

Dectin-1 介导香菇多糖诱导人单核细胞系 THP-1 细胞产生 IL-12 的研究

陈青, 陈晓, 孙俊, 曾容, 胡素泉, 李岷, 刘维达

【摘要】

目的 探讨香菇多糖能否依赖 Dectin-1 介导而诱导人单核细胞系 THP-1 细胞产生 IL-12。

方法 香菇多糖作用 THP-1 细胞后, 实时荧光定量 RT-PCR 检测 Dectin-1、IL-12p35 和 IL-12p40 的 mRNA 表达水平; ELISA 法检测 THP-1 细胞分泌 IL-12 的含量; 以 Dectin-1 抑制剂昆布多糖预处理 THP-1 细胞, 比较香菇多糖诱导产生 IL-12 的变化。

结果 香菇多糖可上调 THP-1 细胞表达 Dectin-1 的 mRNA 水平; 能上调 THP-1 细胞 IL-12p35 和 IL-12p40 的 mRNA 表达和 IL-12 分泌; 昆布多糖可明显抑制香菇多糖诱导 THP-1 细胞分泌 IL-12。

结论 Dectin-1 能介导香菇多糖诱导人单核细胞系 THP-1 细胞产生 IL-12。

【关键词】 香菇多糖; 巨噬细胞; 外源凝集素类, C 型; IL-12

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2012, 7(1):26-29

香菇多糖 (lentinan, LNT) 作为免疫调节剂已在我国、日本、美国及东南亚各国等临床上用于肿瘤治疗, 该多糖是菌体细胞壁中分离的主链为 1→3 连接键型、枝链为 1→6 键型的 β-D-葡聚糖^[1-3]。国外学者及我们的研究均表明树突状细胞相关 C 型凝集素 1 (Dectin-1) 是识别 β-葡聚糖、激活免疫反应的最主要模式识别受体^[4-6]。本研究旨在研究香菇多糖能否依赖人单核/巨噬细胞系 THP-1 细胞表达的 Dectin-1 介导来诱导产生 IL-12。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及主要试剂 香菇多糖购自南京康海药业有限公司; 人 THP-1 细胞株购自美国模式菌种收藏中心 (ATCC); IL-12 酶联免疫吸附试剂盒购自美国 R&D Systems 公司; SuperScript III 逆转录酶试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品; Dectin-1

抑制剂昆布多糖 (laminarin) 为美国 Sigma 公司产品。

1.1.2 仪器 Smart Cycler System II 型实时荧光定量 PCR 仪为美国 Cepheid 公司产品; Bio-rad 680 型全自动酶标仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 THP-1 单核细胞在含 10% 小牛血清、1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基中, 于 37℃、5% CO₂ 环境下培养、传代。接种 2 × 10⁶ 个细胞于 6 孔培养板, 血清饥饿 16 h 后, 与刺激物共培养。

1.2.2 实时荧光 RT-PCR THP-1 细胞与 LNT (终浓度 5 μg/ml) 共培养, 并设培养基空白对照组。Trizol 法抽提总 RNA, 取 2 μg 总 RNA 按 SuperScript III 逆转录酶试剂盒说明书合成 cDNA。采用 Syber green 法对目的基因进行扩增, 相关基因引物如下^[5]:

Dectin-1: 正向序列 5' TCAATGTAAGAGGAA GGGTG 3'; 反义序列 5' GCCAAGCTCTCTAAAC ATTT 3'。

IL-12p40: 正向序列 5' CCACATTCCTACTTC TC 3'; 反义序列 5' GTCTATTCCGTTGTGTC 3'。

IL-12p35: 正向序列 5' ACCAGGTGGAGTTC AAGACC 3'; 反义序列 5' TGGCACAGTCTCACT GTTGA 3'。

GAPDH: 正向序列 5' CGGATTTGGTCGTATT GGG 3'; 反义序列 5' CTCGCTCCTGGAAGATGG 3'。

以 2^{-ΔΔC_T} 法计算目的基因的变化水平, ΔC_T = 目的基因 C_T 值 - 内参照 (GAPDH) C_T 值; 某

基金项目: 国家自然科学基金 (81101734、30671893); 江苏省自然科学基金 (BK2011128)

作者单位: 210042 南京, 江苏省血液中心 (陈青、孙俊); 210042 南京, 中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所真菌科 (陈晓、曾容、胡素泉、李岷、刘维达)

通讯作者: 李岷, Email: minli08@gmail.com

收稿日期: 2011-11-02

一样品的 $\Delta\Delta C_T = \text{某一样品 } \Delta C_T - \text{最低表达的样品的 } \Delta C_T$ 。LNT 刺激后 1、6、24 h 分别检测 Dectin-1 的 mRNA 水平；刺激后 1、4、6 h 分别检测 IL-12p35、IL-12p40 的 mRNA 水平。

