基于Fos-Trem1轴调控糖酵解通路研究黄芩苷诱导RAW264.7细胞M1型极化机制

张 瑜[1,2,3], 王宇航[1,2,3], 姚铖铖[1,2,3], 刘晓嘉[1,2,3], 鄢 丹[1,2,3*]

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京市临床药学研究所, 北京 100050; 2. 源于临床的中药创新药研发北京市重点实验室, 北京 100050; 3. 首都医科大学附属北京友谊医院, 消化健康全国重点实验室, 北京 100050)

摘要: 黄芩苷依赖糖酵解代谢途经诱导巨噬细胞向M1型极化表型明确, 但深层调控机制尚不清楚。本研究旨在挖掘黄芩苷调控糖酵解代谢的关键上游靶点及受调控的转录因子。采用RAW264.7细胞模型及RNA-seq与ATAC-seq高通量筛选技术, 结合Western blot、qRT-PCR、siRNA及双荧光素酶报告基因方法进行检测和验证。结果显示, 黄芩苷在100 μmol·L^{-1}时促进RAW264.7细胞向M1型极化伴随髓系细胞触发受体1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1, Trem1) 的高表达, Trem1抑制剂LP17联合干预后可逆转黄芩苷介导的RAW264.7细胞极化及下游糖酵解信号通路的激活。*Trem1*启动子区相关的转录因子中, 原癌基因编码蛋白 (proto-oncogene c-Fos, Fos) 被证明参与了黄芩苷对RAW264.7细胞极化的调控。本研究揭示了黄芩苷通过调控转录因子Fos激活*Trem1*进而促进下游糖酵解代谢, 驱动巨噬细胞向M1型极化, 为其在肿瘤免疫调节及炎症相关疾病中的治疗潜力提供了新的代谢机制依据。

关键词: 黄芩苷; 巨噬细胞极化; 转录因子Fos; Trem1; 糖酵解; 表观遗传; ATAC-seq

中图分类号: R963 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)08-3065-09

Mechanism of baicalin-induced M1 polarization in RAW264.7 cells based on the regulation of the glycolysis pathway by the Fos-Trem1 axis

ZHANG Yu[1,2,3], WANG Yu-hang[1,2,3], YAO Cheng-cheng[1,2,3], LIU Xiao-jia[1,2,3], YAN Dan[1,2,3*]

(*1. Beijing Institute of Clinical Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Beijing Key Laboratory of Clinical-Based Innovative Drug R&D of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100050, China; 3. State Key Laboratory of Digestive Health, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China*)

Abstract: It is well established that baicalin induces the polarization of macrophages toward the M1 phenotype *via* glycolytic pathways; however, the underlying regulatory mechanisms remain unclear. This study aimed to identify the key upstream targets and regulated transcription factors involved in baicalin's regulation of glycolytic metabolism. Using the RAW264.7 cell model, RNA-seq and ATAC-seq technologies were employed, combined with Western blot, qRT-PCR, siRNA, and dual-luciferase reporter assays for detection and validation. The results showed that baicalin, at concentration of 100 μmol·L^{-1}, promoted RAW264.7 cell M1 polarization accompanied by high expression of Trem1; co-treatment with the Trem1 inhibitor LP17 reversed baicalin-mediated RAW264.7 cell polarization and the activation of downstream glycolytic signaling pathways. Among the transcription factors associated with the *Trem1* promoter region, Fos was shown to be involved in the regulation of RAW264.7 cell polarization by baicalin. This study reveals that baicalin promotes downstream glycolytic metabolism by regulating

收稿日期: 2026-06-24; 修回日期: 2026-07-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304776, 82304512); 北京市自然科学基金资助项目 (L2608077).

*通讯作者 Tel: 86-10-63139318, E-mail: danyan@ccmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0786

the transcription factor Fos to activate *Trem1*, thereby driving macrophage polarization toward the M1 phenotype, providing a new metabolic mechanism to support its therapeutic potential in tumor immunoregulation and inflammation-related diseases.

Key words: baicalin; macrophage polarization; transcription factor Fos; triggering receptor expressed on myeloid cells 1; glycolysis; epigenetics; assay for transposase-accessible chromatin using sequencing

黄芩苷是传统中药黄芩的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性[1,2]。在肠道炎症模型中, 黄芩苷能够通过上调抗炎细胞因子IL-10的水平, 降低促炎细胞因子IL-1β的表达, 抑制M1型巨噬细胞的极化, 从而减轻肠道炎症[3]; 在脑缺血再灌注损伤模型中, 黄芩苷能够促进小胶质细胞从促炎M1型向抗炎M2型极化, 减少炎症介质的分泌, 发挥神经保护作用[4]。项目组前期研究已经发现, 黄芩苷能够通过激活PI3K/Akt/HIF-1α信号通路调控巨噬细胞糖酵解代谢重编程, 诱导RAW264.7细胞向M1型极化, 进而发挥其免疫调节作用[5]。然而, 黄芩苷调控巨噬细胞糖酵解重编程的深层分子机制尚不清楚, 亟待进一步阐明。

髓系细胞触发受体1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1, Trem1) 作为一种重要的免疫调节受体, 主要表达于单核细胞、巨噬细胞等髓系细胞表面, 能够通过与病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 结合, 放大炎症反应, 促进M1型巨噬细胞的活化[6]。Trem1在巨噬细胞极化过程中扮演着关键的调控角色, 其表达水平的变化可直接影响巨噬细胞的极化方向与功能状态, 是介导免疫炎症反应的重要分子靶点[7]。此外, Trem1还是调控重塑肿瘤免疫微环境的核心分子。研究表明Trem1激动剂可重编程肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAM) 为M1促炎表型, 大量释放TNF-α、IFN-γ等促炎因子, 重塑抗肿瘤免疫微环境、抑制肿瘤增殖[8]。另有研究发现, 肿瘤内的Trem1激活显著抑制了Pan02肿瘤的生长, 而*Trem1*$^{-/-}$小鼠中未见此效应[9]。因此, Trem1可作为靶向TAM、改善肿瘤免疫治疗的潜在靶点。

