

· 论 著 ·

基于 RNA 测序探究发热对巨噬细胞吞噬沙门菌极化状态的影响

戴婷婷, 马雪寒, 詹晔斐, 许兆军

【摘要】目的 基于高通量 RNA 测序技术探究温度对吞噬伤寒沙门菌巨噬细胞极化的影响。**方法** 制备 37、38、39、40 °C 4 种温度条件下巨噬细胞感染伤寒沙门菌模型, RNA 测序分析各温度条件下感染伤寒沙门菌组和未感染伤寒沙门菌组的共同差异表达基因, 对巨噬细胞 M1、M2 极化相关基因进行转录分析和趋势分析。**结果** 分析得到 1 256 条共同上调基因, 1 231 条共同下调基因, 将其中与巨噬细胞 M1、M2 极化相关基因进行转录分析和趋势分析后, 发现随温度升高(低于 39 °C), 巨噬细胞向 M1 极化能力逐渐增强, 温度继续升高(40 °C), 其向 M1 极化能力逐渐衰减; 与此同时, 随温度升高, 巨噬细胞向 M2 极化的能力也逐渐增强。**结论** 适当的发热有利于巨噬细胞 M1 极化, 而温度过高则会诱导巨噬细胞提前向易产生免疫逃逸的 M2 极化。

【关键词】 RNA 测序; 巨噬细胞极化; 沙门菌; 发热

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.03.003

【中图分类号】 R364.6 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)03-0288-06

Exploration on the impact of fever on polarization of macrophage infected with Salmonella based on RNA-sequencing
DAI Tingting, MA Xuehan, ZHAN Yefei, XU Zhaojun (Ningbo University Health Science Center, Ningbo 315211, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To investigate the impact of temperature on polarization of macrophage infected with Salmonella based on the high-through RNA-sequencing technique. **Methods** The model of macrophage infected with Salmonella was established under different temperature conditions including 37°C, 38°C, 39°C and 40°C. RNA sequencing was used to analyze the common differentially expressed genes between the Salmonella typhi infected and non Salmonella typhi infected groups under various temperature conditions. Transcription analysis and trend analysis were performed on the polarization related genes of macrophages M1 and M2. **Results** One thousand two hundred and fifty six up-regulated and 1231 down-regulated co-expression genes were obtained by RNA-sequencing, and the genes related to M1 or M2 polarization of macrophage were analyzed by transcription level and trend analysis; then, it was found that the increase of temperature to a degree less than 39°C promoted the macrophage polarization to M1. However, M1 polarization of macrophage attenuates from 39°C to 40°C. Meanwhile, the increased temperature enhanced the polarization of macrophage to M2 state. **Conclusions** Proper fever favors the polarization of macrophage to M1 state, while extreme temperature induces macrophage polarization earlier to M2 state that is prone to immune evasion.

【Key words】 RNA-sequencing; Macrophage polarization; Salmonella; Fever

[Modern Practical Medicine, 2024, 36(3):288-293]

伤寒是由伤寒沙门菌引起的全身性感染性疾病, 包括持续性高热(40 ~ 41 °C)、特殊中毒面容及皮肤玫瑰疹等多种临床表现, 其中持续性高热(稽留热)为其重要的表现之一^[1]。伤寒沙门菌通过污染的

食物到达小肠, 穿过肠黏膜进入肠系膜淋巴结, 并进入血液、肝、脾和骨髓中, 被巨噬细胞吞噬并大量繁殖。伤寒沙门菌感染巨噬细胞初期, 细胞向 M1 型分化, 导致以 M1 型为特征的多种细胞因子转录水平改变, 对机体启动急性感染期的炎症发应和清除病原菌具有重要作用, 但过度的 M1 型巨噬细胞反应会引发炎症瀑布, 导致败血症^[2]。在感染后期, 巨噬细胞由 M1 型转变为以免疫修复和调节为主的 M2 型。引起慢性感染的细胞内细菌也可诱导巨噬细胞

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY19H190001); 宁波市医学重点扶植学科(2022-F16)

作者单位: 315211 宁波, 宁波大学医学部(戴婷婷); 宁波市第二人民医院(马雪寒、詹晔斐、许兆军)

