

文章编号 1006-8147(2018)02-0093-04

论 著

炎症反应中巨噬细胞的 Siglec-G 分子对 DAMPs 和 PAMPs 的识别及调节作用

樊亚童, 郑 鉴, 肖 俊, 张学军

(天津医科大学免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的: 探究巨噬细胞中唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素 (Siglecs) 家族的成员 Siglec-G 参与损伤相关分子模式 (DAMPs) 和病原相关分子模式 (PAMPs) 识别及其在炎症反应中的调节作用。方法: 提取并纯化野生型小鼠腹腔巨噬细胞, 用 DAMPs 中的高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 和 PAMPs 中的脂多糖 (LPS) 分别刺激 24 h, Real-time PCR 方法检测细胞中 Siglec-G 基因的表达, ELISA 方法检测野生型和 Siglec-G 基因敲除小鼠腹腔巨噬细胞培养上清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 的分泌情况。结果: HMGB1 能够使巨噬细胞中 Siglec-G 的表达明显升高, 而 LPS 作用后 Siglec-G 的表达没有明显改变, 同时发现, HMGB1 作用于 Siglec-G 敲除小鼠的巨噬细胞后, TNF- α 和 IL-6 的分泌明显增加, 而 LPS 刺激后炎症因子的分泌没有明显改变。结论: 巨噬细胞通过表达 Siglec-G 来识别 DAMPs 并发挥免疫抑制作用, 而其对于 PAMPs 缺乏识别及调控作用。

关键词 DAMPs; PAMPs; 巨噬细胞; Siglec-G

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

Identification of DAMPs and PAMPs by Siglec-G in macrophages and its regulatory effect on DAMPs and PAMPs in inflammatory response

FAN Ya-tong, ZHENG Jian, XIAO Jun, ZHANG Xue-jun

(Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To identify the PAMPs and DAMPs by Siglec-G, a member of the Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Siglecs) family, in macrophages and to explore its regulatory effect on PAMPs and DAMPs in inflammatory response. **Methods:** Peritoneal macrophages harvested and purified from wild type mice were stimulated with high mobility group protein B1 (HMGB1) in DAMPs and lipopolysaccharide (LPS) in PAMPs for 24 h, respectively. Real-time PCR was performed to analyze the Siglec-G mRNA expression in macrophages. ELISA was used to detect the secretion of TNF- α and IL-6 in the culture supernatants of peritoneal macrophages in wild type and Siglec-G knockout mice. **Results:** HMGB1 could significantly increase the expression of Siglec-G in macrophages, while the expression of Siglec-G was not altered after the stimulation of LPS. And it was found that the secretion of TNF- α and IL-6 increased significantly after HMGB1 acted on macrophages of Siglec-G knockout mice, but the secretion of inflammatory factors did not change markedly after LPS stimulation. **Conclusion:** Macrophages could recognize DAMPs by Siglec-G, and play a critical role in immune suppression, but it may not recognise or regulate PAMPs.

Key words PAMPs; DAMPs; macrophage; Siglec-G

免疫系统对“自我”和“非我”识别及其相关分子机制是当前免疫学研究的热点问题之一。免疫细胞表面存在丰富的糖链结构, 该结构与病原体表面的糖链结构存在较大差异。巨噬细胞中唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素 (Siglecs) 是识别细胞表面糖链结构的重要受体, 具有参与“自我”和“非我”识别和调节免疫细胞功能等多方面的作用。Siglec-G 是 Siglecs 家族重要成员之一, 通过识别含有唾液酸的糖链结构, 参与细胞间相互作用, 此外还可以识别

