

脂多糖通过 Galectin-9/Tim-3 信号通路 调控小鼠巨噬细胞 M1/M2 表型极化

张望 章云涛 方强

310003 浙江杭州, 浙江大学医学院附属第一医院重症医学科

通讯作者: 方强, Email: 1183005@zju.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.09.004

【摘要】 目的 探讨半乳糖凝集素-9/T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3 (Galectin-9/Tim-3) 信号通路在脂多糖 (LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 M1/M2 表型极化中的意义及分子机制。方法 体外培养小鼠腹腔巨噬细胞 RAW264.7, 待细胞生长至 80%~90% 时用于实验。① 将细胞以无血清 DMEM 培养基培养, 并分别以 0 (空白对照)、0.01、0.1、1、10、100 mg/L 的 LPS 刺激 24 h。采用荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 或蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测巨噬细胞 M1 型标志物白细胞介素-6 (IL-6)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和 M2 型标志物精氨酸酶-1 (Arg-1)、白细胞分化抗原 206 (CD206) 以及细胞内 Tim-3、Galectin-9 的表达。② 另取小鼠腹腔巨噬细胞, 并分为空白对照组 (用无血清 DMEM 培养基培养 24 h)、LPS 处理组 (用含 0.1 mg/L 的 LPS 无血清 DMEM 刺激 24 h) 和 α -乳糖预处理组 (在 LPS 刺激前 1 h 用含 40 μ mol/L Galectin-9 信号拮抗剂 α -乳糖的无血清 DMEM 进行预处理), 通过封闭 Galectin-9 信号以验证 Galectin-9 在巨噬细胞 M1/M2 表型极化中的作用。结果 ① 低浓度 LPS (0.01 mg/L、0.1 mg/L) 刺激 24 h 后, 巨噬细胞 M1 型标志物的表达仅轻度上调 (iNOS mRNA) 或无明显变化 (IL-6 mRNA); 而 M2 型标志物 Arg-1 mRNA 和 CD206 mRNA 表达则明显升高, 并分别于 0.1 mg/L 和 0.01 mg/L 的 LPS 浓度下达到峰值 [与空白对照组比较: Arg-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 为 1.85 ± 0.07 比 1.00 ± 0.02 , CD206 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 为 2.03 ± 0.11 比 1.00 ± 0.05 , 均 $P < 0.01$]; 随 LPS 浓度升高, IL-6 mRNA 和 iNOS mRNA 表达持续升高, 而 Arg-1 mRNA 和 CD206 mRNA 表达则逐渐降低, 巨噬细胞 M1/M2 表型极化状态发生改变。同时, 经 LPS 刺激后, 巨噬细胞内 Tim-3 蛋白表达在 0.01 mg/L 的 LPS 刺激后即较空白对照组明显上调 (Tim-3/GAPDH: 0.84 ± 0.04 比 0.69 ± 0.02 , $P < 0.01$), 并在 0.1 mg/L 浓度下达峰, 之后随 LPS 浓度升高而逐渐下降; 细胞内 Galectin-9 及上清中分泌型 Galectin-9 (s-Galectin-9) 蛋白表达在低浓度 LPS (0.01 mg/L、0.1 mg/L) 刺激后无明显变化, 之后随 LPS 浓度升高而逐渐降低。② 与空白对照组相比, LPS 处理组 M1 型标志物 iNOS 和 M2 型标志物 Arg-1、CD206 的 mRNA 表达均明显升高, 而 IL-6 mRNA 表达无明显变化。使用 α -乳糖预处理后, IL-6 mRNA 和 iNOS mRNA 表达较 LPS 处理组进一步升高 [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.44 ± 0.02 比 1.14 ± 0.11 , iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.45 ± 0.04 比 2.01 ± 0.08 , 均 $P < 0.01$], 而 Arg-1 mRNA 和 CD206 mRNA 表达明显下降 [Arg-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.75 ± 0.01 比 1.85 ± 0.02 , CD206 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.58 ± 0.02 比 2.03 ± 0.14 , 均 $P < 0.01$]。同时, Galectin-9 信号封闭也可减少 Galectin-9 胞外分泌 [与 LPS 处理组比较: s-Galectin-9/GAPDH 为 0.10 ± 0.01 比 0.23 ± 0.02 , $P < 0.01$], 下调胞内 Tim-3 和 Galectin-9 的蛋白表达 (Tim-3/GAPDH: 0.28 ± 0.01 比 0.43 ± 0.01 , Galectin-9/GAPDH: 0.21 ± 0.01 比 0.43 ± 0.01 , 均 $P < 0.01$)。结论 LPS 通过 Galectin-9/Tim-3 信号通路调控巨噬细胞 M1/M2 表型极化, 低浓度 LPS 可通过调节 Galectin-9 表达及分泌使巨噬细胞向 M2 表型极化, 从而限制炎症发展; 高浓度 LPS 通过下调 Galectin-9 的表达和分泌使巨噬细胞向 M1 表型极化, 从而促进炎症发展。

