

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.004

## IRE1-XBP1 通路调控肝巨噬细胞极性的机制研究\*

胡大仁<sup>1</sup>,程黎<sup>1</sup>,刘燕<sup>1</sup>,刘一鸣<sup>2</sup>,李金政<sup>2</sup>,龚建平<sup>2</sup>,苟剑林<sup>1△</sup>

(1. 重庆三峡中心医院肝胆外科,重庆万州 404000;2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

**[摘要]** **目的** 分离、培养 LEWIS 大鼠肝脏肝巨噬细胞(KCs),观察肌醇酶 1-X 盒连接蛋白 1(IRE1-XBP1)通路活性改变对 KCs 功能的调控的作用机制。**方法** (1)采取 IV 型胶原酶消化肝脏联合非连续梯度离心法分离 Lewis 大鼠 KCs;(2)鉴定后的 KCs 分为 4 组: XBP1 沉默组(XBP1-shRNA 组)、错义序列沉默对照组(Ctrl-shRNA 组); Adv-XBP1 过表达组(Adv-XBP1 组)、错义序列过表达对照组(Ctrl-Adv 组);(3)实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组 KCs 中 XBP1、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 转录水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JAK1、JAK2、STAT1 及 STAT3 的蛋白表达水平;(4)流式细胞术(FCM)及激光共聚焦检测各组 KCs 表型的变化情况;(5)分离大鼠脾脏淋巴细胞,尼龙毛柱过滤纯化 T 细胞,与上述各组 KCs 共培养, Brdu 渗入法检测 T 细胞增殖情况;(6) Annexin V/PI 法 FCM 观察 T 淋巴细胞凋亡情况;(7)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测上清液中 IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 及 IL-10 水平。**结果** (1)RT-PCR 结果显示, XBP1-shRNA 组中 XBP1 的表达量较对照组显著降低,而在 Adv-XBP1 组则明显上调( $P<0.05$ );(2)FCM 发现, XBP1-shRNA 组中 MHC-II、CD86、CD40 的表达明显低于对照组,而 CD204 和 CD206 的表达则显著高于对照组;而在 Adv-XBP1 组,则呈相反趋势;(3)Western blot 检测发现 XBP1-shRNA 组中 JAK1、JAK2、STAT1 和 STAT3 的蛋白表达及其磷酸化水平均受到抑制,而在 Adv-XBP1 组则上述蛋白的表达及磷酸化水平得到显著增强;(4)Brdu 发现抑制 KCs 中 IRE1-XBP1 活性后 T 细胞增殖受到明显抑制,凋亡增加,促炎细胞因子分泌减少,抗炎细胞因子分泌增加( $P<0.05$ ),而上调 KCs 中 IRE1-XBP1 活性后 T 细胞增殖则明显增强,凋亡明显减少,促炎细胞因子分泌增加,抗炎细胞因子分泌减少( $P<0.05$ )。**结论** KCs 中 IRE1-XBP1 通路活性变化可以转化 KCs 的极性状态,并通过调节 JAK-STAT 家族成员表达,调控 KCs 自分泌细胞因子的组成成分;KCs 中 IRE1-XBP1 通路活性变化可以影响共培养初始 T 淋巴细胞的增殖分化、凋亡及相关细胞因子的分泌。

