

引文格式:

林结桃, 李健, 成文翔, 等. THP-1 源巨噬细胞上清液对类风湿性关节炎成纤维细胞和血管内皮细胞的作用 [J]. 集成技术, 2020, 9(4): 1-10.

Lin JT, Li J, Cheng WX, et al. The effect of supernatant-derived from THP-1 macrophage on rheumatoid arthritis fibroblasts and vascular endothelial cells *in vitro* [J]. Journal of Integration Technology, 2020, 9(4): 1-10.

## THP-1 源巨噬细胞上清液对类风湿性关节炎成纤维细胞和血管内皮细胞的作用

林结桃<sup>1,2,3</sup> 李 健<sup>1,2,3</sup> 成文翔<sup>1,3</sup> SUN Antonia<sup>1,3</sup> 陈建海<sup>1,2,3</sup>

柯丽青<sup>1,3</sup> 甘东浩<sup>3</sup> 张 鹏<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

<sup>2</sup>(中国科学院大学 北京 100049)

<sup>3</sup>(深圳市医用生物活性材料工程研究中心 深圳 518000)

**摘 要** 在类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 病理过程中, 成纤维细胞的“肿瘤”样转型被认为与 M1 型巨噬细胞分泌的诱导因子有关, 表现为增殖过度、凋亡减少以及异常分泌促炎症因子。此外, 成纤维细胞的异常转型也会通过反馈调节进一步刺激巨噬细胞向 M1 型极化。目前关于 M1 型巨噬细胞对成纤维细胞和血管内皮细胞的体外作用尚未有报道。为探讨 RA 滑膜中不同细胞间的相互作用, 该研究利用实时荧光定量法检测人髓系白血病单核细胞 (THP-1) 源 M0、M1 型巨噬细胞中白细胞介素-8 (*IL-8*) 和内皮型一氧化氮合酶 (*eNOS*) 基因的 mRNA 表达量, 酶联免疫吸附法测定 THP-1 源 M1 型巨噬细胞上清液炎症因子的含量, 通过细胞增殖实验测定不同比例 M1 型巨噬细胞上清液对成纤维细胞和血管内皮细胞的增殖影响。结果显示, THP-1 源 M1 型巨噬细胞主要分泌白细胞介素-1 $\beta$ 、白细胞介素-8 蛋白。对类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞 (MH7A) 而言, M1 型巨噬细胞上清液与含血清 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 培养基混合 (比例为 7:3) 作用 48 h 能促进细胞增殖; 对人脐静脉细胞融合细胞 (EA.hy926) 而言, M1 型巨噬细胞上清液与含血清 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) 培养基混合 (比例为 6:4 或 7:3) 处理 72 h 显著促进了细胞的增殖。该研究可为建立 RA 血管翳类组织模型提供前期研究的数据支撑, 有助于体外构建抗 RA 药物高通量筛选平台。

**关键词** 类风湿性关节炎; 成纤维细胞; 巨噬细胞; 血管内皮细胞

中图分类号 Q 291 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20200512001

收稿日期: 2020-05-12 修回日期: 2020-05-25

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目 (2018YFC1705205); 中国科学院国际合作局国际伙伴计划项目 (172644KYSB20190032); 国家自然科学基金委员会面上项目 (81672224, 81473709); 深圳市科技计划项目基础研究项目 (JCYJ20170818153602439, JCYJ20180302150101316); 深圳市医疗卫生三名工程项目 (SZSM201808072); 深圳市发展和改革委员会工程研究中心扶持计划项目 ((2019) No. 561.); 深圳市工业和信息化局“创新链+产业链”融合专项项目 (201908141541)

作者简介: 林结桃, 硕士, 研究方向为体外构建类风湿性关节炎血管翳模型; 李健, 助理研究员, 研究方向为生物材料应用及转化; 成文翔, 助理研究员, 研究方向为生物信息学及中医药治疗; Sun Antonia, 博士后, 研究方向为骨关节炎机理及治疗; 陈建海, 博士, 研究方向为类风湿性关节炎机制; 柯丽青, 学士, 研究方向为类风湿性关节炎药物筛选; 甘东浩, 博士, 研究方向为类风湿性关节炎中医药治疗; 张鹏 (通讯作者), 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为老药新用在类风湿性关节炎中的作用机理及创新生物材料的应用及临床转化, E-mail: peng.zhang@siat.ac.cn.

## The Effect of Supernatant-Derived from THP-1 Macrophage on Rheumatoid Arthritis Fibroblasts and Vascular Endothelial Cells *in Vitro*

LIN Jietao<sup>1,2,3</sup> LI Jian<sup>1,2,3</sup> CHENG Wenxiang<sup>1,3</sup> SUN Antonia<sup>1,3</sup>

CHEN Jianhai<sup>1,2,3</sup> KE Liqing<sup>1,3</sup> GAN Donghao<sup>3</sup> ZHANG Peng<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>( Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China )

<sup>2</sup>( University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China )

<sup>3</sup>( Shenzhen Engineering Research Center for Medical Bioactive Materials, Shenzhen 518000, China )

