DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0724
文章编号 1671-8852(2025)05-0583-12

转录因子c-Maf在卡介苗免疫后巨噬细胞极化和记忆T细胞活化中的作用

曹艺格 田 晴 孙素娟 张雯雯 刘 敏 罗凤玲
武汉大学泰康医学院(基础医学院)免疫学系 湖北 武汉 430071

摘要 目的:探究转录因子c-Maf对卡介苗免疫中巨噬细胞极化和记忆T细胞活化的作用。方法:用卡介苗体外刺激小鼠RAW264.7巨噬细胞、小鼠骨髓源性巨噬细胞(BMDMs)和经诱导的人单核细胞来源巨噬细胞THP-1,用RT-qPCR和Western Blot法检测卡介苗对巨噬细胞极化的影响;构建c-Maf过表达和敲低的RAW264.7巨噬细胞,用RT-qPCR、Western Blot、ELISA法和流式细胞术检测卡介苗对巨噬细胞极化的影响是否受转录因子c-Maf的调控;最后用卡介苗免疫野生型C57BL/6小鼠和巨噬细胞c-Maf条件性敲除的C57BL/6小鼠,30 d后用流式细胞术检测小鼠脾脏和肺脏中记忆T细胞的生成以及$CD4^+$T细胞产生的细胞因子情况。结果:体外实验显示,卡介苗诱导巨噬细胞呈现M1/M2混合表型。RAW264.7细胞中c-Maf的过表达促进了巨噬细胞向M2抗炎表型转变,而c-Maf的敲低则有利于M1促炎表型的转变。体内实验表明,巨噬细胞中c-Maf的定向敲除增加了卡介苗免疫后脾脏和肺脏中效应性记忆T细胞(T_{EM})的比例,同时$CD4^+$T细胞产生的促炎细胞因子水平升高。结论:转录因子c-Maf在调节巨噬细胞M1和M2极化之间的平衡中起着至关重要的作用,并最终影响卡介苗诱导的适应性免疫反应的疗效,这为寻找抗结核新靶点拓宽了思路。

关键词 c-Maf;卡介苗;巨噬细胞极化;记忆T细胞
中图分类号 R378.911
文献标识码 A
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Role of transcription factor c-Maf in macrophage polarization and memory T cell activation induced by BCG immunization

CAO Yige, TIAN Qing, SUN Sujuan, ZHANG Wenwen, LIU Min, LUO Fengling
Dept. of Immunology, Taikang Medical School(School of Basic Medical Sciences), Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the role of transcription factor c-Maf in macrophage polarization and memory T cell activation induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunization. **Methods:** Mouse RAW264.7 macrophages, mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs), and human monocyte-derived macrophages THP-1 were stimulated with BCG *in vitro*, and the effects of BCG on macrophage polarization were detected by RT-qPCR and Western Blot. Then we constructed RAW264.7 macrophages with overexpression or knockdown of c-Maf, and detected whether the effect of BCG on macrophage polarization was regulated by the transcription factor c-Maf by RT-qPCR, Western Blot, ELISA, and flow cytometry assays. Finally, wild-type C57BL/6 mice and mac-

课题来源:国家自然科学基金资助项目(编号:81971904)
作者简介:曹艺格,女,1997—,医学硕士生,主要从事感染免疫研究,E-mail:446695469@qq.com
通信作者:罗凤玲,女,1981—,副教授,主要从事感染免疫研究,E-mail:luofengling@whu.edu.cn

rophage c-Maf conditional knockout mice were injected with BCG subcutaneously, the generation of memory T cells in the spleen and lung and the cytokines produced by $CD4^+$ T cells were detected by flow cytometry 30 days later. **Results:** *In vitro* experiments demonstrated that BCG-stimulated macrophages showed a mixed M1/M2 phenotype. Overexpression of c-Maf in RAW264.7 cells promoted the transformation of the M2 anti-inflammatory phenotype, while knockdown of c-Maf facilitated the transformation of the M1 pro-inflammatory phenotype. *In vivo* experiments showed that c-Maf conditional knockout in macrophages increased the proportion of effector memory T cells (T_{EM}) in the spleen and lung after BCG immunization, and the level of pro-inflammatory cytokines produced by $CD4^+$ T cells also increased. **Conclusion:** Transcription factor c-Maf plays a crucial role in modulating the balance between M1 and M2 macrophage polarization and influences the efficacy of BCG-induced adaptive immune responses, thus providing new insights into finding targets against tuberculosis.

Key Words c-Maf; Bacillus Calmette-Guérin; Macrophage Polarization; Memory T Cell

巨噬细胞是免疫系统的重要组成部分,具有适应各种环境信号和刺激的能力[1]。这种适应性使它们可以在不同环境中展现出不同的功能状态,通常被归类为促炎M1表型或抗炎M2表型[2]。M1巨噬细胞通常具有杀菌和抗肿瘤功能,产生高水平的促炎细胞因子,如白细胞介素(IL)-12、肿瘤坏死因子(TNF)-α和干扰素(IFN)-γ等,并表达诱导型一氧化氮合酶(iNOS)。相反,M2巨噬细胞参与组织修复、炎症消退和抗炎细胞因子[如IL-10和转化生长因子(TGF)-β]的产生,并与精氨酸酶-1(Arginase-1)、CD206和c-Maf的表达升高相关[3-4]。巨噬细胞这两种表型之间的平衡在各种生理和病理环境中发挥重要作用,包括感染、癌症和自身免疫[5]。巨噬细胞极化失调可导致慢性炎症、肿瘤进展和免疫反应受损[6-8]。因此,了解调控巨噬细胞极化的分子机制对免疫学和治疗发展具有重要意义。

卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin,BCG)是牛分枝杆菌的一种减毒活菌株,近一个世纪以来一直被广泛用于预防结核病[9]。此外,有研究表明卡介苗作为一种非肌性浸润性膀胱癌的免疫疗法已经显示出明显疗效,可以调节免疫系统,特别是通过激活巨噬细胞[10-11]。卡介苗诱导的巨噬细胞活化是一个复杂的过程,涉及先天和适应性免疫反应的相互作用[12-13]。该疫苗刺激广泛的免疫反应,包括从促炎细胞因子的产生到记忆T细胞的激活[14]。

然而,尽管卡介苗具有重要的临床意义,但调控卡介苗对巨噬细胞激活和极化的分子途径仍不完全清楚。在调控巨噬细胞功能的众多转录因子中,c-Maf最近因其在巨噬细胞M1和M2极化平衡中的作用而受到关注[15]。c-Maf是AP-1转录因子家族的一员,在包括M2巨噬细胞和调节性T细胞(Tregs)在内的调节性和抗炎性免疫细胞中高表达[16-17]。众所周知,它通过上调IL-10的产生和增强精氨酸酶-1的表达来促进抗炎反应,从而推动巨噬细胞向M2表型转化[18-19]。

在这项研究中,我们将采用体外和体内模型来探讨转录因子c-Maf在卡介苗诱导的巨噬细胞极化中的作用及其对免疫反应的后续影响。本研究将为c-Maf在卡介苗刺激下影响巨噬细胞功能和免疫应答的分子机制提供新的见解。了解c-Maf在巨噬细胞极化中的作用可能对提高卡介苗的保护效力和开发靶向免疫疗法具有潜在意义,特别是对传染病和癌症的免疫治疗。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

1.1.1 *细胞培养和细菌培养相关试剂* 细胞培养基RPMI 1640(11875119)和DMEM(11965092)购自Gibco公司,胎牛血清(S711-001S)购自Lonser公司,佛波酯PMA(HY-18739)、巨噬细胞集落刺激因子M-CSF细胞因子(HY-P7085A)购自MCE公司;分枝杆菌培养的培养基Middlebrook7H9(LA7220)及增菌液OADC(LA9560)从索莱宝公司购进。

1.1.2 *RT-qPCR相关试剂* 总RNA提取试剂盒TRIzol购自武汉汇宇生物科技有限公司(RHYC01),逆转录试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司(G3332-50)、SYBR Green荧光染料由TOLOBIO公司提供(22204-01)。鼠和人的iNOS、IL-1β、巨噬细胞炎症蛋白-1α(MIP-1α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、c-Maf、IL-10和GAPDH的上下游引物由武汉擎科生物科技有限公司合成。

