

本文引用: 许莉, 李东升, 董碧麟, 等. 白色念珠菌经组织蛋白酶 B 途径诱导小鼠腹腔巨噬细胞 NLRP3 炎性体表达[J]. 新乡医学院学报 2014, 31(1): 1-4.

【基础研究】

白色念珠菌经组织蛋白酶 B 途径诱导小鼠腹腔巨噬细胞 NLRP3 炎性体表达

许莉¹, 李东升¹, 董碧麟¹, 陈宏翔², 陈娜¹, 王辉¹

(1. 武汉市第一医院皮肤科, 湖北 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院皮肤科, 湖北 武汉 430022)

摘要: 目的 探讨含热蛋白结构域 3 富含亮氨酸重复序列的核苷酸结合寡聚化结构域 (NLRP3) 在白色念珠菌诱导的小鼠腹腔巨噬细胞促炎性细胞因子产生中的作用及其激活途径。方法 体外培养小鼠腹腔巨噬细胞, 将其分为空白对照组、CA-074Me 组、白色念珠菌组、白色念珠菌 + 10^{-6} mol · L⁻¹ CA-074Me 组和白色念珠菌 + 10^{-5} mol · L⁻¹ CA-074Me 组。实时荧光定量聚合酶链反应检测细胞内 NLRP3 mRNA 表达, Western blot 检测细胞内溶酶体组织蛋白酶 B (cathepsin B) 和胱天蛋白酶-1 (caspase-1) p20 蛋白质水平。酶联免疫吸附试验测定各组细胞培养上清液中白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平。结果 白色念珠菌组细胞内 NLRP3 mRNA 表达、cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白表达、细胞培养上清液中 IL-1 β 水平均显著高于空白对照组 ($P < 0.01$)。加入 10^{-5} mol · L⁻¹ CA-074Me 干预后, 细胞内 NLRP3 mRNA 表达、cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白的表达及细胞培养上清液中 IL-1 β 水平与白色念珠菌组比较显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 白色念珠菌通过活化 cathepsin B 诱导巨噬细胞 NLRP3 的表达、caspase-1 的活化和 IL-1 β 的分泌。

关键词: 白色念珠菌; 含热蛋白结构域 3 富含亮氨酸重复序列的核苷酸结合寡聚化结构域; 组织蛋白酶 B; 胱天蛋白酶-1; 白细胞介素-1 β

中图分类号: R379 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2014)01-0001-04

Candida albicans induced expression of NLRP3 in murine peritoneal macrophage through activating cathepsin B

XU Li¹, LI Dong-sheng¹, DONG Bi-lin¹, CHEN Hong-xiang², CHEN Na¹, WANG Hui¹

(1. Department of Dermatology, Wuhan No. 1 Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China; 2. Department of Dermatology, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of nucleotide-binding oligomerization domain-leucine-rich repeats containing pyrin domain 3 (NLRP3) in the production of pro-inflammatory cytokines induced by *Candida albicans* in murine peritoneal macrophages and the activation pathway of NLRP3. **Methods** Murine peritoneal macrophages were cultured *in vitro* and randomly divided into five groups: control group, CA-074Me group, *Candida albicans* group, *Candida albicans* + 10^{-6} mol · L⁻¹ CA-074Me group and *Candida albicans* + 10^{-5} mol · L⁻¹ CA-074Me group. The mRNA expressions of NLRP3 in the cells were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. Western blot was performed to detect the protein expression of cathepsin B and caspase-1 p20 in cytoplasm. The protein of interleukin-1 β (IL-1 β) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Compared with control group, administration of *Candida albicans* not only enhanced the mRNA expressions of NLRP3 ($P < 0.01$), but also elevated the protein expression of cathepsin B and caspase-1 p20 in cytoplasm ($P < 0.01$). Murine peritoneal macrophages stimulated with *Candida albicans* secreted significantly higher concentration of IL-1 β than control group ($P < 0.01$). After adding 10^{-5} mol · L⁻¹ CA-074Me into the cells challenged with *Candida albicans*, the mRNA expressions of NLRP3, the activities of cathepsin B and caspase-1 p20 in macrophages and the levels of IL-1 β in the supernatant decreased significantly than those in the *Candida albicans* group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Candida albicans* induces the production of NLRP3, the activation of caspase-1 and pro-inflammatory cytokines IL-1 β in macrophages via activating cathepsin B.

