



SHANGHAI JIAO TONG
UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE

学者介绍

刘智多 LIU Zhi-duo
博士 Ph. D



研究员、博士生导师

Professor, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-5482-1109



刘智多 (1979—)，上海交通大学医学院上海市免疫学研究所研究员。2009 年于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所获博士学位。2010—2016 年赴美国国立卫生研究院从事博士后研究工作。2016 年加入上海交通大学医学院上海市免疫学研究所。

长期从事 T 细胞分化和功能调控方面的研究，重点关注组织中免疫细胞的空间分布与生物学功能之间的关系，寻找在微环境里发挥特定功能的免疫细胞新亚群。曾利用多种先进的影像技术揭示调节性 T 细胞和自身反应性 T 细胞在免疫器官特定区域里的共定位，从细胞空间分布的角度为阐明免疫稳态的维持提供了一个全新的视角。该研究成果发表在国际科学期刊 *Nature* 上并获得美国国立卫生研究院 2016 年度“William E. Paul Prize”。相关研究工作已获得国家自然科学基金和上海市科委的支持。

该研究依托上海交通大学医学院“双一流”暨高水平地方高校建设“一流学科—基础医学”项目。

LIU Zhi-duo born in 1979, professor of Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. He obtained his Ph.D from Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences in 2009. Then, he went to National Institutes of Health for postdoctoral research from 2010 to 2016. In 2016, Dr. LIU joined Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

Dr. LIU is mainly interested in T cell differentiation and function regulation, focusing on the relationship between the immune cell distribution and their function in tissues, and identifying novel immune cell subsets in the microenvironment. He has used a variety of advanced imaging tools to show the co-localization of auto-reactive and regulatory T cells in secondary lymphoid tissues, which contributes to suppressing incipient autoimmunity and maintaining immune homeostasis. The research was published in *Nature*, and he was awarded NIH “William E. Paul Prize” in 2016. The related research work has been supported by National Natural Science Foundation of China and Shanghai Science and Technology Commission.

The research relies on the Basic Medical Sciences, First-Class Discipline of “National Double First-Class” and “Shanghai-Top-Level” high education initiative at Shanghai Jiao Tong University School of medicine.

论著·基础研究

基于 CD169 表达水平的小鼠脾红髓巨噬细胞分型研究

杨施琪*, 李梦瑶*, 刘思明, 刘智多

上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·基于小鼠脾红髓巨噬细胞唾液酸黏附蛋白 (sialoadhesin, Sn) 即 CD169 分子的表达水平, 研究 CD169⁺ 和 CD169⁻ 红髓巨噬细胞亚群的基因表达谱差异。 **方法**·采用流式细胞术和免疫荧光法检测 C57BL/6J 野生型 (WT) 小鼠脾红髓巨噬细胞中 CD169 的表达, 以 CD169 敲除 (CD169 KO) 小鼠为阴性对照。富集 F4/80⁺ 的脾红髓巨噬细胞并分选出 CD169⁺ 和 CD169⁻ 2 个亚群, 进行 RNA 测序。利用 DESeq2 软件以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ 为条件筛选出差异表达基因, 通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes, KEGG) 功能分析, 将差异基因按照参与的通路或功能进行分类。通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 验证部分差异基因。 **结果**·流式细胞术和免疫荧光法证实部分红髓巨噬细胞表达 CD169。CD169⁺ 和 CD169⁻ 亚群拥有 485 个差异表达基因。一些与介导炎症相关的基因在 CD169⁺ 亚群中高表达。 **结论**·CD169⁺ 和 CD169⁻ 红髓巨噬细胞有不同的转录谱, CD169⁻ 红髓巨噬细胞亚群具有更多 M1 型巨噬细胞的特征。

[关键词] 脾红髓巨噬细胞; 异质性; CD169; RNA 测序

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.06.008 **[中图分类号]** 310.99 **[文献标志码]** A

Definition of macrophage subtypes based on the expression of CD169 in murine splenic red pulp macrophages

YANG Shi-qi*, LI Meng-yao*, LIU Si-ming, LIU Zhi-duo

Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the gene expression profiles of CD169⁺ and CD169⁻ red pulp macrophages based on the expression of CD169 in murine splenic red pulp macrophages. **Methods**·The expression of CD169 in splenic red pulp macrophages in C57BL/6 wild-type (WT) mice was analyzed by flow cytometry and immunofluorescence. CD169 knockout (KO) mice were used as negative control. F4/80⁺ splenic red pulp macrophages were enriched and separated into CD169⁺ and CD169⁻ subtypes. RNA-sequencing was performed on the two subtypes. DESeq2 was used to analyze differentially expressed genes at $P < 0.05$ & $|\log_2 FC| \geq 1$. Kyoto Encyclopedia of Genes (KEGG) enrichment analysis was used to classify the differentially expressed genes according to the pathways involved or functions they performed, and some differentially expressed genes were verified by quantitative real-time PCR (qPCR). **Results**·Expression of CD169 in some red pulp macrophages was confirmed by flow cytometry and immunofluorescence. There were 485 differentially expressed genes in CD169⁺ and CD169⁻ subtypes. Some differentially expressed genes related to inflammation were highly expressed in the CD169⁺ subtype. **Conclusion**·The CD169⁺ and CD169⁻ red pulp macrophages have different transcriptional profiles, and CD169⁻ red pulp macrophages have more features of M1 macrophages.

[Key words] splenic red pulp macrophage; heterogeneity; CD169; RNA sequencing

脾是人体最大的周围淋巴样器官, 实质由红髓、白髓及其边界 (称为边缘区) 组成^[1-2], 是重要的次级免疫器官。小鼠脾内的巨噬细胞主要分为位于红髓的 F4/80⁺ CD11b⁻ 红髓巨噬细胞 (red pulp macrophage, RpM Φ)、位于边缘区的 F4/80^{-low} MARCO⁺ 边缘区巨噬细胞 (marginal zone macrophage, MZM Φ)、F4/80⁻ CD169⁺

嗜金属巨噬细胞 (marginal metallophilic macrophage, MMM Φ), 以及白髓内的 F4/80⁻ CD68⁺ 着色小体巨噬细胞 (tingible body macrophage, TBM Φ)^[3-4]。因此, 利用小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体 (mouse EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1, F4/80) 和 CD11b 可以很好地将 RpM Φ 与其他脾巨噬细

