

Dectin-1 在 curdlan 诱导的慢性肉芽肿病 高炎症反应中的作用机制 *

原慧萍 ** 车福刚 杨 泽 **

(北京医院, 卫生部北京老年医学研究所, 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730)

摘要 慢性肉芽肿病(CGD)是一种罕见的遗传免疫缺陷综合症。CGD 病人最常见为 NADPH 氧化酶 2(NADPH oxidase 2, NOX2)功能缺失造成吞噬细胞内活性氧生成障碍, 不能清除外源的细菌与真菌的感染。凝胶多糖 curdlan 属于 1, 3- β - 葡聚糖, 是白色念珠菌细胞壁的主要成分。目前, 作为吞噬细胞中主要的模式识别受体, 凝集素 dectin-1 是否参与 curdlan 诱导巨噬细胞参与免疫炎症反应以及其分子机制不十分清楚。为了研究这一机制, 我们采用 luminol 和 Amplex Red 法检测活性氧生成水平, ELISA 检测炎症因子 IL-1 β 水平以及免疫荧光法检测 NF- κ B 信号通路的激活情况。结果表明, curdlan 浓度依赖性上调巨噬细胞活性氧生成, NOX2 缺失显著降低活性氧产生, dectin-1 缺失部分降低活性氧的生成和部分阻断 NF- κ B 信号通路的激活。NOX2 KO 小鼠炎症因子 IL-1 β 水平显著升高, Dectin-1 缺失后 NOX2 KO 小鼠 IL-1 β 水平降低; Dectin-1 KO 小鼠的 IL-1 β 水平与 WT 小鼠比无显著差异, 与 Dectin-1/NOX2 KO 小鼠比差异显著。上述结果提示, curdlan 刺激下机体通过巨噬细胞内的 dectin-1 受体诱导免疫应答, 激活 NF- κ B 信号通路释放炎症因子 IL-1 β , 同时通过 dectin-1 受体激活 NOX2 释放活性氧清除病原, 促进机体修复。在这一过程中 dectin-1 不是唯一参与的受体。

关键词 慢性肉芽肿性疾病, curdlan, 活性氧, dectin-1, IL-1 β

学科分类号 Q2

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0023

慢性肉芽肿病(chronic granulomatous disease, CGD)是一种罕见的先天性吞噬细胞功能缺陷造成的遗传异质性免疫缺陷综合症, 发病机制为基因突变所导致的还原型辅酶 II (NADPH)氧化酶复合物(NOX)功能缺失造成吞噬细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成障碍, 不能清除外源的过氧化物酶阳性细菌与真菌^[1-2], 从而引发炎症因子如白介素 1 β (interleukin-1, IL-1 β)等的释放, 引起炎症反应。CGD 发病率在美国约为 1/200 000, 而中国的发病率尚无报道^[3]。CGD 是一种综合症, 病人临床表现为严重和经常性的感染并形成肉芽肿, 其中常见的是肺炎、感染性皮炎、严重的和反复性的皮下脓肿形成。除了高度易感性, 患者罹患黏膜性疾病如溃疡性结肠炎、肠炎和胃出口阻塞的发病率较高, 60%~70%的患者会发生皮肤疾病^[4]。通过免疫重建纠正吞噬细胞的功能缺陷是根治 CGD 的唯一有效的方法^[5]。

CGD 病人最常见的感染是细菌及真菌感染。 β - 葡聚糖(β -glucan)是白色念珠菌细胞壁的主要成

分, 其中 curdlan 属于 1, 3- β -glucan, 能够与机体内免疫细胞相应的受体结合, 激活免疫反应。Dectin-1 是一种 C- 型凝集素^[6], 通常在骨髓细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突细胞中表达。研究表明, 在树突细胞中 dectin-1 作为模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)能够与 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)等协同作用识别真菌细胞壁来源的 β -glucan, 从而激活先天免疫反应, 参与炎症过程^[7-8]。

虽然 NADPH 氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2)来源的 ROS 的缺失能够解释 CGD 病人的高

* 国家自然科学基金(81400790, 81061120527, 81370445, 81472408), 卫生部公益性研究基金(201302008)和国家科技部十二五支撑计划(2012BAI10B01)资助项目。

