

半乳糖凝集素-3 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路 促进巨噬细胞自噬分化

陈杨,冯莹,卢晓,郑蓉

(武汉市第一医院心血管内科,湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨半乳糖凝集素-3(galectin-3, Gal-3)通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR)通路调控巨噬细胞自噬及极化的作用,为炎症疾病的靶向治疗提供新的理论依据。方法 采用 RAW264.7 细胞,实验分为 4 组:对照组(不作处理)、模型组(100 nmol/L 雷帕霉素诱导自噬 6 h)、Gal-3 过表达组(Gal-3 OE 组,转染 pcDNA3.1-Gal-3 质粒)及敲低组(Gal-3 KD 组,感染 shRNA-Gal-3 慢病毒)。采用免疫荧光法检测微管相关蛋白 1 轻链 3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B)水平、Western blotting 法检测自噬标志物 p62 及 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白;流式细胞术评估巨噬细胞极化(CD86/CD206)及凋亡情况;酶联免疫吸附试验检测炎症因子[肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)]水平;RT-qPCR 法检测自噬相关基因精氨酸酶 1(arginase 1, Arg-1)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达;荧光染色法测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。结果 与模型组相比, Gal-3 OE 组 p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 水平下调($P < 0.01$), LC3B 升高($P < 0.05$), 差异有统计学意义; CD206 阳性细胞比例、IL-10、TGF- β 及 Arg-1 mRNA 表达升高($P < 0.01$), iNOS mRNA 表达降低($P < 0.01$), 差异有统计学意义;同时 ROS 水平与细胞凋亡率升高($P < 0.05$)。Gal-3 KD 组则呈现相反效应。结论 Gal-3 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路参与巨噬细胞自噬及 M2 型极化, 伴随 ROS 依赖性凋亡调控。

关键词:半乳糖凝集素-3; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点; 自噬; 活性氧; 凋亡

中图分类号:R392.5

文献标志码:A

Galectin-3 promotes autophagy and polarization of macrophages via the PI3K/Akt/mTOR pathway

CHEN Yang, FENG Ying, LU Xiao, ZHENG Rong

(Department of Cardiovascular Medicine, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China)

Abstract: Objective To explore the role of galectin-3 (Gal-3) in regulating autophagy and polarization of macrophages through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway, thus providing a new theoretical basis for targeted therapy of inflammatory diseases. **Methods** RAW264.7 cells were divided into four groups: control group (untreated), model group (treated with 100 nmol/L rapamycin for 6 hours to induce autophagy), Gal-3 overexpression group (Gal-3 OE, transfected with pcDNA3.1-Gal-3 plasmid), and Gal-3 knockdown group (Gal-3 KD, infected with shRNA-Gal-3 lentivirus). Immunofluorescence was used to detect

the level of microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), Western blotting to assess autophagy markers p62 and related proteins in the PI3K/Akt/mTOR pathway, flow cytometry to evaluate macrophage polarization (CD86/CD206) and apoptosis, enzyme-linked immunosorbent assay to measure inflammatory factors (tumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin-10, transforming growth factor- β), RT-qPCR to detect the expression of autophagy-related genes arginase1 and inducible nitric oxide synthase, and fluorescent staining to determine reactive oxygen species levels.

Results Compared with the model group, the Gal-3 OE group showed downregulated levels of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR ($P<0.01$), increased LC3B ($P<0.05$), with statistical significance. The proportion of CD206-positive cells and the expressions of IL-10, TGF- β , and Arg-1 mRNA increased ($P<0.01$), while iNOS mRNA expression decreased ($P<0.01$), with statistical significance. Simultaneously, ROS levels and apoptosis rate increased ($P<0.05$). The Gal-3 KD group exhibited opposite effects. **Conclusion** Gal-3 participates in macrophage autophagy and M2-type polarization by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway, accompanied by ROS-dependent apoptosis regulation.

Key words: Galectin-3; Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway; Autophagy; Reactive oxygen species; Apoptosis

巨噬细胞作为免疫系统的关键执行者,其 M1/M2 型极化平衡对炎症调控、组织修复至关重要^[1-2]。M1 型巨噬细胞通过分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等促炎因子启动免疫防御, M2 型巨噬细胞则依赖白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等发挥抗炎与组织修复功能^[3-4]。自噬作为细胞维持稳态的核心过程,受磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶点 (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR) 信号通路精密调控^[5]。该通路是自噬的核心负调控轴:生长因子或营养充足时,PI3K 激活下游 Akt,进而磷酸化 mTOR 并抑制自噬起始复合体 ULK1;而在应激状态下,该通路活性降低,解除 mTOR 对自噬的抑制^[6-7]。半乳糖凝集素-3 (galectin-3, Gal-3) 作为多功能糖结合蛋白,广泛参与细胞黏附、炎症反应及免疫应答^[8-9]。Gal-3 能否通过干预 PI3K/Akt/mTOR 通路,进而驱动巨噬细胞发生“自噬-极化”的协同转变,是理解其免疫调节功能与相关疾病机制的关键。