**[关键词]** X 盒结合蛋白 1;肝巨噬细胞;极性调节

**[中图分类号]** R392.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2314-05

### The effect of IRE1-XBP1 pathway on regulation of polarization in activated Kupffer cells\*

Hu Daren<sup>1</sup>, Cheng Li<sup>1</sup>, Liu Yan<sup>1</sup>, Liu Yiming<sup>2</sup>, Li Jinzheng<sup>2</sup>, Gong Jianping<sup>2</sup>, Gou Jianlin<sup>1△</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Wanzhou, Chongqing 404000, China;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To isolate and culture rats liver KCS, and to explore the effect of IRE1-XBP1 pathway on regulation of polarization in activated Kupffer cells(KCs). **Methods** (1)Rat KCs were isolated by IV type collagenase digestion and gradient centrifugation methods. (2)KCs were transfected and randomly divided into four groups: XBP1-shRNA group, Ctrl-shRNA group, Adv-XBP1 group and Ctrl-Adv group. (3)The transfection level of KCs XBP1, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 were detected by RT-PCR; the protein expression level of JAK1, JAK2, STAT1 and STAT3 were evaluated by Western blot. (4)The changes of KCs expression type in each group were detected by flow cytometry (FCM) and the laser confocal. (5)T cells derived from rat spleen cells were co-cultured within the 4 groups of KCs mentioned above; T cells proliferation was measured by Brdu labeling assay. (6)T cells apoptosis was determined by Annexin V/PI FCM analysis. (7)The density of IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 and IL-10 in the supernatant of co culture was assessed by ELISA. **Results** (1)The mRNA and protein level of XBP1 were measured by RT-PCR and western blot, those in XBP1-shRNA group were significantly reduced compared with those in the other three groups, while in Adv-XBP1 groups, results demonstrated entirely the opposite tendency ( $P<0.05$ ). (2)The expression of marker molecules on the surface of KCs such as MHC II, CD86 and CD40 in XBP1-shRNA group were significantly lower ( $P<0.05$ ), but CD204 and CD206 expression were much higher compared with the other three ( $P<0.05$ ). However the expression tendency of these surface markers were shown the opposite results in Adv-XBP1 group ( $P<0.05$ ). (3)Western blot revealed the XBP1-shRNA could statistically suppress the protein levels and phosphorylation of JAK1, JAK2, STAT1 and STAT3, which involved in the pro inflammatory cytokines regulation and KCs polarization ( $P<0.05$ ). But in Adv-XBP1 group, these protein and its phosphorylation were markedly promoted ( $P<0.05$ ). ELISA results collaborated with Western blot. (4)3 d after co cultured with KCs transfected with XBP1-shRNA, the levels of T lymphocyte proliferation and pro inflammatory cytokines secretion were significantly reduced, but the levels of T lymphocyte apoptosis and anti inflammatory cytokines secretion were remarkably enhanced( $P<0.05$ ). **Conclusion** Blockage of IRE1-XBP1 activation could alter the phenotype of active KCs to M2 like type and attenuated the capacity of antigen present of KCs, while up regulated the expression of IRE1-XBP1 pathway could change the phenotype of KCs to M1 type plus the promotion of antigen present capacity.

**[Key words]** X binding protein 1; Kupffer cells; polarization regulation

目前认为,急性排斥反应发生的实质是持续的炎症反应及炎症因子蓄积浸润。而抗原递呈细胞是诱导炎症反应及炎症因子趋化的核心因素<sup>[1-2]</sup>。笔者前期发现,作为肝血窦内的固有巨噬细胞,也是机体最大的抗原递呈细胞群的肝巨噬细胞(kupffer cells, KCs),活化后具有即可促进急性排斥反应,也能调控下游相关耐受分子表达改变,有利于免疫抑制的双重“性格”。但其具体机制尚不清楚。尝试增强其下游耐受相关分子的表达,仅能延缓排斥反应的发生<sup>[3-4]</sup>。其原因可能与忽略了 KCs 活化后 M1/M2 极性调节相关。

前期对肌醇酶 1-X 盒连接蛋白 1 (inositol requiring enzyme 1-X-box binding protein 1, IRE1-XBP1) 通路的研究主要局限于非折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 中<sup>[5]</sup>。新近文献报道, IRE1-XBP1 通路活性改变参与了调节 B 淋巴细胞分化、树突状细胞等抗原递呈细胞功能稳态、巨噬细胞分泌性质等诸多免疫调控环节<sup>[6-7]</sup>。而 KCs 作为机体最大的巨噬细胞群/APC 群, IRE1-XBP1 通路调控 KCs 的作用, 尚未见相关报道。本课题组认为, IRE1-XBP1 通路可能在调控 KCs 功能及其自分泌细胞因子中起着关键作用。本研究中, 笔者以大鼠肝脏 KCs 为靶细胞, 分别转染 XBP1-shRNA 及 AdV-XBP1, 观察其功能极性的改变, 以及对初始 T 淋巴细胞激活分化的影响, 从体外实验的角度初步探讨以 KCs 中 IRE1-XBP1 通路为作用靶点调控细胞免疫的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 健康近交系 6~8 周龄 Lewis(Rtl1) 大鼠, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养于 SPF 级实验室。给予标准鼠料喂养, 12 h 昼夜节律, 正常饮水。术前 8~12 h 禁食。主要试剂: IV 型胶原酶购于 Santa Cruz 公司; 小鼠抗大鼠 XBP1、MCH-II、CD86、CD204、CD206、CD163 抗体购自 Abcam 公司; 兔抗大鼠 JNK、JAK1、STAT3 单克隆抗体购自 eBioscience 公司; PrimeScript<sup>TM</sup> reagent Kit 试剂盒购于 Takara 公司; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购于 Sigma 公司。所有操作遵守重庆医科大学伦理委员会指南。

### 1.2 方法

**1.2.1 沉默及过表达质粒的构建** 干扰质粒与过表达质粒及其错义序列对照质粒的构建交由上海英潍捷基贸易有限公司代为构建。选择载体分别是 pcDNA3.1/Hygro-IRES2-EGFP 和 pcDNA6.2<sup>TM</sup>-GW/EmGFP。质粒抽取按照 OMEGA 质粒抽取试剂盒说明书进行, 最终调整质粒浓度为 500 ng/ $\mu$ L。参照脂质体 Lipofectamine2000 说明书指导进行胞内转染操作。

