

论著·基础研究

# SIRT2 通过组蛋白 H4K8 去乳酸化修饰调控巨噬细胞趋化功能

宋文汀<sup>1</sup>, 陶悦<sup>2</sup>, 潘艺<sup>2</sup>, 莫茜<sup>2</sup>, 曹清<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心感染科, 上海 200127; 2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心儿科转化医学研究所, 上海 200127

**[摘要]** **目的**·探讨沉默信息调节因子2 (silent information regulator 2, SIRT2) 通过组蛋白 H4 第8位赖氨酸 (H4K8) 去乳酸化修饰对早期感染后巨噬细胞免疫表型的调节作用及相应机制。**方法**·使用佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA) 诱导人单核细胞白血病 THP-1 细胞, 使其分化为具有巨噬细胞特性的人血单核细胞株 (PMA-primed THP-1, pTHP-1), 再以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激建立巨噬细胞感染模型。将未经 LPS 处理的巨噬细胞 (pTHP-1) 设为对照 (CTRL) 组, 经过 LPS 处理的巨噬细胞设为感染 (LPS) 组。通过蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测巨噬细胞中组蛋白乳酸化各位点修饰水平、组蛋白乙酰化各位点修饰水平及 SIRT2 蛋白水平; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法检测 2 组间糖酵解限速酶乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA)、肝脏磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase liver type, PKFL)、糖酵解调节因子低氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ), 以及 Sirtuin 家族基因和 HDAC 家族基因表达水平; 通过 Transwell 方法检测巨噬细胞趋化能力; 使用慢病毒包装及细胞感染方法建立 SIRT2 过表达细胞系; 使用 RNA 测序技术 (RNA sequencing, RNA-seq) 与染色质免疫共沉淀测序技术 (chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) 交互分析方法对组蛋白 H4 第8位赖氨酸乳酸化 (lactylation of histone H4 lysine 8, H4K8la) 特异性结合的基因进行差异性分析及通路富集分析。**结果**·相较于 CTRL 组, LPS 组巨噬细胞糖酵解上调, 组蛋白 H4K8 位点乳酸化水平显著增加 ( $P<0.05$ ), 而组蛋白其余位点乙酰化水平未见显著变化。所有已知的具有去乳酸化修饰功能的酶中, 仅 SIRT2 在 LPS 处理后出现显著降低 ( $P<0.05$ ), 且 SIRT2 过表达可显著抑制巨噬细胞中组蛋白 H4K8 位点的乳酸化水平 ( $P<0.05$ ), 但不影响组蛋白 H4K8 位点的乙酰化水平 ( $P>0.05$ )。ChIP-seq 与 RNA-seq 交互分析发现, 组蛋白 H4K8 位点乳酸化修饰可调控巨噬细胞趋化相关基因, 并且巨噬细胞的趋化能力在 SIRT2 过表达、H4K8la 修饰水平下调后显著下降 ( $P<0.05$ )。**结论**·SIRT2 可通过去修饰组蛋白 H4K8 位点乳酸化改变趋化相关靶基因表达, 从而降低巨噬细胞趋化能力。靶向 SIRT2 及 H4K8la 修饰将有助于控制巨噬细胞介导的炎症反应。

**[关键词]** 巨噬细胞; 趋化; 乳酸化; 翻译后修饰; 沉默调节蛋白 2**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.08.008 **[中图分类号]** R725.1 **[文献标志码]** A

## SIRT2 regulates macrophage chemotaxis by de-modifying histone H4K8 lactylation

SONG Wenting<sup>1</sup>, TAO Yue<sup>2</sup>, PAN Yi<sup>2</sup>, MO Xi<sup>2</sup>, CAO Qing<sup>1</sup>

1. Department of Infectious Disease, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Pediatric Translational Medicine Institute, Shanghai Children's Medical Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

**[Abstract]** **Objective**·To explore the regulatory role of silent information regulator 2 (SIRT2) in modulating the immune phenotype of macrophages after infection by removing the lactylation at H4K8 site of histone and the corresponding mechanism. **Methods**·Human THP-1 leukemia cells were induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and stimulated by lipopolysaccharide (LPS) to establish a macrophage infection model. Macrophages without LPS treatment (pTHP-1) were set as the control (CTRL) group, and macrophages with LPS treatment were set as the infected (LPS) group. Western blotting was used to detect the level of histone modification and SIRT2 protein in macrophages. RT-qPCR was used to detect the expression level of glycolytic key enzymes [phosphofructokinase liver type (PFKL), lactate dehydrogenase A (LDHA)] and modulators genes hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), and the expression level of Sirtuin genes and HDAC genes between the two groups. Transwell was used to detect the ability of macrophage chemotaxis. Lentivirus packaging and cell infection were used to construct SIRT2

[作者简介] 宋文汀 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: tsuyo300@163.com。

[通信作者] 曹清, 电子信箱: caoqing@scmc.com.cn。

[Corresponding Author] CAO Qing, E-mail: caoqing@scmc.com.cn。

overexpression cell line. The interaction analysis method of RNA sequencing (RNA-seq) and chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) was used to analyze the difference and pathway enrichment of the genes specifically bound to H4K8 lactylation (H4K8la). **Results**·Compared to the CTRL group, macrophage glycolysis was upregulated and the level of H4K8la was significantly increased in the LPS group ( $P<0.05$ ), while the level of lactylation in other sites remained unchanged. Among all known enzymes with deacetylation modification function, only SIRT2 showed a significant decrease after LPS treatment ( $P<0.05$ ), and overexpression of SIRT2 could significantly inhibit the level of H4K8la modification, while the level of H4K8ac remained unchanged ( $P>0.05$ ). The interactive analysis of ChIP-seq and RNA-seq revealed that chemotaxis-related genes were regulated by H4K8la, and macrophage chemotaxis ability significantly decreased after the overexpression of SIRT2 and downregulation of H4K8la ( $P<0.05$ ). **Conclusion**·SIRT2 can change the expression of target genes related to chemotaxis by removing H4K8la modification, thereby reducing the chemotaxis ability of macrophages. Targeting SIRT2 and H4K8la modification may help control inflammation mediated by macrophages.

