

• 论著 •

组蛋白甲基转移酶抑制剂对脓毒症小鼠腹腔巨噬细胞极化的影响

张倩倩¹ 周晓慧² 唐伦先^{1,3}

¹ 同济大学附属东方医院急诊内科, 上海 200120; ² 同济大学附属东方医院转化医学研究中心, 上海市心力衰竭研究中心, 上海 200120; ³ 上海市东方医院吉安医院急诊内科, 江西吉安 343000

通信作者: 唐伦先, Email: 456tlx@163.com

【摘要】 目的 探讨组蛋白甲基转移酶(EZH2)抑制剂对脓毒症小鼠腹腔巨噬细胞极化的影响及其作用机制。**方法** 选取 36 只健康雄性 C57BL/6J 小鼠,按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、脓毒症模型组(CLP 组)和 EZH2 抑制剂干预组(CLP+3-DZNeP 组),每组 12 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症动物模型;Sham 组不结扎、穿刺盲肠。CLP+3-DZNeP 组分别于制模前 24 h 和制模后 1 h 腹腔注射 3-DZNeP 1 mg/kg。每组取 8 只小鼠于术后 24 h 处死,应用高通量液相蛋白芯片分别检测腹腔灌洗液中白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;应用流式细胞仪检测巨噬细胞极化标志物诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和 CD206 表达;以贴壁法分离、纯化小鼠腹腔巨噬细胞,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测巨噬细胞 EZH2 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的蛋白表达。各组剩余小鼠于术后 48 h 处死,采用苏木素-伊红(HE)染色观察肺脏、肾脏组织病理学改变。**结果** 与 Sham 组比较,CLP 组小鼠肺脏和肾脏组织炎性细胞浸润增加,腹腔灌洗液中促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高[IL-6 (ng/L): 7794.75 $\pm$ 405.56 比 78.63 $\pm$ 74.09, TNF- α (ng/L): 147.25 $\pm$ 25.19 比 18.20 $\pm$ 5.03, 均 $P < 0.01$], M1 型巨噬细胞占比增多[iNOS⁺ F4/80⁺: (13.18 $\pm$ 8.80)% 比 (1.57 $\pm$ 0.77)%, $P < 0.05$], 腹腔巨噬细胞中 EZH2 蛋白表达明显增高(EZH2/GAPDH: 0.84 $\pm$ 0.11 比 0.11 $\pm$ 0.03, $P < 0.01$), PPAR γ 蛋白表达则明显降低(PPAR γ /GAPDH: 0.09 $\pm$ 0.01 比 0.27 $\pm$ 0.09, $P < 0.01$)。与 CLP 组比较,CLP+3-DZNeP 组小鼠肺脏和肾脏组织病理学改变明显缓解,腹腔灌洗液中促炎细胞因子表达水平显著降低[IL-6 (ng/L): 4207.10 $\pm$ 876.60 比 7794.75 $\pm$ 405.56, TNF- α (ng/L): 63.00 $\pm$ 25.37 比 147.25 $\pm$ 25.19, 均 $P < 0.01$], M1 型巨噬细胞占比显著降低[iNOS⁺ F4/80⁺: (3.64 $\pm$ 0.89)% 比 (13.18 $\pm$ 8.80)%, $P < 0.05$], M2 型巨噬细胞占比显著增高[CD206⁺ F4/80⁺: (17.68 $\pm$ 5.63)% 比 (7.60 $\pm$ 3.17)%, $P < 0.01$], 腹腔巨噬细胞中 EZH2 蛋白表达明显下降(EZH2/GAPDH: 0.53 $\pm$ 0.09 比 0.84 $\pm$ 0.11, $P < 0.05$), PPAR γ 蛋白表达则明显增高(PPAR γ /GAPDH: 0.39 $\pm$ 0.14 比 0.09 $\pm$ 0.01, $P < 0.05$)。**结论** 脓毒症诱导腹腔巨噬细胞 EZH2 高表达,并可能通过抑制 PPAR γ 蛋白表达诱导 M1 型巨噬细胞极化,促进炎性细胞因子释放; EZH2 特异性抑制剂 3-DZNeP 能明显抑制腹腔巨噬细胞 M1 型分化,从而减轻炎症反应。

【关键词】 脓毒症; 巨噬细胞极化; 组蛋白甲基转移酶; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ **基金项目:** 国家自然科学基金(81500059, 81670067); 江西省自然科学基金重点项目(2018ACB20016)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.02.013

Effects of histone methyltransferase inhibitor on the polarization of peritoneal macrophages in septic mice