**Abstract** Normal synovium is mainly composed of fibroblasts and macrophages. In the pathological process of rheumatoid arthritis (RA), the “tumor like” transformation of fibroblasts is considered to be related to inducers secreted by M1 macrophages. They are manifested as excessive proliferation, decreased apoptosis and abnormal secretion of pro-inflammatory factors, which in turn stimulate the macrophages for M1 polarization. However, the effect of M1 macrophages on fibroblasts and vascular endothelial cells has not been reported. In this study, we aim to reveal the interactions between different types of cells in the RA synovium. mRNA expression of *IL-8* and *eNOS* in M0 and M1 macrophages derived from human myeloid leukemia monocytes (THP-1) were detected by real-time fluorescence quantitative method. Moreover, the concentration of inflammatory factors in the supernatant of THP-1 derived M1 macrophages was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, the proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells was investigated by CCK8. The results showed that interleukin-1 $\beta$  and interleukin-8 proteins were mainly secreted by THP-1 derived M1 macrophages. We found that the rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (MH7A) treated with mixture of M1 macrophage supernatant and serum-containing roswell park memorial institute (RPMI) with the ratio of 7 : 3 for 48 h, and the cells proliferation was improved. Meanwhile, the proliferation of human umbilical vein cells was remarkable enhanced after treated with the mixture ratio at 6 : 4 or 7 : 3 for 72 h. Based on this study, we will further establish the *in vitro* RA pannus model in future, which will facilitate the generation of high-throughput screening techniques for anti-RA drugs development.

**Keywords** rheumatoid arthritis; fibroblasts; macrophages; vascular endothelial cells

### 1 引 言

类风湿关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 是一种主要侵蚀关节的慢性、全身性自身免疫疾病<sup>[1]</sup>。不可控的 RA 常导致关节损伤、残疾、心血管疾病和其他并发症的发生,严重影响患者的生活质量。据统计,RA 在全球范围内发病

率为 1%~2%,多见于妇女及老年人<sup>[2]</sup>。由于我国人口基数巨大,RA 患者人数已达 480 万<sup>[3]</sup>。目前 RA 发生的病因尚未明确,多认为与性别、家族性遗传和吸烟等有关<sup>[4]</sup>。临床上常用的治疗药物,如传统抗风湿药物甲氨喋呤、来氟米特以及生物制剂(如肿瘤坏死因子抑制剂——TNFi 等),虽然都可在一定程度上减缓病症,但不良

反应往往限制了其应用, 故研发安全、有效且廉价的 RA 治疗药物非常有必要<sup>[5]</sup>。由于新药研发前期成本昂贵且失败率极高, 药物安全性和有效性难以得到高效评估, 导致有效治疗药物发展缓慢<sup>[6]</sup>。因此, 若想更好地进行药物开发, 需要对 RA 的发病机理进行深入探索, 以期能找到新的药物作用靶点。

RA 的主要病理特征包括滑膜细胞异常增生、炎性细胞迁移聚集、血管翳新生等, 最终引起软骨破坏和骨侵蚀<sup>[7]</sup>。血管生成是 RA 的早期表现, RA 患者的关节滑膜通常含有丰富的血管, 体内外众多研究均表明血管生成在 RA 的病程中起着极其重要的作用<sup>[8]</sup>。其中, 血管生成不仅为增生的滑膜细胞提供更多的氧气和营养物质, 还为炎症因子的扩散提供了更多的渠道, 同时也为白细胞的浸润提供了病理条件, 最终促进了滑膜炎症的发展和骨、软骨的破坏<sup>[9]</sup>。此外, 滑膜纤维组织增生后会和周围的新生血管共同形成血管翳, 对周围的关节滑膜进一步造成破坏, 从而加快 RA 的病程发展。因此, 抑制血管生成是早期预防和治疗 RA 的重要策略之一。

正常的关节滑膜有 1~3 层细胞, 主要分为两类: 滑膜巨噬细胞和滑膜成纤维细胞。在 RA 发病前期, 滑膜增生至 8~10 层<sup>[10-11]</sup>。滑膜巨噬细胞和滑膜成纤维细胞被认为是促炎细胞因子、趋化因子和酶的主要来源, 起到降解滑膜内结缔组织及破坏关节软骨的作用<sup>[12]</sup>。滑膜巨噬细胞静息阶段表型为 M $\Phi$ , 但在不同微环境下, M $\Phi$  可由静息阶段极化为 M1 型或 M2 型<sup>[13]</sup>。在脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 或促炎因子, 如干扰素- $\gamma$  (Gamma-Interferon, IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的刺激下, M $\Phi$  被激活为 M1 型巨噬细胞。M1 型巨噬细胞主要通过产生白细胞介素-6 (Interlekin6, IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$  (Interlekin1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子促进炎症的发展。另外, M $\Phi$  在白细胞

介素-4、白细胞介素-10、白细胞介素-13 等因子的刺激下极化为 M2 型巨噬细胞, 此表型主要在炎症消除、血管生成和组织修复中发挥作用。然而, 在 RA 患者组织样本中发现 M1/M2 比率明显升高<sup>[14]</sup>。

炎性白细胞的迁移和炎症因子的浸润, 特别是随着 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的大量产生, 导致破骨细胞功能增强, 滑膜成纤维细胞向高度迁移和强破坏性的表型转化<sup>[15]</sup>。滑膜成纤维细胞激活后不仅产生具有促炎症反应的细胞因子, 还产生具有促血管生成作用的因子, 其中包括白细胞介素-8 (Interlekin 8, IL-8)、血管生成素-1 和血管内皮细胞生长因子<sup>[16]</sup>。血管内皮细胞生长因子的主要作用是促进血管内皮细胞增殖及诱导血管新生, 在白细胞介素-1 和 TNF- $\alpha$  的作用下, 其促血管新生的作用会得到进一步增强。此外, 血管生成素-1 与血管内皮细胞生长因子在血管新生中起协同效应, 具有促进血管发芽和提高血管通透性的作用<sup>[17]</sup>。然而, 滑膜巨噬细胞和滑膜成纤维细胞之间是如何相互影响的? 又是如何对血管生成产生促进作用的? 这些问题对于揭示 RA 的病理过程及体外构建 RA 血管翳病理类组织模型具有重要意义, 同时也是本文的研究重点。

