



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.004

http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201902134.pdf

## 低氧条件下气道上皮细胞增加巨噬细胞趋化和炎症因子的分泌

陈兴无, 秦立龙, 孙珍贵, 邢敏, 臧蕾蕾, 王寒黎

(皖南医学院第一附属医院呼吸内科, 安徽 芜湖 241001)

**[摘要]** 目的: 探讨低氧条件下气道上皮细胞对巨噬细胞趋化和炎症因子表达的影响。方法: 将0, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴( $\text{CoCl}_2$ )处理或转染缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 $\alpha$  siRNA的人支气管上皮细胞HBE与人单核细胞THP-1诱导分化的M1或M2巨噬细胞共培养, 采用Transwell小室趋化实验记录巨噬细胞趋化数量, ELISA法检测巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10浓度, RT-qPCR检测HBE细胞HIF-1 $\alpha$ 和巨噬细胞Cav-1 mRNA的表达。结果: 共培养8和12 h, HBE细胞诱导巨噬细胞趋化, 并且呈时间和 $\text{CoCl}_2$ 浓度依赖性; 转染HIF-1 $\alpha$  siRNA的HBE相对于未转染组对共培养的M1或M2巨噬细胞趋化诱导明显减弱( $P < 0.01$ ), 在相同培养条件下, M2巨噬细胞趋化性高于M1巨噬细胞。巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10水平呈时间和 $\text{CoCl}_2$ 浓度依赖性升高, 共培养8和12 h, TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 浓度增加较IL-4, IL-13, IL-10浓度增加更明显; 共培养24 h, IL-4, IL-13, IL-10浓度增加程度高于TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 。与转染HIF-1 $\alpha$  siRNA的HBE共培养的巨噬细胞上清中各细胞因子水平较未转染组均明显降低( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ), 其中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 降低更明显。共培养8和12 h, HBE细胞HIF-1 $\alpha$ 和巨噬细胞Cav-1 mRNA表达均呈 $\text{CoCl}_2$ 浓度依赖性增加; 转染HIF-1 $\alpha$  siRNA后, HBE细胞HIF-1 $\alpha$ 和巨噬细胞Cav-1 mRNA表达量均明显减少。结论: 低氧环境下气道上皮细胞可增加巨噬细胞趋化因子和致炎因子的表达, HIF-1 $\alpha$ 和Cav-1可能是这些过程的重要介质。

**[关键词]** 气道上皮细胞; 巨噬细胞; 趋化; 炎症因子

## Airway epithelial cells increase macrophage chemotaxis and inflammatory cytokine secretion under hypoxic conditions

CHEN Xingwu, QING Lilong, SUN Zhengui, XING Min, ZANG Leilei, WANG Hanli

(Department of Respiratory, First Affiliated Hospital, Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241001, China)

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effects of airway epithelial cells on macrophages chemotaxis and inflammatory cytokine expression under hypoxic conditions.

**Methods:** Human bronchial epithelial cells (HBE) treated with different concentrations (0, 100,

收稿日期(Date of reception): 2018-03-06

第一作者(First author): 陈兴无, Email: cxw0028@126.com, ORCID: 0000-0002-4891-6486

通信作者(Corresponding author): 陈兴无, Email: cxw0028@126.com, ORCID: 0000-0002-4891-6486

基金项目(Foundation item): 安徽省自然科学基金(160808SMH192); 弋矶山医院引进人才科研基金(YR201401)。This work was supported by Anhui Provincial Natural Science Foundation (160808SMH192) and Scientific Research Fund for Introduction of talent of Yijishan Hospital (YR201401), China.

200, 400, 800  $\mu\text{mol/L}$ ) of  $\text{CoCl}_2$  or transfected with HIF-1 $\alpha$  siRNA were co-cultured with THP-1-derived M1 macrophages or M2 macrophages. The chemotactic effects on macrophages were analyzed by Transwell assay. The levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 and IL-10 in the supernatants of macrophages were detected by ELISA, and HIF-1 $\alpha$  or Cav-1 mRNA expression in HBE or macrophages was detected by RT-qPCR.

**Results:** HBE cells promoted macrophages chemotaxis in a time- and concentration-dependent manner. Compared to un-transfected group, the chemotactic ability of HBE transfected with HIF-1 $\alpha$  siRNA was significantly weakened ( $P < 0.01$ ). Under the same culture conditions, the chemotaxis of M2 macrophages was greater than that in THP1-derived M1 macrophages. The concentrations of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13 and IL-10 in the supernatants of macrophages were increased in a time- and concentration-dependent manner. The concentrations of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were increased further after co-culturing for 8 and 12 h; while IL-4, IL-13 and IL-10 concentrations were increased further during 24 h of co-culture. The levels of cytokines in the supernatants of macrophages co-cultured with HBE and transfected with HIF-1 $\alpha$  siRNA were significantly lower than those in un-transfected cells ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The reduction of TNF- $\alpha$  or IFN- $\gamma$  was more obvious. The expression of HIF-1 $\alpha$  or Cav-1 mRNA in HBE or macrophages was increased in a concentration-dependent manner after 8 or 12 h co-culture, which was significantly reduced when HBE was transfected with HIF-1 $\alpha$  siRNA.

**Conclusion:** Airway epithelial cells can enhance macrophages chemotaxis and pro-inflammatory cytokines expressions under hypoxic condition. HIF-1 $\alpha$  and Cav-1 may be the important mediators in these processes.

