

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20210989

· 论 著 ·

## 基于 mRNA-seq 数据筛选 $Mn^{2+}$ 调控小鼠巨噬细胞的差异表达基因

吴双双, 陈 晶, 王云成, 马一瑄, 魏书宇, 刘鸿雁, 董亚尊, 王北艳, 崔玉东, 马金柱\*

黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319

**[摘要]** **目的** 对  $Mn^{2+}$  调控的小鼠巨噬细胞 mRNA 进行测序和生物信息学分析, 筛选出差异表达的基因并分析其生物学功能, 探究  $Mn^{2+}$  对小鼠巨噬细胞的调控作用。 **方法** 采用  $MnCl_2$  和 NaCl 分别处理小鼠腹腔巨噬细胞 24 h, 利用 mRNA-seq 方法筛选出  $Mn^{2+}$  调控巨噬细胞的差异表达基因, 对差异表达基因进行基因本体 (GO) 和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并采用 qPCR 对关键的差异表达基因进行验证。 **结果** 通过整合数据库信息和分析获得 1 637 个差异表达基因, 包括表达上调的基因 912 个、表达下调的基因 725 个, GO 富集分析表明这些差异表达基因具有免疫吞噬、细胞增殖和分化、转录因子调控等生物活性, KEGG 通路主要富集在 PI3K-Akt、NF- $\kappa$ B 等信号通路。其中与免疫相关且差异最显著的 10 个基因为免疫球蛋白 G Fc 段受体 I (*Fcgr1*)、含不育  $\alpha$  基序结构域蛋白 11 (*Samd11*)、活性调节的细胞骨架相关蛋白 (*Arc*)、G 蛋白偶联受体 35 (*Gpr35*)、富含脯氨酸的小蛋白 2H (*Sprp2h*)、Wnt 家族成员 4 (*Wnt4*)、整合膜蛋白 2A (*Itm2a*)、无调性 bHLH 转录因子 8 (*Atoh8*)、泛素结合酶 E2C (*Ube2c*) 及富含脯氨酸的小蛋白 2B (*Sprp2b*), qPCR 验证结果与 mRNA 测序分析趋势一致。 **结论** 通过 mRNA-seq 数据筛选  $Mn^{2+}$  调控小鼠巨噬细胞的差异表达基因及 GO 和 KEGG 富集分析结果表明  $Mn^{2+}$  对巨噬细胞具有免疫调节作用。

**[关键词]** mRNA 测序; 巨噬细胞; 锰; 免疫调节; 差异表达基因

**[中图分类号]** R 392.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 2097-1338(2023)05-0589-06

### Screening of differentially expressed genes in mouse macrophages regulated by $Mn^{2+}$ based on mRNA-seq data

WU Shuang-shuang, CHEN Jing, WANG Yun-cheng, MA Yi-xuan, WEI Shu-yu, LIU Hong-yan, DONG Ya-zun, WANG Bei-yan, CUI Yu-dong, MA Jin-zhu\*

College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

**[Abstract]** **Objective** To conduct sequencing and bioinformatics analysis of mRNA from mouse macrophages regulated by  $Mn^{2+}$ , screen out differentially expressed genes, and analyze their biological functions, so as to explore the regulatory effect of  $Mn^{2+}$  on mouse macrophages. **Methods**  $MnCl_2$  and NaCl were used to treat mouse peritoneal macrophages for 24 h, respectively. The mRNA-seq method was used to screen for the differentially expressed genes of macrophages regulated by  $Mn^{2+}$ , then the differentially expressed genes were analyzed with the Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses, and the key differentially expressed genes were verified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** A total of 1 637 differentially expressed genes were obtained by integrating database information and analyses, including 912 upregulated genes and 725 down-regulated genes. GO enrichment analysis showed that these differentially expressed genes had biological activities, such as phagocytosis, cell proliferation and differentiation, and regulation of transcription factors. The KEGG pathway was mainly enriched in phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B and nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathways. The top 10 genes associated with immunity and with the most significant differences were Fc receptor, immunoglobulin G, high affinity I (*Fcgr1*), sterile  $\alpha$

