

• 论著 •

细胞色素 P450 1A1 对巨噬细胞吞噬功能的调控作用及机制研究

田李星¹ 万凌辉² 朱俊宇³ 梁华平³

¹陆军军医大学边防卫勤训练大队军事预防医学教研室,新疆维吾尔自治区呼图壁 831200;

²陆军军医大学边防卫勤训练大队基础医学教研室,新疆维吾尔自治区呼图壁 831200;³陆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:梁华平,Email:13638356728@163.com

【摘要】目的 探讨细胞色素 P450 1A1(CYP1A1)对巨噬细胞吞噬大肠杆菌(*E.coli*)能力的调控作用及机制。**方法** ①体外培养小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞株RAW264.7(RAW),用感染复数(MOI)为30的*E.coli*刺激细胞40 min,并设甘油对照组,观察感染时CYP1A1的表达变化。②体外培养CYP1A1过表达RAW细胞(CYP1A1/Raw)、CYP1A1敲除RAW细胞(CYP1A1 KO/Raw),用MOI为30的*E.coli*刺激细胞40 min,并以阴性对照RAW细胞(NC/Raw)为对照,观察细胞吞噬功能与CYP1A1表达的关系,以及CYP1A1对吞噬受体〔清道夫受体A(SR-A)〕及其信号通路〔丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)通路〕的调控作用。③体外培养NC/Raw、CYP1A1 KO/Raw细胞,用1 μmol/L细胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂U0126预处理2 h后,再用MOI为30的*E.coli*刺激细胞40 min,并设磷酸盐缓冲液(PBS)对照组,观察CYP1A1是否通过调节MAPK通路调控巨噬细胞的吞噬功能。④体外培养RAW细胞,用100 nmol/L的CYP1A1羟化酶活性产物12(S)-羟基二十碳四烯酸〔12(S)-HETE〕预处理2 h后,再用MOI为30的*E.coli*刺激细胞40 min,并设PBS对照组,观察巨噬细胞的吞噬功能是否与CYP1A1羟化酶代谢产物有关。⑤体外培养CYP1A1过表达且羟化酶活性位点突变的RAW细胞(CYP1A1m/Raw),用MOI为30的*E.coli*刺激细胞40 min,并设CYP1A1/Raw对照组,观察巨噬细胞的吞噬功能是否与CYP1A1羟化酶活性有关。**结果** ①与甘油对照组相比,*E.coli*刺激后RAW细胞中CYP1A1 mRNA表达显著增加($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 7.79 ± 0.71 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),提示CYP1A1可能参与调控感染进程。②与NC/Raw细胞相比,*E.coli*刺激40 min后CYP1A1/Raw细胞吞噬*E.coli*菌落数明显降低($\times 10^3$ CFU/mL: 4.67 ± 3.06 比 15.67 ± 5.03 , $P < 0.05$),而CYP1A1 KO/Raw细胞吞噬*E.coli*菌落数则显著增加($\times 10^3$ CFU/mL: 46.00 ± 5.29 比 15.67 ± 5.03 , $P < 0.05$),说明CYP1A1可负性调控巨噬细胞吞噬功能。同时,与NC/Raw细胞相比,CYP1A1/Raw细胞中SR-A mRNA表达明显下调($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.31 ± 0.03 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),且ERK的活化水平明显降低;而CYP1A1 KO/Raw细胞中SR-A mRNA表达明显上调($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.74 ± 0.25 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),且ERK活化增强,说明CYP1A1可以负性调控吞噬受体及其信号通路。③与PBS相比,U0126预处理可显著抑制CYP1A1敲除诱导的SR-A mRNA表达上调($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.62 ± 0.05 比 4.38 ± 0.39 , $P < 0.05$),ERK活化水平也被抑制,同时可阻遏CYP1A1敲除导致的巨噬细胞吞噬能力增强〔细胞吞噬*E.coli*菌落数($\times 10^3$ CFU/mL): 12.67 ± 1.15 比 45.33 ± 4.16 , $P < 0.05$ 〕,说明CYP1A1可通过抑制ERK活化而减弱巨噬细胞的吞噬功能。④与PBS相比,12(S)-HETE预处理后,RAW细胞的吞噬功能并无明显变化〔细胞吞噬*E.coli*菌落数($\times 10^3$ CFU/mL): 17.00 ± 1.00 比 16.33 ± 2.52 , $P > 0.05$ 〕,说明CYP1A1对巨噬细胞吞噬功能的调控作用可能并非通过其羟化酶代谢产物12(S)-HETE实现。⑤与单纯过表达CYP1A1的RAW细胞相比,CYP1A1m/Raw细胞的吞噬功能并无明显变化〔细胞吞噬*E.coli*菌落数($\times 10^3$ CFU/mL): 3.67 ± 1.15 比 3.33 ± 0.58 , $P > 0.05$ 〕,说明CYP1A1也并非通过其羟化酶活性来调控巨噬细胞的吞噬功能。**结论** CYP1A1可通过抑制ERK活化降低SR-A表达,从而负性调控巨噬细胞的吞噬功能,但此调控效应与CYP1A1羟化酶活性及其致炎产物12(S)-HETE均无关。