[基金项目] 国家自然科学基金 (31870871); 上海市自然科学基金 (17ZR1425000)。

[作者简介] 杨施琪 (1995—), 女, 硕士生; 电子信箱: 15841135993@163.com。李梦瑶 (1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: limengyao28@163.com。* 为共同第一作者。

[通信作者] 刘智多, 电子信箱: zhiduo.liu@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31870871); Natural Science Foundation of Shanghai (17ZR1425000)。

[Corresponding Author] LIU Zhi-duo, E-mail: zhiduo.liu@shsmu.edu.cn。

胞种群区别开。RpM Φ 分布在脾红髓中,其寿命长,从卵黄囊巨噬细胞或胚胎造血干细胞发育而来,长期表达于成年组织中,在稳定状态下骨髓来源的单核细胞对其产生的贡献很小,被认为是组织驻留巨噬细胞^[5-8]。

与其他组织驻留巨噬细胞相比,RpM Φ 具有独特的转录谱,*Spic*、*Axl*、*F4/80*、*Cd68*、*Vcam1*、*Pecam1* 和 *Ccr3* 等基因在 RpM Φ 中高表达^[9-12]。更重要的是,RpM Φ 对于机体十分关键,其主要功能包括:①吞噬流经红髓的衰老或受损红细胞^[13-14],回收血红蛋白中的铁^[6]。②产生 I 型干扰素对抗寄生虫感染^[15]。③通过分泌抑炎因子白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β),诱导调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 产生,从而调控过度的免疫反应^[16]。由于 RpM Φ 拥有诸多功能,对其展开的研究可加深人们对于脾内血源性感染以及某些自身免疫病及免疫缺陷病的理解。因此,对于 RpM Φ 的功能及分型值得进一步研究。

CD169 分子最初发现于巨噬细胞中^[17]。然而,CD169 的功能至今仍未被完全阐明。一方面,CD169 可直接间接地识别病原体结构,将病原体从血液中移除并递呈给其他免疫细胞^[18]。另一方面,CD169 可与多种淋巴细胞进行唾液酸依赖性结合,介导细胞间的相互作用,调节免疫反应^[19]。目前的研究^[20]发现,CD169 除了在 MMM Φ 上表达,也能够部分在 RpM Φ 上表达,但该现象尚未被明确解释。因此,本研究利用流式细胞术和免疫荧光法 2 种手段证实 CD169 能够在 RpM Φ 上表达,并通过对 CD169⁺ 和 CD169⁻ RpM Φ 亚群进行 RNA 测序,研究这 2 个亚群在基因表达水平之间的差异,从而探索不同亚群可能具有的免疫学功能。

1 对象与方法

1.1 研究对象、试剂及仪器

1.1.1 实验动物 8~12 周龄、雌性、近交系 C57BL/6J 小鼠购于上海灵畅实验动物有限责任公司[生产许可证号为 SCXK (沪) 2018-0003,使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0027];向 C57BL/6J 小鼠敲入 CD169 *Dtr* (diphtheria toxin receptor) 获得 CD169 *Dtr*^{+/+} 小鼠[该纯合子小鼠无法表达 CD169,被用来作为 CD169 敲除 (CD169 KO) 小鼠,C57BL/6J 背景]购自日本 Riken 实验室(实验动物伦理批件号为 A-2017-003),饲养于上海交通大学医学院实验动物中心屏障环境内。实验操作符合上海交通大学医学院动物伦理相关规范。

1.1.2 主要试剂 小鼠 CD11b-APC/Cy7 抗体 (M1/70, BioLegend, 美国),小鼠 F4/80-FITC (fluorescein isothiocyanate) 抗体 (BM8, BioLegend, 美国),小鼠 CD169-PE 抗体 (SER-4, eBioscience, 美国),IV 型胶原酶 (Sigma, 美国),脱氧核糖核酸酶 I (Dnase I, Roche, 美国),甲醇 (上海大合化学制品有限公司),4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA, BBI 生命科学有限公司),蔗糖[生工生物工程(上海)股份有限公司],Mouse FITC 阳性结合试剂盒 (Stemcell, 美国),总 RNA 抽提试剂 TRIzol (Thermo Scientific, 美国),胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、RPMI 1640 无血清基本培养基 (Gibco, 美国),SYBR Green Master (Toyobo, 日本)。

1.1.3 主要仪器 超净工作台、细胞培养箱 (Thermo Scientific, 美国),磁力架 (Stemcell, 美国),LSRFortessa 分析型流式细胞仪、FACS Aria II 流式细胞仪 (BD, 美国),PCR 仪 (Eppendorf, 德国),实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 日本),SP8 激光扫描共聚焦显微镜、Leica CM1950 冰冻切片机 (Leica, 德国),Illumina HiSeq X Ten 测序仪 (Illumina, 美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 小鼠 RpM Φ 的获取及 CD169 的检测 将小鼠的脾剪碎,用含 0.1% IV 型胶原酶和 0.005% Dnase I 的 RPMI 1640 培养基于 37 °C 培养箱进行培养。随后,经 45 min 消化后,过 70 μ m 细胞滤网,于 400 \times g 离心后弃上清液。加入 5 mL 红细胞裂解液,室温静置 5 min,加入 15 mL 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 终止裂红。于 400 \times g 离心弃上清液后,用 1 mL FACS buffer[1 \times PBS, 2% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 和 5 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠]重悬,计数单细胞悬液。取 1 \times 10⁶ 个细胞于每个染色组,加入 F4/80、CD11b 及 CD169 抗体,4 °C 孵育 30 min, FACS buffer 洗涤 2 遍后,利用 LSRFortessa 分析型流式细胞仪进行检测。

1.2.2 CD169⁺ RpM Φ 的免疫荧光检测 颈椎脱臼法处死小鼠。取脾,先后放入 1% PFA 和 30% 蔗糖溶液中固定及脱水,用 OCT 包埋剂 (optimal cutting temperature compound) 包埋脾,-80 °C 保存。使用冰冻切片机制备脾薄片,切片厚度为 20 μ m。将带有组织切片的载玻片用 PBS 清洗并于 -20 °C 甲醇中通透 30 min,经 PBS 清洗 3 遍后用封闭液 (0.3% Triton X-100, 1% BSA, 1% FBS 和 0.1 mol/L Tris-HCl) 室温封闭 1 h,加入 F4/80 和 CD169 抗体室温染色 3 h, PBS 清洗后封片,在避光处晾干。组织切片用 Leica SP8 激光扫描共聚焦显微镜在 20 倍物镜下进行拍

