

肥大细胞调节巨噬细胞极化在炎症性肠病中的作用

余畋余^{1,2,3}, 刘道利¹, 汪朝晖¹, 胡霜久¹, 刘 斌¹

摘要 目的 探究肥大细胞(MC)在炎症性肠病过程中的作用和调节机制。方法 用野生型小鼠、MC缺陷小鼠和MC重建小鼠构建右旋葡聚糖硫酸钠诱导的炎症性肠病模型。采用甲苯胺蓝染色、流式细胞术、实时定量PCR、HE染色和Ki67免疫组化分析相关指标。结果 MC在重组人干细胞因子(Scf)和基质金属蛋白酶-9(Mmp-9)因子诱导下向肠道迁移和浸润。在小鼠炎症性肠病模型中,MC缺陷小鼠的肠黏膜绒毛结构完整性欠佳,肠道炎症较重且黏膜修复能力较差。MC重建后肠道炎症减轻且黏膜修复能力得以恢复。野生型小鼠组巨噬细胞M1/M2比率低于MC缺陷小鼠组。与M2型巨噬细胞相关的白细胞介素4(IL4)和白细胞介素10(IL10)在野生型小鼠组高于MC缺陷小鼠组,其他抑炎因子基因白细胞介素13(IL13)和转录因子Gata3野生型组也

较高,促炎因子基因诱导型一氧化氮合酶Inos则相反。结论 MC是通过极化巨噬细胞而发挥炎症性肠病过程中的抗感染和促进黏膜修复作用的。

关键词 肥大细胞;炎症性肠病;巨噬细胞;炎症因子;抑炎因子;极化

中图分类号 R 656

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)07-1152-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.015

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的累及全肠道的慢性非特异性炎症疾病,主要包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。IBD主要病理特征为肠黏膜的损伤^[1],现主流研究观点认为其致病因素为免疫功能紊乱和上皮细胞屏障受损^[2-3]。肥大细胞(mast cell, MC)是源自骨髓前体细胞的先天免疫细胞,在干细胞因子(stem cell factor, SCF)的影响下成熟,并最终在肠道上皮内间隙中定居。作为前哨免疫细胞群的一员,MC是抵抗攻击的一线防御细胞,与肠道炎症活动密切相关^[4]。然而,MC在炎症性肠病过程中的作用和调节机制仍未有报道。该研究通过右旋葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的IBD模型,构建野生型小鼠(以下简称WT小鼠)、MC缺陷小鼠(以下简称C-kit小鼠)和MC重建小鼠相关炎症癌症序列演变模型,探究MC在IBD过程中的作用和调节

2023-06-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31741087);安徽医科大学校科研基金(编号:2021xkj089);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:2022e07020053)

作者单位:¹安徽医科大学附属安庆市第一人民医院胃肠外科,安庆 246000

²安徽医科大学临床医学院,合肥 230000

³同济大学附属上海市第十人民医院普外科,上海 200000

作者简介:余畋余,男,硕士;

刘 斌,男,硕士,医师,责任作者, E-mail: beanleu2@163.com;

胡霜久,男,主任医师,责任作者, E-mail: hushuangjiu@163.com

angiogenesis of the endothelial cells co-cultured with cancer cells through DLL4-Notch signaling pathway and its molecular mechanism. **Methods** Cancer-endothelial cell co-culture model was established using the Transwell system. The effects of human recombinant IL-17A at 50 ng/ml on the migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in the co-culture system were determined, the proliferation and angiogenesis of HUVECs was observed in co-culture system stimulated by human recombinant IL-17A, the angiogenesis ability of HUVECs was tested by tube formation assay, the proliferation of HUVECs was detected using CCK-8 assay. The expression of DLL4-Notch signaling pathway and angiogenesis protein in each group were detected by Western blot. **Results** 50 ng/ml human recombinant IL-17A could promote the migration of HUVECs in co-culture system. Treatment with 50 ng/ml human recombinant IL-17A significantly enhanced the proliferation and angiogenesis ability of the HUVECs in co-culture system ($P < 0.01$). The expression of DLL4-Notch signaling pathway and angiogenesis-related proteins in co-culture system significantly increased compared with those in control group. **Conclusion** IL-17/IL-17R promotes DLL4-Notch signaling pathway in the angiogenesis of papillary thyroid carcinoma.

Key words IL-17/IL-17R; DLL4-Notch signaling pathway; angiogenesis; papillary thyroid carcinoma

机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 WT 型小鼠: 雌性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄, 20~24 g, 购于北京 Vital River 实验动物中心, 饲养于同济大学 SPF 级动物房。C-kit 小鼠: 6~8 周龄雌性 C57BL/6 KitW-sh/W-sh 小鼠购于美国 Jax 实验室, 繁殖于同济大学 SPF 级动物房。MC 重建小鼠^[4-5]: 雌性 5 周龄 C57BL/6 KitW-sh/W-sh 小鼠, 通过腹腔注射体外培养的 WT 小鼠来源的骨髓来源的 MC (约 5×10^6 个)。5 周后可获得 MC 重建小鼠, 使用肠道甲苯胺蓝染色切片观察重建效率。