**[Key words]** macrophage; chemotaxis; lactylation; post-translational modification; silent information regulator 2 (SIRT2)

感染性疾病是导致死亡的主要原因之一, 如何对其精准治疗并提高患者预后是亟待解决的问题。机体免疫应答在感染的发生、发展和转归中起到重要作用, 其中固有免疫是抵抗病原体入侵的第一道防线。作为最重要的固有免疫细胞之一, 巨噬细胞可吞噬、杀伤病原体, 并通过产生大量细胞因子及趋化因子诱导强烈的免疫炎症反应<sup>[1-2]</sup>。当遭受病原体刺激后, 巨噬细胞会进行代谢重编程, 将主要产能途径转变为糖酵解。该过程可产生包括乳酸在内的大量中间代谢产物, 并且乳酸已被证明可通过多种方式在免疫调节中发挥作用<sup>[3-6]</sup>。

组蛋白翻译后修饰是表观遗传调控最重要的方式之一, 其可通过影响染色质构象调控下游基因转录, 进而在生理病理过程中发挥作用<sup>[7]</sup>。近年来, 已有多种组蛋白修饰被证明与固有免疫相关, 可调节巨噬细胞功能并参与感染进程<sup>[8]</sup>。2019年, 有研究<sup>[9]</sup>首次发现乳酸可作为反应底物在巨噬细胞中修饰组蛋白H3第18位赖氨酸(H3K18)位点, 并在感染晚期调节巨噬细胞向M2型极化。但组蛋白乳酸化修饰是否可以调控感染早期的巨噬细胞功能, 其在巨噬细胞内又是如何被调控的尚不清楚。因此本研究通过建立巨噬细胞感染早期模型, 明确感染早期巨噬细胞不同位点组蛋白乳酸化修饰的变化及其机制, 揭示组蛋白乳酸化对感染早期巨噬细胞的功能调控作用, 旨在为感染性疾病宿主控制炎症和改善预后提供新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和质粒

人单核细胞白血病 THP-1 细胞及人胚胎肾上皮细胞系 HEK 293T 均购自中国科学院上海细胞库。

SIRT2 过表达 (SIRT2 overexpression, SIRT2 OE) 质粒由上海儿童医学中心感染研究室李畅技术员提供。

### 1.2 主要试剂和仪器

佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA; 上海碧云天生物技术有限公司), 重组人单核细胞趋化蛋白-1 (recombinant human monocyte chemotactic protein-1, rhMCP-1; Peprotech, 美国), 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS; 上海碧云天生物技术有限公司), TRIzol 试剂 (Life Technologies, 美国), Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 和 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (上海翌圣生物科技有限公司), RPMI-1640 培养基 (Hyclon, 美国), 10% 胎牛血清 (Gemini, 美国), 0.25% 胰酶 (Gibco, 美国), LIPOFECTAMINE 3000 和 puromycin (Life Technologies, 美国), 乙酰化及乳酸化抗体 (杭州景杰生物科技股份有限公司), Anti-Rabbit/Mouse IgG 抗体 (CST, 美国), 抗 SIRT2 抗体 (CST, 美国), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)-conjugated GAPDH 抗体和 HRP-conjugated  $\beta$ -actin 抗体 (上海翌圣生物科技有限公司), Anti-Rabbit-488 抗体 (Invitrogen, 美国), 染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 试剂盒、结晶紫和 4% 多聚甲醛 (上海碧云天生物技术有限公司), 16% 甲醛 (CST, 美国), ECL 发光试剂盒 (Millipore, 美国)。

生物安全柜 [力新仪器 (上海) 有限公司], 二氧化碳培养箱 (Thermo Scientific, 美国), 电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司), 荧光倒置显微镜 (Olympus, 日本), 水平脱色摇床 (海门市其林贝尔

仪器制造有限公司), 涡旋振荡器 (Scientific Industries, 美国), 冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), 生物分子成像仪 (GE, 美国), 自动聚焦超声波破碎仪 (Covaris, 美国)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 巨噬细胞感染早期细胞模型建立** THP-1 细胞采用添加 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 置于 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温湿润培养箱培养。将 THP-1 细胞加入含 100 ng/mL PMA 的 RPMI-1640 培养基, 孵育 48 h 后更换普通 RPMI-1640 培养基继续培养 24 h, 使其刺激分化为具有巨噬细胞特性的人血单核细胞株 (PMA-primed THP-1, pTHP-1)。使用含 1 μg/mL LPS 处理 pTHP-1 细胞 12 h, 获得巨噬细胞早期感染的细胞模型。将未经 LPS 处理的巨噬细胞 (pTHP-1) 设为对照组 (CTRL 组), 经 LPS 处理的巨噬细胞设为感染组 (LPS 组)。

**1.3.2 蛋白质印迹法** 取 CTRL 组及 LPS 组巨噬细胞, 使用 1.25×Loading Buffer 进行裂解, 99 °C 煮

10 min, Nanodrop 检测蛋白浓度。采用 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离总蛋白, 并转移至聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 添加一抗包括乙酰化、乳酸化抗体 (1:1 000)、抗 SIRT2 抗体 (1:1 000)、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (1:40 000)、抗 β-actin 抗体 (1:50 000), 4 °C 孵育过夜; 聚对苯二甲酸-共-丁二酸丁二醇酯 [poly (butylene succinate-co-terephthalate), PBST] 洗涤后加入 HRP 偶联的二抗 (1:3 000) 孵育 1 h; PBST 洗涤后使用 ECL 发光检测试剂盒显色后成像分析。

**1.3.3 RNA 提取及实时荧光定量 PCR** 取 LPS 组巨噬细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA; 取总 RNA 1 μg, 使用反转录试剂盒合成 cDNA; 取 cDNA 1 μL 进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 反应, 引物序列见表 1。反应条件: 95 °C, 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 39 个循环; 再 95 °C 15 s。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Tab 1 Primer sequences for real-time qPCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>HIF-1α</i>	GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG	CCTTATCAAGATGCGAACTCACA
<i>PFKL</i>	GTACCTGGCGCTGGTATCTG	CCTCTCACACATGAAGTCTCC
<i>LDHA</i>	ATGGCAACTCTAAFFATCAGC	CCAACCCCAACAACTGTAATCT
<i>SIRT1</i>	AGGCCACGGATAGGTCCATA	GTGGAGGTATTGTTCCGGC
<i>SIRT2</i>	TGCGGAACTTATCTCCCAGA	GAGAGCGAAAGTCGGGGAT
<i>SIRT3</i>	TGCTCATCAACCGGGACTTG	TTGCTGGTCCATCAAGCCTA
<i>SIRT5</i>	CTCAAGATGCCAGCATCCCA	AGGAAGTGCCACCACCTAGA
<i>HDAC1</i>	CATCGCTGTGAATTGGGCTG	ACCCTCTGGTGATACTTTAGCAG
<i>HDAC2</i>	TCTGCTACTACTACGACGGTGA	TCATTCTTCGGCAGTGGCT
<i>HDAC3</i>	CATGACGGTGTCTTCCACA	CAGAGTCAGCTCCACACTGG
<i>GAPDH</i>	TCTCCTGACTTCAACAGCGACA	CCCTGTGCTGTAGCCAAATTCGT

Note: *PFKL*—phosphofructokinase liver type; *LDHA*—lactate dehydrogenase A; *HDAC1*—histone deacetylase 1.