## KEY WORDS

airway epithelial cells; macrophages; chemotaxis; inflammatory factors

异常增强的气道炎症是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的重要病理标志, 其特征在于中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞聚集。这些细胞和气道结构细胞包括上皮细胞、内皮细胞及成纤维细胞分泌多种促炎介质, 其中巨噬细胞是一种功能高度可塑的细胞, 应答细胞因子或膜受体等信号, 获得以产生特定细胞因子和趋化因子为特征的经典活化(M1)或替代活化(M2)两种表型状态。研究<sup>[1]</sup>发现COPD患者气道壁、肺实质、肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和痰巨噬细胞数量增加, 且痰巨噬细胞百分比与肺功能呈负相关。通过释放高水平促炎细胞因子和趋化因子, 巨噬细胞促进包括中性粒细胞和单核细胞在内的其他炎症细胞向肺部趋化而加速疾病进展<sup>[2]</sup>, 在气道炎症形成过程中起至关重要的作用。

支气管上皮细胞不仅是环境应激的靶点, 还能释放促炎细胞因子和趋化因子趋化和激活炎症细胞并调节免疫和炎症反应<sup>[3]</sup>。在气道微环境, 巨噬细胞与气道壁上皮细胞等交互作用或相互接收信号, 这种通讯交流可调节巨噬细胞的功能和活化状态。

缺氧是COPD气道炎症微环境的一种常见现象, 巨噬细胞常聚集于缺氧组织, 缺氧强烈影响巨噬细胞功能, 缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 $\alpha$ 是缺氧和炎症过程中激活的一个关键转录因子, 对免疫和炎症反应调节起关键作用, 影响巨噬细胞炎症因子基因表达、表型和功能状态。已报道COPD患者支气管上皮和上皮纤维化组织HIF-1 $\alpha$ 表达上调<sup>[4]</sup>。小窝蛋白-1(Cav-1)是细胞质膜微囊的主要结构成分, 在免疫细胞中作为有效的促炎效应分子, 参与COPD的发展<sup>[5]</sup>。研究<sup>[6]</sup>发现Cav-1调节早期生长反应因子1(early growth responsive gene-1, EGR-1)的转录活性, 促进单核细胞向巨噬细胞分化、吞噬并抑制迁移。

本研究假设低氧状态下的支气管上皮细胞可能通过释放与低氧有关的炎症介质影响巨噬细胞迁移和炎症因子表达, 促进气道炎症发生发展, 以低氧模拟剂氯化钴( $\text{CoCl}_2$ )刺激气道上皮细胞, 并与不同状态的巨噬细胞共培养, 探讨气道上皮细胞作用的巨噬细胞迁移和促炎性因子表达, 以及HIF-1 $\alpha$ 和Cav-1在上述过程中的作用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

人支气管上皮细胞HBE购自江苏齐式生物科技有限公司; 人单核细胞THP-1购自杭州赫贝生物技术有限公司。CoCl<sub>2</sub>, 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和异硫氰酸荧光素异构体I(fluorescein isothiocyanate isomer I, FITC)购自美国Sigma公司; CD68抗体为美国Santa Cruz公司产品; Alexa Fluor®R488驴抗兔IgG(H+L)购自美国Life公司; 抗人CD206 APC购自美国eBioscience公司; RNA提取试剂盒、反转录试剂盒PrimeScript™ RT Master Mix、定量PCR试剂盒SuperReal PreMix Color分别购自上海捷瑞生物工程公司、大连TaKaRa公司、北京天根生化科技公司; 溴化乙锭为上海生工生物有限公司产品; Homo-488, Homo-1216, Homo-1553 siRNA购自上海吉玛制药技术有限公司; TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-13, IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购于杭州联科生物技术股份有限公司; 流式细胞仪为美国BD Accuri公司产品。微光分光光度计和定量PCR仪分别购自美国Merinton公司和BIO-RAD公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 THP-1细胞培养和诱导分化

将THP-1细胞常规培养于含10%德国serana胎牛血清(serana fetal bovine serum, SFBS)的RPMI 1640培养基, 以5.0×10<sup>5</sup>个/孔铺至24孔细胞培养板中, 加入终浓度为100 ng/mL的PMA进行诱导分化。24 h后, 进行免疫荧光染色, 显微镜下观察诱导分化的CD68<sup>+</sup>巨噬细胞。部分THP-1细胞用100 ng/mL PMA诱导24 h再加IL-4(20 ng/mL)培养72 h诱导分化为M2巨噬细胞, 进行后续实验。

#### 1.2.2 HIF-1α siRNA转染

将HBE细胞用不含抗生素的10% SFBS的DMEM培养基以5.0×10<sup>5</sup>个/孔接种于24孔培养板中, 待70%~80%融合后, 换无血清培养液用于转染。实验分5组: 对照组(不转染, CK组)、阴性对照组(转染negative control siRNA, NC组)、Homo-488 siRNA组、Homo-1216 siRNA组、Homo-1553 siRNA组。参照lipofectamine 3000说明书进行转染, 利用实时定量PCR(RT-qPCR)评估沉默效率, 效率最高的用于后续实验。siRNA基因序列: Negative control, 正义, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 反义, 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; HIF-1α-Homo-488, 正义, 5'-GGCGAAGUAAAGAAUCUGATT-3', 反义, 5'-UCAGAUUCUUACUUCGCCTT-3'; HIF-1α-Homo-1216, 正义,

5'-GGCGAAGUAAA-GAAUCUGATT-3', 反义, 5'-UCAGAUUCUUACUUCGCCTT-3'; HIF-1α-Homo-1553, 正义, 5'-GUAGCCUCUUUGACA-AACUTT-3', 反义, 5'-AGUUUGUCAAGAGG-CUACTT-3'。

#### 1.2.3 HBE与巨噬细胞共培养

将HBE细胞以1.0×10<sup>5</sup>个/室铺至24孔Transwell小室上室, 培养于含10% SFBS的DMEM培养基中。24 h后换无血清培养基并以CoCl<sub>2</sub>处理, 共分5组: HBE组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(100 μmol/L)组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(200 μmol/L)组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(400 μmol/L)组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(800 μmol/L)组。各组细胞经CoCl<sub>2</sub>处理24 h, 再与上述诱导分化的巨噬细胞共培养8, 12或24 h, 收获上室HBE细胞用于HIF-1α mRNA检测, 下室巨噬细胞用于Cav-1 mRNA检测, 收集巨噬细胞上清用于细胞因子检测。

预实验证实CoCl<sub>2</sub>(800 μmol/L)和Homo-488 siRNA实验效果最佳后, 选择部分细胞进一步探讨HIF-1α的作用, 分3组: HBE+control siRNA组(NC组), HBE+Homo-48 siRNA组(siRNA组), HBE+Homo-48 siRNA+CoCl<sub>2</sub>(800 μmol/L)组(siRNA+800组), HBE细胞处理同上, 然后与诱导分化的巨噬细胞共培养8, 12或24 h。

