

网络出版时间: 2021-6-11 16:31 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0927.002.html>

◇基础医学研究◇

Scara3 介导巨噬细胞对多壁碳纳米管摄取和炎症细胞因子产生的影响

王琼¹, 何佳丽², 王其其³, 赵子悦¹, 徐结苟¹

摘要 目的 研究清道夫受体 A 成员 3 (Scara3) 在多壁碳纳米管 (MWCNT) 摄取和细胞因子产生中的作用。方法 在存在或不存在血清的条件下, 比较 MWCNT 刺激后的对照组细胞 (NC 组) 和敲低组细胞 (Scara3 k/d 组) 中肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白介素 (IL)-1 β 及 IL-6 的表达、MWCNT 的摄取。结果 与存在血清条件比较, 无血清时, 无论是 NC 组还是 Scara3 k/d 组对 MWCNT 刺激后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达和对 MWCNT 摄取均下降; 而与 NC 组相比, 无论是含血清还是不含血清, Scara3 k/d 组明显降低 MWCNT 诱导的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达和对 MWCNT 摄取。结论 Scara3 介导了巨噬细胞对 MWCNT 摄取和细胞因子的产生。

关键词 多壁碳纳米管; 巨噬细胞; Scara3; 吞噬作用; 细胞因子

中图分类号 R 392.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1007-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.001

人工合成纳米材料 (engineered nanomaterial, ENM) 进入机体后产生炎症等异物反应^[1]。巨噬细胞对颗粒性异物的吞噬作用是一个重要防御机制^[2]。巨噬细胞的病原微生物吞噬有两种基本方式: ① 巨噬细胞膜上的模式识别受体介导的吞噬; ② 调理吞噬, 即巨噬细胞膜上的 Fc γ R 或补体受体介导的吞噬。ENM 在体液中其表面吸附了多层蛋白质^[3], 其中包含 IgG 和补体, 通过它们的调理作用从而促进巨噬细胞的吞噬^[4]。

多壁碳纳米管 (multi-walled carbon nanotubes, MWCNT) 是一种新型纳米材料, 具有良好的应用前景^[5], 但在动物实验中其具有炎症、纤维化和恶性

肿瘤等肺部毒性^[6]。该课题组前期研究表明刺激小鼠巨噬细胞 Raw264.7 清道夫受体 A 成员 3 (scavenger receptor A member 3, Scara3) 表达增高, 该研究将深入探讨 Scara3 在巨噬细胞对 MWCNT 的摄取和炎症细胞因子产生中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 纳米材料 MWCNT 购自三井化学有限公司; SiO₂ 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; TiO₂ 购自日本化妆品协会; 富勒烯 C60 购自日本先端碳材料株式会社; TRIzol 试剂购自广州美基生物科技有限公司; HiScript[®] II QRT SuperMix for qPCR 试剂盒、AceQ[®] qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒和 2 × Rapid Taq Master Mix 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; siRNA、shRNA 质粒均购自上海吉玛基因有限公司; 抗 Scara3 抗体购自美国 Novusbio 公司; 抗 Gapdh 抗体购自美国 Peprotech 公司; 电化学发光显影液 (ECL) 购自赛默飞世尔科技有限公司; X-VIVO 巨噬细胞无血清培养基购自比利时 Lonza 公司; ELISA 试剂盒购自上海酶联生物有限公司。

Polytron PT1600 E 匀浆器购自瑞士 Kinematica 公司; JY92-2 超声粉碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; LightCycler 96 定量 PCR 仪购自美国 Roche 公司; NEPA21 高效基因电转仪购自日本 NEPA GENE 公司; 凝胶数码成像分析系统购自上海天能科技有限公司; ECLIPSE 偏光显微镜购自尼康仪器有限公司。

1.2 细胞系及培养 小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。RAW264.7 复苏后, 用添加了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 传代用 0.25% 胰蛋白酶消化。

1.3 ENM 悬液的制备 在无菌条件下分别称取 MWCNT、SiO₂、TiO₂ 及富勒烯 C60 纳米材料粉末各 10 mg, 放入 20 ml 含 0.5% Pluronic F-68 的生理盐

2021-03-19 接收

基金项目: 安徽省重点研究和开发计划对外科技合作项目 (编号: 201904b11020024)

作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院免疫学教研室, 合肥 230032² 安徽省疾病预防控制中心免疫预防科, 合肥 230093³ 武警安徽省总队医院检验科, 合肥 230041

