

陈婷婷, 单杉, 李南, 等.  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 40–46.  
Chen TT, Shan S, Li N, et al. Effect of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 40–46.  
Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.005

## $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响

陈婷婷, 单杉, 李南, 汪子颖, 杞萌, 张胜男, 胡姗姗, 魏伟\*, 孙妩弋\*

(安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,  
合肥 230032)

**【摘要】 目的** 探讨  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, pM $\phi$ ) 功能的影响。**方法** 分别分离野生型(wild type, WT) 和  $\beta$ -arrestin2 基因敲除( $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup>) 小鼠的 pM $\phi$ , Transwell 法检测  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  迁移的影响; 中性红吞噬实验检测缺失  $\beta$ -arrestin2 基因的 pM $\phi$  吞噬功能的变化; 流式细胞术检测 pM $\phi$  表面分子 CD86 的变化情况; ELISA 法检测  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  炎症因子产生的影响; Western Blot 法检测  $\beta$ -arrestin2、JAK1/STAT1 通路相关蛋白的表达。**结果** 与 WT 组相比, 敲除  $\beta$ -arrestin2 明显降低了 pM $\phi$  的迁移能力, 增强了 pM $\phi$  的吞噬功能, 且上调 pM $\phi$  表面 CD86 分子的表达, 同时 pM $\phi$  分泌炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 的水平也明显升高; Western Blot 检测结果表明, 缺失  $\beta$ -arrestin2 的 pM $\phi$  中 p-JAK1、p-STAT1 的表达明显上调。**结论**  $\beta$ -arrestin2 对小鼠 pM $\phi$  的迁移、吞噬、极化等功能具有调节作用, 其机制可能与调控 JAK1/STAT1 通路有关。

**【关键词】**  $\beta$ -arrestin2; 腹腔巨噬细胞; 炎症因子; JAK1; STAT1

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0040-07

### Effect of $\beta$ -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages

CHEN Tingting, SHAN Shan, LI Nan, WANG Ziyang, QI Meng, ZHANG Shengnan, HU Shanshan, WEI Wei\*, SUN Wuyi\*

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anhui-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032, China)

Corresponding author: SUN Wuyi. E-mail: sunwuyi51@aliyun.com; WEI Wei. E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the function of mouse peritoneal macrophages (pM $\phi$ ). **Methods** The primary mouse pM $\phi$  were isolated from wild type mice and  $\beta$ -arrestin2 gene knockout mice. The migration of pM $\phi$  was measured by Transwell assay. Changes in the phagocytosis of pM $\phi$  after  $\beta$ -arrestin2 gene knockout were detected by the neutral red phagocytosis test. The expression of CD86 on pM $\phi$  was analyzed by flow cytometry. The levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in pM $\phi$  were detected by ELISA. Protein expression levels of  $\beta$ -arrestin2, JAK1, p-JAK1, STAT1 and p-STAT1 were detected by Western Blot. **Results** Compared with the control group,  $\beta$ -arrestin2 knockout significantly inhibited the migration ability of pM $\phi$ , and significantly enhanced the phagocytosis of pM $\phi$  and the expression of CD86. The production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  was

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81770605, 81300332), 安徽医科大学科研水平提升计划(2021xkjT016)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(81770605, 81300332), the Research Level Improvement Program of Anhui Medical University (2021xkjT016).

**【作者简介】** 陈婷婷(1997—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 肝脏药理学。Email: 1945010416@stu.ahmu.edu.cn

**【通信作者】** 孙妩弋(1981—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肝脏药理学。Email: sunwuyi51@aliyun.com;

魏伟(1960—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床药理学。Email: wwei@ahmu.edu.cn。

\* 共同通信作者

significantly increased in pM $\phi$  after  $\beta$ -arrestin2 depletion. The result of Western Blot showed that  $\beta$ -arrestin2 deficiency significantly up-regulated the levels of p-JAK1 and p-STAT1 in pM $\phi$ . **Conclusions** These result indicated that  $\beta$ -arrestin2 plays an important role in regulating the migration, phagocytosis and polarization of pM $\phi$ , and these effects appear to be mediated by the JAK1/STAT1 signaling pathway.

【**Keywords**】  $\beta$ -arrestin2; peritoneal macrophages; inflammatory cytokines; JAK1; STAT1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

巨噬细胞是参与炎症免疫反应的重要效应细胞之一,具有呈递抗原、分泌细胞因子等功能,从而调控机体微环境,发挥免疫调节作用。巨噬细胞具有高度可塑性,经过不同的刺激后,可以分化为特定的表型,包括经典活化的 M1 型巨噬细胞和选择性活化的 M2 型巨噬细胞<sup>[1]</sup>。M1 型巨噬细胞主要表达 CD86 等基因,能够帮助宿主抵御病毒和微生物的感染,抑制肿瘤,产生多种炎症因子如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等,进而参与炎症及免疫反应<sup>[2-3]</sup>。腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, pM $\phi$ )作为腹腔内最主要的细胞类型之一,参与了腹腔内各种类型的免疫炎症反应。已有研究报道,pM $\phi$  与腹膜炎以及腹膜炎引起的全身性脓毒血症、腹腔器官胰腺、肠道等炎症性疾病密切相关<sup>[4]</sup>。因此,更好地了解 pM $\phi$  的特征和功能对于炎症免疫反应相关疾病的治疗具有重要意义。

