DOI:10.16016/j.2097-0927.202406060

ATP6V1A 缺失导致脓毒症心脏驻留巨噬细胞清除能力损伤

杨顺心[1],周远群[2],向鑫明[2],刘良明[2],李 涛[2],胡 弋[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心:麻醉科[1];400042 重庆,野战外科研究部战伤休克与输血研究室,创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 探讨脓毒症后心脏驻留巨噬细胞的清除能力及其机制。**方法** 利用盲肠穿孔结扎术建立脓毒症小鼠模型,将 30 只雄性 C57BL/6 小鼠(8 周龄,体质量 20~25 g)按随机数字抽样法分为假手术组(Sham 组,$n=15$)和脓毒症模型组(Sepsis 组,$n=15$)。使用免疫荧光技术标记心肌细胞与巨噬细胞观察小鼠心肌细胞凋亡及心脏驻留巨噬细胞对心肌细胞的吞噬情况。提取心脏驻留巨噬细胞进行转录组学测序,观察脓毒症后心脏驻留巨噬细胞的功能变化。在细胞水平建立心脏驻留巨噬细胞系,即正常组(RAC 组);用 LPS 处理 RAC 组细胞后,即脓毒症组(RAC+LPS 组)。观察 2 组间对凋亡心肌细胞清除能力的差异;使用 DQ-BSA-RED 溶酶体活性检测探针、Lyso-Sensor yellow/bule 染料、ELISA 以及蛋白质印迹实验法检测心脏驻留巨噬细胞溶酶体功能、溶酶体重要水解酶活性及蛋白表达、囊泡型腺苷三磷酸酶(vacuolar-type adenosine triphosphatases,V-ATPase)含量及其相关亚基的改变。**结果** 与 Sham 组相比,Sepsis 组小鼠心肌细胞凋亡数量增加($P<0.05$),心脏巨噬细胞对心肌细胞的吞噬增加($P<0.05$),转录组学结果分析发现脓毒症后心脏驻留巨噬细胞的溶酶体相关功能显著失调。体外实验结果显示,与 RAC 组相比,RAC+LPS 组对凋亡心肌细胞的碎片化能力降低,溶酶体的黄色荧光强度明显减弱($P<0.05$),溶酶体水解酶活性降低($P<0.05$)。此外,LPS 处理显著降低了心脏驻留巨噬细胞 V-ATPase 及其主要亚基 ATP6V1A 的活性和表达($P<0.05$)。**结论** 脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除能力降低,其机制可能与其溶酶体 V-ATPase 重要亚基 ATP6V1A 和溶酶体水解酶活性降低有关。

[**关键词**] 脓毒症心脏功能障碍;心脏驻留巨噬细胞;溶酶体;囊泡型腺苷三磷酸酶
[**中图法分类号**] R322.11; R345; R631.1 [**文献标志码**] A

ATP6V1A deletion leads to impaired clearance of septic cardiac resident macrophages

YANG Shunxin[1], ZHOU Yuanqun[2], XIANG Xinming[2], LIU Liangming[2], LI Tao[2], HU Yi[1] [1]Department of Anesthesiology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042; [2]State Key Laboratory of Trama and Chemical Poisoning, Department of War Wound Shock and Transfusion, Institute of Surgery Research, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the clearance capacity of cardiac resident macrophages in post-sepsis and its underlying mechanism. **Methods** A mouse model of sepsis was established using cecum perforation ligation. Thirty male C57BL/6 mice (8 weeks old, weighing 20~25 g) were randomly and equally divided into a sham operation group (sham group) and a model group (sepsis group). Immunofluorescence assay was employed to label the cardiomyocytes and macrophages to observe the apoptosis of cardiomyocytes and the phagocytosis by cardiac resident macrophages. Cardiac resident macrophages were extracted for transcriptomic sequencing to determine the functional changes of the cells after sepsis. Cardiac resident macrophage cell lines were established at the cellular level and served as the normal group (RAC group), and the RAC cells treated with LPS were subjected as the sepsis group (RAC+LPS group). Then the differences in the ability to clear apoptotic cardiomyocytes between the 2 groups were observed. Then DQ-BSA-RED

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82270523)
[**通信作者**] 胡 弋,E-mail: Huyi921@sina.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

lysosomal activity detection probe, Lyso-Sensor yellow/bule dye, ELISA, and Western blotting were applied to detect the lysosomal function of cardiac resident macrophages, activity and expression of important lysosomal hydrolases, changes in contents and related subunits of vacuolar-type adenosine triphosphatases (V-ATPase). **Results** Compared with the sham group, the sepsis group had larger number of apoptotic cardiomyocytes ($P<0.05$) and increased phagocytosis of cardiomyocytes by cardiac macrophages ($P<0.05$). The results of transcriptomic sequencing revealed a significant dysfunction of lysosome-associated functions of cardiac-resident macrophages after sepsis. In *in vitro* experiments, the RAC+LPS group had a reduced fragmentation capacity of apoptotic cardiomyocytes, reduction in the intensity of yellow fluorescence of lysosomes ($P<0.05$), and decrease in lysosomal hydrolase activity ($P<0.05$) when compared with the RAC group. In addition, LPS treatment significantly decreased the activity and expression of V-ATPase and its major subunit ATP6V1A in cardiac resident macrophages ($P<0.05$). **Conclusion** Cardiac resident macrophages show reduced clearance of apoptotic cardiomyocytes after sepsis, which may be related to a decrease in the activity of ATP6V1A, an important subunit of its lysosomal V-ATPase, and reduced activity of lysosomal hydrolases.

[**Key words**] cardiac dysfunction in sepsis; cardiac resident macrophages; lysosome; vacuolar-type adenosine triphosphatases

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82270523). Corresponding author: HU Yi, E-mail: Huyi921@sina.com

脓毒症是临床常见危重症,是由宿主感染引起的免疫反应失调的多器官功能障碍综合征[1]。脓毒症所致的心脏功能障碍是脓毒症患者最严重的并发症[2]。脓毒症致心功能障碍时,会诱导大量心肌细胞的凋亡,若这些凋亡的心肌细胞未被吞噬细胞及时有效的清除,可能会诱导继发性坏死并释放大量促炎物质[3-4],继而进一步损害吞噬细胞的清除能力[5],导致全身性炎症、器官衰竭和死亡[6]。因此,提高凋亡心肌细胞的有效清除、减少炎症反应的发生对脓毒症心脏功能障碍的防治具有重要意义。

心脏驻留巨噬细胞是心脏中最重要的一类吞噬细胞,占非心肌细胞的6%~8%[7],其起源于胚胎造血,具有自我更新功能[8],在维持心脏稳态中发挥着重要调控作用,如促进冠状动脉发育[9]、促进淋巴管的生成[10]、清除衰老和濒死的细胞等[11-12]。近年来的研究发现心肌梗死后,心脏驻留巨噬细胞负责有效清除和降解凋亡的心肌细胞,减少梗死面积、促进炎症消退和组织修复[13]。但脓毒症后,心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除作用尚不清楚。

