

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.21.003

文章编号: 1005-8982(2016)21-0013-06

论著

免疫抑制剂对酵母聚糖诱导巨噬细胞 Dectin-1、Toll 样受体 2 及肿瘤坏死因子 - α 表达的影响

毛亚男¹, 王雯², 王东², 张波¹

(1.安徽医科大学,安徽 合肥 230032;2.空军总医院 呼吸内科,北京 100142)

摘要:目的 研究霉酚酸酯和环孢素 A 对酵母聚糖(Zymosan A)诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞模式识别受体 Dectin-1、Toll 样受体 2(TLR2)表达及细胞因子肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)释放的影响。**方法** 体外培养 RAW264.7 巨噬细胞,分别给予不同浓度的霉酚酸酯、环孢素 A 预处理细胞 24 h,再利用 100 μ g/ml Zymosan A 单独刺激细胞,逆转录聚合酶链反应和流式细胞术检测细胞 Dectin-1、TLR2 mRNA 和蛋白水平的变化,酶联免疫吸附试验检测上清液中 TNF- α 浓度的变化。**结果** Zymosan A 单独作用巨噬细胞 Dectin-1、TLR2 mRNA 和蛋白水平明显上调,TNF- α 浓度升高($P < 0.05$)。Zymosan A 作用于霉酚酸酯或环孢素 A 预处理 24 h 的巨噬细胞 Dectin-1、TLR2 mRNA 和蛋白水平较 Zymosan A 单独作用组明显下调,TNF- α 分泌量减少($P < 0.05$)。**结论** 霉酚酸酯和环孢素 A 抑制巨噬细胞 Dectin-1 和 TLR2 的转录和翻译,并下调 TNF- α 的释放,降低机体对真菌病原体的清除能力,这可能是应用霉酚酸酯和环孢素 A 引起难控性真菌感染的机制之一。

关键词: 霉酚酸酯;环孢素 A;酵母聚糖;模式识别受体;细胞因子

中图分类号: R96

文献标识码: A

Effect of immunosuppressants on Zymosan A-induced expressions of Dectin-1, TLR2 and TNF- α in macrophages

Ya-nan Mao¹, Wen Wang², Dong Wang², Bo Zhang¹

(1. Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China; 2. Department of Respiratory Medicine, General Hospital of Chinese Air Force, Beijing 100142, China)

Abstract: Objective To study the effects of Mycophenolate mofetil and Cyclosporin A on Zymosan A-induced expressions of Dectin-1, Toll-like receptor 2 (TLR2) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in RAW264.7 macrophages. **Methods** During *in vitro* culture, RAW264.7 macrophages were pre-treated with different dosages of Mycophenolate mofetil and Cyclosporine A for 24 h, and then stimulated with 100 μ g/ml of Zymosan A alone. RT-PCR was used to detect the expressions of Dectin-1 and TLR2 mRNAs in RAW264.7 macrophages and flow cytometry was used to detect the average fluorescence intensity of Dectin-1 and TLR2 proteins. TNF- α level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The expressions of Dectin-1 and TLR2 mRNAs and proteins, as well as the concentration of TNF- α increased significantly in the Zymosan A+ macrophage group ($P < 0.05$). Mycophenolate mofetil and Cyclosporin A inhibited the expressions of Zymosan A-induced Dectin-1 and TLR2 mRNAs and proteins in various degrees and reduced the secretion of cytokine TNF- α ($P < 0.05$). **Conclusions** Mycophenolate mofetil and Cyclosporin A reduce the transcription and translation of Dectin-1 and TLR2 and the secretion of the inflammatory cytokine TNF- α induced by Zymosan A, aggravating infection by inhibiting the body's ability to recognize and remove the fungal pathogens. It is probably one of the key mechanisms that Mycophenolate mofetil and

收稿日期:2016-04-06

[通信作者] 张波, E-mail: zhangbohuxi@sina.com

Cyclosporin A cause refractory fungal infection.

