

网络出版时间:2024-11-18 15:59:20 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1542.012

STING 通路的活化诱导巨噬细胞极化促进 T 细胞免疫应答

李健飞,段植,刘倩,宗启印,段婉露,刘付婷,张浩,周强,王琴

(安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨干扰素基因刺激因子(STING)通路的活化对巨噬细胞极化功能的影响,及其对 T 细胞应答的作用。**方法** 利用小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系,给予 STING 激动剂二聚氨基苯并咪唑(diABZI)刺激,Western blot 检测巨噬细胞 STING 通路相关蛋白表达,包括 TANK 结合激酶 1(TBK1)、干扰素调节因子 3(IRF3)、STING、p-TBK1、p-IRF3、p-STING;流式细胞术检测巨噬细胞极化表型;STING 通路活化后的巨噬细胞与 T 细胞共培养,流式分析 T 细胞表型及功能变化。**结果** diABZI 刺激巨噬细胞 3 h 后,STING 通路活化相关蛋白显著上调,刺激 12 h 后巨噬细胞表面 CD86 表达上调,CD86/CD206 比值升高,呈现 M1 极化表型。STING 通路活化诱导极化的巨噬细胞与 T 淋巴细胞共培养,CD8⁺T 细胞分泌细胞因子能力增强,并且 CD107a 表达上调;同时,CD4⁺T 细胞细胞因子分泌增强。**结论** STING 通路活化诱导巨噬细胞 M1 极化,促进 T 细胞功能增强,尤其是 CD8⁺T 细胞的免疫应答。

关键词 巨噬细胞;STING 通路;巨噬细胞极化;T 细胞免疫应答;CD4⁺T 细胞;CD8⁺T 细胞

中图分类号 R 392.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1974-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.012

巨噬细胞是机体免疫系统的重要环节,具有不同的极化表型。由脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)刺激产生的 M1 型巨噬细胞,表现出高水平的促炎效应,由白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)刺激产生的 M2 型巨噬细胞则表现出明显的抑炎效应^[1]。干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon gene, STING)是机体先天免疫系统的重要衔接分子,与干扰素相关基因的转录密切相关^[2]。已有研究^[3-4]报道,TLR4/NF- κ B 信号激活是 LPS 介导的 M1 型巨噬细胞极化的关键,提示参与炎症激活的 STING 通路可能也会影响巨噬细胞极化。同时,STING 通路通过影响巨噬细胞极化能否改变 T 细胞状态,沟通或上调适应性免疫反应尚未深入研究。因此,该研究通过探讨 STING 激动剂二聚氨基苯并咪唑(dimeric amidobenzimidazole, diABZI)激活 STING 通路能否诱导巨噬细胞极化,并进一步探索 STING 激动剂诱导极化后的巨噬细胞对 T 细胞功能应答产生的作用,以更好地揭示 STING 通路激活在免疫治疗中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及实验动物 RAW264.7 细胞系购自上海酶研生物科技有限公司。SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 5 只,6~8 周龄,体质量 15~20 g,购自河南斯克贝斯生物科技公司,饲养于安徽医科大学第二附属医院科研动物中心,每日给予 12 h 的光照/黑暗交替处理并设置充足的饮用水及饲料。动物实验伦理审批号:20190091。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:流式抗体包括 FITC anti-mouse CD86、PE anti-mouse CD11b、APC anti-mouse F4/80、PE-Cy7 anti-mouse CD206、PE anti-mouse GzmB、PE-Cy7 anti-mouse CD107a、PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD8、PE-Cy7 anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD8、FITC anti-mouse TNF- α 、PerCP-Cy5.5 anti-mouse IL-2、APC anti-mouse IFN- γ 均购自美国 Biolegend 公司;eFluor506-FVD 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;IC Fixation Buffer、Permeabilization Buffer 10 $\times$ 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;RAW264.7 专用细胞培养基购自武汉 Servicebio 公司;RPMI-1640 培养基、青-链霉素溶液购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自南京维森特生物技术公司;diABZI(CAS number: 2138299-34-8)购自法国 Invivogen 公司;Anti-STING、Anti-IRF3、Anti-

2024-06-07 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81902056);安徽省高校科研计划重点项目(编号:2023AH053169)

作者简介:李健飞,男,硕士研究生;

王琴,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,通信作者,

E-mail: qinwang1025@163.com

TBK1 购自美国 Abcam 公司; Anti-p-STING、Anti-p-IRF3、Anti-p-TBK1 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。RIPA Lysis Buffer、BCA 蛋白测定试剂盒购自上海 Beyotime 生物技术公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%)购自上海雅酶生物医药科技公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。主要仪器: 流式细胞仪(BD FACS Lyric, 美国); 电泳仪 & 转膜仪(Bio-Rad PowerPac Basic, 美国); 蛋白显影仪(上海培清 JS-1070PEV)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用包含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素溶液的 RAW264.7 专用细胞培养基在 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱培养细胞, 注意观察细胞密度, 每天更换 1 次培养基, 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞培养与刺激 待培养瓶细胞长满后, 收获细胞并转移至 10 ml 离心管, 800 r/min 离心 5 min, 使用细胞培养基重悬并调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml, 每孔 2 ml 接种于 6 孔板。对于巨噬细胞 STING 通路活化的检测, 实验组于细胞生长至汇合度达 90% 时使用 1 μ mol/L 的 diABZI 刺激 3 h 后进行 Western blot 实验; 对于巨噬细胞极化实验, 实验组于细胞生长至汇合度达 80% 时使用 1 μ mol/L 的 diABZI 刺激 12 h 后进行流式检测; 对于共培养实验, 实验组于细胞生长至汇合度达 60% 时使用 1 μ mol/L 的 diABZI 刺激 12 h, 收获细胞并用 PBS 洗涤, 随后与制备好的小鼠脾淋巴细胞悬液共培养 24 h 后进行流式检测, 所有的对照组加入等体积的 diABZI 溶剂。