$\beta$ -arrestin2 广泛表达于哺乳动物的组织细胞和免疫细胞中,是一种重要的接头蛋白和信号转导调控蛋白,其在细胞增殖、迁移、凋亡和炎症反应中发挥重要的调节作用<sup>[5-6]</sup>。然而, $\beta$ -arrestin2 对 pM $\phi$  功能的影响尚未见相关报道。本研究采用  $\beta$ -arrestin2 基因敲除小鼠( $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup>),观察  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠 pM $\phi$  功能的影响,初步探讨  $\beta$ -arrestin2 调控 pM $\phi$  功能的可能机制,为后续深入研究  $\beta$ -arrestin2 在免疫应答和相关临床疾病中的作用提供前期实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

4 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 小鼠,6 ~ 8 周龄,体重约为 20 g。购自美国 Jackson 实验室【1511A06788】,遗传背景 C57BL/6J。8 只 SPF 级雌性野生型(wide type, WT) C57BL/6J 小鼠,6 ~ 8 周龄,体重约为 20 g,购

自江苏集萃药康生物科技股份有限公司【SCXK(苏)2018-0008】。实验动物在安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房饲养及繁育【SYXK(皖)2020-001】,给予动物自由饮水与摄食,饲养环境温度 20 ~ 25℃,湿度 40% ~ 70%,光照 12 h。所有操作经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:LLSC20200794)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基(以色列 Biological Industries, 01-100-1ACS),脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(美国 Sigma, L2880),胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司, 11011-8611),Transwell 小室(美国 Corning, 3422),中性红(大连美仑生物技术有限公司, MB4613),APC 标记的 Anti-CD86(美国 Biolegend, 105113),小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 试剂盒(上海酶联生物技术有限公司, ml002095、ml063132、ml002293),Anti- $\beta$ -arrestin2(美国 Affinity, DF6305)、Anti-p-JAK1(美国 Affinity, AF2012)、Anti-JAK1(美国 Affinity, AF5012)、Anti-STAT1(美国 Affinity, AF6300)、Anti- $\beta$ -actin(美国 Affinity, AF7018),Anti-p-STAT1(英国 Abcam, ab109461)。

Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪(TECAN, 瑞士),Image Quant 化学发光成像系统(GE, 美国),CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman, 美国),BX53 正置显微镜(Olympus, 日本),BIO-RAD powerpac164-5070 电泳仪(BIO-RAD, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验动物的繁育鉴定

将  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 雄性小鼠与 WT 雌性小鼠 1:2 比例合笼,饲养过程中,每日观察和记录小鼠的生长情况,每周更换 2 次垫料,及时补充饲料和饮用水。将繁殖出的 F1 代杂合子小鼠继续进行合笼,获得的 F2 代小鼠按本实验室此前方法进行基因型检测<sup>[7]</sup>,筛选出年龄和性别匹配的同窝  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 小鼠和 WT 对照小鼠进行实验。

#### 1.2.2 pM $\phi$ 的分离提取及分组处理

pM $\phi$  的提取参照耿田欣等<sup>[8]</sup>方法,颈椎脱臼处死小鼠后,无菌条件下磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)灌洗并收集腹腔液。1000 rpm 离心 10 min, 所得细胞沉淀用 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素混合溶液)重悬接种至 6 孔板中, 于 37℃ 培养 4 h 后, 洗去未贴壁细胞, 余下的贴壁细胞即为 pM $\phi$ , 并在显微镜下观察细胞形态。体外使用 LPS(终浓度 100 ng/mL)刺激 pM $\phi$ , 分为 WT 对照组(WT control)、LPS 刺激组(WT + LPS)、 $\beta$ -arrestin2 基因敲除对照组( $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> control)、 $\beta$ -arrestin2 基因敲除刺激组( $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> + LPS), 每组 5 只小鼠。

### 1.2.3 Transwell 法检测 pM $\phi$ 的迁移能力

用 RPMI 1640 无血清培养基重悬细胞, 并调整细胞密度为每毫升  $1 \times 10^5$  个, 将 100  $\mu$ L 细胞悬液加入上室, 下室加入 500  $\mu$ L 含 10% 血清的培养基, 培养 24 h 后, 用湿棉签擦拭小室内未迁移的细胞, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min。0.01% 结晶紫染色液染色 30 min, PBS 清洗 3 次, 晾干, 在显微镜下观察膜底细胞拍照计数。

