

斑马鱼下颌芽基再生过程中巨噬细胞极化模式的研究

尉菲菲^{1,2} 程梦楠^{1,2} 王建^{1,3} 王军^{1,3} 严继舟^{1,2,3,4*}

(¹上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; ²上海赛唐生物技术有限公司, 上海 201318; ³上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; ⁴上海海洋大学海洋生物系统和神经科学研究所, 上海 201306)

摘要 组织和器官的完全再生仍然是再生医学面临的重要课题。越来越多的证据显示巨噬细胞极化(分为M1和M2型)在创伤引起的炎症修复阶段扮演重要角色。该文研究斑马鱼下颌芽基再生过程中的巨噬细胞极化表现。首先通过巨噬细胞特异标记的转基因斑马鱼活体荧光拍照和免疫组化观察巨噬细胞分布情况。然后聚类分析下颌再生关键时间点的转录组数据, 比对经典M1/M2型细胞/炎症因子的表达模式, 并通过qRT-PCR进行检测。最后通过下颌显微注射和转录组测序分析(RNA seq), 观察脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)+ γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素4(interleukin 4, IL-4)、地塞米松和生理盐水对下颌再生的影响。结果证实了巨噬细胞动态参与下颌再生过程, 并且在下颌芽基再生的炎症反应期混有经典M1型和部分M2型极化反应, 而芽基组织再建期仅有部分M2型因子高表达。根据巨噬细胞极化型的多样化, 该文提出了斑马鱼下颌芽基再生型巨噬细胞极化新的分类: M1.5型和M2(+)型, 以及LPS/IFN- γ 和IL-4信号通路调节模式。显微注射结果显示, 单独注射LPS+IFN- γ 、IL-4或地塞米松都不利于组织修复与再生。该文研究结果为巨噬细胞极化因子介导的组织再生治疗研究提供了新思路。

关键词 下颌再生; 巨噬细胞极化; qRT-PCR; 显微注射; 信号通路

Polarization Mode of Macrophages During Blastema Regeneration in Zebrafish Lower Jaw

YU Feifei^{1,2}, CHENG Mengnan^{1,2}, WANG Jian^{1,3}, WANG Jun^{1,3}, YAN Jizhou^{1,2,3,4*}

(¹College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ²Shanghai Satang Biotechnology Co., LTD, Shanghai 201318, China; ³Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources of the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; ⁴Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract The complete regeneration of tissues and organs is still a hot topic in regenerative medicine. There is increasing evidence that macrophage polarization (M1 and M2 types) play an important role in the inflammatory repair phase induced by trauma. This study investigates the putative macrophage polarization in the lower jaw regeneration of zebrafish. Firstly, the distribution of macrophages was observed by *in vivo* fluorescence photography and immunohistochemistry of transgenic zebrafish specifically labeled with macrophages. Then, the cluster analyses on transcriptome data-based key time points of lower jaw regeneration were performed, and compare with the expression profile of classic M1/M2 macrophage cytokines, and qRT-PCR was used for detection. Finally, mi-

收稿日期: 2021-12-18

接受日期: 2022-05-05

上海市教委水产学高峰学科项目(批准号: A1-2035-17-0001B3-12)和上海市中华绒螯蟹现代农业产业技术体系建设项目(批准号: 沪农科产字2021-4号)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15692166669, E-mail: jyan2@shou.edu.cn

Received: December 18, 2021

Accepted: May 5, 2022

This work was supported by the Aquatic Science Summit Project of Shanghai Education Commission (Grant No.A1-2035-17-0001B3-12), and Shanghai Chinese Mitten Crab Modern Agricultural Tural Industrial Technology System Construction Project (Grant No.Hnkc21-4)

*Corresponding author. Tel: +86-15692166669, E-mail: jyan2@shou.edu.cn

croinjection and RNA-seq were combined to analyze the effects on LPS+IFN- γ , IL-4, dexamethasone, and NaCl on blastema regeneration processes. The results confirmed the dynamic involvement of macrophages in lower jaw regeneration, and there were classical M1-type and partial M2-type polarization reactions during the inflammatory reaction stage of the lower jaw blastema regeneration in zebrafish, and certain M2-type factors were highly expressed during the blastema tissue reconstruction stage. According to the diverse induction of the typical M1 and M2-type cytokines, a new blastema regeneration-based macrophage polarization mode was proposed: M1.5 type, M2 (+) type, and putative LPS/IFN- γ and IL-4 signaling pathways. The microinjection results showed that sole microinjection LPS+IFN- γ , IL4 or dexamethasone was detrimental to the blastema regeneration. Thus, this study will provide new insight into macrophage polarization-mediated tissue regeneration researches.

Keywords lower jaw regeneration; macrophage polarization; qRT-PCR; microinjection; signaling pathways

组织再生一直是再生医学研究的重要课题, 现组织与器官的再生也是人类长久以来的梦想。但再生过程十分复杂, 受多种细胞、细胞外基质以及调控因子的共同影响。斑马鱼作为再生能力极强的模式生物, 心脏、尾鳍、下颌等组织在受损一定程度后均可完全再生, 其中下颌在剪切 1/3 后的 2 个月内就能够完全再生, 剪切后 0 h、2 h、2 天和 5 天是下颌再生的四个关键时间点, 分别代表剪切初始期、炎症急性期、芽基形成起始期和芽基组织再建期^[1]。下颌受损后完全再生的过程涉及到一系列炎症反应, 但其再生过程中的基因表达情况和具体调控机制并不清楚。

巨噬细胞作为造血系统中功能最丰富的细胞, 具有可塑性和异质性等特征^[2-4], 在机体受到损伤时, 可立即迁移到发炎组织清除微生物, 修复受损组织^[5]。根据不同的活化状态和激活机制, 巨噬细胞分为经典活化的 M1 型以及替代性活化的 M2 型, 这两种分型代表了巨噬细胞动态变化的两个极端^[6]。其中 M1 型通过 IFN- γ 刺激, 暴露于微生物触发器如脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 产生促炎表型, 分泌促炎细胞因子, 如白细胞介素 il1 β 、il12、il6、il18、il23, 肿瘤坏死因子 tnfa 等^[7], 发挥促炎作用。而 M2 型通过暴露于 il4、il13、il10 等触发器, 产生抗炎表型, 释放抗炎细胞因子如白细胞介素 il4、il13、il10 和转化生长因子 tgf- β , 参与炎症消退、过敏反应、抗寄生虫反应和组织重塑等进程^[8-11], 在促进组织修复和重建、血管生成、伤口愈合和肿瘤进展中起重要作用^[12-13]。此前, 有研究表明 M1/M2 型巨噬细胞与很多疾病有关, 如炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)^[14-17]、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)^[18]、多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS)^[19-20]、类风湿性关节炎 (rheumatoid

arthritis, RA)^[21]、1 型糖尿病^[22-24]、心脑血管疾病^[25-26]等。迄今为止, 已经有几种研究较为成熟的信号通路, 如 IRF/STAT、C-JunN-terminalkinase (JNK)、PI3K/Akt、Notch 等, 它们能够介导众多细胞因子间的相互作用, 调控巨噬细胞不同表型之间的极化^[27-29], 但巨噬细胞极化的概念目前相对较新, 仍有更多的表型标记物和细胞因子分泌谱有待发现, 从 M1 向 M2 动态转变的机制仍有待于进一步研究完善。

本研究采用斑马鱼下颌为研究对象, 通过活体荧光拍照、免疫组化、qRT-PCR、显微注射等方法以及 RNA 测序和生物信息学分析手段, 观察巨噬细胞在下颌再生过程中的表达变化情况, 揭示经典 M1/M2 型巨噬细胞因子在下颌芽基再生过程中的表达规律, 研究 M1/M2 不同表型之间的动态转变机制, 不仅为组织再生医学的研究提供新思路, 同时对阐明一些以巨噬细胞功能和极化为基础的疾病的分子理论基础以及设计新型巨噬细胞介导的治疗和诊断策略具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用鱼 CZ98[*ihb20Tg, Tg(mpeg1:EGFP)*] 品系的转基因斑马鱼由上海海洋大学海洋生物系统和神经科学研究所范纯新老师提供, 该品系由编码巨噬细胞特异表达基因 1 (macrophage expressed gene 1, *mpeg1*) 启动子驱动绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达, 用于特异标记巨噬细胞。TB 品系成年斑马鱼为实验室人员自行繁育, 在上海海圣斑马鱼养殖系统中以 28 °C、14 h/10 h 昼夜节律饲养, 按照上海海洋大学动物保护与使用委员会的指导方针 (批准号: SHOU-DW-2012-082) 饲养并用于

实验。使用0.05% MS-222麻醉斑马鱼后,用手术直剪剪去其下颌前端约1/3,放入养殖系统中继续饲养,在剪切后0 h、4 h、2天和5天进行下颌取材。

1.1.2 实验试剂 MS-222、TRIZOL、氯仿(trichloromethane)、异丙醇(isopropanol, IPA)、无水乙醇、氯化钠(sodium chloride, NaCl)、OCT冰冻切片包埋剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; cDNA Synthesis Super Mix、UNICON qPCR SYBR Green Master Mix、Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、Alexa Fluor 594 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)购自上海翊圣生物科技有限公司; IL-1 β 抗体购自Proteintech公司; Macrophage Marker(CD11b、CD68、CD163、CD14、CD16) Antibody Panel购自Abcam公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、 γ 干扰素(interferon-gamma, IFN- γ)细胞因子、白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)细胞因子购自Sino Biological公司; 地塞米松磷酸钠注射液购自上海缔彩科贸有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CZ98[*ihb20Tg*, *Tg(mpeg1:EGFP)*]斑马鱼活体拍照 使用0.05% MS-222麻醉1条CZ98[*ihb20Tg*, *Tg(mpeg1:EGFP)*]斑马鱼,在剪去其下颌1/3后的0 h、4 h、2天和5天用倒置荧光显微镜(Zeiss)对其进行拍照,观察巨噬细胞的荧光分布情况,并用ImageJ软件进行荧光定量。

1.2.2 下颌再生转录组数据的聚类分析 使用实验室前期所得斑马鱼下颌再生四个关键时间点(0 h、2 h、2天和5天)的转录组数据(NCBI accession number: SRA048162.1),根据log FPKM的均值,使用R语言k-means函数对基因进行聚类,把具有相同表达模式的基因聚集在一起,同组内的基因可能具有相似的功能或参与相同的生物学过程。并使用dist函数计算基因间的欧氏距离,距离值越小说明两基因表达模式越接近。同时,观察其中经典M1/M2型巨噬细胞因子在下颌再生0 h、2 h、2天和5天的表达情况及变化规律。

1.2.3 qRT-PCR 使用TRIZOL提取剪切0 h、4 h、2天和5天后的下颌总RNA,使用逆转录试剂盒将总RNA反转录为cDNA。以上述cDNA为模板,用SYBR[®]试剂在ABI Prism 7500 PCR仪中进行qRT-PCR反应,检测经典M1/M2型巨噬细胞因子的表达情况。以斑马鱼 *actin-beta1* 作为内参,使用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法

