

血管活性肠肽对肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化及相关细胞因子的影响

惠毅¹, 魏海梁^{2a}, 闫曙光¹, 李京涛^{2b}, 史捷^{2c*} (1. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学附属医院, a. 普外科, b. 感染科, c. 呼吸科, 陕西 咸阳 712000)

摘要: 目的 观察血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)对肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM) M1/M2 极化和相关细胞因子的影响。方法 分别采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-4(interleukin 4, IL-4)联合白细胞介素-13(interleukin 13, IL-13)诱导 AM M1/M2 型极化, 后用 10^{-8} ~ 10^{-6} mol·L⁻¹ VIP 干预极化的 AM, 免疫荧光双标法测定 M1 型 AM 标记物 CD86 和促炎因子白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)的共表达, M2 型 AM 标记物 CD206 和抗炎因子白细胞介素-10(interleukin 10, IL-10)的共表达; ELISA 检测细胞上清中 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-10、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)的表达, RT-PCR 检测巨噬细胞表面标记物 CD86、CD206 和巨噬细胞相关因子 IL-6、TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-10、Arg-1、几丁质酶-3 样蛋白 3(chitinase 3-like 3, Ym1)的表达。结果 经 LPS 联合 IFN- γ 、IL-4 联合 IL-13 诱导后, AM 分别向 M1/M2 型极化, 与 M1 型相关的促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 和与 M2 型相关的抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 的激活和释放明显高于未经诱导的正常组($P<0.05$); 不同浓度 VIP(10^{-8} ~ 10^{-6} mol·L⁻¹)的干预, 均可下调 M1 型 AM 和相关炎症因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 的活性和表达($P<0.05$); 上调 M2 型 AM 和相关抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 的活性和表达($P<0.05$)。结论 VIP 可抑制 AM M1 型极化, 减少炎症因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 的激活和释放; 促进 AM M2 型极化, 提高抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 的激活和释放, 提示 VIP 在肺内炎症时可能通过调控 AM M1/M2 型极化, 抑制炎症反应, 对肺组织起保护性作用。

关键词: 血管活性肠肽; 肺泡巨噬细胞; M1/M2 型巨噬细胞极化; 炎症因子

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)17-2053-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.17.002

引用本文: 惠毅, 魏海梁, 闫曙光, 等. 血管活性肠肽对肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化及相关细胞因子的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2053-2059.

Effects of Vasoactive Intestinal Peptide on M1/M2 Polarization and Related Cytokines in Alveolar Macrophages

HUI Yi¹, WEI Hailiang^{2a}, YAN Shuguang¹, LI Jingtao^{2b}, SHI Jie^{2c*} (1. College of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. The Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, a. Department of General Surgery, b. Department of Infectious Disease, c. Department of Respiratory, Xianyang 712000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of vasoactive intestinal peptide(VIP) on M1/M2 polarization and related cytokines of alveolar macrophages(AM). **METHODS** Lipopolysaccharide(LPS) combined with interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-4(IL-4) combined with interleukin-13(IL-13) were used to induce M1/M2 type polarization of AM, and then VIP (10^{-8} ~ 10^{-6} mol·L⁻¹) was used to intervene the polarization of AM. The co-expression of M1 type AM marker CD86 and pro-inflammatory factor interleukin 6(IL-6) and co-expression of M2-type AM marker CD206 and anti-inflammatory factor interleukin 10(IL-10) was determined by immunofluorescence double standard method. Expression of IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-10 and arginase-1(Arg-1) in cell supernatant was detected by ELISA. The macrophage surface markers CD86, CD206 and macrophage related factors IL-6, TNF- α , inducible nitric oxide synthase(iNOS), IL-10, Arg-1 and chitinase 3-like 3(Ym1) were detected by RT-PCR. **RESULTS** After induction by LPS combined with IFN- γ and IL-4 combined with IL-13, AM was polarized to M1/M2 type respectively. The activation and release of pro-inflammatory factors IL-6, TNF- α and iNOS related to M1 and anti-inflammatory factors IL-10, Arg-1 and Ym1 related to M2 were significantly higher than those in the uninduced normal group($P<0.05$). Interference with different concentrations of VIP(10^{-8} ~ 10^{-6} mol·L⁻¹) could down-regulate the activity and expression of M1 type AM and related inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and iNOS($P<0.05$). The activity and

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703974); 陕西中医药大学学科创新团队建设项目(2019-YL05)

作者简介: 惠毅, 女, 博士, 副教授 Tel: (029)38185122 E-mail: drhy1982@163.com *通信作者: 史捷, 女, 硕士, 主任医师 Tel: (029)33320769 E-mail: 2780067265@qq.com

expression of M2 type AM and related anti-inflammatory factors IL-10, Arg-1 and Ym1 were up-regulated($P<0.05$).
CONCLUSION VIP can inhibit AM M1-type polarization and reduce the activation and release of inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and iNOS. It can promote AM M2-type polarization and increase the activation and release of anti-inflammatory factors IL-10, Arg-1 and Ym1, suggesting that VIP may inhibit the inflammatory response and play a protective role in lung tissue by regulating the M1/M2-type polarization of AM in the process of pulmonary inflammation.

