

论著·基础研究

## CaMKK $\beta$ 通过激活 AMPK/JAK2/STAT3 信号促进小鼠单核巨噬细胞向 M2 表型转换

孔祥歆<sup>1,2</sup>, 刘卉芳<sup>2#</sup>, 陈凤玲<sup>2#</sup>

1. 蚌埠医学院, 蚌埠 233030; 2. 上海交通大学 医学院附属第九人民医院内分泌科, 上海 201999

**[摘要]** **目的**· 探明钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) 在白介素 4 (IL-4) 诱导的 RAW264.7 细胞极化过程中的作用和机制。**方法**· RT-PCR 和 ELISA 检测 IL-4 诱导 RAW264.7 细胞极化水平, Western blotting 测定极化过程中 CaMKK $\beta$ 、AMPK、JAK2、STAT3 蛋白表达及磷酸化水平。慢病毒为载体的 shRNA 稳定干扰 RAW264.7 细胞 CaMKK $\beta$  表达, RT-PCR 和 ELISA 检测 IL-4 诱导下细胞极化水平的改变, Western blotting 检测 AMPK、JAK2、STAT3 蛋白及磷酸化蛋白的表达。分别特异性阻断 AMPK、JAK2 和 STAT3 蛋白活性, 经 RT-PCR 检测 IL-4 诱导下 RAW264.7 细胞极化水平的改变。**结果**· IL-4 主要诱导 RAW264.7 细胞向 M2 型巨噬细胞极化 ( $P<0.05$ ), 且 CaMKK $\beta$ 、AMPK、JAK2、STAT3 的磷酸化水平明显升高 (均  $P<0.05$ )。shRNA 稳定干扰 RAW264.7 细胞 CaMKK $\beta$  表达后, IL-4 促进巨噬细胞向 M2 型极化作用降低 ( $P<0.05$ ), 且 AMPK、JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平降低 (均  $P<0.05$ )。分别阻断 AMPK、JAK2 和 STAT3, 巨噬细胞向 M2 型极化减少 (均  $P<0.05$ )。**结论**· CaMKK $\beta$  通过激活 AMPK/JAK2/STAT3 信号通路, 促进 IL-4 诱导的巨噬细胞 M2 型极化。

**[关键词]** CaMKK $\beta$ ; AMPK; JAK2; STAT3; 巨噬细胞极化

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2017.07.006 **[中图分类号]** R593.2 **[文献标志码]** A

### CaMKK $\beta$ promotes mouse macrophage M2 polarization by activating AMPK/JAK2/STAT3 signaling

KONG Xiang-xin<sup>1,2</sup>, LIU Hui-fang<sup>2#</sup>, CHEN Feng-ling<sup>2#</sup>

1. Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China; 2. Department of Endocrinology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

**[Abstract]** **Objective**· To investigate the role and mechanism of CaMKK $\beta$  in RAW264.7 macrophage M2 polarization induced by interleukin-4 (IL-4). **Methods**· IL-4 induced RAW264.7 polarization was measured by RT-PCR and ELISA. Western blotting was used to analyze the total and phosphorylated protein levels of CaMKK $\beta$ , AMPK, JAK2 and STAT3 during polarization. A lentiviral vector carrying an shRNA targeting the CaMKK $\beta$  gene was successfully constructed. The expression of M1 and M2 markers and the expression of phosphorylated AMPK, JAK2, STAT3 were detected by RT-PCR and Western blotting respectively. The protein activity of AMPK, JAK2 and STAT3 were selectively blocked, and then the effect of IL-4 on macrophage polarization was detected by RT-PCR. **Results**· IL-4 significantly polarized RAW264.7 cells towards M2 macrophages ( $P<0.05$ ), and the phosphorylated protein expression of CaMKK $\beta$ , AMPK, JAK2, STAT3 was significantly increased (all  $P<0.05$ ). The expression of M2 markers induced by IL-4 was decreased and the phosphorylation of AMPK, JAK2 and STAT3 was also decreased after knockdown of CaMKK $\beta$  by shRNA (all  $P<0.05$ ). The polarization of macrophages to M2 was decreased after the activities of AMPK, JAK2 and STAT3 proteins were blocked respectively (all  $P<0.05$ ). **Conclusion**· CaMKK $\beta$  promotes IL-4 induced M2 macrophage polarization via activation of AMPK/JAK2/STAT3 pathway.

**[Key words]** CaMKK $\beta$ ; AMPK; JAK2; STAT3; macrophage polarization

巨噬细胞是固有免疫的重要组成部分, 在防御、修复和代谢等生理及病理过程中发挥重要作用。不同的激活条件下可以产生不同的亚型并表现出不同的功能<sup>[1]</sup>, 据此分为经典激活的 M1 型和选择性激活的 M2 型。M1 型巨噬细胞由 Th1 淋巴因子干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、脂多糖 (LPS)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等诱导活化产生, 除直接参与免疫防御反应外, 还可分泌促炎细胞因子 (如 TNF- $\alpha$ 、IL-

1 $\beta$ 、IL-6) 和趋化因子等促进炎症反应。M2 型巨噬细胞可由 IL-4、IL-13 和 IL-10 等诱导, 分泌大量 IL-10、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等细胞因子从而抑制炎症反应, 并高表达精氨酸酶 1 (Arg1)、甘露糖受体 (MR)、清道夫受体 (SR) 等。M2 型巨噬细胞为抑炎性, 对组织修复和重建、血管生成和肿瘤生长浸润等均有促进作用。巨噬细胞极化与代谢性疾病有密切联系, 参与动脉粥样硬化<sup>[2]</sup>、肥胖<sup>[3]</sup>、

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金 (81400802); 上海交通大学医学院附属第九人民医院优秀青年骨干培养计划 (jyyq08201607) (National Natural Science Foundation of China, 81400802; Excellent Youth Training Program, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, jyyq08201607)。

**[作者简介]** 孔祥歆 (1989—) 女, 硕士生; 电子信箱: kongxiangxin1106@126.com。

**[通信作者]** 陈凤玲, 电子信箱: cfl1993@126.com。刘卉芳, 电子信箱: lhf\_404@163.com。\* 共同通信作者。



胰岛素抵抗<sup>[4-5]</sup>等重要疾病的病理生理过程。

钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$ , CaMKK $\beta$ ) 是钙调蛋白激酶家族成员之一<sup>[6]</sup>, 主要表达在中枢神经系统, 在小鼠骨髓及腹腔巨噬细胞、肝细胞和人脐静脉内皮细胞内也有所表达<sup>[7]</sup>。其作用底物主要为 CaMK I、CaMK IV 和 AMP 依赖的蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)。有文献报道, 在 CaMKK $\beta$  特异性敲除的小鼠体内, 高脂饮食所致肝脏的胰岛素抵抗可得到缓解<sup>[8]</sup>。这与 CaMKK $\beta$  缺失抑制富含脯氨酸的非受体酪氨酸激酶 2 (proline-rich tyrosine kinase 2, PYK2) 活性, 进而损害巨噬细胞迁移、吞噬, 释放细胞因子和趋化因子减少相关<sup>[9]</sup>。此后, 有研究证实 CaMKK $\beta$  活性水平升高可增强诱导小胶质细胞 (属于单核巨噬细胞系) 向抑制炎症的 M2 型转变, 改善中枢神经系统炎症<sup>[10-11]</sup>。