作者简介: 王琼, 女, 硕士研究生;

徐结苟, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xujiegou@ahmu.edu.cn

水中。MWCNT 悬液用匀浆器打碎(3 000 r/min) 4 次, 每次 1 min, 间隔 2 min。然后 MWCNT 及其他纳米材料悬液每次使用前用超声粉碎仪以 600 W 超声处理 15 min。终浓度为 500 g/L。

1.4 RNA 的提取、逆转录和定量 PCR Raw264. 7 细胞总 RNA 提取、逆转录和定量 PCR 分别采用 TRIzol、HiScript® II QRT SuperMix for qPCR 和 AceQ® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行, 使用定量 PCR 仪分析靶基因表达情况。以 GAPDH 为内参 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各靶基因的相对表达量。小鼠靶基因所使用的定量 PCR 引物见表 1。

表 1 引物序列

目的基因	正向引物(5'-3')	反向引物(3'-5')
Gapdh	AACGACCCCTTCATTGAC	TCCACGACATACTCAGCAC
Scara3	GGCATGGACATCACCTGAA	CAGTCTTGGCAGAGTGCTT
TNF- α	AAAACGGAGCTGAGCTGTCC	GACCCGTAGGGCATTACAG
IL-1 β	GCAGTGGTTCGAGGCCTAAT	CATCACTGTCAAAAAGGTGGCA
IL-6	CAACGATGATGCACCTGCAGA	TCTGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG

1.5 建立 Raw264. 7 的 Scara3 k/d 稳定表达株 1×10^6 个 Raw264. 7 细胞悬于 Opti-Mem 中, 加入 1 μ g Scara3 shRNA 质粒 DNA(预先用 3 条 siRNA 进行预实验, 选用敲低效果最佳的序列建立 shRNA 质粒) 混匀后, 用 NEPA21 高效基因电转仪转染。24 h 后, 培养基中加入 800 mg/L G418 进行筛选, 约 14 d 后大部分细胞死亡, 极少部分转染成功的细胞存活形成克隆。挑取较大的细胞克隆于 24 孔板培养, 待细胞长满后再扩大培养来建立稳定细胞株。

对 Scara3 的敲低效果采用普通 PCR、定量 PCR 和 Western blot 进行检测。RNA 提取、逆转录和定量 PCR 方法见 1. 4。普通 PCR 反应使用 $2 \times$ Rapid Taq Master Mix 进行, 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳后, 使用成像分析仪器进行成像。Scara3 蛋白表达采用 Western blot 检测, 简述如下: 20 mg 总蛋白上样进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜、封闭后, 加入一级抗体(抗 Scara3, 1 : 1 000 稀释; 以及抗 GAPDH, 1 : 1 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗 3 次, 然后将膜与 1 : 10 000 稀释的二级抗体共孵育 1 h。最后使用 ECL 进行显影成像。

1.6 MWCNT 对巨噬细胞的暴露 取 1×10^6 个对数生长期的空载或 Scara3 ShRNA 稳转的 Raw264. 7 细胞, 接种于 6 孔板, 在含 1 mg/L LPS 的 DMEM 完全培养基培养 8 h 后, 细胞大部分被 LPS

活化贴壁, 吸去细胞培养上清液, 更换为含 10% 胎牛血清及 1 mg/L LPS 的 X-VIVO 巨噬细胞无血清培养基或含 1 mg/L LPS 的 X-VIVO 巨噬细胞无血清培养基, 培养 24 h 后, 加入 10 mg/L MWCNT 刺激 12 h 后, 收取上清液和细胞分别用于 Elisa 和定量 PCR 检测细胞因子的表达情况。

1.7 炎症细胞因子分析 收取的细胞培养上清液 3 000 r/min 离心 20 min, 去除沉淀。上清液中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factors, TNF) - α 、白介素(interleukin, IL) -1 β 及 IL-6 的浓度采用 ELISA 试剂盒按产品说明进行测定。细胞中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的 mRNA 表达按 1. 4 方法进行测定。

