

缺氧环境中 RA 滑膜成纤维细胞促进巨噬细胞向 M2 极化

成宇, 丁梦蕾, 叶蓓, 司玉莹, 陈存存, 虞珊珊, 宗明, 范列英

(同济大学附属东方医院 检验科, 上海 200120)

摘要: 研究模拟 RA 患者关节腔特征性缺氧环境, 探索滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)对巨噬细胞向经典活化型巨噬细胞(classically activated macrophage, M1)和替代活化型巨噬细胞(alternatively activated macrophage, M2)极化的影响, 探讨巨噬细胞在 RA 进展中的作用。利用抗 M1、M2 特征性表面标志(CD119 和 CD206)抗体对 RA 组和对照组[骨关节炎(osteoarthritis, OA)]患者关节滑膜组织进行免疫组织化学染色, 分析 M1、M2 数量及比值。佛波酯体外诱导人单核细胞(THP-1)为 M0 巨噬细胞, 用 Transwell 非接触式共培养体系将 RA-FLS 与 M0 置于缺氧和常氧培养箱共培养, 实时荧光定量 PCR 及免疫荧光法检测 M0 极化情况。免疫组织化学结果显示, RA 组的 M1 和 M2 细胞数量多于 OA 组, M1/M2 比值低于 OA 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。21% O₂ 培养箱中共培养体系巨噬细胞 M1 表型基因 *CCR7*、*TNF- α* 的 mRNA 表达水平高于单独培养组, *NOS-2* 的 mRNA 表达水平低于单独培养组, M2 表型基因 *IL-10*、*TGF- β* 的 mRNA 表达水平低于单独培养组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 3% O₂ 培养箱中共培养体系巨噬细胞 M1 和 M2 表型基因的 mRNA 表达水平平均高于单独培养组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。细胞免疫荧光检测结果与实时荧光定量 PCR 一致。以上结果提示缺氧环境下 RA-FLS 有促进巨噬细胞向 M2 极化的作用。

关键词: 类风湿关节炎; 滑膜成纤维细胞; 缺氧; 替代活化型巨噬细胞

中图分类号: R392.12

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)04-0265-06

RA 是一种病因未明的全身性自身免疫性疾病, 与其他同类疾病类似, 其主要特征是多种免疫细胞及其分泌的炎症介质在滑膜组织中的浸润^[1]。在 RA 滑膜中, 增殖活跃的滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)与大量浸润的炎症细胞引起滑膜组织的慢性炎症、增生以及血管翳形成, 最终导致关节软骨和骨组织的进行性破坏^[2, 8]。巨噬细胞在 RA 的发病中起重要作用, 处于炎症微环境的滑膜组织和软骨-血管连接处有大量活化的巨噬细胞^[3]。滑膜组织中浸润的巨噬细胞根据表型及功能大致分为两型: 一种是发挥促炎功能的经典活化型巨噬细胞(classically activated macrophage, M1); 另一种是清除碎片, 促进组织修复的替代活化型巨噬细胞(alternatively activated macrophage, M2)^[6]。已有研究证实, 滑膜巨噬细胞的浸润程度与关节破坏的进展程度呈正相

关^[4]。滑膜组织中 M1/M2 比例的失衡是导致慢性滑膜炎迁延不愈的重要原因之一^[7]。本研究采用免疫组织化学染色分析 RA 患者关节滑膜组织中 M1、M2 细胞数量及比例, 并建立 RA-FLS 与 M0 巨噬细胞共培养体系, 通过模拟 RA 关节腔内缺氧微环境研究在常氧和缺氧状态下 RA-FLS 对巨噬细胞 M0 极化的影响。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 实验对象 滑膜组织取自同济大学附属东方医院 2011 年 3 月至 2012 年 4 月于风湿免疫科就诊的 RA 患者(女性 10 例, 男性 2 例, 年龄 46~70 岁, 平均年龄 58 岁)和骨关节炎(osteoarthritis, OA)患者(女性 5 例, 男性 1 例, 年龄 39~71 岁, 平均年龄 56 岁)(表 1)。样本来自关节镜手术切除和常规病理检查后剩余的滑膜组织。人单核细胞(THP-1)购自中国科学院干细胞库, RA-FLS 由本课题组冻存。研究经该医院医学伦理委员会批准, 且均取得患者的知情同意。

