

# 两种PMA诱导方案对THP-1巨噬细胞M1和M2亚型相关基因表达的影响

章述军\* 雷青松 李麟 秦波 黄文祥

(重庆医科大学附属第一医院感染科, 重庆市传染病与寄生虫病重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 佛波酯诱导THP-1单核细胞系分化为巨噬细胞的模型广泛被使用, 目前主要使用高、低浓度两种方案, 其是否对M1和M2亚型相关基因的表达有影响鲜有报道。该研究比较了两种常用佛波酯方案对THP-1细胞分化为巨噬细胞及进一步极化为M1和M2亚型过程后相关标志基因的表达情况。结果表明, 高浓度佛波酯方案增强M0细胞白介素-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、诱导型一氧化氮合酶和甘露糖受体C1、转化生长因子- $\beta$ 的表达, 而抑制白介素-10的表达。进一步极化为M1和M2亚型时, 高浓度佛波酯方案主要增强白介素-1 $\beta$ , 而抑制白介素-6对干扰素- $\gamma$ 的应答, 而低浓度方案增强甘露糖受体C1、树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3结合非整合蛋白因子对白介素-4的应答。两种佛波酯方案可诱导THP-1产生不同表型的巨噬细胞以及后续极化亚型, 需根据实验目的选择合适的诱导方案。

**关键词** THP-1; 巨噬细胞; 极化; 佛波酯

## The Effects of Two Different PMA Induction on M1 and M2 Subtypes Related Genes Expression Profile in Differentiation and Polarization of THP-1 Derived Macrophages

Zhang Shujun\*, Lei Qingsong, Li Lin, Qin Bo, Huang Wenxiang

(Chongqing Key Laboratory of Infectious Diseases and Parasitic Diseases, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** THP-1 derived macrophages differentiated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) is the most common model *in vitro* for macrophages associated investigation. However, it is still controversial that how to use PMA in differentiation of THP-1 into macrophages. The present study examined the effects of two popular PMA induction on profile of M1 and M2 subtypes related genes by Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results showed that high concentration induction could enhance the relative expression of interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), inducible nitric oxide synthase (iNOS), mannose receptor C-type 1 (MRC-1) and transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), but suppress interleukin-10 (IL-10) in M0 macrophages compared with low concentration induction. Further, M0 macrophages differentiated by high concentration PMA induction have enhanced IL-1 $\beta$  but weakened response of IL-6 to interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), while low concentration PMA induction enhanced response of both MRC-1 and DC-SIGN to interleukin-4 (IL-4). The results indicated that higher and lower concentration PMA inductions generated different phenotypes of THP-1 derived macrophages and polarized subtypes. Therefore, it is

收稿日期: 2016-12-23 接受日期: 2017-03-24

国家自然科学基金(批准号: 81300317)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-89012430, E-mail: zsj800809@163.com

Received: December 23, 2016 Accepted: March 24, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81300317)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89012430, E-mail: zsj800809@163.com

网络出版时间: 2017-05-18 17:36:35 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170518.1736.016.html>

necessary to optimize PMA induction according to the goal and genes involved in specific experiments.

**Keywords** THP-1; macrophages; polarization; PMA

巨噬细胞是连接人体天然免疫和特异性免疫的重要免疫细胞,广泛分布于人体多种组织器官,在许多感染及非感染性疾病中起着重要的作用。巨噬细胞可随着局部微环境的改变而活化为多种具有不同功能的亚型。巨噬细胞不同亚型具有显著不同的病理生理功能,其机制研究对于我们揭示疾病的发生、发展具有重要意义。目前,获取实验所需的巨噬细胞有三种方式:(1)直接从动物或人体标本获取原代巨噬细胞;(2)使用集落刺激因子诱导原代单核细胞分化为巨噬细胞;(3)使用传代细胞系(包括需使用刺激因子进行分化的单核细胞系)。虽然直接使用原代巨噬细胞和单核细胞更接近生理状态,但由于动物或人体原代细胞的获取困难、体外生存周期短,加之费用昂贵和个体间差异难以控制,因此,使用传代巨噬细胞系或诱导单核细胞系分化为巨噬细胞仍是目前获取巨噬细胞的主要途径。但不同的分化诱导方法对分化形成的巨噬细胞的特性影响较大。