处理qRT-PCR数据。数据分析及相关作图通过IBM SPSS statistics 20.0软件完成。

1.2.4 冰冻切片及免疫组化 使用手术直剪剪去TB斑马鱼下颌的1/3,在0 h、4 h、2天和5天后剪取伤口处下颌组织进行固定与梯度脱水处理,加入OCT包埋后进行8 μ m匀速冰冻切片。玻片用4% PFA固定冲洗后加封闭液(1% BSA + 0.3% Triton X-100, PBS)室温封闭1 h,然后加入以1:100稀释的IL-1 β 抗体和巨噬细胞标志抗体组合(CD11b、CD68、CD163、CD14、CD16),4 $^{\circ}$ C湿盒孵育12 h。清洗后加入以1:200稀释的山羊抗兔荧光标记二抗,25 $^{\circ}$ C孵育1 h,DAPI封片,使用倒置荧光显微镜(Zeiss)拍照观察,并使用ImageJ软件进行荧光信号定量。

1.2.5 下颌显微注射与电转 使用0.05% MS-222麻醉斑马鱼,剪去其下颌1/3,2天后,使用显微注射仪在下颌受损部位注射0.25 mg/mL M1型刺激因子LPS+IFN- γ 、M2型刺激因子IL-4以及地塞米松磷酸钠注射液,同时注射0.9% NaCl作为对照组,每组5条鱼。分别注射1 μ L至伤口的左侧、中间和右侧。为了增强注射效率,分别把钨针正负极放到下颌的腹、背处进行电转,待循环结束后,放入干净的水中饲养。

1.2.6 转录组测序及数据处理 收集显微注射三组不同刺激因子组和生理盐水对照组2天后的斑马鱼下颌,提取总RNA进行转录组测序分析,由金唯智生物科技有限公司完成。使用Cutadapt(version 1.9.1)软件对显微注射后转录组中的低质量数据进行过滤,去除污染及接头序列。使用Htseq软件(V 0.6.1)计算基因表达量FPKM(Fragments Per Kilobases per Million reads)^[30]。然后检测样品间基因表达水平的相关性,使用Pearson相关系数表示两个变量间的相关程度和方向,相关系数的绝对值范围在0~1,绝对值越大,两变量之间关系越亲密。

1.2.7 差异表达基因的筛选 使用DESeq2(V 1.6.3)软件进行基因差异分析^[31],对检测结果按照差异显著性标准(差异基因表达变化2倍以上且 $P < 0.05$)进行筛选,统计各组间的显著差异表达基因。

1.2.8 差异表达基因的GO功能注释 使用Gene Ontology(www.geneontology.org, GO)数据库描述转录组基因的分子功能、细胞组分和参与的生物过程。通过GO seq方法对差异基因进行GO功能显著性富

集分析,使用GO功能条目柱状图直观地反映差异基因在GO term上的显著富集情况。

1.2.9 差异表达基因的KEGG富集分析 通过Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(www.genome.jp/kegg/pathway.html, KEGG)公共数据库筛选差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。以KEGG Pathway为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著性富集($P<0.05$)的信号通路,从而预测并构建M1/M2型巨噬细胞极化的信号通路。

2 结果

2.1 巨噬细胞动态参与下颌再生过程

为了验证巨噬细胞是否参与下颌再生,我们利用转基因斑马鱼观察荧光标记的巨噬细胞在下颌剪切0 h、4 h、2天和5天后的分布情况。发现巨噬细胞在下颌伤口处新生表层、下颌骨、下颌肌肉处(图1a、图1d、图1g和图1j)、眼睛和鳃部(图1b、图1e、图1h和图1k)及腹部(图1c、图1f、图1i和图1l)呈动态分布。相比剪切初始(0 h),巨噬细胞在头部的4 h、2天、5天的荧光均有不同程度的显著增强。在下颌的4 h和5天荧光信号最强。在腹部,4 h和5天荧光同样显著增强,在2天有所减弱。这些结果综合表明巨噬细胞动态参与下颌再生,不仅在损伤的组织,在其他多个部位的炎症急性期(4 h)和组织再建期(5天)也显著增多。

2.2 经典M1/M2型细胞因子在下颌再生转录组中的表达模式

为了明确巨噬细胞在下颌再生过程中的表达模式,分析了实验室前期已发表的斑马鱼下颌再生关键时间点的转录组数据,得到了所有转录组基因在下颌再生0 h、2 h、2天、5天的表达量,用FPKM值表示。结果发现其中存在很多经典M1型巨噬细胞因子如*il1b*(图2A)、*il12a*、*il23r*、*tnfb*、*ifnglr*(图2B)具有相同表达趋势,均在下颌再生的炎症急性期2 h上调,芽基形成期2天下调,由于*il1b*的表达量远高于其他几个基因,所以在图2中单独列出。而经典M2型巨噬细胞因子的表达趋势产生差异,其中白介素家族的*il4*、*il13*、*il10*变化趋势相同,均在2 h显著上调,2天和5天持续下调(图3A),而转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)家族的*tgfb1*、*tgfb2*、*tgfb3*、*tgfb2*总体在2天下调,5天显著上调(图

3B)。

2.3 qRT-PCR验证经典M1/M2型细胞因子在下颌再生过程中的表达

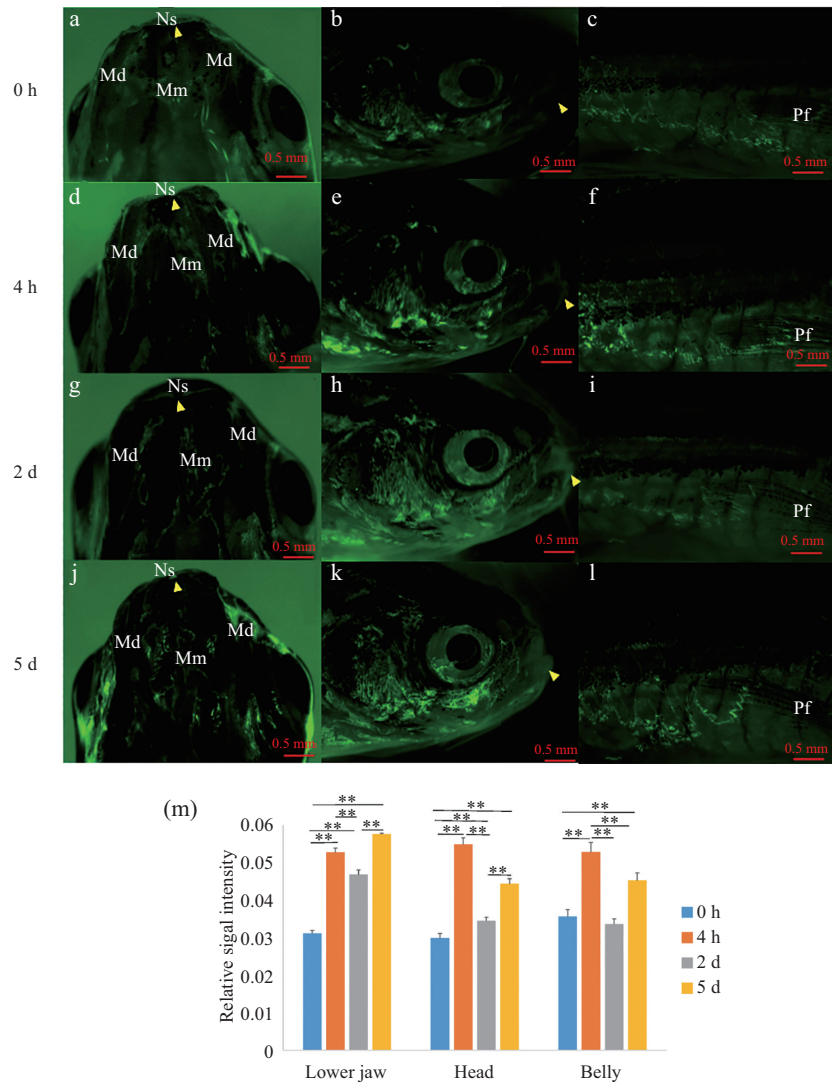
通过qRT-PCR检测了经典M1/M2型细胞因子在下颌再生0 h、4 h和5天的表达变化。结果发现,与剪切初始0 h相比,经典M1型细胞因子中的白介素*il1b*、*il12a*、*il23r*在4 h表达显著上调,相比4 h,在5天均显著下调,而肿瘤坏死因子*tnfb*和干扰素*ifnglr*与其表达趋势恰好相反,在4 h显著下调,在5天显著上调(图4)。经典M2型细胞因子中的白介素*il4*和*il10*在4 h和5天均显著上调。另一个白介素*il13*与转化生长因子*tgfb1*、*tgfb2*表达趋势一致,在4 h显著下调而在5天显著上调(图5)。除了*il10*外,其他因子均在5天时的表达水平最高。

2.4 下颌再生过程中巨噬细胞极化分类模式

通过对下颌再生过程中0 h、2 h、2天、5天四个时间点的转录组聚类分析,把具有相同表达模式的基因分为10类(cluster 1~10)(图6)。根据2.3所得qRT-PCR结果,选取经典M1型巨噬细胞因子*il12a*、*il23r*和经典M2型巨噬细胞因子*il10*、*tgfb1*为目标基因,筛选与目标基因欧氏距离最近的前30个基因(附表1~附表4)。发现*il12a*聚类的基因的主要为1、3、4类,*il23r*聚类的基因主要为1、4类。M2中*il-10*聚类的基因主要为2、3类,这几类基因均在2 h上调,2天下调。与*tgfb1*聚类的基因主要为5、6、8类,这些基因均在5天上调。因此,筛选聚类在1、2、3、4类的基因,选取其中在0~2 h呈2倍上调的基因,在本研究中归为M1.5型,主要在炎症急性期急剧上调表达。筛选聚类在5、6、8类的基因,选取其中在2天~5天呈2倍上调的基因,在本研究中归为M2(+)型(表1),主要在炎症修复期急剧上调表达,猜测这类基因在斑马鱼下颌芽基再生中发挥抗炎作用,可促进组织修复。

2.5 免疫组化验证斑马鱼下颌再生过程中巨噬细胞极化模式

为了明确巨噬细胞极性在下颌再生过程中的作用,进一步通过切片免疫组化检测了IL-1 β 和多个巨噬细胞标志分子组合(CD11b、CD68、CD163、CD14、CD16)在下颌再生过程中的表达情况。发现巨噬细胞在下颌剪切后0 h(图7a),已经大量分布在下颌肌肉,在4 h时聚集在下颌伤口处(图7c),在2天时大量分布在整個下颌新生表层(图7e),且荧光信号显著高于其他三个时间点(图7i)。在5天时,巨

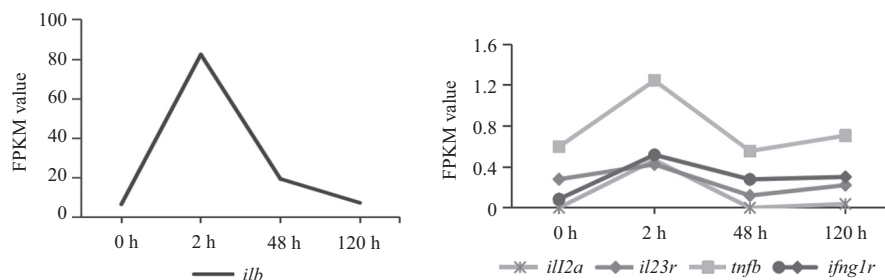


a, d, g, j: 斑马鱼下颌腹面观; b, e, h, k: 斑马鱼头部侧面观; c, f, i, l: 斑马鱼腹部。黄色三角标记为下颌伤口处。绿色荧光(EGFP)为巨噬细胞。Ns: 新生表层; Md: 下颌骨; Mm: 下颌肌肉; Pf: 胸鳍。m: 荧光定量柱状图。横坐标表示斑马鱼的三个部位, 纵坐标表示荧光信号相对强度。** $P < 0.01$ 。

a, d, g, j: the ventral view of the lower jaw of zebrafish; b, e, h, k: side view of zebrafish head; c, f, i, l: posterior ventral of the pectoral fin of zebrafish. The yellow triangle marks the jaw wound. Macrophages are shown in green fluorescence (EGFP). Ns: new surface; Md: mandible; Mm: mandible muscle; Pf: pectoral fin. m: the bar graph of fluorescence quantitative. The abscissa represents the three parts of zebrafish, and the ordinate represents the relative intensity of the fluorescence signal. ** $P < 0.01$.

