

网络出版时间: 2018-9-25 14:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.015.html>

肝细胞生长因子对小鼠巨噬细胞 M1、M2 亚型极化的影响

圣波¹ 胡泽平¹ 郭影¹ 顾奕玥¹ 王云飞¹ 周青² 汪渊²

摘要 目的 探讨体外条件下肝细胞生长因子(HGF)对小鼠巨噬细胞M1、M2亚型极化的影响。方法 体外培养RAW264.7巨噬细胞,分为M_φ组(RAW264.7细胞)、M1组(M1型巨噬细胞)及M2组(M2型巨噬细胞),M1组以干扰素-γ(IFN-γ)联合细菌脂多糖(LPS)诱导极化,M2组以白介素-4(IL-4)诱导极化,其中M1组和M2组在诱导极化的同时分别予以0.1、1.0、10.0 ng/ml HGF处理。MTT法检测HGF对M_φ、M1及M2组巨噬细胞的增殖情况;Western blot法和细胞免疫荧光法分别检测M1型标志物精氨酸酶Ⅱ(ArgⅡ)、诱导性一氧化氮合酶(iNOS)及M2型标志物精氨酸酶Ⅰ(ArgⅠ)的蛋白表达;ELISA法检测细胞上清中IL-6、

IL-10的浓度。结果 HGF对M_φ组及M1、M2组均无明显的增殖抑制作用;与M_φ组相比,M1组ArgⅡ、iNOS、IL-6及M2组ArgⅠ、IL-10的表达水平平均明显升高($P < 0.05$)。不同浓度的HGF干预后,与M1组相比,HGF各干预组ArgⅡ、iNOS、IL-6的表达明显降低($P < 0.05$);与M2组相比,HGF各干预组ArgⅠ、IL-10的表达明显升高($P < 0.05$),且1.0、10.0 ng/ml HGF处理组呈剂量依赖性($P < 0.01$)。结论 体外条件下,HGF抑制RAW264.7细胞向M1型极化,促进其向M2型极化。

关键词 肝细胞生长因子;巨噬细胞;极化;炎症

中图分类号 R 392

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1725-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.015

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是间质细胞趋化的多功能生长因子,可作用于多种类型的细胞,在细胞增殖、运动与迁移、抗凋亡、抗纤维化和调节免疫等方面发挥重要的生物学功能^[1]。最近研究^[2]表明:HGF具有很强的抗炎作用,增加其表达可能有抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作用。AS是发生在动脉血管壁的慢性炎症性疾病,炎症反应是其突出的促发因素。其中,巨

2018-05-29 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(编号:1508085MH168);安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目(编号:2016B097);安徽省卫生计生委中医药科研课题项目(编号:2014zy23);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20123420120005);安徽省高校省级自然科学研究项目(编号:KJ2012A147)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022
²安徽医科大学分子生物学实验室,合肥 230032

作者简介: 圣波男,硕士研究生;
胡泽平,男,主任医师,教授,责任作者,E-mail:
1431318679@qq.com

tibility test were carried out with the automatic VITEK2 system. Modified Hodge test (MHT),Carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP) test and modified Carbapenem inactivation method (mCIM) were used to detect carbapenemases phenotype of carbapenems. The carbapenem class B enzymes (metallo) was tested by EDTA/IMP for joint experiments. KPC carbapenemase resistance gene was detected by PCR and the homology of resistant strains was analyzed by ERIC-PCR. **Results** Drug sensitivity test showed that 25 strains of CRKP had a higher susceptibility to sulfamethoxazole and minocycline. It showed that the test results were the same through comparing MHT, Carba NP test and mCIM. 24 strains (96%) of CRKP contained carbapenemases. One strain of CRKP did not detect carbapenemases. Synergy experiment to test 25 strains of CRKP were not found metal enzyme-positive strains. 23 strains of CRKP carrying blaKPC-2 gene were identified by PCR. ERIC-PCR results showed that 25 strains of CRKP were divided into 8 types, the main epidemic strain was type II, 14 strains belonged to type II. Genotype I had 3 isolates, genotype III and genotype VII each had 2 strains, genotype IV, V, VI and VIII each had 1 isolate. **Conclusion**

