

## C/EBP $\epsilon$ 对炎症和感染调控的研究进展

刘亚君<sup>1</sup> 陈涛<sup>1</sup> 梁华平<sup>2</sup>

<sup>1</sup>遵义医科大学附属医院重症医学科 563003; <sup>2</sup>陆军军医大学陆军特色医学中心战伤感染与特需药品研究室, 重庆 400042

通信作者: 陈涛, Email: 2395086838@qq.com

**【摘要】** 炎症和感染是造成危重病患者高病死率的主要原因之一, 传统治疗措施单一且局限。人 CCAAT/ 增强子结合蛋白 epsilon (C/EBP  $\epsilon$ ) 是调节中性粒细胞终末分化的关键转录因子, 它通过对炎症反应细胞的调控在抗炎、抗感染过程中起重要作用。本文通过对 C/EBP  $\epsilon$  在炎症和感染中的变化、相关调控机制以及相关针对性逆转加强措施进行综述, 旨在为发掘新的针对炎症及感染的治疗方向和有效治疗措施提供参考。

**【关键词】** 人 CCAAT/ 增强子结合蛋白 epsilon; 中性粒细胞; 炎症; 感染

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81871612)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.022

### Progress of human CCAAT/enhancer binding protein epsilon on inflammation and infection

Liu Yajun<sup>1</sup>, Chen Tao<sup>1</sup>, Liang Huaping<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Intensive Care Unit, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, Guizhou, China;

<sup>2</sup>Department of Wound Infection and Drug, Army Medical Center, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing 400042, China

Corresponding author: Chen Tao, Email: 2395086838@qq.com

**【Abstract】** Inflammation and infection are main causes of death in critically ill patients. But traditional treatment are non-comprehensive and limited. Human CCAAT/enhancer binding protein epsilon (C/EBP  $\epsilon$ ) is a key transcription factor regulating the terminal differentiation of neutrophils. It plays an important role in anti-inflammatory and anti-infective process by regulating inflammatory response cells. This article reviews the changes of C/EBP  $\epsilon$  in inflammation and infection, related regulatory mechanisms and targeted reversal measures, in order to provide references for exploring new directions and effective measures for inflammation and infection treatment.

**【Key words】** Human CCAAT/enhancer binding protein epsilon; Neutrophil; Infection; Inflammation

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81871612)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.10.022

炎症和感染在门诊及住院患者占比极大, 是多种危重病的直接病因和诱因, 发病率和病死率居高不下。目前临床上针对炎症和感染的有效干预措施比较单一且局限, 我们迫切需要寻找新的治疗方向和有针对性的治疗方法。众所周知, 中性粒细胞是机体响应炎症和感染而产生先天免疫的关键效应物, 与炎症和感染发生发展及其转归密切相关。而人 CCAAT/ 增强子结合蛋白 epsilon (C/EBP  $\epsilon$ ) 对中性粒细胞的终末分化极其重要, 参与调节从早幼粒细胞发育到成熟中性粒细胞的过渡阶段, 对反应性超氧化物、二级和三级颗粒形成必不可少<sup>[1]</sup>, 与中性粒细胞的吞噬能力和杀菌能力密切相关, 在抗炎、抗感染过程中起重要作用。C/EBP  $\epsilon$  表达增强可能提供一种独特的方法来增强个体对抗炎症和感染的能力<sup>[2]</sup>。现就近年来 C/EBP  $\epsilon$  在炎症和感染中的相关研究进展进行综述。

### 1 C/EBP $\epsilon$ 的基因结构

C/EBP  $\epsilon$  是一种髓样特异性转录因子, 仅在髓样细胞表达, 具有高度保守的基本 DNA 序列和亮氨酸拉链二聚化结构域, 与 C/EBP 蛋白共有 5'-ATTGCGCAAT-3' 序列<sup>[3]</sup>。C/EBP  $\epsilon$  基因编码 2 个启动子和 3 个外显子, 启动子和翻译起始位点的差异使用及外显子 2 的可变剪接导致 C/EBP  $\epsilon$