目前血管新生的实验模型主要分为两种, 体外细胞培养和体内动物模型。由于动物模型建模时间长且难度较大, 故药物的初筛主要采用体外细胞培养。血管内皮细胞在 RA 血管新生的过程中受到巨噬细胞以及成纤维细胞的刺激, 所以单纯采用内皮细胞较难完整复制体内复杂的过程<sup>[18]</sup>。因此, 通过多种细胞的联合培养模拟体内血管生成过程是一种更好的方法。黄欢<sup>[19]</sup>采用 Transwell 方法, 研究染料木素对细胞共培养体系的血管抑制作用。Blasioli 等<sup>[20]</sup>的研究表明在含三维软骨成分下, 单核细胞与滑膜细胞共培养可产生细胞因子、降解酶、基质金属蛋白酶-1 和基质金属蛋白酶-3, 利用细胞间的相互作用可

体外模拟骨关节炎疾病环境,建立早期骨关节炎软骨降解模型。另外,有研究表明在未对 RA 患者滑膜进行酶切的情况下可获得炎症细胞群体,以此混合培养构建血管翳模型,在此基础上可研究白细胞介素-17 在血管翳与破骨细胞中的双向作用<sup>[21]</sup>。

由于在 RA 增生的滑膜血管翳中, M1 型巨噬细胞大量释放促炎症因子,因此其对于滑膜成纤维细胞和血管内皮细胞而言是重要的病理进展推手。然而,目前相关的研究和机理仍然不清楚,这会阻碍后续对模拟血管翳病理类组织的体外构建,因此有必要对该问题进行前期探讨。基于此,本研究采用人髓系白血病单核细胞(THP-1)源 M1 型巨噬细胞上清液进行研究。具体地,采用酶联免疫吸附测定方法检测 M1 型巨噬细胞上清液炎症因子的蛋白含量;采用 CCK8 试剂盒检测 THP-1 源 M1 型巨噬细胞上清液对促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞(MH7A)、人脐静脉细胞融合细胞(EA.hy926)的增殖作用。通过本研究,初步探讨了 M1 型巨噬细胞对滑膜巨噬细胞和成纤维细胞的影响,也为下一步体外建立 RA 血管翳模型提供前期数据支持。

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

THP-1 细胞获赠于深圳大学陈心春教授课题组,人 RA 成纤维细胞 MH7A 购于 Riken 细胞库,人血管内皮细胞 EA.hy926 获赠于香港中文大学秦岭教授课题组;细胞培养基 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)、RPMI(Roswell Park Memorial Institute),磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS),青霉素-链霉素混合双抗均购于美国 Hyclone 公司;胎牛血清购于美国 Gibco 公司;胰酶购于美国 Invitrogen 公司;佛波酯(Phorbol 12-Myristate

13-acetate, PMA)获赠于中国科学院深圳先进技术研究院李亮课题组;LPS 购于美国 Sigma-Aldrich 公司;IFN- $\gamma$  购于中国 Sinobiological 公司;CCK8 细胞增殖与毒性检测试剂盒购于日本 Dojindo 公司;酶联免疫吸附测定试剂盒(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8)购于美国 R&D 公司。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 细胞培养

本实验的 THP-1 细胞、MH7A 细胞均采用 RPMI 完全培养基(含 10% 血清和 1% 青链霉素混合双抗)进行培养,EA.hy926 细胞采用 DMEM 完全培养基(含 10% 血清和 1% 青链霉素混合双抗)进行培养。其中,细胞培养箱环境为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。

#### 2.2.2 THP-1 诱导 M1 型巨噬细胞的分型实验

THP-1 细胞状态良好且密度达 80% 时,取部分用于细胞计数后,将剩余细胞悬液离心(1 000 r/min、5 min)后,弃上层培养基并轻轻弹散细胞(避免细胞抱团),调整种板密度为  $3.5 \times 10^5$  个/mL,同时加入 100 ng/mL PMA,移液枪混匀后等体积分到相应培养皿中,随后置于培养箱内。PMA 作用 48 h 后使其诱导分化为 M $\Phi$  型细胞, PBS 清洗三遍,加入新鲜 RPMI 培养基(无血清)过夜。次日用 RPMI 完全培养基配制 100 ng/mL LPS 和 20 ng/mL IFN- $\gamma$  并替换细胞培养液,作用 24 h 后转为 M1 型巨噬细胞,用 PBS 清洗两遍,更换为 RPMI 培养基(无血清)培养 24 h,收集 THP-1 源巨噬细胞及其上清液。

#### 2.2.3 引物合成

所用引物委托华大基因科技有限公司合成,具体引物序列如表 1 所示。

#### 2.2.4 实时荧光定量法

为检测 M $\Phi$  型和 M1 型巨噬细胞中 IL-8、eNOS 基因在 mRNA 水平上的含量变化,诱导 THP-1 成为 M $\Phi$  型后,加入新鲜 RPMI 完全培养

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	上游引物	下游引物
<i>IL-8</i>	5'-ACATGACTTCCAAGCTGGCCG-3'	5'-TTTATGAATTCTCAGCCCTC-3'
<i>eNOS</i>	5'-ACCCTCACCGCTACAACATC-3'	5'-GCTCATTCTCCAGGTGCTTC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-GGAGTCCACTGGCGTCTT-3'	5'-AGGCTGTTGTCACTTCTCAT-3'