【关键词】 半乳糖凝集素-9; T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3; 脂多糖; 巨噬细胞表型; 极化

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY16H150003)

Effect of Galectin-9/Tim-3 pathway on the polarization of M1/M2 subtype in murine macrophages induced by lipopolysaccharide Zhang Wang, Zhang Yuntao, Fang Qiang

Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, Zhejiang, China

Corresponding author: Fang Qiang, Email: 1183005@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the meaning and molecular mechanisms of Galectin-9/T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) pathway on lipopolysaccharide (LPS) induced murine macrophage M1/M2 subtype polarization. **Methods** The murine peritoneal macrophages RAW264.7 were cultured *in vitro* until the cells had matured with 80%~90% fusion rate. ① The cells were cultured in serum-free medium and treated with 0 (blank control), 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/L LPS for 24 hours. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) or Western Blot was used to determine the expressions of M1 macrophage markers such as interleukin-6 (IL-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and M2 macrophage markers such as arginase-1 (Arg-1), leukocyte differentiation antigen 206 (CD206), as well as Tim-3 and Galectin-9 in the cells. ② The other mice

peritoneal macrophages were divided into blank control group (cultured in serum-free DMEM medium for 24 hours), LPS treatment group (cultured in serum-free DMEM medium containing 0.1 mg/L LPS for 24 hours) and α -lactose pretreatment group (pretreated with serum-free DMEM containing 40 μ mol/L Galectin-9 signal antagonist 1 hour before LPS stimulation). Over closed Galectin-9 signal was used to verify the role of Galectin-9 in macrophage M1/M2 subtype polarization. **Results** ① After stimulation with low concentrations of LPS (0.01 mg/L, 0.1 mg/L) for 24 hours, the expression of M1 markers was only slightly increased such as iNOS mRNA or not significantly changed such as IL-6 mRNA in macrophages, while the expressions of M2 markers such as Arg-1 mRNA and CD206 mRNA were significantly increased and peaked at LPS concentrations of 0.1 mg/L and 0.01 mg/L [compared with blank control group: Arg-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 1.85 ± 0.07 vs. 1.00 ± 0.02 , CD206 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 2.03 ± 0.11 vs. 1.00 ± 0.05 , both $P < 0.01$]. With the increase of LPS concentration, the expressions of IL-6 mRNA and iNOS mRNA continued to increase, while the expressions of Arg-1 mRNA and CD206 mRNA were gradually decreased, and the macrophage M1/M2 subtype polarization status changed. At the same time, the level of Tim-3 protein in macrophages was significantly up-regulated after stimulation with 0.01 mg/L LPS as compared with that of blank control group (Tim-3/GAPDH: 0.84 ± 0.04 vs. 0.69 ± 0.02 , $P < 0.01$), peaked at LPS concentrations of 0.1 mg/L, and then decreased with increasing LPS concentration. The intracellular Galectin-9 and supernatant secreted Galectin-9 (s-Galectin-9) protein levels showed no significant change after stimulation with low concentrations of LPS (0.01 mg/L, 0.1 mg/L), while then gradually decreased with the increase of LPS concentration. ② Compared with blank control group, the mRNA expressions of M1 marker iNOS and M2 markers Arg-1 and CD206 were significantly increased in LPS treatment group, but IL-6 mRNA level was not changed significantly. The mRNA levels of IL-6 and iNOS were further elevated after pretreatment with α -lactose as compared with that of the LPS treatment group [IL-6 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.44 ± 0.02 vs. 1.14 ± 0.11 , iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.45 ± 0.04 vs. 2.01 ± 0.08 , both $P < 0.01$], while the mRNA levels of Arg-1 and CD206 were significantly decreased [Arg-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.75 ± 0.01 vs. 1.85 ± 0.02 , CD206 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.58 ± 0.02 vs. 2.03 ± 0.14 , both $P < 0.01$]. Meanwhile, the blocking of Galectin-9 signaling could also reduce the extracellular s-Galectin-9 (compared with LPS treatment group: s-Galectin-9/GAPDH was 0.10 ± 0.01 vs. 0.23 ± 0.02 , $P < 0.01$), down-regulated the expressions of Tim-3 and Galectin-9 (Tim-3/GAPDH: 0.28 ± 0.01 vs. 0.43 ± 0.01 , Galectin-9/GAPDH: 0.21 ± 0.01 vs. 0.43 ± 0.01 , both $P < 0.01$). **Conclusions** LPS regulates macrophage M1/M2 subtype polarization via Galectin-9/Tim-3 signaling pathway. Low-doses of LPS can limit the development of inflammation by accommodating the expression and secretion of Galectin-9 to polarize macrophages to M2. High-doses of LPS promotes the development of inflammation by down-regulating the expression and secretion of Galectin-9 to polarize macrophages to M1.