可编码 4 种具有不同反式激活潜力的同种型蛋白质, 相对分子质量分别为 32 000、30 000、27 000 和 14 000, 可与其他 C/EBP 蛋白结合相同的 DNA 靶点<sup>[4]</sup>。但这 4 种蛋白质在骨髓分化期间功能上有所不同, 相对分子质量 32 000、30 000 为转录激活, 相对分子质量 27 000 为转录抑制, 相对分子质量 14 000 为显性负调控<sup>[5]</sup>。骨髓中 C/EBP  $\epsilon$  以全长 32 000 蛋白质存在最广泛<sup>[1]</sup>, 其在所有同种型蛋白质中具有最大的反式激活潜力, 对中性粒细胞的终末分化影响最大。

### 2 C/EBP $\epsilon$ 在炎症和感染中的变化

当机体发生炎症或感染时, 机体的两大免疫系统即开始产生免疫细胞, 抵御这种病理学损伤。在炎症初期阶段, 固有免疫系统细胞如巨噬细胞、中性粒细胞及其他免疫蛋白等, 首先作为一线效应器对不同抗原进行清除, 并诱导损伤部位产生炎症反应, 随后特异性免疫细胞 (T 细胞、B 细胞) 出现并有效控制炎症反应<sup>[6]</sup>。先天免疫系统是机体的第一道防线, 中性粒细胞是先天免疫反应中最关键的效应细胞, 包括迁移至炎症部位、吞噬病原体、杀菌颗粒释放和中性粒细胞胞外陷阱形成。大量研究证实, 炎症和感染可导致体内 C/EBP  $\epsilon$  表达上调, 刺激未成熟中性粒细胞增殖分化, 尤其是中性粒细胞的终末分化, 诱导中性粒细胞产生白细胞介

素-8(IL-8)、髓过氧化物酶(MPO)、乳铁蛋白和反应性超氧化物,介导中性粒细胞迁移到炎症感染区域,快速脱颗粒并释放中性粒细胞胞外陷阱,发挥吞噬作用<sup>[7]</sup>。C/EBP $\epsilon$ 突变或缺失可导致中性粒细胞发育异常,包括吞噬和杀菌作用抑制、氧化反应受损、二级和三级颗粒蛋白 mRNA 缺陷以及对炎症刺激反应延迟,最终可导致中性粒细胞特异性颗粒缺乏症,患者表现为明显的中性粒细胞异常和复发性感染<sup>[8]</sup>,尤其是皮肤、耳、肺和淋巴结等非深部器官感染<sup>[9]</sup>。

### 3 C/EBP $\epsilon$ 对炎症和感染的调控

**3.1 C/EBP $\epsilon$  通过调节 lamin B 受体(LBR)基因表达,控制中性粒细胞核成熟:**中性粒细胞分化成熟的标志是核分割。LBR是一种内核膜蛋白,是中性粒细胞核分割、表达成熟中性粒细胞的特征性分叶形态所必需的核膜蛋白。C/EBP $\epsilon$ 可与LBR启动子结合,通过激活LBR启动子,转录翻译蛋白质LBR,促进中性粒细胞核分裂,进一步促进中性粒细胞分化成熟<sup>[10]</sup>,为机体对炎症和感染作出快速反应提供前提条件。