1.1.3　Western Blot 相关试剂　裂解细胞用的 RIPA 裂解液（PC101）、蛋白酶抑制剂（GRF101）、磷酸酶抑制剂（GRF102）、5×loading 上样缓冲液（LT101）、一步法 7.5%PAGE 凝胶快速制备试剂盒（PG211）、蛋白 Marker（WJ102）、无蛋白快速封闭液（PS108P）购自雅酶公司，Tris-Base（1115）、甘氨酸（1275）、十二烷基磺酸钠（3250）购自 Biofroxx 公司，氯化钠（BS112）、氯化钾（BS244）购自 BioSharp 公司，PVDF 膜购自 Cytiva 公司（10600023），甲醇溶液（67-56-1）及吐温-20（9005-64-5）购自中国国药集团化学试剂有限公司；c-Maf 单抗（JE39-57）、iNOS 多抗（ER1706-89）、Arginase-1 单抗（SY09-06）购自于杭州华安生物技术有限公司，ECL 显色底物（SQ202L）购自于雅酶公司。

1.1.4　ELISA（酶联免疫吸附实验）相关试剂　Mouse IL-10 ELISA Kit（CME0016-096）和 Mouse IFN-γ ELISA Kit（CME0003-096）购自北京四正柏生物科技有限公司。

1.1.5　流式细胞术相关试剂　消化肺组织所用胶原酶Ⅳ购自 Absin（abs47048003）公司，破红剂 ACK 按实验室配方配置，牛血清白蛋白 BSA（4240）购自 Biofroxx 公司。流式抗体染料、抗小鼠 APC-F4/80（123115）、PE-CD80（104707）、PE-CD86（159203）、PE-CD163（111804）、FITC-CD206（141703）、FITC-CD3（100203）、APC-CD4（100411）、Percp-Cy5.5-CD44（103032）、APC-Cy7-CD62L（104427）、BV421-IL-2（503825）、PE-IFN-γ（505807）、PE-IL-10（505007）流式抗体以及胞内固定剂（420801）、破膜剂（421002）均购自 Biolegend 公司。

1.2　方法

1.2.1　小鼠　所有体内实验均采用野生型（WT）C57BL/6 小鼠和巨噬细胞 c-Maf 条件性敲除（c-Maf-cKO）小鼠（8～12 周龄）。通过将 c-Maf folx 的小鼠与 Lyz2-Cre 小鼠杂交，以实现巨噬细胞定向敲除 c-Maf，从而产生 c-Maf-cKO 小鼠。所有小鼠在无特定病原体条件下饲养，并置于单独通风的鼠笼中。实验方案均经实验动物管理和使用委员会批准，并遵循国家实验室动物管理和使用指南。

1.2.2　细胞培养　RAW264.7、THP-1 细胞系由本实验室传代保存，骨髓源性巨噬细胞（BMDMs）取自野生型小鼠腿骨。RAW264.7 细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 培养基中，THP-1 需要用 100 ng•mL^{-1} 的 PMA 诱导 48 h，贴壁成功为巨噬细胞后，培养于含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基中进行后续实验。BMDMs 的获取方法是，将野生型 6～8 周 C57BL/6 雌鼠颈椎脱臼处死，在无菌环境中获取其股骨和胫骨，将完整的骨头浸泡于 75% 乙醇溶液中 30 s 后立即用 PBS 冲洗，然后剪断骨头两端，用 1 mL 注射器吸取适量 DMEM 培养基冲出骨髓直至骨髓腔变白；将取好的骨髓液离心后弃上清，加入 5～8 mL 红细胞裂解剂 ACK 充分吹打混匀，37 ℃破红 1 min 后立刻离心弃上清，用 PBS 重悬混匀，过滤至新的离心管中，离心弃上清后，最终用含有 25 ng•mL^{-1} M-CSF，1% 双抗以及 10%FBS 的 DMEM 完全培养基重悬培养，3 d 后换液，第 7 天培养成功用于后续实验。

1.2.3　细菌获取　卡介苗（BCG）菌株由本实验室传代保存，培养于 7H9 培养基中。在本实验中，我们吸取适量体积的 BCG 菌液，5 000 r•min^{-1} 离心 5 min，弃去培养基后加入等量 PBS 重悬，再次离心，弃上清后加入适量 PBS 重悬混匀，调整菌液光密度（*OD*）值至 1×10^{9} CFU•mL^{-1}（CFU：克隆形成单位）。本实验所用 MOI（感染复数）=10∶1。

1.2.4　卡介苗刺激 RAW264.7 等细胞　将适量细胞接种于 6 孔板，待 12 h 后细胞贴壁，将 1.2.3 处理好的 BCG 按 MOI=10∶1 加到培养基中，轻摇混匀，刺激 4 h 后，将旧培养基弃去，用无菌 PBS 将孔板中残余的 BCG 洗掉，最后加入新鲜培养基，分别于 12、24、36 h 后收样。

1.2.5　c-Maf 过表达和敲低 RAW264.7 细胞的构建　为了研究 c-Maf 在巨噬细胞极化中的作用，使用 Lipofectamine 2000（Thermo Fisher Scientific）按照制造商的方案转染了 c-Maf 过表达（OE）质粒或 c-Maf 敲低（KD）shRNA 质粒。选择稳定的转染物，用 G418（800 μg•mL^{-1}）筛选过表达细胞，嘌呤霉素（2 μg•mL^{-1}）筛选敲低细胞。用 Western Blot 和 RT-qPCR 证实转染成功和稳定表达。

1.2.6　小鼠卡介苗免疫　将每 100 μL 含 1×10^{6} CFU 卡介苗皮下免疫 WT 和 c-Maf-cKO 小鼠，每组 4 只。对照组小鼠单独注射 100 μL PBS。免疫后 30 d，将小鼠安乐死，取脾和肺作进一步分析。用流式细胞术分析免疫细胞群，用细胞内流式染色法评估细胞因子的产生。

1.2.7　RT-qPCR　采用 TRIzol 试剂提取巨噬细胞中总 RNA。使用高通量 cDNA 反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。在 ABI Prism 7500 系统上使用 SYBR Green 3/7 Master Mix（Applied Biosystems）进行 RT-qPCR。该实验使用了针对小鼠和人

iNOS、IL-1β、MCP-1、MIP-1α、Arginase-1、IL-10、c-Maf和GAPDH的特异性引物(见表1)。基因表达水平以GAPDH为对照进行标准化,并使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算倍数变化。

表1 RT-qPCR引物序列

基因名称	引物序列(3′—5′)
m-iNOS	F:AATAGAGGAACATCTGGCCAGG
	R:ATGGCCGACCTGATGTTGC
m-IL-1β	F:CCCAACTGGTACATCAGCAC
	R:TCTGCTCATTCACGAAAAGG
m-MIP-1α	F:TTCTCTGTACCATGACACTCTGC
	R:CGTGGAATCTTCCGGCTGTAG
m-MCP-1	F:TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA
	R:GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
m-c-Maf	F:AGCAGTTGGTGACCATGTCG
	R:TGGAGATCTCCTGCTTGAGG
m-IL-10	F:AGTGGAGCAGGTGAAGAGTG
	R:TTCGGAGAGAGGTACAAACG
m-Arginase-1	F:CAGAAGAATGGAAGAGTCGA
	R:CAGATATGCAGGGAGTCACC
m-GAPDH	F:CCTTCCGTGTTCCTACCC
	R:GCCTGCTTCACCACCTTC
h-iNOS	F:CTCTATGTTTGCGGGGATGT
	R:TTCTTCGCCTCGTAAGGAAA
h-IL-1β	F:CGTCAGTTGTTGTGGCCATG
	R:TTTGGTCCCTCCCAGGAAGA
h-MIP-1α	F:GGCTCTCTGCAACCAGTTCT
	R:TTCTGGACCCACTCCTCACT
h-MCP-1	F:ATCAATGCCCCAGTCACCTG
	R:TTGGGTTTGCTTGTCCAGGT
h-c-Maf	F:TGCACTTCGACGACCGCTCTC
	R:GGTGGCTAGCTGGAATCGGG
h-IL-10	F:CCCACTTCCCAGGCAACCTGC
	R:CCCAGGGAGTTCACATGCGCC
h-Arginase-1	F:GGCTGGTCTGCTTGAGAAAC
	R:TTCCCACAGACCTTGGATTC
h-GAPDH	F:CCTGCCAAATATGATGACAT
	R:TCCACCACCCTGTTGCTGTA

m:小鼠;h:人;F:上游引物;R:下游引物

1.2.8 Western Blot 用添加1%蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液从巨噬细胞提取总蛋白。蛋白浓度采用BCA法测定。等量的蛋白质(20～30 μg)通过SDS-PAGE分离,转移到PVDF膜上。将膜封闭在5%脱脂牛奶中,在4 ℃下用针对iNOS、Arginase-1、c-Maf和GAPDH(细胞信号传导技术)的一抗探针过夜。洗涤后,用酶标二抗孵育膜,再次洗涤后配置ECL显影液,最后使用ChemiDoc XRS+成像系统(Bio-Rad)对蛋白质条带进行可视化。

