

网络出版时间:2026-01-06 10:33:01 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260129.0854.004

Lck/Yes 相关新型酪氨酸激酶在巨噬细胞 M1 极化中的作用及机制研究

于欣,高振盛,卞伟华,刘向勇,孙业盈
(滨州医学院药学院,烟台 264003)

摘要 目的 探讨 Lck/Yes 相关新型酪氨酸激酶(Lyn)对脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞 M1 型极化的作用及机制。方法 使用 BSMBI-V2 限制性内切酶酶切 LentiCRISPR-V2 质粒,回收酶切后的 DNA 片段,用 T4 连接酶连接酶切质粒与 *Lyn*-sgRNA,制备 Lenti-*Lyn*-gRNA 慢病毒,用 Lenti-*Lyn*-gRNA 慢病毒感染 THP-1 细胞获得敲除 *Lyn* 基因的 THP-1 稳转株,得到完全敲除 *Lyn* 的 THP-1 单克隆细胞株(*Lyn*^{-/-})。采用 100 ng/mL 佛波酯(PMA)诱导 *Lyn* 野生型(*Lyn*^{WT})和 *Lyn*^{-/-} THP-1 细胞 48 h 分化为 M0 巨噬细胞,用 100 ng/mL LPS 诱导 M0 巨噬细胞 24 h 极化为 M1 巨噬细胞。通过荧光实时定量 PCR(qPCR)检测 M0 巨噬细胞标志物整合素 α M(CD11b)、巨噬细胞抗原 CD68 和单核细胞分化抗原 CD14 的表达。qPCR 检测野生型 THP-1 细胞分化的 M1 巨噬细胞(*Lyn*^{WT}-M1)中 *Lyn* 表达,Western blot 检测 *Lyn*^{WT}-M1 细胞中磷酸化 *Lyn*(P-*Lyn*)/*Lyn*。qPCR 检测野生型敲除 *Lyn* 基因的 THP-1 细胞分化的 M1 巨噬细胞(*Lyn*^{-/-}-M1)一氧化氮合酶(iNOS)、白介素(IL)-6 和趋化因子-10(CXCL-10)mRNA 表达;Western blot 检测 iNOS 蛋白表达及 Janus 激酶 1(JAK1)-信号转录与转录激活因子 1(STAT1)信号通路相关分子 JAK1、磷酸化 JAK1(P-JAK1)和 STAT1、磷酸化 STAT1(P-STAT1)的蛋白表达。流式细胞术检测 M1 巨噬细胞标志物抗原分化簇 80(CD80)的表达。**结果** 成功构建 *Lyn*^{-/-} 单克隆细胞株。*Lyn*^{-/-}-M0 巨噬细胞 *CD11b* 表达量明显升高($P < 0.0001$),表明 M1 巨噬细胞分化成功。分化为 M1 巨噬细胞后 *Lyn* 的 mRNA 和蛋白表达升高($P < 0.05$),*Lyn* 促进 M1 巨噬细胞的极化。敲除 *Lyn* 抑制 M1 巨噬细胞 iNOS、IL-6、CXCL-10 的 mRNA 表达,iNOS 的蛋白表达和 CD80 的表达($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示 *Lyn* 敲除后抑制 M1 巨噬细胞 JAK1 和 P-STAT1 的蛋白表达($P < 0.01$)。**结论** CRISPR/Cas9 敲除 *Lyn* 后,M1 巨噬细胞 JAK/STAT 信号通路中的关键分子 JAK1 与 P-STAT1 表达水平显著下调的同时,M1 巨噬细胞特异性分泌因子 iNOS、IL-6、CXCL-10 mRNA 及 CD80 表达也下调,可能是通过靶向调控 JAK1/P-STAT1 介导的 JAK/STAT 信号通路来实现的。

关键词 *Lyn* 激酶;THP-1;M1 巨噬细胞;CRISPR/Cas9;慢性炎症;JAK-STAT 信号通路

中图分类号 R 392.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2026)02-0209-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.02.004

慢性炎症是病理复杂的炎症反应^[1],涉及多种细胞类型和分子机制^[2-3]。在慢性炎症过程中,经典活化的 M1 型巨噬细胞可大量释放促炎性细胞因子,进而加剧炎症的进展与恶化^[4]。Lck/Yes 相关新型酪氨酸激酶(Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase, Lyn)作为非受体型酪氨酸激酶家族成员^[5],在慢性炎症中发挥调控作用。研究^[6-7]表明,Lyn 的表达水平及活性与巨噬细胞的功能状态密切相关。Lyn 可通过激活核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等通路,磷酸化髓样分化因

子 88(myeloid differentiation primary response 88, MyD88)等下游适配分子启动炎症信号级联反应,上调促炎因子表达,最终介导 M1 型巨噬细胞的促炎免疫应答。此外,Lyn 还参与调控巨噬细胞的吞噬功能与细胞因子分泌过程,是介导巨噬细胞极化的重要分子^[8-11]。目前,Lyn 调控 M1 型巨噬细胞极化的具体机制尚未完全明确。基于此,本研究拟通过靶向调控 Lyn 活性,深入探究其在 M1 型巨噬细胞极化中的作用及机制,以期为慢性炎症性疾病的病理机制解析与治疗策略开发提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和质粒 人单核细胞系 THP-1 细胞系和人胚胎肾细胞 HEK 293T 细胞购自美国 121 典型培养物保藏中心(ATCC)。表达质粒和包装质粒及

2025-12-28 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82270305)

作者简介:于欣,女,硕士研究生;