本研究旨在深入探讨黄芩苷诱导RAW264.7细胞M1型极化的分子机制, 通过转录组结合ATAC-seq挖掘黄芩苷调控的上游转录因子及下游靶点, 并对关键的转录因子和靶点进行系统验证, 进而揭示黄芩苷调控巨噬细胞极化及糖酵解重编程的表观深层分子机制。本研究不仅有助于深入理解黄芩苷的免疫调节作用, 还将为开发基于巨噬细胞极化调控的新型免疫治疗策略提供重要的数据支持。

材料与方法

主要试剂及材料 黄芩苷 (货号: BT-HQ03) 购自北京市倍特仁康生物医药科技有限公司; DMEM高糖培养基 (货号: 03.1002C)、特级胎牛血清 (货号: 03.U16001DC) 与青链霉素混合液 (货号: 03.12001A) 购自北京中生奥邦生物科技有限公司; PBS (SinoDetech, 货号: CBSOO4S-BR500)、裂解液 (货号: R0010)、蛋白酶抑制剂 (货号: P6730) 均购自北京索莱宝科技有限公司; APC anti-mouse F4/80 (货号: 123115)、APC/Cyanine7 anti-mouse CD86 (货号: 105029) 购自美国BioLegend公司; Phospho-PI3 kinase p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) (货号: #4228) 抗体、PI3 kinase p85 (19H8) (货号: #4257) 抗体、Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® (货号: #4060) 抗体、HIF-1α (D2U3T) (货号: #14179) 抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司; Akt (10176-2-AP); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH recombinant monoclonal antibody, 货号81640-5-RR)、β-微管蛋白 (beta tubulin polyclonal antibody, 货号10094-1-AP)、羊抗鼠IgG (HRP标记) 二抗 (货号SA00001-1)、羊抗兔IgG (HRP标记) 二抗 (货号SA00001-2) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; Trem 1抑制剂LP17 (LQVTDSGLYRCVIYHPP, 货号: HY-P3400)、Fos抑制剂T-5224 (货号: HY-12270) 和Trem1抗体CD354 antibody (YA4511, 货号: HY-P84814) 购自美国MedChemexpress生物科技公司; *Trem1*、*Fos*、*Stat1*、*Nr4a1*、*Myc*、*Vdr*与*Hey1*引物购自武汉塞维尔生物科技有限公司 (货号: GM2045)。

细胞培养及药物处理 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 购自北京中生奥邦生物科技有限公司。HEK293T细胞 (货号: CL-0005) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。采用10%胎牛血清及1%青霉素链霉素的DMEM高糖培养基置于细胞培养箱中培养。黄芩苷药物配置方法: 精密称取黄芩苷标准品 (纯度 ≥ 98%), 以二甲基亚砜 (DMSO) 为溶剂配制成100 mmol·L^{-1}母液后, 使用RAW264.7细胞专用培养基稀释成浓度为100 μmol·L^{-1}的工作液。Trem1抑制剂LP17的配置: 以510 μL无菌水为溶剂配制为1 mmol·L^{-1}

工作液。Fos抑制剂T-5224的配置: T-5224干粉加入261.5 μL无菌DMSO, 充分吹打并超声助溶至溶液澄清; 分装冻存管−20 ℃避光保存。细胞干预实验前, 取10 mmol·L^{-1}储备液用细胞完全培养基稀释至100 μmol·L^{-1}作为工作液。

流式细胞术分析　收集药物处理后的RAW264.7细胞: 用细胞刮刀刮下细胞至15 mL离心管, 800 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清, 加入1 mL PBS重悬, 取200 μL至1.5 mL EP管, 800 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清。CD86抗体孵育: 用100 μL PBS重悬细胞, 在每100 μL细胞悬液中加入2.5 μL荧光标记的CD86抗体, 混匀后置4 ℃避光孵育30 min; CD206抗体孵育: 用100 μL破膜液重悬细胞, 4 ℃避光孵育15 min, 800 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清。用100 μL缓冲液洗涤两次, 800 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清后用100 μL缓冲液重悬细胞, 使用安捷伦NovoCyteQuanteon流式细胞分析仪上机, FlowJo v10.8.1进行数据分析。

蛋白免疫印迹法 (Western blot, WB)　收集黄芩苷处理48 h后的RAW264.7细胞。弃掉培养基, 用冷PBS清洗细胞2遍, 每孔加入50 μL裂解液置于冰上裂解15 min, 用细胞刮刀将6孔板中细胞刮下。随后4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心15 min。收集上清, 用Bradford法测定蛋白浓度并配平, 煮沸15 min。取20 μg总蛋白进行10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳 (80 V, 15 min后120 V, 1 h)。湿转法转膜后5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 随后与特异性一抗 (PI3K、p-PI3K、p-Akt、Akt、HIF-1α、Trem1、GAPDH及β-tubulin, 均按1∶1 000稀释) 于4 ℃孵育过夜。TBST洗膜后, 与相应的辣根过氧化物酶标记二抗 (1∶10 000稀释) 室温孵育1 h。使用ECL超敏发光液进行化学发光显影。所有图像使用ImageJ (v1.52) 和GraphPad Prism 9.0软件进行定量分析。

转录组分析 (RNA-seq)　RNA提取检测: 使用RNAprep Pure Tissue Kit (Tiangen, DP431) 提取Total RNA, NanoPhotometer® 分光光度计检测样品纯度 (IMPLEN, CA, USA), 安捷伦2100 RNA Nano 6000 Assay Kit (Agilent Technologies, CA, USA) 检测RNA样品的浓度和完整性。序列比对到参考基因组: 参考基因和基因组注释文件下载自ENSEMBL网站 (http://www.ensembl.org/index.html), 使用Bowtiev1.0.1对参考基因组进行建库, 然后将CleanData通过HISAT2v 2.1.0比对到参考基因组上。差异表达分析: DEGSeqv1.18.0针对两种样本的无生物学重复的差异表达分析。DESeq根据统计学方法中的负二项分布检测在基因表达水平上的差异表达基因, 得到的P值根据Benjamini和Hochberg方法校正控制假阳性。由校正后的$P \leqslant 0.05$定义为差异表达基因。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genesand Genomes, http://www.kegg.jp/) 对蛋白质交互 (互动) 网络在各种细胞活动起的作用作出预测。对KEGG中每个Pathway应用超几何检验进行富集分析, 找出差异表达基因中显著性富集的Pathway。