图1 巨噬细胞在斑马鱼下颌再生过程中的动态分布

Fig.1 Dynamic distribution of macrophages during lower jaw regeneration in zebrafish

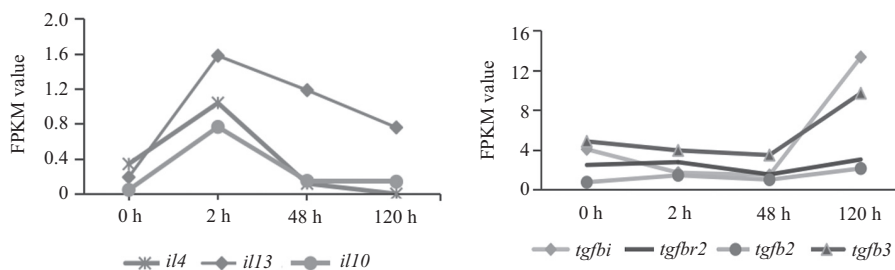


横坐标代表下颌再生四个关键时间点; 纵坐标表示FPKM值。

Abscissa represents four critical time points of jaw regeneration; the ordinate represents the FPKM value.

图2 经典M1型巨噬细胞因子在斑马鱼下颌再生关键时间点的基因表达趋势

Fig.2 The gene expression trend of traditional M1 macrophage cytokines at key timepoints of lower jaw regeneration in zebrafish

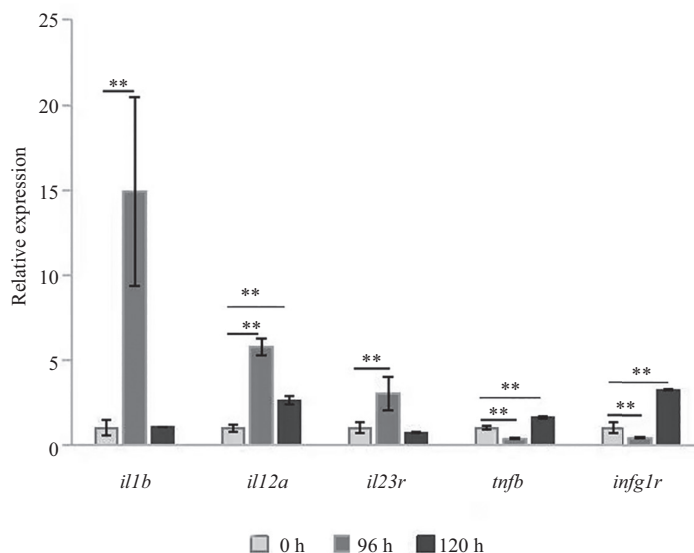


横坐标代表下颌再生四个关键时间点; 纵坐标表示FPKM值。

The abscissa represents four critical time points of jaw regeneration; the ordinate represents the FPKM value.

图3 经典M2型巨噬细胞因子在斑马鱼下颌再生关键时间点的基因表达趋势

Fig.3 The gene expression trend of traditional M2 macrophage cytokines at key time points of lower jaw regeneration in zebrafish

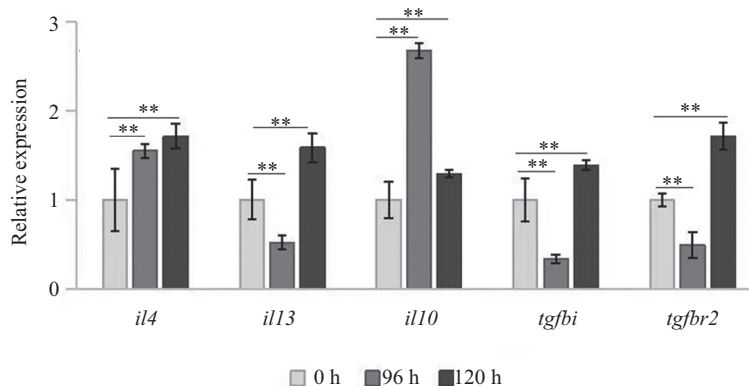


横坐标为基因名, 纵坐标为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值。在组间做了显著性差异分析, $**P<0.01$; 无标记表示两组之间无显著差异。

The abscissa represents gene, ordinate is $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mean value. Significant difference was analyzed between groups, $**P<0.01$; no marker indicated no significant difference between the two groups.

图4 经典M1型巨噬细胞因子在斑马鱼下颌再生关键时间点的基因表达变化

Fig.4 Changes in gene expression of traditional M1-type macrophage cytokines at key time points of lower jaw regeneration in zebrafish

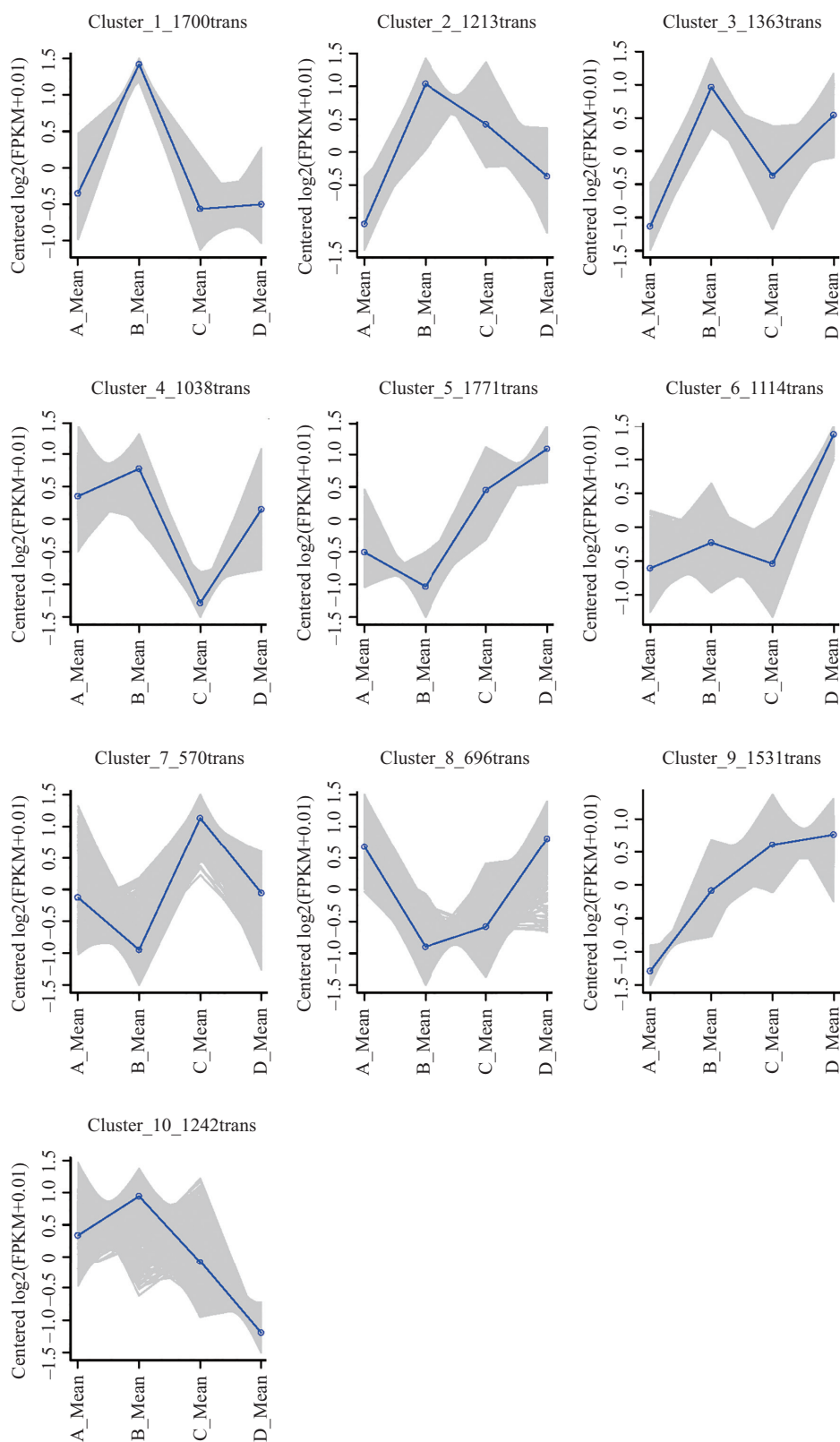


横坐标为基因名, 纵坐标为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均值。在组间做了显著性差异分析, $**P<0.01$; 无标记表示两组之间无显著差异;

The abscissa represents gene, ordinate is $2^{-\Delta\Delta Ct}$ mean value. Significant difference was analyzed between groups, $**P<0.01$; No marker indicated no significant difference between the two groups.

图5 经典M2型巨噬细胞因子在斑马鱼下颌再生关键时间点的基因表达变化

Fig.5 Changes in gene expression of traditional M2-type macrophage cytokines at key time points of lower jaw regeneration in zebrafish



横坐标中的A_Means、B_Means、C_Means、D_Means分别代表下颌再生四个关键时间点0 h、2 h、2天、5天, 纵坐标为标准化后的对数水平的FPKM值。

A_Means, B_Means, C_Means and D_Means in the abscissa respectively represent the four key time points of lower jaw regeneration: 0 h, 2 h, day 2 and day 5, and the Y axis are normalized logarithmic FPKM.

