

本文引用: 杨皓天, 李朝荃, 李 婧, 等. S1P/S1PR1 通过上调 TAM 受体和吞噬相关蛋白表达增强巨噬细胞胞葬作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2026, 34(7): 621-632. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.07.004.

[文章编号] 1007-3949(2026)34-07-0621-12

· 实验研究 ·

S1P/S1PR1 通过上调 TAM 受体和吞噬相关蛋白表达 增强巨噬细胞胞葬作用

杨皓天¹, 李朝荃¹, 李 婧³, 付傲妮¹, 刘婉婷², 雷 偲¹, 谢玉鑫^{1,2}, 易光辉^{1,2,3}

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地,
2. 南华大学药学院药理学教研室, 3. 南华大学基础医学院, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探究 1-磷酸鞘氨醇(S1P)是否通过其受体 S1PR1 促进 LC3 相关吞噬作用,进而增强 THP-1 源性巨噬细胞的胞葬作用。**[方法]** 以 80 $\mu\text{g/L}$ 佛波酯诱导 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞;采用 254 nm 紫外线照射 Jurkat 细胞,诱导其发生早期凋亡,以用于细胞吞噬实验。巨噬细胞分别经 0、0.5、1.0 和 1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理 12 h;或以 1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理,并单独或联合使用 S1PR1 拮抗剂 W146、S1PR2 拮抗剂 JTE-013、S1PR3 拮抗剂 CAY10444 及 ATG4B 抑制剂 NSC185058 进行干预。采用 Western blot 检测 MerTK、Axl、Tyro3、LC3B 及 LAMP1 的表达水平;通过荧光标记凋亡细胞开展吞噬实验以评估吞噬效率;利用 ELISA 测定细胞上清液中促炎因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)与抗炎因子(TGF- β 、IL-4 和 IL-10)的水平。**[结果]** S1P 可显著增强巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬能力,且该作用呈浓度依赖性。具体表现为:巨噬细胞吞噬凋亡细胞的效率显著提升($P<0.01$);胞葬受体 MerTK、Axl、Tyro3 的表达显著上调($P<0.01$);同时,抗炎因子(TGF- β 、IL-4 和 IL-10)水平显著增加($P<0.01$),促炎因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)水平显著降低($P<0.01$)。S1P 阻断实验结果显示,使用 W146 阻断 S1PR1 可逆转 S1P 的促胞葬作用($P<0.05$),而阻断 S1PR2 或 S1PR3 则无明显效果。S1P 处理能显著提高巨噬细胞内 LC3B 和 LAMP1 的基因及蛋白表达水平($P<0.01$),并促进吞噬溶酶体成熟。使用 NSC185058 后,巨噬细胞的吞噬效率及抗炎因子分泌均随之下降($P<0.05$)。此外,同时阻断 S1PR1 与 LC3 相关吞噬对胞葬作用的抑制效果更为显著($P<0.01$)。**[结论]** S1P 通过 S1PR1 介导的 LC3 相关吞噬作用,显著增强 THP-1 源性巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬清除能力,并促进巨噬细胞向抗炎表型转化。

[关键词] 1-磷酸鞘氨醇; 1-磷酸鞘氨醇受体 1; TAM 受体; 胞葬作用; 巨噬细胞; 吞噬相关蛋白

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

S1P/S1PR1 enhances macrophage efferocytosis by upregulating the expression of TAM receptors and phagocytosis-related proteins

Yang Haotian¹, Li Chaoquan¹, Li Jing³, Fu Aoni¹, Liu Wanting², Lei Cai¹, Xie Yuxin^{1,2}, Yi Guanghui^{1,2,3}

1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, 2. Institute of Pharmacy and Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, University of South China, 3. School of Basic Medical Sciences, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether sphingosine-1-phosphate (S1P) promotes LC3-associated phagocytosis via its receptor S1PR1, thereby enhancing the efferocytosis of THP-1-derived macrophages. **Methods** THP-1 monocytes were induced to differentiate into macrophages using 80 $\mu\text{g/L}$ phorbol ester; 254 nm ultraviolet radiation was used to induce early apoptosis in Jurkat cells for cell phagocytosis experiments. Macrophages were treated with 0, 0.5, 1.0 and 1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P for 12 h, or treated with 1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P alone or in combination with S1PR1 antagonist W146, S1PR2

[收稿日期] 2025-12-26

[修回日期] 2026-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770490);湖南省科技计划项目(2020JJ4535)

[作者简介] 杨皓天,硕士研究生,主要从事动脉粥样硬化与心肌缺血损伤的病因发病学及防治研究, E-mail:993014794@qq.com。通信作者易光辉,博士,教授,博士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化与心肌缺血损伤的病因发病学及防治研究, E-mail:1984001973@usc.edu.cn。

antagonist JTE-013, S1PR3 antagonist CAY10444 and ATG4B inhibitor NSC185058. Western blot was used to detect the expression levels of MerTK, Axl, Tyro3, LC3B and LAMP1, fluorescence-labeled apoptotic cells were applied in phagocytosis assays to evaluate phagocytic efficiency, ELISA was employed to measure the levels of pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) and anti-inflammatory factors (TGF- β , IL-4 and IL-10) in the supernatant. **Results** S1P could significantly enhance the phagocytic capacity of macrophages for apoptotic cells, and this effect was concentration-dependent. Specifically, the phagocytic efficiency of macrophages for apoptotic cells was significantly improved ($P < 0.01$); the expression of cell burial receptors MerTK, Axl and Tyro3 was markedly upregulated ($P < 0.01$); at the same time, levels of anti-inflammatory factors (TGF- β , IL-4 and IL-10) increased ($P < 0.01$), while pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) decreased ($P < 0.01$). The results of the S1P blockade experiment showed that blocking S1PR1 with W146 could reverse the efferocytosis of S1P ($P < 0.05$), while blocking S1PR2 or S1PR3 had no significant effect. S1P treatment significantly increased the gene and protein expression levels of LC3B and LAMP1 in macrophages ($P < 0.01$) and promoted lysosome maturation. After NSC185058 treatment, the phagocytic efficiency and anti-inflammatory factor secretion of macrophages decreased ($P < 0.05$). In addition, the inhibitory effect of blocking S1PR1 and LC3-related phagocytosis on efferocytosis was more significant ($P < 0.01$). **Conclusion** S1P significantly enhances the phagocytic clearance ability of THP-1-derived macrophages towards apoptotic cells through S1PR1-mediated LC3-related phagocytosis, and promotes the transformation of macrophages into anti-inflammatory phenotypes.

[**KEY WORDS**] sphingosine-1-phosphate; sphingosine-1-phosphate receptor 1; TAM receptor; efferocytosis; macrophage; phagocytosis-related protein

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种以慢性炎症为特征的病变,脂质沉积与炎症反应共同推动病变进展^[1]。巨噬细胞在As发生发展过程中起核心作用,它不仅能吞噬氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)形成泡沫细胞,还可通过清除凋亡细胞维持动脉内环境稳态^[2]。然而,胞葬作用受损会导致凋亡细胞堆积,进一步加剧炎症反应,最终促使不稳定性斑块形成与破裂,从而增加心血管事件风险^[3]。

胞葬作用是巨噬细胞、树突状细胞等吞噬细胞清除凋亡细胞的过程,涉及募集、识别、吞噬和消化四个阶段^[4]。胞葬作用清除效率高度依赖于TAM受体(MerTK、Axl、Tyro3)、清道夫受体及整合素等特定受体,这些受体通过桥接分子Gas6与凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)结合,实现对凋亡细胞的靶向识别并启动吞噬信号^[5]。在吞噬阶段,PS受体激活后会活化Rac1等Rho家族GTP酶,驱动细胞骨架重排与伪足延伸,进而包裹并内化凋亡细胞^[6]。进入消化阶段后,吞噬体在Rab GTP酶的调控下与溶酶体融合形成吞噬溶酶体,最终通过溶酶体酶降解凋亡细胞^[7]。

LC3相关吞噬(LC3-related phagocytosis, LAP)作用是一种特殊的吞噬途径,在凋亡细胞清除过程中发挥着独特作用。其中的关键调控因子不仅包括LC3B,还涉及溶酶体相关膜蛋白1(lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP1)^[8]。LAMP1主要定位于溶酶体膜,是溶酶体的常用标志蛋白,不

