

杨晓,陈冲. 小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 16-22.

Yang X, Chen C. Comparison of immune responses induced by poly(I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 16-22.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.11.003

## 小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较

杨 晓<sup>1\*</sup>, 陈 冲<sup>2</sup>

(1.西安交通大学第二附属医院科研中心实验室,西安 710004; 2.天津医科大学肿瘤医院检验科,天津 300060)

**【摘要】** 目的 探讨小鼠腹腔巨噬细胞亚群在病毒侵染早期免疫应答功能的差异与相关机制。方法 流式细胞术分选获得小鼠腹腔 F4/80<sup>hi</sup>亚群和 F4/80<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞, Poly I:C 免疫刺激8 h 后采用实时定量 PCR 方法比较两群细胞促炎因子与相关转录因子基因表达的变化, 进一步采用 Western blot 方法检测信号通路的变化, 最后使用通路抑制剂实施阻断实验。结果 小鼠腹腔 F4/80<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞数量显著性高于 F4/80<sup>lo</sup>亚群 ( $P < 0.05$ ); Poly I:C 作用后, F4/80<sup>hi</sup>亚群促炎因子 IL6、iNOS、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$  基因的表达变化倍数显著性高于 F4/80<sup>lo</sup>亚群 ( $P < 0.05$ ), 转录因子 IRF3、IRF7 基因表达均显著性升高 ( $P < 0.05$ ); 同时 F4/80<sup>hi</sup>亚群 JNK 通路磷酸化水平显著上升 ( $P < 0.05$ ); 采用 JNK 信号通路磷酸化抑制剂 SP600125 阻断后, 促炎因子 IL6 与 IFN $\alpha$  基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ )。结论 F4/80<sup>hi</sup>巨噬细胞亚群在病毒感染早期活化程度显著性高于 F4/80<sup>lo</sup>亚群, 可能通过上调 IRF7 分子表达和 JNK 通路的活化水平参与巨噬细胞活化的调控。

**【关键词】** 巨噬细胞亚群; 病毒早期感染; 免疫应答; JNK 信号通路

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 11-0016-07

### Comparison of immune responses induced by poly(I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets

YANG Xiao<sup>1\*</sup>, CHEN Chong<sup>2</sup>

(1. Core Research Laboratory, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China.  
2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060)

**【Abstract】** **Objective** To explore the function and mechanism of macrophage subsets in early immune responses to viral infection. **Methods** Fluorescence-assisted cell sorting was performed to acquire F4/80<sup>hi</sup> and F4/80<sup>lo</sup> subsets of mouse peritoneal macrophages, which were stimulated with poly(I:C) for 8 h. qRT-PCR was performed to compare gene expression levels of pro-inflammatory factors and transcription factors. Furthermore, Western blot was performed to identify the potential activated signaling pathway. Finally, an inhibitor block experiment was conducted. **Results** The percentage of F4/80<sup>hi</sup> macrophages was significantly higher than the F4/80<sup>lo</sup> subset ( $P < 0.05$ ). After stimulation with poly(I:C), gene expression of pro-inflammatory factors interleukin 6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase iNOS, interferon alpha (IFN $\alpha$ ), and IFN $\gamma$  was significantly higher in the F4/80<sup>hi</sup> subset compared with the F4/80<sup>lo</sup> subset ( $P < 0.05$ ), and

**【基金项目】**国家自然科学基金(81802862);陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-546);西安交通大学第二附属医院科研基金(YJ(QN)201716)。

**【作者简介】**杨晓(1989—),男,助理研究员,博士,研究方向:肿瘤免疫。E-mail: yang\_x@xjtu.edu.cn

expression of transcription factors IRF3 and IRF7 was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Moreover, phosphorylation of the JNK pathway in the F4/80<sup>hi</sup> subset was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Upregulated expression of IL-6 and IFN $\alpha$  were significantly attenuated by SP600125 ( $P < 0.05$ ), a phosphorylation inhibitor of the JNK signaling pathway. **Conclusions** The F4/80<sup>hi</sup> subset was more activated than the F4/80<sup>lo</sup> subset during the early stage of viral infection, and may be modulated by IRF7 upregulation and JNK pathway activation.