基过夜。接着, M0 组用 RPMI 完全培养基替换原本培养基作用 24 h; M1 组用 RPMI 完全培养基配制 100 ng/mL LPS 和 20 ng/mL IFN- $\gamma$  并替换细胞培养液作用 24 h。此后, 两组均换为 RPMI 培养基(无血清)培养 24 h。接着, 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA, 同时采用紫外分光光度计定量各 mRNA 浓度并进行 RNA 逆转录。其中, 逆转录程序为: 37  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min; 85  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s; 4  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\infty$ 。逆转录完成后得到 cDNA, 将其与上下游引物等反应液混匀充分后, 离心去除气泡, 使用荧光定量 PCR 仪器进行检测。

### 2.2.5 酶联免疫吸附测定

为检测 M1 型巨噬细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及 IL-8 的蛋白含量。将收集到的 M1 型巨噬细胞上清液吸取到 1.5 mL 小型离心管(Eppendorf)中进行离心(3 000 r/min、20 min), 离心结束后将上层液体转入新的离心管中; 随后按说明书配制标准液, 将样品加到酶联免疫吸附测定试剂盒专用的 96 孔板中, 孵育, 清洗。接着加入抗体结合液后再次孵育, 清洗, 加入显色液, 避光孵育, 随即加入终止液。充分混匀后采用紫外分光光度计在 450 nm 和 540 nm 波长处测量样品吸光值, 根据标准曲线即可计算出各因子的蛋白含量。

### 2.2.6 CCK8 细胞增殖与毒性实验

为检测 M1 型巨噬细胞上清液对 MH7A、EA.hy926 的增殖与毒性作用, 将 MH7A 细胞(密度为 5 000 个/孔)、EA.hy926 细胞(密度为 3 000 个/孔)分别接种于 96 孔板。其中, 收集 M1 型巨噬细

胞上清为实验组; 将不加处理的无血清 RPMI 作为对照组, 并以此作为条件培养基。对于 MH7A 细胞而言, 对照组培养基使用 RPMI(无血清)与 RPMI 完全培养基混合, 比例分别为 5:5、6:4 和 7:3; 实验组培养基使用 M1 型巨噬细胞上清液与 RPMI 完全培养基混合, 比例对应为 5:5、6:4 和 7:3。经过恒温培养箱分别培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 每孔加入 10% 培养基体积的 CCK8, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。孵育完成后, 使用紫外分光光度计在 450 nm 波长下测量吸光值, 利用细胞活力公式计算增殖与毒性值。

对于 EA.hy926 细胞而言, 对照组培养基使用 RPMI(无血清)与 DMEM 完全培养基混合, 比例分别为 5:5、6:4 和 7:3; 实验组培养基使用 M1 型巨噬细胞上清液与 DMEM 完全培养基混合, 比例对应为 5:5、6:4 和 7:3, 分别作用 24 h、48 h、72 h 进行 CCK8 测试, 并根据公式对相应指标进行计算。

### 2.2.7 统计学分析

首先, 对实时荧光定量法、酶联免疫吸附测定、CCK8 实验获得的初步数据使用 Excel 进行公式计算; 然后, 使用 SPSS17.0 软件对所有组内及组间数据进行分析。其中, 所有数值均以“平均值 $\pm$ 标准误差”表示; 采用单因素方差分析和双因素方差分析了解各组数据间是否具有统计学差异。当  $P < 0.05$  时, 认为两组数据间具有统计学差异; 当  $P < 0.01$  时, 认为两组数据间具有显著统计学差异; 当  $P < 0.001$  时, 认为两组数据间具有极显著统计学差异。

### 3 实验结果

#### 3.1 THP-1 细胞诱导的 M1 型巨噬细胞的形态变化

光学显微镜下观察 THP-1 细胞状态良好时细胞形态呈圆形，大小均一，为单个悬浮细胞(图 1(a))；经 100 ng/mL PMA 诱导 48 h 后，部分细胞形态发生改变，呈长梭型，且贴壁牢固，细胞团聚生长，此时诱导分化成的细胞为 THP-1-M $\Phi$  型(图 1(b))。静息过夜后，加入 LPS、IFN- $\gamma$  诱导 6 h，细胞形态呈现细长状，且细胞膜突起更为明显，此时诱导分化成的细胞为 THP-1-M1 型(图 1(c))。LPS、IFN- $\gamma$  诱导 24 h，圆形或椭圆形细胞脱落较多，此时诱导分化成的细胞也为 THP-1-M1 型，但单个细胞突起较 6 h 更多(图 1(d))。

#### 3.2 RT-PCR 检测 THP-1 源 M $\Phi$ 和 M1 型巨噬细胞中 *IL-8*、*eNOS* 的 mRNA 水平

巨噬细胞 M $\Phi$  与经 100 ng/mL LPS 和 20 ng/mL IFN- $\gamma$  诱导 24 h 的 M1 型巨噬细胞相比，两者在 *IL-8*、*eNOS* 的 mRNA 水平上均有表达，但没有显著性差异( $P>0.05$ ) (图 2)。

#### 3.3 酶联免疫吸附测定检测 THP-1 源巨噬细胞上清液中炎症因子的蛋白含量

与同一时期收取的 M0 型细胞上清液相比，经 LPS+IFN- $\gamma$  诱导 6 h 的 THP-1-M1 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 含量显著增多，其中 IL-1 $\beta$  浓度增加了 3.61 倍，IL-8 增加了 2.84 倍；经 LPS+IFN- $\gamma$  诱导 24 h 后，THP-1-M1 细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-8 含量较 M0 上清液中有所增多，IL-1 $\beta$  浓度增加了 1.67 倍，IL-8 浓度增加了 2.1 倍，但显著性差异较诱导 6 h 的小(图 3)。另外，由

