

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20194380

· 论 著 ·

大鼠肺部侵袭性光滑假丝酵母菌感染过程中 Dectin-1 蛋白和 IL-17、IL-23 的含量变化及意义

黄 婷¹, 骆雪萍¹, 赵 莹¹, 吴呈霖²

(1. 桂林医学院第二附属医院重症医学科, 广西 桂林 541001; 2. 十堰市太和医院呼吸内科, 湖北 十堰 442000)

[摘 要] **目的** 通过建立大鼠肺部侵袭性光滑假丝酵母菌感染模型, 探讨大鼠肺组织树突状细胞相关 C 型凝集素-1(Dectin-1)和血清、肺泡灌洗液中白细胞介素(IL)-17、IL-23 含量的变化及意义。**方法** 将 54 只 SD 大鼠随机分为 A、B、C 组, 每组 18 只。A 组不做任何处理, B 组直接气管内灌注热处理光滑假丝酵母菌菌液, C 组先免疫抑制后再气管内灌注等剂量热处理光滑假丝酵母菌菌液。在感染后第 1、3、5 天, 观察各组大鼠肺组织的病理变化, 并对各组大鼠肺组织中的 Dectin-1 蛋白表达量以及大鼠血清、肺泡灌洗液中的 IL-17 及 IL-23 含量进行检测及比较。**结果** C 组大鼠肺组织炎症病变及肺损伤最严重, B 组次之, A 组无炎症改变。A 组血清及肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量及肺组织 Dectin-1 蛋白表达量在各时间点均最低; B 组和 C 组中 IL-17、IL-23 含量及肺组织 Dectin-1 蛋白的表达量均随时间增高, 且 C 组 IL-17、IL-23 含量以及 Dectin-1 蛋白表达量在各个时间点均高于 A 组和 B 组。通过多元回归分析得出, 对大鼠进行免疫抑制、大鼠真菌感染及感染后的时间长短均分别对大鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量及肺组织 Dectin-1 蛋白的表达量有影响, 其中应用免疫抑制剂对大鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量及肺组织 Dectin-1 蛋白的表达量影响程度最大, 大鼠真菌感染及感染后的时间长短的影响次之。**结论** Dectin-1 是识别热处理光滑假丝酵母菌感染的重要受体, 诱导产生的 IL-17、IL-23 参与抗真菌的免疫应答, 并可能导致肺损伤。

[关 键 词] 热处理光滑假丝酵母菌; Dectin-1 受体; 白细胞介素-17; 白细胞介素-23

[中图分类号] R519

Changes and significance of Dectin-1 protein, IL-17, and IL-23 in rat lung infection with invasive *Candida glabrata*

HUANG Ting¹, LUO Xue-ping¹, ZHAO Ying¹, WU Cheng-lin² (1. Intensive Care Unit, The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Taihe Hospital, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes and significance of dendritic cell-associated C-type lectin-1 (Dectin-1) in rat lung tissue as well as interleukin-17 (IL-17) and interleukin-23 (IL-23) in rat serum and alveolar lavage fluid by establishing rat invasive *Candida glabrata* (*C. glabrata*) infection model. **Methods** 54 SD rats were randomly divided into group A, B and C, with 18 rats in each group. Group A didn't receive any treatment, group B was directly intratracheally perfused with heat-treated *C. glabrata* solution, group C was first immunosuppressed and then intratracheally perfused with equal dose of heat-treated *C. glabrata*. On the 1st, 3rd, and 5th day after infection, pathological changes in rat lung tissue were observed, expression of Dectin-1 protein in rat lung tissue, as well as concentration of IL-17 and IL-23 in rat serum and alveolar lavage fluid were detected and compared. **Results** Inflammatory lesion and lung injury were most serious in group C, followed by group B, and no inflammatory changes were found in group A. Concentrations of IL-17 and IL-23 in serum and alveolar lavage fluid as well as expres-

[收稿日期] 2018-11-05

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2016GXNSFAA380015)

[作者简介] 黄婷(1992-), 女(汉族), 湖北省十堰市人, 医师, 主要从事重症感染方面研究。

[通信作者] 骆雪萍 E-mail: 2522418296@qq.com

sion of Dectin-1 protein in lung tissue of group A were the lowest at all time points; levels of IL-17 and IL-23, as well as expression of Dectin-1 protein in lung tissue of group B and group C increased progressively with time, concentrations of IL-17 and IL-23 as well as expression of Dectin-1 protein in group C were all higher than group A and B at different time points. Multivariate regression analysis showed that immunosuppression, fungal infection and the duration of infection in rats had effect on concentrations of IL-17 and IL-23 in rat serum and alveolar lavage fluid as well as expression of Dectin-1 protein in lung tissue respectively, application of immunosuppressive agents had the greatest effect on the concentrations of IL-17 and IL-23 in rat serum and alveolar lavage fluid as well as expression of Dectin-1 protein in lung tissue, followed by fungal infection and the duration of infection in rats. **Conclusion** Dectin-1 is an important receptor for identifying heat-treated *C. candida* infection, which induces IL-17 and IL-23 involving anti-fungal immune response and may lead to lung injury.