Zhang Qianqian¹, Zhou Xiaohui², Tang Lunxian^{1,3}¹Department of Emergency Medicine and Critical Care, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China;²Translational Medicine Research Center, East Hospital, Tongji University, Shanghai Institute of Heart Failure, Shanghai200120, China; ³Department of Emergency Medicine and Critical Care, Ji'an Hospital of Shanghai Oriental Hospital, Ji'an 343000, Jiangxi, China

Corresponding author: Tang Lunxian, Email: 456tlx@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of histone methyltransferase (EZH2) inhibitor on the polarization of peritoneal macrophages in septic mice. **Methods** Thirty-six healthy male C57BL/6J mice were divided into three groups by random number table method ($n = 12$): sham operated group (Sham group), sepsis model group (CLP group) and EZH2 inhibitor treatment group (CLP+3-DZNeP group). Sepsis animal model was established by cecum ligation and puncture (CLP); Sham group was challenged only by cecum traction without ligation. 3-Deazaneplanocin A (3-DZNeP) 1 mg/kg was intraperitoneal injected 24 hours before and 1 hour after CLP in CLP+3-DZNeP group. Eight mice in each group were sacrificed at 24 hours after surgery. The levels of proinflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in peritoneal lavatory fluid were detected by high throughput liquid protein chip. The expression levels of inducible nitrogenase (iNOS) and macrophage mannose receptor (CD206) were analyzed by flow cytometry. Mouse peritoneal macrophages were isolated and purified by adherent method, the protein expressions of EZH2, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) were detected by Western Blot. The remaining 4 mice

were sacrificed at 48 hours after surgery, the histopathological changes of lung and kidney tissue were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with Sham group, the infiltration of inflammatory cells in lung and kidney of the CLP group, the levels of IL-6 and TNF- α in peritoneal lavatory fluid were significant increased [IL-6 (ng/L): 7794.75 ± 405.56 vs. 78.63 ± 74.09 , TNF- α (ng/L): 147.25 ± 25.19 vs. 18.20 ± 5.03 , both $P < 0.01$], the percentage of M1 type macrophages was significantly increased [iNOS⁺ F4/80⁺: $(13.18 \pm 8.80)\%$ vs. $(1.57 \pm 0.77)\%$, $P < 0.05$], and the protein expression of EZH2 was significantly increased (EZH2/GAPDH: 0.84 ± 0.11 vs. 0.11 ± 0.03 , $P < 0.01$), while the protein expression of PPAR γ was significantly decreased (PPAR γ /GAPDH: 0.09 ± 0.01 vs. 0.27 ± 0.09 , $P < 0.01$). Compared with CLP group, the histopathological changes of lung and kidney in CLP+3-DZNeP group were significantly alleviated, the levels of IL-6 and TNF- α in peritoneal lavatory fluid were significantly decreased [IL-6 (ng/L): 4207.10 ± 876.60 vs. 7794.75 ± 405.56 , TNF- α (ng/L): 63.00 ± 25.37 vs. 147.25 ± 25.19 , both $P < 0.01$], the percentage of M1 type macrophages was significantly decreased [iNOS⁺ F4/80⁺: $(3.64 \pm 0.89)\%$ vs. $(13.18 \pm 8.80)\%$, $P < 0.05$], while the percentage of M2 type macrophages was significantly increased [CD206⁺ F4/80⁺: $(17.68 \pm 5.63)\%$ vs. $(7.60 \pm 3.17)\%$, $P < 0.01$], the protein expression of EZH2 was significantly decreased (EZH2/GAPDH: 0.53 ± 0.09 vs. 0.84 ± 0.11 , $P < 0.05$), and the protein expression of PPAR γ was significantly increased (PPAR γ /GAPDH: 0.39 ± 0.14 vs. 0.09 ± 0.01 , $P < 0.05$). **Conclusions** Sepsis induces high expression of EZH2 in peritoneal macrophages, and may induce polarization of M1 type macrophages by inhibiting the expression of PPAR γ protein. EZH2 inhibitor 3-DZNeP can lessen the inflammatory cytokines release by inhibiting the M1 type macrophages polarization.