AMPK 是重要的细胞代谢感受器, 在炎症反应中起抑制作用<sup>[12]</sup>, 同时促进抗炎性的巨噬细胞极化。AMPK 促进巨噬细胞向 M2 型极化的途径较多, 包括抑制 NF- $\kappa$ B 和激活 PPAR- $\delta$ 、Akt 等<sup>[13-14]</sup>。JAK2 (酪氨酸激酶 2, Janus kinase 2)/STAT (信号转导和转录激活因子, signal transducers and activators of transcriptions) 3 的激活与血管生成、细胞存活、免疫抑制和肿瘤浸润有关<sup>[15-16]</sup>。动物实验证实, STAT3 基因敲除小鼠的巨噬细胞释放更高水平的促炎细胞因子<sup>[17]</sup>。与 M1 型巨噬细胞相比, M2 型巨噬细胞中 STAT3 的激活水平显著上升<sup>[18-19]</sup>。因此, 本研究进一步探讨 AMPK/JAK2/STAT3 在巨噬细胞向 M2 型极化过程中的重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

Raw264.7 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所, DMEM 高糖培养基和胎牛血清购于 Hyclone 公司。shRNA 慢病毒购于汉恒生物科技 (上海) 有限公司 (GFP 标记, puromycin 抗性, 滴度  $2 \times 10^8$  IU/mL)。小鼠重组 IL-4 购于 Sigma-Aldrich 公司。AMPK 阻断剂 (Compound C) 购于 Tocris 公司, JAK2 抑制剂 (Fedratinib) 和 STAT3 抑制剂 (Stattic) 购于 Selleckchem 公司。兔抗小鼠 CaMKK $\beta$  抗体购于 Sigma-Aldrich 公司。磷酸化 CaMKK $\beta$  (Thr286) 抗体、AMPK $\alpha$ 1 抗体、磷酸化 AMPK $\alpha$ 1 (Thr172) 抗体、JAK2 抗体、磷酸化 JAK2 (Tyr1007/1008) 抗体、STAT3 和磷酸化 STAT3 (Tyr705)

抗体购于 CST 公司;  $\beta$ -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗购自武汉谷歌生物科技有限公司。反转录和实时定量 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。TNF- $\alpha$  和 IL-10 ELISA 试剂盒购于 R&D Systems 公司。引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** Raw264.7 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。加入 IL-4 诱导极化时终浓度为 20 ng/mL, 分别使用特异性抑制剂 Compound C、Fedratinib、Stattic 抑制 AMPK、JAK2、STAT3 活性, 终浓度分别为 5、1 和 10  $\mu$ mol/L, 均较 IL-4 提前 1 h 加入培养液。

**1.2.2 稳转细胞株的建立** 汉恒生物根据 Life Technologies 公司在线 siRNA 设计软件选择 3 条针对其基因编码区的 siRNA 序列及其错义序列 (NC), 分别为 siRNA1 (5'-GAGGACTGCGTGCGAGCTGAATCAGTA-3'), siRNA2 (5'-GCCCGCTTCTACTTC CAGGATCTGAT-3'), siRNA3 (5'-GGTGTGACGCTGTACTGCTTTGTCT-3') 及 siRNANC (5'-GAACCCAGATCCAGGTTCCATT-3')。根据每条 siRNA 序列合成互补的 shRNA-DNA 序列。单链 DNA 退火, 形成互补的双链 DNA。shRNA 质粒表达载体 (pHBLV-U6-MCS-CMV-ZsGreen-PGK-Puro) 进行酶切线性化处理后将目的片段与线性化载体 DNA 连接。将连接产物加入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 收集菌液用于阳性克隆鉴定。

选取对数期 Raw264.7 细胞铺于 24 孔板, 每孔  $1 \times 10^5$  个细胞, 分为对照组及病毒感染组 4 组, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜后, 1/2 体积 4 h 感染法感染细胞 (病毒感染复数 MOI 为 10), 感染后 72 h 荧光显微镜检测 GFP 荧光表达, 并使用 puromycin (2  $\mu$ g/mL) 对感染后的细胞进行初筛选, puromycin 终浓度减半对稳转株进行二次筛选和培养放大。提取 RNA 和蛋白, real-time PCR 和 Western blotting 检测 CaMKK $\beta$  mRNA 和蛋白的表达, 对稳转细胞株进行鉴定, 选取干扰效率最高的细胞株进行后续实验。

**1.2.3 Western blotting 检测目的蛋白表达量** 将收集好的细胞进行裂解, 于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃除沉淀, 用 BCA 法进行蛋白定量。上样缓冲液调各组蛋白量一致, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (4  $^{\circ}$ C, 100 mA, 2 h) 后转移至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白相对分子质量标准的位置。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 2 h, 按 1:500 至 1:2 000 稀释一抗, 4  $^{\circ}$ C 培育过夜。TBST 洗 3

次, 1:1 000 加入辣根过氧化物酶标记二抗, 室温培育 1 h。TBST 洗 3 次, 用 Western blotting 荧光检测试剂盒激发荧光, 用 Image J 图像分析系统获取各条带的光密度值。

**1.2.4 酶联免疫吸附试验测定细胞培养上清中目的蛋白分泌水平** Raw264.7 细胞接种于 24 孔板, 按不同处理因素进行处理, 处理前加无血清培养基, 处理后收集培养基, 存储于 -80 ℃ 冰箱备用。按说明书方法, 测定培养基 TNF-α 和 IL-10 的水平。

**1.2.5 实时定量 PCR 检测目的基因 mRNA 水平** 采用 TRIzol 法提取总 RNA 后, 反转录为 cDNA, 进行实时定量 PCR 反应, 具体操作步骤按照说明书进行, 引物序列见表 1。根据实时荧光定量扩增曲线测得目的基因及内参基因的 Ct 值, 目的基因的表达水平用 r18S 进行标准化, 通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析。所有实验重复 3 次。

表 1 引物序列  
Tab 1 Sequences of the primers

引物	上游 (5' → 3')	下游 (5' → 3')
MCP-1	CCCACTCACCTGCTGCTACT	TCTGGACCAITCCTTCTTG
TNF-α	CAGACCCTCACACTCACAACCA	CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAAC
IL-1β	TCACAGCAGCACATCAACAA	TGTCCTCATCCTGGAAGGT
Arg-1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCAATAGGGACATC
IL-10	CCAAGCCTTATCGAAATGA	TTCACAGGGGAGAAATCG
TGF-β	CCCTGGATACCAACTATTGC	GCAGAAGTTGGCATGTAGTC
r18S	CCAGTGGTCTTGGTGTGCTGA	TTCTGGCCAACGGTCTAGACAAC

1.3 统计学处理

使用 SPSS17.0 软件分析, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-4 诱导巨噬细胞向 M2 型转化, CaMKKβ 及下游的 AMPK、JAK2、STAT3 的磷酸化水平升高

Raw264.7 细胞经 IL-4 诱导 12 和 24 h 后, 巨噬细胞 M1 型标志 (*MCP-1*、*IL-1β* 和 *TNF-α*) 的 mRNA 水平与对照组相比显著下降 (均 *P* < 0.05, 图 1A), 但 *TNF-α* 分泌水平未见明显下降 (图 1B); 而 M2 型标志 (*Arg-1*、*IL-10* 和 *TGF-β*) 的 mRNA 水平与对照组相比显著上升 (均 *P* < 0.05, 图 1A), *IL-10* 水平亦显著上升 (均 *P* < 0.05, 图 1B), M2 型巨噬细胞诱导成功。IL-4 分别刺激 Raw264.7 细胞一段时间 (5 min、10 min、30 min、1 h、3 h、6 h), *CaMKKβ* 蛋白表达量与未刺激组相比无显著变