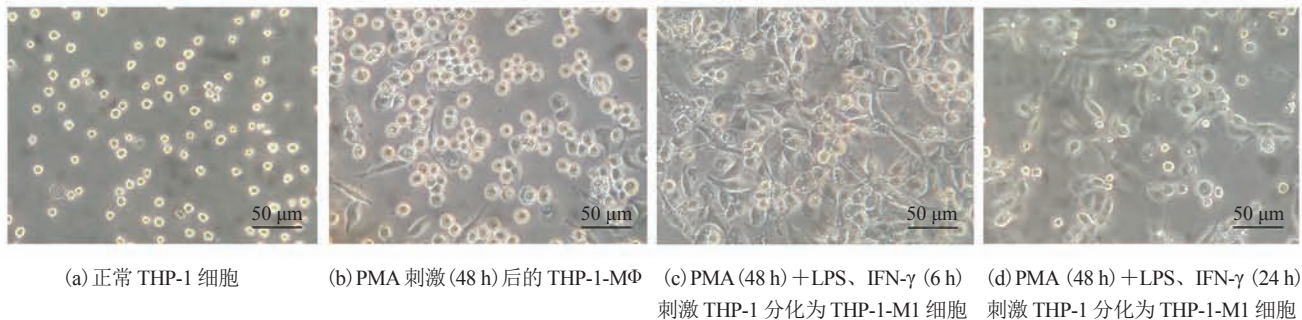


图 1 THP-1 不同诱导阶段的细胞形态( $\times 20$ )

Fig. 1 Cell morphology of THP-1 in different induction stages ( $\times 20$ )

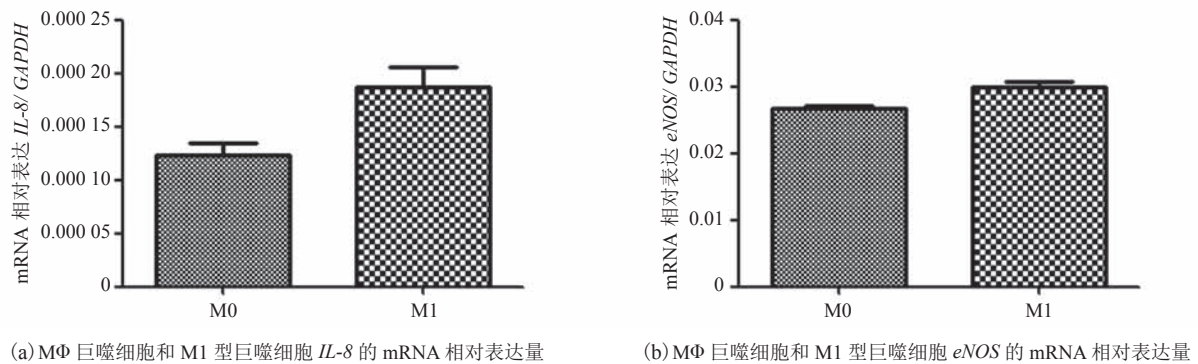
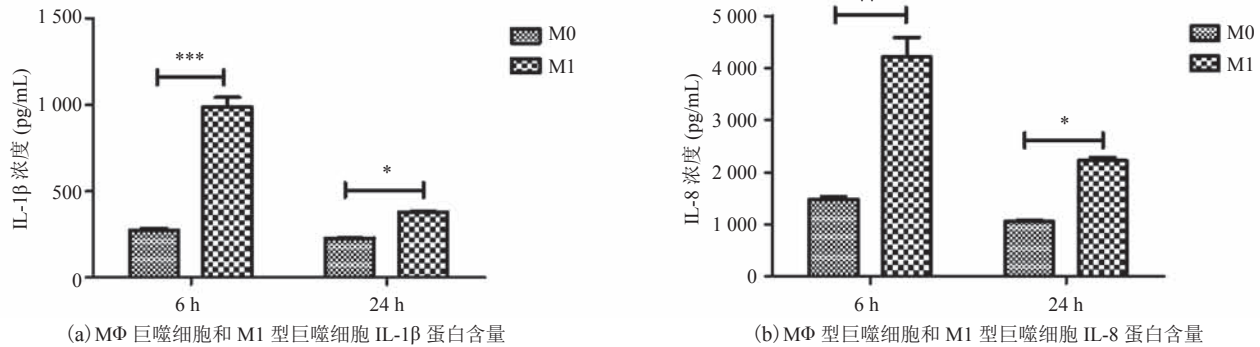


图 2 RT-PCR 检测 THP-1 源 M $\Phi$  和 M1 型巨噬细胞 *IL-8* 与 *eNOS* 的表达量

Fig. 2 Expression of *IL-8* and *eNOS* in M $\Phi$  and M1 macrophages derived from THP-1