**1.2.2 KCs 分离培养及分组** 取 Lewis 大鼠肝组织, 加入终浓度为 0.1% 的 IV 型胶原酶后切碎并水浴, 经 200 目细胞筛过滤后得到肝细胞悬液。经 4 次离心后得到含少量红细胞的肝脏非实质细胞悬液。采用 2 h 选择性贴壁法纯化 KCs。常规培养 3 d 后, 取 KCs 种于 6 孔板 ( $1 \times 10^6$  个/孔), 参照脂质体 Lipofectamine2000 说明书指导分别转染 XBP1-shRNA、AdV-XBP1 及其对照质粒。分组如下: XBP1 沉默组 (XBP1-shRNA 组, 滴度为  $3 \times 10^8$  TU/mL), 错义序列质粒沉默对照组 (Ctrl-shRNA 组, 滴度为  $3 \times 10^8$  TU/mL), AdV-XBP1 过表达组 (AdV-XBP1 组, 滴度为  $3 \times 10^8$  TU/mL), 错义序列质粒过表达对照组 (Ctrl-AdV 组, 滴度为  $3 \times 10^8$  TU/mL)。

**1.2.3 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测** 各组中 XBP1、IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-17 mRNA 表达水平 按 Trizol 试剂盒说明书提取 KCs 及肝脏总组织 RNA, XBP1 上游引物: 5'-ATC GTC GAC CCG GGA CTA CAG GAC CAA TA-3', 下游引物: 5'-GCG CAA GCT TAT GTG ATG GTC AGG GAA AGG-3'; IL-6 上游引物: 5'-AGA TAA CAA GAA AGA CAA AGC CAG AGT C-3', 下游引物: 5'-GCA TTG GAA ATT

GCG GTA GGA AG-3'; IFN- $\gamma$  上游引物: 5'-ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC-3', 下游引物: 5'-TAG GCT TTC AAT GAC TGT -3'; TNF- $\alpha$  上游引物: 5'-TCT ACT GAA CTT CGG GGT GAT CG-3', 下游引物: 5'-CGT GGG CTA CAG GCT TGT A-3'; IL-17 上游引物: 5'-CTC AAC CGT TCC ACG TCA CCC -3', 下游引物: 5'-CCA GCT TTC CCT CCG CAT-3'; 利用 SYB<sup>R</sup> Premix Ex Taq II 试剂盒测定 RNA 的逆转录的表达情况。RT-PCR 结果采取  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析表达基因的表达差异,  $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 实验组} - (Ct \text{ 目的基因} - Ct \text{ 管家基因}) \text{ 对照组}$ 。以上实验均重复 3 次。

**1.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测** 各组 KCs 中 XBP1、JAK、STAT 的蛋白表达 按照总蛋白提取试剂盒说明书提取 KCS 和移植肝脏总蛋白进行含量测定, 常规 Western blot 测定, 一抗浓度稀释成 1:200; 二抗浓度稀释成 1:2000 显影后 BioRad 系统捕获图片, Quantity One 分析。以上实验均重复 3 次。

**1.2.5 流式细胞术检测 KCs 表型分子表达** 将转染后 48 h 各组 KCs 分为 LPS 处理及对照两个亚组, 加入不同荧光素标记的兔抗大鼠 MHC-II、CD206、CD204、CD40 和单克隆抗体避光孵育 2 h。打开机器及氩离子光源, 预热, 机器自动初始化。用标准荧光微球校准, 荧光信号的变异系数设置小于 3%。孵育相应二抗, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 1 次, 1 h 内上机检测, 每个亚组取  $1 \times 10^4$  个细胞, FlowJo 分析结果。以上实验均重复 3 次。

**1.2.6 T 淋巴细胞共培养及功能检测** 取经卵清蛋白 (OVA) 皮下免疫 2 次的 Lewis 鼠脾组织制作脾细胞悬液, 经梯度离心法获混合淋巴细胞悬液, 用尼龙毛柱 (Wako) 过滤纯化。培养液中加入终浓度为 100  $\mu$ mol/L 的 Brdu 工作液。将  $5 \times 10^5$  个 T 细胞按 5:1 比例与上述各转染的 KCs 在 6 孔培养板中进行混合培养 72 h, 按照 Brdu 试剂说明书进行处理, 用 Image-Pro Plus6.0 软件选取相同的红光作为判断所有照片阳性的统一标准, 阳性率 = 阳性细胞数/核数量。将  $5 \times 10^5$  个 T 细胞按 5:1 配置与上述各组 KCs 在 96 孔板中混合培养 72 h, 每孔加入 1  $\mu$ g/mL OVA323-339, 刺激后收集细胞液, 离心后加入 Annexin V-FITC 及 PI, 上机, 激发波长为 488 nm (绿光) 和 630 nm (红光), 检测凋亡。以上实验均重复 3 次。