化, 但磷酸化 *CaMKKβ* 蛋白量迅速升高, 磷酸化 *AMPK* 及 *JAK2* 和 *STAT3* 也出现相似变化 (图 1C)。

2.2 慢病毒介导 shRNA 稳定干扰 RAW264.7 细胞 CaMKKβ 表达后, IL-4 诱导巨噬细胞向 M2 型极化的作用降低, AMPK、JAK2 及 STAT3 的磷酸化水平下降

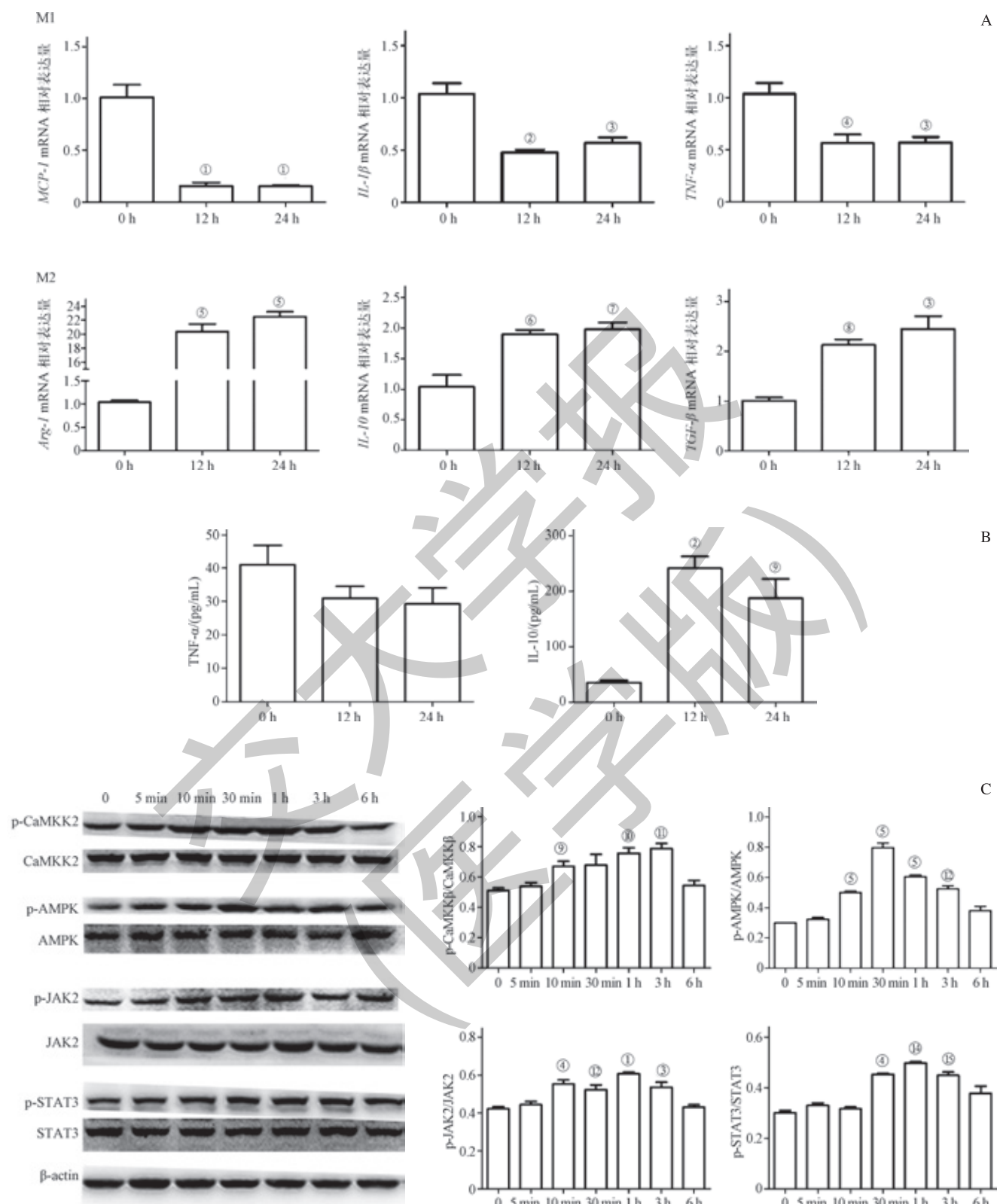
与阴性对照组相比, shRNA1/2/3 组 *CaMKKβ* mRNA 表达分别下降 88.0%、95.7%、82.0% (均 *P* < 0.05, 图 2A), 蛋白表达分别下降 59.9%、77.4%、41.1% (均 *P* < 0.05, 图 2B), 选取第 2 组进行后续实验。IL-4 分别诱导稳转细胞组及空白对照细胞 12 h, 稳转细胞组 M1 型标志因子 (*MCP-1*、*IL-1β* 和 *TNF-α*) mRNA 表达和 *TNF-α* 释放较正常细胞对照组显著升高 (均 *P* < 0.05, 图 2C~D), 同时 M2 型标志因子 (*Arg-1*、*IL-10* 和 *TGF-β*) mRNA 表达和 *IL-10* 释放明显下降 (均 *P* < 0.05, 图 2C~D), 且在未加 IL-4 刺激和 IL-4 诱导 1 h 时 *AMPK*、*JAK2* 和 *STAT3* 蛋白磷酸化水平较相同条件下正常细胞对照组磷酸化水平明显减弱或消失 (均 *P* < 0.05, 图 2E)。

2.3 抑制 Raw 264.7 细胞 AMPK 活性后, IL-4 诱导下 M2 表型减少, JAK2 及 STAT3 磷酸化水平降低

Compound C 抑制 *AMPK* 活性化后再使用 IL-4 诱导, 与正常对照组相比, M1 型巨噬细胞标志因子 (*MCP-1*、*IL-1β*、*TNF-α*) mRNA 表达增多 (均 *P* < 0.05), M2 型标志因子 (*Arg-1*、*IL-10* 和 *TGF-β*) mRNA 表达减少 (IL-4 刺激 12 h, 均 *P* < 0.05), M1 型巨噬细胞极化增多, M2 型减少 (图 3A)。相较相同 IL-4 刺激时间对照组 *JAK2* 和 *STAT3* 磷酸化蛋白量减少 (图 3B), *CaMKKβ* 磷酸化及总蛋白量不变 (IL-4 刺激 1 h, 图 3C)。

2.4 分别特异性阻断 JAK2 和 STAT3 活性, 再经 IL-4 诱导, 巨噬细胞向 M2 型极化减少

*Fedratinib* 抑制 *JAK2* 活性后, 再使用 IL-4 诱导, 与对照组相比 M1 型标志 (*MCP-1*、*IL-1β*、*TNF-α*) 增多 (均 *P* < 0.05), M2 型标志 (*Arg-1*、*IL-10* 和 *TGF-β*) 减少 (均 *P* < 0.05, 图 4A); *STAT3* 的总量不变, 但磷酸化蛋白量与相同 IL-4 刺激时间下未加阻断剂组相比减少 (图 4B), 上游的磷酸化 *CaMKKβ* 和 *AMPK* 不变 (图 4C)。Stattic 阻断 *STAT3* 活性后, IL-4 刺激下与未加阻断剂组相比 M1 型标志 (*MCP-1*、*IL-1β*、*TNF-α*) 增多 (均 *P* < 0.05), M2 型标志 (*Arg-1*、*IL-10* 和 *TGF-β*) 减少 (*P* < 0.05, 图 5A), 上游的 *CaMKKβ*、*AMPK* 和 *JAK2* 磷酸化蛋白量不变 (图 5B)。

