

本文引文格式:台立,汤兴丽.白色念珠菌对 M2 巨噬细胞极化逆转作用的研究[J].
右江民族医学院学报,2025,47(1):32-36.

【论著与临床报道】

白色念珠菌对 M2 巨噬细胞极化逆转作用的研究

台立,汤兴丽

(皖南医学院基础医学院,安徽 芜湖 241002)

摘要:目的 探究高温灭活的白色念珠菌对人外周血来源的 M2 巨噬细胞极化逆转的作用,并探讨其作用位点是否与 Dectin-1 相关。方法 分离健康人外周血单核细胞,并在体外将其分化为 M2 型巨噬细胞。利用高温灭活的白色念珠菌刺激 M2,通过 ELISA 法测定其 M2 相关特征的变化;利用抗 Dectin-1 抗体对该过程进行阻断,判断 Dectin-1 是否参与该过程。结果 经过热灭活白色念珠菌预处理的 M2 巨噬细胞再一次接触到外来刺激物 LPS 时,会分泌更多的炎症细胞因子,并且白色念珠菌对 M2 巨噬细胞的刺激作用具有剂量依赖性,即 M2 巨噬细胞对 LPS 的反应性也随着白色念珠菌的刺激浓度的升高而增大。除此之外,Dectin-1 的抗体可以阻断白色念珠菌对 M2 巨噬细胞的极化逆转作用。结论 高温灭活的白色念珠菌处理后的 M2 巨噬细胞,其极化状态发生了明显改变,由抑炎性的状态逐渐转变为促炎性的状态,并且 Dectin-1 参与了此过程。

关键词: M2 巨噬细胞;白色念珠菌;极化

中图分类号: R329.24

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2025)01-0032-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2025.01.005

Study on the reversal effect of *Candida albicans* on M2 macrophage polarization

TAI Li, TANG Xingli

(School of Basic Medical Sciences, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of heat-inactivated *Candida albicans* on the polarization reversal of M2 macrophages derived from human peripheral blood and to investigate whether its site of action is related to Dectin-1. **Methods** Monocytes isolated from the peripheral blood of healthy individuals were differentiated into M2 macrophages in vitro. Heat-inactivated *Candida albicans* was used to stimulate M2 macrophages, and changes in M2-related characteristics were measured by ELISA. Anti-Dectin-1 antibodies were used to block this process to determine whether Dectin-1 was involved. **Results** M2 macrophages pretreated with heat-inactivated *Candida albicans* secreted more inflammatory cytokines when re-exposed to the foreign stimulus LPS. The stimulatory effect of *Candida albicans* on M2 macrophages exhibited a dose-dependent relationship, meaning that the reactivity of M2 macrophages to LPS increased with the concentration of *Candida albicans* stimulation. In addition, antibodies against Dectin-1 could block the polarization reversal effect of *Candida albicans* on M2 macrophages. **Conclusion** M2 macrophages treated with heat-inactivated *Candida albicans* showed a significant change in polarization state, gradually transitioning from an anti-inflammatory to a pro-inflammatory state, and Dectin-1 was involved in this process.

Key words: M2 macrophages; *Candida albicans*; polarization

基金项目: 皖南医学院中青年科研项目(WK202221)

第一作者: 台立,实验师,研究方向:自身免疫病,E-mail:taili0902@163.com

通讯作者: 汤兴丽,实验师,研究方向:医学微生物学,E-mail:107547969@qq.com

巨噬细胞在机体的固有免疫应答和适应性免疫应答过程中都发挥着关键性的作用,巨噬细胞具有很强的可塑性和异质性。血液中的单核细胞在体内外不同微环境的影响下,可以显著改变其生物学功能,分化为不同的亚群,即 M1 和 M2。其中 M1 型巨噬细胞能够释放大量的促炎性细胞因子,在机体中发挥细胞毒作用和导致组织损伤;M2 型巨噬细胞能够分泌抑炎性的细胞因子,在机体中发挥免疫调节作用和组织修复的功能^[1]。体内巨噬细胞极化状态的不平衡能构成许多病理过程,包括肿瘤发展、自身免疫病和慢性炎症疾病。但在近年的许多文献报道中,发现 M2 型巨噬细胞在某些疾病的发展过程中发挥着促炎性的作用。在类风湿性关节炎病人关节滑膜组织中,有相当一部分的 M2 细胞能够产生促炎性细胞因子 TNF- α ^[2];除此之外,在小鼠的心肌炎模型中也发现了小鼠 M2 型巨噬细胞上的 TLR4、IL-1 β 等标志物的表达相对高于 M1 型巨噬细胞^[3],以上研究成果皆提示了 M2 型巨噬细胞在机体某些特定的病理性状况下扮演着活化而不是抑制性的角色。白色念珠菌是人类共生微生物群不可分割的一部分,在机体微环境产生变化时,白色念珠菌的入侵会导致机体发生炎症反应和黏膜表面感染^[4]。据相关报道,白色念珠菌及其配体 β -葡聚糖(β -glucan)能够诱导单核细胞功能重组,导致其炎症细胞因子产生增加^[5]。作为一种病原相关分子模式, β -glucan 已被发现可触发巨噬细胞的吞噬作用并且诱导其产生炎性细胞因子^[6-7]。此外, β -glucan 与其主要模式识别受体 Dectin-1 结合能够形成吞噬突触,进而导致直接的细胞抗菌反应^[8]。然而,白色念珠菌是否影响组织中巨噬细胞的极化目前尚不清楚。

