

L929 细胞条件培养基诱导培养的小鼠原代巨噬细胞生物学特性对比

王伟¹, 秦贻¹, 王亚茹¹, 邹节节¹, 陈静¹, 陈金武¹, 张雁¹, 耿明¹, 徐忠东¹, 戴敏², 潘礼龙³

1 合肥师范学院 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 安徽中医药大学 药学院, 安徽 合肥 230012

3 江南大学 医学院, 江苏 无锡 214122

王伟, 秦贻, 王亚茹, 等. L929 细胞条件培养基诱导培养的小鼠原代巨噬细胞生物学特性对比. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1431-1439.

Wang W, Qin Y, Wang YR, et al. Characteristic comparison of mouse primary macrophages cultured in L929 cell conditioned medium. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1431-1439.

摘要: 本研究旨在对比分析小鼠骨髓源巨噬细胞 (BMDM) 和腹腔巨噬细胞 (PM) 原代培养及巨噬细胞生物学特性差异, 为合理选择原代巨噬细胞培养方法提供参考依据。原代培养小鼠 BMDM 和 PM, 细胞计数仪测定细胞数量, 倒置显微镜观察形态学变化, 流式细胞仪检测细胞纯度, CCK-8 法测定细胞增殖, 中性红吞噬实验测定细胞吞噬功能, 实时荧光定量 PCR 分析巨噬细胞表型变化。结果显示, BMDM 原代培养获取的细胞数量显著高于 PM ($P < 0.01$), PM 贴壁及伸展时间早于 BMDM。BMDM 中 F4/80⁺CD11b⁺ 百分比 ($98.30\% \pm 0.53\%$) 高于 PM ($94.83\% \pm 1.42\%$), 但无统计学差异 ($P > 0.05$)。在 L929 细胞条件培养基培养体系中, BMDM 增殖能力显著高于 PM ($P < 0.001$)。吞噬实验发现, 基础状态下 BMDM 吞噬能力显著高于 PM ($P < 0.01$), 经 LPS 刺激 24 h 后, 除低剂量 LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 外, BMDM 吞噬能力均显著高于 PM ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 提示 BMDM 吞噬能力在基础和激活状态下均强于 PM。巨噬细胞极化实验发现, 基础状态下 *Tnfa* 在 BMDM 中表达显著高于 PM ($P < 0.001$), *Arg1* 和 *Yml* 在 BMDM 中表达显著低于 PM ($P < 0.001$), 这一差异在极化诱导剂 (LPS+IFN- γ 或 IL-4) 处理后依然存在。上述结果表明, 原代培养 BMDM 较 PM 可获取更多细胞, 且两种细胞在吞噬功能和极化状态上存在一定生物学差异, 应谨慎合理选择巨噬细胞原代培养方法。

关键词: 巨噬细胞, 原代培养, 增殖, 吞噬功能, 极化

Received: November 19, 2019; **Accepted:** March 3, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81973322, 81573420, 81773937), Natural Science Foundation of Anhui Province, China (Nos. 2008085MH270, 1908085MH263), Key Projects of Anhui Province University Outstanding Youth Talent Support Program (Nos. gxyqZD2016235, gxgnfx2019025), National Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. 201814098058).

Corresponding authors: Wei Wang. Tel: +86-551-63674150; E-mail: weiw@hfnu.edu.cn

Min Dai. Tel: +86-510-65121176; E-mail: daiminliao@163.com

国家自然科学基金(Nos. 81973322, 81573420, 81773937), 安徽省自然科学基金 (Nos. 2008085MH270, 1908085MH263), 安徽省高等学校优秀青年人才基金 (Nos. gxyqZD2016235, gxgnfx2019025), 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 201814098058) 资助。

网络出版时间: 2020-04-07

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200403.2241.002.html>

Characteristic comparison of mouse primary macrophages cultured in L929 cell conditioned medium

Wei Wang¹, Yi Qin¹, Yaru Wang¹, Jiejie Zou¹, Jing Chen¹, Jinwu Chen¹, Yan Zhang¹, Ming Geng¹, Zhongdong Xu¹, Min Dai², and Lilong Pan³