KEYWORDS: vasoactive intestinal peptide; alveolar macrophages; polarization of M1/M2 macrophages; inflammatory cytokines

肺泡巨噬细胞活化所引起的免疫炎症是导致肺内炎症性疾病发生、发展的重要原因^[1]。巨噬细胞根据环境刺激的不同,可被激活为经典激活的巨噬细胞(classically activated macrophages, M1)和替代激活的巨噬细胞(alternatively activated macrophages, M2),这被称为巨噬细胞的 M1/M2 型极化^[2]。M1 型巨噬细胞以吞噬杀菌,释放炎症因子,促炎作用为主;M2 型巨噬细胞以降低炎症反应,促进组织修复功能为主。因此,巨噬细胞的 M1/M2 型极化与炎症的发展和转归密切相关^[3]。调控肺泡巨噬细胞的极化也成为目前治疗炎症相关肺系疾病的重要策略之一。

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是由非肾上腺能非胆碱能抑制性神经末梢释放的神经递质之一,在肺组织内具有广泛的调节免疫细胞功能,抑制炎症反应的作用,已有文献报道 VIP 具有抑制 M1 型巨噬细胞活化的功能^[4-5],但其对 M2 型巨噬细胞活化的影响,尚未见报道。VIP 是否通过调控 M1/M2 型肺泡巨噬细胞极化,进而控制促炎/抗炎因子的平衡,发挥其控制炎症反应进程的作用尚无报道。本研究采用不同刺激方法诱导原代培养的小鼠肺泡巨噬细胞 M1/M2 极化,观察 VIP 对肺泡巨噬细胞 M1/M2 极化和相关炎症因子表达和释放的影响,探究 VIP 是否能调控肺泡巨噬细胞 M1/M2 极化平衡,调控炎症反应进程,从而为炎症相关肺系疾病的治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 细胞与试剂

小鼠肺泡巨噬细胞(分离自肺组织的原代肺泡巨噬细胞,采用机械研磨结合差速贴壁法制备而成,纯度>90%)、培养基(批号:CM-M152)、胎牛血清(批号:164210-50)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;VIP(批号:V3628)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(批号:L2630)均购自 Sigma 公司;重组小鼠白细胞介素-4(interleukin 4, IL-4)、白细胞介素-13(interleukin 13, IL-13)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)均购自 Peprotech 公司,批号分别为 315-05, 214-14, 210-13;CD86 抗体(Abcam 公司,批号:Ab119857);CD206 抗体(武

汉三鹰生物技术有限公司,批号:60143-1-IG);白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin 10, IL-10)抗体、荧光(Cy3)标记 IgG 均购自 Bioss 公司,批号分别为 Bs-0379R, BS-0698R, BS-0293G-CY3;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定试剂盒(优尔生,批号:SEA133Mu);IL-6、IL-10、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)酶联免疫吸附测定试剂盒均购自 Elabscience 公司,批号分别为 E-EL-M0044c, E-EL-M0046c, E-EL-M0154c;荧光(FITC)标记 IgG (武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA1105)。

1.2 仪器

ICV-450 二氧化碳培养箱(日本 ASONE 公司);Multiskan MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司);BX53 倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);7900/Via7 型 RT-PCR 仪(美国 illumina 公司)。

2 方法

2.1 小鼠肺泡巨噬细胞的鉴定和培养

取分离好的小鼠肺泡巨噬细胞,用含 10%胎牛血清在 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养 2 h 后更换新鲜培养基,培养 48 h 后换液,免疫荧光单标法检测肺泡巨噬细胞标记物 F4/80 的表达,确定为肺泡巨噬细胞后,开始相关试验。结果见图 1。

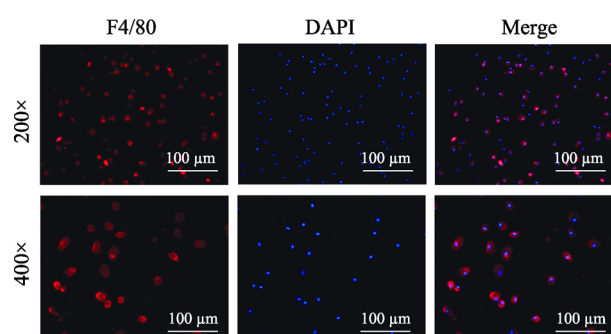


图 1 肺泡巨噬细胞的鉴定

Fig. 1 Identification of alveolar macrophages

2.2 分组

2.2.1 分组 1 ①正常组,巨噬细胞正常培养;②LPS+IFN- γ 组,巨噬细胞培养液中加入终浓度为 100 ng·mL⁻¹ 的 LPS 和终浓度为 20 ng·mL⁻¹ 的 IFN- γ 作用 24 h^[6];③VIP-1 组,巨噬细胞培养液