**【Keywords】** macrophage subsets; early stage of virus infection; immune response; JNK pathway

巨噬细胞是免疫系统中的重要组分,对机体稳态维持、病原清除起着至关重要的作用。巨噬细胞具有较强的可塑性,按其功能表型、驻留器官、来源发育等,可分为不同的细胞亚群。根据其释放促炎/抑炎细胞因子或趋化因子的功能行为,可分为经典活化(classically activated)的 M1 型巨噬细胞亚群和选择性活化(alternatively activated)的 M2 型巨噬细胞亚群<sup>[1-3]</sup>。根据其各类驻留器官划分,可分为库佛细胞(肝组织)、朗格汉斯细胞(皮肤组织)、肺泡巨噬细胞(肺组织)、破骨细胞(骨组织)、小胶质细胞(脑组织)等巨噬细胞亚群<sup>[4-5]</sup>。根据来源,可将其分为胎肝造血干细胞来源、胚胎造血干细胞来源和成体骨髓造血干细胞来源的巨噬细胞亚群<sup>[6]</sup>。有研究报道表明,腹腔巨噬细胞具有一定的溯源异质性,其 F4/80<sup>hi</sup>巨噬细胞亚群来源于肝造血干细胞,在稳态环境下依赖于自我增殖维持细胞群体数量的恒定;F4/80<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群由骨髓造血干细胞来源的单核细胞发育而来,在机体遭受细菌感染或病毒侵扰的 24~72 h,被大量募集并向 F4/80<sup>hi</sup>巨噬细胞亚群定向分化<sup>[7]</sup>。然而在病毒侵染早期,腹腔巨噬细胞 F4/80<sup>hi</sup>亚群和 F4/80<sup>lo</sup>亚群是否具有免疫应答功能的异质性,仍未获曾阐明。

聚肌胞(Poly I:C)是一种天然双链 RNA(dsRNA)的类似物,能够有效模拟病毒感染后所形成的 dsRNA,刺激机体产生抗病毒免疫反应和炎症反应<sup>[8]</sup>。已有报道表明,Poly I:C 可与成熟巨噬细胞表面 Toll 受体 3(TLR3)受体结合,通过活化下游髓样分化因子 88(MyD88)蛋白或  $\beta$  干扰素 TLR 结构域衔接蛋白(TRIF)两种方式,诱导 I 型干扰素(IFN)产生,进而触发炎症反应<sup>[9]</sup>。然而,目前对于异质性巨噬细胞抗病毒功能与机制的研究仍较少。因此,进一步深入研究巨噬细胞亚群感染早期病毒免疫应答作用与机制,对理解机体免疫系统早期病毒识别与应答调控具有重要意义。本实验通过研究 Poly I:C 免疫刺激对小鼠腹腔 F4/80<sup>hi</sup>和 F4/80<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群各类促炎因子和转录因子基因表达水平的影响,并进一步探究信号通路相关机制,以

期为病毒感染的免疫应答调控研究提供理论依据和新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C67BL/6J 雄性小鼠,6~8 周龄,20 只,体重 20~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],于西安交通大学医学部动物实验中心[SYXK(陕)2015-0002]SPF 级环境繁育饲养。温度 20℃~25℃,相对湿度 40%~70%,每天 12 h 昼夜明暗交替。本研究所有动物实验依据优化、减少、替代的 3R 原则进行实验设计,并经过西安交通大学动物实验伦理委员会批准(XJTULAC2018-2225)。

### 1.2 主要试剂与仪器

小鼠 CD11b、F4/80 流式抗体(1:200, Biolegend, 美国); RPMI-1640 培养基、胎牛血清(Gibco, 美国); Poly I:C(Sigma, 美国); RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen, 美国); cDNA 合成试剂盒(Thermo, 美国); SYBR Green 荧光定量盒(TaKaRa, 日本); BCA 蛋白浓度定量试剂盒(Thermo, 美国); JNK 抗体(1:500, CST, 美国); P-JNK 抗体(1:500, CST, 美国); GAPDH 抗体(1:500, CST, 美国); 羊抗兔 HRP 二抗(1:3000, 北京中杉金桥生物技术有限公司); JNK 磷酸化抑制剂 SP600125(MedChemExpress, 美国); 引物序列合成(北京六合华大基因科技股份有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 流式分析和分选小鼠腹腔巨噬细胞

选取 6~8 周龄 C67BL/6J 小鼠,脱颈处死,使用预冷的 PBS 缓冲液反复冲洗腹腔,离心后重悬,置于冰上裂解红细胞 10 min。离心后重悬行细胞计数,取  $5 \times 10^6$  细胞,同时加入 5  $\mu$ L 的 CD11b-PE-Cy7 和 F4/80-APC 抗体,避光冰上孵育 30 min 后,离心去上清。将细胞加入 1 mL 流式缓冲液重悬,过 200 目无菌滤网后上机进行流式细胞分选和分析,所用流式细胞仪为 ARIA II(BD, 美国),具体步骤参

见文献<sup>[10]</sup>。共分选 20 只小鼠腹腔巨噬细胞,获得的小鼠 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>hi</sup>巨噬细胞亚群和 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>lo</sup>巨噬细胞亚群,一部分(8 只小鼠样本)用于荧光定量 PCR 检测促炎因子和转录因子 mRNA 表达的检测,一部分(6 只小鼠样本)用于 JNK 通路拮抗实验,另一部分(6 只小鼠样本)用于 Western blot 检测信号通路磷酸化水平的检测,所有实验均至少开展三次独立重复实验。