**1.2.7 ELISA 检测** 取各组共培养上清液, 按 ELISA 试剂盒标准步骤操作, 检测各组中 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-17 的表达差异。以上实验均重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计软件对所有数据进行正态性检验, 正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 非正态分布数据用中位数表示。对正态分布计量资料采用参数检验, 非正态分布数据采取秩和检验或  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 KCs 中 XBP1 转录、表达的变化** 转染 48 h 后, 荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白大量表达。其转染效率约为 87% (图 1A)。RT-PCR 提示: XBP1-shRNA 组、Ctrl-shRNA 组、AdV-XBP1 组及 Ctrl-AdV 组中 XBP1 mRNA 相对表达量分别为  $0.58 \pm 0.07$ 、 $0.81 \pm 1.28$ 、 $48.65 \pm 5.82$  和  $10.31 \pm 1.74$  (图 1B)。XBP1-shRNA 组中 XBP1 的转录水平较其余 3 组明显受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 提示 XBP1-shRNA 质粒有效抑制 KCs 中 XBP1 正常生理量的表达水平; 而在 AdV-XBP1 组中, XBP1 mRNA 的转录活性较其余 3 组则明显上调 ( $P < 0.05$ )。Western blot 检测各组 KCs 中 XBP1 蛋白表达水平, 其结果显示: XBP1-shRNA 组、Ctrl-shRNA 组、AdV-XBP1 组及 Ctrl-AdV 组中 XBP1 的蛋白相对表达水平分别为  $0.14 \pm 0.04$ 、 $0.49 \pm 0.01$ 、 $0.84 \pm 0.02$ 、 $0.53 \pm 0.07$ 。Western blot 结果 (图 1C) 与

RT-PCR 的趋势相一致。

### 2.2 IRE1-XBP1 通路对 KCs 极性的影响

#### 2.2.1 IRE1-XBP1 通路活性对 KCs 表型分子的影响

MHC-II、CD40、CD86 等功能分子是决定 KCs 抗原呈递细胞呈递功能,以及活化初始 T 细胞功能的关键因子,其高表达提示 KCs 呈 M1 型极化。而 CD204 及 CD206 则是 M2 型 KCs 的表面特异性标志物。FCM 显示: XBP1-shRNA 组中 MHC-II (28.56±1.34)%, CD40(31.75±5.87)% 和 CD86(18.24±2.63)% 较 Ctrl-shRNA 组 MHC-II (68.74±12.56)%, CD40 (72.60±12.45)% 和 CD86 (57.76±9.74)% 明显下调 ( $P < 0.05$ )。在 AdV-XBP1 组中, MHC-II (89.46±21.43)%, CD40(72.60±15.74)% 及 CD86(86.17±24.28)% 的表达水平与 Ctrl-AdV 组 (60.39±18.73)%, (49.24±18.45)% 和 (59.13±15.67)% 相比则显著增加 ( $P < 0.05$ )。但是 CD204 及 CD206 分子在各组中的表达水平则呈相反趋势, CD204 和 CD206 在 XBP1-shRNA 组的表达水平分别为 (47.22±9.84)% 和 (45.67±11.37)%, 较 AdV-XBP1 中 CD204

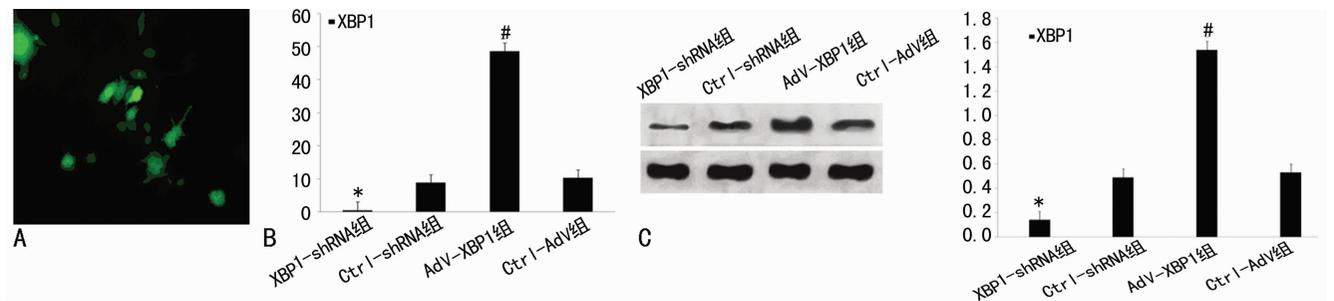
(12.54±3.41)% 和 CD206(12.31±3.34)% 的明显上升 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A。