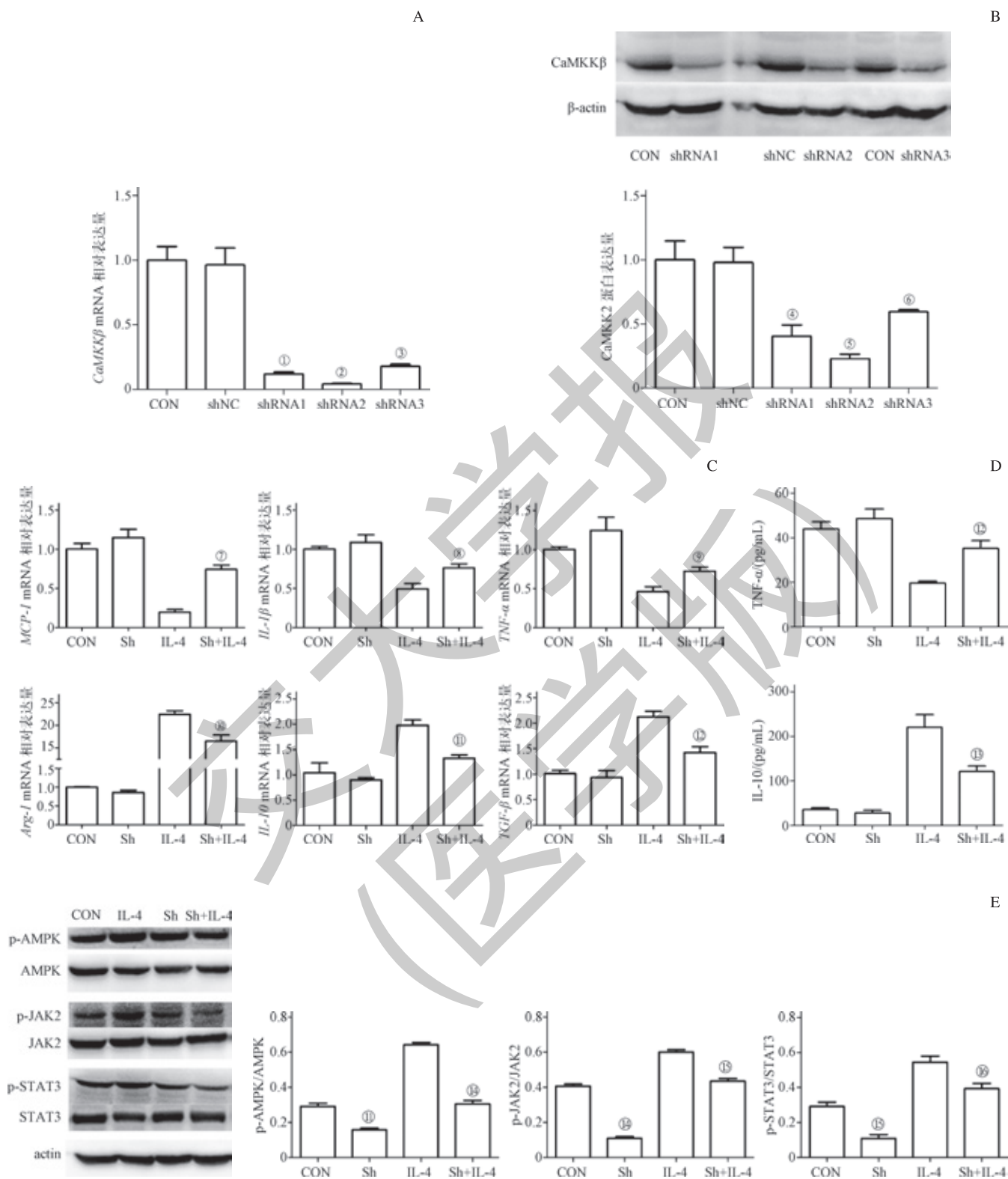


注: A. IL-4 刺激 Raw264.7 细胞后 M1/M2 型标志因子表达; B. IL-4 刺激 Raw264.7 细胞后 TNF- $\alpha$  和 IL-10 水平; C. 极化过程中 CaMKK $\beta$ 、AMPK、JAK2 和 STAT3 总量和磷酸化形式的表达水平。① $P=0.002$ , ② $P=0.007$ , ③ $P=0.016$ , ④ $P=0.006$ , ⑤ $P=0.000$ , ⑥ $P=0.015$ , ⑦ $P=0.014$ , ⑧ $P=0.009$ , ⑨ $P=0.012$ , ⑩ $P=0.013$ , ⑪ $P=0.004$ , ⑫ $P=0.003$ , ⑬ $P=0.022$ , ⑭ $P=0.008$ , ⑮ $P=0.046$ , 与 IL-4 刺激 0 h 组比较。

图 1 IL-4 诱导巨噬细胞向 M2 型极化过程中 CaMKK $\beta$ 、AMPK、JAK2、STAT3 蛋白及其磷酸化形式的表达

Fig 1 Expression of total and phosphorylated CaMKK $\beta$ 、AMPK、JAK2、STAT3 in IL-4 induced M2 polarization progress