【Key words】 Sepsis; Macrophage polarization; Histone methyltransferase EZH2; Peroxisome proliferator-activated receptor γ

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500059, 81670067); the Key Program of National Science Foundation of Jiangxi Province (2018ACB20016)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.02.013

脓毒症是机体对感染反应失调而导致的危及生命的器官功能障碍,其重要特点是非特异性免疫功能障碍和免疫失衡^[1-3]。巨噬细胞不仅是固有免疫的主力军,还是固有免疫和适应性免疫反应的“桥梁”,可发挥吞噬、抗原呈递和免疫调节等功能,其对脓毒症的发生发展具有重要意义。据报道,巨噬细胞极化参与介导脓毒症“瀑布”样炎症反应^[2-3],但其具体调控机制仍有待阐明。

有研究表明,表观遗传可参与调控巨噬细胞的极性转化^[4]。其中组蛋白翻译后修饰在肿瘤、炎症和纤维化疾病中发挥着重要作用。果蝇 zeste 基因增强子同源物 2,即组蛋白甲基转移酶(EZH2)具有组蛋白赖氨酸转移酶活性,可通过调控多种免疫细胞功能状态,介导炎症相关疾病的进展^[5-6],但其是否参与调控脓毒症过程中腹腔巨噬细胞的极化,迄今鲜见报道。本研究中拟通过盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症小鼠模型,获取腹腔原代巨噬细胞,观察 EZH2 的表达及其对巨噬细胞极化的影响,并进一步探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组处理: 36 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 22~26 g,购自上海市斯莱克实验动物责任有限公司,动物许可证号:SCXK(沪)2017-0005。按随机数字表法将动物分为假手术组(Sham 组)、脓毒症模型组(CLP 组)和 EZH2 抑制剂干预组(CLP+3-DZNeP 组),每组 12 只。采用 CLP

制备脓毒症动物模型。腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠后仰卧位固定,腹壁正中切口约 1 cm,游离盲肠,避免损伤肠系膜血管,用无菌 4-0 丝线在盲肠末端距盲瓣 1/4 处结扎,并用 20G 无菌针头在结扎部位与盲肠末端中点处贯通穿刺盲肠壁,造成穿孔,还纳盲肠,逐层缝合切口,术后于颈部皮下注射生理盐水 1 mL 进行液体复苏;Sham 组除不结扎、穿刺盲肠外,其余操作相同。CLP+3-DZNeP 组于制模前 24 和制模后 1 h 腹腔注射 EZH2 抑制剂 3-DZNeP [1 mg/kg,溶于无菌磷酸盐缓冲液(PBS),购自美国 Cayman 公司]。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,按照同济大学附属东方医院管理办法进行相关实验(审批号:TJLAC-017-034)。

1.2 检测指标及方法: 各组取 8 只小鼠于术后 24 h 处死,获取腹腔灌洗液备检;余小鼠于术后 48 h 处死,获取肺脏、肾脏组织用于组织病理学观察。

1.2.1 组织病理学观察: 左侧肾组织和左肺上叶组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定,经石蜡包埋、5 μ m 厚连续切片、苏木素-伊红(HE)染色后,光镜下观察组织形态学改变。

1.2.2 分离、纯化腹腔巨噬细胞: 小鼠处死后仰卧位固定,分离腹部皮肤和腹膜,同时保持腹膜的完整性,以 5 mL PBS 进行腹腔灌洗,重复 3 次,灌洗液离心 10 min 弃上清液,以温 RPMI1640 培养基(含 20% 胎牛血清)调整细胞数为 2×10^6 /mL 接种于细胞

培养皿, 37 ℃ 孵箱孵育 2 h, 去上清液, 以无菌 PBS 冲洗 3 遍, 细胞刮刀刮取细胞, 收集于 15 mL 离心管, 离心后取细胞沉淀, 部分细胞以 100 μ L 重悬, 加入藻红蛋白 (PE) 标记的 F4/80 抗体, 以流式细胞仪检测其纯度, 余冻存于 -80 ℃ 备用。

1.2.3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测腹腔巨噬细胞 EZH2、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的蛋白表达: 分离、纯化后的巨噬细胞提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性后, 以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜; 封闭后加入 EZH2、PPAR γ 一抗工作液 (均购自美国 CST 公司) 4 ℃ 孵育过夜; 加入荧光标记的羊抗兔 IgG 二抗工作液室温、避光孵育 1 h, 上机检测。使用 Image J 图像软件测定各条带灰度值, 以目的条带与内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的灰度值比值作为蛋白表达量。

1.2.4 腹腔灌洗液中炎症因子表达检测: 腹腔灌洗液离心后取上清液 200 μ L, 按照高通量液相蛋白芯片试剂盒 (购自美国 R & D System 公司) 说明书步骤检测白细胞介素 -6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 水平。

1.2.5 腹腔灌洗液巨噬细胞极化指标检测: 取腹腔灌洗液, 以 PBS 调整细胞数为 1×10^7 /mL, 取 100 μ L, 加入 PE 标记的 F4/80 抗体, 别藻青蛋白 (APC) 标记的 CD206 抗体, 4 ℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次, 固定、破膜后, 加入 PE-Cy7 标记的诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体, 再次避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次, 重悬于 500 μ L PBS 中, 用流式细胞仪检测 iNOS⁺ F4/80⁺ 细胞 (M1 型巨噬细胞) 及 CD206⁺ F4/80⁺ 细胞 (M2 型巨噬细胞) 的百分比。