注: \*表示  $P < 0.05$ ; \*\*表示  $P < 0.01$ ; \*\*\*表示  $P < 0.001$ ; 同图 4

图 3 酶联免疫吸附测定检测细胞上清中 IL-1 $\beta$  和 IL-8 的蛋白含量

Fig. 3 The protein content of IL-1 $\beta$  and IL-8 was detected by ELISA

于各组分泌 IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平较低, 无法进行比较(未显示)。

### 3.4 CCK8 检测 M1 型巨噬细胞上清液对 MH7A、EA.hy926 细胞的增殖作用

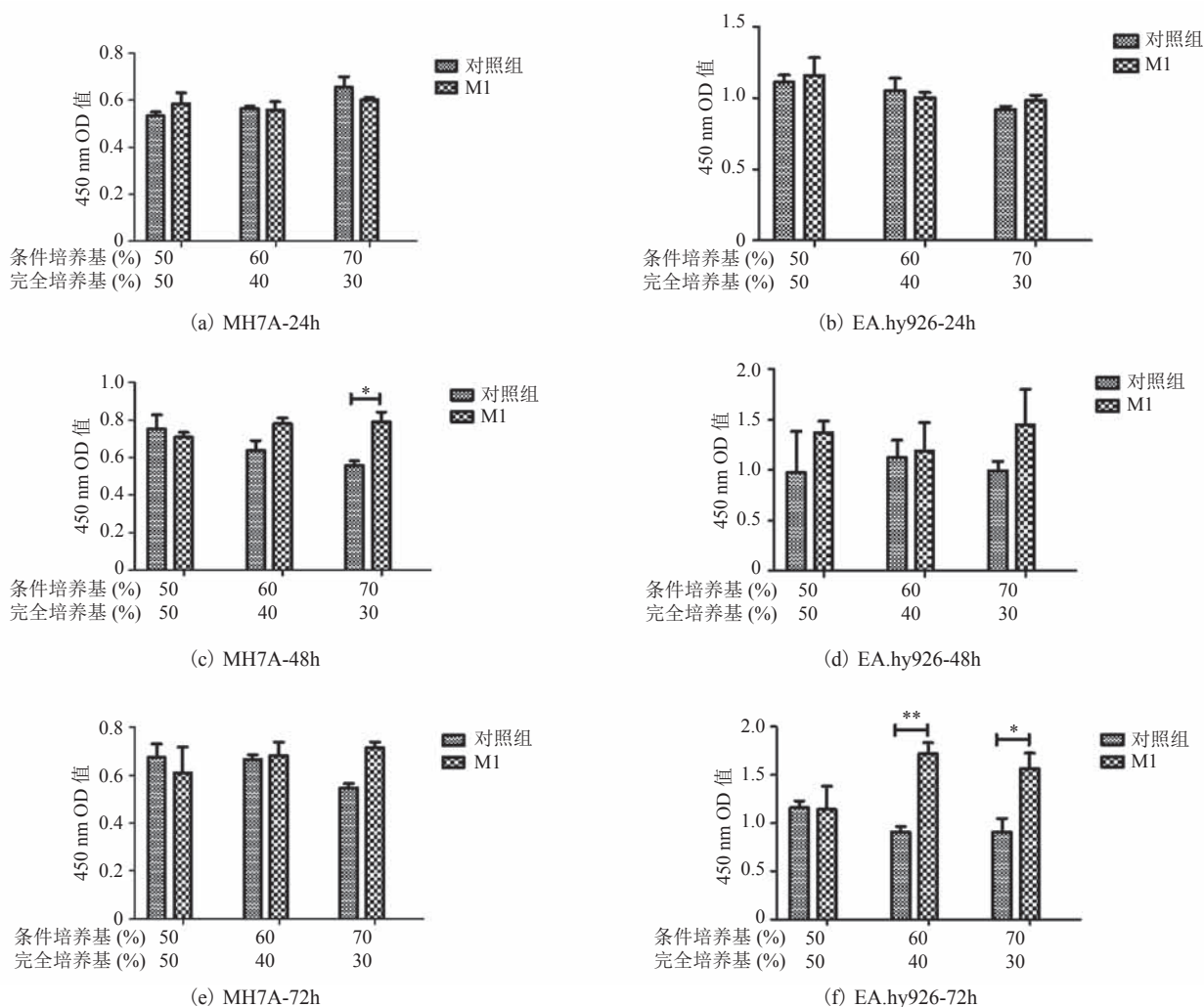
在实验组中, 条件培养基为 LPS + IFN- $\gamma$  处理 THP-1 细胞 24 h 后 M1 型细胞的无血清 RPMI 上清液, 对照组条件培养基为不加处理的无血清 RPMI 培养基。当条件培养基与 RPMI 含血清培养基混合比例为 7 : 3 作用 MH7A 细胞 48 h 时, M1 型巨噬细胞上清液组对 MH7A 细胞的增殖作用明显高于无血清 RPMI 组, 细胞存活率较无血清 RPMI 组高 1.41 倍 ( $P < 0.05$ )。另外, 条件培养基与 DMEM 含血清培养基混合比例为 6 : 4 和 7 : 3 作用 EA.hy926 细胞 72 h 时, M1 巨噬细胞上清液组对 EA.hy926 细胞的增殖作用明显高于无血清 RPMI 组, 细胞存活率较无血清 RPMI 组分别高 1.89 倍和 1.72 倍, 且具有显著性差异(图 4)。

## 4 讨论与分析

在 RA 中, 细胞间的相互作用会影响药物治疗的效果。因此, 阐明 RA 各类细胞的相互影响将有助于更好地建立 RA 血管翳模型, 同时可以高效、低成本地进行 RA 药物的高通量筛选。本

文从巨噬细胞的作用及其对成纤维细胞、血管内皮细胞的增殖影响进行研究, 了解在滑膜增生血管翳中促炎的 M1 型巨噬细胞对另外两种细胞的作用。同时对 RA 病理血管翳类组织的构建条件进行了摸索, 为后续体外筛选 RA 治疗药物提供支撑。本文初步探讨的结果显示: 体外 THP-1 源 M1 型巨噬细胞主要分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-8 两种炎症因子, 但低表达 IL-6、TNF- $\alpha$ 。CCK8 结果显示, 巨噬细胞上清液对 MH7A 细胞促增殖作用不明显, 72 h 对 EA.hy926 细胞的促增殖作用较显著。