[Key words] heat-treated *Candida glabrata*; Dectin-1 receptor; interleukin-17; interleukin-23

侵袭性念珠菌病(invasive candidiasis, IC)是指真菌侵入人体内脏、血液或表皮角质层以下深部组织结构引起的感染。过去 IC 最常见的病原体是白假丝酵母菌,近年来随着重症监护病房中高龄、免疫缺陷或免疫功能低下患者的增多,以及机械通气、动静脉穿刺、持续床旁血液透析、体外膜肺氧合等各种侵入性操作的增加,我国光滑假丝酵母菌血症已仅次于白假丝酵母菌,在全部假丝酵母菌感染中上升至第 4 位^[1]。光滑假丝酵母菌对氟康唑敏感性低,对一线治疗药物棘白菌素的耐药率也在逐年增加,从而导致光滑假丝酵母菌感染发病率高,预后差,病死率高^[2]。

β -葡聚糖是真菌致病的重要成分,树突状细胞相关 C 型凝集素-1(Dectin-1)受体在抗真菌感染免疫以及 β -葡聚糖介导的机体固有免疫调节中起着至关重要的作用。白细胞介素(IL)-17 是新近发现的 TH17 细胞所分泌的效应因子,具有强大的促炎作用。IL-23 是维持 TH17 细胞亚群分化和稳定的重要因子,对 IL-17 的生成至关重要,同时本身也是一种促炎症因子。研究^[3]证实,白假丝酵母菌感染时宿主通过免疫系统激活 TH17 细胞,产生 IL-17、IL-22 等细胞因子,募集中性粒细胞杀灭真菌孢子。以往对光滑假丝酵母菌及其 β -葡聚糖信号通路、下游相关细胞因子的研究相对较少,本研究采用经气管内灌注光滑假丝酵母菌液复制光滑假丝酵母菌肺部感染的动物模型,通过观察大鼠肺组织病理改变,肺组织中 Dectin-1 蛋白表达量的变化,血清及肺泡灌洗液中 IL-17 及 IL-23 含量的动态变化,从而进一步探讨 Dectin-1 通路对侵袭性肺部热处理光滑假丝酵母菌感染的识别,以及 IL-17、IL-23 表达和变化的意义,为光滑假丝酵母菌感染的发病机制、治疗提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级雌性 SD 大鼠 54 只,体重 180~220 g,由桂林医学院实验动物中心提供。动物合格证号 SCXK 桂 2013-0001,按清洁级标准正常饲养。

1.1.2 主要实验试剂 光滑假丝酵母菌标准株(编号为 9627)购于上海酶联生物科技有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司,PVDF 膜购自北京索莱宝科技有限公司,兔抗鼠 Dectin-1 一抗购自美国 ABCAM 公司,山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术公司, β -actin 一抗、二抗及 ELC 发光液均购自武汉 Proteintech 公司,IL-17 及 IL-23 酶联接免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自美国 eBioscience 公司。

1.1.3 热处理光滑假丝酵母菌悬液的制备 将光滑假丝酵母菌菌株接种于沙堡琼脂培养基,置于真菌培养箱培养 48 h 后,用细菌接种环挑取菌落,用灭菌生理盐水冲洗 2 次后再用生理盐水稀释成菌悬液,采取比浊法将其含菌量定量至 5×10^7 CFU/mL,按照文献^[4]进行热处理(95℃水浴热处理 30 min),备用。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和模型制备 健康雌性 SD 大鼠 54 只,所有大鼠均适应性喂养 3 d 后,采用随机数字表法分为空白对照组(A 组)、直接感染组(B 组)和免疫抑制感染组(C 组),每组 18 只。A 组全程正常饲养,C 组大鼠连续 5 d 腹腔注射地塞米松(0.6 mg/kg),B 组腹腔注射等剂量生理盐水。5 d 后 B 组及 C 组大鼠予 10%水合氯醛(3 mL/kg)

腹腔注射麻醉后,仰卧固定于鼠板,用小型压舌板将舌体推开,在透射光源下观察到大鼠会厌和声带的运动后,以16 G 静脉留置针作为气管导管在明视下进行气管插管,B组及C组大鼠在气管插管后一次性快速灌注准备好的热处理菌悬液0.3 mL,连续感染3 d,灌注后立即竖立鼠板,水平摇晃3 min使菌液在双肺内均匀分布。