### 1.3.2 Poly I:C 免疫刺激和 JNK 信号通路拮抗实验

将 Poly I:C 干粉溶于 PBS 中,调整为终浓度 2 mg/mL 的储液,冻存于 -80℃ 冰箱备用。本实验共设计两个 Poly I:C 浓度组,分别为对照组 (0 μg/mL),实验组 (50 μg/mL),将作用后的 F4/80<sup>hi</sup>亚群和 F4/80<sup>lo</sup>亚群置于 5% CO<sub>2</sub> 浓度和 37℃ 温度下培养 8 h。将 JNK 通路磷酸化抑制剂 SP600125 干粉溶于 DMSO 中,调整为终浓度 10 mmol/L 的储液,低温冻存备用。在实验组加入 Poly I:C 刺激的同时,设置加入 SP600125 (10 μmol/L) 处理组和同体积 DMSO 对照组 (每组 3 个样本,每个样本为分选的 6 只小鼠细胞两两合并),同上述条件培养 8 h。

### 1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测

收集处理后的巨噬细胞亚群提取总 RNA,采用 Nanodrop 微量分光光度计 (Thermo, 美国) 测定提取 RNA 含量与质量 (1.8 < OD 值 < 2.0), 取 1 μg 左右的 RNA, 利用 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。本研究采用 SYBRgreen 法对目的基因 mRNA 的表达水平进行检测,按照厂商说明书将反应体系设置为 20 μL,扩增程序设置为:95℃ 预变性

5 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 复性及延伸 1 min, 40 个循环; 每个样品均设置 3 个技术重复。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 相对定量法进行目的基因相对表达量分析,加入无 Poly I:C 普通培养基的 F4/80<sup>hi</sup> 亚群设置为对照组 (RQ=1)。共收集 8 只小鼠腹腔巨噬细胞样本,由于 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>lo</sup> 亚群占总细胞比例较低,为保证其细胞量不低于 5×10<sup>5</sup>,将收集的样本两两合并,分别进行了 4 次独立重复实验。本研究所涉及的引物信息详见表 1。

### 1.3.4 Western blot

提取处理后的巨噬细胞亚群蛋白,BCA 定量法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,半干转法电转至 PVDF 膜,10% BSA 封闭液室温封闭 1 h,加入比例稀释后的 JNK、p-JNK、GAPDH 抗体工作液,置于往复式摇床 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h。电化学发光显影,用 Image J 软件测定条带的灰度值,以磷酸化 JNK 灰度值与 JNK 总蛋白灰度值的比值作为蛋白的相对表达量。共收集 6 只小鼠腹腔巨噬细胞样本,由于 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>lo</sup> 亚群占总细胞比例较低,为保证其细胞量不低于 5×10<sup>5</sup>,将收集的样本两两合并,分别进行了 3 次独立重复实验。在结果部分对其中一次代表性实验结果进行阐述。

### 1.4 统计学方法

采用 FlowJo 软件对流式数据进行分析,使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析,实验数据采用平均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用 Levene 法行方差齐性检验,组间比较采用非配对 *t* 检验或 Mann-Whitney 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息  
Table 1 Primers for qRT-PCR detection

基因名称 Gene	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	基因库序列号 Gene bank ID
白介素-6 IL6	Forward: CCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC Reverse: ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCC	NM_031168
诱导型一氧化氮合酶 NOS2	Forward: CAGCGGAGTGACGGCAAAC Reverse: AGACCAGAGGCAGCACATCAA	NM_010927.4
α 型干扰素 IFNα	Forward: GCCATCCCTGTCTGAGTGA Reverse: GCTGCTGGTGGAGGTCATTG	NM_010502.2
γ 型干扰素 IFNγ	Forward: CGAAGCAGCAGAACAGGAAGAAC Reverse: TGATAGCGGTGAGGCTACAAG	NM_010511.3
干扰素调节因子 3 IRF3	Forward: CACGCTACACTCTGTGGTTCTG Reverse: GGAGATAGGCTGGCTGTTGGA	NM_016849.4
干扰素调节因子 7 IRF7	Forward: GTCACCAGACTAGCCATCTACCT Reverse: TAGACAAGCACAAGCCGAGACT	NM_016850.3
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	Forward: TGAAGGTCGGTGTGAACGGATT Reverse: CTCGCTCTGGAAGATGGTGAT	NM_008084.3