#### 1.2.4 Transwell小室趋化实验

将HBE细胞以5.0×10<sup>5</sup>个/室接种于24孔细胞培养板, 培养24 h后, 以CoCl<sub>2</sub>刺激, 共分5组: HBE组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(100 μmol/L)组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(200 μmol/L)组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(400 μmol/L)组, HBE+CoCl<sub>2</sub>(800 μmol/L)组。培养24 h后换无血清培养液。诱导分化的M1或M2巨噬细胞以1.0×10<sup>5</sup>个/室接种于Transwell上室, 与接种于24孔培养板的HBE共培养8, 12或24 h, 甲醇固定20 min, 将小室适当风干, 用0.1%结晶紫染色20 min; 自来水洗3遍, 棉签擦尽上室细胞, 光学显微镜下随机选取3个视野, 计数小室下室的细胞数, 每组设3个复孔, 取平均值。

#### 1.2.5 流式细胞术分析巨噬细胞CD206的表达

收集1.2.1中PMA及IL-4诱导分化的巨噬细胞, 以未用IL-4诱导的巨噬细胞作为阴性对照, 细胞以PBS重悬, 分别加入5 μL CD206特异性抗体染色细胞, 避光孵育30 min。使用AccuriC6流式细胞仪分析CD206的表达。

#### 1.2.6 RT-qPCR检测HIF-1α, CAV-1 mRNA的表达

按试剂盒说明提取总RNA, 定量并评估RNA完整性。使用反转录试剂盒合成cDNA, 定量PCR试剂盒进行定量qPCR, 2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析数据。每个实验重复3次。PCR引物: Homo-HIF-1α, 正向, 5'-AGGCTACTTGTATCTTCTG-3'; 反向,

5'-CGTTGTGAGTGGTATTATTC-3'; Homo-Cav-1, 正向, 5'-CAGACAGCAAGCGGTAAA-3', 反向, 5'-ATGACGTGGTCAAGATTGA-3'; Homo-ACTB, 正向, 5'-TAACGCAACTAAGTCATA-3', 反向, 5'-TGAAGATCAAGATCATTG-3'。

### 1.2.7 检测细胞上清TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10浓度

ELISA法测定TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10浓度, 操作步骤参照试剂盒说明书。检测灵敏度下限分别为0.42, 0.30, 0.48, 0.90, 0.59 pg/mL。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多组间比较采用方差分析,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 巨噬细胞诱导分化

经100 ng/mL PMA诱导24 h的THP-1巨噬细胞组CD68免疫荧光染色阳性, 而阴性对照组CD68免疫荧光染色阴性(图1)。

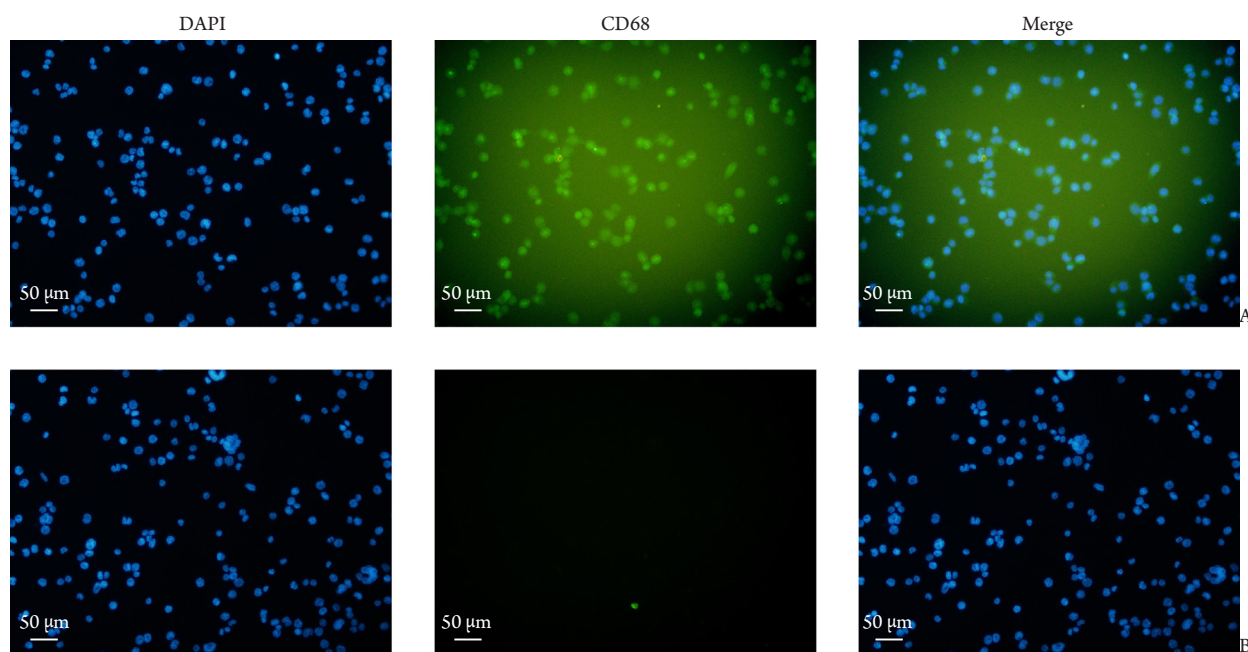


图1 THP-1细胞免疫荧光分析

Figure 1 Immunofluorescence analysis of THP-1 cells

A: THP-1 macrophage group; B: Negative control group

### 2.2 siRNA下调HBE细胞HIF-1 $\alpha$ 表达

各组HIF-1 $\alpha$ 相对表达: CK组 $1\pm 0.035$ ; NC组 $1.21\pm 0.026$ ; Homo-488 siRNA组 $0.36\pm 0.031$ ; Homo-1216 siRNA组 $0.75\pm 0.028$ ; Homo-1553 siRNA组 $0.48\pm 0.031$ 。与NC组相比, 3种siRNA均明显减弱HIF-1 $\alpha$ 的表达( $P<0.01$ ); 但Homo-488 siRNA减弱效果最明显, 因此后续实验选择Homo-488 siRNA。