¹ School of Life Sciences, Hefei Normal University, Hefei 230601, Anhui, China

² School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China

³ School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: The purpose of this study is to provide a culture for mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM) and peritoneal macrophages (PM) and to characterize their molecular and cellular biology. The cell number and purity from the primary culture were assessed by cell counter and flow cytometry, respectively. Morphological features were evaluated by inverted microscope. Phagocytosis by macrophages was detected by the neutral red dye uptake assay. Phenotypic markers were analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. Our results show that the cell number was much higher from culture of BMDM than PM, while there was no significant difference regarding the percentage of F4/80⁺CD11b⁺ cells (98.30%±0.53% vs. 94.83%±1.42%; $P>0.05$). The proliferation rate of BMDM was significantly higher than PM in the presence of L929 cell conditioned medium, by using CCK-8 assay. However, PM appeared to adhere to the flask wall and extend earlier than BMDM. The phagocytosis capability of un-stimulated BMDM was significantly higher than PM, as well as lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BMDM, except the BMDM stimulated by low dose LPS (0.1 μg/mL). Furthermore, *Tnfa* expression was significantly higher in un-stimulated BMDM than PM, while *Arg1* and *Ym1* mRNA expression were significantly lower than PM. The expression difference was persistent if stimulated by LPS+IFN-γ or IL-4. Our data indicate that bone marrow can get larger amounts of macrophages than peritoneal cavity. However, it should be aware that the molecular and cellular characteristics were different between these two culture systems.

Keywords: macrophages, primary culture, proliferation, phagocytosis, polarization

巨噬细胞在固有免疫和适应性免疫中都起着至关重要的作用^[1]。巨噬细胞在机体的各种组织中均有分布,其在发育早期阶段就能通过执行特定免疫反应对抗不同类型病原微生物感染,因此是宿主防御系统必不可少的部分。巨噬细胞具有显著的异质性和可塑性,在维持组织稳态、重塑组织、清除细胞碎片、调节免疫反应等方面发挥重要生理作用^[2]。目前已证实,巨噬细胞参与多种炎症性疾病病理过程,包括动脉粥样硬化、哮喘、炎性肠病、类风湿关节炎、纤维化和癌症等^[3-8]。鉴于巨噬细胞在生理及病理过程中的重要作用,基于靶向巨噬细胞功能研究日益增多,而巨噬细胞体外培养在其中扮演不可或缺的角色。

体外培养的巨噬细胞主要来自于永生化细胞系和原代细胞,常用的巨噬细胞细胞系包括人单核细胞株 (THP-1) 和小鼠巨噬细胞株 (RAW 264.7) 等,前者需要在佛波酯 (PMA) 诱导下分

化为巨噬细胞进行后续研究^[9]。相对于经过基因修饰永生化的细胞系,原代细胞生物学性质和特点上更接近于真实的生理及病理环境。目前,原代巨噬细胞培养多来源于小鼠腹腔巨噬细胞 (PM) 和骨髓源巨噬细胞 (BMDM),然而上述两种原代细胞培养难度、培养时间以及生物学功能是否存在差异目前仍不清楚。本实验通过对比分析两种不同来源的小鼠巨噬细胞在细胞数量、形态学、生长曲线、细胞纯度、吞噬和极化功能上的差异,为巨噬细胞原代培养方法的选择提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞

雄性 C57BL/6 小鼠 (体重(22±3) g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:

SCXK (京) 2012-0001。L929 细胞株购于美国 ATCC 公司。

1.1.2 试剂

DMEM 培养基 (高糖型)、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS, 经 56 °C 30 min 热灭活) 购自以色列 BI 公司; 胰蛋白酶购自北京索莱宝生物科技有限公司; 红细胞裂解液、中性红试剂盒、CCK-8 试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司; 细菌脂多糖 (LPS, 大肠杆菌 055:B5) 和巯基乙酸钠购自美国 Sigma-Aldrich 公司; IFN- γ 、IL-4 购自美国 Peprotech 公司; 大鼠抗小鼠 CD11b 抗体 (FITC)、大鼠抗小鼠 CD11b 同型对照抗体 (大鼠 IgG2b, kappa 单克隆抗体-FITC) 购自英国 Abcam 公司; 大鼠抗小鼠 F4/80 抗体 (APC)、大鼠抗小鼠 F4/80 同型对照抗体 (大鼠 IgG2a, kappa 单克隆抗体-APC) 购自美国 eBioscience 公司; Trizol、RNA 酶抑制剂和 SBYR Green 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; M-MLV 逆转录酶购自美国 Promega; 引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成。

1.1.3 仪器

CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, #3111); 细胞计数仪 (美国 Inno-Alliance Biotech 公司, #IC 1000); 全波长多功能酶标仪 (美国 MD 公司, #SpectraMax M2); 倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司, #IX71); 流式细胞仪 (美国 BD 公司, #C6); 台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司, # Allegra X-30R); 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司, #Stepone)。

1.2 方法

1.2.1 L929 细胞培养

常规复苏 L929 细胞, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 24 h 后, 更换培养液 1 次, 继续培养 24 h 后消化传代, 传代过程中离心 (1 000 r/min 5 min) 收集细胞上清液 (L929 细胞条件培养基), 0.22 μ m 滤膜过滤后放置 -80 °C 冰箱保存。