**[收稿日期]** 2021-09-28 **[接收日期]** 2021-12-07

**[基金项目]** 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2019C047), 大庆市指导性科技项目 (zd-2020-62), 留学归国科研启动基金计划 (ZRCLG201905), 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研项目 (YJSCX2021-Y104), 大学生创新创业训练计划 (202110223005, 202110223007). Supported by Natural Science Foundation Joint Guidance Project of Heilongjiang Province (LH2019C047), Science and Technology Guiding Project of Daqing (zd-2020-62), Returned Overseas Research Starting Fund (ZRCLG201905), Graduate Innovative Research Project of Heilongjiang Bayi Agricultural University (YJSCX2021-Y104), and Training Program of Innovation and Entrepreneurship for College Students (202110223005, 202110223007).

**[作者简介]** 吴双双, 硕士生. E-mail: 1377545625@qq.com

\*通信作者 (Corresponding author). Tel: 0459-6819293, E-mail: majinzhu1976@163.com

motif domain containing 11 (*Samd11*), activity regulated cytoskeleton-associated protein (*Arc*), G protein-coupled receptor 35 (*Gpr35*), small proline-rich protein 2H (*Sprp2h*), Wnt family member 4 (*Wnt4*), integral membrane protein 2A (*Itm2a*), atonal bHLH transcription factor 8 (*Atoh8*), ubiquitin conjugating enzyme E2C (*Ube2c*) and small proline rich protein 2B (*Sprp2b*). The qPCR verification results of the 10 genes were consistent with the trend of mRNA sequencing analysis. **Conclusion** The screening of the differentially expressed genes from mouse macrophages regulated by  $Mn^{2+}$  based on mRNA-seq data and the analyses of GO and KEGG enrichment show that  $Mn^{2+}$  has an immunoregulation effect on mouse macrophages.

[ **Key words** ] mRNA sequencing; macrophages; manganese; immunoregulation; differentially expressed genes

[ Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(5): 589-594 ]

锰(Mn)是机体必需的微量元素之一,在机体的营养代谢、生长发育和系统免疫中发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>,参与一百多种酶的激活,主要涉及糖、氨基酸、蛋白质、胆固醇的合成、脂肪代谢等过程<sup>[3-4]</sup>。在免疫调节中,Smialowicz等<sup>[5]</sup>发现在小鼠腹腔注射  $MnCl_2$  可促进干扰素的产生,进而增强自然杀伤细胞的活性。Mn可增强环鸟苷酸-腺苷酸合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)/环鸟苷酸-腺苷酸(cyclic GMP-AMP, cGAMP)/干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon gene, STING)信号通路的敏感性,从而增强机体免疫反应<sup>[6]</sup>。

巨噬细胞来源于骨髓中的前体细胞,主要功能是吞噬细胞残片与病原体,并激活其他免疫细胞,增强机体抗感染、抗肿瘤等作用<sup>[7]</sup>。已证实天然抗性相关巨噬蛋白1(natural resistance-associated macrophage protein 1, NRAMP1)可调节细胞内的  $Mn^{2+}$  水平<sup>[8]</sup>,但  $Mn^{2+}$  与巨噬细胞相互作用的分子机制尚不清楚。本研究对  $Mn^{2+}$  调控的小鼠巨噬细胞进行转录组测序(mRNA-seq)和生物信息学分析,筛选出差异表达的基因并分析其生物学功能,为探究  $Mn^{2+}$  对巨噬细胞调控作用的分子机制、寻找新的药物靶点提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 CR21型高速离心机(日本Hitachi公司),FA2104N电子天平(上海菁海仪器有限公司),二氧化碳培养箱(日本Sanyo公司),恒温金属浴(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),Light Cycler 96实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司),BCN-1360B洁净工作台(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)。  $NH_4Cl$ -Tris红细胞裂解液(美国Biolegend公司),  $MnCl_2$ (美国Sigma公司), NaCl(哈尔滨三联药业股份有限公司), FBS(北京赛默飞世尔生物化学制品有