1.8 偏振显微镜观察细胞摄取 取 1×10^6 个对数生长期的空载或 Scara3 ShRNA 稳转的 Raw264. 7 细胞, 接种于预先放置了细胞爬片的 6 孔板, 在含 1 mg/L LPS 的 DMEM 完全培养基培养过夜, 大部分细胞被 LPS 活化贴壁, 轻轻吸去细胞培养上清液和未贴壁的细胞。更换培养基为添加或不加 10% 胎牛血清的含 1 mg/L LPS 的 X-VIVO 巨噬细胞无血清培养基继续培养 12 h, 然后加入 1 mg/L 的 MWCNT 刺激 12 h。细胞爬片上的细胞经 4% 多聚甲醛固定 20 min 后进行 HE 染色, 然后用中性树胶封片。使用 ECLIPSE 偏光显微镜, 在 20 倍镜下随机选取 10 个视野来观察细胞中含有的发光 MWCNT 数量, 然后计算含发光 MWCNT 的细胞数占细胞总数的百分比。

1.9 统计学处理 统计学分析采用 SSPS 19. 0 软件进行。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用双尾 t 检验比较组间差异, 以 $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MWCNT 悬液的制备和观察结果 为了研究 MWCNT 对巨噬细胞的作用, 先将 MWCNT 干粉制成悬液。电子显微镜下 MWCNT 在悬液中仍然呈管状, 并聚集成大小不等的团块(图 1A), 经 NanoSight 分析显示这些聚集团块的大小。见图 1B。

2.2 MWCNT 诱导 Scara3 表达增加和建立稳定 Scara3 敲低的细胞系 定量 PCR 的结果显示, 在 MWCNT 刺激的 Raw264. 7 细胞中 Scara3 的表达远高于对照组和其他纳米材料(SiO₂、TiO₂ 及富勒烯 C60) 刺激组(图 2A), 提示 Scara3 可能参与了巨噬细胞对 MWCNT 的吞噬以及细胞因子产生等过程。

为了阐明 Scara3 在巨噬细胞对 MWCNT 吞噬以及细胞因子产生的作用, 首先采用 shRNA 技术建立

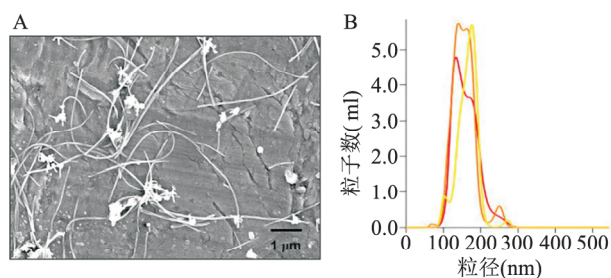


图1 MWCNT的形态和大小

A: 电镜下MWCNT形态 $\times 10\,000$; B: Nanosight测量的MWCNT粒径

了稳定 Scara3 表达敲低(Scara3 k/d) Raw264.7 系。图2B显示2个代表性克隆 Scara3 的表达,其中1个克隆(克隆8)的 Scara3 mRNA 被明显敲低;定量PCR表明克隆8的 Scara3 约为稳定转染对照质粒(NC)细胞的10.65%(图2C)。Western blot 进一步表明克隆8 Scara3 蛋白表达也显著下降(图2D)。因此,随后的研究在克隆8细胞系(Scara3 k/d 组)和稳转对照-5(NC组)细胞系上进行。

2.3 Scara3 敲低减少炎症细胞因子的产生 该研究以 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 为指标来观察巨噬细胞对 MWCNT 刺激的反应。如图3A、B和C所示,与存在血清条件相比,无血清条件时,无论是 NC 组还是 Scara3 k/d 组巨噬细胞经 MWCNT 刺激后所表达的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 均有一定程度下降;而与 NC 相比,无论是存在还是不存在血清的条件下, Scara3 k/d 都明显降低了 MWCNT 诱导巨噬细胞产生的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 表达水平。使用 ELISA 测定培养上清液中这些炎症细胞因子的含量,结果显示在存在和不存在血清的两种条件下, Scara3 k/d 组 MWCNT 刺激后,巨噬细胞产

生的 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌降低(图3D、E、F)。

2.4 Scara3 敲低后降低对 MWCNT 的摄取 偏光显微镜技术利用光折射原理,在弱光源背景下,颗粒性材料会发出折射的光。因此,在偏光显微镜下可以观察到 MWCNT 的分布。通过偏光显微镜观察显示,在存在血清时,NC 细胞中含有 MWCNT 的比例较多(图4A、E),而 Scara3 k/d 细胞中的比例下降(图4B、E);同样,在不存在血清时,NC 细胞和 Scara3 k/d 细胞中该比例分别为(13.40 \pm 5.23)%和(9.29 \pm 2.11)% (图4C、D和E)。关于吞噬率的统计学比较,血清组中 Scara3 k/d 与 NC 组比较的 $P=0.00018$,无血清组中 Scara3 k/d 与 NC 组比较的 $P=0.00034$;无血清组 NC 与血清组 NC 比较的 $P=0.00016$,无血清组 Scara3 k/d 与血清组 Scara3 k/d 比较的 $P=0.012$,差异有统计学意义。