1.2.3 巨噬细胞与脾淋巴细胞共培养 制备小鼠脾淋巴细胞悬液, 取小鼠脾脏, 70 μ m 滤网研磨过滤后加入适量 PBS, 800 r/min 离心 10 min 后去上清液, 加入红细胞裂解液, 800 r/min 离心 10 min 后再次加入 PBS 洗涤 1 次后重悬细胞。按照 diABZI 刺激 12 h 后的巨噬细胞: 脾细胞 = 1 : 2 的比例使用含 1 μ g/ml CD3 和 1 μ g/ml CD28 功能性抗体的 1640 完全培养基共培养 24 h。对于 T 细胞表型检测, 培养结束后即可进行流式细胞分析; 对于 T 细胞分泌细胞因子能力检测, 培养后收集淋巴细胞并转移至 96 孔板, 使用 5 μ g/ml CD3 + 1 μ g/ml CD28 + 10 μ g/ml BFA 联合刺激 5 h 后进行流式检测。

1.2.4 Western blot 实验 采用蛋白提取裂解液(RIPA)裂解细胞并离心收取上清液总蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样本浓度, 使用 RIPA 将各样本浓度调平后, 添加 4 $\times$ 蛋白上样缓冲液

并置于水浴锅中 100 °C 10 min, 冰上冷却后即可进行 Western blot 实验。配置 10% SDS-PAGE 预制胶, 待胶凝固后依次上样及蛋白 marker, 开始电泳, 电泳结束后取下凝胶, 按待测蛋白分子量范围裁剪等大小的 PVDF 膜, 甲醇激活后置于凝胶上, 夹紧转膜夹并置于转膜槽中进行转膜, 转膜完毕后进行封闭, 一抗孵育, 包括: Anti-STING (1 : 1 000), Anti-p-STING (1 : 1 000), Anti-IRF3 (1 : 1 000), Anti-p-IRF3 (1 : 1 000), Anti-TBK1 (1 : 1 000), Anti-p-TBK1 (1 : 1 000), Anti-Tubulin (1 : 10 000), 二抗孵育, 包括: HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (110 000), HRP-Goat Anti-Mouse IgG (1 : 10 000), 曝光显影。

1.2.5 流式细胞术 收获培养板内细胞, 调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml, 每孔 200 μ l 铺于 96 孔 U 型板内, 4 °C、800 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 以每孔 50 μ l 染色体系, 按照 PBS: Ab = 200 : 1 的比例配置表染工作液, 避光室温下孵育 20 min, 加入 150 μ l FACS Flow 鞘液, 离心同前, 弃上清液, 加入 200 μ l FACS Flow 鞘液重悬后上机检测。对于需要破膜染色的抗体, 于表染后加入 IC Fixation buffer 穿孔固定液 100 μ l 避光室温固定 20 min, 使用 ddH₂O 将 $1 \times$ PWP 穿孔工作液, 以每孔 50 μ l 染色体系, 按照 PWP 工作液 : Ab = 200 : 1 的比例配置破膜染色工作液, 避光室温下孵育 20 min, 加入 150 μ l PWP 工作液, 离心同前, 弃上清液, 加入 200 μ l FACS Flow 鞘液重悬后上机检测。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件和 SPSS 27.0 软件分别进行作图和统计学分析, 使用 Shapiro-Wilk 检验对计量资料进行正态性检验。对于正态分布资料, 组间差异比较使用 *t* 检验; 对于非正态分布资料, 组间差异比较使用非参数秩和检验。报告的所有 *P* 值均为双侧, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 diABZI 激活巨噬细胞 STING 通路 使用 1 μ mol/L 的工作浓度刺激 RAW264.7 巨噬细胞 3 h, 提取细胞蛋白并用 Western blot 检测小分子 STING 激动剂 diABZI 的作用效果, 结果显示, diABZI 刺激 3 h, 通路相关磷酸化激活蛋白 p-TBK1、p-IRF3、p-STING 的表达水平明显上调, 而 TBK1、IRF3、STING 表达无明显趋势, 提示 diABZI 明显激活了巨噬细胞 STING 通路。见图 1。

2.2 diABZI 促进巨噬细胞 M1 极化 使用 diABZI

刺激巨噬细胞 12 h, 应用流式细胞术分析检测 STING 通路激活对巨噬细胞极化的影响。结果显示, 与对照组相比, 刺激 12 h 后的巨噬细胞表面 M1 极化标志物 CD86 分子平均荧光强度显著上调 ($P = 0.022$), M2 极化标志物 CD206 分子平均荧光强度有降低趋势但无统计学意义, CD86/CD206 比值刺激组显著高于对照组 ($P = 0.030$), 综上结果提示,

diABZI 刺激巨噬细胞诱导其向 M1 方向极化, 见图 2。

2.3 diABZI 诱导 M1 极化后的巨噬细胞促进 CD8⁺T 细胞活化 为了检测 STING 通路激活诱导极化的巨噬细胞对 CD8⁺T 细胞功能的影响, 先用 diABZI 刺激巨噬细胞 12 h 使其 M1 极化, 洗涤细胞以去除残留的 diABZI 及上清液的细胞因子, 再将其