通信作者: 许兆军, Email: zhaojunxu168@163.com

提前向 M2 型分化,从而逃避机体的免疫反应^[3-4]。伤寒患者发热时体内感染沙门菌的巨噬细胞其极化状态如何改变,一直以来并不清楚。因此本研究通过高通量 RNA 测序技术探究发热温度对吞噬伤寒沙门菌的巨噬细胞极化的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 材料 小鼠单核-巨噬细胞株(J774A.1)购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,鼠伤寒沙门菌[CMCC(B)50071]由宁波市疾病预防控制中心病原微生物实验室赠送。

1.2 巨噬细胞处理 在 37、38、39 和 40 °C 4 种温度条件下制备巨噬细胞感染和未感染伤寒沙门菌的模型,共得到 8 组分别为 M37、M37CK、M38、M38CK、M39、M39CK、M40 和 M40CK,其中 CK 为对照组。伤寒沙门菌培养和荧光标记:采用营养肉汤震荡培养至对数期,用 PBS(pH 值 7.2)制备 1×10^8 /ml 菌悬液。将一定细菌浓度的菌悬液与 CFDA-SE 染料溶液混合一定时间后,洗掉未结合的 CFDA-SE,在荧光显微镜下观察可明显看见细菌发出绿色荧光。单核-巨噬细胞培养并感染伤寒沙门菌:以 100:1 的感染复数将荧光标记的对数期伤寒沙门菌加入单核-巨噬细胞培养液中,110 g 离心 5 min 以促进细胞和细菌接触,分别选择 37 ~ 40 °C 4 个温度共孵育 30 min,再用预温(与培养温度一致,下同)的 PBS 洗涤 2 次,随后换成含 100 μ g/ml 庆大霉素细胞培养液孵育 1 h 以去除细胞外细菌,最后换成含 10 μ g/ml 庆大霉素细胞培养液,培养 2 h。巨噬细胞吞噬沙门菌率的检测采用 Dx-FLEX 流式细胞仪(美国 BeckmanCoulter)进行,并使用 CytExpert 流式细胞处理软件操作分析。

1.3 RNA 文库构建 采用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)依照说明书提取总 RNA,使用 NanoDrop 2000 核酸蛋白质分析仪(美国 Thermo Scien-

tific 公司)测定总 RNA 的质量和浓度,使用 Agilent 2100 生物分析仪(美国安捷伦公司)评估 RNA 完整性,使用 VAHTS Universal V5 RNA-seq Library Prep 试剂盒依照说明书构建转录组文库。

1.4 RNA 测序和差异表达基因分析 采用 Illumina Novaseq 6000 测序平台对文库进行测序,并生成 150 bp 双端读序。采用 fastp 软件对 fastq 格式的原始读序进行处理,去除低质量读序后获得高质量读序用于后续数据分析。使用 HISAT2 软件进行参考基因组比对,并进行基因表达量(FPKM)计算,通过 HTSeq-count 获得每个基因的读序计数。利用 DESeq2 软件进行差异表达基因分析,其中符合 q 值 < 0.05 且 $|\log_2\text{FC}| > 1$ 阈值的基因被定义为差异表达基因(DEGs)。

1.5 共同差异表达基因分析 利用韦恩图找出不同温度条件下共同表达的差异基因,分为上调和下调。

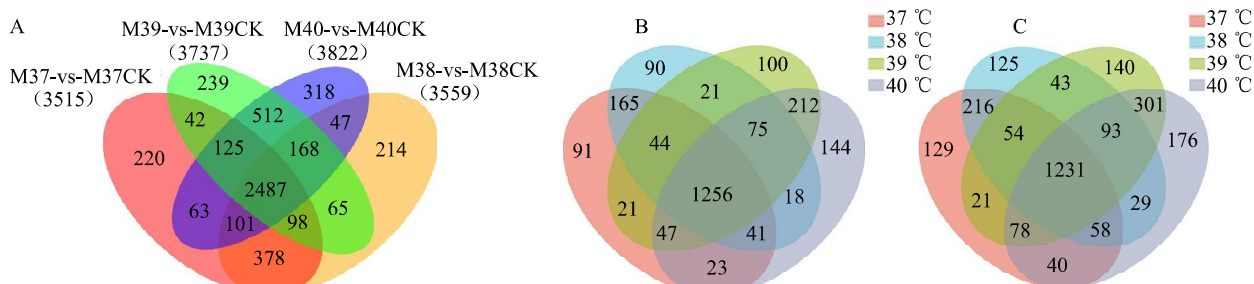
1.6 巨噬细胞 M1、M2 极化相关基因转录分析和趋势分析 利用欧易云平台转录热图和趋势分析工具,对巨噬细胞 M1、M2 极化相关基因进行转录水平热图分析和趋势分析。