Key words: *Candida albicans*; nucleotide-binding oligomerization domain-leucine-rich repeats containing pyrin domain 3; cathepsin B; caspase-1; interleukin-1 β

DOI: 10.7683/xxyxb.2014.01.001

收稿日期: 2013-09-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81101201, 81171495, 81271765)

作者简介: 许莉(1976-), 女, 湖北汉川人, 博士, 主治医师, 主要从事性传播疾病基础及临床研究。

通信作者: 王辉(1971-), 男, 山东章丘人, 学士, 副主任医师, 主要从事性传播疾病临床及基础研究。

白色念珠菌是一种条件致病性真菌,可引起人类皮肤黏膜、内脏各系统感染^[1]。白细胞介素(interleukin, IL)是一类产生于多种细胞,又在多种细胞之间起调节作用的细胞因子,其在信息传递、免疫细胞激活调节等方面有重要作用^[2],其中 IL-1 β 是一种作用广泛的细胞因子^[3],在抗白色念珠菌感染中发挥重要作用^[4]。含热蛋白结构域 3 富含亮氨酸重复序列的核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain-leucine-rich repeats containing pyrin domain 3, NLRP3)炎性体是一类大分子蛋白质,它通过活化胱天蛋白酶-1(caspase-1),调控 IL-1 β 、IL-18、IL-33 等炎性细胞因子的成熟和分泌,在天然免疫和获得性免疫中发挥重要作用^[5]。研究发现,淋球菌可通过激活溶酶体组织蛋白酶 B(cathepsin B)调控下游 NLRP3 炎性体的活化、细胞凋亡^[6]。本研究以小鼠腹腔巨噬细胞为动物细胞模型,观察白色念珠菌刺激后 NLRP3 表达情况及 cathepsin B 特异性抑制剂 CA-074Me 对其表达的影响,为防治白色念珠菌感染提供科学的理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物与菌株 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体质量 18~20 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。白色念珠菌标准株 ATCC10231 由澳大利亚悉尼 Westmead 医院感染性疾病和微生物研究中心提供,实验前 2 d 经培养基 27 °C 传代培养,取少量菌落于灭菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中,以 500 r·min⁻¹ 离心 8 min,洗涤 2 次,将菌液调成 10⁹ L⁻¹,锥虫蓝染色证实 >95% 为活细胞,显微镜下观察 >95% 为白色念珠菌酵母。

1.2 主要试剂 RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 1640 培养基(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物工程公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(日本 Toyobo 公司),SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒(日本 Takara 公司),抗 cathepsin B 抗体、抗 caspase-1 p20 单抗(美国 Santa Cruz 公司),CA-074Me(美国 Cal Biochem 公司),IL-1 β 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(深圳晶美生物试剂公司)。

1.3 主要仪器 Olympus 显微摄影仪(日本 Olympus 公司),酶联免疫标记分析仪(美国 LAB-SYSTEMS 公司),Mini. PROTEAN 11 电泳仪(美国 BIO. RAD 公司),低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),FAC 2000 实时荧光定量基因扩增仪(加拿大

Funglynn 公司)。

1.4 腹腔巨噬细胞体外培养及处理 常规分离小鼠腹腔巨噬细胞,加入 10 mL 含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,细胞调整为 2 × 10⁸ L⁻¹ 接种于 6 孔板中,置 37 °C 培养,细胞贴壁后,更换 RPMI 1640 培养基,细胞分为 5 个组:(1)空白对照组:用含体积分数 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基常规培养 8 h;(2)CA-074Me 组:预先用 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CA-074Me 作用细胞 30 min,再常规培养 8 h;(3)白色念珠菌组:加入 10⁹ L⁻¹ 白色念珠菌悬液作用 8 h;(4)白色念珠菌 + 10⁻⁶ mol·L⁻¹ CA-074Me 组:预先用 10⁻⁶ mol·L⁻¹ CA-074Me 作用细胞 30 min,再加入 10⁹ L⁻¹ 白色念珠菌悬液作用 8 h;(5)白色念珠菌 + 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CA-074Me 组:预先用 10⁻⁵ mol·L⁻¹ CA-074Me 作用细胞 30 min,再加入 10⁹ L⁻¹ 白色念珠菌悬液作用 8 h。