炎症性疾病的发生发展与巨噬细胞极化失衡密切相关^[10],探索其调控机制具有重要临床意义。目前研究表明,靶向 Gal-3 或自噬通路可能成为治疗慢性炎症性疾病的新策略,但 Gal-3-自噬-极化三者之间的调控网络尚未明确。基于此,本研究通过构建 Gal-3 过表达与敲低的细胞模型,结合 PI3K/Akt/mTOR 通路活性检测、自噬与极化标志物分析,旨在明确 Gal-3 是否通过该通路调控巨噬细胞自噬

与极化进程,为炎症性疾病的机制研究与靶点开发提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 购自武汉普诺赛生物科技有限公司,过表达质粒 pcDNA3.1-Gal-3 及敲低用 shRNA-Gal-3 慢病毒购自南京金斯瑞生物科技有限公司。

1.1.1 主要试剂

抗体:Gal-3 (货号 89572)、微管相关蛋白 1 轻链 3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B, LC3B, 货号 3868)、p62 (货号 88588)、PI3K (货号 4249)、p-PI3K (货号 17366)、Akt (货号 9272)、p-Akt (货号 4060)、mTOR (货号 2972)、p-mTOR (货号 5536) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;CD86-APC (货号 305412)、CD206-PE (货号 321106) 购自美国 BioLegend 公司。

试剂盒:Lipofectamine 3000 转染试剂 (货号 L3000015) 购自美国 Invitrogen 公司;Alexa Fluor 488 (货号 108321-42-2) 和细胞凋亡检测试剂盒 (货号 YT131) 购自北京索莱宝生物科技有限公司;PrimeScript™ RT 试剂盒 (货号 RR047A) 购自日本 Takara Bio 公司;TNF- α (货号 EK0527)、IL-6 (货号 EK0411)、IL-10 (货号 EK0417) 和 TGF- β 1 (货号 EK0530) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (S0033S) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

主要试剂:雷帕霉素(货号HY-10219)购自美国 MedChemexpress 公司, LysoTracker Red DND-99 (货号L7528)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.2 主要仪器

FACSVerse 流式细胞仪(美国 BD 公司), TCS SP8 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司), 7500 Fast 实时定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞模型构建及实验分组

采用 100 nmol/L 雷帕霉素处理 RAW264.7 细胞 6 h 以构建自噬模型。为进行 Gal-3 功能研究, 将细胞以 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板, 培养 24 h 后, 使用 LipofectamineTM 3000 转染试剂(5 μ L/孔)分别转染 pcDNA3.1-Gal-3 质粒或 shRNA-Gal-3 慢病毒(质粒用量 1 μ g/孔)。转染 48 h 后, 采用 Western blotting 验证 Gal-3 的过表达与敲低效率。实验共设置 4 组: 对照组(不作任何处理)、模型组(100 nmol/L 雷帕霉素处理)、Gal-3 过表达组(Gal-3 OE 组)和 Gal-3 敲低组(Gal-3 KD 组)。

1.2.2 免疫荧光染色法分析 LC3B 水平

为观察自噬水平, 对活细胞进行免疫荧光染色。首先, 使用 60 nmol/L LysoTracker(Red DND-99) 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育细胞 40 min, PBS 洗涤后用 4% (w/v) 多聚甲醛固定 5 min, 0.1% (w/v) Triton X-100 透膜 5 min, 5% (w/v) 牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA) 封闭 1 h。随后加入 LC3B 一抗(1:200) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗涤后加入 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗鼠二抗(1:500) 室温避光孵育 1 h, DAPI 复染细胞核 5 min。PBS 清洗后封片, 使用共聚焦显微镜(63 \times 油镜) 采集图像, 并采用 ImageJ 1.53t 分析 LC3B 斑点数量。

1.2.3 Western blotting 检测自噬及通路相关蛋白

提取各组细胞总蛋白, 采用二辛可宁酸法(bicinchoninic acid, BCA) 进行定量。取等量蛋白经 12% (w/v) SDS-PAGE 电泳分离后转至聚偏二氟乙烯膜。膜经 5% (w/v) 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入以下一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜: Gal-3、p62、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR 和 p-mTOR。洗膜后加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗(1:5 000) 室温孵育 1 h, 增强化学发光显影, 并使用 ImageJ 1.53t 软件分析目标条带灰度值。

1.2.4 流式细胞术检测巨噬细胞极化

收集各组细胞, PBS 洗涤后用胰酶消化, 离心重悬并调整细胞密度至 1×10^6 个/mL。取 1×10^5 个细胞, 加入 CD86-APC(1:100) 和 CD206-PE(1:200) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 设置同型和单染对照。使用流式细胞仪检测, FlowJo 10.0.7 软件分析 CD86 与 CD206 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI) 值, 并计算 M2/M1 极化比率(CD206/CD86 的 MFI 比值)。