2 结果

2.1 腹腔 F4/80<sup>hi</sup> 亚群和 F4/80<sup>lo</sup> 亚群相对数量的比较

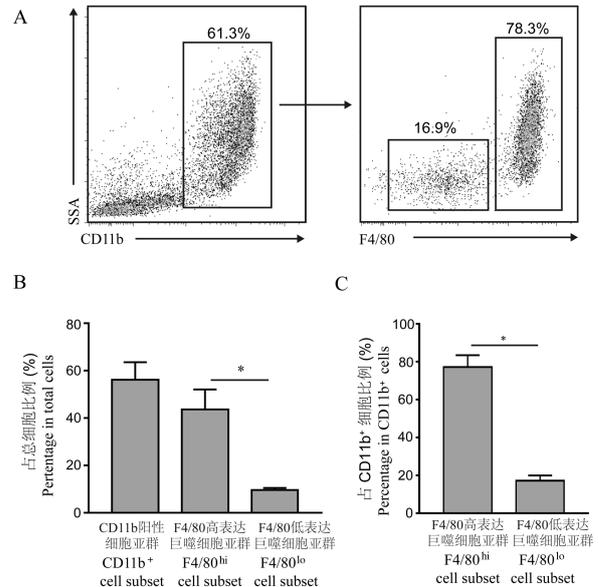
经 PBS 缓冲液灌注冲洗, 收集小鼠腹腔细胞。随后行 CD11b-PE-Cy7 和 F4/80-APC 抗体染色标记, 通过流式分选, 获得 F4/80<sup>hi</sup> 亚群和 F4/80<sup>lo</sup> 亚群细胞。其中 CD11b<sup>+</sup> 细胞占总细胞比例为 (56.23 ± 3.71)%; CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群占总细胞比例为 (43.67 ± 4.20)%, 占 CD11b<sup>+</sup> 细胞比例为 (77.23 ± 3.16)%; CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群分别为 (9.58 ± 0.48)% 和 (17.23 ± 1.39)%。F4/80<sup>hi</sup> 亚群和 F4/80<sup>lo</sup> 亚群数量比较, P < 0.05, 具体结果见图 1。

2.2 Poly I:C 免疫刺激下巨噬细胞亚群促炎因子和转录因子表达变化趋势

利用上述引物 (见表 1), 对 Poly I:C 作用后巨噬细胞促炎因子 IL6、iNOS、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$  和信号通路相关转录因子 IRF3、IRF7 信使 RNA 的表达水平, 进行荧光定量 PCR 检测。加入无 Poly I:C 普通培养基的 F4/80<sup>hi</sup> 亚群设置为对照组 (RQ = 1), 统计两个亚群巨噬细胞在 Poly I:C 刺激前、后促炎因子和转录因子相对表达量 (表 2), 并计算两个亚群巨噬细胞在 Poly I:C 刺激后促炎因子和信号通路相关转录因子表达倍数的变化, 具体结果见表 3。

巨噬细胞经典 M1 型极化指标 IL6 和 iNOS, 相较于对照组, F4/80<sup>hi</sup> 亚群 IL6、iNOS 表达增高 (2.61 ± 0.32) 倍和 (2.05 ± 0.36) 倍, F4/80<sup>lo</sup> 亚群为 (1.32 ± 0.10) 倍和 (1.02 ± 0.12) 倍; 同时 F4/80<sup>hi</sup> 亚群对 Poly I:C 刺激的效应因子 IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$  表达增加 (3.90 ± 0.54) 倍和 (2.29 ± 0.29) 倍, F4/80<sup>lo</sup> 亚群为 (1.37 ± 0.10) 倍和 (1.22 ± 0.10) 倍。在病毒感染过程中, 巨噬细胞通过胞膜模式受体识别病原, 经胞

内信号转导上调核内 IRF3 和 IRF7 转录, 从而激活干扰素刺激反应原件 (interferon stimulated response element, IRSE) 的活性以发挥抗病毒和病原清除效应<sup>[11]</sup>。相较于对照组, F4/80<sup>hi</sup> 亚群表达 IRF3、IRF7 表达增高 (2.66 ± 0.15) 倍和 (3.01 ± 0.17) 倍, F4/80<sup>lo</sup> 亚群为 (1.21 ± 0.11) 倍和 (1.16 ± 0.07) 倍。综



注: A: 流式细胞术分选 F4/80<sup>hi</sup> 亚群和 F4/80<sup>lo</sup> 亚群划门策略; B: 目的细胞占总细胞数百分比 (左) 或占 CD11b<sup>+</sup> 细胞数百分比 (右)。F4/80 高表达亚群与 F4/80 低表达亚群比较, \*P < 0.05。

图 1 F4/80<sup>hi</sup> 亚群和 F4/80<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞相对数量  
Note. A, Gating Strategy for sorting F4/80<sup>hi</sup> subset and F4/80<sup>lo</sup> subset by Flow cytometre. B, Percentage of target cells in total cells (left panel) or in CD11b<sup>+</sup> cells (right panel). F4/80<sup>hi</sup> subset Compared with F4/80<sup>lo</sup> subset, \*P < 0.05.