【关键词】 细胞色素 P450 1A1; 大肠杆菌; 巨噬细胞; 吞噬

基金项目: 陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2021XQN11);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0234)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220825-00785

Effect and mechanism of cytochrome P450 1A1 on regulating phagocytosis of macrophage

Tian Lixing¹, Wan Linghui², Zhu Junyu³, Liang Huaping³

¹Department of Military Preventive Medicine, Frontier Medical Service Training Brigade, Army Medical University, Hutubi 831200, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Basic Medicine, Frontier Medical Service Training Brigade, Army Medical University, Hutubi 831200, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ³Department of Wound Infection and Drug, Army Medical Center, Army Medical University, Chongqing 400042, China

Corresponding author: Liang Huaping, Email: 13638356728@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) on regulating phagocytosis of macrophage treated with *Escherichia coli* (*E.coli*). **Methods** ① The mouse leukemia cells lines of monocyte macrophage RAW264.7 (RAW) were cultured *in vitro* and treated with 30 multiplicity of infection (MOI) dosages of *E.coli* for 40 minutes, glycerin control group was set up to observe the change of CYP1A1 during infection. ② The RAW cells with CYP1A1 overexpression (CYP1A1/RAW) and knock out (CYP1A1 KO/RAW) were cultured *in vitro* and treated with 30 MOI *E.coli* for 40 minutes, while the negative controlled RAW cells (NC/RAW) were established as control to observe the relationship between cell phagocytosis and CYP1A1 expression, and the effect of CYP1A1 on phagocytic receptor [scavenger receptor-A (SR-A)] and its signal pathway [mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway]. ③ NC/RAW and CYP1A1 KO/RAW cells were cultured *in vitro* and pretreated with 1 μmol/L extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor (U0126) for 2 hours, and then treated with 30 MOI *E.coli* for 40 minutes, phosphate buffered solution (PBS) control group was set up to observe whether the effect of CYP1A1 on phagocytosis through controlled the MAPK pathway. ④ The RAW cells were cultured *in vitro* and pretreated with 100 nmol/L CYP1A1 hydroxylase active product 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid [12(S)-HETE] for 2 hours, and then treated with 30 MOI *E.coli* for 40 minutes, and PBS control group was set up to observe whether the effect of CYP1A1 on phagocytosis was related to CYP1A1 hydroxylating metabolite. ⑤ The RAW cells with overexpression CYP1A1 hydroxylase-activity mutation (CYP1A1m/RAW) were cultured *in vitro* and treated with 30 MOI *E.coli* for 40 minutes, the CYP1A1/RAW cells were set up as control group to observe whether the effect of CYP1A1 on phagocytosis was related to CYP1A1 hydroxylase-activity. **Results** ① Compared with glycerin control group, CYP1A1 mRNA expression was significantly increased by *E.coli* stimulation ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 7.79 ± 0.71 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), indicating that CYP1A1 might participate in regulating infection progress. ② Compared with NC/RAW cells, the number of *E.coli* colonies phagocytized by CYP1A1/RAW cells was significantly decreased after 40 minutes of *E.coli* stimulation ($\times 10^3$ CFU/mL: 4.67 ± 3.06 vs. 15.67 ± 5.03 , $P < 0.05$), while CYP1A1 KO/RAW cells had a significant increase in the number of *E.coli* colonies phagocytized ($\times 10^3$ CFU/mL: 46.00 ± 5.29 vs. 15.67 ± 5.03 , $P < 0.05$), suggesting that CYP1A1 might negatively control macrophage phagocytosis function. Meanwhile, compared with NC/RAW cells, the expression of SR-A mRNA in CYP1A1/RAW cells was significantly down-regulated ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.31 ± 0.03 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), and the activation level of ERK was significantly reduced. However, the expression of SR-A mRNA in CYP1A1 KO/RAW cells was significantly up-regulated ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 3.74 ± 0.25 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), and the activation of ERK was enhanced, indicating that CYP1A1 could negatively regulate phagocytic receptors and their signaling pathways. ③ Compared with PBS, U0126 pretreatment significantly inhibited the CYP1A1 knockout induced upregulation of SR-A mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.62 ± 0.05 vs. 4.38 ± 0.39 , $P < 0.05$) and ERK activation, and inhibited the enhancement of phagocytosis in macrophages induced by CYP1A1 knock out [*E.coli* colonies phagocytized by cells ($\times 10^3$ CFU/mL): 12.67 ± 1.15 vs. 45.33 ± 4.16 , $P < 0.05$], suggesting that CYP1A1 inhibited macrophage phagocytosis function by regulating ERK activation. ④ Compared with PBS, the phagocytosis of RAW cells pretreated with 12(S)-HETE did not change significantly [*E.coli* colonies phagocytized by cells ($\times 10^3$ CFU/mL): 17.00 ± 1.00 vs. 16.33 ± 2.52 , $P > 0.05$], suggesting that CYP1A1 might not control phagocytosis function by its hydroxylase-activity metabolism 12(S)-HETE. ⑤ Compared with CYP1A1/RAW cells, there was no significant change in the phagocytic function of CYP1A1m/RAW cells [*E.coli* colonies phagocytized by cells ($\times 10^3$ CFU/mL): 3.67 ± 1.15 vs. 3.33 ± 0.58 , $P > 0.05$], suggesting that CYP1A1 might not control phagocytosis function by its hydroxylase-activity. **Conclusion** CYP1A1 can negatively regulate the phagocytosis of macrophages by inhibiting the activation of ERK and reducing the expression of SR-A, but this regulatory effect is not related to the activity of CYP1A1 hydroxylase and its pro-inflammatory metabolism 12(S)-HETE.