孙业盈,男,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:

suny21en@163.com

包膜质粒:质粒 lentiCas9-Blast(美国 Addgene 有限公司,货号:#52962);pMD2. G 和 psPAX2 质粒均由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、100 mmol/L PMSF、RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物(All-in-one, 100x)(北京索莱宝科技有限公司,货号:P6741、IL2020、P0100、R0010、K107680P);Lyn、磷酸化 Lyn 激酶(phospho-Lyn, P-Lyn, Tyr507)、 β -actin(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:#2796、#2731T、#4967);磷酸化 Janus 激酶 1 (phospho-JAK1, P-JAK1)、JAK1(杭州臻优品生物科技有限公司,货号:YP-Ab-14315、YP-Ab-14225);磷酸化 STAT1(phospho-STAT1, P-STAT1), STAT1、抗原分化簇 80(cluster of differentiation 80, CD80)(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号:AP0135、A19563、A23729);RNAiso Easy、逆转录试剂、qPCR 试剂(日本 TAKARA 公司,货号:TCH020、RR037A、RR820A)。酶标仪(瑞士 Tecan 公司,型号:Infinite 200 PRO);qPCR 仪、梯度 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:QuantStudio 3、veriti Fast);曝光仪(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:GenoSens 2000);电泳仪(美国 Bio-RAD 公司,型号:PowerPac™ Basic Power Supply),流式细胞仪(美国 BD 公司,型号:Accuri™ C6 Plus)。

1.2 方法

1.2.1 敲除 Lyn 质粒载体构建 根据 NCBI 数据库中人 Lyn 基因编码序列[Gene ID:4067,转录本:Lyn-202, ENST 00000519728.6 借助于在线设计平台(<https://chopchop.cbu.uib.no/>)],遵循 CRISPR/Cas9 的靶向设计准则,本研究成功构建了特异性作用于 Lyn 基因的 sgRNA 序列,并进而获得了其相应的反义互补序列。使用 BsmBI-V2 酶酶切 LentiCRISPR-V2 质粒,将得到酶切后的 DNA 片段进行琼脂糖凝胶电泳。酶切成功进行胶回收,将 Lyn-sgRNA 进行退火,在退火过程中形成的双链 DNA 片段与经 BsmBI 核酸内切酶(BsmBI restriction enzyme, BsmBI)切割并产生特定黏性末端的质粒载体进行互补配对,并用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接成功即为 Lenti-Lyn-gRNA 载体,将连接成功的载体进行测序,用作后续构建 THP-1 单克隆细胞株的质粒载体。

1.2.2 慢病毒包装及感染 THP-1 细胞 按照包装

体系:目的质粒、包装质粒以及包膜质粒的比例被设定为 4:3:1,在 1.5 mL EP 管内静置 5 min 后,将含有包装体系的溶液与 PEI 进行混合并施以涡旋操作,随后于室温条件下进一步静置 30 min。随后将质粒混合液加入 HEK293T 细胞中进行培养,12 h 后换液,48 h 和 72 h 收集上清液,将收集的病毒上清液 5 560 r/min 离心 15 min,将获得的病毒沉淀分装,于 -80 °C 保存。病毒体积按照 0、2、5、10、15 μ L 的量加入接种有 THP-1 细胞的 6 孔板中,再加入 2 μ L 1 μ L/mL 的聚凝胺,加完后用封口膜包板,用台式冷冻离心机于 37 °C、3 000 r/min 离心 1 h,离心完成后正常培养,于 12 h 后去除含有病毒的培养基,并替换为全新的完全培养基。

1.2.3 Lyn^{-/-}单克隆细胞株的构建 将 1.2.2 项中获得的细胞进行 Western blot 检测,初步鉴定 Lyn 的敲低情况。扩增培养敲低效果最好的细胞,将细胞进行计数,采用极限稀释法,即取 200 个细胞制备细胞悬液(100 μ L 培养基中含有一个细胞),取 100 μ L 每孔接种于 96 孔板中培养扩增,Western blot 检测 Lyn 敲除情况。

1.2.4 M0 及 M1 巨噬细胞分化 将处于对数期生长的野生型 THP-1 细胞(Lyn^{WT})按照 3×10^6 个/孔接种于 6 孔板,将 100 ng/mL 的 PMA 稀释液加入到 6 孔板中,培养 48 h 分化为 M0 巨噬细胞。将 100 ng/mL 的 LPS 稀释液加入到 M0 细胞中,培养 0、4、6、8 h,分化为 M1 巨噬细胞。

1.2.5 RNA 提取和 qPCR 检测 使用 RNAiso Easy 试剂提取 Lyn^{WT}、Lyn^{-/-}、Lyn^{WT}-M1、Lyn^{-/-}-M1 的总细胞 RNA。qPCR 是使用 Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific(QuantStudio 3),在 QuantStudio 3 实时 PCR 机器中完成。使用 Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific Veriti 逆转录机器进行逆转录。使用两步法进行逆转录,条件是,第 1 步:42 °C、2 min;第 2 步:37 °C、15 min,85 °C、5 s,4 °C 保存。反转录结束后,按照 TAKARA(RR820A)说明书配制 qPCR 反应体系,反应条件:95 °C、30 s,90 °C、5 s,60 °C、30 s,进行 40 个循环;使用 QuantStudio™ 3 System 软件对 PCR 产物进行熔解分析。实时 PCR 引物合成序列见表 1。

1.2.6 流式细胞术分析 将分化时间为 0、4、6、8 h 的 M1 巨噬细胞消化 2 115 r/min 离心 4 min 收集细胞,将收集的细胞用 1 mL 0.5% BSA/PBS 溶液重悬,2 115 r/min 离心 3 min,去上清液,重复 2 次,用 0.5%