1.2.2 小鼠 PM 原代培养

小鼠腹腔注射 4.0% 巯基乙酸钠 3.0 mL, 刺激 72 h 后颈椎脱臼法处死小鼠, 75% 酒精浸泡 3 min, 超净台内剪开皮肤后充分暴露腹膜, 腹腔注射 4 °C 预冷 RPMI-1640 培养基 4.0 mL, 轻揉小鼠腹部 2 min, 用注射器回抽腹腔灌洗液, 收集于 15 mL 离心管中, 重复抽吸过程 2-3 次。上述操作均需避免刺破腹腔脏器及血管。将获得的细胞悬液离心 (1 000 r/min 5 min) 后弃上清。用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞至培养皿内, 细胞计数仪计算总细胞数, 细胞培养箱 (37 °C、5% CO₂) 培养 2 h 后, 更换培养液去除未贴壁细胞以纯化巨噬细胞^[10], 细胞计数仪计数未贴壁悬浮细胞。PM 细胞数=总细胞数-未贴壁悬浮细胞数。

1.2.3 小鼠 BMDM 原代培养

颈椎脱臼法处死小鼠后放入 75% 的酒精中完全浸没 3-5 min, 分离双侧股骨和胫骨, 仔细去除骨骼外肌组织及结缔组织, 完全暴露出骨质, 放于 75% 酒精内浸泡 5 min 后转移至超净工作台, 眼科剪沿骨垢线剪断长骨两端, 用 DMEM 培养液 (10% FBS+15% L929 细胞条件培养基) 冲洗骨髓腔内细胞, 200 目筛网过滤冲洗液以去除细胞团块和骨骼碎片, 滤液离心 (1 000 r/min 5 min) 后弃上清, 用红细胞裂解液 (1.0 mL) 重悬细胞, 室温裂解 2 min 后加入 10 mL DMEM 培养液, 200 目筛网过滤以去除裂解的红细胞, 滤液离心 (1 000 r/min 5 min) 后用 DMEM 培养液重悬细胞接种至培养皿内, 细胞计数仪分析细胞数量。

1.2.4 巨噬细胞纯度测定

原代细胞以相同密度 (5×10^5 个/mL) 接种 6 孔板, 每孔加入 2.0 mL 细胞悬液。原代细胞培养过程中观察细胞形态学变化。培养 7 d 后, 吸出各孔内细胞培养液, 用 4 °C 预冷的 PBS 清洗后胰蛋白酶消化细胞, 离心弃上清液后每管加入 100 μ L PBS 重悬细胞, 分别加入 CD11b 抗体、CD11b 同型对照抗体、F4/80 抗体和 F4/80 同型对照抗体,

室温下避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测荧光信号 (FL1-H 和 FL4-H 通道)。

1.2.5 细胞增殖检测

胰蛋白酶消化收集原代培养 7 d 后巨噬细胞, 以相同密度 (1×10^4 个/mL) 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ L 细胞悬液。两种来源的巨噬细胞培养液均为 DMEM 培养液 (10% FBS+15% L929 细胞条件培养基)。铺板后第 1、3、5 和 7 天分别使用 CCK-8 法检测细胞活性及增殖情况。每孔内加入 20 μ L 的 CCK-8 溶液, 细胞培养箱内孵育 2 h, 全波长多功能检测仪测定 450 nm 波长下的 OD 值。

1.2.6 巨噬细胞吞噬功能检测

原代细胞以相同密度 (1×10^4 个/mL) 接种于 96 孔板。培养 7 d 后, 采用不同浓度 LPS (0.1、1、10 μ g/mL) 作用细胞 24 h, 每孔加入 20 μ L 中性红染色液, 细胞培养箱内孵育 2 h, 吸出含有中性红染色液的细胞培养液, PBS 洗涤 1 次, 各孔加入 200 μ L 中性红检测裂解液, 室温摇床上裂解 10 min, 全波长多功能检测仪测定 540 nm 波长下的 OD 值。