[Key words] Galectin-9; T-cell immunoglobulin mucin-3; Lipopolysaccharide; Macrophage subtype; Polarization

Fund program: Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LY16H150003)

脓毒症是宿主针对细菌、病毒或真菌感染的免疫反应失调导致的威胁生命的器官功能障碍^[1],是临床危重病患者死亡的重要原因之一。脓毒症患者常并发急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[2],肺损伤评分、血乳酸均为脓毒症患者发展为ARDS的高危因素,可用于ARDS的早期预测^[3],但其分子机制尚未明确。肺泡巨噬细胞作为免疫系统的第一道防线,其炎症表型与功能多样化的单核/巨噬细胞密切相关^[4-6]。其中巨噬细胞M1/M2表型极化与ARDS的炎症过程密切相关,在免疫系统调节下介导了呼吸系统屏障功能从损伤到恢复的一系列转变过程^[7]。

T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(Tim-3)是近年来被发现的一种免疫调控分子,高表达于辅助性T细胞1(Th1)和细胞毒性T细胞1(Tc1)上,并产生抑制信号,从而导致Th1和Tc1细胞凋亡;它同时还表达于Th17、调节性T细胞(Treg)、单核/巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞和小胶质细胞,并可介导对凋亡细胞的吞噬和抗原的交叉呈递。半乳糖凝集素-9(Galectin-9)是Tim-3的天然配体,几乎可表达在所

有体内细胞上,与Th1细胞上的Tim-3分子特异性结合后,为T细胞提供一种负性共刺激信号,引发Th1细胞程序性死亡,诱发外周免疫耐受^[8]。目前有关Galectin-9/Tim-3信号对巨噬细胞M1/M2表型极化的具体影响和调控过程中所涉及的信号通路,以及可能影响Tim-3表达的因素等关键问题尚未明确,可能成为脓毒症相关ARDS治疗的新靶点。

本研究采用不同浓度的脂多糖(LPS)处理小鼠巨噬细胞,选择白细胞介素-6(IL-6)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)作为M1型标志物,选择精氨酸酶-1(Arg-1)、白细胞分化抗原206(CD206)作为M2型标志物,观察小鼠巨噬细胞M1/M2表型极化及Galectin-9/Tim-3信号的变化,并利用Galectin-9信号拮抗剂 α -乳糖封闭Galectin-9信号,从而验证Galectin-9在巨噬细胞M1/M2表型极化中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与试剂:小鼠腹腔巨噬细胞株RAW264.7由浙江大学医学院免疫学实验室修慧卿馈赠;DMEM高糖培养基购于美国Hyclone公司,胎

牛血清 (FBS) 和胰酶购于美国 Gibco 公司, LPS 购于美国 Sigma 公司, α -乳糖购于北京索莱宝生物科技有限公司, Tim-3、Galectin-9、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 抗体及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗购于美国 Abcam 公司, RNA 提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司, RNA 反转录 (RT) 试剂盒及荧光定量聚合酶链反应 (qPCR) 试剂盒购于日本 Takara 公司, IL-6、iNOS、Arg-1、CD206 等 qPCR 引物由杭州擎科生物技术有限公司合成。

1.2 RAW264.7 培养与传代: 当细胞密度达到 50% 时, 反复吹打细胞, 并加入适量细胞培养液重悬细胞, 将细胞悬液以 1×10^5 /mL 的密度接种于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基的 6 孔细胞培养板中, 37 °C、5% CO₂ 培养, 待细胞生长至 80% ~ 90% 时用于实验。

1.3 分组与处理: ① 将细胞分为两组: 空白对照组用无血清 DMEM 培养 24 h; LPS 处理组分别用含 0.01、0.1、1、10、100 mg/L 的 LPS 无血清 DMEM 刺激 24 h。② 另取细胞分为 3 组: 空白对照组用无血清 DMEM 培养 24 h; LPS 处理组用含 0.1 mg/L 的 LPS 无血清 DMEM 刺激 24 h; α -乳糖预处理组在 LPS 刺激前 1 h 用含 40 μ mol/L α -乳糖的无血清 DMEM 进行预处理。

1.4 RT-qPCR 检测细胞因子 mRNA 表达: 提取细胞总 RNA, 并进行纯化, 以总 RNA 为模板, 按试剂盒要求将 RNA 反转录为 cDNA, 然后以 GAPDH 为内参进行 qPCR。95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火、延伸 30 s, 共 40 个循环。PCR 后进行熔解曲线分析。每个样品中目的基因相对于空白对照组样品的表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

