

昆布多糖对巨噬细胞识别、吞噬烟曲霉功能的影响[※]

● 赵文杰* 陈丽红 李晓霞

摘要 目的:以巨噬细胞与烟曲霉分生孢子的共培养体系为研究基础,检测昆布多糖对地塞米松作用前后巨噬细胞吞噬功能的影响。方法:共培养细胞分为四组:A.烟曲霉分生孢子组;B.烟曲霉分生孢子+昆布多糖组;C.烟曲霉分生孢子+地塞米松组;D.烟曲霉分生孢子+昆布多糖+地塞米松组。分别以巨噬细胞存活率、吞噬指数为指标,研究昆布多糖对巨噬细胞识别、吞噬功能的影响。结果:(1)与烟曲霉分生孢子组比较,地塞米松可降低巨噬细胞的吞噬指数($P<0.05$),增加共培养巨噬细胞的存活率($P<0.05$),昆布多糖可上调巨噬细胞的吞噬指数($P<0.05$),降低共培养巨噬细胞的存活率($P<0.05$);(2)与地塞米松组比较,昆布多糖可上调巨噬细胞的吞噬指数($P<0.05$),降低共培养巨噬细胞的存活率($P<0.05$)。结论:昆布多糖可增强免疫抑制状态下巨噬细胞识别与吞噬烟曲霉分生孢子的作用。

关键词 昆布多糖;烟曲霉;巨噬细胞;识别;吞噬

昆布是临床常用中药,具有消痰软坚、泄热利水、止咳平喘、散结的作用。常用于瘰疬、瘰癧、疝气下坠、咳嗽、水肿。多个经方以昆布为君药,如昆布散、三香昆布丸、五癭昆布方、海藻玉壶汤等,在治疗瘰疬、瘰癧等疾病中发挥了重要的作用。昆布的主要活性成分为昆布多糖(Laminarin)。近年来,研究表明其可通过增强T细胞的增殖,提高NK细胞的活性等作用提高机体免疫力,亦可通过诱导肿瘤细胞凋亡而实现其抗肿瘤作用^[1]。昆布多糖以 β -1,3连接的葡聚糖为主,与真菌细胞壁成分 β -1,3葡聚糖分子结构相似,是模式识别受体TLR-2、Dectin-1的配体。细胞壁作为药物靶点研究已成为抗真菌药物的研究热点^[2]。模式识别受体是机体天然免疫识别病原微生物的第一道防线,其识别并引导吞噬细胞吞噬病

原真菌是机体清除病原菌的最重要的防御机制。昆布多糖具有成为新的抗真菌的免疫调节剂或疫苗的潜能,但其作用过程及机制并未得到完整的解释^[3-4]。

糖皮质激素是临床常用的抗炎及免疫抑制剂。长期大剂量应用糖皮质激素治疗的病人可出现致命的侵袭性真菌感染(invasive fungal infections, IFI),临床常见的侵袭性真菌为白色念珠菌(*Candida albicans*)及烟曲霉(*Aspergillus*)。如何降低免疫抑制状态下机会性真菌感染,如何有效地治疗深部真菌病已成为现实的难题。地塞米松(Dexamethasone, DEX)可降低巨噬细胞的识别、吞噬真菌的能力^[5],但其机制尚不明确。那么昆布多糖能否作为免疫调节剂对巨噬细胞识别与吞噬病原真菌功能产生影响,从而对抗免疫抑制下的机会性真菌感染?

笔者通过建立昆布多糖、地塞米松与巨噬细胞共培养的免疫抑制模型,研究昆布多糖对巨噬细胞识别、吞噬病原真菌的作用,以期探讨昆布多糖对免疫抑制状态下巨噬细胞的免疫识别及吞噬功能的影响。从而为机会性真菌的防治提供新的治疗思路:

※基金项目 福建省医学创新项目(No.2011 CXB45)

* 作者简介 赵文杰,医学博士,副主任医师。主要从事皮肤真菌病及自身免疫病的研究。

• 作者单位 厦门市中医院皮肤美容科(福建 厦门 361009)

针对模式识别受体激动剂的应用及靶向治疗的定位等,亦为常用中药昆布的开发与利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 真菌的取材及鉴定及培养 实验用烟曲霉购自中国微生物菌种保藏管理委员会医学真菌中心,标准菌株为:烟曲霉 CCCC ID A1。刮取菌落加入盛有无菌生理盐水 10mL 及 8 个玻璃珠的三角烧瓶内,振荡 20min 后用 8 层粗纱滤去菌丝,制成浓度为 1×10^7 CFU/mL 孢子混悬液。

1.2 巨噬细胞 RAW264.7 RAW264.7 细胞系购自中科院细胞库,离心去冻存液:放至离心机中 500G 离心 2min,弃上清,应用 37℃、5% CO₂ 完全培养液培养重悬细胞,吹打,调整细胞浓度为 5×10^6 分瓶。置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱内,换液、传代时间视细胞生长情况而定。