1.2.7 巨噬细胞极化功能检测

原代细胞培养 7 d 后, 采用 LPS (100 ng/mL)+IFN- γ (20 ng/mL) 作为巨噬细胞 M1 型诱导剂, 采用 IL-4 (20 ng/mL) 作为巨噬细胞 M2 型诱导剂, 分别刺激两种来源巨噬细胞 24 h, 刺激结束后每孔加入 1 mL Trizol 提取总 RNA, 统一 RNA 浓度后逆转录合成 cDNA, 逆转录体系为 DEPC 水 (10.125 μ L)、5 \times Buffer (5 μ L)、dNTPs (1.25 μ L)、RNA 酶抑制剂 (0.625 μ L) 和 M-MLV 逆转录酶 (1 μ L), 反应结束后, 取出 cDNA 样品, 加入 75 μ L DEPC 水, 吹打混匀后备用。实时荧光定量 PCR (qPCR) 反应体系为 2 μ L 模板 cDNA、7 μ L DEPC 水、10 μ L SBYR Green Master Mix、0.5 μ L 上游引物、0.5 μ L 下游引物, 引物序列见表 1。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达水平。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Sequence of the primers for real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>Tnfa</i> -forward	CAGGCGGTGCCTATGTCTC
<i>Tnfa</i> -reverse	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
<i>Nos2</i> -forward	ATCTTTGCCACCAAGATGGCCTGG
<i>Nos2</i> -reverse	TTCCTGTGCTGTGCTACAGTTCCG
<i>Arg1</i> -forward	TGACTGAAGTAGACAAGCTGGGGAT
<i>Arg1</i> -reverse	CGACATCAAAGCTCAGGTGAATCGG
<i>Ym1</i> -forward	ATGAAGCATTGAATGGTCTGAAAG
<i>Ym1</i> -reverse	TGAATATCTGACGGTCTGAGGAG
<i>Gapdh</i> -forward	AAGAAGGTGGTGAAGCAGG
<i>Gapdh</i> -reverse	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT

1.2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 实验数据以平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验 (双尾法), $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 细胞数量分析

细胞计数结果显示, 从单只小鼠腹腔中获取的巨噬细胞数为 $(18.33 \pm 3.63) \times 10^4$ 个/mL, 而经骨髓腔冲洗获得的细胞数为 $(416.70 \pm 72.65) \times 10^4$ 个/mL。经独立样本 *t* 检验 (双尾), $P = 0.0098$, 差异具有显著统计学意义, 说明从骨髓中获取的细胞数显著高于腹腔 (图 1)。

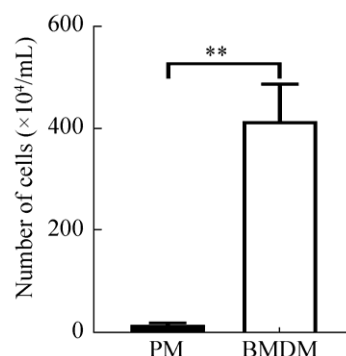


图 1 对比分析不同来源巨噬细胞数量

Fig. 1 Comparison of the number of macrophages from different sources. ** $P < 0.01$.

2.2 细胞形态学观察

倒置显微镜观察发现, PM 贴壁速度快, 细胞在悬浮状态时或者刚开始贴壁时呈圆形, 原代培养 1 d 后呈现出具有突起的不规则形态。骨髓源细胞贴壁速度较 PM 慢, 原代培养 3 d 后部分细胞贴壁生长, 原代培养 7 d 后, 多数细胞开始伸展呈细长梭形, 有钝圆形的突起, 部分细胞呈现出星形, 有伪足和突起, 呈现出典型的巨噬细胞

胞体外培养形态 (图 2)。

2.3 巨噬细胞纯度鉴定

原代培养 7 d 后, 流式细胞仪检测发现, PM 中 $F4/80^+CD11b^+$ 细胞比例为 $94.83\% \pm 1.42\%$, BMDM 中 $F4/80^+CD11b^+$ 细胞比例为 $98.30\% \pm 0.53\%$, 经独立样本 t 检验 (双尾), $P=0.0837$, 差异无统计学意义, 说明两种原代巨噬细胞培养均可获得高纯度的巨噬细胞 (图 3)。

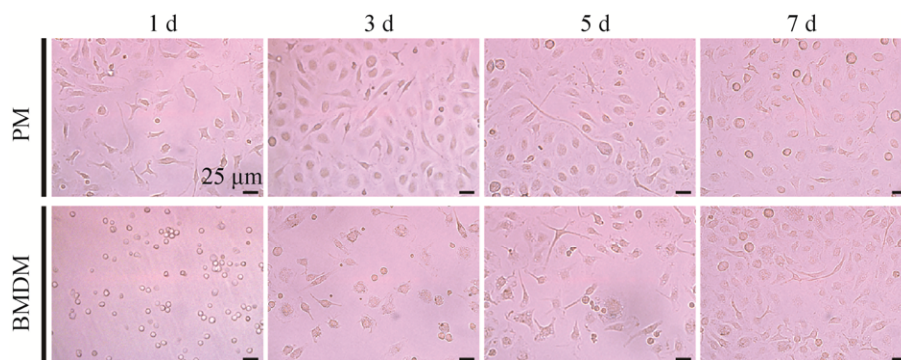


图 2 对比分析不同来源巨噬细胞形态学变化

Fig. 2 Comparison of the morphology of macrophages from different sources (scale bar=25 μ m).