巨噬细胞的清除作用主要涉及内吞体的形成、内吞体与溶酶体的融合、酸化、水解酶作用以及产物回收和排出几个重要环节,其中溶酶体水解异物是清除作用的最终环节[14-15]。大量研究表明,溶酶体功能缺陷,如酸性pH的丧失、囊泡型腺苷三磷酸酶(vacuolar-type adenosine triphosphatases, V-ATPase)结构亚基表达改变、溶酶体定位的错误调节或与溶酶体相关的信号分子的缺陷,都会减弱巨噬细胞对凋亡细胞的降解能力[15-18]。但脓毒症后,心脏驻留巨噬细胞的溶酶体功能如何改变,以及这些改变如何影响脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除作用,尚不清楚。

为此,本研究通过盲肠结扎穿孔术在动物水平建立脓毒症小鼠模型,并在细胞水平建立心脏驻留巨噬细胞系,以LPS处理模拟脓毒症,结合转录组学测序,研究其对凋亡心肌细胞的清除能力,以及溶酶体功能的改变,以初步明确脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除作用和相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级雄性C57BL/6小鼠30只,8周龄,体质量20~25 g,购自陆军特色医学中心动物实验中心;RAW264.7细胞(小鼠小单核巨噬细胞白血病细胞)、HL-1细胞(小鼠心肌细胞)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DMEM培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、HBSS缓冲溶液购自美国Gibco公司;PBS缓冲液、4%多聚甲醛固定液购自武汉塞维尔生物科技有限公司;红细胞裂解液、巨噬细胞分离试剂盒(试剂盒内含Fc受体抑制剂、抗生物素磁珠)、CCR2生物素抗体、CD11b生物素抗体、MACS分选柱购自德国美天旎生物科技有限公司;白介素4(interleukin-4, IL-4)和白介素10(interleukin-10, IL-10)购自上海MCE公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、Ⅰ型胶原酶(Collagenase Ⅰ)、BSA和透明质酸购自美国Sigma公司;脱氧核糖核酸酶Ⅰ(DNase Ⅰ)购自瑞士罗氏制药公司;蛋白酶抑制剂混合物、RIPA裂解液、5×上样缓冲液、Western blot一抗稀释液、40 μm过滤器、30 μm过滤器、EDTA、30%蔗糖溶液、免疫染色通透液(Triton X-100)、一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公司;封闭用羊血清购自北

京中杉金桥生物科技有限公司;聚醋酸纤维素(NC)膜购自德国默克集团;DQ-BSA-RED 溶酶体活性检测探针购自上海圣尔生物科技有限公司;Lyso-Sensor yellow/bule、细胞示踪染色试剂、Hoechst 33342 购自赛默飞世尔科技公司;小鼠 V-ATP 酶(V-ATPase)酶联免疫吸附测定试剂盒购自上海酶联生物;ATP6V1A、Cathepsin B(CTSB)、Cathepsin D(CTSD)抗体、Cardiac Troponin T(cTNT)抗体、DAPI 染液购自美国 Abcam 公司;HEXA 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;GAPDH 抗体、CD68 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 *方法*

1.2.1 动物分组与脓毒症小鼠模型建立 动物实验经陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审核符合动物伦理和动物福利要求(AMUWEC20224882),许可证号:SYXK(渝)20170002。将 30 只雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字抽样法平均分为假手术组(Sham 组)和脓毒症模型组(Sepsis 组),每组 15 只。Sepsis 组根据参考文献[19]制备小鼠盲肠穿孔结扎术模型。Sham 组仅开腹后缝合,注射 500 μL 无菌生理盐水,放回笼中禁食不禁饮饲养。24 h 后进行后续实验。

1.2.2 心脏组织冰冻切片制备及免疫荧光染色 取 Sham 组和 Sepsis 组各 3 只小鼠,戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后,暴露胸腔与心脏,用 20 mL 冷 PBS 缓冲液灌流心脏,随后取下心脏置于 4% 多聚甲醛固定液中固定过夜,经 30% 蔗糖溶液脱水处理 24 h 后对心脏组织进行包埋,切片,-80 ℃长期保存。

染色时,切片室温放置 30 min,PBS 洗涤,0.2% Triton X-100 孵育 15 min,根据一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行使用 TUNEL 染色。免疫荧光需用羊血清封闭 60 min,加一抗(cTNT 1∶300,CD68 1∶100),4 ℃过夜。次日,加入与一抗相对应的荧光二抗,室温下避光孵育 1 h,共聚焦显微镜下观察。

1.2.3 小鼠心脏驻留巨噬细胞分离提取 取假手术组(Sham 组)和脓毒症模型组(Sepsis 组)各 10 只小鼠使用戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后,暴露胸腔与心脏,用 20 mL 冷 PBS 缓冲液灌流心脏,剪下心脏,切成小块,置于含 Collagenase Ⅰ(450 U/mL)、DNase Ⅰ(60 U/mL)和透明质酸(60 U/mL)的 DMEM 培养基中,37 ℃下消化 45 min,使心脏组织消化成单细胞悬液。用 40 μm 过滤器过滤并收集液体,在 4 ℃下 400×*g* 离心 5 min,将沉淀重悬于含 2% 胎牛血清和 0.2% BSA 的 HBSS 缓冲溶液中,得到细胞悬液。用红细胞裂解液处理 5 min,离心后重悬于含 2% 胎牛血清和 292.24 μg EDTA 的 PBS 溶液中,得到心脏单细胞悬液。用 30 μm 过滤器过滤后进行细胞计数。在 4 ℃下 300×*g* 离心 10 min,用含 4 μL Fc 受体抑制剂的 HBSS 缓冲液重悬细胞(40 μL 缓冲液/10^7 个细胞),加入 CCR2 生物素抗体(10 μL/10^7 个细胞),混匀后在 2~8 ℃孵育 10 min。加 1~2 mL HBSS 缓冲液洗涤细胞,离心后用 80 μL HBSS 缓冲液重悬,并加入 20 μL 抗生物素磁珠,混匀后孵育 10 min,洗涤细胞并离心,用 500 μL HBSS 缓冲液重悬细胞,过柱处理,未标记的细胞流入管中为 CCR2 阴性细胞。收集细胞,与 CD11b 标记的磁珠共孵育 10 min,过柱处理,CCR2 和 CD11b 双阴性细胞先流入试管中;取出 MACS 分选柱,洗脱得到 CCR2 阴性 CD11b 阳性巨噬细胞,即为心脏驻留巨噬细胞。收集细胞,并进行转录组测序。