1.1.2 试剂及仪器 RPMI 1640 培养液、DMEM 培养液、FCS、青链霉素混合液即双抗购自 Gibco 公

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671599);上海市浦东新区卫生系统重点学科(PWZxk2017-09)

作者简介: 成宇(1993-),女,硕士生,主要从事 RA 诊断和治疗相关研究

通信作者: 范列英(E-mail: flieying@hotmail.com)

表1 OA患者的临床和血清学特征

| 编号 | 诊断 | 性别 | 年龄(岁) | CRP(mg/L) | ESR(mm/h) | RF(IU/mL) | 抗 CCP 抗体(U/mL) |
|----|----|----|-------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| 1 | OA | 女 | 63 | 102 | 6 | 12 | 15 |
| 2 | OA | 男 | 57 | 23 | 8 | 4 | 15 |
| 3 | OA | 女 | 58 | 6 | 6 | 12 | 13 |
| 4 | OA | 女 | 71 | 24 | 2 | 1 | < 5 |
| 5 | OA | 女 | 48 | 24 | 8 | 34 | 45 |
| 6 | OA | 女 | 39 | 32 | 14 | 2 | 13 |

司；佛波酯购自 Sigma-Aldrich 公司；羊抗人 CD197-FITC 抗体和兔抗人 CD206-PE 抗体购自 Abcam 公司；TRIzol 试剂购自 TaKaRa 公司；M-MLV 反转录酶试剂购自 Promega 公司；SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) 试剂盒购自 TaKaRa 公司。实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。实时荧光定量 PCR 仪来自 Applied Biosystems 公司，正置荧光显微镜来自 Leica 公司。本研究经同济大学附属东方医院医学伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组织化学染色 将 12 份 RA 和 6 份 OA 滑膜组织样本制成石蜡切片，采用 SABC 染色法将切片脱蜡脱水。用 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 以清除内源性过氧化物酶。加 20% 正常山羊血清室温封闭 30 min 后，加一抗 4 °C 过夜，加入相应二抗室温孵育 1 h，加 DAB 显色。显微镜下观察切片，阳性部位呈棕褐色，细胞核呈蓝色。200 倍放大后每一份样本计数 30 个视野中的阳性细胞，取平均值用以计算 M1/M2 比值。

1.2.2 人巨噬细胞的体外诱导培养 取对数生长

期的 THP-1 接种于 24 孔培养板，加入 100 ng/mL 佛波酯，于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 48 h。得到的贴壁细胞即为 M0 巨噬细胞，用于后续实验。

1.2.3 RA-FLS 的培养 用含 10% FCS 的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 RA-FLS。

1.2.4 M0 与 RA-FLS Transwell 共培养体系的建立 将 4~6 代处于对数生长期的 RA-FLS 以 1 × 10⁴ 个/孔接种于 Transwell 共培养小室，放入培养箱。待 RA-FLS 贴壁后，将小室移入含有已诱导 M0 的 24 孔板中(培养板中已更换新鲜培养液)，分别放入含 21% 和 3% O₂ 的培养箱中，共培养 48 h。以 M0 单独培养组为对照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测 共培养 48 h 后，提取 RNA 并反转录为 cDNA，按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) 实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书配制 20 μL 反应体系，在全自动 PCR 仪上扩增。反应条件为 95 °C 变性 30 s，95 °C 5 s，60 °C 34 s，二步法扩增 40 个循环。另溶解曲线分析采用 95 °C 15 s，60 °C 30 s，95 °C 15 s，解离时间为 4 s。引物序列如下(表 2)。目的基因的相对 mRNA 表达量 = 2^{-ΔΔC_t}。