#### 2.2.2 IRE1-XBP1 通路对 KCs 自分泌细胞因子的影响

RT-PCR 检测上清液中促炎细胞因子 IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 转录调控变化。PCR 结果(图 2B); XBP1-shRNA 组与 Ctrl-shRNA 组比较, IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-17 的 mRNA 表达量均受到明显的抑制 ( $P < 0.05$ ); 而 AdV-XBP1 组与 Ctrl-shRNA 组比较, 这类促炎细胞因子的表达量则明显上调 ( $P < 0.05$ )。

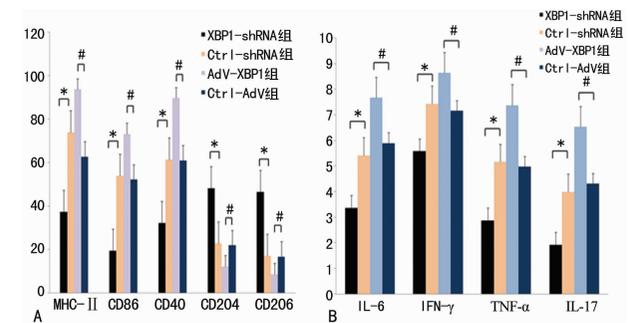
#### 2.3 IRE1-XBP1 通路经由 JAK-STAT 通路影响 KCs 细胞因子分泌改变

结果显示, 抑制 IRE1-XBP1 通路的活性, JAK 家族中 JAK1 与 JAK2(图 3A) 和 STAT 家族成员中 STAT1 及 STAT3(图 3B) 自身蛋白表达及其磷酸化水平均受到抑制 ( $P < 0.05$ )。而促进 IRE1-XBP1 通路的表达或传导, JAK 家族及 STAT 家族上述成员的蛋白表达量及其磷酸化水平均得到显著提升 ( $P < 0.05$ )。Western blot 结果提示, IRE1-XBP1 调控 KCs 自分泌细胞因子成分改变很有可能是通过 JAK-STAT 通路而实施的。但有待进一步的验证。



A: 转染后 48 h KCs 内绿色荧光蛋白表达; B: RT-PCR 检测转染后 48 h 各组 KCs 中 XBP1 的基因转录水平; C: Western blot 检测 KCs 中 XBP1 蛋白的表达。

图 1 转染后各组 KCs 中 XBP1 转录、表达的变化



A: 各组 KCs 表型分子改变柱状图分析; B: 各组 KCs 分泌细胞因子 mRNA 的表达水平。

图 2 IRE1-XBP1 通路对 KCs 极性的影响

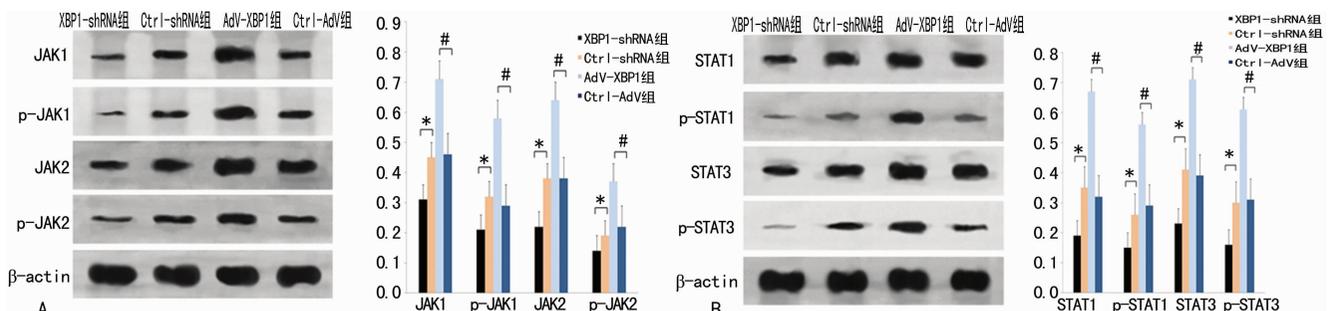
### 2.4 KCs 中 IRE1-XBP1 通路活性对活化 T 细胞的影响

#### 2.4.1 IRE1-XBP1 通路活性对活化 T 细胞增殖的影响

BrdU 掺入法检测共培养 T 淋巴细胞增殖结果显示, XBP1-shRNA 组中, 标记了红光的阳性率为 (14.69±2.31)%, 较 Ctrl-shRNA 组的 (21.32±5.41)%, T 淋巴细胞分裂增殖的能力明显受到抑制 ( $P < 0.05$ )。而在 AdV-XBP1 组中, AdV-XBP1 组 (40.80±7.54)% 较 Ctrl-AdV 组 (22.03±4.76)%, T 淋巴细胞分裂增殖的能力得到明显加强 ( $P < 0.05$ ), 见图 4A。