1.2.9 酶联免疫吸附实验(ELISA) 收集卡介苗刺激巨噬细胞后的上清液,并在－80 ℃保存以待分析。根据制造商的说明,使用ELISA试剂盒(R&D Systems)检测IL-10和IFN-γ的水平。利用酶标仪在450 nm处测量吸光度,并根据每个细胞因子生成的标准曲线计算细胞因子浓度。

1.2.10 细胞系流式细胞术检测 将6孔板中卡介苗刺激后的RAW264.7细胞培养液弃去,将PBS从孔板侧壁轻轻加入清洗细胞一次,然后用细胞刮将细胞缓缓刮下,吹打混匀后过滤至流式管中,留取每100 μL含1×10^6个细胞的细胞悬液进行流式染色。先染死活染料,避光孵育30 min后,用含2%BSA的PBS清洗,然后留100 μL体积的液体进行表面分子染色,表面分子包括:APC-F4/80,PE-CD80,PE-CD86,PE-CD163和FITC-CD206,各自避光孵育30 min,用PBS振荡清洗后弃上清,最终加入300～500 μL PBS重悬混匀,等待上机检测。

1.2.11 动物细胞流式细胞术检测 在无菌条件下取小鼠脾脏和肺脏,将取好的动物脏器暂时放置于冰上。对于脾脏而言,首先用70 μm孔径的不锈钢细胞筛对小鼠脾脏进行研磨,然后经滤膜过滤、离心弃上清、红细胞裂解液去除红细胞、PBS重悬等步骤最终获得脾脏单细胞悬液;肺脏则需要用剪刀将其剪至糜状,按说明书配置相应浓度的胶原酶溶液对肺组织进行消化,在37 ℃条件下消化约1 h,后续操作与脾脏相同,最终获取肺组织单细胞悬液,悬液细胞经计数后,调整细胞浓度至1×10^7个·mL^{-1}。肺和脾细胞除了各取一部分直接进行后续流式染色外,还需要留一部分细胞铺板进行卡介苗体外刺激检测胞内细胞因子。具体操作为:将脾和肺组织细胞重悬于RPMI 1640培养基中,然后接种于6孔板中,同样按MOI=10:1比例加入灭活卡介苗(65 ℃水浴灭活2 h)刺激,肺细胞体外刺激4～6 h,脾细胞体外刺激18～24 h,收样前4～6 h按1:1 000的比例加入布雷非德菌素A(BFA,一种蛋白转运阻断剂)抑制细胞因子分泌出胞外。接下来进行流式染色,保证每个流式管中的细胞量为每100 μL含1×10^6个。实验管染色顺序为先染死活染料,避光孵育30 min后,用含2%BSA的PBS清洗后留100 μL体积的液体进行多个表面分子染色,表面分子包括FITC-CD3、APC-CD4、Percp-Cy5.5-CD44、APC-Cy7-CD66L,同样避光孵育30 min,用PBS振荡清洗后弃上清,加入300～500 μL PBS重

悬混匀，准备上机检测；另一部分体外刺激检测细胞因子的细胞需要在死活染色和表面染色之后，用流式胞内染色专用固定剂固定 45～60 min 后，加 2 mL 按比例配置的胞内破膜剂对细胞膜表面进行打孔，然后进行细胞因子染色，包括 BV421-IL-2、PE-IFN-γ，由于 IL-10 和 IFN-γ 荧光染料重合，所以 PE-IL-10 需要单独染色，同样避光 30 min 后用 PBS 振荡洗涤，最后加 300～500 μL PBS 重悬混匀，使用 CYTEK AURORA 流式分析仪进行检测。

1.2.12　统计学分析　所有数据均以至少 3 个独立实验的均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。两组间的比较采用非配对 t 检验。对于多组间的比较，采用单因素或双因素方差分析，然后进行 Tukey 事后检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　卡介苗刺激诱导巨噬细胞 M1/M2 混合表型　为了研究卡介苗对巨噬细胞极化的影响，我们用卡介苗刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞、小鼠 BMDMs 和人 THP-1 巨噬细胞，并检测 M1 和 M2 标记物的表达情况。定量 RT-PCR 和 Western Blot 结果显示，在上述三种细胞类型中，卡介苗刺激导致巨噬细胞呈现混合表型，其特征是 M1 和 M2 标记物同时上调。具体来说，M1 相关标志物，包括 iNOS、IL-1β、MCP-1 和 MIP-1α，在卡介苗刺激下显著上调；同时，M2 相关标志物如 Arginase-1、c-Maf 和 IL-10 的表达也显著增加（图 1A～1C）。这些趋势在 RAW264.7、BMDMs 和 THP-1 细胞中是一致的，表明卡介苗触发了一个复杂的巨噬细胞激活程序，包括促炎和抗炎反应。Western Blot 结果进一步证实了这些 M1 和 M2 标记在蛋白水平上的表达。iNOS、c-Maf 和 Arginase-1 在卡介苗刺激后的多个时间点显著上调，进一步证明了卡介苗诱导的混合极化表型（图 1D～1F）。这些发现表明，卡介苗刺激巨噬细胞不会导致单一 M1 或 M2 的特异性极化，而是诱导一种以 M1 和 M2 标记物共同表达为特征的混合状态。这种混合表型可能反映了巨噬细胞在卡介苗应答中的多方面作用，其中炎症反应和调节机制都参与促进有效的免疫应答。

2.2　过表达 c-Maf 促进 RAW264.7 细胞向 M2 极化　为了阐明 c-Maf 在巨噬细胞极化中的作用，我们构建过表达 c-Maf 的 RAW264.7 细胞（c-Maf-OE），并将其与对照转染的 RAW264.7 细胞进行比较。定量 RT-PCR 和 Western Blot 结果证明，与对照细胞相比，c-Maf-OE 巨噬细胞中 c-Maf 过表达成功（图 2A、2B）。定量 RT-PCR 分析显示，c-Maf 过表达的 RAW264.7 细胞 M2 型标记物（包括 Arginase-1 和 IL-10）显著上调，同时 M1 相关标记物（如 iNOS、IL-1β、MCP-1 和 MIP-1α）的表达明显下调（图 2C）。Western Blot 结果显示，c-Maf-OE 组 c-Maf 蛋白水平升高，同时 Arginase-1 相应升高，iNOS 减少（图 2D）。流式细胞术分析显示，与对照细胞相比，c-Maf-OE 细胞表面 M2 标记物 CD163 和 CD206 的表达显著升高，而 M1 标记 CD80 和 CD86 的表达显著降低（图 2F）。此外，ELISA 结果显示 c-Maf-OE 细胞中抗炎细胞因子 IL-10 的分泌增加，而促炎因子 IFN-γ 的分泌减少（图 2E）。这些数据表明，c-Maf 过表达使巨噬细胞极化倾向于抗炎 M2 表型，其特征是 M2 标记物 IL-10、Arginase-1、CD163 和 CD206 表达升高。