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Lyn</i>	TGCAGACCCTGAGCCCACTA	TTCCTTCCACTGCCCACTCC
β -actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTACGCACGAT
<i>iNOS</i>	GCTCTACACCTCCAATGTGACC	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG
<i>IL-6</i>	AGACAGCCACTCACCTCTTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
<i>CXCL-10</i>	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC	GTCCATCCTTGGAAAGCACTGCA
<i>CD11b</i>	GCCTTGACCTTATGTGATGGG	CCTGTGCTGTACTGCGCACT
<i>CD68</i>	GGAAATGCCACGGTTTATCCA	TGGGGTTTCAGTACAGAGATGC
<i>CD14</i>	ACGCCAGAACCTTGTGAGC	GCATGGATCTCCACCTCTACTG

的BSA/PBS重悬细胞,每管100 μ L。为了检测CD80在M1巨噬细胞表面的表达,每管加入0.2 μ g/mL的CD80一抗稀释液(稀释比1:1 000)5 μ L。振荡混匀,室温避光孵育20 min。2 115 r/min离心5 min去上清液,0.5% BSA/PBS溶液洗涤1次。200 μ L甲醛固定15 min,0.5%的BSA/PBS溶液2 115 r/min离心5 min洗涤1次,400 μ L 0.5%的BSA/PBS重悬细胞,然后通过流式细胞仪分析细胞。使用FlowJo软件分析数据。

1.2.7 Western blot 实验 从M1巨噬细胞及THP-1细胞中提取总蛋白,并添加了RIPA:PMSF:蛋白磷酸酶抑制剂=100:1:1的混合溶液100 μ L。蛋白质浓度通过BCA法来确定。蛋白质通过SDS/PAGE蛋白电泳,转移到聚偏二氟化物(PVDF)膜上,并用5%的脱脂牛奶洗脱^[12]。将PVDF膜与0.2 μ g/mL一抗Lyn、总 JAK1、P-JAK1、总 STAT1、P-STAT1(均1:1 000)与0.05 μ g/mL β -actin抗体(1:5 000)共同放于4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗膜,采用0.05 μ g/mL的辣根过氧化物酶偶联的抗兔IgG和抗鼠IgG用作二抗(稀释比1:5 000),室温孵育2 h,用显色液显色,进行曝光检测。用ImageJ进行灰度分析条带灰度值确定蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 本研究均进行了3次独立重复实验,所得数据均以 $(\bar{x}\pm s)$ 的形式呈现。使用GraphPad Prism 8.0软件对所收集的数据进行统计检验,组间两两均值比较使用 t 检验,多组之间的比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用Sidak检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建Lyn^{-/-}单克隆细胞 酶切质粒的琼脂糖凝胶电泳结果显示已将LentiCRISPR-V2质粒酶切为两个片段,即12 000 bp和2 000 bp(图1A)。

Lenti-Lyn-sgRNA质粒公司测序显示,Lenti-Lyn-sgRNA质粒测序结果与空白LentiCRISPR-V2质粒结果比对产生了5处碱基错配,证明产生突变,Lyn-sgRNA已经成功连接到LentiCRISPR-V2质粒上(图1B)。慢病毒感染THP-1野生型细胞Western blot检测结果显示,加入慢病毒后敲低了THP-1细胞中的Lyn,加入5 μ L和10 μ L慢病毒感染的混合克隆稳定株的Lyn敲低效率更明显(图1C)。选取5 μ L病毒感染的混合细胞进行单克隆筛选,Western blot条带图显示Lyn^{-/-}细胞中没有Lyn表达,Lyn^{WT}与Lyn^{-/-}细胞中Lyn的表达量差异有统计学意义($t=91.30, P<0.0001$)(图1D),由此已成功构建完全敲除Lyn的单克隆细胞(Lyn^{-/-}),将得到的单克隆细胞进行培养扩增,用于进行后续实验。

2.2 M0巨噬细胞分化成功 M0巨噬细胞表达多种巨噬细胞相关的特征性表面标志物,如CD68、CD14、CD11b和CD45。本实验通过qPCR检测THP-1分化为M0巨噬细胞后CD11b、CD68和CD14的mRNA表达水平,来判断M0巨噬细胞的分化(图2)。结果显示,无论是Lyn^{WT}还是Lyn^{-/-},利用PMA诱导后,CD11b($t=76.53, 23.48, 均P<0.0001$)、CD68($t=24.05, 13.00, 均P<0.001$)、CD14($t=7.40, 44.09, 均P<0.01$)表达量均明显升高,表明Lyn^{WT}-M0及Lyn^{-/-}-M0巨噬细胞均已分化成功。

2.3 Lyn参与M1巨噬细胞极化 qPCR检测Lyn的mRNA表达结果显示(图3A),细胞分化为M1巨噬细胞后Lyn的mRNA表达升高,Western blot检测结果显示细胞分化为M1巨噬细胞后Lyn的蛋白表达升高($t=149.9, P<0.0001$)、P-Lyn蛋白表达升高($t=4.563, P<0.05$)(图3B),证明Lyn参与了M1巨噬细胞极化。