** 通讯联系人。

杨泽. Tel: 010-58115043, E-mail: yang_ze@sina.com

原慧萍. Tel: 010-58115043, E-mail: yuanhuiping@126.com

收稿日期: 2016-01-20, 接受日期: 2016-04-27

度易感性, 但是其与高炎症反应之间的关系尚不清楚. 已有研究表明, 1, 3- β - 葡聚糖被人的巨噬细胞膜上的 dectin-1 受体识别后, 激活 Caspase-1 依赖的 IL-1 β 释放^[9], 从而介导炎症反应. 然而, curdlan 是否可以通过巨噬细胞表面的 dectin-1 受体影响巨噬细胞内 ROS 的生成, 其介导免疫应答过程中所涉及的分子机制也不清楚. 因此, 本研究旨在阐明 curdlan 通过 dectin-1 受体对慢性肉芽肿性疾病中巨噬细胞参与免疫炎症反应的影响及其所涉及的分子机制, 为慢性肉芽肿疾病的治疗提供依据和理论基础.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Curdlan(美国 sigma 公司); 胎牛血清、DMEM 培养基(Gibco 公司); Amplex Red(美国 Invitrogen 公司); Luminol(美国 Sigma 公司); IL-1 β ELISA 试剂盒(R&D Systems); NF- κ B (P65)(美国 Santa Cruz 公司).

1.2 实验动物选择

野生型(WT)、NOX2^{-/-}(NOX2 KO)小鼠、dectin-1^{-/-} NOX2^{-/-}(dectin-1 NOX2 KO)小鼠和 dectin-1^{-/-}(dectin-1 KO)小鼠(C57Bl6/J, 8~12 周龄, 雄性). 各品系小鼠由瑞士日内瓦大学动物实验研究中心提供, 喂养于 SPF(specific pathogen free)级动物房(微隔离笼, 高压灭菌食物, 酸化灭菌水). 食物与水充足供应, 动物房内温度维持在 25℃, 昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h.

1.3 小鼠原代骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)培养

WT, NOX2 KO 小鼠和 dectin-1 KO 小鼠取股骨和胫骨, 分离其骨髓干细胞(BM), 吹散成单个细胞, 计数. 在含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基加入 20% 过滤除菌的 L929 细胞培养基(含 M-CSF)^[10]以及 1%的青霉素, 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养分离的骨髓干细胞, 并在第 2 天、第 4 天换一半新鲜培养基, 到第 6 天细胞分化成熟. 7 天后将悬浮细胞去除, 得到的贴壁细胞即为分化成熟的骨髓来源巨噬细胞(bone marrow derived macrophage, BMDM).

1.4 小鼠原代腹腔来源的巨噬细胞培养

WT 和 dectin-1 KO 小鼠腹腔注射 10 ml Hank's 平衡盐溶液(HBSS)后, 轻揉小鼠腹壁, 10 min 后将 HBSS 回收, 细胞计数后接种于 96 孔培养板. 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜,

得到腹腔来源的巨噬细胞(peritoneal macrophages).

1.5 CGD 细胞模型建立

原代分离培养得到的骨髓来源巨噬细胞(BMDM)及腹腔来源巨噬细胞中加入 curdlan (50、100、200 mg/L), 建立 CGD 细胞模型.

1.6 ELISA 方法检测炎症因子 IL-1 β 的表达

分别提取第 2、7 天的鼠耳蛋白, 检测其中炎症因子 IL-1 β 的表达: PBS 1 : 180 稀释捕获抗体(capture antibody), 50 μ l/孔加入酶标板中, 室温过夜; 洗板后, 加入封闭缓冲液(block buffer)150 μ l/孔室温 1 h; 洗板 3 次, 加入稀释好的样品和标准品 50 μ l/孔(用试剂稀释液 1/170 稀释后逐次以 1 : 1 稀释配制标准品为 1~7, 8 为试剂稀释液), 室温 2 h; 洗板 3 次, 加入检测抗体(detection antibody)50 μ l/孔(1/180), 室温 2 h; 洗板 3 次, 加入 50 μ l/孔链霉亲和素-辣根过氧化物酶(streptavidin-HRP), 避光室温 30 min; 洗板 3 次, 加入底物溶液 50 μ l/孔, 避光室温 40 min; 加入终止液 25 μ l/孔, 上机检测: 检测波长 450 nm, 校正波长 540 nm.

1.7 活性氧(ROS)检测

1.7.1 Amplex Red 检测 ROS

BM 4 $\times$ 10⁶ 接种于 96 孔板中, 7 天后分化为成熟的 BMDM. 配制混合溶液(MIX)及 H₂O₂ 标准品. MIX 中包括: 辣根过氧化物酶(HRP), 500U/ml, 2 ml (1 : 10 000 稀释); Amplex Red, 10 g/L, 50 μ l; HBSS, 6 ml. 将 MIX 加入样品孔中, 80 μ l/孔; 加入 curdlan 20 μ l/孔. 上机检测, 37℃ $\times$ 60 min 收集荧光值, 激发和发射波长分别为 600 nm 和 550 nm.