THP-1细胞是一种人白血病细胞来源的单核细胞系,佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)刺激后能够获得类似于原代巨噬细胞的表型和功能特征<sup>[1-2]</sup>,是目前使用最为广泛的人源巨噬细胞体外模型。在PMA诱导其分化为巨噬细胞的基础上,进一步以干扰素- $\gamma$ (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ )、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、白介素-4(interleukin-4, IL-4)、白介素-13(IL-13)等诱导极化为M1和M2亚型,以研究亚型功能<sup>[3]</sup>。但已有研究表明,不同PMA诱导方案会导致对LPS所介导的炎症反应产生影响<sup>[4]</sup>,部分学者主张使用低浓度(5~20 ng/mL)长时间诱导,另一部分学者则建议使用高浓度(50~100 ng/mL)短时间刺激后更换为不含PMA的培养基使其静息一段时间后再给予后续刺激。但两种方案对其进一步极化为相关亚型(如M1和M2亚型)是否有影响并没有相关报道。因此,本研究比较了目前广泛使用的两种PMA诱导方案对于THP-1来源巨噬细胞分化中M1和M2亚型相关基因的影响。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

人THP-1细胞系(ATCC number: TIB-2020)和

胎牛血清(ATCC number: 30-2020)购自美国ATCC。RPMI1640培养基(Cat. No.11835055)、 $\beta$ -巯基乙醇(31350010)、重组人IFN- $\gamma$ (PHC4031)及IL-4(PHC0045)均购自Gibco公司。PMA购自Sigma公司(P1585)。荧光定量PCR采用iQ Sybr Green Supermix试剂盒,购自Bio-Rad公司(170-8882)。

### 1.2 细胞及培养

用于实验的THP-1细胞不超过20代,生长密度不超过 $1 \times 10^6$ /mL。在37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下,细胞培养于含10%胎牛血清和50  $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇的RPMI1640培养基中。

### 1.3 THP-1巨噬细胞的分化及极化

当给予5 ng/mL PMA刺激THP-1细胞48 h,仅能诱导约60%的细胞贴壁,而10 ng/mL浓度可使95%以上的细胞贴壁,因此选择低浓度为10 ng/mL。两种方案分别为:(1)以PMA(10 ng/mL, 16 nmol/L)持续刺激72 h;(2)或以PMA(100 ng/mL, 160 nmol/L)刺激24 h后以无菌PBS淋洗2次后更换为不含PMA的完全培养基继续培养48 h。下文简称为10 ng/mL(低浓度PMA)方案和100 ng/mL(高浓度PMA)方案,图表中以10 ng/mL和100 ng/mL表示。对于PMA诱导后的巨噬细胞,继续以IFN- $\gamma$ (50 ng/mL)刺激24 h诱导其向M1亚型极化,以IL-4(40 ng/mL)刺激24 h诱导其向M2亚型极化,下文分别简称为M0、M1和M2细胞。

### 1.4 荧光定量PCR

待细胞诱导完成后,以PBS淋洗2次,以Trizol法提取总RNA,以ABI cDNA合成试剂盒合成cDNA,保存于-20 °C备用。选用不同亚型巨噬细胞发挥主要生物功能的基因作为目标基因,引物序列见表1,上样量为每20  $\mu$ L体系中加入600 ng cDNA。扩增条件为:95 °C预变性5 min;95 °C变性10 s,58 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,共40个循环;以GAPDH作为参考基因进行表达量的标准化。每次实验每个待测样本设置3个复孔,所得3个CT值之间相差小于或等于0.5认为实验成功,纳入统计,如大于0.5认为实验失败,不纳入统计,再次重复。

### 1.5 统计学分析

所有实验均独立重复3次,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,使用SigmaPlot 11.0进行统计分析,两组间

