

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(Arg II)、诱导性一氧化氮合酶(iNOS)及 M2 型标志物精氨酸酶 I(Arg I)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 Arg II、iNOS、IL-6 及 M2 组 Arg I、IL-10 的表达水平均明显升高($P < 0.05$)。不同浓度的 HGF 干预后,与 M1 组相比,HGF 各干预组 Arg II、iNOS、IL-6 的表达明显降低($P < 0.05$);与 M2 组相比,HGF 各干预组 Arg I、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

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基金项目(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

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

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 isolate, 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;兔诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)多抗购自美国 Abcam 公司;兔精氨酸酶 II(arginase II, Arg II)多抗、兔精氨酸酶 I(arginase I, Arg I)多抗购自北京博奥森生物技术有限公司; β -actin 单抗购自美国 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 μ g/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素),细胞培养瓶置入饱和湿度、37 $^{\circ}$ 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 μ l/孔(2×10^3 个细胞)接种于 96 孔板中,置于饱和湿度、37 $^{\circ}$ 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 μ l MTT 继续孵育 4 h,弃 MTT 上清液,添加 200 μ l 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 μ l 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ g/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 \pm 0.047
2	0.1	1.301 \pm 0.095
3	0.5	1.207 \pm 0.179
4	1.0	1.278 \pm 0.129
5	1.5	1.180 \pm 0.120
6	2.0	1.160 \pm 0.358
7	2.5	1.312 \pm 0.190
8	3.0	1.129 \pm 0.070
9	3.5	1.159 \pm 0.103
10	4.0	1.173 \pm 0.027
11	4.5	1.280 \pm 0.055
12	5.0	1.226 \pm 0.253
13	5.5	1.227 \pm 0.124
14	6.0	1.143 \pm 0.108
15	6.5	1.114 \pm 0.135
16	7.0	1.215 \pm 0.359
17	8.0	1.130 \pm 0.072
18	9.0	1.288 \pm 0.176
19	10.0	1.153 \pm 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 \pm 0.126	1.054 \pm 0.122
0.1	1.071 \pm 0.047	1.055 \pm 0.101
1.0	1.061 \pm 0.187	1.019 \pm 0.069
10.0	0.982 \pm 0.218	0.993 \pm 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 $M\phi$ 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。

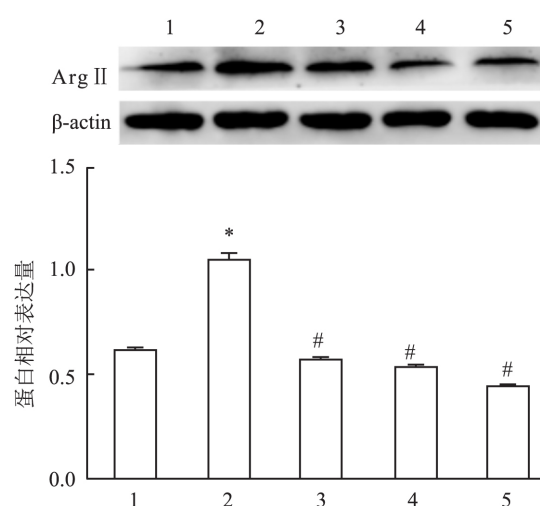


图 1 Western blot 法检测 Arg II 蛋白表达

1: $M\phi$ 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 $M\phi$ 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 $M\phi$ 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 $M\phi$ 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 $M\phi$ 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($F = 1.338$,