### 1.2.4 中性红吞噬实验检测 pM $\phi$ 的吞噬功能

将细胞悬液的密度调整为每毫升  $5 \times 10^4$  个, 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 培养 24 h 后, PBS 清洗 3 次, 加入 0.075% 中性红溶液 100  $\mu$ L, 继续培养 2 h 后, 弃去中性红溶液, PBS 洗 3 次, 加入 100  $\mu$ L 细胞裂解液(50% 乙醇:50% 乙酸 = 1:1), 4℃ 过夜, 酶标仪检测波长为 540 nm 处的吸光度(OD)值。

### 1.2.5 流式细胞术检测 pM $\phi$ 表面分子 CD86 的变化

LPS 刺激后收集细胞, PBS 洗 1 遍, 1200 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入 50  $\mu$ L PBS 重悬细胞, 再加入 1  $\mu$ L CD86-APC 荧光标记抗体, 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗 1 遍, 加入 300  $\mu$ L PBS 重悬, 流式细胞仪检测。

### 1.2.6 ELISA 检测 pM $\phi$ 炎症细胞因子的释放量

细胞分组处理后, 收集细胞上清液, 采用 ELISA 试剂盒检测 pM $\phi$  分泌炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的水平。操作按照试剂盒说明书步骤进行, 配制并滴加标准品、上清液样品, 再依次加入酶标试剂及显色剂 A、B, 酶标仪检测 OD 值, 按照说明书绘制标准曲线, 并计算炎症因子含量。

### 1.2.7 Western Blot 法检测 pM $\phi$ 中 $\beta$ -arrestin2、JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1 的表达

收集细胞, 提取蛋白。配制 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 上样进行电泳, 转移至 PVDF 膜上, 用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 配制的 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜, 37℃ 摇床封闭 2 h, 孵育抗  $\beta$ -arrestin2、JAK1、p-JAK1、STAT1、p-STAT1、 $\beta$ -actin 抗体, 4℃ 过夜, 洗去一抗后, 37℃ 孵育二抗 2 h 后, 洗去二抗, 化学发光成像系统显影。采用 Image J 图像分析软件进行结果分析, 测得条带的灰度值, 计算各组目的条带与内参  $\beta$ -actin 的比值以反映目的蛋白表达水平, 比较各组间差异。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。结果用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间的差异比较采用单因素方差分析, GraphPad Prism 8.0 绘制柱状图,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 $\beta$ -arrestin2 敲除对小鼠 pM $\phi$ 的形态的影响

倒置显微镜下观察了贴壁后 pM $\phi$  的细胞形态。结果显示, WT 组小鼠 pM $\phi$  呈圆形, 部分细胞出现伪足, 呈梭形。而  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 组小鼠 pM $\phi$  多呈圆形, 边缘光滑, 较少见伪足(见图 1)。