1.7.2 Luminol 检测 ROS

BM 4 $\times$ 10⁶ 接种于 96 孔板中, 7 天后分化为成熟的 BMDM; 配制 MIX. MIX 中包括: HRP, 2500U/ml, 2 μ l/孔(1 : 10 000 稀释); 鲁米诺(Luminol), 10 g/L, 1 μ l/孔; HBSS, 97 μ l/孔. 将 MIX 加入样品孔中, 100 μ l/孔及 curdlan. Fluostar 上机选择发光检测, 在 37℃收集化学发光(RLU) > 80 min.

1.8 免疫荧光检测 NF- κ B 信号通路激活情况

将 BM 细胞接种在盖玻片上, 7 天后分化成熟为 BMDM. 取出有细胞生长的盖玻片在磷酸缓冲液(PBS)中洗涤 1 次, 加入甲醇在-20℃固定 10 min; PBS 洗片后加入用 3%牛血清白蛋白(BSA)/PBS

(*m/v*)按 1:200 稀释的 NF- κ B 一抗, 37℃ 孵育 1 h; PBS 洗片, 加入用 3% BSA/PBS(*m/v*)按 1:50 稀释的二抗, 37℃ 避光孵育 1 h; 避光条件下用 PBS 洗片, 加入用 PBS 以 1:100 稀释的 DAPI 后, 室温避光孵育 3 min; 避光条件下用 PBS 洗片, 滤纸吸去多余液体, 树脂封片, 荧光显微镜下观察。

1.9 统计学处理

结果分析使用 GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA). 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 连续性计量资料采用单因素方差分析进行比较, 进行多组间比较采用 two-way ANOVA. 95% 可信区间, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NOX2^{-/-}小鼠 (NOX2 KO) 中 curdlan 诱导 IL-1 β 高表达

在注射 curdlan 后第 2 天、第 7 天检测鼠耳 IL-1 β 水平变化. ELISA 结果如图 1 和图 2 所示, NOX2 KO 小鼠组 IL-1 β 水平显著高于对照 WT 组。

2.2 Dectin-1^{-/-}(Dectin-1 KO)小鼠中 curdlan 引起 IL-1 β 低表达

Dectin-1 是病原识别的主要受体之一. 为了检测 dectin-1 在 CGD 小鼠模型中作为病原识别中的作用, 我们使用 dectin-1 敲除和 dectin-1 与 NOX2 双敲除的小鼠, 同时耳部真皮下注射浓度为 4 g/L 的 curdlan 50 μ l, 在注射后第 2 天、第 7 天取鼠耳提取蛋白. 图 1 和图 2 结果表明, 与野生型(WT)小鼠相比, NOX2 敲除小鼠炎症因子 IL-1 β 水平显著升高, dectin-1 敲除小鼠并未表现出明显的炎症反应, IL-1 β 水平略低于 WT 组小鼠, 但无显著性差异. 而 dectin-1 敲除和 dectin-1/NOX2 双敲除的小鼠之间 IL-1 β 水平在第 2 天差异有显著性($P < 0.05$); 第 7 天无显著差异. 此外, dectin-1/NOX2 双敲除的小鼠 IL-1 β 水平低于 NOX2 敲除小鼠. 以上结果说明, NOX2 的缺失是导致慢性肉芽肿病高炎症性反应的主要原因. Dectin-1 是巨噬细胞表面主要的 curdlan 识别受体, 介导固有免疫应答, 但其不是唯一受体。

2.3 Curdlan 诱导 BMDM 产生大量活性氧

如图 3 所示, curdlan(50、100、200 mg/L)诱导 WT 小鼠的 BMDM 产生大量活性氧(超氧化物和过氧化氢). 其中, BMDM 中 curdlan 小剂量时, 超氧化物生成呈剂量依赖性, 当 curdlan 浓度大于 200 mg/L 时, 巨噬细胞因 curdlan 的浓度过高而细

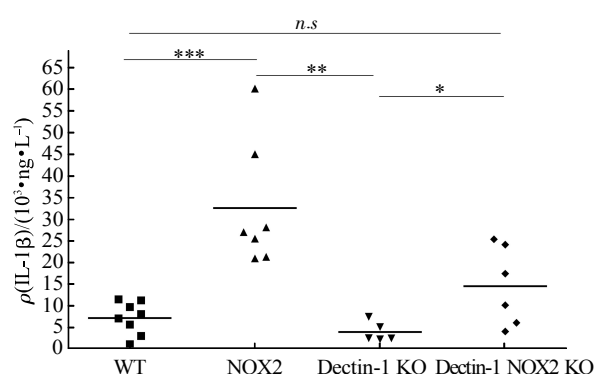


Fig. 1 Decreased level of IL-1 β in dectin-1-deficient mice 2 days after injection of curdlan

WT, NOX2^{-/-}, dectin-1^{-/-} and dectin-1^{-/-}/NOX2^{-/-} mice were injected with 50 μ l of 4 g/L curdlan or 50 μ l of PBS intradermally at the basis of the ear. The level of IL-1 β in the ear was measured at day 2 after curdlan and PBS injection. Results of each point were expressed as $\bar{x} \pm s$ from independent mice ($n \geq 5$). *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. ■: WT; ▲: NOX2; ▼: Dectin-1 KO; ◆: Dectin-1 NOX2 KO.