1.2.3 ELISA 法测定 IL-12 含量 THP-1 细胞与终浓度分别为 10、5、1 $\mu\text{g/ml}$ 的 LNT 共培养 6 h 后；收集上清液，按照试剂盒说明书检测上清液中 IL-12 的含量。用 laminarin 100、50 $\mu\text{g/ml}$ 分别预处理 THP-1 细胞 30 min，再予 5 $\mu\text{g/ml}$ 的 LNT 刺激；检测上清液中 IL-12 的浓度。

1.3 统计学处理

采用 Excel 软件进行统计分析，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较进行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LNT 对 Dectin-1 的 mRNA 表达水平的影响

LNT 作用 THP-1 细胞后 1、6、24 h，LNT 组、培养基对照组的 Dectin-1 的 mRNA 水平结果见图 1。上述 3 个不同时刻，LNT 组的 Dectin-1 的 mRNA 水平均明显高于对照组 ($*P < 0.001$)。

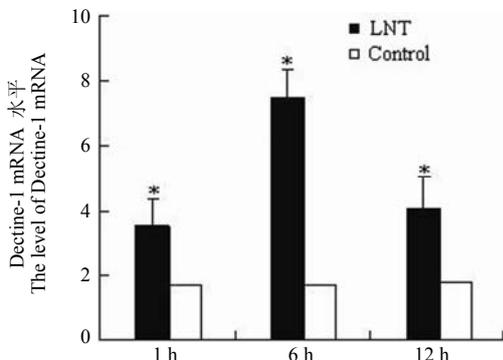


图 1 LNT 对 Dectin-1 的 mRNA 表达水平的影响
Figure 1 The effect of LNT on the level of Dectin-1 mRNA

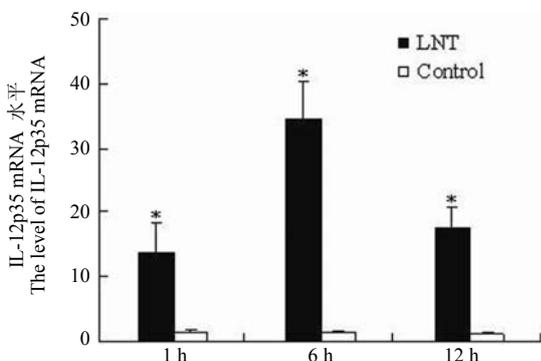


图 2 LNT 对 IL-12p35 mRNA 水平的影响
Figure 2 The effect of LNT on the level of IL-12p35 mRNA

2.2 LNT 对 IL-12p35、IL-12p40 mRNA 表达水平的影响

LNT 作用 THP-1 细胞 1、4、6 h 后，IL-12p35、IL-12p40 的 mRNA 表达水平的变化情况见图 2 和图 3。与培养基对照组比较，LNT 组 IL-12p35、IL-12p40 的 mRNA 水平在刺激不同时间后均显著增高 ($*P < 0.0001$)。

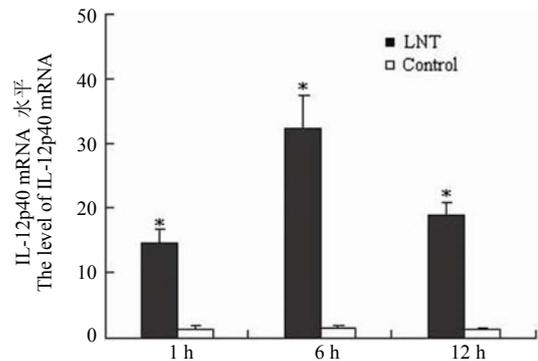


图 3 LNT 对 IL-12p40 mRNA 水平的影响
Figure 3 The effect of LNT on the level of IL-12p40 mRNA

2.3 LNT 对 IL-12 蛋白分泌的影响

不同浓度组 (1、5、10 $\mu\text{g/ml}$) 的 LNT 作用 THP-1 细胞 6 h，上清液中 IL-12 蛋白含量结果见图 4。三组含量均明显高于培养基对照组 ($*P < 0.0001$)。