2 结果

2.1 共同差异表达基因分析 通过不同温度处理获得各温度条件下的共同差异表达基因 2487 条,利用韦恩图找出 1256 条共同上调基因,1231 条共同下调基因,见图 1。

2.2 M1 和 M2 极化相关基因的转录分析 将共同上调基因按温度上升作出其转录水平变化的热图,存在三簇基因对温度的处理呈现规律变化,基因簇 I 随温度升高表达水平逐渐下调,而与之相反,基因簇 II 和基因簇 III 随温度升高表达逐渐升高,见图 2。

将这些基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,基因簇 I 基因参与凋亡、模式识别受体信号通路、NF- κ B 信号正向调控、免疫反应等过程,KEGG 分析中主要参与肿瘤坏死因子(TNF)通路、Toll 样受体信号通路

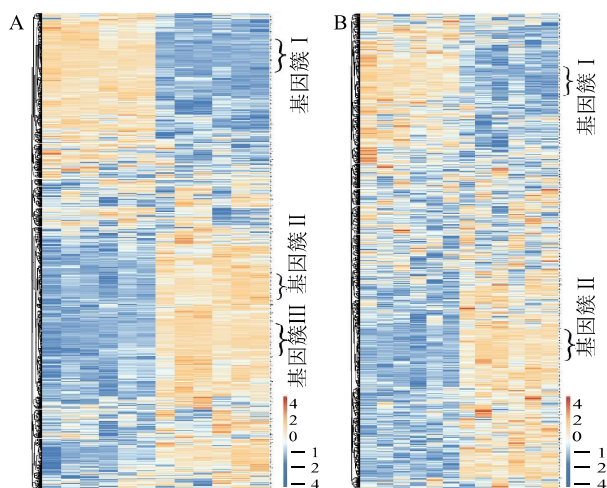


