

# 甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体 2 促进小鼠巨噬细胞内毒素耐受形成的研究

刘焱<sup>1</sup> 刘逸<sup>2</sup> 张小禾<sup>2</sup> 陈睦虎<sup>1</sup> 胡迎春<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西南医科大学附属医院急诊医学部, 四川泸州 646000; <sup>2</sup>西南医科大学临床医学院, 四川泸州 646000

通信作者: 胡迎春, Email: huyingchun913@qq.com

**【摘要】** 目的 寻找内毒素耐受(ET)的潜在关键基因,为脓毒症的治疗提供理论和实验依据。方法 ①实验1(基因芯片与生物信息分析):从基因表达数据库(GEO)中下载 ET 相关基因数据集 GSE47783,该数据集由脂多糖(LPS)刺激小鼠巨噬细胞建立脓毒症模型(LPS组)和 ET 模型(ET组)后进行实验获得;利用 IDEP 0.92 软件筛选数据集中两组差异表达基因(DEG),同时进行基因本体(GO)分析,并定位 DEG 主要富集的功能和信号通路。利用基因与蛋白质相互作用检索数据库(String),针对 DEG 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,筛选出核心基因甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体 2(HAVCR2)进行后续验证研究。②实验2(小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 模型制备):体外培养 RAW264.7 细胞,通过 LPS 刺激制备 ET 模型(ET组,用 10 μg/L 的 LPS 培养 24 h 后,再用 100 μg/L 的 LPS 培养 4 h)和脓毒症模型(LPS组,用 100 μg/L 的 LPS 培养 4 h);磷酸盐缓冲液(PBS)组给予等体积溶媒 PBS 培养 4 h。采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测细胞 HAVCR2 的 mRNA 及蛋白表达。③实验3(HAVCR2 慢病毒载体转染 RAW264.7 细胞):为进一步明确 HAVCR2 是否参与 ET 形成,用慢病毒短发夹 RNA(shRNA)技术敲低 RAW264.7 细胞中的 HAVCR2 后,再制备 ET 模型(HAVCR2<sup>-</sup>-ET组),并设非敲低 HAVCR2 的对照组(ET组)。采用 RT-qPCR 法检测细胞中巨噬细胞极化关键基因[精氨酸酶 1( ARG1)、CD206、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、一氧化氮合酶 2(NOS2)]的 mRNA 表达。结果 ①实验1:共获得 1 013 个 DEG;与 LPS 组比较,ET 组有 521 个上调基因,492 个下调基因;这些 DEG 的功能主要为增加生物合成、抑制炎症反应,主要富集于 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子(JAK/STAT)、NOD 样受体、Toll 样受体(TLR)、TNF、缺氧诱导因子-1(HIF-1)等信号通路。选择 ET 组第一个表达上调的膜蛋白 HAVCR2 作为验证研究的目标。②实验2:体外实验结果显示,经大剂量 LPS 处理后,RAW264.7 细胞中 HAVCR2 mRNA 表达较 PBS 组明显下调;而 ET 组 HAVCR2 mRNA 表达明显高于 LPS 组( $2^{-\Delta\Delta CT}$ : $1.10 \pm 0.10$  比  $0.60 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ );Western blotting 检测结果与 RT-qPCR 结果一致。③实验3:与 ET 组相比,HAVCR2<sup>-</sup>-ET 组细胞 ARG1 和 CD206 的 mRNA 表达明显降低[ ARG1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $0.50 \pm 0.10$  比  $1.00 \pm 0.10$ , CD206 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $0.73 \pm 0.10$  比  $1.00 \pm 0.10$  ],下游因子 TNF-α 和 IL-1β 的 mRNA 表达明显升高[ TNF-α mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $2.20 \pm 0.10$  比  $1.00 \pm 0.10$ , IL-1β mRNA ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $9.00 \pm 0.10$  比  $1.00 \pm 0.10$  ],差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );两组 NOS2 mRNA 表达差异无统计学意义。结论 HAVCR2 参与脓毒症下游炎症因子的调节,参与 ET 的形成,有望成为脓毒症新的治疗靶点。

**【关键词】** 甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体 2; 内毒素耐受; 脓毒症; 生物信息学

基金项目:四川省科技计划项目(2019JDPT0003)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201106-00705

## Hepatitis A virus cell membrane protein receptor 2 promotes endotoxin tolerance in mouse macrophages

Liu Yao<sup>1</sup>, Liu Yi<sup>2</sup>, Zhang Xiaohe<sup>2</sup>, Chen Mulu<sup>1</sup>, Hu Yingchun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Emergency Medicine, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China; <sup>2</sup>Department of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

