

Prdx1 通过维持线粒体稳态调节巨噬细胞的极化

张翔, 张子悦, 祁一鸣, 张晓娜, 殷松娜*

延安大学医学院, 陕西 延安 716000

张翔, 张子悦, 祁一鸣, 张晓娜, 殷松娜. *Prdx1* 通过维持线粒体稳态调节巨噬细胞的极化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1509-1522.

ZHANG Xiang, ZHANG Ziyue, QI Yiming, ZHANG Xiaona, YIN Songna. *Prdx1* regulates macrophage polarization by maintaining mitochondrial homeostasis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1509-1522.

摘要: 为了研究过氧化物还原酶 1 (peroxiredoxin 1, *Prdx1*) 在巨噬细胞极化过程中的作用, 使用脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 联合干扰素 γ (interferon gamma, IFN γ)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4) 处理小鼠白血病单核巨噬细胞 (mouse leukemia cells of monocyte macrophage, RAW264.7), 敲除 *Prdx1* 标记为 *Prdx1*^{-/-} 组, 采用流式细胞术检测巨噬细胞分化标志物, 采用酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测细胞因子水平, 检测诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric-oxide synthase, iNOS) 和精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 活性反应以及 *Prdx1*^{-/-} 细胞氧化损伤情况, 通过能量分析仪检测细胞外酸化率和氧消耗速率, 线粒体膜电位染料 (mitochondrial membrane potential dye, JC-1) 荧光探针法检测线粒体膜电位, 荧光染色法检测线粒体超氧化物水平, 并用线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 清除剂处理 RAW264.7 细胞来评估细胞极化情况。结果表明, 敲除 *Prdx1* 导致巨噬细胞 ROS、过氧化氢和 8-羟基-2-脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHDG) 水平升高, 线粒体拷贝数降低, 线粒体内膜转位酶 23 (translocase of inner mitochondrial membrane 23, TIM23) 蛋白和热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP60) 表达减少, 线粒体膜电位下降, 超氧化物增多, 三磷酸腺苷 (adenosine-triphosphate, ATP) 水平降低; 在 1 型巨噬细胞 (type 1 macrophage, M1) 中敲除 *Prdx1*, 细胞外酸化率 (extra cellular acidification rate, ECAR) 增加, 在 2 型巨噬细胞 (type 2 macrophage, M2) 中敲除 *Prdx1*, 耗氧率 (oxygen consumption rate, OCR) 降低。这表明敲除 *Prdx1* 能够通过损伤巨噬细胞线粒体来降低其氧化磷酸化功能, 导致巨噬细胞倾向 M1 型极化而抑制其向 M2 型极化, 本研究可为巨噬细胞介导的免疫治疗提供新的治疗策略。
关键词: 巨噬细胞; 极化; 线粒体; *Prdx1*

资助项目: 陕西省科技厅项目 (2021JQ-639)

This work was supported by the Project of Shaanxi Provincial Science and Technology Department (2021JQ-639).

*Corresponding author. E-mail: snyin@yau.edu.cn

Received: 2023-09-27; Accepted: 2023-11-24; Published online: 2023-12-05

Prdx1 regulates macrophage polarization by maintaining mitochondrial homeostasis

ZHANG Xiang, ZHANG Ziyue, QI Yiming, ZHANG Xiaona, YIN Songna*

Medical College, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: In order to investigate the role of *Prdx1* in macrophage polarization, mouse leukemia cells of monocyte macrophage (RAW264.7) were treated with lipopolysaccharides (LPS)+interferon gamma (IFN γ) or IL-4 to induce type 1 macrophage (M1) and type 2 macrophage (M2) macrophages, respectively. The *Prdx1* gene knockout cells (*Prdx1*^{-/-}) were used for the study. Flow cytometry was conducted to detect M1/M2 macrophage markers, and ELISA kits were used to measure M1/M2 cytokine levels. Inducible nitric-oxide synthase (iNOS) activity, arginase-1 (Arg-1) activity, and oxidative damage were also assessed. The Seahorse XFe24 Extracellular Flux Analyzer was employed to measure extracellular acidification rate and oxygen consumption rate. The mitochondrial membrane potential was analyzed using the mitochondrial membrane potential dye (JC-1) fluorescent probe, and mitochondrial superoxide was detected through fluorescence staining. Additionally, the impact of adding a mitochondrial reactive oxygen species (ROS) scavenger on RAW264.7 macrophage polarization was examined. The results demonstrated an increase in ROS, hydrogen peroxide, and 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHDG). Cytotoxicity and mitochondrial toxic effects, including mitochondrial superoxide accumulation, decreased adenosine-triphosphate (ATP) production, reduced mitochondrial membrane potential, and decreased mitochondrial DNA copy number, were observed. Furthermore, down-regulation of translocase of inner mitochondrial membrane 23 (TIM23) mitochondrial protein and mitochondrial stress protein heat shock protein 60 (HSP60) was noted. The extra cellular acidification rate (ECAR) in M1 macrophage polarization in RAW264.7 cells was increased, while oxygen consumption rate (OCR) in M2 macrophages was reduced. These findings indicate that *Prdx1* knockout in RAW264.7 cells can inhibit M2 macrophage polarization but promote M1 macrophage polarization by impairing mitochondrial function and reducing oxidative phosphorylation.

Keywords: macrophage; polarization; mitochondria; *Prdx1*

巨噬细胞(macrophages, M ϕ)最早由 Mechnikov 在 1884 年发现^[1], 是一种广泛分布于全身血液、组织的免疫细胞, 由血液内的单核细胞穿出血管分化后而成。巨噬细胞在不同的组织器官中存活的时间并不相同, 一般 2 个月或更长, 巨噬细胞可以吞噬癌细胞、抗原等, 在人体内发挥着重要的抵御外界细菌、病毒及其他

病原体入侵的功能^[2-3]。

在局部不同微环境的信号调节下巨噬细胞会产生不同的表型和功能, 如 1 型巨噬细胞 (type 1 macrophage, M1) (经典激活)发挥促炎作用, 2 型巨噬细胞(type 2 macrophage, M2) (替代激活)发挥抗炎作用。当机体遇到细胞内病原体感染时, 巨噬细胞极化形成 M1 型, 分泌诱导

型一氧化氮合酶以及促炎因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)和趋化因子等来清除病原微生物;当机体遇到细胞外病原微生物如寄生虫感染或过敏原等刺激时,巨噬细胞极化形成M2型,并表达精氨酸酶-1和炎症区分子(found in inflammatory zone, FIZZ),促进寄生虫的清除和组织修复,抑制效应性T细胞介导的免疫反应。因此,巨噬细胞的极化对机体抵抗病原体感染及损伤修复具有重要作用,巨噬细胞极化的精确调控对保持机体健康十分重要^[4-5]。

过氧化物还原酶超家族(peroxiredoxin, PRDX)是一类分子量约为22-27 kDa的含过氧化氢酶活性的抗氧化蛋白,可通过将过氧化氢还原为水,从而维持机体的氧化还原平衡系统^[6-7]。*Prdx1*作为Prdx家族中的一员,在细胞中分布最广,参与多种生物学作用,胞外Prdx1在炎症调节中起到关键的作用^[8-9],它可以作为分子伴侣来调节许多分子的作用^[10],也可作为转录调控因子发挥作用^[11]。有研究发现,在*Prdx1*基因敲除小鼠中,巨噬细胞对发生氧化损伤的红细胞吞噬能力减弱^[12],Prdx1在一定条件下可与TRAF6互作,从而抑制自噬的发生^[13],但是*Prdx1*在巨噬细胞参与炎症过程的具体机制尚不清楚。本研究以小鼠白血病单核巨噬细胞(mouse leukemia cells of monocyte macrophage, RAW264.7)巨噬细胞株为研究模型,探究*Prdx1*在巨噬细胞极化中的作用机制,以期为巨噬细胞相关的免疫治疗研究提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 试剂和仪器

RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞

由延安大学医学院中心实验室保存。*Prdx1*^{-/-}sgRNA: 5'-ATCAGCCTAAGTGAATACAA-3'。细胞培养液Dulbecco改良的Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Gibico公司;诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric-oxide synthase, iNOS)活性检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、过氧化氢检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(mitochondrial membrane potential dye, JC-1)、三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)检测试剂盒和小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;TNF- α 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) kit、IL-6 ELISA kit、白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) ELISA kit、lip3000 (lipofectamine 3000, lip3000)和线粒体超氧化物(mitochondrial superoxide, MitoSOX) Red线粒体超氧化物指示剂购自Invitrogen公司;大鼠抗CD80抗体、兔抗CD86抗体和兔抗CD163抗体购自Abcam公司;小鼠抗CD206抗体和小鼠抗HSP60抗体购自Santa公司;兔抗Prdx1抗体、兔抗Stat6抗体和兔抗Phospho-Stat6 (Tyr641)抗体购自Cell Signaling Technology公司;小鼠抗TIM23抗体(Becton, Dickinson and Company公司);精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1)活性检测试剂盒(Sigma公司);8-羟基-2-脱氧鸟苷(8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHDG)检测试剂盒(Cell Biolabs公司);线粒醌(mitoquinone, MitoQ10)甲磺酸盐(mesylate) (Selleck公司)。流式细胞仪和Spectramax190连续波长酶标仪(Becton, Dickinson and Company公司);CKX41光学显微镜(Olympus公司);细胞能量代谢仪Seahorse XFe24 (Agilent公司);Galaxy170S CO₂恒温细胞培养器(Eppendorf公司)。

1.2 细胞培养和诱导

使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂, 每 2 天更换新鲜培养液。取对数生长期细胞进行传代及实验, 野生型为 *Prdx1*^{+/+}组 RAW264.7 巨噬细胞组, *Prdx1* 敲除组为 *Prdx1*^{-/-}组 RAW264.7 巨噬细胞。使用 100 ng/mL 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS) 联合 20 ng/mL IFN γ 处理 RAW264.7 巨噬细胞 12 h 以刺激分化为 M1 型 M ϕ (LPS+IFN γ), 使用 20 ng/mL IL-4 处理 RAW264.7 巨噬细胞 12 h 以刺激分化为 M2 型 M ϕ (IL-4)。

1.3 在巨噬细胞中敲除 *Prdx1*

利用成簇的规则间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR/Cas9)技术构建 *Prdx1* 基因小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)的编辑载体, 根据 lip3000 说明书转染巨噬细胞。

1.4 iNOS 活性、Arg-1 活性和细胞氧化损伤检测

iNOS 活性检测使用荧光酶标仪测定, 按照碧云天公司提供的说明书进行。Arg-1 活性检测使用荧光酶标仪测定, 按照 Sigma 公司提供的说明书进行^[25]。使用活性氧检测试剂盒检测 ROS, 按照碧云天公司提供的说明书进行。使用过氧化氢检测试剂盒检测过氧化氢, 按照碧云天公司提供的说明书进行。使用 8-OHdG 检测试剂盒检测 8-OHDG, 按照 Cell Biolabs 公司提供的说明书进行。

1.5 流式细胞术检测 RAW264.7 巨噬细胞极化标记物阳性表达率

M ϕ (LPS+IFN γ)组细胞消化重悬后, 在流式管内分别加入 CD80 荧光抗体和 CD86 荧光抗体, 4 °C 孵育 30 min, 用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液洗涤 2 次后重悬, 采用流式细胞仪检测 CD80 和 CD86 阳性比率。

M ϕ (IL-4)组细胞消化重悬后, 在流式管内分别加入 CD163 荧光抗体和 CD206 荧光抗体(细胞需要破膜处理), 4 °C 孵育 30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后重悬, 采用流式细胞仪检测 CD163 和 CD206 阳性表达率。

1.6 ELISA 法检测 RAW264.7 巨噬细胞 M1/M2 型细胞因子

细胞于 2 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测细胞上清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平。

1.7 线粒体损伤检测

线粒体损伤由线粒体脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)/细胞核基因组 DNA 的比值来表征, 若线粒体 DNA 的相对拷贝数量减少则表明线粒体受到损伤。线粒体 DNA/细胞核基因组 DNA 的相对比值通过荧光定量 PCR 来检测, 其中线粒体 ATP 合成酶 6 kDa 亚基(mitochondrial ATP synthase 6 kDa subunit, MtATP6)基因代表线粒体 DNA 的拷贝数, 核糖体蛋白 L13a (ribosomal protein L13a, Rpl13a)基因代表细胞核基因组 DNA 的拷贝数。定量引物如表 1 所示。

1.8 蛋白免疫印迹检测相关表达蛋白质

收集各组细胞, 以 GAPDH (上海碧云天生物技术有限公司, 1:1 000)为内参, 检测 PRDX1 (Cell Signaling Technology 公司, 1:1 000)、TIM23 (Becton, Dickinson and Company 公司, 1:2 500)、

表 1 *MTATP6* 和 *RPL13A* 引物序列

Table 1 Sequences of *MtATP6* and *Rpl13a* primers

Name	Primer sequence (5'→3')
<i>MtATP6</i> -F	CAGTCCCCTCCCTAGGACTT
<i>MtATP6</i> -R	TCAGAGCATTGGCCATAGAA
<i>Rpl13a</i> -F	GGGCAGGTTCTGGTATTGGAT
<i>Rpl13a</i> -R	GGCTCGGAAATGGTAGGGG

HSP60 (Santa Cruz 公司, 1:200)、p-STAT6 (Cell Signaling Technology 公司, 1:1 000)和 STAT6 (Cell Signaling Technology 公司, 1:1 000)的蛋白质表达变化^[26]。

1.9 细胞能量分析仪检测细胞胞外酸化率 (extra cellular acidification rate, ECAR)和细胞氧消耗速率(oxygen consumption rate, OCR)

利用细胞能量分析仪每隔 10 min 实时检测 ECAR 和 OCR 值, 检测总时长为 80 min。以野生型为 *Prdx1*^{+/+}组 RAW264.7 巨噬细胞组的平均值为基准均值, 用 *Prdx1*^{-/-}组 RAW264.7 巨噬细胞各时间点数值与基准均值的比值表示 ECAR 和 OCR。

1.10 JC-1 荧光探针法检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)

通过荧光显微镜观察各组荧光颜色的转变来分析 MMP 的变化。MMP 较高时, JC-1 可形成聚合物, 荧光显微镜下可观察到红色荧光; 在 MMP 较低时, JC-1 以单体形式存在, 荧光显微镜下可观察到绿色荧光。

