

巨噬细胞炎症状态与过氧化物酶体增殖的相关性研究

乔彩霞 郑诚 汪吟杰 蔡婷婷 尹亚军* 张瑾*

(嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314001)

摘要 肥胖引起巨噬细胞浸润机体组织, 诱发慢性低度炎症反应, 是形成胰岛素抵抗的重要因素。因此研究影响巨噬细胞炎症状态的因素, 有助于深入了解胰岛素抵抗的形成机理。该文通过免疫荧光、Real-time PCR等技术, 研究巨噬细胞炎症状态与胞内过氧化物酶体数量之间的关系。结果表明, 当巨噬细胞极化为炎症状态的M1型, 胞内过氧化物酶体数量变化不显著; 当巨噬细胞极化为抗炎状态的M2型, 胞内过氧化物酶体数量显著升高。当饱和脂肪酸诱导巨噬细胞极化为炎症状态的类M1型, 胞内过氧化物酶体数量变化不显著; 当不饱和脂肪酸诱导的抗炎状态的类M2型, 胞内过氧化物酶体数量显著升高。此外, 使用过氧化物酶体增殖缺陷型(*Pex3*^{-/-})巨噬细胞重复上述实验, 也可以极化为M2/类M2型, 呈现抗炎状态, 但胞内过氧化物酶体数量无显著变化。综上所述, 该研究发现巨噬细胞M2/类M2型极化能够诱导胞内过氧化物酶体增殖, 但过氧化物酶体增殖不是M2/类M2型极化的必要条件。

关键词 巨噬细胞; 过氧化物酶体; 极化; 脂肪酸

The Relationship between Macrophages Inflammation and Peroxisome Proliferation

Qiao Caixia, Zheng Cheng, Wang Yinjie, Cai Tingting, Yin Yajun*, Zhang Jin*

(College of Biological and Chemical Science and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China)

Abstract Obesity-induced macrophage infiltration into the tissues could lead to chronic low-grade inflammatory or even insulin resistance. Identifying factors that influence the macrophage inflammatory state would thus shed lights on the pathogenesis of insulin resistance. In this study, we investigated the relationship between macrophage inflammatory status and the number of peroxisomes on three sets of systems using techniques including immunofluorescence and Real-time PCR. Results showed that when macrophages polarized to M1 (pro-inflammatory), the number of peroxisome did not change significantly, while macrophages polarized to M2 (anti-inflammatory), the number of peroxisome increased significantly. These unexpected results were also observed when macrophages polarized in the presence of fatty acids. No significant peroxisome proliferation was observed when macrophages polarized to M1-like by the stimulation of saturated fatty acids, yet peroxisome proliferated significantly when macrophages polarized to M2-like by the stimulation of unsaturated fatty acids. The last set of experiments was carried out on *Pex3*^{-/-} macrophages, where the peroxisome proliferation was restrained. *Pex3*^{-/-} macrophages could still po-

收稿日期: 2018-11-13 接受日期: 2019-04-24

浙江省新苗人才计划立项项目(批准号: 2018R417008)、浙江省自然科学基金(批准号: LY17C170003)、河北省杰出青年基金(批准号: C2014407083)和河北省出国留学人员资助项目(批准号: C2015003030)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18458395251, E-mail: y928430500@sina.com; Tel: 13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com

Received: November 13, 2018 Accepted: April 24, 2019

This work was supported by the New Talents Program of Zhejiang province (Grant No.2018R417008), Zhejiang Natural Scientific Foundation (Grant No.LY17C170003), Hebei Natural Scientific Foundation for Distinguished Young Scientists (Grant No.C2014407083) and Scientific Research Foundation of Hebei for Returned Scholars (Grant No.C2015003030)

Corresponding authors. Tel: +86-18458395251, E-mail: y928430500@sina.com; Tel: +86-13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com

网络出版时间: 2019-08-12 15:07:26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1507.024.html>

larize to anti-inflammatory M2/M2-like status, yet without any noticeable peroxisome proliferation. In conclusion, this study indicated that macrophages M1/M1-like polarization does not induce significant peroxisome proliferation, and M2/M2-like polarization could induce peroxisome proliferation under certain conditions.

Keywords macrophage; peroxisome; polarization; fatty acid

巨噬细胞是由骨髓干细胞发育而来的一类高度异质性细胞,是先天性免疫的重要组成部分^[1]。体内环境中不同的信号物质,可以激活巨噬细胞呈现不同的状态,发挥迥异的生理功能。近年的研究确定了巨噬细胞极化的两种类型: M1型和M2型。M1型被称作经典途径激活的巨噬细胞,其胞内的炎症标志基因如诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)表达量增加,并且能够分泌大量的促炎因子如白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)等。M1型巨噬细胞在急性促炎反应、清除入侵病原体和坏死细胞碎片中发挥重要作用。M2型巨噬细胞被称作替代性激活的巨噬细胞,胞内的抗炎标志基因如I型精氨酸酶(arginase1, Arg1)和I型甘露糖受体C(mannose receptor C-type 1, MRC1)等表达水平增加,并能够分泌大量的抗炎因子如白细胞介素10(interleukin 10, IL-10)等,而M2型巨噬细胞在组织修复、伤口愈合等病理过程中发挥重要作用^[2]。在体外实验中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)的组合,能诱导巨噬细胞极化为M1型;而白细胞介素4(interleukin 4, IL-4)能够诱导巨噬细胞极化为M2型。M1和M2型是巨噬细胞处于炎症或抗炎的极端状态,而体内的大多数巨噬细胞处于M1与M2之间的各种亚型,为了便于研究,学者将接近M1型(或M2型),但又没有完全实现极化的巨噬细胞称为类M1型(或类M2型)^[3]。巨噬细胞的极化被学者关注已久,其细胞表面标志分子、相关信号通路及与生理功能密切相关的功能基因均已被大量报道^[4]。近年来发现,过度脂肪沉积会招募巨噬细胞浸润机体的肝脏、肌肉和脂肪等组织,并诱发巨噬细胞极化为M1型(或类M1型),进而分泌炎症因子,引起慢性低度炎症反应,这与机体发生胰岛素抵抗具有密切相关性^[5]。研究表明,“不良营养”的摄入是造成体内巨噬细胞极化为M1型的主要原因^[6]。本课题组前期研究也印证了此观点: 碳链长度不同的4种饱和脂肪酸能够诱发巨噬