#### 2.4.2 IRE1-XBP1 通路活性对活化 T 细胞凋亡的影响

采取 Annexin V-FITC/PI 法检测 T 淋巴细胞凋亡情况发现: T 淋巴细胞在 XBP1-shRNA 组 (42.17±8.74)% 凋亡明显高于 Ctrl-shRNA 组 (23.74±4.16)%, 而在 AdV-XBP1 组 (10.95±3.79)% 凋亡明显低于 Ctrl-AdV (21.87±3.72)%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4B。

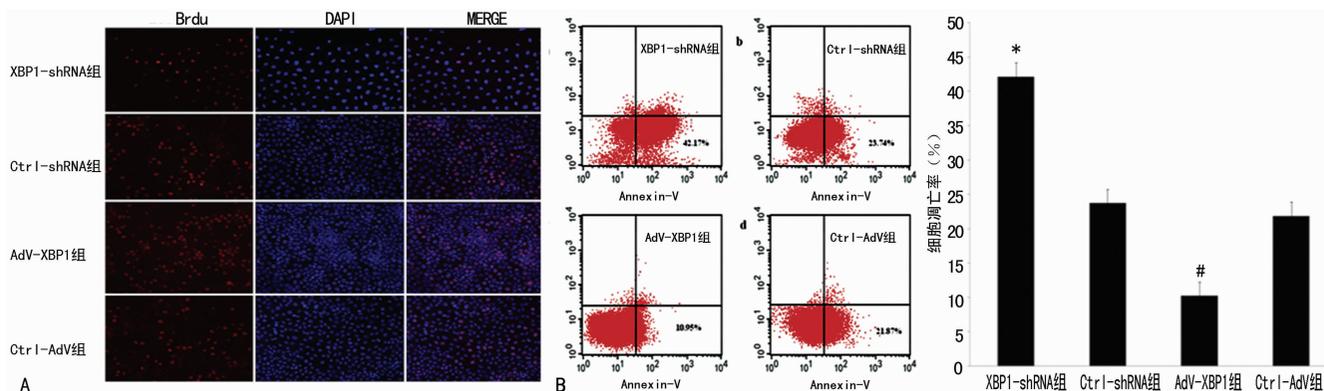


A: IRE1-XBP1 对 JAK1 和 JAK2 蛋白表达及磷酸化水平的调控; B: IRE1-XBP1 对 STAT1 和 STAT3 蛋白表达及磷酸化水平的调控。\*:  $P < 0.05$ , 与 Ctrl-shRNA 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 Ctrl-AdV 组比较。

图 3 IRE1-XBP1 通路对 JAK-STAT 通路的调节

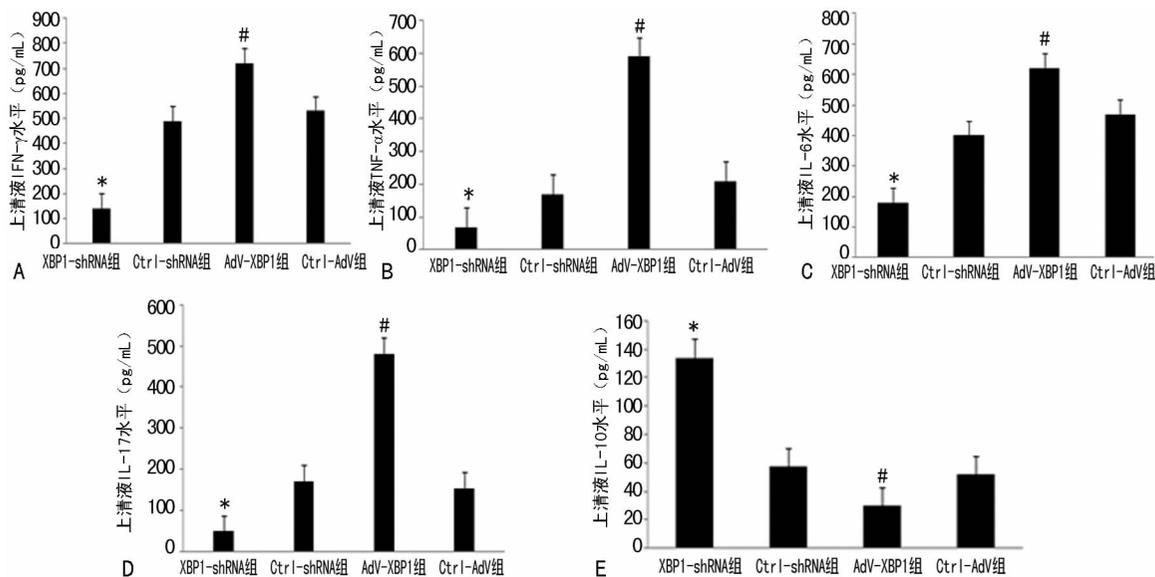
**2.4.3 KCs 中 IRE1-XBP1 通路对活化 T 细胞分泌细胞因子的影响** 共培养上清液 ELISA 检测结果显示,IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17 在 XBP1-shRNA 组中,与 Ctrl-shRNA 组比较,其分泌均受到不同程度的抑制;而在 AdV-XBP1 组,与 Ctrl-AdV