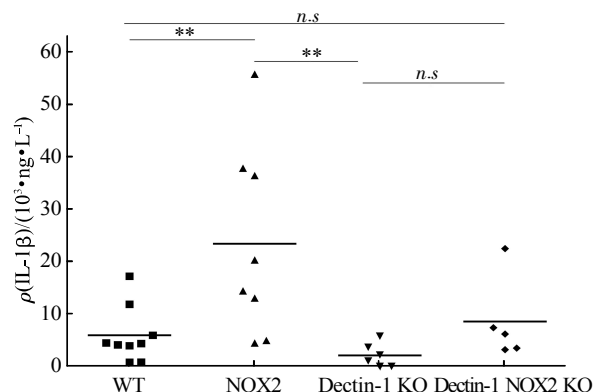


Fig. 2 Decreased level of IL-1 β in dectin-1-deficient mice 7 days after injection of curdlan

WT, NOX2^{-/-}, dectin-1^{-/-} and dectin-1^{-/-}/NOX2^{-/-} mice were injected with 50 μ l of 4 g/L curdlan or 50 μ l of PBS intradermally at the basis of the ear. The level of IL-1 β in the ear was measured at day 7 after curdlan and PBS injection. Results of each point were expressed as $\bar{x} \pm s$ from independent mice ($n \geq 5$). ** $P < 0.01$. ■: WT; ▲: NOX2; ▼: Dectin-1 KO; ◆: Dectin-1 NOX2 KO.

胞受损, 不能产生更多的超氧化物. 同时, 在 BMDM 中, 随着 curdlan 浓度升高, 过氧化氢生成增加. Dectin-1 缺失导致 curdlan 诱导的活性氧(超氧化物和过氧化氢)生成减少, 但与 curdlan 浓度无关. 以上结果说明, curdlan 诱导巨噬细胞活性氧生成增加, dectin-1 是巨噬细胞表面识别外源刺激 curdlan 的受体, 但不是唯一受体。

2.4 NOX2 是 BMDM 中活性氧产生的主要来源

如图 4 所示, dectin-1 缺失小鼠的 BMDM 在

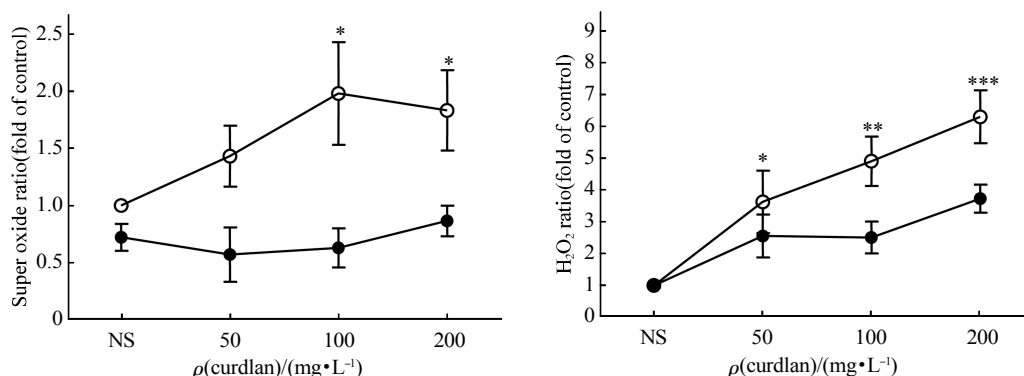


Fig. 3 Production of ROS triggered by curdlan is dectin-1 and dose-dependent

Bone-marrow cells freshly isolated from WT and dectin-1-deficient mice to get BMDM. BMDM were stimulated with 100 mg/L of curdlan and ROS production was measured by Amplex Red (right) and Luminol (left) assay. Results are expressed as the rate of peroxide production, the histograms representing $\bar{x} \pm s$ of 3 independent experiments performed in duplicates. * $P < 0.05$ curdlan vs. NS. ** $P < 0.01$ curdlan vs. NS. *** $P < 0.001$ curdlan vs. NS. ○—○: WT; ●—●: Dectin-1 KO.

curdlan 100 mg/L 刺激下, 活性氧产生较 WT curdlan 组显著减少, 约为 WT 组 50% 左右. Dectin-1/NOX2 KO 小鼠在 curdlan 100 mg/L 刺激下, 活性氧产生与 WT NS 组无差异. 以上结果再次证明 dectin-1 是巨噬细胞表面识别外源刺激 curdlan 的受体, 但不是唯一受体. 此外在 BMDM 中, NOX2 是活性氧产生的主要来源.

