·论　著·

# 体外机械力对人肺巨噬细胞细胞毒性及 IL－8 分泌水平的影响

华辰凤,尚平平,赵俊伟,李翔,谢复炜
中国烟草总公司郑州烟草研究院,郑州　450001

**摘要:目的**　利用体外驱动－缓冲培养－循环系统产生液体流速以模拟巨噬细胞在体内暴露机械力环境,并评估该机械力对巨噬细胞细胞毒性及白介素－8(IL－8)分泌水平的影响。**方法**　在该系统内,观察并拍照系统内相同位置 Loading buffer 在不同流速下分布以比较所受机械力;以人肺巨噬细胞系为研究对象,采用 CCK－8 和 ELISA 法分别(实时或孵育培养 24 h 后)检测其暴露于不同流速下 3h 内不同时间点细胞存活率和 IL－8 分泌水平。**结果**　随着流速的增加,Loading buffer 分布区域向上移动、扩展并受到不断增加和复杂的机械力;当流速为 1 mL/min 时,该流速对各时间点的细胞存活和 IL－8 分泌水平均无显著影响($P>0.05$);当流速为 5,10 mL/min 时,流速以流速－时间－依赖性的方式降低细胞存活率、促进 IL－8 分泌($P<0.05$);与实时检测组相比,孵育培养 24h 后检测组在相同时间和流速下,细胞存活率和 IL－8 分泌水平变化趋势一致。**结论**　在该系统内,流速的增加形成较高且复杂的机械力,且随着作用巨噬细胞机械力的不断增加引起不可自主恢复的细胞毒性和炎症反应升高。

**关键词:**流速;机械力;巨噬细胞;细胞毒性;IL－8
**中图分类号:**R114　**文献标志码:**A　**文章编号:**1006-2483(2019)05-0015-05　DOI:10.3969/j.issn.1006－2483.2019.05.004

# Effects of in vitro mechanical force on cell cytotoxicity and IL－8 secretion level of human lung macrophages

HUA Chenfeng, SHANG Pingping, ZHAO Junwei, LI Xiang, XIE Fuwei
*Zhengzhou Tobacco Research Institute of China National Tobacco Corporation, Zhengzhou*　450001, *China*
*Corresponding author: XIE Fuwei, Email: xiefuwei@sina.com*

**Abstract: Objective**　Using an external drive-buffer-circulation system to generate a certain liquid flow rate creating mechanical forces to simulate the mechanical force environment in which macrophages are exposed in vivo, and to evaluate the effects of different circulating flow rates on the cell cytotoxicity and interleukin－8 secretion of macrophages. **Methods**　The loading buffer was added to the same position in the buffer culture chamber, and the distribution of loading buffer at different flow rates was observed and photographed to compare the mechanical forces at different flow rates. The human lung macrophage cell line was used as the research object and was inoculated into the buffer culture chamber. The suspended macrophages in the system were exposed to different circulating flow rates, and the cell viability and IL－8 secretion at different time points within 3 h under different circulating flow rates were detected by CCK－8 method and ELISA (in real time or after 24 h incubation), respectively. **Results**　As the flow rate increased, the loading buffer distribution area moved up, expanded, and was subject to increasing and complex mechanical forces. When the circulation flow rate was 1mL·min$^{-1}$, the flow rate had no significant effect on cell viability and IL－8 secretion levels at each time point. When the circulating flow rate reached to 5 or 10 mL·min$^{-1}$, the cell viability was reduced while the IL－8 secretion was increased in a flow-time-dependent manner. After 24 hours of culture, the test group had lower cell viability and increased IL－8 secretion level at the same time and flow rate when compared with the real-time test group. **Conclusion**　In this system, a high and complex mechanical force was generated as the circulating flow rate increased. The macrophage survival rate was decreased and the inflammatory response was elevated as the mechanical force of the macrophages increased.