2.3　敲低 c-Maf 促进卡介苗刺激后的 RAW264.7 巨噬细胞向 M1 极化　为了进一步研究 c-Maf 在卡介苗刺激的巨噬细胞极化中的作用，我们构建了 c-Maf 敲低（KD）的 RAW264.7 巨噬细胞。Western Blot 结果证实，与对照细胞相比，c-Maf-KD 巨噬细胞中 c-Maf 被成功敲除（图 3A）。在卡介苗刺激后 0、12、24、36 h 后对 M1 和 M2 标记物进行定量 RT-PCR 分析。与对照细胞相比，c-Maf-KD 巨噬细胞表现为 M1 相关基因表达显著升高，包括 iNOS、IL-1β、MCP-1 和 MIP-1α；相反，M2 标记物如 IL-10 和 Arginase-1，在 c-Maf-KD 巨噬细胞中的表达明显降低（图 3B）。Western Blot 分析进一步证实，卡介苗刺激后 c-Maf-KD 巨噬细胞 iNOS 蛋白表达增加，Arginase-1 水平降低（图 3C）。流式细胞术检测细胞表面标志物结果也支持这些发现，显示 c-Maf-KD 巨噬细胞与对照细胞相比，显示出更高水平的 M1 表面标记物 CD80 和 CD86，而 M2 表面标记物 CD163 和 CD206 则显著下调，特别是在卡介苗刺激后（图 3E）。此外，细胞因子检测结果显示，在卡介苗刺激后，c-Maf-KD 巨噬细胞产生的 IL-10 明显少于对照巨噬细胞（图 3D）。这些结果共同表明，c-Maf 敲低使巨噬细胞趋向促炎 M1 表型，其特征是 M1 标记物的表达增加，同时抑制 M2 表型和抗炎细胞因子 IL-10。

2.4　卡介苗免疫增强效应性记忆 T 细胞反应　为了研究卡介苗免疫对记忆 T 细胞群和细胞因子产

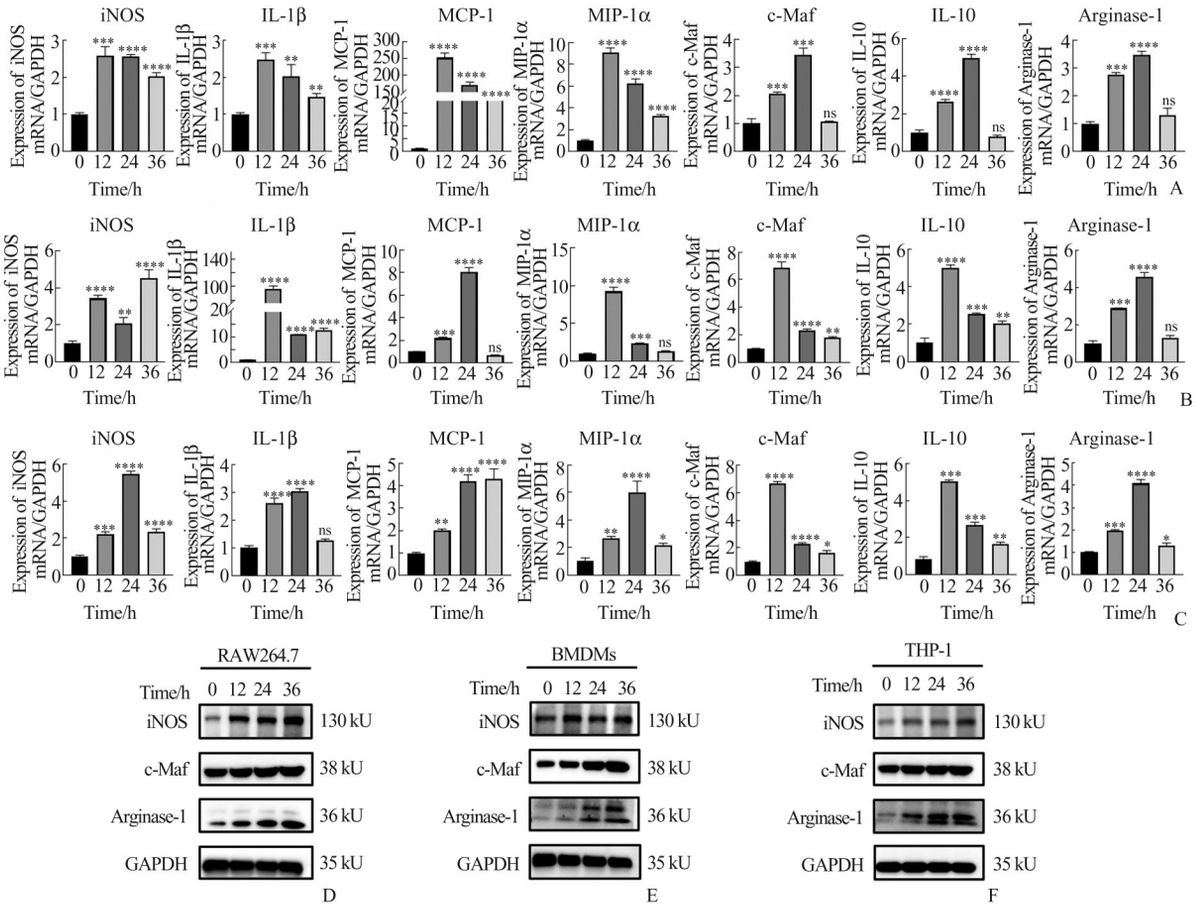


图1 卡介苗刺激诱导RAW264.7、BMDMs和THP-1中M1/M2混合巨噬细胞表型

用卡介苗(MOI=10:1)刺激巨噬细胞(RAW264.7、BMDMs和THP-1)。A～C. 定量RT-PCR分析显示,卡介苗刺激12、24和36 h后,M1标记物(iNOS、IL-1β、MCP-1、MIP-1α)和M2标记物(c-Maf、IL-10、Arginase-1)在上述三种巨噬细胞中的相对表达水平。数据表示为与未受刺激对照(0 h)相比的倍数变化,A～C分别代表RAW264.7、BMDMs和THP-1细胞;D～F. Western Blot分析显示三种细胞分别在卡介苗刺激后iNOS、c-Maf、和Arginase-1蛋白表达水平,以GAPDH作为内参对照,D～F分别代表RAW264.7、BMDMs和THP-1细胞。结果以$\bar{x}\pm s$(n=3)表示。采用One-way ANOVA检验,与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.000\,1$,ns:$P>0.05$

生的影响,我们分析了卡介苗免疫后第30天野生型(WT)小鼠脾脏和肺部$CD4^+$T细胞的变化。流式细胞术显示,卡介苗免疫显著增加了效应记忆T细胞(T_{EM},$CD44^{hi}CD62L^{low}$)的比例,对于中央记忆T细胞(T_{CM},$CD44^{hi}CD62L^{hi}$)的比例影响相对较小。在肺脏中,T_{EM}的比例从PBS对照组的32.3%上升到卡介苗免疫小鼠的62.3%(图4A、4B),在脾脏中也观察到类似的趋势,其中T_{EM}的比例从PBS处理小鼠的34.7%增加到卡介苗免疫小鼠的44.2%(图4A、4B)。除了改变记忆T细胞群外,卡介苗免疫还增强了脾和肺中$CD4^+$T细胞产生的细胞因子。胞内细胞因子的流式细胞术显示,与PBS对照组相比,卡介苗免疫使小鼠肺脏和脾脏$CD4^+$T细胞产生的促炎细胞因子IL-2和IFN-γ显著增加,同时抑炎因子IL-10的产生也增加,表明促炎和调节途径均被广泛激活(图4C、4D)。

2.5 巨噬细胞c-Maf条件性敲除增强卡介苗诱导的效应性记忆T细胞反应 为了进一步阐明c-Maf在调节卡介苗免疫反应中的作用,我们在卡介苗免疫后第30天评估了野生型(WT)小鼠和c-Maf敲除(c-Maf-cKO)小鼠的记忆T细胞群和细胞因子的产生。结果显示,c-Maf-cKO小鼠免疫后T_{EM}的比例明显高于WT小鼠。在肺脏中,T_{EM}从WT小鼠的60.4%增加到c-Maf-cKO小鼠的76.6%(图5A、5B),这种效应在脾脏也很明显,T_{EM}细胞从WT小鼠的42.7%增加到c-Maf-cKO小鼠的62.9%(图5A、5B)。c-Maf敲除后细胞因子的产生也显著增加。肺$CD4^+$T细胞的流式细胞术分析显示,与WT小鼠相比,c-Maf-cKO小鼠的IL-2阳性细胞从3.51%增加到6.83%,IFN-γ阳性细胞

