

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.003

腺苷脱氨酶抑制巨噬细胞增殖迁移的作用研究*

马海航 邵赵伟 刘冲 和婷 刘丽 董轲 张惠中^Δ

(空军军医大学第二附属医院检验科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨腺苷脱氨酶对鼠源巨噬细胞 RAW264.7 增殖、迁移、细胞周期、细胞凋亡的影响。**方法:**用不同浓度 (0、0.25、1.25、2.5、5U/mL) 的腺苷脱氨酶处理 RAW264.7 细胞后,用实时细胞分析系统检测细胞增殖能力,用流式细胞术检测腺苷脱氨酶对细胞凋亡和周期的影响,划痕修复实验检测 RAW264.7 细胞迁移能力。**结果:**与对照组相比,高浓度腺苷脱氨酶 (2.5 U/mL、5 U/mL) 处理可以显著抑制 RAW264.7 细胞的增殖能力,且抑制效果随腺苷脱氨酶浓度升高而增强 ($P<0.05$)。流式细胞术检测结果显示,相较于对照组,高浓度腺苷脱氨酶 (2.5 U/mL) 处理可以诱导 RAW264.7 细胞凋亡,并导致细胞周期 G2/M 期阻滞 ($P<0.05$)。此外,细胞划痕实验表明,高浓度腺苷脱氨酶 (2.5 U/mL) 处理可以显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞的迁移能力 ($P<0.05$)。**结论:**高浓度腺苷脱氨酶对巨噬细胞增殖和迁移具有抑制作用,并可诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞。

关键词:腺苷脱氨酶;巨噬细胞;增殖;周期;迁移

中图分类号:R-33;Q813;Q26 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)03-414-04

The Effects of Adenosine Deaminase on Macrophage Cells Proliferation and Migration*

MA Hai-hang, GAO Zhao-wei, LIU Chong, HE Ting, LIU Li, DONG Ke, ZHANG Hui-zhong^Δ

(Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of adenosine deaminase on the proliferation, migration, cycle and apoptosis of macrophage RAW264.7 cells. **Methods:** RAW264.7 cells were treated with adenosine deaminase at gradient concentrations (0, 0.25, 1.25, 2.5, 5U/mL). The proliferation ability was detected by realtimecellularanalysis. The effect of adenosine deaminase on apoptosis and cell cycle was detected by flow cytometry. Scratch repair experiment was used to investigate the migration ability of RAW264.7 cells. **Results:** Compared with the control group, high concentration of adenosine deaminase (2.5 U/mL, 5 U/mL) significantly inhibited the proliferation capacity of RAW264.7 cells compared with the control group, and the inhibitory effect was enhanced with the increase of adenosine deaminase concentration ($P<0.05$). Flow cytometry showed that high concentration of adenosine deaminase (2.5 U/mL) induced RAW264.7 cell apoptosis and led to G2/M cell cycle arrest ($P<0.05$). In addition, cell scratch experiments showed that high concentration of adenosine deaminase (2.5 U/mL) significantly inhibited RAW264.7 macrophage migration ($P<0.05$). **Conclusions:** Adenosine deaminase inhibits the proliferation and migration of macrophages and induces apoptosis and cell cycle arrest.

Key words: Adenosine deaminase; Macrophage; Proliferation; Cycle; Migration

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q813; Q26 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)03-414-04

前言

巨噬细胞通过分泌 TNF- α 、IL-6、IL-10、iNOS 等多种细胞因子参与机体的炎症反应、组织修复等不同病理过程,在免疫应答和维持机体免疫稳态中发挥着不可或缺的作用^[1]。研究表明,巨噬细胞功能异常与多种疾病的发生和发展相关,如:肿瘤、自身免疫性疾病、心脑血管等疾病^[2-4]。

腺苷是机体微环境中重要的免疫调节信号,一定浓度的腺苷可以抑制炎症反应,维持机体免疫稳态^[5-9]。腺苷对巨噬细胞的生长、分化、成熟及活性具有调控作用^[10]。腺苷脱氨酶

