

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.19.001

白藜芦醇对脂多糖诱导的巨噬细胞极化改变的影响^{*}

雷宇鹏¹,曾振国^{2△},胡德泉³

(1.南昌大学第一附属医院消化科 330006;2.南昌大学第一附属医院重症医学科 330006;
3.南昌大学医院内科 330031)

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇对脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞极化表型改变的影响。**方法** 体外培养的 RAW264.7 小鼠巨噬细胞在六孔板孵育 12 h,分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组、LPS(100 ng/mL)组、LPS(100 ng/mL)+白藜芦醇(30 μmol/L)组,LPS+白藜芦醇组在加入 LPS 前预先加入白藜芦醇孵育 12 h;上述细胞在 LPS 刺激 12 h 后分别收集细胞和培养上清液;实时定量 PCR(RT-qPCR)检测经典的炎症活化型巨噬细胞(M1)型相关基因 iNOS、TNF-α mRNA 表达,以及替代活化巨噬细胞(M2)型相关基因 IL-10、PPARγ 和 Arg-1 mRNA 表达,Western blot 检测细胞 iNOS、Arg-1 蛋白表达,ELISA 检测培养上清液中炎症因子 IL-12 p40、IL-10 和 TNF-α 的水平。**结果** RT-qPCR 检测结果显示,与 LPS 组相比,M1 型相关基因 iNOS、TNF-α mRNA 较 LPS+白藜芦醇组显著上升($P<0.05$),而 M2 型相关基因 IL-10、PPARγ、Arg-1 mRNA 表达显著下调($P<0.05$)。Western blot 检测发现,LPS 组 iNOS 蛋白水平显著高于 LPS+白藜芦醇组($P<0.05$),而 Arg-1 蛋白水平显著低于 LPS+白藜芦醇组($P<0.05$)。ELISA 检测发现,LPS 组培养上清液中炎症因子 IL-12 p40、TNF-α 水平显著高于 LPS+白藜芦醇组($P<0.05$),而 IL-10 和水平显著低于 LPS+白藜芦醇组($P<0.05$)。**结论** 白藜芦醇可能促进了 LPS 刺激的 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 型极化改变。

[关键词] 巨噬细胞;白藜芦醇;极化

[中图分类号] R392.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)19-2593-03

Effect of resveratrol on macrophage polarizing phenotype induced by lipopolysaccharide^{*}

Lei Yupeng¹,Zeng Zhenguo^{2△},Hu Dequan³

(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 3. Department of Internal Medicine, Nanchang University Hospital, Nanchang, Jiangxi 330031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of resveratrol on murine macrophage cell line (RAW264.7 cells) polarizing phenotype induced by lipopolysaccharide. **Methods** RAW264.7 mouse macrophages seeded in a 6 well plate, then randomly divided into phosphate buffer saline(PBS) control group, LPS (100 ng/mL) group, and LPS (100 ng/mL) + resveratrol (30 μmol/L) group. In the LPS+resveratrol group, LPS was added after incubation with resveratrol for 12 h. Cells were harvested and supernatant were collected after incubation with LPS for 12 h. Both the mRNA expression levels of M1 associated markers iNOS and TNF-α and M2 associated markers IL-10, PPARγ and Arg-1 were measured by real time quantitative PCR. Expression of iNOS, Arg-1 protein were detected by Western blot, inflammatory factor IL-12 p40, IL-10 and TNF-α protein in the supernatant of were assayed by ELISA. **Results** PCR detection showed that the mRNA expression levels of M1 associated markers iNOS and TNF-α in the LPS group were significantly higher than that of LPS+ resveratrol group($P<0.05$), but the mRNA expression levels of M2 associated markers IL-10, PPARγ and Arg-1 were significantly lower than that of LPS+ resveratrol group($P<0.05$). Compared with LPS+ resveratrol group, western blot assay showed that iNOS protein level in LPS group was significantly higher than it ($P<0.05$), but Arg-1 protein level was significantly lower than it($P<0.05$). The levels of IL-12 p40 and TNF-α in LPS group were significantly higher than that in LPS+ resveratrol group($P<0.05$), but the levels of IL-10 was significantly lower than it($P<0.05$). **Conclusion** Resveratrol may promote LPS stimulated RAW264.7 macrophage polarization to M2 phenotype.