### 2.3 CoCl<sub>2</sub>对HBE细胞活力的影响

将0, 100, 200, 400和800  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub>加

入HBE细胞中培养24 h, 测定LDH的释放量分别为 $0.61\pm 0.03$ ,  $0.61\pm 0.05$ ,  $0.64\pm 0.03$ ,  $0.67\pm 0.04$ ,  $0.68\pm 0.04$ , 与对照组(0  $\mu\text{mol/L}$ )比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 2.4 M2巨噬细胞鉴定

流式细胞仪示PMA及IL-4诱导分化的M2巨噬细胞CD206荧光强度比率达92.2%, 而阴性对照的巨噬细胞仅0.1%(图2)。

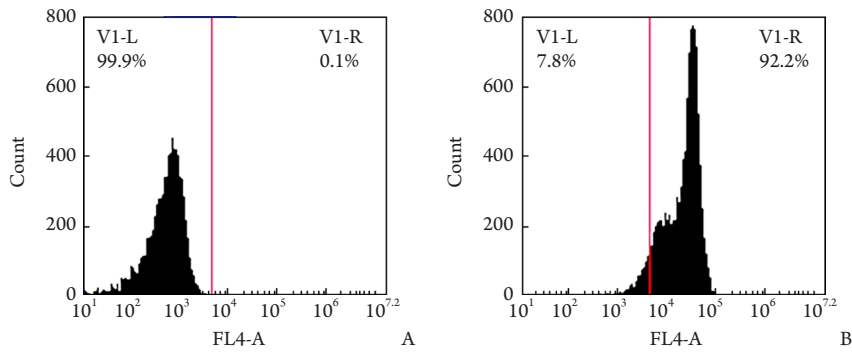


图2 巨噬细胞CD206的相对荧光强度

Figure 2 Relative fluorescence intensity of CD206 detected in macrophages

A: Negative control; B: M2 macrophages

2.5 HBE对巨噬细胞趋化的影响

共培养8和12 h, 各组HBE细胞均诱导巨噬细胞趋化, 与200, 400和800  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$ 刺激的HBE共培养的巨噬细胞趋化数量均明显大于0  $\mu\text{mol/L}$ 组 ( $P < 0.01$ ), 800  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$ 作用的HBE对巨噬细胞的趋化最明显, 同时在相同 $\text{CoCl}_2$ 浓度, 12 h巨噬细胞趋化数量更多; 共培养24 h时, 各组HBE细胞趋化巨噬细胞的数量差异无统计学意义(图3, 4)。与转染Homo-488 siRNA的HBE共培养的M1或M2巨噬细胞趋化数量较未转染组明显减少( $P < 0.01$ ), 转染Homo-488 siRNA同时以800  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$ 刺激的HBE不能明显增加M1或M2巨噬细胞趋化数量, 而在相同转染及 $\text{CoCl}_2$ 刺激情况下, M2巨噬细胞趋化数高于THP1诱导分化的M1巨噬细胞(图5, 6)。

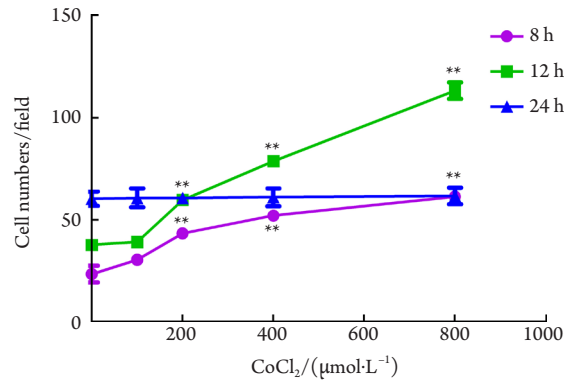


图3 不同浓度 $\text{CoCl}_2$ 刺激的HBE共培养的巨噬细胞的趋化数  
Figure 3 Numbers of chemotactic macrophages co-cultured with different concentrations of  $\text{CoCl}_2$ -stimulated HBE

\*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  group

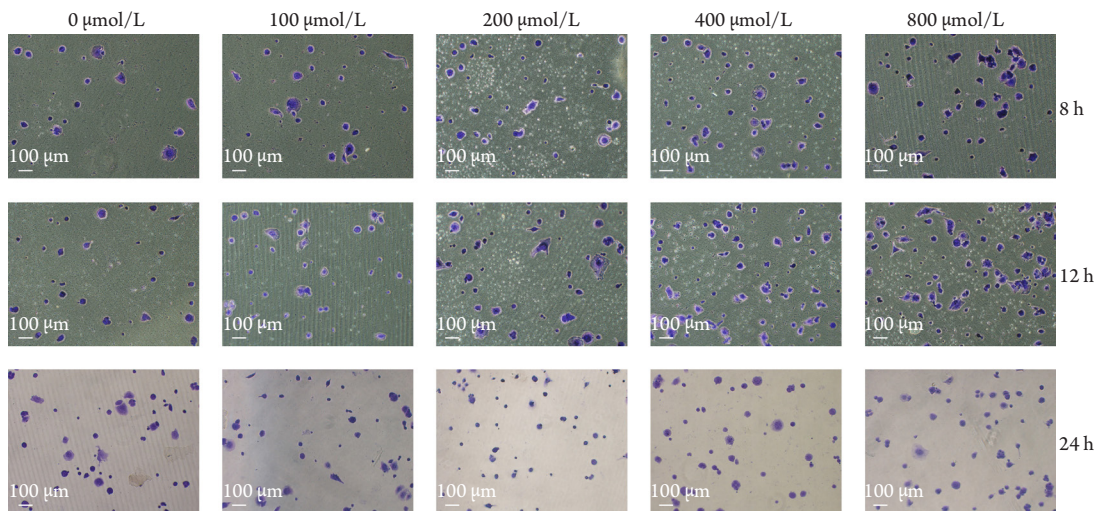


图4 不同浓度 $\text{CoCl}_2$ 刺激的HBE对巨噬细胞趋化的影响

Figure 4 Effects of different concentrations of  $\text{CoCl}_2$ -stimulated HBE on the chemotaxis of macrophages