(adenosine deaminase, ADA)通过调节腺苷代谢,作用于免疫系统,影响免疫细胞的功能,促进或抑制其增殖、分化、迁移等能力,间接调节人体免疫平衡^[11]。目前,对于 ADA 对免疫系统调节还主要集中在 T、B 等淋巴细胞^[12,13],具体调控机制还没有阐明。本文以鼠源性巨噬细胞为研究对象,通过系列实验来研究 ADA 对巨噬细胞生物学行为的作用,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 由本实验室液氮保存。腺苷脱氨

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81772485);陕西省自然科学基金项目(2020JM-315)

作者简介:马海航(1990-),男,硕士研究生,检验技师,研究方向:临床检验诊断,电话:18810961027, E-mail: mhhang1990@163.com

^Δ 通讯作者:张惠中,男,博士生导师,教授,主要研究方向:临床检验诊断, E-mail: huizz328@163.com

(收稿日期:2020-06-06 接受日期:2020-06-30)

酶购自上海科华生物工程公司(产品批号:20190412),细胞周期检测试剂盒(产品批号:20191230)、细胞凋亡检测试剂盒(产品批号:20200103)均购自凯基生物技术股份有限公司。FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);实时细胞分析系统(艾森生物公司);IX71 倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 RAW264.7 细胞培养 采用 90%高糖 DMEM 培养液+10% FBS, 37°C、5% CO₂ 培养箱。

1.2.2 细胞增殖实验 RAW264.7 细胞培养,按照实时细胞分析系统(real time cellular analysis, RTCA)操作流程,首先加 50 μL 空白培养液至检测板中,测定基线,然后每孔接种 100 μL 含有 5000 个细胞的培养液至 RTCA 检测板中,培养液中含有不同浓度的 ADA [0(对照)、0.25、2.5、5 U/mL],将 RTCA 检测仪置于孵箱中,培养 77 小时,监测细胞增殖曲线。

1.2.3 划痕修复实验 在 6 孔板的每个孔中接种 5×10^5 个 RAW264.7 细胞,使培养细胞的密度达到 80%时,制备划痕。用 PBS 洗涤细胞 3 次后,洗去脱落细胞,每孔加 2 mL 无血清培养液,培养液中含不同浓度的 ADA [0(对照)、0.25、2.5 U/mL],每隔 10 h 在显微镜下观察并拍照记录。相对迁移率=(初始划痕宽度 - 培养后划痕宽度)/初始划痕宽度 \times 100%。

1.2.4 细胞凋亡检测 在 6 孔板的每个孔中接种 5×10^5 个 RAW264.7 细胞,加入含不同浓度 ADA [0(对照)、0.25、1.25、2.5 U/mL]的培养液,培养 24 h,用无 EDTA 的胰酶消化收集细胞。用 PBS 洗涤细胞 2 次后,加入 500 μL 的 Binding Buffer 重悬细胞,分别加入 5 μL Annexin V-FITC 与 5 μL PI,混匀,室温避光反应 5-15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 细胞周期检测 在 6 孔板的每个孔中接种 5×10^5 个 RAW264.7 细胞,采用梯度浓度的 ADA[0(对照)、0.25、2.5 U/mL]处理细胞,培养 24 h,胰酶消化收集细胞,100 L PBS 重悬细胞,加入 1 mL 75%预冷无水乙醇固定 2 h,离心收集细胞。用 PBS

洗涤细胞 1 次后,加入 450 μL Propidium Iodide (PI)及 50 μL RNaseA,室温避光 30-60 min,流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件对实验数据进行统计学分析,实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组实验数据比较,采用两独立样本 t 检验方法对数据进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADA 抑制 RAW264.7 细胞增殖