1.2.5 ELISA 法检测细胞极化代表性炎症因子水平

收集各组细胞培养上清, 采用相应的 ELISA 试剂盒按说明书步骤检测 TNF- α 、IL-6(M1 型代表性因子) 及 IL-10、TGF- β (M2 型代表性因子) 水平。简要步骤为: 包被捕获抗体(4 $^{\circ}$ C 过夜)、5% (w/v) BSA 封闭, 依次加入样品和标准品、生物素化检测抗体及 HRP-链霉亲和素, 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色后以硫酸终止反应, 于 450 nm 波长测定 OD 值并根据标准曲线计算浓度。

1.2.6 RT-qPCR 法检测自噬与极化相关基因表达

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 经氯仿-异丙醇沉淀纯化后, 以 DEPC 水溶解, 并测定其浓度与纯度。使用 PrimeScriptTM RT 试剂盒进行反转录以获得 cDNA, 反应体系(10 μ L) 包括 1 μ g RNA、Oligo dT 随机引物及反转录酶。反应程序设置为 37 $^{\circ}$ C 15 min、85 $^{\circ}$ C 5 s。采用 SYBRTM Green 法进行 RT-qPCR, 反应体系为 20 μ L, 含 2 \times 预混液、特异性引物及稀释后的 cDNA。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 随后进行 40 个循环(95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 30 s), 最后进行熔解曲线分析。以 GAPDH 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	方向	引物序列 5'-3'
Gal-3	上游	GCTGCTGCTGCTGCTGAC
	下游	GCTGCTGCTGCTGCTGAG
iNOS	上游	CCGAGTACGCCAAGATGAAG
	下游	GCTTGTCGGAGATGGTGGT
Arg-1	上游	CTGGACCTGCTGCTGATGTT
	下游	GCTGCTGCTGATGTTGATGG
GAPDH	上游	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	下游	GAAGATGGTGTATGGGATTTT

1.2.7 荧光染色法检测细胞 ROS 水平

收集 4 组细胞,使用无血清培养基洗涤。加入 ROS 特异性荧光探针,于 37 °C 避光孵育 30 min。PBS 洗涤细胞 3 次,用 4% (w/v) 多聚甲醛固定 15 min。封片后于荧光显微镜下观察并采集图像,使用 ImageJ 1.53t 软件分析荧光强度以评估各组细胞的 ROS 水平。

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡

收集四组 RAW264.7 细胞,经 PBS 洗涤后,重悬于 Binding Buffer(10×浓缩液按 1:9 比例以去离子水稀释)。依次加入 Annexin V-FITC(5 μL)与 PI(5 μL),室温避光孵育 15 min。使用流式细胞仪进行检测,并使用 FlowJo 10.0.7 软件分析细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,事后比较采用 Tukey 检验,所有实验均独立重复 3 次。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 LC3B 表达水平

免疫荧光染色分析 LC3B 水平的结果显示,各组间的 LC3B 表达差异有统计学意义($F = 25.54$, $P < 0.001$)。与模型组(1.48 ± 0.08)相比,Gal-3 KD 组 LC3B 相对表达量(1.10 ± 0.12)下降,差异有统计学意义($P = 0.018$)。见图 1。

