

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.32.004

VGX-1027 对光滑念珠菌刺激大鼠气道上皮细胞 IL-1 β 和 TNF- α 表达影响的研究*

王玉春¹, 张 雪², 骆雪萍^{2 Δ}

(桂林医学院第二附属医院:1. 检验科;2. 重症医学科, 广西桂林 541199)

[摘要] **目的** 探讨未加免疫抑制剂 VGX-1027 大鼠气道上皮细胞(RTEC)与加入 VGX-1027 的 RTEC 分别与光滑念珠菌孵育后炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 表达及意义。**方法** 以体外培养未加 VGX-1027 孵育的 RTEC(未加组)和加入 VGX-1027 孵育的 RTEC(加入组),分别与光滑念珠菌孵育 3、6、9 h,观察未加和加入组 RTEC 形态变化;Real time PCR 检测未加和加入组 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达;ELISA 检测未加和加入组 IL-1 β 和 TNF- α 分泌。未与光滑念珠菌孵育并未加 VGX-1027 的 RTEC 为对照组。**结果** 随孵育时间延长,IL-1 β 和 TNF- α 表达呈进行性增高,未加组与加入组相比,未加组 IL-1 β 和 TNF- α 表达更高。相同时间点,未加组与加入组比较 IL-1 β 和 TNF- α 表达均差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RTEC 可识别光滑念珠菌启动天然免疫,并激活下游炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌,介导炎症反应,但是过度的炎症反应不能起到保护作用反而加重损伤。

[关键词] 光滑念珠菌;大鼠气道上皮细胞;VGX-1027;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素 1 β **[中图分类号]** R519.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)32-4475-04

Study of effect of VGX-1027 on expression of IL-1 β and TNF- α in rat tracheal epithelial cells stimulated by *Candida glabrata**

Wang Yuchun¹, Zhang Xue², Luo Xueping^{2 Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of ICU, Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541199, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression and significance of IL-1 β and TNF- α in rat tracheal epithelial cells(RTEC) without adding immunosuppressant VGX-1027 and RTEC with adding VGX-1027 after co-culturing with *Candida glabrata*. **Methods** RTEC without and with VGX-1027 were respectively co-cultured with *Candida glabrata* bacteria liquid for 3, 6, 9 h. Then the morphological changes of RTEC were observed in the adding VGX-1027 group and non-adding VGX-1027 group; the mRNA expressions of IL-1 β and TNF- α were detected by real-time PCR and secretion of IL-1 β and TNF- α was determined by ELISA. **Results**

With the culture time extending, the expression of IL-1 β and TNF- α showed the progressive increase; the expressions of IL-1 β and TNF- α in the non-adding VGX-1027 group were higher than those in the adding VGX-1027 group. At the same time point, the expressions of IL-1 β and TNF- α had statistically significant difference between the non-adding VGX-1027 group and adding VGX-1027 group($P < 0.05$). **Conclusion** RTEC can recognize *Candida glabrata* to activate natural immunity and secretion of downstream inflammatory factors IL-1 β and TNF- α , and mediates inflammatory reaction, but excessive inflammation can not play a protective effect, on the contrary aggravates damage.

[Key words] *Candida glabrata*; rat tracheal epithelial cells; VGX-1027; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

近年,由于未能控制的重症感染诱导大量炎症因子的释放,使机体发生失控的自我持续放大和自我破坏的全身性炎症反应。全身炎症反应综合征(SIRS)与代偿性抗炎反应综合征(CARS)的失衡是多器官功能障碍综合征(MODS)的主要发病机制^[1]。其中,重症监护病房(ICU)患者由于光滑念珠菌等真菌感染导致菌血症和脓毒败血症而引起大量炎症因子的释放,使炎症反应失衡而死亡^[2]。本研究通过培养未加免疫抑制剂 N-乙酰-3,5-二碘-L-酪氨酸(VGX-1027)^[3]的大鼠气道上皮细胞(RTEC)和加入 VGX-1027 的 RTEC 分别与光滑念珠菌孵育,探讨在免疫调节剂作用下,光滑念珠菌对 RTEC 刺激下加入组和未加组炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达及影响。