1.2.4 细胞培养与分组 RAW264.7 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃含有 5%CO_2 的培养箱中培养,待生长密度达到 80% 时传代消化,以 1×10^5 个/mL 密度接种细胞。次日,用含 60 ng/mL IL-4 和 60 ng/mL IL-10 的无血清 DMEM 培养基培养 48 h,模拟心脏驻留巨噬细胞系,即正常组(RAC 组)。用 1 μg/mL LPS 处理 RAC 细胞 12 h,在细胞水平复制脓毒症模型,即脓毒症组(RAC+LPS 组)。

HL-1 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃含有 5%CO_2 的培养箱中培养,待细胞生长密度达到 90% 时传代消化,以 1×10^5 个/mL 密度接种细胞进行后续实验。

1.2.5 凋亡的小鼠心肌细胞(HL-1)与心脏驻留巨噬细胞(RAC)共培养 为验证脓毒症后心脏驻留巨噬细胞消化降解凋亡组分的功能改变,将心脏驻留巨噬细胞与心肌细胞共培养,观察其对凋亡心肌细胞的碎片化降解情况。HL-1 细胞用细胞示踪染色试剂按照 1∶1 000 染色 30 min,随后在紫外灯下照射 15 min 诱导细胞凋亡,用胰酶消化细胞,300×*g* 离心 5 min,取沉淀。然后将凋亡 HL-1 细胞与巨噬细胞共培养(凋亡 HL-1 细胞∶心脏驻留巨噬细胞=5∶1)45 min 后去除未吞噬的心肌细胞,加入新的 DMEM 培养基继续培养心脏驻留巨噬细胞 2 h。2 h 后弃上清,用 PBS 清洗 2 次后用 4% 多聚甲醛固定 10 min, DAPI 染色 10 min。共聚焦显微镜下观察。

1.2.6 溶酶体功能检测 DQ-BSA-RED 可用于检测溶酶体水解酶的整体活性,按上述方法培养细胞,实验当天细胞弃上清,用 DMEM 培养基将 DQ-BSA-RED 染料按 1∶200 稀释,37 ℃孵育 6 h 后,再加入 1∶1 000 稀释的 Hoechst 33342 染料,10 min 后更换为无染料的 DMEM 培养基,共聚焦显微镜下观察。

1.2.7 溶酶体 pH 值检测 使用 LysoSensor Yellow/Blue 染料检测溶酶体 pH 值,从而可视化脓毒症后心脏驻留巨噬细胞溶酶体内的酸化程度,黄色荧光表示溶酶体内的 pH 值偏酸性,而蓝色荧光表示溶酶体内的 pH 值偏向中性。细胞按上述培养后弃上

清,用 PBS 缓冲液将 Lysosensor yellow/blue 染料按 1∶100 稀释,37 ℃孵育 5 min 后更换为无染料的 PBS 缓冲液,共聚焦显微镜下观察。

1.2.8 ELISA 检测溶酶体 V-ATPase 活性 取细胞培养基后 4 ℃离心,300×*g* 离心 20 min,去沉淀取上清备用。按照试剂盒说明书检测上清中 V-ATPase 的活性。

1.2.9 蛋白质印迹实验法(western blot)检测蛋白表达 按上述培养结束后收集细胞,制备蛋白样品,经 10% SDS-PAGE 分离胶电泳 1.5 h,电转移至 NC 膜上。HEXA、CTSB、CTSD、ATP6V1A 和 GAPDH 使用一抗稀释液按(1∶1 000)进行稀释,二抗均为山羊抗兔。用双色红外成像激光扫描,获得 HEXA、CTSB、CTSD、ATP6V1A 和 GAPDH 的蛋白表达图像,用 Image J 软件进行灰度值分析。