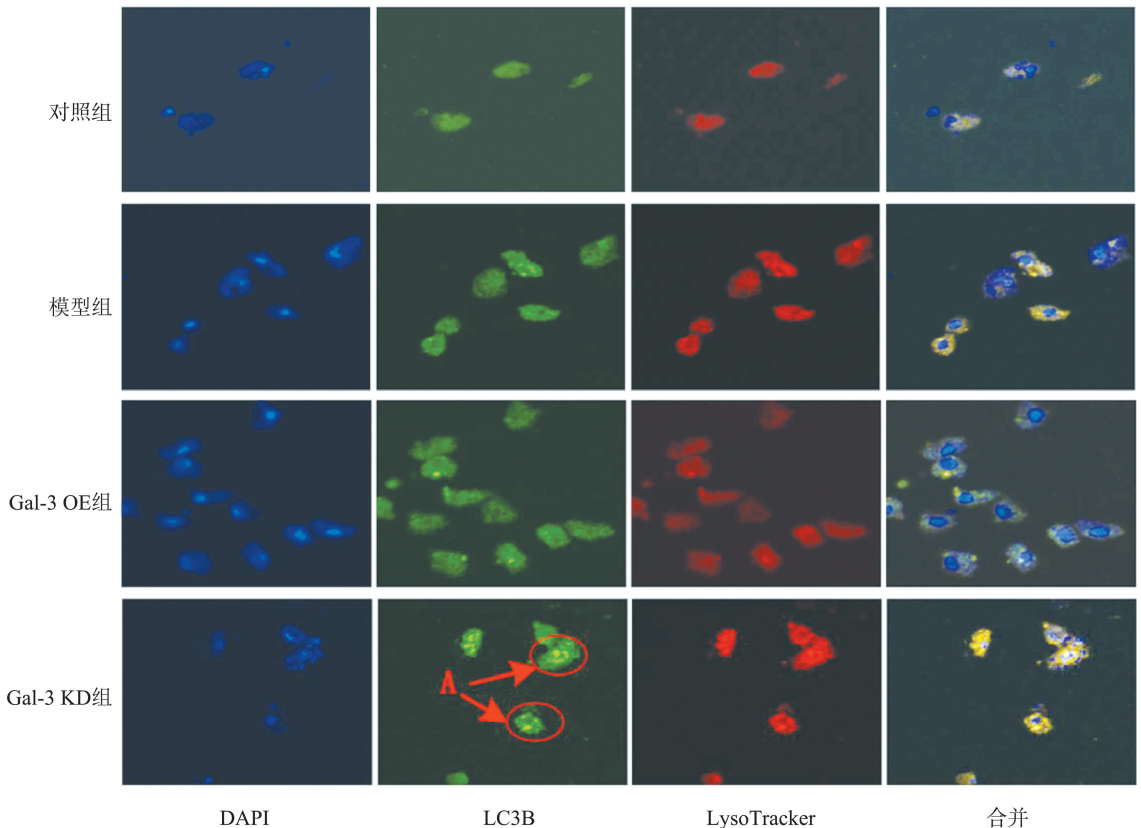


图 1 免疫荧光染色检测细胞 LC3B 水平

Figure 1 Immunofluorescence staining detects the level of LC3B in cells

2.2 Gal-3 与 PI3K/Akt/mTOR 通路活性

Western blotting 检测 Gal-3、p62 及 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白的结果显示,4 组间的 Gal-3 ($F = 319.79$)、p62 ($F = 51.73$)、p-PI3K ($F = 68.902$)、p-Akt ($F = 292.60$) 及 p-mTOR ($F = 920.62$) 的表达差异均有统计学意义($P < 0.001$)。与模型组相比,

Gal-3 OE 组 Gal-3 蛋白表达增加 ($P = 0.003$), p-PI3K ($P < 0.001$)、p-Akt ($P < 0.001$) 及 p-mTOR ($P = 0.010$) 水平下降;Gal-3 KD 组上述蛋白的表达呈相反趋势,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

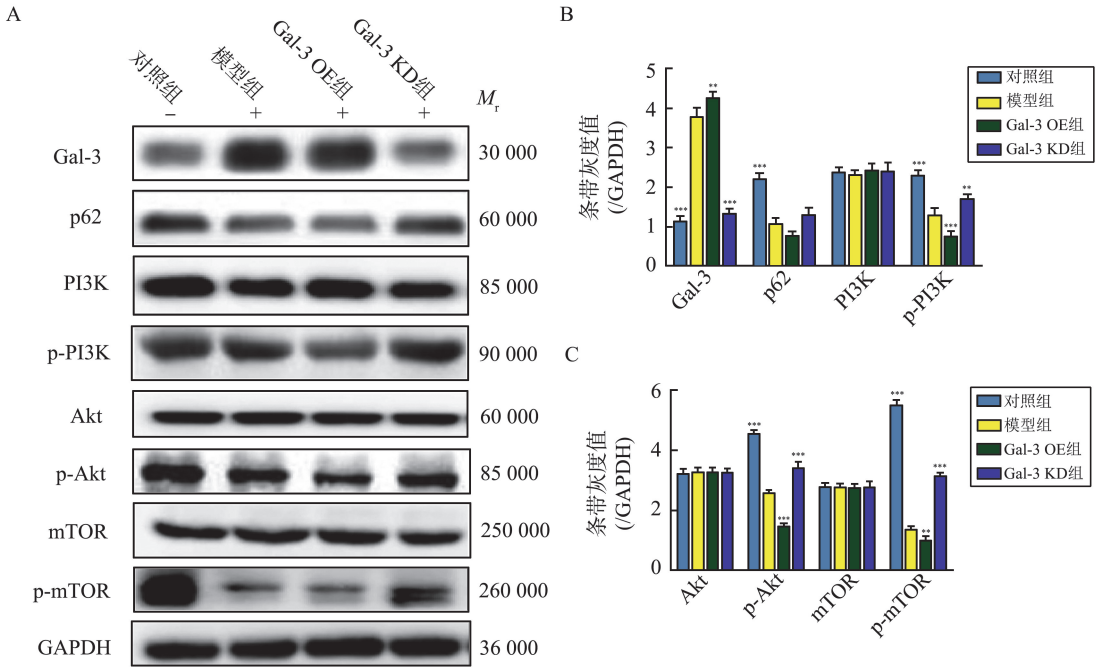


图2 Gal-3、p62及PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达

A: 各组蛋白条带图; B、C: 各蛋白相对表达水平量化分析结果。

Figure 2 Expression of Gal-3, p62 and PI3K/Akt/mTOR pathway-related proteins

A: Protein bands of each group; B, C: Quantitative analysis of relative expression levels of each protein.