限公司), 硫基乙醇酸盐(美国Sigma公司), 青霉素-链霉素溶液、DMEM(美国HyClone公司), 庆大霉素(上海现代哈森药业有限公司)。总RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司), 反转录试剂盒[兰博利德(福州)生物技术有限公司], 荧光定量PCR试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

1.2 小鼠腹腔巨噬细胞的提取 成年野生型C57小鼠购自长春市亿斯实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK(吉)2020-0002]。在小鼠腹腔注射1 mL 硫基乙醇酸盐培养基。3 d后将小鼠颈椎脱臼处死,于75%乙醇中浸泡10 min。用灭菌的剪刀和镊子剪开小鼠外皮,暴露出腹膜,用酒精棉轻轻擦拭腹膜,使用20 mL注射器向小鼠腹腔注射15 mL DMEM,为了收集更多的巨噬细胞,需来回抽吸并轻轻抚摸小鼠腹部。将收集到的灌洗液以  $500\times g$  离心5 min,加入1 mL  $NH_4Cl$ -Tris裂解液裂解红细胞,2 min后加入10 mL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4),  $500\times g$  离心5 min,弃掉上清;补加10 mL PBS轻轻吹悬细胞,  $500\times g$  离心5 min,洗涤细胞3次,然后对细胞进行计数。将收集到的细胞铺到6孔板中,在细胞培养箱中过夜培养后弃掉细胞上清液,用PBS洗细胞3次,加入DMEM进行饥饿处理1 h后分为实验组和对照组。实验组细胞加入  $250\ \mu\text{mol/mL}$   $MnCl_2$  处理,对照组细胞加入  $250\ \mu\text{mol/mL}$  NaCl处理,1 h后感染金黄色葡萄球菌Newman株(感染复数为1:50),3 h后加入  $100\ \mu\text{g/mL}$  庆大霉素处理细胞外的金黄色葡萄球菌,24 h后收集细胞进行检测。

1.3 mRNA-seq 利用RNA提取试剂盒提取  $MnCl_2$  和 NaCl 处理巨噬细胞的总RNA,操作过程按照试剂盒说明书进行。检测提取的总RNA样本的浓度和纯度,将符合要求的样本送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 差异表达基因分析 使用FastQC软件(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)对获得的 mRNA-seq 数据进行评估和质控, 使用 Trimmomatic 数据过滤软件去除低质量数据和核糖体 RNA 序列后获得合格的样本, 用 DESeq 软件包进行差异表达分析。筛选条件:  $q\text{-value} < 0.05$  且差异倍数 (fold change, FC)  $> 2$  或  $< 0.05$ 。

1.5 差异表达基因的通路富集分析和基因功能注释 筛选出 MnCl<sub>2</sub> 组与 NaCl 组的差异表达基因, 通过基因本体 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 进行基因功能和信号通路分析。

1.6 关键基因的 qPCR 验证 筛选出与免疫相关且差异表达最显著的 10 个基因, 利用反转录试剂盒将提取的合格样本 RNA (每个样本取 1 μg) 合成 cDNA。反应体系 (20 μL): cDNA 模板 1 μL, 正、反向引物各 0.5 μL, 2×ChamQ™ Universal® SYBR qPCR Master Mix 10 μL, 无 RNA 酶水 8 μL。反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 5 s, 58 °C 10 s, 72 °C 15 s, 40 个循环。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 各引物序列见表 1。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算目的基因的相对表达量, 利用 GraphPad Prism 8.3.0 和 SPSS 19.0 软件对 qPCR 检测结果进行统计和分析。