1.11 ATP 的含量检测

按照 ATP 含量测试盒说明书提取样品, 按照试剂盒说明书分别加入上清液、稀释和工作液, 进行化学发光值测定, 使用酶标仪检测 ATP 含量^[27]。

1.12 MitoSOX 免疫染色分析线粒体超氧化物水平

MitoSOX Red 是一种对活细胞线粒体中活性氧(reactive oxygen species, ROS)具有高度选择性的染料, 被线粒体中的 ROS 氧化, 从而显示出红色, 通过流式细胞仪检测细胞发光的强弱来表征代表线粒体内 ROS 的含量。

1.13 统计学处理

所有数据均来自 3 次独立重复实验, 并以平均值±标准误($\bar{x} \pm s$)表示。用 SPSS22.0 统计

软件进行统计与分析, 组间统计学显著性采用双尾 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 被认为显著, $P < 0.01$ 被认为极显著。使用 GraphPad Prism 6 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 敲除 *Prdx1* 可诱导巨噬细胞 M1 型极化

在巨噬细胞中敲除 *Prdx1* (图 1), 与 *Prdx1*^{+/+}组相比, *Prdx1*^{-/-}组巨噬细胞 iNOS 活性显著高于 *Prdx1*^{+/+}组 ($P < 0.01$) (图 2A), *Prdx1*^{-/-}组 CD80⁺和 CD86⁺阳性细胞明显多于 *Prdx1*^{+/+}组 ($P < 0.01$) (图 2B、2E), *Prdx1*^{-/-}组细胞 M1 型巨噬细胞相关促炎因子 TNF- α ($P < 0.01$) (图 2C)和 IL-6 ($P < 0.01$) (图 2D)表达水平显著高于 *Prdx1*^{+/+}组细胞; 与 *Prdx1*^{+/+}组相比, *Prdx1*^{-/-}组巨噬细胞 Arg-1 活性显著高于 *Prdx1*^{+/+}组 ($P < 0.01$) (图 3A), 而 CD163⁺和 CD206⁺阳性细胞明显少于 *Prdx1*^{+/+}组 ($P < 0.01$) (图 3B、3E), *Prdx1*^{-/-}组细胞 IL-10 ($P < 0.01$) (图 3C)和 pSTAT6 ($P < 0.01$) (图 3D)的表达水平显著低于 *Prdx1*^{+/+}组, 表明敲除 *Prdx1* 可促进 RAW264.7 巨噬细胞向 M1 型极化, 而抑制其向 M2 型极化。

2.2 敲除 *Prdx1* 导致巨噬细胞易受氧化性损伤

与 *Prdx1*^{+/+}组相比, *Prdx1*^{-/-}组中 ROS 水平 ($P < 0.01$) (图 4A)、H₂O₂ 量(图 4B)和 8-OHdG 水平(图 4C)均明显升高 ($P < 0.01$)。

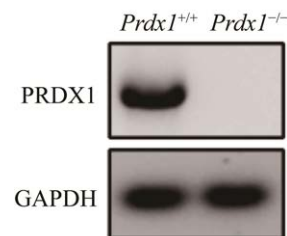


图 1 在巨噬细胞中敲除 *Prdx1*

Figure 1 Knockout of *Prdx1* in macrophages.

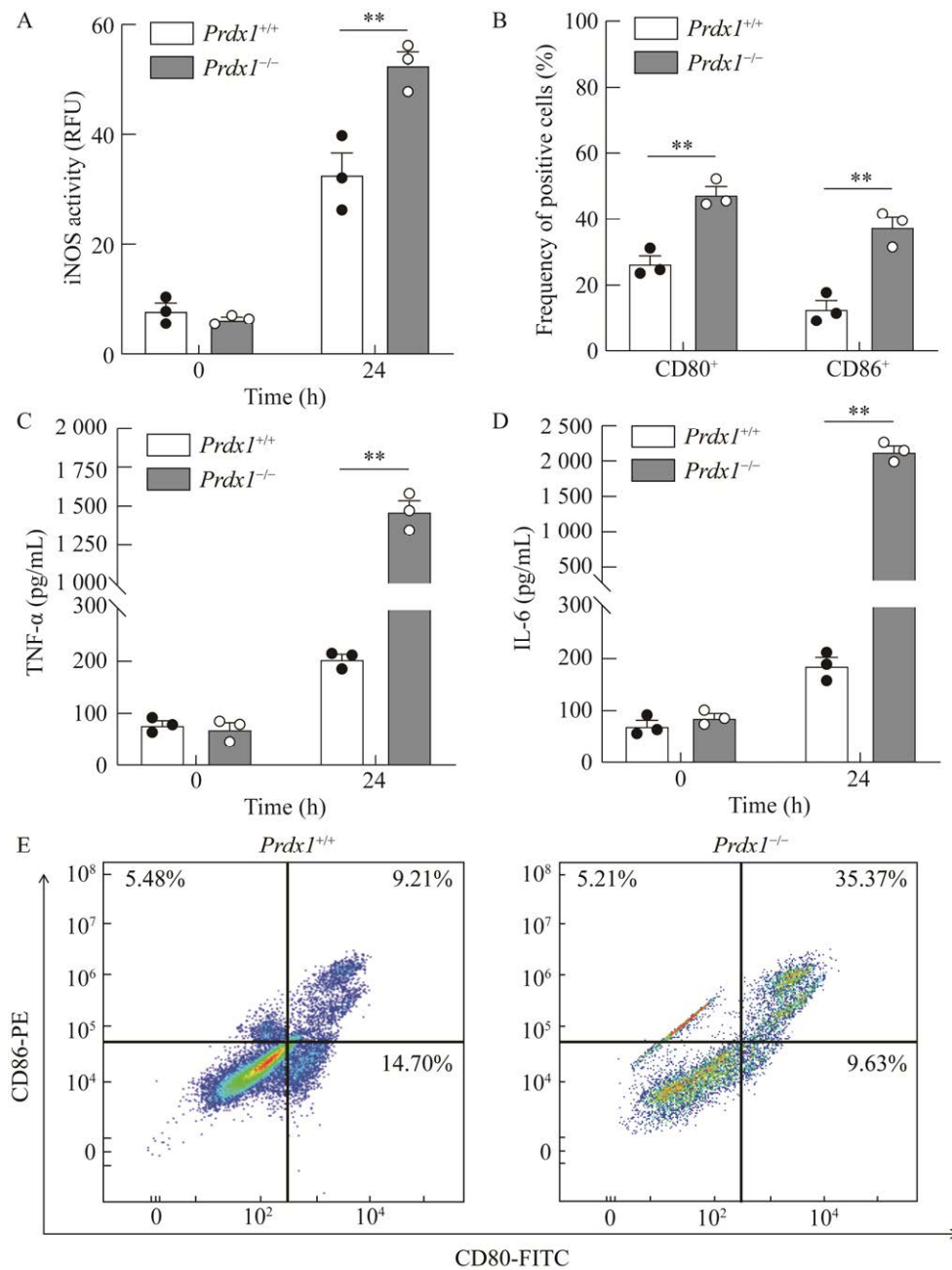


图 2 敲除 *Prdx1* 可促进巨噬细胞的 M1 型极化 A: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 iNOS 活性的影响. B: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M1 型极化标志物 CD80 和 CD86 的影响. C: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M1 型极化的 TNF- α 的影响. D: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M1 型极化的 IL-6 的影响. E: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M1 型极化标志物 CD80 和 CD86 的流式检测. **: $P < 0.01$

Figure 2 Knockout of *Prdx1* promotes M1 polarization in macrophages. A: Effect of knockout of *Prdx1* on iNOS activity in M1 macrophages. B: Effect of knockout of *Prdx1* on M1 markers CD80 and CD86 in M1 macrophages. C: Effect of knockout of *Prdx1* on TNF- α in M1 macrophages. D: Effect of knockout of *Prdx1* on IL-6 in M1 macrophages. E: Flow cytometry analysis of M1 markers CD80 and CD86 in M1 macrophages with knockout of *Prdx1*. **: $P < 0.01$.