ATAC-seq测序分析　细胞裂解和细胞核收集: 用PBS重悬清洗细胞, 4 ℃、1 000 ×g离心5 min, 移除PBS; 加入200 μL预冷的lysis buffer到洗涤好的细胞中, 轻轻吹打重悬细胞, 冰上放置10 min; 500 ×g离心10 min后加入1 μL Washing buffer, 颠倒混匀3次; 4 ℃、500 ×g离心10 min收集细胞核; 转座酶消化和文库构建: 加入50 μL转座反应液至细胞核沉淀中, 重悬细胞核, 轻轻吹打; PCR仪上37 ℃孵育30 min, 4 ℃保存; 用2× DNA clean beads纯化DNA; 使用P5和P7接头引物扩增15个循环, 获得初级文库; 使用1.5XNGS磁珠纯化筛选, 获得最终文库。并通过Illumina平台完成高通量测序。原始测序数据质控过滤获得Clean Reads, 比对至小鼠参考基因组, 识别差异染色质开放区域 (DAR); 联合转录组数据筛选关键靶基因, 同时可视化代表性基因染色质开放峰。

***Trem1*转录因子筛选**　首先通过NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 下载转录因子序列及启动子 (TSS) 上游1～2 kb的启动子序列, 利用JASPAR数据库的Scan工具预测潜在结合的转录因子 (transcription factor, TF), 设置核心相似度阈值以筛选高可信度候选; 随后通过TRRUST v2数据库交叉验证, 快速获取已被文献证实的“TF-靶基因”调控关系, 明确激活/抑制作用类型; 对关键候选TF, 进一步在Cistrome DB中检索对应物种的ChIP-seq数据集, 验证其在目标基因启动子区的实际结合峰信号。

siRNA转染　转染前24 h将RAW264.7细胞接种于6孔细胞培养板中, 每孔密度为每毫升5×10^{4}个, 培养24 h后细胞汇合度达到30%～40%时进行siRNA转染。实验分为空白对照组、阴性对照siRNA组 (negetive) 及*Fos*基因敲低组 (*Fos*-siRNA)。采用Lipofectamine RNAiMAX转染试剂 (货号: L3000015, Invitrogen, 美国赛默飞世尔公司) 进行siRNA瞬时转染。将小鼠*Fos*特异性siRNA及阴性对照siRNA用无酶水配制成100 μmol·L^{-1}储存液。转染体系如下: 取1 μL siRNA与250 μL Opti-MEM无血清培养基混匀, 室温静置5 min; 同时取7.5 μL RNAiMAX转染试剂与250 μL Opti-MEM培养基 (货号: 31985070, Gibco, 美国赛默飞世尔公司) 混匀静置5 min。将上述两种稀释液混匀, 室温避光孵育15 min, 形成siRNA-脂质体复合物。将复合物

均匀滴加至含有新鲜无抗完全培养基的细胞孔中, 晃板混匀。转染4～6 h后更换新鲜完全培养基, 去除残留转染复合物以降低细胞毒性。继续恒温培养48 h后收集细胞总RNA, 检测*Fos*基因表达水平, 验证基因敲低效率。若需加药黄芩苷, 则在转染4～6 h后换液为含100 μmol·L^{-1}黄芩苷的新鲜培养基, 48 h后收样。

双荧光素酶报告基因实验 构建野生型与突变型双荧光素酶报告载体, 将目标片段克隆至pGL3-Basic、pmirGLO等报告载体的对应区域, 同时准备pRL-TK等内参质粒 (北京中生奥邦生物科技有限公司); 随后本研究选用HEK293T细胞开展双荧光素酶实验验证Fos与*Trem1*启动子结合, 该细胞转染效率高, 含SV40大T抗原可扩增报告质粒, 荧光检测信噪比佳; 其内源性Fos表达极低, 可排除内源蛋白干扰, 精准反映外源Fos的转录激活效应, 是转录因子−启动子互作验证通用工具细胞。将处于70%～80%汇合度的HEK293T细胞接种于24孔板, 采用Lipofectamine 3000 (Thermo-Fisher L3000008) 系列转染试剂进行共转染, 实验组加入报告质粒与Fos过表达质粒, 对照组加入报告质粒与阴性对照, 所有组均按10∶1或20∶1比例加入内参质粒; 转染24～48 h后, 使用passive lysis buffer裂解细胞, 取上清液通过双荧光素酶检测试剂盒依次测定萤火虫与海肾荧光素酶的相对光单位 (RLU); 最后计算Fluc/Rluc比值, 以对照组数据归一化处理组结果, 通过*t*检验或ANOVA进行统计学分析。

统计学分析 数据使用GrpahPad Prism 9.0软件进行统计分析。两组间均数比较采用*t*检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 每组实验重复3次及以上, $P < 0.05$具有显著性差异。

结果

1 Trem1参与黄芩苷诱导RAW264.7细胞M1型极化

本研究在前期明确黄芩苷可诱导RAW264.7细胞发生M1型极化的基础上[5], 采用转录组研究其调控的信号通路及潜在基因靶点。结果如图1所示, 差异表达基因的KEGG通路富集分析表明, 富集程度排名靠前的通路主要集中在PI3K-Akt、HIF及糖酵解信号通路 (图1A), 这与我们前期的研究结果[5]基本一致。进一步对差异基因进行热图分析, 发现参与巨噬细胞极化方向与功能状态调节的*Trem1*基因, 在黄芩苷干预组表达上调 (图1B)。后续的qRT-PCR ($P < 0.001$) 和Western blot ($P < 0.01$) 结果也验证了这一表型 (图1C、D), 提示Trem1可能参与介导黄芩苷诱导的RAW264.7细胞M1型极化过程。

2 Trem1可能是黄芩苷激活糖酵解信号通路的上游靶点

为验证Trem1的表达在黄芩苷诱导巨噬细胞M1型极化中的作用, 本研究采用Trem1特异性抑制剂LP17进行干预实验。结果表明, LP17可显著逆转黄芩苷诱导的巨噬细胞M1型极化表型。与黄芩苷单独处理组相比, 联