表1 荧光定量PCR所使用引物序列  
Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

目标基因 Target genes	正义引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	反义引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')
<i>TNF-α</i>	GAG GCC AAG CCC TGG TAT G	CGG GCC GAT TGA TCT CAG C
<i>IL-6</i>	ACT CAC CTC TTC AGA ACG AAT TG	CCA TCT TTG GAA GGT TCA GGT TG
<i>IL-1β</i>	ATG ATG GCT TAT TAC AGT GGC AA	GTC GGA GAT TCG TAG CTG GA
<i>iNOS</i>	TTC AGT ATC ACA ACC TCA GCA AG	TGG ACC TGC AAG TTA AAA TCC C
<i>IL-10</i>	GAC TTT AAG GGT TAC CTG GGT TG	TCA CAT GCG CCT TGA TGT CTG
<i>MRC-1</i>	TAC CCC TGC TCC TGG TTT TT	CAG CGC TTG TGA TCT TCA TT
<i>DC-SIGN</i>	TCA AGC AGT ATT GGA ACA GAG GA	CAG GAG GCT GCG GAC TTT TT
<i>TGF-β</i>	CTA ATG GTG GAA ACC CAC AAC G	TAT CGC CAG GAA TTG TTG CTG
<i>SOCS1</i>	CAC GCA CTT CCG CAC ATT C	TAA GGG CGA AAA AGC AGT TCC
<i>GAPDH</i>	TGT GGG CAT CAA TGG ATT TGG	ACA CCA TGT ATT CCG GGT CAA T

比较采用Student's *t*检验,  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同PMA诱导方案对巨噬细胞相关标志基因表达的影响

图1显示, 使用PMA诱导THP-1细胞分化为M0时, 相较于10 ng/mL方案, 100 ng/mL方案能够显著上调M1亚型相关基因*IL-1β*(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 1.27±0.25倍vs 55.27±23.30倍,  $P < 0.05$ )、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, *TNF-α*)(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 1.05±0.23倍vs 1.67±0.25倍,  $P < 0.05$ )、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, *iNOS*)(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 0.93±0.28倍vs 4.99±1.38倍,  $P < 0.01$ ), 以及M2亚型相关基因甘露糖受体C-1(mannose receptor C type-1, *MRC-1*)(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 1.07±0.14倍vs 2.12±0.42倍,  $P < 0.05$ )和转化生长因子-β(transforming growth factor-beta, *TGF-β*)(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 0.98±0.19倍vs 2.17±0.54倍,  $P < 0.05$ )的表达, 下调*IL-10*(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 0.98±0.18倍vs 0.38±0.09倍,  $P < 0.01$ )的表达。