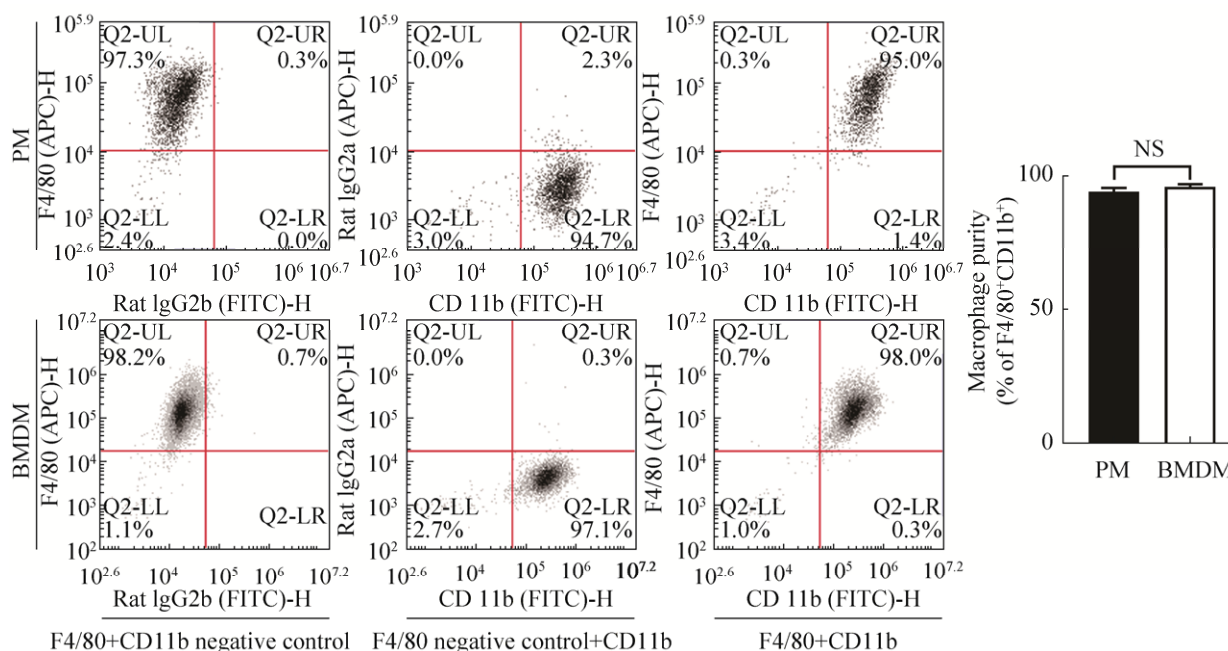


图 3 对比分析不同来源巨噬细胞纯度

Fig. 3 Comparison of the purity of macrophages from different sources.

2.4 巨噬细胞增殖情况

CCK-8 检测结果表明, 两种来源的巨噬细胞生长曲线具有相似特征, 对数生长期均出现在 5–7 d。培养 7 d 后, BMDM 数量显著高于 PM ($P<0.001$), 说明在 L929 细胞条件培养基培养体系中, BMDM 体外增殖能力显著高于 PM (图 4)。

2.5 巨噬细胞吞噬功能检测

中性红检测发现, 基础状态下 PM 吞噬能力显著低于 BMDM ($P<0.01$), 经 LPS 刺激 24 h 后, 除低剂量 LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 外, PM 吞噬能力均显著低于 BMDM ($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 说明不同来源巨噬细胞吞噬能力上存在差异, BMDM 吞噬功能在基础和细菌内毒素 LPS 刺激状态下均强于 PM (图 5)。

2.6 巨噬细胞极化功能检测

qPCR 结果显示, 基础状态下巨噬细胞 M1 型标志基因肿瘤坏死因子- α (*Tnfa*) 在 PM 中表达显著低于 BMDM ($P<0.001$), M2 型标志基因精氨酸酶-1 (*Arg1*) 和类几丁质酶 3 样分子 1 (*Ym1*) 在 PM 中表达显著高于 BMDM ($P<0.001$), 说明基础状态下, 不同来源巨噬细胞 M1/M2 型标志基因表达存在差异 (图 6A)。