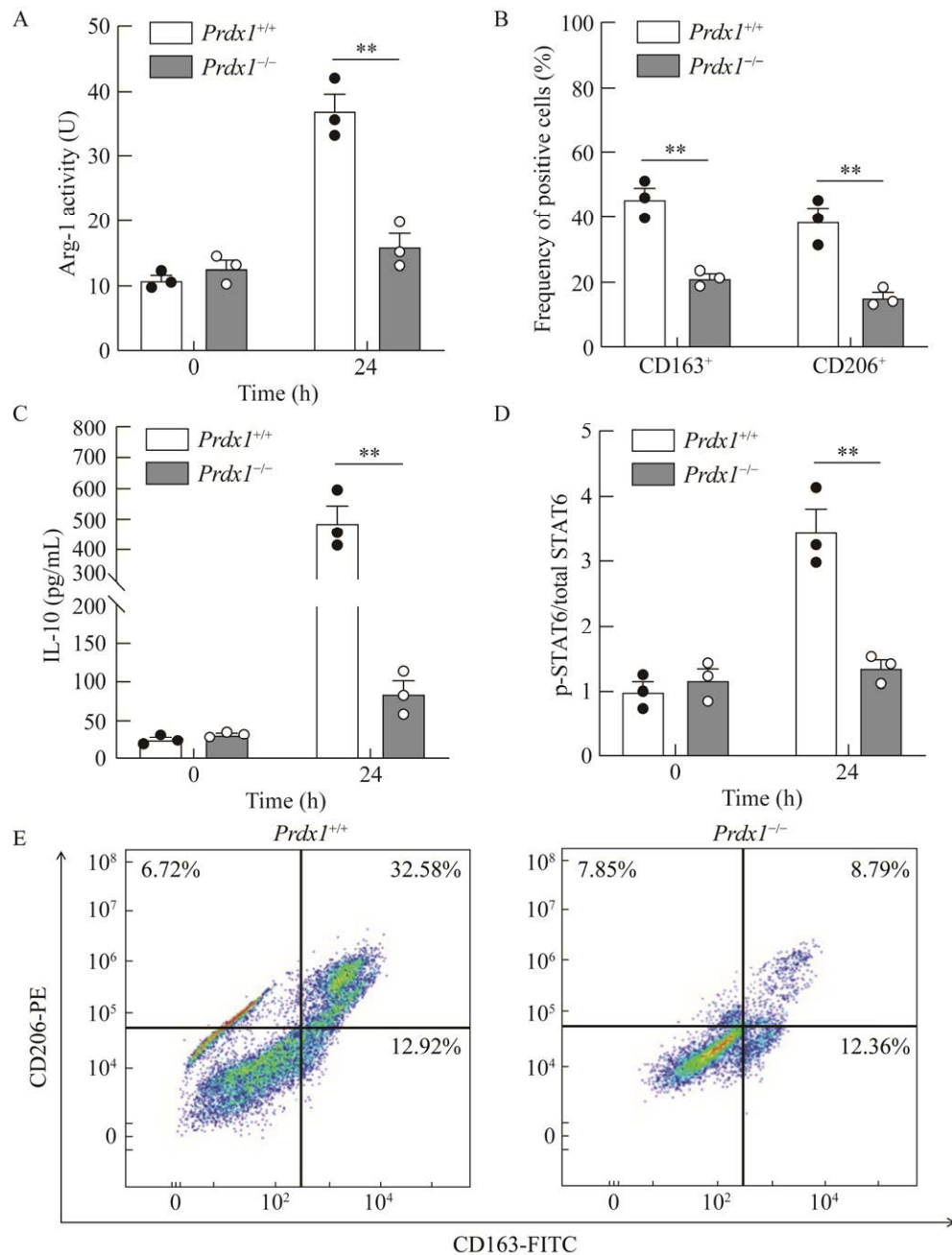


图 3 敲除 *Prdx1* 可抑制巨噬细胞的 M2 型极化 A: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 Arg-1 活性的影响. B: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M2 型极化标志物 CD163 和 CD206 的影响. C: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M2 型极化的 IL-10 的影响. D: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M2 型极化的 pSTAT6 的影响. E: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 M2 型极化标志物 CD163 和 CD206 的流式检测. **: $P < 0.01$

Figure 3 Knockout of *Prdx1* inhibits M2 polarization in macrophages. A: Effect of knockout of *Prdx1* on Arg-1 activity. B: Effect of knockout of *Prdx1* on M2 markers CD163 and CD206. C: Effect of knockout of *Prdx1* on IL-10 in M2 macrophages. D: Effect of knockout of *Prdx1* on pSTAT6 in M2 macrophages. E: Flow cytometry analysis of M2 markers CD206 and CD163 in M2 macrophages with knockout of *Prdx1*. **: $P < 0.01$.

2.3 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 ECAR 和 OCR 的影响

与 *Prdx1*^{+/+} 组相比, *Prdx1*^{-/-} 组 ECAR 明显增加 ($P < 0.01$) (图 5A、5B), 而 OCR 明显降低

($P < 0.01$) (图 6A、6B), 表明敲除 *Prdx1* 后, 巨噬细胞的呼吸方式发生改变, 巨噬细胞向 M1 型极化供能的糖酵解功能增强, 向 M2 型极化供能的氧化磷酸化功能减弱。

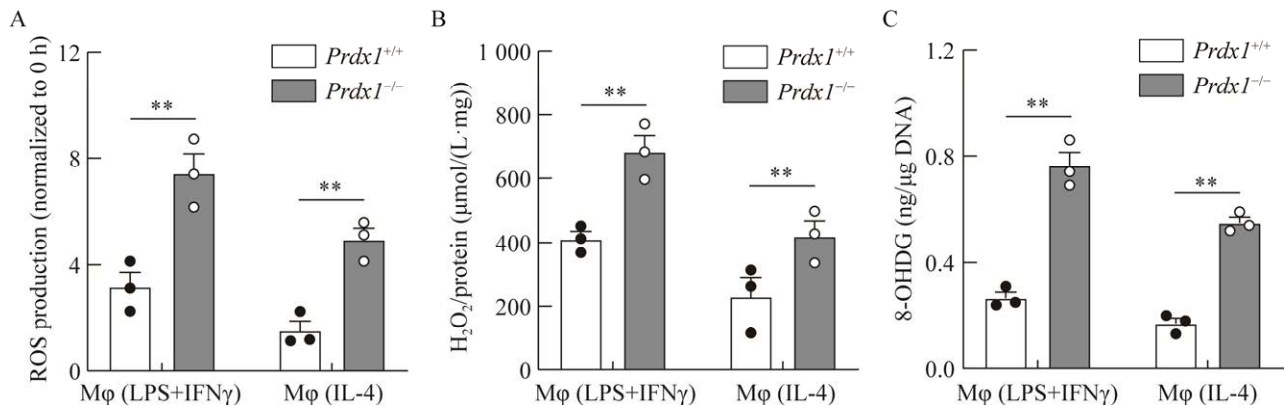


图 4 敲除 *Prdx1* 导致巨噬细胞氧化性损伤 A: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 ROS 活性的影响. B: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 H₂O₂ 活性的影响. C: 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 8-OHdG 含量的影响. **: $P < 0.01$; Mφ: 巨噬细胞

Figure 4 Knockout of *Prdx1* causes oxidative damage in macrophages. A: Effect of knockout of *Prdx1* on ROS in macrophages. B: Effect of knockout of *Prdx1* on H₂O₂ in macrophages. C: Effect of knockout of *Prdx1* on 8-OHdG in macrophages. **: $P < 0.01$; Mφ: Macrophages.