本次研究证实了经过热处理的白色念珠菌预刺激 M2 巨噬细胞后,当其再次接触刺激因子时能够诱发产生大量的炎性细胞因子。这种现象是具有剂量依赖性的,并且 Dectin-1 的抗体可以阻断这一现象,这提示 Dectin-1 可能与白色念珠菌诱导 M2 巨噬细胞极化逆转有关,为后续研究提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 M2 巨噬细胞的分化与培养 采集健康人外周血于 EDTA 抗凝管中,利用人淋巴细胞分离液经过密度梯度离心将血液中的 PBMC 分离出来。采用单核细胞阳选试剂盒将 PBMC 中的 CD14⁺ 单核细胞分离出来。对提取出的单核细胞进行计数,每孔以 5×10^5 个细胞的密度接种在 24 孔板中;同时加入 20 ng/mL 细胞因子 M-CSF 培养 6 d,再加入 20 ng/mL 细胞因子 IL-4 继续分化 1 d,更换 1640 培养基静息。即分化完成的 M2 型巨噬细胞,可用于后续处理。分化成功的 M2 巨噬细胞,重新提取计数重悬于 1640 培养基并接种于 96 孔板中,每个孔接种 5×10^4 个细胞,同时加

入相应的刺激物于二氧化碳培养箱中培养 12 h,收取上清液后再加入含 100 ng/mL LPS 的 1640 完全培养基中,刺激 24 h 后再收取上清液,收集上清液储存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱待测。在阻断实验中,将细胞与 Dectin-1 抗体(购自 Abcam 公司)提前共同培养 2 h,再加入相应的刺激物,其余步骤与上述一致。

1.2 流式细胞术鉴定 M2 巨噬细胞 将体外分化的 M2 型巨噬细胞收集起来并计数,取适量细胞分装在 EP 管中,将流式抗体(CD14、CD163、CD206 购自 Biotrend 公司)用 PBS 1 : 50 稀释,在放置细胞的 EP 管中加入相应抗体于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 染色 30 min,期间每隔 10 min 混匀 1 次,染色结束后,每管加入 1 mL PBS 离心 500 g/5 min 洗去多余抗体,弃去上清液,最后加入荧光抗体保存液,利用流式细胞仪进行检测。

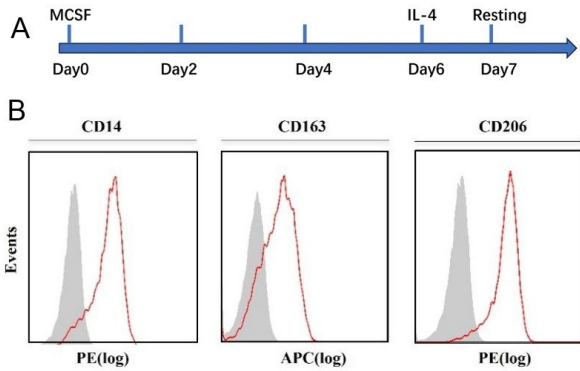
1.3 酶联免疫吸附实验(ELISA) 采用细胞因子 ELISA 检测试剂盒检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 细胞因子(购自 eBioscience 公司)的释放情况。具体检测步骤如下,包被:将捕获抗体用包被液稀释,在酶标板中每孔加入 100 μL 包被液, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,次日取出甩尽液体备用;用 0.05% PBST 重复洗板 3 次,每次 3 min,甩干;封闭:用 5% 脱脂奶封闭检测孔,每孔加入 230 μL ,放置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 封闭 2 h 后甩干;加样:将标准品按照递减倍数稀释成 7 个不同浓度梯度,TNF- α 标准品第一孔浓度为 1 000 pg/mL,其余为 300 pg/mL,最后一孔浓度为 0,每个孔中加入 100 μL ;同时在其余的孔中加入待测细胞上清液,然后在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h;甩干待测样品后用 0.05% PBST 重复洗板 3 次,每次 3 min,甩干;加入检测抗体:将检测抗体稀释至要求倍数,每个孔加入 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h,甩干后用 0.05% PBST 重复洗板 3 次,每次 3 min,甩干;加入 Avidin-HRP:Avidin-HRP 用稀释液稀释至要求倍数,每个孔加入 100 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min;甩干后用 0.05% PBST 重复洗板 3 次,每次 3 min,甩干;显色:在每个孔中加入 100 μL TMB 显色液,室温显色 5~10 min 后注入 50 μL 终止液以终止显色反应;读数:使用酶标仪测定波长为 450 nm 处的吸收度值,根据标准曲线和相应稀释倍数对上清液中细胞因子含量进行计算。