【Key words】 Cytochrome P450 1A1; *Escherichia coli*; Macrophage; Phagocytosis

Fund program: Science and Technology Innovation Enhancement Project of Army Medical University (2021XQN11); Natural Science Foundation of Chongqing (General Program, cstc2021jcyj-msxmX0234)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220825-00785

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是一种单加氧酶, 其家族成员 CYP1A1 可催化代谢多种内外源性有害异物, 主要分布在肺脏、肠道及肝脏中, 可在多种致炎物质诱导下表达增高^[1-3]。以往研究大多关注 CYP1A1 代谢产物的致癌作用, 但近年越来越多的研究开始将其与免疫调控联系起来^[4-7]。巨噬细胞作为重要的免疫效应细胞, 在感染性疾病尤其是脓毒症中具有重要的调控作用, 其非特异性免疫功能, 如杀菌吞噬等, 在机体前期抵御外界病原体入侵的过程中发挥了相当重要的作用。当病原体入侵时, 巨噬细胞可以分泌大量炎症因子以杀灭

病原体, 同时其表面的吞噬受体可识别病原体并介导巨噬细胞发挥吞噬作用, 从而清除机体面临的感染威胁^[8]。本课题组前期研究已证实, 炎症刺激时巨噬细胞中的 CYP1A1 表达增高, 并可以促使巨噬细胞中的诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 生成过量的一氧化氮 (nitric oxide, NO), 从而加重炎症反应^[9], 但 CYP1A1 对感染时巨噬细胞吞噬功能的调控作用及具体机制仍不明确。本研究旨在探讨 CYP1A1 对巨噬细胞吞噬功能的调控作用及机制, 进而为防治脓毒症等感染性疾病寻找新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养方法: 小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞株 RAW264.7(RAW)由陆军军医大学陆军特色医学中心提供; 阴性对照 RAW 细胞(negative controlled RAW, NC/Raw)、CYP1A1 过表达 RAW 细胞(CYP1A1/Raw)、CYP1A1 敲除 RAW 细胞(CYP1A1 knock out RAW, CYP1A1 KO/Raw)以及 CYP1A1 过表达且羟化酶活性位点突变的 RAW 细胞(CYP1A1 mutation RAW, CYP1A1m/Raw)均委托广州赛业生物科技有限公司制作并插入嘌呤霉素抗性基因。以上经过基因编辑的细胞均培养在含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素、5 mg/L 嘌呤霉素的 RPMI 1640 培养基中备用。

1.2 实验分组设计: 以每孔 5×10^5 个细胞的密度将细胞铺至 6 孔板, 置于 37 °C 恒温箱中培养 12 h。采用完全随机设计方法分组处理, 符合伦理学标准, 并获得陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审批(审批号: AMUWEC20223482)。

1.2.1 大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E.coli*)对 RAW 细胞中 CYP1A1 表达的影响: 将采用甘油储藏的感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 30 的 *E.coli* 加入 RAW 细胞刺激 40 min(RAW+*E.coli* 组), 设 RAW+ 甘油组。收集细胞, 采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测细胞中 CYP1A1 mRNA 表达, 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测细胞中 CYP1A1 蛋白表达。

1.2.2 CYP1A1 对 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 能力的影响: 将 MOI 为 30 的 *E.coli* 加入 NC/Raw、CYP1A1/Raw、CYP1A1 KO/Raw 细胞刺激 40 min(NC/Raw+*E.coli* 组、CYP1A1/Raw+*E.coli* 组、CYP1A1 KO/Raw+*E.coli* 组), 然后更换为含 50 mg/L 庆大霉素的 RPMI 1640 培养基继续培养 1 h 以杀灭细胞表面黏附细菌, 用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗 3 次, 用无菌 LB 培养基收集细胞, 采用菌落计数法检测细胞内 *E.coli* 菌落数, 以反映细胞吞噬能力。