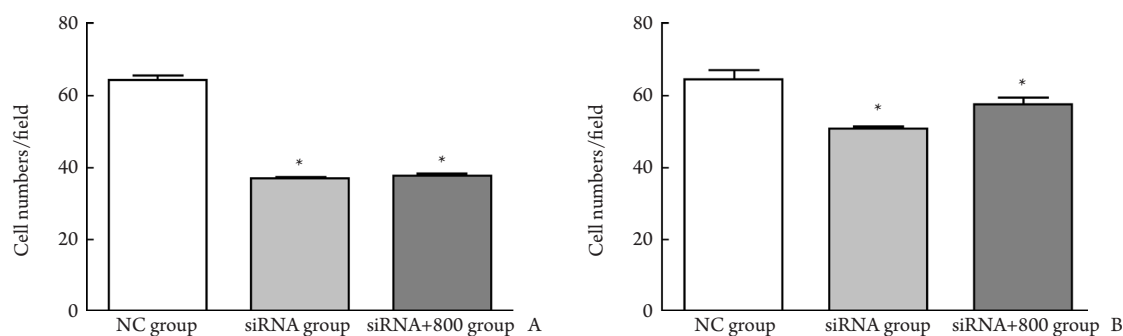


图5 不同因素处理的HBE共培养12 h的巨噬细胞趋化数

Figure 5 Numbers of chemotactic macrophages co-cultured with different stimulated HBE at 12 h

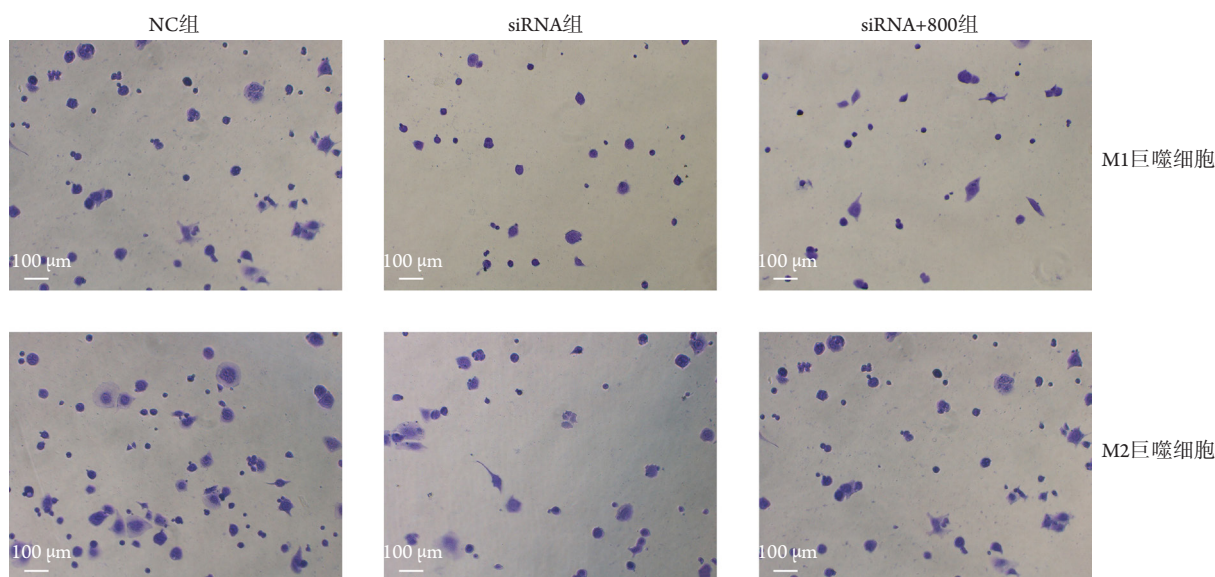
A: M1 macrophages; B: M2 macrophages. \* $P < 0.05$  vs NC group

图6 共培养12 h时不同因素处理的HBE对巨噬细胞趋化的影响

Figure 6 Effects of different stimulated HBE on the chemotaxis of macrophages at 12 h

## 2.6 巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13和IL-10浓度的变化

CoCl<sub>2</sub>刺激的HBE共培养的巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13和IL-10水平在3个时间点均随CoCl<sub>2</sub>浓度和时间呈上升趋势, 所有细胞因子表达水平均在800  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h时最高; 但共培养8和12 h的巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 较IL-4, IL-13, IL-10浓度增加更明显; 共培养24 h的巨噬细胞上清中IL-4, IL-13, IL-10浓度增加程度要高于TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ (图7)。转染Homo-488 siRNA或同时以

800  $\mu\text{mol/L}$  CoCl<sub>2</sub>刺激的HBE共培养的巨噬细胞上清中各细胞因子水平较NC组均明显降低( $P < 0.05$ 或 $0.01$ ), 其中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 较IL-4, IL10, IL-13降低更明显(图8)。

## 2.7 HBE细胞HIF-1 $\alpha$ 和巨噬细胞Cav-1 mRNA的相对表达量

共培养8和12 h时HBE细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA和巨噬细胞Cav-1 mRNA表达均随CoCl<sub>2</sub>浓度增加呈上升趋势, 并于800  $\mu\text{mol/L}$ 时达到峰值; 而共培养24 h时HBE细

胞HIF-1 $\alpha$  mRNA和巨噬细胞Cav-1 mRNA表达量与对照组比较均无明显改变( $P>0.05$ , 图9)。

转染Homo-488 siRNA后, HBE细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA和巨噬细胞Cav-1 mRNA表达量均呈明显下降趋势,

即使以800  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$ 刺激HBE也不能明显增加HBE细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA和巨噬细胞Cav-1 mRNA的表达( $P>0.05$ , 图10)。