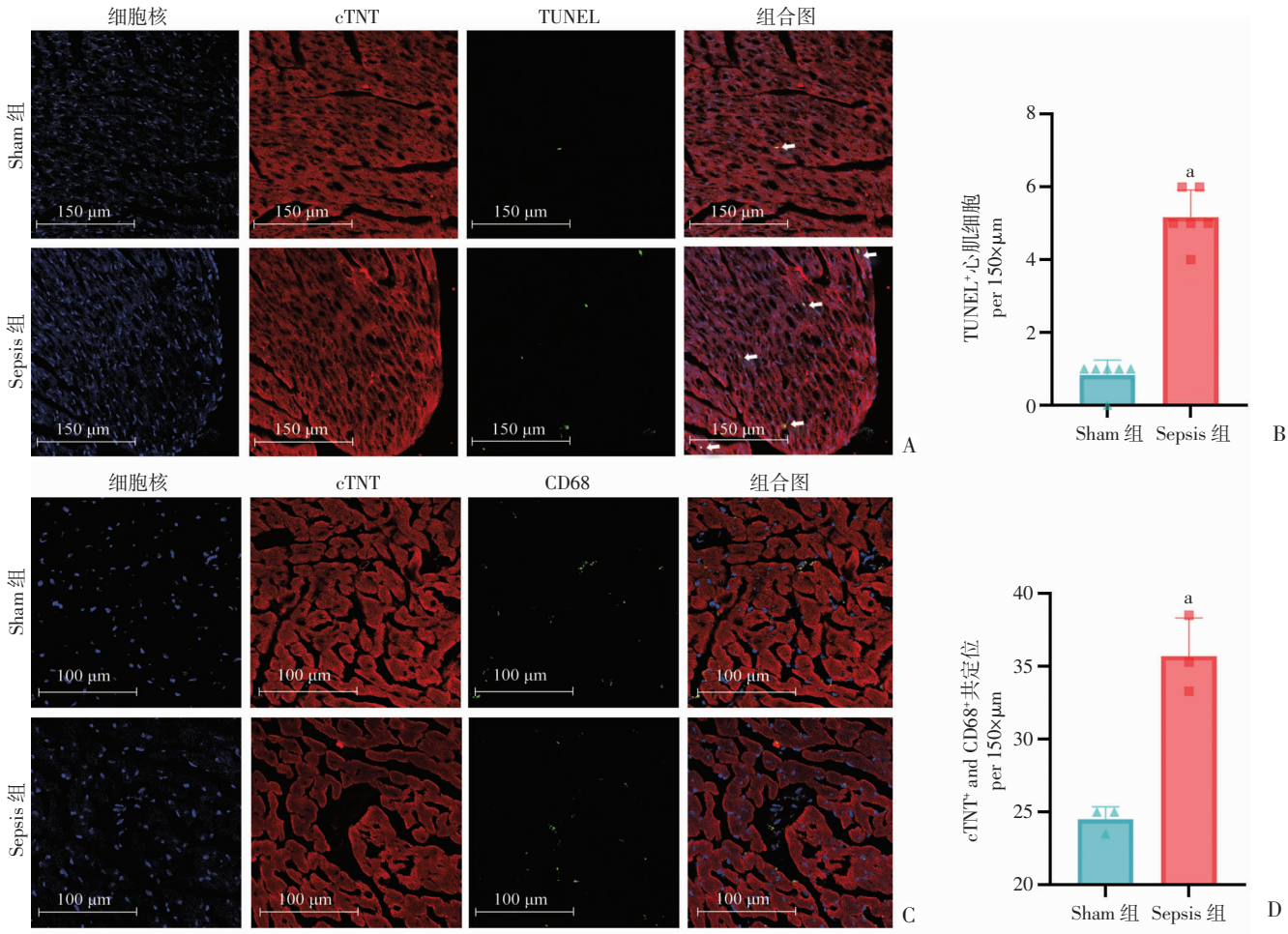
1.3 统计学方法

统计分析均使用 GraphPad Prism 8.0 软件,符合正态分布的数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,t 检验用于组间比较,数据不符合正态性检验时采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症后小鼠心肌细胞凋亡以及心脏驻留巨噬细胞对心肌细胞的吞噬能力改变

为观察脓毒症诱导的心肌细胞凋亡情况,对心肌切片进行 TUNEL 染色,结果显示与 Sham 组相比,Sepsis 组中 TUNEL$^+$心肌细胞数量显著增加($P<0.05$,图 1A、B),表明脓毒症后小鼠心肌细胞发生明显凋亡。使用巨噬细胞标志蛋白 CD68 和心肌细胞标志蛋白 cTNT 分别标记巨噬细胞和心肌细胞,发现与 Sham 组相比,Sepsis 组中 cTNT$^+$心肌细胞和 CD 68$^+$巨噬细胞的共定位显著增加($P<0.05$,图 1C、D),表明脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对心肌细胞的吞噬能力增加。



a:$P<0.05$,与 Sham 组比较

A:cTNT$^+$心肌细胞、TUNEL$^+$心肌细胞和细胞核染色的代表性图片 红色:示心肌细胞标志物;绿色:示凋亡的细胞;白色箭头:示 TUNEL$^+$心肌细胞;B:TUNEL 染色的定量分析($n=6$,$\bar{x}\pm s$);C:CD68$^+$巨噬细胞与 cTNT$^+$心肌细胞的共定位代表性图片 红色:示心肌细胞;绿色:示巨噬细胞;D:CD 68$^+$巨噬细胞与 cTNT$^+$心肌细胞的共定位分析($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

图 1 脓毒症后小鼠心肌细胞凋亡以及心脏驻留巨噬细胞对心肌细胞的吞噬能力改变

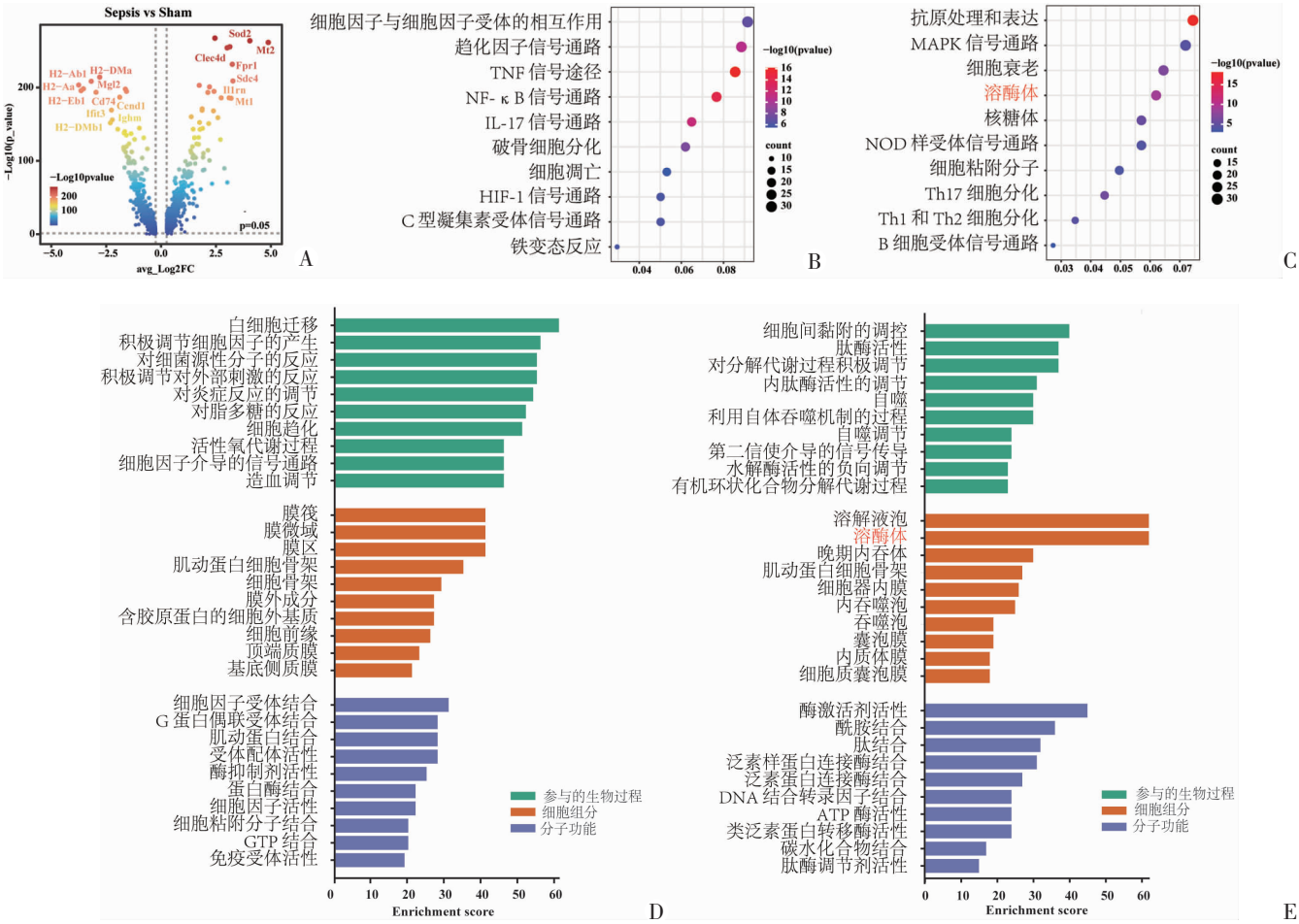
2.2　脓毒症后心脏驻留巨噬细胞溶酶体功能失调

为了进一步探究脓毒症后心脏驻留巨噬细胞的作用,提取心脏驻留巨噬细胞进行转录组测序,观察脓毒症后心脏驻留巨噬细胞的功能变化。差异基因火山图结果显示,与 Sham 组相比,Sepsis 组心脏驻留巨噬细胞有 1388 个基因发生显著变化,其中 788 个基因下调,600 个基因上调(图 2A)。对差异基因进行 KEGG 富集,结果显示上调基因显著富集于 TNF 信号通路、NF-κB 信号通路、IL-17 信号通路等与炎症相关的信号通路,而下调基因主要富集于抗原处理与表达、溶酶体、细胞衰老等信号通路(图 2B、C)。