1.1.2 主要试剂和仪器 葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 购自美国 MP Biomedicals 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; BB515 Rat Anti-CD11b、PE Rat Anti-mouse F4/80、Alexa Fluor 647 Rat Anti-mouse CD206、PE-Cy7 Rat Anti-mouse CD86、Fixation/Permeabilization Kit 破膜染色剂、APC-Cy7 通道死活细胞染料均购自美国 BD Science 公司; Percp/cy5.5 Anti-mouse CD45、PE-Cy7 Rat Anti-mouse CD117、FITC Rat Anti-mouse FcεRI 均购自美国 Biolegend 公司; Ki67 抗体购自美国 Abcam 公司; 小鼠 mRNA 引物购自上海生工生物工程有限公司; TRIzol 用于提取总 RNA, 购自 Invitrogen 公司; LightCycler RNA Master SYBR Green 试剂盒购自瑞士 Roche 公司, 使用购自 Roche 公司的 LightCycler 仪器进行进一步分析; 单核细胞分离试剂盒购自德国 Miltenyibiotec 公司。

1.1.3 小鼠 mRNA 引物 表 1 中所涉及的引物均为 IBD 期间参与炎症形成的关键细胞因子。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 IBD 模型构建 配制浓度为 2.5% 的 DSS (分子量 36 000~50 000) 水溶液。小鼠连续饲喂 DSS 水溶液 7 d, 随后更换为正常水连续饲喂 7 d。每天观察小鼠的炎症特征, 包括腹泻、便血、体质量和存活率的变化, 综合这类特征计算活动疾病指数 (disease activity index, DAI)。具体公式如下: 体质量下降百分率 (体质量不变为 0, 1~5 为 1 分, 5~10 为 2 分, 10~15 为 3 分, 大于 15 为 4 分)、大便黏稠度 (正常为 0, 松散的大便为 2 分, 腹泻为 4 分) 和大便出血 (正常 0 分, 隐血阳性为 2 分, 显性出血为 4 分), 3 项结果的总分除以 3 即得到 DAI 值。即

表 1 引物序列 (5'-3')

基因名称	上游引物 (F)	下游引物 (R)
<i>Il23</i>	CAGCGGGACATATGAATCTACT	TTGAAGATGTCAGAGTCAAGCA
<i>Rorc</i>	ACAAATTGAAGTGATCCCTTGC	GGAGTAGGCCACATTACACTG
<i>Il17a</i>	GAGCTTCATCTGTCTCTCTGAT	GCCAAGGGAGTTAAAGACTTTG
<i>Tbet</i>	GATCACTCAGCTGAAAATCGAC	AGGCTGTGAGATCATATCCTTG
<i>Foxp3</i>	TTTCACCTATGCCACCCTTATC	CATGCCAGTAAACCAATGCTAG
<i>Il6</i>	CTCCCAACAGACCTGTCTATAC	CCATTGCACAACCTCTTTTCTCA
<i>Sata3</i>	TGTCAGATCAGATGGGCTAAAT	GGTCGATGATATTGCTAGCCA
<i>Sata5a</i>	GATACGTGAAGCCACAGATCAA	GGGTACATGTTGTAGTGAGGTT
<i>Sef</i>	TGACAGCAGTAGCAGTAATAGG	AATTACAAGCGAAATGAGAGCC
<i>Mmp-9</i>	CAAAGACCTGAAAACCTCCAAC	GACTGCTTCTCTCCCATCATC
<i>Inos</i>	TGCCACGGACGACGGGATAG	CTCTTCAAGCACTCCAGGAACG
<i>Ccl2</i>	TTTTTGTACCAAGCTCAAGAG	TTCTGATCTCATTTGGTTCGCA
<i>Vegf</i>	TAGAGTACATCTTCAAGCCGTC	CTTTCTTTGGTCTGCATTACACA
<i>Tgfb</i>	CCAGATCCTGTCCAACTAAGG	CTCTTTAGCATAGTAGTCCGCT
<i>Ccl2</i>	TTTTTGTACCAAGCTCAAGAG	TTCTGATCTCATTTGGTTCGCA
<i>Cer9</i>	CAGTTTGCAAGCCATTTCCTTC	GTCTTCACTCTGTGCAATACC
<i>Cer6</i>	AACTTCACCAAGGTAATTTGTGC	AGGTATCACCACCATAATGTT
<i>Cer5</i>	GCTCATCTTTGCCATCATGATT	ATAGATGACAGGGTTTAGGCAG
<i>Cer4</i>	AAATACAAGAGGCTCAAGTCCA	GATGCCAGGTATCTCTCTATG
<i>Il22</i>	GCAGATAACAACAGATGTCC	GTCTTCCAGGGTGAAGTTGAC
<i>Il5</i>	CTCTGTGACAAAGCAATGAGAC	GTCTAGCCCTGAAAGATTCT
<i>Gata3</i>	ATTACACCTATCCGCCCTAT	CGGTCTGCCATTCATTTTAT
<i>Mep7</i>	CCTGCGTGCCAAATGACACCTAC	CGGAGCTGTACTCTGACCTTGTG
<i>Il4</i>	TACCAGGAGCCATATCCACGGATG	TGTGCTGTTCTCTGCTGTGAG
<i>Il15</i>	TCTCTGGAATTCAGGTTATT	GCCAGATTCGTCTACATTCTTG
<i>Il2</i>	TGAGCAGGATGAGCAATTACAG	CAGAGGTCCAAGTTCACTTCT
<i>Ccl11</i>	CTTCTGCTGCTTTATCATGAC	AACCTGCTCTTGAAGACTATGG
<i>Ccl5</i>	GTATTTCTACACCAGCAGCAAG	TCTTGAACCCACTTCTCTCTG
<i>Cxcl10</i>	CAACTGCATCCATATCGATGAC	GATTCGGAGTTCAGACATCTCT
<i>Cxcl9</i>	AATCCCTCAAAGACCTCAAACA	TCCCATCTTTTCATCAGCTTCT
<i>Il17f</i>	CGTGAATTCAGAACCGCTCCAG	TTGCTGAATGGCAGCGAGTTC
<i>Il13</i>	ACCCTTAAGGAGCTTATTGAGG	ATTGCAATTGAGATCTTGGTC
<i>Il10</i>	TTCTTTCAAACAAAGGACCAGC	GCAACCCAACTAACCCCTTAAAG
<i>Il1g</i>	CTTGAAAGACAATCAGGCCATC	CTTGCAATACTCATGAATGCA
<i>Tnfa</i>	ATGCTCAGGCTCTTCTCATTC	GCTTGTCACTCGAATTTGAGA