Figure 1 The percentage of F4/80<sup>hi</sup> subset and F4/80<sup>lo</sup> subset in total cells or CD11b<sup>+</sup> cells

表 2 Poly I:C 免疫刺激 8 h 后巨噬细胞促炎因子和相关转录因子基因的相对表达量

Table 2 Relative expression value of pro-inflammatory factors and related transcription factor in macrophages with/without 8 h of Poly I:C stimulation

基因名称 Genes	F4/80 <sup>lo</sup> 亚群相关基因的 相对表达量 RQ value of F4/80 <sup>lo</sup> M $\phi$		F4/80 <sup>hi</sup> 亚群相关基因的 相对表达量 RQ value of F4/80 <sup>hi</sup> M $\phi$	
	Poly I:C (-)	Poly I:C (+)	Poly I:C (-)	Poly I:C (+)
白介素-6 IL6	0.39 ± 0.04	0.51 ± 0.04	1.00 ± 0.02	2.62 ± 0.32
诱导型一氧化氮合酶 NOS2	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.07	1.00 ± 0.04	2.05 ± 0.36
$\alpha$ 型干扰素 IFN $\alpha$	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.01	1.00 ± 0.03	3.90 ± 0.54
$\gamma$ 型干扰素 IFN $\gamma$	1.25 ± 0.17	1.53 ± 0.18	1.01 ± 0.07	2.29 ± 0.29
干扰素调节因子 3 IRF3	1.59 ± 0.10	1.91 ± 0.17	1.00 ± 0.05	2.66 ± 0.15
干扰素调节因子 7 IRF7	0.39 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.91 ± 0.06	3.01 ± 0.17

注: 未刺激的 F4/80<sup>hi</sup> 亚群各基因相对表达量设为对照 (RQ = 1)。

Note. Set RQ value of F4/80<sup>hi</sup> subset without stimulation as control.

上, F4/80<sup>lo</sup>亚群相关因子增高倍数均未能大于 1.4 倍, 提示该亚群对 Poly I:C 刺激不敏感; 而 F4/80<sup>hi</sup>亚群相关炎症因子和转录因子指标增高倍数均显著高于 F4/80<sup>lo</sup>亚群,  $P < 0.05$ 。

### 2.3 Poly I:C 免疫刺激下 F4/80<sup>hi</sup>亚群和 F4/80<sup>lo</sup>亚群信号通路的变化

前期研究发现, Poly I:C 可诱导巨噬细胞 IRF7 表达上调, 通过激活 JNK 信号通路以促进 M1 型极化反应<sup>[12]</sup>。Poly I:C 作用 F4/80<sup>hi</sup>亚群后, 其 JNK 通路磷酸化水平(相对表达量为 1.19)相较于对照组(相对表达量 0.29), 呈升高趋势。Poly I:C 作用 F4/80<sup>lo</sup>亚群后, JNK 通路磷酸化水平(相对表达量为 0.064)相较于对照组磷酸化水平(相对表达量 0.075), 无明显变化趋势, 具体结果见图 2。

### 2.4 阻断 JNK 通路活化对 Poly I:C 作用后 F4/80<sup>hi</sup>亚群和 F4/80<sup>lo</sup>亚群促炎因子表达的影响

为进一步研究 JNK 信号通路在腹腔异质性巨

噬细胞亚群应答 Poly I:C 过程中的作用机制, 在 Poly I:C 作用的同时, 加入 JNK 通路磷酸化抑制剂 SP600125, 以观察阻断 JNK 通路磷酸化对 F4/80<sup>hi</sup>亚群和 F4/80<sup>lo</sup>亚群促炎因子 IL6 和 IFN $\alpha$  表达的影响。以无 Poly I:C 和 SP600125 普通培养基的 F4/80<sup>hi</sup>亚群为基线(RQ=1)。结果表明, 未加入 Poly I:C 刺激, F4/80<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞, IL6 相对表达量为  $1.00 \pm 0.02$ , IFN $\alpha$  相对表达量为  $1.00 \pm 0.03$ ; Poly I:C 刺激后的 F4/80<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞, IL6 相对表达量( $2.64 \pm 0.05$ )和 IFN $\alpha$  相对表达量( $3.93 \pm 0.18$ )均显著上调,  $P < 0.05$ ; 加入 SP600125 作用后, F4/80<sup>hi</sup>亚群巨噬细胞 IL6 相对表达量( $1.25 \pm 0.05$ )和 IFN $\alpha$  相对表达量( $0.93 \pm 0.13$ )均显著下调,  $P < 0.05$ 。未加入 Poly I:C 刺激, F4/80<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞, IL6 相对表达量为( $0.32 \pm 0.02$ ), IFN $\alpha$  相对表达量为( $0.22 \pm 0.02$ ); Poly I:C 刺激后的 F4/80<sup>lo</sup>亚群巨噬细胞, IL6 表达( $0.37 \pm 0.01$ )和 IFN $\alpha$  表达