细胞发生类M1型极化,碳链长度不同的4种不饱和脂肪酸能诱发巨噬细胞发生类M2型极化,但相关分子机制还有待深入研究。

过氧化物酶体是真核细胞中的一种细胞器,外部由单层膜包裹,内部有多种代谢酶类,其主要功能是参与极长链脂肪酸的代谢、清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)等^[7]。过氧化物酶体由多种蛋白组成,其中Pex3是过氧化物酶体生物合成因子3,是参与过氧化物酶体生物合成的膜锚定蛋白^[8],当其缺失后,过氧化物酶体增殖受阻^[9]; Pex14是过氧化物酶体膜蛋白,也可通过对其进行荧光标记实现过氧化物酶体计数^[9]。在胞内,过氧化物酶体具有高度动态、代谢活跃等特点,其数量与大小会随着细胞的状态变化而变化,进而影响细胞的代谢和生理功能。但关于过氧化物酶体增殖与细胞功能相关性的研究鲜见报道,与巨噬细胞的极化相关性研究尚无报道。

本研究利用Pex3^{-/-}和野生型小鼠的骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage)原代培养,进行极化诱导,研究巨噬细胞极化与过氧化物酶体数量的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所使用6周龄C57BL/6J雄性小鼠均为SPF级别,野生型(WT)小鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,本实验室扩繁,Pex3缺失(Pex3^{-/-})小鼠由苏州大学-剑桥基因组中心负责构建。

本实验所有小鼠饲养于嘉兴学院医学院实验动物中心(SPF级)饲养环境。所有动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定,并已通过嘉兴学院医学院动物实验及实验动物伦理委员会审查批准。

1.2 试剂及仪器

4种脂肪酸(表1)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)均购于美国Sigma公司; R/MINI 1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、非必需氨基酸均购于美国Gibco公司; β -巯基乙醇购于英国Amresco公

表1 本研究使用的饱和/不饱和脂肪酸

Table 1 Saturated/unsaturated fatty acids used in this study

脂肪酸 Fatty acids	类型 Type	C链长度 Carbon chain length
PA	Saturated	16:0
LA	Saturated	24:0
PO	Unsaturated	16:1
DHA	Unsaturated	22:6 (ω -3)

PA: 棕榈酸; LA: 二十四烷酸; PO: 棕榈油酸; DHA: 二十二碳六烯酸。

PA: palmitate acid; LA: lignoceric acid; PO: palmitoleate acid; DHA: docosahexenoic acid.

表2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')
<i>iNOS</i> -F	GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG
<i>iNOS</i> -R	CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC
<i>TNF-α</i> -F	CTT CTC ATT CCT GCT TGT GG
<i>TNF-α</i> -R	GGT CTG GGC CAT AGA ACT GA
<i>ARG</i> -F	CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA G
<i>ARG</i> -R	AGG AGC TGT CAT TAG GGA CAT C
<i>IL10</i> -F	TGC CCA GAA ATC AAG GAG G
<i>IL10</i> -R	CAG CAG ACT CAA TAC ACA CT
<i>PMP70</i> -F	ATG GGA ATA AAC GGG AGA AGC
<i>PMP70</i> -R	GTG AAG GTG GCG AGG GTG T
<i>Abt1</i> -F	CCC CTT CCG TTA TGA CCT GTG
<i>Abt1</i> -R	TGT TGT CCC TGT TCT ACG TTT CG
<i>Cat</i> -F	TTG TTC AGT GAC CGA GGG ATT
<i>Cat</i> -R	GCC CTG GTC GGT CTT GTA ATG

司; 反转录酶SuperScript II购于美国Invitrogen公司; Real-time PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成, 具体信息见表2。

脂肪酸的配制^[6]: 将脂肪酸加入到50%乙醇(200 mM), 加热溶解(50 °C), 制成母液, 使用MEM培养基溶解BSA(无脂肪酸、低内毒素, 10.5%), 脂肪酸溶液加入25×的BSA溶液中, 40 °C搅拌水域振荡, 直形成均一透明溶液(约2 h)。将溶液(脂肪酸:BSA=5:1)分装后保存于-20 °C中。

实验仪器包括: CO₂培养箱(Thermo, USA)、高速冷冻离心机(Sigma, USA)、凝胶成像系统拍照(Bio-Rad, USA)、StepOnePlus™实时荧光定量PCR系统(Thermo, USA)。

1.3 骨髓来源的小鼠巨噬细胞的分离、培养

将3只小鼠(6周龄左右)颈椎脱臼法处死, 取2条后腿, 去除肌肉后, 在膝关节上下位置分别剪断腿骨, 4 °C下12 000 r/min离心10 s收集骨髓细胞; 弃腿骨, 向

沉淀中加入用37 °C预热的R/MINI 1640培养基1 mL, 悬起沉淀, 去除块状组织, 再次4 °C下12 000 r/min离心。弃上清, 用R/MINI 1640培养基(10% FBS, 1%非必需氨基酸, 0.5% β -巯基乙醇, 50 ng/mL M-CSF)培养基重选沉淀、计数, 接种于6孔板中, 每孔细胞数约 1×10^6 。置于5% CO₂、饱和湿度、37 °C的培养箱培养, 每3天换1次培养液, 培养7天后, 添加各种刺激因子。对于需要激光共聚焦显微镜观察的样本, 在培养孔中放置盖玻片, 制备细胞爬片。