Corresponding author: Hu Yingchun, Email: huyingchun913@qq.com

**【Abstract】 Objective** To screen out the potential key genes of endotoxin tolerance (ET), and to provide theoretical and experimental evidence for treatment and prognosis of sepsis. **Methods** ① Experiment 1 (gene chip and bioinformatics analysis): ET related data set GSE47783 was downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO). The data set was obtained from lipopolysaccharide (LPS) stimulated mouse macrophages to establish sepsis model (LPS group) and ET model (ET group). IDEP 0.92 software was used to screen differential expressed gene (DEG) between the two groups, analyze gene ontology (GO), and locate the main functions and signaling pathways of differential genes. The protein-protein interaction (PPI) network of DEG was constructed by the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database (STRING) to screen core genes hepatitis A virus cell membrane protein receptor 2 (HAVCR2) for following up validation study. ② Experiment 2 (reproduction of mouse macrophage RAW264.7 model): RAW264.7 cells were cultured *in vitro*, the ET model (ET group, cells were cultured with 10 μg/L LPS for 24 hours and then with 100 μg/L

LPS for 4 hours) and sepsis model (LPS group, cells were cultured with 100  $\mu\text{g/L}$  LPS for 4 hours) were reproduced by LPS stimulation. Phosphate buffer saline (PBS) group was given equal volume of solvent PBS for 4 hours. The mRNA and protein expressions of HAVCR2 were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting. ③ Experiment 3 (RAW264.7 cells transfected with HAVCR2 lentiviral vector): to further clarify whether HAVCR2 was involved in the formation of ET, after knockdown of HAVCR2 in RAW264.7 cells by lentiviral short hairpin RNA (shRNA) technology, the ET model (HAVCR2<sup>-</sup>-ET group) was constructed again, and the control group (ET group) without knockdown of HAVCR2 was set up. RT-qPCR method was used to detect the mRNA expressions of macrophage polarization key proteins [arginase 1 (ARG1), CD206, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), nitric oxide synthase 2 (NOS2)] in cells. **Results** ① Experiment 1: a total of 1 013 DEG were identified, compared with LPS group, 521 genes were up-regulated and 492 genes were down-regulated in ET group. The function of these DEG was to increase biosynthesis and reduce inflammatory reaction. Signal pathways were mainly enriched in Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT), NOD like receptor, Toll-like receptor (TLR), TNF, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). The first up-regulated HAVCR2 in the ET group was selected as the target of the study. ② Experiment 2: the results of *in vitro* experiment showed that the mRNA expression of HAVCR2 after high-dose LPS stimulation was down-regulated as compared with PBS group, and the mRNA expression of HAVCR2 in ET group was significantly higher than that in LPS group ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ :  $1.10 \pm 0.10$  vs.  $0.60 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ). The results of Western blotting were consistent with RT-qPCR results. ③ Experiment 3: the mRNA expressions of ARG1 and CD206 in HAVCR2<sup>-</sup>-ET group were significantly lower than those in ET group [ARG1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $0.50 \pm 0.10$  vs.  $1.00 \pm 0.10$ , CD206 ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $0.73 \pm 0.10$  vs.  $1.00 \pm 0.10$ ], and the mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly higher than those in ET group [TNF- $\alpha$  mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $2.20 \pm 0.10$  vs.  $1.00 \pm 0.10$ , IL-1 $\beta$  mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $9.00 \pm 0.10$  vs.  $1.00 \pm 0.10$ ], with significant differences (all  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of NOS2 mRNA between the two groups. **Conclusion** HAVCR2 is involved in the regulation of inflammatory factors downstream of sepsis and the formation of ET, which is expected to become a new therapeutic target of sepsis.

**【Key words】** Hepatitis A virus cell membrane protein receptor 2; Endotoxin tolerance; Sepsis; Bioinformatics  
**Fund program:** Science and Technology Department of Sichuan Province of China (2019JDPT0003)  
DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20201106-00705

脓毒症(sepsis)是感染引起的宿主反应失调导致危及生命的器官功能障碍的症候群,是一个高病死率的临床综合征<sup>[1]</sup>。脓毒症不仅严重威胁人类健康,也给医疗卫生带来巨大的经济负担。现有的抗感染治疗已到达“瓶颈”,可能是因为研究者对脓毒症的机制尚未完全了解,目前认为其多数由革兰阴性杆菌表面的内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)促进了机体“炎症瀑布效应”<sup>[2]</sup>。研究表明,脓毒症患者处于免疫抑制状态时,单核/巨噬细胞分泌的促炎因子减少,而抗炎因子分泌增多,出现对内毒素吞噬作用减弱的内毒素耐受(endotoxin tolerance, ET)现象<sup>[3]</sup>,虽然ET现象的研究已较为广泛<sup>[4]</sup>,但目前其相关分子机制仍不明确。因此,本研究对ET与脓毒症的差异表达基因(differential expressed gene, DEG)进行鉴定,筛选出潜在新靶点甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体2(hepatitis A virus cellular receptor 2, HAVCR2),并初步探讨其是否有导致ET的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验注册与伦理学:**本实验为四川省科技计划项目(2019JDPT0003)内容,该项目经西南医科大学附属医院伦理委员会审批(审批号:ky2018029),并进行了注册(注册号:ChiCTR1900021261)。