**3.2 C/EBP $\epsilon$  激活趋化因子并通过 Hlx(H2.0 同源盒样基因)赋予中性粒细胞趋化功能:**趋化因子具有定向细胞趋化作用,能促进多种炎症反应细胞的表达,并将其吸引到特定的炎症部位。C/EBP $\epsilon$ 在机体发生炎症时能激活编码IL-6、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、 $\beta$ -趋化因子、MIP-1 $\alpha$ 和MIP-1 $\beta$ 等基因的表达,产生趋化因子并引导炎症细胞快速到达炎症感染部位,吞噬包裹消灭炎症及感染<sup>[3]</sup>。C/EBP $\epsilon$ 还可通过Hlx赋予中性粒细胞趋化功能,使中性粒细胞快速作用于炎症部位,成为先天免疫关键效应物。在缺乏C/EBP $\epsilon$ 的情况下,中性粒细胞不仅分化不完全,且其中间细胞类型骨髓细胞生成中断,还表现出异常的趋化性,即响应趋化刺激的迁移能力受损。C/EBP $\epsilon$ 缺乏的中性粒细胞Hlx1 mRNA表达显著降低,而恢复C/EBP $\epsilon$ 缺乏细胞的Hlx1表达后,其功能部分恢复;虽然Hlx对中性粒细胞核形态、乳铁蛋白表达和“呼吸爆发”没有明显影响,但可以完全改善C/EBP $\epsilon$ 缺乏中性粒细胞的趋化性缺陷<sup>[11]</sup>,使其在趋化因子的引导下快速到达炎症部位发挥作用。

**3.3 C/EBP $\epsilon$  可增强中性粒细胞对病原体的吞噬能力:**中性粒细胞的吞噬能力取决于其引起“呼吸爆发”的能力和细胞质颗粒的合成能力<sup>[12]</sup>。C/EBP $\epsilon$ 缺乏的中性粒细胞“呼吸爆发”是异常的,其响应佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)产生超氧化物的能力显著降低,中性粒细胞和单核粒细胞产生的反应性超氧化物明显减少<sup>[2]</sup>。同时,C/EBP $\epsilon$ 缺陷细胞中可检测到的二级和三级颗粒蛋白几乎为零,二级和三级颗粒是维持还原型辅酶II(NADPH)氧化酶装置的膜结合元件的储库,提供 $\beta$ -整联蛋白的细胞内储备,响应中性粒细胞活化时快速上调,通过 $\beta$ -整联蛋白结合激活中性粒细胞,使二级和三级颗粒向细胞表面转运及内容物向细胞外空间分泌,二级和三级颗粒的缺失导致中性粒细胞的氧化反应,即“呼吸爆发”被削弱<sup>[4]</sup>,致使中性粒细胞在炎症和感染中的吞噬能力下降。且C/EBP $\epsilon$ 缺乏的中性粒细胞p47phox蛋白水平也显著降低,限制了NADPH氧化酶的组装<sup>[2]</sup>,抑制其氧化反应,进而抑制中性粒细胞的吞噬能

力,使中性粒细胞在炎症和感染中无法发挥其应有的作用。

**3.4 C/EBP $\epsilon$  能够提高中性粒细胞杀菌能力及机体对炎症和感染的抵抗能力:**成熟的中性粒细胞内含有许多预先形成的受体和存储在不同亚细胞器中的抗菌肽。这些抗菌肽与靶细胞膜融合,控制细胞从血管到炎症部位的外渗以及细胞感知、摄取和破坏微生物的能力。原发性(嗜天青)颗粒特征性地含有MPO;次级颗粒以其高含量的乳铁蛋白和转钴胺素-1标记,乳铁蛋白具有强大的杀菌、抗菌和免疫调节功能;三级颗粒由高含量的中性粒细胞明胶酶定义,可降解绝大多数细胞及微生物细胞外基质,还能激活生长因子,维持自身正常组织稳定<sup>[13]</sup>。这些颗粒的基因表达与C/EBP $\epsilon$ 密切相关,C/EBP $\epsilon$ 缺乏的中性粒细胞中未检测到乳铁蛋白和明胶酶 mRNA 表达,骨髓细胞中胶原酶 mRNA 水平也显著降低。研究表明,C/EBP位点突变使乳铁蛋白启动子活性降低35%;而C/EBP $\epsilon$ 过表达可使其活性增加3倍<sup>[2]</sup>,极大地提高了中性粒细胞的杀菌能力及机体对炎症和感染的抵抗能力。