表2 引物序列

| 基因 | 正向引物(5→3) | 反向引物(5→3) |
|--------|------------------------|-----------------------|
| GAPDH | ACCATGGGGAAGGTGAAG | AATGAAGGGGTCATTGATGG |
| CCR7 | GCATTTGTAGTCCTGCTGCG | CTCCTCAGATCTCACCCGTTG |
| TNF-α | TCTTCTCGAACCCCGAGTGAC | GGTACAGGCCCTCTGATG |
| IL-10 | CACTGCTCTGTTGCTGGTC | GAAGCATGTTAGGCAGGTTGC |
| NOS-2 | CATGAGCCCTTCATCAATGC | TTGAAGTCTGTGTCCGAAGGC |
| TGF-β | CCGAGAAGCGGTACCTGAAC | CGCCAGGAATTGTTGCTGTA |
| CCL-18 | ACTCTGACCACTTCTCTCTGCC | ACTTGGAAGATGTCGCCTGA |

1.2.6 免疫荧光法检测共培养体系中 M1、M2 标志蛋白的表达 将 M0 铺于洁净无菌的载玻片上，将其放入共培养体系的下室。与 RA-FLS 共培养后，用镊子取出玻片，置于新的 24 孔板中，4%甲

醛交联固定 30 min，洗去固定液。加入 0.2% Triton-100 透化 2~5 min，用 1% BSA 封闭 30 min 后加入一抗稀释液，4 °C 孵育过夜；PBS 清洗 3 次后加入二抗孵育，常温避光孵育 1 h。用按

1:5 000 稀释的 DAPI 染色 2~5 min。晾干后封片,在荧光显微镜下观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,每组数据来自 3 次独立实验。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用配对样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD197⁺ 细胞和 CD206⁺ 细胞在人 RA 和 OA