此外,GO 富集结果显示,Sepsis 组心脏驻留巨噬细胞参与的生物过程,如白细胞迁移、细胞趋化等显著上调,而细胞间黏附的调控、肽酶活性、自噬等下调(图 2D、E)。同时,上调的基因主要富集膜筏、肌动蛋白细胞骨架、膜外成分等细胞组分,而下调的基因主要与溶解液泡、溶酶体、晚期内吞体等细胞组分有关;分子功能分析显示,上调的差异基因涉及细胞因子受体结合、G 蛋白偶联受体结合、免疫受体活性等功能,而下调的差异基因涉及酶激活剂活性、酰胺结合、ATP 酶活性等功能(图 2D~E)。这些结果表明脓毒症后心脏驻留巨噬细胞溶酶体功能损伤。

2.3　脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除能力改变

为进一步验证脓毒症后心脏驻留巨噬细胞消化降解凋亡组分的功能改变,在体外将心脏驻留巨噬细胞与凋亡的心肌细胞共培养。结果显示,RAC 组和 RAC+LPS 组心脏驻留巨噬细胞均能吞噬凋亡心肌细胞,但 LPS 处理后,凋亡的心肌细胞大量并长时间地聚集在心脏驻留巨噬细胞中,表明心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的碎片化降解明显减弱(图 3)。这些结果提示脓毒症后心脏驻留巨噬细胞虽对凋亡心肌细胞的吞噬增加但其清除能力显著减弱,这可能与脓毒症导致的心脏驻留巨噬细胞溶酶体功能损伤有关。



A:Sham 组与 Sepsis 组心脏驻留巨噬细胞差异基因火山图;B~C:具有显著差异的前 10 条上调、下调 KEGG 通路;D~E:具有显著差异的前 10 条上调、下调 GO 富集通路

图 2　脓毒症后心脏驻留巨噬细胞清除能力减弱与溶酶体功能失调有关

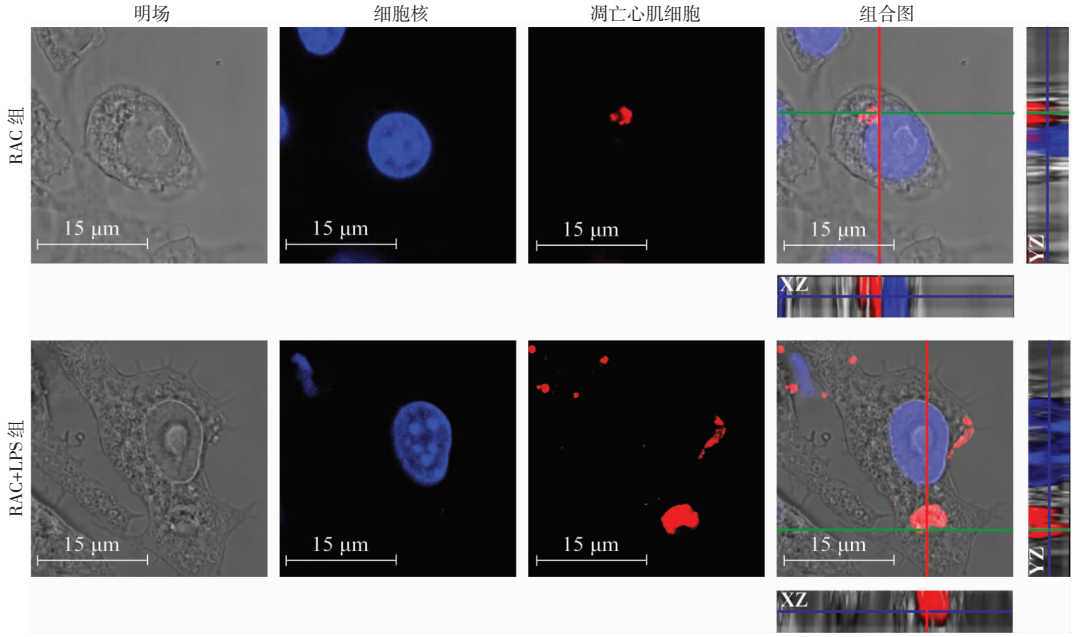
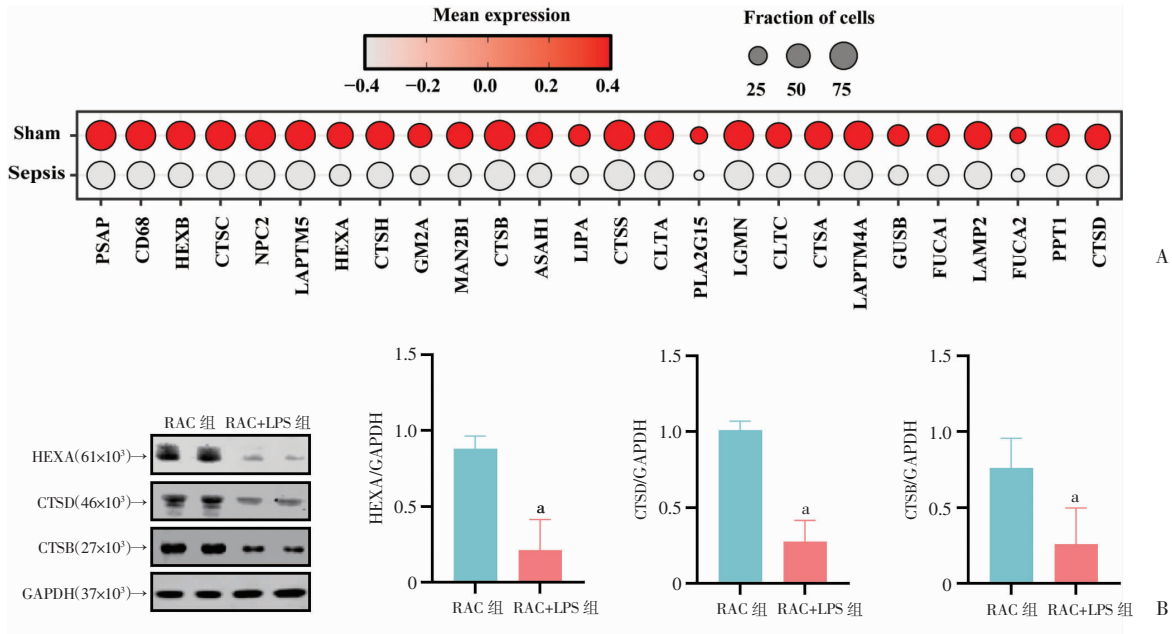