Keywords: Mycophenolate mofetil; Cyclosporin a; Zymosan a; pattern-recognition receptors; cytokine

免疫抑制剂被广泛应用于自身免疫病及移植抗宿主病的预防和治疗,目的在于控制免疫反应的加剧^[1]。然而长期接受大剂量免疫抑制剂治疗,机体免疫功能遭到严重破坏,对外界病原菌的抵抗力减弱,极易发生难以控制的感染性疾病,尤其是侵袭性真菌感染,严重威胁免疫抑制患者的生存。巨噬细胞等固有免疫细胞通过模式识别受体(pattern-recognition receptors, PRRs)区分自我和非我,识别并结合微生物表面病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)启动快速的天然免疫防御反应,进而触发持久的特异性的适应性免疫反应^[2],介导机体对致病真菌的杀灭和清除。环孢素 A 和霉酚酸酯是临床最常用的两种免疫抑制剂,与真菌感染的发病率和死亡率有着密切的联系。本研究通过体外模拟真菌感染试验,观察环孢素 A 和霉酚酸酯对酵母聚糖(Zymosan A)诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1、Toll 样受体 2(Toll-like receptors 2, TLR2)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达的影响,从模式识别水平探讨环孢素 A、霉酚酸酯与真菌感染之间的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞购自南京凯基生物公司细胞库。复苏细胞,用含 10% 新生牛血清的罗斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute, RPMI)1640 培养基在 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 孵箱中培养,0.25% 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)胰蛋白酶消化传代 2~3 次后,以 1×10⁵ 个/ml 密度接种于 35 mm 培养皿。

1.2 主要试剂

Zymosan A 购自美国 Sigma 公司,超纯 RNA 提取试剂盒、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒、PCR Mixture 购自北京康为世纪生物科技有限公司,抗小鼠 PE-Dectin-1 抗体、抗小鼠 PE-TLR2 抗体购自德国美天旆生物技术有限公司, TNF- α 酶联免疫吸附试验(enzymelinked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司,霉酚酸酯、环孢素 A 购自大连美仑生物技术有限公司。

1.3 实验分组

实验分霉酚酸酯+Zy 组、环孢素 A+Zy 组、阳性对照组(Zy 组)和空白对照组,其中霉酚酸酯+Zy 组、环孢素 A+Zy 组又分为低浓度、中浓度和高浓度 3 个组别。具体步骤如下:①向各实验组的培养皿中分别加入霉酚酸酯(0.10、0.25 和 0.50 μ g/ml)或环孢素 A (2.5、5.0 和 10.0 μ g/ml)预处理;阳性对照组和空白对照组加入等量完全培养基,24 h 后弃净原培养基。②空白对照组给予等量完全培养基,其余各组分别加入 100 μ g/ml Zymosan A 刺激细胞^[3]。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测 Dectin-1、TLR2 mRNA 表达

Zymosan A 干预后 4 h 后,按照超纯 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。按照世纪康为 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒要求进行反转录,聚合酶链反应扩增条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 1 min,共 40 个循环。引物合成由上海生物工程股份有限公司设计完成,序列如下:①Dectin-1 正向引物:5'-AGACTTCAGCACTCAAGACATCCA-3',反向引物:5'-CAGGATTCCTAAACCCACTGCAA-3';②TLR2 正向引物:5'-CCCCTTCAGGCTCTTTGAC-3',反向引物:5'-GCCACTCCAGGTAGGTCTTG-3';③脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk);④髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88);⑤ β -actin 正向引物:5'-TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCC-3',反向引物:5'-CTAGAAGCATTGCGGTG GACGATG-3'。待反应结束后,采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 进行相对定量分析。

1.5 流式细胞术检测 Dectin-1、TLR2 蛋白的表达

Zymosan A 作用细胞 3 和 6 h 后,用 0.25% EDTA-胰蛋白酶消化细胞并转移至流式管中,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗后重悬细胞,分别加 5 μ l 抗小鼠 PE-Dectin-1 抗体和抗小鼠 PE-TLR2 抗体,室温避光 20 min 进行荧光标记染色, PBS 漂洗离心,弃掉残余抗体,上机检测各组细胞的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)。