DAI = (体质量指数 + 大便形状 + 出血情况) / 3。

1.2.2 组织 HE、甲苯胺蓝染色和免疫组化染色 在前期的研究^[5]中已具体描述。

1.2.3 实时定量 PCR 检测小鼠结肠 mRNA 使用 TRIzol 方法提取 RNA, 并使用 RNeasy 柱对其进行纯化。通过 PCR 仪以及特异性引物对基因的表达式进行检测。扩增完成后, 进行 DNA 解链曲线分析以确认单个扩增子的存在。GAPDH 是用于标准化转录水平的内部参考基因。每个基因转录水平的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

1.2.4 结肠固有层单核细胞分离及 MC 流式分析 按照单核细胞分离试剂盒制造商的说明从小鼠结肠中分离单核细胞。然后使用前文方法^[4-5]标记单核细胞中的 MC。使用 BD FACSCanto 仪器进行采

集,使用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.2.5 M1 和 M2 型巨噬细胞染色和流式分析 M1 型巨噬细胞染色:将 BB515 Rat Anti-CD11b、PE Rat Anti-mouse F4/80、PE-Cy7 Rat Anti-mouse CD86、Percp/cy5.5 Anti-mouse CD45 抗体加入样品中,4 ℃ 条件下孵育 30 min。M2 型巨噬细胞染色:先将 BB515 Rat Anti-CD11b、PE Rat Anti-mouse F4/80、Percp/cy5.5 Anti-mouse CD45 抗体加入样品中,4 ℃ 条件下孵育 30 min 染表面 Marker。使用固定破膜液进行表面 Marker 固定及破膜作用后,加入抗体 Alexa Fluor 647 Rat Anti-mouse CD206,4 ℃ 条件下孵育 30 min,进行胞内染色。1 × PBS 洗涤后使用 FACSCanto II 仪器上机和 FlowJo 软件进行数据分析。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验和单因素方差分析对数据进行统计学分析。每个实验至少重复 3 次,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MC 在 DSS 诱导的肠炎恢复期浸润增加 在

DSS 水溶液诱导的肠炎小鼠模型中,第 3 ~ 7 天为炎症的活动期,第 10 ~ 14 天为炎症的恢复期。如图 1A 所示,对不同时间节点的结肠进行实时定量 PCR 分析,与 MC 迁移和分化紧密相关的因子 *Scf* 的 mRNA 表达水平随着时间节点变化,可见炎症活动期结束的第 7 天 *Scf* mRNA 表达最高,且恢复期一直维持在较高的表达水平。可见肠上皮损伤后肠道在炎症期逐渐分泌了大量 *Scf* 因子。另一种与 MC 迁移及浸润有关的因子 *Mmp-9* 的表达也在恢复期上调。为了进一步探索 MC 是否受到分泌的 *Scf* 和 *Mmp-9* 因子的影响,用流式细胞术检测了不同时间点的 MC 在单核细胞中的占比(图 1B),可见在恢复期 MC 比例升高,差异有统计学意义($F_{\text{Day10}} = 79.75, P < 0.001$)($F_{\text{Day12}} = 13.00, P < 0.001$)。此外,一种反映 MC 数量和功能的类胰蛋白酶基因 *Mcpt7* 的表达也在恢复期上升(图 1C)。同时,在第 3、7 天炎症期,*Mmp-9*、*Scf* 和 *Mcpt7* 的表达量与第 0 天比较,差异无统计学意义。最后,本研究使用甲苯胺蓝对不同时间节点的结肠进行染色,结果显示炎症活动期的 MC 较少,恢复期可见 MC 大量浸润于肠组织中(图 1D)。