2.5 Curdlan 诱导腹腔来源的巨噬细胞产生大量超氧化物

如图 5 所示, 在 curdlan (100 mg/L) 刺激下, WT 小鼠腹腔来源的巨噬细胞产生大量超氧化物 ($P < 0.01$), 而 dectin-1 KO 超氧化物产生相对较少, 仅为对照 WT 组的 20%~30%. 以上结果证明在腹腔来源的巨噬细胞中, dectin-1 能够作为模式识别受体, 参与随后活性氧的生成, 但 dectin-1 并不是 curdlan 的唯一识别受体.

2.6 核转录因子 κ B (NF- κ B) 信号通路参与 dectin-1 受体识别病原后介导的炎症过程

为了研究 curdlan 诱导 BMDM 炎症反应中的 NF- κ B 信号通路作用, 用免疫荧光法检测 NF- κ B 激活情况. 如图 6 所示, curdlan 100 mg/L 刺激 120 min 后, NF- κ B P65 由胞质转入胞核, 而 dectin-1 KO 小鼠 BMDM 中, NF- κ B P65 部分由胞质转入胞核. 以上结果再次证明, dectin-1 只是病原识别的受体之一, 因此 dectin-1 的缺失导致 curdlan 通过部分激活 NF- κ B 信号通路参与免疫炎症反应.

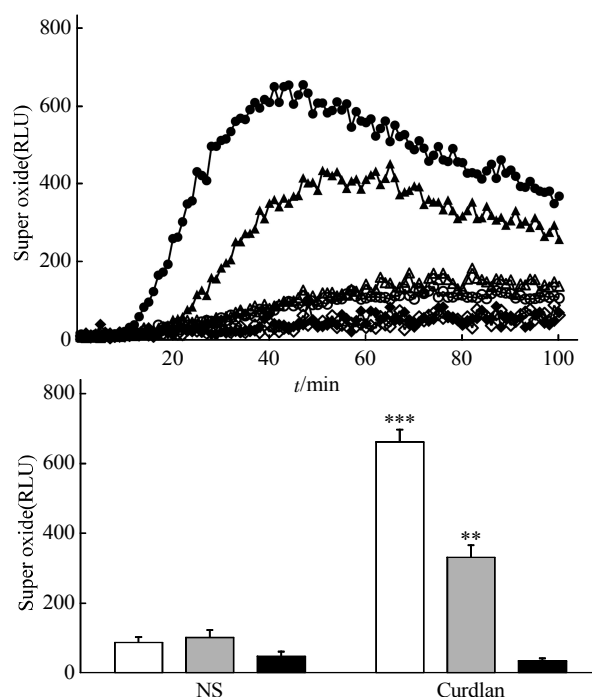


Fig. 4 Production of ROS triggered by curdlan in BMDM

BMDM were isolated from WT and dectin-1-deficient mice were stimulated with 100 mg/L of curdlan and ROS production was measured by Luminol assay. Results are expressed as the rate of peroxide production, the histograms representing $\bar{x} \pm s$ of 3 independent experiments performed in duplicates. ** $P < 0.01$ curdlan vs. NS. *** $P < 0.001$ curdlan vs. NS. ○—○: WT NS; △—△: Dectin-1 KO NS; ◇—◇: Dectin-1/NOX2 KO NS; ●—●: WT curdlan; ▲—▲: Dectin-1 KO curdlan; ◆—◆: Dectin-1/NOX2 KO curdlan. □: WT; ■: Dectin-1 KO; ▨: Dectin-1/NOX2 KO.