1.6 ELISA 检测 TNF- α 的表达

Zymosan A 作用细胞 12 h 后收集上清液,按照

TNF- α 试剂盒说明书,检测各组上清液中 TNF- α 的浓度。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用独立样本 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,多组间的两两比较用 Bonferroni 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

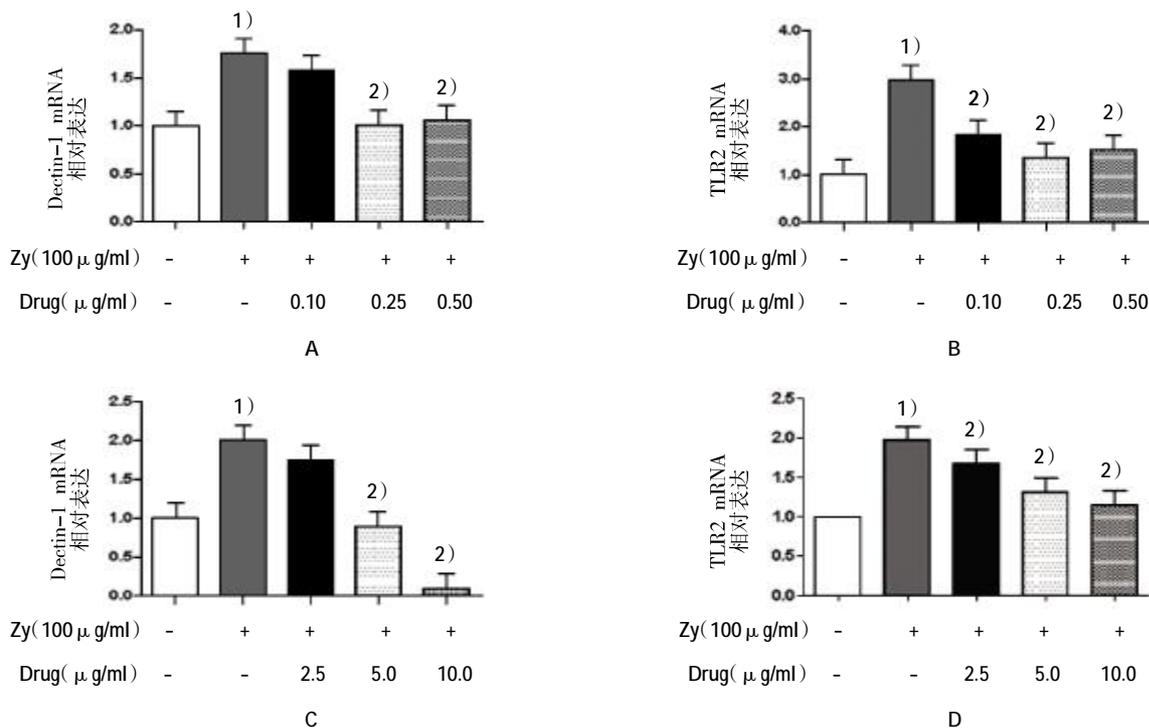
2.1 霉酚酸酯、环孢素 A 对 Zymosan A 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1 和 TLR2 mRNA 表达的影响

Zymosan A 单独 RAW264.7 巨噬细胞 4 h 后 Dectin-1 (1.757 ± 0.020) 和 TLR2 (2.970 ± 0.649) 表达水平与空白对照组 (1.000 ± 0.000) 比较,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 99.546$ 和 $74.816, P = 0.000$), Zymosan A 上调巨噬细胞 Dectin-1 和 TLR2 的转录。就 Dectin-1 和 TLR2 mRNA 表达水平而言,霉酚酸酯 $0.10 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、霉酚酸酯 $0.25 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、霉酚酸酯 $0.50 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、Zy 组 4 组比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 12.652$ 和 $54.953, P = 0.000$)。环孢素 A $2.5 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、环孢素 A $5.0 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、

