

• 综述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.02.045

表观遗传调控在巨噬细胞极化中的研究进展^{*}

王捷敏 综述,王胜军[△]审校

(江苏大学检验医学研究所,江苏镇江 212013)

关键词:巨噬细胞; 极化; 表观遗传学

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)02-0277-04

巨噬细胞作为一种异质性固有免疫细胞,具有极其重要的理论研究和临床应用前景。近年来,表观遗传调控巨噬细胞极化成为学者们改造巨噬细胞来治疗感染与炎症的研究方向。表观遗传是指 DNA 序列不存在改变,而基因表达发生可遗传的改变,如 DNA 甲基化,组蛋白修饰,非编码 RNA 调控等表观修饰方式单独或联合作用以影响基因表达与维持。表观遗传参与许多生物进程的调控,包括肿瘤发生、发展,免疫细胞分化发育等。和 T 细胞分化发育一样,巨噬细胞在一些关键转录因子及信号途径的作用下,由前体细胞分化并活化为不同极化状态的亚型。该过程伴随着大量炎症及表型相关基因的表达或抑制^[1],同时,基因组的表观遗传修饰状态也存在动态改变。目前发现,多种表观修饰酶影响巨噬细胞极化状态,但对于其为何能作用于巨噬细胞以及详细机制仍然有待深入研究。本文针对巨噬细胞极化过程中表观修饰状态变化及其调控作用予以综述。

1 巨噬细胞的极化及其功能

科学家们根据巨噬细胞对不同细胞因子及微生物激活后的表型及功能状态对巨噬细胞进行了分类^[2]:由经典方式活化的巨噬细胞(CAM),又称 M1 型巨噬细胞,在诱导活化后产生大量促炎性物质如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-12 和 IL-1,主要参与对抗细菌、病毒感染;选择性活化的巨噬细胞(AAMs),也称 M2 型巨噬细胞,主要在一些非炎性因素刺激下产生,参与抗寄生虫感染、血管形成、组织重塑甚至肿瘤发展。根据刺激剂不同,M2 型巨噬细胞可进一步分为 M2a、M2b 和 M2c 3 个亚型。其中,由 IL-4 和 IL-13 诱导的巨噬细胞活化为 M2a,而 M2b 是在免疫复合物与 TLR 或 IL-1R 配体同时作用下诱导形成,IL-10 或糖皮质激素诱导巨噬细胞为 M2c 亚型。近年来,肿瘤微环境重要构成部分-M2 亚型也越来越引起研究者的注意。总之,巨噬细胞通过整合来自微生物、损伤组织或正常组织的不同信号分子,活化为不同功能亚型以适应或对抗外界环境,即极化是特定时间和环境中活化状态的总体估算。

然而巨噬细胞极化是一个连续性的过程,典型的 M1 和 M2 型极化只是简化的两种极端功能状态,而且越来越多的研究发现该过程受到由转录因子和表观遗传修饰交织形成的复杂网络调控。

2 表观遗传学

2.1 DNA 甲基化 作为最常见的表观遗传修饰方式,DNA 甲基化在基因表达沉默过程扮演重要角色。比如,经一系列 DNA 甲基转移酶(DNMT)介导,CpG 双核苷酸中的胞嘧啶甲基化影响转录因子在此处的募集从而阻断某些基因的表达,改变细胞生命活动。

2.2 组蛋白修饰 与 DNA 甲基化常造成基因沉默不同,组蛋白甲基化位点及程度不同与染色质紧密或疏松状态都相关。一般来说,组蛋白 H3 的 N 端第 4 位(H3K4),第 36 位(H3K36)二甲基化或三甲基化与转录激活有关。相反,H3K9 的二甲基化或三甲基化,H3K27、H3K79 的三甲基化则是基因转录抑制标志。这些组蛋白甲基化水平是由组蛋白甲基转移酶(HMTs)以及去甲基化酶(HDMs)共同调节的。构成核小体的组蛋白通过甲基化、乙酰化及磷酸化等,特异性组合在一起构成“组蛋白密码”,通过改变染色质紧密结合或疏松状态变换转录因子的可接近性,导致转录抑制或活化,影响基因表达,改变细胞的表型及功能状态。因此,根据基因转录的促进或抑制作用将不同染色体组蛋白修饰粗略分为活化型与抑制型标记^[3]。