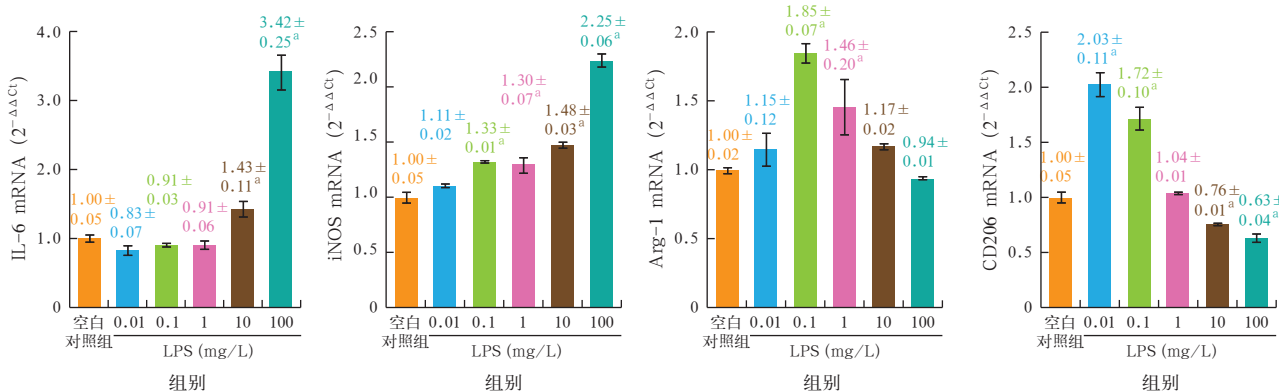
1.5 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测细胞

因子蛋白表达: 各组细胞经不同药物处理 24 h 后, 提取培养基上清蛋白, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解, BCA 蛋白定量后调整蛋白浓度, 加入上样缓冲液后 100 °C 加热 10 min。细胞内蛋白上样 30 μ g, 上清蛋白上样 30 μ L; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 电转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加一抗 (1:1000 稀释) 4 °C 孵育过夜, 用含吐温 20 的羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBST) 洗涤, 加二抗 (1:5000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤后加入增强化学发光 (ECL) 试剂, 暗室中胶片曝光, 显影成像, 以目的蛋白与内参 GAPDH 条带灰度值比值作为目的蛋白表达量。

1.6 统计学分析: 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学处理。所有资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间比较经过 *F* 检验后符合方差齐性则用 LSD 检验; 不符合方差齐性则用 Tamhane *T*₂ 检验; 采用 Graphpad prism 7.0 软件作图。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 LPS 处理后巨噬细胞 M1/M2 型标志物 mRNA 表达变化 (图 1): 与空白对照组比较, 低浓度 LPS (0.01 mg/L、0.1 mg/L) 处理 24 h 后, 巨噬细胞 M1 型标志物 IL-6 mRNA 表达无明显变化, iNOS mRNA 表达则轻度增加 (P < 0.01); 而 M2 型标志物 Arg-1、CD206 的 mRNA 表达明显上调 (均 P < 0.01); 随 LPS 浓度升高, IL-6、iNOS 的 mRNA 表达持续升高, 而 Arg-1、CD206 的 mRNA 表达逐渐降低。表明低浓度 LPS 处理可增加 RAW264.7 细胞中 M2 型巨噬细胞的数量, 并随 LPS 浓度升高逐渐减少, 而 M1 型巨噬细胞逐渐增多。

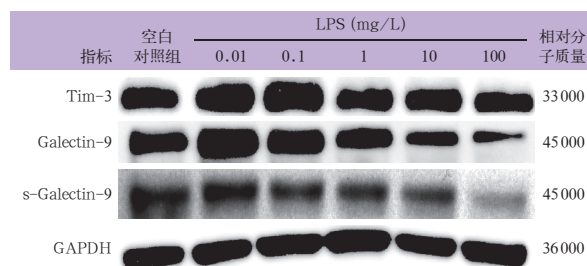


注: LPS 为脂多糖, IL-6 为白细胞介素-6, iNOS 为诱导型一氧化氮合酶, Arg-1 为精氨酸酶-1, CD206 为白细胞分化抗原 206; 与空白对照组比较, ^aP < 0.01

图 1 不同浓度 LPS 处理 24 h 小鼠腹腔巨噬细胞 M1 型标志物 IL-6、iNOS 及 M2 型标志物 Arg-1、CD206 的 mRNA 表达变化

2.2 不同浓度 LPS 处理后巨噬细胞 Galectin-9/Tim-3 表达变化(图 2~3):与空白对照组比较,巨噬细胞内 Tim-3 蛋白表达在 0.01 mg/L 低浓度 LPS 刺激后即明显上调($P<0.01$),并在 0.1 mg/L 浓度下达峰值,之后随 LPS 浓度升高而逐渐下降;细胞内 Galectin-9 及上清中分泌型 Galectin-9(s-Galectin-9)蛋白表达在低浓度 LPS(0.01 mg/L、0.1 mg/L) 刺激后均无明显变化,之后随 LPS 浓度升高而逐渐降低,与空白对照组比较差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。