图 3 脓毒症对心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除能力的影响

2.4 脓毒症心脏驻留巨噬细胞溶酶体水解酶活性改变

进一步检测了脓毒症后“Lysosome”这一信号通路涉及的基因表达情况,结果显示脓毒症后,心脏驻留巨噬细胞中大量溶酶体水解酶的表达水平下调,包括 HEXA、HEXB、CTSC、CTSB、CTSD、CTSH 等(图 4A)。同时,在细胞水平,用 LPS 处理心脏驻留巨噬细胞检测上述蛋白的表达变化,结果证实与 RAC 组相比,RAC+LPS 组中主要的水解酶包括 HEXA、CTSB、CTSD 的蛋白表达显著降低($P<0.05$)(图 4B)。用 DQ-BSA-RED 检测溶酶体水解酶的整体活性,发现 RAC+LPS 组的红色荧光强度显著下调($P<0.05$),较 RAC 组下调了约 50%(图 4C)。这些结果表明脓毒症后心脏驻留巨噬细胞溶酶体水解酶表达和活性降低导致溶酶体功能损伤。

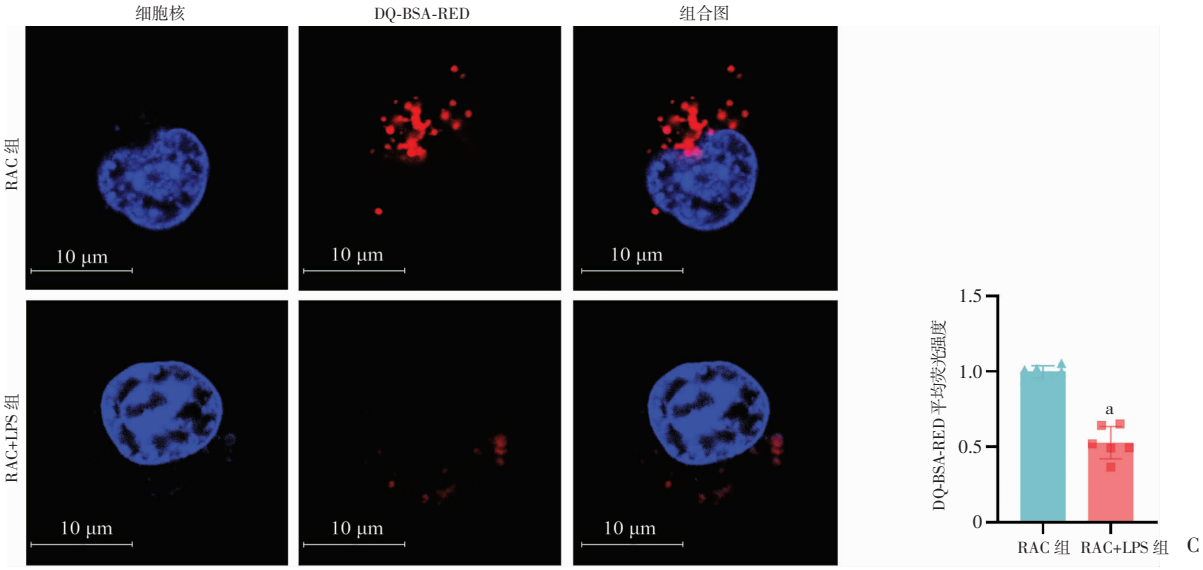


a:$P<0.05$,与 RAC 组比较

A:Sham 组与 Sepsis 组心脏驻留巨噬细胞溶酶体相关基因的表达;B:WB 验证溶酶体水解酶 HEXA、CTSB、CTSD 的相对表达水平

图 4 脓毒症心脏驻留巨噬细胞溶酶体水解酶活性改变

(图 4C 续下页)