中加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IFN- γ 后, 再加入终浓度为 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VIP 共培养 24 h; ④VIP-2 组, 巨噬细胞培养液中加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IFN- γ 后, 再加入终浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VIP 共培养 24 h; ⑤VIP-3 组, 巨噬细胞培养液中加入终浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IFN- γ 后, 再加入终浓度为 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VIP 共培养 24 h, VIP 浓度梯度参考文献剂量^[6]。

2.2.2 分组 2 ①正常组, 巨噬细胞正常培养; ②IL-4+IL-13 组, 巨噬细胞培养液中加入终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-4 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-13 作用 24 h^[7]; ③VIP-1 组, 巨噬细胞培养液中加入终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-4 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-13 后, 再加入终浓度为 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VIP 共培养 24 h; ④VIP-2 组, 巨噬细胞培养液中加入终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-4 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-13 后, 再加入终浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VIP 共培养 24 h; ⑤VIP-3 组, 巨噬细胞培养液中加入终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-4 和终浓度为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IL-13 后, 再加入终浓度为 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 VIP 共培养 24 h, VIP 浓度梯度参考文献剂量^[6]。

2.3 免疫荧光双标法检测 CD86、IL-6 和 CD206、IL-10 的双表达

将肺泡巨噬细胞按每孔 5×10^5 个接种于 12 孔板, 依照不同分组进行处理, 24 h 后在培养板中将已爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗, 4%的多聚甲醛固定 15 min, 0.5%Triton X-100 室温下细胞通透; 山羊血清, 室温封闭; 抗 CD86 抗体、抗 CD206 抗体(1:50) 4℃孵育过夜; PBST 浸洗 3 次, 荧光 II 抗(1:100, Cy3 标记, 呈红色)湿盒中 37℃孵育 1 h, PBST 浸洗 3 次, 血清, 室温封闭 30 min, 吸掉封闭液, 滴加稀释好的抗 IL-6 抗体、IL-10 抗体(1:50), 4℃孵育避光过夜, PBST 浸洗 3 次, 荧光 II 抗(1:100, FITC, 标记, 呈绿色)湿盒中 37℃孵育 1 h, PBST 浸洗 3 次, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min 对标本进行核染色, PBST 浸洗 4 次去处多余的 DAPI, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在荧光显微镜下观察采集图像。使用 IPP 6.0 软件对免疫荧光照片进行光密度分析, 每张切片选取 3 张 400×照片做光密度分析。

2.4 ELISA 检测细胞培养上清中炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-10、Arg-1 的含量

取细胞培养上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、TNF- α 、IL-10、Arg-1 的含量。

2.5 RT-PCR 检测 CD86、CD206、IL-6、TNF- α 、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-10、Arg-1、几丁质酶-3 样蛋白 3(chitinase 3-like 3, Ym1)的 mRNA 表达水平

①RNA 提取: 取肺泡巨噬细胞, 加入 1 mL Trizol 试剂, 混匀, 移至无 RNase 的 1.5 mL EP 管中, 裂解 10 min。加入 200 μL 氯仿, 混匀, 室温放置 5 min; 4℃, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 15 min, 取离心后上层水相(约 400 μL)于另一新 1.5 mL EP 管中, 加入 400 μL 异丙醇, 混匀后室温静置 10 min。4℃, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 管底可见白色的 RNA 沉淀。弃上清, 加入无 RNase 的 75%乙醇 1 mL, 涡旋混匀后, 4℃, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 5 min, 弃上清, 空气中干燥 RNA 沉淀 5~10 min, 将沉淀溶于 20 μL DEPC 水中, 放于 -80℃冰箱内保存以备。②RNA 反转录成 cDNA: 按反转录试剂盒说明书配制 PT 反应液, 反应液体系为 20 μL , 条件: 25℃ 5 min, 50℃ 15 min, 85℃ 5 min, 4℃ 10 min。③RT-PCR: PCR 的反应体系为 10 μL , 其中上、下游引物各 0.4 μL , cDNA 4 μL , DEPC 水 5.2 μL , SYBR Green 10 μL 。反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。绘制溶解曲线, 最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 PCR primer sequence