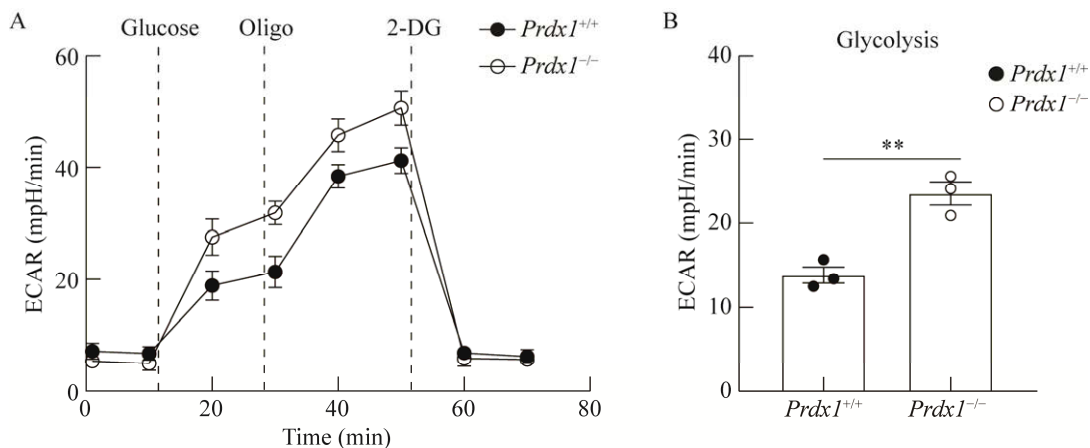


图 5 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 ECAR 的影响 A: 敲除 *Prdx1* 对 M1 型极化巨噬细胞 ECAR 的影响. B: 敲除 *Prdx1* 对 M1 型极化巨噬细胞 ECAR 的影响. **: $P < 0.01$

Figure 5 Effect of knockout of *Prdx1* on extracellular acidification rate (ECAR) in macrophages. A: Effect of knockout of *Prdx1* on ECAR in M1 macrophages. B: Effect of knockout of *Prdx1* on ECAR in M1 macrophages. **: $P < 0.01$.

2.4 敲除 *Prdx1* 影响巨噬细胞能量代谢重塑
与 *Prdx1*^{+/+}组相比, *Prdx1*^{-/-}组细胞线粒体拷贝数均明显降低($P<0.01$) (图 7A), 而且线粒体内膜 TIM23 蛋白和关键功能蛋白 HSP60 表达量明显减少(图 7B)。

2.5 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞线粒体功能的影响

与 *Prdx1*^{+/+}组相比, *Prdx1*^{-/-}组红色荧光明显减弱, 绿色荧光增强(图 8), 表明线粒体膜电位下降, 线粒体发生去极化, 而且, *Prdx1*^{-/-}

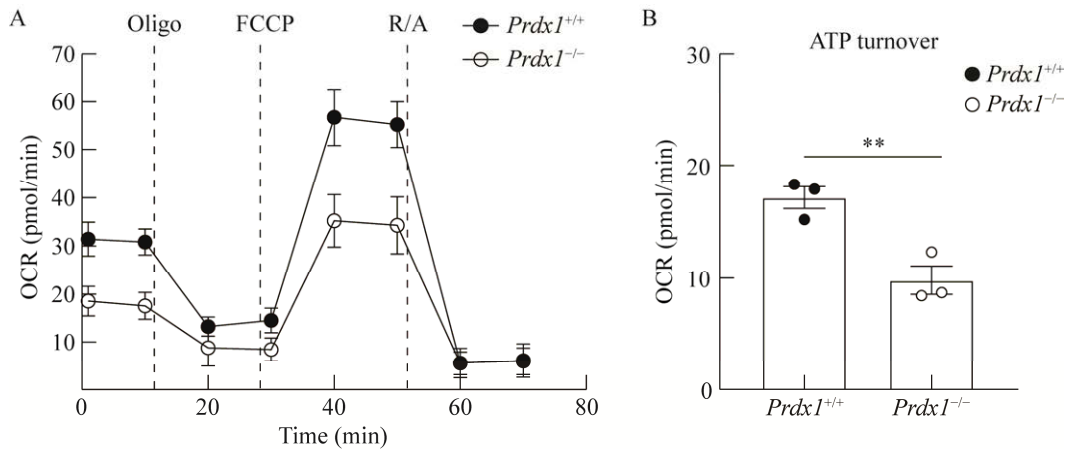


图 6 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞 OCR 的影响 A: 敲除 *Prdx1* 对 M2 型极化巨噬细胞 OCR 的影响. B: 敲除 *Prdx1* 对 M2 型极化巨噬细胞 OCR 的影响. **: $P<0.01$

Figure 6 Effect of Knockout of *Prdx1* on oxygen consumption rate (OCR) in macrophages. A: Effect of knockout of *Prdx1* on OCR in M2 macrophages. B: Effect of knockout of *Prdx1* on OCR in M2 macrophages. **: $P<0.01$.

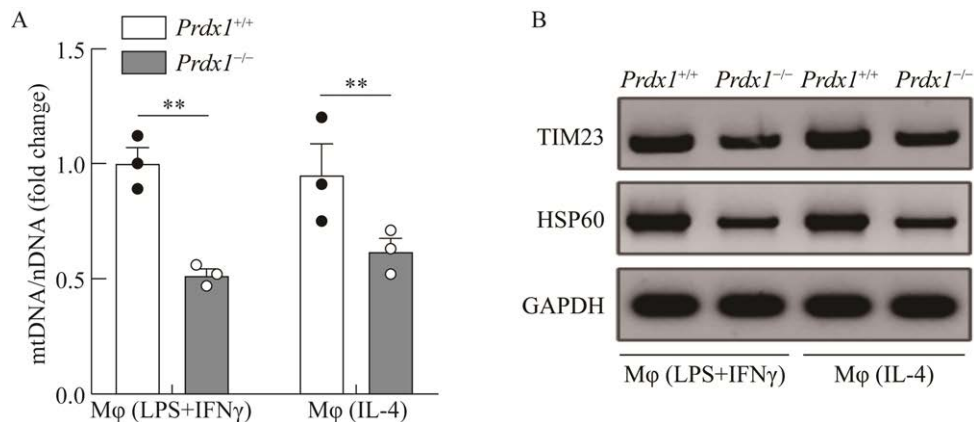


图 7 敲除 *Prdx1* 导致巨噬细胞线粒体损伤 A: 敲除 *Prdx1* 对 LPS 联合 IFN γ 以及 IL-4 诱导处理的线粒体拷贝数的影响. B: 敲除 *Prdx1* 对 LPS 联合 IFN γ 以及 IL-4 诱导处理的巨噬细胞线粒体关键蛋白的影响. **: $P<0.01$; mtDNA: 线粒体 DNA

Figure 7 Knockout of *Prdx1* causes mitochondrial damage in macrophages. A: Effect of knockout of *Prdx1* on mtDNA in M ϕ (LPS+IFN γ) and M ϕ (IL-4). B: Effect of knockout of *Prdx1* on mitochondrial protein in M ϕ (LPS+IFN γ) and M ϕ (IL-4). **: $P<0.01$; mtDNA: mitochondrial DNA.