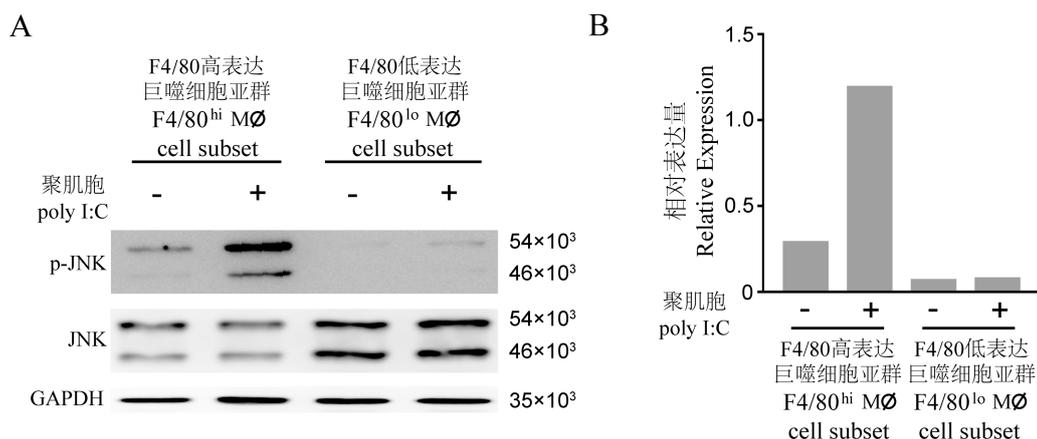
表 3 Poly I:C 免疫刺激 8 h 后巨噬细胞促炎因子和相关转录因子基因表达倍数的变化

Table 3 Fold changes of pro-inflammatory factors and related transcription factor in macrophages after 8 h of Poly I:C stimulation

基因名称 Genes	F4/80 <sup>lo</sup> 亚群基因表达变化倍数		F4/80 <sup>hi</sup> 亚群基因表达变化倍数	
	F4/80 <sup>lo</sup> M $\phi$ fold change		F4/80 <sup>hi</sup> M $\phi$ fold change	
白介素-6 IL6	1.32	$\pm 0.10$	2.61	$\pm 0.30^*$
诱导型一氧化氮合酶 NOS2	1.02	$\pm 0.12$	2.05	$\pm 0.36^*$
$\alpha$ 型干扰素 IFN $\alpha$	1.37	$\pm 0.10$	3.90	$\pm 0.54^*$
$\gamma$ 型干扰素 IFN $\gamma$	1.22	$\pm 0.10$	2.29	$\pm 0.29^*$
干扰素调节因子 3 IRF3	1.21	$\pm 0.11$	2.66	$\pm 0.15^*$
干扰素调节因子 7 IRF7	1.16	$\pm 0.07$	3.01	$\pm 0.17^*$

注: F4/80<sup>hi</sup>亚群相关基因表达倍数与 F4/80<sup>lo</sup>亚群相关基因表达倍数变化比较。F4/80 高表达亚群 Poly I:C 刺激前与刺激后比较,  $*P < 0.05$ 。

Note. Fold changes of F4/80<sup>hi</sup> subset compared with F4/80<sup>lo</sup> subset. F4/80<sup>hi</sup> subset Poly I:C stimulation compared with before Poly I:C stimulation,  $*P < 0.05$ 。



注: A: Western blot 检测 JNK 信号通路磷酸化与表达水平代表图, 采用 GAPDH 作为内参; B: Image J 软件对目的条带灰度值量化统计分析。

图 2 JNK 信号通路磷酸水平差异的检测

Note. A, Phosphorylation and expression level of JNK signal pathway was detected by Western blot, GAPDH was loaded as internal reference. B, Intensities of the Western blot bands were quantitated by ImageJ software.

Figure 2 Phosphorylation level of JNK signal pathway

( $0.17 \pm 0.02$ ), 与未加入 Poly I:C 的 F4/80<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞组相比均无显著差异; 加入 SP600125 作用后, F4/80<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞 IL6 相对表达量 ( $0.34 \pm 0.02$ ) 和 IFN $\alpha$  相对表达量 ( $0.11 \pm 0.01$ ), 与加入 Poly I:C 但未加入 SP600125 的 F4/80<sup>lo</sup> 亚群巨噬细胞组相比均无显著差异, 具体结果见图 3。