1.3 试验方法 巨噬细胞培养 2~3 天后,换液,巨噬细胞 1×10^6 cell/孔,每孔加入 1×10^7 烟曲霉分生孢子进行实验。共培养细胞分为四组:A. 烟曲霉分生孢子组;B. 烟曲霉分生孢子+昆布多糖组;C. 烟曲霉分生孢子+地塞米松组;D. 烟曲霉分生孢子+昆布多糖+地塞米松组。巨噬细胞存活率检测:各组共培养 2h 后,取出培养板中的盖玻片。台盼蓝染色,光镜下观察 200 个巨噬细胞,计算存活率。巨噬细胞吞噬指数检测:吞噬指数=被吞噬的分生孢子数/吞噬了分生孢子的巨噬细胞数。各组共培养 2h 后,取出培养板中的盖玻片,PAS 染色,光镜下观察 200 个巨噬细胞,计算吞噬指数。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 24 统计软件进行统计学处理。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组均数间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 昆布多糖对巨噬细胞存活率的影响 台盼蓝染色,光镜下观察巨噬细胞存活率:(1)与烟曲霉分生孢子组比较,地塞米松可增加共培养巨噬细胞的存活率($P < 0.05$),昆布多糖可降低共培养巨噬细胞的存活率($P < 0.05$);(2)与地塞米松组比较,昆布多糖可降低共培养巨噬细胞的存活率($P < 0.05$)。见图 1、图 2。

2.2 昆布多糖对巨噬细胞吞噬指数的影响

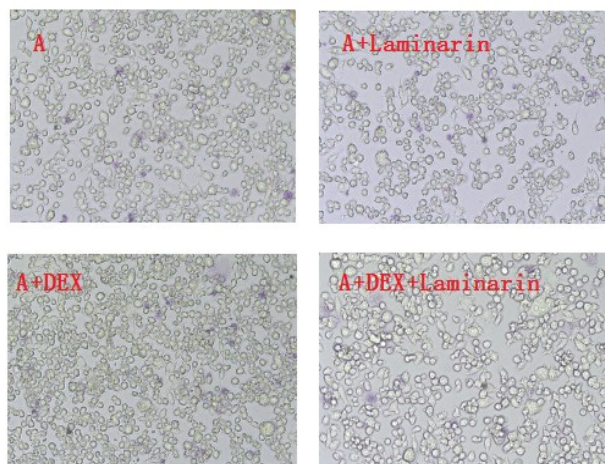


图 1 各组共培养 2h 后巨噬细胞存活率(×400)
(A 为烟曲霉分生孢子,DEX 为地塞米松,L 为昆布多糖)

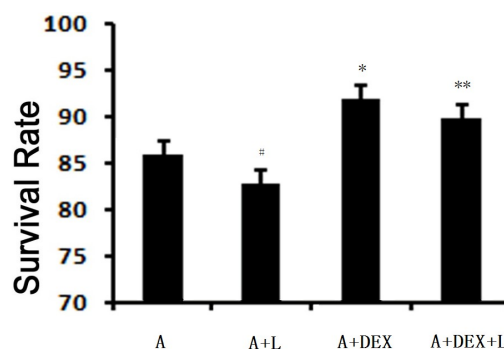


图 2 巨噬细胞与烟曲霉分生孢子共培养 2h 后巨噬细胞存活率(A 为烟曲霉分生孢子,DEX 为地塞米松,L 为昆布多糖)

注:与烟曲霉分生孢子组比较,地塞米松可增加共培养巨噬细胞的存活率(* $P < 0.05$),昆布多糖可降低共培养巨噬细胞的存活率(* $P < 0.05$);与地塞米松组比较,昆布多糖降低共培养巨噬细胞的存活率(** $P < 0.05$)($n=5$)

与烟曲霉分生孢子组比较,昆布多糖可增加共培养巨噬细胞的吞噬指数($P < 0.05$);地塞米松降低共培养巨噬细胞的吞噬指数($P < 0.05$)。与地塞米松组比较,昆布多糖可增加巨噬细胞的吞噬指数($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

3 讨论

昆布,药用来源为海带科植物海带或翅藻科植物昆布的干燥叶状体,是一种重要的食用及药用植物。昆布气腥,味咸,入肝、胃、脾经,具有化痰、软坚散结、止咳平喘、散结行水之功效。《本草纲目》中指出:“昆布下气,……海岛之人爱食之,为无好菜,只

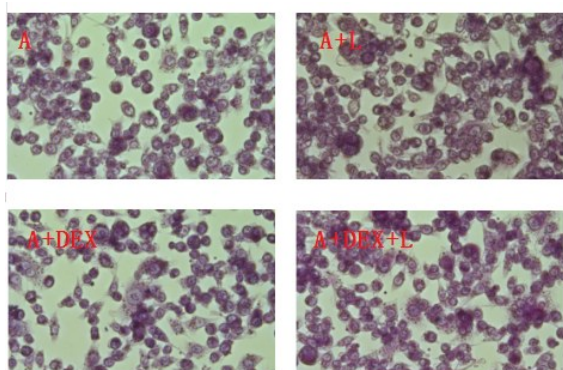


图3 各组巨噬细胞吞噬分生孢子($\times 400$) (A为烟曲霉分生孢子, L为昆布多糖, DEX为地塞米松)