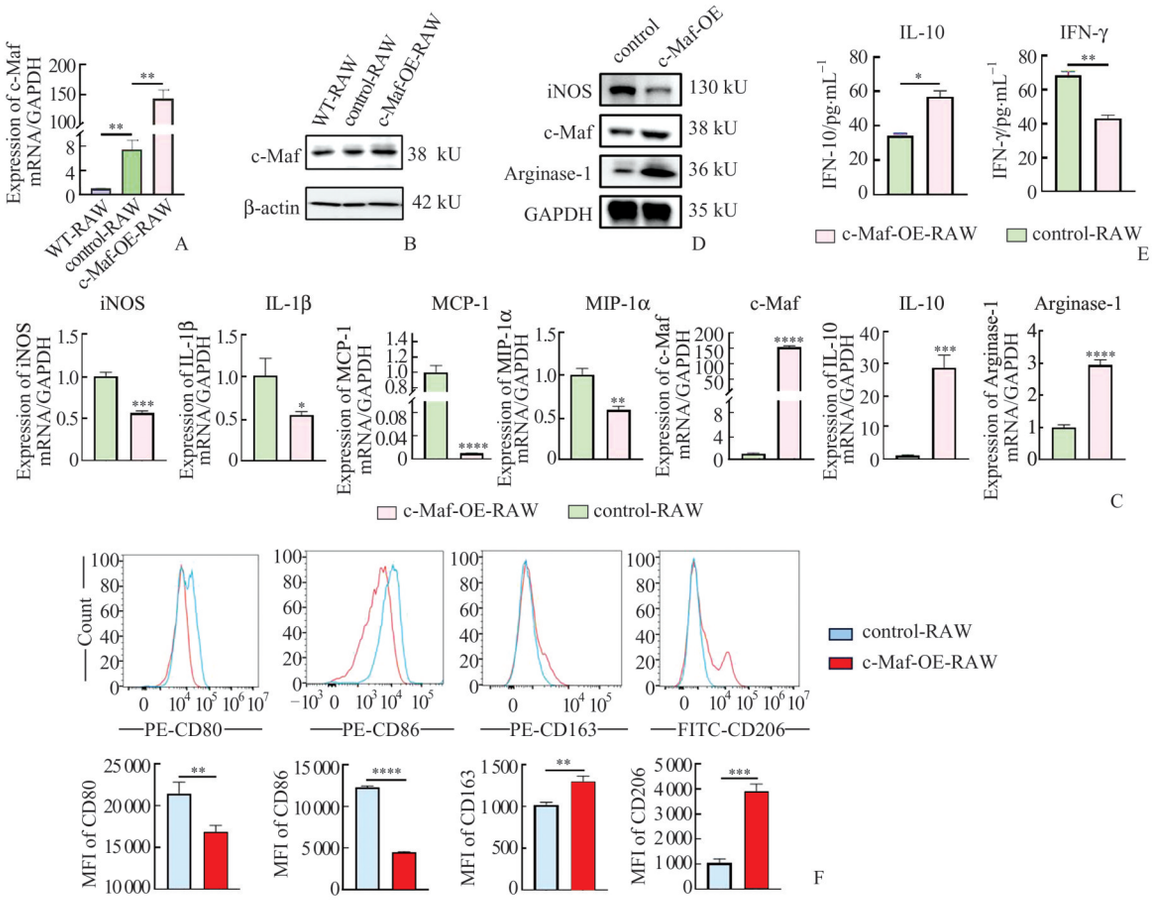


图 2　c-Maf 过表达促进 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 极化

用 c-Maf-OE 载体或对照载体转染 RAW264.7 巨噬细胞。A、C. 定量 RT-PCR 分析显示，与对照细胞相比，c-Maf-OE 巨噬细胞中 M1 标记物（iNOS、IL-1β、MCP-1、MIP-1α）和 M2 标记物（Arginase-1、c-Maf、IL-10）的相对表达；B、D. c-Maf-OE 和对照巨噬细胞中 c-Maf、iNOS 和 Arginase-1 蛋白水平的 Western Blot 分析，以 GAPDH 作为内参对照；E. ELISA 分析显示 c-Maf-OE 和对照细胞分泌 IL-10 和 IFN-γ 的水平；F. c-Maf-OE 和对照细胞表面 M1 标记物（CD80、CD86）和 M2 标记物（CD206、CD163）的流式细胞术分析，MFI：平均荧光强度。采用 t 检验，结果以 $\bar{x}\pm s$（$n=3$）表示；与对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\,1$

从 7.91% 增加到 12.1%。此外，在 c-Maf-cKO 小鼠中，IL-10 阳性细胞从 10.6% 下降到 5.40%（图 5C、5D）。在脾脏中类似的趋势更加显著，与 WT 小鼠相比，c-Maf-cKO 小鼠 IL-2 和 IFN-γ 的产生明显增加。其中 c-Maf-cKO 小鼠中 IL-2 阳性细胞从 1.82% 上升到 7.41%，IFN-γ 阳性细胞从 6.80% 上升到 16.6%，促炎细胞因子的增加伴随着抑炎因子 IL-10 产生的显著减少，IL-10 阳性 $CD4^{+}$ T 细胞从 WT 小鼠的 22.9% 下降到 c-Maf-cKO 小鼠的 2.72%（图 5C、5D）。总之，这些发现表明卡介苗免疫增强了 WT 小鼠的效应性记忆 T 细胞反应，其特征是 T_{EM} 细胞比例增加和细胞因子产生增加。此外，巨噬细胞中 c-Maf 的下调进一步增加了 T_{EM} 细胞的比例，促进了炎性细胞因子的产生，同时降低了抑炎细胞因子 IL-10 水平，从而放大了这些反应。这表明在卡介苗免疫后记忆 T 细胞形成过程中，c-Maf 在调节促炎和抗炎反应之间的平衡中起关键作用。

3　讨论

这项研究为转录因子 c-Maf 在卡介苗诱导的免疫反应中调节巨噬细胞极化方面的作用提供了重要见解。我们的发现表明，卡介苗刺激会导致巨噬细胞呈现混合的 M1/M2 表型，其特征是同时表达促炎和抗炎标志物。此外，我们还证明了 c-Maf 在决定 M1 和 M2 极化的平衡方面起着关键作用，其过表达会驱动巨噬细胞向抗炎的 M2 表型转变，而敲低则会促进促炎的 M1 表型。

卡介苗诱导的混合巨噬细胞表型与分枝杆菌感染引起免疫反应的复杂性是一致的[20]。巨噬细胞是初始先天免疫反应和随后适应性免疫的关键参与者[21]。卡介苗同时刺激 M1 和 M2 巨噬细胞标