The multi-drug resistance of CRKP is serious and carbapenemase is mainly produced KPC-2 type in CRKP. MHT, Carba NP test and mCIM can rapidly and simply screening the carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, and the result is highly consistent with PCR method, so as to provide reliable methods for clinical screening.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; modified Hodge test; Carba NP test; modified carbapenem inactivation method; drug resistance

噬细胞扮演着重要角色^[3]。巨噬细胞根据激活方式的不同,可分为经典活化的M1型和替代活化的M2型。M1型巨噬细胞具有促炎作用,增加易损斑块的不稳定性,加速AS进程;M2型巨噬细胞具有抗炎作用,促进组织修复与血管形成,延缓AS进程。在AS中,两者之间的比例显著影响斑块的结局。本课题组前期研究^[4]已表明,在AS兔模型中,HGF通过抑制M1型巨噬细胞浸润、诱导M2型巨噬细胞分化而促进斑块稳定,抑制AS进展。然而,体外条件下,HGF能否调控巨噬细胞极化至今尚未见报道。该研究探讨体外条件下,HGF对巨噬细胞M1、M2型极化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 RAW264.7细胞株为小鼠来源的巨噬细胞株,由中国科学技术大学生命科学院馈赠。
1.1.2 主要试剂和仪器 HGF、白介素-4(interleukin-4, IL-4)和干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)购自美国Peprotech公司;二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)、细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自美国Sigma公司;DMEM培养基(高糖)购自美国Gibco公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;青霉素、链霉素购自华北制药华胜公司;免诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)多抗购自美国Abcam公司;免精氨酸酶II(arginase II, Arg II)多抗、免精氨酸酶I(arginase I, Arg I)多抗购自北京博奥森生物技术有限公司;β-actin单抗购于美国Santa Cruz公司;相应二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;免疫荧光试剂盒购自碧云天公司;白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)ELISA试剂盒购自北京四正柏科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 RAW264.7细胞培养于DMEM高糖完全培养基中(10%胎牛血清、100 μg/ml青霉素、100 U/ml链霉素),细胞培养瓶置入饱和湿度、37 °C、5% CO₂培养箱培养,待细胞长至80%~90%融合并处于对数生长期时,PBS清洗3次后0.25%胰酶进行1:3消化传代。

1.2.2 体外诱导RAW264.7细胞极化 待细胞处于对数生长期时,细胞换液后,用含IFN-γ(20 ng/ml)

和LPS(500 ng/ml)的DMEM高糖完全培养基培养24 h,诱导其向M1型极化;用含IL-4(20 ng/ml)的DMEM高糖完全培养基培养24 h,诱导其向M2型极化。

1.2.3 实验分组 实验分为5组。细胞对照组:即M_φ型巨噬细胞;空白对照组:即M1、M2型巨噬细胞;用药组:分别给予0.1、1.0、10.0 ng/ml的HGF对M1、M2型巨噬细胞进行处理12 h。

1.2.4 MTT试验 取对数生长期的RAW264.7细胞悬液以200 μl/孔(2×10³个细胞)接种于96孔板中,置于饱和湿度、37 °C、5% CO₂培养箱培养,待细胞贴壁后,吸弃上清液,换成含不同浓度的HGF完全培养基,HGF的浓度分别为0、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0、10.0 ng/ml;培养12 h后,每孔加入20 μl MTT继续孵育4 h,弃MTT上清液,添加200 μl DMSO并置于平板床上低速震动10 min,待结晶完全溶解后,在酶标仪上测定450 nm波长处的吸光度值。同样的方法分别测定M1、M2型巨噬细胞在HGF浓度为0.1、1.0、10.0 ng/ml时的吸光度值。