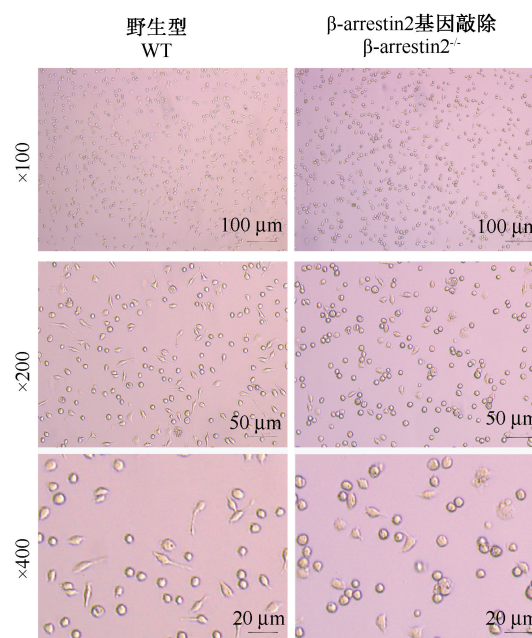


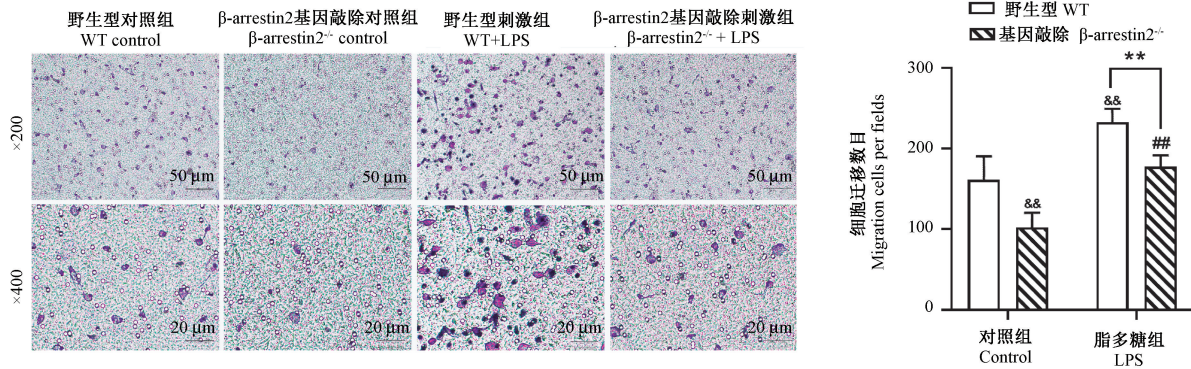
图 1 pM $\phi$  的形态学观察

Figure 1 Morphological observation of pM $\phi$

## 2.2 $\beta$ -arrestin2 敲除对小鼠 pM $\phi$ 的迁移能力的影响

为了研究  $\beta$ -arrestin2 是否参与了 pM $\phi$  迁移过程,通过 Transwell 迁移实验检测  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  迁移的影响。结果如图 2 所示,与未刺激

的对照组 pM $\phi$  相比,LPS 刺激后 pM $\phi$  的细胞迁移数目明显增加;与 WT 组 pM $\phi$  相比, $\beta$ -arrestin2 基因敲除明显减少了 pM $\phi$  的细胞迁移数目( $P < 0.01$ )。提示  $\beta$ -arrestin2 基因敲除可以抑制 pM $\phi$  的迁移能力。



注:与野生型对照组相比,<sup>&</sup> $P < 0.05$ ,<sup>&&</sup> $P < 0.01$ ;与  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对照组相比,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ;与野生型刺激组相比,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。(下同)

图 2  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  迁移能力的影响

Note. Compared with WT control group,<sup>&</sup> $P < 0.05$ ,<sup>&&</sup> $P < 0.01$ . Compared with  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> control group,<sup>##</sup> $P < 0.01$ . Compared with WT+LPS group,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ . (The same in the flowing figures)

Figure 2 Effect of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the migration ability of pM $\phi$

## 2.3 $\beta$ -arrestin2 敲除对小鼠 pM $\phi$ 吞噬功能的影响

吞噬功能被认为是巨噬细胞参与免疫反应的重要指标之一,因此我们采用了中性红实验检测  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  吞噬功能的影响。结果如图 3 所示,与未刺激的对照组相比,LPS 刺激明显升高 pM $\phi$  的吞噬指数( $P < 0.01$ );与 WT 组 pM $\phi$  相比, $\beta$ -arrestin2 基因敲除后显著提高了小鼠 pM $\phi$  的吞噬指数( $P < 0.01$ )。以上结果提示  $\beta$ -arrestin2 基因敲除可以增强巨噬细胞的吞噬功能。

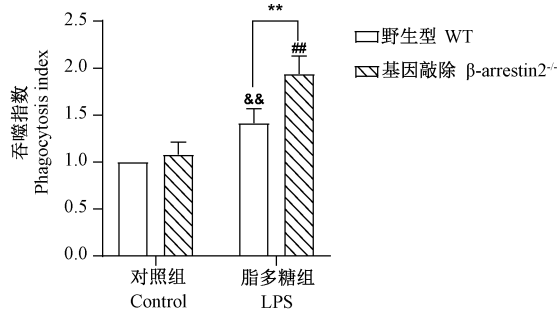


图 3  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  吞噬功能的影响

Figure 3 Effect of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the phagocytic ability of pM $\phi$

## 2.4 $\beta$ -arrestin2 敲除对小鼠 pM $\phi$ 表面分子 CD86 表达的影响

CD86 作为 M1 型巨噬细胞的表面标志,其表达

水平与巨噬细胞的极化程度密切相关<sup>[9]</sup>。为了探究  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 M1 型巨噬细胞极化的影响,使用流式细胞仪检测 pM $\phi$  表面分子 CD86 的水平变化。结果如图 4 显示,与未刺激的对照组相比,LPS 刺激后,小鼠 pM $\phi$  表面分子 CD86 的表达均明显升高;与 WT 组相比, $\beta$ -arrestin2 基因敲除后明显增加了 CD86 的表达水平( $P < 0.01$ ),提示  $\beta$ -arrestin2 可能参与了 LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞的极化过程。

## 2.5 $\beta$ -arrestin2 敲除对小鼠 pM $\phi$ 炎症因子分泌量的影响

极化的 M1 型巨噬细胞可以分泌大量的炎症因子,为了进一步验证  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  极化能力的影响,我们使用 ELISA 试剂盒检测  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  分泌炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响。结果如图 5 所示,与对照组相比,LPS 刺激后,小鼠 pM $\phi$  中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的分泌量明显升高( $P < 0.01$ );与 WT 组 pM $\phi$  相比, $\beta$ -arrestin2 基因敲除明显上调了 pM $\phi$  中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的分泌水平( $P < 0.01$ )。

## 2.6 $\beta$ -arrestin2 敲除对 JAK1/STAT1 信号通路的影响

为了进一步阐明  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  功能影响的可能机制,我们通过 Western Blot 法检测了 JAK1/STAT1 通路相关蛋白的水平变化。结果