注:A 为对差异表达基因进行共表达分析的韦恩图,其中 2487 条基因是所有温度条件下共同差异表达的基因;B 为共同上调基因,C 为共同下调基因

图 1 差异表达基因的共表达分析

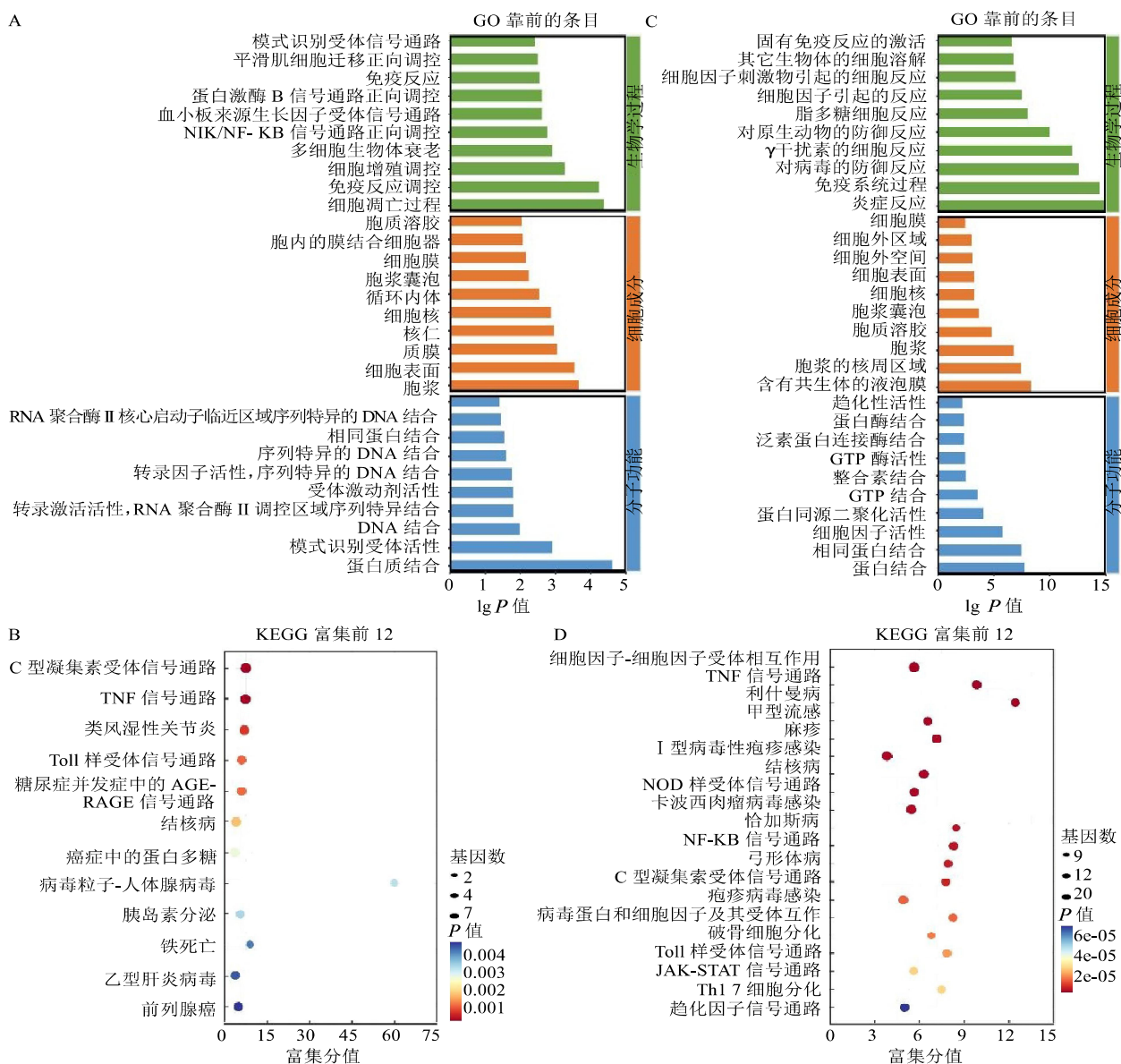
等过程。基因簇 II 和基因簇 III 则参与炎症反应、免疫系统过程、抗病毒防御反应、干扰素 IFN- γ 细胞反应和对 LPS 的细胞反应等与促炎反应相关的生物学过程。而 KEGG 富集显示这些基因参与调控细胞因子-细胞因子受体相互作用、TNF 信号通路、NOD 样受体信号通路、NF- κ B 信号通路和 JAK-STAT 通路等与 M1 极化相关的信号通路过程, 见图 3。

与共同上调基因不同, 共同下调基因中基因簇 I 基因参与 IL-6 的负调控过程、B 细胞的增殖等过程, 但主要参与固醇和胆固醇等生物合成及脂质代谢过程。KEGG 富集分析主要有 HIF-1 缺氧信号通路、脂肪酸代谢与合成信号通路, 此外还包括 B 细胞受体信号通路、Fc γ R 介导的巨噬细胞吞噬过程。