图6 斑马鱼下颌再生关键时间点转录组的聚类分析

Fig.6 Cluster analysis of transcriptome at key time points of lower jaw regeneration in zebrafish

表1 斑马鱼下颌芽基再生中巨噬细胞极化的分类

Table 1 Classification of macrophage polarization in regeneration of lower jaw blastema in zebrafish					
M1.5		M1.5		M2(+)	
<i>il12a</i> & <i>il23r</i> 聚类基因 Genes clustered with <i>il12a&il23r</i>	聚类类型 Clustering type	<i>il10</i> 聚类基因 Genes clustered with <i>il10</i>	聚类类型 Clustering type	<i>tgfb1</i> 聚类基因 Genes clustered with <i>tgfb1</i>	聚类类型 Clustering type
<i>nog2</i>	1	<i>il-10</i>	2	<i>tgfb1</i>	8
<i>irak4</i>	3	<i>foxh1</i>	2	<i>igfbp7</i>	8
<i>ifrd1</i>	3	<i>eam2</i>	3	<i>pdgfaa</i>	6
<i>sall4</i>	1	<i>sall1a</i>	2	<i>smad6a</i>	8
<i>tlr9</i>	3	<i>crfb4</i>	2	<i>pdgfr1</i>	6
<i>Nr1h4</i>	3	<i>bmp6</i>	2	<i>tbx2b</i>	8
<i>jagn1a</i>	3	<i>lingo4b</i>	3	<i>igfbp5a</i>	8
<i>fgf23</i>	1	<i>tdp2b</i>	3	<i>tnfrsf19</i>	8
<i>sostdc1b</i>	1	<i>relt</i>	3	<i>sox2</i>	8
<i>flt4</i>	1	<i>tgif1</i>	3	<i>nrp2b</i>	6
<i>inhibab</i>	1	<i>flcn</i>	3	<i>zgc:113531</i>	8
<i>at11</i>	1	<i>mstna</i>	3	<i>thbs4b</i>	6
<i>bmp7a</i>	3	<i>mapkapk2a</i>	2	<i>tnfsf10l3</i>	5
<i>fgf14</i>	2	<i>tnfrsf9a</i>	3	<i>grem1a</i>	6
<i>ppp4cb</i>	1	<i>il-6r</i>	2	<i>bmp4</i>	6
<i>tnfa</i>	1	<i>il-17a/f3</i>	3	<i>fst11a</i>	8
<i>traf3</i>	4	<i>si:ch211-158d24.4</i>	3		
<i>igf2bp3</i>	1	<i>ifnphil</i>	3		
<i>pparab</i>	4	<i>smn1</i>	2		
<i>f2</i>	1	<i>rel</i>	2		
<i>dharma</i>	4	<i>cd40lg</i>	3		
<i>ins</i>	4	<i>il-12rb2</i>	2		
<i>szl</i>	4				
<i>fgf8b</i>	1				
<i>bdnf</i>	1				
<i>lingo4a</i>	4				
<i>dab2</i>	4				
<i>ntrk2b</i>	1				
<i>tgfa</i>	4				

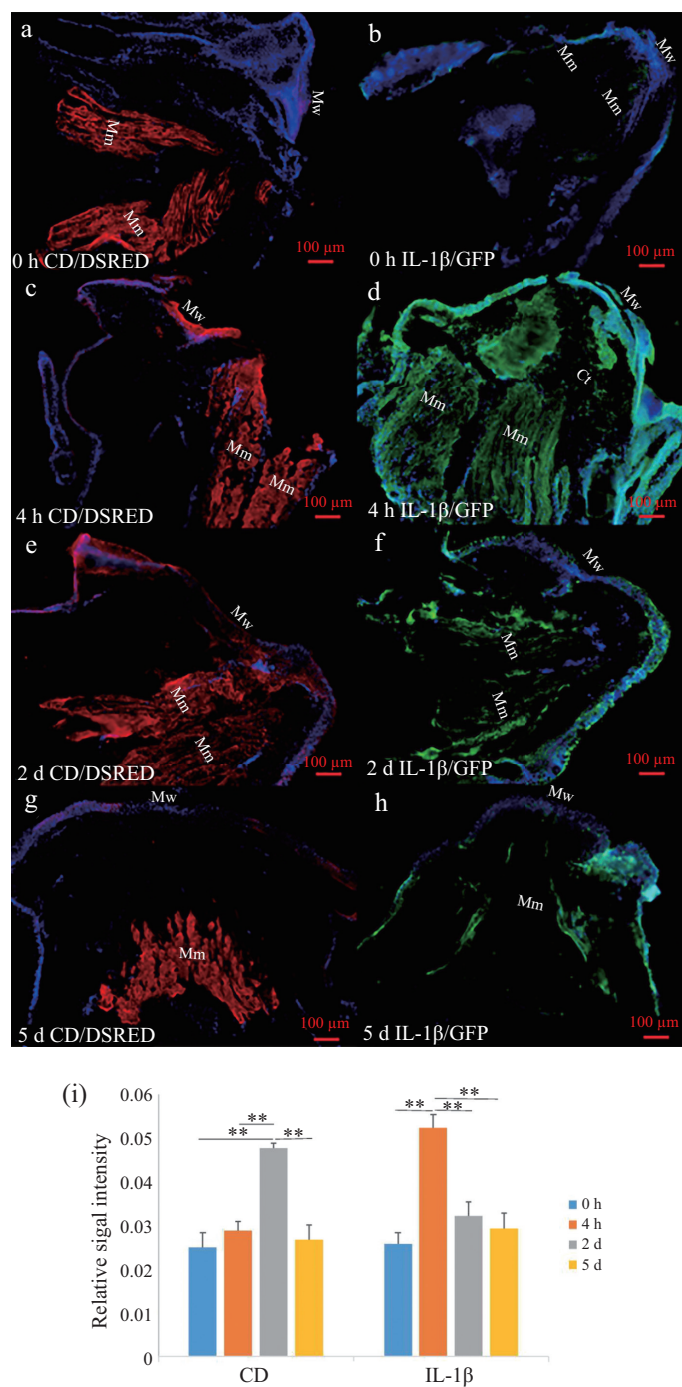
噬细胞在肌肉仍明显分布,但在表层部分的荧光分布减少,荧光强度减弱(图7g),可能是巨噬细胞表型发生改变的结果。相对于巨噬细胞标志抗体荧光信号在炎症急性期(4 h)的增强,在芽基形成初始(2天)达到顶峰,在组织再建期(5天)减弱。IL-1β的荧光信号在炎症急性期(4 h)(图7d)显著增强,在芽基形成起始(2天)(图7f)和组织再建期(5天)(图7h)的表达逐渐减弱。这与转录组测序中的经典M1型巨噬细胞因子*il1b*的表达模式一致,均在炎症急性期(4 h)表达最高。

2.6 巨噬细胞极化相关调控通路预测

2.6.1 转录组相关性分析 通过下颌显微注射0.9% NaCl、LPS+IFN-γ、IL-4以及地塞米松磷酸钠注射液2天后的转录组测序,得到了所有转录组基因的表达量FPKM值,将三个实验组与注射0.9% NaCl对

照组比对,筛选出了各组的显著差异表达基因180、201、151个($P<0.05$)。通过相关性检验,发现对照组与LPS+IFN-γ组、IL-4组和地塞米松组的相关性系数分别为0.89、0.96、0.97,表明各组基因显著相关,且IL-4组与LPS+IFN-γ组相关方向相反,与地塞米松组相关方向相同(图8)。这与文献所述各组刺激因子的功能相对应,即LPS和IFN-γ诱导巨噬细胞向M1型极化^[32],而IL-4诱导巨噬细胞向M2型极化^[3],地塞米松作为一种免疫抑制剂,通过抑制促炎巨噬细胞活化来限制炎症放大,并进一步诱导抗炎单核细胞和巨噬细胞群积极促进炎症缓解,即抑制巨噬细胞向M1型表达而诱导向M2表型分化^[33-34]。

2.6.2 转录组GO分析 通过对显微注射后的差异表达基因进行GO(Gene Ontology)分析,得到了各组差异基因显著富集的GO功能条目。GO富集结果显



图a、c、e、g的红色荧光为巨噬细胞标志组合抗体(CD11b、CD68、CD163、CD14、CD16)在下颌再生四个关键时间点的表达。图b、d、f、h的绿色荧光为IL-1β的表达。蓝光为DAPI染色。Mw: 下颌伤口; Mm: 下颌肌肉; Ct: 结缔组织。i: 免疫组化的荧光定量结果。横坐标表示抗体名称, 纵坐标表示荧光信号相对强度。** $P < 0.01$ 。

DSRED in figure a,c,e,g show the expression of macrophage marker antibody panel (CD11b, CD68, CD163, CD14, CD16) at four key time points of the lower jaw regeneration. GFP in b,d,f,h: the expression of IL-1β. Blue light is DAPI staining. Abbr. Mandibular wound; Mm: mandible muscle; Ct: connective tissue. i: the fluorescent quantitative results of immunohistochemistry. The abscissa represents the antibody, and the ordinate represents the relative intensity of the fluorescence signal. ** $P < 0.01$.

图7 斑马鱼下颌再生过程中IL-1β抗体和巨噬细胞标志抗体组合的表达

Fig.7 Expression of IL-1β antibody and macrophage marker antibody panel during jaw regeneration in zebrafish

示, 与对照组相比, 注射LPS+IFN-γ组后, 显著富集的GO功能条目主要涉及钙、铁离子的结合, 以及许多蛋白如糖蛋白、血红蛋白、细胞因子、前列腺素

E合酶、角鲨烯单氧酶的活性, 参与氧运输、跨膜转运体活动、特异性DNA结合转录因子活性的转录负调控、骨骼肌纤维的装配、肌球蛋白与肌动蛋白

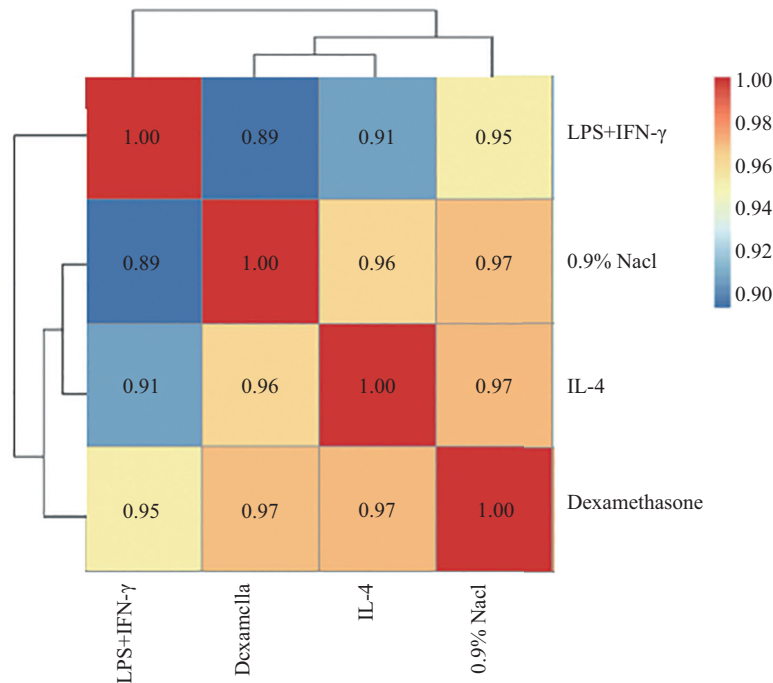


图8 四组转录组测序样本间基因表达水平的相关性
Fig.8 Correlation of gene expression levels between four transcriptome sequencing samples