[Key words] macrophages; resveratrol; polarization

脓毒症是指因感染而导致的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),常并发于外科大手术后、大面积烧伤、严重创伤、休克等疾病,属临床常见危重疾病。该病病情凶险,进展迅速,患者常出现急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),严重者最终发展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160233)。 作者简介:雷宇鹏(1987—),硕士,主要从事消化疾病研究。 △ 通讯作者, Tel: 13576056501; E-mail: zzg6501@163.com。

syndrome,MODS)。美国的统计数据显示,该病每年导致的死亡人数超过 22.5 万人^[1],并以每年 1.5%~1.8%的速度增长^[2]。巨噬细胞广泛分布于机体各组织和器官中,是固有免疫反应的重要组成部分,脓毒症时巨噬细胞分泌释放的大量炎症因子,是机体免疫反应的重要构成环节。现有研究发现,巨噬细胞是一类具有极强功能可塑性的免疫细胞,根据所处微环境不同,可被诱导分化为经典的炎症活化型巨噬细胞(classically activated macrophage,M1)和替代活化巨噬细胞(alternatively activated macrophage,M2)^[3]。巨噬细胞的不同极化方式,决定了其在脓毒症发生、发展过程中所发挥的不同作用^[4]。调控脓毒症时巨噬细胞的极化过程,进而控制脓毒症疾病过程,具有十分重要的科研和临床价值。

作为一类多酚类化合物,白藜芦醇广泛存在于葡萄、花生等植物中,并具有良好的抗炎、抗氧化、抗肿瘤活性等药理作用^[5]。有研究表明,白藜芦醇能显著降低脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)所致巨噬细胞炎症反应,下调包括 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6 等炎症介质的表达^[6],但白藜芦醇在该过程中是否影响了巨噬细胞极化改变,尚未见相关报道。本实验拟通过体外 LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞,探讨白藜芦醇对其炎症表达及极化表型的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 RAW264.7 巨噬细胞(中国科学院细胞库),胎牛血清(美国 HyClone),RPMI1640 培养基(美国 Gibco),LPS(E.coli 0111:B4,美国 Sigma-Aldrich),白藜芦醇(美国 Sigma),TRIzol® Reagent(美国 Invitrogen),实时定量 PCR(RT-qPCR)检测试剂盒、逆转录试剂盒(日本 Takara),兔抗鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)抗体、兔抗鼠精氨酸酶 1(arginase 1,Arg-1)抗体(美国 Abcam),ELISA 试剂盒:小鼠 IL-12 亚单位 p40(IL-12 p40,上海高创化学科技有限公司)、TNF- α 和 IL-10(北京达科为生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验及分组 体外培养的 RAW264.7 细胞在六孔板孵育 12 h,分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组、LPS(100 ng/mL)组、LPS(100 ng/mL)+白藜芦醇(30 μ mol/L)组,LPS+白藜芦醇组在加入 LPS 前预先加入白藜芦醇孵育 12 h;上述细胞在 LPS 刺激 12 h 后分别收集细胞和培养上清液,用于各项指标的检测。