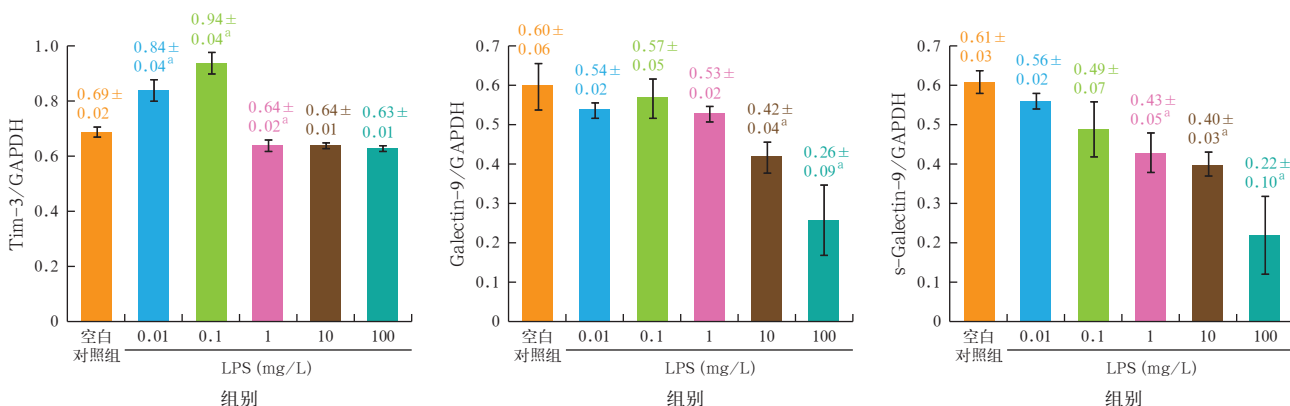
2.3 LPS 促进 Galectin-9 分泌活化 Tim-3 介导巨噬细胞 M1/M2 表型极化(图 4~5):以 Galectin-9 表达量最高的 LPS 浓度 0.1 mg/L 刺激 RAW264.7 细胞 24 h,与空白对照组相比, M1 型标志物 iNOS 和 M2 型标志物 Arg-1、CD206 的 mRNA 表达水平均明显升高(均 $P<0.01$),而 IL-6 mRNA 表达无明显变化;使用 α -乳糖预处理后, iNOS mRNA 和 IL-6 mRNA 表达进一步升高,而 Arg-1 mRNA 和 CD206 mRNA 表达明显下降(均 $P<0.01$)。表明 Galectin-9 信号介导



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, LPS 为脂多糖, Tim-3 为 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3, Galectin-9 为半乳糖凝集素-9, s-Galectin-9 为分泌型 Galectin-9, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

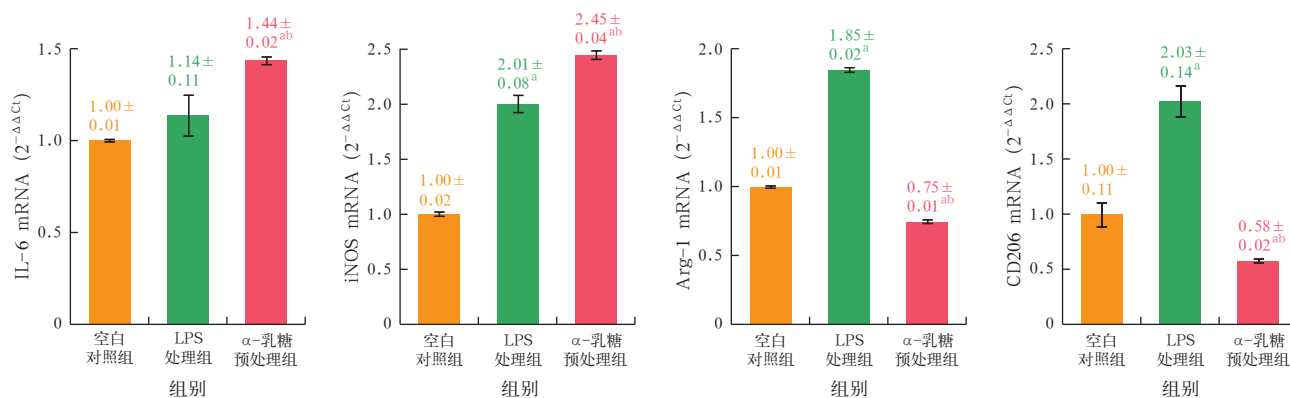
图 2 Western Blot 检测不同浓度 LPS 处理 24 h 小鼠巨噬细胞内 Tim-3、Galectin-9 及上清中 s-Galectin-9 的蛋白表达