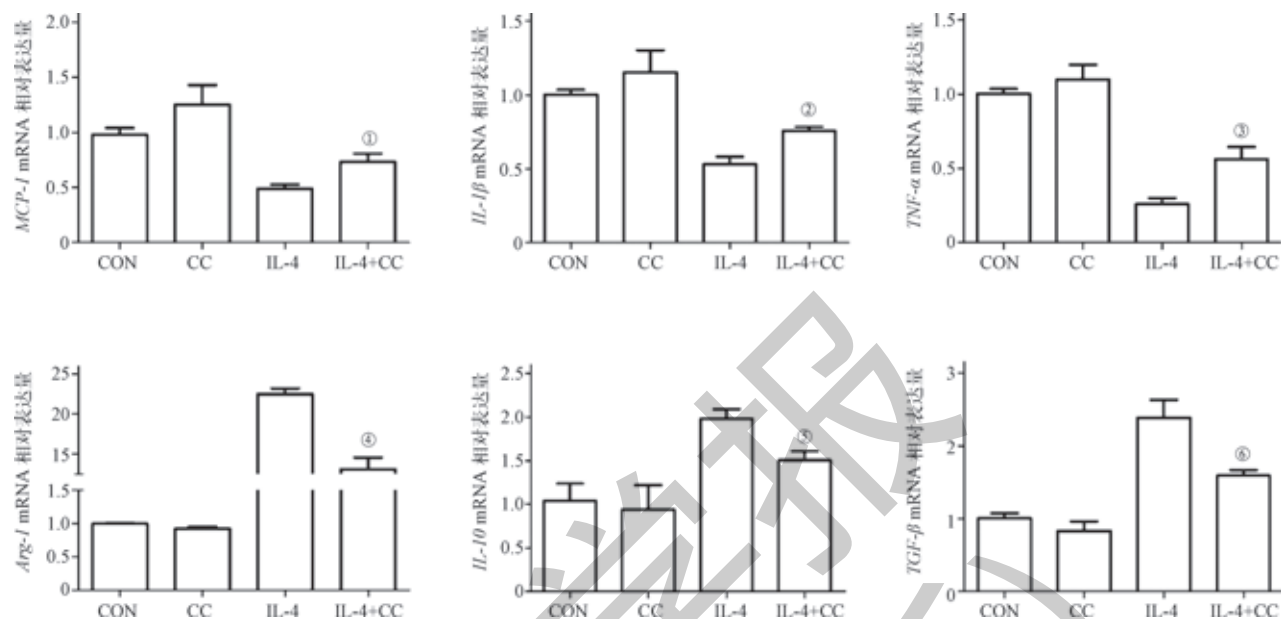


注: A~B. 慢病毒为载体的 shRNA 干扰 *CaMKKβ* 表达的稳转细胞株 *CaMKKβ* mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达; C~D. M1 型标志因子 (*MCP-1*、*IL-1β*、*TNF-α*) 表达和 *TNF-α* 释放增多, M2 型标志因子 (*Arg-1*、*IL-10* 和 *TGF-β*) 表达和 *IL-10* 释放减少; E. *IL-4* 刺激稳转细胞株 1 h 后, AMPK、JAK2 和 STAT3 总量和磷酸化形式的蛋白表达水平。①  $P=0.001$ , ②  $P=0.000$ , ③  $P=0.002$ , ④  $P=0.023$ , ⑤  $P=0.006$ , ⑥  $P=0.048$ , 与 CON 组比较; ⑦  $P=0.001$ , ⑧  $P=0.041$ , ⑨  $P=0.032$ , ⑩  $P=0.018$ , ⑪  $P=0.007$ , ⑫  $P=0.012$ , ⑬  $P=0.032$ , ⑭  $P=0.000$ , ⑮  $P=0.002$ , ⑯  $P=0.023$ , 与相同刺激下的对照组比较。CON: 对照组; Sh: shRNA; shNC: 错义序列组。

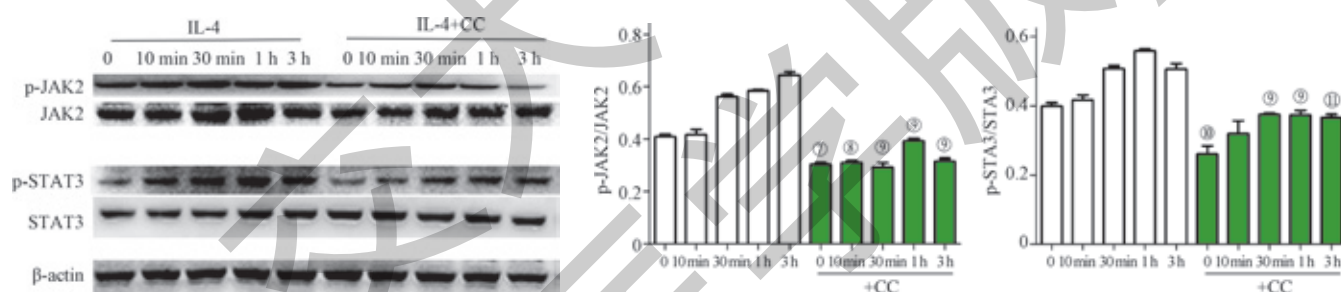
图 2 干扰 *CaMKKβ* 表达后 *IL-4* 促 M2 型巨噬细胞极化作用及对 AMPK、JAK2 及 STAT3 的激活作用降低

Fig 2 *IL-4* induced M2 polarization and AMPK, JAK2 and STAT3 activation decreased after knocking down *CaMKKβ* expression

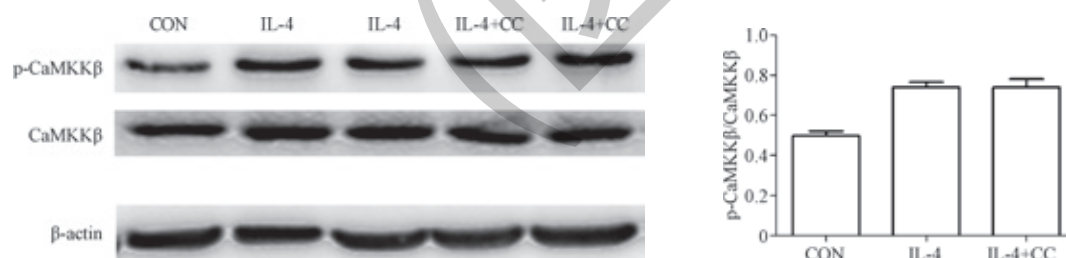
A



B



C

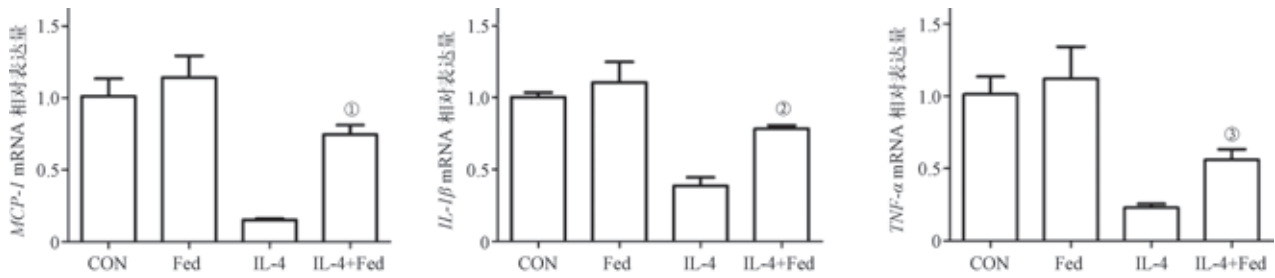


注: A. Compound C (CC) 抑制 AMPK 活性, IL-4 刺激 12 h 后 M1 型、M2 型标志的表达; B. Compound C 抑制 AMPK 活性, IL-4 刺激下 JAK2、STAT3 总量和磷酸化形式的蛋白表达水平; C. Compound C 抑制 AMPK 活性, IL-4 刺激 1 h 时 CaMKK $\beta$  总量和磷酸化形式的蛋白表达水平。<sup>①</sup> $P=0.048$ , <sup>②</sup> $P=0.018$ , <sup>③</sup> $P=0.030$ , <sup>④</sup> $P=0.004$ , <sup>⑤</sup> $P=0.036$ , <sup>⑥</sup> $P=0.008$ , 与相同刺激下未加阻断剂组比较; <sup>⑦</sup> $P=0.009$ , <sup>⑧</sup> $P=0.008$ , <sup>⑨</sup> $P=0.000$ , <sup>⑩</sup> $P=0.006$ , <sup>⑪</sup> $P=0.001$ , 与相同 IL-4 刺激时间下未加阻断剂组比较。

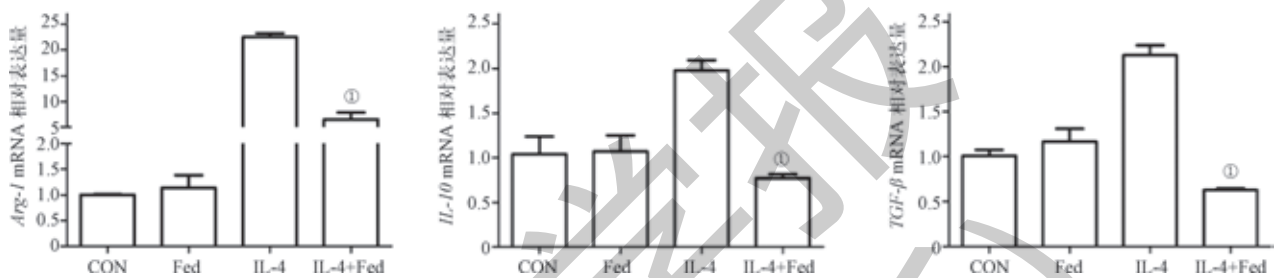
图 3 抑制 AMPK 活性后 M2 极化以及 JAK2、STAT3、CaMKK $\beta$  磷酸化减少