显示,  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 组 pM $\phi$  中几乎不表达  $\beta$ -arrestin2; WT 组中, 在 LPS 的刺激下,  $\beta$ -arrestin2 的表达较对照组明显降低(图 6A,  $P < 0.01$ ), 提示在炎性环境下,  $\beta$ -arrestin2 在 pM $\phi$  功能调控中发挥作用。与未刺激的对照组相比, LPS 刺激后 p-JAK1 和

p-STAT1 的表达明显上升(图 6B,  $P < 0.01$ ); 与 WT 组 pM $\phi$  相比,  $\beta$ -arrestin2 基因敲除后明显促进了 p-JAK1 和 p-STAT1 表达(图 6B,  $P < 0.01$ )。以上结果提示  $\beta$ -arrestin2 基因敲除可以促进 pM $\phi$  中 JAK1/STAT1 通路的激活。

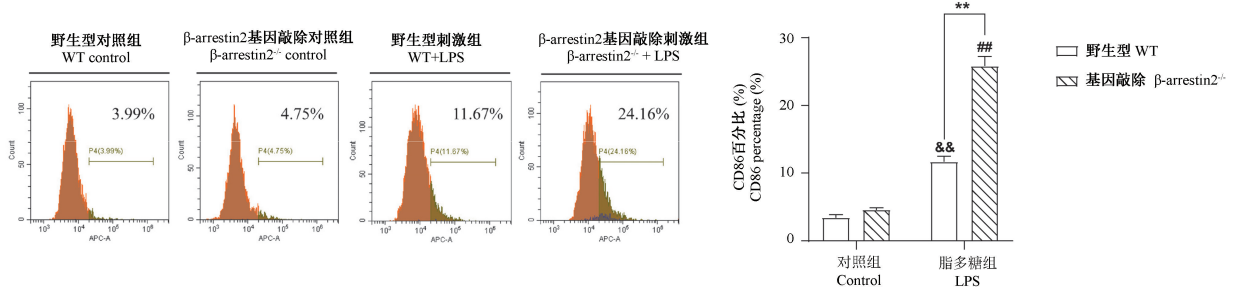


图 4  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠 pM $\phi$  表面分子 CD86 表达的影响

Figure 4 Effect of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the expression of CD86 on the surface of mouse pM $\phi$

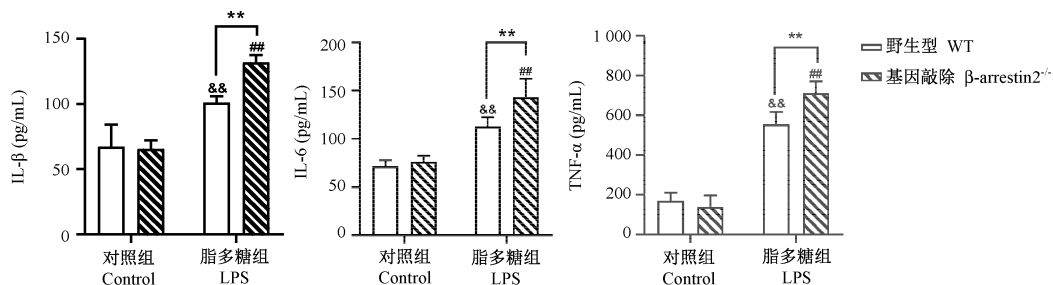
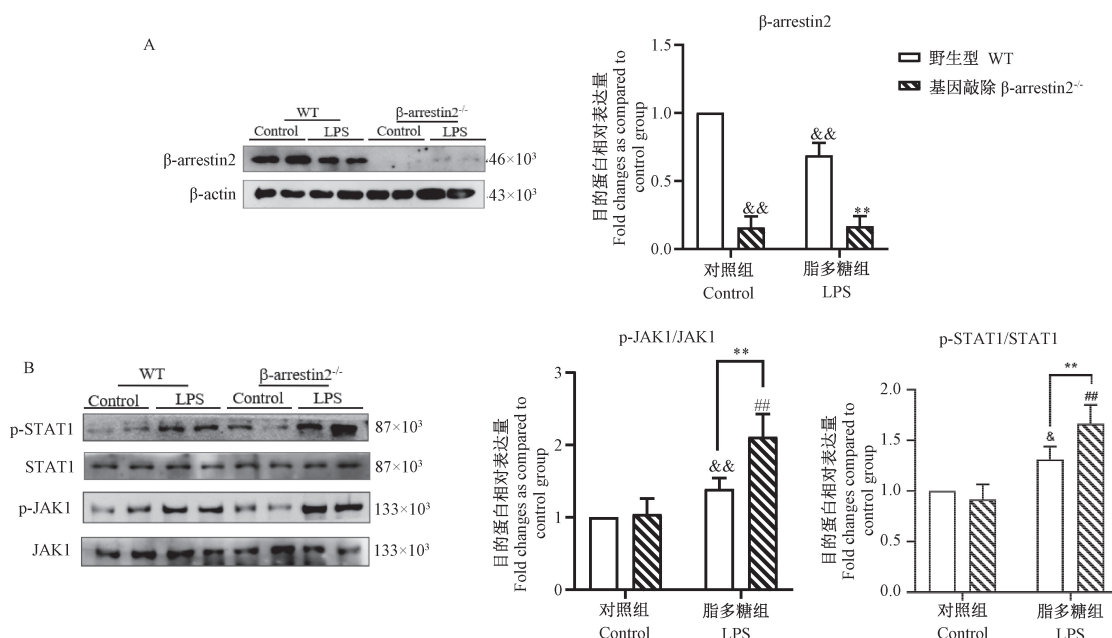