1.2.5 Western blot法检测Arg II、Arg I的蛋白表达 按上述方法进行细胞培养及极化,在诱导12 h后,分别加入0.1、1.0、10.0 ng/ml的HGF处理细胞,同时设立细胞对照组与空白对照组,共培养24 h,每孔加入80 μl蛋白裂解液,冰上静置30 min,充分裂解后提取蛋白,反复冻融3次,于4 °C、14 000 r/min离心30 min后采用BCA法进行蛋白定量。12.5% SDS聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,50 V浓缩胶,100 V分离胶,电泳分离细胞蛋白质,160 mA将蛋白质转移至PVDF膜上。室温下5%脱脂牛奶封闭2 h,孵育相应一抗Arg II(1:200)、Arg I(1:200)4 °C过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,室温孵育二抗2 h,TBST洗涤3次后用ECL进行显影及曝光,以β-actin为内参,用Quantity One系统进行灰度值分析。

1.2.6 细胞免疫荧光法检测iNOS、Arg I的表达

将盖玻片置于12孔板中,种入RAW264.7细胞培养过夜,按上述极化方法及实验分组培养细胞,共培养24 h,取出盖玻片,PBS清洗,在37 °C条件下用4%多聚甲醛固定细胞20 min,PBS清洗后0.3%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)透化细胞膜5 min,TBS清洗1次后改用PBS清洗2次,封闭液(含5%BSA及0.1% TritonX-100)封闭细胞60 min,去封闭液,加入iNOS和Arg I一抗(均1:150),4 °C孵育

过夜, 次日去除一抗,TBS 清洗 1 次,PBS 清洗 2 次, 每次 5 min, 加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:1 000), 室温避光孵育 60 min, TBS 清洗 1 次, PBS 清洗 2 次, DAPI (0.5 μg/ml) 染核 10 min, 弃 DAPI, PBS 清洗 3 次, 抗荧光淬灭封片液进行封片, 荧光显微镜下观察结果并采集图片。

1.2.7 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6、IL-10 的浓度 取各组培养上清液进行实验, 根据 IL-6、IL-10 的 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 检测上清液中表达水平, 酶标仪检测吸光度值, 用标准曲线计算浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HGF 对 RAW264.7 及 M1、M2 型巨噬细胞增殖的影响 HGF 浓度在 0.1~10.0 ng/ml 范围内对 RAW264.7 巨噬细胞无增殖作用 ($F = 0.720, P = 0.770$) (表 1); 当 HGF 浓度分别为 0.1、1.0、10.0 ng/ml 时, 对 M1 及 M2 型巨噬细胞均无增殖作用 ($F = 1.238, P = 0.323$; $F = 0.469, P = 0.707$) (表 2); 结果提示本实验采取的药物浓度梯度对后续实验无影响。

2.2 HGF 对 M1 型巨噬细胞极化的影响

表 1 不同浓度 HGF 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (ng/ml)	吸光度值
1	0	1.435 ± 0.047
2	0.1	1.301 ± 0.095
3	0.5	1.207 ± 0.179
4	1.0	1.278 ± 0.129
5	1.5	1.180 ± 0.120
6	2.0	1.160 ± 0.358
7	2.5	1.312 ± 0.190
8	3.0	1.129 ± 0.070
9	3.5	1.159 ± 0.103
10	4.0	1.173 ± 0.027
11	4.5	1.280 ± 0.055
12	5.0	1.226 ± 0.253
13	5.5	1.227 ± 0.124
14	6.0	1.143 ± 0.108
15	6.5	1.114 ± 0.135
16	7.0	1.215 ± 0.359
17	8.0	1.130 ± 0.072
18	9.0	1.288 ± 0.176
19	10.0	1.153 ± 0.067

表 2 不同浓度 HGF 对 M1、M2 型巨噬细胞增殖的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

浓度 (ng/ml)	吸光度值	
	M1 型	M2 型
0	1.190 ± 0.126	1.054 ± 0.122
0.1	1.071 ± 0.047	1.055 ± 0.101
1.0	1.061 ± 0.187	1.019 ± 0.069
10.0	0.982 ± 0.218	0.993 ± 0.131