注: ** $P < 0.01$ vs. 模型组; *** $P < 0.001$ vs. 模型组。

2.3 巨噬细胞极化标志物表达

流式细胞术分析细胞表面标志物 CD86 与 CD206 的结果显示, 4 组间的 CD86 与 CD206 的 MFI 及 CD206/CD86 的 MFI 比值的差异均有统计学意义。与对照组相比, 模型组 CD86 的 MFI 降低,

CD206 的 MFI 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。与模型组相比, Gal-3 OE 组 CD86 的 MFI 下降 ($P = 0.002$), 且 CD206/CD86 的 MFI 比值最高, Gal-3 KD 组 CD206/CD86 的 MFI 增加, 但低于 Gal-3 OE 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 2。

表 2 细胞 CD86 和 CD206 水平

Table 2 Levels of cell CD86 and CD206

组别	CD86	CD206	CD206/CD86
对照组	4 222.77±118.62	5 673.00±556.69	1.35±0.03
模型组	1 411.65±128.37	11 304.33±1 300.36	8.04±0.09
Gal-3 OE 组	941.06±46.72	12 504.00±788.39	13.25±0.14
Gal-3 KD 组	2 670.27±111.02	8 118.33±199.92	3.03±0.10
<i>F</i>	574.30	43.26	8 837.98
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 炎症因子表达水平

ELISA 检测细胞培养上清炎症因子水平的结果显示, 4 组间的 TNF- α 、IL-6、IL-10 及 TGF- β 的表达差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。与模型组相比,

Gal-3OE 组 TNF- α 、IL-6 水平降低, IL-10、TGF- β 升高, 而 Gal-3 KD 组呈现相反趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 3。

表 3 各组自噬相关炎症因子水平/(pg/mL)

Table 3 Levels of autophagy-related inflammatory factors in each group/(pg/mL)

组别	TNF- α	IL-6	IL-10	TGF- β
对照组	25.57±2.91	18.16±2.62	45.70±3.86	61.15±5.36
模型组	85.83±4.01	61.87±3.37	74.49±3.94	100.73±4.55
Gal-3 OE 组	40.89±4.04	28.65±2.52	122.31±8.18	157.50±6.82
Gal-3 KD 组	112.05±7.74	76.29±4.61	30.24±2.35	41.01±1.99
<i>F</i>	189.53	196.32	191.22	316.79
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 自噬与极化相关基因表达

RT-qPCR 检测基因表达的结果显示,4 组间的 Gal-3、iNOS 及 Arg-1 表达的差异有统计学意义 ($P <$

0.001)。与模型组相比,Gal-3 KD 组 Gal-3 表达下降,iNOS 表达升高,差异有统计学意义 ($P <$ 0.001)。见表 4。

表 4 各组自噬相关基因表达水平

Table 4 Expression levels of autophagy-related genes in each group

组别	Gal-3	iNOS	Arg-1
对照组	0.73±0.07	1.63±0.08	1.15±0.08
模型组	1.53±0.11	1.12±0.10	2.32±0.13
Gal-3 OE 组	1.86±0.05	0.50±0.08	2.73±0.08
Gal-3 KD 组	0.97±0.12	0.74±0.05	2.14±0.15
<i>F</i>	99.60	120.95	104.84
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

2.6 ROS 水平

荧光染色测定 ROS 水平的结果显示,4 组间 ROS 荧光强度的差异有统计学意义 ($F = 50.04, P <$ 0.001)。与模型组 (0.30 ± 0.05) 相比,Gal-3 OE 组

ROS 荧光强度 (0.48 ± 0.04) 增强 ($P = 0.001$),Gal-3 KD 组 (0.21 ± 0.02) 减弱 ($P = 0.036$),差异有统计学意义。见图 3。

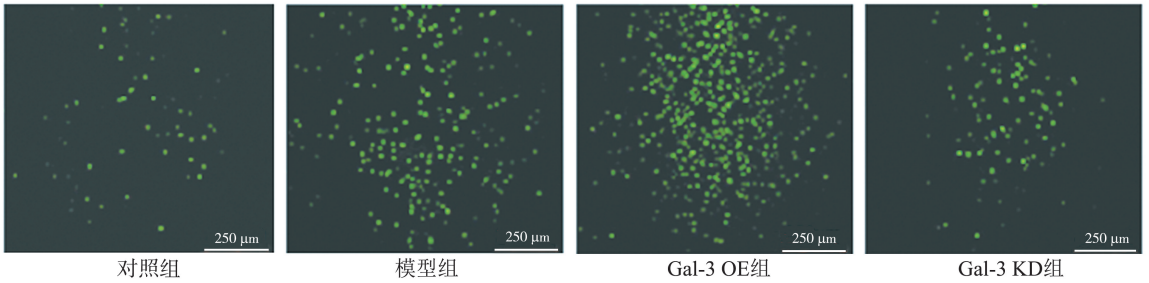


图 3 荧光染色分析各组细胞 ROS 水平
Figure 3 ROS levels of cells in each group were analyzed by fluorescence staining

2.7 细胞凋亡率

流式细胞术检测细胞凋亡的显示,4 组间细胞凋亡的差异有统计学意义 ($F = 188.40, P <$ 0.001)。

与模型组 (28.00 ± 2.66) 相比,Gal-3 OE 组 (50.16 ± 2.24) 和 Gal-3KD 组的凋亡率 (40.53 ± 3.25) 升高,差异有统计学意义 ($P <$ 0.001)。见图 4。