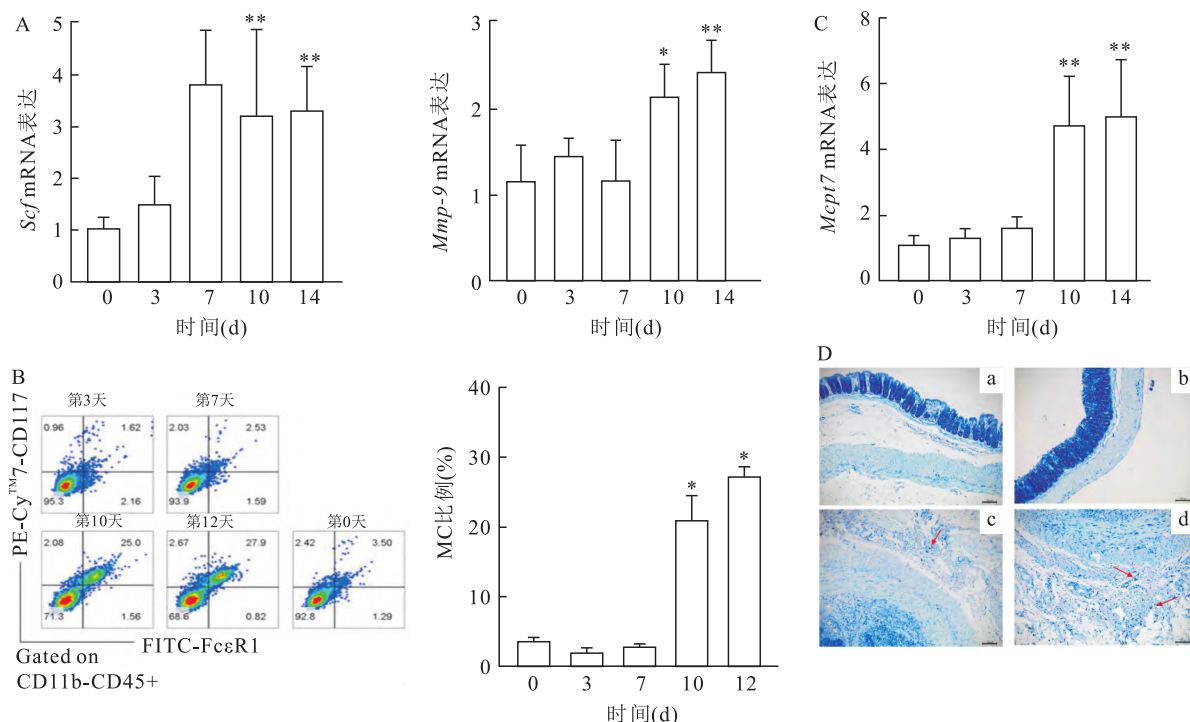


图1 MC 在 DSS 诱导的肠炎恢复期浸润增加

A: 实时荧光定量 PCR 分别检测各时间节点肠组织中 *Scf* (a) 和 *Mmp-9* (b) 基因的变化水平; B: 流式细胞术分析各时间节点肠组织 CD45⁺ CD11b⁺ CD117⁺ FcεRI⁺ 的 MC 含量; C: 实时荧光定量 PCR 分别检测各时间节点肠道中 *Mcpt7* 基因的变化水平; D: 使用甲苯胺蓝染色分析各时间节点的 MC 迁移和浸润情况 ×100; a: 第 0 天; b: 第 7 天; c: 第 10 天; d: 第 12 天; 与第 0 天比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 DSS 诱导的肠炎模型中 MC 缺陷鼠结肠黏膜损伤较重且黏膜修复受限 用 WT 小鼠和 C-kit 小鼠构建肠炎模型。较 WT 组而言,C-kit 组体质量损失较大(图 2A)。小鼠生存曲线表明 C-kit 组肠道炎症较重,生存率较低(图 2B)。小鼠 DAI 指数通过综合评估小鼠便血(图 2C)、腹泻、体质量减轻等体征获得。可见 C-kit 组不同时间节点 DAI 指数均低于 WT 组(图 2D)。结肠受炎症程度的影响会缩短,长度越短则代表肠道炎症越重。C-kit 组结肠长度整体较 WT 组缩短更多(图 2E),WT 组和 C-kit 组结肠长度分别为 (10.3 ± 1.17) cm 和 (7.9 ± 0.91) cm,差异有统计学意义($F = 1.06, P < 0.01$)。HE 染色反映肠道黏膜的结构完整性。如图 2F 所示,WT 组绒毛可见,结构较完整,肠道恢复较好。

然而,C-kit 组未见完整的绒毛结构,组织破坏严重,肠道恢复较差。Ki67 免疫组化染色反映组织的增生和修复能力(图 2G),WT 组和 C-kit 组 Ki67(+)细胞百分比分别为 $(64.2 \pm 5.89)\%$ 和 $(27.2 \pm 10.23)\%$,Ki67(+)细胞百分比 WT 组较高,差异有统计学意义($F = 3.017, P < 0.001$)。

2.3 MC 缺陷鼠重建 MC 后炎症减轻且恢复了修复能力 利用 WT 小鼠、MC 小鼠和 MC 重建小鼠构建肠炎模型。MC 重建组体质量损失介于 WT 组和 C-kit 组之间(图 3A)。MC 重建组结肠长度为 (8.04 ± 0.59) cm,与 WT 组比较,差异无统计学意义,与 C-kit 组比较,差异有统计学意义($F = 1.526, P < 0.05$),MC 重建组结肠长度大于 C-kit 组(图 3B)。MC 的重建一定程度上抑制了肠道炎症。NC