**1.2 基因芯片与生物信息分析:**通过基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)筛出ET相关数据集GSE47783<sup>[5]</sup>。平台数据为GLP13912(美国Agilent Technologies公司2011年提供)。GSE47783数据集由LPS刺激小鼠巨噬细胞建立脓毒症或ET模型后进行实验获得,该实验设脓毒症组(LPS组,  $n=3$ )和ET组( $n=3$ )。提取两组基因表达谱数据,用网络软件IDEP 0.92,以 $P < 0.05$ 和 $\log_2$ 差异倍数(fold change, FC)  $> 1$ 标准筛选出初始DEG,并进行基因本体(gene ontology, GO)分析,寻找DEG主要富集功能和信号通路。用基因与蛋白质相互作用检索数据库(Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes Database, STRING),针对DEG构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction network, PPI)网络,以筛选出核心基因。

**1.3 小鼠巨噬细胞株RAW264.7模型制备:**RAW264.7细胞购自上海麦克林生化科技有限公司,置于含10%胎牛血清、1%青霉素和1%链霉素的RPMI 1640培养基,于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。ET组细胞用10  $\mu\text{g/L}$ 的LPS培养24 h后更换培养基,再用100  $\mu\text{g/L}$ 的LPS培养4 h;LPS组细胞用100  $\mu\text{g/L}$ 的LPS培养4 h;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)对

照组 (PBS 组) 细胞用等体积的溶媒 PBS 培养 4 h。

**1.4 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA):** 采用 ELISA 法检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的含量, 具体操作按照 ELISA 试剂盒 (武汉博士德科技有限公司) 说明书进行。

**1.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR):** 提取细胞总 RNA, 使用 mRNA 反转录试剂盒合成 cDNA; 参照宝生物染料法荧光定量试剂盒说明书进行 qPCR, 总体积为 20  $\mu$ L。热循环参数: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 随后进行 39 次循环 (95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s)。基因引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。基因表达量用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算。

**1.6 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting):** 制备全细胞裂解物, 提取待测蛋白质, 测量蛋白浓度并定量。将 80  $\mu$ g 蛋白质装载到每个通道中, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 2 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h。加大鼠抗鼠 HAVCR2 抗体 (1:100), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffer saline tween-20, PBST) 洗涤 3 次, 加二抗, 室温孵育 1 h, 显色曝光后, 用 Quantity one 4.0 软件对条带进行扫描分析。

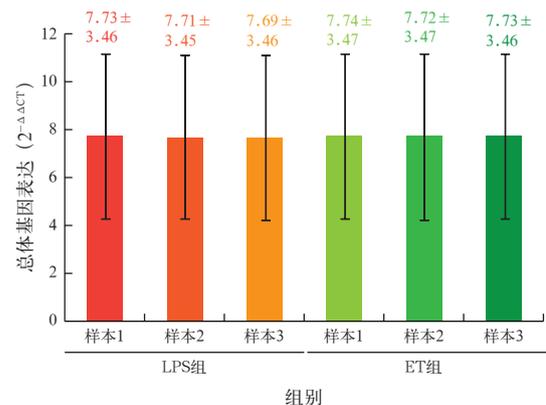
**1.7 HAVCR2 慢病毒载体转染 RAW264.7 细胞:** 从美国圣克鲁斯生物技术公司购买慢病毒载体, 该载体混合物由 3 个专为 HAVCR2 设计的独立短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 载体混合而成。将慢病毒载体转染到 RAW264.7 细胞 3 d 后, 用嘌呤霉素筛选细胞, 传至第 3 代获得稳定细胞株, 制备 ET 细胞模型, 分为 HAVCR2 敲低组 (HAVCR2<sup>-</sup>-ET 组) 和 ET 组, 进一步明确 HAVCR2 是否参与 ET 的形成。

**1.8 统计学分析:** 所有数据采用 Graphpad Prism 7.0 软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 原始测序数据经对数化处理后进行 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