1.3 统计学方法: 所有数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两样本比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺脏和肾脏组织病理学改变 (图 1): Sham 组肺、肾组织结构正常。与 Sham 组相比, CLP 组可见肺泡结构改变, 肺泡间隔增厚, 炎性细胞浸润; 肾组织炎性细胞浸润, 红细胞溢出。与 CLP 组相比, CLP+3-DZNeP 组肺泡结构相对完整, 病理表现较轻; 肾组织炎性细胞浸润、红细胞溢出减少。提示 CLP 组小鼠肺脏和肾脏存在一定的病理损伤, 而 EZH2 抑制剂可部分缓解重要器官组织病理学改变。

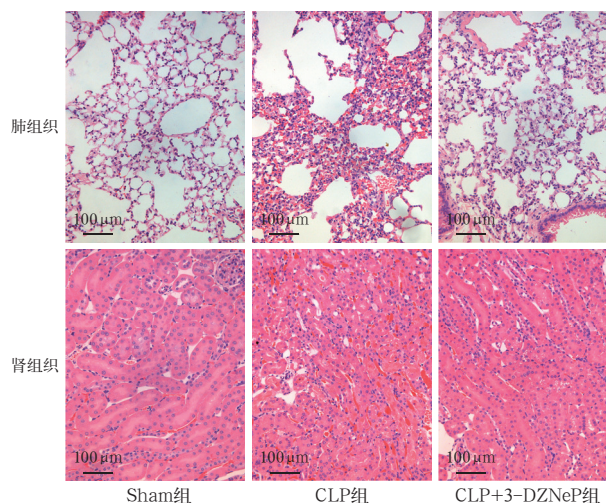
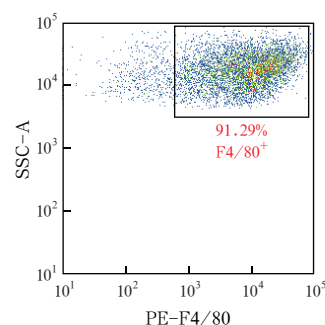


图 1 镜下观察各组小鼠术后 48 h 肺、肾组织病理学改变 假手术组 (Sham 组) 肺、肾组织结构未见明显异常。盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组 (CLP 组) 可见肺泡结构改变, 肺泡间隔增厚; 肾组织炎性细胞浸润、红细胞溢出。组蛋白甲基转移酶抑制剂干预组 (CLP+3-DZNeP 组) 肺泡结构相对完整, 病理表现较 CLP 组减轻; 肾组织炎性细胞浸润、红细胞溢出减少 HE 染色 低倍放大

2.2 腹腔巨噬细胞的贴壁分离及纯度 (图 2): 以 F4/80 标记巨噬细胞, 流式细胞仪检测结果显示, 以贴壁法获得腹腔巨噬细胞的纯度可达 91.29%。



注: PE 为藻红蛋白, SSC-A 为侧向散射光, F4/80⁺ 标记巨噬细胞

图 2 流式细胞仪检测小鼠腹腔巨噬细胞纯度

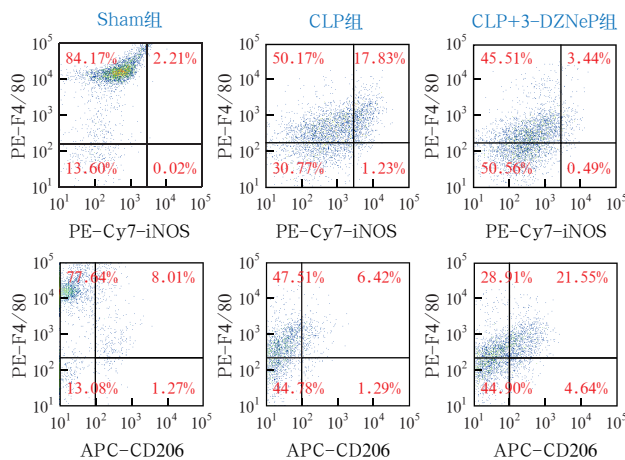
2.3 各组小鼠腹腔灌洗液促炎因子表达 (表 1): 与 Sham 组比较, CLP 组、CLP+3-DZNeP 组腹腔灌洗液中 IL-6 和 TNF- α 水平均明显升高 (均 $P < 0.01$)。但 CLP+3-DZNeP 组腹腔灌洗液中细胞因子水平均较 CLP 组明显降低 (均 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠腹腔灌洗液中促炎因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
Sham 组	8	78.63 $\pm$ 74.09	18.20 $\pm$ 5.03
CLP 组	8	7 794.75 $\pm$ 405.56 ^a	147.25 $\pm$ 25.19 ^a
CLP+3-DZNeP 组	8	4 207.10 $\pm$ 876.60 ^{ab}	63.00 $\pm$ 25.37 ^{ab}