名称	引物	序列
GAPDH	Forward	5'- ATGGGTGTGAACACGAGA -3'
	Reverse	5'- CAGGAGTATGTTCTGGGCA -3'
IL-6	Forward	5'-CACAGAGGATACCACTCCCAACAGA-3'
	Reverse	5'- ACAATCAGAATTGCCATTGCACAAC-3'
TNF- α	Forward	5'- AGCACAGAAAGCATGATCCG-3'
	Reverse	5'- CTGATGAGAGGGAGGCCATT-3'
iNOS	Forward	5'- TTGGCTCCAGCATGTACCCT-3'
	Reverse	5'- TCCTGCCCACTGAGTTCGTC-3'
IL-10	Forward	5'- GCTGGACAACATACTGCTAACCG-3'
	Reverse	5'- CACAGGGGAGAAATCGATGACAG-3'
Arg-1	Forward	5'- ATCGTGTACATTGGCTTGCG-3'
	Reverse	5'- CGTCGACATCAAAGCTCAGG-3'
Ym1	Forward	5'- TGGAAATTGGTGCCCTACAA-3'
	Reverse	5'- CCACGGCACCTCCTAAATTG-3'
CD86	Forward	5'- TGCCGTGCCATTACAAAG-3'
	Reverse	5'- ATTGATCCTGTGGGTGGCTT -3'
CD206	Forward	5'- AACAAAGGGACGTTTCGGTG-3'
	Reverse	5'- TCCTTCTGCCCAATGTTTGC-3'

2.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析, 采用 GraphPad Prism 7 软件进行图形绘制。试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (oneway-ANOVA), 两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 VIP 对 LPS 联合 IFN- γ 诱导的 M1 型肺泡巨噬细胞标志物 CD86 及促炎因子 IL-6 表达的影响

CD86 与 IL-6 免疫荧光双标检测结果显示, 正常组仅有少量 CD86 和 IL-6 表达, 且荧光强度较弱; LPS 联合 IFN- γ 刺激后, M1 型肺泡巨噬细胞标志物 CD86 和 IL-6 阳性细胞数量显著增多, 荧光强度明显增强, 且明显高于正常组 ($P < 0.05$), 表明肺泡巨噬细胞向 M1 型极化; VIP 干预 24 h 后, CD86 和 IL-6 阳性细胞数量显著减少, 荧光强度明显减弱, 其中 VIP-1、VIP-2 组与 LPS+IFN- γ 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), VIP-3 组与 LPS+IFN- γ 组比较差异无统计学意义。结果见图 2。

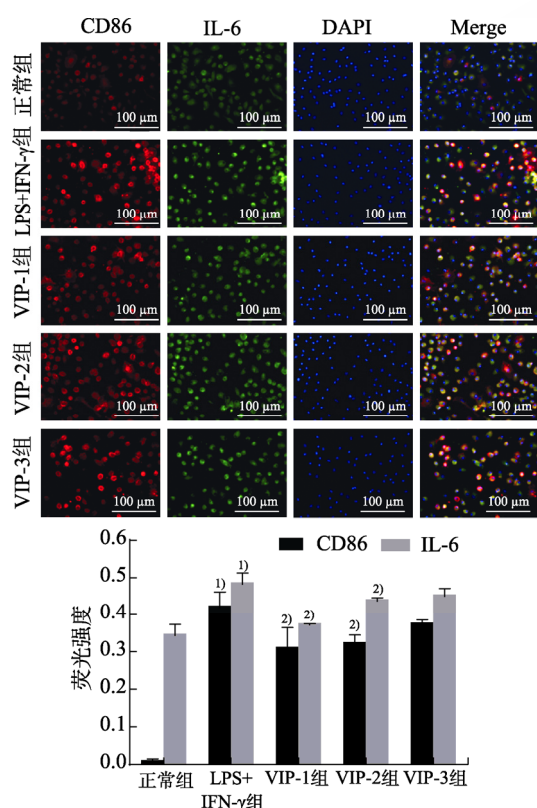


图 2 VIP 对 M1 型肺泡巨噬细胞标志物 CD86 和 IL-6 蛋白表达的影响(免疫荧光双标, 400 $\times$)

与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 LPS+IFN- γ 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Effects of VIP on expression of CD86 and IL-6 protein markers in M1 type alveolar macrophages (immunofluorescence double label, 400 $\times$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the LPS+IFN- γ group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.2 VIP 对 IL-13 联合 IL-4 诱导的 M2 型肺泡巨噬细胞标志物 CD206 及抗炎因子 IL-10 表达的影响

CD206 与 IL-10 免疫荧光双标检测结果显示, 正常组仅有少量 CD206 和 IL-10 表达, 且荧光强度较弱; IL-13 联合 IL-4 刺激后, M2 型肺泡巨噬细胞表明标志物 CD206 和 IL-10 阳性细胞数量显著增多, 荧光强度明显增强, 且明显高于正常组 ($P < 0.05$), 表明肺泡巨噬细胞向 M2 型极化; VIP 干预 24 h 后, CD206 和 IL-10 阳性细胞数量显著增多, 荧光强度明显增强, 其中 VIP-1、VIP-2 组与 IL-13+IL-4 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), VIP-3 组和 IL-13+IL-4 组比较无差异。结果见图 3。