细胞增殖曲线结果显示(图 1):统计 ADA 加入 48 h 后实验结果,通过与对照组相比,高浓度 ADA(2.5 U/mL、5 U/mL)处理会显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞增殖能力,且抑制效果随 ADA 的浓度升高而增大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

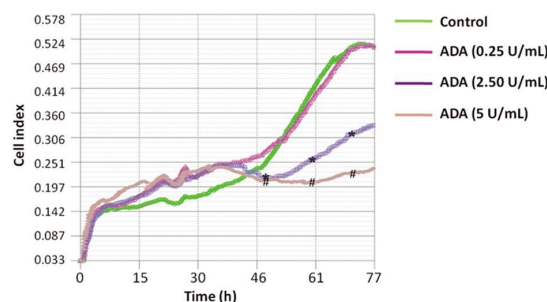


图 1 ADA 处理对 RAW264.7 细胞增殖的影响

Fig.1 The effect of ADA on Raw264.7 cells proliferation

Note: * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with control group.

2.2 ADA 抑制 RAW264.7 细胞迁移

划痕修复实验结果(图 2A)和相对迁移率(图 2B)显示:与对照组相比,2.5 U/mL 的 ADA 处理 RAW264.7 细胞,会使细胞迁移的能力受到抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$),0.25 U/mL 的 ADA 处理则对细胞迁移能力无显著影响。

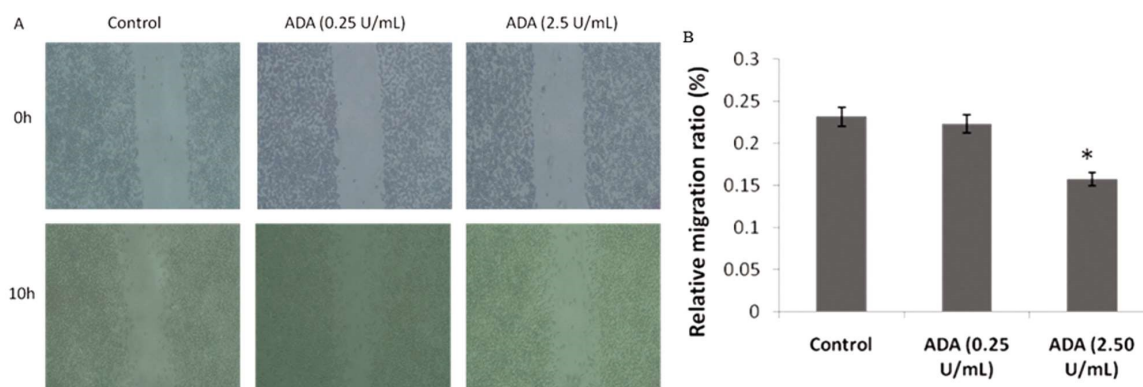


图 2 ADA 对 RAW264.7 细胞迁移能力的影响

(A) 0.25 U/mL、2.5 U/mL ADA 处理 RAW264.7 细胞 0h 和 10h 后迁移实验结果;(B) 相对迁移率计算及统计分析结果

Fig.2 The effect of ADA on Raw264.7 cells migration

(A) Migration results of RAW264.7 cells treated by 0.25 U/mL and 2.5 U/mL ADA after 0h and 10h; (B) The results of relative migration ratio calculation and statistical analysis

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, n=3. * $P < 0.05$, compared with control group.