1.4 巨噬细胞的极化及细胞形态分析

向获得的巨噬细胞中添加刺激因子, 经48 h诱导极化为M1(50 μ g/mL IFN- γ 和50 μ g/mL LPS)或M2型(10 μ g/mL IL-4)^[6], 收获细胞。用PBS浸洗细胞3次, 每次5 min; 用4%的多聚甲醛固定20 min后, PBS清洗3次, 每次5 min; 加入5 μ g/mL的Phalloidin(绿色荧光)室温染色60 min, 弃染料后, PBS清洗3次, 每次5 min; DAPI染细胞核10 min, 弃染料后, PBS清洗3次, 每次5 min; 吸去多余水分, 盖上盖玻片, 激光共聚焦显微镜下观察极化后的巨噬细胞形态。

1.5 脂肪酸刺激巨噬细胞

将巨噬细胞均匀接种到6孔板中, 当细胞密度达到70%~80%, 分别添加不同脂肪酸, 添加浓度为0.5 mol/L, 以BSA为对照, 5% CO₂的培养箱, 37 °C培养2天后收集细胞。

1.6 过氧化物酶体的计数

取出细胞爬片, 预冷PBS洗3次, 染色主要步骤如下(每步处理后, PBS洗3次): 4%多聚甲醛固定20 min, 0.04% Triton X-100(Invitrogen)通透细胞10 min, 3% BSA封闭1 h, Pex14(1:1 000)抗体(Invitrogen) 4 °C孵育过夜, 二抗孵育3 h(避光), DAPI(1:1 000)染细胞核10 min, 制片, 用激光共聚焦显微镜观察, 选择细胞分散较好的区域, 选定1个细胞, 使用Z-stack收集区域内红斑数量, 排除小于0.1 μ m³斑点, 每张片子取不

同区域20个细胞的平均数, 为该片的细胞内过氧化物酶体的数量。每个样本的数据来自于3只不同小鼠的3个生物学重复。

1.7 Real-time PCR

使用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, 使用 Super-Script II 合成 cDNA。Real-time PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 延伸 20 s, 40 个循环; 72 °C 退火 10 min。内参基因为 *Abt1*, ΔCt 法计算目的基因相对表达丰度。

1.8 数据统计分析

实验重复 3 次, 实验数据以“平均值 \pm 标准误 (mean \pm S.E.M.)”表示。实验数据结果采用 SPSS 17.0 软件进行描述性分析、*t* 检验分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ (mean \pm S.E.M., $n=3$)。 $P<0.05$ 为有显著性差异, $P<0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果

2.1 巨噬细胞的极化对胞内过氧化物酶体数量的影响

从小鼠骨髓分离得到细胞, 经诱导分化后, 贴壁的为巨噬细胞, 培养 7 天后细胞长满培养孔, 再添加巨噬细胞极化试剂, 2 天后极化为 M1 或 M2 型巨噬细胞。通过 Phalloidin 对细胞骨架进行染色, 观察极化后巨噬细胞形态 (图 1A)。与 M0 型 (未极化的巨噬细胞) 相比, M1 型巨噬细胞分枝显著减少, 呈现近球形, 而 M2 型巨噬细胞细胞分枝状增加; 对炎症标志基因表达水平分析发现, M1 型巨噬细胞中 *iNOS* 表达显著上调, *Arg1* 表达水平也有上调, 但幅度远小于 M2 型巨噬细胞的上升水平; M2 型巨噬细胞中 *Arg1* 表达水平显著升高, 而 *iNOS* 表达水平下降 (图 1B), 上述数据说明小鼠骨髓来源的巨噬细胞实现了完全极化。

通过免疫荧光技术对过氧化物酶体膜蛋白 Pex14 进行标记, 通过激光共聚焦显微镜分析巨噬细胞内过氧化物酶体的数量 (图 2A)。与 M0 型巨噬细胞相比, M1 型巨噬细胞内过氧化物酶体数量变化不显著, 而 M2 型巨噬细胞内过氧化物酶体数量显著升高 (图 2B)。利用 Real-time PCR 技术, 对过氧化物酶体标志基因: 过氧化物酶体膜蛋白 70 (peroxisome membrane protein 70, *PMP70*) 和过氧化氢酶 (*Cat*) 的表达水平分析, 与 M0 型巨噬细胞相比, M1 型巨噬细胞无显著变化, 而 M2 型巨噬细胞内表达水平显著升高 (图 2C), 推断巨噬细胞 M2 型极化过程伴随着过氧

化物酶体增殖。

2.2 过氧化物酶体缺失对巨噬细胞极化的影响

为了揭示过氧化物酶体增殖与 M2 型巨噬细胞极化之间的关系, 选用了 *Pex3*^{-/-} 小鼠分离巨噬细胞, 与野生型巨噬细胞相比, *Pex3* 基因被敲除后, 细胞内过氧化物酶体数量减少 (图 3A 和图 3B), 增殖受阻。