表 1 用于 qPCR 的引物序列

Tab 1 Primer sequences for qPCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Fcgr1</i>	GCATGGGAAGACACCGCTAC	CCGGGAAGGGAGATGACAC
<i>Samd11</i>	AGCCACGATCTGCTTAGGGT	CTGTAGACGAGGGCAGGTGA
<i>Arc</i>	ATCAAGGCTGTCTTTGCCG	CCTCCACACGTGCATCTCAC
<i>Gpr35</i>	AATACCTGTGCTGCCCGAGA	TGTGTTGGAAGACGTGGCTG
<i>Spr2h</i>	CCCTCCCTCATACCAGCAGAA	TCATTTGTTCTTGGGTGGACTT
<i>Wnt4</i>	ACTCCCTCCCTGTCTTTGGG	CGGTCACAGCCACACTTCTC
<i>Itm2a</i>	CTTCATGCCCAAGAGCACCA	TCAGCCTCCTCAGTCACAGG
<i>Atoh8</i>	GAAGCTCAAGCGAAAGGCA	GTTGTGTCCTGTCCCGAAGC
<i>Ube2c</i>	ATCTCCGCTTCCCTGAGTC	GGGTGCGTTGTAAGGGTAGC
<i>Spr2b</i>	CCAAAGTGCCCTGAGCCTTGTC	CTTCTGCTGGCATGGTGGAAATTG
β-actin	GGTAGTCAAAGTGTTCATAAGG	TCATCGCCTTGGTAGTTAAAT

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; *Fcgr1*: Fc receptor, immunoglobulin G, high affinity I; *Samd11*: Sterile α motif domain containing 11; *Arc*: Activity regulated cytoskeleton-associated protein; *Gpr35*: G protein-coupled receptor 35; *Spr2h*: Small proline-rich protein 2H; *Wnt4*: Wnt family member 4; *Itm2a*: Integral membrane protein 2A; *Atoh8*: Atonal bHLH transcription factor 8; *Ube2c*: Ubiquitin conjugating enzyme E2C; *Spr2b*: Small proline rich protein 2B.

## 2 结果

2.1 mRNA-seq 数据分析 通过 mRNA-seq 分析 MnCl<sub>2</sub> 和 NaCl 处理的小鼠腹腔巨噬细胞的差异表达基因, 共获得差异表达基因 1 637 个, 其中在 MnCl<sub>2</sub> 处理组表达上调的基因有 912 个、表达下调的基因有 725 个 (图 1)。

2.2 差异表达基因功能和通路分析 GO 富集分析结果 (图 2A) 显示, MnCl<sub>2</sub> 和 NaCl 处理的小鼠腹腔巨噬细胞的差异表达基因功能主要富集在免疫吞噬、细胞增殖和分化、转录因子调控等生物活性。KEGG 富集分析结果 (图 2B) 表明, 这些差异表达基因主要参与的信号通路包括 PI3K-Akt 信号通路、NF-κB 信号通路等, 这可能预示着 Mn<sup>2+</sup> 通过激活巨噬细胞调控宿主的免疫应答。

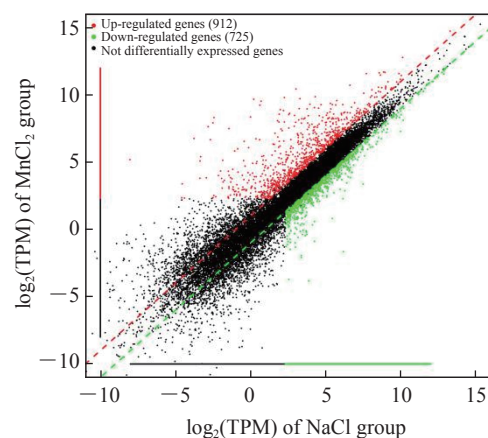


图 1 MnCl<sub>2</sub> 和 NaCl 处理的小鼠腹腔巨噬细胞差异表达基因散点图

Fig 1 Scatter diagram of differentially expressed genes of mouse peritoneal macrophages treated with MnCl<sub>2</sub> or NaCl

TPM: Transcripts per million.