注: A 为共同上调基因, B 为共同下调基因

图 2 不同温度条件共同上调和下调基因的转录热图



注: A 和 B 为基因簇 I 基因的 GO 和 KEGG 分析, C 和 D 为基因簇 II 和基因簇 III 基因的 GO 和 KEGG 分析

图 3 共同上调基因基因簇基因 GO 和 KEGG 分析

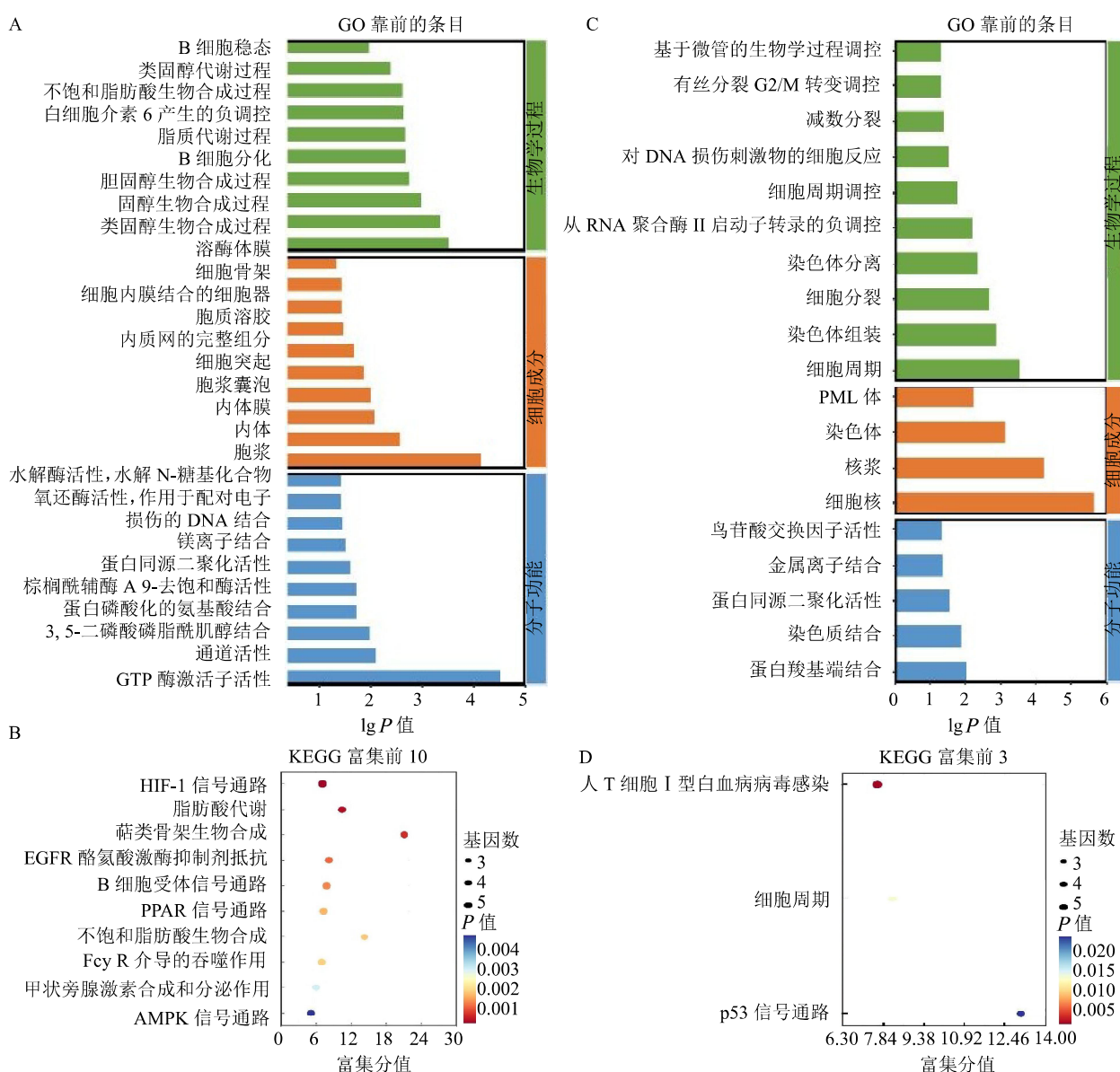
而基因簇 II 基因簇则主要参与细胞周期、细胞分裂、染色体分离和组装以及 DNA 损伤的细胞反应等过程,见图 4。

通过将促进巨噬细胞向 M1 极化的信号通路组分以及下游标志性分子与以上基因簇比对,发现与 M1 极化有关的大多数基因都在共同上调基因的基因簇 II 和基因簇 III 中富集,只有少数的基因在基因簇 I 富集,将这些基因作转录水平随温度升高的热图,见图 5A,除少数基因包括 TNF- α 、IRF1 和 CD80/CD86 外随温度升高呈先升高后逐渐下降或持续下降趋势,绝大多数基因随温度升高均逐渐上调,包括 JAK-STAT1/2 信号通路组分、干扰素调节因子 IRF9、诱导

型一氧化氮合酶 Nos2、细胞因子 IL-12b 和趋化因子 CCL-5、CXCL-9 和 CXCL-16。

IL-4/IL-13-JAK1/JAK3-STAT6 信号通路、IL-10-STAT3-TGF β /IL-1Ra/Arg1 和 JMJD3-IRF4 通路可诱导巨噬细胞 M2 极化,并抑制 M1 极化。通过对比分析发现大多数 M2 极化相关基因存在于共同上调基因中,而且大多数存在于基因簇 II 和基因簇 III 中,绘制转录水平热图,见图 5B。