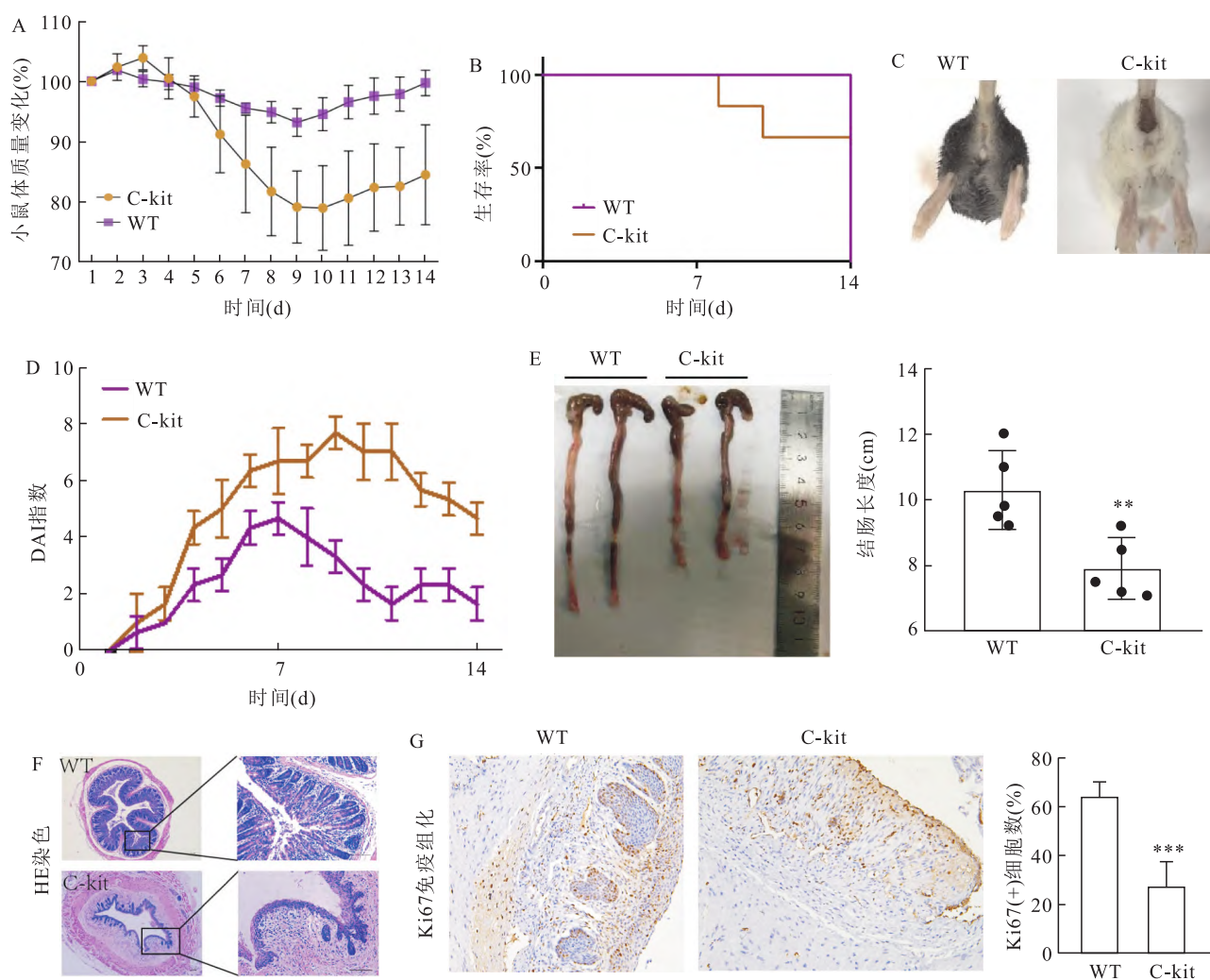


图2 WT组和C-kit组第14天的肠炎损伤和恢复对比

A: 两组小鼠的体质量变化率;B: 两组小鼠的生存曲线;C: 典型的两组小鼠便血症状;D: 两组小鼠 DAI 指数;E: 第 14 天小鼠结肠长度;F: 第 14 天两组小鼠代表性的 HE 染色;左侧 $\times 50$;右侧 $\times 200$;G: 第 14 天两组小鼠代表性的 Ki67 免疫组化染色和定量分析 $\times 200$;与 WT 组小鼠比较: $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

组和 MC 重建组 Ki67(+) 细胞百分比分别为 $(6.4 \pm 2.07)\%$ 和 $(49.4 \pm 8.32)\%$ 。MC 重建组 Ki67(+) 细胞百分比低于 WT 组 ($F=1.997, P<0.05$), 高于 C-kit 组 ($F=1.511, P<0.01$), 见图 3C、3D。