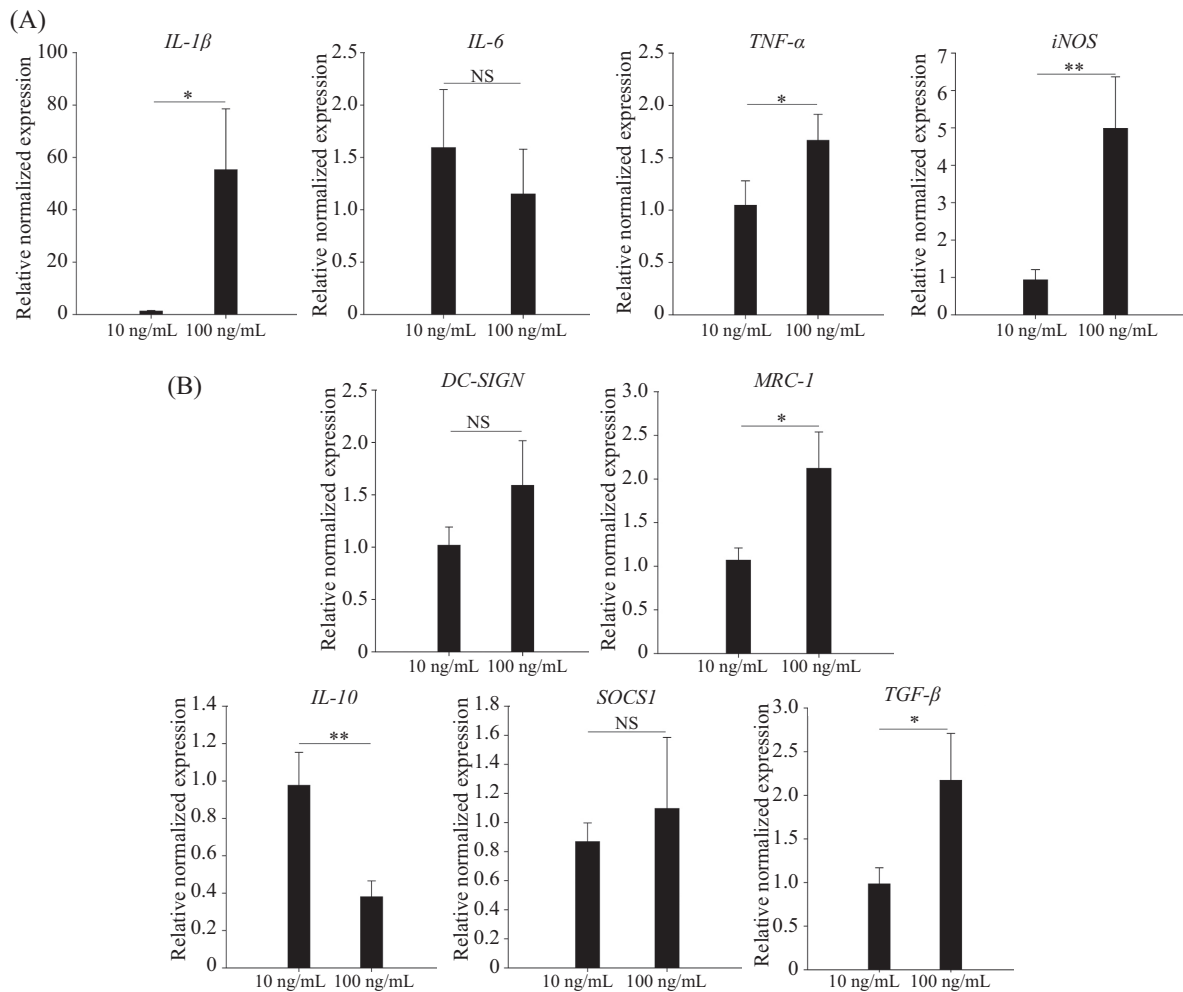
### 2.2 不同PMA方案诱导所获M0巨噬细胞对IFN-γ的应答反应

上述结果提示, 高、低浓度PMA两种方案在诱导THP-1单核细胞分化为M0巨噬细胞后, 部分M1和M2亚型相关基因已经存在显著差异。随后, 给予IFN-γ(50 ng/mL)诱导极化为M1亚型巨噬细胞, 观察不同方案PMA诱导分化形成的M0巨噬细胞对IFN-γ的应答反应的差异。结果显示, 相对于两种

方案所获M0巨噬细胞, IFN-γ可显著上调*IL-6*的表达, 但10 ng/mL组M0巨噬细胞的应答显著强于100 ng/mL组(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 92.72±15.16倍vs 58.25±16.85倍)(图2)。虽然IFN-γ也能显著上调两种PMA方案所获M0巨噬细胞中*TNF-α*的表达, 但在两种PMA方案中并没有显著差异(10 ng/mL vs 100 ng/mL: 5.39±1.46倍vs 4.50±0.69倍,  $P = 0.388$ )。而对于*IL-1β*, 100 ng/mL PMA诱导所获M0巨噬细胞在给与IFN-γ极化后, 能够获得显著的应答反应(M0 vs M1: 0.89±0.38倍vs 3.35±0.33倍,  $P = 0.001$ ), 而10 ng/mL PMA诱导所获M0巨噬细胞虽然有一定程度的升高, 但差异无统计学意义(M0 vs M1: 1.27±0.25倍vs 2.18±0.61倍,  $P = 0.075$ )。在PMA诱导THP-1形成的M0巨噬细胞, 无论低浓度方案或高浓度方案, 使用IFN-γ都不能诱导*iNOS*表达上调。

### 2.3 不同PMA方案诱导所获M0巨噬细胞对IL-4的应答反应

对两种PMA诱导方案所获M0巨噬细胞, 使用IL-4(40 ng/mL)诱导24 h极化为M2亚型后, 分析M2亚型巨噬细胞相关基因的表达, 并分别与各自M0巨噬细胞比较计算倍数变化。如图3所示, 两种PMA方案诱导所获的M0巨噬细胞中树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合非整合蛋白因子(dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, *DC-SIGN*)、*MRC-1*、细胞因子信号传导抑制蛋白-1(suppressor of cytokine signaling-1, *SOCS-1*)的基因表达对于IL-4具有良好应答反应, 而IL-10和TGF-β均不能被IL-4诱导生成。但对于DC-SIGN和MRC-1, 10 ng/mL PMA方案所获M0巨噬细胞接受