环孢素 A $10.0 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、Zy 组 Dectin-1 和 TLR2 mRNA 表达水比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 138.202$ 和 $34.434, P = 0.000$)。应用中、高浓度的霉酚酸酯和环孢素 A 预先处理 RAW264.7 巨噬细胞再受到 Zymosan A 刺激后,与单独应用 Zymosan A 刺激组比较,经 Bonferroni 法检验,Dectin-1 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 3 种浓度的霉酚酸酯和环孢素 A 预处理细胞后均能下调 Zymosan A 诱导的 TLR2 mRNA 的表达水平($P < 0.05$)。见图 1 和表 1、2。

2.2 霉酚酸酯、环孢素 A 对 Zymosan A 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 Dectin-1 和 TLR2 蛋白表达的影响

空白对照组 Dectin-1 蛋白免疫荧光强度为 (32.483 ± 2.597), Zymosan A 单独刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 3 h 后 Dectin-1 蛋白免疫荧光强度为 (47.060 ± 3.310), 经 t 检验,差异有统计学意义($t = 6.746, P = 0.003$), Zymosan A 促进细胞表面 Dectin-1 蛋白表达。霉酚酸酯 $0.50 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、环孢素 A $10.0 \mu\text{g/ml} + \text{Zy}$ 组、Zy 组的 Dectin-1 蛋白 MFI 比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 49.109, P = 0.000$)。预先给予 $0.50 \mu\text{g/ml}$ 霉酚酸酯或 $10.0 \mu\text{g/ml}$ 环孢素 A 处理后,再受到 Zymosan A 刺激的 RAW264.7 细胞表面 Dectin-1 蛋白荧光强度分别为 (22.967 ± 2.098)



A, B: 霉酚酸酯; C, D: 环孢素 A。1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 Zy 组比较, $P < 0.05$

图 1 霉酚酸酯、环孢素 A 对 Zymosan A 诱导 RAW264.7 细胞 Dectin-1、TLR2 mRNA 表达的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

表 1 霉酚酸酯对 Zymosan A 诱导 Dectin-1、TLR2 mRNA 表达的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	Dectin-1 mRNA	P ₁ 值	TLR2 mRNA	P ₂ 值
Zy 组	1.757 ± 0.020	-	2.970 ± 0.649	-
MMF 0.10 μg/ml+Zy 组	1.578 ± 0.261	1.000	1.846 ± 0.169	0.000
MMF 0.25 μg/ml+Zy 组	1.013 ± 0.276	0.000	1.368 ± 0.213	0.000
MMF 0.50 μg/ml+Zy 组	1.063 ± 0.343	0.001	1.530 ± 0.325	0.000

注: P₁: 与 Zy 组的 Dectin-1 mRNA 比较; P₂: 与 Zy 组的 TLR2 mRNA 比较

和(23.193 ± 2.852), 低于 Zymosan A 单独刺激组(P < 0.01)。给予 Zymosan A 单独作用 6 h 后, 巨噬细胞表面 TLR2 免疫荧光强度(776.453 ± 29.847) 高于空白对照组(549.153 ± 35.424), 差异有统计学意义(t = 15.018, P = 0.003); 霉酚酸酯 0.50 μg/ml+Zy 组、环孢素 A 10.0 μg/ml+Zy 组、Zy 组的 TLR2 蛋白 MFI 比较, 经方差分析, 差异有统计学意义(F = 34.434, P = 0.000)。MMF 0.50 μg/ml+Zy 组和 CsA 10.0 μg/ml+Zy 组的 TLR2 免疫荧光强度分别为(578.697 ± 25.382) 和(597.763 ± 25.113), 与 Zymosan A 单独作用组比较, 经 Bonferroni 法检验, 差异有统计学意义。见图 2 和表 3、4。