1.2.3 CYP1A1 对 *E.coli* 刺激下 RAW 细胞中吞噬受体清道夫受体 A(scavenger receptor-A, SR-A)表达及其信号通路的影响: 另取 NC/Raw、CYP1A1/Raw、CYP1A1 KO/Raw 细胞, 细胞分组、*E.coli* 刺激及细胞收集等方法同 1.2.2。采用 RT-PCR 检测细胞中 SR-A mRNA 表达, 采用 Western blotting 检测细胞中 SR-A 蛋白表达及丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路中细胞外信号调节激酶

(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p38MAPK 的活化水平。

1.2.4 ERK 抑制剂对 CYP1A1 敲除时 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 能力的影响: 分别使用 PBS 及 1 μmol/L 的 ERK 抑制剂 U0126 预处理 NC/Raw 细胞(NC/Raw+PBS+*E.coli* 组、NC/Raw+U0126+*E.coli* 组)和 CYP1A1 KO/Raw 细胞(CYP1A1 KO/Raw+PBS+*E.coli* 组、CYP1A1 KO/Raw+U0126+*E.coli* 组)2 h, 再用 *E.coli* 刺激, *E.coli* 刺激及细胞收集等方法同 1.2.2。采用 RT-PCR 检测细胞中 SR-A mRNA 表达, 采用 Western blotting 检测细胞中 SR-A 蛋白表达及 MAPK 信号通路的活化水平, 采用菌落计数法检测细胞内 *E.coli* 菌落数, 以反映细胞吞噬能力。

1.2.5 CYP1A1 羟化酶活性产物 12(S)-羟基二十碳四烯酸[12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid, 12(S)-HETE]对 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 能力的影响: 分别使用 100 nmol/L 的 12(S)-HETE 以及等量的 PBS 预处理普通 RAW 细胞 2 h, 再用 *E.coli* 刺激(RAW+PBS+*E.coli* 组和 RAW+12(S)-HETE+*E.coli* 组)。收集细胞, 检测 RAW 细胞的吞噬能力, *E.coli* 刺激、细胞收集及吞噬能力检测等方法同 1.2.2。

1.2.6 CYP1A1 羟化酶活性对 RAW 吞噬 *E.coli* 能力的影响: 用 *E.coli* 分别刺激 NC/Raw、CYP1A1/Raw、CYP1A1m/Raw 细胞(NC/Raw+*E.coli* 组、CYP1A1/Raw+*E.coli* 组及 CYP1A1m/Raw+*E.coli* 组)。收集细胞, 检测 RAW 细胞的吞噬能力, *E.coli* 刺激、细胞收集及吞噬能力检测等方法同 1.2.2。

1.3 指标检测方法

1.3.1 菌落计数法检测细胞内 *E.coli* 菌落数: 取 1 mL 细胞悬液稀释 100 倍至 1 mL 无菌 LB 培养基中, 置于冰上, 每组取 100 μL 稀释液均匀涂至 LB 琼脂平板上, 然后置于 37 °C 恒温箱培养 18 h。取出平板, 进行菌落计数, 再乘以相应稀释倍数进行反算, 获得实际细菌载量。

1.3.2 RT-PCR 检测 CYP1A1 及 SR-A 的 mRNA 表达: 提取细胞总 RNA, 定量至 500 mg/L, 取 1 μg 总 RNA, 反转录为 cDNA 后上机扩增。探针及引物均由上海生工生物工程有限公司设计合成。以 β- 肌动蛋白(β-actin)作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CYP1A1 及 SR-A 的 mRNA 表达量。

1.3.3 Western blotting 检测 CYP1A1、SR-A 的蛋白表达及 MAPK 通路活化水平: 取细胞悬液, 500 × g 离心 5 min 得到细胞团块, 用 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋

白,采用BCA法进行蛋白定量;蛋白煮沸5 min后上样,电泳40 min后,以110 V参数电转90 min,加入4%脱脂牛奶或4%牛血清白蛋白封闭1 h, PBS洗净后加入一抗孵育过夜(4 °C),次日加入二抗室温孵育1 h,使用化学发光成像系统曝光。

1.4 统计学分析:采用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 E.coli刺激可增加RAW细胞中CYP1A1表达: RAW+E.coli组细胞中CYP1A1的mRNA表达明显高于RAW+甘油组($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 7.79 ± 0.71 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$),蛋白条带也较RAW+甘油组更深(图1),提示CYP1A1可能参与调控感染进程。