2.4 在 IBD 过程中 MC 通过极化 M1/M2 型巨噬细胞发挥抑炎和促进黏膜修复的作用 对结果 2.2 项中两组小鼠的结肠组织提取单核细胞并用流式细胞术标记和分析。C-kit 组 (0.53 ± 0.02) 的 M1 型巨噬细胞比例高于 WT 组 (0.48 ± 0.02) , C-kit 组 (0.10 ± 0.01) 的 M2 型巨噬细胞比例低于 WT 组 (0.20 ± 0.03) 。统计学分析 C-kit 组巨噬细胞 M1/M2 的比率较 WT 组增高(图 4A), 柱状图反映了两组小鼠 M1/M2 型巨噬细胞比例, 使用非配对 t 检验进行分析 ($t=5.584$), 差异有统计学意义 ($F=1.183, P<0.01$)。为探究这种比率差异对 IBD 过程的影响, 用实时定量 PCR 检测了两组小鼠结肠组织中包含与 M2 巨噬细胞功能密切相关的抑炎因子基因和 M1 巨噬细胞功能相关的促炎因子基因(图 4B)。分析其中差异有统计学意义 ($P<0.05$) 的多个基因, 包括 *Il4*、*Il10*、*Il13*、*Ccl5*、*Cxcl9*、*Gata3*、*Inos* 等。基因 *Inos* 是反映炎症程度指标, WT 组 (0.62 ± 0.43) 相对表达低于 C-kit 组 (2.25 ± 0.94) , 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。基因 *Il4*、*Il10*、*Il13*、*Gata3*

是参与抑制炎症发展和促进组织重塑过程的指标, 与 M2 巨噬细胞功能关系极为密切, WT 组表达均高于 C-kit 组(图 4C)。WT 组基因 *Il4*、*Il10*、*Il13*、*Gata3* 的表达依次为 (2.18 ± 1.24) 、 (1.78 ± 0.63) 、 (1.15 ± 0.13) 和 (1.22 ± 0.10) , C-kit 组依次为 (0.46 ± 0.35) 、 (0.81 ± 0.41) 、 (0.34 ± 0.26) 和 (0.47 ± 0.44) , 差异均有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。

3 讨论

本研究表明肠上皮受损后肠道可分泌 *Scf* 和 *Mmp-9* 诱导 MC 向炎症肠组织迁移和浸润。*Scf* 和 *Mmp-9* 的表达上调可能是为炎症恢复期 MC 的聚集提供有利环境, 以便于 MC 在炎症恢复期活化和发挥特定功能。在小鼠 IBD 模型中, MC 缺陷小鼠的肠黏膜绒毛结构破坏较严重, 肠道炎症较重且黏膜修复能力较差。然而, 当在 MC 缺陷小鼠体内重建 MC 后, 发现肠黏膜再生修复功能得以恢复, 肠道炎症也得以减轻。这证实 MC 对于 IBD 的免疫调节和黏膜修复是至关重要且必不可少的。本研究用流式细胞术分析了炎症反应中至关重要的巨噬细胞, 活化的巨噬细胞有两种亚型, 即促炎 M1 型和抑炎 M2 型巨噬细胞^[6]。M1 型巨噬细胞在炎症过程中扮演