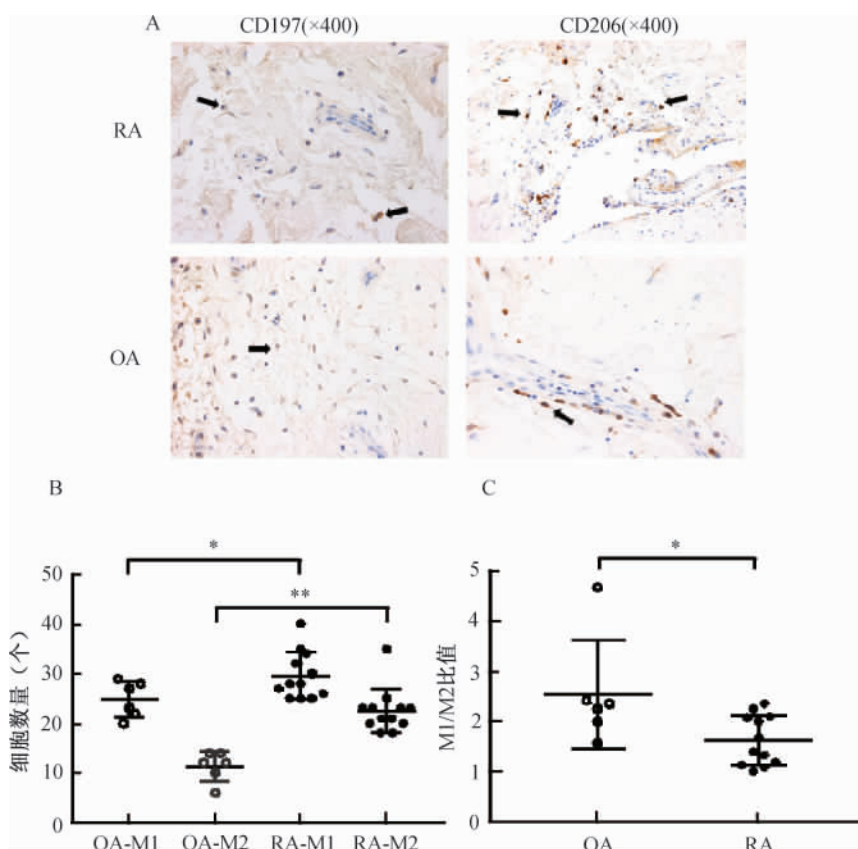


图1 RA和OA滑膜组织中M1和M2的分布以及M1/M2比值情况

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

2.2 不同氧浓度及培养体系对巨噬细胞极化分子 mRNA 水平的影响 RA-FLS 与 M0 共培养模拟了巨噬细胞体内生长微环境。共培养 48 h 后,抽提下室巨噬细胞中的 RNA,反转录成 cDNA 后采用实时荧光定量 PCR 检测 *CCR7*、*TNF- α* 、*CCL18*、*IL-10*、*TGF- β* 、*NOS-2* 的 mRNA 表达水平。在 21% O_2 浓度下,共培养体系中巨噬细胞 M1 表型基因 *CCR7*、*TNF- α* 的 mRNA 相对表达水平分别为 2.524 ± 0.124 和 5.696 ± 1.461 ,较对照组明显升高 ($P < 0.01$),*NOS-2* 的 mRNA 相对表达水平为 0.062 ± 0.007 ,较对照组明显下降 ($P < 0.01$);

关节滑膜组织中的表达 使用抗 CD197 抗体标记 M1 细胞,抗 CD206 抗体标记 M2 细胞,对 RA 和 OA 患者关节滑膜组织进行免疫组织化学染色(图 1A),并计数阳性细胞数量。结果显示,RA 组中 M1 和 M2 的数量均显著高于 OA 组 ($P < 0.05$, $P < 0.001$,图 1B);RA 组 M1/M2 比值为 1.633 ± 0.144 ,OA 组 M1/M2 比值为 2.544 ± 0.443 (图 1C, $P < 0.05$)。

M2 表型基因 *IL-10*、*TGF- β* 的 mRNA 相对表达水平分别为 0.114 ± 0.024 、 0.453 ± 0.017 ,明显低于单独培养组 ($P < 0.05$) (图 2)。在 3% O_2 浓度下,共培养体系中巨噬细胞 *CCR7*、*NOS-2*、*TNF- α* 的 mRNA 相对表达水平分别为 6.290 ± 0.804 、 2.780 ± 0.480 、 4.051 ± 0.350 ,*CCL18*、*IL-10* 的 mRNA 相对表达水平分别为 4.094 ± 0.406 、 1.683 ± 0.113 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$,图 3)。缺氧条件下,与单独培养组相比,除 M1 表型基因 mRNA 表达水平升高外,M2 表型基因的 mRNA 水平也显著提高,表明缺氧条件下共培养体系中巨

噬细胞向 M1 和 M2 极化均增加。

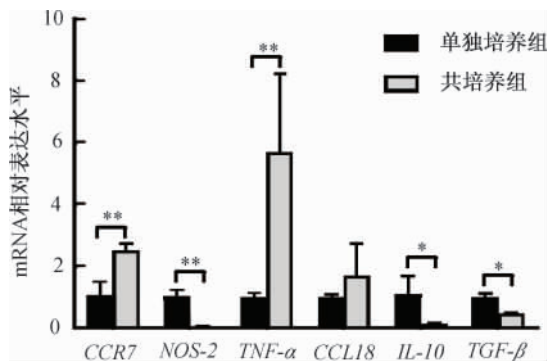


图2 21% O₂ 浓度下 RA-FLS 与 M0 共培养后 M1、M2 表型基因 mRNA 表达情况

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 不同氧浓度对共培养体系中巨噬细胞极化分子蛋白表达水平的影响