**1.3.4 Transwell 趋化实验** Transwell 小室提前 1 h 置于含 RPMI-1640 培养基的 24 孔板中孵育。取 CTRL 组及 LPS 组巨噬细胞, 洗涤后取同等密度细胞悬液 200 μL 加入 Transwell 小室上室, 下室加入趋化因子 rhMCP-1, 于 37 °C 培养箱培养 16 h; 取出小室, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 洗涤后结晶紫染色 10 min, 显微镜下观察计数。

**1.3.5 慢病毒包装及细胞感染** 在 HEK 293T 细胞中使用 Lipo3000 试剂盒进行 SIRT2 OE 质粒转染, 48 h 后收集病毒液并过滤; 将 THP-1 细胞与病毒液 1:1 混合, 培养 6 h 后使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640

培养基换液, 继续培养 48 h, 使用杀稻瘟菌素 (blastidicin) 筛选细胞并检测细胞过表达效率。

**1.3.6 RNA 测序** RNA 测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 文库构建和 Illumina 测序由明码生物科技 (上海) 有限公司完成; 使用基因本体 (gene ontology, GO) 数据库、京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库进行基因功能注释; 使用 DESeq2 软件分析各细胞之间的差异基因表达。

**1.3.7 ChIP 测序** ChIP 测序技术 (chromatin

immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) 是 ChIP 后结合高通量测序的方法。取 LPS 组巨噬细胞, 使用 1% 甲醛交联 10 min 后加入 1× 甘氨酸终止交联; SDS 裂解液重悬细胞后超声法破碎 DNA, 取 10% DNA 产物作为 Input, 其余 DNA 产物用于后续免疫沉淀 (immunoprecipitation, IP) 实验, 分别加入抗组蛋白 H4 第 8 位赖氨酸乳酸化 (lactylation of histone H4 lysine 8, H4K8la) 抗体及抗 IgG 抗体, 4 °C 低速混合孵育过夜; 每个样本中加入 30 μL protein A/G beads, 4 °C 低速混合孵育 2 h; 按说明书洗涤 DNA 产物, 并使用 Elute buffer 洗脱; 加入无水乙醇沉淀产物后, 使用乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA)、三羟甲基氨基甲烷 (trihydroxymethyl aminomethane, Tris) 及 Proteinase K 解交联; 使用 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA。后续文库构建和测序由安诺优达基因科技有限公司完成。

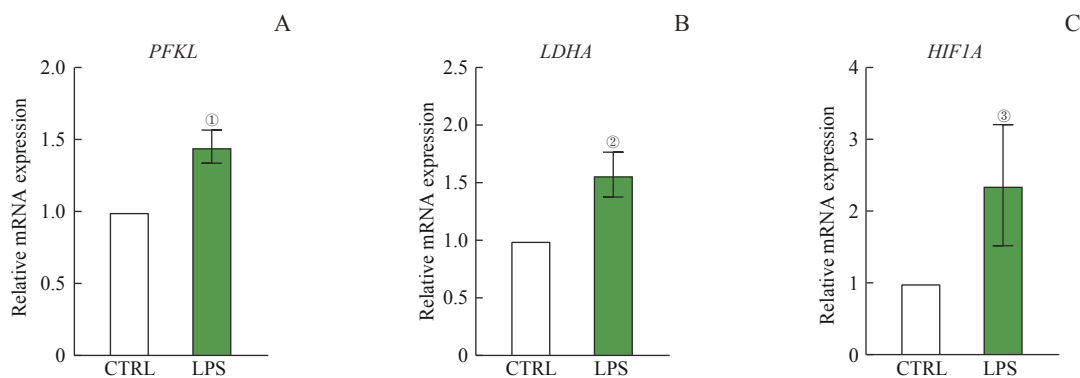
## 1.4 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9 进行统计分析。每组实验进行 3 次独立生物学重复, 组间比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 巨噬细胞经 LPS 处理后糖酵解增强

与 CTRL 组相比, LPS 组巨噬细胞可观察到糖酵解限速酶肝脏磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase liver type, *PFKL*) 和乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, *LDHA*) 显著升高, 糖酵解调节因子低氧诱导因子 1α (hypoxia inducible factor 1α, *HIF-1α*) 也显著升高 (均  $P < 0.05$ , 图 1), 提示感染早期的巨噬细胞存在糖酵解通路激活。



Note: ① $P=0.027$ , ② $P=0.015$ , ③ $P=0.049$ , compared with the CTRL group.

图 1 RT-qPCR 检测巨噬细胞糖酵解限速酶及糖酵解调节因子表达

Fig 1 Expression of glycolytic rate-limiting enzyme and transcription factors in macrophages detected by RT-qPCR

### 2.2 LPS 处理显著上调巨噬细胞组蛋白 H4K8 乳酸化水平

与 CTRL 组相比, LPS 组巨噬细胞组蛋白 H4K8 位点乳酸化修饰水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而其余位点乳酸化水平均无显著升高; 与此同时, 12 h LPS 处理也不能改变组蛋白相应位点的乙酰化水平 (图 2)。结果提示 LPS 处理可以特异性上调巨噬细胞 H4K8la 修饰水平。