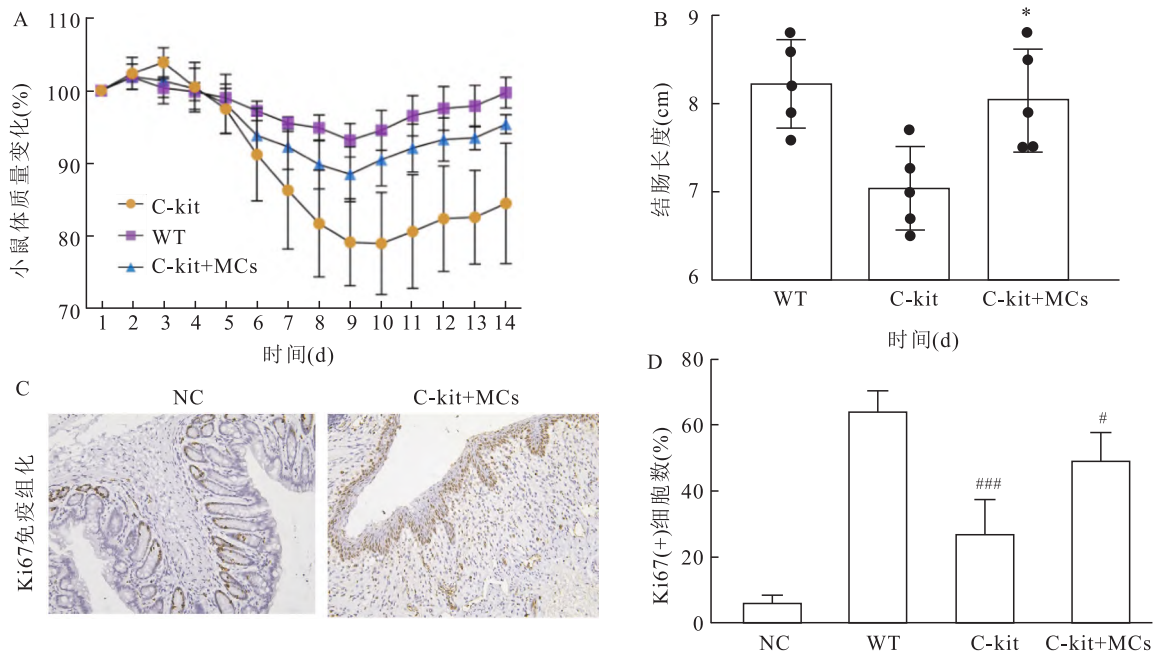


图3 MC 缺陷鼠重建 MC 后第 14 天的炎症和黏膜恢复情况

A: 3 组小鼠的体质量变化; B: 第 14 天 3 组小鼠结肠长度差异; C: NC 组和 C-kit + MCs 组小鼠代表性的 Ki67 免疫组化染色 $\times 200$; D: 定量分析小鼠 Ki67 免疫组化染色; 与 C-kit 组比较: * $P<0.05$; 与 WT 组比较: # $P<0.05$, ### $P<0.001$

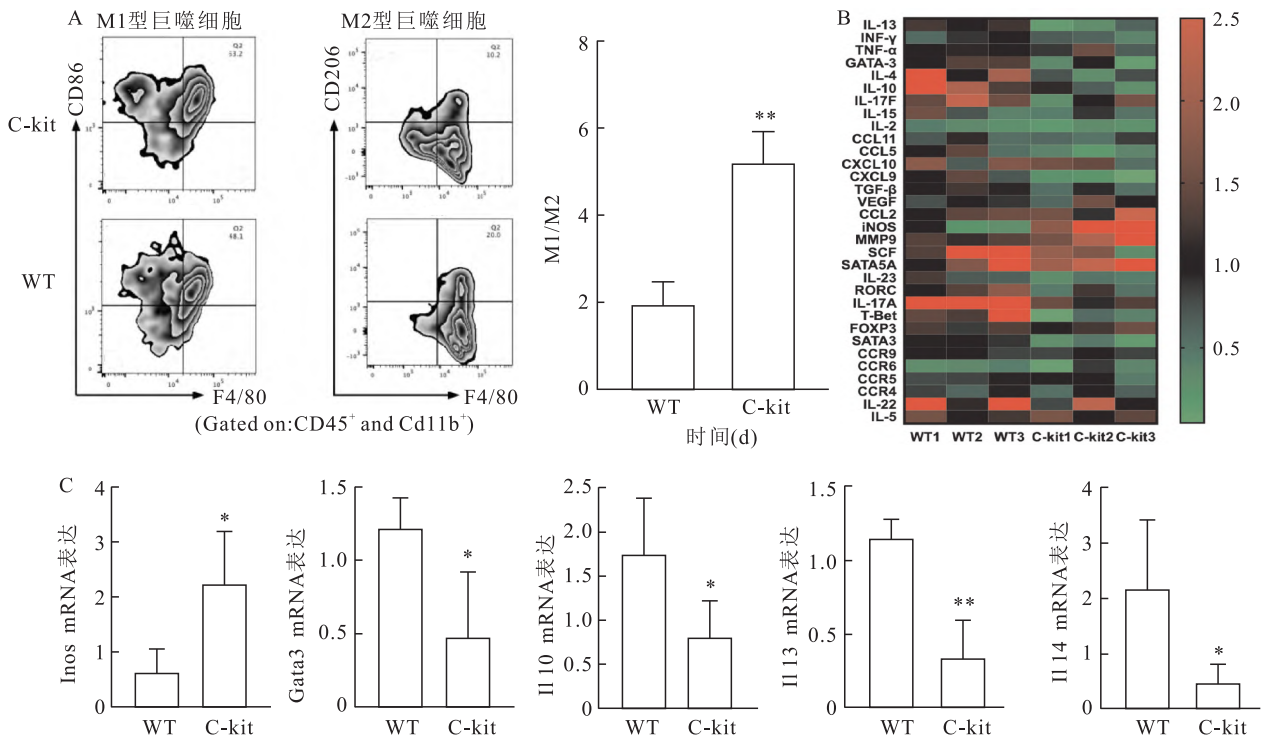


图4 MC对巨噬细胞极化和肠组织环境的影响

A: 两组小鼠结肠中单个核细胞的流式数据图和统计; B: 热图显示两组小鼠结肠中常见并与 M1 和 M2 巨噬细胞功能密切相关的细胞因子的基因表达水平; C: 在 WT 和 C-Kit 小鼠结肠内相关基因的表达水平差异; 与 WT 型小鼠比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

着促炎的角色,其主要分泌肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, *Tnf-α*)、*Il6*、*Il12* 和 *Il1β*; M2 型巨噬细胞在炎症过程中则扮演着抑炎的角色,其主要分泌 *Il4* 和 *Il10* 等因子,弱化免疫反应进而抑制炎症的发生发展,促进伤口愈合^[7]。活化的巨噬细胞既能调节组织损伤也能促进修复^[8]。结果显示 WT 野生型小鼠组的结肠内巨噬细胞 M1/M2 比率低于 MC 缺陷小鼠组。同时,类似 M2 型巨噬细胞,MC 自身活化后也可以分泌 *Il4*,除此之外,还可分泌 *Il13*,共同起到抗炎作用^[9]。显然,MC 一定程度上富集了抗感染作用的 M2 型巨噬细胞,降低了促炎作用的 M1 型巨噬细胞,这种极化巨噬细胞的作用有利于肠炎恢复期的黏膜愈合和组织修复。32 种抑炎和促炎因子基因的检测进一步证实了上述结论。