1.2.2 ELISA 检测 检测培养上清液中炎症因子 IL-12 p40、TNF- α 及 IL-10 表达,具体操作参照试剂盒说明书。

1.2.3 RT-qPCR 检测 检测细胞 M1 型相关基因 iNOS、

TNF- α mRNA 表达以及 M2 型相关基因 IL-10、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)和 Arg-1 mRNA 表达:采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,总 RNA 提取质量通过琼脂糖凝胶电泳来验证,总 RNA 水平采用紫外分光光度计测定;Takara 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,扩增采用的所有基因引物购买自生工生物工程(上海)有限公司。RT-qPCR 引物序列,(1)M1 型相关基因,iNOS 上游:CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C,下游:GGC TGT CAG AGA GCC TCG TGG CTT TGG;TNF- α 上游:CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT,下游:GCT ACG ACG TGG GCT ACA G;(2)M2 型相关基因,IL-10 上游:CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA,下游:TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG;PPAR γ 上游:TCG CTG ATG CAC TGC CTA TG,下游:GAG AGG TCC ACA GAG CTG ATT;Arg-1 上游:CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA,下游:AGG AGC TGT CAT TAG GGA CAT C。所有目的基因选取 β -actin 作为内参,上游:ATG TGC AAA AAG CTG GCT TTG,下游:ATT TGT GGT GGA TGA TGG AGG;目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.2.4 Western blot 检测 检测细胞 iNOS、Arg-1 蛋白表达:各组细胞收集后加入 RIPA 蛋白裂解液,冰浴 20 min 后 12 000 g 离心 30 min(4 $^{\circ}$ C),总蛋白于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,Bradford 法进行蛋白定量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),恒定电流 100 mA,恒温 4 $^{\circ}$ C,转膜 2 h 至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),5%脱脂牛奶 TBST 溶液封闭 1 h 后,分别加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗(1:4 000)室温 1 h,ECL 化学发光试剂盒曝光,Quantity One 软件进行图像灰度分析,所有目的蛋白灰度值与 β -actin 灰度值之比为所需结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间两两比较采取 LSD- t 检验,单因素方差分析比较多样本间差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白藜芦醇对细胞炎症因子 IL-12 p40、TNF- α 及 IL-10 表达的影响 ELISA 检测显示,LPS 组较 LPS+白藜芦醇组培养上清液中炎症因子 IL-12 p40、TNF- α 水平显著升高,而 IL-10 水平显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 白藜芦醇对细胞 M1 型和 M2 型基因表型的影响 RT-qPCR 检测表明 LPS 组较 LPS+白藜芦醇组 M1 型相关基因 iNOS、TNF- α mRNA 表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$);M2 型相关基因 IL-10、PPAR γ 、Arg-1 mRNA 表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 1 白藜芦醇对细胞炎症因子 IL-12 p40、TNF- α 及 IL-10 表达的影响($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	IL-12 p40	TNF- α	IL-10
PBS 组	78.53 $\pm$ 15.20	28.19 $\pm$ 7.36	186.91 $\pm$ 21.43
LPS 组	519.17 $\pm$ 41.29*	741.92 $\pm$ 54.52*	622.75 $\pm$ 48.72*
LPS+白藜芦醇组	278.19 $\pm$ 42.95*#	302.37 $\pm$ 40.61*#	1 285.68 $\pm$ 92.87*#

*: $P<0.05$,与 PBS 组比较;#: $P<0.05$,与 LPS 组比较。

表 2 白藜芦醇对细胞 M1 型和 M2 型基因 mRNA 表型的影响($\bar{x}\pm s$,pg/mL)					
组别	iNOS	TNF- α	IL-10	PPAR γ	Arg-1
PBS 组	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.20
LPS 组	57.26 $\pm$ 8.51 [*]	43.68 $\pm$ 5.27 [*]	8.97 $\pm$ 1.21 [*]	7.61 $\pm$ 1.53 [*]	10.29 $\pm$ 1.86 [*]
LPS+白藜芦醇组	30.68 $\pm$ 6.29 ^{*#}	27.63 $\pm$ 4.37 ^{*#}	15.23 $\pm$ 2.18 ^{*#}	23.68 $\pm$ 3.18 ^{*#}	21.97 $\pm$ 2.69 ^{*#}

^{*}:*P*<0.05,与 PBS 组比较;[#]:*P*<0.05,与 LPS 组比较。

2.3 白藜芦醇对细胞 iNOS、Arg-1 蛋白表达影响 Western blot 检测表明,LPS 组较 LPS+白藜芦醇组 iNOS 蛋白表达升高,而 Arg-1 表达降低,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 3,图 1、2。