2.4 Lyn影响M1巨噬细胞的细胞表型 qPCR检测Lyn敲除对M1巨噬细胞*iNOS*、*IL-6*和*CXCL-10*

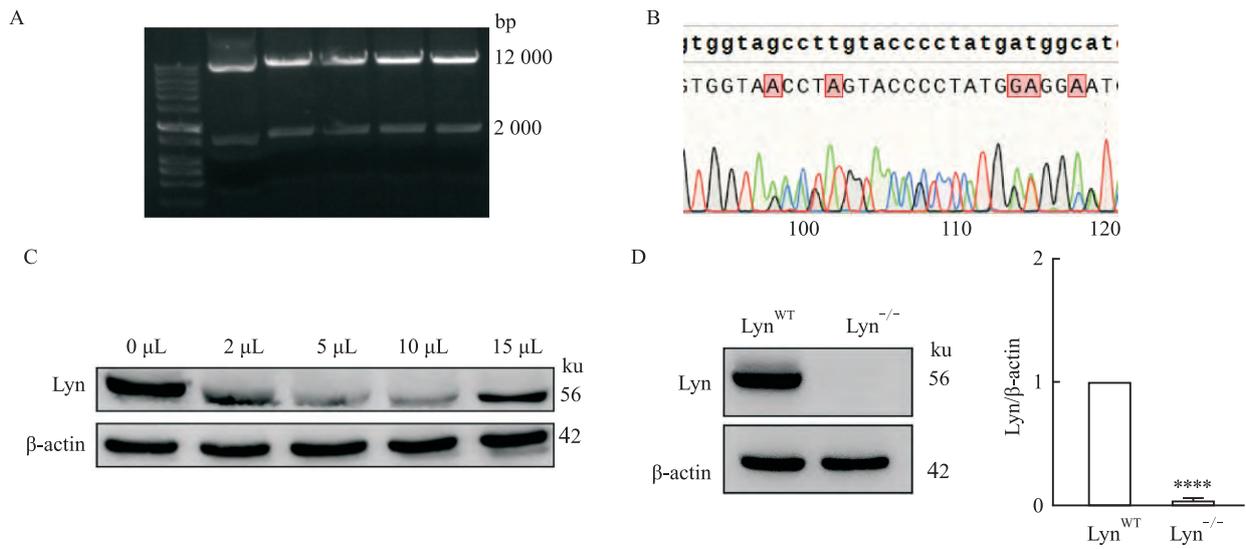


图1 Lenti-Lyn 载体构建及 Lyn^{-/-} 单克隆筛选

Fig. 1 Construction of Lenti-Lyn vector and screening of Lyn^{-/-} monoclonal

A: BsmBI-V2 digestion of LentiCRISPR-V2 plasmid, characterized by 1.5% agarose gel electrophoresis; B: Sequencing of Lyn-gRNA recombinant plasmid; C: Lyn protein levels in stable cell lines obtained via monoclonal selection with different viral concentrations; D: Lyn protein expression levels in Lyn^{-/-} stable cell lines obtained via monoclonal selection after infection with 5 μL of virus; ****P < 0.0001 vs Lyn^{WT}.

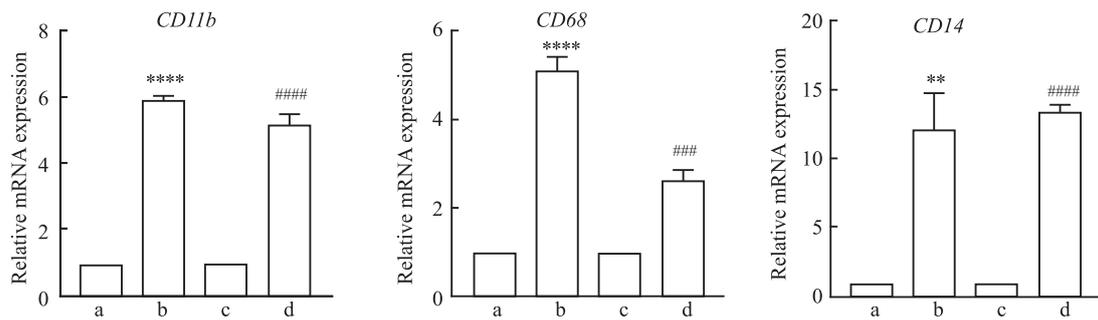


图2 qPCR检测M0巨噬细胞标志物 CD11b、CD68、CD14 表达

Fig. 2 qPCR was performed to detect the expression of M0 macrophage markers CD11b, CD68 and CD14

a: Lyn^{WT}; b: Lyn^{WT}-M0; c: Lyn^{-/-}; d: Lyn^{-/-}-M0; **P < 0.01, ****P < 0.0001 vs Lyn^{WT}; ###P < 0.001, ####P < 0.0001 vs Lyn^{-/-}.

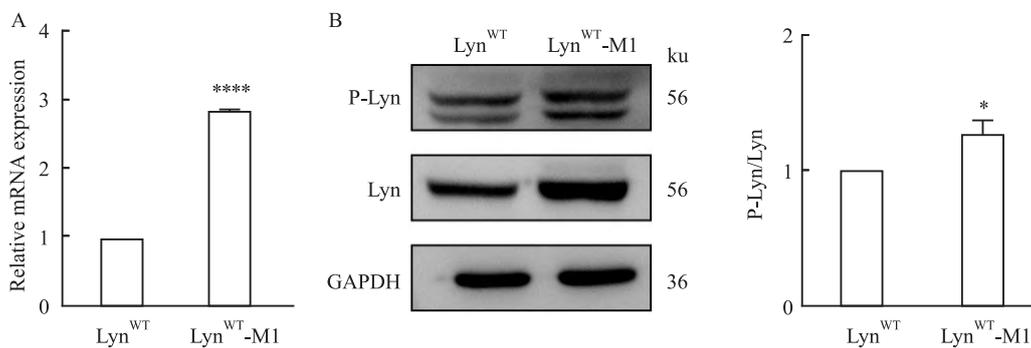


图3 qPCR 和 Western blot 检测 M1 巨噬细胞极化 Lyn 和 P-Lyn 的表达

Fig. 3 Detection of Lyn and P-Lyn expression during M1 macrophage polarization by qPCR and Western blot analysis

A: Detection of Lyn expression during M1 polarization of Lyn^{WT} macrophages by qPCR analysis; B: Detection of Lyn and P-Lyn expression during M1 polarization of Lyn^{WT} macrophages by Western blot analysis; *P < 0.05, ****P < 0.0001 vs Lyn^{WT}.