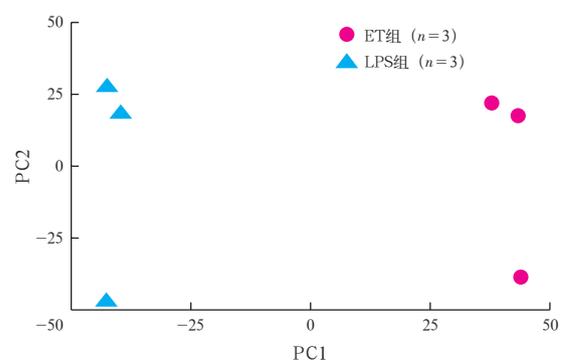
**2.1 DEG 筛选结果与功能分析:** GSE47783 基因芯片数据经 IDEP 0.92 平台分析以及基因均一化和对数化处理后显示, ET 组与 LPS 组总体基因在同一水平, 具有可比性 (图 1~2)。共获得 DEG 1 013 个,

与 LPS 组比较, ET 组有 521 个上调基因, 492 个下调基因 (图 3)。DEG 功能及信号通路富集分析显示, 上述 DEG 功能主要为增加生物合成, 抑制炎症反应 (表 1); 主要富集于 Janus 激酶 / 信号转导与转录激活因子 (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription, JAK/STAT)、NOD 样受体、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、TNF、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 等信号通路 (表 2)。PPI 网络显示 (图 4), 有多个基因位于网络中; 其中, HAVCR2、CD247、Smad7、原癌基因 ABL1 和 Fos、集落刺激因子 1 (colony stimulating factor 1, CSF1)、核受体亚家族 1 H 组成员 3 (nuclear receptor subfamily 1 group H member 3, NR1H3) 等在 ET 时表达相对增高, TNF、细胞因子信号转导抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1)、原癌基因 LCK 和 PML 等则在 ET 时表达相对下降 (图 5)。本研究选择在 ET 组第一个表达上调的膜蛋白 HAVCR2 进行后续的验证研究。



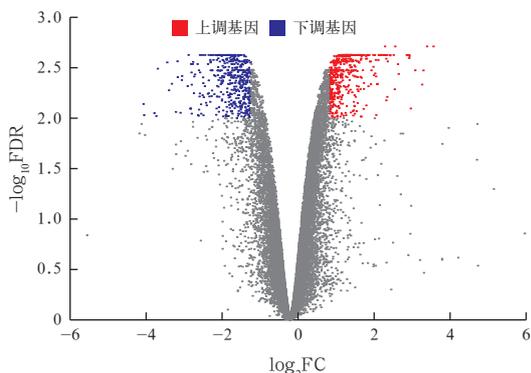
注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖

图 1 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组总体基因表达比较



注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖; PC1、PC2 分别为两种主要区分因子 (基因)

图 2 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组基因主成分分析 (PCA)



注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖, FC 为差异倍数, FDR 为错误发现率

图3 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组差异表达基因的火山图

表1 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组差异表达基因的主要功能富集分析

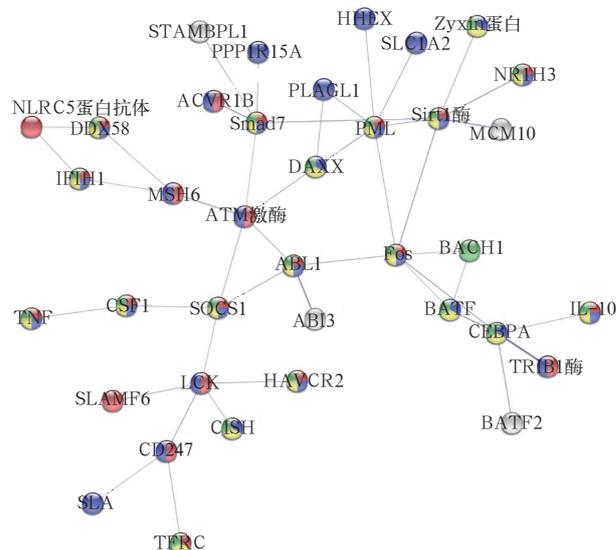
差异表达基因变化趋势	P 值	基因数 (个)	基因功能富集
下调	$7.80 \times 10^{-17}$	134	细胞代谢过程的正调控
	$1.90 \times 10^{-16}$	129	氮化合物代谢过程的正调控
	$4.50 \times 10^{-16}$	131	高分子代谢过程的正调控
	$4.50 \times 10^{-16}$	83	磷酸化的调控
	$4.50 \times 10^{-16}$	132	细胞对化学刺激的反应
	$2.60 \times 10^{-15}$	130	细胞对有机物刺激的反应
	$2.60 \times 10^{-15}$	73	对细胞因子刺激的反应
上调	$3.30 \times 10^{-5}$	84	对外部刺激的反应
	$4.00 \times 10^{-5}$	112	细胞通讯的调节
	$4.00 \times 10^{-5}$	113	信号调节
	$4.00 \times 10^{-5}$	129	细胞发育过程
	$4.00 \times 10^{-5}$	87	发展调节过程
	$4.00 \times 10^{-5}$	131	调节对刺激的反应
	$4.10 \times 10^{-5}$	109	细胞代谢过程的正调控
	$7.30 \times 10^{-5}$	102	细胞对化学刺激的反应
	$5.10 \times 10^{-5}$	56	细胞大分子生物合成过程的负调控
	$1.40 \times 10^{-4}$	120	细胞分化