a:$P<0.05$,与 RAC 组比较

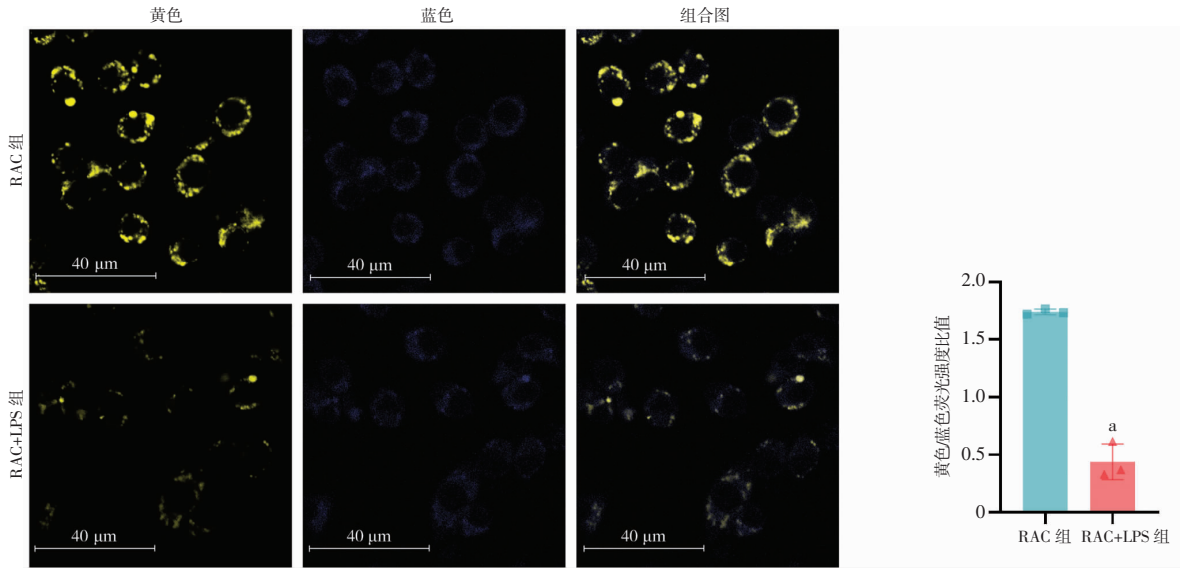
C:DQ-BSA-RED 检测溶酶体水解酶的总体活性　红色:示水解酶总体活性

续图 4　脓毒症心脏驻留巨噬细胞溶酶体水解酶活性改变

2.5　溶酶体内酸碱平衡失调致水解酶活性改变

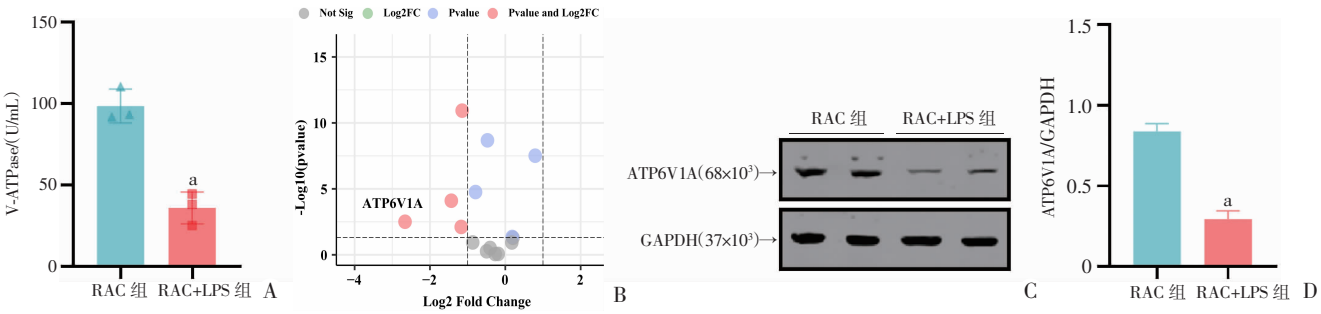
溶酶体的酸性环境(pH=4.5~5.0)是溶酶体水解酶保持最佳活性的必要条件。使用 LysoSensor Yellow/Blue 检测溶酶体 pH 值。结果发现与 RAC 组相比,LPS 刺激后,心脏驻留巨噬细胞的黄色荧光强度明显减弱,黄色荧光与蓝色荧光比值较 RAC 组显著降低($P<0.05$)(图 5),表明 LPS 刺激诱导了心脏驻留巨噬细胞溶酶体酸化不足。

溶酶体酸性环境需要 V-ATPase 来维持。因此通过 ELISA 检测了 RAC 组和 RAC+LPS 组中 V-ATPase 的活性,结果显示与 RAC 相比,LPS 刺激后心脏驻留巨噬细胞的 V-ATPase 活性显著降低($P<0.05$)(图 6A)。进一步在转录水平分析了 V-ATPase 各个亚基的表达情况以确定影响 V-ATPase 功能的关键分子。以 $P<0.05$,FC>2 为筛选条件,发现与 Sham 组相比,Sepsis 组 ATP6V1A、ATPV1G2、ATP6V1F、ATP6V0A1 的表达明显下调,其中 ATP6V1A 下调最显著($\log_2FC=2.66$,$P=3.1\times10^{-5}$)(图 6B)。通过 western blot 进一步验证了脓毒症后心脏驻留巨噬细胞中 ATP6V1A 的蛋白表达水平明显降低($P<0.05$,图 6C、D)。以上结果提示脓毒症后溶酶体酸化不足与 ATP6V1A 有关。



a:$P<0.05$,与 RAC 组比较

图 5　正常和脓毒症组心脏驻留巨噬细胞溶酶体 pH 值



a:$P<0.05$,与 RAC 组比较

A:RAC 组和 RAC+LPS 组 V-ATPase 活性变化;B:脓毒症模型组心脏驻留巨噬细胞 V-ATPase 各个亚基的差异表达倍数;C、D:Western blot 检测 ATP6V1A 的相对蛋白表达水平

图 6 心脏驻留巨噬细胞溶酶体 V-ATPase 及其相关亚基的表达

3 讨论

对于脓毒症的研究已经超过 30 年,其治疗在很大程度上采用源头控制、早期抗生素治疗、液体复苏和器官功能障碍的支持性护理,然而没有一种治疗方法可以持续挽救脓毒症患者的生命[20-21],因此针对脓毒症患者治疗的方案迫在眉睫。

目前公认的脓毒症心脏功能障碍的损伤机制主要是炎症反应、线粒体功能障碍和心肌细胞凋亡[22-24]。研究表明,心脏驻留巨噬细胞能有效地摄取并降解心脏中的凋亡细胞组分,如在心脏发生炎症反应时,心脏驻留巨噬细胞中与内吞作用和细胞内运输相关的基因差异表达[12];在有关脓毒症心肌病的研究中发现,心肌细胞中功能障碍线粒体可被髓系细胞触发受体 2(triggering receptor expressed on myeloid cells-2,TREM2)高表达的心脏驻留巨噬细胞吞噬,然后递送到酸性溶酶体环境[5]。溶酶体是抵御外来入侵者的第一线细胞器,在巨噬细胞的降解清除功能中发挥关键作用[25]。本研究利用盲肠结扎穿孔术建立脓毒症小鼠模型,发现脓毒症后小鼠心肌细胞凋亡显著增加,并且心脏驻留巨噬细胞对心肌细胞的吞噬显著增强。通过提取心脏驻留巨噬细胞并在转录组水平分析,发现脓毒症后心脏驻留巨噬细胞溶酶体功能损伤。

溶酶体降解功能的发挥依赖于管腔内的不同水解酶,溶酶体内水解酶发挥正常降解功能需要一个偏酸性的 pH 环境(pH=4.5~5.0)[26-27]。V-ATPase 是一种大型多亚基质子泵,也是负责酸化和维持细胞内区室 pH 的主要质子泵,由可溶性的 ATP 水解亚复合物(V1)和质子转位亚复合物(V0)组成[28-29]。V-ATPase 的活性被认为受其亚基组成、组装、构象的调控[28]。本研究发现脓毒症后心脏驻留巨噬细胞内 pH 值增加,导致溶酶体水解酶的总体活性以及主要水解酶表达水平显著下调。进一步研究发现,脓毒症导致心脏驻留巨噬细胞的 V-ATPase 的含量显著降低,其中 V-ATPase 的关键分子 ATP6V1A 下调最显著。因此,本研究结果提示脓毒症后心脏驻留巨噬细胞 ATP6V1A 表达降低致 V-ATPase 活性降低,引起溶酶体酸化不足,进一步影响溶酶体功能,使其对凋亡心肌细胞的清除能力减弱。

本研究从动物水平和细胞水平研究了脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞清除能力减弱的机制,为寻找改善脓毒症心脏功能障碍的治疗靶点提供了理论依据。但本研究存在一定的局限性:本研究通过检测脓毒症 24 h 后小鼠心脏中心脏驻留巨噬细胞和心肌细胞的共定位以及在体外通过凋亡心肌细胞和巨噬细胞共培养 2 h 来评估心脏驻留巨噬细胞对心肌细胞的吞噬及降解能力,未能追踪巨噬细胞吞噬并降解凋亡心肌细胞的动态过程。因此,在未来的研究中,还需进一步完善对巨噬细胞吞噬并降解凋亡心肌细胞的动态过程的研究。

综上所述,脓毒症后心脏驻留巨噬细胞对凋亡心肌细胞的清除能力降低,其机制可能与其溶酶体 V-ATPase 重要亚基 ATP6V1A 和溶酶体水解酶活性降低有关,提示靶向心脏驻留巨噬细胞溶酶体 ATP6V1A 的治疗措施可能通过减少凋亡心肌细胞累积改善脓毒症心脏功能障碍,但仍需进一步研究。

参考文献:

[1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, *et al*. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

[2] VIEILLARD-BARON A, CAILLE V, CHARRON C, *et al*. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock[J]. Crit Care Med, 2008, 36(6): 1701-1706. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318174db05.