仅参与自噬体与溶酶体的融合过程,还介导细胞内成分的降解。LC3B和LAMP1在调控吞噬体与溶酶体融合、维持细胞内环境稳定等方面均发挥着重要作用^[9]。在LAP过程中,LC3B首先被ATG4B酶剪切成LC3B-I;随后,在ATG7和ATG3的作用下,LC3B-I与磷脂酰乙醇胺结合形成LC3B-II,进而锚定在吞噬体膜上,最终促进病原体或凋亡细胞的降解^[10]。NSC185058作为ATG4B抑制剂,可减少LC3B-II在吞噬体上的募集,进而阻断LAP过程的膜修饰及吞噬物降解,最终导致LAP作用受阻^[11]。

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是一种调节血管稳态、免疫细胞迁移及炎症反应的生物活性脂质^[12],其受体S1PR1在淋巴循环及As进展中具有重要作用。研究表明,激活S1P/S1PR1信号可促进巨噬细胞内吞噬体与溶酶体的共定位,提示其可能增强巨噬细胞的物质消化能力^[13]。此外, S1PR2与S1PR3也表达于血管内皮细胞和巨噬细胞,参与调控炎症反应与血管通透性^[14]。在As进程中,通过胞葬作用有效清除凋亡细胞对维持斑块稳定至关重要;若该过程出现障碍,将导致凋亡细胞堆积并加剧炎症反应^[15]。尽管已有研究证实巨噬细胞过表达S1PR1可增强胞葬作用并延缓As进展^[16],但其是否通过LAP介导这一过程仍不明确。目前, S1P/S1PR轴在LAP介导的胞葬过程中的作用机制仍不明确^[17]。因此,本研究旨在探讨S1P是否通过S1PR1上调TAM受体表达水平以激活LAP,进而增强巨噬细胞的胞葬作用并抑制炎症反应,为

炎症性疾病的防治提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人 THP-1 细胞(iCell h213)购自上海赛百康,人 Jurkat 细胞(CL-0129)购自武汉普诺赛。

1.2 细胞培养

将冻存细胞转移至离心管,并向离心管中加入 5 倍于冻存细胞液体积的 1640 培养基(10% BSA、1% 双抗),轻轻混匀,以 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 1640 培养基重悬细胞。将重悬后的细胞转移至 T25 或 T75 细胞培养瓶,在培养瓶上标记细胞种类及复苏时间,随后放入 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

根据实验的需求,选择不同细胞密度进行种板。在显微镜下观察细胞状态及细胞密度。用移液枪将细胞转移至离心管,以 1 000 r/min 离心 3 min。弃培养基,加入新鲜 1640 培养基。取 20 μL 细胞悬液滴加到细胞计数板中,根据检测的细胞密度,配置好所需细胞密度的细胞液,然后以 80 μg/L 佛波酯诱导 THP-1 细胞 24 h,使其分化为巨噬细胞。

1.3 Jurkat 细胞凋亡模型制备

取出 Jurkat 细胞悬液,以 1 000 r/min 离心 5 min 后重悬;通过细胞计数仪计数,计算并配制浓度为 1.0×10⁶/mL 的细胞悬液。将细胞置于距紫外灯 15 cm 处,经 254 nm 紫外线照射以诱导凋亡;照射结束后加入 10% BSA,放入培养箱孵育 2 h。

1.4 实验处理及分组

以 80 μg/L 佛波酯诱导 THP-1 细胞分化为巨噬细胞;254 nm 紫外线照射 Jurkat 细胞制备早期凋亡细胞用于吞噬实验。将巨噬细胞分别给予 0、0.5、1.0 及 1.5 μmol/L S1P 处理 12 h 后检测吞噬与炎症指标。在受体阻断实验中,分别用 5 μmol/L S1PR1 拮抗剂 W146、1 μmol/L S1PR2 拮抗剂 JTE-013、1 μmol/L S1PR3 拮抗剂 CAY0444 联合 1.5 μmol/L S1P 处理细胞。在 LAP 阻断实验中,分别用 1.5 μmol/L S1P、5 μmol/L W146 和 10 μmol/L ATG4B 抑制剂 NSC185058 单独或联合处理细胞。

1.5 Western blot

将各组细胞经相应处理后,采用 BCA 试剂盒(北京康为)测定蛋白质浓度。配制所需浓度的 SDS-PAGE 分离胶后进行实验,随后开展 Western blot 分析。

提前配制 TBST 溶液与 5% 封闭液。转膜完成

后,将膜置于室温摇床孵育 4 h。根据抗体说明书,用 TBST 稀释一抗,分别为 GAPDH(1 : 4 000)、MerTK(1 : 2 000)、Axl(1 : 1 000)、Tyro3(1 : 5 000)、LAMP1(1 : 1 000)、LC3B(1 : 1 000)。封闭结束后,用 TBST 洗涤膜,于 4 ℃ 摇床孵育过夜。次日回收一抗,再次洗膜;将膜放入含二抗稀释液的抗体孵育盒中,室温摇床孵育 4 h。最后将膜置于自动化发光图像分析系统检测蛋白条带,曝光并保存显影记录。

1.6 RT-qPCR

使用 StedyPure 快速 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,分装后于-80 ℃ 保存。使用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒获取 cDNA,反转录反应条件:37 ℃,15 min;85 ℃,5 s;4 ℃,维持。随后用 SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒进行 qPCR 反应。以 GAPDH 为内参,利用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的相对表达量。各基因的引物序列见表 1。

表 1. 基因引物序列
Table 1. Gene primer sequences

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F:GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	R:TGGTGAAGACGCCAGTGGA
LC3B	F:CGAGAGCAGCATCCAACCAA
	R:GTTCCACCAACAGGAAGAAGGC
LAMP1	F:TGTGATCCCGGCAGACAGAA
	R:CCAAACCACACATCTCGAAGC

1.7 荧光细胞吞噬实验

将巨噬细胞以 2×10⁵/mL 的密度接种于 48 孔板中培养并进行处理,随后加入 PKH26,避光孵育 30 min。凋亡细胞经 1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清,用 PBS 重悬,同时加入 5 μmol/L CFSE 避光孵育 20 min;之后用新鲜培养基重悬并静置孵育 10 min,再以 1 000 r/min 离心 5 min。将 CFSE 标记的凋亡细胞与 PKH26 标记的巨噬细胞以 5 : 1 的比例共孵育 2 h。孵育结束后,弃去培养基,加入 PBS,在摇床上摇晃清洗 5 min,重复 3 次。加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,用 PBS 清洗。每孔加入 100 μL PBS,在荧光显微镜下观察,保存的图像用 Image 软件分析。巨噬细胞吞噬效率(%)= PKH26⁺CFSE⁺/PKH26⁺×100%。

1.8 流式细胞术

按 1×10⁶/孔比例配制细胞悬液,加入佛波酯诱

导分化。在细胞培养箱(37 ℃,5% CO₂)培养 24 h。各组经不同处理后,用 PBS 清洗 3 次。加入配好的 Cell Tracker TM Deep Red,在培养箱中孵育 30 min。用 PBS 清洗 3 次。以 5:1 的比例加入用 CFSE 标记的凋亡细胞,孵育 2 h。弃培养液,用 PBS 清洗 3 次。加入 37 ℃ 预热胰蛋白酶,并轻轻吹打细胞。将消化的巨噬细胞以 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入 PBS 重悬,立即用流式细胞仪检测。

1.9 ELISA

使用 ELISA 检测试剂盒,根据制造商说明书测量。完成处理后,用洗涤液清洗 5 次后,每孔加入 90 μL TMB 底物,盖上封板膜于 37 ℃ 避光孵育 15 min。取出酶标板,每孔加入终止液 50 μL,立即在 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值。

1.10 统计学分析

实验结果均来自 3 次独立实验,数据分别采用 Image J 和 FlowJo 软件进行分析,统计分析则通过 GraphPad Prism 10.1.2 软件完成。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;所有数据分析前均进行了正态性检验和方差齐性检验,组间两两

比较采用 Tukey 法。以双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 S1P 增强巨噬细胞胞葬作用