A: M1亚型相关基因; B: M2亚型相关基因。10 ng/mL和100 ng/mL指诱导THP-1单核细胞分化为M0巨噬细胞过程所使用的PMA浓度。数据以均值±标准差表示( $n=3$ )。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与10 ng/mL方案组比较; NS: 无统计学意义。

A: M1 subtype related genes; B: M2 subtype related genes. 10 ng/mL and 100 ng/mL refer to the concentration of PMA used for THP-1 differentiation into M0 macrophages. Data is represented as mean±S.D. ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared to the 10 ng/mL group; NS: no statistical significance.

图1 两种PMA方案诱导THP-1分化为M0巨噬细胞后相关基因表达的变化

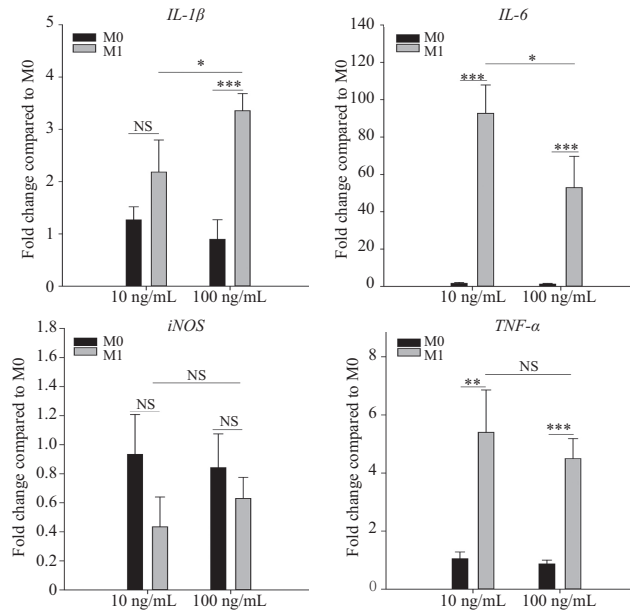
Fig.1 The change of the related genes expression in M0 macrophages induced by two PMA methods

IL-4刺激后MRC-1上调了 $3.58\pm 0.02$ 倍, 显著高于100 ng/mL PMA方案的 $2.34\pm 0.001$ 倍, 差异有统计学意义( $P=0.004$ )。MRC-1也呈现类似的情况, 在10 ng/mL PMA方案中M2亚型巨噬细胞较M0升高了 $6.42\pm 0.87$ 倍, 显著高于100 ng/mL PMA方案的 $2.76\pm 0.37$ 倍,  $P=0.003$ 。而SOCS-1对于IL-4的应答中在两种PMA方案中无显著差异(10 ng/mL vs 100 ng/mL:  $6.09\pm 3.24$ 倍 vs  $6.45\pm 2.42$ 倍,  $P>0.05$ )。

### 3 讨论

既往, 将高水平分泌促炎因子、促进Th1应答的巨噬细胞亚群称为M1亚型, 而将以抗寄生虫免疫、促进组织修复和肿瘤侵袭的亚群称为M2亚型<sup>[5]</sup>。该概念的产生源于上世纪90年代初, 来自于牛津大

学和麻省波士顿儿童医院的科学家观察到IL-4激活的巨噬细胞呈现与IFN- $\gamma$ 激活巨噬细胞不同的基因表达谱<sup>[6]</sup>。2000年, Mills等<sup>[7]</sup>发现, 来源于不同小鼠种属(Th1和Th2株)的巨噬细胞对于某些刺激甚至具有相反的应答, 由此将其命名为M1和M2。然而, 随着巨噬细胞研究的不断深入, 研究者发现, 许多其他信号通路激活的巨噬细胞很难被划分至上述两个亚型<sup>[8]</sup>。因此, Murray等<sup>[9]</sup>于2014年发表了关于巨噬细胞活化的命名及实验指南, 建议按照巨噬细胞活化的刺激因素命名, 根据不同的实验目的选择合适的刺激因子。本研究选取了最常用的由IFN- $\gamma$ 和IL-4诱导的M1、M2亚型作为研究对象, 其他相关刺激因子如IL-13、LPS联合INF- $\gamma$ 等诱导的亚型则需要更多数据。