内源性危险信号和病原微生物, 在固有免疫和适应性免疫中发挥重要的调控作用^[1-2]。DAMPs 是组织或细胞受到损伤和低氧等因素刺激后释放到细胞间或血液循环中的一类物质^[3]; PAMPs 则是病原体上的分子结构^[4]。二者均被模式识别受体 (PRR) 识别引起免疫应答。巨噬细胞作为机体重要的免疫细胞参与免疫识别、免疫应答和免疫调节等多种免疫反应过程, 然而 Siglec-G 在巨噬细胞的表达及其与免疫识别和免疫调节相关性尚有待进一步证明。本研究通过提取小鼠腹腔巨噬细胞, 用 HMGB1 (具有代表性的 DAMPs) 与 LPS (具有代表性的 PAMPs) 在体外刺激, 探讨在 DAMPs 和 PAMPs 存在下, 巨噬细胞中 Siglec-G 的表达情况及其对炎症反应的调控作用。

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (31370891, 31240036); 天津市自然科学基金重点项目 (13JCZDJC30000)

作者简介 樊亚童 (1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 张学军, E-mail: xjzhimmunology@163.com。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验对象 C57BL/6 野生型小鼠购自军事医学科学院实验动物中心, Siglec-G 基因敲除小鼠由中国医学科学院曹雪涛教授惠赠。实验小鼠均在天津医科大学实验动物中心繁育, 所有的程序按照天津医科大学实验动物中心的操作规范流程进行。实验时选用健康雄鼠, 8~10 周龄, 体质量 20~22 g。

1.1.2 主要试剂和仪器 巯基乙醇酸盐购自美国 BD 公司, 小鼠 HMGB1 蛋白(Fc 标签)购自北京义翘神州科技有限公司, LPS 购自 Sigma 公司, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, M-MLV 逆转录试剂盒购自美国 Promage 公司, Real time PCR Master Mix (SYBR Green) 购自 Roche 公司, TNF alpha Mouse ELISA Kit 和 IL-6 Mouse ELISA Kit 购自美国 eBioscience 公司, PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司, Real-time PCR 仪(LightCycler® 96)购自 Roche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠腹腔巨噬细胞的提取和纯化 选取 8 周以上雄鼠, 腹腔注射 2 mL 巯基乙醇酸盐 48 h 后, 处死小鼠, 以无血清的 DMEM 培养液灌洗小鼠腹腔数次, 收集得到的细胞悬液离心 5 min (2 000 r/min), 弃上清, 收集细胞, 1×PBS 洗 1 遍, 加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 2 h 后分离培养, 用 1×PBS 沿培养板内壁冲洗细胞 3 至 4 遍, 贴壁细胞为巨噬细胞, 用含 10%FBS 的 DMEM 培养液继续培养 24 h 后可做实验。

1.2.2 细胞培养与刺激方案 (1) 提取野生型小鼠腹腔巨噬细胞, 以适当细胞密度接种于 6 孔板中, 置于 37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h 后, 弃掉细胞上清, 用无 FBS 培养液继续培养 6 至 8 h 后, 弃去上清, 换成含 10%FBS 的 DMEM 培养液, 同时在培养液中加入 10 μg/mL 的 HMGB1 刺激不同时间(0、3、6、12、18 h 和 24 h)后提取细胞 RNA, 检测 Siglec-G 的基因表达; (2) 提取野生型小鼠腹腔巨噬细胞, 其余操作方法同上, 最后用不同浓度的 HMGB1(1、5 和 10 μg/mL)刺激 24 h 后提取细胞 RNA, 检测 Siglec-G 的基因表达; (3) 提取野生型小鼠腹腔巨噬细胞, 操作方法同上, 用 100 ng/mL 的 LPS 刺激不同时间(0、3、6、12、18 h 和 24 h)后提取细胞 RNA, 检测 Siglec-G 的基因表达; (4) 提取野生型小鼠腹腔巨噬细胞, 操作方法同上, 最后用不同浓度 LPS(10、100 和 1 000 ng/mL)刺激 24 h 后提取细胞 RNA, 检测 Siglec-G 的基因表达; (5) 提取野生型和 Siglec-G^{-/-}小鼠腹腔巨噬细胞, 以适当细胞密度接种于 48 孔