共培养 48 h 后, 采用免疫荧光法对 M1 和 M2 的表面标志 CD197 和 CD206 进行

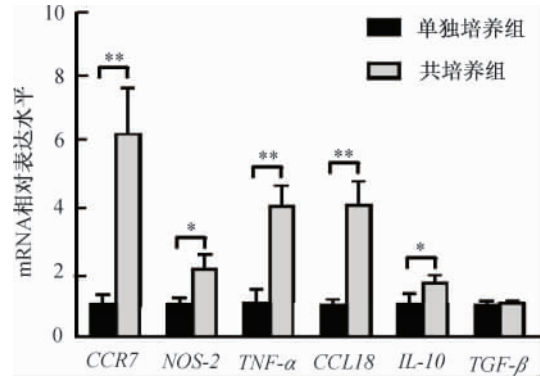


图3 3% O₂ 浓度下 RA-FLS 与 M0 共培养后 M1、M2 表型基因 mRNA 表达情况

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

染色, 荧光显微镜下观察并拍照。结果显示, 在缺氧的共培养体系中, M1、M2 极化均明显多于常氧组(图 4)。

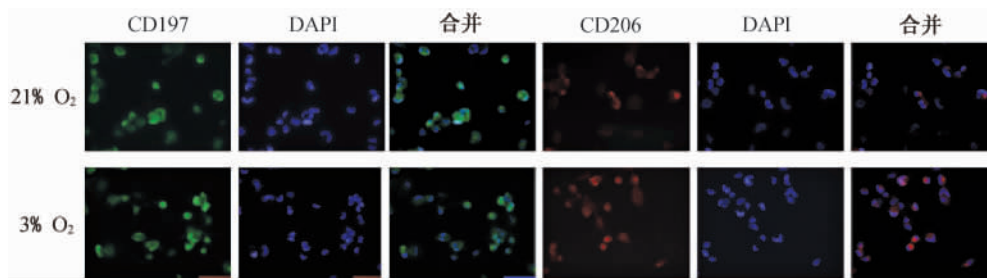


图4 不同 O₂ 浓度下 RA-FLS 与 M0 共培养后 M1 和 M2 标志分子的表达情况

2.4 不同氧浓度下共培养体系中 RA-FLS 内 TGF-β 的表达情况

实时荧光定量 PCR 检测共培养体系上室的 RA-FLS 中 TGF-β 的 mRNA 表达水平。在 3% O₂ 浓度下, RA-FLS 中 TGF-β mRNA 相对表达水平为 7.664 ± 0.059 , 与 21% O₂ 浓度组相比差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 5)。

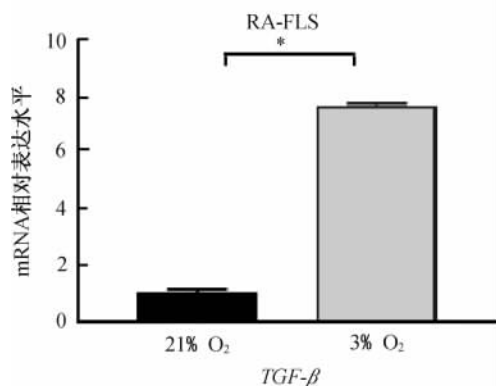


图5 不同氧浓度对共培养体系 RA-FLS 内 TGF-β 的 mRNA 表达水平影响

注: * $P < 0.001$

3 讨论

RA 是一种病因复杂的自身免疫性疾病, 其特征性病理变化为关节滑膜组织的异常增生以及慢性炎症的迁延不愈^[10-11]。关节腔内大量异常增殖的细胞过度消耗 O₂, 造成关节腔内特有的缺氧环境, 使 RA-FLS 和多种免疫细胞组成了类似肿瘤组织的炎症微环境^[9]。大多数研究认为 RA 的慢性炎症多由 M1 释放的促炎因子引起。Zhu 等^[12]采用 FACS 发现 RA 患者滑膜液中的巨噬细胞 M1/M2 比值为 32.76 ± 11.02 , 显著高于 OA 组。RA 中 Notch 信号通路等多条通路的激活引发大量 M1 活化, 加重滑膜炎症状^[6]。现普遍认为 RA-FLS 活化后通过旁分泌作用刺激外周血单核细胞进入关节腔分化成巨噬细胞^[5], 但极少有研究揭示关节腔内 RA-FLS 对巨噬细胞极化的影响。本研究通过免疫组织化学染色分析 RA 和 OA 患者关节滑膜组织中 M1/M2 比例, 结果显示 RA 中 M1/M2 比值为 1.633 ± 0.144 , M2 所占比例显著高于 OA, 与以