3 讨论

新型纳米材料 MWCNT 在材料科学、半导体工业和生物医学领域具有良好的应用前景,但许多研究^[7]表明 MWCNT 可以引起机体的炎症反应以及其他毒性。巨噬细胞通过对 MWCNT 等颗粒性物质的吞噬而清除进入机体的这些颗粒性材料,起到保护机体的防御作用,但同时巨噬细胞颗粒性材料而活化后产生许多细胞因子和氧自由基,促进炎症反应,引起细胞损伤。因此,了解巨噬细胞对 MWCNT 的吞噬和炎症因子产生在研究 MWCNT 毒性机制和指导更安全的 MWCNT 等方面具有重要意义。

既往研究中通过转录组高通量测序,表明在纳米材料刺激小鼠巨噬细胞 Raw264.7 基因表达谱改变中,纳米材料诱导了几个模式识别受体的表达增

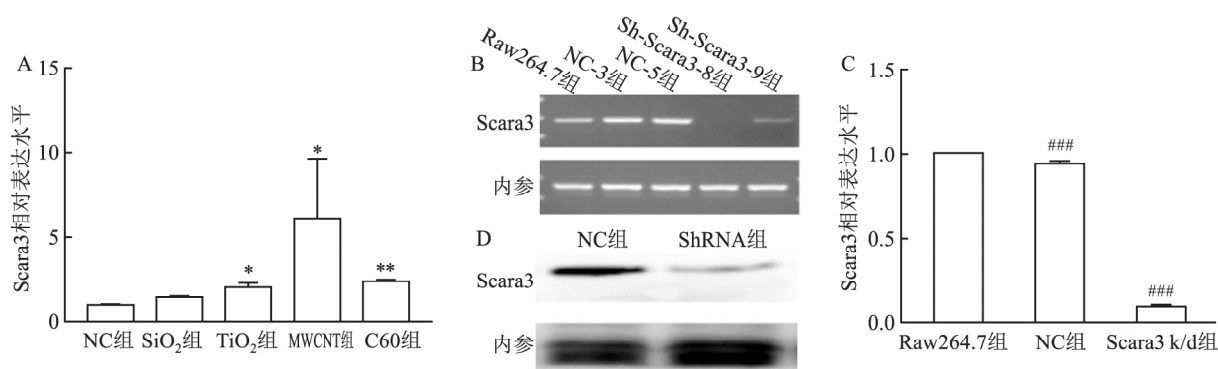


图2 Scara3 的敲低结果

A: 定量 PCR 结果表明 MWCNT 刺激的 Raw264.7 细胞中 Scara3 表达最高;与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; B: 普通 PCR 检测 Scara3 敲低稳转细胞系; C: 定量 PCR 验证 Scara3 敲低稳转细胞系;与 Raw264.7 组比较: ### $P < 0.001$; D: Western blot 验证克隆8 Scara3 敲低稳转细胞系