1 材料与方法

1.1 材料 RTEC 购于北京协和细胞资源中心。DMEM F12 1:1 混合培养传代,培养条件 37 °C、5% CO₂。标准光滑念珠菌,购自上海酶联生物科技有限公司。接种沙堡培养基 37 °C 培养 48 h,挑菌落在高温高压灭菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,配成悬液,显微镜计数,无菌 PBS 重悬,4 °C 存备用。

1.2 方法

1.2.1 RTEC 与光滑念珠菌孵育实验

1.2.1.1 孵育前准备 细胞用胰酶消化、离心、计数,调整密度 5×10^5 /mL,每孔 1 mL 细胞悬液分别加入 6 孔板,培养 24 h。

1.2.1.2 孵育实验及分组 稀释菌液,计数,调整浓度 $5 \times$

10^6 /mL, 每孔 100 μ L 菌液, 孵育复数(MOI)为 $1^{[4]}$ 。向六孔板任意一孔加菌液后, 每间隔 3 h, 从其他六孔板任选一孔加菌液, 共加 3 次, 分别标记未加(VGX-1027 孵育)3、6、9 h 组。从剩余孔中选取 1 孔, 未与光滑念珠菌孵育并未加 VGX-1027 的 RTEC 标记对照组。

1.2.1.3 加入抑制剂 VGX-1027 按照 1.2.1.1 操作后, 调整 VGX-1027 浓度为 1 mg/mL^[3] 分别加入每 1 个孔, 随机选取 3 个孔按照 1.2.1.2 操作加菌液, 标记加入 3、6、9 h 组。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 IL-1 β 和 TNF- α 终止孵育, 收集细胞加入 1 mL Trizol, 按说明书提取 RNA 配制逆转录体系, 合成 cDNA 第一链。IL-1 β 引物序列如下, 上游: 5'-ACC TGG TAG AAG TGA TGC C-3', 下游: 5'-CAA GGA GTT GTT TCC GTT A-3'; TNF- α 引物序列如下, 上游: 5'-CAC CAC GCT CTT CTG TCT ACT-3', 下游: 5'-AGA TGA TCT GAG TGT GAG GGT C-3'; β -actin 引物序列如下, 上游: 5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3', 下游: 5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'。Real time PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 59 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2 s, 40 循环。

1.2.3 上清液 ELISA 检测 IL-1 β 和 TNF- α 终止孵育, 分别

取 100 μ L 上清液, 按说明进行, 绘制曲线, 计算出 IL-1 β 和 TNF- α 表达水平。

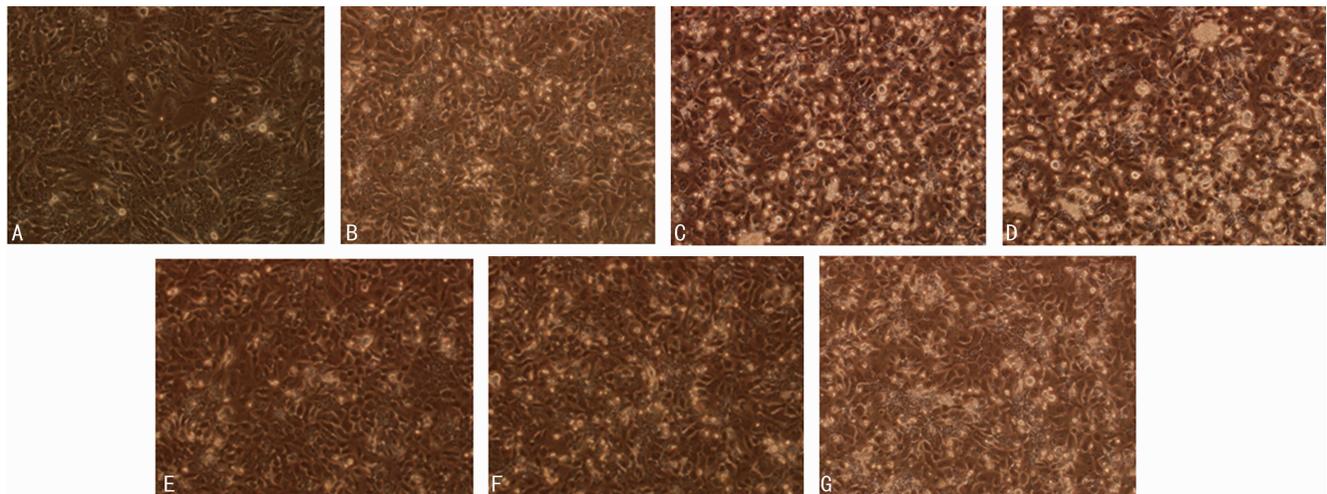
1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0, 计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两独立样本 *t* 检验统计学分析, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RTEC 光镜观察