Fig 3 Inhibiting AMPK activity leads to declined phosphorylation level of JAK2, STAT3 and M2 polarization, but unchanged phosphorylated CaMKK $\beta$  level

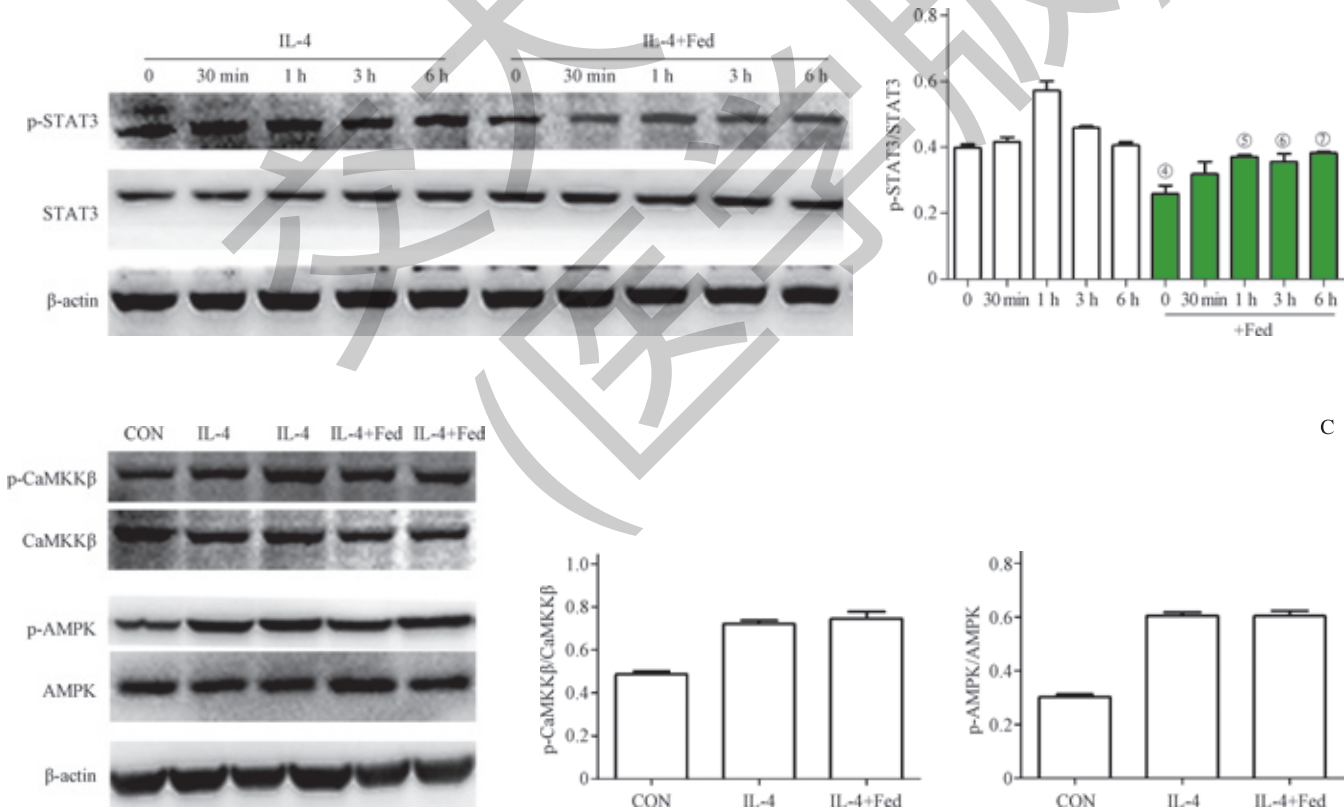
A



B



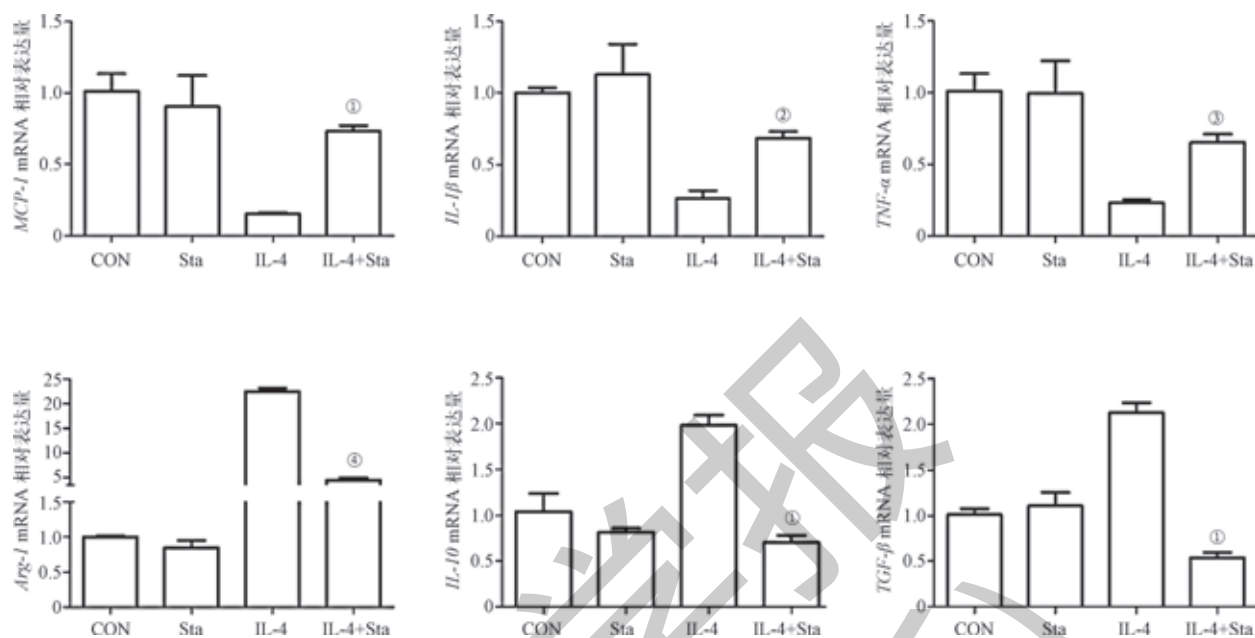
C



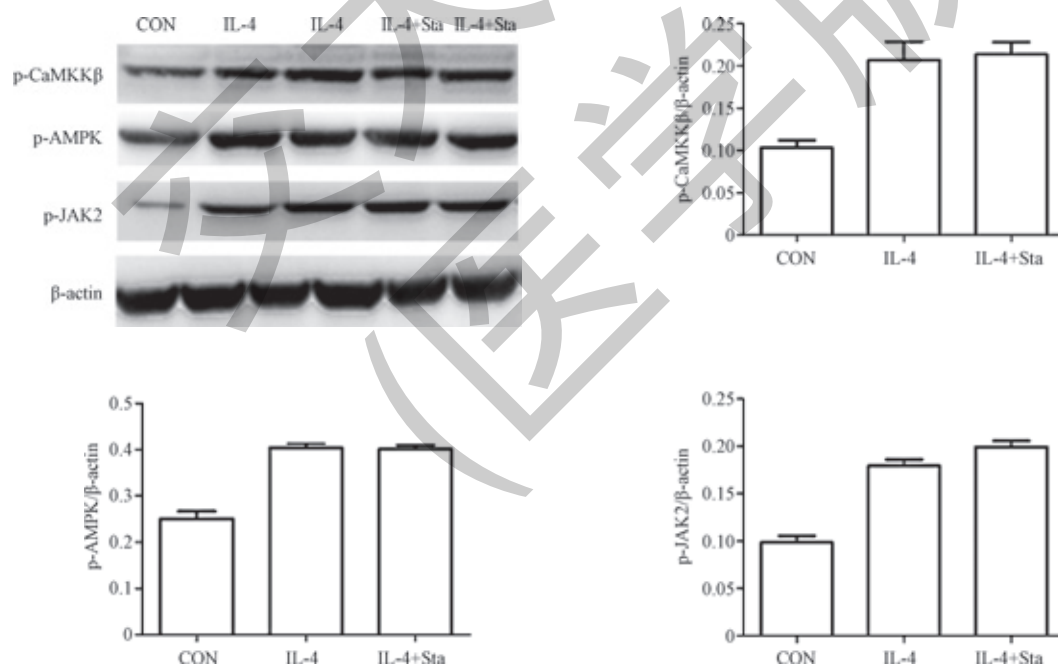
注: A. 抑制 JAK2 活性, IL-4 刺激 12 h 后 M1 型、M2 型标志的表达; B. 抑制 JAK2 活性, IL-4 刺激下 STAT3 总量和磷酸化形式的蛋白表达水平; C. 抑制 JAK2 活性, IL-4 刺激下 1 h 时 CaMKK $\beta$ 、JAK2 总量和磷酸化形式的蛋白表达水平。<sup>④</sup> $P=0.000$ , <sup>⑤</sup> $P=0.004$ , <sup>⑥</sup> $P=0.012$ , 与相同刺激下未加阻断剂组比较; <sup>⑦</sup> $P=0.006$ , <sup>⑧</sup> $P=0.030$ , <sup>⑨</sup> $P=0.014$ , <sup>⑩</sup> $P=0.002$ , 与相同刺激时间下未加阻断剂组比较。Fed: Fedrationib。

图 4 抑制 JAK2 活性后巨噬细胞向 M2 型极化及上游蛋白磷酸化水平的变化  
Fig 4 Changes of M2 polarization and upstream protein phosphorylation after inhibiting JAK2 activity

A



B



注: A. 抑制 STAT3 活性, IL-4 刺激 1 h 时 JAK2 总量和磷酸化形式的蛋白表达水平; B. 抑制 STAT3 活性, IL-4 刺激 1 h 时 CaMKK $\beta$  和 AMPK 总量和磷酸化形式的蛋白表达水平。①  $P=0.000$ , ②  $P=0.004$ , ③  $P=0.002$ , ④  $P=0.001$ , 与相同刺激下未加阻断剂组比较。Sta: Stattic。

图 5 抑制 STAT3 活性后巨噬细胞向 M2 型极化及上游蛋白磷酸化水平的变化

Fig 5 Changes of M2 polarization and upstream protein phosphorylation after inhibiting STAT3 activity



### 3 讨论

2型糖尿病作为代谢紊乱性疾病的一种,与巨噬细胞极化有密切联系,尤其是发病和患病过程中的胰岛素抵抗和动脉粥样硬化。动物和细胞实验都表明脂肪组织巨噬细胞在慢性炎症和包括2型糖尿病和胰岛素抵抗在内的代谢紊乱性疾病中起到关键作用<sup>[20-21]</sup>。普遍认为M1型极化巨噬细胞会通过其“促炎性”导致和加重胰岛素抵抗和动脉粥样硬化,而M2型极化巨噬细胞则表现出“抑炎性”,缓解胰岛素抵抗和动脉粥样硬化。