2.2.1 HGF 对 M1 型巨噬细胞标志物 Arg II 蛋白表达的影响 结果显示: 与 M_φ 组相比, M1 组 Arg II 表达明显增加 ($F = 3.680, P < 0.05$); 与 M1 组相比, HGF 各干预组 Arg II 表达明显减少 ($F = 183.472, P < 0.05$)。见图 1。

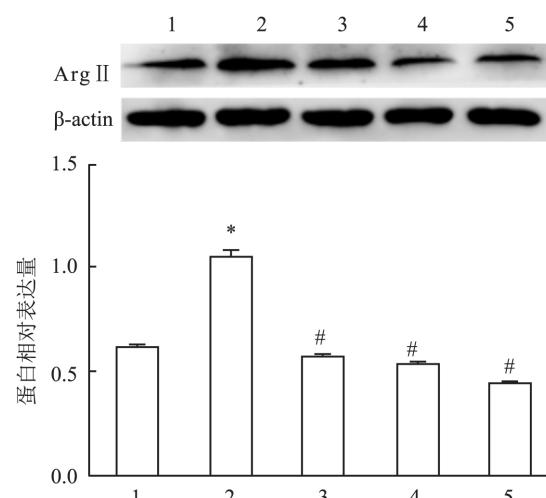


图 1 Western blot 法检测 Arg II 蛋白表达

1: M_φ 组; 2: M1 组; 3: M1 + 0.1 ng/ml HGF 组; 4: M1 + 1.0 ng/ml HGF 组; 5: M1 + 10.0 ng/ml HGF 组; 与 M_φ 组比较: * $P < 0.05$; 与 M1 组比较: # $P < 0.05$

2.2.2 HGF 对 M1 型巨噬细胞胞内 iNOS 蛋白表达的影响 结果显示: 与 M_φ 组相比, M1 组 iNOS 表达明显增加; 与 M1 组相比, HGF 各干预组 iNOS 表达明显减少。见图 2。

2.2.3 HGF 对 M1 型巨噬细胞培养上清液 IL-6 水平的影响 结果显示: 与 M_φ 组相比, M1 组细胞上清液 IL-6 水平明显增加 ($F = 0.430, P < 0.05$); 与 M1 组相比, HGF 各干预组细胞上清液 IL-6 水平明显减少 ($F = 30.367, P < 0.05$)。见图 3。

2.3 HGF 对 M2 型巨噬细胞极化的影响

2.3.1 HGF 对 M2 型巨噬细胞标志物 Arg I 蛋白表达的影响 结果显示: 与 M_φ 组相比, M2 组 Arg I 表达明显上升 ($F = 0.920, P < 0.05$); 与 M2 组相比, HGF 各干预组 Arg I 表达明显上升 ($F = 1.338, P < 0.05$)。