了巨噬细胞 M1/M2 表型极化,高水平 Galectin-9 信号可使巨噬细胞极性偏向 M2 型,而抑制 Galectin-9 信号可使 M2 型巨噬细胞减少。同时, Galectin-9 信号封闭也可影响 Galectin-9 和 Tim-3 蛋白合成,减少胞外 Galectin-9 分泌,下调胞内 Galectin-9 和 Tim-3 蛋白表达(均 $P<0.01$)。说明 Galectin-9/Tim-3 信号强弱影响 M1/M2 表型标志物的表达。



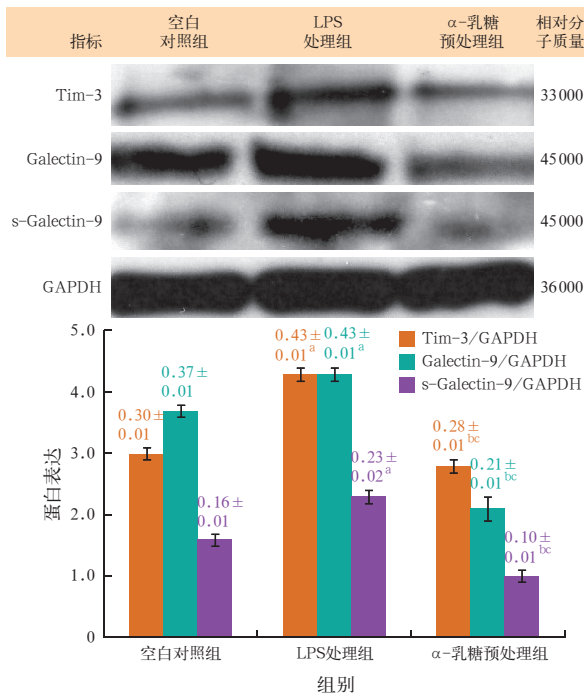
注: LPS 为脂多糖, Tim-3 为 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3, Galectin-9 为半乳糖凝集素-9, s-Galectin-9 为分泌型 Galectin-9, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与空白对照组比较, ^a $P<0.01$

图 3 不同浓度 LPS 处理 24 h 小鼠腹腔巨噬细胞内 Tim-3、Galectin-9 及上清中 s-Galectin-9 的蛋白表达变化



注: Galectin-9 为半乳糖凝集素-9, LPS 为脂多糖, iNOS 为诱导型一氧化氮合酶, IL-6 为白细胞介素-6, Arg-1 为精氨酸酶-1, CD206 为白细胞分化抗原 206;与空白对照组比较, ^a $P<0.01$;与 LPS 处理组比较, ^b $P<0.01$

图 4 Galectin-9 信号拮抗剂 α -乳糖预处理对 LPS 刺激小鼠巨噬细胞 M1 型标志物 iNOS、IL-6 及 M2 型标志物 Arg-1、CD206 mRNA 表达的影响



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, Galectin-9 为半乳糖凝集素-9, LPS 为脂多糖, Tim-3 为 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白-3, s-Galectin-9 为分泌型 Galectin-9, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 LPS 处理组比较, ^c $P < 0.01$

图 5 Western Blot 检测 Galectin-9 信号拮抗剂 α-乳糖预处理对 LPS 刺激小鼠巨噬细胞内 Tim-3、Galectin-9 及上清中 s-Galectin-9 蛋白表达的影响

3 讨论

在静止期,巨噬细胞黏附于上皮细胞, Toll 样受体(TLR)和树突细胞相关性 C 型凝集素 1(Dectin-1)受体持续表达,细胞更新及代谢缓慢,主要依靠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)/粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)诱导局部增殖^[7]。当机体遭受病原微生物感染时,循环中的单核细胞被募集并分化为巨噬细胞,与肺泡及血管中常驻的巨噬细胞被激活,分泌炎症因子并促进中性粒细胞肺内迁移^[9]。炎症状态下,巨噬细胞活化可向两种状态分化,分别是经典活化的巨噬细胞(CAM)和选择活化的巨噬细胞(AAM)。CAM 表达 M1 巨噬细胞表型,并产生高水平的促炎细胞因子 IL-1、IL-6、IL-12、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和 iNOS,以响应 Th1 旁分泌的细胞因子 γ-干扰素(IFN-γ)信号及由巨噬细胞自身分泌细胞因子 IFN-β 信号^[10-11]。AAM 表达 M2 巨噬细胞表型并产生抗炎细胞因子 IL-10、Arg-1、CD206 等,以响应来自 Th2 的细胞因子 IL-4 和 IL-13 的信号^[12]。有研究表明,免疫抑制小鼠重症肺部感染时的巨噬细胞分型呈 M1 偏向 M2 亚群优势活化的状态^[13]。通常,在细菌感染早期,巨噬细胞向 M1 表