注: Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组, CLP+3-DZNeP 组为组蛋白甲基转移酶抑制剂干预组; IL-6 为白细胞介素 -6, TNF- α 为肿瘤坏死因子 - α ; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 CLP 组比较, ^b $P < 0.01$

2.4 各组小鼠腹腔灌洗液中巨噬细胞极化水平(图3;表2):与Sham组比较,CLP组腹腔灌洗液中M1型巨噬细胞($iNOS^+ F4/80^+$)百分比明显升高($P<0.05$),M2型巨噬细胞($CD206^+ F4/80^+$)百分比差异则无统计学意义($P>0.05$)。CLP+3-DZNeP组腹腔灌洗液中M1型巨噬细胞虽较Sham组有增高趋势($P>0.05$),但明显低于CLP组($P<0.05$);而M2型巨噬细胞较Sham组和CLP组均明显增高(均 $P<0.05$)。说明脓毒症损伤可能诱导腹腔巨噬细胞M1型极化,而EZH2抑制剂可部分逆转脓毒症诱导的M1型极化。



注:Sham组为假手术组,CLP为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+3-DZNeP组为组蛋白甲基转移酶抑制剂干预组;PE为藻红蛋白,iNOS为诱导型一氧化氮合酶,APC为别藻青蛋白,iNOS⁺F4/80⁺为M1型巨噬细胞,CD206⁺F4/80⁺为M2型巨噬细胞

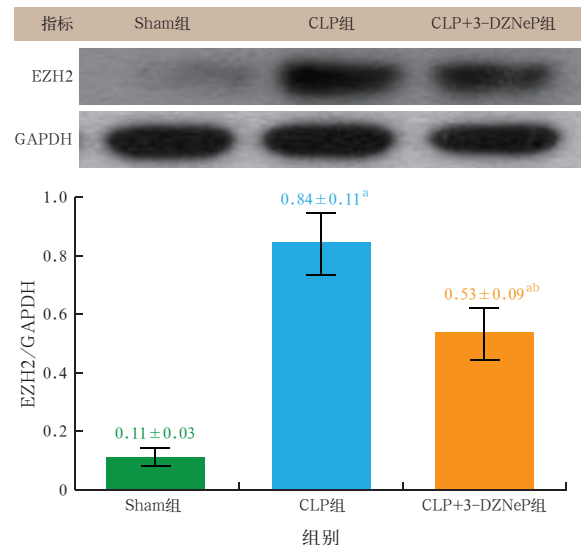
图3 流式细胞仪检测各组小鼠腹腔灌洗液中巨噬细胞极化水平

表2 各组小鼠腹腔巨噬细胞极化水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	iNOS ⁺ F4/80 ⁺ (%)	CD206 ⁺ F4/80 ⁺ (%)
Sham组	8	1.57 ± 0.77	8.25 ± 0.25
CLP组	8	13.18 ± 8.80 ^a	7.60 ± 3.17
CLP+3-DZNeP组	8	3.64 ± 0.89 ^b	17.68 ± 5.63 ^{ac}

注:Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+3-DZNeP组为组蛋白甲基转移酶抑制剂干预组;iNOS为诱导型一氧化氮合酶,iNOS⁺F4/80⁺为M1型巨噬细胞,CD206⁺F4/80⁺为M2型巨噬细胞;与Sham组比较,^a $P<0.05$;与CLP组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