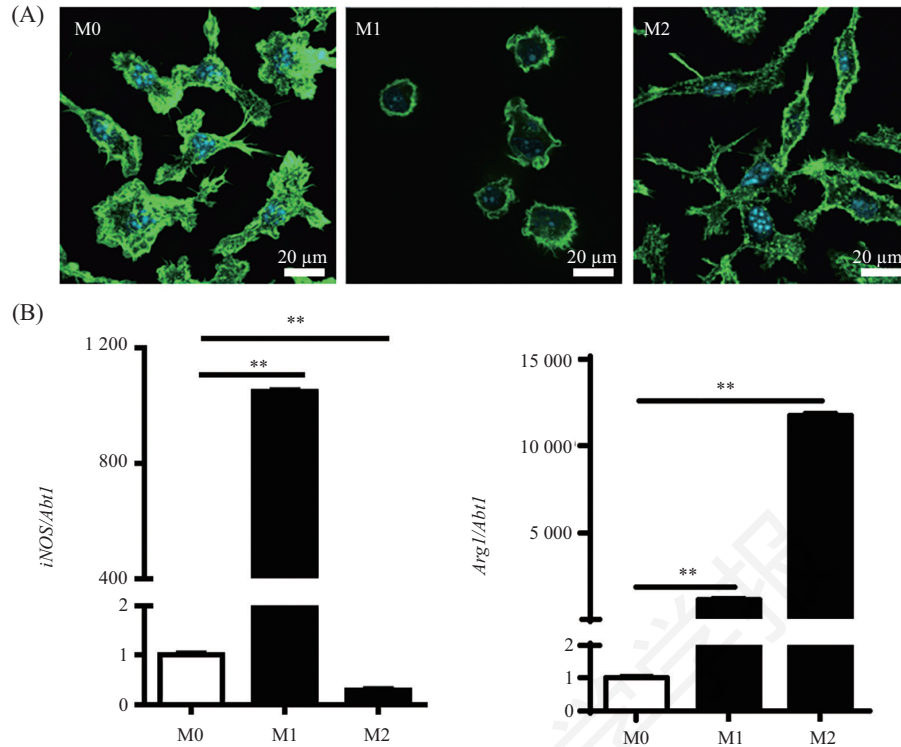
利用极化试剂诱导两种基因型的巨噬细胞分别极化为 M1 和 M2 型, Real-time PCR 分析巨噬细胞极化标志基因的表达水平, 发现 *Pex3*^{-/-} 巨噬细胞的 *iNOS*、*Arg1* 表达水平量与野生型相近, 无显著差异 (图 4A), 说明 *Pex3* 敲除以后并不影响巨噬细胞的极化。对胞内过氧化物酶体数量分析发现, *Pex3*^{-/-} 型巨噬细胞 (M1 和 M2 型) 内, 过氧化物酶体数量均显著低于野生型 (图 4B 和图 4C)。在野生型巨噬细胞中, M2 型巨噬细胞内过氧化物酶体数量显著高于 M1 型, 而在 *Pex3*^{-/-} 型巨噬细胞中, M2 型与 M1 型差异不显著 (图 4C)。上述结果表明, 过氧化物酶体增殖受阻的 *Pex3*^{-/-} 型巨噬细胞也能极化为 M2 型, 推断过氧化物酶体增殖不是 M2 型巨噬细胞极化的必要条件。

2.3 脂肪酸诱导的巨噬细胞极化对过氧化物酶体的影响

鉴于过氧化物酶体参与长链 (22 碳以上) 脂肪酸的降解, 我们选择了 16 碳 (代谢过程无需过氧化物酶体参加) 和 24 碳 (代谢过程需过氧化物酶体参加) 的脂肪酸诱发巨噬细胞发生极化, 分析其对过氧化物酶体数量的影响 (图 5A)。巨噬细胞在用不同脂肪酸处理之后, 与 BSA 对照组对比分析发现: 饱和脂肪酸 (PA、LA) 处理后, 巨噬细胞的炎症因子 *TNF- α* 表达增加, 抗炎因子 *IL-10* 表达水平降低 (图 5B), 细胞处于炎症状态, 其胞内过氧化物酶体数量变化不显著 (图 5C); 而不饱和脂肪酸 (PO、DHA) 处理后, 巨噬细胞的炎症因子 *TNF- α* 表达降低, 抗炎因子 *IL-10* 表达升高 (图 5B), 细胞处于抗炎状态, 胞内过氧化物酶体数量显著增加 (图 5C)。对比不同碳链长度的脂肪酸对巨噬细胞内过氧化物酶体数量的影响, 发现 16 碳的 PA 和 24 碳的 LA 处理无显著差异, 16 碳的 PO 和 22 碳的 DHA 亦然, 推断脂肪酸的碳链长度对过氧化物酶体数量没有显著影响 (图 5C)。