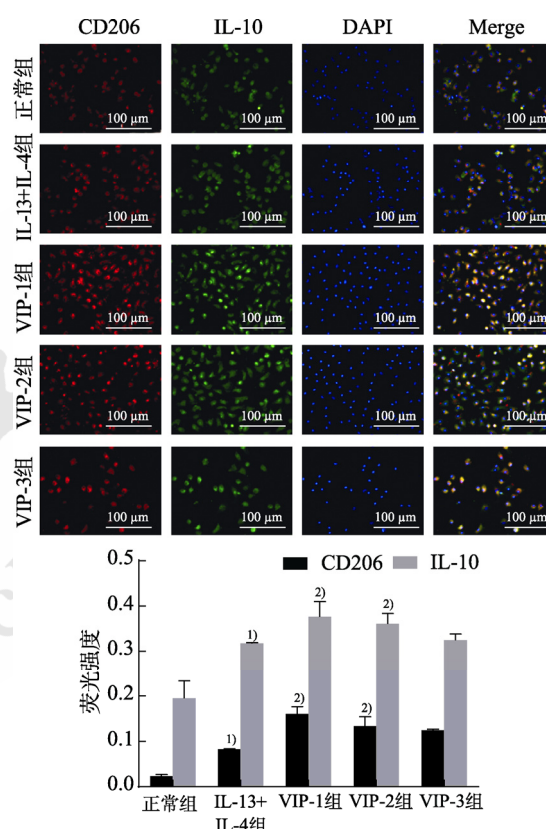


图 3 VIP 对 M2 型肺泡巨噬细胞标志物 CD206 和 IL-10 蛋白表达的影响(免疫荧光双标, 400 $\times$)

与正常组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 IL-13+IL-4 组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effects of VIP on expression of CD206 and IL-10 protein markers in M2 type alveolar macrophages (immunofluorescence double label, 400 $\times$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with the IL-13+IL-4 group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.3 VIP 对 M1 型巨噬细胞培养上清中促炎因子 IL-6、TNF- α 含量的影响

ELISA 检测结果显示, 与正常组比较, LPS+IFN- γ 组巨噬细胞培养上清中 IL-6、TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.05$), 这表明 LPS+IFN- γ 诱导肺泡巨噬细胞 M1 型极化后会释放大促炎因子 IL-6、

TNF- α 进入培养上清中; 与 LPS+IFN- γ 组比较, VIP 各组巨噬细胞培养上清中 IL-6、TNF- α 含量显著降低($P<0.05$), 且与 VIP 剂量呈反比关系, 这表明 VIP 能抑制 M1 型肺泡巨噬细胞释放促炎因子 IL-6、TNF- α , 从而发挥抑制炎症反应的作用。结果见图 4。

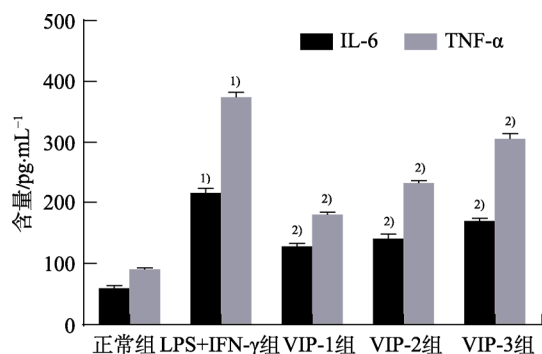


图 4 VIP 对肺泡巨噬细胞培养液上清中 IL-6、TNF- α 含量的影响

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS+IFN- γ 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of VIP on the contents of IL-6 and TNF- α in the supernatant of alveolar macrophage culture solution

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the LPS+IFN- γ group, ²⁾ $P<0.05$.

3.4 VIP 对 M2 型巨噬细胞培养液上清中抗炎因子 IL-10、Arg-1 含量的影响

ELISA 检测结果显示, 与正常组比较, IL-13+IL-4 组巨噬细胞培养液上清中 IL-10、Arg-1 含量显著升高($P<0.05$), 这表明 IL-13 联合 IL-4 诱导肺泡巨噬细胞 M2 型极化后会释放大量抗炎因子 IL-10、Arg-1 进入培养液上清中; 与 IL-13+IL-4 组比较, VIP-1、VIP-2 组巨噬细胞培养液上清中 IL-10、Arg-1 含量显著升高($P<0.05$), VIP-3 组无显著性变化, 这表明一定剂量浓度的 VIP 能促进 M2 型肺泡巨噬细胞释放抑炎因子 IL-10、Arg-1, 从而抑制促炎因子的过度表达, 抑制炎症反应进程。结果见图 5。

3.5 VIP 对 M1 型巨噬细胞活化标记物 CD86 和相关促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS mRNA 相对表达水平的影响

RT-PCR 结果显示, 与正常组比较, LPS+IFN- γ 组 M1 型巨噬细胞标记物 CD86 及 M1 型巨噬细胞内的促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS mRNA 相对表达水平显著升高($P<0.05$), 这表明 LPS+IFN- γ 促进了巨噬细胞向 M1 型极化, 同时 M1 型巨噬细胞内的促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 被激活; 与 LPS+IFN- γ 组比较, VIP 各剂量组 M1 型巨噬