板中, 操作方法同上, 最后用 HMGB1(10 μg/mL)和 LPS(100 ng/mL)刺激 24 h 后收集细胞上清, 检测 TNF-α 和 IL-6 分泌情况。

1.2.3 RNA 的提取、逆转录反应和 Real-time PCR 用 Trizol 裂解细胞, 振荡并室温静置 3 min 后 12 000×g 离心 15 min, 吸取上层无色透明溶液并加入 500 μL 异丙醇混匀, 室温静置 10 min 后, 12 000×g 离心 20 min, 去掉上清, 加入 75% 的乙醇洗涤沉淀两遍, 离心后弃上清, 所得沉淀即为 RNA, 加入 DEPC 水溶解 RNA, 于 56℃水浴 10 min 后放在冰上即可。用 DEPC 水适当稀释 RNA 后, 测定 OD 值, 计算 RNA 纯度及产量。根据 Promega 逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA, Real-time PCR 采用 Roche 的 SYBR green 染料说明指导, 用 LightCycler® 96 仪器检测基因表达情况。Siglec-G 正向: 5'-TGATCATCGTGAAGACCCTC-3', 反向: 5'-TGAGCTCCTAGAAGGGGCAT-3'; β-actin 正向: 5'-AGAAGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3', 反向: 5'-TACTCTGCTTGCTGATCCACAT-3'。以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

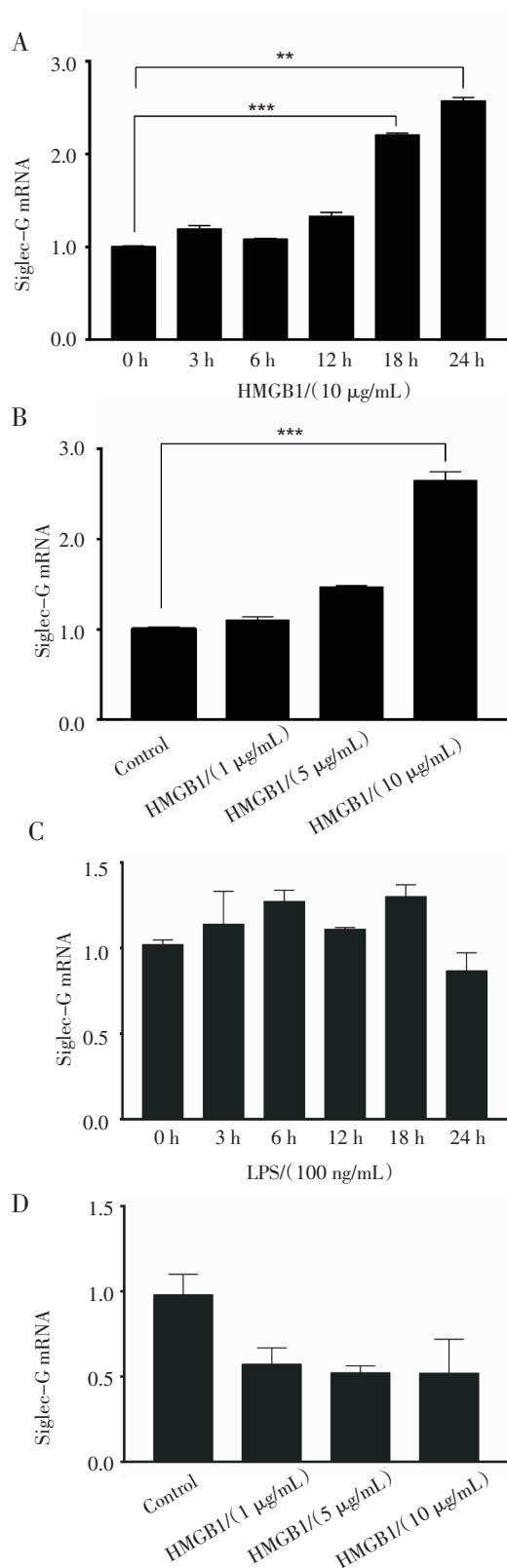
1.2.4 ELISA 法检测细胞上清 TNF-α 和 IL-6 分泌情况 按照 ELISA 试剂盒操作说明进行, 实验前一晚包被捕获抗体, 转天晨洗板 3 次, 加入 200 μL 封闭液, 室温封闭 1 h 后洗板 1 次, 加入 100 μL 待检测细胞上清原液, 室温孵育 2 h 后洗板 3 次, 加入 100 μL 检测抗体, 室温孵育 1 h 后洗板 5 次, 加入 100 μL HRP, 室温避光孵育 30 min, 洗板 5 至 7 次后加入显色液, 最后加入终止液在酶标仪上检测。