型极化,当细菌中存在的病原相关分子模式(PAMP)被 TLR 等病原体识别受体识别时,巨噬细胞被激活并产生大量促炎介质,包括 TNF-α、IL-6、iNOS 等,杀死入侵的病原体,激活适应性免疫应答^[14]。如果不能快速控制巨噬细胞介导的炎症反应,形成细胞因子“风暴”,则可能引起脓毒症,在肺部常导致脓毒症相关性 ARDS^[15]。在利用铜绿假单胞菌的临床菌株诱导的肺炎鼠急性肺损伤(ALI)模型中发现,小鼠感染早期巨噬细胞表型偏向 M1 型,而感染中晚期巨噬细胞表型偏向 M2 型^[16]。在本研究中,我们首先明确了不同浓度 LPS 处理的巨噬细胞极化能力不同:低浓度 LPS 可以维持或轻度上调 M1 型巨噬细胞、显著上调 M2 型巨噬细胞的数量,随 LPS 浓度升高, M2 型巨噬细胞逐渐减少,提示低浓度 LPS 可以使 RAW264.7 细胞向 M2 型巨噬细胞极化,从而促进抗炎功能的表达;而高浓度 LPS 可以诱导 RAW264.7 细胞向 M1 型巨噬细胞极化并发挥促炎作用。这与众所周知的 LPS 损伤效应不同,我们观察到与高浓度 LPS 刺激相比,低浓度 LPS 有助于维持巨噬细胞 M1/M2 表型数量的平衡,从而限制炎症的发展。因此,阐明不同剂量 LPS 向不同方向调节 RAW264.7 极化的机制对预防和治疗脓毒症及其相关性 ARDS 的发生尤为重要。

有研究证实, Galectin-9/Tim-3 信号可能介导巨噬细胞极化,在对炎症性肠病(IBD)的研究中发现, Tim-3 参与了 IBD 的病理生理学过程, Tim-3 可抑制致病性促炎 M1 型巨噬细胞极化,而下调或阻断 Tim-3 可导致 M1 反应增加,并增强炎症反应, Tim-3 过表达则通过降低 M1 型巨噬细胞的反应来减弱炎症^[17]。然而,在小鼠结核杆菌感染模型中证实, Tim-3 和 Galectin-9 相互作用诱导巨噬细胞活化,并通过产生促炎细胞因子 IL-1β 而控制巨噬细胞内结核分枝杆菌的生长^[18]。抑制 Tim-3 通路在脓毒症早期阶段加剧巨噬细胞的促炎反应和淋巴细胞的凋亡,增强脓毒症后期阶段巨噬细胞和 Th 向抗炎反应转变。结果表明, Galectin-9/Tim-3 信号通路通过调节固有免疫和适应性免疫广泛参与脓毒症的病理生理学机制^[19];过表达或抑制 Galectin-9 对巨噬细胞特定表面标志物表达、细胞因子分泌具有显著的影响^[20]。在本研究中,我们发现 Galectin-9 的表达受到 LPS 浓度的影响,在低剂量 LPS 的刺激下, Galectin-9 表达维持在稳定状态,之后随 LPS 浓度的升高而逐渐下降。有研究表明, Galectin-9/Tim-3

自分泌循环在干细胞功能中具有重要的作用,自分泌的 Galectin-9 与其受体 Tim-3 相互作用,并介导 Galectin-9 和其他细胞因子的合成与分泌^[21]。因此,我们检测了细胞培养液上清中 s-Galectin-9 的表达,发现 s-Galectin-9 表达随 LPS 浓度的增加而逐渐降低,提示细胞上清中不同浓度的 s-Galectin-9 与 RAW264.7 的极化相关,并通过阻断 Galectin-9 验证了 Galectin-9/Tim-3 信号通路在巨噬细胞极化中的作用机制。

有研究表明,使用 α -乳糖阻断 Galectin-9 信号通路加剧了疟原虫诱导的免疫性肺损伤, Galectin-9 与其多种受体的相互作用引起过度免疫反应,导致寄生虫相关性肺损伤的发生^[22]。我们使用 α -乳糖封闭 Galectin-9 信号,发现 Tim-3/Galectin-9 信号阻断时, M2 型极化的 RAW264.7 细胞较 LPS 处理组及空白对照组均明显减少,且巨噬细胞 M1/M2 型标志物的表达与 Galectin-9/Tim-3 信号强弱有关;同时 Galectin-9/Tim-3 的表达也随着胞外 Galectin-9 信号的抑制而逐渐减少。由此我们认为,来自细胞外的 s-Galectin-9 信号通过受体 Tim-3 介导了 RAW264.7 中 M2 型巨噬细胞表面标志物的表达,而不同浓度 LPS 诱导了细胞中 Galectin-9 分泌的差异。