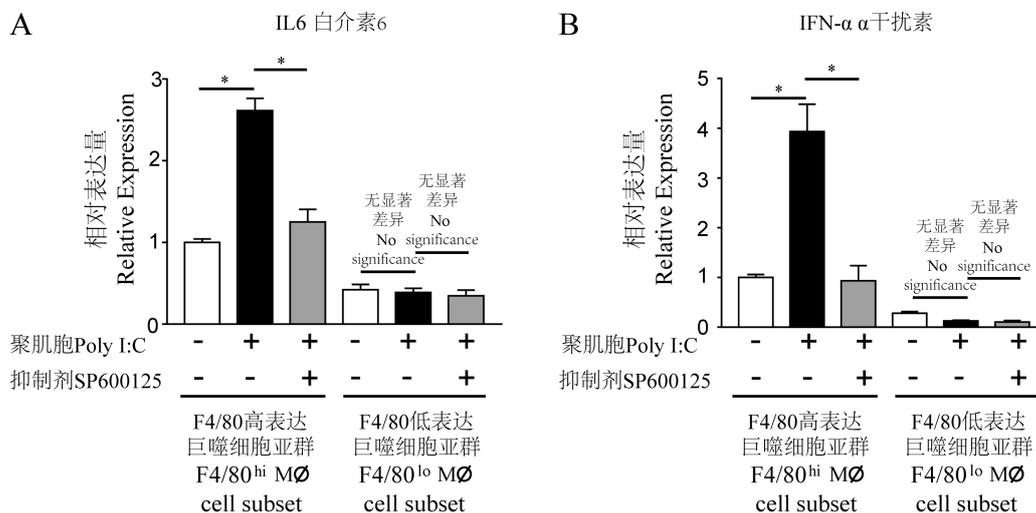
### 3 讨论

流行性感病毒(流感病毒)其感染的严重程度, 和病毒引起的以过度炎症反应为特征的细胞因子风暴呈正相关<sup>[13]</sup>。部分宿主在感染 H1N1 流感病毒后, 免疫细胞过度激活进而释放大量促炎细胞因子, 引发细胞因子风暴, 可发展为急性肺损伤, 甚至可进展为急性呼吸窘迫综合征, 导致呼吸衰竭与多器官损伤<sup>[14]</sup>。本研究通过研究异质性巨噬细胞亚群对早期病毒感染差异化应答及相关机制, 发现在 Poly I:C 诱导的病毒感染模型中, F4/80<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群在病毒感染早期活化程度显著性高于 F4/80<sup>lo</sup> 亚群。F4/80<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群释放大量的促炎细胞因子 IL6, IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ , 同时转录因子 IRF3 和 IRF7 显著上调, 通过活化 JNK 信号通路推进其促炎表型的形成, 而抑制 JNK 通路磷酸化可显著抑制 F4/80<sup>hi</sup> 亚群致敏性。该结果进一步提示我们, 定向干预 F4/80<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群过度激活, 可能对抑制或延缓

细胞因子风暴的发生起着积极重要作用。

固有免疫系统是机体抵抗病毒侵染的第一道防线, 同时也是适应性免疫发展的基础。近年来, 固有免疫中树突状细胞(DC)和巨噬细胞在抗病毒中的作用备受关注。髓系 DC(mDC)可以主动摄取乙肝病毒抗原肽, 通过 MHCI 类分子途径提呈抗原肽至 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 进而引发 Th1 型免疫反应<sup>[15]</sup>。而在巨细胞病毒感染中, 浆细胞样 DC(pDC)可通过分泌干扰素诱导 Th2 型免疫反应<sup>[16]</sup>。有报道表明, M1 型巨噬细胞过度活化可导致急性流感病毒感染患者细胞因子风暴的产生, 在感染早期介入抑制 M1 型巨噬细胞的过度激活, 可以有效改善预后<sup>[17]</sup>。在本研究中我们发现, F4/80<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群在早期病毒感染中促炎因子 IL6、iNOS、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$  表达上调。已有报道表明<sup>[18]</sup>, F4/80<sup>hi</sup> 巨噬细胞亚群成熟度和吞噬能力高于 F4/80<sup>lo</sup> 亚群。提示我们在病毒感染早期, 可以通过氯磷酸盐脂质体类药物清除过度活化的 F4/80<sup>hi</sup> 亚群, 以降低细胞因子风暴产生风险。然而随着病毒感染进程的推进, F4/80<sup>lo</sup> 巨噬细胞亚群可能定向发育为 F4/80<sup>hi</sup> 亚群, 此时采用氯磷酸盐脂质体清除巨噬细胞后是否能够抑制过度激活、能够真正利于机体病毒清除还有待进一步研究。

前期研究发现, 功能异质性巨噬细胞亚群和组织特异性巨噬细胞亚群在白血病微环境中起着迥



注: A: 促炎因子 IL-6 基因表达的变化; B: 促炎因子 IFN $\alpha$  基因表达的变化。F4/80 高表达亚群 Poly I:C 刺激前与刺激后比较; F4/80 高表达亚群加入抑制剂与未加入抑制剂的比较, \* $P < 0.05$ 。

图 3 阻断 JNK 信号活化后促炎因子 IL-6 和 IFN $\alpha$  基因表达变化

Note. A, Relative expression of IL-6. B, IFN $\alpha$ . F4/80<sup>hi</sup> subset after Poly I:C stimulation compared with before Poly I:C stimulation, F4/80<sup>hi</sup> subset with SP600/25 stimulation compared with without SP600/25 stimulation, \* $P < 0.05$ .