**3.5 C/EBP $\epsilon$  缺乏导致机体对炎症刺激的反应速度下调:**C/EBP $\epsilon$ 几乎仅在造血系统中表达,特别是在骨髓谱系中,主要在中性粒细胞的终末分化和较小程度的巨噬细胞分化期间起作用<sup>[14]</sup>,通过其基本的亮氨酸拉链结构域二聚化与同源DNA序列结合,调节中性粒细胞的终末分化和特定颗粒基因的表达;同时参与巨噬细胞和T细胞的基因表达,并在EML-C1细胞株的髓样分化期间表达上调。C/EBP $\epsilon$ 缺乏的机体中性粒细胞终末分化缺陷和嗜酸粒细胞数量减少,粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和粒-巨噬细胞集落刺激因子受体(GM-CSFR)在骨髓细胞中的表达水平也明显降低<sup>[2]</sup>。C/EBP $\epsilon$ 缺乏导致多种粒细胞缺陷,包括响应体内炎症攻击的中性粒细胞、嗜酸粒细胞、巨噬细胞、T细胞及B细胞,导致炎症反应细胞的迁移延迟和杀菌能力降低。

### 4 调节 C/EBP $\epsilon$ 的药物在炎症和感染中的应用

**4.1 曲古抑菌素 A(TSA):**TSA源自链霉菌代谢产物,现被作为组蛋白去乙酰化酶(HDAC)泛抑制剂的代表,TSA有选择性细胞毒性作用,也可以发挥免疫调节作用。Muraoka等<sup>[9]</sup>研究表明,TSA通过HDAC I的脱乙酰化酶活性恢复C/EBP $\epsilon$ 缺乏中性粒细胞与Gata1之间的蛋白质-蛋白质的相互作用,允许C/EBP $\epsilon$ 缺乏中性粒细胞蛋白多糖2、嗜酸粒细胞主要碱性蛋白等表达其诱导活性,表明通过TSA调节HDAC活性调控中性粒细胞的终末分化,进而发挥抗炎、抗感染作用。TSA还能抑制炎症因子、凋亡因子的表达,减少细胞凋亡。总之,TSA可通过组蛋白和(或)转录因子的去乙酰化调节C/EBP $\epsilon$ 的转录活性,从而影响中性粒细胞的分化成熟,在炎症和感染的调控中发挥积极作用。

**4.2 4-氨基-2-三氟甲基-苯基视黄酸(ATPR):**ATPR是全反式维甲酸(ATRA)衍生物,在机体发育、细胞分化及维持内环境稳态方面广泛发挥作用。ATPR作为核受体配体,激活维甲酸受体和维甲酸X样受体形成二聚体,进而调控多种基因表达,诱导多种组织和细胞包括中性粒细胞分化

成熟。Wang 等<sup>[15]</sup>研究表明, ATPR 可通过降低真核起始因子 eIF6 的表达而抑制原癌基因 MYC 编码的转录因子 c-Myc 和细胞周期蛋白 D1 的蛋白水平, 显著促进 C/EBP  $\epsilon$  的表达, 进而产生大量功能性中性粒细胞以抵抗炎症和感染。

**4.3 他米巴罗汀 (Am80) 协同 G-CSF:** Am80 是维甲酸受体激动剂, 可选择性激活维甲酸受体  $\alpha$  以改变细胞周期抑制因子 p21 的转录, 以及 CD34<sup>+</sup> 前体和人急性早幼粒细胞白血病 NB4 细胞中的其他粒细胞分化调节因子, 包括终末粒细胞分化调节因子 C/EBP  $\epsilon$  的转录, 有效将中性粒细胞前体分化为功能性中性粒细胞, 提高中性粒细胞抗炎、抗感染能力。Li 等<sup>[16]</sup>研究表明, Am80-G-CSF 协同作用可以通过改变维甲酸-靶基因转录, 诱导产生较单独 Am80 作用更大量、更好形态、更多活性氧物质和更强杀菌能力的功能性中性粒细胞, 以抵挡炎症和感染。Am80-G-CSF 可介导中性粒细胞分化相关的先天免疫发展过程, 在不引起骨髓过度扩张的前提下, 产生足够数量中性粒细胞, 并增强中性粒细胞杀菌能力和吞噬作用, 以快速高效地控制炎症和感染。