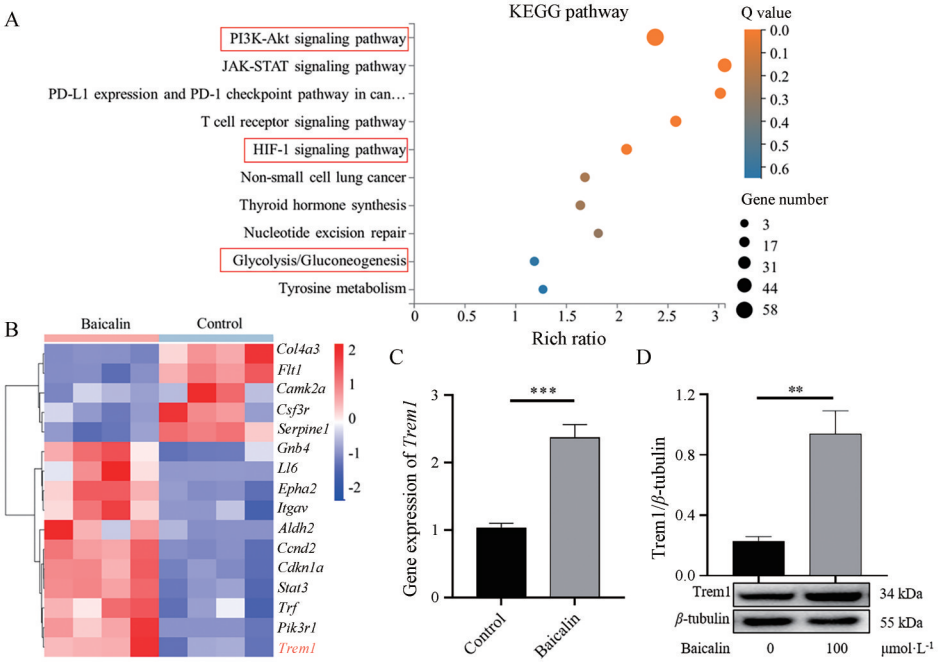


Figure 1 Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (Trem1) is involved in the regulation of M1 polarization in RAW264.7 cells by baicalin. A: Bubble plot of KEGG enrichment; B: Heatmap showing expression profiles of core differential genes; C: qRT-PCR quantification of *Trem1* mRNA; D: Western blot analysis of Trem1 protein. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

合LP17处理后, CD86阳性细胞率降低至与对照组无显著差异的水平 (图2A)。同时, LP17可有效抑制黄芩苷诱导的Trem1表达上调, 其mRNA ($P < 0.000\ 1$) 与蛋白表达水平 ($P < 0.05$) 均有不同程度的回调 (图2B、C)。

为进一步揭示Trem1蛋白的调控是否参与糖酵解代谢轴, 本研究对LP17联合黄芩苷干预后的样本进行了PI3K/Akt/HIF-1α轴的检测。结果表明 (图2D), LP17干预后, 确实可不同程度地回调PI3K、pAkt/Akt ($P < 0.01$) 和HIF-1α ($P < 0.01$) 的表达, 说明LP17可通过阻断糖酵解信号通路PI3K/Akt/HIF-1α的激活, 最终逆转M1型极化表型。提示Trem1是黄芩苷调控PI3K/Akt/HIF-1α轴的重要上游靶点。

3　黄芩苷通过调节染色质开放性促进*Trem1*基因的转录调控

为了探究黄芩苷如何在表观遗传水平上通过调控*Trem1*基因激活下游糖酵解信号通路控制巨噬细胞极化, 我们对黄芩苷干预的巨噬细胞进行了ATAC-seq和RNA-seq的联合分析。对转录起始位点 (±2 kb; TSS) 周围全基因组区域ATAC-seq峰的富集情况分析表明, 黄芩苷干预导致染色质可及性整体增加 (图3A)。根据基因组分布对差异峰进行了注释, 其中大部分峰位于内含子和基因间区域 (图3B)。RNA-seq与ATAC-seq数据联合分析的九象限图结果表明, ATAC-seq和RNA-seq数据之间有133个重叠的差异表达基因 (115个上调基因和18个下调基因) (图3C)。Gene plot结果发现, *Trem1*的编码基因在黄芩苷组呈现出更易接近的启动子和更高的基因表达水平。此外, RNA-seq数据中许多与Glycolysis、PI3K/Akt和HIF通路密切相关的上调基因, 其启动子区域更易接近, 比如, Glycolysis通路 (*Aldh2*)、PI3K/Akt通路 (*Cdkn1a*, *Gnb4*) 因子和HIF通路 (*Pik3r1*, *Trf*) 的编码基因在黄芩苷组 (baicalin) 表现出更易接近的启动子和更高的基因表达水平 (图3D)。*Cdkn1a*是PI3K/Akt下游应激应答核心分子, 参与巨噬细胞代谢重编程与促炎功能激活[10]。*Gnb4*作为上游信号衔接分子正向激活PI3K/Akt级联通路, 其表达升高可提升PI3K、Akt磷酸化水平, 促进巨噬细胞增殖与促炎因子分泌[11]。*Pik3r1*是PI3K复合物的核心组分, 介导生长信号、炎症受体向Akt传递信号, 缺氧条件下HIF-1α可结合其启动子促进转录, 上调p85α后增强PI3K激酶活性, 持续激活Akt-HIF-1α正反馈环路, 推动巨噬细胞糖酵解代谢重塑、放大Trem1介导的促炎信号[12]。*Trf*属于HIF通路下游应答基因, 缺氧微环境下HIF-1α促进*Trf*启动子染色质开放、表达上调, 进而延长M1巨噬细胞存活时间, 持续释放促炎介质, 协同PI3K通路放大巨噬细胞抗肿瘤免疫功能[13]。这些基因的启动子区域染色质开放上调, 提示黄芩苷可从表观染色质层面激活这些通路中的相关靶基因的转录, 这一结果也与我们前期在蛋白层面的检测结果[5]相符。