往报道结果不一致。可能原因为不同检测方法导致的细胞损伤及结果判读方式不同。免疫组织化学染色法基于对滑膜组织中的细胞进行染色与定位,而细胞在滑膜组织与滑膜液中的分布也有区别。Misharin 等^[13]的研究揭示了在 RA 进展期巨噬细胞可由 M1 转变为 M2,以促进损伤修复。RA-FLS 与巨噬细胞在常氧状态下共培养后其分泌的成纤维细胞因子能够强烈抑制 M1 的促炎活性,并增强了促进 M2 极化的基因的表达^[14]。M1/M2 比例失衡可能是导致 RA 慢性滑膜炎的原因之一, M2 虽被认为可改善炎症^[21],但目前尚未有研究证实 M2 能够在 RA 关节中缓解炎症。本研究中免疫组织化学结果显示 RA 患者滑膜中 M1、M2 数量均多于 OA, M2 的数量差异更为显著。

本研究利用佛波酯将 THP-1 诱导分化为 M0, 采用 Transwell 共培养体系将 RA-FLS 与 M0 分别在常氧和缺氧条件下共培养, 结果提示在常氧共培养体系中巨噬细胞向 M1 极化增加, M2 极化被抑制, 缺氧则使共培养体系中 M1 和 M2 的极化均显著增加, 与临床标本的免疫组织化学染色结果相一致。OA 患者关节腔内氧分压高于 RA, 其滑膜炎症反应主要由 M1 分泌的 IL-1 和 TNF- α 引起^[15]。研究证实, 缺氧导致巨噬细胞中多种基因表达发生变化, 并通过驱动 NF- κ B 信号通路促进巨噬细胞向 M1 极化, 上调 IL-1 β 等促炎因子的表达^[16]。增加的 M2 一方面可能来源于缺氧环境下 M1 向 M2 转化, 另一方面也可能是 RA-FLS 在缺氧环境中分泌的细胞因子促进 M2 极化。本研究结果显示共培养体系中 RA-FLS 内 TGF- β 的 mRNA 表达水平升高, 而 TGF- β 同时也是 M2 的诱导剂^[22], 提示缺氧环境使 RA-FLS 分泌更多的 TGF- β , 促进巨噬细胞向 M2 极化并分泌 TGF- β 等抑炎因子以起负反馈调节作用^[17]。另有研究证实 RA-FLS 分泌的 TGF- β 有增强其自身增殖能力的作用, 且 TGF- β 作为一种白细胞趋化因子, 能够促进单核细胞聚集黏附从而加重慢性疾病中炎症细胞的过度浸润^[23]。在进展期肿瘤组织中同样存在缺氧微环境, 肿瘤相关巨噬细胞以 M2 型为主, M2 型巨噬细胞分泌血管内皮细胞生长因子以及多种基质蛋白酶, 促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[18-20]。在 RA 患者的滑膜炎症中, M2 导致的炎症微环境是否与 RA-FLS 获得类似肿瘤细胞的过度增殖和侵袭能力有关, 目前尚未有研究报道, 具体情况有

待于进一步研究。

综上, 本研究发现在 RA 关节滑膜中 M1/M2 比值较 OA 组有明显差异, 且 M1、M2 数量均多于 OA。RA-FLS 能够促进 M1 极化, 且与氧浓度变化无关, 缺氧环境下 RA-FLS 不仅增强了巨噬细胞向 M1 极化, 同时也能显著增加其向 M2 极化, 然而 M2 是否能在 RA 关节中发挥缓解炎症的作用, 以及它是否与 RA-FLS 的迁移、促进滑膜组织进一步增生有关, 需要在后续的研究中进行探讨。