的相关组装、巨噬细胞趋化、后脑-脊髓边界形成、应激反应、对病毒的防御反应以及IL-1受体结合等生物进程。

注射IL-4后显著富集的GO功能条目涉及金属内肽酶、精氨酸酶、 β -1,4-甘露糖蛋白4- β -N-乙酰氨基葡萄糖转移酶以及结构分子的活性,参与细菌的应答、心肌收缩、胚系干细胞的维护、RNA5'的加工、肉芽肿形成的正向调控、SMAD蛋白复合物组装的负调控等生物进程。

注射地塞米松后,显著富集的GO功能条目主要涉及脂肪酸以及许多蛋白如清道夫受体以及氧化还原和分解代谢相关的酶的活性与合成,参与蛋白质的绑定与桥接、有氧呼吸、前肾发展、胚胎前肠形态发生、病原相关分子模式依宿主先天免疫反应的共生诱导等生物学进程。

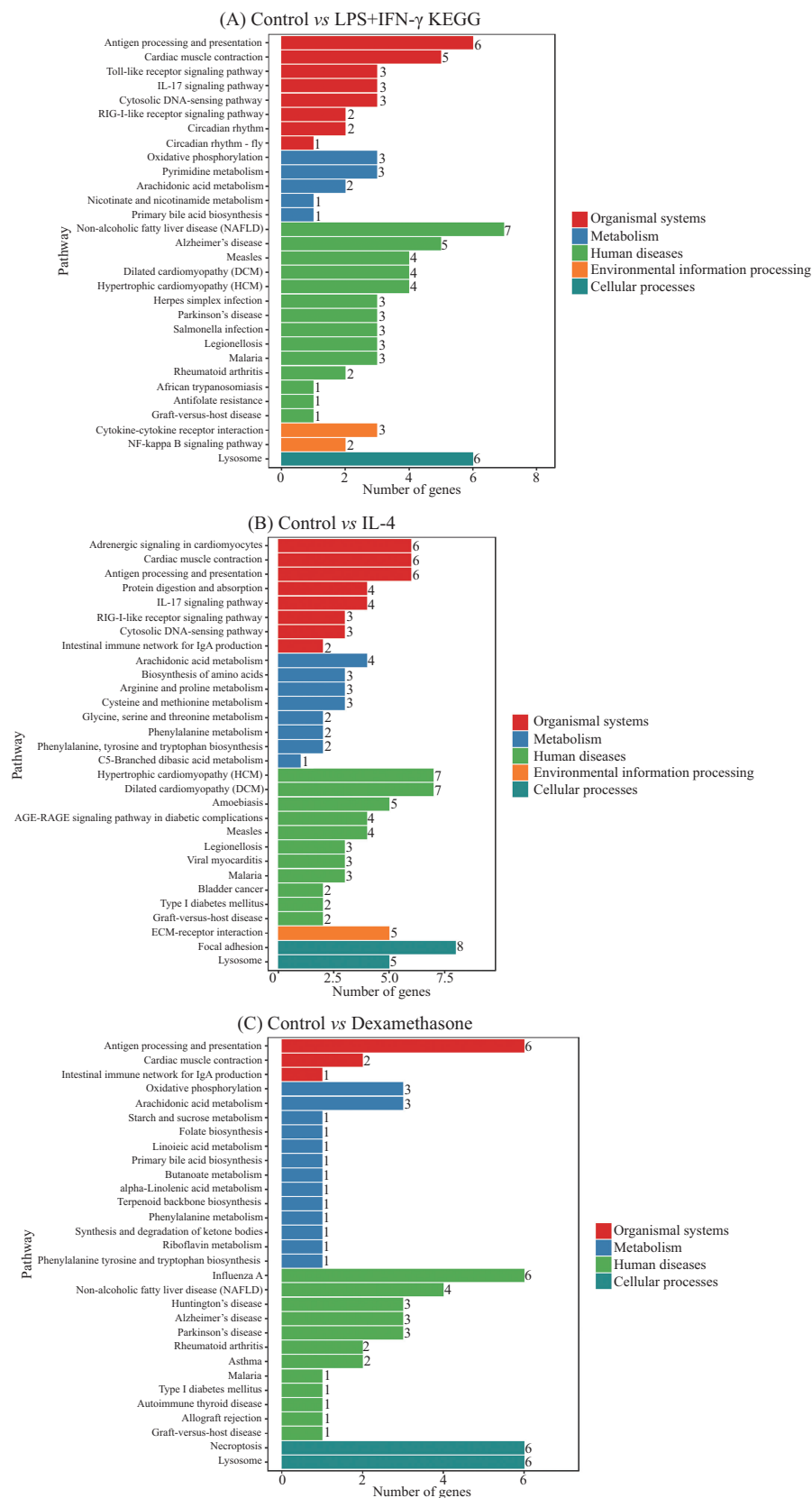
三组差异基因所显著富集的GO功能条目均涉及糖蛋白、钙离子的结合,以及氧运输、应激反应、对细菌的防御、骨骼肌纤维的装配、肌球蛋白与肌动蛋白的组装等生物学进程。

2.6.3 转录组KEGG分析 通过KEGG Pathway显著性富集确定了差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。如图9中A、B、C所示,分别为注射LPS+IFN- γ 、IL-4、地塞米松和对照组相

比的差异基因显著富集的信号通路,筛选了每组富集最显著的30条通路条目。

注射LPS+IFN- γ 后,显著富集的通路主要涉及Toll样受体信号通路、昼夜节律、嘌呤嘧啶代谢缺陷、烟酸和烟酰胺代谢、初级胆汁酸的生物合成、单纯疱疹感染、沙门氏菌感染、非洲锥虫病、抗叶酸拮抗、细胞因子与受体的相互作用以及NF-KappaB信号通路。其中*il1b*与干扰素调节因子7(*irf7*)共同聚集在Toll样受体信号通路、麻疹、胞质DNA感知通路中,与*cxcl8a*共同富集在疟疾、Toll样受体信号通路、军团杆菌病、沙门氏菌感染、非酒精性脂肪肝中,与*mmp13a*共同富集在IL-17信号通路中。

注射IL-4后,显著富集的通路涉及心肌细胞中的肾上腺素能信号、蛋白质消化吸收、各类氨基酸的生物合成、阿米巴病、糖尿病并发症中的AGE-PAGE信号通路、病毒性心肌炎、膀胱癌、ECM受体相互作用和黏着斑。其中*arg2*显著富集在精氨酸生物合成以及精氨酸和脯氨酸代谢通路。与LPS+IFN- γ 组相比,发现*fosab*基因显著富集在昼夜节律、破骨细胞分化、c5支链二元酸代谢、单纯疱疹感染、rna降解、结直肠癌、类风湿性关节炎、Th17细胞分化、IL-17细胞分化、催产素信号通路、乳腺癌、toll样受体信号通路、T细胞受体信号通路、TNF信



A: 注射LPS+IFN- γ 组; B: 注射IL-4组; C: 注射地塞米松组; 纵坐标表示显著富集的通路名称, 横坐标表示富集基因个数。

A: LPS+IFN- γ group. B: IL-4 injection group. C: Dexamethasone injection group. The ordinates represents the pathway names that were significantly enriched, and the abscissa represents the number of enriched genes.

图9 下颌显微注射后KEGG通路显著富集条形图

Fig.9 Bar chart of KEGG pathway enrichment after lower jaw microinjection

号通路、细胞凋亡、癌症中的胆碱代谢、Th1和Th2细胞分化、多巴胺能神经突触等多条信号通路。

注射地塞米松后, 显著富集的通路涉及一些糖类、维生素、脂肪酸的代谢与合成。同时涉及到甲型流感、亨廷顿舞蹈病、哮喘、自身免疫性甲状腺病、同种异体移植排斥以及坏死性凋亡等疾病。

2.7 巨噬细胞极化因子的再生治疗尝试

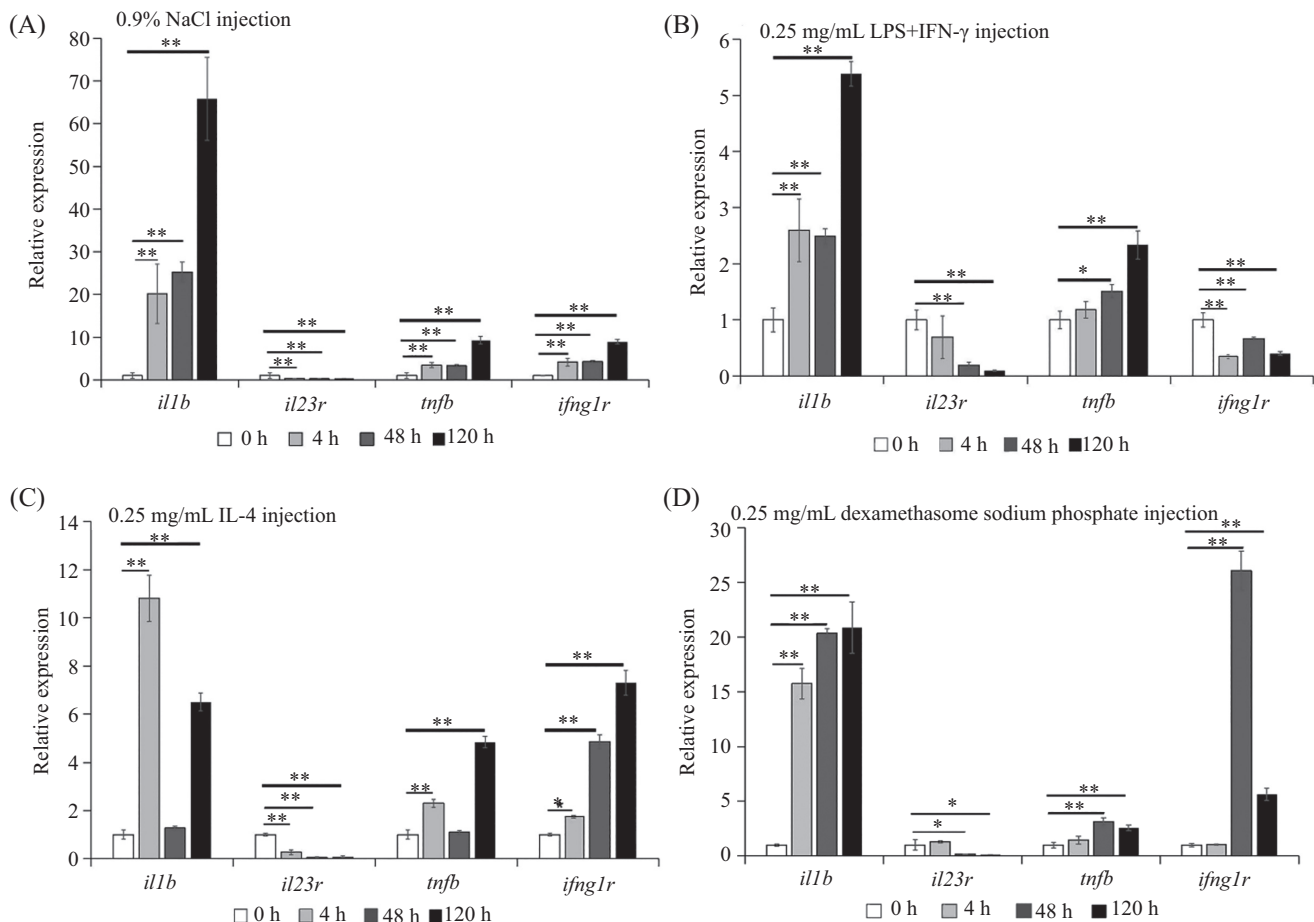
利用qRT-PCR, 检测了经典M1/M2型细胞因子在下颌注射不同刺激因子后的表达变化趋势。