2.1.1 凋亡细胞 为在体外模拟巨噬细胞胞葬作用,本研究选用 Jurkat 细胞,通过 254 nm 紫外线照射制备凋亡细胞模型。为确定最佳照射时间,实验设置 5 min、15 min 和 25 min 三个时间点,采用 Annexin V-FITC/PI 双染联合流式细胞术检测细胞凋亡与坏死情况。结果显示,254 nm 紫外线照射 5 min、15 min 和 25 min 时,Jurkat 细胞的凋亡率分别为 85.00%、80.50% 和 30.80%,坏死率分别为 2.92%、11.40% 和 64.50% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中,5 min 处理组的凋亡率处于较高且坏死率较低,表明该照射时长主要诱导细胞发生早期凋亡,细胞状态良好(图 1)。因此,后续实验均采用紫外线照射 5 min 获取凋亡细胞用于巨噬细胞胞葬实验。

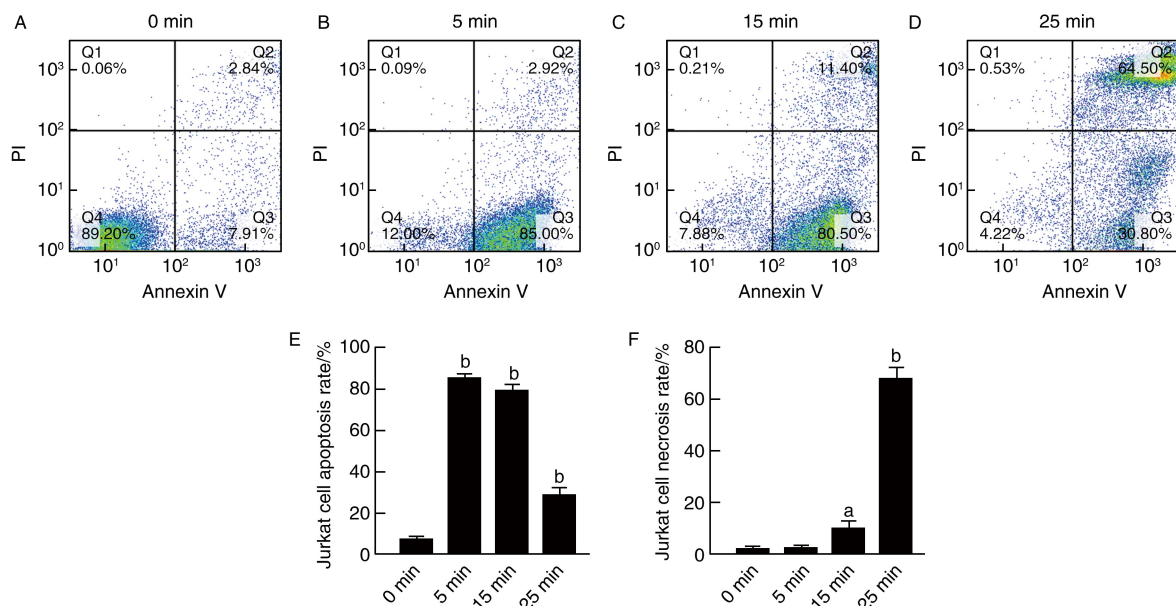


图 1. 254 nm 紫外线照射 Jurkat 细胞后的凋亡率与坏死率

A: 紫外线照射 0 min; B-D: 254 nm 紫外线照射 5 min、15 min、25 min; E: 细胞凋亡率量化统计图; F: 细胞坏死率量化统计图。n=3。

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 0 min 比较。

Figure 1. Apoptosis and necrosis rates of Jurkat cells after 254 nm ultraviolet irradiation

2.1.2 S1P 对巨噬细胞吞噬凋亡细胞的影响

为探究 S1P 对巨噬细胞吞噬凋亡细胞的影响,实验将 0.5、1.0、1.5 μmol/L S1P 分别处理巨噬细胞

12 h,随后用 PKH26 染色巨噬细胞,同时用 CFSE 染色经 254 nm 紫外线诱导凋亡的 Jurkat 细胞。二者共孵育 2 h 后,去除未结合的游离凋亡细胞,通过荧

光显微镜观察结果。结果显示,与对照组相比,0.5、1.0 和 1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理后巨噬细胞的吞噬效率分别提升 10%、18% 和 33% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),

表明 S1P 可呈浓度依赖性地增强巨噬细胞的吞噬效率(图 2)。

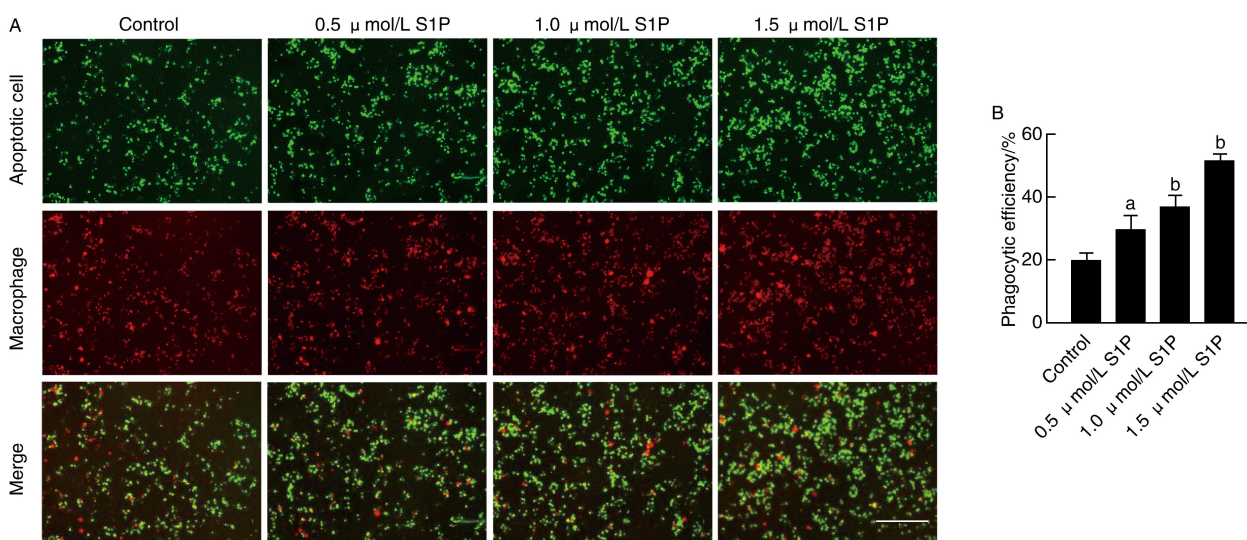


图 2. 不同浓度 S1P 对巨噬细胞吞噬效率的影响

A:不同浓度 S1P 处理后巨噬细胞吞噬凋亡细胞的荧光图,巨噬细胞经 PKH26 染色呈红色,凋亡细胞经 CFSE 染色呈绿色;
B:荧光图的定量分析结果。Bar=300 μm , $n=3$ 。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 2. The effect of different concentrations of S1P on macrophage phagocytic efficiency

2.1.3 S1P 对 TAM 受体蛋白表达的影响 巨噬细胞识别受体的表达缺失会降低其胞葬作用,而高表达则可增强该作用^[18]。因此,本研究通过检测胞葬受体 MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平,以评估胞葬作用的强弱。实验分别采用 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理巨噬细胞 12 h,采用 Western

blot 检测 MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平。结果显示,与对照组相比,1.0 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理后 MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平增加 1.2 ~ 1.5 倍,1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理后上述蛋白表达水平增加 2.6 ~ 3.0 倍($P<0.01$),而 0.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理后仅 MerTK 蛋白表达水平显著增加($P<0.05$;图 3)。