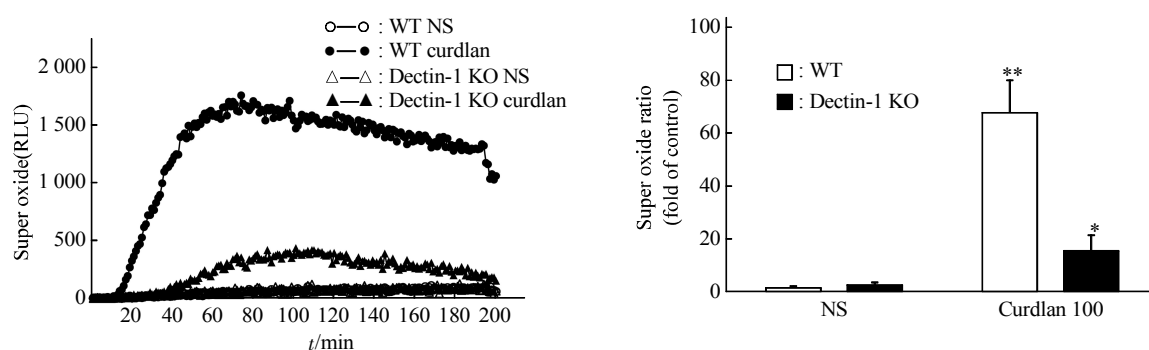


Fig. 5 Production of ROS triggered by curdlan in peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages were isolated from WT and dectin-1-deficient mice were stimulated with 100 mg/L of curdlan and ROS production was measured by Luminol assay. Results are expressed as the rate of peroxide production, the histograms representing $\bar{x} \pm s$ of 3 independent experiments performed in duplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ curdlan *vs.* NS.

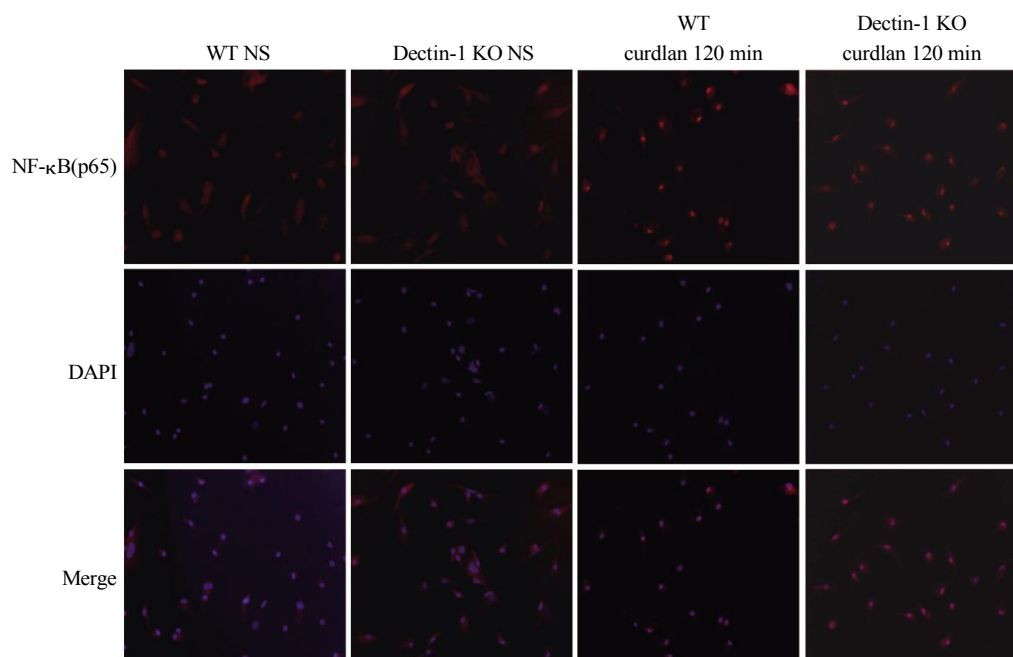


Fig. 6 Curdlan promoted translocation of NF-κB from cytoplasm to nucleus

BMDM cells were induced with curdlan 100 mg/L for 120 min. Cells were fixed and permeabilized, then incubated with anti- NF-κB P65 antibody and TRITC-conjugated antibody (red). DAPI shows nucleus staining. Images were captured using an OLYMPUS fluorescent microscope.

3 讨 论

慢性肉芽肿病(CGD)是一种罕见的遗传性疾病,它是一种遗传性免疫缺陷综合症,最常见的是编码 NOX2 的 gp91phox 基因突变,由此造成吞噬细胞不能产生呼吸爆发而杀灭和清除侵入的细菌和真菌.典型的 CGD 病人常伴有肺、淋巴结、皮肤、皮下组织和肝脏的复发性脓肿及骨髓炎.常见的病原微生物包括金黄色葡萄球菌、沙雷氏菌属、

克雷白市杆菌属、简单胞菌属、曲菌属和白色念珠菌等.

固有免疫是机体抵抗病原微生物感染的主要力量,其通过机体分泌的固有免疫分子和吞噬细胞实现杀灭和清除病原微生物的功能.正常机体中,巨噬细胞在释放炎症因子的同时也会清除外来病原降低炎症反应,因此固有免疫使得机体在病原入侵后得以恢复正常.而 CGD 病人由于 NOX2 缺失,巨噬细胞清除能力显著降低,炎症因子大量持续释

放, 导致炎症持续反复发生. 虽然 NOX2 来源的 ROS 缺失能够解释 CGD 病人的高度易感性, 但是其与高炎症反应之间的关系尚不十分清楚. 此外, 在 CGD 炎症级联反应的一个关键点就是 dectin-1 的存在, dectin-1 作为 β -glucan 最基本的识别受体能够激活机体固有免疫^[8].