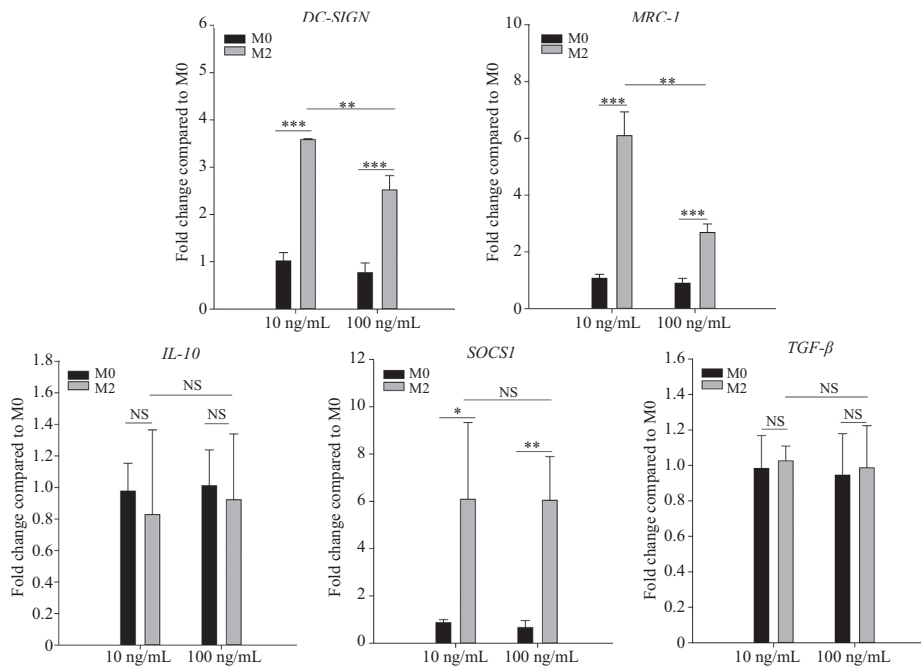


给予IFN- $\gamma$ (50 ng/mL)极化M0巨噬细胞24 h为M1亚型巨噬细胞, 检测M1亚型相关标志基因并分别与各自M0巨噬细胞比较, 计算倍数变化。10 ng/mL和100 ng/mL指诱导THP-1形成M0巨噬细胞过程中所使用的PMA浓度。数据以均值 $\pm$ 标准差表示( $n=3$ )。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; NS: 无统计学意义。

After differentiation into M0 macrophages, cells were polarized into M1 subtype with IFN- $\gamma$  (50 ng/mL) for 24 h. Then, fold change of M1 subtype related genes compared to M0 macrophages of each group was examined. 10 ng/mL and 100 ng/mL refer to the concentration of PMA used for THP-1 differentiation into M0 macrophages. Data is represented as mean $\pm$ S.D. ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . NS: no statistical significance.

图2 不同PMA方案诱导所获M0巨噬细胞对IFN- $\gamma$ 的应答反应

Fig.2 IFN- $\gamma$  stimulates M0 macrophages induced by two PMA methods



给予IL-4(40 ng/mL)极化M0巨噬细胞24 h为M2亚型巨噬细胞, 检测M2亚型相关标志基因, 并分别与各组M0巨噬细胞比较计算倍数变化。10 ng/mL和100 ng/mL指诱导THP-1形成M0巨噬细胞过程中所使用的PMA浓度。数据以均值 $\pm$ 标准差表示( $n=3$ )。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; NS: 无统计学意义。

After differentiation into M0 macrophages, cells were polarized into M2 subtype macrophages with IL-4 (40 ng/mL) for 24 h. Then, fold change of M2 subtype related genes compared to M0 macrophages of each group were examined. 10 ng/mL and 100 ng/mL refer to the concentration of PMA used for THP-1 differentiation into M0 macrophages. Data is represented as mean $\pm$ S.D. ( $n=3$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ; NS: no statistical significance.