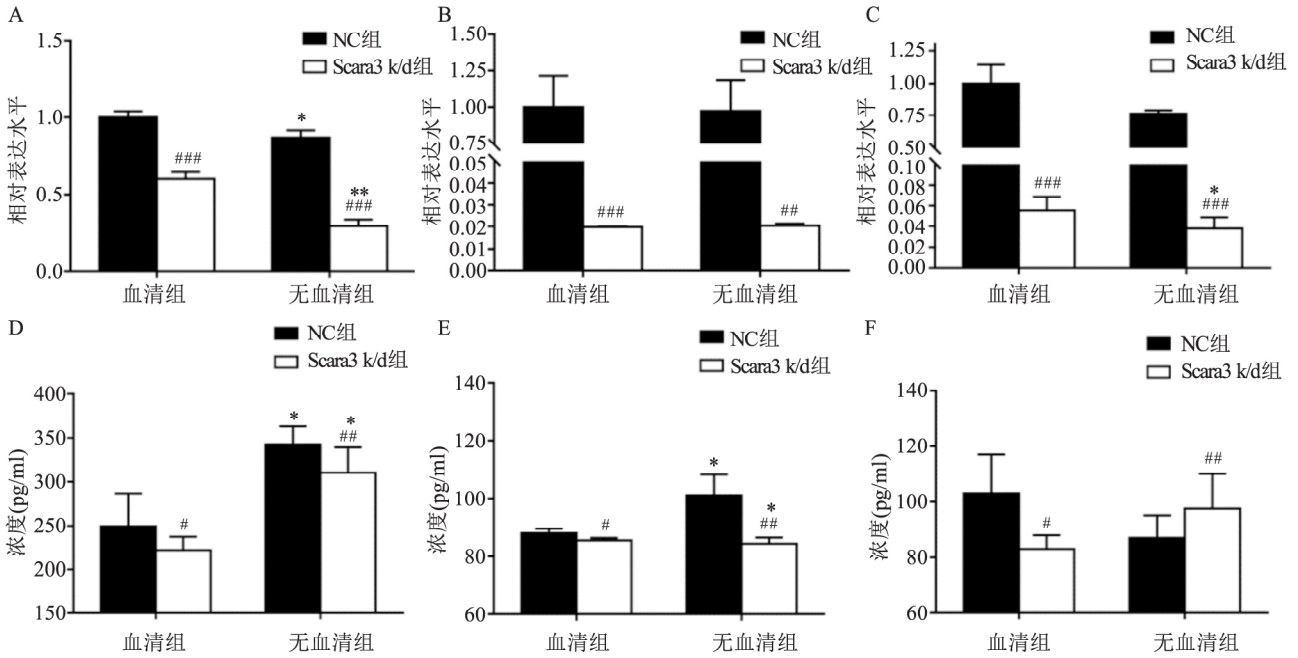


图3 Scara3 敲低炎症细胞因子的表达情况

A、B、C: 分别表示定量 PCR 检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 的 mRNA 表达水平; D、E、F: 分别表示 ELISA 检测上清液中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的含量; 与血清组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与 NC 组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001

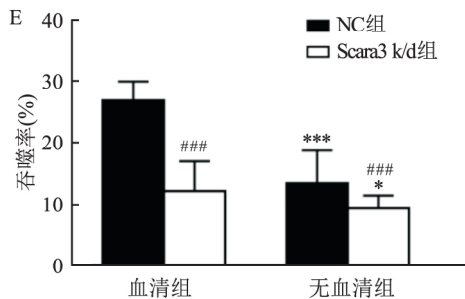
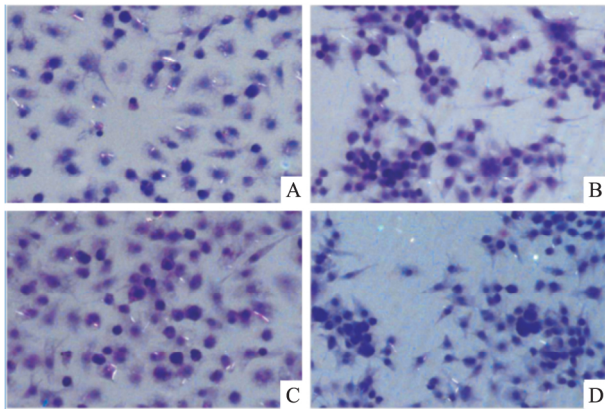


图4 MWCNT 的摄取 HE × 20

A: NC 组(存在血清); B: Scara3 k/d 组(存在血清); C: NC 组(不存在血清); D: Scara3 k/d 组(不存在血清); E: 吞噬率; 与血清组比较: * P < 0.05, *** P < 0.001; 与 NC 组比较: ### P < 0.001