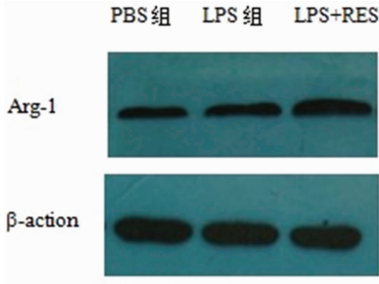


图 1 Western blot 检测 Arg-1 蛋白表达

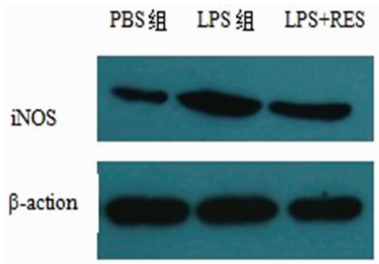


图 2 Western blot 检测 iNOS 蛋白表达

表 3 白藜芦醇对细胞 iNOS、Arg-1 蛋白表达影响($\bar{x}\pm s$,pg/mL)		
组别	Arg-1	iNOS
PBS 组	0.24 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01
LPS 组	0.27 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.03 [*]
LPS+白藜芦醇组	0.48 $\pm$ 0.03 ^{*#}	0.41 $\pm$ 0.02 ^{*#}

^{*}:*P*<0.05,与 PBS 组比较;[#]:*P*<0.05,与 LPS 组比较。

3 讨 论

脓毒症是入侵病原微生物与机体免疫系统、凝血系统之间交互作用的结果,脓毒症发生时,病原微生物释放的内毒素等激活巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞等炎症细胞,释放各种细胞因子、氧自由基、趋化因子等物质,造成过度炎性反应,最终形成 MODS 和机体弥散性血管内凝血^[7-8]。该病病情凶险,是世界性难点危重疾病,据统计,我国脓毒症患者的死亡率高达 48.7%^[9]。巨噬细胞广泛分布于机体,在脓毒症中的发病过程中扮演十分重要的地位,它可直接杀伤侵入的病原微生物,也可通过释放各种炎性产物抵御细菌侵入,是脓毒症发病的重要因素之一。调节巨噬细胞免疫状态,防止其在脓毒症发病过程中过度活化,是解决脓毒症的可行方式。

有研究表明,巨噬细胞是一类具有功能可塑性的免疫细

胞,在机体处于不同应激状态下时,可出现内在功能和外在表型变化的现象^[10]。在 LPS 刺激时,可诱导巨噬细胞成 M1 型极化表型,细胞处于激活状态,分泌大量的炎症因子生 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-12 等,并高表达 M1 型相关基因 iNOS、TNF- α 、CXCL9、CXCL10 等。当巨噬细胞受到细胞因子 IL-4 和 IL-13 等刺激时,则会呈现出 M2 型极化表型,分泌大量 IL-10、TGF- β 等抗炎介质,并高表达 PPAR γ 、Arg-1、YM1 和 FIZZ1 等基因^[11]。本研究也发现,在 LPS 刺激后,RAW264.7 细胞高表达炎症因子 TNF- α 、IL-12 p40,以及 iNOS 和 TNF- α mRNA,呈典型的 M1 型激活,与 Ohashi 等^[12]的研究一致。

白藜芦醇是一种多酚类植物雌激素,在葡萄、虎杖及花生中含量较高。现有研究表明,白藜芦醇具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抑制血小板聚集、保护心脑血管等多种作用,是一类具有极强生物活性的植物抗毒素^[13-15]。本实验表明,白藜芦醇预处理后可显著抑制 LPS 诱导下巨噬细胞分泌促炎症因子 TNF- α 、IL-12 p40 分泌,同时促进抗炎因子 IL-10 的表达。通过检测笔者发现,白藜芦醇预处理的巨噬细胞高表达 M2 型相关基因 Arg-1、PPAR γ 和 IL-10 mRNA,上调 Arg-1 蛋白的同时下调 iNOS 蛋白表达,显示出白藜芦醇预处理的巨噬细胞在 LPS 刺激时呈现 M2 型极化表型特点。

综上所述,脓毒症时 LPS 诱导巨噬细胞呈经典的 M1 型极化表型;白藜芦醇可抑制 LPS 所致巨噬细胞促炎症因子分泌,上调抗炎因子的表达,诱导噬细胞呈的 M2 型极化表型改变。白藜芦醇可调剂巨噬细胞免疫功能状态,为临床治疗脓毒症提供了新的理论依据和思路。

参考文献

[1] Boomer JS,To K,Chang KC,et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure[J]. JAMA,2011,306(23):2594-2605.