为了检测 NOX2 的作用以及 dectin-1 在 CGD 小鼠模型中作为模式识别受体的作用, 我们使用 dectin-1 敲除和 dectin-1/NOX2 双敲除的小鼠, 同时耳部真皮下注射 50 μ l 4g/L 的 curdlan, 在注射后第 2 天、第 7 天取鼠耳提取蛋白. ELISA 检测 IL-1 β 水平的结果表明, NOX2 敲除小鼠与 WT 小鼠以及 dectin-1 敲除小鼠与 dectin-1/NOX2 双敲除的小鼠之间存在显著差异, 证明 NOX2 的缺失导致巨噬细胞不能产生活性氧清除外来病原是导致慢性肉芽肿病高炎症性反应的主要原因. 此外, dectin-1/NOX2 双敲除的小鼠 IL-1 β 水平低于 NOX2 敲除小鼠而高于 dectin-1 敲除小鼠, 证明 dectin-1 是巨噬细胞表面介导固有免疫应答的重要受体, 但 curdlan 激活巨噬细胞免疫应答并不完全依赖 dectin-1, 即 dectin-1 不是唯一的模式识别受体, 也不是唯一参与 NOX2 激活的受体. 在 CGD 高炎症反应中, 有可能还存在其他受体参与识别真菌^[11]. 可能的受体包括: TLR2、补体受体 (complement receptor 3, CR3) 或者乳糖氨基鞘氨醇 (lactosylceramide, LacCer)^[12-13], 后者能识别 β -glucan 并且引起 ROS 产生^[14]. 在细胞实验中, 通过原代培养的巨噬细胞模型可见, curdlan 可以引起巨噬细胞内活性氧的生成显著增加, 呈剂量依赖性, 而 dectin-1 缺失组, 活性氧生成也部分缺失, 无剂量依赖效应. 因此, dectin-1 缺失时活性氧虽然能够产生, 但是产生的量比 WT 减少 50% 左右, 说明 dectin-1 与 NOX2 的激活是相关的, 如果缺失, 活性氧生成就会降低. 我们的结果说明, dectin-1 作为巨噬细胞膜表面的模式识别受体在识别真菌的过程中起着重要作用, 它的缺失导致病原识别部分受阻, 活性氧的生成部分减低. 由于活性氧不会完全消失, 说明 dectin-1 只是与 NOX2 激活相关的受体之一, 还有其他受体参与 NOX2 激活. 所以, 在小鼠中 dectin-1 缺失组仍然有活性氧产生, 部分生成的活性氧能够清除外来病原, 使得小鼠整体表现为炎症因子 IL-1 β 检测水平并不高.

Dectin-1 缺失使得活性氧部分缺失, 从而导致巨噬细胞清除能力下降, 细胞模型中仍然表现出炎

症反应, 其机制又如何呢? 核转录因子 κ B(NF- κ B) 是细胞中重要的转录调节因子, 通常状态下 NF- κ B 以非活化状态存在, 即以 P50-P65 异二聚体的形式与其抑制性蛋白(inhibitor kappaB, I κ B)结合^[15]. 在刺激因子的作用下, NF- κ B 被活化, 持续性激活的 NF- κ B 进而诱导多种基因的表达, 产生多种细胞因子参与炎症反应, 如 IL-1 β 、TNF、IL-6 等^[16]. 我们的结果显示, curdlan 可以激活 NF- κ B, 使得 P65 由胞质转位入胞核, 而 Dectin-1 缺失的 BMDM 中, NF- κ B P65 部分由胞质转入胞核, 进而诱导炎症细胞因子 IL-1 β 由巨噬细胞释放增加, 启动炎症级联反应. 以上结果再次证明, dectin-1 只是病原识别的受体之一, dectin-1 的缺失导致 curdlan 通过部分激活 NF- κ B 信号通路参与免疫炎症反应. 即由 NF- κ B 信号通路介导的免疫炎症反应部分依赖于 dectin-1 的病原识别过程.

综上所述, 通过以上细胞和小鼠实验表明, curdlan 刺激下机体通过巨噬细胞内的一些模式识别受体诱导免疫应答, 激活 NF- κ B 信号通路释放炎症因子 IL-1 β ; 同时通过模式识别受体激活 NOX2 释放活性氧清除病原, 促进机体修复. 其中, dectin-1 是参与病原识别的重要受体, 也是激活 NOX2 的重要受体, 但 dectin-1 不是参与这一过程的唯一受体.