2.3 M1 和 M2 极化相关基因的趋势分析 M1 极化相关基因表达水平随温度升高(低于 39℃)而逐渐升高,39 ~ 40℃,其总体表达水平不再改变,且部分基因发生下调。与 M2 极化相关的基因表达水平随



注:A 和 B 为基因簇 I 基因的 GO 和 KEGG 分析,C 和 D 为基因簇 II 的 GO 和 KEGG 分析

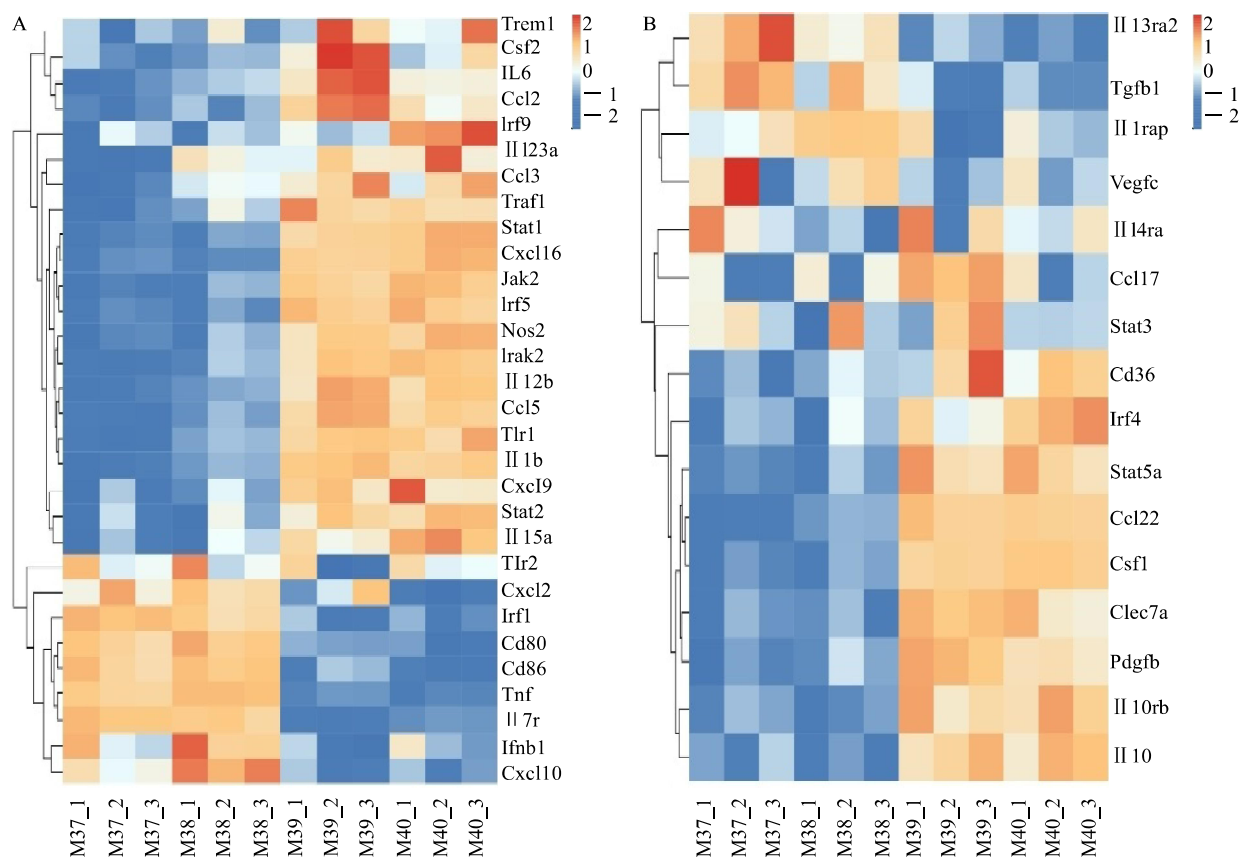
图 4 共同下调基因簇基因 GO 和 KEGG 分析

温度升高而逐渐升高(39℃),40℃时不再增加,见图6。

3 讨论

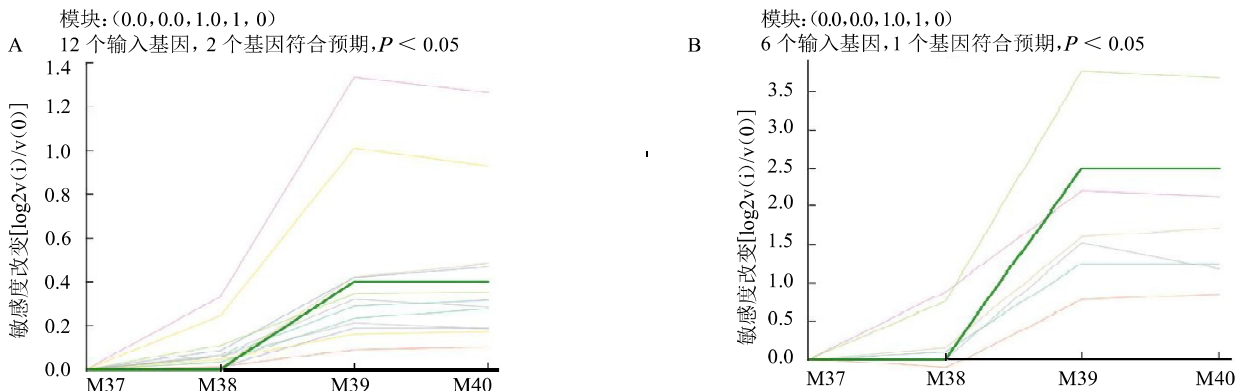
伤寒是沙门菌感染引起的一种全身性疾病,巨噬细胞一方面在清除病原体和特异性免疫应答中发挥不可或缺的作用,但也容易成为沙门菌免疫逃逸和繁殖的场所。伤寒患者伴随严重的发热症状,目前尚不清楚发热对于巨噬细胞极化的影响,探究温度影响巨噬细胞极化状态的调控机理,对于认识和处置伤寒热具有重要意义。

本研究通过体外感染沙门菌的小鼠单核巨噬细胞,利用不同温度处理模拟体内发热状态,发现沙门菌的感染均会诱导各温度条件下的巨噬细胞向 M1 状态极化,且随着温度升高(低于 39℃),大多数与 M1 极化相关的基因转录水平逐渐升高,而温度继续升高(40℃),这些基因不再发生上调,且少数发生下调。此外,温度升高的同时,也会逐渐诱导与 M2 极化相关基因的表达。因此,适当的发热(低于 39℃)有利于巨噬细胞发挥病原体清除的能力,而温度过高则可能造成巨噬细胞过早向 M2



注:A 为 M1 极化相关基因,B 为 M2 极化相关基因

图5 与激活巨噬细胞 M1 和 M2 极化相关的基因变化热图