摄, 以 LIF 格式保存, 用 Imaris 软件进行图像处理。

1.2.3 小鼠脾 F4/80⁺ 细胞分选 由于 F4/80⁺ CD11b⁻ RpMΦ 在脾细胞中占比约为 1%, 为收集到足够数量的 CD169⁺ 和 CD169⁻ 亚群, 本研究利用 FITC⁺ 磁珠对红髓巨噬细胞进行富集。获得单细胞悬液后调整细胞浓度至 2×10^8 个/mL, 加入 Fc 封闭抗体于室温封闭 10 min 后, 加入 F4/80-FITC 于 4 °C 避光染色 30 min。每 2×10^8 个细胞加入 11.6 μL 分选液, 室温孵育 15 min, 再加入 6 μL 磁珠室温孵育 10 min。将装有细胞的圆底管置于磁力架上, 通过磁力吸附收集获得 F4/80⁺ 细胞。加入 CD11b-APC/cy7、CD169-PE 抗体于 4 °C 避光孵育 30 min, 利用 FACSaria II 流式细胞仪得到小鼠脾 CD169⁺/CD169⁻ 红髓巨噬细胞。

1.2.4 RNA 测序及数据处理 向 CD169⁺/CD169⁻ 细胞中加入 TRIzol 裂解液提取总 RNA, 每个亚型做 2 次重复。RNA 测序由中国科学院上海生命科学研究院计算生物学研究所多维组学数据平台的 Illumina Hiseq X Ten 测序仪完成, 使用 Qubit Fluorometer 和 Agilent Bioanalyzer 2100 RNA 6000 Chip 2 种方法评估 RNA 的完整性, RNA 完整值均大于 7.1, 说明完整性较好。利用 TopHat2 软件将 RNA 测序数据与 GRCm38 (genome reference consortium m38) (http://asia.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index) 小鼠基因组进行比对, 通过 Cufflinks 软件对 Mapped Reads 进行拼接, 并与原有的基因组注释信息进行比较。表达定量软件 RSEM 用于对基因和转录本的表达水平进行定量分析, 定量指标为 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)。CD169⁺/CD169⁻ 亚群的差异基因由 DESeq2 软件对原始计数进行分析。当 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ 时认为该基因表达差异显著。所有分析均基于美吉生物云平台 (<https://www.i-sanger.com/>) 进行。

1.2.5 数据分析 对 CD169⁺、CD169⁻ 2 个亚群细胞基因集进行分析, 韦恩图显示亚群间共有或特有的表达基因数目。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 体现出样本间的相似性; 各个样本点的距离代表了样本的距离, 距离越近表明样本间相似性越高。热图是对 2 个亚群细胞差异表达的基因进行表达模式聚类分析。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes, KEGG) 功能分析用于系统分析基因功能, 可将基因集中的基因按照参与的通路或行使的功能分类^[21]。

1.2.6 qPCR 验证差异表达基因 将 CD169⁺ 和 CD169⁻ 红髓巨噬细胞的 RNA 用 Hifair™ II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 即用型预混液反转录得到 cDNA, 选取 8 个

KEGG 通路分析中富集的差异表达基因进行 qPCR 验证, 结果分析用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法。所用的引物序列 (表 1) 通过 PrimerBank 搜索得到。

表 1 qPCR 所用的引物序列

Tab 1 Sequences of primers for qPCR

Gene	Primer sequences (5' → 3')
<i>Akt3</i>	F:GCGGGATTCTACCGGCAAG R:GAGCAGACTGAGCCGTAGG
<i>Ccl3</i>	F:TGGGTTTCAGAAGAGGGGAGAA R:AGGGGATAAGGTAAGTCCACATC
<i>Ccl4</i>	F:TTCTCTGTACCATGACACTCTGC R:CGTGAATCTTCCGGCTGTAG
<i>Card6</i>	F:TTTCTCCGTGTTTGTCTAATG R:GTTACACCCACAGTCTCTTC
<i>Pstpip1</i>	F:GGCCACACAGGTATGAG R:CAGCCTTGCGTGCAATCTG
<i>Chst3</i>	F:GCCTAAAGATTCCAGGCAGATAC R:GTCGGAGACCCTGGATATGATT
<i>Xylt1</i>	F:TCCACAACCAAGTCCACTGAT R:GCGAAGTTGCTGTATCCACATT
<i>Hs3st1</i>	F:CCCAGCTGTGCAATCCCA R:TGTGGAACCATTGGATGCTGT