1.5 SYBR green 荧光定量聚合酶链反应检测细胞中 NLRP3 mRNA 表达 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 用于反转录,反转录按照反转录酶试剂说明操作。反转录-聚合酶链反应所用引物序列: NLRP3 上游: 5'-CGAGACCTCTGG-GAAAAAGCT-3',下游: 5'-GCATACCATAGAGGAAT-GTGATGTACA-3'; 内参 β -actin: 上游 5'-TGTCCCTG-TATGCCTCTGG-3',下游: 5'-CCTTTAGCACGCACTG-TAG-3'。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环。 β -actin 作为内参, NLRP3 对 β -actin 的相对表达量用倍数表示,计算公式为 2^{- $\Delta\Delta$ CT}。其中 CT 值表示荧光信号强度达到设定阈值的循环数, Δ CT = 目的基因 CT - 内参基因 CT, $\Delta\Delta$ CT = 实验组 Δ CT - 对照组 Δ CT。

1.6 Western blot 分析 cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白表达 提取培养细胞的总蛋白,测定样品蛋白浓度。取各组不同组分蛋白样品 60 μ g,经体积分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转移膜,加入稀释后的一抗 37 °C 孵育 1 h,特异性二抗及生物素-链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶 37 °C 孵育 1 h,用质量分数 0.05% 二氨基联苯胺缓冲液避光显色。

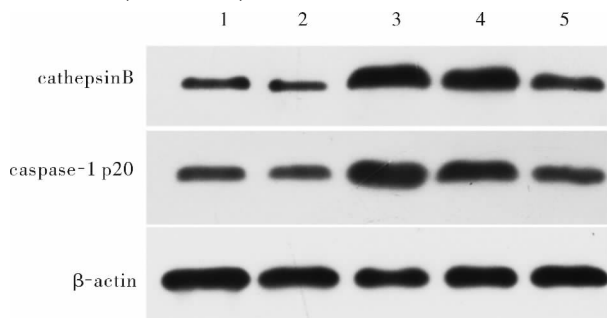
1.7 ELISA 检测细胞培养上清液中 IL-1 β 水平 按试剂盒说明进行,实验完成后用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度值,根据制作的标准曲线,用间接法读各样品的 IL-1 β 水平。

1.8 统计学处理 所有数据应用 SPSS 15.0 统计软件进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞内 NLRP3 mRNA 表达的变化 荧光定量聚合酶链反应结果显示,空白对照组和 CA-074Me 组细胞内的 NLRP3 mRNA 表达分别为 1.09 ± 0.11 和 1.23 ± 0.14 , 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 白色念珠菌组细胞内 NLRP3 mRNA 表达为 6.31 ± 0.59 , 与空白对照组比较明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。加入 10^{-6} 、 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 预处理细胞 30 min 后, 细胞内 NLRP3 mRNA 表达分别为 5.56 ± 0.52 、 2.94 ± 3.05 , 其中加入 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组与白色念珠菌组比较明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 细胞内 cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白表达的变化 结果见图 1、表 1。Western blot 检测结果显示, CA-074Me 组和空白对照组细胞内 cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。白色念珠菌组细胞内 cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白表达明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。加入 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组细胞内 cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白的表达与白色念珠菌组比较明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。



1: 空白对照组; 2: CA-074Me 组; 3: 白色念珠菌组; 4: 白色念珠菌 + 10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组; 5: 白色念珠菌 + 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组。

图 1 Cathepsin B、caspase-1 p20 Western blot 检测结果

Fig. 1 Western blot analysis of cathepsin B and caspase-1 p20

表 1 各组细胞内 cathepsin B 和 caspase-1 p20 蛋白表达比较

Tab. 1 Comparison of cathepsin B and caspase-1 p20 protein expression among the groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	cathepsin B	caspase-1 p20
空白对照组	1.05 ± 0.13	1.08 ± 0.12
CA-074Me 组	0.94 ± 0.08	1.21 ± 0.14
白色念珠菌组	5.30 ± 0.61^a	4.63 ± 0.49^a
白色念珠菌 + 10^{-6} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组	4.85 ± 0.47	4.21 ± 0.45
白色念珠菌 + 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组	2.74 ± 0.31^b	2.32 ± 0.26^b