综上所述, LPS 可以通过 Galectin-9/Tim-3 信号调控巨噬细胞 M1/M2 表型极化,低浓度 LPS 可以通过稳定 Galectin-9 的表达及分泌使巨噬细胞向 M2 表型极化,从而限制炎症的发展;高浓度 LPS 通过下调 Galectin-9 的表达和分泌使巨噬细胞向 M1 表型极化,从而促进炎症的发展。不同浓度的 LPS 对巨噬细胞炎症状态的影响不同,从而起到抗炎或促炎的作用, Galectin-9/Tim-3 信号通路成为脓毒症及其相关性 ARDS 治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 762-774. DOI: 10.1001/jama.2016.0288.
- [2] ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition [J]. *JAMA*, 2012, 307 (23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- [3] 乔良, 刘志. 按柏林新标准分析急诊脓毒症患者发生急性呼吸窘迫综合征的危险因素 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (7): 558-562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.004.
Qiao L, Liu Z. Analysis of the risk factors of acute respiratory distress syndrome of Berlin new definition in patients with sepsis in emergency department [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (7): 558-562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.004.
- [4] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (12): 953-964. DOI: 10.1038/nri1733.
- [5] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122 (3): 787-795. DOI: 10.1172/

- JCI59643.
- [6] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling [J]. *J Pathol*, 2013, 229 (2): 176-185. DOI: 10.1002/path.4133.
- [7] Aggarwal NR, King LS, D'Alessio FR. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306 (8): L709-725. DOI: 10.1152/ajplung.00341.2013.
- [8] Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4 (11): 1102-1110. DOI: 10.1038/ni988.
- [9] 张文凯, 吕洁萍, 强准, 等. 肺泡巨噬细胞在脓毒症急性肺损伤中的作用 [J]. *中国药物与临床*, 2013, 13 (7): 876-878. DOI: 10.11655/zgywylc.2013.07.017.
Zhang WK, Lyu JP, Qiang Z, et al. Role of alveolar macrophages in sepsis induced acute lung injury [J]. *Chin Remed Clin*, 2013, 13 (7): 876-878. DOI: 10.11655/zgywylc.2013.07.017.
- [10] Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT1 α /beta-dependent gene expression in macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3 (4): 392-398. DOI: 10.1038/ni774.
- [11] Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11 (11): 750-761. DOI: 10.1038/nri3088.
- [12] 屠国伟, 任杨华, 史懿, 等. 肺泡巨噬细胞亚型与急性肺损伤 [J]. *中国临床医学*, 2017, 24 (3): 470-475. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160807.
Tu GW, Ren YH, Shi Y, et al. Correlation between alveolar macrophage subtypes and acute lung injury [J]. *Chin J Clin Med*, 2017, 24 (3): 470-475. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160807.
- [13] 秦科, 邝晓聪, 孙煦勇, 等. 免疫抑制小鼠急性重症肺部感染中巨噬细胞亚型变化与乌司他丁调控效应 [J/CD]. *实用器官移植电子杂志*, 2016, 4 (1): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.009.
Qin K, Kuang XC, Sun XY, et al. Alterations of macrophage subsets and the regulation of ulinastatin in the immunosuppressed mouse with severe pulmonary infection [J/CD]. *Prac J Organ Transplant (Electronic Version)*, 2016, 4 (1): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.009.
- [14] Liu YC, Zou XB, Chai YF, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10 (5): 520-509. DOI: 10.7150/ijbs.8879.
- [15] Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, et al. The pathogenesis of sepsis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 19-48. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130327.
- [16] Johnston LK, Rims CR, Gill SE, et al. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47 (4): 417-426. DOI: 10.1165/rmb.2012-0090OC.
- [17] Jiang X, Yu J, Shi Q, et al. Tim-3 promotes intestinal homeostasis in DSS colitis by inhibiting M1 polarization of macrophages [J]. *Clin Immunol*, 2015, 160 (2): 328-335. DOI: 10.1016/j.clim.2015.07.008.
- [18] Sada-Ovalle I, Chávez-Galán L, Torre-Bouscoulet L, et al. The Tim3-galectin 9 pathway induces antibacterial activity in human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Immunol*, 2012, 189 (12): 5896-5902. DOI: 10.4049/jimmunol.1200990.
- [19] Zhao Z, Jiang X, Kang C, et al. Blockade of the T cell immunoglobulin and mucin domain protein 3 pathway exacerbates sepsis-induced immune deviation and immunosuppression [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 178 (2): 279-291. DOI: 10.1111/cei.12401.
- [20] Lv R, Bao Q, Li Y. Regulation of M1-type and M2-type macrophage polarization in RAW264.7 cells by Galectin-9 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (6): 9111-9119. DOI: 10.3892/mmr.2017.7719.
- [21] Kikushige Y, Miyamoto T, Yuda J, et al. A TIM-3/Gal-9 autocrine stimulatory loop drives self-renewal of human myeloid leukemia stem cells and leukemic progression [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17 (3): 341-352. DOI: 10.1016/j.stem.2015.07.011.
- [22] Liu J, Huang S, Su XZ, et al. Blockage of galectin-receptor interactions by α -lactose exacerbates plasmodium berghei-induced pulmonary immunopathology [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32024. DOI: 10.1038/srep32024.