注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖; 因基因富集功能较多, 且基因功能多有交叉, 故仅列出部分关联紧密的基因功能

表2 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组差异表达基因的信号通路富集分析

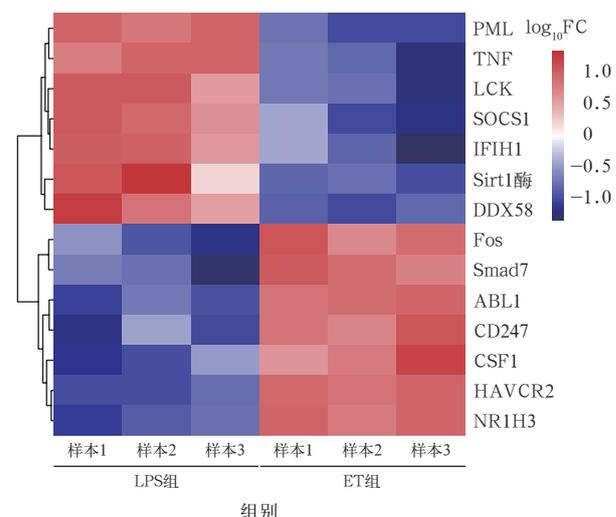
差异表达基因变化趋势	P 值	基因数 (个)	信号通路
下调	$0.66 \times 10^{-3}$	10	TLR 信号通路
	$0.66 \times 10^{-3}$	8	RIG-I 样受体信号通路
	$0.66 \times 10^{-3}$	12	JAK/STAT 信号通路
	$0.66 \times 10^{-3}$	10	TNF 信号通路
	$0.94 \times 10^{-3}$	12	NOD 样受体信号通路
	$0.56 \times 10^{-2}$	9	FoxO 信号通路
上调	$1.11 \times 10^{-3}$	10	HIF-1 信号通路
	$0.17 \times 10^{-2}$	8	糖酵解 / 糖异生

注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖, TLR 为 Toll 样受体, RIG-I 为视黄酸 (维甲酸) 诱导基因蛋白 I, JAK/STAT 为 Janus 激酶 / 信号转导与转录激活因子, TNF 为肿瘤坏死因子, FoxO 为叉头盒转录因子 O, HIF-1 为缺氧诱导因子-1; 因基因通路富集较多, 且基因功能多有交叉, 故仅列出部分关联紧密的信号通路



注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖, PPI 为蛋白质-蛋白质相互作用, STAMBPL1 为 STAM 结合蛋白 1, PPP1R15A 为蛋白磷酸酶 1 调节因子亚基 15A, ACVR1B 为激活素 A 受体 1B 型, HHEX 为造血表达同源盒, SLC1A2 为溶质载体家族 1 成员 2, PLAGL1 为多型性腺瘤基因样 1, PML, LCK, ABL1, Fos 为原癌基因, DAXX 为死亡结构域相关蛋白, NR1H3 为核受体亚家族 1H 组成员 3, MCM10 为微染色体维持蛋白 10, DDX58 为 DEX/D/H-Box 解旋酶 58, IFIH1 为干扰素诱导的解旋酶 C 结构域 1, MSH6 为错配修复基因, TNF 为肿瘤坏死因子, CSF1 为集落刺激因子 1, SOCS1 为细胞因子信号转导抑制因子 1, BACH1 为转录调节蛋白抗体, HAVCR2 为甲型肝炎病毒细胞受体 2, CISH 为细胞因子诱导含 SH2 蛋白, SLA 为 Src 样受体, TFRC 为转铁蛋白受体, BATF 为碱性亮氨酸拉链转录因子, CEBPA 为 CCAAT/增强子结合蛋白  $\alpha$ , IL-10 为白细胞介素-10; 红色代表免疫系统进程调节, 蓝色代表细胞交流, 黄色代表对有机物的细胞反应, 绿色代表对化学物的细胞反应