注:A 表示与 M1 极化相关的基因,B 表示与 M2 极化相关基因

图6 与 M1 和 M2 极化相关基因的显著模块趋势图

极化,抑制巨噬细胞的促炎功能。

以往研究发现,巨噬细胞极化为 M1 状态时,会分泌 TNF,作为标志性分子发挥杀伤细菌功能^[5];同时上调细胞表面共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达,促进与 T 细胞的接触并使之活化^[6]。在沙门菌感染巨噬细胞早期,TNF- α 信号通路也会被激活,促进巨噬细胞向 M1 极化,发挥促炎功能^[7]。本研究表明,较低发热温度(37 ~ 38 °C)下沙门菌感染早期,TNF 表达量较未感染组升高,这与之前的研究一致。但随温度继续升高,其表达量开始下降,提示巨噬细胞 M1 极化被抑制。许多微生物都有利用巨噬细胞极化过程实现免疫逃逸的能力^[8],其中沙门菌能够诱导巨噬细胞向 M2 极化,王耀楠等^[9]发现肠炎沙门菌能够通过促进 PKM2-JAK2-STAT3-IL10 通路诱导巨噬细胞 M2 型极化,同时鼠沙门菌能够拮抗 TNF- α 通路而促进巨噬细胞向 M2 极化。本研究中过高的发热温度(39 ~ 40 °C)使 TNF 转录水平下降,表明沙门菌可能通过拮抗 TNF- α 通路而促进巨噬细胞 M2 极化,从而逃逸免疫杀伤,这与以往的研究一致。此外,巨噬细胞作为一种抗原递呈细胞,其表面的 CD80/CD86 共刺激分子是 M1 极化的标志性分子。本研究结果显示随发热温度上升,也呈现出先升高后降低的趋势,与 TNF 的变化相似。以上结果表明,不同的发热温度能够激活或抑制巨噬细胞极化信号通路,从而导致不同的巨噬细胞分化命运,而这一过程是否是沙门菌所独有的,则需要更多的证据支撑。