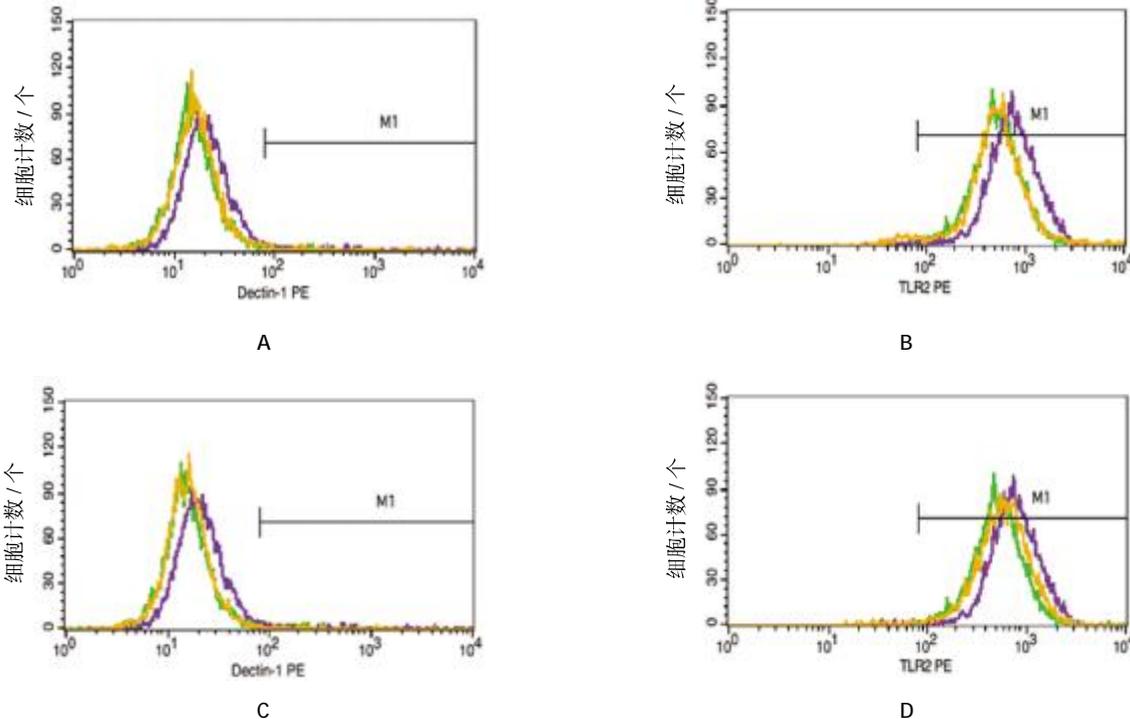
表 2 环孢素 A 对 Zymosan A 诱导 Dectin-1、TLR2 mRNA 表达的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	Dectin-1 mRNA	P ₁ 值	TLR2 mRNA	P ₂ 值
Zy 组	2.009 ± 0.209	-	1.980 ± 0.162	-
CsA 2.5 μg/ml+Zy 组	1.751 ± 0.274	0.138	1.678 ± 0.222	0.018
CsA 5.0 μg/ml+Zy 组	0.907 ± 0.110	0.000	1.303 ± 0.078	0.000
CsA 10.0 μg/ml+Zy 组	0.118 ± 0.038	0.001	1.151 ± 0.128	0.000

注: P₁: 与 Zy 组的 Dectin-1 mRNA 比较; P₂: 与 Zy 组的 TLR2 mRNA 比较

2.3 霉酚酸酯、环孢素 A 对 Zymosan A 诱导 RAW264.7 巨噬细胞分泌 TNF-α 的影响

空白对照组可检测到低水平 TNF-α [(720.450 ± 61.642)pg/ml], Zymosan A 共培养的 RAW264.7 巨噬细胞分泌 TNF-α 水平为(1 908.752 ± 32.070)pg/ml, 经 t 检验, 差异有统计学意义(t = 34.203, P = 0.003), Zymosan A 能够促进 TNF-α 的表达。霉酚酸酯 0.10 μg/ml+Zy 组、霉酚酸酯 0.25 μg/ml+Zy 组、霉酚酸酯 0.50 μg/ml+Zy 组、环孢素 A 2.5 μg/ml+Zy 组、环孢素 A 5.0 μg/ml+Zy 组、环孢素 A 10.0 μg/ml+Zy 组与 Zy 组的 TNF-α 分泌水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义(F = 675.899, P = 0.000)。不同浓度