1.3 统计学方法 各组实验均独立重复至少 3 次, 用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 定义为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAMPs 和 PAMPs 作用巨噬细胞后 Siglec-G 的基因表达情况 应用 HMGB1 在不同时间点刺激野生型小鼠腹腔巨噬细胞, Real-time PCR 检测 Siglec-G 的基因表达情况。结果见图 1, 随着刺激时间的延长, Siglec-G 的表达逐渐升高, 尤其在第 18 h 和 24 h, 其表达明显高于对照组 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, 图 1A)。应用不同浓度的 HMGB1 刺激巨噬细胞, 结果发现随着给药浓度的增加, Siglec-G 的表达量也明显增高 ($P < 0.001$, 图 1B)。而用 LPS 在不同时间点刺激巨噬细胞后, Siglec-G 的表达没有明显升高(图 1C)。同样地, 用不同浓度的 LPS 刺激巨噬细胞, Siglec-G 的表达也没有升高(图 1D)。以上结果表明

DAMPs 能够影响巨噬细胞中 Siglec-G 的表达,而 PAMPs 对 Siglec-G 的表达无明显影响,说明 Siglec-G 可以特异识别 DAMPs 并具有时间和剂量依赖性。

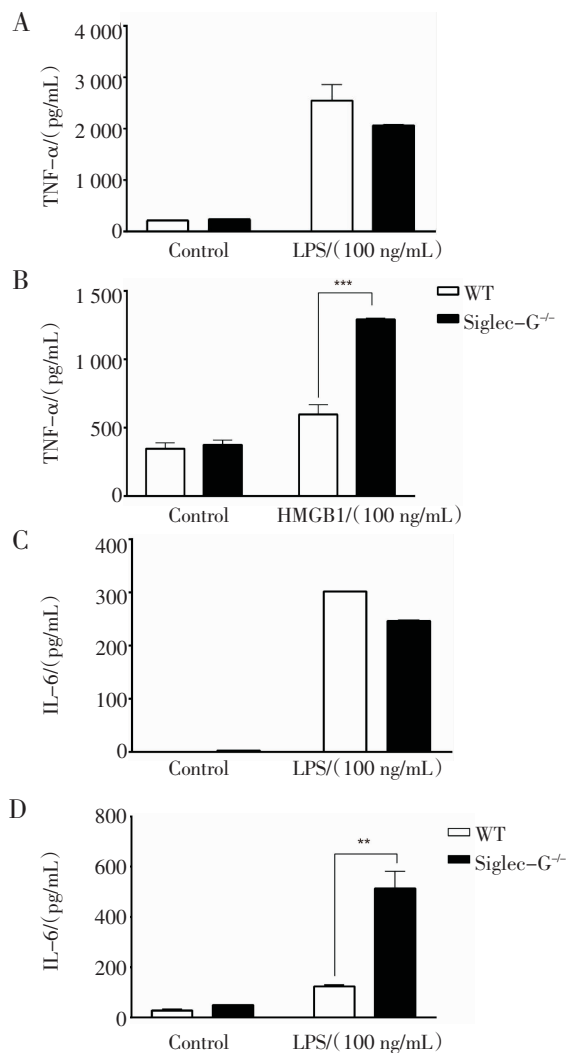


** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图1 巨噬细胞中 Siglec-G 的基因表达

Fig 1 The expression of Siglec-G mRNA in macrophages

2.2 DAMPs 和 PAMPs 作用不同基因型小鼠巨噬细胞后 TNF- α 和 IL-6 的分泌情况 为了观察 Siglec-G 表达对 DAMPs 和 PAMPs 作用后巨噬细胞分泌炎症因子的影响,我们分别用 HMGB1 和 LPS 刺激野生型和 Siglec-G^{-/-}小鼠的巨噬细胞,ELISA 检测细胞上清中炎症因子的分泌情况。结果见图 2, LPS 刺激两种基因型小鼠的巨噬细胞其分泌 TNF- α 没有明显变化(图 2A),而 HMGB1 刺激后, Siglec-G 敲除的巨噬细胞分泌 TNF- α 明显多于野生型小鼠的巨噬细胞($P < 0.001$,图 2B)。同样地, LPS 刺激两种基因背景的巨噬细胞后, IL-6 的分泌没有变化(图 2C), HMGB1 刺激后, Siglec-G 敲除的巨噬细胞分泌 IL-6 明显增多($P < 0.01$,图 2D)。以上结果表明, Siglec-G 特异性抑制 DAMPs 诱导的巨噬细胞分泌促炎因子,而对于 PAMPs 引起的炎症反应没有影响,说明在巨噬细胞中 Siglec-G 是通过识别 DAMPs 来发挥免疫抑制功能。