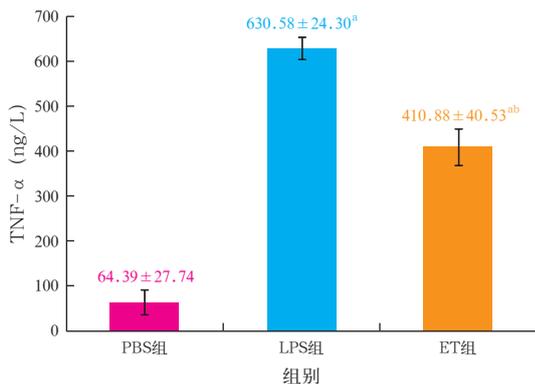
图4 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组差异基因的 PPI 网络图



注: GSE47783 为从基因表达数据库 (GEO) 筛出的内毒素耐受 (ET) 相关数据集, LPS 为脂多糖, FC 为差异倍数, PML, LCK, Fos, ABL1 为原癌基因, TNF 为肿瘤坏死因子, SOCS1 为细胞因子信号转导抑制因子 1, IFIH1 为干扰素诱导的解旋酶 C 结构域 1, DDX58 为 DEX/D/H-Box 解旋酶 58, CSF1 为集落刺激因子 1, HAVCR2 为甲型肝炎病毒细胞受体 2, NR1H3 为核受体亚家族 1H 组成员 3; 红色代表上调基因, 蓝色代表下调基因

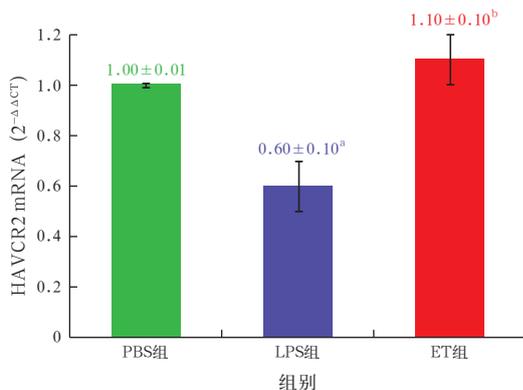
图5 GSE47783 数据集中 LPS 组与 ET 组核心差异表达基因热图

**2.2 HAVCR2 在 ET 时的表达情况:**体外实验显示,经大剂量 LPS 处理 4 h 后,RAW264.7 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  含量较 PBS 组明显升高( $P<0.05$ );而 ET 组 TNF- $\alpha$  含量较 LPS 组下降约 30%( $P<0.01$ ;图 6),提示 ET 细胞模型制备成功。RT-qPCR 结果显示, LPS 组 RAW264.7 细胞 HAVCR2 mRNA 表达较 PBS 组明显降低( $P<0.05$ );而 ET 组 HAVCR2 mRNA 表达则较 LPS 组升高约 1 倍( $P<0.01$ ;图 7);Western blotting 结果与 RT-qPCR 结果一致(图 8)。



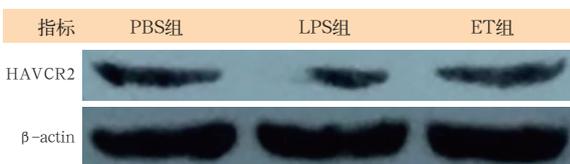
注: PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, ET 为内毒素耐受, RAW264.7 为小鼠巨噬细胞株, TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 与 PBS 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 LPS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.01$

**图 6 各组 RAW264.7 细胞上清液中 TNF- $\alpha$  水平比较**



注: PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, ET 为内毒素耐受, RAW264.7 为小鼠巨噬细胞株, HAVCR2 为甲型肝炎病毒细胞受体 2; 与 PBS 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 LPS 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$

**图 7 各组 RAW264.7 细胞中 HAVCR2 mRNA 表达比较**



Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, PBS 为磷酸盐缓冲液, LPS 为脂多糖, ET 为内毒素耐受, RAW264.7 为小鼠巨噬细胞株, HAVCR2 为甲型肝炎病毒细胞受体 2,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

**图 8 Western blotting 检测各组 RAW264.7 细胞中 HAVCR2 蛋白表达**

**2.3 HAVCR2 的功能:**使用 shRNA 技术将 RAW264.7 细胞中 HAVCR2 基因敲低后再制备 ET 细胞模型,以明确 HAVCR2 是否参与 ET 形成。结果显示(表 3),与 ET 组相比, HAVCR2<sup>-</sup>-ET 组 RAW264.7 细胞精氨酸酶 1 (arginase 1, ARG1) 和 CD206 的 mRNA 表达明显降低(均  $P<0.05$ );但 HAVCR2<sup>-</sup>-ET 组下游因子 TNF- $\alpha$  和白细胞介素-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 的 mRNA 表达较 ET 组显著增高(均  $P<0.05$ );两组一氧化氮合酶 2 (nitric oxide synthase 2, NOS2) mRNA 表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**表 3 是否敲低 HAVCR2 基因两组 RAW264.7 细胞中巨噬细胞极化关键基因表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本数 (孔)	mRNA 表达 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )		
		ARG1	CD206	NOS2
ET 组	3	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10
HAVCR2 <sup>-</sup> -ET 组	3	0.50 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.10