A、B: 霉酚酸酯 + Zymosan A; C、D: 环孢素 A + Zymosan A。绿色线条代表空白对照组, 紫色线条代表 ZA 组, 黄色线条代表霉酚酸酯 0.50 μg/ml + Zymosan A 组或环孢素 A 10.0 μg/ml + Zymosan A 组

图 2 霉酚酸酯、环孢素 A 对 Zymosan A 诱导 RAW264.7 细胞 Dectin-1 和 TLR2 蛋白的影响

表 3 Zymosan(100 μ g/ml)对巨噬细胞表达 Dectin-1、TLR2 蛋白 MFI 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Dectin-1 蛋白	t_1 值	P_1 值	TLR2 蛋白	t_2 值	P_2 值
空白对照组	32.483 \pm 2.597			549.153 \pm 35.424		
Zy 组	47.060 \pm 3.310	6.746	0.003	776.453 \pm 29.847	15.018	0.003

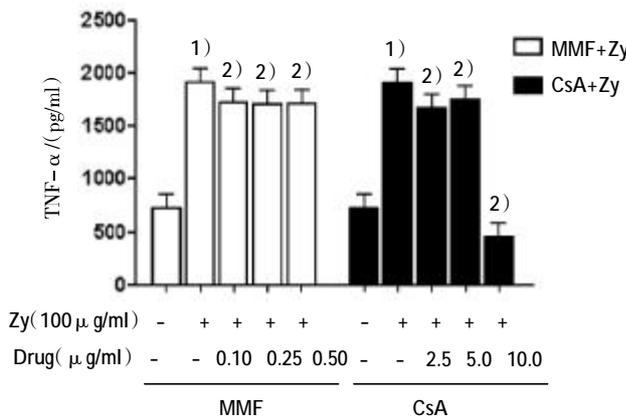
注: t_1, P_1 : 与空白对照组的 Dectin-1 蛋白比较; t_2, P_2 : 与空白对照组的 TLR2 蛋白比较

的环孢素 A 和霉酚酸酯均能抑制 Zymosan A 诱导的 TNF- α 的释放水平,其中大剂量的环孢素 A (10.0 μ g/ml)抑制作用最为明显。见图 3 和表 5。

表 4 霉酚酸酯、环孢素 A (μ g/ml)对 Zymosan A 诱导 Dectin-1、TLR2 蛋白 MFI 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Dectin-1 蛋白	P_1 值	TLR2 蛋白	P_2 值
Zy 组	47.060 \pm 3.310	-	776.453 \pm 29.847	-
MMF 0.50 μ g/ml + Zy 组	22.967 \pm 2.098	0.000	578.697 \pm 25.382	0.000
CsA 10.0 μ g/ml + Zy 组	23.193 \pm 2.852	0.000	597.763 \pm 25.113	0.000

注: P_1 : 与 Zy 组的 Dectin-1 蛋白比较; P_2 : 与 Zy 组的 TLR2 蛋白比较



1) 与空白组比较, $P < 0.05$; 2) 与 Zy 组比较, $P < 0.05$

图 3 霉酚酸酯对 Zymosan A 诱导 RAW264.7 巨噬细胞 TNF- α 分泌的影响 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

表 5 霉酚酸酯、环孢素 A 对 Zymosan A 诱导 TNF- α (pg/ml)分泌的影响 ($n=4, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	P_1 值	P_2 值
Zy 组	1 908.752 \pm 32.070	-	-
MMF 0.10 μ g/ml + Zy 组	1 714.344 \pm 26.852	0.000	0.000
MMF 0.25 μ g/ml + Zy 组	1 701.978 \pm 41.446	0.000	0.000
MMF 0.50 μ g/ml + Zy 组	1 706.031 \pm 26.786	0.000	0.000
CsA 2.5 μ g/ml + Zy 组	1 665.385 \pm 17.197	0.000	0.000
CsA 5.0 μ g/ml + Zy 组	1 744.354 \pm 25.409	0.000	0.000
CsA 10.0 μ g/ml + Zy 组	449.482 \pm 70.639	0.000	0.000