与对照组相比, 细胞经 LPS 和 IFN- γ 的共同

诱导后, M1 型标志基因一氧化氮合成酶 2 (*Nos2*) 和 *Tnfa* 在 PM 和 BMDM 中表达均显著升高 ($P<0.001$)。与对照组相比, 细胞经 IL-4 诱导后, M2 型标志基因 (*Arg1* 和 *Ym1*) 在 PM 和 BMDM 中表达均显著升高 ($P<0.001$), 说明两种不同来源的巨噬细胞极化功能均可满足极化实验要求 (图 6B 和 C)。进一步分析发现, 细胞经 LPS 和 IFN- γ 的共同诱导后, *Tnfa* 在 PM 中表达显著低于 BMDM ($P<0.001$) (图 6D)。细胞经 IL-4 诱导后, M2 型标志基因 (*Arg1* 和 *Ym1*) 在 PM 中表达显著高于 BMDM ($P<0.001$) (图 6E), 说明 PM 向 M2 型极化能力可能高于 BMDM, 而在 M1 型极化能力上 BMDM 更占优势。

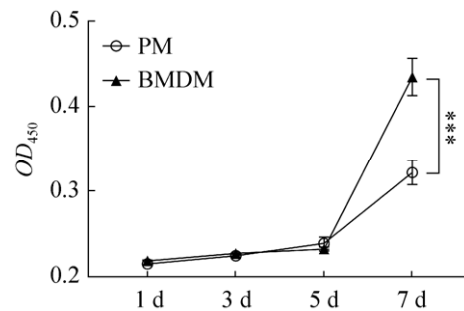


图 4 对比分析不同来源巨噬细胞增殖能力

Fig. 4 Comparison of the proliferation of macrophages from different sources. *** $P<0.001$.

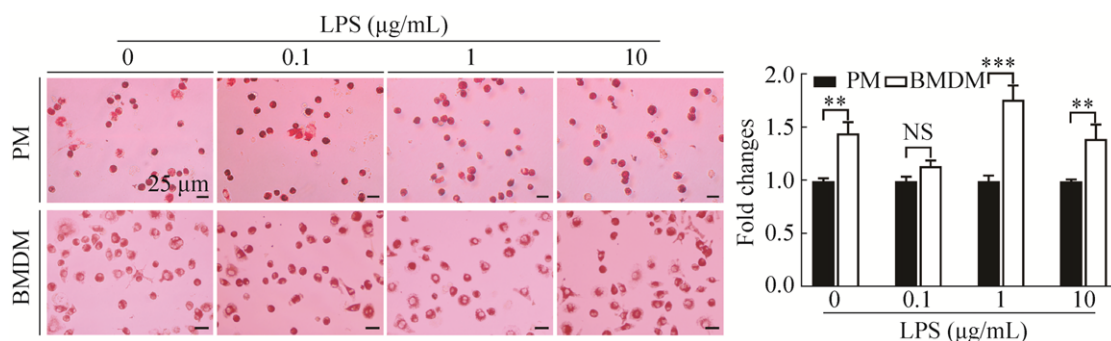


图 5 对比分析不同来源巨噬细胞吞噬功能

Fig. 5 Comparison of the phagocytic function of macrophages from different sources (scale bar, 25 μm). ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