食此物, 服久相习, 病亦不生……”初步提及了昆布的“免疫增强”作用。随着昆布食用及药用功能的研究不断深入, 有学者发现其可以提高机体细胞免疫从而增强机体免疫力^[3]。笔者在本实验中研究了昆布多糖对巨噬细胞的免疫识别及吞噬功能的影响, 进一步证实了昆布的免疫增强作用。

正常免疫状态下, 人体吸入的真菌孢子可被机体天然的免疫系统清除, 因此不易致病。现今对自身免疫性疾病、变态反应性疾病、肿瘤、器官移植术后等的治疗仍大量采用糖皮质激素。随之而来的免疫抑制状态下的侵袭性真菌感染越来越多, 逐渐成为这类疾病的重要致死因素。抗真菌药物耐药增加亦成为治疗中的棘手问题^[6], 上市不久的棘白素类抗真菌药也出现了耐药现象^[7]。烟曲霉是临床上仅次于白念珠菌的一种重要的条件致病真菌。近年来烟曲霉病的发病率呈上升趋势^[8-9]。机体杀灭烟曲霉的免疫细胞主要是巨噬细胞。其识别、吞噬、杀伤烟曲霉的功能决定了曲霉病的发展方向。校正免疫抑制状态下的巨噬细胞识别、吞噬真菌能力亦成为抗真菌治疗的关键。

在本研究中, 笔者发现地塞米松可以降低巨噬细胞对烟曲霉分生孢子的吞噬指数, 同时提高共培养巨噬细胞的存活率。巨噬细胞存活率高, 表明其因吞噬杀伤病原真菌后的细胞凋亡率低, 即其识别吞噬病原真菌功能低下。昆布多糖则能够增加巨噬细胞的吞噬指数, 降低共培养巨噬细胞的存活率, 并可以逆转地塞米松对巨噬细胞识别与吞噬的抑制作用。说明昆布多糖可以增强巨噬细胞对烟曲霉识别与吞噬, 从而说明了昆布多糖在机体抗真菌中的免疫增强作用。

笔者在以往的实验中发现了昆布多糖可上调

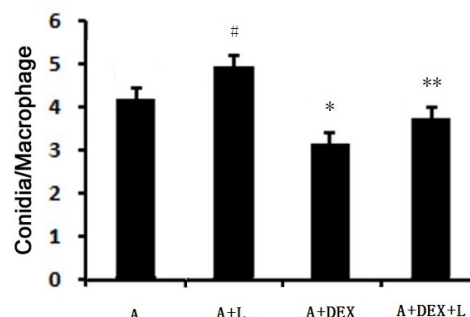


图4 各组巨噬细胞的吞噬指数(A为烟曲霉分生孢子, L为昆布多糖, DEX为地塞米松)

注: 与烟曲霉分生孢子组比较, 昆布多糖可增加共培养巨噬细胞的吞噬指数($^{\#}P<0.05$); 地塞米松降低共培养巨噬细胞的吞噬指数($^{*}P<0.05$)。与地塞米松组比较, 昆布多糖可增加巨噬细胞的吞噬指数($^{**}P<0.05$) ($n=5$)

TLR-2与Dectin-1表达^[10], 其不能激活巨噬细胞产生炎症因子, 而高表达的模式识别受体可增强巨噬细胞的识别病原能力。结合本实验可以推论: 昆布多糖的抗真菌天然免疫增强作用, 即其增强巨噬细胞识别与吞噬病原真菌的作用, 可能与其上调模式识别受体TLR-2与Dectin-1相关。而正因为昆布多糖不能对机体产生促炎反应即致病性反应, 所以其临床药理安全性高。

昆布多糖有望成为侵袭性真菌病防治的免疫调节剂及有效的靶向药物。真菌免疫过程十分复杂, 其被机体天然免疫识别及被杀伤细胞吞噬后, 激活细胞通过不同的信号转导过程最终产生效应性炎症因子, 最终完成炎症过程。昆布多糖通过何种信号途径来实现其免疫增强作用, 仍需要深入研究。昆布是廉价、高产的常用中药, 开发其功效及疗效, 具有深远的意义。

参考文献

- [1] ZENG M, WU X, LI F, et al. Laminaria japonica polysaccharides effectively inhibited the growth of nasopharyngeal carcinoma cells in vivo and in vitro study[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2017, 69(7): 527-532.
- [2] 房文霞. 烟曲霉细胞壁作为药物靶标的鉴定研究[J]. 广西科学 2017, 24(1): 61-66.
- [3] Wu ML, Huang TC, Hung HJ, et al. Investigation of beta-glucans binding to human/ mouse dectin-1 and associated immunomodulatory effects on two monocyte/macrophage cell lines[J]. Biotechnol Prog. 2010, 26

(下转第60页)