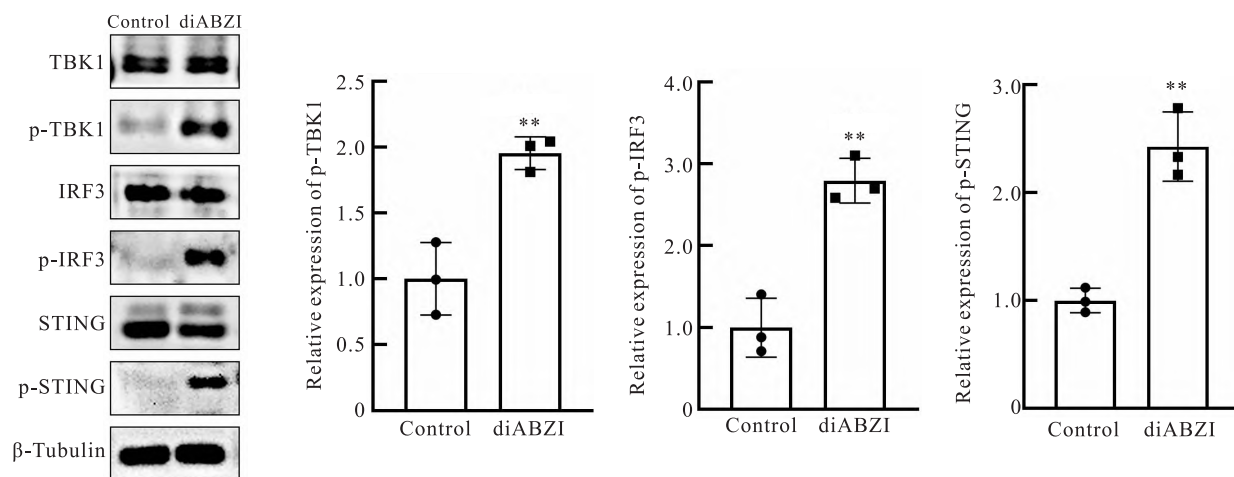


图 1 diABZI 刺激后巨噬细胞 STING 通路相关蛋白表达

Fig. 1 The expression of STING pathway-related proteins in macrophages after diABZI stimulation

** $P < 0.01$ vs Control group.

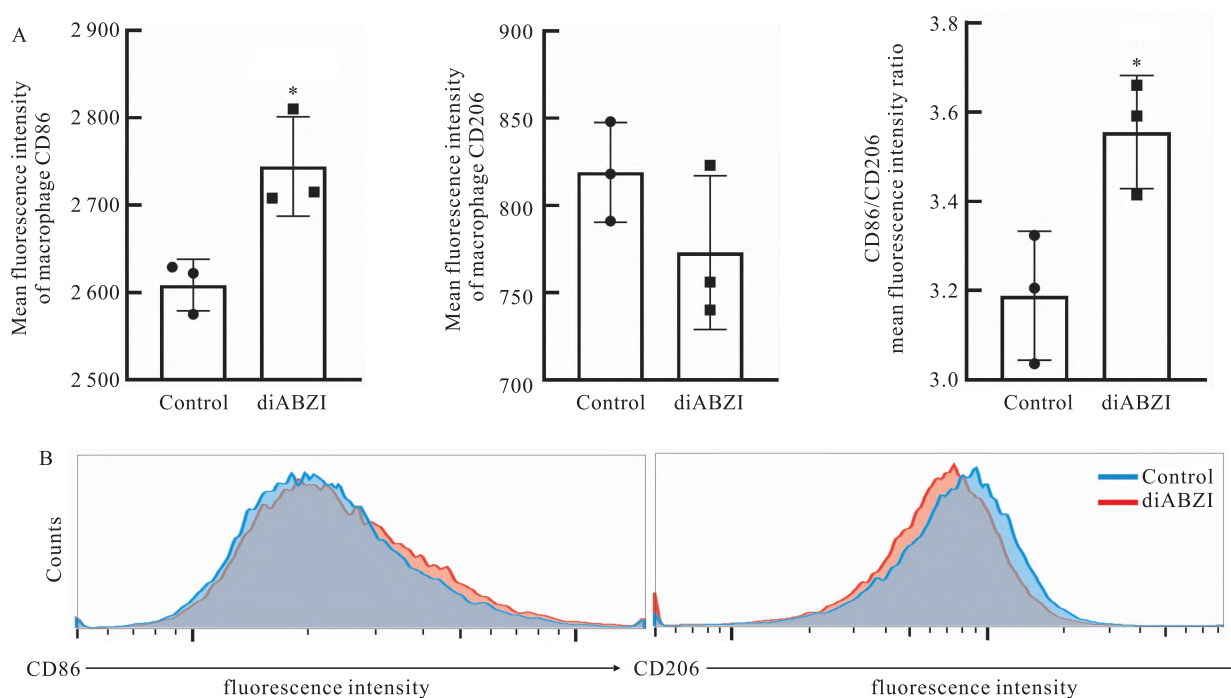


图 2 diABZI 刺激后巨噬细胞表面 CD86 及 CD206 分子表达

Fig. 2 The expression of CD86 and CD206 molecules on the surface of macrophages after diABZI stimulation

A: Macrophage surface CD86 and CD206 expression after diABZI stimulation; B: Representative flow chart; * $P < 0.05$ vs Control group.