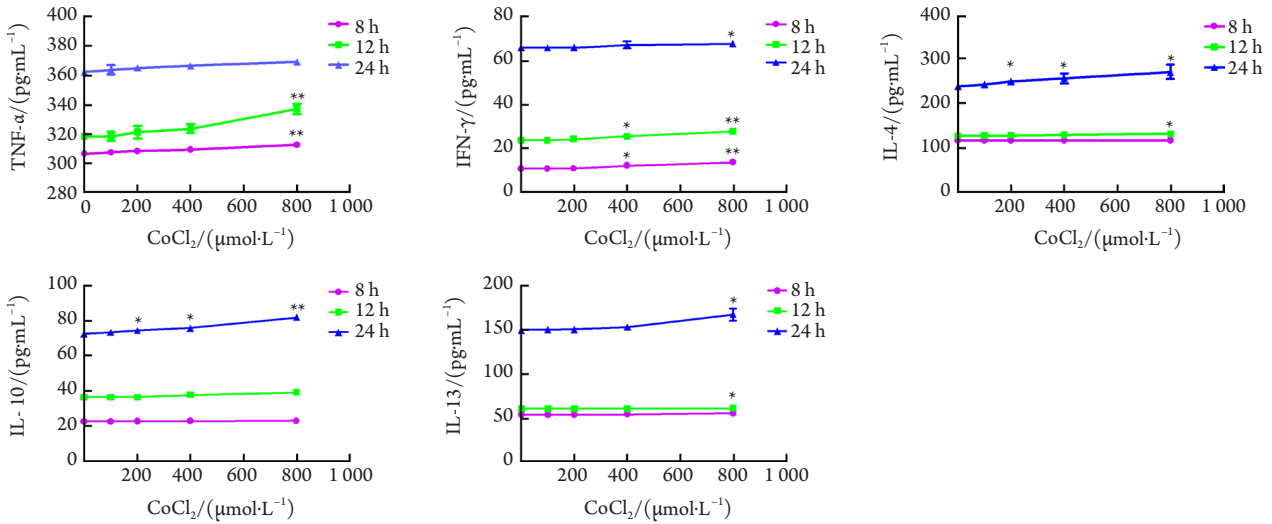


图7 巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13的表达水平( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Figure 7 Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, and IL-13 in the supernatants of macrophages ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CoCl}_2$  group

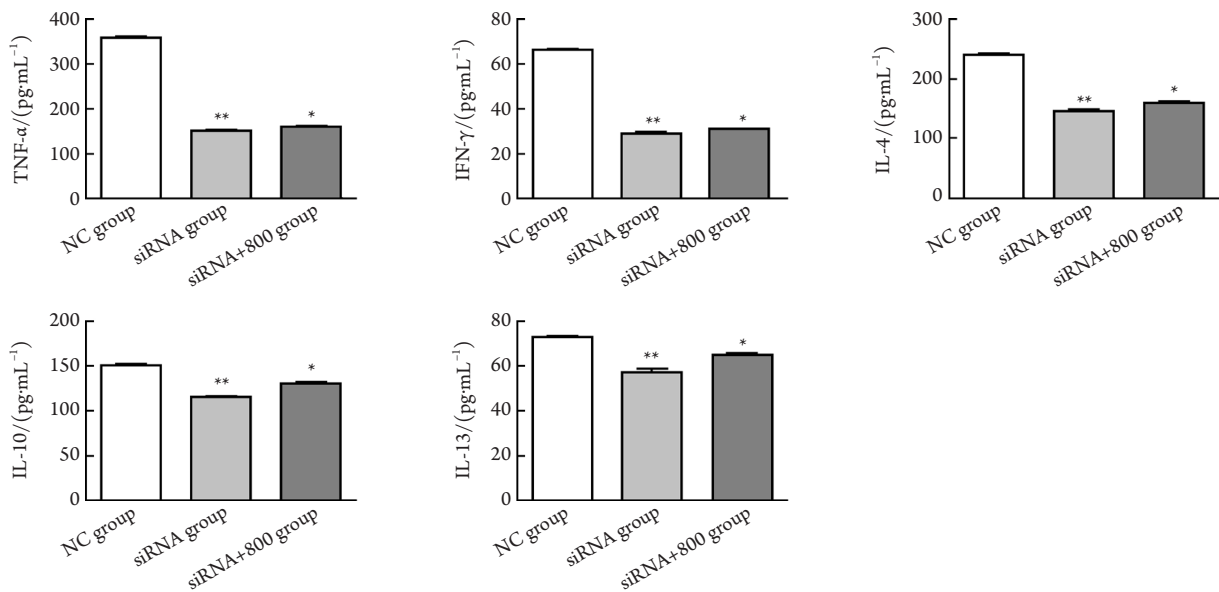


图8 不同条件HBE共培养24 h的巨噬细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13和IL-10表达水平( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Figure 8 Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, and IL-13 in the supernatants of macrophages co-cultured with HBE under different conditions at 24 h ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs NC group

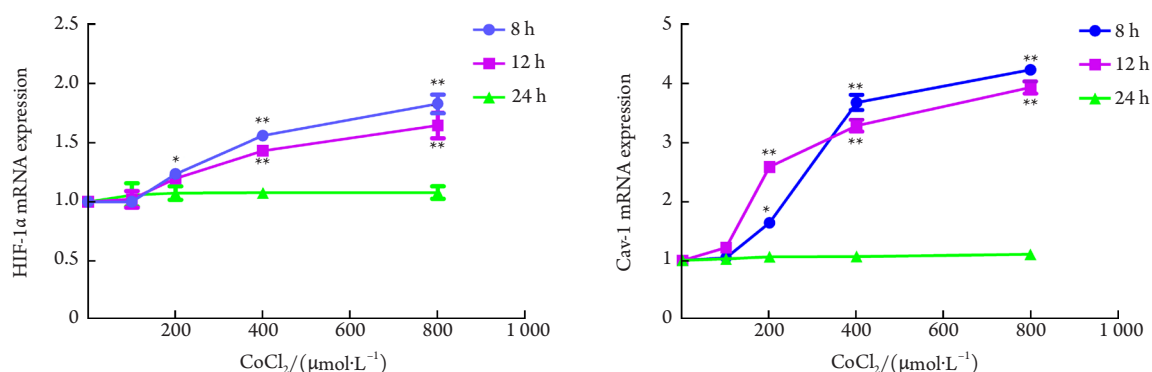


图9 不同浓度CoCl<sub>2</sub>共培养后HBE细胞HIF-1α和巨噬细胞Cav-1 mRNA的相对表达量

Figure 9 Relative expression of HIF-1α mRNA in HBE cells and Cav-1 mRNA in macrophages co-cultured with different concentrations of CoCl<sub>2</sub>