2.4 过氧化物酶体缺失对脂肪酸诱导的巨噬细胞极化的影响

图 6 显示, 为了揭示过氧化物酶体增殖与脂肪酸诱发的巨噬细胞极化之间的关系, 选用了 *Pex3*^{-/-}

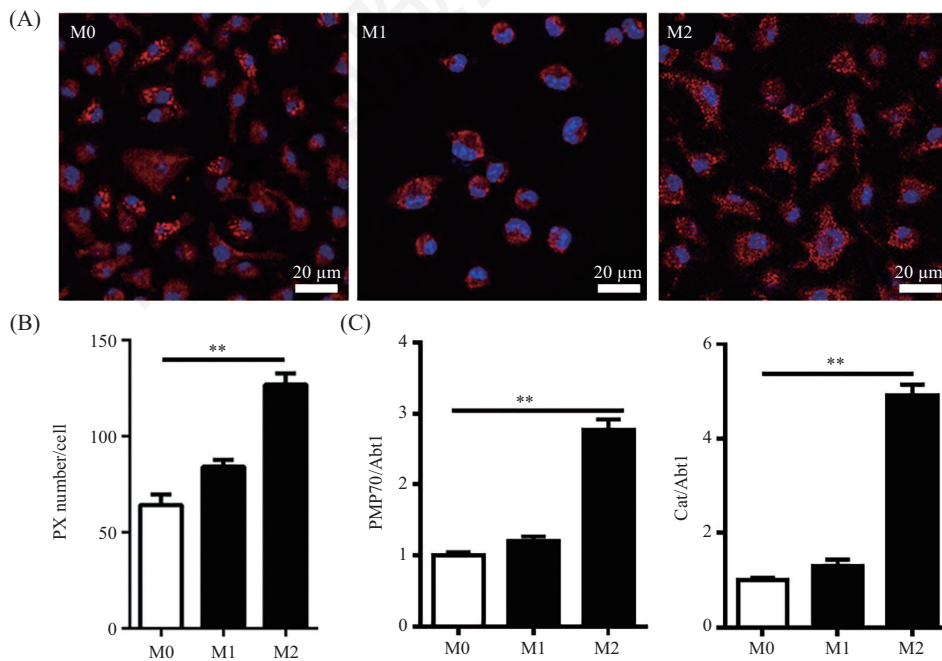


A: 不同亚型巨噬细胞形态。绿色: 细胞骨架; 蓝色: 细胞核。B: 巨噬细胞极化标志基因表达水平。 *t* test, ** $P < 0.01$ 。

A: different subtypes of macrophage morphologies. green: cytoskeleton; blue: nucleus. B: the mRNA expression level of polarized marker in macrophages. *t* test, ** $P < 0.01$.

图1 极化的巨噬细胞

Fig.1 Polarized macrophages

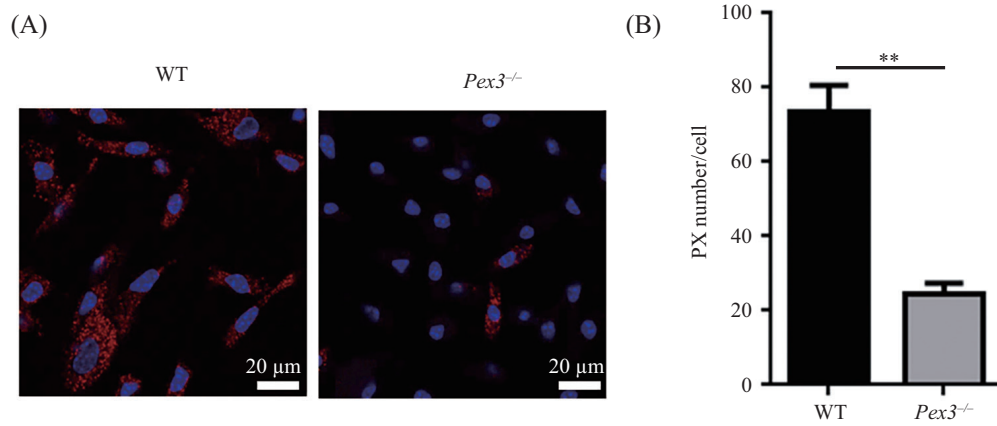


A: 不同亚型巨噬细胞内过氧化物酶体的分布。红色: 过氧化物酶体; 蓝色: 细胞核。B: 巨噬细胞内过氧化物酶体数量。C: 过氧化物酶体标志基因表达水平。 *t* test, ** $P < 0.01$ 。

A: distribution of peroxisomes in different subtypes of macrophage morphologies. red: peroxisomes; blue: nucleus. B: the number of peroxisomes in macrophages. C: the mRNA expression level of peroxisome marker gene. *t* test, ** $P < 0.01$.