与脾淋巴细胞共培养 24 h。流式细胞分析显示, diABZI 刺激组共培养后 $CD8^+$ T 细胞表面活化标志物 CD107a 显著上调 ($P=0.029$), 颗粒酶 B (GzmB) 表达有升高趋势但无统计学意义。综上所述, 通过 STING 通路激活诱导 M1 极化的巨噬细胞能显著促进 $CD8^+$ T 细胞活化, 见图 3。

2.4 diABZI 诱导 M1 极化后的巨噬细胞促进 T 细胞细胞因子分泌 为了检测 T 细胞功能应答能力的变化, 同 1.2.2 条件将小鼠脾淋巴细胞与巨噬细胞共培养 24 h 后, 收获淋巴细胞, 并用 CD3 + CD28 + BFA 联合刺激 5 h, 流式细胞分析显示, 在总淋巴细胞中, diABZI 刺激组 $IFN-\gamma^+$ $CD8^+$ T 细胞 ($P=0.034$)、 $IL-2^+$ $CD8^+$ T 细胞 ($P=0.018$)、 $TNF-\alpha^+$ $CD8^+$ T 细胞 ($P=0.033$) 频率均明显增高; 同时 diABZI 刺激组 $IL-2^+$ $CD4^+$ T 细胞 ($P=0.012$)、 $TNF-\alpha^+$ $CD4^+$ T 细胞 ($P=0.026$) 也明显增高, $IFN-\gamma^+$ $CD4^+$ T 细胞频率有增高趋势, 但无统计学意义, 见图 4、5。

3 讨论

巨噬细胞是分布广泛的天然免疫细胞, 在宿主抵御入侵病原体和维持免疫平衡方面发挥着核心作用, 具有显著的异质性和极化特性, 在病理条件下, 除了组织驻留的巨噬细胞外, 其他巨噬细胞也可被招募到病变组织中, 并在微环境的各种因素的刺激下极化为各种表型, 从而发挥不同的作用和功能^[5]。目前的研究^[1, 6]表明, 巨噬细胞主要分化为两种表型, 促炎的 M1 表型和抗炎的 M2 表型, 具体来说, 在 LPS 或 $IFN-\gamma$ 等刺激下诱导极化的 M1 型经典活化巨噬细胞高表达 CD68、CD80、CD86 和 CD16/32, 并能够分泌促炎细胞因子诸如 IL-1、IL-6、IL-12、iNOS 和 $TNF-\alpha$ 等, 这些介质诱导激活各种抗微生物机制有助于杀死病原体和引起炎症, 与此相反, 在 IL-4、IL-13、IL-10、TGF- β 等刺激下诱导极化的 M2 型交替活化巨噬细胞高表达 Arg-1、CD206、抗炎因子 IL-10 等, 能够减轻炎症反应, 促进和加速伤