2.1.1 未加组的 RTEC 光镜观察 对照组 RTEC 形状完整、结构清晰(图 1A); 未加 3、6、9 h 组(图 1B、C、D)可见, RTEC 形状变异、边缘模糊、结构不完整, 未加 3 h 组与对照组比较, 未加 6 h 组与未加 3 h 组比较, 未加 9 h 组与未加 6 h 组比较, 光滑念珠菌菌群数量逐渐增多, 细胞碎片、溶解现象更明显。

2.1.2 加入组的 RTEC 光镜观察 由 1 图 E、F、G 可见, 加入 3 h 组与未加 3 h 组比较、加入 6 h 组与未加 6 h 组比较、加入 9 h 组与未加 9 h 组比较发现, 加入组 RTEC 形状、结构和完整性均比未加入组损伤减轻, 细胞变异减少, 随时间延长光滑念珠菌数量逐渐增多, 但细胞碎片和细胞溶解现象比未加组明显减少。



A: 对照组; B: 未加 3 h 组; C: 未加 6 h 组; D: 未加 9 h 组; E: 加入 3 h 组; F: 加入 6 h 组; G: 加入 9 h 组。

图 1 RTEC 与光滑念珠菌孵育光镜观察($\times 20$)

2.2 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 荧光定量 PCR 结果

2.2.1 未加 3、6、9 h 组与光滑念珠菌孵育后 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达 未加 3 h 组与对照组比较、未加 6 h 组与未加 3 h 组比较、未加 9 h 组与未加 6 h 组比较, IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达均明显增高。

2.2.1.1 未加 3、6、9 h 组 IL-1 β mRNA 表达 未加 3 h 组 (2.4985 ± 0.1205) 与对照组 (1.0000 ± 0.0000) 比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 未加 6 h 组 (3.8981 ± 0.1411) 与未加 3 h 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 未加 9 h 组 (5.9421 ± 0.1107) 与未加 6 h 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.2.1.2 未加 3、6、9 h 组 TNF- α mRNA 表达 未加 3 h 组与对照组 (1.0000 ± 0.0000) 比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 未加 6 h 组 (6.2989 ± 0.1097) 与未加 3 h 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 未加 9 h 组 (8.7857 ± 0.5173) 与

未加 6 h 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.2.2 加入与未加 3、6、9 h 组的 RTEC 与光滑念珠菌孵育后 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平 相同时间, 加入组 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的表达降低 ($P<0.05$), 尤其是加入 9 h 组与未加 9 h 组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 见图 2、3 和表 1、2。