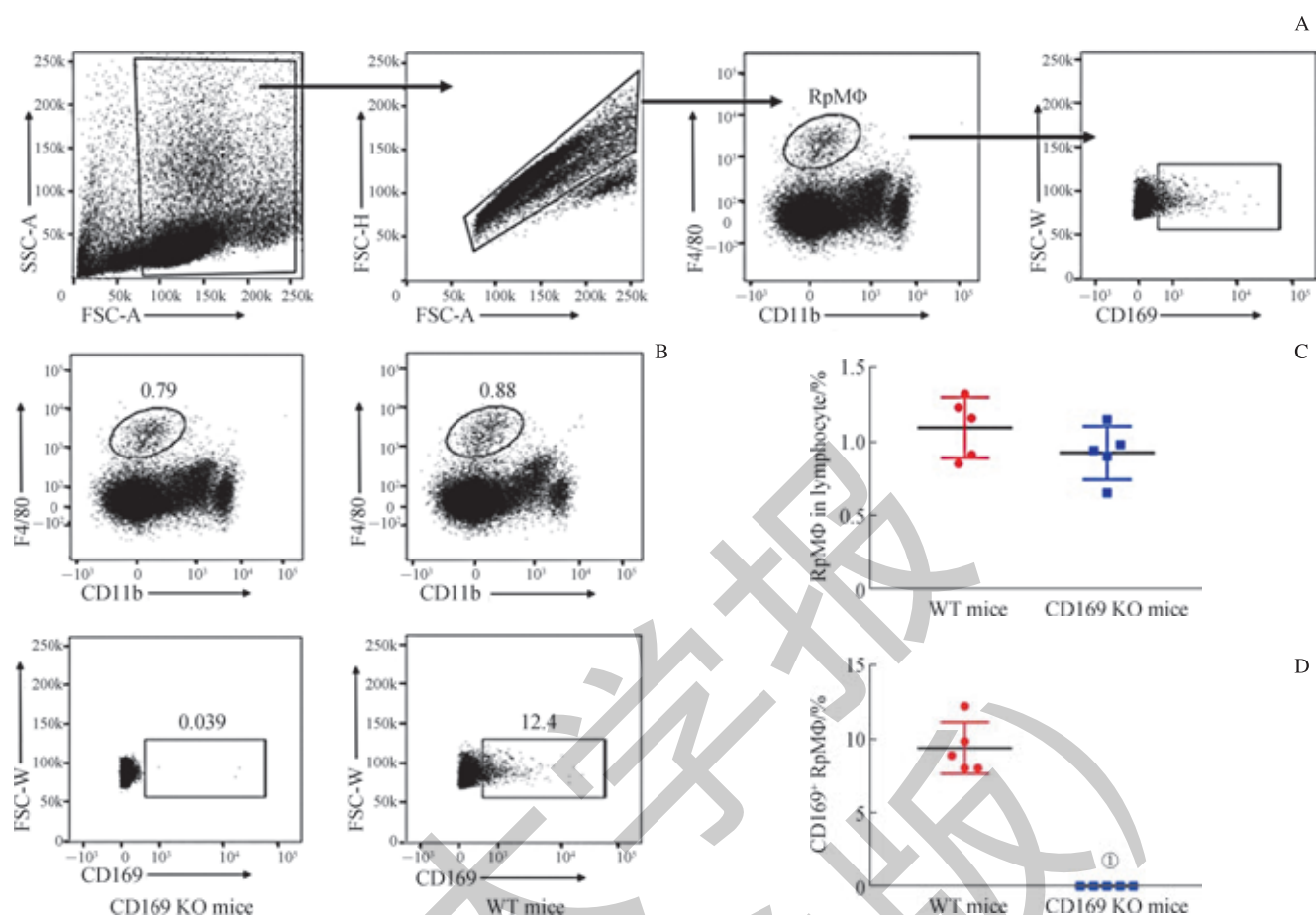
1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 软件对研究数据进行统计学分析及作图。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验或校正 t 检验进行 CD169⁺ 和 CD169⁻ 亚群细胞比例的差异比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 部分 RpMΦ 表达 CD169

为了验证野生型 (wild type, WT) 小鼠部分 RpMΦ 表达 CD169 分子, 本研究先利用流式细胞术检测 WT 小鼠和 CD169 KO 小鼠脾中 RpMΦ 的比例, 再比较 RpMΦ 中 CD169 分子的表达情况。根据已有的研究^[22-23]表明, F4/80⁺ CD11b⁻ 可作为 RpMΦ 的表面标志物。因此, 如流式细胞术策略 (图 1A) 所示, 在圈选了脾细胞并去黏连后, F4/80⁺ CD11b⁻ 细胞群即为 RpMΦ。结果显示, CD169 KO 小鼠脾内 RpMΦ 的比例与 WT 小鼠相似 (图 1B), 2 组小鼠 RpMΦ 占脾细胞的比例均在 0.5% ~ 1.5%, 差异无统计学意义 (图 1C); 但以 CD169 KO 小鼠作为阴性对照, 在 WT 小鼠 RpMΦ 中可明显地观察到部分 RpMΦ 表达 CD169 分子 (图 1B、D)。



Note: A. Gating strategy of CD169⁺ RpmΦ by flow cytometry. The circled cells represent F4/80⁺ CD11b⁺ RpmΦ, and CD169⁺ RpmΦs are gated from F4/80⁺ CD11b⁺ RpmΦ. B. Representative flow cytometry plots of CD169⁺ RpmΦ in WT and CD169 KO mice. Gating strategy is the same with A. C-D. Quantification of RpmΦ (C) and CD169⁺ RpmΦ (D) in WT and CD169 KO mice. ^a $P=0.000$, compared with WT mice.

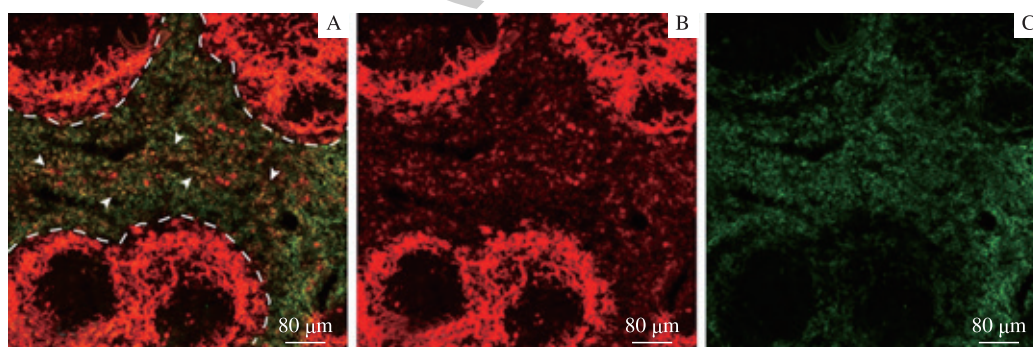
图 1 WT 小鼠和 CD169 KO 小鼠中 CD169⁺ RpmΦ 比例

Fig 1 Proportion of CD169⁺ RpmΦ in WT and CD169 KO mice

2.2 CD169⁺ RpmΦ 的空间分布

为进一步确认 CD169 在小鼠脾 RpmΦ 中的表达,本研究利用免疫荧光技术对脾 RpmΦ 上 CD169 表达情况进行检测,结果(图 2)显示,在白色虚线内侧边缘(边缘区)存在一圈高表达 CD169(红色)的 MMMΦ;在脾红

髓中 CD169 呈散在分布,并与部分 F4/80⁺ 的 RpmΦ 有很好的共定位。由此再次证实,部分 RpmΦ 可表达 CD169 分子。同时,结果还发现 F4/80 主要分布于圆形区域以外的红髓区域,在边缘区有微量的表达,但其荧光强度明显低于红髓区域。



Note: A. Immunofluorescence of RpmΦ in WT mouse. White arrows—CD169⁺ RpmΦs. B. Expression of CD169 in RpmΦ. C. Expression of F4/80 in RpmΦ.