mRNA 表达的影响,结果显示,敲除 Lyn 后 THP-1 细胞向 M1 巨噬细胞分化的不同时间内 iNOS (t=11.820、1.635、3.581、5.378, P < 0.001, P > 0.05, P <

0.01, P < 0.001)、IL-6 (t=3.264、56.340、41.550、19.300, 均 P < 0.05) 和 CXCL-10 (t=125.200、4.974、9.409、11.310, 均 P < 0.001) 的分泌减少 (图 4A-

4C)。Lyn^{WT}与Lyn^{-/-}细胞在0 h时Lyn^{-/-}细胞的IL-6($t=3.264, P<0.05$)明显变少,表明敲除Lyn后抑制了M0细胞IL-6的分泌,同时也抑制了M1细胞分泌iNOS、IL-6和CXCL-10。这些结果显示,Lyn参与了M1巨噬细胞的极化过程,敲除Lyn之后抑制了THP-1向M1巨噬细胞的分化。

Western blot检测iNOS的蛋白表达结果显示(图4D),向M1巨噬细胞极化4 h和8 h($t=4.141、4.962$,均 $P<0.01$)Lyn^{-/-}-M1组iNOS蛋白水平下降,但是向M1巨噬细胞极化0 h和6 h的iNOS蛋白水平没有显著变化,证明Lyn敲除后会抑制M1巨噬细胞分泌iNOS,结果也同时证明了Lyn敲除后会抑制THP-1细胞向M1巨噬细胞的分化。流式细胞术结果显示(图4E),相对于Lyn^{WT} M1巨噬细胞,Lyn^{-/-} M1巨噬细胞8 h时细胞表面标志物CD80的表达降低

($t=3.31, P<0.05$)。

2.5 Lyn 基因敲除对 M1 巨噬细胞极化能力存在明显影响 JAK/STAT信号通路在巨噬细胞分化过程发挥着关键作用。本研究Western blot检测结果显示,随着分化时间的延长,Lyn^{-/-}-M1巨噬细胞JAK1蛋白表达逐渐下降($F_{趋势}=180.02, P<0.0001$),而P-JAK1的表达没有显著变化(图5A)。同时,Lyn^{-/-}-M1巨噬细胞JAK1下游P-STAT1/STAT1表达量在4、6、8 h也明显下降(图5B)($t=4.137、4.454、4.206$,均 $P<0.01$)。这些Western blot结果说明敲除Lyn明显抑制了THP-1向M1巨噬细胞的极化。