组别	样本数 (孔)	mRNA 表达 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
ET 组	3	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10
HAVCR2 <sup>-</sup> -ET 组	3	2.20 ± 0.10 <sup>a</sup>	9.00 ± 0.10 <sup>b</sup>

注: ET 为内毒素耐受, HAVCR2<sup>-</sup> 为甲型肝炎病毒细胞膜蛋白受体 2 (HAVCR2) 敲低, RAW264.7 细胞为小鼠巨噬细胞株, ARG1 为精氨酸酶 1, NOS2 为一氧化氮合酶 2, TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  为白细胞介素-1 $\beta$ ; 与 ET 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$

### 3 讨论

脓毒症是目前医学界面临的重大难题与挑战,随着现代医学的快速发展,各个领域对脓毒症的探索越来越深入。尽管多年来国际上对脓毒症采用积极的“拯救”措施,但是近 20 年来脓毒症的发病率和病死率居高不下<sup>[6]</sup>,仍然是一个全球性的健康问题<sup>[7]</sup>。脓毒症发病过程中机体并非处于持续的过度炎症反应状态,同时还合并免疫抑制<sup>[8]</sup>。目前的抗感染、高级生命支持治疗<sup>[9-10]</sup>以及祖国传统医药的辨证施治<sup>[10]</sup>都已经进入了“瓶颈期”,决定疾病预后的机制仍未阐明,所以寻找新的脓毒症生物标志物,为脓毒症的研究提供新的靶点尤为紧迫。本研究中采用生物信息分析的方法,对 ET 转录数据进行比较分析,确定了 ET 的 DGE, 并发现 DGE 分布于多条信号通路,如 JAK/STAT、NOD 样受体、TLR、TNF、HIF-1 等,通过 GO 富集分析和信号通路分析发现, DEG 与免疫反应和生物合成相关,且 DGE 在 T 细胞受体和代谢等与 ET 相关的信号通路富集。为了补充阐明 ET 形成的机制,了解参与 ET 形成的膜蛋白,本研究选择了表达明显升高的膜蛋白 HAVCR2 作为验证研究的目标。

HAVCR2 属于 I 型跨膜蛋白,其细胞外区含有免疫球蛋白 V 区,该区域有 31% 丝氨酸和丝氨酸残基组成的黏蛋白区,胞质区含有被高度保守的氨基酸序列包绕的 6 个酪氨酸序列,其中一个属于酪氨酸磷酸化基序,是 HAVCR2 参与调控细胞信号转导途径的关键位点,但具体调控过程及对细胞的影响并不清楚<sup>[11-13]</sup>。目前 HAVCR2 相关研究主要集中在肿瘤免疫抑制相关机制方面,并证实其与 T 细胞免疫衰竭有关,在感染性疾病中研究相对较少<sup>[14-16]</sup>。HAVCR2 天然配体半乳凝集素-9 (galectin-9, Gal-9) 广泛分布于组织中,与 HAVCR2 结合后形成细胞通路,产生多种生物学效应,在调节机体免疫、诱导细胞凋亡等方面具有重要作用,但其参与调节的机制比较复杂,有待进一步探索研究<sup>[17-19]</sup>。本研究通过 RT-qPCR 及 Western blotting 均发现,HAVCR2 在 ET 组中表达较 LPS 组明显增高,这提示 HAVCR2 可能参与了 ET 的形成,与本实验中基因芯片生物信息学分析结果是一致的。为进一步明确 HAVCR2 是否参与 ET 形成,本研究使用 shRNA 技术对 HAVCR2 进行敲低后制备 ET 模型,结果提示, HAVCR2 减弱了巨噬细胞 RAW264.7 向 M2 型转化,并减少炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达,促进巨噬细胞内毒素耐受形成。有研究提示,严重脓毒症患者外周血单个核细胞 HAVCR2 mRNA 表达较脓毒症早期患者明显下调, HAVCR2 与重组人 Gal-9 作用后可抑制 LPS 诱导巨噬细胞活化,表明 HAVCR2 对 LPS 信号通路起负调控作用,在脓毒症中对机体有保护性作用<sup>[20]</sup>,这与本研究的结果一致。所以我们推测 HAVCR2 参与了 ET 的形成,并对机体具有一定的保护作用。