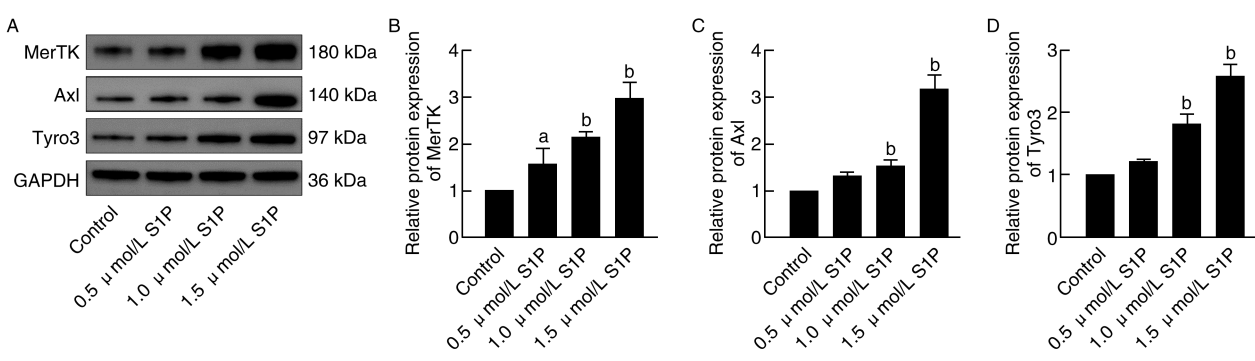


图 3. 不同浓度 S1P 处理后巨噬细胞中 MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平

A:各组巨噬细胞中 MerTK、Axl 及 Tyro3 蛋白表达水平;B-D:蛋白表达水平的定量分析结果。 $n=3$ 。
a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$,与对照组比较。

Figure 3. Protein expression levels of MerTK, Axl and Tyro3 in macrophages treated with different concentrations of S1P

2.1.4 S1P 对炎症因子水平的影响 当胞葬有效进行时,巨噬细胞会释放抗炎因子 TGF- β 、IL-4 和

IL-10,以此抑制炎症反应、促进组织修复并维持免疫稳态^[19];同时,促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的

水平降低,可防止炎症扩散^[20]。然而,若胞葬作用受损或凋亡细胞未能及时清除,未被清除的凋亡细胞会释放损伤相关分子,导致促炎因子大量释放,进而加剧炎症反应与组织损伤^[21]。本研究采用 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理巨噬细胞后,检测了

其分泌的炎症因子水平。结果显示,与对照组相比,S1P 处理后抗炎因子 TGF- β 、IL-4 和 IL-10 的分泌水平显著升高,促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的分泌水平显著降低 ($P<0.05$ 或 ($P<0.01$)。其中,1.5 $\mu\text{mol/L}$ S1P 处理后的效果最为明显(图 4)。

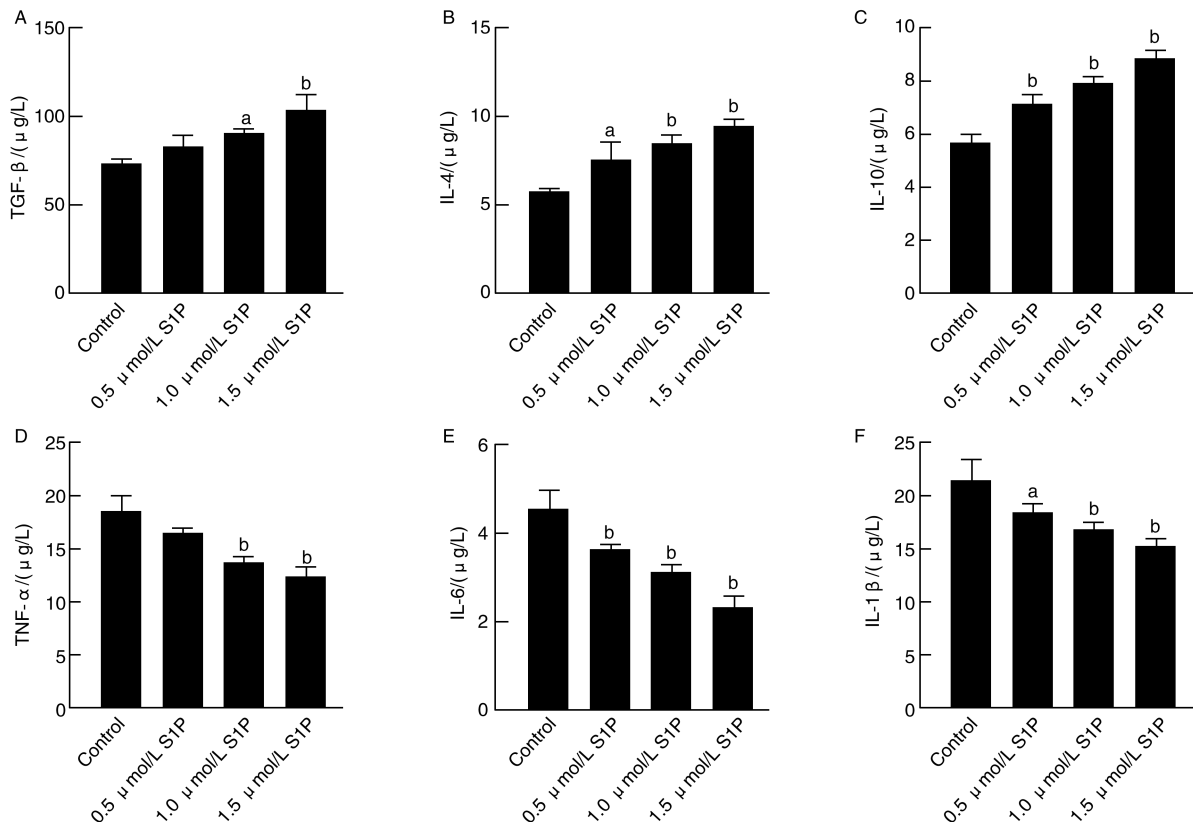


图 4. 不同浓度 S1P 对巨噬细胞炎症因子水平的影响

A-F 分别为 ELISA 检测巨噬细胞中抗炎因子 TGF- β 、IL-4、IL-10 及促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平。n=3。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 4. The effect of different concentrations of S1P on the levels of inflammatory factors in macrophages

2.2 S1P 通过 S1PR1 促进巨噬细胞胞葬作用

2.2.1 阻断 S1PR1、S1PR2 及 S1PR3 对巨噬细胞吞噬效率的影响

将巨噬细胞和凋亡细胞分别用 PKH26 和 CFSE 染色后,置于细胞培养箱中共孵育 2 h;洗去未被吞噬的凋亡细胞后,在荧光显微镜下观察结果。结果显示,与对照组相比,S1P 组、S1P+JTE-013 组和 S1P+CAY10444 组巨噬细胞吞噬效率分别提升 30%、23% 和 24% ($P<0.01$);与 S1P 组相比,S1P+W146 组巨噬细胞吞噬效率降低 27% ($P<0.01$),而 S1P+JTE-013 组和 S1P+CAY10444 组巨噬细胞吞噬效率无显著差异 ($P>0.05$;图 5)。上述结果表明,S1P 可通过 S1PR1 增强巨噬细胞吞噬效率。

2.2.2 阻断 S1PR1、S1PR2 及 S1PR3 对 TAM 受体

蛋白表达的影响

为进一步明确 S1P 增强胞葬作用的受体依赖机制,采用 Western blot 检测各组巨噬细胞中 TAM 受体蛋白表达水平。结果显示,与对照组相比,S1P 组 MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平显著上调 ($P<0.01$);与 S1P 组相比,S1P+W146 组 MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平显著下调 ($P<0.01$),S1P+JTE-013 组和 S1P+CAY10444 组 MerTK、Axl 蛋白表达水平也显著下调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 JTE-013 和 CAY10444 对 S1P 上调 Tyro3 的作用无显著影响 ($P>0.05$;图 6)。以上结果表明,S1P 诱导的 TAM 受体蛋白上调主要由 S1PR1 介导,阻断 S1PR1 可显著抑制 S1P 对吞噬受体蛋白表达的促进作用。