本研究仍存在一定局限性,小鼠肠组织环境中炎性多细胞因子的实时定量荧光 PCR 检测反映了 mRNA 基因水平的差异性,基因调控下游蛋白水平的差异性仍需在后续的研究中进一步补充。此外,MC 可以分泌多种趋化因子,如 *Ccl3*、*Ccl4*、*Ccl5*、*Cxcl9* 等^[10]。但笔者发现 MC 缺陷以后,这些趋化因子基因表达水平没有明显降低,说明 MC 并非唯一

影响 IBD 过程的免疫细胞,将在后续工作中进一步剖析 IBD 过程中免疫细胞浸润和串扰的相关机制。

本研究阐述了 MC 是通过极化巨噬细胞在 IBD 过程中发挥抗炎和促进黏膜修复作用的,它为 MC 参与 IBD 调控提供了可靠的理论依据。如果临床研究进一步证实此理论的可靠性,未来 MC 数目和活性可能作为评价 IBD 患者结肠黏膜愈合功能的一项可靠指标。*Il13*、*Gata3*、*Il4*、*Il10*、*Inos* 等指标也可能作为评价 IBD 患者肠道自愈功能的辅助指标。

参考文献

- [1] Guan Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. J Immunol Res, 2019, 2019: 7247238.
- [2] 李旭辉,肖伟明. T 细胞和 B 细胞及其细胞因子在炎症性肠病中的作用研究进展[J]. 医学综述, 2020, 26(2): 209-13.
- [3] Garcia-Carbonell R, Yao S J, Das S, et al. Dysregulation of intestinal epithelial cell RIPK pathways promotes chronic inflammation in the IBD gut[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1094.
- [4] He Z, Song J, Hua J, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulating IL-33/ST2 signaling for an immune network favorable to mucosal healing in experimentally inflamed colons [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(12): 1173.

- [5] He Z, Li Y, Ma S, et al. Degranulation of gastrointestinal mast cells contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(20): 2241–59.
- [6] Ding C, Zheng J, Wang B, et al. Exosomal microRNA-374b-5p from tubular epithelial cells promoted M1 macrophages activation and worsened renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:587–693.
- [7] Xie X, Yang X, Wu J, et al. Trib1 contributes to recovery from ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by regulating the polarization of renal macrophages[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 473.
- [8] Aiello S, Podestà M A, Rodriguez-Ordóñez P Y, et al. Transplantation-induced ischemia-reperfusion injury modulates antigen presentation by donor renal CD11c + F4/80 + macrophages through IL-1R8 regulation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(3):517–31.
- [9] McLeod J J, Baker B, Ryan J J. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13[J]. *Cytokine*, 2015, 75(1):57–61.
- [10] Elieh Ali Komi D, Grauwet K. Role of mast cells in regulation of T cell responses in experimental and clinical settings[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2018, 54(3):432–45.

Mast cells regulate inflammatory bowel disease by mediating macrophage polarization

Yu Tianyu^{1,2,3}, Liu Daoli¹, Wang Zhaohui¹, Hu Shuangjiu¹, Liu Bin¹

(¹*Dept of Gastrointestinal Surgery, Anqing First People's Hospital of Anhui Medical University, Anqing 246000;*

²*Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230000;*

³*Dept of General Surgery, Shanghai Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200000)*

Abstract Objective To investigate the role of mast cell (MC) in the progression of inflammatory bowel disease (IBD) and the possible regulatory mechanisms. **Methods** Wild type mice, MC-deficient mice and MC reconstituted mice were used to construct dextran sodium sulfate (DSS) -induced colitis models. Assays such as toluidine blue staining, flow cytometry and Real-time quantitative PCR were used to analyze results. **Results** MCs migrated and infiltrated to the intestine under the induction of stem cell factor (*Scf*) and matrix metalloprotein 9 (*Mmp-9*) factors. In the mouse IBD models, the integrity of intestinal mucosal villi in MC-deficient mice was worse than that in WT mice. In MC-deficient mice, the intestinal inflammation was more severe and the ability of mucosal repair was worse. After MC reconstruction, intestinal inflammation was reduced and mucosal repair ability was restored. The ratio of macrophage M1/M2 in WT mouse was lower than that in MC-deficient mouse. The genes interleukin-4 (*Il4*) and interleukin-10 (*Il10*) associated with M2 macrophages were higher in the WT mouse than in the MC-deficient mouse, and other anti-inflammatory factor genes interleukin-13 (*Il13*) and GATA binding protein 3 (*Gata3*) were also higher than those in the WT group. The pro-inflammatory factor gene inducible nitric oxide synthase (*Inos*) was opposite. **Conclusion** MC polarizes macrophages to exert anti-inflammatory and promote mucosal repair in the process of IBD.

Key words mast cell; inflammatory bowel disease; macrophages; inflammatory factors; anti-inflammatory factors; polarization