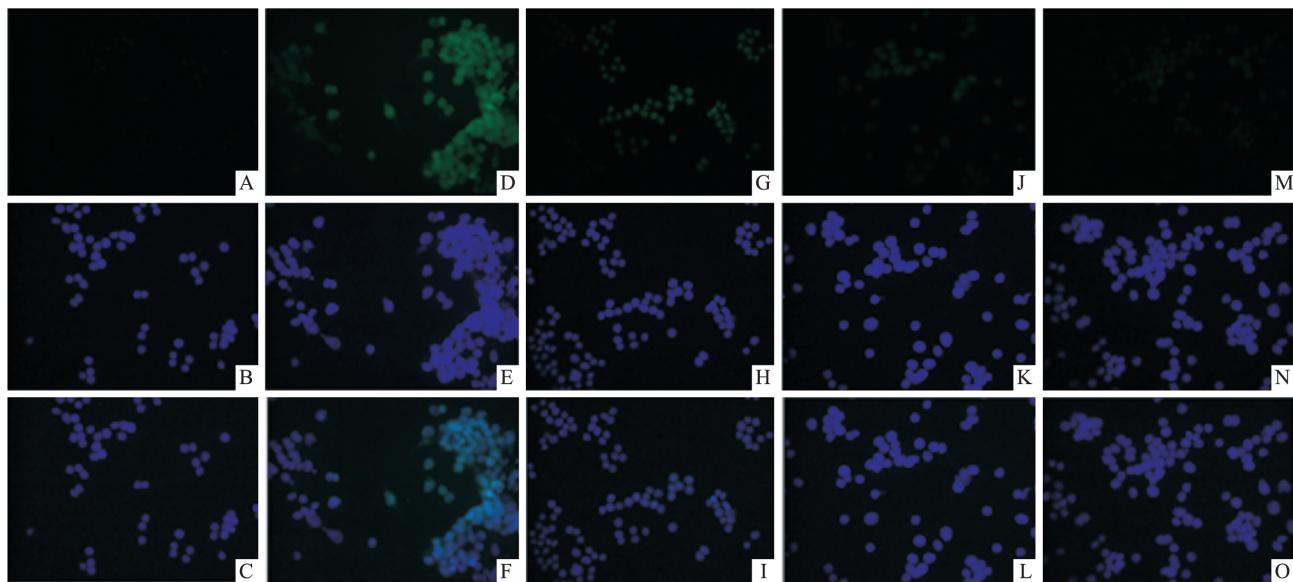


图2 细胞免疫荧光法检测 iNOS 蛋白表达 ×400

A: M_φ 组 iNOS 表达; B: M_φ 组细胞核染色; C: A、B 合成图; D: M1 组 iNOS 表达; E: M1 组细胞核染色; F: D、E 合成图; G: M1 + 0.1 ng/ml HGF 组 iNOS 表达; H: M1 + 0.1 ng/ml HGF 组细胞核染色; I: G、H 合成图; J: M1 + 1.0 ng/ml HGF 组 iNOS 表达; K: M1 + 1.0 ng/ml HGF 组细胞核染色; L: J、K 合成图; M: M1 + 10.0 ng/ml HGF 组 iNOS 表达; N: M1 + 10.0 ng/ml HGF 组细胞核染色; O: M、N 合成图

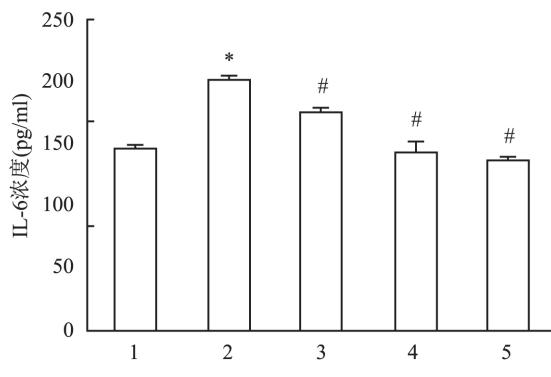


图3 ELISA 法检测细胞上清液 IL-6 浓度

1: M_φ 组; 2: M1 组; 3: M1 + 0.1 ng/ml HGF 组; 4: M1 + 1.0 ng/ml HGF 组; 5: M1 + 10.0 ng/ml HGF 组; 与 M_φ 组比较: * P < 0.05; 与 M1 组比较: #P < 0.05

P < 0.05), 且 1.0、10.0 ng/ml HGF 处理组呈剂量依赖性 (F = 0.182, P < 0.01)。见图 4。

2.3.2 HGF 对 M2 型巨噬细胞内 Arg I 蛋白表达的影响 结果显示: 与 M_φ 组相比, M2 组 Arg I 表达明显上升; 与 M2 组相比, HGF 各干预组 Arg I 表达明显上升。见图 5。

2.3.3 HGF 对 M2 型巨噬细胞培养上清液 IL-10 水平的影响 结果显示: 与 M_φ 组相比, M2 组 IL-10 表达水平上升 (F = 1.226, P < 0.05); 与 M2 组相比, HGF 各干预组 IL-10 表达水平明显上升 (F = 90.437, P < 0.05), 且 1.0、10.0 ng/ml HGF 处理组呈剂量依赖性 (F = 0.276, P < 0.01)。见图 6。