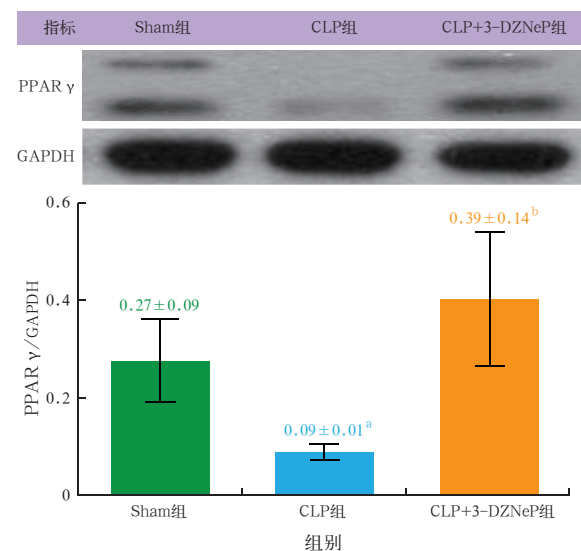
2.5 各组小鼠腹腔巨噬细胞EZH2蛋白表达(图4):与Sham组相比,CLP组和CLP+3-DZNeP组腹腔巨噬细胞EZH2蛋白表达水平明显升高(均 $P<0.01$);但CLP+3-DZNeP组腹腔巨噬细胞EZH2蛋白表达水平较CLP组明显下降($P<0.05$)。说明脓毒症损伤后小鼠腹腔巨噬细胞EZH2高表达,而EZH2抑制剂可部分抑制脓毒症损伤后EZH2的高表达。



Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+3-DZNeP组为EZH2抑制剂干预组;GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;与Sham组比较,^a $P<0.01$;与CLP组比较,^b $P<0.05$

图4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠腹腔巨噬细胞组蛋白甲基转移酶(EZH2)蛋白表达

2.6 各组小鼠腹腔巨噬细胞PPAR γ 蛋白表达(图5):与Sham组相比,CLP组腹腔巨噬细胞PPAR γ 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);CLP+3-DZNeP组腹腔巨噬细胞PPAR γ 蛋白表达水平较CLP组明显升高($P<0.05$),而与Sham组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。



Sham组为假手术组,CLP组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组,CLP+3-DZNeP组为组蛋白甲基转移酶抑制剂干预组;GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;与Sham组比较,^a $P<0.05$;与CLP组比较,^b $P<0.05$

图5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠腹腔巨噬细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)蛋白表达

3 讨论

脓毒症病因复杂,涉及全身炎症网络效应、基因多态性、免疫功能障碍、凝血异常、组织损伤以

及宿主对不同病原微生物及其毒素的异常反应等多个方面,与机体多器官、多系统的病理生理改变密切相关,目前尚未明了其根本发病机制。但普遍认为宿主炎症反应失控是脓毒症病情进展的关键环节。巨噬细胞分布广泛,存在于机体的全部组织中,是炎症发生发展的启动者、调控者、效应者^[7]。巨噬细胞因其所处微环境不同而呈现不同的表型变化,进而分化为经典激活表型(M1型)和替代激活表型(M2型)。不同的极化表型在炎症反应过程中发挥不同甚至截然相反的作用。M1特征性表达CD80/CD86、IL-6、TNF、iNOS等,介导宿主防御(细菌、原虫、病毒等)及肿瘤免疫应答。M2特异性表达甘露糖受体(CD206)、精氨酸酶-1(Arg-1)等,具有抗炎功能,参与调节损伤修复和纤维化病变^[8]。感染等因素导致M1型巨噬细胞持续过度活化、炎性介质失控性释放和免疫反应紊乱,并造成远隔部位的损伤,是脓毒症的重要发病机制^[9-11];另外,有研究表明,促进巨噬细胞M2型极化,可有效降低脂多糖(LPS)诱导的脓毒症小鼠死亡率^[12]。本研究显示,CLP诱导小鼠腹腔巨噬细胞向M1型极化,同时腹腔灌洗液中IL-6和TNF- α 水平明显升高,并伴随远隔器官肺脏和肾脏损伤,与既往研究结果一致^[13]。说明CLP致脓毒症模型小鼠腹腔巨噬细胞M1型极化可能参与了远隔器官的损伤过程,调节巨噬细胞的极化类型,避免M1型巨噬细胞过度极化,可能在脓毒症防治中具有重要的意义。

EZH2是多聚梳蛋白(PcG)家族成员多梳抑制复合物2(PRC2)的核心组分,其主要作用是参与催化组蛋白3的Lys27位点(H3K27)的二甲基和三甲基化(H3K27me3),抑制相关靶点基因转录,在胚胎发育、肿瘤进展、纤维化疾病中发挥重要作用。有研究表明,EZH2可通过调控T细胞、B细胞等免疫细胞的功能状态,参与炎症性疾病病变^[5,14]。小鼠体内条件性缺失EZH2,可通过影响巨噬细胞活化,改善结肠炎及脑脊髓炎等自身免疫性疾病病变^[15]。有研究表明,脓毒症大鼠心肌组织心血管内皮细胞高表达EZH2^[16]。本研究通过Western Blot检测结果表明,脓毒症小鼠腹腔原代巨噬细胞高表达EZH2。3-DZNeP是一种腺苷的碳环类似物,可选择性地降解EZH2,继而抑制H3K27me3^[17]。该复合物作为EZH2抑制剂,目前已被广泛地用于相关的体外和临床前期研究,结果显示其能有效抑制细胞增殖,