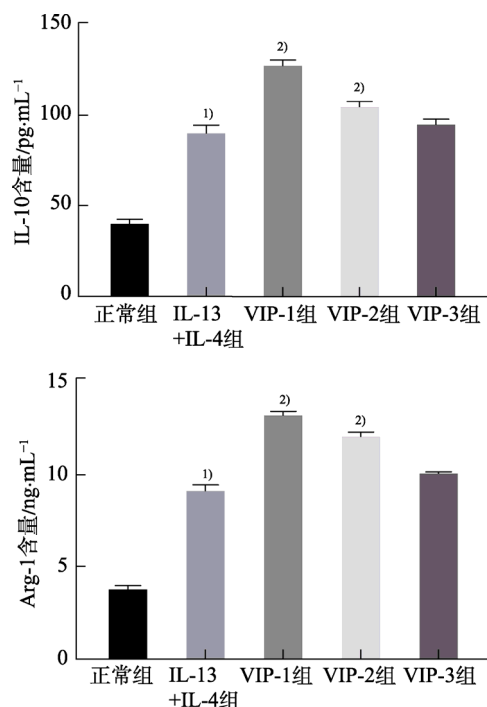


图 5 VIP 对肺泡巨噬细胞培养液上清中 IL-10、Arg-1 含量的影响

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 IL-13+IL-4 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of VIP on IL-10 and Arg-1 in the supernatant of alveolar macrophage culture solution

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the IL-13+IL-4 group, ²⁾ $P<0.05$.

细胞标记物 CD86 及 M1 型巨噬细胞内的促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS mRNA 相对表达水平显著降低($P<0.05$), 且与 VIP 剂量呈反比关系, 这表明 VIP 能抑制由 LPS+IFN- γ 诱导的 M1 型巨噬细胞极化, 相应的也抑制了 M1 型巨噬细胞内促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 的激活。结果见图 6。

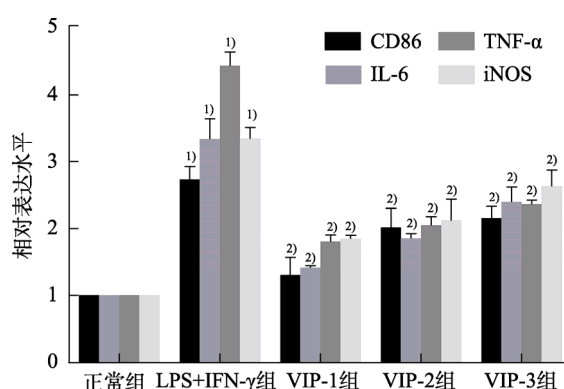


图 6 VIP 对肺泡巨噬细胞标记物 CD86、IL-6、TNF- α 、iNOS mRNA 相对表达水平的影响

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 LPS+IFN- γ 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Effect of VIP on mRNA relative expression levels of alveolar macrophage markers CD86, IL-6, TNF- α and iNOS

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the LPS+IFN- γ group, ²⁾ $P<0.05$.

3.6 VIP 对 M2 巨噬细胞活化标记物 CD206 和相关抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 mRNA 相对表达水平的影响

RT-PCR 结果显示,与正常组比较,IL-13+IL-4 组 M2 型巨噬细胞标记物 CD206 及细胞内的抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 mRNA 相对表达水平显著升高($P<0.05$),这表明 IL-13+IL-4 促进了巨噬细胞向 M2 型极化,同时 M2 型巨噬细胞内的抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 被激活;与 IL-13+IL-4 组比较,VIP-1、VIP-2 组 M2 型巨噬细胞标记物 CD206 及 M2 型巨噬细胞内的抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 mRNA 相对表达水平显著升高($P<0.05$),这表明 VIP 能促进 IL-13+IL-4 诱导的 M2 型巨噬细胞极化,相应也促进了 M2 型巨噬细胞内抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 的激活,但其作用需要 VIP 达到一定剂量浓度。结果见图 7。

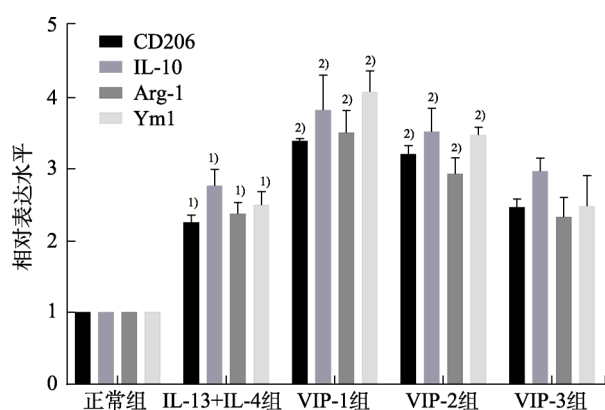


图 7 VIP 对肺泡巨噬细胞标记物 CD206、IL-10、Arg-1、Ym1 mRNA 相对表达水平的影响

与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 IL-13+IL-4 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 7 Effect of VIP on mRNA relative expression levels of alveolar macrophage markers CD206, IL-10, Arg-1 and Ym1 Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the IL-13+IL-4 group, ²⁾ $P<0.05$.