**4.4 维生素 B3:** 维生素 B3 属于 B 族维生素, 参与体内脂质代谢、组织氧化呼吸和糖类无氧分解的过程。杨湖等<sup>[17]</sup>研究表明, 高剂量维生素 B3 可使血清烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 水平显著升高, 骨髓单个核细胞中 G-CSF、G-CSFR、去乙酰化酶 1 (SIRT1)、C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\epsilon$  和烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 的 mRNA 表达明显增加, 大剂量维生素 B3 可依赖 NAMPT-NAD<sup>+</sup>-SIRT1 信号通路, 在稳定状态下增加中性粒细胞数量, 激活抗炎、抗感染机制以维持机体稳态。

## 5 总结和展望

中性粒细胞是炎症和感染的关键效应细胞, 与炎症和感染的发生发展及转归密切相关。C/EBP  $\epsilon$  是中性粒细胞终末分化的核心转录调节因子, 在炎症和感染的调控中发挥重要作用。因此, 深入研究 C/EBP  $\epsilon$  对中性粒细胞的作用对于抗炎、抗感染具有十分重要的临床意义。目前已知的 C/EBP  $\epsilon$  在炎症和感染相关方面的基因调控机制主要有: ① C/EBP  $\epsilon$  的 N-末端区域对中性粒细胞生长停滞和功能分化必不可少<sup>[5]</sup>; ② 激活转录因子 4 (ATF4) 蛋白是 C/EBP  $\epsilon$  的主要伴侣<sup>[18]</sup>; ③ 乙酰化是终末中性粒细胞分化先决条件<sup>[1]</sup>; ④ Trem1 是粒细胞生成过程中 C/EBP  $\epsilon$  下游转录靶标<sup>[7]</sup>。推测 C/EBP  $\epsilon$  在炎症和感染调控的研究趋势可能是: ① 使用现代分子生物学技术揭示 C/EBP  $\epsilon$  调控中性粒细胞分化机制而发挥抗炎、抗感染作用; ② 研发新型 C/EBP  $\epsilon$  因子激活剂, 有效提高中性粒细胞缺乏症患者存活率, 有效控制炎症和感染; ③ 深入研究 C/EBP  $\epsilon$  介导的信号通路以找到新的干预措施, 从而为调控炎症和感染提供新的方向及新的治疗方案。目前 C/EBP  $\epsilon$  在炎症和感染调控方面的相关性研究尚在起步阶段, 相信随着研究的深入, 其分子机制将不断被揭示, 新的治疗方向和有效的干预措施也将不断被发掘。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

[1] Bartels M, Govers AM, Fleskens V, et al. Acetylation of C/EBP  $\epsilon$  is a prerequisite for terminal neutrophil differentiation [J]. *Blood*, 2015,

125 (11): 1782-1792. DOI: 10.1182/blood-2013-12-543850.