2.3 ADA 诱导 RAW264.7 细胞凋亡

流式细胞术分析结果显示(图 3):ADA 处理 RAW264.7 细胞 24 h 后,凋亡细胞比率显著升高,且凋亡率与 ADA 处理

的浓度呈正相关。表明 ADA 处理对 RAW264.7 细胞凋亡具有诱导作用,随 ADA 浓度升高而增大。

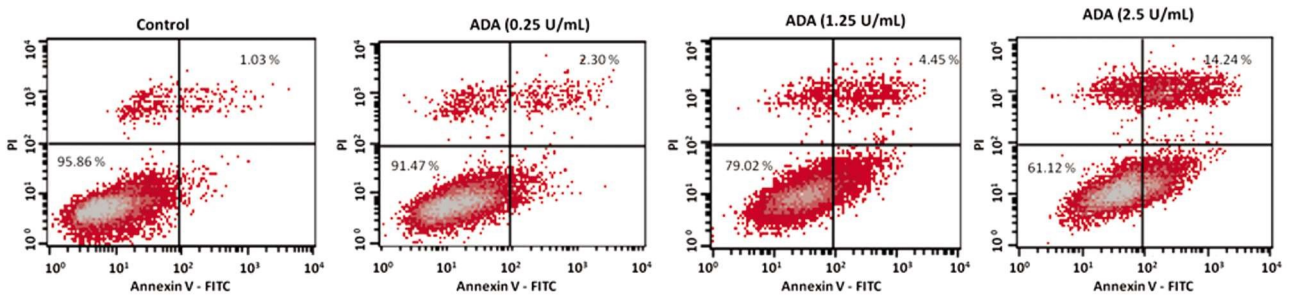


图3 ADA对RAW264.7细胞凋亡的影响

Fig.3 The effect of ADA on Raw264.7 cell apoptosis

2.4 ADA 诱导细胞周期阻滞

流式细胞术检测结果(图4A)和细胞周期比率(图4B)显示:2.5 U/mL的ADA处理RAW264.7细胞24h后,G2/M期细胞比率(13.19%)高于对照组(7.51%)差异有统计学意义($P < 0.05$).

05),S期细胞比率(26.32%)低于对照组(31.17%)差异有统计学意义($P < 0.05$),表明ADA对RAW264.7细胞周期具有调节作用。

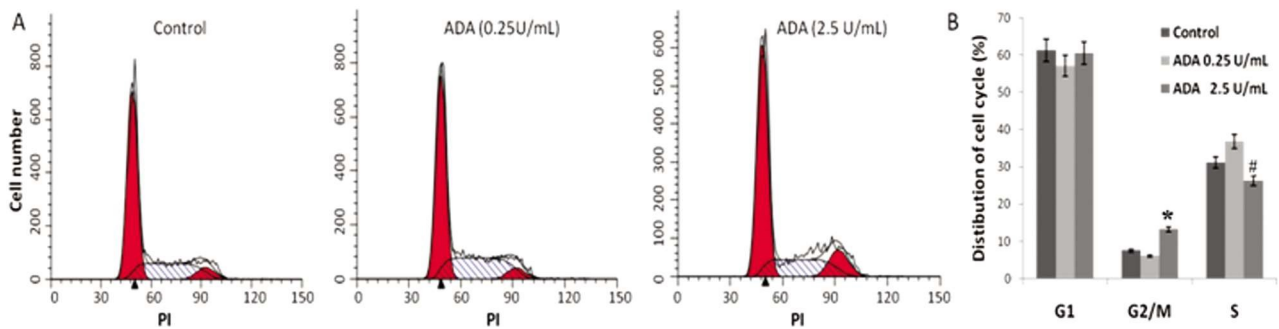


图4 ADA处理对RAW264.7细胞周期的影响

(A)0.25 U/mL、2.5 U/mL ADA处理RAW264.7细胞后细胞周期流式细胞术检测结果;(B)细胞周期分布统计分析结果

Fig.4 The effect of ADA on Raw264.7 cell cycle distribution

(A) The results of RAW264.7 cells were detected by flow cytometry after treatment by 0.25 U/mL and 2.5 U/mL ADA; (B) Statistical analysis of cell cycle distribution