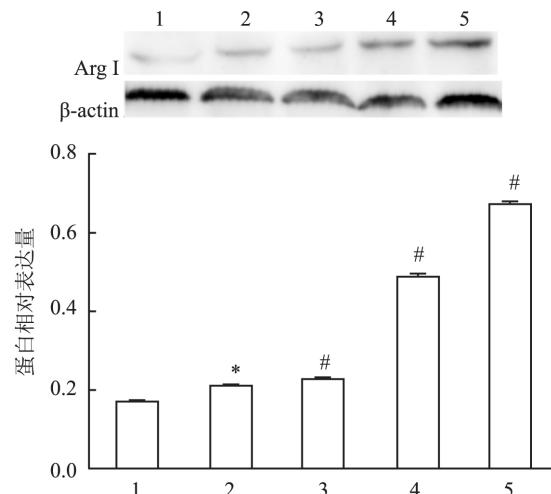
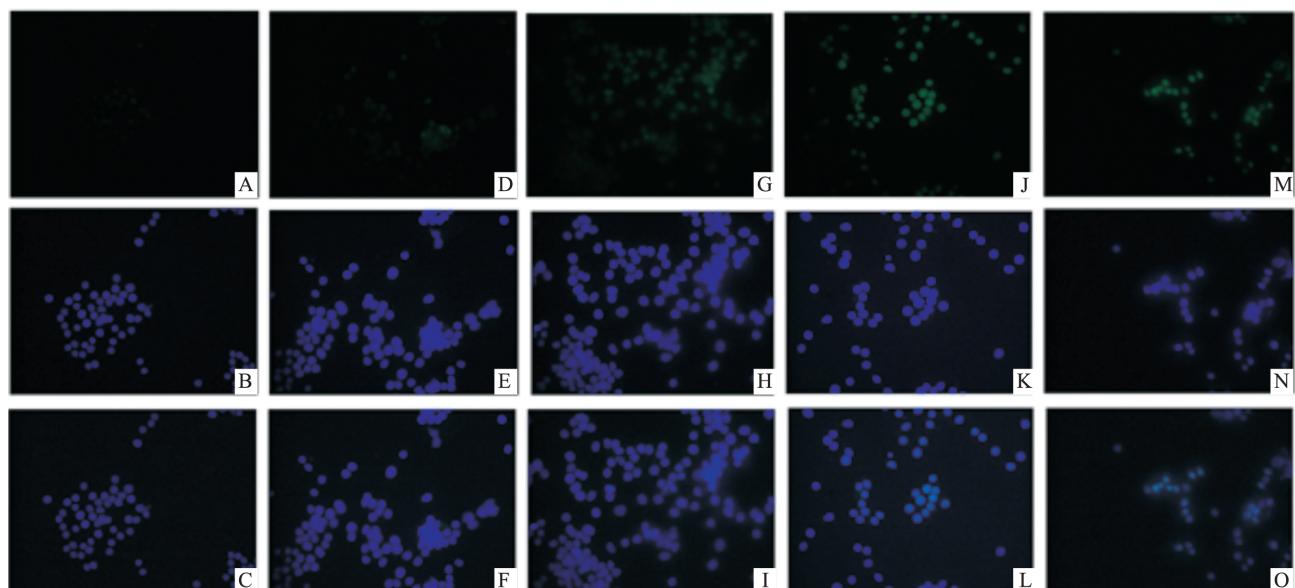


图4 Western blot 法检测 Arg I 蛋白表达

1: M_φ 组; 2: M2 组; 3: M2 + 0.1 ng/ml HGF 组; 4: M2 + 1.0 ng/ml HGF 组; 5: M2 + 10.0 ng/ml HGF 组; 与 M_φ 组比较: * P < 0.05; 与 M2 组比较: #P < 0.05

3 讨论

以 AS 为病理基础的心脑血管疾病逐年递增, 防治任务艰巨。AS 的发生、发展是一个慢性炎症过程, 巨噬细胞作为最具代表性的炎症细胞, 其通过吞噬氧化修饰的脂质、凋亡细胞碎片, 分泌炎症因子、金属蛋白酶等途径介导炎症过程^[5]。由于巨噬细胞具有异质性及可塑性的特点, 在 AS 发生、发展过