**Keywords:** Circulating flow rate; Mechanical force; Macrophage; Cell survival; IL－8

**基金项目:**中国烟草总公司郑州烟草研究院院长科技发展基金项目(322017CA0140);中国烟草总公司项目:"本草香"作用机理的系统生物学研究(110201401025<JH－03>)

**第一作者简介:**华辰凤,硕士,工程师,主要研究方向:烟草制品风险评估
**通信作者:**谢复炜,博士,研究员,Email:xiefuwei@sina.com

呼吸机产生的机械通气不仅是挽救呼吸衰竭的干预措施，也是 COPD 患者死亡的独立危险因素[1-4]。研究表明，导致这一结果的主要原因是创伤性机械通气产生的潮气量通过形成一定的机械力激活肺泡中巨噬细胞等炎症细胞引起肺部炎症并加重先前存在的肺部炎症[5-6]。为改善有创机械通气的人机对抗，目前主要采用临床实验[7]和动物实验[8]观察并研究机械通气诱发炎症机制，这两种方法具有真实、直观、可靠等优点，但也存在成本大、时间长、争议大等问题。随着体外模拟体内所受机械力在内皮细胞细胞骨架重组[9]、骨重塑[10]、巨核细胞成熟[11]等领域的研究应用，在传统体外静息培养的基础上[12-13]利用驱动 – 缓冲培养 – 循环系统产生一定的液体流速以形成机械力，用以模拟巨噬细胞在体内暴露的一定的机械力环境，并评估不同循环流速产生的不同机械力对巨噬细胞的细胞毒性及 IL – 8 分泌水平的影响，为体外模拟并研究巨噬细胞受到的机械力提供一定的数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1** 细胞、试剂和仪器 人肺巨噬细胞（human lung macrophage cell）由郑州大学基础医学院馈赠；DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素混合液（100X）（美国 Gbico 公司），5X SDS – PAGE Sample Loading Buffer（碧云天生物技术），细胞毒性检测试剂盒（cell counting kit – 8，CCK – 8）（日本同仁化学研究所），人 CXCL8/IL – 8 Quantikine ELISA 试剂盒（美国 R&D 公司）；HERA Cell 240 $CO_2$ 细胞培养箱、SW – CJ – 2FD 超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）、HFU486 超低温冰箱（德国 Thermo 公司）、Sigma 3 – 18K 低温高速离心机（德国 Sigma 公司）、SPECTRA MAX 190 酶标仪（日本 Bio – Rad 公司）、TH 4 – 200 荧光倒置显微镜（日本 Olympus 公司）、Milli – Q 超纯水纯化系统（美国 Millipore 公司）、细胞计数板（德国 Marienfeld 公司）；25$cm^2$ 培养瓶（美国 Corning Costar 公司），缓冲培养室、循环驱动系统、维护系统、计算机监控系统（北京慧荣和科技有限公司）。

### 1.2 实验方法

**1.2.1** 细胞培养 人肺巨噬细胞。将细胞在含有 10%（v/v）胎牛血清、100U/mL 青霉素、100μg /mL 链霉素的 DMEM 培养基的 25 $cm^2$ 培养瓶中培养，并将培养瓶置于 37℃、5% $CO_2$（v/v）饱和湿度培养箱中，取生长良好、处于对数期的细胞用于后续试验。

**1.2.2** 驱动 – 缓冲培养 – 循环系统 设计并组装驱动 – 缓冲培养 – 循环系统（图 1），该系统由四部分组成：（i）缓冲培养室（1），（ii）驱动循环装置（2 和 3），（iii）维护系统（4、5 和 6）和（iv）计算机监控系统（用于监控系统中缓冲培养室的温度、空气湿度和 $CO_2$ 浓度，并控制循环管路中的液体流速）。

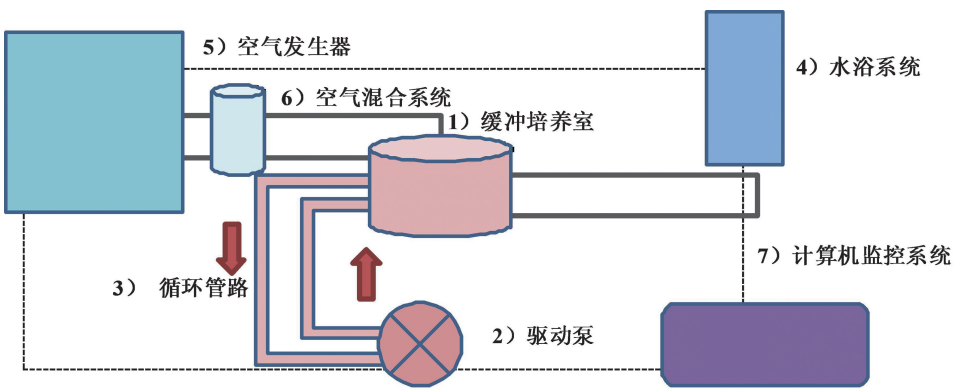


**图 1** 驱动 – 缓冲培养 – 循环系统示意图

**Figure 1** Schematic diagram of the drive-buffer culture-circulation system

**1.2.3** 观察不同循环流速下缓冲仓 Loading buffer 所受机械力 在驱动 – 缓冲培养 – 循环系统的缓冲培养室加入 30 mL PBS 缓冲液，于缓冲室喇叭口上方相同位置加入 10μL Loading buffer，分别暴露于 4 种液体流速（0、1、5、10 mL/min）0.5 h，于 0、5、10、20、30 min 时观察缓冲仓内 Loading buffer 分布情况并拍照记录，以比较不同流速下缓冲仓内 Loading buffer 所受机械应力情况。

**1.2.4** 巨噬细胞暴露于驱动 – 缓冲培养 – 循环系统的循环流速 在驱动 – 缓冲培养 – 循环系统中加入混匀的细胞悬液（细胞密度为 $5 \times 10^4$/mL；缓冲培养室 35 mL，循环管路 5mL），并暴露于 4 种不同的液体流速（0、1、5、10 mL/min）3h，在 4 种循环流速作用方式下的 0、0.5、1、2 和 3h 的时间点处，吹打混匀后移取系统中 0.2mL 细胞悬液用于实时检测细胞存活率，移取 0.6mL 细胞悬液用于实时检测 IL – 8 表达水