参 考 文 献

- [1] Saleem N, Ahmed T A, Bashir M. Chronic granulomatous disease. *J Pak Med Assoc*, 2016, **66**(1): 97-100
- [2] O'Neill S, Brault J, Stasia M J, *et al.* Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol*, 2015, **6**: 135-156
- [3] Liping Jiang, Tian W. Advance of chronic granulomatous disease. *J Appl Clin Pediatr*, 2012, **27**(21): 1628-1630
- [4] De Ravin S S, Naumann N, Robinson M R, *et al.* Sarcoidosis in chronic granulomatous disease. *Pediatrics*, 2006, **117**(3): e590-595
- [5] Dreyer a K, Hoffmann D, Lachmann N, *et al.* TALEN-mediated functional correction of X-linked chronic granulomatous disease in patient-derived induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*, 2015, **69**: 191-200
- [6] Brown G D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**(1): 33-43
- [7] Liu M, Luo F, Ding C, *et al.* Dectin-1 activation by a natural product beta-glucan converts immunosuppressive macrophages into an M1-like phenotype. *J Immunol*, 2015, **195**(10): 5055-5065
- [8] Dennehy K M, Brown G D. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*, 2007, **82**(2): 253-258
- [9] Kankkunen P, Teirila L, Rintahaka J, *et al.* (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol*, 2010, **184**(11): 6335-6342

- [10] Gersuk G M, Razai L W, Marr K A. Methods of *in vitro* macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *J Immunol Methods*, 2008, **329**(1-2): 157-166
- [11] Viriyakosol S, Fierer J, Brown G D, *et al.* Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun*, 2005, **73**(3): 1553-1560
- [12] Lin J S, Huang J H, Hung L Y, *et al.* Distinct roles of complement receptor 3, Dectin-1, and sialic acids in murine macrophage interaction with *Histoplasma* yeast. *J Leukoc Biol*, 2010, **88**(1): 95-106
- [13] Obonyo M, Sabet M, Cole S P, *et al.* Deficiencies of myeloid differentiation factor 88, Toll-like receptor 2 (TLR2), or TLR4 produce specific defects in macrophage cytokine secretion induced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 2007, **75**(5): 2408-2414
- [14] Iwabuchi K, Nagaoka I. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood*, 2002, **100**(4): 1454-1464
- [15] Jozwiak P, Forma E, Brys M, *et al.* O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, **5**: 145.1-145.13
- [16] Kim J E, Lee J Y, Kang M J, *et al.* Withaferin A inhibits *Helicobacter pylori*-induced production of IL-1 β in dendritic cells by regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation. *Immune Netw*, 2015, **15**(6): 269-277

Role of Dectin-1 in Hyperinflammation of Chronic Granulomatous Disease Induced by Curdlan*

YUAN Hui-Ping**, CHE Fu-Gang, YANG Ze**

(The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract Chronic granulomatous disease (CGD) is an inherited disorder of the immune system due to mutations in gp91phox gene which coding for NOX2 protein. Bacterial and fungal infections are most common infections in CGD patients. β -glucan (curdlan) is the main component of the cell wall of *Candida albicans*. At present, the molecular mechanism of dectin-1 in macrophage which involved in immune inflammation induced by curdlan is not very clear. In order to study the molecular mechanism, we estimated the level of ROS production by luminal and Ampled Red; estimated levels of IL-1 β by ELISA; and estimated NF- κ B signaling pathway by immunofluorescence assay. Our results showed that curdlan induced ROS production in macrophage in a dose-dependent way. Dectin-1 deficiency can partially reduce ROS generation and partially block the activation of NF- κ B signaling pathway. NOX2 deficient mice displayed high level of IL-1 β after curdlan injection and IL-1 β level decreased in NOX2 KO mice when dectin-1 was knocked out. IL-1 β level in Dectin-1 KO mice was as same as in WT mice while significantly different from Dectin-1/NOX2 KO mice. In summary, curdlan can activate NOX2 to generate ROS through recognition of foreign pathogens by receptor dectin-1 which existed in macrophage cell surface. Besides that, immune response induced by curdlan activated NF- κ B signaling pathway and increased IL-1 β level through dectin-1. Dectin-1 was involved in this process, but it was not the only pattern recognition receptor.

Key words chronic granulomatous disease, curdlan, ROS, dectin-1, IL-1 β

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0023

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81400790, 81061120527, 81370445, 81472408), Funding from National Department Public Benefit Research Foundation by Ministry of Health P. R. China (201302008), 12th 5 Year National Program from the Ministry of Scientific Technology (2012BAI10B01).

**Corresponding author.

YANG Ze. Tel: 86-10-58115043, E-mail: yang_ze@sina.com

YUAN Hui-Ping. Tel: 86-10-58115043, E-mail: yuanhuiping@126.com

Received: January 20, 2016 Accepted: April 27, 2016