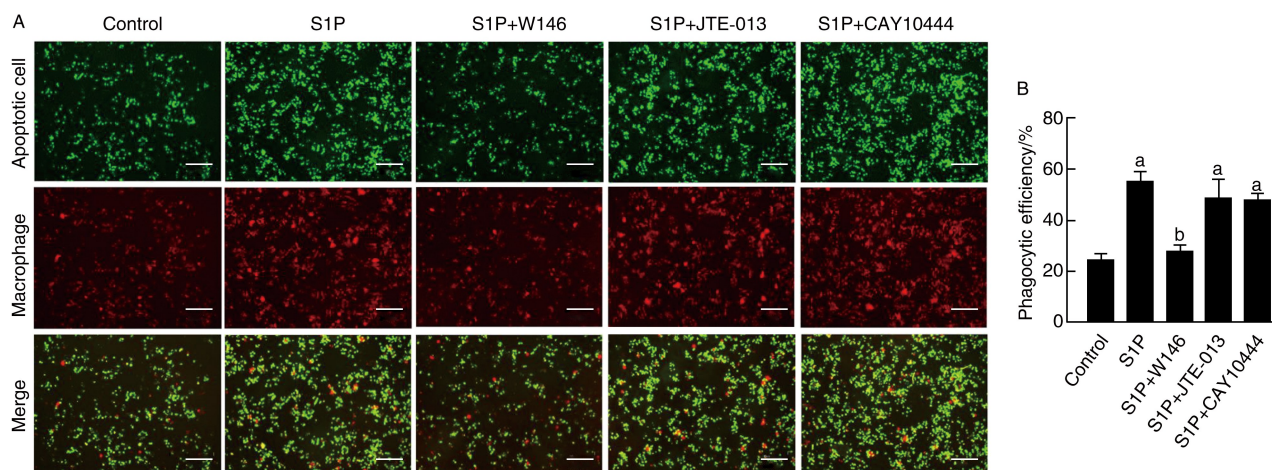


图 5. W146、JTE-013 及 CAY10444 处理对 S1P 增强的巨噬细胞吞噬效率的影响

A: W146、JTE-013 及 CAY10444 干预后巨噬细胞吞噬凋亡细胞的荧光图,巨噬细胞经 PKH26 染色呈红色,凋亡细胞经 CFSE 染色呈绿色;

B: 荧光图的定量分析结果。Bar=300 μm , $n=3$ 。a 为 $P<0.01$,与对照组比较;b 为 $P<0.01$,与 S1P 组比较。

Figure 5. The effect of W146, JTE-013 and CAY10444 treatments on S1P enhanced macrophage phagocytic efficiency

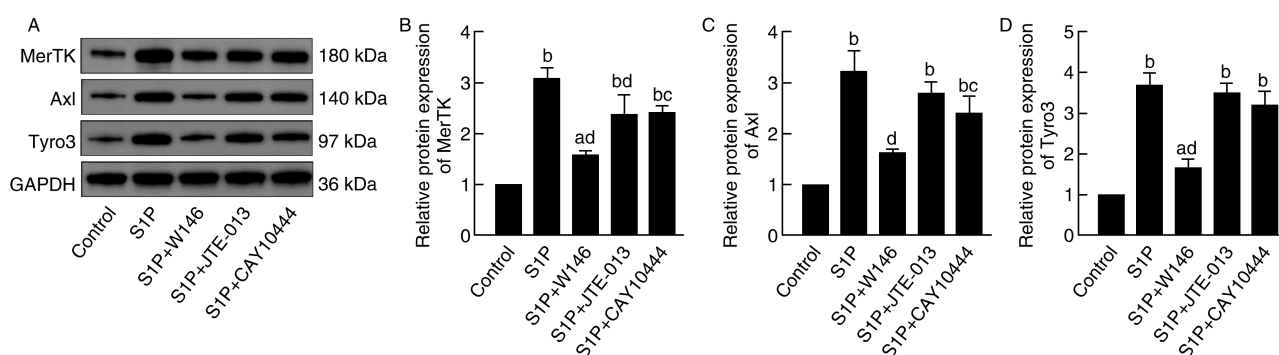


图 6. W146、JTE-013 及 CAY10444 处理后巨噬细胞中 TAM 受体蛋白表达水平

A: 各组巨噬细胞中 MerTK、Axl、Tyro3 蛋白表达水平;B-D: 蛋白表达条带的定量分析结果。 $n=3$ 。

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较;c 为 $P<0.05$,d 为 $P<0.01$,与 S1P 组比较。

Figure 6. Protein expression levels of TAM receptors in macrophages after treatment with W146, JTE-013 and CAY10444

2.2.3 阻断 S1PR1、S1PR2 及 S1PR3 对巨噬细胞炎症因子水平的影响 ELISA 检测结果显示,与对照组相比,S1P 单独处理可显著上调抗炎因子 TGF- β 、IL-4 和 IL-10 的水平,同时显著下调促炎因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的水平(均 $P<0.01$),表明 S1P 可促进巨噬细胞向抗炎表型极化。与 S1P 组相比,S1P+W146 处理能显著逆转上述效应($P<0.05$ 或 $P<0.01$);S1P+JTE-013 处理后,巨噬细胞的炎症因子水平无显著差异($P>0.05$);而 S1P+CAY10444 处理后,抗炎因子 IL-4 水平显著降低,促炎因子 TNF- α 、IL-6 水平显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),抗炎因子 TGF- β 、IL-10 及促炎因子 IL-1 β 的水平则无显著差异($P>0.05$;图 7)。上述结果进一步证实,S1P 调控巨噬细胞促炎/抗炎因子分泌的作用主要

由 S1PR1 介导。

2.3 S1P/S1PR1 的促胞葬作用涉及 LAP 的参与

2.3.1 S1P/S1PR1 对 LC3B 和 LAMP1 表达的影响

S1P 处理使巨噬细胞 LC3B 和 LAMP1 的 mRNA 水平分别上调 48% 和 46% (均 $P<0.01$),而加入 W146 可逆转这一变化($P<0.05$)。Western blot 结果显示,S1P 处理后巨噬细胞 LC3B-II 蛋白表达水平升高 174%,LAMP1 蛋白表达水平升高 59% ($P<0.01$);加入 W146 后,S1P 诱导的 LC3B 和 LAMP1 表达上调程度被显著抑制($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图 8)。以上结果表明,S1P 通过 S1PR1 信号通路促进巨噬细胞中 LC3B-II 和 LAMP1 的表达,提示 LAP 过程被激活。

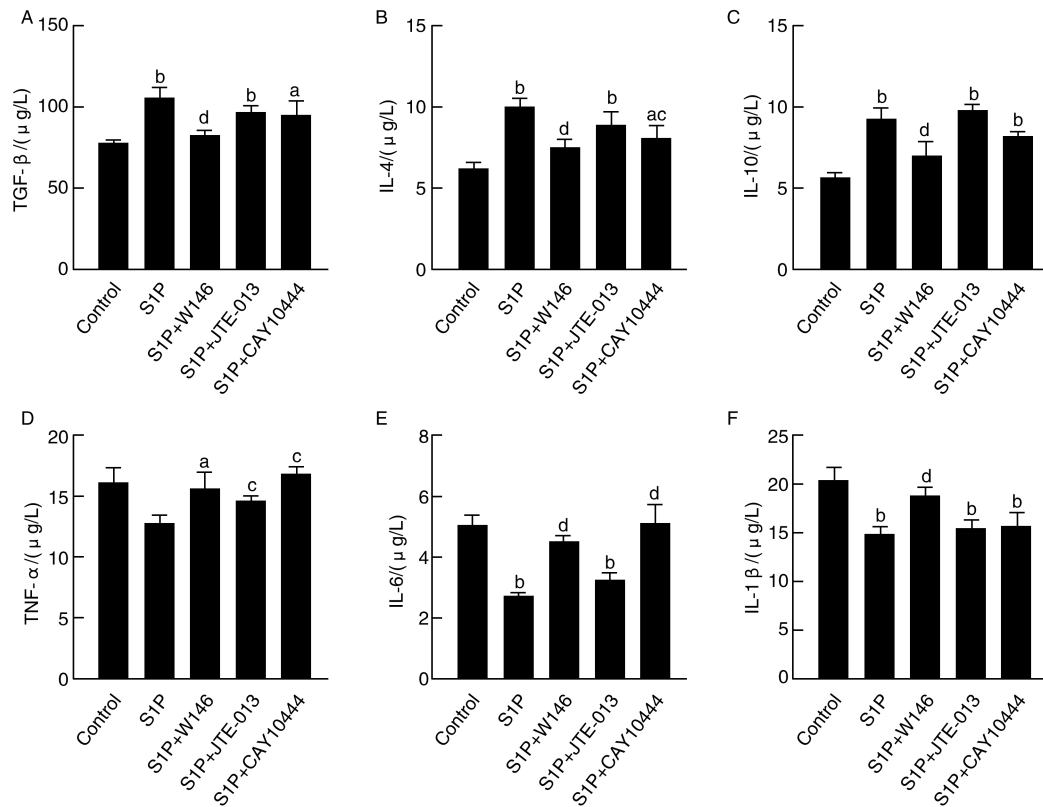


图 7. W146、JTE-013 及 CAY10444 处理后巨噬细胞炎症因子水平

A-F 分别为 ELISA 检测巨噬细胞中抗炎因子 TGF- β 、IL-4、IL-10 及促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平。n=3。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 S1P 组比较。