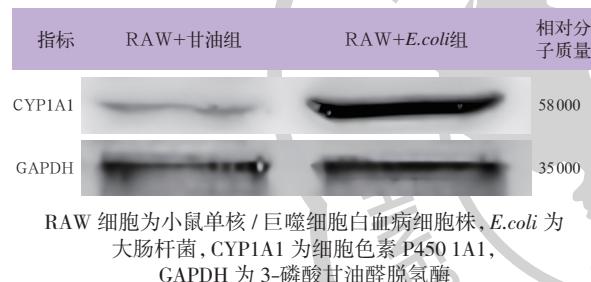


图1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测两组RAW细胞经甘油或E.coli刺激40 min后CYP1A1的蛋白表达

2.2 CYP1A1可负性调控RAW细胞对E.coli的吞噬能力(表1):CYP1A1/Raw+E.coli组RAW细胞吞噬E.coli菌落数明显低于NC/Raw+E.coli组($P < 0.05$);而CYP1A1 KO/Raw+E.coli组细胞吞噬E.coli菌落数明显高于NC/Raw+E.coli组($P < 0.05$)。说明CYP1A1可负性调控RAW细胞的吞噬功能,即当CYP1A1高表达时可抑制RAW细胞吞噬E.coli的能力,而敲除CYP1A1则可增强RAW细胞吞噬E.coli的能力。

表1 各组RAW细胞经E.coli刺激40 min后吞噬细菌数量及细胞中SR-A mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	吞噬E.coli菌落数 ($\times 10^3$ CFU/mL)	SR-A mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
NC/Raw+E.coli组	3	15.67 ± 5.03	1.00 ± 0.00
CYP1A1/Raw+E.coli组	3	4.67 ± 3.06^a	0.31 ± 0.03^a
CYP1A1 KO/Raw+E.coli组	3	46.00 ± 5.29^a	3.74 ± 0.25^a

注:RAW细胞为小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞株,NC/Raw为阴性对照RAW细胞,CYP1A1/Raw为细胞色素P450 1A1(CYP1A1)过表达RAW细胞,CYP1A1 KO/Raw为CYP1A1敲除RAW细胞,E.coli为大肠杆菌,SR-A为清道夫受体A,CFU为菌落形成单位;与NC/Raw+E.coli组比较, $^aP < 0.05$

2.3 CYP1A1可负性调控E.coli刺激下RAW细胞中SR-A的表达(表1;图2):CYP1A1/Raw+E.coli组细胞中SR-A mRNA表达显著低于NC/Raw+E.coli组($P < 0.05$),蛋白条带也较NC/Raw+E.coli组更浅;而CYP1A1 KO/Raw+E.coli组细胞中SR-A mRNA表达则明显高于NC/Raw+E.coli组($P < 0.05$),蛋白条带也较NC/Raw+E.coli组更深。说明感染时高表达的CYP1A1可能通过下调SR-A表达以抑制巨噬细胞的吞噬功能。

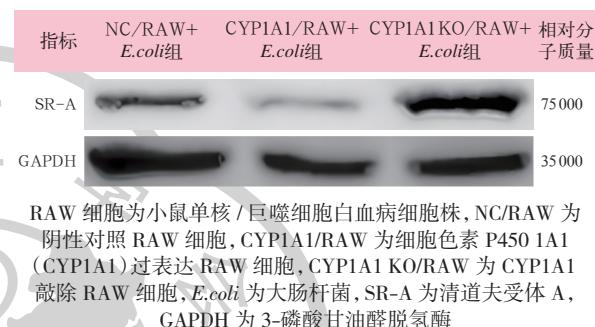
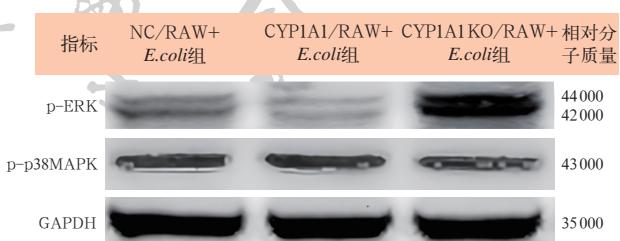


图2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组RAW细胞经E.coli刺激40 min后SR-A的蛋白表达

2.4 CYP1A1可负性调控E.coli刺激下RAW细胞中MAPK通路活化水平(图3): MAPK通路中ERK及p38MAPK主要负责调控SR-A表达。CYP1A1/Raw+E.coli组细胞中ERK磷酸化水平低于NC/Raw+E.coli组;而CYP1A1 KO/Raw+E.coli组细胞中ERK磷酸化水平则高于NC/Raw+E.coli组。各组另一调控因子p38MAPK磷酸化水平无明显差异。说明CYP1A1可能通过MAPK信号通路中的ERK调控巨噬细胞中SR-A的表达,进而影响其吞噬能力。



RAW细胞为小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞株,NC/Raw为阴性对照RAW细胞,CYP1A1/Raw为细胞色素P450 1A1(CYP1A1)过表达RAW细胞,CYP1A1 KO/Raw为CYP1A1敲除RAW细胞,E.coli为大肠杆菌,p-ERK为磷酸化细胞外信号调节激酶,p-p38MAPK为磷酸化p38丝裂素活化蛋白激酶,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶

图3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组RAW细胞经E.coli刺激40 min后p-ERK及p-p38MAPK的蛋白表达

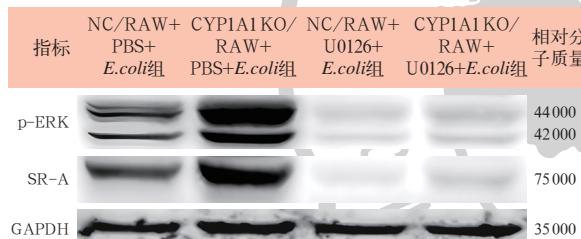
2.5 ERK抑制剂可阻遏CYP1A1敲除引起的RAW细胞吞噬能力增强现象(表2;图4):CYP1A1 KO/Raw+U0126+E.coli组细胞中SR-A mRNA表达及

细胞吞噬 *E.coli* 菌落数均较 CYP1A1 KO/RAW+PBS+*E.coli* 组明显降低(均 $P < 0.05$), SR-A 蛋白及 ERK 磷酸化水平也较 CYP1A1 KO/RAW+PBS+*E.coli* 组显著下降。进一步证明 CYP1A1 可能通过 ERK 调控巨噬细胞的吞噬功能。

表 2 不同预处理各组 RAW 细胞经 *E.coli* 刺激 40 min 后 SR-A mRNA 表达和吞噬细菌数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	SR-A mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	吞噬 <i>E.coli</i> 菌落数 ($\times 10^3$ CFU/mL)
NC/RAW+PBS+ <i>E.coli</i> 组	3	1.00±0.00	16.00±2.00
CYP1A1 KO/RAW+PBS+ <i>E.coli</i> 组	3	4.38±0.39 ^a	45.33±4.16 ^a
NC/RAW+U0126+ <i>E.coli</i> 组	3	0.47±0.07	8.33±1.53
CYP1A1 KO/RAW+U0126+ <i>E.coli</i> 组	3	0.62±0.05 ^b	12.67±1.15 ^b

注:RAW 细胞为小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞株, NC/RAW 为阴性对照 RAW 细胞, CYP1A1 KO/RAW 为细胞色素 P450 1A1(CYP1A1) 敲除 RAW 细胞, PBS 为磷酸盐缓冲液, *E.coli* 为大肠杆菌, U0126 为细胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂, SR-A 为清道夫受体 A, CFU 为菌落形成单位;与 NC/RAW+PBS+*E.coli* 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CYP1A1 KO/RAW+PBS+*E.coli* 组比较, ^b $P < 0.05$



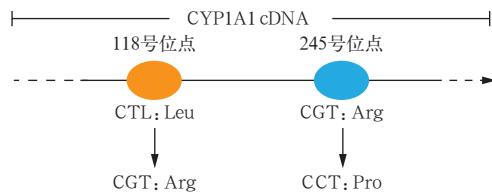
RAW 细胞为小鼠单核/巨噬细胞白血病细胞株, NC/RAW 为阴性对照 RAW 细胞, CYP1A1 KO/RAW 为细胞色素 P450 1A1(CYP1A1) 敲除 RAW 细胞, PBS 为磷酸盐缓冲液, *E.coli* 为大肠杆菌, U0126 为细胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂, p-ERK 为磷酸化 ERK, SR-A 为清道夫受体 A, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测不同预处理各组 RAW 细胞经 *E.coli* 刺激 40 min 后 p-ERK 及 SR-A 的蛋白表达

2.6 CYP1A1 羟化酶活性产物 12(S)-HETE 不影响 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 的能力: RAW+12(S)-HETE+*E.coli* 组细胞吞噬 *E.coli* 菌落数与 RAW+PBS+*E.coli* 组差异无统计学意义($\times 10^3$ CFU/mL: 17.00 ± 1.00 比 16.33 ± 2.52 , $P > 0.05$), 提示 12(S)-HETE 并不能抑制 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 的能力。说明 CYP1A1 对 RAW 细胞吞噬功能的调控作用可能不是通过其羟化酶产物 12(S)-HETE 实现的。

2.7 CYP1A1 羟化酶活性不影响 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 的能力: CYP1A1/RAW+*E.coli* 组细胞吞噬 *E.coli* 菌落数较 NC/RAW+*E.coli* 组明显降低($\times 10^3$ CFU/mL: 3.33 ± 0.58 比 16.67 ± 3.21 , $P < 0.05$); 而 CYP1A1m/RAW+*E.coli* 组与 CYP1A1/RAW+*E.coli* 组差异无统计学意义($\times 10^3$ CFU/mL: 3.67 ± 1.15 比 3.33 ± 0.58 , $P > 0.05$), 提示过表达 CYP1A1 同时突变其羟化酶活