[3] SCHILPEROORT M, NGAI D, KATERELOS M, *et al*. PFKFB2-mediated glycolysis promotes lactate-driven continual efferocytosis by macrophages[J]. Nat Metab, 2023, 5(3):

431-444. DOI: 10.1038/s42255-023-00736-8.
[4] MORIOKA S, MAUERÖDER C, RAVICHANDRAN K S. Living on the edge: efferocytosis at the interface of homeostasis and pathology[J]. Immunity, 2019, 50(5): 1149-1162. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.04.018.
[5] ZHANG K, WANG Y, CHEN S Y, *et al*. TREM2^{hi} resident macrophages protect the septic heart by maintaining cardiomyocyte homeostasis[J]. Nat Metab, 2023, 5(1): 129-146. DOI: 10.1038/s42255-022-00715-5.
[6] POON I K, LUCAS C D, ROSSI A G, *et al*. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(3): 166-180. DOI: 10.1038/nri3607.
[7] PINTO A R, ILINYKH A, IVEY M J, *et al*. Revisiting cardiac cellular composition[J]. Circ Res, 2016, 118(3): 400-409. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.
[8] ZAMAN R, EPELMAN S. Resident cardiac macrophages: Heterogeneity and function in health and disease[J]. Immunity, 2022, 55(9): 1549-1563. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.08.009.
[9] LEID J, CARRELHA J, BOUKARABILA H, *et al*. Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation[J]. Circ Res, 2016, 118(10): 1498-1511. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308270.
[10] CAHILL T J, SUN X, RAVAUD C, *et al*. Tissue-resident macrophages regulate lymphatic vessel growth and patterning in the developing heart[J]. Development, 2021, 148(3): dev194563. DOI: 10.1242/dev.194563.
[11] NICOLÁS-ÁVILA J A, LECHUGA-VIECO A V, ESTEBAN-MARTÍNEZ L, *et al*. A network of macrophages supports mitochondrial homeostasis in the heart[J]. Cell, 2020, 183(1): 94-109.e23. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.031.
[12] EPELMAN S, LAVINE K J, BEAUDIN A E, *et al*. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation[J]. Immunity, 2014, 40(1): 91-104. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.11.019.
[13] JIA D L, CHEN S Q, BAI P Y, *et al*. Cardiac resident macrophage-derived legumain improves cardiac repair by promoting clearance and degradation of apoptotic cardiomyocytes after myocardial infarction[J]. Circulation, 2022, 145(20): 1542-1556. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057549.
[14] BOADA-ROMERO E, MARTINEZ J, HECKMANN B L, *et al*. The clearance of dead cells by efferocytosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(7): 398-414. DOI: 10.1038/s41580-020-0232-1.
[15] XU H, REN D. Lysosomal physiology[J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77: 57-80. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021014-071649.
[16] BALLABIO A, BONIFACINO J S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 101-118. DOI: 10.1038/s41580-019-0185-4.
[17] JOHNSON D E, OSTROWSKI P, JAUMOUILLÉ V, *et al*. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH[J]. J Cell Biol, 2016, 212(6): 677-692. DOI: 10.1083/jcb.201507112.
[18] WANG X N, WU R Y, ZHAI P S, *et al*. Hypoxia promotes EV secretion by impairing lysosomal homeostasis in HNSCC through negative regulation of ATP6V1A by HIF-1α[J]. J Extracell Vesicles, 2023, 12(2): e12310. DOI: 10.1002/jev2.12310.
[19] RITTIRSCH D, HUBER-LANG M S, FLIERL M A, *et al*. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.
[20] MARSHALL J C. Why have clinical trials in sepsis failed?[J]. Trends Mol Med, 2014, 20(4): 195-203. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.01.007.
[21] VAN DER POLL T, SHANKAR-HARI M, WIERSINGA W J. The immunology of sepsis[J]. Immunity, 2021, 54(11): 2450-2464. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.10.012.
[22] SHE H, TAN L, DU Y L, *et al*. VDAC2 malonylation participates in sepsis-induced myocardial dysfunction *via* mitochondrial-related ferroptosis[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(10): 3143-3158. DOI: 10.7150/ijbs.84613.
[23] YANG H, ZHANG Z C. Sepsis-induced myocardial dysfunction: the role of mitochondrial dysfunction[J]. Inflamm Res, 2021, 70(4): 379-387. DOI: 10.1007/s00011-021-01447-0.
[24] OUYANG M Z, OUYANG X N, PENG Z F, *et al*. Heart-targeted amelioration of sepsis-induced myocardial dysfunction by microenvironment responsive nitric oxide nanogenerators *in situ*[J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 263. DOI: 10.1186/s12951-022-01457-y.
[25] SCHUSTER E M, EPPLE M W, GLASER K M, *et al*. TFEB induces mitochondrial itaconate synthesis to suppress bacterial growth in macrophages[J]. Nat Metab, 2022, 4(7): 856-866. DOI: 10.1038/s42255-022-00605-w.
[26] SONG Q Y, MENG B, XU H D, *et al*. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent lysosomal acidification in neurodegenerative diseases[J]. Transl Neurodegener, 2020, 9(1): 17. DOI: 10.1186/s40035-020-00196-0.
[27] WARTOSCH L, BRIGHT N A, LUZIO J P. Lysosomes[J]. Curr Biol, 2015, 25(8): R315-6. DOI: 10.1016/j.cub.2015.02.027.
[28] SETTEMBRE C, PERERA R M. Lysosomes as coordinators of cellular catabolism, metabolic signalling and organ physiology[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2024, 25: 223-245. DOI: 10.1038/s41580-023-00676-x.
[29] VASANTHAKUMAR T, RUBINSTEIN J L. Structure and roles of V-type ATPases[J]. Trends Biochem Sci, 2020, 45(4): 295-307. DOI: 10.1016/j.tibs.2019.12.007.

(收稿:2024-06-18;修回:2024-10-16)
(编辑 刘秋池)