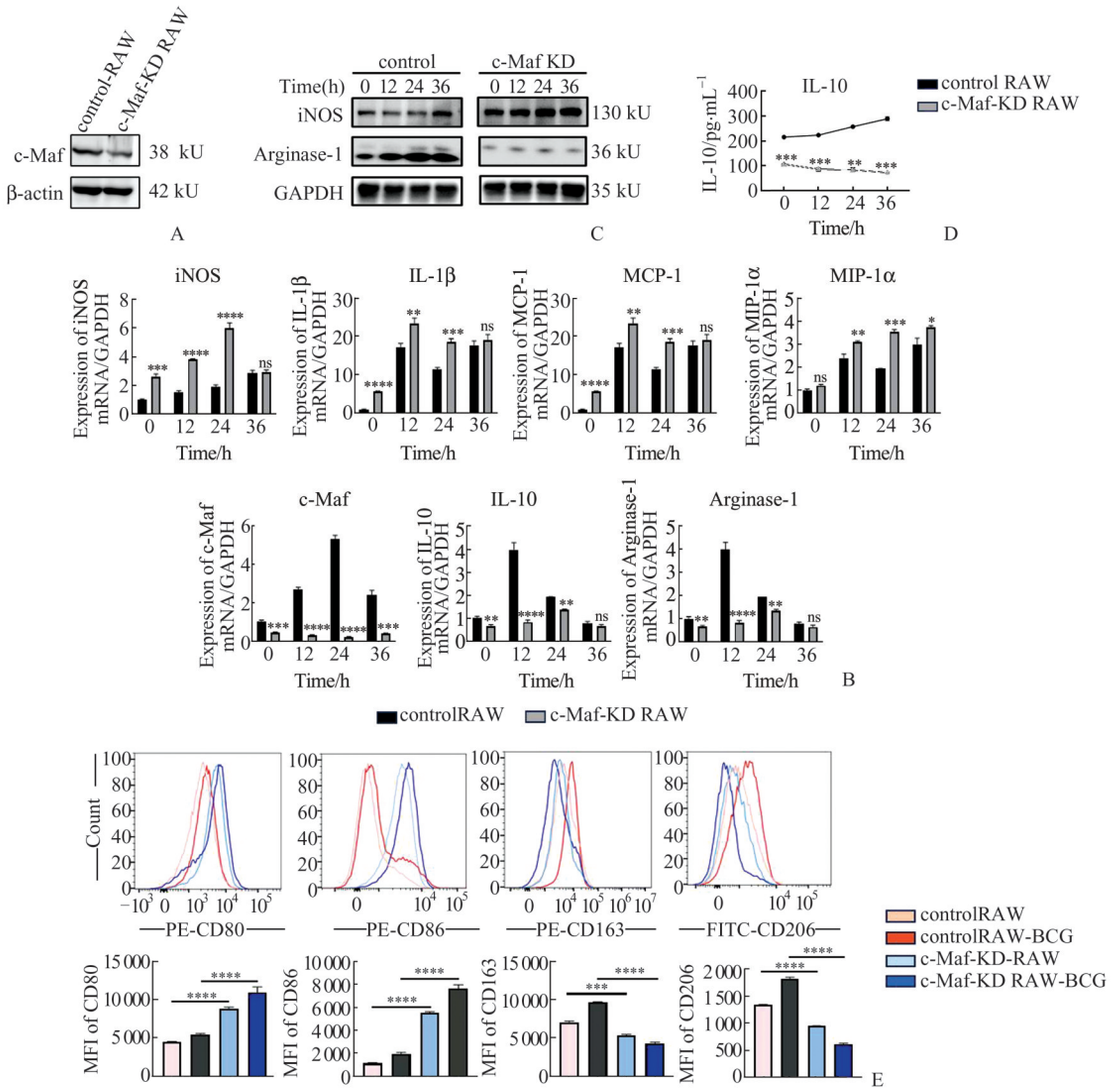


图3 敲低c-Maf促进卡介苗刺激的RAW264.7巨噬细胞向M1极化

A. Western Blot分析显示RAW264.7巨噬细胞c-Maf敲低(c-Maf-KD)效率,β-actin作为内参对照;B. 定量RT-PCR分析对照组和c-Maf-KD RAW264.7巨噬细胞中M1标记物(iNOS、IL-1β、MCP-1、MIP-1α)和M2标记物(c-Maf、IL-10、Arginase-1)在卡介苗刺激后(0、12、24、36 h)的变化,数据以相对于未刺激对照(0 h)的倍数变化表示;C. Western Blot分析卡介苗刺激后不同时间点(0、12、24、36 h),对照组和c-Maf-KD RAW264.7巨噬细胞中iNOS和Arginase-1蛋白的表达情况,以GAPDH作为内参对照。D. 卡介苗刺激后0、12、24、36 h,用ELISA法分析对照组和c-Maf-KD RAW264.7巨噬细胞IL-10的分泌水平;E. 卡介苗刺激后0、12、24、36 h,对照组和c-Maf-KD RAW264.7巨噬细胞中M1表面标记物(CD80、CD86)和M2表面标记物(CD163、CD206)的流式细胞术分析。采用t检验,结果以$\bar{x}\pm s$(n=3)表示。与对照RAW细胞相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.000\,1$,ns:$P>0.05$

记物的能力表明,巨噬细胞可能在卡介苗的作用下呈现复合状态,使其能够发挥多种功能[22]。其中,M1巨噬细胞以其在病原体清除和产生促炎细胞因子(如IL-12和TNF-α)中的作用而闻名,这些细胞因子对于激活Th1细胞和促进针对细胞内病原体(如结核分枝杆菌)的有效免疫反应至关重要[23]。另一方面,M2巨噬细胞有助于组织修复和炎症消退,这些过程对于在长期免疫反应中维持组织稳态同样重要[24]。

本研究结果表明,c-Maf是控制M1和M2表型之间平衡的分子开关,在巨噬细胞极化过程中发挥关键调控作用。RAW264.7巨噬细胞中c-Maf的过表达使平衡向M2表型转移,表现为Arginase-1、IL-10和其他M2标记物的表达增加,同时抑制M1相关标记物如iNOS和IL-1β的表达。这些发现与先前的研究一致,先前研究已经确定c-Maf是IL-10和其他抗炎基因的转录调节因子。相反,c-Maf的敲低促进了强烈的M1反应,促炎细胞因子的产生增