2.3 非编码 RNA 调控 随着基因组及转录组深度分析,曾被认为进化过程中累积的“垃圾序列”越来越多被发现是参与基因调控的非编码 RNA(分为短非编码 RNA 和长非编码 RNA 两类)。虽然非编码 RNA 对于巨噬细胞极化的调控机制大部分未知,到目前为止人们已发现不少非编码 RNA,尤其是 miRNA 参与巨噬细胞极化调控^[4]。GRAFF 等^[5]发现,巨噬细胞在受到外界刺激(如 LPS、IL-4)时,miRNAs 表达量会发生明显改变。相应的,过表达或抑制部分 miRNA 后,也会调控巨噬细胞极化进程。目前已确认的促进 M1 型巨噬细胞极化的 miRNA 有 miR-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31470881)。

[△] 通信作者,E-mail:sjwjs@ujs.edu.cn。

155、let-7c、miR-125a-5p, 相应的促进 M2 型的 miR-NA 有 miR-223、miR-124、miR-146 等, 本文不作分析。

3 巨噬细胞极化过程中的表观遗传现象

前体细胞分化为成熟巨噬细胞过程中需要许多转录因子协同作用, 其中转录因子 PU. 1 和 C/EBP α 的作用尤为重要。KAPELLOS 等^[6]研究发现, PU. 1 结合到巨噬细胞基因组 DNA 利于染色质稳定打开, 不仅能募集与巨噬细胞功能与表型相关的其他转录因子, 还被发现存在于基因组反式作用元件启动子与增强子区域, 这可能与启动子与增强子表观遗传修饰有关。巨噬细胞分化过程中整体基因组即已形成了转录因子与表观遗传双重调节网络, 其基因启动子与增强子上具有一定水平的组蛋白标记(分别为 H3K4me1 和 H3K4me3), 转录起始点(TSS)上游区域核小体被去除, 从而具有基础水平的转录^[7]。转录效率则由被募集的引导转录因子 JunB、IRF4 等决定。巨噬细胞接受刺激后引导转录因子招募其他转录因子如炎性相关转录因子核转录因子- κ B(NF- κ B)作出应答。成熟巨噬细胞极化表型相关的基因在巨噬细胞分化后存在不同“组蛋白密码”^[8]:(1)含抑制型标记 H3K9me3 和 H3K27me3, 缺乏活化型标记, 具有相对封闭的染色体构象, 这类基因能抵抗急性刺激的诱导。(2)处于“准备”状态, 具有活化型组蛋白标记如 H3K4me3、H3K9ac, 染色体构象部分打开, 而且某些基因 TSS 会预先结合 RNA 聚合酶 II。这类基因的转录可能受限于同时存在的抑制性组蛋白标记(如 H3K9me3 和 H3K27me3)及共抑制复合物, 需要活化额外组蛋白标记和依赖 ATP 的核小体重塑才能打开不完全闭合的染色体, 为转录因子提供全面亲和性。(3)某些基因具有活化型组蛋白标记的活化状态, 具有开放性染色体构象, 并且能持续转录。

3.1 干扰素(IFN)启动 M1 活化 IFNs 预处理可促使病原相关分子模式(PAMPs)或炎性细胞因子刺激后的巨噬细胞分泌更高水平的促炎因子, 达到 M1 全面活化。有报道称共生微生物诱导巨噬细胞产生基础水平 IFNs 信号, 维持其在“准备”状态, 在受到感染信号刺激后迅速作出强烈反应^[9]。现已明确 IFN 预处理后, IFN β 、IL-6 和 TNF 启动子活化型标志 H3K4me3 上调, 同时该区域附近 NF- κ B 亚单位 p65 和 pol II 也增多。有意思的是, 甲型流感病毒蛋白 NS1 能模拟含 H3K4 的多肽, 阻碍 IFNs 反应基因启动子活化性标志 H3K4me3 的阅读而使其沉默^[10]。因此, 表观修饰参与 IFN 启动的巨噬细胞促炎因子表达, 进而可能调控固有免疫反应。

3.2 Toll 样受体(TLRs)触发 M1 极化 TLRs 信号能活化巨噬细胞内 NF- κ B、干扰素调节因子(IRFs)、信号转导与转录激活因子(STAT1)途径, 引起下游炎症相关细胞因子及趋化因子表达, 如 TNF- α 、IL-1 β 、