图3 不同PMA方案诱导所获M0巨噬细胞对IL-4的应答反应

Fig.3 IL-4 stimulates M0 macrophages induced by two PMA methods

多种化合物包括DMSO、PMA、丁酸钠(sodium butyrate)、六亚甲基双乙酰胺(hexamethylene bisacetamide)和糖皮质激素(glucocorticoid)等均可诱导鼠及人白血病细胞分化成熟。其中, PMA由于其多效性, 可激活多条信号通路包括蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、核因子-kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)、磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(phosphatidylinositol 3 kinase/serine-threonine kinase, PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等<sup>[10-12]</sup>, 既能诱导肿瘤细胞分化, 也能诱导正常细胞分化<sup>[1]</sup>。已有研究证实, 5 ng/mL PMA即可诱导THP-1单核细胞分化成巨噬细胞并具备对LPS的良好应答反应性。由于实验室间的差异, 本研究在使用5 ng/mL PMA 48 h仅能使得约60%的THP-1细胞贴壁, 故选择了能够诱导95% THP-1分化贴壁的10 ng/mL作为低浓度方案。

既往相关报道发现, PMA浓度逐渐升高能够促进部分细胞因子如IL-1 $\beta$ 、IL-8和TNF- $\alpha$ 等的表达<sup>[13]</sup>。因此, 许多研究者认为, PMA使用浓度越高, 分化形成的巨噬细胞越倾向于M1亚型<sup>[14]</sup>。也有部分研究者发现, 使用低浓度PMA所获的M0巨噬细胞能够对IL-10, 或联合使用IFN- $\gamma$ 加LPS产生更好的应答<sup>[15]</sup>, 包括TNF- $\alpha$ 。然而, 被广泛接受为M1和M2亚型巨噬细胞诱导剂的IFN- $\gamma$ 和IL-4, 并没有不同PMA方案对于其诱导的M1和M2亚型标志基因影响的研究报道, 尤其是M2亚型巨噬细胞相关基因。同Park等<sup>[13]</sup>观察到的结果一致, 本研究发现, 在THP-1细胞中, 高浓度PMA相较于低浓度PMA方案, 能够显著增强M0巨噬细胞IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和*iNOS*等与M1亚型巨噬细胞功能和分化相关的基因表达, 但同样诱导M2亚型相关基因*MRC-1*和*TGF- $\beta$* 的上调, 同时抑制*IL-10*的表达。因此, 不能认为使用PMA浓度越高, 所获得的巨噬细胞越倾向于M1亚型。

此外, 高浓度PMA方案在显著上调M0巨噬细胞*IL-1 $\beta$* 表达的同时, 还可进一步增强巨噬细胞*IL-1 $\beta$* 基因对IFN- $\gamma$ 的应答反应, 对于炎症体尤其涉及IL-1 $\beta$ 的研究具有较大的影响, 需要特别关注, 必要时需针对实验室所保存的细胞株和试剂进行进一步优化。而在IFN- $\gamma$ 诱导TNF- $\alpha$ 时, 不同于Maess等<sup>[15]</sup>观察到低浓度PMA(10 ng/mL)较高浓度(100 ng/mL)分化所获得的巨噬细胞对IFN- $\gamma$ 联合LPS具有更强的应答, 本研究

中单独使用IFN- $\gamma$ 诱导TNF- $\alpha$ 的上升倍数在高、低浓度PMA组间并没有差异, 这可能是由于PMA本身可激活NF- $\kappa$ B通路, 而LPS也通过TLR4(toll-like receptor 4)激活NF- $\kappa$ B上调细胞因子的表达, 当NF- $\kappa$ B已经被PMA部分激活后, 再给予LPS刺激时, 所获得的应答会有所减弱<sup>[16]</sup>。因此, 使用低浓度PMA诱导分化的巨噬细胞可能较高浓度PMA所获巨噬细胞对IFN- $\gamma$ 联合LPS有更好的反应性, 而单独使用IFN- $\gamma$ 主要激活Janus蛋白酪氨酸激酶/信号转导和转录激活因子(Janus protein tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)通路, 因而表现出高、低浓度组之间没有差别。此外, 值得注意的是*iNOS*基因, 它能诱导NO的产生, 对巨噬细胞发挥促炎、抗感染作用极为重要。本研究发现, 虽然高浓度PMA方案较低浓度方案能够增强其表达, 但两种方案中进一步使用IFN- $\gamma$ 诱导THP-1来源巨噬细胞形成M1亚型的过程中, 均不能进一步增强其表达。这与以前的报道也是符合的, 在部分人源巨噬细胞中, *iNOS*并不宜作为单独使用IFN- $\gamma$ 诱导M1亚型巨噬细胞分化的标志基因<sup>[17]</sup>。