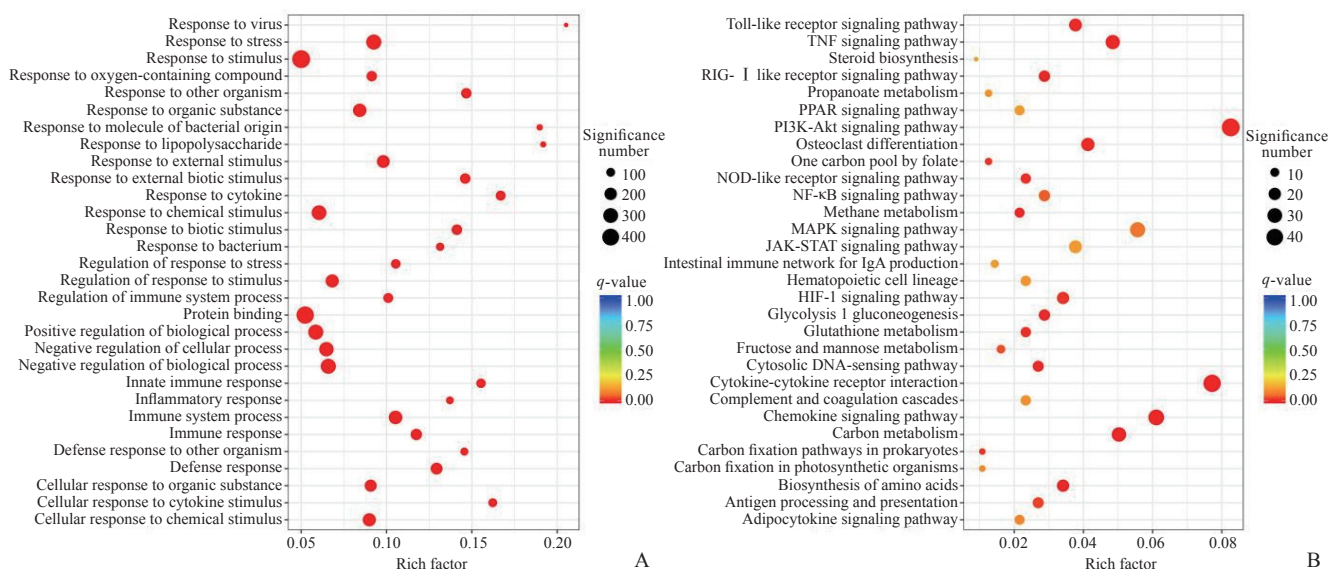


图2 MnCl<sub>2</sub> 和 NaCl 处理的小鼠腹腔巨噬细胞的差异表达基因的 GO (A) 和 KEGG (B) 富集分析

Fig 2 GO (A) and KEGG (B) enrichment analyses of differentially expressed genes of mouse peritoneal macrophages treated with MnCl<sub>2</sub> or NaCl

GO: Gene Ontology; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; TNF: Tumor necrosis factor; RIG- I : Retinoic acid inducible gene I ; PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; Akt: Protein kinase B; NOD: Nucleotide oligomerization domain; NF-κB: Nuclear factor κB; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; JAK: Janus kinase; STAT: Signal transducer and activator of transcription; IgA: Immunoglobulin A; HIF-1: Hypoxia-inducible factor-1.

2.3 关键差异表达基因的验证 筛选出与免疫相关且差异最显著的 10 个基因, 分别为免疫球蛋白 G Fc 段受体 I (Fc receptor, immunoglobulin G, high affinity I ; *Fcgr1*)、含不育 α 基序结构域蛋白 11 (sterile alpha motif domain containing 11, *Samd11*)、活性调节的细胞骨架相关蛋白 (activity regulated cytoskeleton associated protein, *Arc*)、G 蛋白偶联受体 35 (G protein-coupled receptor 35, *Gpr35*)、富含脯氨酸的小蛋白 2H (small proline-rich protein 2H, *Sprr2h*)、Wnt 家族成员 4 (Wnt family member 4, *Wnt4*)、整合膜蛋白 2A (integral membrane protein 2A, *Itm2a*)、无调性 bHLH 转录因子 8 (atonal bHLH transcription factor 8, *Atoh8*)、泛素结合酶 E2C (ubiquitin conjugating enzyme E2C, *Ube2c*) 及富含脯氨酸的小蛋白 2B (small proline rich protein 2B, *Sprr2b*)。采用 qPCR 对上述 10 个关键差异表达基因进行验证, 结果显示 10 个基因的差异表达趋势与测序结果一致, *Fcgr1*、*Samd11*、*Arc*、*Gpr35* 及 *Sprr2h* 在 MnCl<sub>2</sub> 处理组表达上调, *Wnt4*、*Itm2a*、*Atoh8*、*Ube2c* 及 *Sprr2b* 在 MnCl<sub>2</sub> 处理组表达下调 (图 3)。