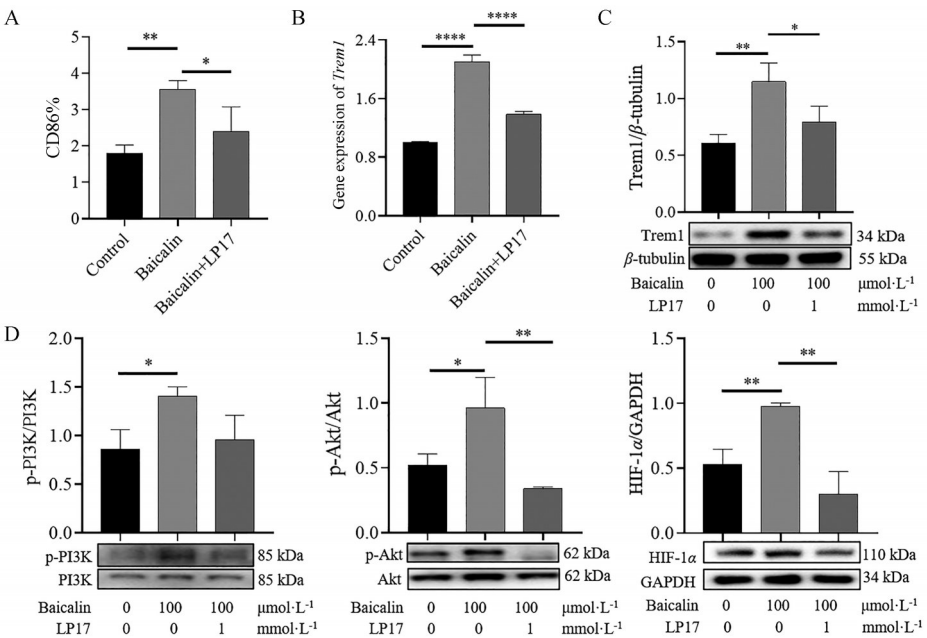


Figure 2　The Trem1 inhibitor LP17 reverses the regulation of the sugar metabolism pathway targets by baicalin. A: Flow cytometry quantification of CD86-positive M1 macrophages after intervention with Trem1 inhibitor; B: qRT-PCR analysis of *Trem1* mRNA expression after intervention with Trem1 inhibitor; C: Western blot detection of Trem1 protein after intervention with Trem1 inhibitor; D: Western blot for phosphorylated and total protein levels of PI3K/Akt and HIF-1α after intervention with Trem1 inhibitor. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$. LP17: Trem1 inhibitor

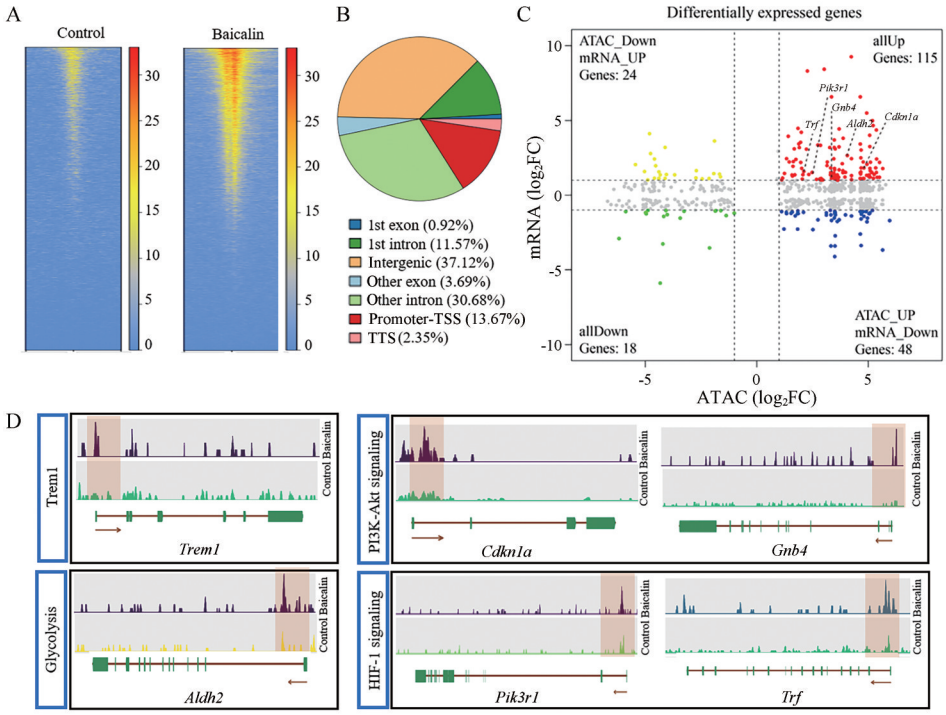


Figure 3 ATAC-seq chromatin accessibility profiling and integrative transcriptomic analysis of macrophages treated with baicalin. A: Heatmap of genome-wide chromatin open signals; B: Pie chart showing genomic distribution of differential accessible regions (TSS: Transcription start site; TTS: Transcription termination site); C: Nine-quadrant plot integrating ATAC-seq and transcriptome data with key target genes labeled; D: Gene plot of representative genes involved in Trem1, PI3K/Akt, HIF-1 and glycolysis pathways

4 基于RNAseq和ATAC-seq数据分析与*Trem1*相关的上游转录因子基因

为了将*Trem1*可及染色质的变化与特定转录因子联系起来，我们首先从RNA-seq数据中筛出与*Trem1*相关的转录因子，最终得到*Fos*、*Stat1*、*Nr4a1*、*Myc*、*Vdr*及*Hey1*这6个转录因子基因（图4A）。进一步采用qRT-PCR进行验证（图4B），与空白对照组（control）相比，黄芩苷（baicalin）干预后，转录因子*Fos*和*Stat1*的基因表达呈上升趋势，与转录组结果的趋势一致；转录抑制因子*Nr4a1*的基因表达与转录组结果的趋势相反，其他三个转录因子在两个组别则未发现明显差异变化，可能是转录组出现假阳性结果。

进一步地，我们对富集的开放染色质区域进行了HOMER基序分析，并在黄芩苷干预的巨噬细胞中鉴定出显著富集的Fos转录因子（图4C）。根据ATAC-seq的motif结果，与该研究中的转录组数据中差异转录因子相关基因取得交集，得到转录因子Fos染色质区域打开、使得Fos更容易结合，激活下游基因。同时通过NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）下载转录因子Fos序列及*Trem1*启动子序列，然后通过JASPAR网站（A database of transcription factor binding profiles, https://jaspar.elixir.no/）预测结合位点。预测分数高达0.931。因此后续研究重点围绕转录因子Fos展开。首先采用Fos抑制剂（T-5224）进行干预，发现其可回调黄芩苷诱导的M1型巨噬细胞标志物CD86的表达（图4D），同时Trem1在基因和蛋白水平也都有不同程度的下调（图4E），提示Fos确实参与了黄芩苷诱导巨噬细胞M1型极化，并对Trem1的转录和翻译水平产生调节作用。