加,其中包含 Scara3,尤其在 MWCNT 刺激的 Raw264.7 细胞中 Scara3 的表达量明显增加。定量

PCR 的结果表明,在 MWCNT 刺激的 Raw264.7 细胞中 Scara3 的表达远高于对照组和其他纳米材料(SiO₂、TiO₂ 及富勒烯 C60)刺激组,提示 Scara3 可能参与了巨噬细胞对 MWCNT 的吞噬以及细胞因子产生等过程。所以该研究通过基因沉默和偏光显微镜技术等方法进行研究,结果表明了巨噬细胞膜上的 Scara3 介导了对 MWCNT 的识别和摄取以及炎症细胞因子的产生。Scara3 属于 A 类清道夫受体,以同源二聚体表达于质膜和内质网膜上,氧自由基诱导其表达增加。Scara3 的配体主要为脂质成分,其多形性和表达异常与肥胖、冠心病等代谢疾病相关^[8],也与手足口疫、冠状病毒和埃博拉病毒感染有关^[9]。最近的研究^[10]表明 Scara3 也介导了球形核酸纳米颗粒透过表皮细胞。这些研究结果提示 Scara3 可以结合不同的配体,参与巨噬细胞的识别和吞噬过程。该研究表明在无血清的条件下,巨噬细胞仍能吞噬 MWCNT,诱导细胞因子产生,尽管与存在血清时相比有所下降,说明了巨噬细胞除了血清中补体、IgG 等调理素介导的吞噬作用以外,还有其他介导识别和吞噬 MWCNT 的机制。无论是存在还是不存在血清的条件下,基因沉默 Scara3 均会导致 MWCNT 吞噬和细胞因子下降,显示 Scara3 可以直接识别 MWCNT,或者通过识别吸附的脂质等成分,介导 MWCNT 吞噬和细胞因子产生。

该研究探讨了巨噬细胞通过 Scara3 介导其对 MWCNT 的吞噬和炎症细胞因子的产生。Scara3 在 MWCNT 诱发的炎症、纤维化和肿瘤发生中的作用值得进一步研究。

参考文献

- [1] You D J, Bonner J C. Susceptibility factors in chronic lung inflammatory responses to engineered nanomaterials [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7310.
- [2] 张芳芳, 王聪, 罗庆礼, 等. 中国优势基因型弓形虫 Wh3 株诱导人单核巨噬细胞 THP-1 偏移极化的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 169-75.
- [3] Xu L, Xu M, Wang R, et al. The crucial role of environmental coronas in determining the biological effects of engineered nanomaterials [J]. *Small* 2020, 16(36): 2003691.
- [4] Fukai E, Sato H, Watanabe M, et al. Establishment of an *in vivo* simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(4): 1024-31.
- [5] Bergamaschi E, Murphy F, Poland C A, et al. Impact and effectiveness of risk mitigation strategies on the insurability of nanomaterial production: evidences from industrial case studies [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2015, 7(6): 839-55.
- [6] Saleh D M, Alexander W T, Numano T, et al. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2020, 17(1): 17-48.
- [7] Li Y, Cao J. The impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on macrophages: contribution of MWCNT characteristics [J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(11): 1333-51.
- [8] Peng H, Guo Q, Su T, et al. Scara3 identification of with potential roles in metabolic disorders [J]. *Aging*, 2020, 13(2): 2149-67.
- [9] Tian Y, Zhou K, Hu J, et al. Scavenger receptor class a, member 3 is associated with severity of hand, foot, and mouth disease in a case-control study [J]. *Medicine*, 2019, 98(40): e17471.
- [10] Song Q, Wang X Q, Holmes T R, et al. Epidermal class a scavenger receptor complexes are lipid raft-based and promote nucleic acid nanoparticle uptake [J]. *J Invest Dermatol*, 2021, 141(6): 1428-37.

Effects of Scara3 mediates phagocytosis of MWCNT and inflammatory cytokines on macrophages

Wang Qiong¹, He Jiali², Wang Qiqi³, et al

¹Dept of Immunology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Immunophylaxis, Anhui Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230093;

³Dept of Clinical Laboratory, Anhui Provincial Armed Police Corps Hospital, Hefei 230041)

Abstract Objective To investigate the role of scavenger receptor A member 3 (Scara3) in the phagocytosis of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) and cytokine production. **Methods** Under addition or without serum, expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6, and phagocytosis of MWCNT were compared between the control (NC) and knockdown group (Scara3 k/d) cells. **Results** Compared with the presence of serum, when there was without serum, the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and the uptake of MWCNT in the NC group and Scara3 k/d group all decreased after MWCNT stimulation. Compared with NC group, whether with serum or without serum, Scara3 k/d significantly reduced the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 induced by MWCNT and the uptake of MWCNT. **Conclusion** Scara3 mediates phagocytosis of MWCNT and cytokine production in macrophages.

Key words multi-walled carbon nanotubes; macrophage; Scara3; phagocytosis; cytokine