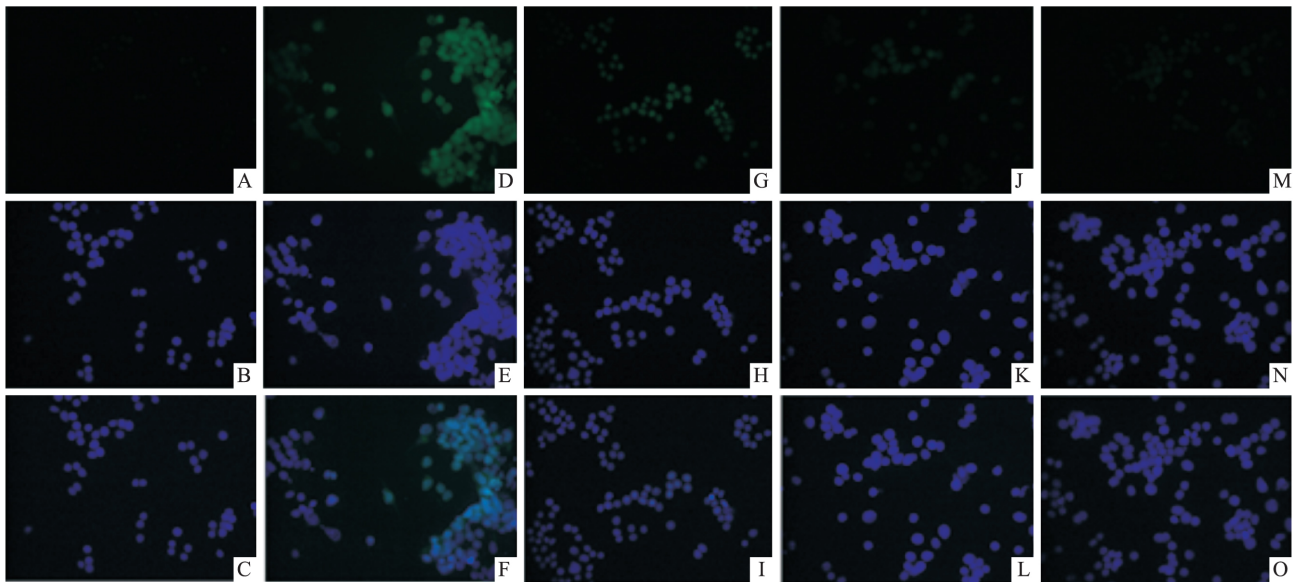


图2 细胞免疫荧光法检测 iNOS 蛋白表达 ×400

A: Mφ 组 iNOS 表达; B: Mφ 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

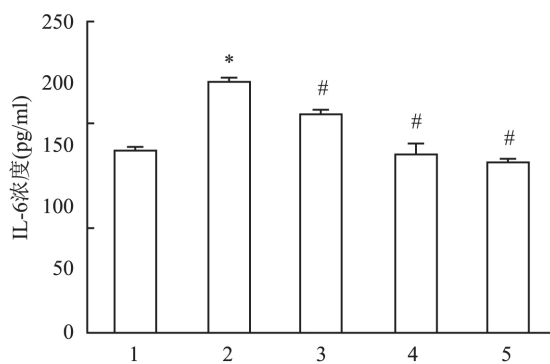


图3 ELISA 法检测细胞上清液 IL-6 浓度

1: Mφ 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 Mφ 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 型巨噬细胞胞内 Arg I 蛋白表达的影响 结果显示: 与 Mφ 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 Mφ 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。

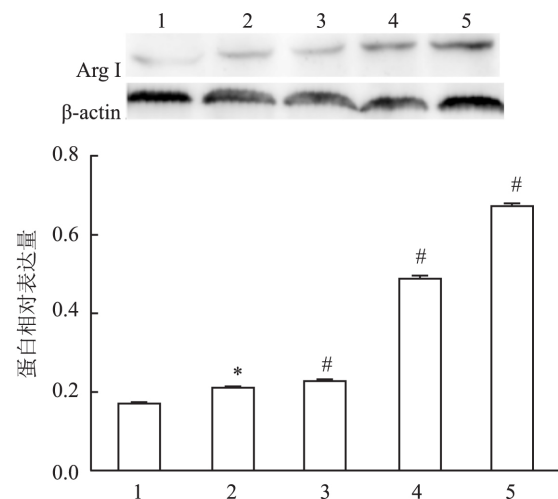


图4 Western blot 法检测 Arg I 蛋白表达

1: Mφ 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 Mφ 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

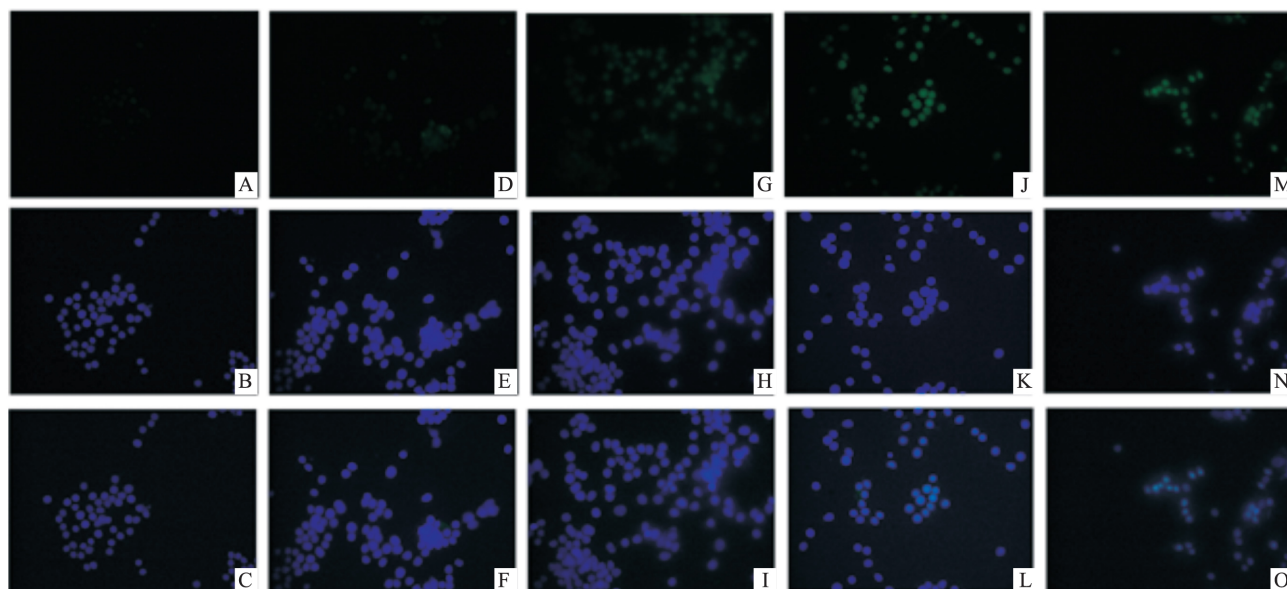


图5 细胞免疫荧光法检测 Arg I 蛋白表达 ×400

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: M2 + 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

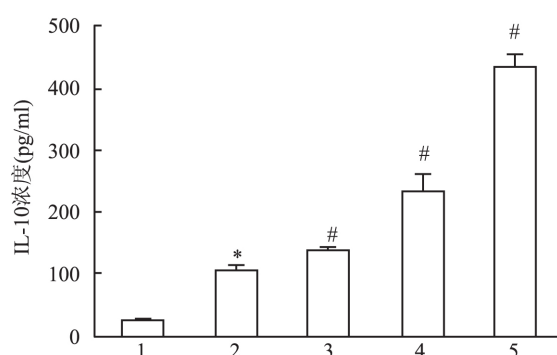


图6 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-10 浓度

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 I、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 I、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: Mφ 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 Mφ, 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 Mφ, M1 and M2 groups; Compared with Mφ 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