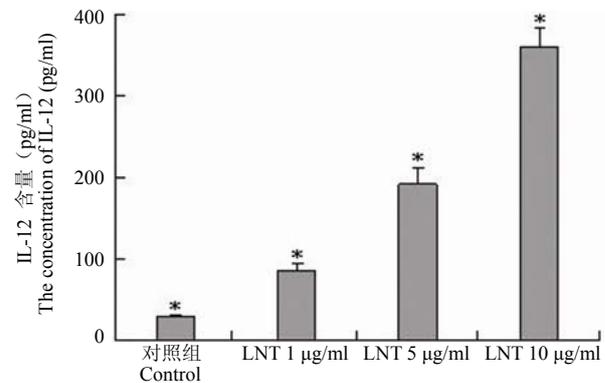


图 4 LNT 对 IL-12 蛋白分泌的影响
Figure 4 The effect of LNT on the secretion of IL-12 protein

2.4 Dectin-1 抑制剂 laminarin 对 LNT 诱导 IL-12 分泌的影响

不同浓度 laminarin (100、50 $\mu\text{g/ml}$) 预处理 THP-1 细胞后，再予 5 $\mu\text{g/ml}$ LNT 刺激，检测上清液中 IL-12 的含量，结果见图 5。与 LNT 组比较，laminarin 预处理组 IL-12 分泌量分别降低了 51% 和 26%，差异有统计学意义 ($**P < 0.0001$)。

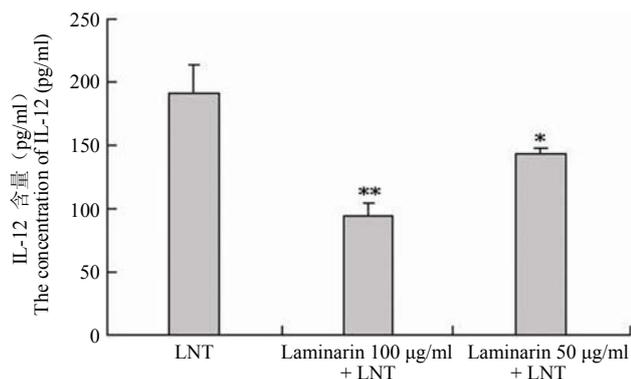


图5 Dectin-1 抑制剂 laminarin 对 LNT 诱导 IL-12 分泌的影响

Figure 5 The effect of dectin-1 inhibitor laminarin on the secretion of IL-12 induced by LNT

和 $*P < 0.01$)。

3 讨论

香菇多糖已被证实具有较强的免疫调节作用,能激活巨噬细胞、LAK 细胞、NK 细胞等固有免疫细胞^[1]。有研究发现可通过诱导消化道肿瘤患者上调 Th1 型细胞因子分泌(如 IL-2、IL-12)并抑制 Th2 型细胞因子分泌(如 IL-4)来影响获得性免疫反应^[3]。而对于免疫细胞是如何识别 LNT 而诱发相应免疫反应的相关机制尚未充分揭示。近来发现 Dectin-1 作为一种 C 型凝集素样受体家族的成员,是识别 β -1,3 和(或) β -1,6 葡聚糖的高亲和性关键受体,分布于树突状细胞、单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、某些亚类的 T 淋巴细胞等免疫细胞以及上皮、角膜和皮肤等组织^[4-6]。本研究旨在初步明确人单核细胞系 THP-1 细胞能否通过所表达的 Dectin-1 来识别香菇多糖并诱导免疫反应。

研究发现 THP-1 细胞上 Dectin-1 的 mRNA 表达水平在 LNT 作用后出现上调现象,与无刺激细胞对照组比较,在作用 1 h 后,该受体 mRNA 水平出现升高,6 h 达到峰值,在作用 24 h 后仍可出现较高水平的表达,结果提示 LNT 在一定范围内能以时间-效应方式上调 THP-1 细胞 Dectin-1 的 mRNA 表达。

IL-12 是由 p40 和 p35 两个亚基构成的异源二聚体,分子量约为 $(70 \sim 75) \times 10^3$,编码 p35 和 p40 的基因位于不同的染色体,转录由各自的启动子和增强子调控,具有免疫活性的 IL-12p70 需要两亚基共同表达后聚合而成,主要由单核巨噬细胞、DC 细胞等分泌^[7]。Murata 等^[8]报道 LNT 能

诱导小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-12 蛋白,李丹等^[9]采用 ELISA 法检测 LNT 体外与人 PBMC 细胞作用后 IL-12 水平显著增加。本研究与上述研究结果一致,发现 LNT 刺激 THP-1 单核细胞后,能显著促进 IL-12 的分泌,且随 LNT 浓度增高而升高,呈现剂量依赖方式。LNT 还能上调 IL-12p35 和 p40 两个亚基的 mRNA 表达,并呈现时间-效应关系。