5 抑制转录因子Fos可调控Trem1逆转黄芩苷对M1型巨噬细胞极化

为进一步明确转录因子Fos是调控Trem1表达的上游转录因子，本研究进行了Fos的siRNA实验。结果如图5所示，与空白对照组（control）、阴性干扰组（negative）相比，*Fos*-siRNA组*Fos* mRNA表达水平显著下调（$P < 0.000\ 1$），证明siRNA可有效沉默细胞内*Fos*基因（图5A），后续敲低功能实验体系成立。此外，相比对照组，黄芩苷处理后*Trem1*基因表达显著升高（$P < 0.01$），敲低*Fos*后可显著逆转黄芩苷诱导的*Trem1*上调（$P < 0.05$）；说明黄芩苷上调*Trem1* mRNA的效应依赖*Fos*基因（图5B）。同时，敲低*Fos*后还可导致黄芩苷介导的Trem1蛋白升高呈现下调趋势（图5C），从蛋白水平再次验证黄芩苷促进Trem1表达的作用需要Fos的参与。流式结果同样表明，黄芩苷联合*Fos*-siRNA处理后，CD86阳性比例明显回落，敲低*Fos*可阻断黄

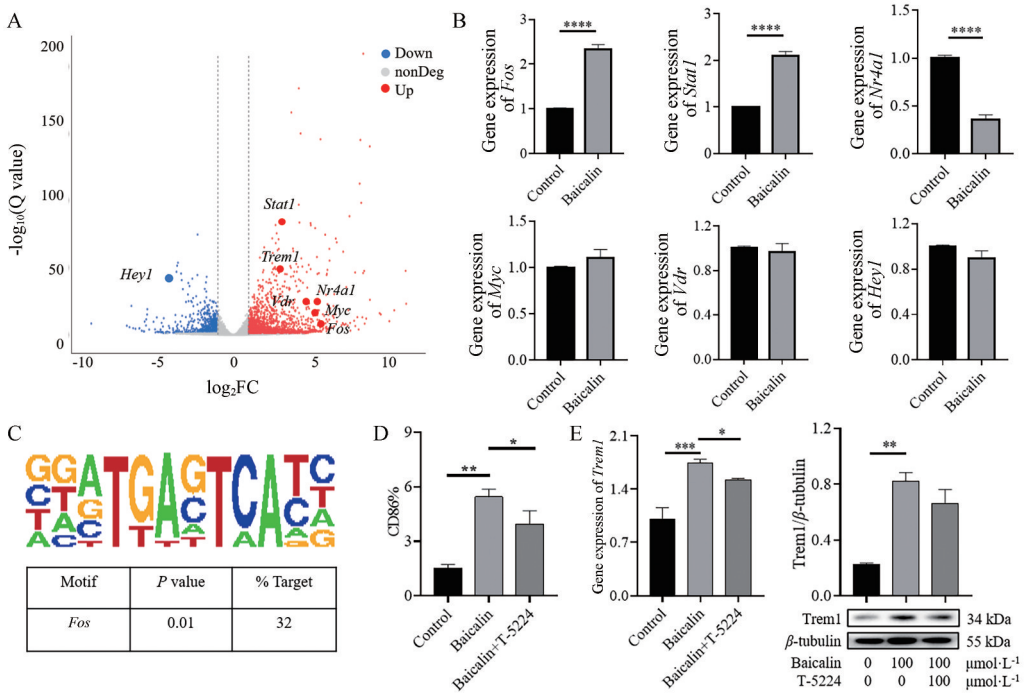


Figure 4　Fos may be an upstream transcription factor that regulates Trem1. A: Volcano plot of differentially expressed genes with key transcription factors and *Trem1* labeled; B: qRT-PCR quantification of 6 IFs gene at mRNA levels; C: Enrichment analysis of conserved *Fos* binding motif; D: Flow cytometry analysis of CD86-positive M1 macrophages after intervention with Fos inhibitor; E: qRT-PCR and Western blot detection of *Trem1* mRNA and protein expression after intervention with Fos inhibitor. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$. T-5224: Fos inhibitor; nonDeg: Non-differentially expressed gene

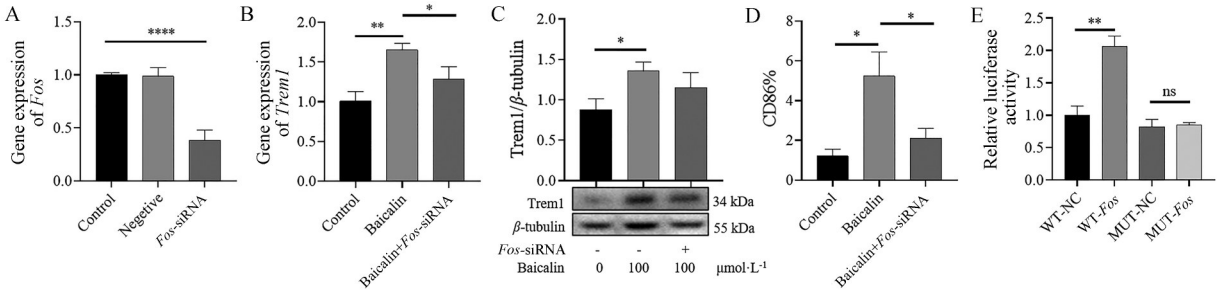


Figure 5　Fos directly transcriptionally activates Trem1 and mediates baicalin-induced M1 macrophage polarization. A: qRT-PCR was performed to verify the knockdown efficiency of *Fos*-siRNA; B: qRT-PCR detection shows that *Fos* knockdown reverses the upregulation of *Trem1* mRNA induced by baicalin; C: Western blot analysis at the protein level verifies that the Fos inhibitor abolishes baicalin-triggered elevation of Trem1 protein; C: Flow cytometry was used to quantify the percentage of CD86-positive M1 macrophages. *Fos* knockdown eliminates the promotive effect of baicalin on M1 polarization; E: Dual-luciferase reporter assay confirms that *Fos* directly activates *Trem1* transcription by binding to conserved motifs on the *Trem1* promoter. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$. WT: Wild-type; MUT: Mutant