比较,上述 4 种细胞因子的分泌显著增高( $P < 0.05$ )。但 IL-10 在 XBP1-shRNA 组中的水平却明显高于其在 Ctrl-shRNA 组中的表达,而 AdV-XBP1 组与 Ctrl-AdV 组比较,则 IL-10 分泌明显减少( $P < 0.05$ ),见图 5。



A: 各组 KCs 对 T 淋巴细胞增殖的影响; B: 各组 KCs 对 T 淋巴细胞凋亡的影响; \*:  $P < 0.05$ , 与 Ctrl-shRNA 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 Ctrl-AdV 组比较。

图 4 KCs 中 IRE1-XBP1 对初始 T 淋巴细胞的影响



\*:  $P < 0.05$ , 与 Ctrl-shRNA 组比较; #:  $P < 0.05$  与 Ctrl-AdV 组比较。

图 5 各组 KCs 对 T 淋巴细胞分泌细胞因子改变的影响

### 3 讨论

目前主流观点认为,APCs 的功能和 T 细胞激活分化在 AcR 中占据关键的位置,对两者的特异性调控,可影响移植耐受或排斥免疫反应<sup>[8]</sup>。KCs 通过模式识别受体(PRRs)识别外来抗原,再经由 TLR4 等途径,进行信号传导,发生极化。M1 型 KCs 主要由 IFN- $\gamma$  及 LPS 等因素诱导极化,可大量分泌促炎细胞因子、促进 Th1/Th17 类反应,具备很强的抗原呈递功能。其表面标志物包括 IL-12、MHC-II、CD68、NOS2、IL-10 等。M2 型 KCs 与 Th2 型免疫反应关系密切,极化的 M2 型 KCs 表型为 IL-12、MHC-II、IL-10、CD204、CD206、IL-1decoyR<sup>[9-10]</sup>。

本实验中,通过抑制或上调 IRE1-XBP1 的活性及传导,发现降低 KCs 中 IRE1-XBP1 通路活性,能有效抑制经 LPS 活化的 KCs 表面 MHC-II 的表达水平,与文献报道结果一致<sup>[11]</sup>。此外,抑制这一通路的活性,也削弱共刺激分子 CD40 及 CD68 的表达。但 KCs 表面 M2 型标志物 CD204 及 CD206 的表达

水平则明显上升,使得 KCs 表型改变为 MHC-II、CD68、CD204、CD206,更符合 M2 型 KCs 的表型特征。在上调这一通路活性时,则 MHC-II、CD40 同 CD86 的表达水平得到明显的增强,而 CD204 及 CD206 的表达则明显受限。KCs 表型呈 MHC-II、CD68、CD204、CD206,与 M1 型表型相近。此外笔者还测定了不同 IRE1-XBP1 活性对 KCs 自身分泌促炎因子的基因及蛋白的转录水平,发现抑制 IRE1-XBP1 通路的活性,KCs 自分泌 IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-17 减少,而上调这一通路的活性,则明显促进这类促炎因子的表达。而这一改变可能是通过对 JAK1、JAK2 及 STAT1 和 STAT3 的蛋白及磷酸化水平的调控而实现的。但本研究未能确认 IRE1-XBP1 主要调控 JAK-STAT 中的哪一条通路,这几者间的关系还有待更深入的研究。以上结果证实,IRE1-XBP1 的活性改变可以诱导 KCs 的极性变化。为进一步确认 IRE1-XBP1 通路诱导的 KCs 极性变化所产生的生物学效应改变,笔者将 4 组 KCs 分别与