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 巨噬细胞上清中炎症因子的分泌情况

Fig 2 The secretion of inflammatory cytokines in the supernatant of macrophages

3 讨论

DAMPs 和 PAMPs 作为特殊的抗原形式,参与宿主免疫细胞的免疫识别,是激活和启动固有免疫应答和适应性免疫应答的必要条件。HMGB1 被认为是一种细胞核内固有免疫危险信号,也是 DAMPs 的重要成员之一^[5],它能够与特异性受体结合,诱导巨噬细胞分泌炎症细胞因子^[6]。LPS 为革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分,它属于 PAMPs,TLR4 识别 LPS 后可直接激活 NF- κ B 信号通路引发炎症反应^[7-8]。目前看来,DAMPs 和 PAMPs 在固有免疫应答中的研究,尤其是树突状细胞相关的研究越来越多^[1,9-10],而在巨噬细胞中的研究还比较少。本研究发现, HMGB1 刺激巨噬细胞后 Siglec-G 的表达明显升高,而 LPS 刺激后其表达没有变化,该结果提示 Siglec-G 特异性识别 DAMPs 模式分子,而对 PAMPs 模式分子没有识别能力。

Siglecs 作为一种免疫识别受体,它通过与细胞表面的多聚糖结合调控天然免疫和获得性免疫反应,从而实现其抗病原体的功能^[11]。Siglecs 主要包括两类:一类是序列保守的 Siglecs,包括唾液酸黏附素、CD22 和 Siglec-15 等;另一类是与 CD33 相关的序列可变的 Siglecs,包括 CD33、Siglec-E 和 Siglec-G 等^[11]。在这两类型中,大多数成员的胞内段含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIMs),从而可以发挥免疫抑制功能^[12-14]。Siglec-G 作为 CD33 家族的一员,在免疫识别和免疫调控中发挥越来越重要的作用^[15-16]。目前关于 Siglec-G 的研究主要聚焦在树突状细胞^[1,17]、B 细胞^[18]和 T 细胞^[19]。为了探讨 Siglec-G 表达对巨噬细胞免疫活性的影响,我们利用 Siglec-G 敲除小鼠,DAMPs 和 PAMPs 两种模式分子分别诱导巨噬细胞活化,观察 Siglec-G 分子对巨噬细胞分泌炎症因子的调节作用。笔者发现 HMGB1 作用于 Siglec-G 敲除小鼠的腹腔巨噬细胞后,TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的分泌水平明显升高,但 LPS 刺激后,其表达在两种基因背景的巨噬细胞中没有差异,提示巨噬细胞可能是通过表达 Siglec-G 来识别胞内危险信号分子并发挥免疫抑制作用,而对病原相关蛋白分子,Siglec-G 缺乏识别及调控作用。