芩苷诱导的M1型极化 (图5D), 证明Fos是黄芩苷调控巨噬M1型极化的关键中间分子。

最后, 为了证明*Fos*可直接与*Trem1*启动子保守基序结合, 促进其转录激活, 本研究开展了双荧光素酶报告基因实验。结果如图5E所示, WT-*Fos*组荧光素酶活性显著高于WT-NC ($P < 0.01$), 说明*Fos*可直接激活野生型*Trem1*启动子转录; 当*Trem1*启动子上*Fos*结合motif发生突变后 (MUT组), 无论是否过表达*Fos*, 与MUT-NC组相比, 荧光比值均无明显变化, *Fos*无法再激活启动子, 表明*Fos*通过特异性结合*Trem1*启动子保守基序, 直接转录激活*Trem1*基因, 该激活作用完全依赖启动子上*Fos*结合位点的完整性。

讨论

在复杂的机体免疫网络中, 巨噬细胞作为关键的固有免疫细胞, 其极化状态的精准调控对于维持免疫

稳态、抵御病原体侵袭以及调控肿瘤发生发展等过程发挥着不可替代的核心作用[14,15]。巨噬细胞主要分为经典活化的M1型和替代活化的M2型, 其中M1型巨噬细胞能够通过分泌大量促炎细胞因子 (如IL-1β、TNF-α等)、表达共刺激分子以及发挥强大的吞噬杀伤功能, 介导机体的抗感染免疫和抗肿瘤免疫应答[16]。作为机体抗肿瘤免疫应答的关键效应细胞, M1型巨噬细胞功能的有效发挥依赖于精准的代谢重编程过程[17,18], 其中糖酵解通路的异常激活被认为是M1型巨噬细胞活化的重要代谢特征[19,20]。本研究基于前期团队发现, 黄芩苷在特定浓度范围内可显著诱导RAW264.7细胞向M1型极化, 具体表现为细胞表面标志物CD86表达上调及促炎细胞因子TNF-α分泌增加, 并通过激活PI3K/Akt/HIF-1α信号通路实现糖酵解信号通路重编程[5]。于是结合RNA-seq和ATAC-seq进一步挖掘激活糖酵解通路的深层表观调控机制。

在本研究中, 通过使用Trem1抑制剂, 我们发现黄芩苷诱导的M1型极化和糖酵解代谢重编程效应被显著抑制, 这一结果明确了Trem1在黄芩苷作用机制中的核心地位。从代谢调控的角度来看, 糖酵解代谢重编程不仅为M1型巨噬细胞提供了能量, 还为其合成促炎细胞因子和其他生物活性物质提供了前体物质[21-23]。黄芩苷通过激活Trem1信号通路, 上调糖酵解关键酶的表达, 加速了葡萄糖的分解代谢, 从而为M1型极化提供了必要的物质和能量基础。这一发现为深入理解巨噬细胞极化的代谢调控机制提供了新的视角, 同时也为黄芩苷的临床应用提供了重要的靶点。

转录因子作为基因表达调控的关键分子, 能够通过结合特定的DNA序列, 精准调控下游靶基因的表达, 进而参与细胞的增殖、分化、代谢等多种生物学过程[24-26]。本研究通过实验证实, 黄芩苷可显著上调*Trem1*基因转录因子Fos的表达。Fos作为AP-1转录复合物的重要组成部分, 在免疫细胞的活化和分化过程中发挥着重要作用[27-29]。进一步的结果表明Fos可直接结合于*Trem1*基因的启动子区域, 激活其转录表达, 从而增强Trem1信号通路的活性。黄芩苷对Fos的上调作用, 促进了其对*Trem1*的刺激, 使得Trem1信号通路得以充分激活。这种转录因子与代谢通路之间的相互调控关系, 形成了一个复杂而精密的调控网络, 确保了巨噬细胞极化过程的精准性和高效性。黄芩苷正是通过干预这一调控网络, 实现了对巨噬细胞极化方向和代谢状态的精准调控。

多项肠道、心肌、脑缺血炎症模型证实黄芩苷可抑制LPS诱导M1极化、偏向M2抗炎表型, 核心机制为阻断NF-κB、JAK/STAT炎症通路, 多用于缓解过度炎症损伤[3,4,30]。但本研究及同类肿瘤免疫相关研究观察到黄芩苷可显著诱导RAW264.7细胞向M1极化, 该双向效应可能由药物浓度、细胞微环境、造模刺激类型共同决定。模型层面, 肠道、缺血损伤以LPS、氧化应激诱发病理性过度炎症, 黄芩苷发挥抑炎修复作用; 而肿瘤背景下巨噬细胞天然偏向免疫抑制M2样TAM, 高浓度黄芩苷通过表观重塑重编程巨噬细胞, 强化抗肿瘤促炎功能, 两种病理微环境对黄芩苷的信号应答完全不同。上述差异也提示黄芩苷具备双向免疫调节特性, 可依据给药剂量与疾病背景实现巨噬细胞极化精准调控, 为区分其抗炎、抗肿瘤两种应用场景提供理论支撑。

从肿瘤免疫治疗的角度来看, M1型巨噬细胞能够通过直接杀伤肿瘤细胞、呈递肿瘤抗原以及激活适应性免疫应答等多种方式抑制肿瘤进展[31-33]。因此, 寻找诱导M1型巨噬细胞的药物是增敏免疫疗法的有效途径。本研究虽然在黄芩苷诱导RAW264.7细胞M1型极化机制方面取得了一定的进展, 但仍存在一些局限性。首先, 本研究仅在细胞水平上探讨了黄芩苷的作用机制, 其在体内的具体效应和调控机制仍需进一步研究。其次, 本研究主要关注了转录因子Fos和Trem1信号通路的作用, 其他可能参与调控的分子和信号通路尚未完全阐明。未来的研究可从以下几个方面展开: 一是开展*Fos*基因敲除小鼠进一步验证体内调控通路; 二是采用高通量测序等技术, 筛选出更多参与黄芩苷调控巨噬细胞极化的分子和信号通路, 完善其调控网络; 三是开展临床试验, 验证黄芩苷在肿瘤免疫治疗中的安全性和有效性, 为其临床应用提供依据。

综上所述, 本研究揭示了黄芩苷介导转录因子Fos与*Trem1*启动子区域结合调控其转录, 激活下游PI3K/Akt/HIF-1α糖酵解通路诱导RAW264.7巨噬细胞向M1型极化。这一研究成果不仅为黄芩苷在肿瘤免疫治疗中的应用提供了重要的理论依据, 也为深入理解巨噬细胞极化的调控机制提供了新的视角。未来随着研究的不断深入, 黄芩苷有望成为一种新型的肿瘤免疫治疗药物, 为肿瘤患者带来新的希望。

作者贡献: 张瑜负责科学假说的提出, 实验方案设计, 结果分析和文章撰写; 王宇航负责实验操作, 数据采集与分析; 鄢丹指导研究思路和修改论文; 姚铖铖、刘晓嘉协助指导实验操作。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Zhang Y, Liu XJ, Zhao W, et al. Baicalin circumvents anti-PD-1 resistance by regulating the gut microbiota metabolite short-chain fatty acids [J]. Pharmacol Res, 2024, 199: 107033.