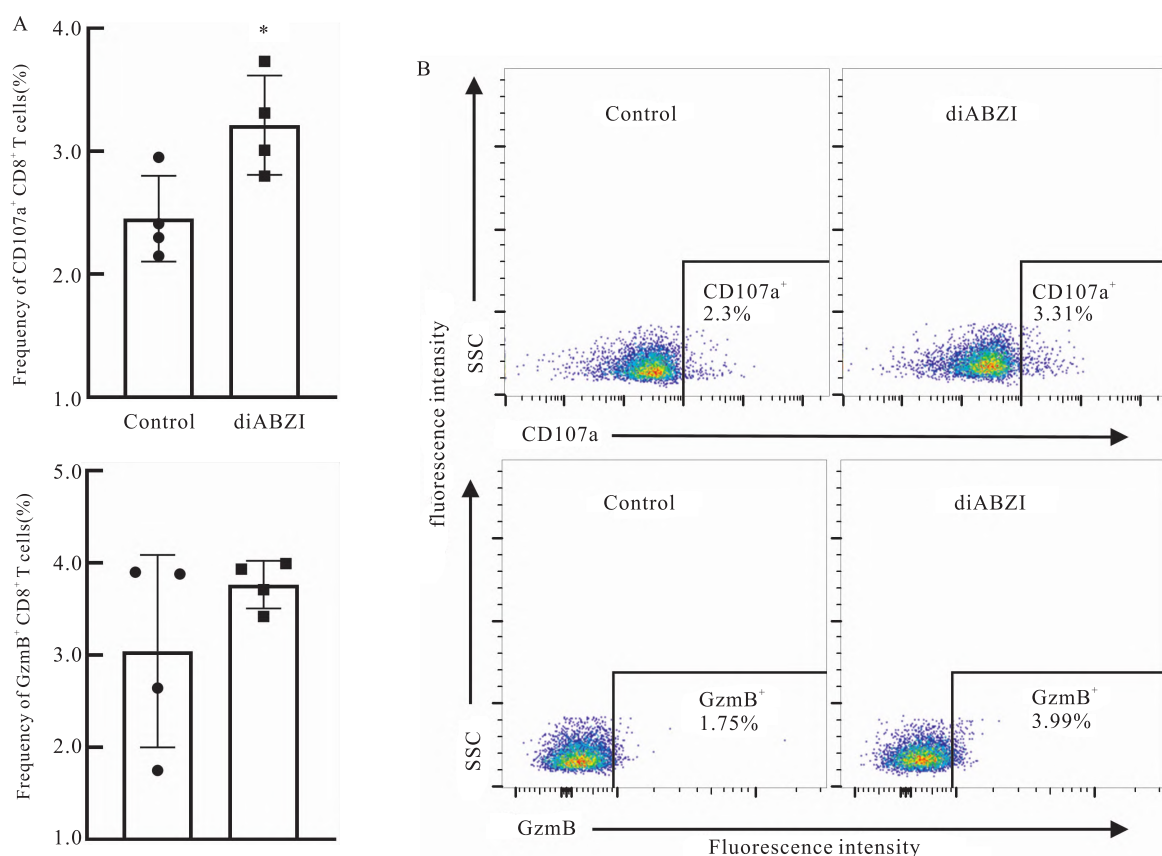
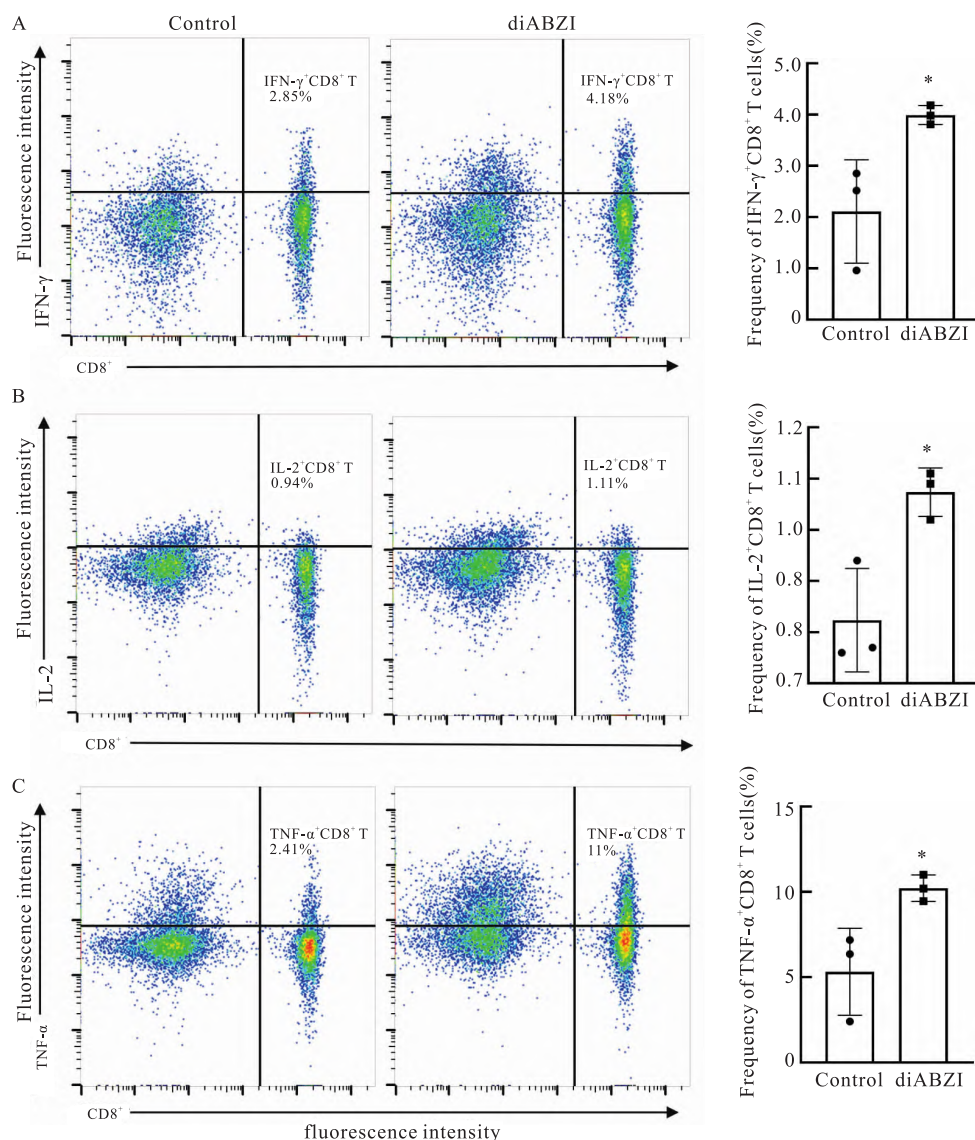


图3 共培养后 $CD8^+$ T 细胞表面分子表达

Fig. 3 The expression of molecules on the surface of $CD8^+$ T cells after co-culture

A: Expression of molecules on the surface of $CD8^+$ T cells after diABZI stimulation of macrophages co-cultured with splenocytes; B: Representative flow chart; * $P < 0.05$ vs Control group.