T 淋巴细胞进行了共培养,发现抑制 KCs 中 IRE1-XBP1 通路,T 淋巴细胞活化增殖能力被削弱,凋亡水平明显上升,且促炎细胞因子分泌受抑制,抑炎因子分泌上调。提示 KCs 提呈抗原激活 T 细胞的能力明显减弱,表现出类似于 M2 型 KCs 的生物学效应。而上调该通路,则表现出类似于 M1 型 KCs 的生物学效应。

综上所述,抑制 KCs 中 IRE1-XBP1 通路的活性,可以诱导 M1 样极化的 KCs 呈 M2 样转化,并表现出对炎症反应的负性调控效用。为进一步明确 KCs 中 IRE1-XBP1 通路在炎症反应亦或肝移植术后急性排斥反应中的作用积累一定的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Wang FS, Fan JG, Zhang Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [2] Germani G, Rodriguez-Castro K, Russo FP, et al. Markers of acute rejection and graft acceptance in liver transplantation[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(4): 1061-1068.
- [3] Chen Y, Liu Z, Liang S, et al. Role of kupffer cells in the induction of tolerance of orthotopic liver transplantation in rats[J]. *Liver Transpl*, 2008, 14(6): 823-836.
- [4] Liu YM, Chen Y, Li JZ, et al. Up-regulation of Galectin-9 in vivo results in immunosuppressive effects and prolongs

survival of liver allograft in rats[J]. *Immunol Lett*, 2014, 162(1 Pt A): 217-222.

- [5] Engel A, Barton GM. Unfolding new roles for XBP1 in immunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 365-367.
- [6] Martinon F, Chen X, Lee AH, et al. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 411-418.
- [7] Yang Q, Shi Y, He J, et al. The evolving story of macrophages in acute liver failure[J]. *Immunol Lett*, 2012, 147(1/2): 1-9.
- [8] Sood S, Testro AG. Immune monitoring post liver transplant[J]. *World J Transplant*, 2014, 4(1): 30-39.
- [9] Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 750-761.
- [10] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 2034-2042.
- [11] He Y, Sun S, Sha H, et al. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor[J]. *Gene Expr*, 2010, 15(1): 13-25.

(收稿日期: 2015-11-15 修回日期: 2016-01-04)

(上接第 2313 页)

的基因转录,发挥抑制细胞凋亡、促进细胞生存的作用。缺氧处理 JAR 细胞后,随着 p-Stat3 蛋白表达降低,使其下游抗凋亡因子表达下降,从而导致细胞凋亡增加。有研究得出重度子痫前期胎盘滋养细胞中 Stat3 和 p-Stat3 的蛋白表达水平下降<sup>[10]</sup>,滋养细胞凋亡增加,与本课题研究结果一致。

综上所述,本研究结果表明缺氧可使 p-Stat3 蛋白表达降低,细胞凋亡增加。Stat3 作为细胞内参与基因转录的蛋白,可协同其他信号通路共同发挥作用,深入探索缺氧和 Stat3 的相互关系可对缺氧性妊娠期疾病的病因、发病机制及预测、治疗提供新思路。

#### 参考文献

- [1] Kleppa MJ, Erlenwein SV, Darashchonak N, et al. Hypoxia and the anticoagulants dalteparin and acetylsalicylic acid affect human placental amino acid transport [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99217.
- [2] Zhou J, Xiao D, Hu Y, et al. Gestational hypoxia induces preeclampsia-like symptoms via heightened endothelin-1 signaling in pregnant rats[J]. *Hypertension*, 2013, 62(3): 599-607.
- [3] Akhilesh M, Mahalingam V, Nalliah S, et al. Participation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the pathogenesis of preeclampsia-related placental ischemia and its potential as a marker for preeclampsia[J]. *Biomarkers Genomic Med*, 2014, 6(3): 121-125.

[4] Can M, Guven B, Bektas S, et al. Oxidative stress and apoptosis in preeclampsia[J]. *Tissue Cell*, 2014, 46(6): 477-481.

- [5] Longtine MS, Chen B, Odibo AO, et al. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR[J]. *Placenta*, 2012, 33(5): 352-359.
- [6] Hong KH, Yoo SA, Kang SS, et al. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 146(2): 362-370.
- [7] 夏俊霞, 乔福元, 吉琼梅, 等. 低氧对 BeWo 细胞骨桥蛋白表达的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2014, 43(1): 48-52.
- [8] Rad E, Dodd K, Thomas L, et al. STAT3 and HIF1 $\alpha$  signaling drives oncogenic cellular phenotypes in malignant peripheral nerve sheath tumors [J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(7): 1149-1160.
- [9] Siveen KS, Sikka S, Surana R, et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1845(2): 136-154.
- [10] Zhang Z, Yang X, Zhang L, et al. Decreased expression and activation of Stat3 in severe preeclampsia[J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(2): 205-219.

(收稿日期: 2015-11-23 修回日期: 2016-03-09)