性后,并不影响 RAW 细胞吞噬 *E.coli* 的能力。说明 CYP1A1 对 RAW 细胞吞噬功能的调控作用也不是通过其羟化酶活性实现的。CYP1A1 羟化酶活性突变位点模式图见图 5。



注: CYP1A1 cDNA 为细胞色素 P450 1A1(CYP1A1)的全长 cDNA, Leu 为亮氨酸, Arg 为精氨酸, Pro 为脯氨酸

图 5 CYP1A1 羟化酶活性突变位点模式图

3 讨论

以往针对 CYP1A1 的研究主要聚焦于其代谢酶及产物在肿瘤形成中的作用,但近年越来越多的研究开始关注其与炎症的关系。有研究报道,给予小胶质细胞(神经系统中的巨噬细胞)脂多糖刺激 12 h 后, CYP1A1 mRNA 表达显著上调^[1]。焚香作为一种空气污染物,可导致小鼠肝脏及肝脏中 CYP1A1 的蛋白表达显著增高,并伴随炎症因子分泌^[2]。另一项研究表明, CYP1A1 过表达能够降低脂多糖刺激时牛乳腺上皮细胞中核转录因子- κ B 信号通路活性,从而抑制炎症因子的合成分泌^[7]。NO 在感染时可以杀灭病原体,但过量的 NO 可导致血压骤降,并诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS);本课题组前期研究表明, CYP1A1 能够上调脂多糖刺激时巨噬细胞中 iNOS 的表达,继而促进 NO 的合成分泌^[9]。此外,在本课题组前期研究中还发现, CYP1A1 可在白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)诱导下表达升高,并上调巨噬细胞 2 型极化因子精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)的表达,提示 CYP1A1 也可参与调控巨噬细胞的极化方向^[10]。本研究也证实, *E.coli* 刺激下 RAW 细胞中 CYP1A1 表达增加。以上结果表明,不同类型的炎症反应或感染时 CYP1A1 表达均增加,提示其可能参与调控炎症或感染进程,但其与巨噬细胞吞噬功能(另一重要的非特异性防御反应)的关系鲜见报道。

脓毒症时,巨噬细胞可释放炎症因子以杀灭病原体,同时其吞噬功能可发挥非特异性防御作用以进一步清除病原体。有研究报道,通过腹腔移植胚胎源性“类腹腔”巨噬细胞可显著降低腹腔注射粪便诱导的脓毒症大鼠死亡率,并增强机体对细菌的吞噬清除能力^[11]。通过注射脂质体提前清除小鼠

体内的腹腔巨噬细胞后再腹腔注射屎肠球菌,可显著降低机体对该球菌的吞噬清除效应,并诱发全身扩散性感染^[12]。*E.coli* 是一种寄生在人体肠道中的常见革兰阴性杆菌,可在一定条件下转化为条件致病菌。有研究报道,*E.coli* 已经成为严重脓毒症的主要致病因素之一,并且其致病率呈现逐年上升的趋势^[13]。以上结果提示,增强脓毒症时巨噬细胞吞噬*E.coli* 的能力,尤其是在当前抗菌药物滥用导致多重耐药菌感染高发的形势下,可作为预防或抑制脓毒症发展的新策略。本研究表明,感染时表达增加的CYP1A1 可负性调控巨噬细胞吞噬 *E.coli* 的能力,为后续开发脓毒症防治策略提供了新的思路。

SR-A 是一种巨噬细胞表面的经典吞噬受体,主要调控巨噬细胞对细菌的吞噬能力。有研究显示,MAPK 是调控 SR-A 表达的主要通路,使用 MAPK 通路相关抑制剂,如 p38MAPK、ERK 抑制剂,可以有效降低 SR-A 介导的巨噬细胞对细菌的吞噬能力^[14]。本研究中探讨了 CYP1A1 对巨噬细胞吞噬功能的调控机制,结果显示,CYP1A1 可以通过抑制 ERK 的活化来降低 SR-A 的表达,从而影响巨噬细胞的吞噬能力。CYP1A1 作为羟化酶时可以将花生四烯酸代谢为 12(S)-HETE,而 12(S)-HETE 已被证实可参与多种炎症反应^[15-22];但 CYP1A1 的羟化酶作用,尤其是其产物 12(S)-HETE 对巨噬细胞吞噬能力的调控效应仍不明确。本研究证明,CYP1A1 的羟化酶活性及其产物 12(S)-HETE 对巨噬细胞的吞噬功能并无影响,因此 CYP1A1 通过何种途径调控 ERK 活化进而影响吞噬功能仍有待进一步研究。