逆转上皮间充质转分化和防治肿瘤的进展^[18]。本研究结果显示,CLP+3-DZNeP组脓毒症小鼠腹腔灌洗液中IL-6和TNF- α 水平较CLP组显著下降,且可部分逆转腹腔巨噬细胞M1型极化;此外,CLP组与Sham组相比M2型巨噬细胞占比差异无统计学意义,但给予EZH2抑制剂干预后,M2型巨噬细胞占比明显增高。以上研究结果提示,EZH2可能参与调控脓毒症小鼠腹腔巨噬细胞极化,高表达EZH2可能促进巨噬细胞M1型极化,而3-DZNeP可能抑制腹腔巨噬细胞M1型过度激活和极化,进而减少促炎因子的释放而减轻炎症反应。

PPAR γ 是一种转录调节因子,可参与调控巨噬细胞的极化、失活及其介导的炎症反应^[19]。巨噬细胞特异性缺失PPAR γ 的研究结果表明,其结构和功能的完整性对维持M2型巨噬细胞的稳态是必须的^[20]。本研究中CLP组腹腔巨噬细胞以M1亚群占据优势,同时PPAR γ 表达水平较Sham组明显降低,EZH2表达水平明显增高;而给予EZH2抑制剂干预后可以抑制EZH2表达,巨噬细胞倾向于M2型极化,同时可以部分逆转PPAR γ 表达水平降低。提示EZH2可能通过调控PPAR γ 的表达,介导腹腔巨噬细胞极化。相关转录组学研究表明,EZH2可直接募集并结合于PPAR γ 启动子区,抑制其基因表达^[21],而这种直接结合作用仍有待进一步实验验证。

综上所述,本研究显示,EZH2可能通过抑制PPAR γ 调控脓毒症小鼠腹腔巨噬细胞M1型极化;EZH2特异性抑制剂3-DZNeP可能通过调控PPAR γ 水平来抑制腹腔巨噬细胞M1型活化,减轻“瀑布”样炎性因子释放。该研究结果将为脓毒症的早期防治作用机制提供新的见解,也为脓毒症及其他感染性疾病提供新的潜在治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 [J]. Intensive Care Med, 2017, 43 (3): 304-377. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6.
- [2] Delano MJ, Ward PA. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? [J]. J Clin Invest, 2016, 126 (1): 23-31. DOI: 10.1172/JCI82224.
- [3] Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis [J]. J Clin Invest, 1991, 88 (5): 1747-1754. DOI: 10.1172/JCI115493.
- [4] Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function [J]. Trends Immunol, 2013, 34 (5): 216-223. DOI: 10.1016/j.it.2012.11.001.