注: 与空白对照组比较^a $P < 0.01$; 与白色念珠菌组比较^b $P < 0.01$ 。

2.3 培养上清液中细胞因子 IL-1 β 水平的变化

ELISA 结果表明, 空白对照组和 CA-074Me 组的细胞培养上清液中 IL-1 β 水平分别为 (21.36 ± 6.05) 、 (19.94 ± 5.92) ng \cdot L $^{-1}$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 白色念珠菌组细胞培养上清液中 IL-1 β 水平为 (196.28 ± 21.09) ng \cdot L $^{-1}$, 明显高于空白对照组和 CA-074Me 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 加入 10^{-6} 、 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 预处理细胞 30 min 后, 细胞培养上清液中 IL-1 β 水平分别为 (162.42 ± 20.61) 、 (85.67 ± 16.83) ng \cdot L $^{-1}$, 加入 10^{-5} mol \cdot L $^{-1}$ CA-074Me 组细胞培养上清液中 IL-1 β 水平与白色念珠菌组比较明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

白色念珠菌寄生在人体体表、口腔等部位, 一般情况下不会致病。当个体免疫力低下或正常菌群相互制约作用失调时, 白色念珠菌大量繁殖, 侵入细胞引起疾病^[7]。NLRP3 炎性体能够广泛识别各种类型的病原体或机体自身危险信号。当 NLRP3 的配体结合到 NLRP3 上以后, NLRP3 能够通过核苷酸结合寡聚化结构域发生自身寡聚化, 并通过其热蛋白结构域招募含有天冬氨酸蛋白水解酶募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白分子 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC), 形成 ASC pyroptosome^[8], 进而激活 caspase-1, 促进 IL-1 β 的释放。IL-1 β 是白色念珠菌引起的机体天然免疫反应最主要的炎性因子, 可刺激其他细胞因子和炎症递质的产生, 促进 T 细胞和 B 细胞的增殖、分化, 进而激活补体, 增强细胞免疫和体液免疫介导的抗真菌免疫反应及组织损伤过程^[4]。Hise 等^[9]发现 NLRP3 敲除鼠对白色念珠菌的抵抗力显著减弱, 说明 NLRP3 炎性体在宿主抵抗白色念珠菌的感染中发挥保护作用。本研究发现, 白色念珠菌刺激巨噬细胞后 NLRP3 mRNA 明显增加, 细胞质内 caspase-1 的活化形式 caspase-1 p20 蛋白的表达明显增加, 炎性细胞因子 IL-1 β 的表达亦相应明显增加。这一结果表明在白色念珠菌感染中 NLRP3 炎性体参与了 caspase-1 活化及 IL-1 β 的分泌。

Cathepsin B 是木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白水解酶, 广泛分布于多种组织细胞的溶酶体中, 是溶酶体中一种重要的蛋白水解酶^[10], 其在 NLRP3 炎性体激活中的作用越来越受到人们的重视^[11]。硅石、石棉和 β 淀粉样蛋白等被免疫细胞内吞后, 可引起溶酶体破坏并释放 cathepsin B, 后者诱导内

源的未知配体激活 NLRP3 炎性体^[12]。在本研究中,预先加入 cathepsin B 的特异性抑制剂 CA-074Me 作用后,白色念珠菌刺激后引起的 NLRP3 mRNA 表达、细胞质内 caspase-1 p20 蛋白表达及细胞因子 IL-1 β 的分泌随着 CA-074Me 浓度的增加而逐渐降低,且这种降低趋势与细胞质内 cathepsin B 蛋白的减少一致。这表明白色念珠菌刺激引起的 NLRP3 炎性体的活化受 cathepsin B 活化的调控,抑制 cathepsin B 的活化可显著抑制 NLRP3 炎性体活化,进而抑制 IL-1 β 等炎性因子的活化。