[2] Wang ZY, Wang YH, Liu XJ, et al. Mechanism of baicalin anti-A549 cells by inhibiting PD-L1 based on autophagy pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 747-754.

[3] Zhu W, Jin Z, Yu J, et al. Baicalin ameliorates experimental inflammatory bowel disease through polarization of macrophages to an M2 phenotype [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 35: 119-126.

[4] Yang S, Wang H, Yang Y, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109102.

[5] Wang YH, Wang ZY, Yao CC, et al. Mechanism of baicalin-induced M1 polarization in RAW264.7 cells: Role of the PI3K/Akt/HIF-1α glycolytic pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2026, 61: 523-531.

[6] Wu D, Weng Y, Feng Y, et al. Trem1 induces periodontal inflammation *via* regulating M1 polarization [J]. J Dent Res, 2022, 101: 437-447.

[7] Yang FC, Chiu PY, Chen Y, et al. TREM-1-dependent M1 macrophage polarization restores intestinal epithelium damaged by DSS-induced colitis by activating IL-22-producing innate lymphoid cells [J]. J Biomed Sci, 2019, 26: 46.

[8] Juric V, Mayes E, Binnewies M, et al. TREM1 activation of myeloid cells promotes antitumor immunity [J]. Sci Transl Med, 2023, 15: eadd9990.

[9] Gross L, Mutisheva I, Hillen H, et al. TREM-1 as a novel immunotherapeutic target to treat pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Mol Ther Oncol, 2025, 33: 201034.

[10] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: Intricate networks and multiple activities [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9: 400-414.

[11] Lin X, Chen DL, Liu BH, et al. The effect of GNB4 on the biological behavior of colorectal cancer cells based on the PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Wenzhou Med Univ (温州医科大学学报), 2025, 55: 789-796.

[12] Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20: 515-534.

[13] De Lange T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres [J]. Genes Dev, 2005, 19: 2100-2110.

[14] Rodríguez-Morales P, Franklin RA. Macrophage phenotypes and functions: Resolving inflammation and restoring homeostasis [J]. Trends Immunol, 2023, 44: 986-998.

[15] Christofides A, Strauss L, Yeo A, et al. The complex role of tumor-infiltrating macrophages [J]. Nat Immunol, 2022, 23: 1148-1156.

[16] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11: 723-737.

[17] Xu X, Xu P, Shen G, et al. Targeting macrophage polarization by inhibiting Pim2 alleviates inflammatory arthritis *via* metabolic reprogramming [J]. Cell Mol Immunol, 2025, 22: 418-436.

[18] Zhao L, Tang S, Chen F, et al. Regulation of macrophage polarization by targeted metabolic reprogramming for the treatment of lupus nephritis [J]. Mol Med, 2024, 30: 96.

[19] Jiang H, Wei H, Wang H, et al. Zeb1-induced metabolic reprogramming of glycolysis is essential for macrophage polarization in breast cancer [J]. Cell Death Dis, 2022, 13: 206.

[20] Wang Z, Kong L, Tan S, et al. Zhx2 accelerates sepsis by promoting macrophage glycolysis *via* Pfkfb3 [J]. J Immunol, 2020, 204: 2232-2241.

[21] Ran L, Zhang S, Wang G, et al. Mitochondrial pyruvate carrier-mediated metabolism is dispensable for the classical activation of macrophages [J]. Nat Metab, 2023, 5: 804-820.

[22] Xu B, Liu Y, Li N, et al. Lactate and lactylation in macrophage metabolic reprogramming: Current progress and outstanding issues [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1395786.

[23] Xiang Q, Zhan J, Tian S, et al. Human iPSCs derived MSCs-secreted exosomes modulate senescent nucleus pulposus cells induced macrophage polarization *via* metabolic reprogramming to mitigate intervertebral disc degeneration [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12: e04347.

[24] Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, et al. The human transcription factors [J]. Cell, 2018, 172: 650-665.

[25] Göös H, Kinnunen M, Salokas K, et al. Human transcription factor protein interaction networks [J]. Nat Commun, 2022, 13: 766.

[26] Hasan A, Khan NA, Uddin S, et al. Deregulated transcription factors in the emerging cancer hallmarks [J]. Semin Cancer Biol, 2024, 98: 31-50.

[27] Cheng X, Chen S, Fu Y, et al. Targeted and personalized immunotherapy in lung adenocarcinoma: Single-cell RNA sequencing of MAFF+ tumor cells and the therapeutic potential of Fos [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1649147.

[28] Yang MG, Ling E, Cowley CJ, et al. Characterization of sequence determinants of enhancer function using natural genetic variation [J]. eLife, 2022, 11: e76500.

[29] Curran T, Franza BR. Fos and Jun: The AP-1 connection [J]. Cell, 1988, 55: 395-397.

[30] Xu M, Li X, Song L. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury *via* inhibiting JAK/STAT pathway [J]. Pharm Biol, 2020, 58: 655-663.

[31] Yu Z, Li Y, Li Y, et al. Bufalin stimulates antitumor immune response by driving tumor-infiltrating macrophage toward M1 phenotype in hepatocellular carcinoma [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10: e004297.

[32] Chen Y, Chen X, Zhang Y, et al. Macrophage-specific *in vivo* RNA editing promotes phagocytosis and antitumor immunity in mice [J]. Sci Transl Med, 2025, 17: eadl5800.

[33] Wang X, Li Y, Li Y, et al. AMPK-dependent Parkin activation suppresses macrophage antigen presentation to promote tumor progression [J]. Sci Adv, 2025, 11: eadn8402.