IL-6、IL-12p40、CXC10, 形成 M1 型巨噬细胞。尽管这些基因活化机制不完全相同, 但是存在着类似的表观修饰方式。炎症相关细胞因子未接受 TLR 信号刺激时, 受抑制型组蛋白标志 H3K9me3、H3K27me3 或 H4K20me3 限制, 转录受限而处于“准备”状态。BCL6 及核受体募集共抑制复合物(含限制活化型组蛋白标记强度的 HDACs、HDMs)也可特异性对某些炎性细胞因子造成转录抑制^[11]。除组蛋白修饰, IL-12b、IL-6 等基因染色体可接近性还存在受限。TLR 触发活化后, 巨噬细胞这些表观“抑制闸”松开, BCL6 和共抑制复合物从基因座区域解除, 组蛋白去甲基酶 JMJD3、AOF1 和 PHF2 等同时被诱导表达, 去除抑制型组蛋白标记 H3K9me3、H3K27me3 和 H4K20me3。IL-6 和 IL-12b 等基因还需依赖 ATP 染色质重构复合物 BAF(也称 SWI 或 SNF)介导核小体重塑后方可诱导表达^[12]。这些表观重塑增加了活化型组蛋白标志 H4-Ac 和 H3K4me3 与增强子乙酰化程度, 有利于炎性转录因子(如 NF- κ B)募集, 促使转录延伸。因此, TLRs 信号诱导巨噬细胞 M1 极化的过程中, 下游炎性及表型分子转录受到多种表观修饰的动态调控, 然而目前 TLRs 将信号传送给染色体和组蛋白的详尽机制仍不清楚。

TLRs 诱导 M1 后, 炎性因子的表达在刺激持续一段时间后会恢复至基础水平, 甚至表达抗炎因子及 M2 标志性产物, 即转变为耐受状态。TLR 诱导的 ATF3、Hes1、IL-10 诱导的反馈抑制因子以及 NF- κ B 亚单元 p50 募集含 HDACs 及 HDMs 的共抑制复合物, 可能与这些炎性基因表达下调有关^[13-14]。有意思的是, 耐受可被 M1 极化因子 IFN- γ 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)延迟, 这与转录抑制因子如 Hes1 的表达抑制部分相关^[15]。此外有证据显示, 核小体重塑及组蛋白去乙酰化酶复合物(NURD)可使核小体构象变化, 阻碍转录因子及转录机器与基因座亲和, 造成基因表达抑制^[16]。不过与活化相比, 科学家们对基因表达的抑制了解相对较少。要明确参与该耐受过程的染色体重塑复合物详细作用机制还需进一步通过全基因组染色体状态分析。

3.3 巨噬细胞选择性极化 巨噬细胞在几丁质或寄生虫感染后, 可依赖组蛋白去甲基酶 JMJD3 选择性极化。由于 H3K27me3 与基因表达抑制相关, 科学家起初猜测 JMJD3 参与 M1 极化基因的表达, 然而 JMJD3 缺陷小鼠无论是 TLRs 信号刺激还是李斯特菌感染后, 炎性细胞因子表达都不受影响^[17]。相反, M-CSF 诱导 JMJD3 敲除小鼠 BMDC 时 M2 极化标志分子 Arg1、Ym1、Fizz、MR 和 IL-13 的表达显著缺陷, 表明 JMJD3 对于 M-CSF 诱导巨噬细胞 M2 基因表达是必需的。全基因组染色体免疫沉淀及高通量测序分析(ChIP-seq)表明 M2 基因并非由 JMJD3 直接作用产生。研究发现, 巨噬细胞几丁质或 M-CSF 诱导

的选择性极化中, JMJD3 通过去除促 M2 关键转录因子 IRF4 基因座上抑制型组蛋白标记 H3K27me3 促进 M2 选择性极化^[18]。除此之外, IL-4 诱导下 JMJD3 依赖于 STAT6 表达上调, 进而降低 M2 标志分子 H3K27 甲基化程度, 引起转录激活^[19]。然而, JMJD3 缺陷的 BMMC 在 IL-4 诱导下仍具有选择性极化能力, 这表明巨噬细胞还存在不依赖 JMJD3 的其他方式向 M2 极化。当然, 这些试验结果不完全相同也可能是试验培养条件及方法灵敏度不同造成。因此, JMJD3 主要参与 M2 选择性极化, 而在 M1 极化中作用较弱。另外, 与 JMJD3 参与促使巨噬细胞选择性极化不同, HDAC3 能够降低 IL-4 诱导 M2 相关基因增强子的乙酰化程度, 从而可作为 IL-4 诱导 M2 极化的“闸”^[18]。因此, 无论是组蛋白甲基化还是乙酰化对 M2 极化都起到举足轻重的作用。