在 RA 中, TNF- $\alpha$  能直接影响内皮细胞的增殖与分化, 参与血管新生。此外, TNF- $\alpha$  联合 IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-17 刺激成纤维细胞产生血管内皮细胞生长因子, 也可以间接促进血管生成。IL-1 $\beta$  虽然不直接参与血管新生, 但可引起成纤维细胞中血管生成素-1、内皮细胞 TEK 酪氨酸激酶和血管内皮细胞生长因子的表达升高, 进而影响血管生成。IL-8 主要由巨噬细胞和成纤维细胞分泌, 通过结合内皮细胞上 CXCR1 和 CXCR2 受体(A 类视紫红质样 G 蛋白偶联受体), 促进血管生成<sup>[9]</sup>。Tu 等<sup>[22]</sup>认为巨噬细胞与成纤维细胞在 RA 中存在细胞交流, 巨噬细胞主要通过分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  诱导成纤维细胞转化为“肿瘤”样细胞; 成纤维细胞通过分泌 IL-6、血管内



(a, c, e) 分别为不同比例 THP-1 源 M1 巨噬细胞上清液在 24 h、48 h、72 h 对 MH7A 细胞的增殖作用；(b, d, f) 分别为不同比例 THP-1 源 M1 巨噬细胞上清液在 24 h、48 h、72 h 对 EA.hy 926 细胞的增殖作用

图 4 CCK8 测定 THP-1 源 M1 巨噬细胞上清液对 MH7A 和 EA.hy926 细胞的增殖作用

Fig. 4 CCK8 was used to determine the proliferation of MH7A and EA.hy926 cells by the supernatant of M1 macrophages derived from THP-1

皮细胞生长因子等细胞因子，促进血管生成。由于 RA 滑膜巨噬细胞含量少且不易在体外长期培养，故本文采用 PMA 诱导 THP-1 单核细胞形成巨噬细胞的方法模拟巨噬细胞的作用。

酶联蛋白吸附测定实验显示，LPS 和 IFN- $\gamma$  诱导巨噬细胞 6 h、24 h 后，M1 型巨噬细胞上清液 IL-1 $\beta$ 、IL-8 炎症因子含量明显增多。其中，LPS 和 IFN- $\gamma$  诱导 6 h 后，M1 上清液中 IL-1 $\beta$  浓度增加了 3.61 倍，IL-8 增加了 2.84 倍；LPS 和

IFN- $\gamma$  诱导 24 h 后，M1 上清液中 IL-1 $\beta$  浓度增加了 1.67 倍，IL-8 浓度增加了 2.1 倍。然而低表达 IL-6、TNF- $\alpha$ 。有文献报道 M1 上清中含有 IL-6 和 TNF- $\alpha$ ，此处不相符的原因可能是本文与其他文献所用的 PMA、LPS 和 IFN- $\gamma$  浓度及作用时间不同<sup>[23-24]</sup>。在诱导过程中，PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞，其使用量、诱导时间对分化程度及功能的影响具有显著性差异<sup>[25]</sup>。

在 CCK8 实验结果中，M1 型巨噬细胞上



清液与 RPMI 含血清培养基混合比例为 7:3 作用 MH7A 细胞 48 h 时, 细胞存活率较无血清 RPMI 组高 1.41 倍; M1 型巨噬细胞上清液与 DMEM 含血清培养基混合比例为 6:4 和 7:3 作用 EA.hy926 细胞 72 h 时, 细胞存活率较无血清 RPMI 组分别高 1.89 倍和 1.72 倍。THP-1 源巨噬细胞上清液对 MH7A、EA.hy926 细胞增殖无明显作用, 可能是由于 LPS 和 IFN- $\gamma$  诱导 24 h 时, M1 巨噬细胞的细胞因子分泌量较少, 如 IL-1 $\beta$  蛋白含量约为 379 pg/mL, 相较于研究常用的 10 ng/mL IL-1 $\beta$ , 或 20 ng/mL TNF- $\alpha$  的刺激量远远不足。另外, 在本实验中, 由于批次间细胞密度不完全一致导致炎症因子浓度间的差异, 因此 CCK8 结果不稳定。但可以观察到, 24 h 时 M1 上清液组与对照组无血清 RPMI 的细胞存活率间无明显差异, 而在 48 h、72 h、血清含量相同的情况下, THP-1 源 M1 型细胞无血清上清液对细胞的存活仍然起到一定的作用, 初步确定了 THP-1 源 M1 型细胞分泌的因子对 MH7A 和 EA.hy926 细胞具有增殖作用。由于 THP-1 源巨噬细胞与患者体内病理环境下滑膜巨噬细胞存在差异, 本研究仅初步探讨了在 RA 增殖的滑膜中不同细胞间的相互作用。

Nozaki 等<sup>[26]</sup>表明从 RA 病患滑膜处收集细胞后直接进行培养能够构建体外 RA 血管翳模型, 虽然这种方法更贴合真实病理情况, 但由于性别、发病程度等因素的不同, 难以将模型标准化进行 RA 药物的高通量筛选。另外, Ibold 等<sup>[27]</sup>收集猪源软骨细胞与 RA 源滑膜成纤维细胞在体外构建血管翳模型, 但更多着重于比较人工与机器操作的剪切力与准确性。本文基于巨噬细胞对滑膜成纤维细胞的诱导转型作用, 采用 THP-1 细胞系诱导形成的 M1 型巨噬细胞, 体外研究 M1 型巨噬细胞对成纤维细胞 MH7A 的刺激作用及血管内皮细胞 EA.hy926 的增殖作用。但本文也存在不足, 如未检测 M1 型巨噬细胞上清液对