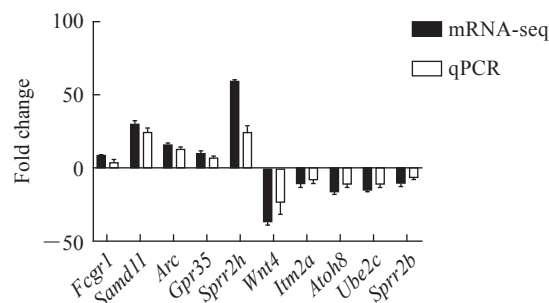


图3 MnCl<sub>2</sub> 和 NaCl 处理的小鼠腹腔巨噬细胞 10 个关键差异表达基因 qPCR 验证结果

Fig 3 Validation results of qPCR for 10 key differentially expressed genes in mouse peritoneal macrophages treated with MnCl<sub>2</sub> or NaCl

*n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; mRNA-seq: MicroRNA-sequencing; *Fcgr1*: Fc receptor, immunoglobulin G, high affinity I ; *Samd11*: Sterile α motif domain containing 11; *Arc*: Activity regulated cytoskeleton associated protein; *Gpr35*: G protein-coupled receptor 35; *Sprr2h*: Small proline-rich protein 2H; *Wnt4*: Wnt family member 4; *Itm2a*: Integral membrane protein 2A; *Atoh8*: Atonal bHLH transcription factor 8; *Ube2c*: Ubiquitin conjugating enzyme E2C; *Sprr2b*: Small proline rich protein 2B.

### 3 讨论

Mn 是哺乳动物体内含量最丰富的金属元素之一, 在机体发育、神经功能调节和免疫调节等过程中发挥重要作用。在化学性质上, Mn<sup>2+</sup> 与 Mg<sup>2+</sup> 非常相似<sup>[9]</sup>, 研究发现 Mn<sup>2+</sup> 可以取代 Mg<sup>2+</sup> 激活 cGAS, 并提升 cGAS 对双链 DNA 检测的灵敏性<sup>[10-11]</sup>。Mn<sup>2+</sup> 在炎症反应及机体免疫中具有重要作用, Mokgobu 等<sup>[12]</sup> 研究表明, Mn<sup>2+</sup> 可通过激活巨噬细胞和中性粒细胞促进过氧化氢的产生, 发挥促氧化作用; 但 Daejin 等<sup>[13]</sup> 研究却显示出相反的结果, 即 Mn<sup>2+</sup> 可激活巨噬细胞发挥抗氧化作用。因此, Mn<sup>2+</sup> 在激活巨噬细胞后引发的免疫应答的分子机制有待于进一步深入研究。

巨噬细胞在吞噬细菌的过程中, 首先识别细菌表面分子, 进而引起细胞骨架重塑, 在受体的帮助下形成吞噬杯, 最后将细菌完全吞噬<sup>[14-15]</sup>。在 qPCR 筛选的 10 个差异表达基因中, *Fcgr1* 和 *Arc* 可能参与巨噬细胞吞噬细菌的过程。*Fcgr1* 可以特异性识别 IgG, 主要在巨噬细胞、树突状细胞、单核细胞和嗜酸性粒细胞中表达, 其表达受细胞因子的调节, 当菌体侵入机体后细胞因子会诱导中性粒细胞中 *Fcgr1* 的表达, 促进中性粒细胞的吞噬作用<sup>[16-17]</sup>。本研究中 mRNA-seq 测序分析和 qPCR 检测结果均显示小鼠腹腔巨噬细胞受到 Mn<sup>2+</sup> 刺激后 *Fcgr1* 表达上调, 表明 *Fcgr1* 可能参与了巨噬细胞的吞噬过程。*Arc* 为神经元突触后致密物质的细胞骨架相关性蛋白, 能够调节细胞骨架活性, 进而促进细胞的增殖和分化<sup>[18-19]</sup>。本研究中小鼠腹腔巨噬细胞受到 Mn<sup>2+</sup> 刺激后 *Arc* 基因表达上调, 原因可能在于 Mn<sup>2+</sup> 刺激触发了巨噬细胞对细菌表面分子的识别, 引起细胞骨架重塑, 最终使巨噬细胞吞噬能力增强。*Atoh8* 是 bHLH 家族的一种转录因子, 与许多肿瘤的发生有关, *Atoh8* 敲低可抑制结肠癌细胞的增殖<sup>[20]</sup>。*Spr2B* 为角质形成细胞中交联包膜蛋白的成员<sup>[21]</sup>, Yao 等<sup>[22]</sup> 报道 *Spr2B* 在胃腺癌中高表达, 并且是预后不良的独立预测因子。本研究中 Mn<sup>2+</sup> 刺激巨噬细胞后, *Atoh8* 和 *Spr2B* 基因表达下调, 提示 Mn<sup>2+</sup> 可能通过调控 *Atoh8* 与 *Spr2B* 基因的表达来调控机体免疫反应。