4 表观遗传修饰指导巨噬细胞极化

机体遇到损伤或感染时, 诱导巨噬细胞向 M1 型极化抵抗外界刺激, 然而持续的炎症也会造成组织损伤, 之后巨噬细胞转变为抑制炎症的 M2 型, 启动组织重塑。例如, 急性心肌梗死发生后, 大量促炎型 M1 迅速募集到梗死区域, 吞噬并清除凋亡坏死的细胞。在梗死后期, 促心肌成纤维细胞形成的 M2 数量增多并占主导地位, 进行心肌重构^[20]。然而, 一些慢性炎症状态下 M1/M2 比例失衡, 如 2 型糖尿病脂肪组织中促炎型 M1 上调而 M2 极化受限, 最终造成慢性炎症和胰岛素抵抗^[21]。同样的, 肿瘤微环境中的巨噬细胞即肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 也异常极化, 呈现促肿瘤血管生成的免疫抑制表型, 不同方式逆转 TAM 向 M1 表型转化后可使免疫抑制微环境好转。目前, 已知各种表观修饰的酶能作用于巨噬细胞炎症基因关键部位组蛋白, 改变其甲基化或乙酰化程度, 共同调控 M1/M2 极化平衡。那么, 可否通过改造巨噬细胞表观遗传状态, 指导其极化从而为肿瘤、肥胖、类风湿关节炎等疾病提供治疗策略呢? 答案是肯定的。通过分析启动子、增强子状态发现, 局部区域微环境能重塑组织特异性巨噬细胞基因活性。例如, Gata6 增强子仅在腹腔巨噬细胞中呈现活化。同样体外 TGF- β 处理可使已分化的巨噬细胞基因表达重新编排^[22]。上述现象说明, 与巨噬细胞来源相比, 微环境刺激信号更能指导巨噬细胞命运。研究表明, HDACs 可诱导巨噬细胞促炎基因表达, 使用一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (iHDACs) MS-275 处理后, 不仅能有效减轻局部免疫细胞及促炎因子的积聚, 还可促使巨噬细胞由 M1 向 M2 极化^[23]。类似的, 另一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Scriptaid 通过上调 GSK3b 的表达间接增强 PI3K/Akt 信号通路, 促进小胶质细胞向 M2 方向极化^[24]。同样的, 其他 iHDACs, 如 ITF2357 可使 IL-6 及 IL-6R 下调, 丙戊酸通过抑制促炎因子及 CD40、CD80 表达减少 M1 极化^[25]。iH-

DACs 能够调控巨噬细胞基因转录, 减少促炎性 M1 细胞因子与趋化因子的产生, 增加 M2 基因表达, 为减轻小鼠气道炎症等提供治疗依据^[26]。另外, DNMT 也参与巨噬细胞极化进程。肥胖小鼠 DNMT3b 异常表达, 引起过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 1 (PPAR γ 1, 一种核受体, 参与 M2 极化的关键转录因子, 其启动子区 CpG 含量丰富, 易于被表观调控) 启动子区 DNA 甲基化程度升高, 使其表达被抑制, 导致巨噬细胞向 M2 极化受限, 从而导致脂肪组织慢性炎症, 而 DNMT3b 敲除后呈现相反趋势^[27]。还有研究表明, DNMT1 引起细胞因子信号转导抑制蛋白 1 (SOCS1) 启动子甲基化水平升高, 使其表达被抑制。使用 DNMT 抑制剂 5-azadC 将 DNMT1 沉默后, SOCS1 基因启动子区甲基化程度降低, 阻断了 LPS 诱导的巨噬细胞 JAK2/STAT3 通路活化, 减轻促炎表型^[28]。因此, 使用靶向 DNMT 的 iDNMT 可用于控制促炎 M1 表型, 促进抗炎的 M2 反应。总之, 通过单独或联合应用 iHDACs、iDNMT 都能达到减轻 M1, 促进 M2 的效果, 这为将来发现并应用新的表观遗传修饰药物奠定了基础。

5 小结与展望

表观修饰的酶能作为中介, 与转录因子共同介导环境因素与巨噬细胞表型的复杂调控网络, 参与巨噬细胞活化的方方面面。相比其他磷酸化信号转导蛋白, 表观遗传标记具有长期性, 这已成为针对巨噬细胞治疗慢性炎症的重要支点。目前对于极化过程的认识比较局限, 而且没有严格的衡量标准来界定巨噬细胞极化状态。通常用于反映分型及功能的标志分子也并不能完全代表某个亚型巨噬细胞。但是, 未来表观遗传调控巨噬细胞极化研究领域中, 全基因组测序技术的应用及巨噬细胞分离纯度的保证将起到巨大推动作用。另外, 还有一些表观修饰方式与巨噬细胞极化的联系尚未被揭示, 许多表观修饰后的基因与巨噬细胞极化的关系仍不明确, 仍需进一步探索。

参考文献

- [1] TUGAL D, LIAO X, JAIN M K. Transcriptional control of macrophage polarization[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6):1135-1144.
- [2] GINHOUX F, SCHULTZE J L, MURRAY P J, et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(1):34-40.
- [3] BUECKER C, WYsocka J. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics [J]. *Trends Genet*, 2012, 28(6):276-284.
- [4] WU X Q, DAI Y, YANG Y, et al. Emerging role of microRNAs in regulating macrophage activation and polarization in immune response and inflammation[J]. *Immunology*, 2016, 148(3):237-248.