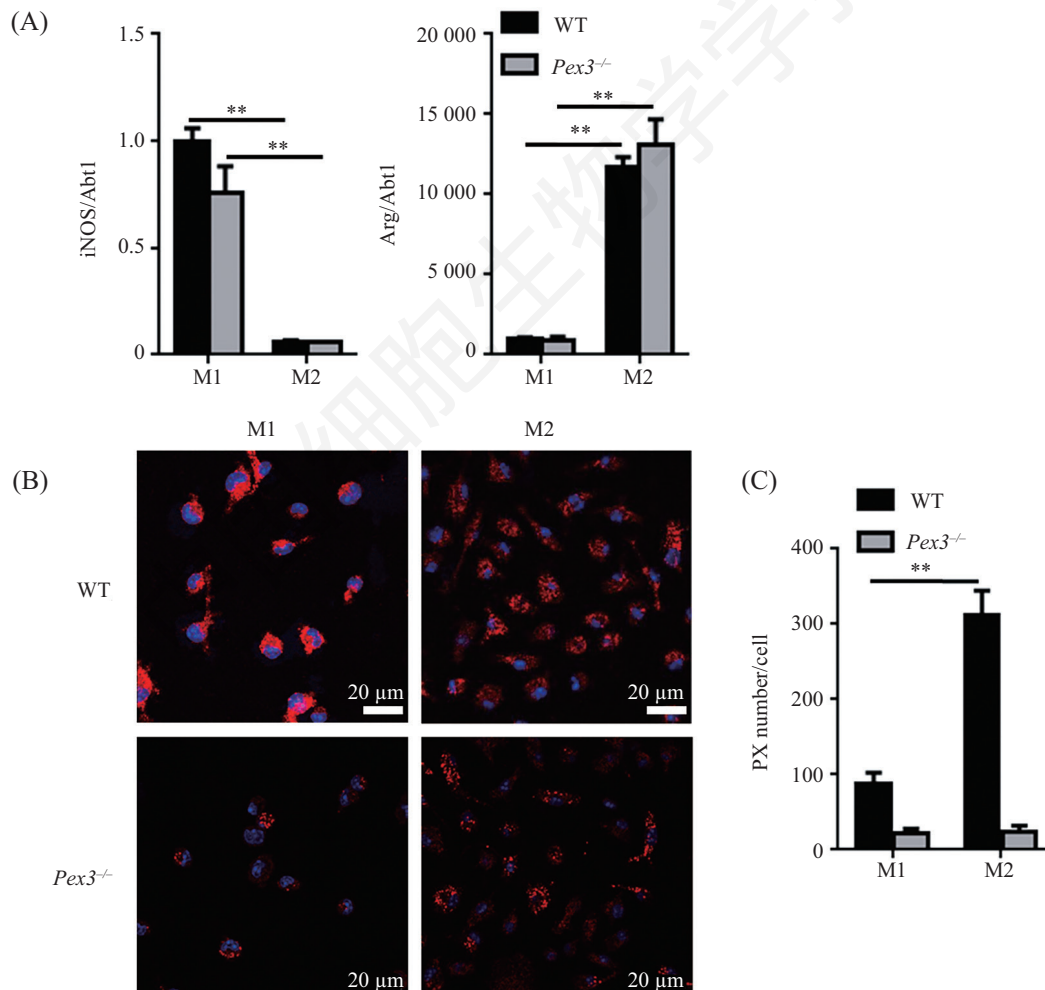
图2 巨噬细胞极化对过氧化物酶体影响

Fig.2 Effects of macrophage polarization on peroxisome



A: 野生型和*Pex3*^{-/-}型的巨噬细胞中的过氧化物酶体。红色: 过氧化物酶体; 蓝色: 细胞核。B: 过氧化物酶体的数量, *t* test, ***P*<0.01。
A: peroxisomes in WT and *Pex3*^{-/-} macrophages. red: peroxisomes; blue: nucleus. B: the number of peroxisomes in macrophages, *t* test, ***P*<0.01.

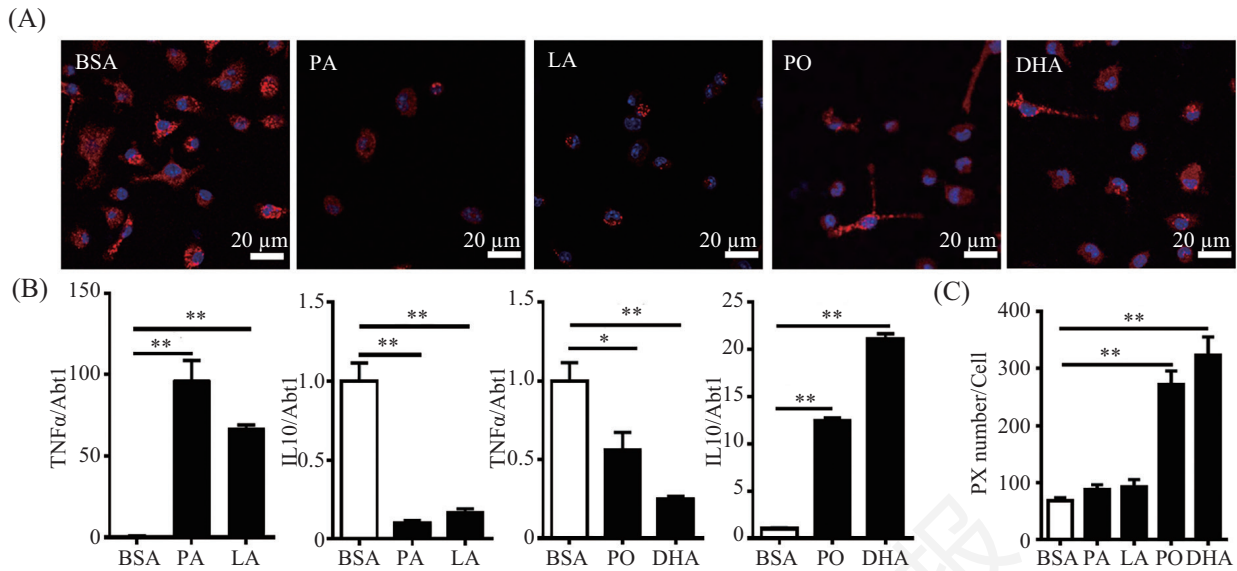
图3 *Pex3*^{-/-}型巨噬细胞中的过氧化物酶体
Fig.3 Peroxisomes in *Pex3*^{-/-} macrophages



A: 巨噬细胞极化标志基因表达水平。红色: 过氧化物酶体; 蓝色: 细胞核。B: 巨噬细胞极化后过氧化物酶体染色; C: 巨噬细胞极化后过氧化物酶体的数量。 *t* test, ***P*<0.01。

A: marker genes expression level of polarized macrophages. Red: peroxisomes; blue: nucleus. B: peroxisomes staining in polarized macrophages. C: the number of peroxisome sin polarized macrophages. *t* test, ***P*<0.01.

图4 野生型和*Pex3*^{-/-}型巨噬细胞极化分析
Fig.4 The analysis of WT and *Pex3*^{-/-} macrophage polarization