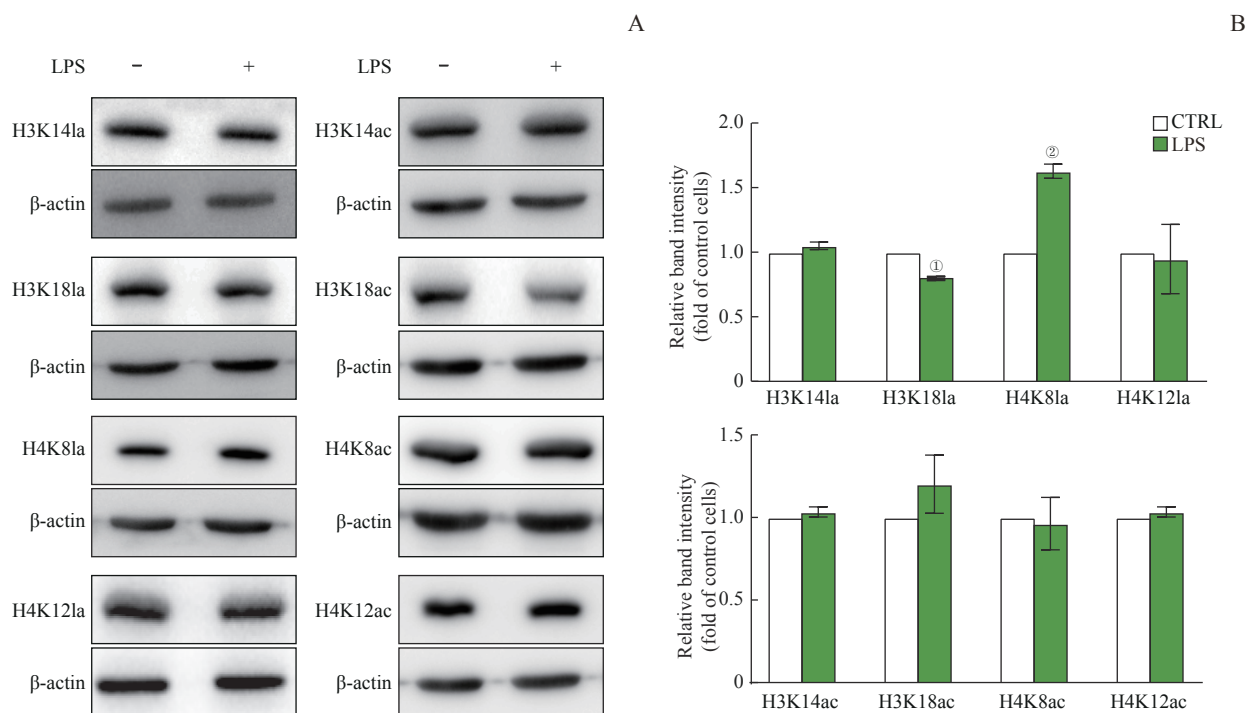
### 2.3 SIRT2 是巨噬细胞中 H4K8la 修饰的去修饰酶

与 CTRL 组相比, LPS 组可观察到仅 *SIRT2* 的 mRNA 水平显著降低 ( $P=0.010$ ), 而具有组蛋白去乳酸化修饰酶活性的其他 Sirtuin 家族成员 (*SIRT1*、*SIRT3* 和 *SIRT5*) 以及 *HDAC* 家族成员 (*HDAC1*、

*HDAC2* 和 *HDAC3*) 的 mRNA 水平均未见明显变化 (图 3A、B)。蛋白质印迹法 (Western blotting) 也进一步证实了 *SIRT2* 的蛋白水平显著降低 (图 3C)。

为验证 *SIRT2* 对 H4K8la 的去修饰作用, 我们构建了 *SIRT2* 过表达 THP-1 细胞系, Western blotting 结果 (图 4A) 显示, *SIRT2* 过表达 THP-1 细胞系构建成功。并进一步将其在 PMA 诱导后以 1 μg/mL LPS 处理 12 h。与未进行过表达处理的野生型 (wild type, WT) THP-1 诱导而来的巨噬细胞相比, *SIRT2* 过表达可使巨噬细胞中 H4K8la 水平显著降低 ( $P=0.001$ , 图 4B)。更重要的是, WT 巨噬细胞中 LPS 上调 H4K8la 水平的作用在 *SIRT2* 过表达细胞系中消失 ( $P > 0.05$ , 图 4B), 表明巨噬细胞中 *SIRT2* 对 H4K8la 修饰具有去修饰作用。

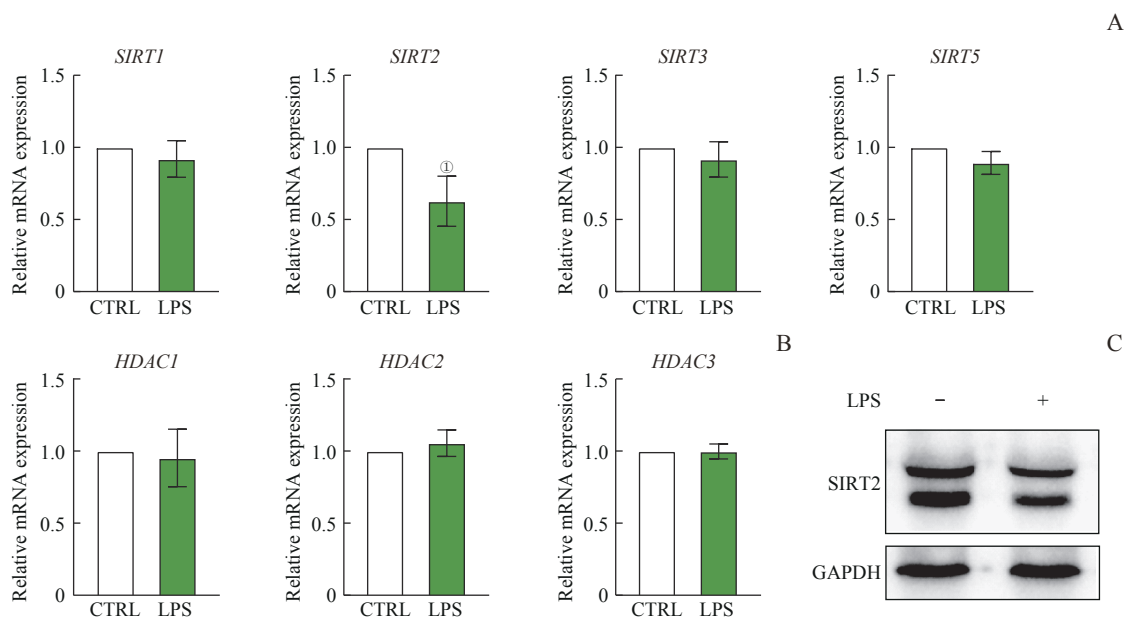




**Note:** A. Detection of histone lactylation (left) and acetylation (right) levels by Western blotting. B. Expression of histone lactylation (above) and acetylation (below). ① $P=0.000$ , ② $P=0.002$ , compared with the CTRL group.