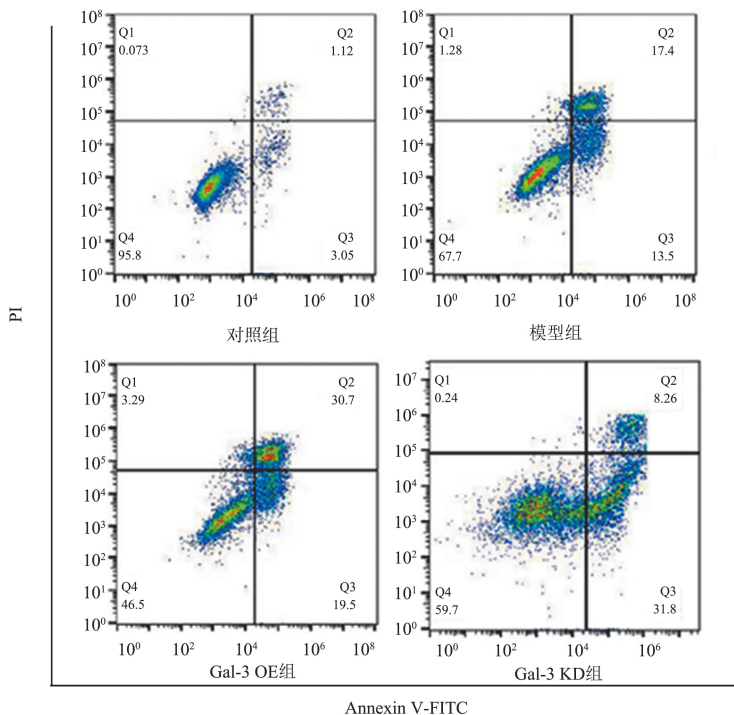


图 4 各组细胞凋亡情况
Figure 4 Apoptosis of cells in each group

3 讨论

巨噬细胞的 M1/M2 极化平衡及其与细胞自噬的交互作用是调控炎症进程的关键环节^[11]。PI3K/Akt/mTOR 通路作为细胞内重要的信号转导枢纽,是调控自噬启动的关键负向开关,其活性受到生长因子、营养状态等多种信号的精密调节。Gal-3 在细胞生长、黏附、炎症及免疫应答中扮演多重角色,其异常表达与多种慢性炎症性疾病及纤维化进程密切相关^[12-13]。本研究系统验证 Gal-3 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,协同促进巨噬细胞自噬活化与 M2 型极化的新功能。与以往多关注 Gal-3 在疾病终末阶段表达变化的研究相比,本研究通过主动干预 RAW264.7 细胞中 Gal-3 的表达水平,并结合多维度功能学检测,直接验证了 Gal-3 作为上游调控分子,通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路活性,从而协同促进巨噬细胞自噬流与 M2 型极化的新功能,为理解炎症微环境中免疫细胞的代谢重编程提供了新的理论视角。

Pei 等^[14]研究发现,沉默 Gal-3 可逆转香烟烟雾提取物引起的 Akt/mTOR 通路抑制和 AMPK 激活,减少内皮前体细胞 ROS 生成和细胞功能障碍。本研究发现,过表达 Gal-3 可显著下调 RAW264.7 中 p-PI3K、p-Akt 及 p-mTOR 的蛋白水平,提示 Gal-3 是 PI3K/Akt/mTOR 通路的一个潜在抑制因子,与上述研究结果基本一致。经典自噬调控理论认为,PI3K/Akt/mTOR 信号通路是自噬的关键负调控途径。该通路的激活会抑制自噬体的形成与成熟,而通路抑制则可解除对自噬的阻断^[15]。本研究的发现扩展了对 Gal-3 信号调控范围的认知,并将其功能与巨噬细胞的自噬调控这一具体生物学过程直接联系起来,为其在免疫代谢中的作用提供了新的机制依据。

自噬作为维持细胞内环境稳定的重要过程,已被证实与巨噬细胞功能极化密切相关。巨噬细胞的极化表型通常由特征性标志物界定,其中 M2 型极化与 CD206、IL-10、TGF- β 及 Arg-1 等分子的上调相关^[16],而 M1 型极化则与 iNOS、TNF- α 、IL-6 等分子的表达增加相联系^[17]。已有研究证实,自噬通过降解泛素化蛋白调控 NF- κ B 通路,从而抑制 M1 型炎症反应^[18];Zhu 等^[19]进一步发现,自噬缺陷会损害巨噬细胞的 M2 极化能力。本研究发现,由 Gal-3 过表达所诱导的自噬活化,与 M2 型极化标志物的上调及 M1 型标志物的抑制同步发生,与

上述研究结论基本一致,提示在炎症微环境中, Gal-3 可能通过增强自噬,为巨噬细胞向修复性表型转换提供必要的代谢基础。

在自噬的分子机制层面,抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路可解除对 ULK1 复合物的抑制,促进自噬体形成^[20]。Jiang 等^[21]在对肺动脉平滑肌细胞的研究中发现, Gal-3 敲低可显著上调自噬底物 p62 的表达水平,提示 Gal-3 可能通过促进自噬流清除 p62,参与细胞稳态维持。本研究发现, Gal-3 过表达可导致 LC3B-II/I 比值升高与 p62 蛋白降解,提示自噬流畅通,表明 Gal-3 是驱动上述自噬-M2 极化协同事件的一个关键上游诱因,其在连接信号通路、自噬活化与细胞功能表型中均起到调控作用。