1.2.2 大鼠处死以及血清、肺泡灌洗液的收集 三组大鼠分别于第3次感染后第1、3、5天,每组随机选取6只大鼠,麻醉后固定于鼠板上,经膈肌心脏放血处死大鼠并收集血液1 mL,4℃ 4 000 r/min离心20 min收集血清;消毒颈部皮肤,暴露颈部气管,用5 mL 灭菌注射器针头呈30°角轻柔插入气管1/2处,随后水平进针约2.5 cm并固定,结扎右侧肺门,将5 mL 4℃ 预冷灭菌生理盐水灌入左肺,间隔1 min后缓慢回抽,反复3次为灌洗1次,共灌洗2次,收集所有的肺泡灌洗液,4℃ 1 500 r/min离心10 min收集上清,与血清一起置于-80℃冰箱保存,备用。

1.2.3 大鼠肺组织的收集 分离肺组织,取右上、中叶肺组织于-80℃保存,用于蛋白印迹法检测Dectin-1蛋白的表达量;取右下肺置于10%多聚甲醛固定、脱水,石蜡包埋,常规切片HE染色。

1.2.4 IL-17、IL-23含量的检测 采用ELISA法检测。取3组大鼠血清及肺泡灌洗液的上清液标本各100 μL,所有标本均设2个复孔检测,严格按照IL-17、IL-23试剂盒说明书的操作步骤检测标本中IL-17、IL-23含量,得到的结果以pg/mL表示。

1.2.5 Dectin-1蛋白表达量的检测 采用Western Blot法进行。取冻存的肺组织50 mg进行组织匀浆,离心后取上清即为总蛋白,用BCA蛋白浓度定量试剂盒进行蛋白定量,用8%聚丙烯酰胺凝胶进行SDS-PAGE电泳,PVDF膜湿转,室温封闭2 h后分别加入Dectin-1一抗(1:2 000)、β-actin一抗(1:4 000) 4℃ 孵育过夜,洗涤3次后加入二抗室温孵育1 h,洗涤3次后用ECL化学试剂发光,用ChemiDo-eXRS图像采集系统采集图像,Image J软件检测条带灰度值,以Dectin-1蛋白目的条带与内参蛋白β-actin条带的灰度比值作为Dectin-1蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析 应用SPSS 18.0统计分析软件进行统计分析。各组实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,影响因素采用多元回归分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及病情观察 实验过程中,A组大鼠全程进食、饮水及活动无明显改变,精神好,较活跃,毛发光亮。B组大鼠活动在气管给药结束后第1天无明显改变,第3天及第5天逐渐有大鼠出现进食及饮水减少,精神稍差,活动较前减少,体重逐渐下降。C组大鼠从给药结束后第1天即开始出现食欲下降,进食及饮水明显减少,精神差,嗜睡,活动明显减少,口鼻部位出现淤血点,粪便软烂,体重明显下降,并且上述症状随时间加重。大鼠平均体重变化情况见图1。