Figure 7. Levels of inflammatory factors in macrophages treated with W146, JTE-013 and CAY10444

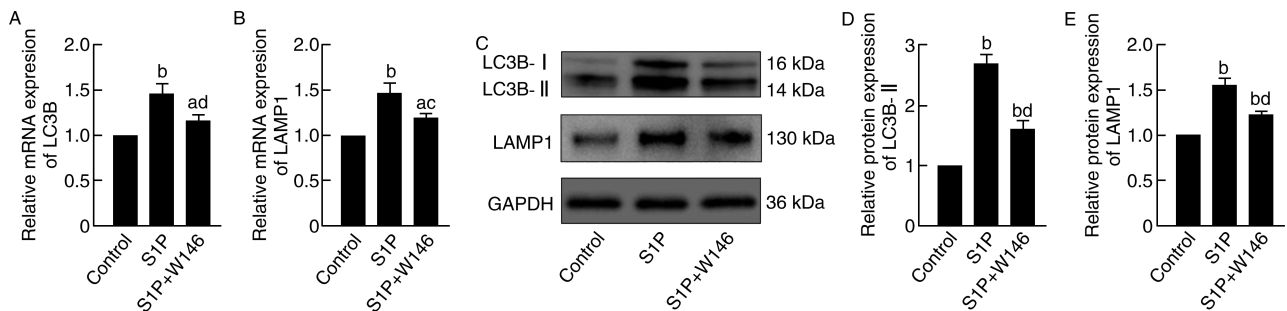


图 8. S1P 对巨噬细胞 LC3B 和 LAMP1 表达的影响

A-B: LC3B 与 LAMP1 的 mRNA 表达水平; C: LC3B-II 和 LAMP1 蛋白表达水平; D-E: 蛋白表达条带的定量分析结果。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 S1P 组比较。

Figure 8. The effect of S1P on the expressions of LC3B and LAMP1 in macrophages

2.3.2 NSC185058 可抑制 S1P 对巨噬细胞吞噬效率的提升作用 在明确 S1P 可促进 LAP 作用后, 进一步探究该途径在 S1P 增强胞葬作用中的功能意义。为此, 采用 LAP 抑制剂 NSC185058 与 S1PR1 抑制剂 W146 干预巨噬细胞, 以评估其吞噬效率。实验将巨噬细胞分为 5 组: 对照组、S1P 组、S1P+NSC185058 组、S1P+W146 组及 S1P+NSC185058+W146 组。结果显示, S1P 组巨噬细胞吞噬效率显著

高于对照组 ($P<0.01$); 使用 NSC185058 阻断 LAP 作用后, 吞噬效率较 S1P 组下降 13% ($P<0.05$); 使用 W146 阻断 S1PR1 后, 吞噬效率与对照组接近 ($P<0.01$); 而 W146 与 NSC185058 联合处理后吞噬效率进一步降低 ($P<0.01$; 图 9)。可见, 无论阻断 LAP 作用还是 S1PR1, 均可削弱 S1P 对巨噬细胞吞噬凋亡细胞的促进效率, 且两种途径联合抑制时吞噬效率下降更为明显。这表明 S1P 对巨噬细胞吞

噬效率的促进作用依赖于 LAP 途径的参与。

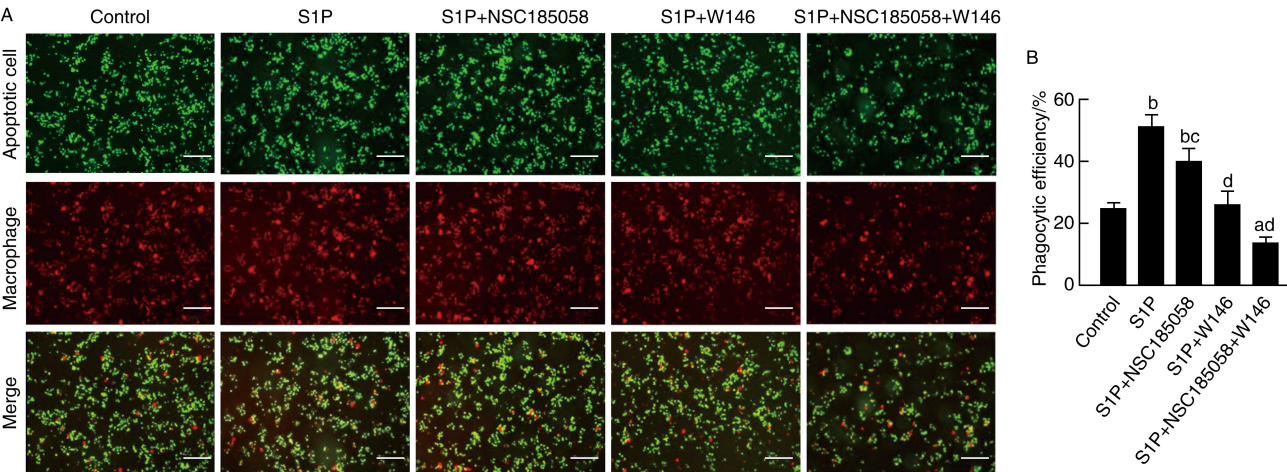


图 9. NSC185058 对 S1P 促进巨噬细胞吞噬效率的影响

A: NSC185058 与 W146 干预后巨噬细胞吞噬凋亡细胞的荧光图, 巨噬细胞经 PKH26 染色呈红色, 凋亡细胞经 CFSE 染色呈绿色;
B: 荧光图的定量分析结果。Bar=300 μm , $n=3$ 。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与 S1P 组比较。

Figure 9. The effect of NSC185058 on the efficiency of S1P-induced macrophage phagocytosis

2.3.3 NSC185058 可抑制 S1P 对 TAM 受体蛋白表达的上调作用 由于 TAM 受体的表达水平直接影响巨噬细胞对凋亡细胞的识别效率, 本研究进一步分析了抑制 LAP 作用对 S1P 诱导 TAM 受体上调的影响。Western blot 结果显示, 与对照组相比, S1P 处理可显著上调巨噬细胞中 MerTK、Axl 及 Tyro3 蛋白表达水平 (均 $P<0.01$); 与 S1P 组相比, 联合 W146 处理后, 上述受体蛋白表达水平降低 (均

$P<0.01$), 提示 S1P 对 TAM 受体表达的调节依赖于 S1PR1。而在 S1P 处理基础上加入 LAP 抑制剂 NSC185058 后, MerTK、Axl 和 Tyro3 蛋白表达水平分别降低 18%、31% 和 38% (均 $P<0.01$); 当 NSC185058 与 W146 联合处理时, 上述三种蛋白表达水平受到显著抑制, 不仅低于单独使用任一抑制剂的处理组, 甚至较对照组降低 27% 以上 (均 $P<0.01$; 图 10)。

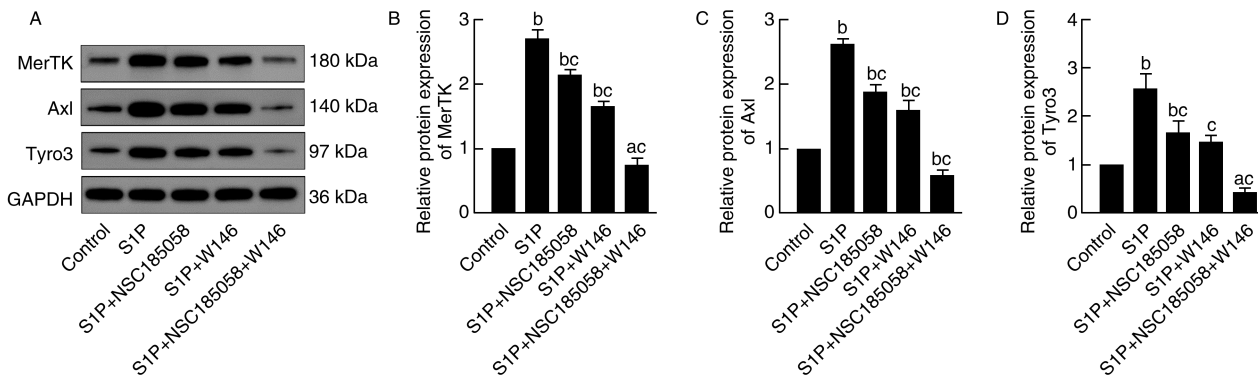


图 10. NSC185058 对 S1P 促进巨噬细胞 TAM 受体蛋白表达的影响

A: 巨噬细胞中 MerTK、Axl、Tyro3 蛋白表达水平; B-D: 蛋白表达条带的定量分析结果。n=3。
a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.01$, 与 S1P 组比较。