3 讨论

慢性炎症是由感染、组织损伤、自身免疫病等因素引发的长期持续性炎症反应^[13],其特征为炎症

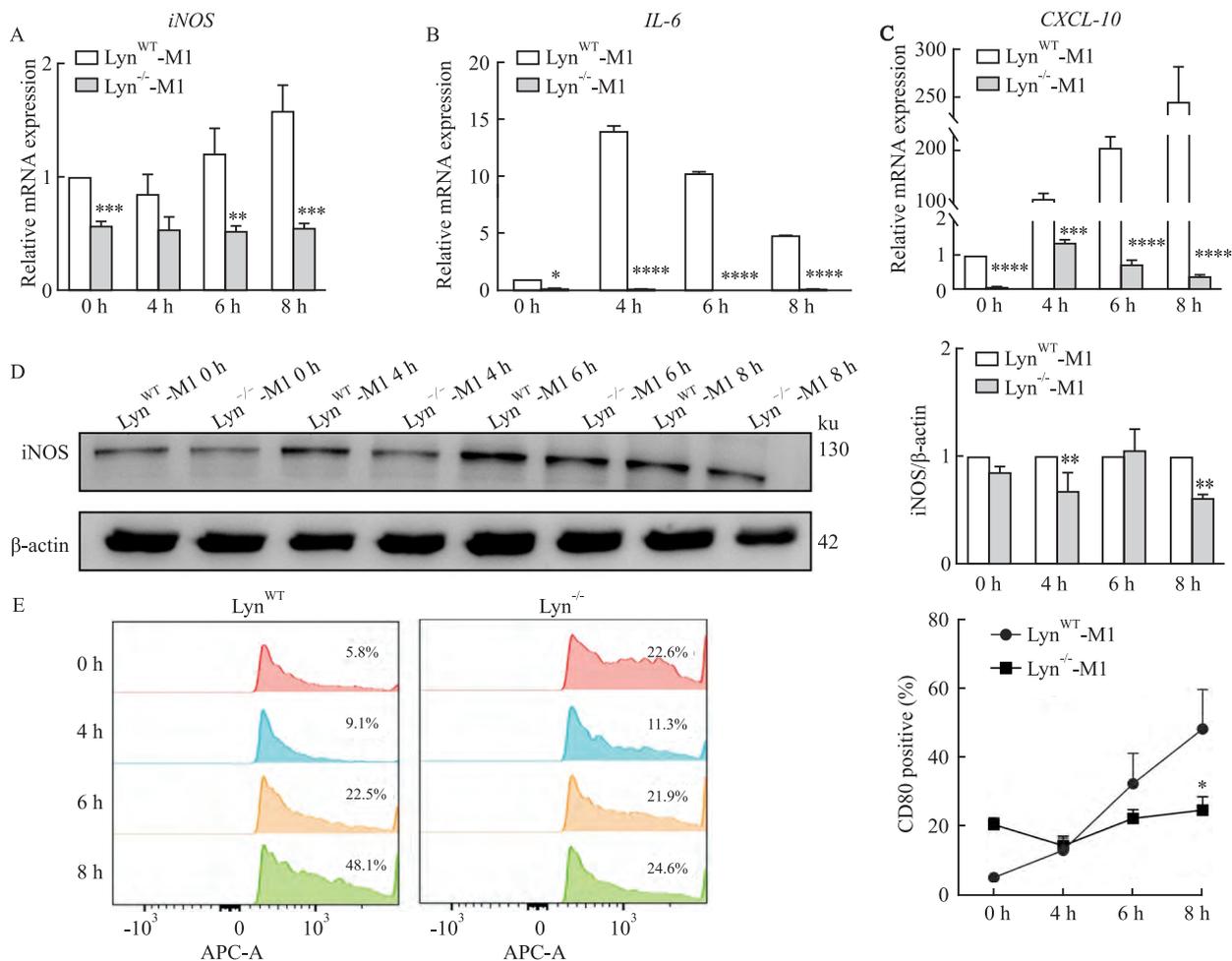


图4 Lyn影响M1巨噬细胞的细胞表型

Fig. 4 Lyn modulated the cellular phenotype of M1 macrophages

A-C: *iNOS*, *IL-6*, *CXCL-10* mRNA expression in Lyn^{-/-}-M1 macrophages at 0, 4, 6, and 8 hours; D: iNOS protein expression in Lyn^{-/-} cells at 0, 4, 6, and 8 hours during M1 macrophage polarization; E: Detection of CD80 expression in Lyn^{-/-} cells at 0, 4, 6, and 8 hours during M1 macrophage polarization via flow cytometry; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs Lyn^{WT}-M1.

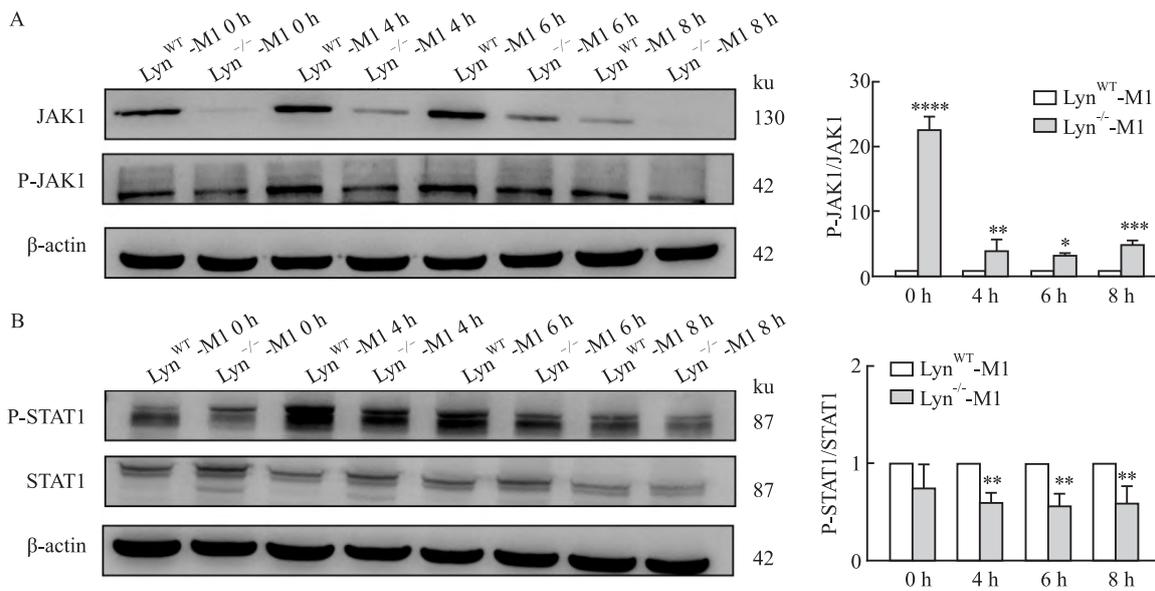


图5 Lyn^{-/-}抑制JAK1/STAT1信号通路

Fig. 5 Inhibition of the JAK1/STAT1 signaling pathway via Lyn^{-/-}

A, B: The effects of Lyn^{-/-} on the protein levels of P-JAK1/JAK1 and P-STAT1, detected by Western blot analysis; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs Lyn^{WT}-M1.

细胞(如巨噬细胞、T细胞)的持续浸润、促炎与抗炎因子失衡及组织纤维化^[14-15]。慢性炎症主要表现为M1巨噬细胞持续分泌炎症因子^[16-17],以及依赖于单核细胞向炎症部位的迁移和浸润及单核细胞与内皮细胞的黏附。巨噬细胞作为慢性炎症病灶中的主要免疫细胞^[14],其极化状态直接影响炎症的转归。M1极化主导促炎阶段^[15-17],若未能及时向M2型转换,可导致炎症慢性化,引发类风湿关节炎^[18]、动脉粥样硬化等疾病。因此,调控巨噬细胞极化有望成为慢性炎症治疗和缓解的有效方式。

在巨噬细胞中,Lyn的表达水平与细胞活化状态相关,其通过磷酸化下游信号分子调控细胞增殖、分化和炎症反应。本实验利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,成功地敲除了Lyn,得到了敲除Lyn的THP-1细胞系。对敲除Lyn后的THP-1-M1巨噬细胞的表型变化和机制进行了深入研究,结果显示Lyn在M1巨噬细胞分化过程中起正向促进作用,敲除Lyn后THP-1-M1型巨噬细胞iNOS、IL-6、CXCL-10和CD80等M1巨噬细胞标志物及炎症的分泌受到抑制,以上的细胞表型实验证明敲除Lyn后抑制了THP-1-M0巨噬细胞向M1巨噬细胞的极化。研究显示^[19],JAK/STAT信号通路与M1巨噬细胞极化有关。本研究检测结果显示,随着分化时间的延长,敲除Lyn后M1巨噬细胞JAK1的蛋白表达逐渐下降,而P-JAK1的表达没有显著变化;同时,JAK1