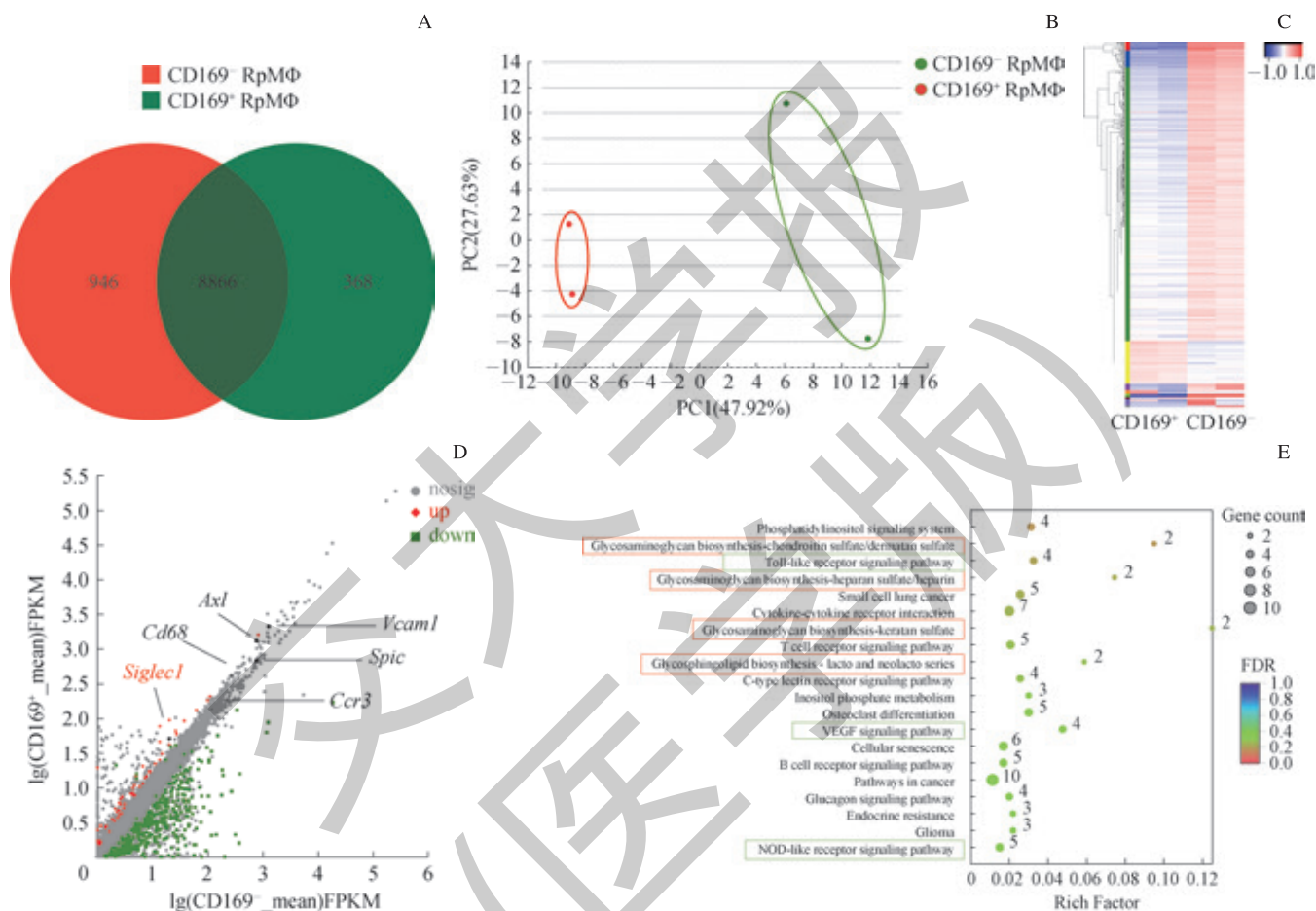
图 2 免疫荧光法检测 WT 小鼠脾内 CD169⁺ RpmΦ 分布 (×20)

Fig 2 Localization of CD169⁺ RpmΦ of spleen in WT mouse by immunofluorescence (×20)

2.3 CD169⁺ 和 CD169⁻ 红髓巨噬细胞差异表达基因分析

为探究 CD169⁺ RpMΦ 与 CD169⁻ RpMΦ 在基因表达水平的差异, 本研究通过富集 RpMΦ, 分选出 CD169⁺ 和 CD169⁻ 2 个亚群, 提取 RNA 并进行测序分析。在 CD169⁺ RpMΦ 群中检测到 9 234 个基因, CD169⁻ RpMΦ 群中检测到 9 812 个基因, 其中共同表达的基因有 8 866 个 (图 3A)。主成分分析显示, 2 群细胞可以被很好地地区分开 (图 3B)。对差异基因进行聚类分析显示, 共有 485

个差异表达基因, 且相比于 CD169⁺ RpMΦ, 在 CD169⁻ RpMΦ 中的上调基因为 427 个, 下调基因为 58 个 (图 3C)。如表达量差异散点图所示, *Siglec1* (编码 CD169 的基因) 在 CD169⁺ RpMΦ 群中高表达 (图 3D), 认为 RNA 测序结果与分选策略一致; 同时, 2 群细胞共同表达小鼠脾 RpMΦ 的特征基因, 如 *Vcam1*、*Axl*、*Spic*、*Cd68* 和 *Ccr3* 等, 表明这 2 群细胞均属于 RpMΦ。



Note: A. Venn diagram of CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ. B. PCA of CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ. The values of X and Y axis represent the principal component scores. C. Heatmap of differentially expressed genes of CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ. D. Scatter plot of differentially expressed genes of CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ. Each dot represents a gene. Gene upregulated in CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ are depicted in red and green. Black dots are non-significantly different genes. E. KEGG analysis of CD169⁻ RpMΦ upregulated genes. The vertical axis stands for pathway and the horizontal axis stands for enrichment factor (Rich factor is proportional to the degree of enrichment). The size of the dots indicates the number of genes and the color of the dots corresponds to different Q value ranges. Red boxes show pathways related to glycosaminoglycan synthesis, and green boxes show pathways related to inflammation. There are four samples in total, two of which are duplicates.