- [5] GRAFF J W, DICKSON A M, CLAY G, et al. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 21816-21825.
- [6] KAPELLOS T S, IQBAL A J. Epigenetic control of macrophage polarisation and soluble mediator gene expression during inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016(3): 1-15.
- [7] ESCOUBET-LOZACH L, BENNER C, KAIKKONEN M U, et al. Mechanisms establishing TLR4-responsive activation states of inflammatory response genes[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(12): e1002401.
- [8] NOVAKOVIC B, HABIBI E, WANG S Y, et al. beta-Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance[J]. *Cell*, 2016, 167(5): 1354-1368.
- [9] ABT M C, OSBORNE L C, MONTICELLI L A, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity[J]. *Immunity*, 2012, 37(1): 158-170.
- [10] MARAZZI I, HO J S, KIM J, et al. Suppression of the antiviral response by an influenza histone mimic[J]. *Nature*, 2012, 483(7390): 428-433.
- [11] BARISH G D, YU R T, KARUNASIRI M, et al. Bcl-6 and NF-kappaB cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(24): 2760-2765.
- [12] RAMIREZ-CARROZZI V R, BRAAS D, BHATT D M, et al. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling[J]. *Cell*, 2009, 138(1): 114-128.
- [13] KOBAYASHI T, MATSUOKA K, SHEIKH S Z, et al. IL-10 regulates IL-12b expression via histone deacetylation; implications for intestinal macrophage homeostasis[J]. *J Immunol*, 2012, 189(4): 1792-1799.
- [14] YAN Q, CARMODY R J, QU Z, et al. Nuclear factor-kappaB binding motifs specify Toll-like receptor-induced gene repression through an inducible repressosome[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(35): 14140-14145.
- [15] HU X, IVASHKIV L B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma; implications for immune responses and autoimmune diseases[J]. *Immunity*, 2009, 31(4): 539-550.
- [16] ROGER T, LUGRIN J, LE ROY D, et al. Histone deacetylase inhibitors impair innate immune responses to Toll-like receptor agonists and to infection[J]. *Blood*, 2011, 117(4): 1205-1217.
- [17] SATOH T, TAKEUCHI O, VANDENBON A, et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(10): 936-944.
- [18] MULLICAN S E, GADDIS C A, ALENGHAT T, et al. Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(23): 2480-2488.
- [19] ISHII M, WEN H, CORSA C A, et al. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype[J]. *Blood*, 2009, 114(15): 3244-3254.
- [20] FERNANDEZ-VELASCO M, GONZALEZ-RAMOS S, BOSCA L. Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases[J]. *Biochem J*, 2014, 458(2): 187-193.
- [21] BABU M, DURGA D T, MAKINEN P, et al. Differential promoter methylation of macrophage genes is associated with impaired vascular growth in ischemic muscles of hyperlipidemic and type 2 diabetic mice: genome-wide promoter methylation study[J]. *Circ Res*, 2015, 117(3): 289-299.
- [22] 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.
- [23] ZHANG Z Y, SCHLUESENER H J. HDAC inhibitor MS-275 attenuates the inflammatory reaction in rat experimental autoimmune prostatitis[J]. *Prostate*, 2012, 72(1): 90-99.
- [24] WANG G H, SHI Y J, JIANG X Y, et al. HDAC inhibition prevents white matter injury by modulating microglia/macrophage polarization through the GSK3beta/PTEN/Akt axis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(2): 2853-2858.
- [25] GLAUBEN R, SONNENBERG E, WETZEL M, et al. Histone deacetylase inhibitors modulate interleukin 6-dependent CD4⁺ T cell polarization in vitro and in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(9): 6142-6151.
- [26] ZHANG L, JIN S W, WANG C D, et al. Histone deacetylase inhibitors attenuate acute lung injury during cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis[J]. *World J Surg*, 2010, 34(7): 1676-1683.
- [27] YANG X S, WANG X F, LIU D X, et al. Epigenetic regulation of macrophage polarization by DNA methyltransferase 3b[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(4): 565-574.
- [28] CHENG C, HUANG C, MA T T, et al. SOCS1 hypermethylation mediated by DNMT1 is associated with lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophages[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 225(3): 488-497.

(收稿日期: 2017-07-21 修回日期: 2017-09-28)