参考文献

- [1] Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis[J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 397-440.
- [2] Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(1): 444-450.
- [3] Bresnihan B. Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis[J]. *J Rheumatol*, 1999, 26(3): 717-719.
- [4] Hamilton JA, Tak PP. The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5): 1210-1221.
- [5] Wang Y, Han CC, Cui D, *et al.* Is macrophage polarization important in rheumatoid arthritis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 345-352.
- [6] Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, *et al.* Macrophages in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(3): 189-202.
- [7] Darrieutort-Laffite C, Boutet MA, Chatelais M, *et al.* IL-1 β and TNF- α promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. *Mediators Inflamm*, 2014: 241840.
- [8] Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, *et al.* Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(5): 361-367.
- [9] Biniecka M, Fox E, Gao W, *et al.* Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(8): 2172-2182.
- [10] Ospelt C, Neidhart M, Gay RE, *et al.* Synovial activation in rheumatoid arthritis[J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 2323-2334.
- [11] 童萍, 何东仪. 雷公藤及其提取物对类风湿关节炎免疫调节机制的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2016, 36(3): 250-252.
- [12] Zhu W, Li X, Fang S, *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies induce macrophage subset disequilibrium in RA patients[J]. *Inflammation*, 2015, 38(6): 2067-2075.
- [13] Misharin AV, Cuda CM, Saber R, *et al.* Nonclassical Ly6C (-) monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(2): 591-604.
- [14] Donlin LT, Jayatilleke A, Giannopoulou EG, *et al.* Modula-

- tion of TNF-induced macrophage polarization by synovial fibroblasts[J]. *J Immunol*, 2014, 193(5): 2373-2383.
- [15] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, *et al*. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): R187.
- [16] Fang HY, Hughes R, Murdoch C, *et al*. Hypoxia inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia[J]. *Blood*, 2009, 114(4): 844-859.
- [17] Gonzalo-Gil E, Galindo-Izquierdo M. Role of transforming growth factor-beta (TGF) beta in the physiopathology of rheumatoid arthritis[J]. *Reumatol Clin*, 2014, 10(3): 174-179.
- [18] Allavena P, Sica A, Solinas G, *et al*. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 66(1): 1-9.
- [19] 刘起会,朱迅,闫东梅. 巨噬细胞的极化及其在肿瘤中作用的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2012, 32(2): 168-171.
- [20] Mason SD, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(4): 228-237.
- [21] Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical *vs* functional differentiation[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 514.
- [22] Oishi S, Takano R, Tamura S, *et al*. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation[J]. *Immunology*, 2016, 149(3): 320-328.
- [23] Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, *et al*. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(10): 4577-4581.

Fibroblast-like synoviocytes of RA promote M2 macrophages activation in hypoxic environment

CHENG Yu, DING Meng-lei, YE Bei, SI Yu-ying, CHEN Cun-cun, Yu Shan-shan, ZONG Ming, FAN Lie-ying (*Department of Clinical Laboratory, Shanghai East Hospital, School of Medicine, Tong Ji University, Shanghai 200120, China*)

Abstract: The joint cavity in patients suffered from RA has a characteristic hypoxic environment. In this study, we aimed to investigate the effect of fibroblast-like synoviocyte (FLS) on the polarization of macrophage to classically activated macrophage (M1) and alternatively activated macrophage(M2), and the role of macrophages in RA progression. Immunohistochemistry method was used to stain the characteristic surface markers CD119 and CD206 representing respectively M1 and M2 in the synovial tissue from RA and OA patients, and the number and proportion of M1 and M2 were analyzed. THP-1 cells were induced into M0 by PMA and then co-cultured with RA-FLS in the co-culture system, duplicates of Transwell system were placed in hypoxic and normoxic incubators respectively. Real-time PCR and immunofluorescence were used to detect the polarization of M0. The results showed that the numbers of M1 and M2 cells in the RA were higher than those in the OA, whereas the M1/M2 ratio was lower than that in the OA ($P < 0.05$). After co-cultured with RA-FLS, the mRNA expression levels of the gene encoding M1 phenotype *CCR7* and *TNF- α* were both increased while the expression levels of mRNA of M2 phenotype genes (*IL-10*, *NOS-2* and *TGF- β*) were inhibited in 21% O_2 group ($P < 0.05$). In 3% O_2 group, the mRNA expression levels of M1 and M2 phenotype genes in macrophages were both increased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$), and the results of immunofluorescence were consistent with those acquired from real-time PCR. In conclusion, our study shows that RA-FLS can promote activation of M2-type macrophage under hypoxic environment.

Key words: rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; hypoxia; M2