**图2** 蛋白质印迹法检测巨噬细胞组蛋白修饰水平

**Fig 2** Histone modification levels in macrophages detected by Western blotting



**Note:** A. Expression of Sirtuin family mRNA. B. Expression of HDAC family mRNA. C. Detection of SIRT2 protein by Western blotting. ① $P=0.010$ , compared with the CTRL group.

**图3** LPS处理后巨噬细胞Sirtuin家族和HDAC家族的RNA表达水平

**Fig 3** RNA expression levels of Sirtuin family and HDAC family of macrophages after LPS treatment

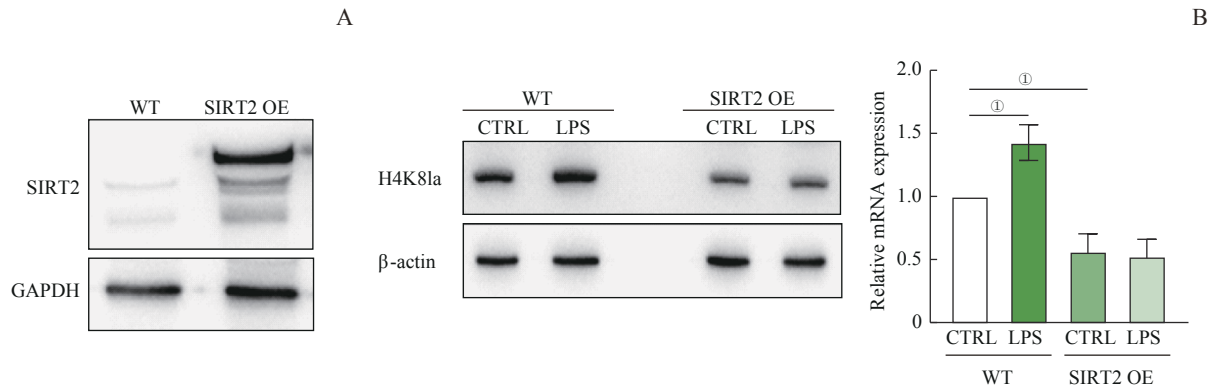
### 2.4 SIRT2通过去修饰H4K8la调控巨噬细胞趋化功能

为探索受H4K8la调控的靶基因，我们对LPS组巨噬细胞进行RNA-seq和ChIP-seq检测（图5A、B）。

ChIP-seq与RNA-seq交互分析结果（图6A、B）表明，受H4K8la调控的基因富集在巨噬细胞趋化相关通路。为验证H4K8la修饰是否调控巨噬细胞趋化功能，我们对SIRT2过表达前后的巨噬细胞趋化能力进

行检测。与CTRL组相比, LPS组可观察到巨噬细胞趋化水平显著升高 ( $P<0.05$ ), 但SIRT2过表达可使LPS对巨噬细胞趋化能力的增强作用消失 ( $P>0.05$ ),

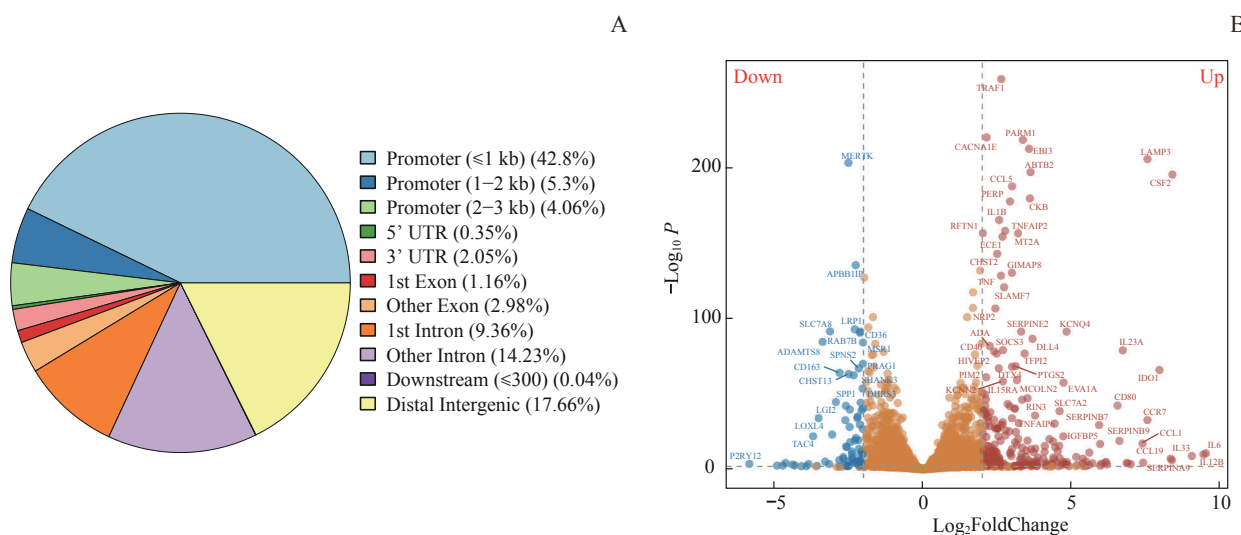
表明SIRT2可通过去修饰H4K8la降低巨噬细胞趋化能力(图7)。



**Note:** A. Detection of SIRT2 protein by Western blotting. B. Detection of H4K8la by Western blotting. ① $P=0.001$ .

图4 Western blotting检测巨噬细胞SIRT2和H4K8la水平

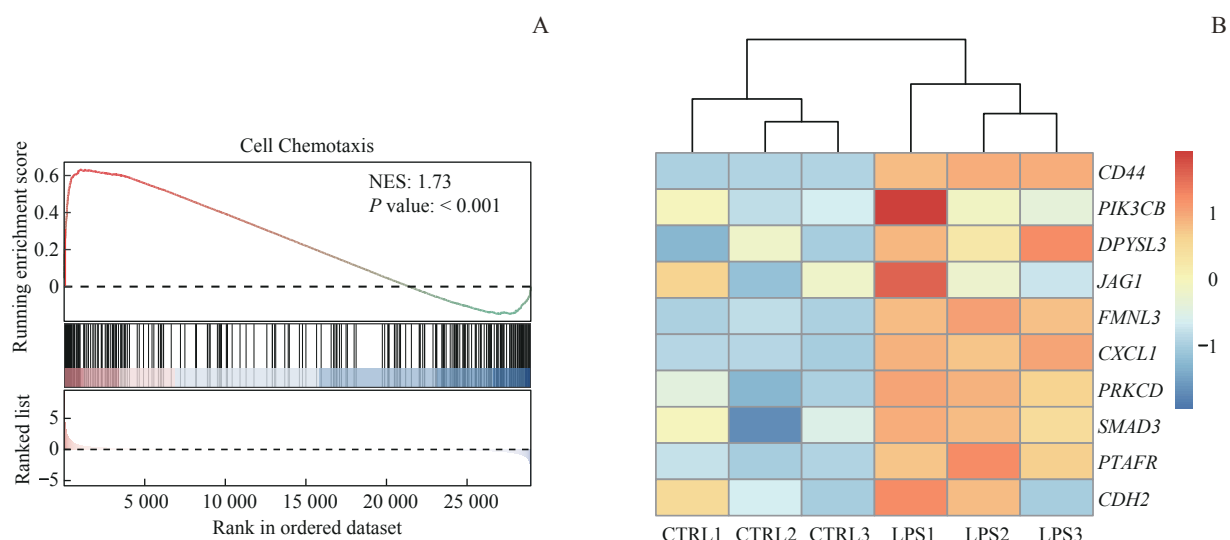
Fig 4 The levels of SIRT2 and H4K8la in macrophages detected by Western blotting