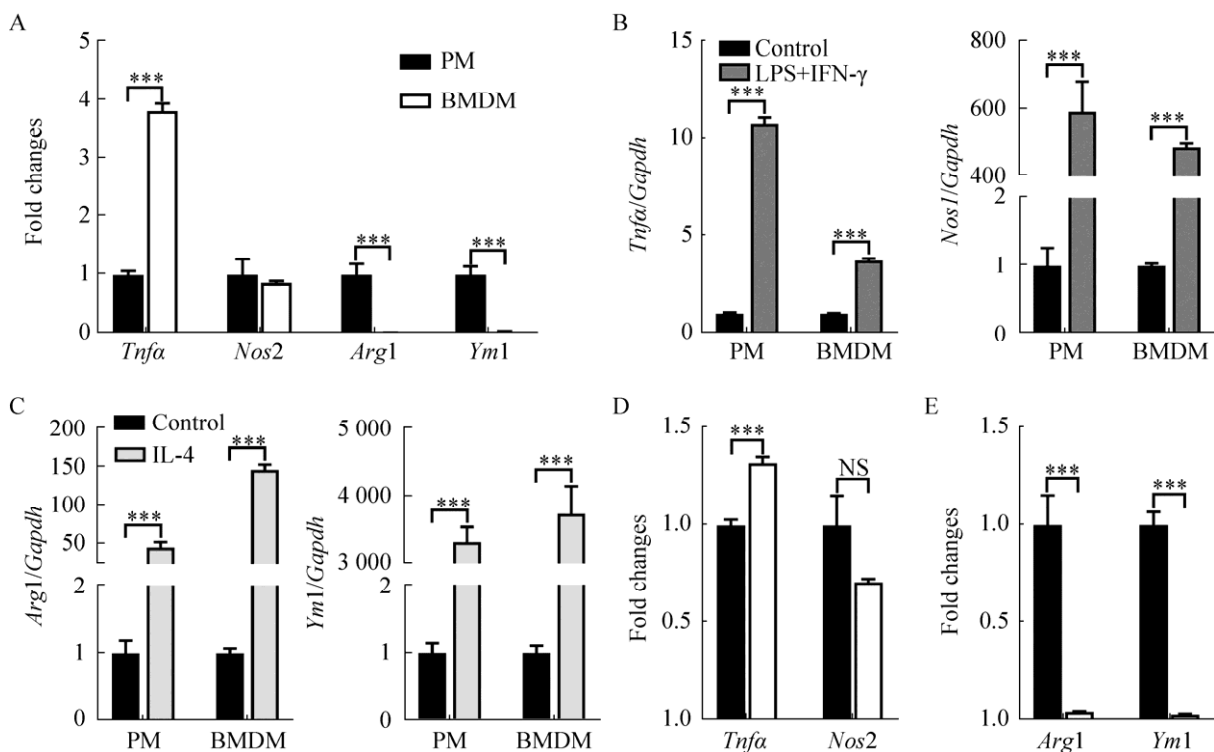


图 6 对比分析不同来源巨噬细胞极化特征

Fig. 6 Comparison of the polarization properties of macrophages from different sources. (A) Untreated cells. (B and D) LPS and IFN- γ treated cells. (C and E) IL-4 treated cells. *** $P < 0.001$.

3 讨论

目前认为, 巨噬细胞并非终分化细胞且广泛分布于多种组织中^[11-12], 然而体外实验中获取大量巨噬细胞仍十分困难。腹腔是小鼠原代巨噬细胞常见来源, 腹腔中除了巨噬细胞外, 还含有大量的淋巴细胞, 包括 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞和自然杀伤 (NK) 细胞, 而巨噬细胞只占其中 35%^[13]。我们发现小鼠经巯基乙酸钠腹腔刺激后, 单只鼠可获取 PM 数量为 $(18.33 \pm 3.63) \times 10^4$ 个/mL。与之前报道一致^[14], 本实验发现单只小鼠经骨髓可获取细胞数为 $(416.70 \pm 72.65) \times 10^4$ 个/mL, 显著高于腹腔 ($P < 0.01$)。细胞增殖实验发现, 在 L929 细胞条件培养基体系中, 不同来源巨噬细胞具有类似的生长曲线, 但 BMDM 增殖能力显著高于 PM。L929 细胞上清液中含有其分泌的巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF), 而 M-CSF 可显著诱导

巨噬细胞增殖^[15]。与本实验发现一致, 在 M-CSF 诱导下, 体外培养的 BMDM 增殖能力显著高于 PM^[16]。在阿霉素诱导的小鼠肾病模型发现, 相对于脾脏源巨噬细胞, 静脉输注的 M2 型 BMDM 在肾脏中显示出更加显著的增殖能力, 但增加的 M2 型 BMDM 却未表现出肾损伤保护作用^[17], 提示巨噬细胞增殖能力可能与其功能和表型稳定呈负相关。

巨噬细胞具有极强的可塑性, 能通过相关受体激活或所处微环境变化进行表型转换^[18-19]。巨噬细胞可极化为具有促炎作用的经典激活表型 (M1 型巨噬细胞) 或具有抗炎、抗纤维化和伤口愈合作用的替代激活表型 (M2 型巨噬细胞)。M1 型巨噬细胞高表达 Fc 受体并产生促炎细胞因子 (MCP-1、IL-6、TNF、IL-12) 和一氧化氮。相反, M2 型巨噬细胞高表达 *Arg1*、*Ym1*、*Il10* 和 *Tgfb* 等基因^[20]。我们发现原代培养 7 d 后, 基础状态下 M1 型巨噬细胞标志基因 *Tnfa* 在 PM 中表达显

著低于 BMDM, M2 型标志基因 *Arg1* 和 *Ym1* 在 PM 中表达显著高于 BMDM, 说明基础状态下, 与 PM 相比, BMDM 更偏向 M1 型状态, 原因可能是骨髓祖细胞经 M-CSF 诱导分化的巨噬细胞多为 M1 型^[21]。M1 型诱导剂 (LPS 和 IFN- γ) 刺激后, M1 型标志基因 *Tnfa* 在 PM 中表达依然显著低于 BMDM, 而 M2 型诱导剂 (IL-4) 诱导细胞后, M2 型标志基因 (*Arg1* 和 *Ym1*) 在 PM 中表达显著高于 BMDM, 提示基础状态下两种不同来源的巨噬细胞表型差异在特定表型诱导剂刺激后依然存在。