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0 μmol/L CoCl<sub>2</sub> group

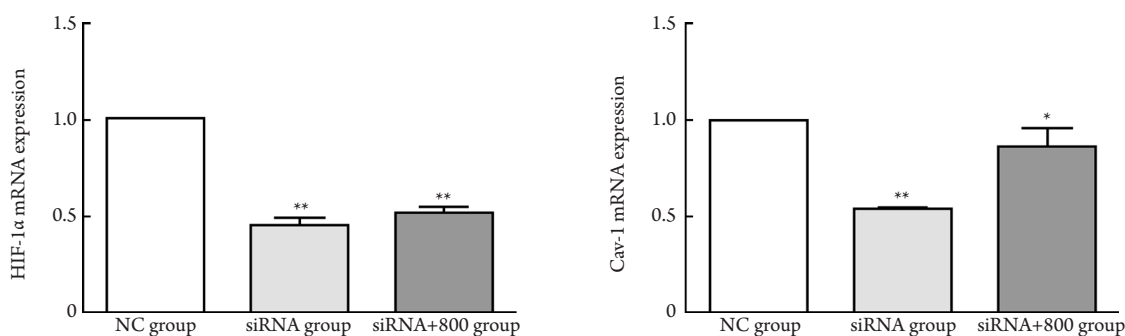


图10 转染Homo-488 siRNA 8 h时HBE细胞HIF-1α和巨噬细胞Cav-1 mRNA的相对表达量

Figure 10 Relative expression of HIF-1α mRNA in HBE cells and Cav-1 mRNA in macrophages transfected with Homo-488 siRNA at 8 h

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group

### 3 讨论

本研究发现: CoCl<sub>2</sub>刺激的上皮细胞共培养的巨噬细胞向低氧上皮趋化数目增加, 并且随CoCl<sub>2</sub>浓度增加, 巨噬细胞上清中首先呈现Th1型炎症环境, 表现为TNF-α, IFN-γ水平上升占优势, 随共培养时间延长, 则表现为Th2型炎症占优势, 即IL-4, IL-13, IL-10的生成增加更明显。而在共培养早期(12 h前), HBE细胞HIF-1α mRNA和巨噬细胞Cav-1 mRNA表达也随CoCl<sub>2</sub>浓度增加而增多。此外, HBE转染HIF-1α siRNA后, 即使CoCl<sub>2</sub>刺激HBE也不能明显增强巨噬细胞上清中Th1和Th2细胞因子水平, 并且共培养的巨噬细胞或M2巨噬细胞趋化减弱。这表明在低氧环境下, 上皮细胞和巨噬细胞通过分泌参与COPD的有关细胞因子产生信号转导, 增强巨噬细胞趋化和炎症因子分泌功能, 促进气道炎症的发生发展。

炎性细胞的趋化性是对各种刺激的一种反应, 已发现吸烟者和COPD患者气道内巨噬细胞总数增加<sup>[1]</sup>, 这可能是循环单核细胞应答趋化因子向肺趋化增加的结果。研究还发现: 吸烟者肺部M2巨噬细胞增加<sup>[1]</sup>, 在COPD患者中更高, 并且M2巨噬细胞与气流阻塞呈正相关<sup>[7]</sup>, 提示M2巨噬细胞趋化性更强或COPD患者气道环境更多的巨噬细胞极化为M2型。低氧细胞可产生信号趋化巨噬细胞向低氧区迁徙, 低氧也可抑制巨噬细胞迁移, 导致其滞留于低氧区。体外实验<sup>[8]</sup>发现: 低氧预处理的乳腺癌细胞促进巨噬细胞定向迁移, 低氧对M2型肿瘤相关巨噬细胞(tumour-associated macrophages, TAMs)归巢至低氧区的趋化驱动性更强。本实验发现: 即使在较低浓度的CoCl<sub>2</sub>作用下, 也观察到上皮细胞对巨噬细胞趋化反应的作用差异, 尤其是M2巨噬细胞趋化数高于THP1诱导分化的M1巨噬细胞(笔者前期实验中检测



了PMA诱导分化的巨噬细胞CCL3, CD163, CD206表达, 发现CCL3荧光强度比率较后两者更高, 提示系M1巨噬细胞), 提示低氧环境下, 气道内巨噬细胞趋化功能增强, 并且随低氧程度加重, 更多的巨噬细胞尤其是M2巨噬细胞向气道上皮趋化聚集, 这或许是重度COPD或重度急性发作患者气道或肺部M2巨噬细胞增多的机制之一。

巨噬细胞功能状态依赖于周围微环境信号, 细胞因子和趋化因子介导巨噬细胞的趋化和表型极化方向。COPD急性加重时痰上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-13, IL-10水平升高并与COPD气流阻塞程度呈明显相关<sup>[9]</sup>, 证实了低氧对促炎介质的影响。本研究所采用的共培养系统中上皮细胞与巨噬细胞相互不接触, 因此两种细胞之间的串扰是通过分泌可溶性因子来介导的。本研究发现: 低氧作用的上皮细胞与巨噬细胞共培养, 早期巨噬细胞上清中主要呈现Th1或M1巨噬细胞相关的细胞因子TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 水平升高; 在较迟些阶段主要表现为Th2或M2巨噬细胞相关的IL-4, IL-13, IL-10分泌增多。这种细胞因子的时间变化可能反映了笔者前期研究(待发表)中观察到的巨噬细胞表型转换的时间趋势。已知TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 和IL-4, IL-13, IL-10的表达分别作为M1和M2巨噬细胞极化的指标, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 驱使巨噬细胞极化为M1型并籍此进一步增强TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 的生成, 而IL-4, IL-13和IL-10由M2巨噬细胞分泌并诱导M2极化, 提示在低氧情况下, 随时间变化气道上皮细胞既能诱导巨噬细胞向致炎性表型转变, 也可诱发其产生抗炎属性, 这可能对于在COPD疾病的每个阶段观察到的不同病理学变化有重要意义, 即早期诱导气道炎症反应增强, 随COPD发展和病情加重, 长期低氧状态的气道上皮细胞诱导M2巨噬细胞分化和趋化, 使气道壁发生纤维化和重塑性改变。本研究还发现转染Homo-488 siRNA的HBE细胞对巨噬细胞细胞因子的诱导效应明显减弱, 其中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 较IL-4, IL-10, IL-13降低更明显, 提示在改善低氧的情况下, 可能有利于气道内环境Th1/Th2失衡状态趋向正常, 因而有益于延缓COPD病情的发展。