THP-1 细胞预先与不同浓度的 Dectin-1 抑制剂 laminarin 共孵育后,再应用 LNT 刺激,发现与 laminarin 未预处理组比较,分泌 IL-12 的含量明显降低,且与 laminarin 的浓度相关,当浓度升高,释放 IL-12 的含量则随之降低。这进一步表明 LNT 诱导 THP-1 细胞分泌释放 IL-12 的能力是与 Dectin-1 对其识别和结合有关。

IL-12 能促进 CD4⁺ 细胞向 Th1 型漂移而增强免疫反应, Th1 细胞进而诱导 CTL、NK 和巨噬细胞的增生和活化,共同参与肿瘤抑制反应^[10]。本研究结果初步表明人单核巨噬细胞系 THP-1 细胞能依赖所表达的 Dectin-1 识别香菇多糖而诱导分泌 IL-12。这为进一步揭示香菇多糖参与机体抗肿瘤免疫反应的机制提供理论依据。在今后研究中,还要对 Dectin-1 相关的下游信号传导通路,包括脾脏酪氨酸激酶(Syk)-蛋白酶募集域 9(CARD9)信号通路及丝氨酸-苏氨酸激酶-1(Raf-1)信号通路^[11]在此效应中的作用进行深入探讨。

参考文献

- [1] Chan GC, Chan WK, Sze DM. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol*, 2009, 2:25.
- [2] Oba K, Kobayashi M, Matsui T, et al. Individual patient based meta-analysis of lentinan for unresectable/recurrent gastric cancer. *Anticancer Res*, 2009, 29(7):2739-2745.
- [3] Yoshino S, Tabata T, Hazama S, et al. Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Res*, 2000, 20(6C):4707-4711.
- [4] Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*, 2001, 4139(6851):36-37.
- [5] Brown GD, Herre J, Williams DL, et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 2003, 197(9):1119-1124.
- [6] Li M, Liu ZH, Chen Q, et al. Insoluble beta-glucan from the cell wall of *Candida albicans* induces immune responses of human THP-1 monocytes through Dectin-1. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(5):496-501.
- [7] Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*, 1994, 84(12):

- 4008-4027.
- [8] Murata Y, Shimamura T, Tagami T, et al. The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(5):673-689.
- [9] Li D, Shang H, Jiang YJ, et al. In vitro immune regulatory effect of lentinan on HIV-infected PBMC. *Chin J Immunol*, 2004, 20(4):253-255. (in Chinese)
- 李丹, 尚红, 姜拥军, 等. 香菇多糖体外抗 HIV 的免疫调节作用的实验研究. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(4):253-255.
- [10] Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*, 2007, 117(5):1175-1183.
- [11] Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol*, 2009, 10(2):203-213.

Lentinan induces the production of IL-12 by mediated by Dectin-1 in human THP-1 monocytes

CHEN Qing, CHEN Xiao, SUN Jun, ZENG Rong, HU Su-quan, LI Min, LIU Wei-da

【Abstract】

Objective To investigate whether lentinan (LNT) could induce the production of IL-12 mediated by Dectin-1 in human THP-1 monocytes (a human acute monocytic leukemia cell line).

Methods Human THP-1 cells were challenged with LNT *in vitro*. The mRNA expressions of Dectin-1, IL-12p35 and IL-12p40 in THP-1 cells treated with LNT were assayed by real time reverse transcription polymerase chain reaction. The secretion of IL-12 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The effect of the Dectin-1 inhibitor laminarin on the production of IL-12 was determined in THP-1 cells induced by LNT.

Results LNT increased the mRNA expressions of Dectin-1, IL-12p35, IL-12p40 and secretion of IL-12 in THP-1 cells. Pretreatment with Dectin-1 inhibitor laminarin significantly inhibited the LNT-induced production of IL-12 in THP-1 cells.

Conclusion Dectin-1 may play an important role in LNT-induced production of IL-12 in human THP-1 monocytes.

【Key words】 Lentinan; Macrophages; Lectins, c-type; IL-12

Author Affiliations: Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042, China (CHEN Qing, SUN Jun); Department of Medical Mycology, Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Nanjing 210042, China (CHEN Xiao, ZEN Rong, HU Su-quan, LI Min, LIU Wei-da)

Corresponding Author: LI Min, Email: minli08@gmail.com

www.cmbp.net.cn

Chin Med Biotechnol, 2012, 7(1):26-29

· 信息站点 ·

卫生部办公厅关于加强脊髓灰质炎和麻疹防控工作的通知

为切实做好脊灰和麻疹防控工作, 卫生部提出以下工作要求: ①切实加强组织领导; ②强化疫情主动监测; ③开展查漏补种月活动; ④做好突发疫情处置工作。详情请登陆卫生部网站 <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohjbyfkzj/s3581/201201/53941.htm> 查阅。