结果发现, 注射0.9% NaCl后, 经典M1型细胞因子总体在4 h、2天、5天均显著上调(图10A)。经典M2型细胞因子中除了*tgfb1*只在4 h显著上调外, 其余总体在2天和5天显著上调(图11A)。表明注射0.9% NaCl后, M1/M2细胞因子在下颌再生关键时间点共

同上调, 促炎和抗炎作用共同加强, 相互调控再生过程。

注射LPS+IFN- γ 后, M1型除了其受体*ifng1r*在三时期被显著抑制外, 其他与NaCl注射组一致(图10B)。M2型总体在2天显著上调, 在5天表达出现分化, 其中*il4*、*il13*在5天显著上调而*tgfb2*和*tgfb1*在4 h和5天被显著抑制(图11B)。这表明再生过程中的促炎作用始终增强而抗炎作用部分减弱。以NaCl注射作为对照组比对后发现, M2中*tgfb1*和*tgfb2*在4 h和5天表达被抑制, 尤其是抑制了表1中归类于M2(+)抗炎型的*tgfb1*在三时期的表达, 综合表明共注射LPS和IFN- γ 可能会抑制炎症修复, 减缓组织修复进程。

注射IL-4后, M1型总体在4 h和5天显著上调(图10C)。M2型表达出现极化, 其中*il4*、*il10*、*tgfb2*

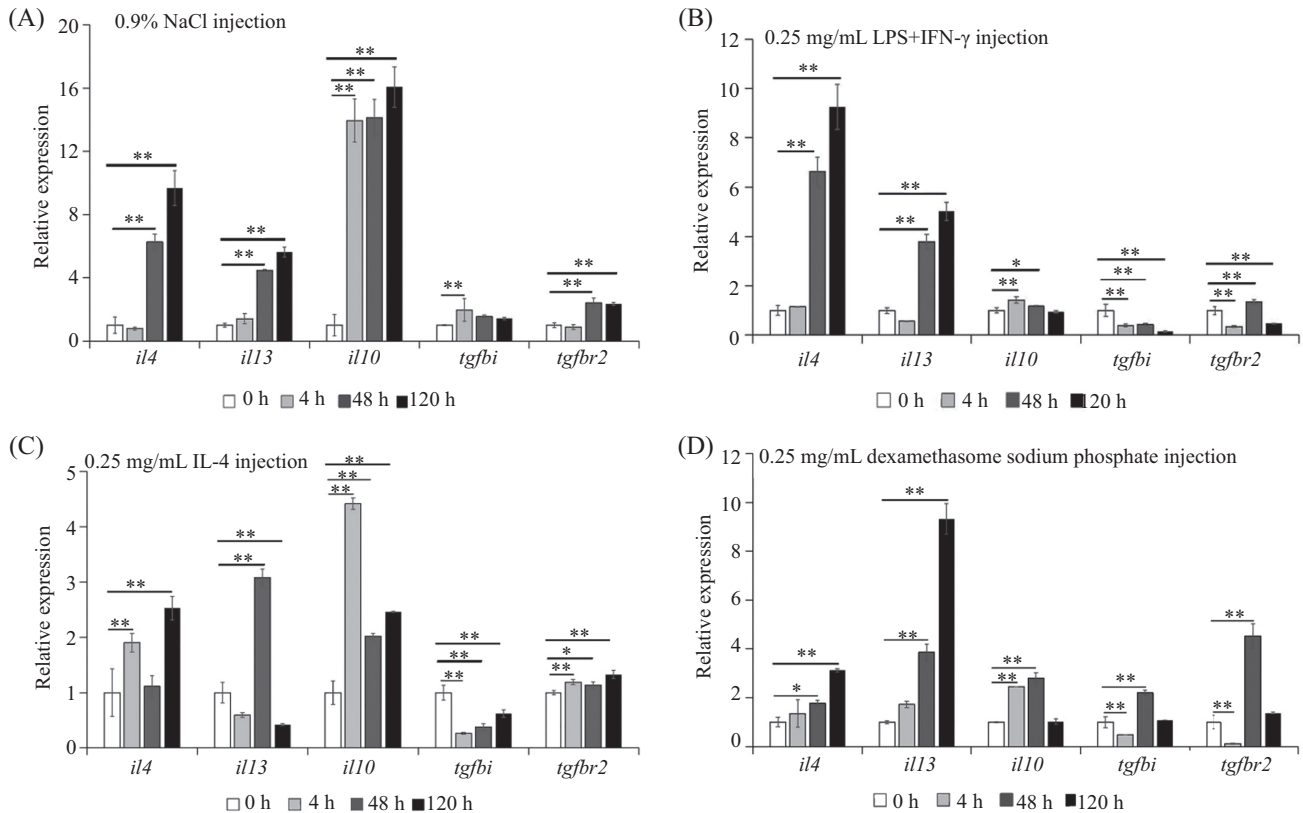


A: 注射生理盐水; B: 注射LPS和IFN- γ ; C: 注射IL-4; D: 注射地塞米松; 横坐标为基因名, 纵坐标为2^{-ΔΔCt}均值。在组间做了显著性差异分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 无标记表示两组之间无显著差异。

A: injection of normal saline. B: injection of LPS and IFN- γ . C: injection of IL-4. D: dexamethasone injection. The abscissa represents gene, the ordinate represents 2^{-ΔΔCt} mean value. Significant difference was analyzed between groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; no marker indicated no significant difference between the two groups.

图10 注射不同刺激后经典M1型巨噬细胞因子在下颌再生关键时间点的基因表达变化

Fig.10 The gene expression changes of classical M1-type macrophage cytokines at critical time points of lower jaw regeneration after injection of different stimuli



A: 注射生理盐水; B: 注射LPS和IFN-γ; C: 注射IL-4; D: 注射地塞米松; 横坐标为基因, 纵坐标为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 均值。在组间做了显著性差异分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 无标记表示两组之间无显著差异。

A: injection of normal saline; B: injection of LPS and IFN-γ; C: injection of IL-4; D: dexamethasone injection; the abscissa represents gene, the ordinate represents $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mean value. Significant difference was analyzed between groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; no marker indicated no significant difference between the two groups.

图11 注射不同刺激后经典M2型巨噬细胞因子在下颌再生关键时间点的基因表达变化

Fig.11 The gene expression changes of classical M2-type macrophage cytokines at critical time points of lower jaw regeneration after injection of different stimuli

在4 h和5天显著上调, 而*il13*和*tgfb1*被显著抑制(图11C)。表明在炎症急性期(4 h)和组织修复期(5天), 始终有促炎因子高表达而抗炎因子部分减弱。通过与NaCl注射组对比, 发现经典M1型细胞因子*il1b*、*tnfb*在2天变得下调, M2型中*il4*、*tgfb2*在4 h变得显著上调, *il13*、*tgfb1*在5天变得下调, 作为M2(+)抗炎型因子的*tgfb1*在三时期仍然被显著抑制。综合表明注射IL-4同时抑制了早期的炎症反应和后期的炎症修复, 阻碍再生进程。

注射地塞米松后, M1型总体在2天和5天显著上调(图10D)。M2型总体在2天显著上调, 5天的表达出现分化, 其中*il4*和*il13*显著上调, 其他无显著变化(图11D)。这表明促炎和抗炎作用在芽基形成起始(2天)共同增强调控下颌再生。通过与NaCl对照组对比, 发现M1型*tnfb*和*ifng1r*在4 h变得下调, M2型*il10*和*tgfb2*在5天变得下调, *tgfb1*在4 h变得下调, 2天上调。

综合表明, 注射地塞米松同时抑制前期炎症反应和后期炎症修复, 不利于组织再生进程。

3 讨论

一直以来, 巨噬细胞根据活化状态和激活机制可分为M1和M2两个动态变化的极端类型^[5], 分别发挥促炎和抗炎作用, 有研究表明它们在组织修复、血管生成、伤口愈合和肿瘤进展中起重要作用^[11-12]。我们的研究丰富了巨噬细胞在组织再生中的作用模式。

首先, 通过CZ98[*ihb20Tg*, *Tg(mpeg1:EGFP)*]转基因斑马鱼活体荧光拍照和切片免疫组化, 证实了巨噬细胞极性动态参与斑马鱼下颌再生过程。通过进一步文献查阅, 发现免疫组化检测的多个巨噬细胞标志分子中, M1型巨噬细胞能够表达高水平的CD68标记^[35], CD11b能够促进骨髓细胞发育成为

M1巨噬细胞亚型,抑制肿瘤生长。在缺乏CD11b的情况下,肿瘤中的大多数骨髓细胞发育为M2型巨噬细胞^[36]。CD163被认为是M2标志物,但在人体组织中检测发现,其必须与转录因子CMAF联合使用,才能作为M2巨噬细胞标志物。CD14作为LPS的受体,在机体的免疫反应和炎症反应过长中起到重要的作用,能够通过NF- κ B和MAPK两条信号通路引起很多经典M1型巨噬细胞因子的释放,导致脓毒症、炎症反应的发生^[37]。CD16/32在巨噬细胞的吞噬及抗原提呈过程中有重要作用^[38],这与M1型巨噬细胞功能相符。因此,猜测CD11b、CD68、CD14、CD16为M1型巨噬细胞标记,CD163为M2型细胞因子标记,这与免疫组化结果中巨噬细胞在炎症急性期(4 h)荧光增强而组织再建期(5天)减弱的结果相对应。

然后,根据转录组和qRT-PCR结果,我们提出了斑马鱼下颌芽基再生型巨噬细胞极化新的分类:M1.5型和M2(+)型,并且预测构建了四条信号通路调节模式。综合GO和KEGG分析,发现注射LPS+IFN- γ 后,*il1b*与*irf7*、*cxcl8a*共同富集,有报道称miR-142a-3p通过抑制*irf7*介导的炎症信号通路调控星状细胞的形成和分化^[39]。*cxcl8s*在急性炎症条件下的中性粒细胞招募中发挥重要作用^[40],并且*mmp9*和*mmp13*可能在斑马鱼心脏再生的炎症阶段发挥关键作用,通过激活趋化因子*cxcl8*介导白细胞招募^[41]。因此,预测LPS/IFN- γ -miR-142a-3p-*irf7*、LPS/IFN- γ -*mmp9*/*mmp13*-*cxcl8a*通路可能调控巨噬细胞向M1型极化,促进炎症反应。注射IL-4后,*arg2*和*fosab*显著富集在多条信号通路,有报道称*arg2*可能抑制哮喘气道上皮炎症相关信号^[42],通过限制M1巨噬细胞的激活和多胺代谢促进*H.pylori*的免疫逃避。而*miR101a*/*fosab*基因轴的精确时间调控对于协调斑马鱼心脏再生中的新生心肌细胞增殖和疤痕组织去除至关重要^[43]。因此,IL-4-*arg2*、IL-4-miR101a-*fosab*通路可能通过调控巨噬细胞向M2型极化,发挥抗炎作用,促进组织再生。