在伤寒感染过程中,临床上对如何处置发热症状存在一定的争议。对一些侵袭性细菌感染,发热一般有利于清除病原菌,抑制细菌生长^[10],也可以诱导淋巴器官中淋巴细胞动员,特别是 IL-6 活化,增强免疫防御^[11],同时也能增强 I 型干扰素反应,促进杀菌功能^[12]。但在目前医疗实践中,即使在程度较低的发热状态下,也常常进行退热干预治疗。但在小鼠脓毒症模型中,发热未干预组比发热干预组可以获得更好的呼吸功能、较低的血乳酸浓度和更长的生存期^[13]。临床上存在着“最有利于疾病恢复的发热温度”等疑问^[14]。因此,正确对待和处置发热有重要的临床意义。本研究初步发现,对于鼠沙门菌感染巨噬细胞模型,较低的发热温度有利于巨噬细胞 M1 极化,发挥杀菌能力,而温度过高则可能诱导巨噬细胞 M2 极化,使沙门菌发生免疫逃逸。这些进

一步为临床上如何处理发热症状提供有益的参考。

致谢 感谢宁波市第二医院医学实验部对本研究的支持

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 戴婷婷:数据整理、论文撰写;马雪寒:数据分析、论文修改;詹晔斐:实验操作、论文修改;许兆军:实验设计、研究指导、经费支持

参 考 文 献

- [1] STANAWAY J D, REINER R C, BLACKER B F, et al. The global burden of typhoid and paratyphoid fevers: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. *Lancet Infect Dis*, 2019, 19(4): 369-381.
- [2] PARISI L, GINI E, BACI D, et al. Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases: Killers or builders[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 8917804.
- [3] PHAM T H M, BREWER S M, THURSTON T, et al. Salmonella-driven polarization of granuloma macrophages antagonizes TNF-mediated pathogen restriction during persistent infection[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(1): 54-67.e5.
- [4] HU L, LIU Y, KONG X, et al. *Fusobacterium nucleatum* Facilitates M2 Macrophage Polarization and Colorectal Carcinoma Progression by Activating TLR4/NF- κ B/S100A9 Cascade[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 658681.
- [5] MUÑOZ J, AKHAVAN N S, MULLINS A P, et al. Macrophage polarization and osteoporosis: a review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(10):2999.
- [6] CUTOLO M, CAMPITIELLO R, GOTELLI E, et al. The role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867260.
- [7] WU X, WANG Z, SHI J, et al. Macrophage polarization toward M1 phenotype through NF- κ B signaling in patients with Behcet's disease[J]. *Arthritis Res Ther*, 2022, 24(1): 1-12.
- [8] THIRIOT J D, MARTINEZ-MARTINEZ Y B, ENDSLEY J J, et al. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens[J]. *Pathog Dis*, 2020, 78(1): ftaa009.
- [9] 王耀楠.肠炎沙门菌 SpiC 蛋白调节巨噬细胞 M1 型极化及其分子机制[D].扬州:扬州大学,2022.
- [10] OSAWA E, MUSCHEL L H. Studies relating to the serum resistance of certain gram-negative bacteria[J]. *J Exp Med*, 1964, 119(1): 41-51.
- [11] EVANS S S, REPASKY E A, FISHER D T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(6): 335-349.
- [12] LANE W C, DUNN M D, GARDNER C L, et al. The efficacy of the interferon alpha/beta response versus arboviruses is temperature dependent[J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00535-18.
- [13] SU F, NGUYEN N D, WANG Z, et al. Fever control in septic shock: beneficial or harmful[J]. *Shock*, 2005, 23(6): 516-520.
- [14] DAI Y T, LU S H. What's missing for evidence-based fever management? Is fever beneficial or harmful to humans[J]. *Int J Nurs Stud*, 2012, 49(5): 505-507.

收稿日期:2023-10-15

(本文编辑:陈志翔)