巨噬细胞与脂肪组织和肝细胞的胰岛素抵抗关系密切,尤其是脂肪组织,与之相关的研究也较多。超重和肥胖患者与体质量正常的健康人相比,外周脂肪组织中巨噬细胞以M1型为主<sup>[22]</sup>。脂肪细胞和巨噬细胞之间的相互作用加剧了脂肪组织中的慢性炎症<sup>[5]</sup>。促炎性脂肪因子如MCP-1和TNF- $\alpha$ <sup>[23]</sup>,及脂肪细胞释放的饱和脂肪酸与TLR4相互作用复杂,诱导NF- $\kappa$ B活化脂肪组织巨噬细胞<sup>[24-25]</sup>。有报道称肥胖者体质量降低后,脂肪组织巨噬细胞的浸润程度和促炎细胞因子减少,因此炎症缓解,从而减轻胰岛素抵抗<sup>[26]</sup>。M1型分泌多种促炎细胞因子,可以促进炎症、杀灭病原体,并可引起组织损伤;其分泌的基质金属蛋白酶可以水解细胞外基质胶原,使粥样斑块的纤维帽软化并形成易损斑块,更容易破裂引起血栓。M2型与M1型在此作用相反,分泌IL-10、Ym-1、血管内皮生长因子(VEGF)和细胞外基质成分等<sup>[5]</sup>。IL-10等抑炎细胞因子通过多种途径抑制炎症使其消退,VEGF促进新生血管生成,避免斑块内细胞缺氧坏死,细胞外基质成分则是纤维帽的构成成分,可以加固纤维帽,使粥样斑块更加稳定,因此M2型巨噬细胞又被称为修复性巨噬细胞<sup>[27-28]</sup>。

目前已知巨噬细胞极化所涉及的主要信号通路及重要调控因子如下:①STAT家族是在JAK/STAT通路中发挥重要作用的转录因子家族。其中激活STAT1是表达巨噬细胞表面许多标志物的必要条件;STAT6的磷酸化则可直接诱导M2型基因的表达,同时诱导促进M2型巨噬细胞极化的重要转录因子PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 及LXR的表达<sup>[29]</sup>。②由高脂饮食或非酒精性脂肪肝所诱导的肥胖及慢性炎症过程中通常激活JNK/NF- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B可调节大量促炎细胞因子和趋化因子的表达,同时上调核转录因子AP1表达,从而促进巨噬细胞向M1型极化<sup>[30]</sup>。③PPAR $\gamma$ 是小鼠及人源巨噬细胞M2基因型的增强子,PPAR $\gamma$ 的激活促使人源单核细胞向M2型分化<sup>[31]</sup>。④SOCS家族。巨噬细胞在炎症情况下可诱导表达SOCS1和SOCS3。研究显示,诱导表达的SOCS3对于M1型激活是必需的,上调SOCS1

表达可使巨噬细胞向M2型分化<sup>[32]</sup>。因此,通过深入探讨调控因子对巨噬细胞极化的影响,可能对代谢性疾病的诊治有所助益。

有研究证明CaMKK $\beta$ 活性水平升高可通过激活AMPK,增强诱导神经小胶质细胞向M2型转变,改善中枢神经炎症<sup>[10-11]</sup>。在本实验中,IL-4刺激巨噬细胞后,CaMKK $\beta$ 总量的表达无明显变化,但磷酸化水平升高,并导致巨噬细胞向M2型极化;干扰CaMKK $\beta$ 表达后,IL-4诱导的M2型极化水平下降,说明CaMKK $\beta$ 参与IL-4诱导的巨噬细胞M2型极化。