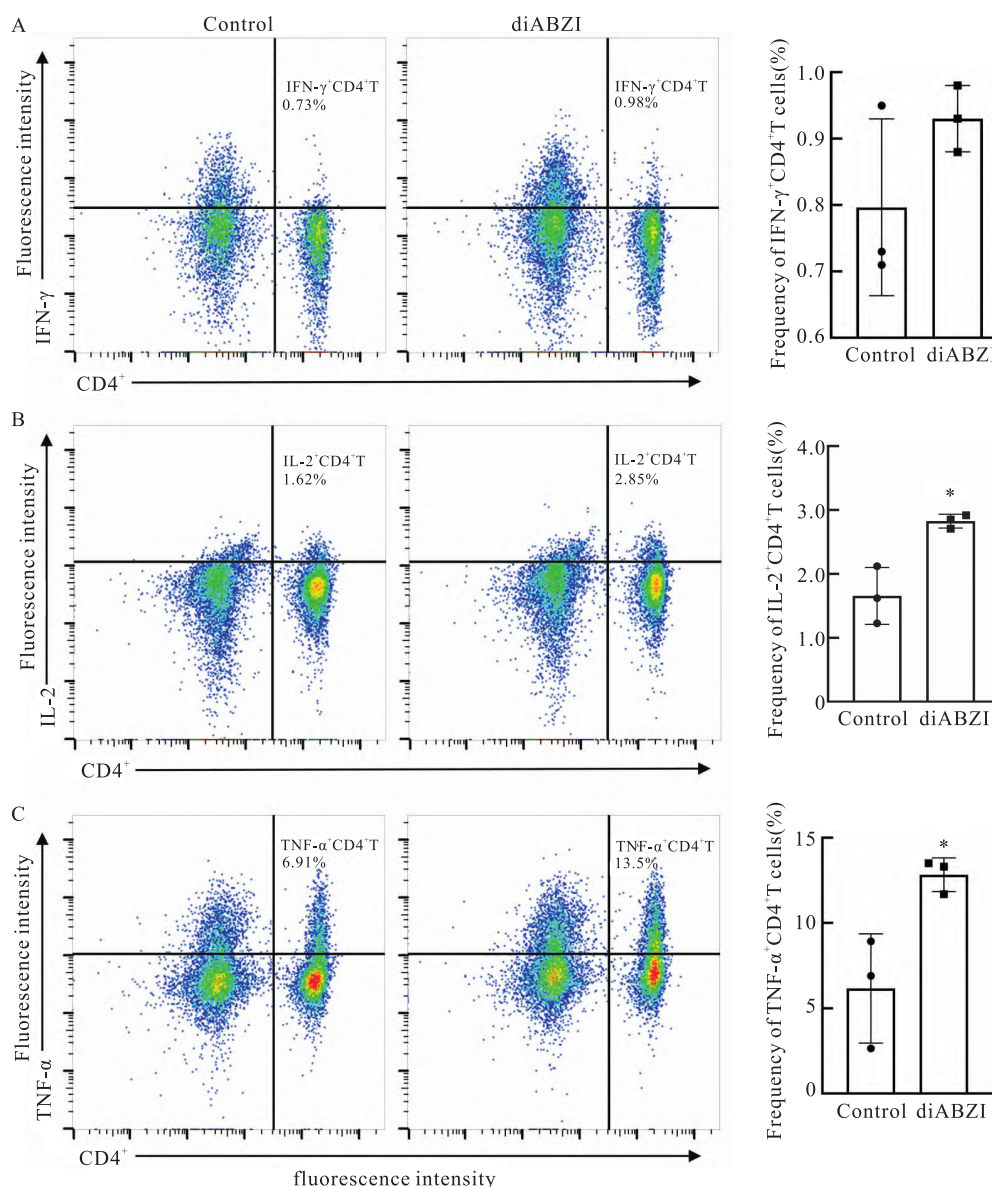
图4 共培养后 CD8⁺ T 细胞分泌细胞因子能力Fig. 4 Cytokine secretion capacity of CD8⁺ T cells after co-culture

A: IFN- γ + CD8⁺ T - cell frequency after diABZI stimulation of macrophages co-cultured with splenocytes; B: IL-2 + CD8⁺ T - cell frequency; C: TNF- α + CD8⁺ T - cell frequency; * $P < 0.05$ vs Control group.

口愈合和组织修复过程,从而避免严重的免疫病理。

作为感染的第一道防线,巨噬细胞利用模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)来识别病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)或其他内源性信号,激活其产生 M1 样促炎介质并促进其 M1 极化^[7]。有研究^[3, 8-9]报道,TLR4/NF- κ B 通路是 M1 巨噬细胞极化的重要机制之一,LPS 通过髓系分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖的途径与 TLR4 结合,激活 NF- κ B 通路,从而促进炎症因子的表达,与此同时,JAK/STAT1、Notch 和 miRNA 等信号通路机制同样参与巨噬细胞极化的调节。这些证据表明,模

式识别受体介导的细胞内免疫通路信号激活对巨噬细胞 M1 极化有重要影响。STING 是机体固有免疫系统的重要衔接分子,其上游模式识别受体环 GMP-AMP 合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)识别来自细菌,病毒等外源性 DNA 或肿瘤细胞异常复制产生的自体 DNA,催化合成第二信使环鸟-腺苷酸(cyclic GMP-AMP, cGAMP)并结合并激活 STING 蛋白,并进一步诱导 TBK1 的磷酸化激活及 IRF3 的入核,诱导干扰素相关基因的转录,同时 STING 也作用于 NF- κ B 通路,诱导炎症细胞因子如 TNF、IL-1 β 和 IL-6 的表达^[10-11]。diABZI 是最近合成的一种非核苷类小分子 STING 激动剂^[12],本研究证明,diABZI

图5 共培养后 CD4⁺ T 细胞分泌细胞因子能力Fig. 5 Cytokine secretion capacity of CD4⁺ T cells after co-culture

A: IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cell frequency after diABZI stimulation of macrophages co-cultured with splenocytes; B: IL-2⁺ CD4⁺ T cell frequency; C: TNF- α ⁺ CD4⁺ T cell frequency; * $P < 0.05$ vs Control group.