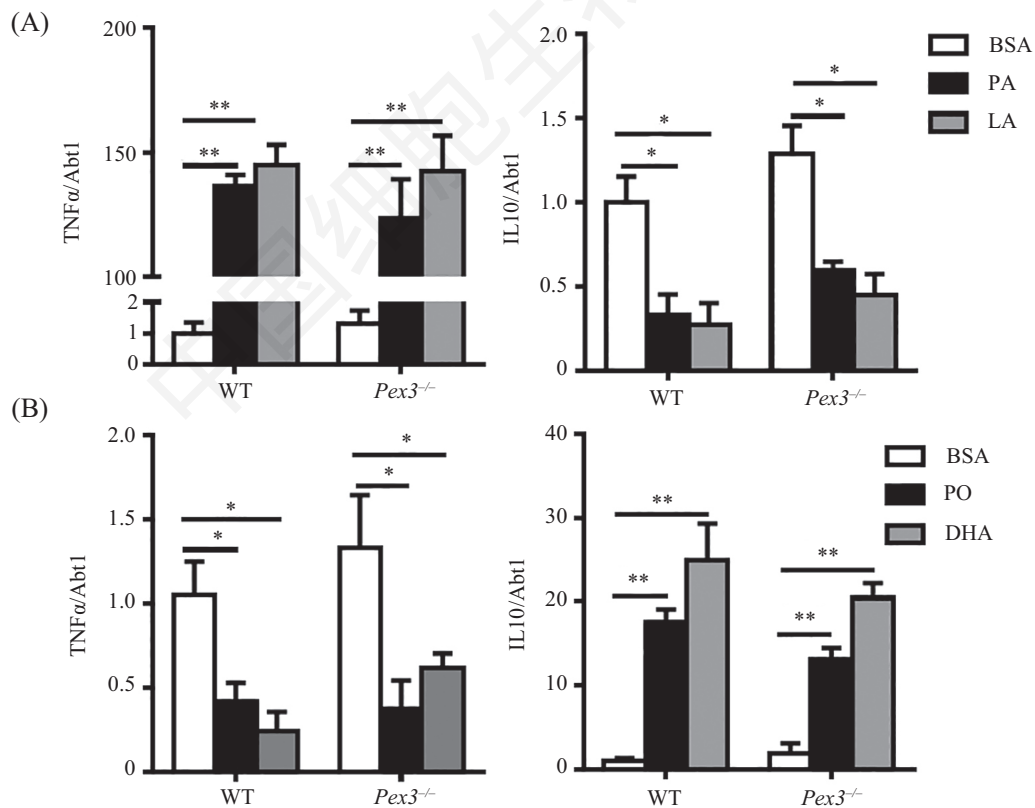


A: 不同脂肪酸处理后巨噬细胞内过氧化物酶体分布。红色: 过氧化物酶体; 蓝色: 细胞核。B: 不同脂肪酸处理后巨噬细胞炎症状态。C: 不同脂肪酸处理后巨噬细胞内过氧化物酶体数。t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: distribution of peroxisomes in macrophages treated by different fatty acids. red: peroxisomes; blue: nucleus. B: the morphologies of macrophage treated by different fatty acids. C: the number of peroxidases in macrophages treated by different fatty acids. t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 不同脂肪酸对小鼠巨噬细胞过氧化物酶体的影响

Fig.5 Effects of different fatty acids on peroxisomes in macrophages



A: 饱和脂肪酸诱导巨噬细胞发生类M1型极化; B: 不饱和脂肪酸诱导巨噬细胞发生类M2型极化。t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: saturated fatty acids induce M1-like polarization in macrophages; B: unsaturated fatty acids induce M2-like polarization in macrophages. t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 $Pex3^{-/-}$ 与野生型巨噬细胞在脂肪酸处理后的极化反应

Fig.6 The polarized response in WT and $Pex3^{-/-}$ macrophages treated by fatty acids

小鼠分离巨噬细胞, 分别以16碳和24碳的饱和/不饱和脂肪酸诱导巨噬细胞发生极化, 以野生型小鼠的巨噬细胞为对照, 分析两种基因型细胞的极化的差异。结果表明, 饱和脂肪酸PA和LA均诱发两种基因型的巨噬细胞发生炎症反应, TNF- α 表达水平上升、IL-10表达下降(图6A), 细胞极化为类M1型; 不饱和脂肪酸PO和DHA均诱发两种基因型巨噬细胞发生抗炎反应, TNF- α 表达水平下降, IL-10表达上调(图6B), 细胞极化为类M2型。结果表明, 与对照组BSA处理相比, 两种基因型的巨噬细胞在各种脂肪酸刺激中未发现明显差异, 推断过氧化物酶体增殖不是脂肪酸诱导的巨噬细胞极化的必要条件。

3 讨论

随着生活水平的提高, 我国人民饮食结构发生了巨大变化。目前, 由于营养过剩或失衡所引起的代谢类疾病的发病率逐年增高, 危害人体健康^[10]。大多数代谢疾病与肥胖密切相关, 而肥胖往往诱发机体产生慢性低度炎症反应, 研究表明, 慢性低度炎症可能是很多代谢疾病的病理学基础^[11]。以二型糖尿病为例, 肥胖导致肝脏、肌肉和脂肪等招募更多的巨噬细胞浸润, 并导致炎症因子分泌增加, 这些炎症因子是诱发胰岛素抵抗的重要原因^[12]。巨噬细胞是诱发慢性低度炎症反应的主要细胞类型, 事实上, 由于所处环境的不同, 巨噬细胞可以呈现多种生理状态, 为了研究巨噬细胞, 将巨噬细胞的两种极端状态定义为M1型和M2型, M1型即为急性炎症状态, M2型为典型的抗炎状态, 巨噬细胞变为M1或M2型的过程称为极化。这一过程发生诸多分子事件, 已有大量研究关注此过程^[13-15]。

饮食中的脂肪酸, 不仅作为营养物质, 也可以作为信号物质, 改变机体的生理状态。小鼠饲喂实验表明, DHA能够降低慢性低度炎症状态, 改善胰岛素敏感性^[16]; 离体细胞实验证明, 当巨噬细胞接触饱和脂肪酸, 可以引起巨噬细胞极化为类M1样, 表现出炎症状态; 而接触不饱和脂肪酸引起巨噬细胞极化为类M2样, 分泌抗炎因子^[7,16]。因此, 通过脂肪酸刺激改变巨噬细胞炎症状态, 可以作为一种研究手段, 来揭示巨噬细胞发挥作用的机理^[17]。

本研究聚焦于巨噬细胞内的过氧化物酶体增殖与巨噬细胞极化的关系。过氧化物酶体是真核细

胞特有的细胞器, 内含有40多种氧化酶, 主要功能是参与长链脂肪酸代谢、清除氧自由基等^[18]。当细胞内的环境改变, 过氧化物酶体的数量可随之发生改变, 既有新的生成, 又有老的被清除, 通过数量不断变化来帮助细胞适应环境, 保持健康状态^[19]。但迄今未见巨噬细胞内过氧化物酶体的相关研究。