图 5  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对 pM $\phi$  分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的影响

Figure 5 Effects of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  by pM $\phi$



注: A: LPS 刺激后, WT 组和  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 组 pM $\phi$  中  $\beta$ -arrestin2 的表达变化; B: LPS 刺激后, WT 组和  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> 组 pM $\phi$  中 p-JAK1、p-STAT1 的表达变化。

图 6  $\beta$ -arrestin2 基因敲除对小鼠 pM $\phi$  中 JAK1/STAT1 通路基因变化的影响

Note. A. The expression of  $\beta$ -arrestin2 in WT group and  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> group under LPS stimulation. B. The expression of p-JAK1 and p-STAT1 in WT group and  $\beta$ -arrestin2<sup>-/-</sup> group under LPS stimulation.

Figure 6 Effects of  $\beta$ -arrestin2 deficiency on the expression changes of JAK1/STAT1 pathway in pM $\phi$

### 3 讨论

巨噬细胞是固有免疫系统的重要组成部分,在炎症、防御、修复、代谢等生理过程中至关重要<sup>[9]</sup>。迄今为止,最常见的巨噬细胞来源是骨髓、脾和腹腔。从腹腔中分离的 pM $\phi$  是进行体外模拟炎症刺激、细胞信号检测、吞噬作用、毒理学等研究常用的巨噬细胞来源<sup>[10]</sup>。越来越多的研究表明,pM $\phi$  的免疫及炎症反应与各种炎症性疾病和癌症的致病过程密切相关<sup>[11-12]</sup>。这些研究提示,研究 pM $\phi$  的功能调控,不仅有利于深入探讨固有免疫应答的具体机制,对于相关腹腔器官炎症性疾病乃至全身感染性疾病的治疗也具有重要意义。

$\beta$ -arrestin2 作为细胞中重要的接头蛋白和信号转导调控蛋白,与多种疾病的发生、发展存在联系,如内分泌疾病、肿瘤和纤维化疾病等<sup>[13]</sup>。已有研究发现  $\beta$ -arrestin2 在脾和白细胞中高度表达,提示其在调节免疫系统功能方面可能具有重要作用<sup>[14]</sup>。目前陆续有研究报道  $\beta$ -arrestin2 参与 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞的功能调节<sup>[15]</sup>。因此,本实验选择了小鼠 pM $\phi$  作为研究对象,采用体外细胞培养的方法,观察了  $\beta$ -arrestin2 对 pM $\phi$  功能的调节作用。本研究发现在 LPS 的刺激下,WT 小鼠的 pM $\phi$  中  $\beta$ -arrestin2 的表达水平明显下降,提示  $\beta$ -arrestin2 可能与 pM $\phi$  的功能调控有关。巨噬细胞的迁移是其发挥生物学功能的过程中必不可少的环节之一,经 LPS 刺激活化后的巨噬细胞的迁移能力明显增强,会迅速募集到炎症感染部位,从而参与机体的炎症免疫反应<sup>[16]</sup>。 $\beta$ -arrestin2 作为一种支架蛋白,在介导细胞肌动蛋白骨架重排,调节各类免疫细胞迁移过程中具有重要影响,研究表明, $\beta$ -arrestin2 基因敲除后,Th2 细胞的迁移能力明显降低<sup>[17]</sup>;此外,在缺失  $\beta$ -arrestin2 基因的淋巴细胞中,T、B 细胞的迁移能力也明显降低<sup>[18]</sup>。那么, $\beta$ -arrestin2 对 pM $\phi$  的迁移能力是否有影响呢?本研究 Transwell 实验发现, $\beta$ -arrestin2 基因敲除可以明显降低 pM $\phi$  的迁移能力。吞噬功能也是检测巨噬细胞功能的重要指标,活化的巨噬细胞不仅可以分泌特定的细胞因子参与机体的炎症反应,其吞噬功能也进一步增强,在机体的非特异性免疫应答中起到重要作用<sup>[19]</sup>。我们采用中性红实验观察了  $\beta$ -arrestin2 对 pM $\phi$  的吞噬功能的影响,研究发现, $\beta$ -arrestin2 基因敲除可以明显提升 pM $\phi$  的吞噬功能。细胞因子的合成和分泌是反映巨噬细胞极化的重要标志,巨噬细胞极化后可合成和分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子,参与固有免疫及适应性免疫应