综上所述,感染时表达增加的 CYP1A1 可抑制 *E.coli* 刺激时巨噬细胞中 ERK 活化,使 SR-A 表达下调,从而导致巨噬细胞的吞噬功能下降,但此效应并非通过 CYP1A1 的羟化酶活性或其产物 12(S)-HETE 而实现。上述结果将进一步丰富巨噬细胞吞噬功能的调控靶点,为脓毒症等感染性疾病的防治策略提供新的思路和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lee YH, Lin CH, Hsu PC, et al. Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia [J]. *Glia*, 2015, 63 (7): 1138–1154. DOI: 10.1002/glia.22805.
- [2] Hussain T, Al-Attas OS, Al-Daghri NM, et al. Induction of CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, increased oxidative stress and inflammation in the lung and liver tissues of rats exposed to incense smoke [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 391 (1–2): 127–136. DOI: 10.1007/s11010-014-1995-5.
- [3] Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, et al. Diesel exhaust
- particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2010, 7: 41. DOI: 10.1186/1743-8977-7-41.
- [4] Schiering C, Wincent E, Metidji A, et al. Feedback control of AHR signalling regulates intestinal immunity [J]. *Nature*, 2017, 542 (7640): 242–245. DOI: 10.1038/nature21080.
- [5] Divanovic S, Dalli J, Jorge-Nebert LF, et al. Contributions of the three CYP1 monooxygenases to pro-inflammatory and inflammation-resolution lipid mediator pathways [J]. *J Immunol*, 2013, 191 (6): 3347–3357. DOI: 10.4049/jimmunol.1300699.
- [6] Xu BJ, Yang H, Sun MN, et al. 2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl induces inflammatory responses in the thyroid through JNK and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 149 (2): 300–311. DOI: 10.1093/toxsci/kfv235.
- [7] Zhang WY, Wang H, Qi SP, et al. CYP1A1 relieves lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 4093285. DOI: 10.1155/2018/4093285.
- [8] Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12 (7): 492–502. DOI: 10.1038/nri3244.
- [9] 唐欣, 陈涛, 田李星, 等. 细胞色素 P450 1A1 对脂多糖诱导巨噬细胞生成一氧化氮的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (5): 605–610. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200204-00167.
- [10] 李晓禹, 田李星, 王静, 等. 细胞色素酶 P450 1A1 对巨噬细胞向 M2 型极化的调控作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2019, 31 (11): 1340–1344. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.11.006.
- [11] Jerkic M, Litvack ML, Gagnon S, et al. Embryonic-derived Myb+ macrophages enhance bacterial clearance and improve survival in rat sepsis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (6): 3190. DOI: 10.3390/ijms22063190.
- [12] Leendertse M, Willems RJ, Giebelan IA, et al. Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice [J]. *Innate Immun*, 2009, 15 (1): 3–12. DOI: 10.1177/1753425908100238.
- [13] Pleșca CE, Luca MC, Luca AS, et al. Etiology and resistance profile of isolated strains from severe systemic infections in patients with immunodepression: experience of the IASI Infectious Diseases Hospital 2011–2014 [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2015, 119 (4): 1141–1146.
- [14] Sulahian TH, Imrich A, Deloid G, et al. Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry [J]. *Respir Res*, 2008, 9 (1): 59. DOI: 10.1186/1465-9921-9-59.
- [15] Sepp-Lorenzino L, Rosen N, Lebwohl DE. Insulin and insulin-like growth factor signaling are defective in the MDA MB-468 human breast cancer cell line [J]. *Cell Growth Differ*, 1994, 5 (10): 1077–1083. DOI: 10.1016/0143-4160(94)90097-3.
- [16] Bleich D, Chen S, Wen Y, et al. The stress-activated c-Jun protein kinase (JNK) is stimulated by lipoxygenase pathway product 12-HETE in RIN m5F cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 230 (2): 448–451. DOI: 10.1006/bbrc.1996.5981.
- [17] Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, et al. An ALOX12–12-HETE–GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia–reperfusion injury [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (1): 73–83. DOI: 10.1038/nm.4451.
- [18] Muñoz-García A, Thomas CP, Keeney DS, et al. The importance of the lipoxygenase–hepoxilin pathway in the mammalian epidermal barrier [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841 (3): 401–408. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.08.020.
- [19] Voorhees JJ. Leukotrienes and other lipoxygenase products in the pathogenesis and therapy of psoriasis and other dermatoses [J]. *Arch Dermatol*, 1983, 119 (7): 541–547. DOI: 10.1001/archderm.119.7.541.
- [20] Wollard PM, Cunningham FM, Murphy GM, et al. A comparison of the proinflammatory effects of 12(R)- and 12(S)-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid in human skin [J]. *Prostaglandins*, 1989, 38 (4): 465–471. DOI: 10.1016/0090-6980(89)90129-9.
- [21] Kragballe K, Voorhees JJ. Arachidonic acid in psoriasis. Pathogenic role and pharmacological regulation [J]. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 1985, 120: 12–17.
- [22] 杨丽萍, 殷商启, 田李星, 等. 12/15-LOX 对免疫细胞的调节作用 [J]. 医学综述, 2018, 24 (20): 3959–3965, 3970. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2018.20.002.

(收稿日期: 2022-08-25)