**Note:** A. Genomic distribution of H4K8la signal peaks. B. Volcano plot of differential genes after LPS stimulation. *MERTK*—MER proto-oncogene, tyrosine kinase; *APBB1IP*—amyloid beta precursor protein binding family B member 1 interacting protein; *SLC7A8*—solute carrier family 7 member 8; *LRP1*—LDL receptor related protein 1; *ADAMTS8*—ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 8; *RAB7B*—RAB7B, member RAS oncogene family; *MSR1*—macrophage scavenger receptor 1; *SPNS2*—SPNS lysolipid transporter 2, sphingosine-1-phosphate; *CHST13*—carbohydrate sulfotransferase 13; *PRAG1*—PEAK1 related, kinase-activating pseudokinase 1; *SHANK3*—SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3; *DHRS3*—dehydrogenase/reductase 3; *SPPI*—secreted phosphoprotein 1; *LGI2*—leucine rich repeat LGI family member 2; *LOXL4*—lysyl oxidase like 4; *TAC4*—tachykinin precursor 4; *P2RY12*—purinergic receptor P2Y12; *TRAF1*—TNF receptor associated factor 1; *CACNA1E*—calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 E; *PARM1*—prostate androgen-regulated mucin-like protein 1; *EBI3*—Epstein-Barr virus induced 3; *ABTB2*—ankyrin repeat and BTB domain containing 2; *CCL5*—C-C motif chemokine ligand 5; *PERP*—p53 apoptosis effector related to PMP22; *IL1B*—interleukin 1 beta; *CKB*—creatine kinase B; *RFTN1*—raftlin, lipid raft linker 1; *TNFAIP2*—TNF alpha induced protein 2; *MT2A*—metallothionein 2A; *ECE1*—endothelin converting enzyme 1; *CHST2*—carbohydrate sulfotransferase 2; *GIMAP8*—GTPase, IMAP family member 8; *TNF*—tumor necrosis factor; *SLAMF7*—SLAM family member 7; *NRP2*—neuropilin 2; *SERPINE2*—serpin family E member 2; *KCNQ4*—potassium voltage-gated channel subfamily Q member 4; *ADA*—adenosine deaminase; *SOC3*—suppressor of cytokine signaling 3; *DLL4*—delta like canonical Notch ligand 4; *HIVEP2*—HIVEP zinc finger 2; *TFPI2*—tissue factor pathway inhibitor 2; *PIM2*—Pim-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase; *KCNN2*—potassium calcium-activated channel subfamily N member 2; *DTX4*—deltex E3 ubiquitin ligase 4; *TFPI2*—tissue factor pathway inhibitor 2; *PTGS2*—prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *MCOLN2*—mucolipin TRP cation channel 2; *EVA1A*—eva-1 homolog A, regulator of programmed cell death; *RIN3*—Ras and Rab interactor 3; *SLC7A2*—solute carrier family 7 member 2; *TNFAIP6*—TNF alpha induced protein 6; *IGFBP5*—insulin like growth factor binding protein 5; *SERPINB7*—serpin family B member 7; *IDO1*—indoleamine 2,3-dioxygenase 1; *SERPINA9*—serpin family A member 9; *CCL1*—C-C motif chemokine ligand 1; *CCR7*—C-C motif chemokine receptor 7; *CSF2*—colony stimulating factor 2; *LAMP3*—lysosomal associated membrane protein 3.

图5 测序结果概述

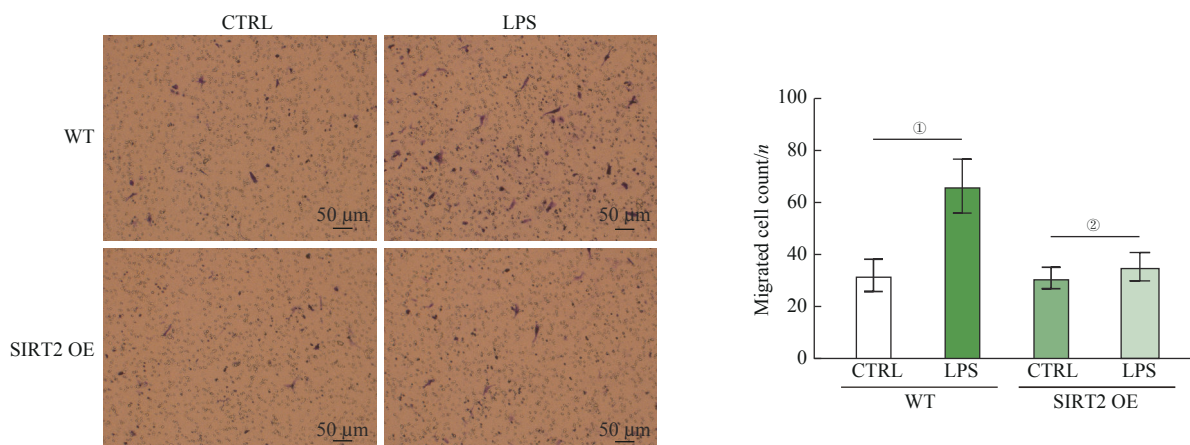
Fig 5 Overview of sequencing results



**Note:** A. Gene set enrichment analysis of macrophages after LPS stimulation. NES—normalized enrichment score. B. Heatmap for macrophage chemotaxis-related genes bound to H4K81a. CTRL1, CTRL2, and CTRL3 were three replicate samples from the control group, while LPS1, LPS2, and LPS3 were three replicate samples from the LPS-treated infection group. *PIK3CB*—phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta; *DPYSL3*—dihydropyrimidinase like 3; *JAG1*—jagged canonical Notch ligand 1; *FMNL3*—formin like 3; *CXCL1*—C-X-C motif chemokine ligand 1; *PRKCD*—protein kinase C delta; *SMAD3*—SMAD family member 3; *PTAFR*—platelet activating factor receptor; *CDH2*—cadherin 2.