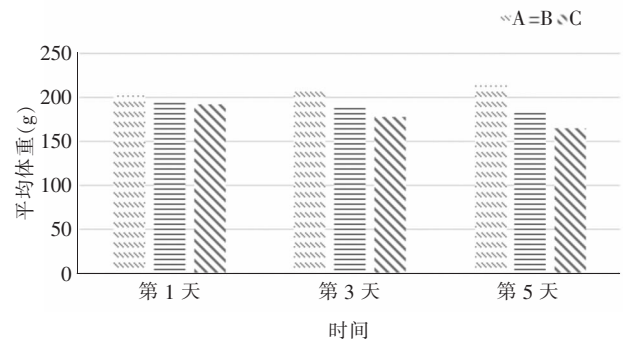


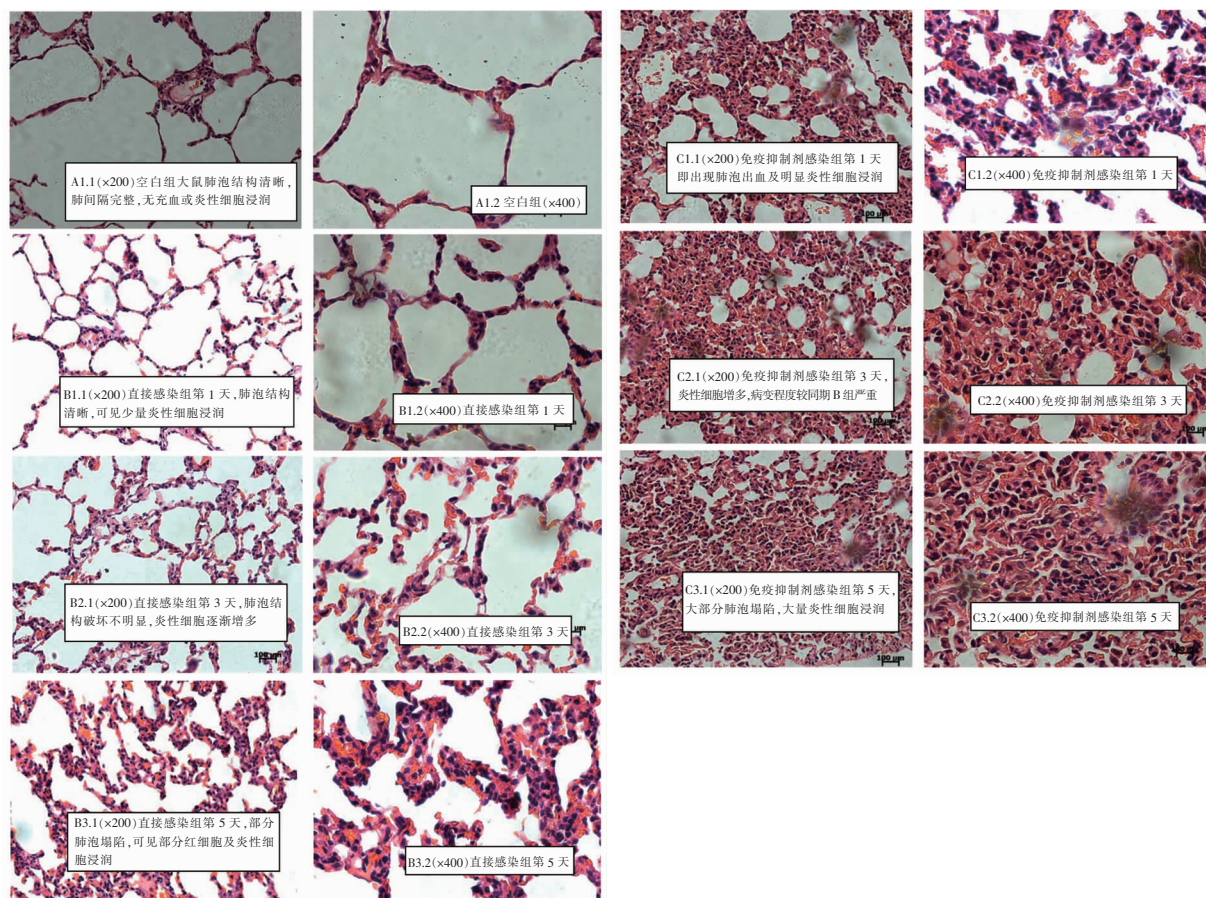
图1 三组大鼠平均体重变化情况

Figure 1 Changes in average body weight of three groups of rats

2.2 肺组织病理学改变

2.2.1 肉眼观察 肉眼见A组大鼠肺组织形态正常,质软,表面光滑呈粉红色,无充血、水肿,边缘锐薄。B组大鼠肺组织第1天稍肿胀,第3天及第5天可见充血、水肿,表面有散在质韧的灰白色病灶,第5天较第3天充血、水肿明显。C组大鼠肺组织病变最严重,充血、水肿明显,触之较硬、弹性差,表面有大小不一的灰白色病灶,病变程度随时间逐渐加重。

2.2.2 HE染色观察 显微镜下可见A组大鼠肺泡结构清晰,肺间隔完整,无充血或炎性细胞浸润,第1、3、5天无明显改变。B组大鼠部分肺泡塌陷,肺泡腔及肺间隔可见炎性细胞浸润,可见肺组织出血,病变严重程度随时间进行性加重。C组大鼠肺组织病变最严重,大部分肺泡塌陷,界限不清晰,病灶之间有大量炎性细胞浸润,肺组织出血、坏死明显,病变严重程度随时间进行性加重。见图2。



A1. 1(×200 倍) 及 A1. 2(×400 倍) 为空白对照组; B1. 1、B2. 1、B3. 1(×200 倍) 及 B1. 2、B2. 2、B3. 2(×400 倍) 分别为 B 组第 1、3、5 天; C1. 1、C2. 1、C3. 1(×200 倍) 及 C1. 2、C2. 2、C3. 2(×400 倍) 分别为 C 组第 1、3、5 天

图 2 三组大鼠肺组织病理检查结果

Figure 2 Pathological examination results of lung tissue in three groups of rats

2.3 三组大鼠血清中 IL-17、IL-23 的含量及影响因素比较 A 组大鼠血清中 IL-17、IL-23 含量在三组中均最低, B 组和 C 组大鼠血清中 IL-17、IL-23 含量均随时间增高, 同时 IL-17、IL-23 含量在各个时间点均是 C 组最高, B 组次之, A 组最低。采用多元回归分析得到对大鼠进行免疫抑制、大鼠真菌感

染及感染后的时间长短均分别对血清中 IL-17、IL-23 含量有影响, 其中应用免疫抑制剂对血清中 IL-17、IL-23 含量影响均最大; 对血清中 IL-17 含量而言感染后的时间影响次之, 真菌感染影响程度最低; 对血清中 IL-23 含量而言, 真菌感染影响程度次之, 感染后时间影响程度最低。见表 1、2。

表 1 各时间点三组大鼠血清中 IL-17、IL-23 含量(pg/mL, n = 6)

Table 1 Concentrations of serum IL-17 and IL-23 in three groups of rats at different time points (pg/mL, n = 6)