注: P_1 : 与 Zy 组比较; P_2 : 与 CsA 10.0 μ g/ml + Zy 组比较

3 讨论

免疫抑制剂的应用为器官移植后的抗宿主排斥反应、自身免疫性疾病、非自身免疫性疾病,如肿瘤和过敏性疾病等的预防及治疗提供了有效的方法和手段^[4]。然而,因免疫功能过度受损引发的感染性疾病,尤其是侵袭性真菌感染,一直是免疫抑制人群面临的重要问题。尽管新的抗真菌药物已被研发出来,但是因为早期诊断困难,病情进展速度快,且发病率和病死率呈逐年攀升趋势,因此侵袭性真菌病仍严重威胁着免疫低下患者的生存。

外来病原体入侵机体时,启动先天性免疫反应和适应性免疫反应形成稳固复杂的免疫网络清除致病真菌。巨噬细胞等固有免疫细胞是先天性免疫系统中的“前哨兵”。通过细胞表面或内部的 PRRs 识别暴露于病原微生物表面的 PAMPs,启动快速有机的炎症信号转导通路,分泌大量炎症细胞因子和趋化因子,驱动并局限中性粒细胞等炎症细胞到达感染部位,触发细胞的吞噬作用、呼吸爆发等功能,进而启动适应性免疫反应,促进机体对真菌病原体的清除^[5-6]。大量研究发现,与真菌感染密切相关的 PRRs,主要涉及 C 型凝集素受体家族(C-type lectin family, CLR)和 Toll 样受体家族^[7],其中尤以 Dectin-1 和 TLR2 的研究最为广泛,是近年来真菌相关免疫识别机制的研究热点。

Zymosan A 来源于酿酒酵母细胞壁,富含 β -葡聚糖和甘露聚糖,常被用来模拟体外真菌感染的免疫学研究。Dectin-1 和 TLR2 协同参与 Zymosan A 的免疫识别过程,通过激活下游的 Syk 和 MyD88 信号通路,最终导致核转录因子活性增强并释放大量的细胞因子 TNF- α ,协同放大炎症反应^[8]。本实验结果表明,在 Zymosan A 刺激小鼠巨噬细胞的早期,可显著上调受体 Dectin-1、TLR2 mRNA 和蛋白的表达水平,促进细胞因子 TNF- α 的释放,最终诱导炎症反应的发生。

环孢素 A 和霉酚酸酯目前是肾移植患者术后最常用的两种免疫抑制剂,在减少移植物抗宿主反应

促进移植术后移植物存活的同时,也往往能够引起患者感染症状加重,甚至发生难控性真菌感染,引起病死率显著升高。目前,有关环孢素 A 和霉酚酸酯对病原体识别过程的影响,具体机制尚不清楚。特异性 T 淋巴细胞功能调节药环孢素 A,能够选择性抑制 T 淋巴细胞相关因子如 IL-2、TNF- α 的分泌,同时削弱宿主的体液/细胞免疫。此外,环孢素 A 发挥免疫抑制功能的具体机制可能也涉及到模式识别水平。GREENBLATT 等^[9]认为,环孢素 A 通过抑制 Dectin-1 通路下调细胞因子 IL-10 的表达,来调控对中性粒细胞的抗真菌免疫功能,而与 TLR2/Myd88 通路无关,并由此得出 Dectin-1 是环孢素 A 作用机制的上游元件。洪英礼等^[10]通过实验观察到,与空白对照组大鼠比较,皮下注射环孢素 A 的大鼠 TLR2 和 TLR4 mRNA 和蛋白水平明显升高。而本研究结果则显示,中浓度和高浓度的环孢素 A 能够抑制 Zymosan A 激活 Dectin-1 mRNA 和蛋白水平的表达,低、中、高 3 种浓度的环孢素 A 均能下调 Zymosan A 诱导的 TLR2 的转录和翻译,且具有一定的剂量依赖性。本实验结果还表明,环孢素 A 能够抑制 Zymosan A 诱导的 TNF- α 的释放,大剂量的环孢素作用尤为明显。由此笔者推测环孢素 A 能同时抑制 Dectin-1/Syk 和 TLR2/Myd88 信号通路,抑制炎症细胞因子 TNF- α 的分泌。霉酚酸酯是一种具有抗代谢功能及强效免疫抑制功能的霉酚酸半合成物,其有效活性成分为霉酚酸(mycophenolic acid,MPA)。前期研究发现,霉酚酸酯主要通过抑制 T/B 淋巴细胞增殖,并减少 B 淋巴细胞分泌相关抗体发挥强效、选择性的免疫抑制功能^[11],而关于霉酚酸酯是否影响机体模式识别功能的文献报道十分罕见。本研究结果表明,与同环孢素作用相似,霉酚酸酯也能够下调正常状态细胞 Dectin-1、TLR2 的转录和翻译,对 Zymosan A 诱导的 Dectin-1、TLR2 mRNA 和蛋白的表达也表现出一定的抑制作用,降低 TNF- α 的释放水平,从而抑制机体免疫防御机制被激活。