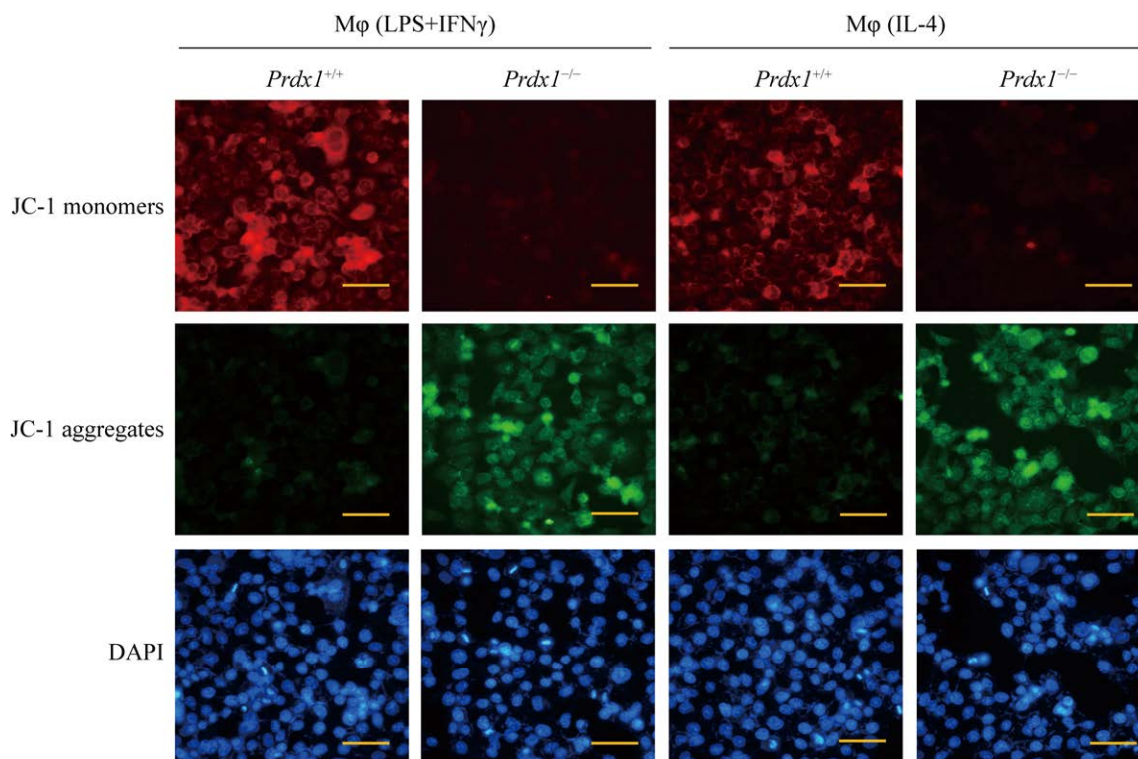


图 8 敲除 *Prdx1* 对巨噬细胞线粒体膜电位的影响(比例尺=50 μm)

Figure 8 Effect of knockout of *Prdx1* on MMP in macrophages (scale bar=50 μm).

组超氧化物明显增多($P<0.01$) (图 9A), ATP 水平明显降低 ($P<0.01$) (图 9B)。

2.6 使用线粒体 ROS 清除剂可消除由于 *Prdx1* 缺失引发的巨噬细胞极化

与未使用线粒体 ROS 清除剂 MitoQ10 处理相比,使用线粒体 ROS 清除剂 MitoQ10 处理的 *Prdx1*^{-/-} 组中 iNOS 活性(图 10A)和 Arg-1 活性无明显差异变化(图 10B),说明使用线粒体 ROS 清除剂可消除由于 *Prdx1* 缺失引发的巨噬细胞极化。

3 讨论与结论

巨噬细胞在机体绝大多数的损伤反应中发挥着关键作用^[14],它是高可塑性细胞,在体内并不是一个稳定的激活状态,而是持续着高度

动态的极化过程。巨噬细胞极化的不同方向参与维持炎症反应和组织稳态, M1/M2 代表了巨噬细胞极化的 2 个极端, M1 巨噬细胞是一种经典的激活途径,它利用厌氧糖酵解和糖醛酸磷酸途径作为主要代谢途径; M2 巨噬细胞是一种“替代激活途径”,它具有完整的三羧酸循环和氧化磷酸化过程。对于线粒体损伤与巨噬细胞极化之间的关系,有研究表明,脑缺血再灌注损伤中巨噬细胞的 M1 极化与由自由线粒体 DNA 驱动的炎症有关^[2]。巨噬细胞的极化是一个多因素过程,它在生理或病理条件下被激活为某一种表型时,仍然保留着继续变化以响应新环境影响的能力,从而逆转它的极化表型,逆转巨噬细胞的极化状态作为免疫治疗方法对于疾病的治疗具有不可估量的价值^[16-17]。

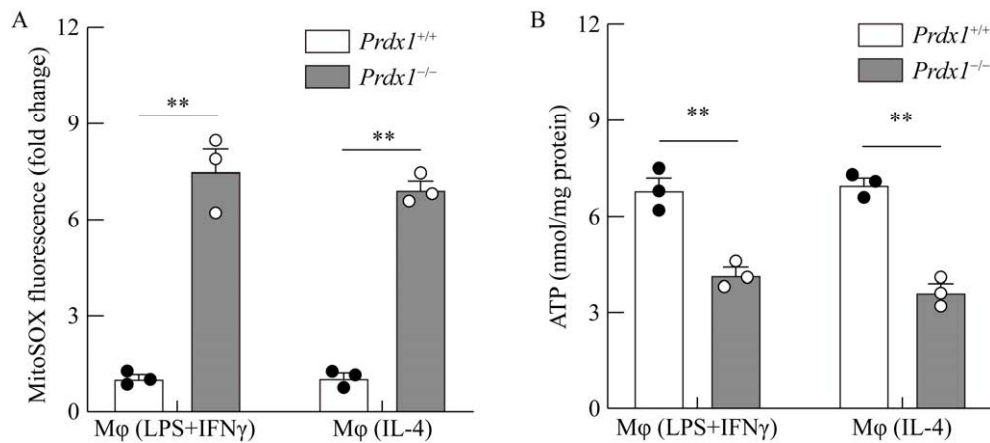


图 9 敲除 *Prdx1* 对 LPS 联合 IFN γ 和 IL-4 诱导的巨噬细胞线粒体超氧化物(A)和 ATP 含量(B)的影响 **; $P < 0.01$

Figure 9 Effect of knockout of *Prdx1* on mitochondrial superoxide (A) and ATP (B) in macrophages. **: $P < 0.01$.