4 讨论

肺泡巨噬细胞位于肺泡腔及小气道内,是肺组织内发挥吞噬、防御功能的主要细胞,同时巨噬细胞也分泌多种细胞因子,通过不同途径启动免疫炎症反应,并调节炎症反应的程度。本实验研究结果显示,在 LPS 联合 IFN- γ 、IL-13 联合 IL-4 的双重刺激下,肺泡巨噬细胞分别朝着 M1 和 M2 型极化,在不同极化方向上,肺泡巨噬细胞的活化程度和活化后所表达和分泌的细胞因子 IL-6、TNF- α 、iNOS、IL-10、Arg-1、Ym1 均显著高于正常组,这与文献报道结果一致^[8-9]。这些炎症因子在免疫炎症的启动和调节中发挥着重要作用,

IL-6、TNF- α 、iNOS 属于促炎因子,会促进炎症反应的启动和加重,适度的炎症反应有利于机体快速清除病原微生物和潜在的危险,但炎症因子过多、炎症反应过重则会引起肺组织的进一步损伤,因此抑制肺泡巨噬细胞的 M1 型极化,减少 IL-6、TNF- α 、iNOS 等促炎因子的过度释放,是减轻肺部炎症,治疗炎症相关肺系疾病的重要策略^[10];然而当入侵者被逐渐消灭,巨噬细胞随着环境的改变便朝着 M2 型极化,此时巨噬细胞会释放抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 等,这些抗炎因子会及时降低炎症反应,对抗由 IL-6、TNF- α 、iNOS 逐渐放大的炎症反应进程,促进受损的肺组织开始修复功能,因此当炎症反应过重时,促进巨噬细胞的 M2 型活极化,增加抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 的释放是治疗炎症相关肺系疾病的另一策略^[11]。由此可见巨噬细胞的 M1/M2 型极化是促使巨噬细胞发挥其细胞活性的主要方式,通过不同的极化方式在炎症的发生/终结 2 个层面发挥不同的作用,因此探寻调控肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化的物质,在炎症反应过重时抑制其 M1 型极化,促进其 M2 型极化,就能发挥双向调节作用,从而尽快终结炎症反应进程,如在新型冠状病毒肺炎、SARS 等相关肺系疾病发病进程中由炎症造成的急性肺损伤是疾病加重,甚至引起死亡的重要原因,因此调控肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化进而快速终结炎症反应进程,减少肺组织损伤意义重大^[12-13]。

目前从肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化的调控研究已经成为炎症相关肺系疾病的热点。临床现有研究多从药物单体调控肺泡巨噬细胞 M1 或 M2 调控机制展开,多是单向机制研究。VIP 作为机体内广泛存在的神经肽,发挥着多重生物学作用,越来越多的研究证实 VIP 是一种重要的免疫系统调节物质,吸入 VIP 作为一种局部治疗手段被证实能显著减少免疫检查点抑制剂肺炎患者的肺泡炎症^[14]。VIP 对多种免疫细胞特别是巨噬细胞的极化具有一定的调节作用,单纯的 VIP 并不能诱导肺泡巨噬细胞极化,而是当肺泡巨噬细胞发挥生物学效应后,VIP 对肺泡巨噬细胞的功能具有一定的调节作用^[15]。本实验观察到 VIP 能抑制 LPS 联合 IFN- γ 所诱导肺泡巨噬细胞 M1 型极化,同时能够降低 M1 型肺泡巨噬细胞内促炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS 的激活和分泌,这与文献报道结果

一致^[16]。本次实验研究发现,用 IL-13 联合 IL-4 诱导肺泡巨噬细胞 M2 型极化后, VIP 能进一步促进肺泡巨噬细胞 M2 型极化,同时能够显著提高 M2 型肺泡巨噬细胞内抗炎因子 IL-10、Arg-1、Ym1 的激活和分泌。这一结果表明, VIP 对肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化具有双向调节作用,能抑制 M1 型极化,抑制促炎因子的释放,减缓炎症反应进程,同时 VIP 还能促进 M2 型极化,释放抗炎因子,对抗促炎因子导致的炎症损伤。