下游P-STAT1/STAT1表达量也明显下降。提示敲除Lyn后,JAK1的抑制作用导致其下游分子P-STAT-1的水平下降,这可能进一步导致了iNOS、IL-6、CXCL-10和CD80等M1巨噬细胞标志物的分泌减少,最终实现对M1巨噬细胞极化的抑制。

M1型巨噬细胞过度活化是类风湿关节炎、银屑病等慢性炎症的核心病理基础,靶向该新型激酶可特异性抑制M1极化相关促炎因子IL-6的释放,降低炎症损伤;同时,在肿瘤微环境中,M1型巨噬细胞具有抗肿瘤免疫活性,通过激活该激酶增强M1极化可提升免疫检查点抑制剂疗效,为肿瘤免疫联合治疗提供新思路^[20]。在自身免疫病治疗研究中,Lyn抑制剂可通过调控托样受体(TLR)信号通路的负反馈机制,对巨噬细胞M1极化过度激活“适度刹车”,临床前试验表明,其能显著减轻胶原诱导性关节炎模型的关节肿胀,抑制滑膜组织中IL-1β、IL-18的过度分泌,疗效优于传统JAK抑制剂且无明显骨髓抑制副作用^[21]。本研究通过CRISPR/Cas9敲除Lyn后,M1巨噬细胞JAK/STAT通路关键分子JAK1、P-STAT1表达显著下调,iNOS、IL-6、CXCL-10及CD80的表达亦受到明显抑制。推测Lyn敲除或通过靶向调控JAK1/P-STAT1介导的JAK/STAT通路发挥作用。本研究揭示了Lck/Yes相关新型酪氨酸激酶对巨噬细胞M1极化的调控机制,填补了Src家族激酶在固有免疫细胞功能调控中的研究空白。

同时,为慢性炎症性疾病和肿瘤的干预提供了新靶点。

然而,本研究也存在着一些局限性。一是仅采用细胞模型,其简化特性限制结论适用性,后续需动物实验验证;二是Lyn功能多样且相互交织,难以精准解析其在慢性疾病中的特定机制。未来研究需综合考量上述因素,优化研究方法与技术,以全面揭示Lyn在慢性疾病中的作用机制,为疾病防治提供理论支撑。

参考文献

- [1] Leuti A, Fazio D, Fava M, et al. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 159: 133-69. doi: 10.1016/j.addr.2020.06.028.
- [2] Suzuki K. Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(6): 223. doi: 10.3390/biom9060223.
- [3] Taylor C T, Colgan S P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(12): 774-85. doi: 10.1038/nri.2017.103.
- [4] Freytes D O, Kang J W, Marcos-Campos I, et al. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(1): 220-9. doi: 10.1002/jcb.24357.
- [5] Yang K, Trepanier C, Sidhu B, et al. Metaplasticity gated through differential regulation of GluN2A versus GluN2B receptors by Src family kinases[J]. *EMBO J*, 2012, 31(4): 805-16. doi: 10.1038/emboj.2011.453.
- [6] 夏 珺. 抑制 CD36 通过 Lyn/JNK 通路减少巨噬细胞吞噬 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020. doi: 10.27674/d.cnki.geyku.2020.001243.
- [6] Xia J. Inhibiting CD36 decrease macrophage phagocytosis *via* the Lyn/JNK pathway [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020. doi: 10.27674/d.cnki.geyku.2020.001243.
- [7] 胡 迎. 非受体酪氨酸激酶 BMX 对 LPS 刺激巨噬细胞分泌促炎性细胞因子 TNF- α 和吞噬功能的影响 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [7] Hu Y. The effect of non-receptor tyrosine kinase BMX on LPS-stimulated macrophage in secretion of pro-inflammatory cytokine TNF- α and phagocytosis of *E. coli*. [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2018.
- [8] Freudenburg W, Mark L Buller R, Corbett J A. Src family kinases participate in the regulation of encephalomyocarditis virus-induced cyclooxygenase-2 expression by macrophages[J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 9): 2278-85. doi: 10.1099/vir.0.022665-0.
- [9] Strous G J, Almeida A D S, Putters J, et al. Growth hormone receptor regulation in cancer and chronic diseases [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 597573. doi: 10.3389/fendo.2020.597573.
- [10] Chhabra Y, Bielefeldt-Ohmann H, Brooks T L, et al. Roles of growth hormone-dependent JAK-STAT5 and lyn kinase signaling in determining lifespan and cancer incidence[J]. *Endocrinology*, 2024, 165(11): bqae136. doi: 10.1210/endo/bqae136.
- [11] Du L, Wang B, Wu M, et al. LINC00926 promotes progression of renal cell carcinoma *via* regulating miR-30a-5p/SOX4 axis and activating IFN γ -JAK2-STAT1 pathway [J]. *Cancer Lett*, 2023, 578: 216463. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216463.
- [12] 汪碧君, 崔浩东, 吴文涌. DPP7 蛋白对肝细胞癌的影响及其机制 [J/OL]. *安徽医科大学学报*, 1-15 [2025-12-28]. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251223.1616.003>.
- [12] Wang B J, Cui H D, Wu W Y. The role of DPP7 protein in hepatocellular carcinoma and its underlying mechanisms. [J/OL]. *Acta Univ Med Anhui*, 1-15 [2025-12-28]. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251223.1616.003>.
- [13] Raj S, Unsworth L D. Targeting active sites of inflammation using inherent properties of tissue-resident mast cells[J]. *Acta Biomater*, 2023, 159: 21-37. doi: 10.1016/j.actbio.2023.01.024.
- [14] Koplev S, Teichmann S A. Universal and tissue-specific fibroblasts in chronic inflammation and cancer[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(10): 1648-50. doi: 10.1016/j.ccell.2024.08.022.
- [15] 葛佳宁, 顾丰华. 慢性支气管炎的炎症相关机制概述 [J]. *世界临床药物*, 2024, 45(12): 1303-8. doi: 10.13683/j.wph.2024.12.015.
- [15] Ge J N, Gu F H. Overview of inflammation-related mechanisms of chronic bronchitis[J]. *World Clin Drug*, 2024, 45(12): 1303-8. doi: 10.13683/j.wph.2024.12.015.
- [16] Qin X, Niu Z, Chen H, et al. Macrophage-derived exosomal HMGB3 regulates silica-induced pulmonary inflammation by promoting M1 macrophage polarization and recruitment [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2024, 21(1): 12. doi: 10.1186/s12989-024-00568-8.
- [17] Tall A R, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(2): 104-16. doi: 10.1038/nri3793.
- [18] Wu Q, Yao Q, Hu T, et al. Dapagliflozin protects against chronic heart failure in mice by inhibiting macrophage-mediated inflammation, independent of SGLT2[J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(12): 101334. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101334.
- [19] 陆贝贝, 陈姗姗, 陈飞蓉, 等. SerpinE1 通过 JAK/STAT 通路调节 HIV-1 在巨噬细胞中的复制 [J]. *广西医科大学学报*, 2024, 41(6): 826-32. doi: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.06.006.
- [19] Lu B B, Chen S S, Chen F R, et al. SerpinE1 regulating HIV-1 replication in macrophages through the JAK/STAT pathway [J]. *J Guangxi Med Univ*, 2024, 41(6): 826-32. doi: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.06.006.
- [20] Yao Z, He J, Hu M, et al. Fuhu Lijie Tang treats rheumatoid arthritis through multitarget therapy from autoantigen formation to bone destruction [J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 157086. doi: 10.1016/j.phymed.2025.157086.
- [21] Dallari S, Macal M, Loureiro M E, et al. Src family kinases Fyn and Lyn are constitutively activated and mediate plasmacytoid