分组	IL-17			IL-23		
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天
A 组	14.85 ± 1.47	14.10 ± 1.26	14.55 ± 1.52	7.63 ± 1.33	6.31 ± 1.07	7.11 ± 1.35
B 组	18.78 ± 2.05	22.86 ± 3.56	27.98 ± 3.59	10.28 ± 2.36	11.85 ± 2.24	15.16 ± 3.07
C 组	31.08 ± 2.82	41.21 ± 4.89	57.90 ± 4.31	17.10 ± 2.49	20.55 ± 2.86	23.68 ± 3.92

表 2 血清中 IL-17、IL-23 浓度的影响因素

Table 2 Influencing factors for concentrations of IL-17 and IL-23 in serum

变量	IL-17			IL-23		
	回归系数及 95%CI	标准化回归系数	P	回归系数及 95%CI	标准化回归系数	P
免疫抑制剂	20.19(16.30,24.08)	0.668	<0.001	8.24(6.45,10.02)	0.621	<0.001
真菌感染	9.04(5.16,12.93)	0.299	<0.001	5.06(3.28,6.85)	0.381	<0.001
感染后时间	5.79(3.84,7.73)	0.332	<0.001	1.94(1.05,2.83)	0.253	<0.001

2.4 三组肺泡灌洗中 IL-17、IL-23 含量及影响因素比较 A 组肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量在三组中均最低, B 组和 C 组大鼠肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量均随时间增高, 同时 IL-17、IL-23 含量在各个时间点均是 C 组最高, B 组次之, A 组最低。采用多元回归分析得到对大鼠进行免疫抑制、

大鼠真菌感染及感染后的时间长短均分别对肺泡灌洗液中 IL-17 及 IL-23 含量有影响, 其中应用免疫抑制剂对两种炎症因子含量影响程度最大, 进行真菌感染影响程度次之, 感染后时间长短影响程度最低。以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、4。

表 3 各时间点三组大鼠肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 浓度 (pg/mL, $n = 6$)

Table 3 Concentrations of IL-17 and IL-23 in alveolar lavage fluid in three groups of rats at different time points (pg/mL, $n = 6$)

分组	IL-17			IL-23		
	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 1 天	第 3 天	第 5 天
A 组	17.99 ± 1.22	18.12 ± 1.32	17.63 ± 1.16	8.89 ± 1.77	9.41 ± 1.84	9.35 ± 1.68
B 组	26.93 ± 3.65	36.96 ± 3.91	48.18 ± 4.25	14.80 ± 3.76	17.65 ± 4.13	22.55 ± 3.84
C 组	50.46 ± 6.76	66.75 ± 6.74	80.43 ± 7.71	22.76 ± 3.97	28.36 ± 5.14	34.76 ± 4.12

表 4 肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 浓度的影响因素

Table 4 Influencing factors for concentrations of IL-17 and IL-23 in alveolar lavage fluid

变量	IL-17			IL-23		
	回归系数及 95%CI	标准化回归系数	P	回归系数及 95%CI	标准化回归系数	P
免疫抑制剂	28.52(23.78,33.26)	0.613	<0.001	12.40(9.70,15.11)	0.591	<0.001
真菌感染	19.42(14.69,23.17)	0.417	<0.001	9.37(6.67,12.08)	0.446	<0.001
感染后时间	8.44(6.07,10.80)	0.314	<0.001	2.23(0.88,3.57)	0.184	<0.05

2.5 相关性分析 经 Pearson 相关发现, B 组: (1) 血清中 IL23 和 IL17 呈正相关; (2) 肺泡灌洗液中 IL23 和 IL17 两个因子也呈正相关(r 分别为 0.885、0.849, 均 $P < 0.05$)。C 组: (1) 血清中 IL23 和 IL17 呈正相关; (2) 肺泡灌洗液中 IL23 和 IL17 两个因子也呈正相关(r 分别为 0.675、0.680, 均 $P < 0.05$)。IL-17 在大鼠血清及肺泡灌洗液中的表达呈正相关($r = 0.967, P < 0.05$), IL-23 在大鼠血清及肺泡灌洗液中的表达也呈正相关($r = 0.886, P < 0.05$)。

2.6 三组大鼠肺组织 Dectin-1 蛋白表达量及影响

因素分析 A 组第 1、3、5 天 Dectin-1 蛋白表达均很低。B 组和 C 组大鼠肺组织 Dectin-1 蛋白表达量随感染时间增加而增高, 第 1、3、5 天均是 C 组蛋白表达量最高, B 组次之, A 组表达量最低。采用多元回归分析得到对大鼠进行免疫抑制、大鼠真菌感染及感染后的时间长短均分别对肺组织 Dectin-1 蛋白表达量含量有影响, 其中应用免疫抑制剂对 Dectin-1 蛋白表达量影响程度最大, 真菌感染影响程度次之, 感染后时间长短影响程度最低。以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3 及表 5、6。