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with control group

3 讨论

巨噬细胞是机体免疫系统的重要组成部分,参与非特异性和特异性免疫应答^[4,15]。巨噬细胞可以吞噬并清除外源病原体或自身衰老损伤的细胞,并可以通过分泌多种细胞因子,参与炎症反应和组织修复^[16,17]。因此,巨噬细胞数量和活性对机体免疫至关重要,如陈经纬等研究发现系统性红斑狼疮患者体内的巨噬细胞表型和功能发生了显著改变^[18],陆峰等研究发现,结肠癌患者肿瘤组织中的巨噬细胞数量与患者预后负相关^[19]。目前,巨噬细胞已被专家视为肿瘤免疫治疗的潜在靶点^[20,21]。因此,发现对巨噬细胞生物学行为和功能具有调控作用的分子,可为巨噬细胞异常相关疾病的临床治疗提供新的思路。

研究显示,多种小分子物质对巨噬细胞的生物学行为具有调控作用,如维生素C可以促进巨噬细胞的增殖和迁移^[22],人参皂苷Rg1可通过促进RAW264.7巨噬细胞自噬,发挥抗凋亡的保护作用^[23],高浓度的人参皂苷Rg2(大于100 g/mL)可显著抑制巨噬细胞的增殖^[24],绿豆肽能够促进RAW264.7巨噬细胞的增殖^[25]。本文实验结果发现高浓度ADA可以诱导巨噬细胞凋亡和细胞周期阻滞,从而抑制巨噬细胞的增殖,并对巨噬细胞的迁移能力有一定的抑制作用。

综上所述,ADA对巨噬细胞生物学行为具有显著的调节作用,本文研究结果为巨噬细胞异常相关疾病的临床治疗药物开发提供新的思路。当然,本文也有一定的研究不足,首先,虽然利用细胞实验揭示了ADA对巨噬细胞生物学行为的影响,但具体分子作用机制不明确。其次,本文未进行动物体内实验,ADA在体内对巨噬细胞的作用尚待进一步研究。因此,在后续的研究中,我们将结合体内外实验,继续探讨ADA对巨噬细胞的调控作用和分子机制。

参考文献(References)

- [1] Sica A, Erreni M, Allavena P, et al. Macrophage polarization in pathology [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(21): 4111-4126
- [2] Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and Therapeutic Resistance in Cancer[J]. Cancer Cell, 2015, 27(4): 462-472
- [3] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(9): 6425-6440
- [4] Cuda CM, Pope RM, Perlman H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases [J]. Nature Reviews Rheumatology, 2016, 12(9): 543-558
- [5] Fong L, Hotson A, Powderly JD, et al. Adenosine 2A Receptor Block-