答的启动<sup>[20]</sup>。本研究表明  $\beta$ -arrestin2 基因敲除后,LPS 诱导的 M1 型巨噬细胞极化相关分子 CD86 的表达也明显增加,同时 pM $\phi$  释放的炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平也明显上升。这些结果表明  $\beta$ -arrestin2 可能还参与了 pM $\phi$  分泌炎症因子和极化的调控过程。

大量研究表明,JAK/STAT 在多种炎症因子刺激下激活,进而发挥信号转导和转录调控作用,影响巨噬细胞的免疫功能<sup>[21]</sup>。已有研究表明,抑制 JAK1/STAT1 信号通路的激活,可以下调巨噬细胞表面吞噬受体的表达,从而显著抑制人源单核细胞株 THP-1 诱导成的巨噬细胞的吞噬功能<sup>[22]</sup>。此外,在体外 LPS 诱导的炎症模型中,JAK1 和 STAT1 的磷酸化程度明显升高,从而促进了 RAW264.7 巨噬细胞向 M1 型的极化<sup>[23]</sup>;另有文献报道,在 LPS 诱导的内毒素休克模型中,与 WT 小鼠相比,STAT1 基因缺失的小鼠具有明显的抵抗性,M1 型巨噬细胞极化和炎症分子的分泌程度也明显降低<sup>[24]</sup>。在急性结肠炎中,选择性抑制 JAK1 的活性可以显著抑制骨髓源性巨噬细胞中 STAT1 的信号转导和 M1 型巨噬细胞的极化程度<sup>[25]</sup>。提示 JAK1/STAT1 通路是调控巨噬细胞极化的关键性通路之一。另有研究表明,在体外用 LPS 诱导建立小胶质细胞活化模型, $\beta$ -arrestin2 高表达后能明显抑制 STAT1 信号通路的活化,同时,下调  $\beta$ -arrestin2 在骨髓源性巨噬细胞的表达,可以促进 STAT1 信号通路的激活<sup>[26-27]</sup>。那么在 pM $\phi$  中, $\beta$ -arrestin2 是否通过影响 JAK1/STAT1 信号通路参与调控 pM $\phi$  的功能呢?本研究通过 Western Blot 检测发现,与 WT 组相比, $\beta$ -arrestin2 基因敲除后可以增强 JAK1 和 STAT1 的磷酸化程度,提示  $\beta$ -arrestin2 敲除可以促进 pM $\phi$  中 JAK1/STAT1 信号通路的激活。

综上所述,本研究发现了  $\beta$ -arrestin2 基因敲除后,pM $\phi$  的迁移能力、吞噬功能、炎症细胞因子的释放以及极化能力明显发生改变,提示  $\beta$ -arrestin2 可能参与了 pM $\phi$  功能的调控过程,其作用可能是通过调控 JAK1/STAT1 信号通路来实现的。这一发现为今后深入探讨  $\beta$ -arrestin2 在巨噬细胞功能中的发挥的作用,以及相关临床疾病的机制探究提供了重要的实验依据。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15: 123-147.
- [2] 仰明明, 牛婷, 刘擎, 等. MMP12 缺失引起小鼠血液和白色脂肪中巨噬细胞的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29 (3): 14-20.