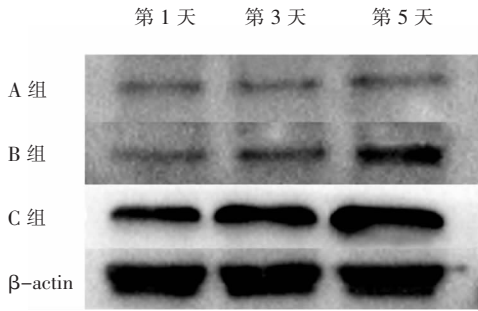


图 3 各时间点三组大鼠肺组织 Dectin-1 蛋白的表达情况
Figure 3 Expression of Dectin-1 protein in lung tissue in three groups of rats at different time points

表 5 各时间点三组大鼠肺组织 Dectin-1 蛋白的相对表达量 (n = 3)

Table 5 Relative expression of Dectin-1 protein of lung tissue in three groups of rats at different time points (n = 3)

分组	第 1 天	第 3 天	第 5 天
A 组	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.01
B 组	0.20 ± 0.03	0.32 ± 0.05	0.46 ± 0.05
C 组	0.49 ± 0.08	0.63 ± 1.10	0.77 ± 0.07

表 6 大鼠肺组织 Dectin-1 蛋白相对表达含量的影响因素

Table 6 Influencing factors for relative expression of Dectin-1 protein in lung tissue

变量	回归系数及 95%CI	标准化回归系数	P
免疫抑制剂	0.30(0.23,0.37)	0.653	<0.001
真菌感染	0.16(0.10,0.24)	0.360	<0.001
感染后时间	0.09(0.06,0.13)	0.345	<0.05

3 讨论

人体的免疫系统分为固有免疫系统 (innate immunity) 和适应性免疫系统 (adaptive immunity), 当病原微生物入侵机体时首要面对的是机体固有免疫系统。在固有免疫中, 对机体而言最大的挑战就是通过有限的受体迅速识别大量不同的病原体并作出应答。系统性念珠菌病的宿主防御主要依靠吞噬细胞 (中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞) 对真菌细胞的摄取和杀死。

机体固有免疫系统通过病原模式识别受体 (PRRs) 识别入侵真菌的病原体相关分子模式 (PAMP), 激活免疫应答。真菌细胞壁作为最外层的细胞结构, 在真菌的致病性中起着重要作用^[5]。

真菌细胞壁是由 β-葡聚糖、几丁质和甘露糖蛋白组成的复杂结构, 而 β-葡聚糖是真菌细胞壁最内层结构, 作为重要的 PAMP 被外层的甘露糖-甘露聚糖蛋白层覆盖, 从而阻止了 PRRs 对 β-葡聚糖的直接识别^[6]。Goodridge 等^[7]发现通过热处理能破坏白假丝酵母菌细胞壁外层的甘露聚糖-甘露糖蛋白结构, 使细胞壁内层的 β-葡聚糖得以暴露, 从而被 C 型凝集素受体家族识别, 进而启动固有免疫开始发挥抗真菌作用。而本课题组前期研究^[8]发现, 经过热处理的光滑假丝酵母菌与活光滑假丝酵母菌同样具有较强的致病性。本研究先建立大鼠免疫抑制状态再经气管感染热处理光滑假丝酵母菌, 发现免疫抑制感染组大鼠较直接感染组大鼠一般情况更差, 病情更严重, 肺组织的炎性细胞浸润、充血及肺泡结构破坏等炎性病变更显著, 说明成功建立了大鼠热侵袭性热处理光滑假丝酵母菌肺部感染模型, 同时可以推测光滑假丝酵母菌通过热处理同样可以破坏了光滑假丝酵母菌细胞壁外层结构甘露聚糖-甘露糖蛋白结构, 使细胞壁内层的 β-葡聚糖得以暴露从而被 PRRs 识别, 进而启动固有免疫开始发挥抗真菌作用。

C 型凝集素受体 (CCRs) 属于 PRRs 家族, C 型凝集素 (如 MR、Dectin. 1、Dectin-2、DC-SIGN、Mincle), 可以介导宿主细胞对真菌的黏附和吞噬, 并激活细胞内信号通路产生抗真菌效应, 包括细胞因子的产生和氧化应激。Dectin-1 受体通过识别真菌细胞壁表面的 β-葡聚糖, 激活酪氨酸激酶 (SyK) 和 Raf-1 途径, 诱导产生多种细胞因子和趋化因子如肿瘤坏死因子 (TNF)-α、IL-2、IL-6、IL-10、IL-23 等, 在真菌的识别和免疫应答中起到重要作用, 并且参与影响 TH1、TH17 的分化^[9]。本研究通过 Western Blot 方法检测大鼠肺组织中 Dectin-1 蛋白的表达量及通过回归分析影响蛋白含量的因素, 可以看出真菌感染的 B 组和 C 组的大鼠 Dectin-1 蛋白表达量较未感染的 A 组明显增高, 同时真菌感染的 B 组和 C 组中的蛋白表达量均随感染时间增加而增高, 说明当热处理光滑假丝酵母菌感染机体后, 单核/巨噬细胞、中性粒细胞等抗原提呈细胞上的 Dectin-1 受体通过直接识别真菌细胞壁表面的 β-葡聚糖, 激活机体天然免疫产生大量的细胞因子和趋化因子对抗真菌感染。而免疫抑制感染组大鼠 Dectin-1 蛋白表达量从感染后第 1 天开始就较对照组及直接感染组明显增高, 肺组织病理改变更严重, 并且经过回归分析得到进行免疫抑制对 Dectin-1