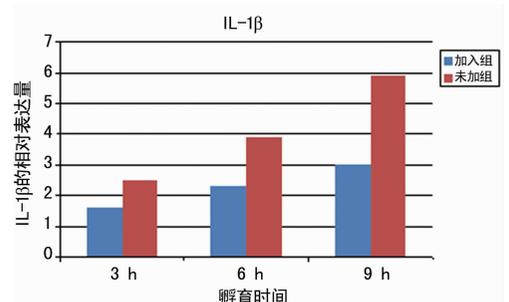


图 2 加入 VGX-1027 组与未加组比较 IL-1 β mRNA 表达

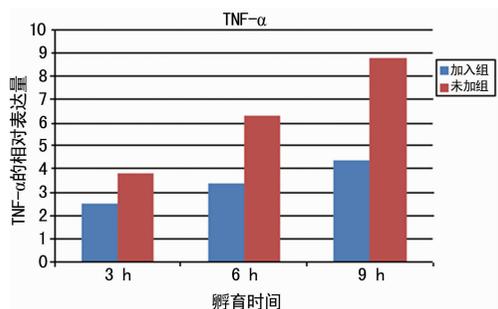


图 3 加入 VGX-1027 孵育组与未加组比较 TNF-α mRNA 表达

2.3 ELISA 检测上清液中 IL-1β 和 TNF-α 分泌

2.3.1 未加 3、6、9 h 组上清液 IL-1β 和 TNF-α 因子的分泌
未加 3 h 组与对照组比较、未加 6 h 组与未加 3 h 组比较,未加 9 h 组与未加 6 h 组比较,IL-1β 和 TNF-α 的表达显著升高。

2.3.1.1 未加 3、6、9 h 组上清液 IL-1β 因子表达 未加 3 h 组(121.53±15.71)与对照组(64.75±8.03)比较差异有统计学意义($P<0.05$);未加 6 h 组(272.94±7.72)与未加 3 h 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);未加 9 h 组(412.55±19.05)与未加 6 h 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3.1.2 未加 3、6、9 h 组上清液 TNF-α 表达 未加 3 h 组(80.69±8.57)与对照组(50.97±2.74)比较差异有统计学意义($P<0.05$);未加 6 h 组(139.13±15.78)与未加 3 h 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);未加 9 h 组(307.79±18.81)与未加 6 h 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3.2 加入与未加 3、6、9 h 组上清液中 IL-1β 和 TNF-α 分泌比较 相同时间,加入组比未加组 IL-1β 和 TNF-α 的分泌均较低,尤其是 9 h 组低表达更显著(表 3、4)。

表 1 加入 VGX-1027 孵育组与未加组比较 IL-1β mRNA 表达

组别	孵育 3 h	孵育 6 h	孵育 9 h
加入组	1.797 9±0.142 1	2.912 2±0.131 2	3.899 7±0.159 3
未加组	2.498 5±0.120 4 ^a	3.898 1±0.141 0 ^b	5.942 1±0.110 7 ^c

^a: $P<0.05$,与加入 3 h 组比较;^b: $P<0.05$,与加入 6 h 组比较;^c: $P<0.01$,与加入 9 h 组比较。

表 2 加入 VGX-1027 孵育组与未加组比较 TNF-α mRNA 表达

组别	孵育 3 h	孵育 6 h	孵育 9 h
加入组	2.995 9±0.069 5	4.998 9±0.128 5	6.579 2±0.528 5
未加组	3.817 3±0.070 8 ^a	6.298 9±0.109 7 ^b	8.785 7±0.517 2 ^c

^a: $P<0.05$,与加入 3 h 组比较;^b: $P<0.05$,与加入 6 h 组比较;^c: $P<0.01$,与加入 9 h 组比较。

表 3 加入 VGX-1027 孵育组与未加组比较 IL-1β 分泌

组别	孵育 3 h	孵育 6 h	孵育 9 h
加入组	82.79±14.92	139.87±7.98	205.98±17.73
未加组	121.53±15.71 ^a	272.94±7.72 ^b	412.55±19.05 ^c