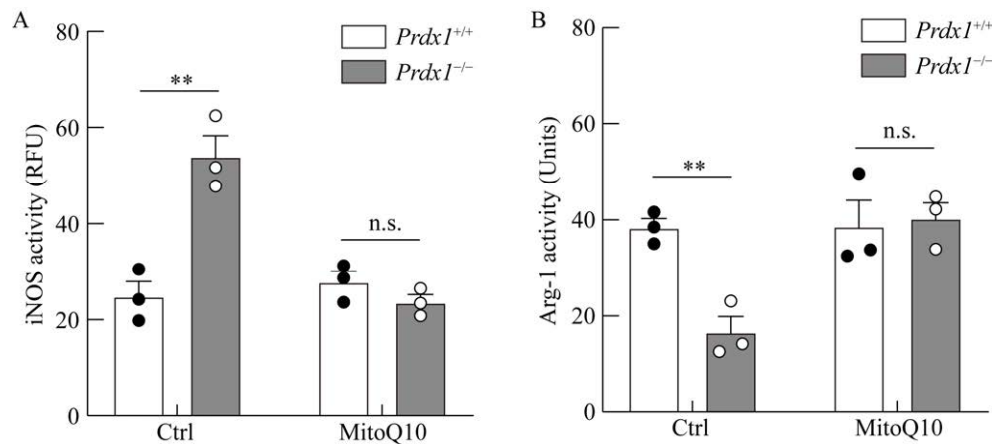


图 10 线粒体 ROS 清除剂对敲除 *Prdx1* 的巨噬细胞 iNOS 活性(A)和 Arg-1 活性(B)的影响 **: $P < 0.01$, n.s.: 无显著差异

Figure 10 Effect of ROS scavenger on iNOS activity (A) and Arg-1 activity (B) in macrophages with knockout of *Prdx1*. **: $P < 0.01$; n.s.: No significance.

PRDXs 是一个小型抗氧化蛋白家族, 是能够维持氧化还原平衡的有效防御系统。*Prdx1* 在细胞的胞质中表达, 首次被鉴定为暴露于氧化应激的小鼠腹膜巨噬细胞中产生的应激诱导蛋白^[16], 是与免疫、炎症、细胞凋亡和氧化应激调节相关的关键因子^[18-19]。*Prdx1* 在巨噬细

胞中发挥着重要的抗氧化、调节免疫和细胞增殖分化等作用, 对于维护机体的免疫平衡和稳定状态具有重要的作用^[20]。研究表明, *Prdx1* 在巨噬细胞中的表达比其他抗氧化酶更高, 而且 *Prdx1* 的缺乏会诱发过度的氧化应激并导致巨噬细胞中自噬通量的维持受损^[21]。本研究发

现敲除 *Prdx1* 可促进 RAW264.7 巨噬细胞向 M1 型极化并抑制其向 M2 型极化, 而且在使用线粒体 ROS 清除剂时, 可消除因 *Prdx1* 缺失导致的 RAW264.7 巨噬细胞极化。这与前人在 RAW264.7 巨噬细胞中敲低 *Prdx1* 可导致 IL-10 的上调以及由此产生促炎细胞因子下调的研究^[22] 相符。

本研究发现敲除 *Prdx1* 能够导致 RAW264.7 巨噬细胞氧化损伤, 包括 ROS 水平、过氧化氢水平和 DNA 氧化损伤标志物 8-OHdG 水平均明显升高, 也有研究表明 *Prdx1* 的表达对于激活和增强中风相关小胶质瘤的抗氧化功能是必需的^[23]。M1 型巨噬细胞可发挥促炎作用, 巨噬细胞在发生 M1 极化的过程中, 细胞主要以糖酵解方式来供能, M2 型巨噬细胞则发挥抗炎作用, 巨噬细胞发生 M2 极化的过程中, 细胞主要以有氧条件下的氧化磷酸化方式来供能, 因此在巨噬细胞的极化过程中, 细胞不同呼吸方式决定了巨噬细胞的极化方向, 也就决定了巨噬细胞发挥的促炎作用或抗炎作用。在 M1 型 RAW264.7 巨噬细胞中敲除 *Prdx1*, ECAR 明显增加, 在 M2 型 RAW264.7 巨噬细胞中敲除 *Prdx1*, OCR 明显降低, 表明敲除 *Prdx1* 后, 巨噬细胞呼吸方式发生改变, 主要为巨噬细胞向 M1 型极化供能的糖酵解功能增强, 向 M2 型极化供能的氧化磷酸化功能减弱, 说明敲除 *Prdx1* 导致 RAW264.7 巨噬细胞易向 M1 型极化, 而抑制其向 M2 型极化。

由于糖代谢中有氧条件下的氧化磷酸化是在线粒体中发生, 在无氧条件下的糖酵解是发生于细胞质中, 因此推测敲除 *Prdx1* 引发的氧化磷酸化功能减弱可能是由于线粒体功能损伤所导致。本研究结果表明: 敲除 *Prdx1* 后, 巨噬细胞中线粒体拷贝数明显降低, 线粒体内膜

TIM23 蛋白和线粒体功能关键蛋白 HSP60 表达量也明显减少, 而且线粒体膜电位下降, 线粒体发生去极化, 线粒体超氧化物明显增多, ATP 水平明显降低, 说明 *Prdx1* 能够通过维持线粒体的稳态来调节巨噬细胞的极化。

有研究表明, 在小鼠 M1 巨噬细胞中, 敲除时钟基因 *Bmal1* 的小鼠无法维持线粒体功能, 进而增强了由丙二酸脱氢酶介导的线粒体产生的活性氧物质的产生, 以及缺氧诱发因子 (hypoxia-inducible factor, Hif-1 α) 依赖的代谢重编程和炎症损伤^[24]。本研究结果说明在 RAW264.7 巨噬细胞中敲除 *Prdx1* 能够损伤巨噬细胞线粒体功能, 而且向 M2 型极化供能的氧化磷酸化功能也减弱, 而其向 M1 型极化供能的糖酵解功能却增强, 说明敲除 *Prdx1* 导致 RAW264.7 巨噬细胞易向 M1 型极化, 而抑制其向 M2 型极化。而且此现象能够通过使用线粒体 ROS 清除剂而被消除, 这也揭示了 *Prdx1* 能够通过维持线粒体的稳态来调节巨噬细胞的极化。本研究能够为巨噬细胞介导的免疫治疗提供新的治疗策略。

REFERENCES

- [1] SPIX B, CHAO YK, ABRAHAMIAN C, CHEN CC, GRIMM C. TRPML cation channels in inflammation and immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 225.
- [2] NASSEF MZ, HANKE JE, HILLER K. Mitochondrial metabolism in macrophages[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2021, 321(6): C1070-C1081.
- [3] WILLENBORG S, SANIN DE, JAIS A, DING XL, ULAS T, NÜCHEL J, POPOVIĆ M, MacVICAR T, LANGER T, SCHULTZE JL, GERBAULET A, ROERS A, PEARCE EJ, BRÜNING JC, TRIFUNOVIC A, EMING SA. Mitochondrial metabolism coordinates stage-specific repair processes in macrophages during wound healing[J]. *Cell Metabolism*, 2021, 33(12): 2398-2414.e9.