蛋白含量影响最大,提示在等量致病菌感染机体时,免疫抑制状态下的大鼠较未免疫抑制的大鼠在光滑假丝酵母菌感染早期 Dectin-1 通路就被更多地激活,并产生大量的炎症因子及趋化因子,诱发更强烈的肺部炎症反应。

辅助性 17 细胞(Th17 细胞)是近年来发现的一种 CD4⁺ 效应 T 细胞,能分泌多种细胞因子,包括 IL-17、IL-21、IL-22 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),在维持黏膜内环境稳定中起着关键作用,有助于对抗细菌和真菌等病原体的入侵^[10]。IL-17 具有强大的促炎作用,能促进巨噬细胞、上皮细胞和成纤维细胞产生趋化因子将吞噬细胞募集到免疫反应部位,增强机体对抗真菌感染的保护性免疫作用。在原发肺曲霉菌感染患者中,能检测到 T 细胞 TH17 型表型特异性表达^[11];IL-17 缺陷小鼠比正常小鼠更易患系统性念珠菌病,在白假丝酵母菌感染后,TH17 细胞能在感染后早期产生 IL-17,在获得性免疫建立之前发挥重要作用^[12]。而 IL-23 不仅能刺激并维持 TH17 细胞分化,促进 IL-17 因子大量表达,同时 IL-23 本身还能通过记忆 T 细胞的扩增产生大量巨噬细胞集落刺激因子来促进单核细胞分化,与 IL-17 一起参与炎症反应^[13]。已有研究^[14-16]证实,在白假丝酵母菌感染及黄曲霉菌引起的超敏性肺炎中,Dectin-1 通过诱导由 IL-12 的 p19 和 p40 亚基组成的 IL-23 等 Th17 驱动细胞因子来调节 Th17 细胞的应答。本研究通过 ELISA 法检测大鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量的变化,发现 3 个时间点均是 C 组 IL-17 及 IL-23 的含量最高,B 组含量次之,A 组含量最低且无明显变化,对血清及肺泡灌洗液中两种炎症因子含量的影响因素进行回归分析可以得出,真菌感染的 B 组和 C 组的大鼠血清及肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 两种炎症因子含量均较未感染的 A 高,并且 B 组和 C 组两种因子随感染时间增加而增高,同时 B 组和 C 组大鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-23 的浓度均与 IL-17 浓度呈正相关,提示光滑假丝酵母菌模型建立成功后,IL-17、IL-23 全程参与抗光滑假丝酵母菌免疫过程,并且两种炎症因子的增长趋势与 Dectin-1 蛋白变化趋势与文献^[17-19]研究的结果一致,可以推测在大鼠侵袭性肺部光滑假丝酵母菌感染过程中,感染早期 Dectin-1 通路被激活后同样刺激 IL-23 分泌,IL-23 不仅参与诱导原始 CD4⁺ T 细胞向 TH17 细胞

分化并产生大量 IL-17,之后 IL-23 还与 IL-17 共同发挥促炎作用,促进巨噬细胞、上皮细胞和成纤维细胞产生趋化因子,将吞噬细胞募集到免疫反应部位,增强机体对抗真菌感染的保护性免疫作用。

同时本实验还发现,在处于免疫抑制状态的免疫抑制感染组各时间点 Dectin-1 蛋白和 IL-17、IL-23 两种炎症因子的含量均较直接感染组高,差异具有统计学意义,同时免疫抑制感染组大鼠肺组织较直接感染组有更多的炎症细胞浸润,肺组织结构破坏更严重,推测当机体处于免疫力低下或者免疫抑制状态时,Dectin-1 通路被过多激活产生更多下游炎症因子,过量表达的 IL-17、IL-23 募集过量炎症因子反而可能加重肺组织损伤。本研究还发现免疫抑制感染组、直接感染组大鼠肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量均比同组相同时间点的血清中高,结合本课题组前期对大鼠气道上皮细胞感染光滑假丝酵母菌的研究^[20],推测通过气管插管给予热处理光滑假丝酵母菌感染时,大鼠气道上皮细胞首先受到感染,其 Dectin-1 受体最先被激活,诱发 IL-23 的等炎症因子释放,促使 TH17 细胞分化并产生 IL-17,首先引起肺部感染进而引起全身炎症反应,使肺泡灌洗液中 IL-17、IL-23 含量高于血清,而当存在免疫抑制时,更严重的肺部炎症病变使这种差距更明显。结合上述研究结果可将机体抗念珠菌病的炎症反应设想为双刃剑,过度增强的炎症反应反而可能加重机体损伤,因此,Dectin-1 信号应由许多负性调节因子严格控制,以终止免疫和炎症反应并防止过度炎症反应发生。