**图6 RNA-seq及ChIP-seq交互分析**

**Fig 6** Interaction analysis of RNA-seq and ChIP-seq



**Note:** Detection of macrophage chemotaxis ability by Transwell. ① $P=0.008$ , ② $P=0.766$ .

**图7 SIRT2过表达抑制LPS诱导的巨噬细胞趋化作用 ( $\times 10$ )**

**Fig 7** SIRT2 overexpression inhibits LPS-induced macrophage chemotaxis ability ( $\times 10$ )

### 3 讨论

巨噬细胞是高度可塑的免疫细胞，能够通过极化过程快速改变其功能特征以提供从防御病原体到组织修复等多种生理功能<sup>[10]</sup>。巨噬细胞极化状态的改变涉及代谢重编程过程，当被病原或炎症信号激活时，巨噬细胞可以从基于氧化磷酸化的有氧模式转变为基于糖酵解的厌氧模式<sup>[2,11]</sup>。这种动态代谢变化提供了炎症期间巨噬细胞功能所需的关键生物合成前体，而过程中所生成的代谢物，如乳酸，也可反过来作为关

键的调节信号发挥作用<sup>[12]</sup>。

作为糖酵解的代谢产物，乳酸多年来被认为是细胞代谢的废物。循环中乳酸水平升高被称为“乳酸性酸中毒”，是脓毒症患者的常见特征，已被用作指示脓症患者严重程度和结局的指标。同时，乳酸被证明是通过HIF-1 $\alpha$ 依赖性重编程抑制巨噬细胞极化的主要介质，可以通过剂量依赖性方式增加M2型巨噬细胞标志物的表达，并通过抑制核因子 $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)活化来抑制M1型巨噬细胞<sup>[3,13-14]</sup>。某些情况下，乳酸也具有促炎作用。例

如,在脓毒症情况下,乳酸也被证明会诱导中性粒细胞迁移及中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)形成<sup>[15-16]</sup>,也可增加LPS刺激后巨噬细胞中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase 1, MMP1)及IL-1的产生<sup>[5-6]</sup>,但直到最近乳酸才被发现可以直接修饰组蛋白并通过表观遗传调控的方式调节巨噬细胞功能<sup>[9]</sup>。

表观遗传修饰包括组蛋白修饰、DNA甲基化、RNA修饰、染色质重塑等方式。其中,组蛋白修饰是一种受环境因素(如代谢物、组蛋白修饰转移酶和去修饰酶等)调控的可遗传的表观修饰。由于其对免疫细胞的长久影响,感染过程中的组蛋白修饰相关调控机制受到越来越多的关注<sup>[17]</sup>。研究<sup>[9,18]</sup>发现乳酸作为一种表观遗传调控分子,可以通过组蛋白乳酸化来调控M2极化相关基因的表达。随后,陆续有研究<sup>[19-21]</sup>提示,巨噬细胞中的乳酸化修饰可通过增加下游基因表达参与损伤修复及组织纤维化过程,但现有研究<sup>[22-23]</sup>多集中在H3K18位点修饰水平及总体乳酸化修饰水平,或集中在巨噬细胞向M2方向极化,而组蛋白乳酸化是否可以调控感染早期巨噬细胞的炎症反应尚不清楚。本研究发现,当使用LPS处理巨噬细胞12 h模拟其感染早期状态时,可观察到巨噬细胞中糖酵解显著激活,且H4K8位点乳酸化修饰水平特异性显著升高,而相应位点的乙酰化水平则无明显改变,提示H4K8la可能在巨噬细胞感染早期发挥作用。

LPS诱导的H4K8la修饰水平升高,一方面可能源于糖酵解增强引起的乳酸水平升高,但另一方面也可能是H4K8la修饰的调节蛋白水平变化,修饰酶水平的升高和/或去修饰酶水平的降低导致的。现有研究<sup>[9,24]</sup>表明,组蛋白乳酸化的修饰酶是p300,去修饰酶包含HDAC1~3和SIRT1/2/3/5等多个蛋白。HDAC家族可以通过改变赖氨酸残基的乙酰化状态影响组蛋白和非组蛋白的翻译后修饰,同样被提示在体外具有去乳酸化活性<sup>[24]</sup>。Sirtuin是一类高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)依赖的蛋白质家族,在进化过程中高度保守,以其抗炎和抗氧化特性而闻名<sup>[25]</sup>。本研究发现,在所有的去修饰酶中,只有SIRT2的表达量在LPS处理后显著降低。SIRT2是Sirtuin家族的成员,其主要特点是可以实现乙酰赖氨酸底物的去乙酰化,并可通过该方式参与感染和炎症过程<sup>[26]</sup>。脓

毒症是一种由宿主对感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍,SIRT2被发现在早期脓毒症患者体内水平低于健康志愿者,且在休克患者体内水平更低<sup>[27]</sup>。一些报告<sup>[28]</sup>表明,SIRT2可通过增加NF- $\kappa$ B去乙酰化、调节巨噬细胞极化和增加M2相关的抗炎途径来防止炎症过程的发展。2022年,有研究<sup>[29]</sup>报道SIRT2可以作为组蛋白乳酸化的去修饰酶参与调控抑制神经母细胞瘤细胞的增殖及迁移。本研究也证实,在巨噬细胞中过表达SIRT2可显著降低组蛋白H4K8la水平,表明SIRT2确实可以在巨噬细胞中去修饰H4K8la。LPS处理巨噬细胞引起的H4K8la修饰水平增加可能是底物(乳酸)水平升高和去修饰酶(SIRT2)水平降低共同作用的结果。