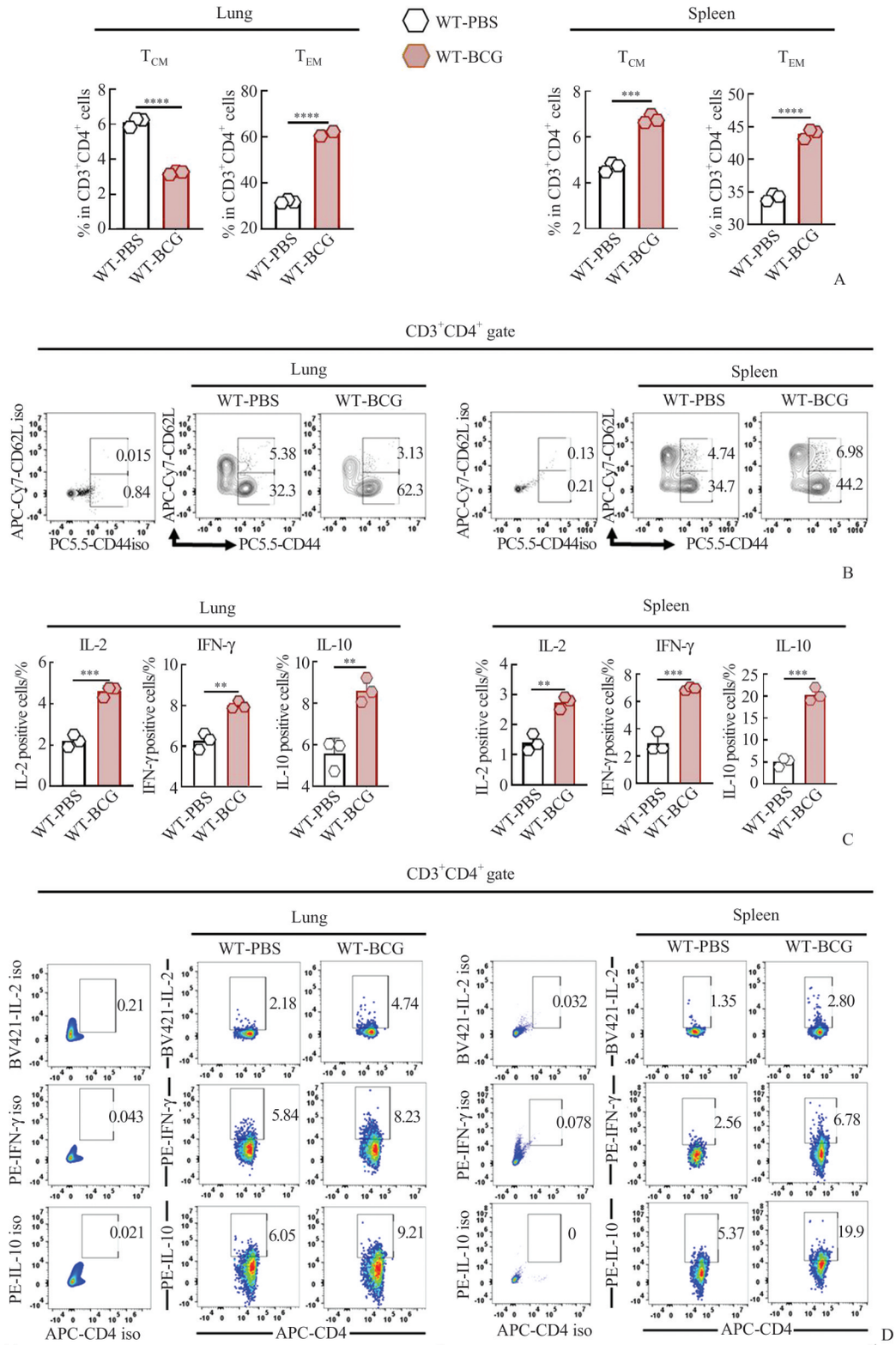


图 4　卡介苗免疫增强 WT 小鼠脾和肺的效应记忆 T 细胞反应

野生型（WT）小鼠接种 PBS（对照）或卡介苗后肺脏和脾脏 $CD4^+$ T 细胞群的流式细胞术分析，通过 APC-Cy7-CD62L 和 PerCP-Cy5.5-CD44 染色，将 $CD4^+$ T 细胞分为中枢记忆 T 细胞（T_{CM}，$CD44^{hi}CD62L^{hi}$）和效应记忆 T 细胞（T_{EM}，$CD44^{hi}CD62L^{low}$）。A、B. 柱状图和流式细胞术图显示，脾脏和肺脏 T_{CM}、T_{EM} 在 $CD4^+$ T 细胞群中的比例；C、D. 柱状图和流式细胞术图总结了 $CD4^+$ T 细胞群中细胞因子（IL-2、IFN-γ 和 IL-10）表达阳性的细胞占比情况，其中脾细胞用 PBS 或卡介苗体外刺激 18～24 h，肺细胞体外刺激 4～6 h。采用 t 检验，结果以 $\bar{x}\pm s$（$n=3$）表示，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\,1$

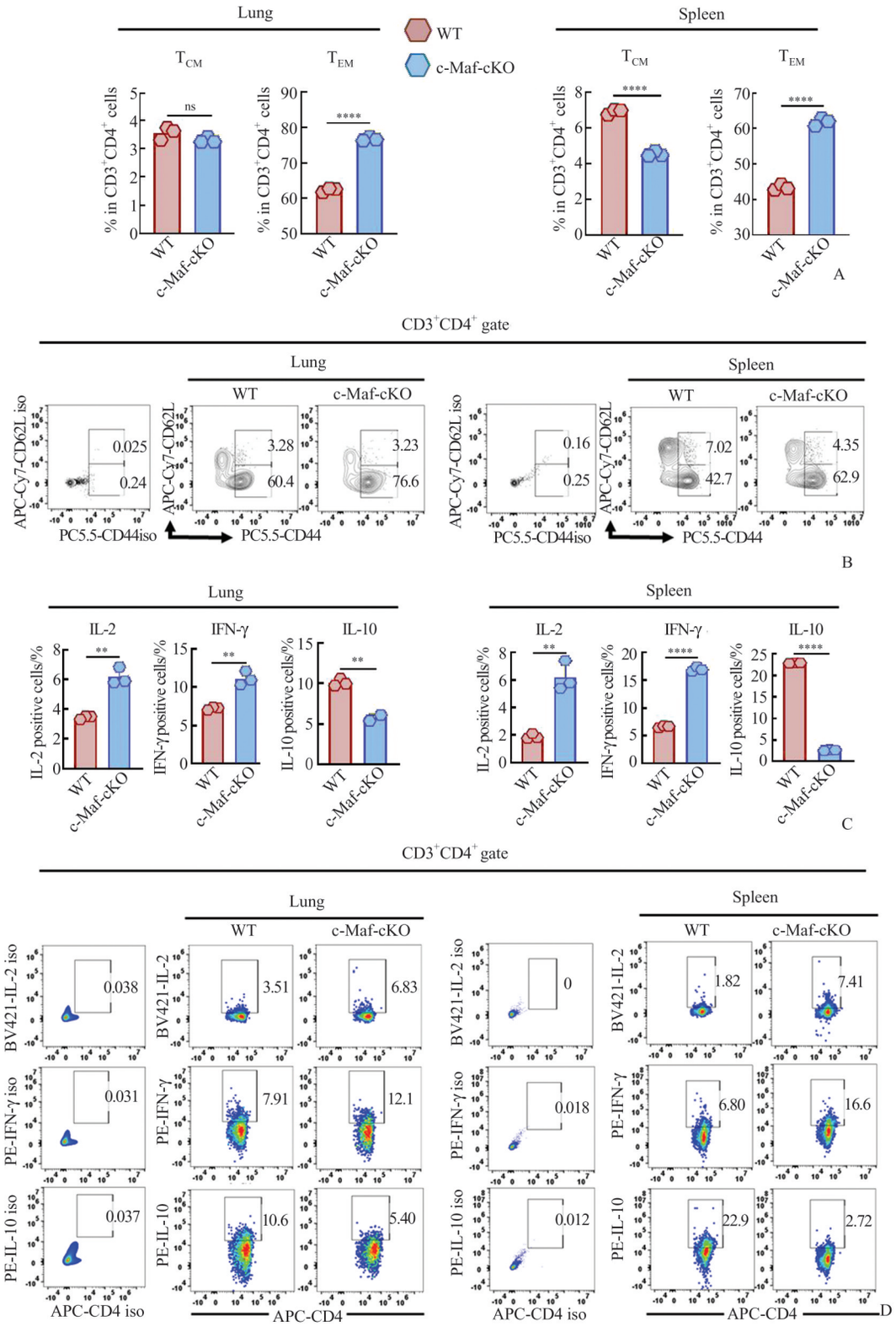


图 5　敲除巨噬细胞 c-Maf 增强卡介苗免疫后脾和肺的效应性记忆 T 细胞反应

野生型(WT)小鼠和巨噬细胞中 c-Maf 定向敲除鼠接种卡介苗后肺脏和脾脏 $CD4^+$ T 细胞群的流式细胞术分析，通过 APC-Cy7-CD62L 和 PerCP-Cy5.5-CD44 染色，将 $CD4^+$ T 细胞分为中枢记忆 T 细胞(T_{CM}，$CD44^{hi}CD62L^{hi}$)和效应记忆 T 细胞(T_{EM}，$CD44^{hi}CD62L^{low}$)。A、B. 柱状图和流式细胞术图显示，肺脏和脾脏 T_{CM}、T_{EM} 在 $CD4^+$ T 细胞群中的比例；C、D. 柱状图和流式细胞术图总结了 $CD4^+$ T 细胞群中细胞因子(IL-2、IFN-γ 和 IL-10)表达阳性的细胞占比情况，其中脾细胞用卡介苗体外刺激 18～24 h，肺细胞体外刺激 4～6 h。采用 t 检验，结果以 $\bar{x}\pm s$(n=3)表示，$^{**}P<0.01$，$^{****}P<0.0001$，ns：$P>0.05$

加，iNOS 和 IL-1β 等表达上调。c-Maf 敲低使巨噬细胞向促炎性表型的转变表明，c-Maf 通常抑制 M1 极化并促进抗炎 M2 表型的发展。

更重要的是，来自 c-Maf 敲除小鼠的体内结果进一步强调了 c-Maf 在卡介苗诱导的免疫应答中的作用。巨噬细胞中缺乏 c-Maf 的小鼠在卡介苗免疫后表现出增强的促炎反应，其特征是 IFN-γ、IL-2 和其他促炎细胞因子的产生增加。这种炎症反应的增强与 c-Maf 敲除小鼠脾脏和肺部 T_{EM} 比例的显著增加有关，这表明 c-Maf 的缺失增强了巨噬细胞促进适应性免疫反应的能力。这些发现在疫苗开发的背景下尤其重要，其目标是引发强大且持久的记忆 T 细胞反应以抵御后续感染[25-26]。c-Maf 在调节先天免疫和适应性免疫中的双重作用对于理解卡介苗对结核病和其他疾病的保护机制具有重要意义。通过调节 M1 和 M2 极化之间的平衡，c-Maf 影响巨噬细胞清除病原体的能力，同时形成适应性免疫反应。c-Maf 的这种调节功能可能被用来提高卡介苗的接种效果。例如，c-Maf 促进 M1 极化并增强促炎反应从而改善保护性免疫反应，未来或许可以应用到结核病或癌症免疫治疗中。