Figure 10. The effect of NSC185058 on S1P-induced expression of macrophage TAM receptor protein

2.3.4 NSC185058 对 S1P 调节巨噬细胞炎症因子水平的抑制作用 S1P 处理后, 巨噬细胞 TGF- β 、IL-4、IL-10 的分泌水平显著高于对照组 (均 $P<$

0.01), 而 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌水平则显著低于对照组 (均 $P<0.01$)。与 S1P 组相比, 加入 NSC185058 后, 炎症因子水平未发生显著变化 ($P>$

0.05);加入 W146 后,巨噬细胞 TGF- β 、IL-4、IL-10 的分泌水平分别降低 38%、29% 和 27%,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌水平分别增加 63%、29% 和 33%;联合加入 NSC185058 和 W146 后,TGF- β 、IL-4、IL-10 的

分泌水平分别降低 39%、35% 和 30%,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌水平分别增加 65%、31% 和 34% (均 $P<0.01$;图 11)。

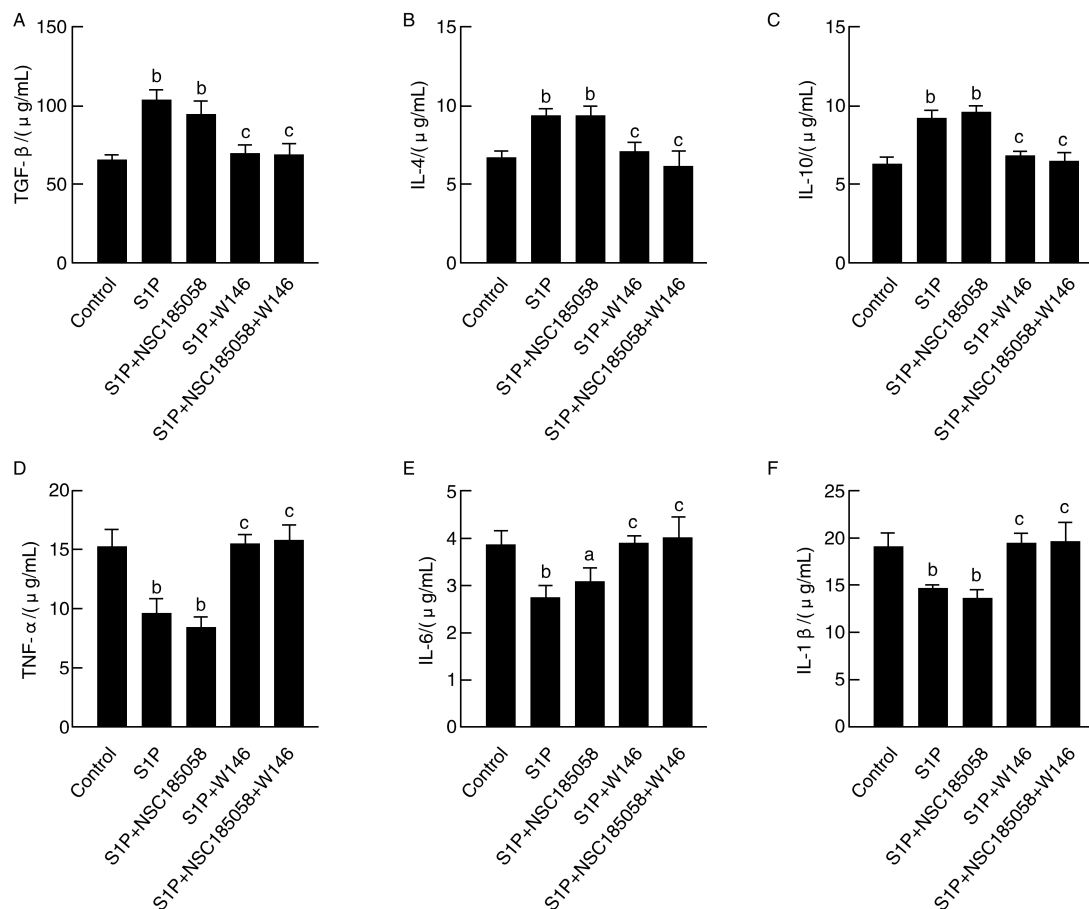


图 11. NSC185058 对 S1P 调控巨噬细胞炎症因子水平的影响

A-F 分别为 ELISA 检测巨噬细胞中抗炎因子 TGF- β 、IL-4、IL-10 及促炎因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平。 $n=3$ 。

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.01$, 与 S1P 组比较。

Figure 11. The effect of NSC185058 on S1P regulation of macrophage inflammatory factor levels

3 讨论

在 As 等慢性炎症性疾病的发生发展过程中,巨噬细胞对凋亡细胞的有效清除对于维持组织稳态至关重要。若凋亡细胞清除不足,会加剧炎症反应并形成坏死核心,进而促进 As 斑块的进展与不稳定^[22]。反之,增强巨噬细胞的胞葬作用则是抑制 As 的潜在策略。尽管泡沫细胞在 As 中会发生凋亡,但其凋亡过程受脂质代谢调控,机制较为复杂。因此,本研究采用紫外线诱导 Jurkat 细胞凋亡,并将其作为胞葬作用的靶细胞,以控制额外变量。本研究揭示,S1P 可通过其受体 S1PR1 激活自噬相关的

非经典通路 LAP,显著增强 THP-1 源性巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬能力,并诱导其向抗炎表型转化。进一步研究发现,S1P 正是通过促进巨噬细胞的 LAP 过程来发挥增强胞葬作用的效应:经 S1P 处理后,巨噬细胞内 LC3B、LC3B-II 及 LAMP1 的表达水平显著升高,提示吞噬体与溶酶体的融合效率增强。当使用 LAP 抑制剂 NSC185058 阻断该通路时,S1P 诱导的 LC3B、LAMP1 表达上调被抑制,同时巨噬细胞吞噬效率及抗炎因子水平也随之下降。值得注意的是,联合使用 S1PR1 抑制剂 W146 与 LAP 抑制剂 NSC185058 可产生协同效应,使巨噬细胞的吞噬效率、TAM 受体表达及抗炎因子水平均降至低

于对照组。上述结果表明, S1PR1 信号转导与 LAP 机制在功能上高度关联, 共同构成促进凋亡细胞高效清除的协同信号轴。现有研究证据表明, 在内皮细胞修复过程中, S1P/S1PR1 信号可通过激活转录因子 EGR1 和 STAT3, 上调其自身合成的关键基因 SPHK1 和 SPNS2 的表达^[23]。基于上述发现, 后续研究将深入阐明 S1P/S1PR1 信号轴调控下游靶基因表达的分子机制, 重点探究其是否通过激活 EGR1、STAT3 等特定转录因子, 或调控 PI3K/Akt、MAPK 等关键信号通路, 进而介导相关基因的转录激活。

上述基于细胞实验的发现与近期体内研究报道的结果一致。研究发现, 巨噬细胞中 S1PR1 信号的上调可增强 MerTK 表达、胞葬能力及 IL-10 等抗炎因子的分泌, 进而延缓 As 进展^[7]。这些研究共同印证了 S1PR1 是 S1P 发挥免疫调节与促进胞葬作用的关键受体。值得注意的是, S1P 通过 S1PR1 通常诱导抗炎表型, 而通过 S1PR2/3 则多促进促炎 M1 极化^[24]。机制层面, S1P/S1PR1 信号可通过上调 TAM 受体表达增强对凋亡细胞的识别^[25], 并通过触发 ATG4B 依赖的 LC3B-II 激活 LAP, 从而协同增强胞葬作用的识别与消化阶段。抑制 ATG4B 或 LAP 均可削弱 S1P 的促进吞噬与抗炎效应。