综上所述,本研究通过生物信息学筛选出 ET 与脓毒症的 DGE,利用关联紧密的基因构建出患者的 PPI 网络,筛选出关键核心基因 HAVCR2 并进行分子生物学分析,以此认为 HAVCR2 参与了 ET 的形成,并对机体具有一定的保护作用,但仍需要大规模的临床数据支撑。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Taeb AM, Hooper MH, Marik PE. Sepsis: current definition, pathophysiology, diagnosis, and management [J]. *Nutr Clin Pract*, 2017, 32 (3): 296-308. DOI: 10.1177/0884533617695243.
- [3] Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance [J]. *Trends Immunol*, 2009, 30 (10): 475-487. DOI: 10.1016/j.it.2009.07.009.
- [4] 吕镗烽, 宋勇. Toll 样受体在脂多糖耐受性机制作用中的研

究进展 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17 (4): 251-253. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2005.04.023.

- [5] Lyu TF, Song Y. Research progress of Toll like receptors in lipopolysaccharide tolerance [J]. *Chin Crit Care Med*, 2005, 17 (4): 251-253. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2005.04.023.
- [6] O'Carroll C, Fagan A, Shanahan F, et al. Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (1): 427-436. DOI: 10.4049/jimmunol.1301722.
- [7] Grande E, Grippo F, Frova L, et al. The increase of sepsis-related mortality in Italy: a nationwide study, 2003-2015 [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38 (9): 1701-1708. DOI: 10.1007/s10096-019-03601-3.
- [8] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10141): 75-87. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30696-2.
- [9] 苏和毅, 莫泽珣, 陈珍, 等. ICU 严重免疫失衡疾病——持续炎症-免疫抑制-分解代谢综合征 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29 (8): 760-764. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.08.019.
- [10] Su HY, Mo ZX, Chen Z, et al. Severe disease of immune imbalance in ICU: persistent inflammation immunosuppression catabolism syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29 (8): 760-764. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.08.019.
- [11] Polat G, Ugan RA, Cadirci E, et al. Sepsis and septic shock: current treatment strategies and new approaches [J]. *Eurasian J Med*, 2017, 49 (1): 53-58. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2017.17062.
- [12] 中国医疗保健国际交流促进会急诊医学分会, 中华医学会急诊医学分会, 中国医师协会急诊医师分会, 等. 中国“脓毒症早期预防与阻断”急诊专家共识 [J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32 (5): 518-530. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200514-00414.
- [13] Emergency Medicine Branch of Chinese Medical Care International Exchange Promotion Association, Emergency Medical Branch of Chinese Medical Association, Chinese Medical Doctor Association Emergency Medical Branch, et al. Consensus of Chinese experts on early prevention and blocking of sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2020, 32 (5): 518-530. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200514-00414.
- [14] Rotte A, Jin JY, Lemaire V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29 (1): 71-83. DOI: 10.1093/annonc/mdx686.
- [15] Lee J, Su EW, Zhu C, et al. Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31 (19): 3963-3974. DOI: 10.1128/MCB.05297-11.
- [16] Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, et al. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion [J]. *Nat Med*, 2012, 18 (9): 1394-1400. DOI: 10.1038/nm.2871.
- [17] Domínguez-Nieto A, Zentella A, Moreno J, et al. Human endotoxin tolerance is associated with enrichment of the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> monocyte subset [J]. *Immunobiology*, 2015, 220 (1): 147-153. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.08.008.
- [18] Yan J, Bai J, Gao C, et al. Chronic unpredictable stress abrogates the endotoxin tolerance induced by repeated peripheral LPS challenge via the TLR4 signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 645: 7-13. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.02.070.
- [19] Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4<sup>+</sup> T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines [J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39 (9): 2492-2501. DOI: 10.1002/eji.200939274.
- [20] Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1 (6): a001651. DOI: 10.1101/cshperspect.a001651.
- [21] Yao Y, Deng H, Li P, et al.  $\alpha$ -Lactose improves the survival of septic mice by blockade of TIM-3 signaling to prevent NKT cell apoptosis and attenuate cytokine storm [J]. *Shock*, 2017, 47 (3): 337-345. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000717.
- [22] Liu Y, Wang J, Wang L, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of Tim-3 and Galectin-9 in the woodchuck model [J]. *Mol Immunol*, 2017, 83: 127-136. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.01.018.
- [23] Yang X, Jiang X, Chen G, et al. T cell Ig mucin-3 promotes homeostasis of sepsis by negatively regulating the TLR response [J]. *J Immunol*, 2013, 190 (5): 2068-2079. DOI: 10.4049/jimmunol.1202661.

(收稿日期: 2020-11-06)