- [5] Tumes DJ, Onodera A, Suzuki A, et al. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁺ T helper type 1 and type 2 cells [J]. *Immunity*, 2013, 39 (5): 819–832. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.09.012.
- [6] Zhang X, Wang Y, Yuan J, et al. Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3 [J]. *J Exp Med*, 2018, 215 (5): 1365–1382. DOI: 10.1084/jem.20171417.
- [7] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (10): 776–787. DOI: 10.1038/nri2402.
- [8] Murray PJ. Macrophage polarization [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 541–566. DOI: 10.1146/annurev-physiol-022516-034339.
- [9] 刘艳存, 柴艳芬, 姚咏明. 巨噬细胞在脓毒症发病机制中的作用研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (4): 247–250. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.020.
Liu YC, Chai YF, Yao YM. Advance in the study of the role of macrophages in the pathogenesis of sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2013, 25 (4): 247–250. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.020.
- [10] 王慧, 赵擎宇, 黄朝峰, 等. 脓毒症时髓源性抑制细胞亚群及其比值的变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (2): 147–152. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.012.
Wang H, Zhao QY, Huang ZF, et al. Variation of subsets of myeloid derived suppressor cells and their ratio in septic mice [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 26 (2): 147–152. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.012.
- [11] 王昌理, 薄禄龙, 邓小明. 单核/巨噬细胞代谢在脓毒症中的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (4): 381–384. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.020.
Wang CL, Bo LL, Deng XM. Research progress on metabolism of monocytes and macrophages in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29 (4): 381–384. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.04.020.
- [12] Singh P, Dejager L, Amand M, et al. DUSP3 genetic deletion confers M2-like macrophage-dependent tolerance to septic shock [J]. *J Immunol*, 2015, 194 (10): 4951–4962. DOI: 10.4049/jimmunol.1402431.
- [13] 郑远华, 熊兵, 邓医宇, 等. 同种异体骨髓间充质干细胞对脓毒症大鼠腹腔巨噬细胞极化改变的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33 (4): 217–223. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.04.006.
- Zheng YH, Xiong B, Deng YY, et al. Effects of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells on polarization of peritoneal macrophages in rats with sepsis [J]. *Chin J Burns*, 2017, 33 (4): 217–223. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.04.006.
- [14] Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4 (2): 124–131. DOI: 10.1038/ni876.
- [15] Zhang X, Wang Y, Yuan J, et al. Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3 [J]. *J Exp Med*, 2018, 215 (5): 1365–1382. DOI: 10.1084/jem.20171417.
- [16] Yu Z, Rayile A, Zhang X, et al. Ulinastatin protects against lipopolysaccharide-induced cardiac microvascular endothelial cell dysfunction via downregulation of lncRNA MALAT1 and EZH2 in sepsis [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39 (5): 1269–1276. DOI: 10.3892/ijmm.2017.2920.
- [17] Koppens MA, Bounova G, Gargiulo G, et al. Deletion of polycomb repressive complex 2 from mouse intestine causes loss of stem cells [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151 (4): 684–697. e12. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.06.020.
- [18] Morera L, Lübbert M, Jung M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy [J]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8: 57. DOI: 10.1186/s13148-016-0223-4.
- [19] Chawla A. Control of macrophage activation and function by PPARs [J]. *Circ Res*, 2010, 106 (10): 1559–1569. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.216523.
- [20] Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance [J]. *Nature*, 2007, 447 (7148): 1116–1120. DOI: 10.1038/nature05894.
- [21] Qiao Y, Kang K, Giannopoulou E, et al. IFN- γ induces histone 3 lysine 27 trimethylation in a small subset of promoters to stably silence gene expression in human macrophages [J]. *Cell Rep*, 2016, 16 (12): 3121–3129. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.051.

(收稿日期: 2018-11-15)

• 科研新闻速递 •

维生素 D 受体激动剂并不能降低非继发性甲状旁腺功能亢进的透析患者心血管事件风险

慢性肾脏病患者维生素 D 活化受损且心血管疾病风险升高。有研究表明,对于血液透析患者,无论其甲状旁腺激素水平如何,使用活性维生素 D 均可降低患者的全因死亡风险。为此,有学者进行了一项多中心随机对照临床试验,旨在了解维生素 D 受体激动剂能否降低非继发性甲状旁腺功能亢进的血液透析患者的心血管事件风险和死亡风险。该研究共纳入了日本 207 个透析中心 976 例接受维持性血液透析的患者(血清甲状旁腺激素水平 < 180 ng/L),研究人员将受试对象随机分为干预组(口服阿法骨化醇 0.5 μ g/d, $n=495$)和安慰剂对照组($n=481$)。主要评价指标是致死性和非致死性心血管事件的综合发生率(包括心肌梗死、因充血性心力衰竭住院、卒中、主动脉夹层或破裂、缺血所致下肢截肢、心脏猝死、需要进行冠状动脉重建、随访 48 个月需要进行小腿动脉血管重建);次要评价指标为患者全因病死率。结果显示:964 例患者被纳入意向治疗分析[中位年龄 65 岁,女性 386 例(占 40.0%)],其中 944 例(97.9%)完成了试验。随访期间(中位数为 4.0 年),干预组患者有 21.1% (103/488) 发生致死性或非致死性心血管事件,对照组发生率则为 17.9% (85/476),两组相差 3.25% [95% 可信区间 (95%CI) = -1.75% ~ 8.24%; 风险比 (HR) = 1.25, 95%CI = 0.94 ~ 1.67, $P=0.13$]。干预组与对照组患者全因病死率差异无统计学意义 (18.2% 比 16.8%; $HR=1.12$, 95%CI = 0.83 ~ 1.52, $P=0.46$)。干预组 488 例受试者中, 40.8% (199 例) 发生了与心血管相关的严重不良事件, 13.1% (64 例) 发生了与感染相关的严重不良事件, 4.5% (22 例) 发生了与恶性肿瘤相关的严重不良事件;而对照组 476 例受试者中相应发生率则为 40.1% (191 例)、13.2% (63 例) 和 4.4% (21 例)。研究人员据此得出结论:对于非继发性甲状旁腺功能亢进且进行维持性血液透析的患者,口服阿法骨化醇并不能降低其心血管事件的发生风险。

罗红敏, 编译自《JAMA》, 2018, 320 (22): 2325–2334