综上所述,在大鼠肺部感染热处理光滑假丝酵母菌后,Dectin-1 通路早期被激活并产生 IL-6、IL-23 等细胞因子,其中 IL-23 参与诱导 TH17 细胞分化并促进 IL-17 产生,之后 IL-17、IL-23 与 Dectin-1 通路产生的其他炎症因子一起共同参与抗真菌的免疫过程,并且过强的 IL-17、IL-23 表达还可能参与介导肺组织损伤,若能使用 Dectin-1 受体抑制剂可能对减轻肺部炎症有一定作用。应当指出,目前关于 Th17 应答的大多数结果均来自于实验动物模型,人类 Th17 的分化过程可能与大鼠 Th17 的分化不完全相同,尚需进一步研究。而本研究从分子水平探索光滑假丝酵母菌及其 PRR 的致病性以及宿主免疫应答过程,希望能为今后临床上侵袭性光滑假丝酵母菌的感染及免疫治疗提供新思路 and 理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Xiao M, Fan X, Chen SC, et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida Parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(3): 802 - 810.
- [2] Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations[J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(12): 1724 - 1732.
- [3] Hernández-Santos N, Gaffen SL. Th17 cells in immunity to *Candida albicans*[J]. Cell Host Microbe, 2012, 11(5): 425 - 435.
- [4] Takahara K, Tokieda S, Ngaoka K, et al. C-type lectin SIGNR1 enhances cellular oxidative burst response against *C. albicans* in cooperation with Dectin-1[J]. Euro J Immunol, 2011, 41(5): 1435 - 1444.
- [5] Romani L. Immunity to fungal infections[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(4): 275 - 288.
- [6] Dambuza IM, Brown GD. C-type lectins in immunity: recent developments[J]. Curr Opin Immunol, 2014, 32: 21 - 27.
- [7] Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'[J]. Nature, 2011, 472(7344): 471 - 475.
- [8] 吴呈霖, 骆雪萍, 吴晔, 等. 大鼠侵袭性肺部热处理光滑念珠菌感染肺组织 Dectin-1 和 IL-10 的表达[J]. 广东医学, 2014, 35(22): 3468 - 3470.
- [9] Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 491 - 529.
- [10] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. Immunity, 2011, 34(2): 149 - 162.
- [11] Jolink H, de Boer R, Hombrink P, et al. Pulmonary immune responses against *Aspergillus fumigatus* are characterized by high frequencies of IL-17 producing T-cells[J]. J Infect, 2017, 74(1): 81 - 88.
- [12] Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, et al. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity[J]. Eur J Immunol, 2011, 41(2): 276 - 281.
- [13] Floss DM, Schröder J, Franke M, et al. Insights into IL-23 biology: from structure to function[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(5): 569 - 578.
- [14] Bhan U, Newstead MJ, Zeng X, et al. TLR9-dependent IL-23/IL-17 is required for the generation of Stachybotrys chartarum-induced hypersensitivity pneumonitis[J]. J Immunol, 2013, 190(1): 349 - 356.
- [15] Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 491 - 529.
- [16] Wüthrich M, Deepe GS Jr, Klein B. Adaptive immunity to fungi[J]. Annu Rev Immunol, 2012, 30: 115 - 148.
- [17] Drummond RA, Saijo S, Iwakura Y, et al. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity[J]. Eur J Immunol, 2011, 41: 276 - 281.
- [18] Saijo S, Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi[J]. Int Immunol, 2011, 23(8): 467 - 472.
- [19] Hardison SE, Brown GD. C-type lectin receptors orchestrate 22 antifungal immunity[J]. Nat Immunol, 2012, 13(9): 817 - 822.
- [20] 张雪, 骆雪萍, 白剑, 等. 热处理光滑念珠菌对大鼠气道上皮细胞 Dectin-1、IL-6 和 TNF- α 表达的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(7): 865 - 868.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:黄婷, 骆雪萍, 赵莹, 等. 大鼠肺部侵袭性光滑假丝酵母菌感染过程中 Dectin-1 蛋白和 IL-17、IL-23 的含量变化及意义[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(5): 380 - 387. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194380.

Cite this article as: HUANG Ting, LUO Xue-ping, ZHAO Ying, et al. Changes and significance of Dectin-1 protein, IL-17, and IL-23 in rat lung infection with invasive *Candida glabrata*[J]. Chin J Infect Control, 2019, 18(5): 380 - 387. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20194380.