气道炎症是众多肺系疾病的共同特征,多种免疫细胞如单核细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞均参与了炎症反应进程,其中肺泡巨噬细胞参与了炎症的启动、放大和损伤的全过程,是导致炎症不断进展并最终恶化的重要免疫细胞^[17-18]。肺泡巨噬细胞在哮喘、肺损伤、肺纤维化等肺系相关性疾病的中起着重要的作用,肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化失常是众多肺系疾病发生、发展的关键因素之一^[19-20]。VIP 对 M1 型肺泡巨噬细胞及相关促炎因子激活与分泌的抑制作用,对 M2 型肺泡巨噬细胞及其相关抗炎因子激活与分泌的促进作用,提示 VIP 在肺内炎症时可通过肺泡巨噬细胞 M1/M2 型极化控制炎症反应进程,从而保护肺组织,这为 VIP 的临床应用提供了依据,但这一作用机制还需要进一步的在体研究证实。

REFERENCES

- [1] JOSHI N, WALTER J M, MISHARIN A V. Alveolar macrophages[J]. *Cell Immunol*, 2018(330): 86-90.
- [2] KONG X Y, GAO J. Macrophage polarization: A key event in the secondary phase of acute spinal cord injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5): 941-954.
- [3] WU Z, WANG Z, XU P, et al. A novel finding: Macrophages involved in inflammation participate in acute aortic dissection complicated with acute lung injury[J]. *Curr Mol Med*, 2017, 17(8): 568-579.
- [4] LAROCCA L, CALAFAT M, ROCA V, et al. VIP limits LPS-induced nitric oxide production through IL-10 in NOD mice macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(10): 1343-1349.
- [5] SHOEMAKER R C, HOUSE D, RYAN J C. Vasoactive intestinal polypeptide(VIP) corrects chronic inflammatory response syndrome(CIRS) acquired following exposure to water-damaged buildings[J]. *Health*, 2013, 5(3): 396-401.
- [6] LIU Y P, GUAN C X, BAI H B, et al. Effects of vasoactive intestinal peptide on LPS-induced MMP-9 expression by alveolar macrophages in rats[J]. *J Cent South Univ(Med Sci)* (中南大学学报: 医学版), 2005, 30(6): 645-649.

- [7] BINGER K J, GEBHARDT M, HEINIG M, et al. High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(11): 4223-4238.
- [8] STAMME C, WALSH E, WRIGHT J R. Surfactant protein A differentially regulates IFN-gamma- and LPS-induced nitrite production by rat alveolar macrophages[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 23(6): 772-779.
- [9] CRAPSTER-PREGONT M, YEO J, SANCHEZ R L, et al. Dendritic cells and alveolar macrophages mediate IL-13-induced airway inflammation and chemokine production[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129(6): 1621-1627.e3.
- [10] XU Y N, MENG C, LIU G L, et al. Classically activated macrophages protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by expressing amphiregulin in mice[J]. *Anesthesiology*, 2016, 124(5): 1086-1099.
- [11] SAFAVIAN D, LEUNG C H, KAPUS A, et al. Hemorrhagic shock/resuscitation reduces the M2 phenotype of alveolar macrophages: A potential mechanism contributing to increased LPS-induced lung injury[J]. *Shock*, 2019, 51(2): 213-220.
- [12] SONG X L, XIE S S, LU K, et al. Mesenchymal stem cells alleviate experimental asthma by inducing polarization of alveolar macrophages[J]. *Inflammation*, 2015, 38(2): 485-492.
- [13] WOJTAN P, MIERZEJEWSKI M, OSIŃSKA I, et al. Macrophage polarization in interstitial lung diseases[J]. *Cent Eur J Immunol*, 2016, 41(2): 159-164.
- [14] FRYE B C, MEISS F, VON BUBNOFF D, et al. Vasoactive intestinal peptide in checkpoint inhibitor-induced pneumonitis[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(26): 2573-2574.
- [15] SONG Z H, LI S F, LIU Y, et al. Effects of vasoactive intestinal peptide on the function of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in RAW_{264.7} murine macrophages [J]. *Chin J Clin Anat(中国临床解剖学杂志)*, 2019, 37(1): 55-59.
- [16] RAN W Z, DONG L, TANG C Y, et al. Vasoactive intestinal peptide suppresses macrophage-mediated inflammation by downregulating interleukin-17A expression via PKA- and PKC-dependent pathways[J]. *Int J Exp Pathol*, 2015, 96(4): 269-275.
- [17] AGGARWAL N R, KING L S, D'ALESSIO F R. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(8): L709-L725.
- [18] HU W, LI L. Effects of loquat leaf extract on airway inflammation and airway remodeling induced by ovalbumin in asthmatic mice[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(1): 20-27.
- [19] STOUCHE A N, ZAYNAGETDINOV R, BARHAM W J, et al. IκB kinase activity drives fetal lung macrophage maturation along a non-M1/M2 paradigm[J]. *J Immunol*, 2014, 193(3): 1184-1193.
- [20] RUAN Z Y, ZHOU H F, TONG X S, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the expression of GITR/GITRL signal system at asthmatic rat alveolar macrophages[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2014, 31(11): 1317-1321.

收稿日期: 2020-11-10

(本文责编: 沈倩)