Figure 3 Relative expression level of pro-inflammatory factors IL-6 and IFN $\alpha$  when phosphorylation of JNK signal pathway was attenuated

然相异的作用,其激活信号通路途径也不尽相同<sup>[19-21]</sup>。相较于脾巨噬细胞亚群,骨髓巨噬细胞亚群 IRF7 基因表达显著上调并活化 JNK 信号通路,诱导其促炎 M1 型表型与功能<sup>[12]</sup>。本研究发现, F4/80<sup>hi</sup>巨噬细胞亚群在病毒感染后 IRF7 基因高表达,且 JNK 磷酸化激活,提示我们 IRF7-JNK 通路可能在成熟巨噬细胞抗病毒早期免疫应答过程中起着重要作用。因此,采用 SP600125 等抑制 JNK 通路激活的化学类抑制剂,亦可作为阻断巨噬细胞过度激活的有效手段。

综上,研究异质性巨噬细胞在病毒感染免疫应答与活化中的作用与机制,进而探讨并开发新的免疫抑制剂与靶向小分子抑制剂,对防止或延缓病毒侵袭导致细胞因子风暴的发生具有重要意义,同时将为疾病的预防与治疗提供积极的帮助。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization; *In vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795.
- [ 2 ] Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [ 3 ] 王佳, 李丽, 黎冰林, 等. 抑制巨噬细胞 Act 1 表达对黑色素瘤肺转移的影响 [J]. *中国比较医学杂志*. 2019, 29(4): 1-6.
- [ 4 ] Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and tissue specialization [J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 643-675.
- [ 5 ] 仰明明, 牛婷, 刘擎, 等. MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(3): 14-20.
- [ 6 ] Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment [J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1312-1326.
- [ 7 ] Yona S, Kim K, Wolf Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis [J]. *Immunity*, 2013, 38(1): 79-91.
- [ 8 ] 陈瑶, 李云珠, 俞善昌, 等. Poly(I:C)模拟 RNA 病毒在气道炎症研究中的应用 [J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(8): 768-771.
- [ 9 ] 朱博, 冷静, 王坤. TLR 信号转导通路及其抗病毒感染机制的研究现状 [J]. *现代免疫学*, 2012, 32(4): 348-353.
- [ 10 ] 彭卓颖, 李想, 丛喆, 等. 流式细胞术分析 PMA 诱导 THP-1 分化为巨噬细胞的表型特征 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(10): 10-15, 22.
- [ 11 ] Siednienko J, Gajanayake T, Fitzgerald KA, et al. Absence of MyD88 results in enhanced TLR3-dependent phosphorylation of IRF3 and increased IFN-beta and RANTES production [J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 2514-2522.
- [ 12 ] Yang X, Feng W, Wang R, et al. Repolarizing heterogeneous leukemia-associated macrophages with more M1 characteristics eliminates their pro-leukemic effects [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 7(4): e1412910.
- [ 13 ] 张海祥, 谢鑫, 张科进, 等. 细胞因子风暴在流行性感病毒感冒病毒感染中的作用及防治研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(5): 556-559.
- [ 14 ] 王伟. 细胞因子风暴在流感病毒诱导的急性肺损伤中作用机制的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2015.
- [ 15 ] Lee YS, Yoon SJ, Kwon TK, et al. Immune response induced by immunization with Hepatitis B virus core DNA isolated from chronic active hepatitis patients [J]. *Immunol Lett*, 2001, 78(1): 13-20.
- [ 16 ] Munks MW, Pinto AK, Doom CM, et al. Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection [J]. *J Immunol*, 2007, 178(11): 7235-7241.
- [ 17 ] Cole SL, Dunning J, Kok WL, et al. M1-like monocytes are a major immunological determinant of severity in previously healthy adults with life-threatening influenza [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(7): e91868.
- [ 18 ] 陈冲, 冯文利, 王荣, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞的异质性观察 [J]. *山东医药*, 2016, 56(42): 40-42.
- [ 19 ] Yang X, Feng W, Wang R, et al. Hepatic leukemia-associated macrophages exhibit a pro-inflammatory phenotype in Notch1-induced acute T cell leukemia [J]. *Immunobiology*, 2018, 223(1): 73-80.
- [ 20 ] Chen S, Yang X, Feng W, et al. Characterization of peritoneal leukemia-associated macrophages in Notch1-induced mouse T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Mol Immunol*, 2017, 81: 35-41.
- [ 21 ] Chen SY, Yang X, Feng WL, et al. Organ-specific microenvironment modifies diverse functional and phenotypic characteristics of leukemia-associated macrophages in mouse T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Immunol*, 2015, 194(6): 2919-2929.

[ 收稿日期 ] 2020-04-01