本研究对筛选出的 Mn<sup>2+</sup> 刺激的小鼠巨噬细胞差异表达基因进行了功能分析, 结果显示这些差异

表达基因主要参与免疫吞噬、细胞增殖和分化、转录因子调控等生物活性, 其主要介导 PI3K-Akt 和 NF-κB 等信号通路活化, 这提示 Mn<sup>2+</sup> 激活的巨噬细胞可能通过这些信号通路调控机体免疫应答。NF-κB 是参与调节多种生物反应和免疫基因表达的转录调节因子, 当细胞被外界刺激物激活后便与 NF-κB 抑制因子 (inhibitor of NF-κB, IκB) 解离, 从而转移至核内与特异性启动子相结合, 进而调控基因的表达<sup>[23-24]</sup>。PI3K-Akt-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路在免疫应答中起着至关重要的作用。临床前数据表明, PI3K-Akt-mTOR 通路的改变可能促进免疫抑制反应<sup>[25]</sup>。PI3K-Akt 通路参与代谢转变, 将效应 CD8<sup>+</sup> T 细胞转化为记忆 T 细胞<sup>[26]</sup>, 并调节肿瘤相关巨噬细胞在免疫刺激和免疫抑制之间的转换。

综上所述, 本研究利用 mRNA-seq 技术分析了 Mn<sup>2+</sup> 调控小鼠巨噬细胞的 mRNA 水平, 并获得了与免疫相关的差异表达基因, 表明 Mn<sup>2+</sup> 对巨噬细胞具有免疫调节作用, 为揭示 Mn<sup>2+</sup> 调控巨噬细胞的功能提供了理论依据, 也为后续研究 Mn<sup>2+</sup> 在机体免疫中的作用机制奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] LV M, CHEN M, ZHANG R, ZHANG W, WANG C, ZHANG Y, et al. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy[J]. *Cell Res*, 2020, 30: 966-979.
- [2] GUPTA U C, GUPTA S C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review[J]. *Pedosphere*, 2014, 24: 13-38.
- [3] ASCHNER M, ERIKSON K. Manganese[J]. *Adv Nutr*, 2017, 8: 520-521.
- [4] 黄鑫, 李玲玲, 王君豪, 闵军霞, 王福梯. 锰离子转运蛋白的发现及功能机制研究进展[J]. *生命科学*, 2018, 30: 603-614.
- [5] SMIALOWICZ R J, ROGERS R R, RIDDLE M M, ROWE D G, LUEBKE R W. *In vitro* augmentation of natural killer cell activity by manganese chloride[J]. *J Toxicol Environ Health*, 1986, 19: 243-254.
- [6] 卫潇茗, 王晨光, 张睿, 蒋争凡. 锰离子作为免疫调节剂的发现及应用展望[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42: 1721-1731.
- [7] YANG Q Y, GUO N N, ZHOU Y, CHEN J J, WEI Q C, HAN M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted

- therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 2156-2170.
- [8] MORIGUCHI R, OTAKI Y, HAZEKI S, SHIMADA T, MATSUMOTO A, KAKITA N, et al. High levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  downregulate antimicrobial iron transport protein, Nramp1, in chronic hemodialysis patients: a key factor for infection risk[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 35: 372-378.
- [9] WEDLER F C. Biological significance of manganese in mammalian systems[J]. *Prog Med Chem*, 1993, 30: 89-133.
- [10] WANG C G, GUAN Y K, LV M Z, ZHANG R, GUO Z Y, WEI X M, et al. Manganese increases the sensitivity of the cGAS-STING pathway for double-stranded DNA and is required for the host defense against DNA viruses[J]. *Immunity*, 2018, 48: 675-687.
- [11] WENTE S R, VILLALBA M, SCHRAMM V L, ROSEN O M.  $Mn^{2+}$ -binding properties of a recombinant protein-tyrosine kinase derived from the human insulin receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2805-2809.
- [12] MOKGOBU M I, ANDERSON R, STEEL H C, CHOLO M C, TINTINGER G R, THERON A J. Manganese promotes increased formation of hydrogen peroxide by activated human macrophages and neutrophils *in vitro*[J]. *Inhal Toxicol*, 2012, 24: 634-644.
- [13] DAEJIN K, GA B P, DAE Y H. Apoptotic signaling through reactive oxygen species in cancer cells[J]. *World J Immunol*, 2014, 4: 158-173.
- [14] 赵文心, 马岚, 杨雪婷, 李晶莹, 杜书嵩, 张雪薇, 等. 肌动蛋白亚型在巨噬细胞吞噬脑膜炎大肠杆菌中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42: 620-628.
- [15] ROUGERIE P, MISKOLCI V, COX D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton[J]. *Immunol Rev*, 2013, 256: 222-239.
- [16] SCOTT C L, T'JONCK W, MARTENS L, TODOROV H, SICHEN D, SOEN B, et al. The transcription factor ZEB2 is required to maintain the tissue-specific identities of macrophages[J]. *Immunity*, 2018, 49: 312-325.
- [17] BI R, KONG L L, XU M, LI G D, ZHANG D F, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, et al. The *Arc* gene confers genetic susceptibility to Alzheimer's disease in Han Chinese[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 1217-1226.
- [18] OKUNO H. [Synapse-to-nucleus signaling and activity-dependent gene expression in neurons: mechanisms of synaptic activity-dependent regulation of the *Arc/Arg3.1* gene][J]. *Seikagaku*, 2010, 82: 841-846.
- [19] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Ann Rev Immunol*, 2018, 36: 489-517.
- [20] YE M S, HE Y, LIN H, YANG S X, ZHOU Y H, ZHOU L L, et al. High expression of atonal homolog 8 predicts a poor clinical outcome in patients with colorectal cancer and contributes to tumor progression[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37: 2955-2963.
- [21] CARREGARO F, STEFANINI A C, HENRIQUE T, TAJARA E H. Study of small proline-rich proteins (SPRRs) in health and disease: a review of the literature[J]. *Arch Dermatol Res*, 2013, 305: 857-866.
- [22] YAO L, YAN J H, CHENG F, GAN L H, HUANG Y Q, ZHENG L, et al. Small proline-rich protein 2B facilitates gastric adenocarcinoma proliferation via MDM2-p53/p21 signaling pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 1453-1463.
- [23] DOLCET X, LLOBET D, PALLARES J, MATIAS-GUIU X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer[J]. *Virchows Arch*, 2005, 446: 475-482.
- [24] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407: 153-189.
- [25] GIANNONE G, GHISONI E, GENTA S, SCOTTO G, TUNINETTI V, TURINETTO M, et al. Immunometabolism and microenvironment in cancer: key players for immunotherapy[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4414. DOI: 10.3390/ijms21124414.
- [26] SHI X, ZHU W, CHEN T, CUI W, LI X, XU S. Paraquat induces apoptosis, programmed necrosis, and immune dysfunction in CIK cells via the PTEN/PI3K/AKT axis[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2022, 130: 309-316.

[本文编辑] 尹 茶