巨噬细胞表型对其吞噬功能有着直接的影响。体外实验证实, M1 表型巨噬细胞 (人或鼠源) 吞噬能力均显著强于 M2 表型^[22-24]。原代培养 7 d 后, BMDM 吞噬能力显著高于 PM。在经细菌内毒素 LPS 进一步刺激后, 上述差异依然存在, 提示体外培养的 BMDM 在基础状态和激活状态, 其吞噬功能均强于 PM。该发现进一步佐证了巨噬细胞极化功能检测结果, BMDM 表型偏向于 M1 极化状态。然而, 表型差异如何影响吞噬功能还有待进一步研究。

综上所述, 尽管原代培养的腹腔源和骨髓源巨噬细胞在纯度和诱导后极化状态均可满足实验要求, 然而 PM 和 BMDM 无论在体外培养过程或生物学特性均存在一定差异。BMDM 在可获取数量上明显多于 PM, 但其基础状态较 PM 却呈现出 M1 表型特征及较强的吞噬能力, 这一差异在特定诱导剂处理后依然存在。因此, 在巨噬细胞相关病理或药理研究过程中应谨慎合理选择巨噬细胞原代培养方法, 以避免原代培养巨噬细胞生物学特性差异对实验结果产生影响。

REFERENCES

- [1] Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 2014, 41(1): 21-35.
- [2] Tarique AA, Logan J, Thomas E, et al. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53(5): 676-88.
- [3] Kuznetsova T, Prange KHM, Glass CK, et al. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*, 2019, doi: 10.1038/s41569-019-0265-3.
- [4] Di Benedetto P, Ruscitti P, Vadasz Z, et al. Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(10): 102369.
- [5] Bercovici N, Guérin MV, Trautmann A, et al. The remarkable plasticity of macrophages: a chance to fight cancer. *Front Immunol*, 2019, 10: 1563.
- [6] Tang PMK, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(3): 144-158.
- [7] Zhou X, Li WY, Wang S, et al. YAP aggravates inflammatory bowel disease by regulating M1/M2 macrophage polarization and gut microbial homeostasis. *Cell Rep*, 2019, 27(4): 1176-89.e5.
- [8] Tokunaga Y, Imaoka H, Kaku Y, et al. The significance of CD163-expressing macrophages in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2019, 123(3): 263-270.
- [9] Safar R, Doumandji Z, Saidou T, et al. Cytotoxicity and global transcriptional responses induced by zinc oxide nanoparticles NM 110 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Toxicol Lett*, 2019, 308: 65-73.
- [10] Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC. Isolation and differentiation of murine macrophages. *Methods Mol Biol*, 2017, 1527: 297-309.
- [11] Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*, 2015, 144(4): 541-548.
- [12] Lavin Y, Mortha A, Rahman A, et al. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(12): 731-744.
- [13] Zhao YL, Tian PX, Han F, et al. Comparison of the characteristics of macrophages derived from murine spleen, peritoneal cavity, and bone marrow. *J*

- Zhejiang Univ Sci B, 2017, 18(12): 1055–1063.
- [14] Parsa R, Andresen P, Gillett A, et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2881–2892.
- [15] Ramón-Vázquez A, De La Rosa JV, Tabraue C, et al. Bone marrow-derived macrophage immortalization of LXR nuclear receptor-deficient cells. *Methods Mol Biol*, 2019, 1951: 75–85.
- [16] Wang CQ, Yu X, Cao Q, et al. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol*, 2013, 14: 6.
- [17] Wang YP, Harris DC. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(1): 21–27.
- [18] Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Front Immunol*, 2019, 10: 1084.
- [19] Lu JY, Cao Q, Zheng D, et al. Discrete functions of M_{2a} and M_{2c} macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2013, 84(4): 745–755.
- [20] Das A, Sinha M, Datta S, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol*, 2015, 185(10): 2596–2606.
- [21] Ho VW, Sly LM. Derivation and characterization of murine alternatively activated (M2) macrophages//Reiner N. *Macrophages and Dendritic Cells*. Totowa: Humana Press, 2009, 531: 173–85.
- [22] Qie YQ, Yuan HF, Von Roemeling CA, et al. Surface modification of nanoparticles enables selective evasion of phagocytic clearance by distinct macrophage phenotypes. *Sci Rep*, 2016, 6: 26269.
- [23] Deng HM, Li ZC, Tan YF, et al. A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. *Sci Rep*, 2016, 6: 29401.
- [24] Zhang M, Hutter G, Kahn SA, et al. Anti-CD47 treatment stimulates phagocytosis of glioblastoma by M1 and M2 polarized macrophages and promotes m1 polarized macrophages *in vivo*. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0153550.

(本文责编 陈宏宇)