^a: $P<0.05$,与加入 3 h 组比较;^b: $P<0.05$,与加入 6 h 组比较;^c: $P<0.01$,与加入 9 h 组比较。

表 4 加入 VGX-1027 组与未加组比较 TNF-α 分泌

组别	孵育 3 h	孵育 6 h	孵育 9 h
加入组	43.52±8.46	96.74±14.38	151.68±18.74
未加组	80.69±8.57 ^a	139.13±15.78 ^b	307.79±18.81 ^c

^a: $P<0.05$,与加入 3 h 组比较;^b: $P<0.05$,与加入 6 h 组比较;^c: $P<0.01$,与加入 9 h 组比较。

3 讨 论

VGX-1027 是一种异恶唑化合物,有很强的免疫调节特性,能针对体内不同受体信号通路刺激抑制炎症因子的分泌^[5]。有研究表明,VGX-1027 是一种有效的免疫调节剂,能降低促炎细胞因子如 IL-1β、TNF-α 和干扰素 γ(INF-γ)等的分泌,并通过抑制细胞因子的炎性作用使细胞存活率显著增加^[3],从而避免炎性-抗炎失衡对机体造成的严重损伤。对于 ICU 患者由于大量激素和免疫抑制剂的应用,真菌侵入机体发生侵袭性肺部真菌感染(IPFI)非常普遍^[6]。严重的未能控制的真菌感染引起大量炎性细胞浸润和炎症介质释放,使炎症介质和抗炎介质失衡造成严重的肺脏损伤最终导致死亡。本研究通过 RTEC 加入免疫抑制剂 VGX-1027 与光滑念珠菌孵育相同时间发现,信号通路下游炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 分泌与未加入组相比显著减少。此时在显微镜下发现,加入组与未加入组相比,加入组细胞轮廓、形态、结构和完整性破坏情况比未加入组明显减轻。由此可见,VGX-1027 具有很强的免疫抑制性,可降低炎症介质 IL-1β 和 TNF-α 的分泌,减轻炎症反应,避免失控的炎症反应带来的严重损伤。

当真菌入侵机体时,首先接触气道上皮细胞,气道上皮细胞是抵抗真菌等病原微生物入侵机体的第一道防线^[7],也是抗病原微生物感染产生免疫应答的前哨细胞。以往气道上皮细胞仅被认为是机械物理屏障,随研究深入发现气道上皮细胞表面存在许多特异的病原识别受体(PRRs),如 Toll 样家族受体^[8]和 C 型凝集素受体(CLR)等,通过对真菌表面病原相关分子模式(PAMPs)识别启动天然免疫,保护机体免受真菌侵袭^[9]。PRRs 通过特异识别 PAMP 后,活化信号通路,招募特异接头蛋白如 MyD88 等,使下游炎症和趋化因子释放,发挥抗真菌感染作用^[10-11]。Dubourdeau 等^[12]发现用分生孢子刺激小鼠能激活信号通路启动天然免疫,诱导下游 TNF-α 和 IL-1 等分泌抗感染。又有研究发现,PRRs 上调也可以促进炎症因子如 TNF-α 等的分泌,增加抗感染作用^[13]。本实验研究同样发现,光滑念珠菌与 RTEC 孵育能诱导下游炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的表达,未加组炎症因子分泌比加入组多。其中,最明显的现象是虽然未加 3 h 组比加入 3 h 组释放的炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 明显增多,但此时在显微镜却发现与加入 3 h 组相比未加 3 h 组 RTEC 细胞形态、结构和完整性的损害相对较轻,细胞溶解和细胞碎片相对较少。由此可见,在真菌感染早期信号通路能启动天然免疫,诱导下游炎症因子如 TNF-α 和 IL-1β 的释放,适度的炎症反应能抗真菌感染。

然而随着孵育时间的延长,下游的炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的表达逐渐增多,尤其在 9 h 组。未加 9 h 组比加入 9 h 组 IL-1β 和 TNF-α 的分泌几乎升高了一倍,但此时显微镜下发现,未加组与加入组相比未加组 RTEC 受到的损害不但没有减轻反而加重。细胞形态结构的完整性均被严重破坏,细胞