最后,我们尝试了巨噬细胞M1/M2关键细胞因子组合注射方式。结果发现单一极化因子注射都会阻碍早期炎症免疫和后期炎症修复。猜测根据再生时间点恰当组合后进行动态注射,可能是促进和调节再生,避免疤痕修复的可行方案。

在接下来的研究中,我们将验证每一条信号通路中的基因具体调控关系,同时探讨关键细胞因子/

刺激因子在下颌再生过程中的动态组合。

—致谢

非常感谢上海交通大学免疫学研究所李斌课题组在巨噬细胞极化分型提供信息指导。感谢上海海洋大学海洋生物系统和神经科学研究所范纯新老师提供巨噬细胞特异标记的转基因斑马鱼。

参考文献 (References)

- [1] ZHANG H, WANG X L, LÜ K L, et al. Time point based integrative analyses of deep transcriptome identify four signal pathways in blastemal regeneration of zebrafish lower jaw [J]. Stem Cells, 2015, 33(3): 806-18.
- [2] LONDON A, BENHAR I, MATTAPALLIL M J, et al. Functional macrophage heterogeneity in a mouse model of autoimmune central nervous system pathology [J]. J Immunol, 2013, 190(7): 3570-8.
- [3] GORDON S, PLUDEMANN A. Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(5): 533-40.
- [4] 赵敏, 杨丽丽, 李文林, 等.巨噬细胞及其在术后腹腔粘连中的作用[J]. 中国免疫学杂志(ZHAO M, YANG L L, LI W L, et al. Macrophages and their role in postoperative abdominal adhesion [J]. Chinese Journal of Immunology), 2019, 35(22): 2791-5.
- [5] 刘波. 慢性缺氧和心肌驻留巨噬细胞在心肌细胞增殖中作用的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [6] 刘磊, 刘作金. 骨髓间充质干细胞诱导免疫耐受的研究进展[J]. 国际检验医学杂志(LIU L, LIU Z J. Research progress of immune tolerance induced by bone marrow mesenchymal stem cells [J]. International Journal of Laboratory Medicine), 2013, 34(18): 2419-22.
- [7] 张莹佳. 含精氨酸的聚酯脲氨酯复合埃洛石材料的骨修复研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
- [8] GORDON S, TAYLOR P R. Monocyte and macrophage heterogeneity [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(12): 953-64.
- [9] ABBAS S M, SAEED M, HOSSEIN V, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 6425-40.
- [10] GHARIB S A, MCMAHAN R S, EDDY W E, et al. Transcriptional and functional diversity of human macrophage repolarization [J]. J Allergy Clin Immunol, 2019, 143(4): 1536-48.
- [11] MOSSER D M. The many faces of macrophage activation [J]. J Leukoc Biol, 2003, 73(2): 209-12.
- [12] GORDON S, MARTINEZ F O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions [J]. Immunity, 2010, 32(5): 593-604.
- [13] BISWAS S K, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [J]. Nat Immunol, 2010, 11(10): 889-96.
- [14] SUZUKI A, HANADA T, MITSYTAMA K, et al. *CIS3/SOCS3/SSI3* plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation [J]. J Exp Med, 2001, 193(4): 471-81.
- [15] MIYANAKA Y, UENO Y, TANAKA S, et al. Clinical significance of mucosal suppressors of cytokine signaling 3 expression

- in ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(21): 2939-44.
- [16] BERND K, AXEL Z H, NURAN B, et al. Hepatitis B virus over-expresses suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) thereby contributing to severity of inflammation in the liver [J]. *Virus Res*, 2009, 148(1): 51-9.
- [17] WHITE G E, COTTERIL I A, ADDLEY M R, et al. Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation [J]. *J Mol Histol*, 2011, 42(2): 137-51.
- [18] FENG D, STONE R C, ELORANTA M L, et al. Genetic variants and disease-associated factors contribute to enhanced interferon regulatory factor 5 expression in blood cells of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(2): 562-73.
- [19] IMAMURA K, SUZUMURA A, HAYASHI F, et al. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients [J]. *Acta Neurol Scand*, 1993, 87(4): 281-5.
- [20] BOUHY D, MALGRANGE B, MULTON S, et al. Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages [J]. *FASEB J*, 2006, 20(8): 1239-41.
- [21] MULHERIN D, FITZGERALD O, BRESNIHAN B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1996, 39(1): 115-24.
- [22] DU X, KARIN S F, PETER R. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(7/8): 752-63.
- [23] KIM J Y, SONG E H, LEE S, et al. The induction of *STAT1* gene by activating transcription factor 3 contributes to pancreatic beta-cell apoptosis and its dysfunction in streptozotocin-treated mice [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(11): 1669-80.
- [24] 李雅清, 李慧, 安振涛, 等. 巨噬细胞在糖尿病胃轻瘫中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*(LI Y Q, LI H, AN Z T, et al. Macrophages in diabetic gastroparesis. a review of the research progress in the field of Biomedical Engineering [J]. *Journal of Clinical pathology*), 2018, 38(9): 2026-9.
- [25] SURANI S R. Diabetes, sleep apnea, obesity and cardiovascular disease: why not address them together [J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(3): 381-4.
- [26] 杨稀仁, 杜刚, 李巍, 等. Chemerin在膝骨关节炎软骨和关节液中的表达[J]. *广东医学*(YANG X R, DU G, LI W, et al. Chemerin expression in cartilage and articular fluid of knee osteoarthritis [J]. *Guangdong Medical*), 2018, 39(12): 1806-9.
- [27] XUAN W J, QU Q, ZHENG B. The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines [J]. *J Leukoc Biol*, 2015, 97(1): 61-9.
- [28] 刘利萍, 张焱皓, 李茂, 等. 调控巨噬细胞极化的相关信号通路及其调节机制研究进展[J]. *中国免疫学杂志*(LIU L P, ZHANG Y H, LI M, et al. Research progress in the regulation of macrophage polarization and its regulation mechanism [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2021, 37(6): 747-53.
- [29] 张梦莹, 李志, 李雪琴, 等. PRDM1调控NF-κB信号通路对巨噬细胞极化和功能的影响[J]. *中国免疫学杂志*(ZHANG M Y, LI Z, LI X Q, et al. Effect of PRDM1 on NF-κB signaling pathway on polarization and function of macrophages [J]. *Chinese Journal of Immunology*), 2021, 37(11): 1286-91.
- [30] 张传朋. 肠出血性大肠杆菌耐酸相关新基因的筛选与鉴定[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [31] 宋雪飞, 郭晶晶, 姜静, 等. 植物乳杆菌FS5-5在盐胁迫下的转录组学分析[J]. *食品科学*(SONG X F, GUO J J, JIANG J, et al. Transcriptome analysis of *Lactobacillus plantarum* FS5-5 under salt stress [J]. *Food Science*), 2017, 38(6): 20-6.
- [32] BREM-EXNER B G, SATTLER C, HUTCHINSON J A, et al. Macrophages driven to a novel state of activation have anti-inflammatory properties in mice [J]. *J Immunol*, 2008, 180(1): 335-49.
- [33] 李敏. 新型糖皮质激素对肥大细胞脱颗粒的快速作用及其机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2010.
- [34] EHRCHEN J M, ROTH J, BARCZYK K. More than suppression: glucocorticoid action on monocytes and macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2028.
- [35] CHAVEZ G, OLLEROS M L, VESIN D, et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169⁺ and TCR⁺ macrophages [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 263.
- [36] SCHMID M C, KHAN S Q, KANEDA M M, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity [J]. *Nat Commun*, 2018, doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4>.
- [37] MARTEL G, ROUSSEAU S. TPL2 signalling: from Toll-like receptors-mediated ERK1/ERK2 activation to cystic fibrosis lung disease [J]. *Int J Biochem Cell B*, 2014, 52: 146-51.
- [38] 李秀忠, 胡承香. 创伤对小鼠腹腔巨噬细胞CD16/32, CD80表达的影响[J]. *解放军医学杂志*(LI X Z, HU C X. Effects of trauma on CD16/32 and CD80 expression in mouse peritoneal macrophages [J]. *PLA Medical Journal*), 1999, 24(2): 97-8.
- [39] LU X, LI X, HE Q, et al. miR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates [J]. *Cell Res*, 2013, 23(12): 1356-68.
- [40] DE-OLIVEIRA S, REYES-ALDASORO C C, CANDEL S, et al. *Cxcl8 (il-8)* mediates neutrophil-recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response [J]. *J Immunol*, 2013, 190(8): 4349-59.
- [41] XU S, WEBB S E, LAU T C K, et al. Matrix metalloproteinases (mmps) mediate leukocyte recruitment during the inflammatory phase of zebrafish heart regeneration [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7199.
- [42] XU W, GHOSH S, COMHAIR S A, et al. Increased mitochondrial arginine metabolism supports bioenergetics in asthma [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(7): 2465-81.
- [43] BEAUCHEMIN M, SMITH A, YIN V P. Dynamic microRNA-101a and *f0sab* expression controls zebrafish heart regeneration [J]. *Development*, 2015, 142(23): 4026-37.

附录

附表1 与*il12a*欧式距离前30的细胞/炎症因子(基因)表达模式
Supplementary table 1 Expression patterns of cytokines and inflammatory cytokines
(gene) with Euclidean distance to *il12a* in the top 30

基因名称 Gene name	<i>il12a</i> 欧式距离 Euclidean distance to <i>il12a</i>	变化倍数(0~2 h) Change multiple (0-2 h)	变化倍数(2 h~2天) Change multiple (2 h-day 2)	变化倍数(2天~5天) Change multiple (day 2-day 5)	聚类类型 Clustering type
<i>il12a</i>	0	47.74465	0.020944755	4.699425	1
<i>nog2</i>	0.121274745	2.935367193	0.237645134	1.465632882	1
<i>irak4</i>	0.269113634	2.244052782	0.479565299	1.37830493	3
<i>egr2b</i>	0.291221071	1.634026757	0.266112559	1.645526732	4
<i>ifrd1</i>	0.335584537	3.621557521	0.400574846	1.283463777	3
<i>sall4</i>	0.337816855	2.338412003	0.38550366	1.225692346	1
<i>tlr9</i>	0.391114081	4.571171554	0.232071844	1.996028619	3
<i>Nr1h4</i>	0.397874291	6.688681422	0.22042664	1.901722929	3
<i>jagn1a</i>	0.413534183	2.746787315	0.314815852	2.331771087	3
<i>fgf23</i>	0.425868184	3.291956321	0.09713767	1.891227813	1
<i>sostdc1b</i>	0.466913733	6.124003422	0.140560488	1.419692974	1
<i>shcbp1</i>	0.473798795	1.83779295	0.705121758	1.119396675	3
<i>flt4</i>	0.481648644	2.066559103	0.541390855	1.051154602	1
<i>inhbab</i>	0.509775815	4.302447999	0.257449362	1.261757866	1
<i>at11</i>	0.514561381	3.24496469	0.139717396	2.413020709	1
<i>tradd</i>	0.516277402	1.845563989	0.696628769	1.378168472	3
<i>ccl25b</i>	0.519429299	1.401168202	1.240143432	1.286816782	9
<i>bmp7a</i>	0.523395751	5.477838304	0.346736714	1.356363375	3
<i>irf2bp2b</i>	0.534006466	1.32387323	0.651348846	1.516769909	4
<i>fgf14</i>	0.559740485	6.155804647	0.430794177	0.909996354	2
<i>ppp4cb</i>	0.579164296	2.079840432	0.441880242	1.085451223	1
<i>pparaa</i>	0.597256916	1.598178146	0.433553276	1.565262007	4
<i>tnfa</i>	0.619933112	2.033468253	0.344417021	1.323041463	1
<i>gata4</i>	0.620203929	14.2111	0.07036753	1	1
<i>traf3</i>	0.639877239	2.12465231	0.360732833	1.941974569	4
<i>il1rap11b</i>	0.644727919	22.3049	0.140665504	1.140656822	2
<i>traf1</i>	0.666606221	1.784182547	0.546233661	1.492883279	3
<i>fgf22</i>	0.677677837	47.96665	0.134205745	3.211412993	3
<i>kazald2</i>	0.709222621	5.260255987	0.038878586	7.8992	-
<i>igf2bp3</i>	0.713514924	2.627112771	0.284680291	1.278676182	1