AMPK可通过多种途径促进巨噬细胞向抗炎方向极化,包括抑制NF- $\kappa$ B和激活PPAR- $\delta$ 、Akt等。AMPK参与IL-4诱导的巨噬细胞M2型极化,例如在人外周循环单核巨噬细胞内AMPK通过抑制花生四烯酸酯加氧酶15(ALOX15),促进IL-4诱导的巨噬细胞极化<sup>[33]</sup>。慢性肾脏病模型小鼠的巨噬细胞在IL-4诱导下的M2型极化被抑制,正是由于AMPK活性的抑制<sup>[34]</sup>。有报道称作为重要的促炎因子IL-6可以激活JAK2/STAT3信号通路,且AMPK在IL-6诱导的JAK2/STAT3激活中,起抑制其活性的作用<sup>[8]</sup>,但AMPK对IL-4诱导的JAK2/STAT3激活的作用尚未明确。本研究发现在IL-4诱导下,阻断AMPK后,JAK2/STAT3激活减少,但阻断JAK2或STAT3后,AMPK的激活却不受影响。AMPK在IL-6和IL-4诱导的JAK2/STAT3激活中这种不同的作用机制不明,尚待后续研究。有研究认为在人外周血单核细胞内IL-13通过IL-4R $\alpha$ -JAK2-STAT3和IL-13R-Tyk2-STAT1/STAT6发挥作用,而IL-4只能通过IL-4R $\alpha$ -JAK1-STAT3/STAT6促进抑炎细胞因子的表达<sup>[35]</sup>。本实验也表明JAK2/STAT3在IL-4刺激后磷酸化水平升高,并且这种现象是依赖于CaMKK $\beta$ 的。

在本研究中,IL-4诱导刺激巨噬细胞10~30 min后,CaMKK $\beta$ 、AMPK、JAK2和STAT3的磷酸化水平即开始升高,但干扰CaMKK $\beta$ 基因表达后,这种现象消失或减弱。分别抑制AMPK、JAK2和STAT3后,IL-4对巨噬细胞极化的影响减弱,但不影响CaMKK $\beta$ 的激活;表明IL-4对CaMKK $\beta$ 的激活是不依赖于AMPK、JAK2和STAT3的,同时对巨噬细胞极化的影响是部分依赖于CaMKK $\beta$ 所激活的AMPK/JAK2/STAT3途径的。本研究阐明了CaMKK $\beta$ 在巨噬细胞M2型极化中的作用及其机制,为调节巨噬细胞极化的研究提供了新的靶点,也为巨噬细胞极化相关疾病,特别是包括胰岛素抵抗和动脉粥样硬化在内的代谢性疾病,进而为2型糖尿病的诊断和治疗提供了新的理论和实验依据。

## 参 · 考 · 文 · 献

- [1] Chen P, Bonaldo P. Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2013, 301: 1-35.
- [2] Feig JE, Rong JX, Shamir R, et al. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(17): 7166-7171.
- [3] Matthijsen RA, de Winther MP, Kuipers D, et al. Macrophage-specific expression of mannose-binding lectin controls atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Circulation*, 2009, 119(16): 2188-2195.
- [4] Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links[J]. *Cell*, 2012, 148(5): 852-871.
- [5] Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 175-184.
- [6] Vinet J, Carra S, Blom JM, et al. Cloning of mouse Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta (CaMKKbeta) and characterization of CaMKKbeta and CaMKKalpha distribution in the adult mouse brain[J]. *Mol Brain Res*, 2003, 111(1-2): 216-221.
- [7] Racioppi L, Means AR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(38): 31658-31665.
- [8] Xin H, Wang M, Tang W, et al. Hydrogen sulfide attenuates inflammatory hepcidin by reducing IL-6 secretion and promoting SIRT1-mediated STAT3 deacetylation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(2): 70-83.
- [9] Marcelo KL, Ribar T, Means CR, et al. Research resource: roles for calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) in systems metabolism[J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(5): 557-572.
- [10] Zhou X, Cao Y, Ao G, et al. CaMKK $\beta$ -dependent activation of AMP-activated protein kinase is critical to suppressive effects of hydrogen sulfide on neuroinflammation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(12): 1741-1758.
- [11] Xu Y, Xu Y, Wang Y, et al. Telmisartan prevention of LPS-induced microglia activation involves M2 microglia polarization *via* CaMKK  $\beta$ -dependent AMPK activation[J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 50: 298-313.
- [12] Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1895-1908.
- [13] Sag D, Carling D, Stout RD, et al. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype[J]. *J Immunol*, 2008, 181(12): 8633-8641.
- [14] Mounier R, Théret M, Arnold L, et al. AMPK $\alpha$ 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(2): 251-264.
- [15] Lin HY, Chiang CH, Hung WC. STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(3): 731-738.
- [16] Zhao X, Sun X, Li XL. Expression and clinical significance of STAT3, p-STAT3, and VEGF-C in small cell lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6): 2873-2877.
- [17] Matsukawa A, Kudo S, Maeda T, et al. Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response[J]. *J Immunol*, 2005, 175(5): 3354-3359.
- [18] Yu Z, Zhang W, Kone BC. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB[J]. *Biochem J*, 2002, 367(Pt 1): 97-105.
- [19] Luo YP, Zhou H, Krueger J, et al. The role of proto-oncogene Fra-1 in remodeling the tumor microenvironment in support of breast tumor cell invasion and progression[J]. *Oncogene*, 2010, 29(5): 662-673.
- [20] Koppaka S, Kehlenbrink S, Carey M, et al. Reduced adipose tissue macrophage content is associated with improved insulin sensitivity in thiazolidinedione-treated diabetic humans[J]. *Diabetes*, 2013, 62(6): 1843.
- [21] Menghini R, Casagrande V, Menini S, et al. TIMP3 overexpression in macrophages protects from insulin resistance, adipose inflammation, and nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. *Diabetes*, 2012, 61(2): 454-462.
- [22] Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages[J]. *Circulation*, 2008, 117(6): 806-815.
- [23] Schmoker JD, Terrien C 3rd, Mcpartland KJ, et al. Cerebrovascular response to continuous cold perfusion and hypothermic circulatory arrest[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 137(2): 459-464.
- [24] Scott T, Owens MD. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF- $\kappa$  B pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45(4): 1001-1008.
- [25] Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes role of free fatty acids and tumor necrosis factor  $\alpha$ [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(10): 2062-2068.
- [26] Cancellor R, Henegar C, Viguerie N, et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss[J]. *Diabetes*, 2005, 54(8): 2277-2286.
- [27] Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 453-61.
- [28] Williams HJ, Fisher EA, Greaves DR. Macrophage differentiation and function in atherosclerosis: opportunities for therapeutic intervention[J]. *J Innate Immun*, 2012, 4(4): 498-508.
- [29] Hoeksema MA, Stöger JL, Winther MP. Molecular pathways regulating macrophage polarization: implications for atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2012, 14(3): 254-263.
- [30] Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, et al. Possible new role for NF- $\kappa$  B in the resolution of inflammation[J]. *Nat Med*, 2002, 7(12): 1291-1297.
- [31] Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases[J]. *Mol Cells*, 2012, 33(3): 217-222.
- [32] Liu Y, Stewart KN, Bishop E, et al. Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Immunol*, 2008, 180(9): 6270-6278.
- [33] Namgaladze D, Snodgrass RG, Angioni C, et al. AMP-activated protein kinase suppresses arachidonate 15-lipoxygenase expression in interleukin 4-polarized human macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(40): 24484-24494.
- [34] Li C, Ding XY, Xiang DM, et al. Enhanced M1 and impaired M2 macrophage polarization and reduced mitochondrial biogenesis *via* inhibition of AMP kinase in chronic kidney disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 358-372.
- [35] Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, et al. IL-4 And IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 54(1): 1-16.

[ 收稿日期 ] 2017-02-15

[ 本文编辑 ] 邵碧云