- [4] PIDWILL GR, GIBSON JF, COLE J, RENSHAW SA, FOSTER SJ. The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 11: 620339.
- [5] RUNTSCH MC, ANGIARI S, HOOFTMAN A, WADHWA R, ZHANG YL, ZHENG YN, SPINA JS, RUZEK MC, ARGIRIADI MA, McGETTRICK AF, MENDEZ RS, ZOTTA A, PEACE CG, WALSH A, CHIRILLO R, HAMS E, FALLON PG, JAYAMARAN R, DUA K, BROWN AC, et al. Itaconate and itaconate derivatives target JAK1 to suppress alternative activation of macrophages[J]. *Cell Metabolism*, 2022, 34(3): 487-501.e8.
- [6] HAMPTON MB, VICK KA, SKOKO JJ, NEUMANN CA. Peroxiredoxin involvement in the initiation and progression of human cancer[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018, 28(7): 591-608.
- [7] KRATA N, FORONCEWICZ B, ZAGOŹDŹON R, MOSZCZUK B, ZIELENKIEWICZ M, PĄCZEK L, MUCHA K. Peroxiredoxins as markers of oxidative stress in IgA nephropathy, membranous nephropathy and lupus nephritis[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2021, 70(1): 3.
- [8] LOVATT M, ADNAN K, KOCABA V, DIRISAMER M, PEH GSL, MEHTA JS. Peroxiredoxin-1 regulates lipid peroxidation in corneal endothelial cells[J]. *Redox Biology*, 2020, 30: 101417.
- [9] KLOPOTOWSKA M, BAJOR M, GRACZYK-JARZYŃKA A, KRAFT A, PILCH Z, ZHYLKO A, FIRCUK M, BARANOWSKA I, LAZNIEWSKI M, PLEWCZYŃSKI D, GORAL A, SOROCZYŃSKA K, DOMAGALA J, MARHELAVA K, SLUSARCZYK A, RETECKI K, RAMJI K, KRAWCZYK M, TEMPLES MN, SHARMA B, et al. PRDX-1 supports the survival and antitumor activity of primary and CAR-modified NK cells under oxidative stress[J]. *Cancer Immunology Research*, 2022, 10(2): 228-244.
- [10] CAO JX, SCHULTE J, KNIGHT A, LESLIE NR, ZAGOZDZON A, BRONSON R, MANEVICH Y, BEESON C, NEUMANN CA. Prdx1 inhibits tumorigenesis *via* regulating PTEN/AKT activity[J]. *The EMBO Journal*, 2009, 28(10): 1505-1517.
- [11] WANG XM, HE SH, SUN JM, DELCUVE GP, DAVIE JR. Selective association of peroxiredoxin 1 with genomic DNA and COX-2 upstream promoter elements in estrogen receptor negative breast cancer cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(17): 2987-2995.
- [12] HAN YH, KWON TH, KIM SU, HA HL, LEE TH, KIM JM, JO EK, KIM BY, YOON DY, YU DY. Peroxiredoxin I deficiency attenuates phagocytic capacity of macrophage in clearance of the red blood cells damaged by oxidative stress[J]. *BMB Reports*, 2012, 45(10): 560-564.
- [13] MIN Y, KIM MJ, LEE SN, CHUN E, LEE KY. Inhibition of TRAF₆ ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NFκB activation and autophagy activation[J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1347-1358.
- [14] OISHI Y, MANABE I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J]. *International Immunology*, 2018, 30(11): 511-528.
- [15] YU SH, FU JY, WANG J, ZHAO YX, LIU BH, WEI JH, YAN XY, SU J. The influence of mitochondrial-DNA-driven inflammation pathways on macrophage polarization: a new perspective for targeted immunometabolic therapy in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 135.
- [16] FUNES SC, RIOS M, ESCOBAR-VERA J, KALERGIS AM. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. *Immunology*, 2018, 154(2): 186-195.
- [17] WANG C, MA C, GONG LH, GUO YQ, FU K, ZHANG YF, ZHOU HL, LI YX. Macrophage polarization and its role in liver disease[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 803037.
- [18] LIU Q, ZHANG Y. PRDX1 enhances cerebral ischemia-reperfusion injury through activation of TLR4-regulated inflammation and apoptosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 519(3): 453-461.
- [19] ATTARAN S, SKOKO JJ, HOPKINS BL, WRIGHT MK, WOOD LE, ASAN A, WOO HA, FEINBERG A, NEUMANN CA. Peroxiredoxin-1 Tyr194 phosphorylation regulates LOX-dependent extracellular matrix remodelling in breast cancer[J]. *British Journal of Cancer*, 2021, 125(8): 1146-1157.
- [20] HE Y, PENG Y, TAO LJ, PENG ZZ, YANG HX. Peroxiredoxin-1 aggravates lipopolysaccharide-induced septic shock *via* promoting inflammation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 527(4): 861-865.
- [21] JEONG SJ, KIM S, PARK JG, JUNG IH, LEE MN,

- JEON S, KWEON HY, YU DY, LEE SH, JANG Y, KANG SW, HAN KH, MILLER YI, PARK YM, CHEONG C, CHOI JH, OH GT. Prdx1 (peroxiredoxin-1) deficiency reduces cholesterol efflux *via* impaired macrophage lipophagic flux[J]. *Autophagy*, 2018, 14(1): 120-133.
- [22] TAE LIM Y, SUP SONG D, JOON WON T, LEE YJ, YOO JS, EUN HYUNG K, WON YOON J, PARK SY, WOO HWANG K. Peroxiredoxin-1, a possible target in modulating inflammatory cytokine production in macrophage like cell line RAW_{264.7}[J]. *Microbiology and Immunology*, 2012, 56(6): 411-419.
- [23] KIM S, LEE W, JO H, SONN SK, JEONG SJ, SEO S, SUH J, JIN J, KWEON HY, KIM TK, MOON SH, JEON S, KIM JW, KIM YR, LEE EW, SHIN HK, PARK SH, OH GT. The antioxidant enzyme peroxiredoxin-1 controls stroke-associated microglia against acute ischemic stroke[J]. *Redox Biology*, 2022, 54: 102347.
- [24] ALEXANDER RK, LIOU YH, KNUDSEN NH, STAROST KA, XU CR, HYDE AL, LIU SH, JACOBI D, LIAO NS, LEE CH. Bmal1 integrates mitochondrial metabolism and macrophage activation[J]. *eLife*, 2020, 9: e54090.
- [25] ÉRSEK B, SILLÓ P, CAKIR U, MOLNÁR V, BENCSIK A, MAYER B, MEZEY E, KÁRPÁTI S, PÓS Z, NÉMETH K. Melanoma-associated fibroblasts impair CD8⁺ T cell function and modify expression of immune checkpoint regulators *via* increased arginase activity[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(2): 661-673.
- [26] ADRIAENSSENS E, ASSELBERGH B, RIVERA-MEJÍAS P, BERVOETS S, VENDREDY L, de WINTER V, SPAAS K, de RYCKE R, van ISTERDAEL G, IMPENS F, LANGER T, TIMMERMAN V. Small heat shock proteins operate as molecular chaperones in the mitochondrial intermembrane space[J]. *Nature Cell Biology*, 2023, 25(3): 467-480.
- [27] WANG ZW, GONG X, LI J, WANG H, XU XX, LI YP, SHA XY, ZHANG ZW. Oxygen-delivering polyfluorocarbon nanovehicles improve tumor oxygenation and potentiate photodynamic-mediated antitumor immunity[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(3): 5405-5419.

(本文责编 陈宏宇)