研究<sup>[10-11]</sup>表明: HIF-1 $\alpha$ 和Cav-1在肺气肿形成过程中具有重要作用, 两者皆参与免疫和炎症反应调节, 其中HIF-1 $\alpha$ 还能抑制气道上皮细胞先天性免疫应答, Cav-1调节单核细胞向巨噬细胞分化; 但Cav-1对炎症反应的调节可能在不同类型、不同条件下的细胞有所不同<sup>[12-13]</sup>。本研究发现: 在共培养条件下, 随CoCl<sub>2</sub>浓度上升, HBE细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA表达在早期增加, 同时, 与之共培养的巨噬细胞Cav-1 mRNA表达也在相应时间段增加; 转染Homo-488 siRNA下调HBE

细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA表达, 导致共培养的巨噬细胞Cav-1 mRNA表达也明显降低, 并且再以CoCl<sub>2</sub>刺激HBE也不能明显增加巨噬细胞Cav-1 mRNA表达量, 这些变化与巨噬细胞趋化数目、细胞上清中细胞因子变化趋势基本一致, 提示低氧环境下支气管上皮细胞HIF-1 $\alpha$ 的上调及由此引起的共培养巨噬细胞Cav-1表达增加可能是巨噬细胞趋化、炎症细胞因子生成和表型转化的关键环节。本实验还观察到巨噬细胞Cav-1表达和与之伴随的细胞上清中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 浓度增加, 这似乎与既往研究<sup>[12]</sup>中Cav-1减弱巨噬细胞促炎细胞因子生成的现象不一致, 可能反映了局部炎症条件下细胞功能的特异性差异和上皮-巨噬细胞间复杂的相互作用, 而巨噬细胞Cav-1表达上调又可能与TNF- $\alpha$ 生成增多有关<sup>[11]</sup>。已知巨噬细胞Cav-1调节转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号<sup>[14]</sup>, 促进M2表型分化, 增强巨噬细胞吞噬活性, 这似乎可以解释笔者前期研究(待发表)中观察到的与本实验同样处理的上皮细胞诱导共培养巨噬细胞吞噬活性增强及表型变化的现象, 提示Cav-1可能成为抑制局部炎症反应的新型治疗靶点之一。

综上, COPD患者受扰动的气道上皮细胞和巨噬细胞间的交叉对话诱导各自HIF-1 $\alpha$ , Cav-1的表达上调, 促进了巨噬细胞趋化因子和致炎因子表达的时间性改变, 从而在气道慢性炎症发生和发展过程中具有重要作用。

**利益冲突声明:** 作者声称无任何利益冲突。

## 参考文献

- [1] Kaku Y, Imaoka H, Morimatsu Y, et al. Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on alveolar macrophages in the lungs of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87400.
- [2] Belchamber KBR, Donnelly LE. Macrophage dysfunction in respiratory disease[J]. Results Probl Cell Differ, 2017, 62: 299-313.
- [3] 秦岭, 冯俊涛, 胡成平, 等. 呼吸道合胞病毒感染支气管上皮细胞介导IL-8致Th17/Treg失衡[J]. 中南大学学报(医学版), 2016, 41(4): 337-344.  
QIN Ling, FENG Juntao, HU Chengping, et al. Bronchial epithelial cells infected by respiratory syncytial virus mediated IL-8-induced Th17/Treg imbalance[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2016, 41(4): 337-344.
- [4] Lee SH, Lee SH, Kim CH, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in lung tissue of patients with chronic bronchitis[J]. Clin Biochem, 2014,

- 47(7/8): 552-559.
- [5] Royce SG, Le Saux CJ. Role of caveolin-1 in asthma and chronic inflammatory respiratory diseases[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2014, 8(3): 339-347.
- [6] Fu Y, Moore XL, Lee MK, et al. Caveolin-1 plays a critical role in the differentiation of monocytes into macrophages[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): e117-e125.
- [7] Eapen MS, Hansbro PM, McAlinden K, et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13392.
- [8] Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, et al. Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1): 24-30.
- [9] Moermans C, Heinen V, Nguyen M, et al. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Cytokine*, 2011, 56(2): 298-304.
- [10] Polke M, Seiler F, Lepper PM, et al. Hypoxia and the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 $\alpha$  suppress the host defence of airway epithelial cells[J]. *Innate Immun*, 2017, 23(4): 373-380.
- [11] Jin Y, Lee SJ, Minshall RD, et al. Caveolin-1: a critical regulator of lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300(2): L151-L160.
- [12] Wang XM, Kim HP, Song R, et al. Caveolin-1 confers antiinflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(4): 434-442.
- [13] Lim JS, Nguyen KC, Nguyen CT, et al. Flagellin-dependent TLR5/caveolin-1 as a promising immune activator in immunosenescence[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(5): 907-915.
- [14] Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF $\beta$ [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(8): 554-567.

(本文编辑 彭敏宁)

**本文引用:** 陈兴无, 秦立龙, 孙珍贵, 邢敏, 臧蕾蕾, 王寒黎. 低氧条件下气道上皮细胞增加巨噬细胞趋化和炎症因子的分泌[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2019, 44(2): 134-143. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.004

**Cite this article as:** CHEN Xingwu, QING Lilong, SUN Zhengui, XING Min, ZANG Leilei, WANG Hanli. Airway epithelial cells increase macrophage chemotaxis and inflammatory cytokine secretion under hypoxic conditions[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2019, 44(2): 134-143. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.004