该文利用体外培养的巨噬细胞极化模型, 首次报道了M2型巨噬细胞内过氧化物酶体数量显著高于M1型巨噬细胞。这与我们的预期相反, 因为M1型巨噬细胞处于炎症状态, 为了应对病原菌, 我们原以为细胞需要更多的过氧化物酶体来维持细胞的健康状态。但实验结果表明, 处于抗炎状态的M2型巨噬细胞内过氧化物酶体数量相当于M1型的2倍。为了确定这一结论, 我们通过免疫荧光、荧光定量PCR等技术, 在不同层面得到了相同结论。但当我们使用过氧化物酶体增殖缺陷的*Pex3*^{-/-}型巨噬细胞作为研究材料的时候, 发现过氧化物酶体的增殖并不是巨噬细胞极化的必要条件。我们推断: 巨噬细胞极化为M2型的过程中, 启动了过氧化物酶体增殖的信号, 引起过氧化物酶体数量的增加, 但此极化过程不依赖于过氧化物酶体增殖过程。为了确定上述实验现象的可靠性, 我们采用脂肪酸刺激巨噬细胞, 诱导巨噬细胞极化为类M1或类M2型。对于类M1和类M2型巨噬细胞, 我们采用同样方法分析胞内过氧化物酶体的数量, 发现类M2型巨噬细胞内过氧化物酶体显著高于类M1型。使用*Pex3*^{-/-}型巨噬细胞重复上述实验, 同样发现过氧化物酶体增殖不是类M2型极化的必要条件。

值得一提的是, 在动物细胞中, 过氧化物酶体参与极长链脂肪酸的氧化, 22碳以上长度的脂肪酸^[20], 需要先在过氧化物酶体中, 通过 β -氧化降解为中链脂肪酸, 进入到线粒体中完成最终的降解。因此我们选取了22碳以下的和22碳以上的饱和/不饱和脂肪酸各一个, 来分析其对巨噬细胞内过氧化物酶体数量的影响, 但实验结果表明, 不同碳链长度的脂肪酸对巨噬细胞内过氧化物酶体的影响无显著差别。这说明, 脂肪酸是作为一种信号分子影响巨噬细胞的炎症状态, 而与代谢过程无关^[7]。

综上所述, M2型/类M2型巨噬细胞的极化能够诱发胞内过氧化物酶体数量增加, 但过氧化物酶体数量增加不是巨噬细胞极化为M2型/类M2型的必要条件。

参考文献 (References)

- 1 Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12): 958-69.
- 2 Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am* 2003; 83(3): 483-507.
- 3 Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH. Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion. *Immunol Cell Biol* 2014; 92(6): 543-52.
- 4 Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(11): 750-61.
- 5 Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013; 496(7446): 445-55.
- 6 Chan KL, Pillon NJ, Sivaloganathan DM, Costford SR, Liu Z, Klip Z, *et al.* Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via amp-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem* 2015; 290(27): 16979-88.
- 7 孙艳, 孙雪培, 姜玲玲, 石芸. 过氧化物酶体生物发生研究进展. *生物学杂志*(Sun Yan, Sun Xuepei, Jiang Lingling, Shi Yun. Research progress in peroxisome biogenesis. *Journal of Biology*) 2015; 32(2): 83-6.
- 8 Yamashita S, Abe K, Tatemichi Y, Fujiki Y. The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy* 2014; 10(9): 1549-64.
- 9 Hua R, Kim PK. Multiple paths to peroxisomes: mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(5): 881-91.
- 10 李少昆, 贾海梅, 哈海枫, 安生花. 门冬胰岛素注射液对糖尿病肾病的疗效及患者SOD、MDA影响. *药物评价研究*(Li Shaokun, Jia Haimei, Ha Haifeng, An Shenghua. Effects of aspart insulin injection on diabetic nephropathy and effects on SOD and MDA. *Drug Evaluation Research*) 2018; 41(8): 1490-4.
- 11 李媛媛, 韩立华, 鞠豪, 常耀光, 薛勇, 王静凤. 海参胶对胰岛素抵抗模型小鼠慢性炎症的改善作用. *中国海洋药物*(Li Yuanyuan, Han Lihua, Ju Hao, Chang Yaoguang, Xue Yong, Wang Jingfeng. The effect of sea cucumber gelatin on ameliorating chronic inflammation in insulin resistance mice. *Chinese Journal of Marine Drugs*) 2018; 37(2): 32-8.
- 12 Chen L, Chen R, Wang H, Liang F. Mechanisms linking inflammation to insulin resistance. *Int J Endocrinol* 2015; 2015: 1-9.
- 13 阮静瑶, 陈必成, 张喜乐, 张戎, 黄欢捷. 巨噬细胞M1/M2极化的信号通路研究进展. *免疫学杂志*(Ruan jingyao, Chen Bicheng, Zhang Xile, Zhang Rong, Huang Huanjie. Progress in signaling pathways of macrophage M1/2 polarization. *Immunological Journal*) 2015; 31(10): 911-7.
- 14 Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 2014; 59(5): 2034-42.
- 15 Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 219-46.
- 16 Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans* 2017; 45(5): 1105-15.
- 17 罗雯静, 隋永恒, 连敏, 华静. 不同种类脂肪酸对巨噬细胞M1/M2极化的影响. *胃肠病学*(Luo Wenjing, Sui Yongheng, Lian Ming, Hua Jing. Effects of different fatty acids on macrophage M1/M2 polarization. *Chin J Gastroenterol*) 2015; 20(1): 24-8.
- 18 Nordgren M, Fransen M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie* 2014; 98: 56-62.
- 19 Nordgren M, Wang B, Apanasets O, Fransen M. Peroxisome degradation in mammals: mechanisms of action, recent advances, and perspectives. *Front Physiol* 2013; 4: 145.
- 20 Wanders RJ, Waerham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 295-332.