*MRC-1*和*DC-SIGN*是表达于巨噬细胞、树突状细胞等表面的受体, 被认为是巨噬细胞M2亚型的标志性基因, 两者在吞噬、抗原提呈、抗炎等多种功能中起作用, 且均受IL-4调控<sup>[18-19]</sup>。本研究发现, 高浓度PMA方案可增强M0巨噬细胞*MRC-1*的表达量, 对*DC-SIGN*无影响, 但却显著抑制了两者对IL-4的应答, 可能与PMA与IL-4涉及的信号转导通路及下游转录因子间的相互作用有关。本研究发现, PMA虽然对M0巨噬细胞*IL-10*和*TGF- $\beta$* 的表达均有显著影响, 但在使用IL-4极化时, *IL-10*和*TGF- $\beta$* 相较于M0并无显著升高。既往也有学者发现, 联合使用IL-4和IL-13诱导THP-1巨噬细胞24 h, *IL-10*无显著升高<sup>[3]</sup>。上述两个基因是M2亚型发挥抗炎和促进肿瘤生长的重要分子, 因此, 使用IL-4极化的THP-1巨噬细胞M2亚型可能并不适宜作为需依赖IL-10和*TGF- $\beta$* 发挥功能的细胞模型。

本研究显示, 两种PMA方案可同时影响THP-1来源的M0巨噬细胞的部分M1和M2亚型相关基因的表达, 而并非向某一亚型偏倚。高浓度PMA方案不但增强M0巨噬细胞M1亚型相关基因*IL-1 $\beta$* 、TNF- $\alpha$ 和*iNOS*的表达, 也对M2亚型相关基因如*MRC-1*、*TGF- $\beta$* 的表达有上调作用。对于IFN- $\gamma$ 的应

答反应, 不同的M1亚型相关基因受PMA影响不一, 高浓度PMA在上调M0巨噬细胞*IL-1 $\beta$* 表达的同时, 更进一步增强其对IFN- $\gamma$ 的应答, 而对*IL-6*表现出抑制作用。对于IL-4的应答, 相较于低浓度PMA方案, 高浓度PMA对IL-4介导的*MRC-1*、*DC-SIGN*表达上调都呈现出一定抑制作用, 而对*SOCS-1*无影响。两种PMA方案诱导的巨噬细胞在表型上存在一定差异, 需根据具体实验目的及涉及的靶分子进行选择。

### 参考文献 (References)

- 1 Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, *et al.* Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982; 42(4): 1530-6.
- 2 Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26(2): 171-6.
- 3 Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* 2015; 15: 577.
- 4 Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods* 2016; 430: 64-70.
- 5 Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787-95.
- 6 Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992; 176(1): 287-92.
- 7 Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164(12): 6166-73.
- 8 Joshi S, Singh AR, Zulcic M, Bao L, Messer K, Ideker T, *et al.* Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation *in vivo*. *PLoS One* 2014; 9(4): e95893.
- 9 Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, *et al.* Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; 41(1): 14-20.
- 10 Zeng C, Wang W, Yu X, Yang L, Chen S, Li Y. Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Sci China Life Sci* 2015; 58(12): 1282-7.
- 11 Richter E, Ventz K, Harms M, Mostertz J, Hochgrafe F. Induction of macrophage function in human THP-1 cells is associated with rewiring of MAPK signaling and activation of MAP3K7 (TAK1) protein kinase. *Front Cell Dev Biol* 2016; 4: 21.
- 12 Kang CD, Lee BK, Kim KW, Kim CM, Kim SH, Chung BS. Signaling mechanism of PMA-induced differentiation of K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221(1): 95-100.
- 13 Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res* 2007; 56(1): 45-50.
- 14 Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HF, Wichers HJ. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct* 2013; 4(2): 266-76.
- 15 Maess MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods* 2014; 402(1/2): 76-81.
- 16 Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 2007; 447(7147): 972-8.
- 17 Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol* 2015; 36(3): 161-78.
- 18 Gazi U, Martinez-Pomares L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 2009; 214(7): 554-61.
- 19 Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol* 2013; 34(10): 482-6.