图3 小鼠 CD169⁺ RpMΦ 和 CD169⁻ RpMΦ 差异表达基因分析

Fig 3 Analysis of differentially expressed genes in CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ

2.4 CD169⁻ 红髓巨噬细胞的促进炎症作用

通过对上述 RNA 测序的数据分析可知, 与 CD169⁺ RpMΦ 群相比, 在 CD169⁻ RpMΦ 群中上调的基因数比下调的基因数多。因此, 我们将重点放在 CD169⁻ RpMΦ 中上调的基因集上, 并对该基因集进行 KEGG 功能分析。结果 (图 3E) 显示, 差异表达基因在介导炎症 (绿色方框显

示) 和糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 生物合成 (红色方框显示) 的通路中显著富集, 提示 CD169⁻ RpMΦ 与 CD169⁺ RpMΦ 的功能有所不同。其中与介导炎症相关的通路包括 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 信号通路、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路及 NOD 样受体 (nucleotide

binding oligomerization domain-like receptors, NLRs) 信号通路。与 GAGs 生物合成相关的通路包括硫酸软骨素 / 硫酸皮肤素 (chondroitin sulfate/dermatan sulfate, CS/DS)、硫酸乙酰肝素 / 肝素 (heparan sulfate/heparin, HS/H)、硫酸角质素 (keratan sulfate, KS) 以及乳酸。对 GAGs 生物合成相关通路中高表达的基因进行分析, 发现这些基因均用于编码糖基或磷基转移酶。而目前关于 GAGs 的研究表明, 这些 GAGs 修饰酶的基因可以被促炎性细胞因子上调表达进而改变 GAGs 的表面结构。这些结构的改变可以为不同种类的分子 (包括炎症介质) 提供大量的结合位点,

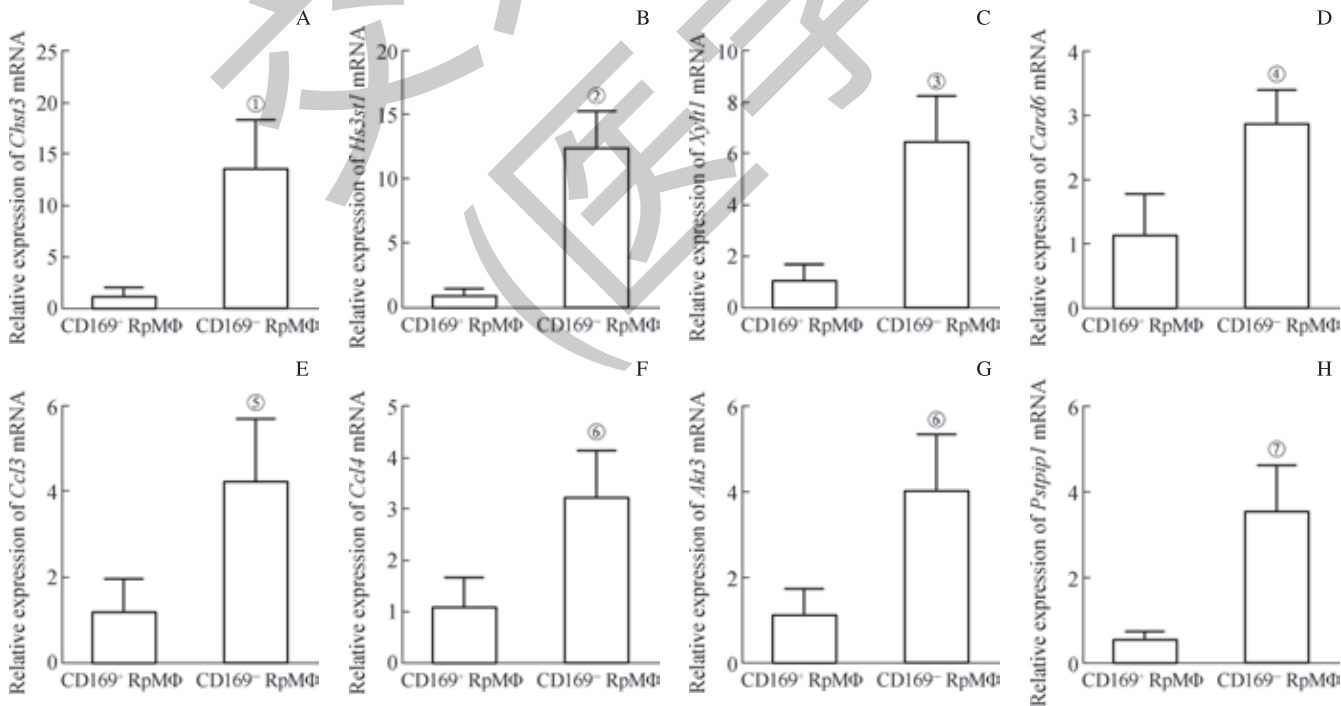
从而促进炎症进程^[24]。结合 CD169⁻ RpMΦ 还在炎症相关通路中富集, 我们推测 CD169⁻ RpMΦ 可能与介导炎症有关。

为了进一步验证 RNA-Seq 的结果, 我们挑选了 8 个在上述多种通路中的富集基因 (表 2)。采用 qPCR 分别检测了 GAGs 生物合成通路中的 *Chst3*、*Hs3st1* 和 *Xylt1*, 以及 TLR 信号通路、VEGF 信号通路及 NLR 信号通路中的 *Card6*、*Pstpip1*、*Akt3*、*Ccl3* 和 *Ccl4* 的表达水平。结果 (图 4) 显示, 与 CD169⁺ RpMΦ 群相比, 上述 8 个基因在 CD169⁻ RpMΦ 群中显著上调。

表 2 CD169⁻ RpMΦ 亚群中不同通路的差异表达基因
Tab 2 Differentially expressed genes in different pathways of CD169⁻ RpMΦ

Gene ID	Gene name	Pathway	Fc (CD169 ⁺ /CD169 ⁻)	Regulate	FPKM			
					CD169 ⁺ 1#	CD169 ⁺ 2#	CD169 ⁻ 1#	CD169 ⁻ 2#
ENSMUSG00000057337	<i>Chst3</i>	GAGs biosynthesis	0.095	down	2.52	2.05	0.24	0.16
ENSMUSG00000030657	<i>Xylt1</i>	GAGs biosynthesis	0.376	down	7.47	12.41	1.21	0.63
ENSMUSG00000051022	<i>Hs3st1</i>	GAGs biosynthesis	0.077	down	3.24	2.55	0.24	0.26
ENSMUSG00000019699	<i>Akt3</i>	VEGF signaling pathway	0.468	down	1.02	0.54	0.34	0.32
ENSMUSG00000000982	<i>Ccl3</i>	TLR-signaling pathway	0.412	down	6.21	4.25	2.36	1.67
ENSMUSG00000018930	<i>Ccl4</i>	TLR-signaling pathway	0.411	down	21.26	24.41	10.17	6.88
ENSMUSG00000041849	<i>Card6</i>	NLR-signaling pathway	0.490	down	1.23	0.90	0.32	0.31
ENSMUSG00000032322	<i>Pstpip1</i>	NLR-signaling pathway	0.357	down	1.72	1.16	0.52	0.35

Note: There are four samples in total, two of which were duplicates. CD169⁺ RpMΦ group: CD169⁺ 1#, CD169⁺ 2#; CD169⁻ RpMΦ group: CD169⁻ 1#, CD169⁻ 2#.