溶解、被吞噬现象越来越明显,细胞碎片逐渐增多。张青等^[14]研究也发现,IL-1 β 和TNF- α 是SIRS主要的前炎症细胞因子,当一个损害性刺激作用机体会诱导前炎症因子的产生和释放,“瀑布样”效应开始启动。患者血浆中前炎症因子IL-1 β 和TNF- α 等水平显著升高,使机体的炎症反应逐渐扩大,甚至失控。对于重症患者在器官损害期,前炎症细胞因子会显著升高,导致组织损伤和器官功能障碍^[15]。此时,重症患者将加重病情甚至死亡。由此证明,过度失控的炎性因子释放会产生瀑布级联,引起机体失控的自我持续放大和自我破坏的全身性炎症反应加重损伤。

综上所述,RTEC能识别光滑念珠菌,通过信号转导诱导下游炎症因子IL-1 β 和TNF- α 的表达,从而启动天然免疫抗真菌感染。适度的炎症反应对机体起到保护作用,但失控的持续放大的炎症反应对机体的损伤更为严重。因此,充分认识炎症避免“二次打击”可能为ICU重症患者在治疗方面提供了一个新的靶点。

参考文献

[1] Tsukamoto T, Chanthaphavong RS, Pape HC. Current theories on the pathophysiology of multiple organ failure after trauma[J]. *Injury*, 2010, 41(1): 21-26.

[2] Groll A H, Lumb J. New developments in invasive fungal disease[J]. *Future Microbiol*, 2012, 7(2): 179-184.

[3] Mangano K, Sardesai N, D'Alcamo M, et al. In vitro inhibition of enterobacteria-reactive CD4+CD25-T cells and suppression of immunoinflammatory colitis in mice by the novel immunomodulatory agent VGX-1027 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586(1/2/3): 313-321.

[4] Seider K, Gerwien F, Kasper L, et al. Immune evasion, stress resistance, and efficient nutrient acquisition are crucial for intracellular survival of *Candida glabrata* within macrophages[J]. *Eukaryot Cell*, 2014, 13(1): 170-183.

[5] Stosic-Grujicic S, Cvetkovic I, Mangano K, et al. A potent immunomodulatory compound, (S, R)-3-Phenyl-4, 5-dihydro-5-isoxazole acetic acid, prevents spontaneous and accelerated forms of autoimmune diabetes in NOD mice and inhibits the immunoinflammatory diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in CBA/H mice[J]. *J*

Pharmacol Exp Ther, 2007, 320(3): 1038-1049.

[6] Che CY, Jia WY, Xu Q, et al. The roles of surfactant protein D during *Aspergillus fumigatus* infection in human corneal epithelial cells[J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5(1): 13-17.

[7] Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, et al. Inducible innate resistance of lung epithelium to infection[J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72(1): 413-435.

[8] Romani L. Immunity to fungal infections[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(4): 275-288.

[9] Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(4): 392-399.

[10] 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.

[11] Netea MG, Marodi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species[J]. *Trends Immunol*, 2010, 31(9): 346-353.

[12] Dubourdeau M, Athman R, Balloy V, et al. *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4[J]. *J Immunol*, 2006, 177(6): 3994-4001.

[13] Bain JM, Louw J, Lewis LE, et al. *Candida albicans* hypha formation and mannan masking of beta-glucan inhibit macrophage phagosome maturation[J]. *mBio*, 2014, 5(6): 1874.

[14] 张青, 李琦, 毛宝龄, 等. ARDS 和 SIRS 患者血浆 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 水平的变化[J]. *感染、炎症、修复*, 2004, 5(3): 92-94.

[15] Holloway TL, Rani M, Cap AP, et al. The association between the Th-17 immune response and pulmonary complications in a trauma ICU population[J]. *Cytokine*, 2015, 76(2): 328-333.

(收稿日期:2016-04-03 修回日期:2016-05-16)

统计资料类型

统计资料共有 3 种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。