- Yang MM, Niu T, Liu Q, et al. Matrix metalloproteinase-12 knockout regulates macrophages in the blood and white fat in mice [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(3): 14-20.
- [ 3 ] 张慧琴, 霍乃蕊, 冀霞, 等. 羊骨胶原肽对大鼠腹腔巨噬细胞免疫能力的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(2): 176-182.
- Zhang HQ, Huo NR, Ji X, et al. Effect of sheep bone collagen peptide on immune function in rat peritoneal macrophages [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(2): 176-182.
- [ 4 ] Liu T, Liu F, Peng LW, et al. The peritoneal macrophages in inflammatory diseases and abdominal cancers [J]. *Oncol Res*, 2018, 26(5): 817-826.
- [ 5 ] Peterson YK, Luttrell LM. The diverse roles of arrestin scaffolds in G protein-coupled receptor signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(3): 256-297.
- [ 6 ] Sun WY, Gu YJ, Li XR, et al.  $\beta$ -arrestin2 deficiency protects against hepatic fibrosis in mice and prevents synthesis of extracellular matrix [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 389.
- [ 7 ] 孙妩弋, 孙家昌, 厉歆然, 等. Arrb2 基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(6): 878-881.
- Sun WY, Sun JC, Li XR, et al. Breeding and genotype identification of Arrb2 gene knockout mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, 34(6): 878-881.
- [ 8 ] 耿田欣, 臧光耀, 严金川. 3% 巯基乙酸盐肉汤诱导法高效提取小鼠腹腔巨噬细胞 [J]. *江苏大学学报 (医学版)*, 2019, 29(1): 45-48, 53.
- Geng TX, Zang GY, Yan JC. Efficient extraction of primary peritoneal macrophages in mice induced by 3% thioglycollate broth [J]. *J Jiangsu Univ (Med Ed)*, 2019, 29(1): 45-48, 53.
- [ 9 ] Xu HT, Lee CW, Li MY, et al. The shift in macrophages polarisation after tendon injury: A systematic review [J]. *J Orthop Translat*, 2019, 21: 24-34.
- [ 10 ] Roohani S, Tacke F. Liver injury and the macrophage issue: molecular and mechanistic facts and their clinical relevance [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7249.
- [ 11 ] 杨晓, 陈冲. 小鼠腹腔巨噬细胞亚群对病毒拟似物 Poly I:C 的免疫应答效应比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 16-22.
- Yang X, Chen C. Comparison of immune responses induced by poly (I:C) in mouse peritoneal macrophage subsets [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(11): 16-22.
- [ 12 ] Cassado AA, D'Imperio LM, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 225.
- [ 13 ] Wang W, Li X, Zheng D, et al. Dynamic changes of peritoneal macrophages and subpopulations during ulcerative colitis to metastasis of colorectal carcinoma in a mouse model [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(7): 669-680.
- [ 14 ] Du JJ, Sun JC, Li N, et al.  $\beta$ -Arrestin2 deficiency attenuates oxidative stress in mouse hepatic fibrosis through modulation of NOX4 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(7): 1090-1100.
- [ 15 ] Li H, Smalligan DA, Xie N, et al.  $\beta$ -arrestin 2-mediated immune suppression induced by chronic stress [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2011, 18(3): 142-149.
- [ 16 ] Li J, Li C, Zhuang Q, et al. The evolving roles of macrophages in organ transplantation [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 5763430.
- [ 17 ] Lin R, Choi YH, Zidar DA, et al.  $\beta$ -Arrestin-2-dependent signaling promotes CCR4-mediated chemotaxis of murine T-helper type 2 cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(6): 745-755.
- [ 18 ] Fong AM, Premont RT, Richardson RM, et al. Defective lymphocyte chemotaxis in  $\beta$ -arrestin2- and GRK6-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(11): 7478-7483.
- [ 19 ] Chauhan AK, Jakhar R, Paul S, et al. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(2): 340-346.
- [ 20 ] 姜文清, 戚艳, 沙若荷, 等. PTEN 在多烯磷脂酰胆碱下调 LPS 诱导巨噬细胞炎症反应中的抑制作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(8): 44-49.
- Jiang WQ, Qi Y, Sha RH, et al. Inhibitory effect of PTEN on polyene phosphatidylcholine in downregulating LPS-induced macrophage inflammatory response [J]. *Chin J Comp Med*, 2019, 29(8): 44-49.
- [ 21 ] Wang A, Singh K, Ibrahim W, et al. The promise of JAK inhibitors for treatment of sarcoidosis and other inflammatory disorders with macrophage activation: a review of the literature [J]. *Yale J Biol Med*, 2020, 93(1): 187-195.
- [ 22 ] Lei Q, Li L, Huang W, et al. HEV ORF3 downregulates CD14 and CD64 to impair macrophages phagocytosis through inhibiting JAK/STAT pathway [J]. *J Med Virol*, 2019, 91(6): 1112-1119.
- [ 23 ] 孙颖, 刘玲, 施晓艳, 等. 丹皮酚通过下调 mir-155/JAK1-STAT1 通路抑制巨噬细胞 M1 极化 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(9): 2158-2164.
- Sun Y, Liu L, Shi XY, et al. Paeonol inhibits macrophage M1 polarization by down-regulating mir-155/JAK1-STAT1 pathway [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2020, 45(9): 2158-2164.
- [ 24 ] Luu K, Greenhill CJ, Majoros A, et al. STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92(9): 761-769.
- [ 25 ] Kim TW, Shin JS, Chung KS, et al. Anti-inflammatory mechanisms of Koreanaside A, a lignan isolated from the flower of forsythia koreana, against LPS-induced macrophage activation and DSS-induced colitis mice: the crucial role of AP-1, NF- $\kappa$ B, and JAK/STAT signaling [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1163.
- [ 26 ] 蒋庆玲.  $\beta$ -Arrestins 对小胶质细胞极化的调节在帕金森病发生中的作用及其机制研究 [D]. 南京: 南京医科大学; 2019.
- Jiang QL.  $\beta$ -Arrestins-orchestrated microglia polarization and their potential roles in the pathogenesis of Parkinson disease [D]. Nanjing: Nanjing Medical University; 2019.
- [ 27 ] Tang Y, Shi Y, Gao Y, et al. Oxytocin system alleviates intestinal inflammation by regulating macrophages polarization in experimental colitis [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(18): 1977-1992.

[收稿日期] 2021-08-09