- ade as an Immunotherapy for Treatment-Refractory Renal Cell Cancer[J]. *Cancer discovery*, 2020, 10(1): 40-53
- [6] Haskó G, Linden J, Cronstein B, et al. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(9): 759-770
- [7] Vijayan D, Young A, Teng MWL, et al. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2017, 17 (12): 709-724
- [8] Kjaergaard J, Hatfield S, Jones G, et al. A2A Adenosine Receptor Gene Deletion or Synthetic A2A Antagonist Liberates Tumor-Reactive CD8⁺T Cells from Tumor-Induced Immunosuppression [J]. *The Journal of Immunology*, 2018, 201(2): 782-791
- [9] Young A, Ngiew S F, Barkauskas D S, et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(3): 391-403
- [10] Haskó G. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2004, 25(1): 33-39
- [11] Tardif V, Muir R, Cubas R, et al. Adenosine deaminase-1 delineates human follicular helper T cell function and is altered with HIV[J]. *Nature communications*, 2019, 10(1): 815-823
- [12] Burnstock G, Boeynaems JM. Purinergic signalling and immune cells [J]. *Purinergic Signal*, 2014, 10(4): 529-564
- [13] Kutryb-Zajac B, Koszalka P, Mierzejewska P, et al. Adenosine deaminase inhibition suppresses progression of 4T1 murine breast cancer by adenosine receptor-dependent mechanisms [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(12): 5939-5954
- [14] Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization [J]. *Annual Review of Immunology*, 2015, 33 (1): 643-675
- [15] Birk R W, Gratchev A, Hakiy N, et al. Alternative Aktivierung antigenpräsentierender Zellen[J]. *Der Hautarzt*, 2001, 52(3): 193-200
- [16] Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe?[J]. *Pathology International*, 2016, 66(9): 491-505
- [17] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(3): 787-795
- [18] 陈经纬, 邓伟, 张卓亚, 等. 系统性红斑狼疮患者巨噬细胞表型和功能初步研究[J]. *现代免疫学*, 2018, 38(2): 100-103
- [19] 陆峰, 陈威鹏, 颜勋, 等. 结直肠癌患者肿瘤组织浸润巨噬细胞 PD-L1 表达及其临床意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(7): 869-873
- [20] 夏莹, 张岩, 杨永广, 等. 靶向肿瘤相关巨噬细胞的肿瘤治疗研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(11): 1405-1409
- [21] 李静凯, 王毓斌, 邵晋凯. 巨噬细胞作为膀胱癌治疗靶点的潜在研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(12): 1145-1148
- [22] 范志浩, 李媛媛, 李莉霞, 等. 维生素 C 对巨噬细胞增殖、迁移及吞噬功能的影响[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2017, 35(3): 266-270
- [23] 凌霄, 杨萍, 盖盛坤, 等. 人参皂苷 Rg1 通过自噬抑制 Raw 264.7 巨噬细胞凋亡[J]. *解剖学报*, 2016, 47(5): 599-606
- [24] 孙爱华, 王宇, 孙秀艳, 等. 酶转化制备人参皂苷 Rg2 及其对巨噬细胞增殖分化的影响[J]. *大连工业大学学报*, 2019, 38(2): 88-91
- [25] 杨健, 郭增旺, 刁静静, 等. 绿豆肽对 RAW264.7 巨噬细胞增殖及免疫活性物质的影响[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(8): 22-30

(上接第 466 页)

- [23] 吴烽芳, 廖军, 黄志伟, 等. 盐酸氟桂利嗪胶囊联合前庭康复治疗前庭性偏头痛[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2019, 26(10): 553-555
- [24] Asadi P, Zia Ziabari SM, Majidi A, et al. Cinnarizine/betahistine combination vs. the respective monotherapies in acute peripheral vertigo: a randomized triple-blind placebo-controlled trial[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 75(11): 1513-1519
- [25] Scholtz AW, Hahn A, Stefflova B, et al. Efficacy and Safety of a Fixed Combination of Cinnarizine 20 mg and Dimenhydrinate 40 mg vs Betahistine Dihydrochloride 16 mg in Patients with Peripheral Vestibular Vertigo: A Prospective, Multinational, Multicenter, Double-Blind, Randomized, Non-inferiority Clinical Trial [J]. *Clin Drug Investig*, 2019, 39(11): 1045-1056
- [26] 王洋, 王妞, 梁艳梅. 强力定眩片联合筋骨调衡手法治疗椎动脉型颈椎病临床研究[J]. *陕西中医*, 2019, 40(7): 899-901
- [27] 沈剑刚. 从补阳还五汤治疗脑卒中谈中药复方药理学新模式及发展方向[J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2018, 20(8): 1430-1435
- [28] Yi C, Wenping X, Hui X, et al. Efficacy and acceptability of oxcarbazepine vs. carbamazepine with betahistine mesilate tablets in treating vestibular paroxysmia: a retrospective review [J]. *Postgrad Med*, 2016, 128(5): 492-495
- [29] Zhou Y, Guo X, Chen W, et al. Angelica polysaccharide mitigates lipopolysaccharide-evoked inflammatory injury by regulating microRNA-10a in neuronal cell line HT22 [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 3194-3201
- [30] 牛雯颖, 王莉丽, 冯月男, 等. 补阳还五汤、少腹逐瘀汤和丹参饮对高脂血症模型大鼠红细胞膜组分影响的研究[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(8): 78-82