MH7A 中促血管因子在 mRNA、蛋白水平上的变化以及对 EA.hy926 细胞迁移、成管腔能力的作用。因此, 未来构建类风湿性关节炎血管翳模型时需进行进一步探讨。

## 5 结 论

本研究围绕 THP-1 源 M1 巨噬细胞上清液是否促进 MH7A、EA.hy926 细胞增殖进行探讨。通过 PMA 诱导 THP-1 细胞, 经 LPS 和 IFN- $\gamma$  刺激 24 h, 得到 M1 型巨噬细胞。酶联免疫吸附测定检测 M1 型巨噬细胞上清液主要含有 IL-1 $\beta$ 、IL-8 蛋白。将 M1 型巨噬细胞上清液与含血清培养基进行不同比例混合发现, 对 MH7A 细胞而言, 7:3 的比例在 48 h 时能促进细胞增殖; 对 EA.hy926 细胞而言, 6:4 和 7:3 在 72 h 对细胞增殖更为明显。以上研究数据提示, M1 巨噬细胞与 MH7A、EA.hy926 细胞存在相互作用, 未来工作将以此作为基础构建类风湿性关节炎血管翳模型并应用于 RA 药物高通量筛选, 以更高效地筛选安全有效的 RA 治疗药物。

## 参 考 文 献

- [1] Townsend MJ. Molecular and cellular heterogeneity in the rheumatoid arthritis synovium: clinical correlates of synovitis [J]. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2014, 28(4): 539-549.
- [2] Doan T, Massarotti E. Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies [J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2005, 45(7): 751-762.
- [3] Zhao JJ, Zhan TH, Zhu JQ, et al. Long-term prognosis and quality of life in patients with early rheumatoid arthritis treated according to the 2015 ACR guideline (LELAND): protocol for a multicentre prospective observational study in Southern China [J]. *BMJ Open*, 2018, 8(11): e023798.
- [4] Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, et al. Genetic and environmental risk factors for

- rheumatoid arthritis [J]. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 2017, 31(1): 3-18.
- [5] 曹芝艳, 于泓. 类风湿关节炎治疗研究进展 [J]. *山东医药*, 2019, 59(21): 108-111.
- [6] 唐靓, 杨亚冬, 罗涛, 等. 3D 打印技术在医药卫生领域中的应用及研究进展 [J]. *中国现代医生*, 2016, 54(28): 165-168.
- [7] Asif AM, Fox DA, Ruth JH. Synovial cellular and molecular markers in rheumatoid arthritis [J]. *Semin in Immunopathol*, 2017, 39(4): 385-393.
- [8] Semerano L, Clavel G, Assier E, et al. Blood vessels, a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? [J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(2): 118-123.
- [9] Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV, et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Angiogenesis*, 2015, 18(4): 433-448.
- [10] Zvaifler NJ, GS Firestein. Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 1994, 37(6): 783-789.
- [11] Zhang F, Wei K, Slowikowski K, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry [J]. *Nature Immunology*, 2019, 20(7): 928-942.
- [12] Sudol-Szopinska I, Kontny E, Maslinski W, et al. The pathogenesis of rheumatoid arthritis in radiological studies. Part I: formation of inflammatory infiltrates within the synovial membrane [J]. *Journal of Ultrasonography*, 2012, 12(49): 202-213.
- [13] Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 76(3): 509-513.
- [14] Siouti E, Andreakos E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2019, 165: 152-169.
- [15] Harre U, Schett G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis [J]. *Seminars in Immunopathology*, 2017, 39(4): 355-363.
- [16] Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, et al. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2017, 19(1): 110.
- [17] Paleolog EM. Angiogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Research*, 2002, 4(Suppl 3): S81- S90.
- [18] 刘春芳. 抗类风湿性关节炎滑膜血管新生的中药药效评价方法研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2012.
- [19] 黄欢. 染料木素抑制类风湿性关节炎血管生成的机制研究 [D]. 深圳: 中国科学院大学深圳先进技术学院, 2018.
- [20] Blasioli DJ, Matthews GL, Kaplan DL. The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(4): 1185-1191.
- [21] Ito H, Yamada H, Shibata TN, et al. Dual role of interleukin-17 in pannus growth and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2011, 13(1): R14.
- [22] Tu J, Hong W, Zhang P, et al. Ontology and function of fibroblast-like and macrophage-like synoviocytes: how do they talk to each other and can they be targeted for rheumatoid arthritis therapy? [J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1467.
- [23] Huang YL, Tian C, Li QM, et al. TET1 knockdown inhibits porphyromonas gingivalis LPS/IFN- $\gamma$ -induced M1 macrophage plarization through the NF- $\kappa$ B pathway in THP-1 cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8): 2023.
- [24] 周瑶瑶. 姜黄素介导 THP-1 来源巨噬细胞极化及其机制的研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [25] Lund ME, To J, O'Brien BA, et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2016, 430: 64-70.
- [26] Nozaki T, Takahashi K, Ishii O, et al. Development of an ex vivo cellular model of rheumatoid arthritis: critical role of CD14-positive monocyte/macrophages in the development of pannus tissue [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2007, 56(9): 2875-2885.
- [27] Ibold Y, Frauenschuh S, Kaps C, et al. Development of a high-throughput screening assay based on the 3-dimensional pannus model for rheumatoid arthritis [J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2007, 12(7): 956-965.