为进一步探索SIRT2调控H4K8la修饰在巨噬细胞中的功能,本研究针对H4K8la抗体的ChIP-seq和LPS处理的RNA-seq进行了交互分析,并发现该修饰在调控巨噬细胞趋化功能中发挥重要作用。当SIRT2过表达时,巨噬细胞内H4K8位点乳酸化水平显著降低,同时伴有巨噬细胞趋化能力的显著降低。多项研究已证实,巨噬细胞的趋化能力在宿主的抗感染免疫中占据重要地位。例如,巨噬细胞趋化能力的增强可提高宿主的病原清除能力,并进一步激活局部的炎症反应<sup>[30]</sup>。但固有免疫系统的过度激活会导致巨噬细胞等免疫细胞破坏性侵入组织,伴随细胞因子、趋化因子及脂质介质等的过度释放,也会引起严重的组织损伤,甚至导致死亡。

综上所述,本研究首次发现SIRT2可通过去修饰组蛋白H4K8la减弱巨噬细胞趋化能力。感染早期巨噬细胞中H4K8位点的乳酸化修饰水平特异性升高,SIRT2可作为去乳酸化修饰酶降低组蛋白H4K8la修饰水平,进而抑制巨噬细胞的趋化能力,这将为控制感染性疾病中的过度炎症反应提供新的治疗靶点。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

本研究不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

宋文汀和莫茜参与实验设计;宋文汀和潘艺完成实验操作;宋文汀、莫茜、陶悦和曹清参与论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by SONG Wenting and MO Xi. The experimental operation was completed by SONG Wenting and PAN Yi.



The manuscript was drafted and revised by SONG Wenting, MO Xi, TAO Yue and CAO Qing. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2023-04-18  
• Accepted: 2023-05-06  
• Published online: 2023-08-28

## 参 · 考 · 文 · 献

- [1] GALLI G, SALEH M. Immunometabolism of macrophages in bacterial infections[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 10: 607650.
- [2] VIOLA A, MUNARI F, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ R, et al. The metabolic signature of macrophage responses[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1462.
- [3] PETER K, REHLI M, SINGER K, et al. Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 457(3): 412-418.
- [4] ERREA A, CAYET D, MARCHETTI P, et al. Lactate inhibits the pro-inflammatory response and metabolic reprogramming in murine macrophages in a GPR81-independent manner[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0163694.
- [5] NAREIKA A, HE L, GAME B A, et al. Sodium lactate increases LPS-stimulated MMP and cytokine expression in U937 histiocytes by enhancing AP-1 and NF- $\kappa$ B transcriptional activities[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 289(4): E534-E542.
- [6] SAMUVEL D J, SUNDARARAJ K P, NAREIKA A, et al. Lactate boosts TLR4 signaling and NF- $\kappa$ B pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 2476-2484.
- [7] XU H W, WU M Y, MA X M, et al. Function and mechanism of novel histone posttranslational modifications in health and disease[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6635225.
- [8] MOHAMMADI A, SHARIFI A, POURPAKNIA R, et al. Manipulating macrophage polarization and function using classical HDAC inhibitors: implications for autoimmunity and inflammation[J]. *Crit Rev Oncol*, 2018, 128: 1-18.
- [9] ZHANG D, TANG Z Y, HUANG H, et al. Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation[J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 575-580.
- [10] MURRAY P J, WYNN T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(11): 723-737.
- [11] NEWSHOLME P, GORDON S, NEWSHOLME E A. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages[J]. *Biochem J*, 1987, 242(3): 631-636.
- [12] PARK D, LIM G, YOON S J, et al. The role of immunomodulatory metabolites in shaping the inflammatory response of macrophages[J]. *BMB Rep*, 2022, 55(11): 519-527.
- [13] COLEGIO O R, CHU N Q, SZABO A L, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid[J]. *Nature*, 2014, 513(7519): 559-563.
- [14] DIETL K, RENNER K, DETTMER K, et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes[J]. *J Immunol*, 2010, 184(3): 1200-1209.
- [15] AWASTHI D, NAGARKOTI S, SADAF S, et al. Glycolysis dependent lactate formation in neutrophils: a metabolic link between NOX-dependent and independent NETosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(12): 165542.
- [16] ALARCÓN P, MANOSALVA C, CONEJEROS I, et al. D (-) lactic acid-induced adhesion of bovine neutrophils onto endothelial cells is dependent on neutrophils extracellular traps formation and CD11b expression[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 975.
- [17] WU D, SHI Y X, ZHANG H, et al. Epigenetic mechanisms of Immune remodeling in sepsis: targeting histone modification[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(2): 112.
- [18] CHEN L H, HUANG L X, GU Y, et al. Lactate-lactylation hands between metabolic reprogramming and immunosuppression[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11943.
- [19] IRIZARRY-CARO R A, MCDANIEL M M, OVERCAST G R, et al. TLR signaling adapter BCAP regulates inflammatory to reparatory macrophage transition by promoting histone lactylation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(48): 30628-30638.
- [20] KOVACS L, CAO Y P, HAN W H, et al. PFKFB3 in smooth muscle promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200(5): 617-627.
- [21] WANG N X, WANG W W, WANG X Q, et al. Histone lactylation boosts reparative gene activation post-myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2022, 131(11): 893-908.
- [22] MA W, AO S, ZHOU J, et al. Methylsulfonylmethane protects against lethal dose MRSA-induced sepsis through promoting M2 macrophage polarization[J]. *Mol Immunol*, 2022, 146: 69-77.
- [23] CHU X, DI C Y, CHANG P P, et al. Lactylated histone H3K18 as a potential biomarker for the diagnosis and predicting the severity of septic shock[J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 786666.
- [24] MORENO-YRUELA C, ZHANG D, WEI W, et al. Class I histone deacetylases (HDAC1-3) are histone lysine delactylases[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(3): eabi6696.
- [25] DAI H, SINCLAIR D A, ELLIS J L, et al. Sirtuin activators and inhibitors: promises, achievements, and challenges[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 188: 140-154.
- [26] WANG Y, YANG J, HONG T, et al. SIRT2: controversy and multiple roles in disease and physiology[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 55: 100961.
- [27] XU H, YU X, WANG B, et al. The clinical significance of the SIRT2 expression level in the early stage of sepsis patients[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4): 1413-1419.
- [28] SASSO G L, MENZIES K J, MOTTIS A, et al. SIRT2 deficiency modulates macrophage polarization and susceptibility to experimental colitis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103573.
- [29] ZU H X, LI C, DAI C R, et al. SIRT2 functions as a histone delactylase and inhibits the proliferation and migration of neuroblastoma cells[J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 54.
- [30] TU Q Q, YU X Y, XIE W, et al. Prokineticin 2 promotes macrophages-mediated antibacterial host defense against bacterial pneumonia[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 125: 103-113.

[本文编辑] 包玲