鉴于巨噬细胞的异质性及其功能相关性,Siglec-G 在不同免疫器官中巨噬细胞及其亚型的表达,Siglec-G 是通过何种途径来发挥免疫抑制功能和具体的作用机制如何尚有待深入研究。

参考文献:

[1] Chen G Y, Tang J, Zheng P, et al. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-Induced immune responses[J]. *Science (New York, NY)*, 2009, 323(5922):1722

- [2] Cao H, Crocker P R. Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation [J]. *Immunology*, 2011, 132(1):18
- [3] Zelenay S, Reise Sousa C. Adaptive immunity after cell death[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(7):329
- [4] Segonzac C, Zipfel C. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(1):54
- [5] Chaochao Q, Lou G, Yang Y, et al. Macrophage inflammatory protein-2 in high mobility group box 1 secretion of macrophage cells exposed to lipopolysaccharide[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(3):913
- [6] Wang X, Sun R, Wei H, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1)-Toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: Interaction of gamma delta T cells with macrophages[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1):373
- [7] Scrima R, Menqa M, Pacelli C, et al. Para-hydroxyphenylpyruvate inhibits the pro-inflammatory stimulation of macrophage preventing LPS-mediated nitro-oxidative unbalance and immunometabolic shift[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11):e0188683
- [8] He X, Liu W, Shi M, et al. Docosahexaenoic acid attenuates LPS-stimulated inflammatory response by regulating the PPAR γ /NF- κ B pathways in primary bovine mammary epithelial cells[J]. *Res Vet Sci*, 2017, 112:7
- [9] Lin S Y, Hsieh S Y, Fan Y T, et al. Necroptosis promotes autophagy-dependent upregulation of DAMP and results in immunosurveillance[J]. *Autophagy*, 2017[Epub ahead of print]
- [10] Zhu J, Wang F L, Wang H B, et al. TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12239
- [11] Pillai S, Netravali I A, Cariappa A, et al. Siglecs and immune regulation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30:357
- [12] O'Keefe T L, Williams G T, Davies S L, et al. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice[J]. *Science (New York, NY)*, 1996, 274(5288):798
- [13] Nitschke L. CD22 and Siglec-G: B-cell inhibitory receptors with distinct functions[J]. *Immunol Rev*, 2009, 230(1):128
- [14] Poe J C, Tedder T F. CD22 and Siglec-G in B cell function and tolerance[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(8):413
- [15] Macauley M S, Crocker P R, Paulson J C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(10):653
- [16] Toubai T, Hou G, Mathewson N, et al. Siglec-G-CD24 axis controls the severity of graft-versus-host disease in mice[J]. *Blood*, 2014, 123(22):3512
- [17] Ding Y, Guo Z, Liu Y, et al. The lectin Siglec-G inhibits dendritic cell cross-presentation by impairing MHC class I-peptide complex formation[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(10):1167
- [18] Gruber S, Hendrikx T, Tsiantoulas D, et al. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin G promotes atherosclerosis and liver inflammation by suppressing the protective functions of B-1 cells[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(10):2348
- [19] Toubai T, Rossi C, Oravec-Wilson K, et al. Siglec-G represses DAMP-mediated effects on T cells[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(14): pii: 92293

(2017-09-29 收稿)