处理巨噬细胞 3 h 即可显著诱导 STING 通路活化, 在 diABZI 刺激 12 h 后, 巨噬细胞表面 M1 标志物 CD86 表达上调, M2 标志物 CD206 表达有降低趋势, CD86/CD206 比值升高, 这些结果均表明, 和 TLR4/NF- κ B 通路一样, STING 通路的激活也有助于巨噬细胞 M1 极化的发生。

完成病原体清除或肿瘤消退最终往往依赖于协调有效的 T 细胞反应, CD8⁺ T 细胞是免疫反应的重要效应细胞, 活化的 CD8⁺ T 细胞通过直接的细胞毒作用(释放颗粒酶 B 和穿孔素)和细胞因子的产生(效应细胞因子如干扰素 γ 和肿瘤坏死因子, 以及

促进增殖的细胞因子如 IL-2) 发挥效应功能^[13-14]。M1 巨噬细胞高水平表达主要组织相容性复合体及共刺激分子 CD80 和 CD86 等, 这对抗原的交叉提呈并诱导 T 细胞活化具有重要意义。有研究^[15] 证明 M1 巨噬细胞与辅助性 T 细胞 1 型(Th1) 反应有关。为了进一步研究 M1 极化的巨噬细胞对 T 细胞的直接影响, 将 diABZI 刺激 12 h 诱导极化的巨噬细胞与健康小鼠脾细胞共培养, 结果发现 M1 极化的巨噬细胞显著促进了 CD8⁺ T 细胞表面 CD107a 表达, CD107a 是一种在活化的 NK 细胞和活化 CD8⁺ T 细胞上高度表达的分子, 被认为是 CTL 细胞脱颗粒和

细胞毒性的标志^[16]。本研究也观察到了 CD8⁺ T 细胞有更高趋势的颗粒酶 B 分泌能力,但差异未达到统计学意义。另一方面,课题组评估了 T 细胞共培养后细胞因子的分泌能力,与 diAZBI 刺激极化的巨噬细胞共培养后,在总淋巴细胞中,IFN- γ ⁺/IL-2⁺/TNF- α ⁺ CD8⁺ T 细胞比例明显上升,同时 IL-2⁺/TNF- α ⁺ CD4⁺ T 细胞比例也出现上调。以上研究表明,diAZBI 诱导 M1 极化的巨噬细胞能增强 T 细胞的效应能力,其细胞毒作用及分泌细胞因子能力均增强,这在一定角度上解释了 STING 通路的作用机制,即巨噬细胞 STING 通路的活化通过直接诱导巨噬细胞 M1 极化进而促进 T 细胞功能。

综上所述,diABZI 激活巨噬细胞 STING 通路通过诱导其 M1 极化,继而促进 T 细胞的功能应答,提示 STING 激动剂 diABZI 的应用可能会重塑体内抑制性免疫环境,有望成为抗感染,抗肿瘤治疗的有效方向。

参考文献

- [1] Wang C, Ma C, Gong L, et al. Macrophage polarization and its role in liver disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 803037. doi:10.3389/fimmu.2021.803037.
- [2] Chen B, Rao X, Wang X, et al. cGAS-STING signaling pathway and liver disease: From basic research to clinical practice [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 719644. doi:10.3389/fphar.2021.719644.
- [3] Gong J, Li J, Dong H, et al. Inhibitory effects of berberine on proinflammatory M1 macrophage polarization through interfering with the interaction between TLR4 and MYD88 [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 314. doi:10.1186/s12906-019-2710-6.
- [4] 谢 娜, 徐兴欣. 汉黄芩苷干预高糖刺激 RAW264.7 巨噬细胞 KLF4/NF- κ B 信号通路 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(10): 1523-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.003.
- [4] Xie S, Xu X X. Effect of wogonoside on KLF4/NF- κ B signal pathway in RAW264.7 macrophages stimulated by high glucose [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(10): 1523-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.003.
- [5] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-40. doi:10.1002/jcp.26429.
- [6] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- [7] Atri C, Guerfali F Z, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1801. doi:10.3390/ijms19061801.
- [8] Wang F, Zhang S, Jeon R, et al. Interferon gamma induces reversible metabolic reprogramming of M1 macrophages to sustain cell viability and pro-inflammatory activity [J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 303-16. doi:10.1016/j.ebiom.2018.02.009.
- [9] Wei W, Li Z P, Bian Z X, et al. Astragalus polysaccharide rap induces macrophage phenotype polarization to M1 via the Notch signaling pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(10). doi:10.3390/molecules24102016.
- [10] Wang Y, Luo J, Alu A, et al. cGAS-STING pathway in cancer biotherapy [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 136. doi:10.1186/s12943-020-01247-w.
- [11] Su M, Zheng J, Gan L, et al. Second messenger 2'3'-cyclic GMP-AMP (2'3'-cGAMP): Synthesis, transmission, and degradation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 198: 114934. doi:10.1016/j.bcp.2022.114934.
- [12] Ramanjulu J M, Pesiridis G S, Yang J, et al. Design of amido-benzimidazole STING receptor agonists with systemic activity [J]. *Nature*, 2018, 564(7736): 439-43. doi:10.1038/s41586-018-0705-y.
- [13] Sun L, Su Y, Jiao A, et al. T cells in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 235. doi:10.1038/s41392-023-01471-y.
- [14] Aichele P, Neumann-Haefelin C, Ehl S, et al. Immunopathology caused by impaired CD8⁺ T-cell responses [J]. *Eur J Immunol*, 2022, 52(9): 1390-5. doi:10.1002/eji.202149528.
- [15] Zhao X, Di Q, Liu H, et al. Mef2c promotes M1 macrophage polarization and Th1 responses [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(4): 540-53. doi:10.1038/s41423-022-00841-w.
- [16] Wiechmann A, Wilde B, Tyczynski B, et al. CD107a⁺ (LAMP-1) cytotoxic CD8⁺ T-cells in lupus nephritis patients [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 556776. doi:10.3389/fmed.2021.556776.