感染白色念珠菌能触发机体的天然免疫反应。NLRP3 作为一种胞内模式识别受体,在天然免疫中发挥重要作用,其在白色念珠菌感染中的具体激活机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Kontoyiannis D P, Marr K A, Park B J *et al.* Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database [J]. *Clin Infect Dis* 2010, 50(8): 1091–1100.
- [2] 王方, 朱豫, 栗夏莲, 等. 甲状腺相关眼病患者血清中白细胞介素-15 和白细胞介素-21 的含量及临床意义 [J]. *眼科新进展*, 2013, 33(6): 565–567.
- [3] 林秀丽, 朱学军, 胡建章, 等. 兔棘阿米巴角膜炎 IL-1 β 和 MIP-1 的表达 [J]. *眼科新进展* 2012, 32(9): 827–830.
- [4] Netea M G, Simon A, van de Veerdonk F *et al.* IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes [J]. *PLoS*, 2010, 6(2): e1000661.
- [5] Zhou R, Yazdi A S, Menu P *et al.* A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature* 2010, 469(7329): 221–225.
- [6] Duncan J A, Gao X, Huang M T *et al.* Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome [J]. *J Immunol*, 2009, 182(10): 6460–6469.
- [7] 刘瑞琪, 崔光富, 郭庆合, 等. 二甲基亚砷抗菌作用研究进展 [J]. *新乡医学院学报* 2012, 29(11): 878–880.
- [8] Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J W *et al.* The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation [J]. *Cell Death Differ* 2007, 14(9): 1590–1604.
- [9] Hise A G, Tomalka J, Ganesan S *et al.* An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans* [J]. *Cell Host Microbe* 2009, 5(5): 487–497.
- [10] 陈情情, 倪宏. Cathepsin B 抑制剂对反复惊厥新生大鼠海马组织 Clusterin 表达的干预作用 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(12): 907–909.
- [11] Willingham S B, Bergstralh D T, O'Connor W *et al.* Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC [J]. *Cell Host Microbe* 2007, 2(3): 147–159.
- [12] Jin C, Flavell R A. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Clin Immunol* 2010, 30(5): 628–631.

(本文编辑: 李胜利 英文编辑: 王 燕)

《新乡医学院学报》计量单位和数字的用法

(1) 计量单位: 实行《中华人民共和国法定计量单位》, 请参照《法定计量单位在医学上的应用》第 3 版(人民军医出版社 2004 年出版)。单位名称与单位符号不可混合使用, 如 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 组合单位符号中表示相除的斜线, 应采用负数幂的形式表示, 如 g/L 应改为 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, ng/kg/min 应改为 $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在叙述中, 可先列出法定计量单位数值, 括号内写旧制单位数值, 如 12 kPa (90 mmHg); 如同一计量单位反复出现, 可在首次出现时注出法定计量单位与旧制单位换算系数, 然后只写出法定计量单位数值。

(2) 数字: 执行 GB/T 15835-2011《出版物上数字用法》。公历世纪、年、月、日、时刻和计数、计量均用阿拉伯数字。如 1995 年不得写成 95 年或一九九五年, 也不得使用时间代名词, 如今年、去年、上月、下月等。小数点前或后超过 3 位数字时, 每 3 位数字一组, 组间空 1/4 个汉字空, 如“1 329.467 5”应写成“1 329.467 5”。但序数词和年份、页数、部队番号、仪表型号、标准号不分节。百分数的范围和偏差, 前一个数的百分符号不能省略, 如 5% ~ 45% 不能写成 5 ~ 45%。在一组中的 $\bar{x} \pm s$ 应考虑到个体的变差, 一般以 s 的 1/3 来定位数, 例如: (3 614.5 \pm 420.8) g, s 的 1/3 超过 100 g, 平均数波动在百位数, 故应写 (3.6 \pm 0.4) kg, 过多的位数并无意义; 又如 (8.61 \pm 0.27) mm, 它的 s 的 1/3 为 0.09 mm, 达小数点后第 2 位, 故平均数也应写到小数点后第 2 位, 写成 (8.61 \pm 0.27) mm。有效位数以后的数字修约: 小于 5 则舍, 大于 5 则进, 如恰等于 5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)则舍。修约时只可 1 次完成, 例如 23.48, 若不要小数点, 则应写成 23, 而不应该写成 23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。附带尺寸单位的数值相乘, 按下列方式书写: 4 cm \times 5 cm \times 2 cm, 而不应写成 4 \times 5 \times 2 cm 或 4 \times 5 \times 2 cm³。