- [2] Verbeek W, Lekstrom-Himes J, Park DJ, et al. Myeloid transcription factor C/EBPepsilon is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils [J]. *Blood*, 1999, 94 (9): 3141-3150.
- [3] Williams SC, Du Y, Schwartz RC, et al. C/EBPepsilon is a myeloid-specific activator of cytokine, chemokine, and macrophage-colony-stimulating factor receptor genes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (22): 13493-13501. DOI: 10.1074/jbc.273.22.13493.
- [4] Lekstrom-Himes JA. The role of C/EBP (epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation [J]. *Stem Cells*, 2001, 19 (2): 125-133. DOI: 10.1634/stemcells.19-2-125.
- [5] Nakajima H, Watanabe N, Shibata F, et al. N-terminal region of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon is critical for cell cycle arrest, apoptosis, and functional maturation during myeloid differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (20): 14494-14502. DOI: 10.1074/jbc.M600575200.
- [6] 何流漾, 郑建洲, 夏蕾, 等. 炎症反应在 ARDS 中的作用机制研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (7): 651-655. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.017.
- [7] He LY, Zheng JZ, Xia L, et al. Research advances of the role of inflammatory responses in ARDS [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29 (7): 651-655. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.07.017.
- [8] Suh HC, Benoukraf T, Shyamsunder P, et al. LPS independent activation of the pro-inflammatory receptor Trem1 by C/EBP  $\epsilon$  in granulocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46440. DOI: 10.1038/srep46440.
- [9] Wada T, Akagi T, Muraoka M, et al. A novel in-frame deletion in the leucine zipper domain of C/EBP  $\epsilon$  leads to neutrophil-specific granule deficiency [J]. *J Immunol*, 2015, 195 (1): 80-86. DOI: 10.4049/jimmunol.1402222.
- [10] Muraoka M, Akagi T, Ueda A, et al. C/EBP  $\epsilon$   $\Delta$ RS derived from a neutrophil-specific granule deficiency patient interacts with HDAC1 and its dysfunction is restored by trichostatin A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516 (1): 293-299. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.06.130.
- [11] Malu K, Garhwal R, Pelletier MG, et al. Cooperative activity of GABP with PU.1 or C/EBP  $\epsilon$  regulates lamin B receptor gene expression, implicating their roles in granulocyte nuclear maturation [J]. *J Immunol*, 2016, 197 (3): 910-922. DOI: 10.4049/jimmunol.1402285.
- [12] Halene S, Gaines P, Sun H, et al. C/EBPepsilon directs granulocytic-vs-monocytic lineage determination and confers chemotactic function via Hlx [J]. *Exp Hematol*, 2010, 38 (2): 90-103. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.11.004.
- [13] Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils [J]. *Immunol Rev*, 2016, 273 (1): 11-28. DOI: 10.1111/imr.12440.
- [14] Serwas NK, Huemer J, Dieckmann R, et al. CEBPE-mutant specific granule deficiency correlates with aberrant granule organization and substantial proteome alterations in neutrophils [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 588. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00588.
- [15] Tang JG, Koeffler HP. Structural and functional studies of CCAAT/enhancer-binding protein epsilon [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (21): 17739-17746. DOI: 10.1074/jbc.M011546200.
- [16] Wang K, Wang C, Zhu CJ, et al. 4-Amino-2-Trifluoromethyl-Phenyl Retinate induced leukemia cell differentiation by decreasing eIF6 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503 (3): 2033-2039. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.153.
- [17] Li L, Qi X, Sun W, et al. Am80-G-CSF synergizes myeloid expansion and differentiation to generate functional neutrophils that reduce neutropenia-associated infection and mortality [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8 (11): 1340-1359. DOI: 10.15252/emmm.201606434.
- [18] 杨湖, 蓝丹, 王梦婕, 等. 大剂量维生素 B3 促进正常大鼠中性粒细胞生成及其作用机制的研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2014, 35 (10): 931-935. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.10.013.
- [19] Yang H, Lan D, Wang MJ, et al. Effect and mechanism of high-dose vitamin B3 on granulopoiesis in normal rat [J]. *Chin J Hematol*, 2014, 35 (10): 931-935. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.10.013.
- [20] Gombart AF, Grewal J, Koeffler HP. ATF4 differentially regulates transcriptional activation of myeloid-specific genes by C/EBPepsilon and C/EBPalpha [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81 (6): 1535-1547. DOI: 10.1189/jlb.0806516.

(收稿日期: 2019-08-19)