ROS 作为自噬的上游信号,其适度升高可激活自噬,而水平过高则会损伤线粒体并触发 Caspase 依赖性凋亡^[22-23]。Chou 等^[24]研究发现, Gal-3 能够通过激活 NADPH 氧化酶促进 ROS 产生,从而诱导肿瘤细胞凋亡。本研究发现, Gal-3 过表达在促进自噬与 M2 极化的同时,也伴随 ROS 水平与凋亡率的升高,与上述研究结果基本一致。提示 ROS/凋亡轴可能是 Gal-3 免疫调控网络中的一个组成部分。本研究结果还表明, Gal-3 KD 组细胞在 ROS 水平降低的情况下,凋亡率仍高于对照组的结果,与“自噬抑制引发凋亡补偿”的观点^[25]一致,提示 ROS/凋亡轴是 Gal-3 免疫调控网络中的一个复杂组成部分。Gal-3 过表达所引发的 ROS 升高,可能是在激活保护性自噬通路的同时,也启动了一个旨在清除过度活化细胞的“安全开关”机制。建议未来重点解析 ROS 水平的精确调控阈值,以及这一“开关”在生理与病理状态下的具体意义。

本研究存在一些局限性:①实验仅基于 RAW264.7 细胞系开展,未在原代巨噬细胞或动物模型中进行验证,限制了结果的外推性;②未深入解析 ROS 产生的具体上游机制以及其在自噬与极化的因果作用,限制了对 ROS 在该调控网络中中介作用的完整阐释;③仅初步明确 Gal-3 调控 PI3K/Akt/mTOR 通路的调控作用,未能进一步鉴定其直接分子靶点,该通路在分子层面的精准调控逻辑仍有待阐明。

综上所述,本研究证实 Gal-3 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路,协同促进巨噬细胞自噬活化及 M2 极化,并伴随 ROS 依赖性凋亡,为靶向“Gal-3-自噬-极化”轴调控炎症性疾病提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 李向阳, 贾赤字. 巨噬细胞膜包裹的纳米颗粒通过抑制拟泛素化促进糖尿病创面的双重免疫调节修复[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2025, 41(2): 179.
LI Xiangyang, JIA Chiyu. Nanoparticles coated with macrophage membrane promote the double immunomodulatory repair of diabetic wounds by inhibiting ubiquitination[J]. Chinese Journal of Burns and Wounds, 2025, 41(2): 179.
- [2] 袁鑫, 史宏硕, 樊炜静, 等. 组蛋白乳酸化调控巨噬细胞功能促进炎症微环境修复的研究进展[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(15): 1180-1186.
YUAN Xin, SHI Hongshuo, FAN Weijing, et al. Research progress of histone lactate regulating macrophage function and promoting inflammatory microenvironment repair[J]. Journal of Hainan Medical University, 2024, 30(15): 1180-1186.
- [3] Chen XC, Zhu LJ, Wu HX. The role of M1/M2 macrophage polarization in primary Sjogren's syndrome [J]. Arthritis Res Ther, 2024, 26(1): 101. doi:10.1186/s13075-024-03340-7
- [4] Liu TT, Chen DR, Tang SS, et al. P53 alleviates the progression of periodontitis by reducing M1-type macrophage differentiation[J]. Inflammation, 2024, 47(4): 1170-1184.
- [5] Morimoto A, Takasugi N, Pan YX, et al. Methyl vinyl ketone and its analogs covalently modify PI3K and alter physiological functions by inhibiting PI3K signaling[J]. J Biol Chem, 2024, 300(3): 105679. doi:10.1016/j.jbc.2024.105679
- [6] Rahman MA, Jalouli M, Bhajan SK, et al. A comprehensive review of nanoparticle-based drug delivery for modulating PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(5): 1868. doi:10.3390/ijms26051868
- [7] Liu WD, Xia KZ, Huang XH, et al. HMGCL activates autophagy in osteosarcoma through β -HB mediated inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. J Transl Med, 2025, 23(1): 219. doi:10.1186/s12967-025-06227-6
- [8] Brubel R, Polgar B, Szereday L, et al. Alteration of serum Gal-3 levels in endometrium-related reproductive disorders[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(4): 1630. doi:10.3390/ijms26041630
- [9] 陈健, 高雅, 李丹彤, 等. 基于Gal-3/NLRP3/IL-1 β 信号通路探讨异荛草苷治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(8): 1123-1131.
CHEN Jian, GAO Ya, LI Dantong, et al. Based on GAL-3/NLRP-3/IL-1 β signaling pathway, the mechanism of isoorientin in the treatment of ulcerative colitis was discussed[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2024, 35(8): 1123-1131.
- [10] 张美玲, 孙卉, 孙文凯, 等. 鼻腔滴入 γ 干扰素对变应性鼻炎大鼠外周血Th17/Treg细胞及相关细胞因子的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2020, 58(1): 13-19.
ZHANG Meiling, SUN Hui, SUN Wenkai, et al. The effect of nasal γ -interferon administration on Th17/Treg cells and related cytokines in peripheral blood of rats with allergic rhinitis [J]. Journal of Shandong University (Medical Edition), 2020, 58(1): 13-19.
- [11] Eun K, Kyung S, Bang YN, et al. SOCS3 protein mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells against acute lung injury[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 8256. doi:10.3390/ijms24098256
- [12] 米传晓, 刘军妮, 邹承伟, 等. 血清可溶性肿瘤因子2抑制剂、半乳糖凝集素-3蛋白水平在慢性心衰分级及预后中的应用[J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(1): 62-67.
MI Chuanxiao, LIU Junni, ZOU Chengwei, et al. Application of serum soluble tumor factor 2 inhibitor and galectin-3 protein levels in grading and prognosis of chronic heart failure[J]. Journal of Shandong University (Medical Edition), 2019, 57(1): 62-67.
- [13] Ge MM, Chen N, Zhou YQ, et al. Galectin-3 in microglia-mediated neuroinflammation: implications for central nervous system diseases[J]. Curr Neuropharmacol, 2022, 20(11): 2066-2080.
- [14] Pei CZ, Wang XY, Lin YJ, et al. Inhibition of galectin-3 alleviates cigarette smoke extract-induced autophagy and dysfunction in endothelial progenitor cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7252943. doi:10.1155/2019/7252943
- [15] Negm A, El-Neanaey AA, El Sayed Khadr A, et al. Chlorogenic acid ameliorates CCl₄ (4)-induced liver fibrosis by modulating the PI3K/AKT/mTOR autophagy pathway[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2025, 25(13): 913-920.
- [16] Yan SW, Zhang R, Guo X, et al. Trichinella spiralis dipeptidyl peptidase 1 suppressed macrophage cytotoxicity by promoting M2 polarization via the STAT6/PPAR γ pathway[J]. Vet Res, 2023, 54(1): 77. doi:10.1186/s13567-023-01209-2
- [17] Liu HY, Niu QH, Wang T, et al. Lipotoxic hepatocytes promote nonalcoholic fatty liver disease progression by