图 5 细胞免疫荧光法检测 Arg I 蛋白表达 $\times 400$

A: M_φ 组 Arg I 表达; B: M_φ 组细胞核染色; C: A、B 合成图; D: M2 组 Arg I 表达; E: M2 组细胞核染色; F: D、E 合成图; G: M2 + 0.1 ng/ml HGF 组 Arg I 表达; H: M2 + 0.1 ng/ml HGF 组细胞核染色; I: G、H 合成图; J: M2 + 1.0 ng/ml HGF 组 Arg I 表达; K: M2 + 1.0 ng/ml HGF 组细胞核染色; L: J、K 合成图; M: M1 + 10.0 ng/ml HGF 组 Arg I 表达; N: M2 + 10.0 ng/ml HGF 组细胞核染色; O: M、N 合成图

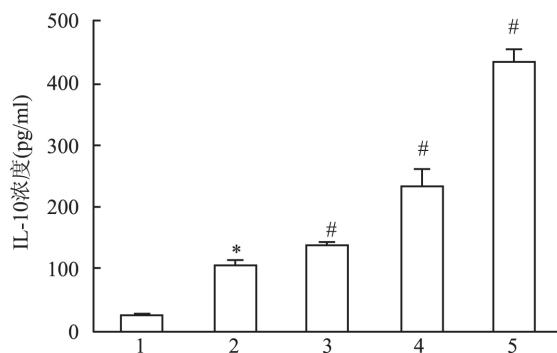


图 6 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-10 浓度

1: M_φ 组; 2: M2 组; 3: M2 + 0.1 ng/ml HGF 组; 4: M2 + 1.0 ng/ml HGF 组; 5: M2 + 10.0 ng/ml HGF 组; 与 M_φ 组比较: * $P < 0.05$; 与 M2 组比较: # $P < 0.05$

程中,其可随局部微环境的改变而表现出不同的功能状态,M1、M2型正是该状态的两个极端。M1型巨噬细胞通过分泌 iNOS、白介素-12(interleukin-12, IL-12)、白介素-23(interleukin-12, IL-23)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)等促炎因子,促进病灶内的炎症反应;M2型巨噬细胞通过分泌 IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor α , TGF- β)等抗炎因子,促进纤维帽的形成及组织修复,抑制病灶内的炎症反应^[6]。因此,调控巨噬细胞极性可能成为临床治疗以 AS 为病理基础的心脑血管疾病的新策略。

本研究采用小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞,在体外条件下,以 IFN- γ 联合 LPS 诱导其向 M1 型极化,IL-4 诱导其向 M2 型极化,诱导极化的同时加入不同浓度的 HGF 进行干预,探讨体外条件下,HGF 对 M1、M2 型巨噬细胞极化的影响。结果显示:与 M_φ 组相比,M1 组 Arg II、iNOS、IL-6 及 M2 组 Arg I、IL-10 的表达水平均明显升高,提示造模成功。不同浓度的 HGF 干预后,与 M1 组相比,HGF 各干预组 Arg II、iNOS、IL-6 的表达明显降低;与 M2 组相比,HGF 各干预组 Arg I、IL-10 的表达明显升高;表明 HGF 抑制 RAW264.7 细胞向 M1 型极化,促进其向 M2 型极化。

目前研究已表明,他汀类^[7]、噻唑烷二酮类^[8]、替米沙坦^[9]及中药姜黄素^[10]等能诱导 M1 型巨噬细胞向 M2 型转化,而巨噬细胞的极化受多种信号通路及转录因子的调控^[11],目前比较明确的主要有:信号传导与转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)、核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)、IFN 调节因子(interferon regulatory factor, IRF)、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR- γ)、孤儿核受体、表观遗传调节等。不同微环境下,巨噬细胞亚型之间可相互转化^[12],HGF 通过何种机制抑制 M1 型极化而促进 M2 型极化,尚需进一步研究。