Note: Relative expression of selected genes in CD169⁺ RpMΦ and CD169⁻ RpMΦ. A. *Chst3*. B. *Hs3st1*. C. *Xylt1*. D. *Card6*. E. *Ccl3*. F. *Ccl4*. G. *Akt3*. H. *Pstpip1*. **P*=0.011, **P*=0.013, **P*=0.007, **P*=0.023, **P*=0.029, **P*=0.026, **P*=0.009, compared with CD169⁺ RpMΦ.

图 4 qPCR 证实部分 RNA 测序结果中的差异表达基因
Fig 4 Validation of differentially expressed genes in RNA-sequencing by qPCR

3 讨论

组织驻留巨噬细胞的异质性一直是免疫学研究的热点问题。即使目前巨噬细胞已获得大致分类, 由于组织驻留巨噬细胞在同一个组织内占据着多个局部微环境, 在已知的巨噬细胞种群中仍不断发现具有微环境特异性表型和功能的亚群。例如近期有研究指出肺间质巨噬细胞 (interstitial macrophages, IMs) 仍存在异质性, 它们可以分成 2 群具有不同基因表达谱和表型的亚群, 一组与伤口愈合有较高的关联性, 另一组则具有更强的抗原递呈能力。在心脏、脂肪和真皮中也存在类似的亚群^[25]。

鉴于 R_pM Φ 是一群拥有清除破损红细胞、调节铁循环、介导炎症反应、抵抗寄生虫感染及调节免疫反应等复杂功能的细胞群, 我们猜测 R_pM Φ 中可能也存在不同分工的亚群。CD169 分子在限制病毒扩散^[26]、介导 T 细胞反应^[27]和调节免疫反应^[28]等方面有重要的作用。本研究利用流式细胞术和免疫荧光法证实了 CD169 在部分 R_pM Φ 中表达。因此我们推测存在以 CD169 表达量分型的 R_pM Φ 亚群, 它们以互补的方式参与控制感染并诱导有效的免疫反应。

通过对于 RNA 测序数据的进一步分析, 本研究发现在 CD169⁺ R_pM Φ 中高表达的且能够在介导炎症及 GAGs 生物合成相关通路中富集的差异表达基因, 多与招募炎症细胞、推进免疫进程有关。例如, 在 GAGs 生物合成通路中富集的基因 *Chst3* 是引起炎症和白细胞趋化的一种碳水化合物磺基转移酶。它可合成 6- 硫酸软骨素, 而硫酸软骨素蛋白聚糖是重要的炎症介质。有研究^[29]发现, 利用小干扰 RNA 使 *Chst3* 沉默后, 肺泡灌洗液和肺实质中巨噬细胞的数量减少, 同时肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloprotein-9, MMP-9) 的表达被抑制。类似地, 在 TLRs 信号通路中富集的 *Ccl3* 和 *Ccl4* 基因能够编码免疫细胞招募的分子巨噬细胞炎症蛋白 1 α / β (macrophage inflammatory protein-1 α / β , MIP-1 α / β)。而 MIP-1 α / β 在诱导 Th1 型反应后会被大量释放^[30-31], 与 T 细胞、树突状细胞、B 细胞和嗜酸性粒细胞上的 CC 趋化因子受体 1 (CC chemokine receptors 1, CCR1)、CCR4 和 CCR5 受体结合, 招募免疫细胞浸润, 是炎症反应期间募集细胞的重要组成部分^[32]。这些分析结果均指向 CD169⁺ R_pM Φ 拥有介导炎症、招募免疫细胞的能力。

巨噬细胞被广泛认为可以分为 M1 M Φ 和 M2 M Φ 2 种极化类型。巨噬细胞在受到脂多糖 (lipopolysaccharide,

LPS)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 的刺激后可极化为 M1 M Φ , 产生炎症细胞因子, 例如 IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-23 和 TNF- α 等, 从而介导炎症, 引起组织损伤。另一方面, 巨噬细胞还可以被 IL-4 和 IL-13 转变为 M2 M Φ , 产生抗炎性细胞因子 IL-10 和 TGF- β , 以限制炎症发展、促进组织修复^[33]。通过与小鼠 M1 和 M2 巨噬细胞中存在的特征差异表达基因集^[34]进行比对, 我们发现 CD169⁺ R_pM Φ 中无 M2 型特征基因, 但有 6 个 M1 型特征基因, 它们分别是 *Gpr18*、*Itgal*、*Oasl1*、*H2-Q6*、*H2-T10* 和 *Arhgap24*。结合上述对于单个通路内上调的基因的分析, 本研究的结果提示 CD169⁺ R_pM Φ 是一群拥有 M1 倾向的 R_pM Φ 。

关于 R_pM Φ 亚群的研究仍存在许多问题亟待解决。首先, 现已知组织特异性转录因子和谱系特异性转录因子共同形成了控制网络, 控制组织驻留巨噬细胞的基因表达, 从而塑造了不同巨噬细胞亚群的独特表达谱^[35], 但对于影响 R_pM Φ 亚群表型至关重要的脾微环境因素仍不明确。通过将蛋白质组学、代谢组学、基因组学及表观基因组学与计算机模拟算法相结合, 可以极大地帮助我们了解 R_pM Φ 生物功能的全貌。其次, 关于 CD169⁺ R_pM Φ 的功能目前只在基因表达水平上进行了检测, 还需要更多体内和体外的功能实验证实本文关于 CD169⁺ R_pM Φ 数据的分析结论。