[2] Bagshaw SM,Bellomo R,Jacka MJ,et al. The impact of early hypoglycemiaand blood glucose variability on outcome in critical illness[J]. Crit Care,2009,13(3):R91.

[3] Murray PJ,Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization[J]. J Leukoc Biol,2011,89(4):557-563.

[4] Mège JL,Mehraj V,Capo C. Macrophage polarization and bacterial infections[J]. Curr Opin Infect Dis,2011,24(3):230-234.

[5] Baur JA,Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol;the in vivo evidence[J]. Nat Rev Drug Discov,2006,5(6):493-506.

[6] Qureshi AA,Guan XQ,Reis JC,et al. (下转第 2599 页)

sion of STAT5 expression during lactation reveals its exclusive roles in mammary gland morphology, milk-protein gene expression, and neonate growth [J]. Mol Reprod Dev, 2011, 78(8):585-596.

[5] Liao ZY, Levaneinen MT. Targeting transcription factor stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer[J]. Am J Transl Res, 2011, 3(2):133-138.

[6] Liao Z, Nevalainen MT. Targeting transcription factor Stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer [J]. Am J Transl Res, 2011, 3(2):133-138.

[7] Martini M, Hohaus S, Petrucci G, et al. Phosphorylated STAT5 represents a new possible prognostic marker in hodgkin lymphoma[J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(3): 472-477.

[8] Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, et al. Transcription factor Stat5 stimulates homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells [J]. Onco-gene, 2005, 24(5):746-760.

[9] Nam S, Williams A, Vultur A, et al. Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(4):1400-1405.

[10] Barros P, Lam EW, Jordan P, et al. Rac1 signalling modu-lates a STAT5/BCL-6 transcriptional switch on cell-cy-cle-associated target gene promoters[J]. Nucl Acids Res, 2012, 40(16):7776-7787.

[11] Lara JF, Thor AD, Dressler LG, et al. P53 Expression in node-positive breast cancer patients: results from the cancer and leukemia group B 9344 trial (159905)[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(15):5170-5178.

[12] Yoo KH, Hennighausen L. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer[J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(1):59-65.

(收稿日期:2014-11-18 修回日期:2015-02-20)

(上接第 2595 页)

Inhibition of nitric oxide and inflammatory cytokines in LPS-stimulated murine macrophages by resveratrol, a po-tent proteasome inhibitor [J]. Lipids Health Dis, 2012 (11):76.

[7] Bauer I, Bauer M, Raddatz A, et al. Influence of gender on stimulated cytokine response in patients of severe sepsis [J]. Anaesthesist, 2006, 55(5):515-527.

[8] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420(6917):885-891.

[9] Cheng B, Xie G, Yao S, et al. Epidemiology of severe sep-sis in critically ill surgical patients in ten university hospi-tals in China[J]. Crit Care Med, 2007(35):2538-2546.

[10] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8 (12):958-969.

[11] Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine sys-tem in diverse forms of macrophage activation and polar-i-zation[J]. Trends Immunol, 2004, 25(12):677-686.

[12] Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, et al. Adiponectin Pro-motes Macrophage Polarization toward an Anti-inflam-matory Phenotype[J]. J Biol Chem, 2010, 285(9):6153-6160.

[13] Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resvera-trol; the in vivo evidence[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6):493-506.

[14] Pervaiz S. Resveratrol; from grapevines to mammalian bi-ology[J]. FASEB J, 2003, 17(14):1975-1985.

[15] 张红, 周静, 姜政. 白藜芦醇联合化疗药物抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖作用研究 [J]. 重庆医学, 2011, 40(28): 2812-2814.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-03-26)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。