综上所述,巨噬细胞M1、M2亚型比例失衡促进AS的发生和发展,HGF抑制巨噬细胞向M1型极化、促进其向M2型极化,可能成为抗AS治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Hu Z P ,Bao Y ,Chen D N ,et al. Effects of recombinant adenovirus hepatocyte growth factor gene on myocardial remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013, 18(5): 476–80.
- [2] Zheng B ,Wang C ,He L ,et al. Neural differentiation of mesenchymal stem cells influences chemotactic responses to HGF [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(1): 149–62.
- [3] 陈孔,曾高峰,唐朝克. 巨噬细胞增殖和凋亡与动脉粥样硬化[J]. 动脉粥样硬化杂志, 2014, 22(9): 965–9.
- [4] 张亮,胡泽平,圣波,等. 肝细胞生长因子对动脉粥样硬化模型兔巨噬细胞M1、M2亚型及斑块成分的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(4): 484–90.
- [5] Pello O M ,Silvestre C ,De Pizzol M ,et al. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis [J]. *Immunobiology* 2011, 216(11): 1172–6.
- [6] Van Ginderachter J A ,Movahedi K ,Hassanzadeh Ghassabeh G ,et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion [J]. *Immunobiology*, 2006, 211(6–8): 487–501.
- [7] Yang N ,Cheng W ,Hu H ,et al. Atorvastatin attenuates sympathetic hyperinnervation together with the augmentation of M2 macrophages in rats postmyocardial infarction [J]. *Cardiovasc Ther*, 2016, 34(4): 234–44.
- [8] Koppaka S ,Kehlenbrink S ,Carey M ,et al. Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans [J]. *Diabetes*, 2013, 62(6): 1843–54.
- [9] 邢亦明,胡泽平,王邦宁,等. 替米沙坦对小鼠巨噬细胞M1/M2亚型极化的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(7): 989–97.
- [10] Li B ,Hu Y ,Zhao Y ,et al. Curcumin attenuates titanium particle-induced inflammation by regulating macrophage polarization *in vitro* and *in vivo* [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 55.
- [11] De Paoli F ,Staels B ,Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis [J]. *Circ J*, 2014, 78(8): 1775–81.
- [12] Porcheray F ,Viaud S ,Rimaniol A C ,et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation [J]. *Clin Exp Immunol* 2005, 142(3): 481–9.

Effects of hepatocyte growth factor on the polarization of M1 and M2 subtypes of murine macrophages

Sheng Bo ,Hu Zeping ,Guo Ying ,et al

(Dept of Cardiology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of hepatocyte growth factor (HGF) on the polarization of M1 and M2 subtypes of murine macrophages *in vitro*. **Methods** RAW264.7 macrophages were cultured *in vitro* and divided into three groups: M ϕ group (RAW264.7 cells), M1 group (M1 macrophages) and M2 group (M2 macrophages). M1 group induced polarization with interferon- γ (IFN- γ) and bacterial lipopolysaccharide (LPS), M2 group induced polarization by interleukin-4 (IL-4). At the same time, M1 and M2 groups were treated with 0.1, 1.0, 10.0 ng/ml HGF respectively during induced polarization. MTT assay was used to detect the proliferation of macrophages in M ϕ , M1 and M2 groups. Western blot and immunofluorescence were used to detect protein expression of M1 markers including arginase II (Arg II) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and protein expression of the M2 marker arginase I (Arg I). The concentrations of IL-6 and IL-10 in supernatant of the cells were detected by ELISA. **Results** HGF did not significantly inhibited the proliferation of M ϕ , M1 and M2 groups; Compared with M ϕ group, the expression levels of Arg II, iNOS and IL-6 in M1 groups and the expression levels of Arg I, IL-10 in M2 groups were significantly increased ($P < 0.05$). After intervention using different concentrations of HGF, compared with M1 group, the expressions of Arg II, iNOS and IL-6 in HGF intervention groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with M2 group, the levels of Arg I and IL-10 in HGF intervention groups were significantly increased with the dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** HGF inhibits the polarization of RAW264.7 macrophages to M1 and promotes their polarization toward M2 *in vitro*.

Key words hepatocyte growth factor; macrophages; polarization; inflammation