结合 RNA 测序结果, CD169⁺ R_pM Φ 中部分 GAGs 修饰酶的表达量上调。而目前已知 M1/M2 型巨噬细胞中许多 GAGs 修饰酶的表达发生改变, 并伴随独特结构特征的 GAGs 表达^[36]。这说明 GAGs 修饰酶可能通过改变 GAGs 的结构诱导炎症因子的释放, 或通过调节它们与靶膜上同源受体的结合, 影响巨噬细胞的可塑性。GAGs 的结构重塑是炎症发生的原因还是后果仍不清楚。如果是后者, 通过抗炎治疗可以恢复正常的聚糖结构和功能。相反, 如果 GAGs 的生物合成失调直接与疾病发生相关, 则可以将 GAGs 修饰酶作为疾病治疗的潜在靶点。

综上所述, 通过流式细胞术和免疫荧光法 2 种手段证实, 在小鼠脾中有部分 R_pM Φ 表达 CD169。随后, 我们根据 CD169 表达量将 R_pM Φ 分为 2 个亚群后发现, 与 CD169⁺ R_pM Φ 相比, CD169⁻ R_pM Φ 参与介导炎症反应, 具有 M1 M Φ 倾向。R_pM Φ 对于多种细菌或寄生虫感染、疾病的病理变化和组织重构过程有着重要的作用。因此, R_pM Φ 异质性的研究结果将更好地揭示免疫系统的协同工作, 从而为人工干预免疫反应提供临床指导依据。

参·考·文·献

- [1] Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(8): 606-616.
- [2] den Haan JM, Mebius RE, Kraal G. Stromal cells of the mouse spleen[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 201.
- [3] Kurotaki D, Uede T, Tamura T. Functions and development of red pulp macrophages[J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(2): 55-62.
- [4] dos Anjos Cassado A. F4/80 as a major macrophage marker: the case of the peritoneum and spleen[M]//Kloc M. Results and problems in cell differentiation. Cham: Springer International Publishing, 2017: 161-179.
- [5] Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, et al. Tissue-resident macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10): 986-995.
- [6] Haldar M, Kohyama M, So AY, et al. Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages[J]. *Cell*, 2014, 156(6): 1223-1234.
- [7] Hashimoto D, Chow A, Noizat C, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes[J]. *Immunity*, 2013, 38(4): 792-804.
- [8] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [9] Lavin Y, Mortha A, Rahman A, et al. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(12): 731-744.
- [10] Gautier EL, Shay T, Miller J, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(11): 1118-1128.
- [11] Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages[J]. *Cell*, 2014, 157(4): 832-844.
- [12] Perez OA, Yeung ST, Vera-Licona P, et al. CD169⁺ macrophages orchestrate innate immune responses by regulating bacterial localization in the spleen[J]. *Sci Immunol*, 2017, 2(16): eaah5520.
- [13] Kohyama M, Ise W, Edelson BT, et al. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis[J]. *Nature*, 2009, 457(7227): 318-321.
- [14] Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, et al. Macrophage receptors and immune recognition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23(1): 901-944.
- [15] Kim CC, Nelson CS, Wilson EB, et al. Splenic red pulp macrophages produce type I interferons as early sentinels of malaria infection but are dispensable for control[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): E48126.
- [16] Kurotaki D, Kon S, Bae K, et al. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses[J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 2229-2237.
- [17] Crocker PR, Gordon S. Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages[J]. *J Exp Med*, 1986, 164(6): 1862-1875.
- [18] van Dinther D, Veninga H, Iborra S, et al. Functional CD169 on macrophages mediates interaction with dendritic cells for CD8⁺ T cell cross-priming[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(6): 1484-1495.
- [19] Wu C, Rauch U, Korpos E, et al. Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression[J]. *J Immunol*, 2009, 182(10): 6508-6516.
- [20] Klaas M, Oetke C, Lewis LE, et al. Sialoadhesin promotes rapid proinflammatory and type I IFN responses to a sialylated pathogen, *Campylobacter jejuni*[J]. *J Immunol*, 2012, 189(5): 2414-2422.
- [21] Kanehisa M, Goto S, Sato Y, et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue): D109-D114.
- [22] A-Gonzalez N, Castrillo A. Origin and specialization of splenic macrophages[J]. *Cell Immunol*, 2018, 330: 151-158.
- [23] Taylor PR, Brown GD, Geldhof AB, et al. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity *ex vivo*[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(8): 2090-2097.
- [24] Groux-Degroote S, Cavdarli S, Uchimura K, et al. Glycosylation changes in inflammatory diseases[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2020, 119: 111-156.
- [25] Chakarov S, Lim HY, Tan L, et al. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches[J]. *Science*, 2019, 363(6432): eaau0964.
- [26] Sewald X, Ladinsky MS, Uchil PD, et al. Retroviruses use CD169-mediated trans-infection of permissive lymphocytes to establish infection[J]. *Science*, 2015, 350(6260): 563-567.
- [27] van Dinther D, Lopez Venegas M, Veninga H, et al. Activation of CD8⁺ T cell responses after melanoma antigen targeting to CD169⁺ antigen presenting cells in mice and humans[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(2): E183.
- [28] Wu Y, Lan C, Ren DR, et al. Induction of siglec-1 by endotoxin tolerance suppresses the innate immune response by promoting TGF- β 1 production[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(23): 12370-12382.
- [29] Kai Y, Tomoda K, Yoneyama H, et al. RNA interference targeting carbohydrate sulfotransferase 3 diminishes macrophage accumulation, inhibits MMP-9 expression and promotes lung recovery in murine pulmonary emphysema[J]. *Respir Res*, 2015, 16: 146.
- [30] Canque B, Rosenzweig M, Gey A, et al. Macrophage inflammatory protein-1 α is induced by human immunodeficiency virus infection of monocyte-derived macrophages[J]. *Blood*, 1996, 87(5): 2011-2019.
- [31] Lukacs NW, Strieter RM, Elner VM, et al. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 α during monocyte-endothelial cell interactions[J]. *Blood*, 1994, 83(5): 1174-1178.
- [32] Annunziato F, Galli G, Nappi F, et al. Limited expression of R5-tropic HIV-1 in CCR5-positive type 1-polarized T cells explained by their ability to produce RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β [J]. *Blood*, 2000, 95(4): 1167-1174.
- [33] Borges da Silva H, Fonseca R, Pereira RM, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 480.
- [34] Jablonski KA, Amici SA, Webb LM, et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): E0145342.
- [35] Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment[J]. *Cell*, 2014, 159(6): 1312-1326.
- [36] Martinez P, Denys A, Delos M, et al. Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(5): 502-513.

[收稿日期] 2020-01-15

[本文编辑] 徐敏