笔者推测霉酚酸酯和环孢素 A 通过下调激活状态下的模式识别受体 Dectin-1 和 TLR2 的转录和翻译,抑制巨噬细胞炎症细胞因子 TNF- α 的释放,导致机体处于免疫耐受状态,降低机体对真菌病原体的敏感性,无法有效地清除入侵的真菌病原体,这可能是免疫抑制剂霉酚酸酯和环孢素 A 诱导感染加重,甚至难控性侵袭性真菌感染的发病机制之一。

除环孢素 A 和霉酚酸酯外,其他种类免疫抑制剂诱发真菌感染的发病机制是否与调节 Dectin-1 和 TLR2 信号通路的激活相关,尚需要体内外基础实验和临床实验的进一步验证。通过探讨免疫抑制剂在受体识别过程中的重要靶点,揭示免疫抑制剂加重真菌感染的具体发病机制,为将来研究预防和控制免疫抑制患者并发真菌感染的靶向药物,改善临床预后提供一定的理论和实践意义。

参 考 文 献:

- [1] LIBERMAN A C, JIMENA K, DAMIÁN R, et al. Molecular mechanisms of action of some immunosuppressive drugs [J]. *Medicina*, 2008, 68(6): 455-464.
- [2] PINKE K H, LIMA H G, CUNHA F O, et al. Mast cells phagocytose *Candida albicans* and produce nitric oxide by mechanisms involving TLR2 and Dectin-1 [J]. *Immunobiology*, 2015, 221 (2): 220-227.
- [3] YANG Z, MARSHALL J S. Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation [J]. *Immunobiology*, 2009, 214(4): 321-330.
- [4] VINCENT J L, RELLO J, MARSHALL J, et al. EPIC II Group of Investigators. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units [J]. *Jama the Journal of the American Medical Association*, 2009, 302(21): 2323-2329.
- [5] LEMOINE S, JARON B, TABKA S, et al. Dectin-1 activation unlocks IL-12A expression and reveals the TH1 potency of neonatal dendritic cells [J]. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 2015, 136(5): 1355-1368.
- [6] ROSENTUL D C, PLANTINGA T S, MARIJE O, et al. Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2011, 204(7): 1138-1145.
- [7] GERSUK G M, UNDERHILL D M, LIQUN Z, et al. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states [J]. *Journal of Immunology*, 2006, 176(6): 3717-3724.
- [8] DILLON S, AGRAWAL S, BANERJEE K, et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(4): 916-928.
- [9] GREENBLATT M B, ANTONIOS A, BELLA H, et al. Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2010, 207(5): 923-931.
- [10] 洪英礼,金英顺,崔镇花,等. TLR 活化参与环孢素 A 诱发的慢性肾小管间质损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(3): 555-559.
- [11] 潘春树,何雪菲,钱华. 常用免疫抑制剂的作用机制及应用 [J]. *安徽医药*, 2008, 12(10): 892-894.

(童颖丹 编辑)