dendritic cell responses [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14830.

doi: 10.1038/ncomms14830.

Role and mechanism of Lck/Yes-related novel tyrosine kinases in macrophage M1 polarization

Yu Xin, Gao Zhensheng, Bian Weihua, Liu Xiangyong, Sun Yeying
(Department of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003)

Abstract Objective To investigate the role and mechanism of Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase (Lyn) on lipopolysaccharide (LPS)-induced M1-type polarization of macrophage. **Methods** The LentiCRISPR-V2 plasmid was digested with the restriction endonuclease BSMBI-V2, and the digested DNA fragments were recovered. The digested plasmid was ligated with *Lyn*-sgRNA using T4 ligase to generate the Lenti-*Lyn*-gRNA lentivirus. THP-1 cells were infected with the Lenti-*Lyn*-gRNA lentivirus to obtain a stable cell line with Lyn knockout, and a monoclonal THP-1 cell line with complete Lyn knockout (*Lyn*^{-/-}) was established subsequently. Wild-type Lyn (*Lyn*^{WT}) and *Lyn*^{-/-} THP-1 cells were induced with 100 ng/mL phorbol myristate acetate (PMA) for 48 h to differentiate into M0 macrophages, which were further polarized into M1 macrophages by stimulation with 100 ng/mL LPS for 24 h. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed to detect the expression of M0 macrophage markers, including integrin α M (CD11b), macrophage antigen (CD68), and monocyte differentiation antigen (CD14). The expression of Lyn in M1 macrophages differentiated from wild-type THP-1 cells (*Lyn*^{WT}-M1) was measured by qPCR, and the ratio of phosphorylated Lyn to total Lyn (P-Lyn/Lyn) in *Lyn*^{WT}-M1 cells was determined by Western blot. In M1 macrophages differentiated from Lyn-knockout THP-1 cells (*Lyn*^{-/-}-M1), qPCR was used to detect the mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-6 (IL-6), and chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL-10). Western blot was conducted to assess the protein expression of iNOS, as well as the protein levels of molecules related to the Janus kinase 1 (JAK1)-signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) signaling pathway, including JAK1, phosphorylated JAK1 (P-JAK1), STAT1, and phosphorylated STAT1 (P-STAT1). Additionally, the expression of the M1 macrophage marker cluster of differentiation 80 (CD80) was analyzed by flow cytometry. **Results** The *Lyn*^{-/-} monoclonal cell line was successfully constructed. The expression of CD11b was significantly elevated in *Lyn*^{-/-} M0 macrophages, and the differentiation of M1 macrophages was successful. Knockdown of Lyn inhibited mRNA expression of *iNOS*, *IL-6*, *CXCL-10*, protein expression of iNOS and CD80 expression in M1 macrophages ($P < 0.05$). Western blot assay showed that Lyn knockdown inhibited protein expression of JAK1 and P-STAT1 ($P < 0.01$). **Conclusion** After CRISPR/Cas9-mediated Lyn knockout, the expression levels of JAK1 and P-STAT1, the key molecules in the JAK/STAT signaling pathway of M1 macrophages, are significantly downregulated; concomitantly, the expression of M1 macrophage-specific secretory factors (*iNOS*, *IL-6*, *CXCL-10* mRNA) and CD80 is also downregulated, which may be achieved *via* targeted regulation of the JAK1/P-STAT1-mediated JAK/STAT signaling pathway.

Key words Lyn kinase; THP-1; M1 macrophage; CRISPR/Cas9; chronic inflammation; JAK/STAT signaling pathway

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82270305)

Corresponding author Sun Yeying, E-mail: suny21cn@163.com