附表2 与*il23r*欧式距离前30的细胞/炎症因子(基因)表达模式
Supplementary table 2 Expression patterns of cytokines and inflammatory cytokines
(gene) with Euclidean distance to *il23r* in the top 30

基因名称 Gene name	<i>il23r</i> 欧式距离 Euclidean distance to <i>il23r</i>	变化倍数(0~2 h) Change multiple (0-2 h)	变化倍数(2 h~2天) Change multiple (2 h-day 2)	变化倍数(2天~5天) Change multiple (day 2-day 5)	聚类类型 Clustering type
<i>il23r</i>	0	1.501516565	0.29830503	1.789245567	4
<i>pparab</i>	0.101257541	2.095336956	0.163276534	1.824602085	4
<i>cd226</i>	0.150647115	1.682880826	0.395264682	1.281387107	1
<i>f2</i>	0.225857822	5.733853979	0.068370802	2.027893365	1
<i>tsc22d3</i>	0.238193337	1.151126297	0.530863987	1.305803363	4
<i>smad9</i>	0.374469479	1.762107564	0.404637656	1.874363648	4
<i>dharma</i>	0.384869174	3.661784647	0.042080015	5.86806	4
<i>ins</i>	0.390322435	5.588315392	0.011493513	11.42335	4
<i>szl</i>	0.398144657	4.010443125	0.042793472	5.28116	4
<i>skilb</i>	0.400280122	1.711129063	0.291824376	1.34736432	1
<i>igf1</i>	0.456989432	1.781060895	0.327916957	0.893958749	1
<i>fgf11a</i>	0.478080075	1.693382871	0.33966172	0.754646173	10
<i>kazald2</i>	0.482174041	5.260255987	0.038878586	7.8992	-
<i>fgf8b</i>	0.494459912	4.042591741	0.067783868	2.360012791	1
<i>scube2</i>	0.497619571	1.213968278	0.250044574	1.865534657	4
<i>bdnf</i>	0.511523268	2.066309326	0.301123018	1.236045587	1
<i>tgfb1a</i>	0.518663822	1.46547598	0.544077278	1.129178779	1
<i>lingo4a</i>	0.527996061	2.483053316	0.183860072	2.139119212	4
<i>irf2bp2a</i>	0.540990725	1.635426205	0.241309354	1.372173599	4
<i>bmpr1ba</i>	0.541876519	4.987931428	0.101886777	3.107043129	-
<i>pde8a</i>	0.548435275	1.941389845	0.244043381	2.61981228	-
<i>dab2</i>	0.5540432	2.306566539	0.244230069	2.328621129	4
<i>ghra</i>	0.556813203	1.473813633	0.567107765	1.037058171	1
<i>pparaa</i>	0.563627826	1.598178146	0.433553276	1.565262007	4
<i>arl3l2</i>	0.567420943	1.895056815	0.328238931	1.189421714	1
<i>crfb12</i>	0.586540044	1.264720902	0.485052037	1.572457005	4
<i>ntrk2b</i>	0.593162451	4.439803624	0.232769886	1.519455453	1
<i>fgf10b</i>	0.601001464	1.396309068	0.035230558	12.11375	4
<i>fgf4</i>	0.614159668	2.176350153	0.234332383	1.410327124	-
<i>tgfa</i>	0.623444793	2.423915969	0.104965389	3.251111967	4

附表3 与*il10*欧式距离前30的细胞/炎症因子(基因)表达模式
Supplementary table 3 Expression patterns of cytokines and inflammatory cytokines
(gene) with Euclidean distance to *il10* in the top 30

基因名称 Gene name	<i>il10</i> 欧式距离 Euclidean distance to <i>il10</i>	变化倍数(0~2 h) Change multiple (0-2 h)	变化倍数(2 h~2天) Change multiple (2 h-day 2)	变化倍数(2天~5天) Change multiple (day 2-day 5)	聚类类型 Clustering type
<i>il10</i>	0	13.932309049	0.205134688	0.941771568	-
<i>foxh1</i>	0.086166028	3.640470959	0.509163001	0.91877498	2
<i>eaf2</i>	0.125201122	2.122243904	0.744351429	1.330554355	3
<i>sall1a</i>	0.144784122	5.658530358	0.48449531	0.916012192	2
<i>crfb4</i>	0.173188392	2.086578473	0.74108461	1.008551723	2
<i>bmp6</i>	0.197038437	3.188830162	0.632034101	0.932528063	2
<i>ifnphi2</i>	0.207008662	81.9554	0.230098932	0.867545876	2
<i>lingo4b</i>	0.219678003	4.598175705	0.548715819	1.150842325	3
<i>tmem33</i>	0.257228964	1.387887681	0.954337074	1.116670033	9
<i>tdp2b</i>	0.267419075	3.150288595	0.684340943	1.615211857	3
<i>relt</i>	0.284909007	4.006446463	0.411758139	1.424617146	3
<i>tgif1</i>	0.289291498	8.587247525	0.345198167	1.335449605	3
<i>si:dkey-204f11.3</i>	0.301264593	63.1125	0.140138641	2.251879699	3
<i>flcn</i>	0.336409233	2.935315651	0.582956148	1.154947488	3
<i>mstna</i>	0.337281481	5.52224807	0.380321204	1.615276778	3
<i>mapkapk2a</i>	0.34713116	3.754473673	0.480796966	1.04356672	2
<i>tnfrsf9a</i>	0.375451559	5.695825079	0.694078812	1.506914967	3
<i>il6r</i>	0.37868861	10.429115543	0.616656591	0.840284678	2
<i>il17a/f3</i>	0.381745776	3.258762701	0.551843236	1.463327404	3
<i>si:ch211-158d24.4</i>	0.397514439	6.53345946	0.176395439	2.121200548	3
<i>ifnphi1</i>	0.403969831	2.57974966	0.47827433	1.545094193	3
<i>smad3a</i>	0.459162788	1.668595378	0.895730208	0.876600585	2
<i>smn1</i>	0.499926772	2.660885476	0.577780621	0.930611203	2
<i>gata3</i>	0.560801076	3.377783647	0.98499529	0.950694561	9
<i>tnfrsf1a</i>	0.583160819	1.98675646	0.998789763	0.962136445	-
<i>fgf22</i>	0.586043365	47.96665	0.134205745	3.211412993	3
<i>gmfg</i>	0.600719706	1.346745708	1.091666364	1.277039656	9
<i>rel</i>	0.606570376	2.626939216	0.630057453	0.953061813	2
<i>cd40lg</i>	0.614270994	2.372383686	0.638330002	1.981809022	3
<i>il12rb2</i>	0.624861182	5.909270722	0.630591273	0.563466031	2

附表4 与*tgfb1*欧式距离前30的细胞/炎症因子(基因)表达模式
Supplementary table 4 Expression patterns of cytokines and inflammatory cytokines
(gene) with Euclidean distance to *tgfb1* in the top 30

基因名称 Gene name	<i>tgfb1</i> 欧式距离 Euclidean distance to <i>tgfb1</i>	变化倍数(0~2 h) Change multiple (0-2 h)	变化倍数(2 h~2天) Change multiple (2 h-day 2)	变化倍数(2天~5天) Change multiple (day 2-day 5)	聚类类型 Clustering type
<i>tgfb1</i>	0	0.424836036	0.862156885	8.909647406	8
<i>cxcl12a</i>	0.11788753	0.913900969	0.891641156	1.91535896	6
<i>igfbp7</i>	0.275562517	0.673962336	0.881006013	2.917471822	8
<i>pdgfaa</i>	0.292665184	1.193199644	0.508556472	3.922001062	6
<i>smad6a</i>	0.315549387	0.670674442	0.813695111	3.017936595	8
<i>pink1</i>	0.330768802	0.894877387	1.01212143	1.360733343	6
<i>twsg1a</i>	0.380126459	0.66797553	0.96861993	1.685295223	8
<i>id2a</i>	0.408134511	0.806275029	1.049117072	1.502152218	8
<i>anxa1b</i>	0.415950102	0.817505611	1.002920609	1.576528934	8
<i>pdgfrl</i>	0.432422318	0.628746573	1.164524008	4.123992569	6
<i>tbx2b</i>	0.469837605	0.576498354	0.915219235	2.902161923	8
<i>faslg</i>	0.484344439	0.708174391	0.818001274	1.794624442	8
<i>igfbp5a</i>	0.492364921	0.510783956	1.263168536	2.541526294	8
<i>tnfrsf19</i>	0.55257027	0.543942884	1.482452344	2.637561462	8
<i>sox2</i>	0.592294121	0.459982669	0.86691763	2.98906988	8
<i>pias4a</i>	0.618340727	0.898001024	1.11314507	1.445061432	6
<i>yap1</i>	0.659280512	1.361956991	0.659060063	1.652458551	3
<i>nrp2b</i>	0.668004776	1.042853866	0.79631554	2.299487262	6
<i>zgc:113531</i>	0.672344965	0.579125988	0.802155002	2.844151563	8
<i>thbs4b</i>	0.701257429	0.800698873	1.028749249	4.166675285	6
<i>tnfsf10l3</i>	0.746401558	0.509538773	2.945166354	2.116683668	5
<i>fgfr3</i>	0.746983431	1.55610075	0.644506354	1.480020241	-
<i>erbb3a</i>	0.785874752	0.717744035	1.010974653	1.386834774	8
<i>grem1a</i>	0.795182497	0.978106346	0.506402157	4.482640761	6
<i>bmp4</i>	0.80662974	0.995291387	0.646992168	2.636144113	6
<i>fstl1a</i>	0.809105726	0.519292458	0.510906534	5.87664513	8
<i>anxa1c</i>	0.828914226	0.707589205	1.711411541	1.640941929	5
<i>dusp22a</i>	0.839932808	0.761757578	0.763541122	1.851959239	8
<i>fgf20a</i>	0.852749696	0.119846596	1	7.5113	8
<i>ifi30</i>	0.883414956	0.510882894	1.635348071	1.404605807	8