本研究存在一定局限性。其一, 实验采用 THP-1 细胞系, 与体内来源的巨噬细胞存在差异; 其二, 在验证受体特异性时, 仅采用药理学拮抗剂策略, 未对 THP-1 源性巨噬细胞上各 S1PR 亚型的基础表达水平进行定量检测。因此, 在解释 S1PR2 和 S1PR3 拮抗剂的阴性结果时, 无法完全排除因受体本身不表达导致拮抗剂无显著作用的可能性。尽管如此, 结合 S1PR1 拮抗剂有效的阳性结果, 仍可明确 S1PR1 在该信号通路中的重要性。此外, 现有研究支持人巨噬细胞中 S1PR1 的功能主导地位^[26], 为本研究的发现提供了间接且合理的佐证。后续实验应采用基因沉默或基因敲除技术, 并结合受体过表达策略, 以更全面地阐明各 S1PR 亚型在巨噬细胞胞葬作用中的具体贡献。其三, 关于 LAP 的鉴定。本研究主要通过免疫荧光观察 LC3 在含凋亡细胞的吞噬体上的招募, 并利用抑制剂 NSC185058 开展功能验证。LAP 的验证标准通常需结合透射电镜以明确区分单层膜的 LAP 体与双层膜的自噬体, 同时借助敲除 LAP 关键分子 Rubicon 等遗传学手段, 将其与经典自噬通路加以区分。本研究缺乏上述关键的形态学与遗传学证据, 因此, 本研究观察到的现象更严谨的表述应为 LAP 过程, 其是否属

于确切的 LAP 机制, 有待后续通过电镜观察及 Rubicon 敲除模型进一步验证。此外, 在巨噬细胞胞葬作用的测定中, 本研究未设置严格的阴性对照与特异性对照。具体而言, 本研究未将吞噬细胞与凋亡细胞置于 4 °C 共孵育以评估非特异性结合的背景水平, 也未使用 RGD 肽 (整合素 $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ 抑制剂) 或抗 MerTK 中和抗体验证所观察到的吞噬是否通过经典受体介导途径进行。此外, 本研究未采用台盼蓝淬灭或胰蛋白酶洗脱等辅助手段, 进一步区分细胞“结合”与“内吞”的贡献。因此, 本研究报道的胞葬效率可能包含部分非特异性结合的背景信号。在后续研究中, 本研究团队将结合原代巨噬细胞及体内模型, 更全面地评估 S1P 的浓度-效应关系。尽管存在上述方法学局限, 本研究关于“S1P/S1PR1 轴通过促进 LAP 过程增强凋亡细胞清除”的核心发现, 在现象层面仍具有可靠性。后续研究中, 可通过构建 LAP 特异性基因敲除细胞、完善胞葬检测对照体系等手段, 对这一发现开展更严谨的验证。

综上所述, 本研究阐明了 S1P/S1PR1 通过上调吞噬相关受体与激活 LAP, 增强巨噬细胞的胞葬作用及抗炎极化, 为 As 的免疫干预提供了潜在的机制靶点, 但其体内有效性仍需进一步验证。

[参考文献]

- [1] Libby P. The changing landscape of atherosclerosis[J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533.
- [2] 王琼, 冯安妮, 牙侯弟, 等. 巨噬细胞铁死亡与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(3): 257-262. Wang Q, Feng A N, Ya H D, et al. Macrophage ferroptosis and atherosclerosis[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(3): 257-262.
- [3] 程坤, 顾宁. 动脉粥样硬化胞葬作用和相关微小 RNA 研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(3): 249-256. Cheng K, Gu N. Advances in research on efferocytosis of atherosclerosis and related microRNAs[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(3): 249-256.
- [4] Doran A C, Yurdagul A, Tabas I. Efferocytosis in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(4): 254-267.
- [5] Potì F, Scalera E, Feuerborn R, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in macrophages reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. JCI Insight, 2024, 9(24): e158127.
- [6] Cohen P L, Shao W H. Gas6/TAM receptors in systemic lupus erythematosus[J]. Dis Markers, 2019, 2019: 7838195.
- [7] Myers K V, Amend S R, Pienta K J. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages

- in the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 94.
- [8] Zhang Q, Liu X, Wei Q, et al. Apoptotic breast cancer cells after chemotherapy induce pro-tumour extracellular vesicles via LAP-competent macrophages[J]. *Redox Biol*, 2025, 80: 103485.
- [9] Cheng X T, Xie Y X, Zhou B, et al. Revisiting LAMP1 as a marker for degradative autophagy-lysosomal organelles in the nervous system[J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1472-1474.
- [10] Agrotis A, Pengo N, Burden J J, et al. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells[J]. *Autophagy*, 2019, 15(6): 976-997.
- [11] Lahiri V, Klionsky D J. ATG4-family proteins drive phagophore growth independently of the LC3/GABARAP lipidation system[J]. *Autophagy*, 2021, 17(6): 1293-1295.
- [12] Ziegler A C, Gräler M H. Barrier maintenance by S1P during inflammation and sepsis[J]. *Tissue Barriers*, 2021, 9(4): 1940069.
- [13] Hla T, Galvani S, Rafii S, et al. S1P and the birth of platelets[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(12): 2137-2140.
- [14] Chen T, Song P, He M, et al. Sphingosine-1-phosphate derived from PRP-Exos promotes angiogenesis in diabetic wound healing via the S1PR1/AKT/FN1 signalling pathway[J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkad003.
- [15] Yang J, Tang X, Liang Z, et al. Taurocholic acid promotes hepatic stellate cell activation via S1PR2/p38 MAPK/YAP signaling under cholestatic conditions[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(2): 465-481.
- [16] 胡陶, 何滢蓉, 王武帅, 等. 低压低氧导致巨噬细胞坏死性凋亡和小鼠动脉粥样斑块不稳定[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2025, 33(3): 219-226.
- Hu T, He Y R, Wang W S, et al. Hypobaric hypoxia promotes macrophage necroptosis and atherosclerotic plaque instability in mice[J]. *Chin J Arterioscler*, 2025, 33(3): 219-226.
- [17] Cho M J, Schroeder M, Flores Garcia J, et al. The current state of the art in autologous breast reconstruction: a review and modern/future approaches[J]. *J Clin Med*, 2025, 14(5): 1543.
- [18] Sakhno L V, Shevela E Y, Tikhonova M A, et al. Efferocytosis modulates arginase-1 and tyrosine kinase Mer expression in GM-CSF-differentiated human macrophages[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2021, 170(6): 778-781.
- [19] Liao Z, Lan H, Jian X, et al. Myofiber directs macrophages IL-10-Vav1-Rac1 efferocytosis pathway in inflamed muscle following CTX myoinjury by activating the intrinsic TGF- β signaling[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 168.
- [20] Ruan S, Jia R, Hu L, et al. Ozone promotes macrophage efferocytosis and alleviates neuropathic pain by activating the AMPK/Gas6-MerTK/SOCS3 signaling pathway[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1455771.
- [21] Hilgendorf I, Frantz S, Frangogiannis N G. Repair of the infarcted heart: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Circ Res*, 2024, 134(12): 1718-1751.
- [22] Liao X, Sluimer J C, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(4): 545-553.
- [23] Akhter M Z, Chandra Joshi J, Balaji Raguathrao V A, et al. Programming to S1PR1+ endothelial cells promotes restoration of vascular integrity[J]. *Circ Res*, 2021, 129(2): 221-236.
- [24] Yang J, Yang L, Tian L, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor 2/3 axis promotes inflammatory M1 polarization of bone marrow-derived monocyte/macrophage via G(α)i/o/PI3K/JNK pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5): 1677-1693.
- [25] Du B, Sun Q, Zheng S, et al. Guizhi Gegen Decoction alleviates influenza-associated intestinal injury by balancing lung-gut ILC2 distribution via the S1P/S1PR1 axis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 361: 121258.
- [26] Kuang Y, Li X, Liu X, et al. Vascular endothelial S1PR1 ameliorates adverse cardiac remodelling via stimulating reparative macrophage proliferation after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(2): 585-599.
- (此文编辑 文玉珊)