此外，本研究的结果表明，调节巨噬细胞中的 c-Maf 表达可能具有治疗结核以外的应用。例如，在癌症中，M2 巨噬细胞通常通过促进免疫抑制环境来加速肿瘤进展，靶向 c-Maf 可以将巨噬细胞转向更促炎的 M1 表型，增强抗肿瘤免疫[27-28]。相反，在以过度炎症为特征的自身免疫性疾病中，促进 c-Maf 表达可能有助于抑制免疫反应并恢复组织稳态[17, 29]。

综上所述，本研究强调了 c-Maf 在卡介苗诱导的免疫应答中对巨噬细胞极化和适应性免疫应答的关键作用。c-Maf 控制 M1 和 M2 巨噬细胞表型平衡的能力对先天性免疫和适应性免疫都存在重要意义。了解 c-Maf 调节巨噬细胞功能的分子机制有助于开发新的治疗策略，从而提高疫苗的免疫效果。然而，本研究也存在着一些不足之处，例如先天性免疫细胞与适应性免疫细胞间相互作用的关键“桥梁”是前者的抗原提呈分子（MHC），我们的研究只是发现了巨噬细胞中转录因子 c-Maf 对适应性免疫应答存在影响，而未深入探究 c-Maf 是否通过调控巨噬细胞的抗原提呈功能最终影响卡介苗诱导的特异性记忆 T 细胞反应。在后续研究中，我们将进一步明确 c-Maf 对巨噬细胞抗原提呈功能以及 T 细胞活化的调控机制，提高在临床环境中靶向 c-Maf 的潜力，从而优化卡介苗诱导的免疫反应。

参考文献

[1] TABAS I, BORNFELDT K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 653-667.

[2] ORIHUELA R, MCPHERSON C A, HARRY G J. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. Br J Pharmacol, 2016, 173(4): 649-665.

[3] HAO N B, LÜ M H, FAN Y H, et al. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 948098.

[4] SAHA B, KODYS K, SZABO G. Hepatitis C virus-induced monocyte differentiation into polarized M2 macrophages promotes stellate cell activation via TGF-B [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016, 2(3): 302-316. e8.

[5] SICA A, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and polarization: *In vivo* veritas[J]. J Clin Invest, 2012, 122(3): 787-795.

[6] ATRI C, GUERFALI F Z, LAOUINI D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1801.

[7] FUNES S C, RIOS M, ESCOBAR-VERA J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity [J]. Immunology, 2018, 154(2): 186-195.

[8] MOHAPATRA S, PIOPPINI C, OZPOLAT B, et al. Non-coding RNAs regulation of macrophage polarization in cancer[J]. Mol Cancer, 2021, 20(1): 24.

[9] BEHR M A. BCG: Different strains, different vaccines?[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(2): 86-92.

[10] DE JONG F C, LAAJALA T D, HOEDEMAEKER R F, et al. Non-muscle-invasive bladder cancer molecular subtypes predict differential response to intravesical Bacillus Calmette-Guérin[J]. Sci Transl Med, 2023, 15 (697): eabn4118.

[11] HAN J S, GU X Q, LI Y, et al. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110393.

[12] BEHAR S M, CARPENTER S M, BOOTY M G, et al. Orchestration of pulmonary T cell immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection: Immunity interruptus[J]. Semin Immunol, 2014, 26(6): 559-577.

[13] MATA E, TARANCON R, GUERRERO C, et al. Pulmonary BCG induces lung-resident macrophage activation and confers long-term protection against tuberculosis[J]. Sci Immunol, 2021, 6(63): eabc2934.

[14] TRAN K A, PERNET E, SADEGHI M, et al. BCG immunization induces CX3CR1^{hi} effector memory T cells to provide cross-protection via IFN-γ-mediated trained immunity[J]. Nat Immunol, 2024, 25(3): 418-431.

[15] LOUWE P A, SCOTT C L. Welcoming c-MAF to

the macrophage transcription factor VAM‐ily[J]. Sci Immunol, 2021, 6(64): eabl5793.
[16] KANG K, PARK S H, CHEN J, et al. Interferon-γ represses M2 gene expression in human macrophages by disassembling enhancers bound by the transcription factor MAF[J]. Immunity, 2017, 47(2): 235-250. e4.
[17] XU M, POKROVSKII M, DING Y, et al. C-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont[J]. Nature, 2018, 554(7692): 373-377.
[18] BARBOZA T C, SOTTO M N, KANASHIRO-GALO L, et al. M2-polarized macrophages determine human cutaneous lesions in lacaziosis[J]. Mycopathologia, 2020, 185(3): 477-483.
[19] PFÄNDER P, EIERS A K, BURRET U, et al. Deletion of *Cdk5* in macrophages ameliorates anti-inflammatory response during endotoxemia through induction of C-maf and Il-10[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9648.
[20] HMAMA Z, PEÑA-DÍAZ S, JOSEPH S, et al. Immunoevasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Immunol Rev, 2015, 264(1): 220-232.
[21] NAVEGANTES K C, DE SOUZA GOMES R, PEREIRA P A T, et al. Immune modulation of some autoimmune diseases: The critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity[J]. J Transl Med, 2017, 15(1): 36.
[22] LE Y Q, CAO W L, ZHOU L, et al. Infection of *Mycobacterium tuberculosis* promotes both M1/M2 polarization and MMP production in cigarette smoke‐exposed macrophages[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1902.
[23] ZHAO X B, DI Q Q, LIU H, et al. MEF2C promotes M1 macrophage polarization and Th1 responses [J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(4): 540-553.
[24] MANTOVANI A, BISWAS S K, GALDIERO M R, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling[J]. J Pathol, 2013, 229(2): 176-185.
[25] CORRADO M, PEARCE E L. Targeting memory T cell metabolism to improve immunity[J]. J Clin Invest, 2022, 132(1): e148546.
[26] LIU X, LI H R, LI S S, et al. Maintenance and recall of memory T cell populations against tuberculosis: Implications for vaccine design[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1100741.
[27] LIU M, TONG Z, DING C L, et al. Transcription factor c-Maf is a checkpoint that programs macrophages in lung cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130(4): 2081-2096.
[28] WANG Y K, QIU F M, YAN J. Transcription factor c-Maf-targeted cancer immunotherapy[J]. Trends Cancer, 2023, 9(4): 265-269.
[29] HSU C Y, YEH L T, FU S H, et al. SUMO-defective c‐Maf preferentially transactivates Il21 to exacerbate autoimmune diabetes[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9): 3779-3793.

(2024-09-23收稿)
编辑 张 峻

(上接第582页)

[19] LIU M, TONG Z, DING C, et al. Transcription factor c-Maf is a checkpoint that programs macrophages in lung cancer[J]. J Clin Invest, 2020, 130(4): 2081-2096.
[20] MINEMATSU H, AFIFY S M, SUGIHARA Y, et al. Cancer stem cells induced by chronic stimulation with prostaglandin E2 exhibited constitutively activated PI3K axis[J]. Sci Rep, 2022, 12: 15628.
[21] YAZDIMAMAGHANI M, KOLUPAEV O V, LIM C, et al. Tumor microenvironment immunomodulation by nanoformulated TLR 7/8 agonist and PI_3k delta inhibitor enhances therapeutic benefits of radiotherapy[J]. Biomaterials, 2025, 312: 122750.
[22] BAMRA T, SHAFI T, DAS S, et al. *Leishmania donovani* secretory mevalonate kinase regulates host immune response and facilitates phagocytosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 641985.
[23] CUI H, LIU Y, ZHENG Y, et al. Intelectin enhances the phagocytosis of macrophages *via* CDC42-$WASF_2$-ARPC2 signaling axis in *Megalobrama amblycephala*[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 236: 124027.
[24] JOSHI S, LÓPEZ L, MOROSI L G, et al. Tim4 enables large peritoneal macrophages to cross-present tumor antigens at early stages of tumorigenesis[J]. Cell Rep, 2024, 43(4): 114096.
[25] MANTOVANI A, ALLAVENA P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages[J]. J Exp Med, 2015, 212(4): 435-445.

(2024-11-12收稿)
编辑 张 峻