- delivering microRNA-9-5p and activating macrophages [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(14): 3745-3759.
- [18] Guo J, Li Y, Ma K, et al. Enhancing autophagy mitigates LPS-induced neuroinflammation by inhibiting microglial M1 polarization and neuronophagocytosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2025, 19: 1546848. doi: 10.3389/fncel.2025.1546848
- [19] Zhu YC, Liu YY, Ma YX, et al. Macrophage autophagy deficiency-induced CEBPB accumulation alleviates atopic dermatitis *via* impairing M2 polarization [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(11): 113430. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113430
- [20] 陈梦雪, 胡婷, 蒲晗旭, 等. 基于网络药理学的葛根素调节非小细胞肺癌自噬和凋亡相关机制研究 [J]. *贵州医科大学学报*, 2024, 49(11): 1561-1576.
CHEN Mengxue, HU Ting, PU Hanxu, et al. Study on the mechanism of puerarin regulating autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer based on network pharmacology [J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2024, 49(11): 1561-1576.
- [21] Jiang G, Shi LF, Li LJ, et al. Activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway improves pulmonary arterial hypertension in MCT-induced rats by inhibiting autophagy [J]. *FASEB J*, 2024, 38(3): e23452. doi: 10.1096/fj.202301563R
- [22] 舒晖, 赵岩, 刘芳菲, 等. β -脱水淫羊藿素通过 ROS 介导的线粒体凋亡途径诱导 MCF-7 细胞凋亡 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(7): 1347-1356.
SHU Hui, ZHAO Yan, LIU Fangfei, et al. β -anhydroisoflavanone induces apoptosis of MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial apoptosis pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2024, 46(7): 1347-1356.
- [23] 秦文华, 袁楚楚, 孙玉慧, 等. 琥珀酸/GPR91 通过 DHODH/CoQ10 促血管内皮细胞线粒体损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(6): 466-472.
QIN Wenhua, YUAN Chuchu, SUN Yuhui, et al. Succinate/GPR91 promotes mitochondrial damage in vascular endothelial cells through DHODH/CoQ10 [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2024, 32(6): 466-472.
- [24] Chou WC, Tsai KL, Hsieh PL, et al. Galectin-3 facilitates inflammation and apoptosis in chondrocytes through upregulation of the TLR-4-mediated oxidative stress pathway in TC28a2 human chondrocyte cells [J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(3): 478-488.
- [25] Jiang G, Shi LF, Li LJ, et al. Activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway improves pulmonary arterial hypertension in MCT-induced rats by inhibiting autophagy [J]. *FASEB J*, 2024, 38(3): e23452. doi: 10.1096/fj.202301563R

(编辑:郑潇)