M1 polarization of macrophage induced by STING signaling promotes T cell immune response

Li Jianfei, Duan Zhi, Liu Qian, Zong Qiyin, Duan Wanlu, Liu Futing, Zhang Hao, Zhou Qiang, Wang Qin
(Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of activation of the stimulator of interferon genes (STING) pathway on macrophage polarization function and its role in T-cell response. **Methods** Mouse macrophage RAW264.7 cells were used. STING signaling related proteins in RAW264.7 macrophage treated with STING agonist diABZI were analyzed by Western blot, including TANK-binding kinase-1 (TBK1), interferon regulatory factor-3 (IRF3),

网络出版时间:2024-11-18 15:59:24 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1542.013

重组鼠 MANF 通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路参与脓毒症诱导心肌损伤的保护作用

何浩,李成,胡赛,夏凤强,张弛,王静

[长沙市第四医院(湖南师范大学附属长沙医院)重症医学科,长沙 410006]

摘要 **目的** 探讨中脑星形胶质细胞来源的神经营养因子(MANF)通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路在脓毒症诱导心肌损伤中的保护作用。**方法** 48 只小鼠随机分为 4 组:对照组、重组鼠 MANF(rmMANF)组、盲肠结扎穿刺(CLP)组和 CLP + rmMANF 组,每组 12 只。CLP 后 8 h 检测存活率、脓毒症评分、肛温、血生化指标、心肌损伤病理指标及内质网应激(ERS)相关蛋白表达。将 H9C2 细胞分为对照(Con)组、脂多糖(LPS)组、LPS + rmMANF 组、LPS + rmMANF + EX527 组和 LPS + rmMANF + Cpd C 组。LPS 处理 24 h,收集细胞,分析细胞中 ERS 蛋白表达和凋亡情况。**结果** 与 CLP 组比较,CLP + rmMANF 组脓毒症评分及血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血尿素氮(BUN)水平降低($P < 0.01$),肛温、血清白蛋白(ALB)水平升高($P < 0.05$);CLP + rmMANF 组心脏组织中 MANF 表达显著增加($P < 0.01$),葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)表达及 TUNEL 阳性细胞百分比显著降低($P < 0.05$)。体外实验中,LPS 刺激下调了 H9C2 细胞中 SIRT1 和 AMPK 的表达,而 rmMANF 进一步增加了 SIRT1 和 AMPK 的表达水平。与 LPS + rmMANF 组比较,LPS + rmMANF + EX527 组和 LPS + rmMANF + Cpd C 组 H9C2 细胞中 GRP78、CHOP 蛋白表达和细胞凋亡率增加($P < 0.05$)。**结论** rmMANF 通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路抑制脓毒症诱导心肌损伤相关 ERS,进而保护心肌损伤。

关键词 内质网应激;中脑星形胶质细胞来源的神经营养因子;脓毒症;心肌损伤

中图分类号 R 459.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1981-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.013

2024-08-31 接收

基金项目:湖南省自然科学基金项目(编号:2021JJ70156)

作者简介:何浩,男,副主任医师;

李成,男,副主任医师,通信作者, E-mail: 13064937@

qq.com

脓毒症诱导的心肌损伤(sepsis-induced myocardial injury, SIMI)无特效疗法,治疗策略主要是支持性治疗,包括血液动力学支持、液体复苏、血管升压治疗和变力药物治疗等^[1-4]。然而,这些疗法并不能解决疾病的潜在病理生理学问题。虽然 SIMI 损

STING, p-TBK1, p-IRF3, p-STING. The polarization of macrophage RAW264.7 cells treated with diABZI was analyzed by flow cytometry. Co-culture of diABZI-treated RAW264.7 macrophage and T cells was applied to evaluate the change of T cell response. **Results** STING signaling related proteins were upregulated in macrophage RAW264.7 cells treated with diABZI for 3 hours. The expression of CD86 was upregulated on the surface of macrophages after 12 hours of diABZI treatment, and the CD86/CD206 ratio was elevated, which presented the M1 polarization phenotype. When coculturing diABZI-treated macrophage RAW264.7 cells with T cells, the cytokine secretion ability of T cells including CD4⁺T and CD8⁺T cells was enhanced and the expression of CD107a in CD8⁺T cells was upregulated. **Conclusion** STING signaling induces M1 polarization of macrophages which enhance the function of T cells, especially CD8⁺T cell immune response.

Key words macrophage; STING signaling; polarization of macrophage; T cell immune response; CD4⁺T cells; CD8⁺T cells

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 81902056); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee(No. 2023AH053169)

Corresponding author Wang Qin, E-mail: qinwang1025@163.com