1.4 统计学方法 本实验数据采用 GraphPad Prism 5 软件处理,组间比较采用方差分析和两样本的 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人单核细胞来源的 M2 巨噬细胞的分化及表型的鉴定 按照上述介绍的方式体外分化人 M2 巨噬细胞,染上相应的流式抗体并对其进行表型分析鉴定,流式结果显示 M2 巨噬细胞表面的特异性标志物 CD14、CD163 和 CD206 均是高表达,提示 M2 巨噬细胞在体

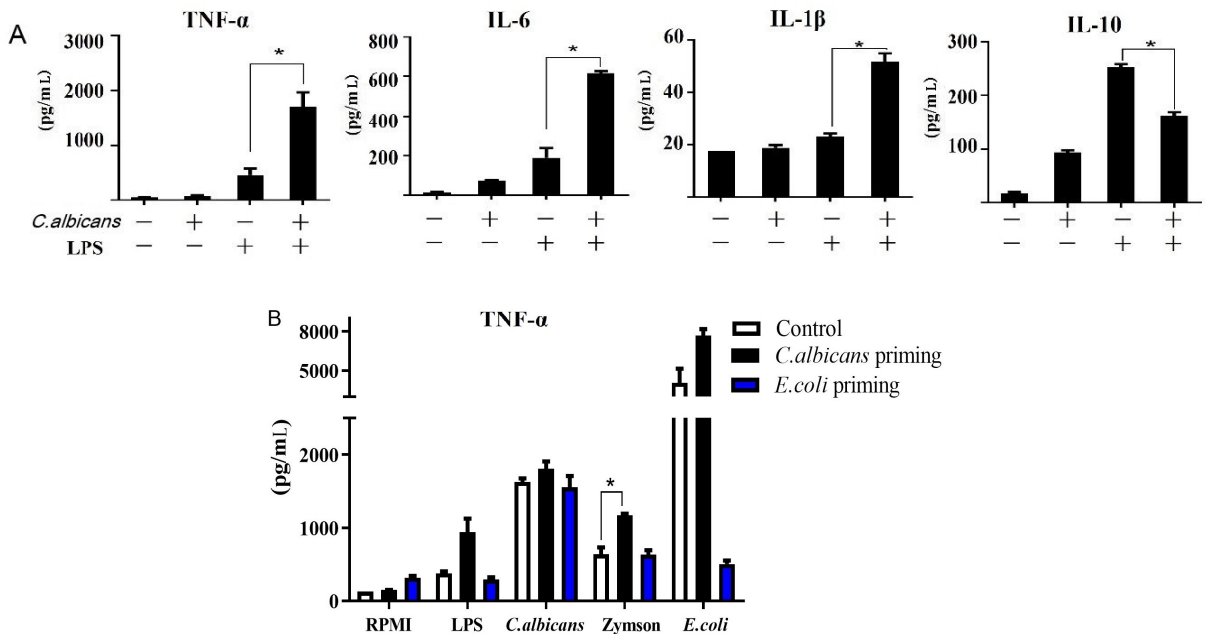
外分化成功,见图 1A 和图 1B。



注:A 为 M2 巨噬细胞在体外的分化步骤;
B 为流式鉴定分化完成后的 M2 巨噬细胞。

图 1 M2 巨噬细胞的分化及鉴定

2.2 白色念珠菌刺激 M2 巨噬细胞诱导其释放大量炎性细胞因子 白色念珠菌经过 95 °C 水浴处理 30 min 后使其灭活,然后计数并保存于 PBS 中。首先



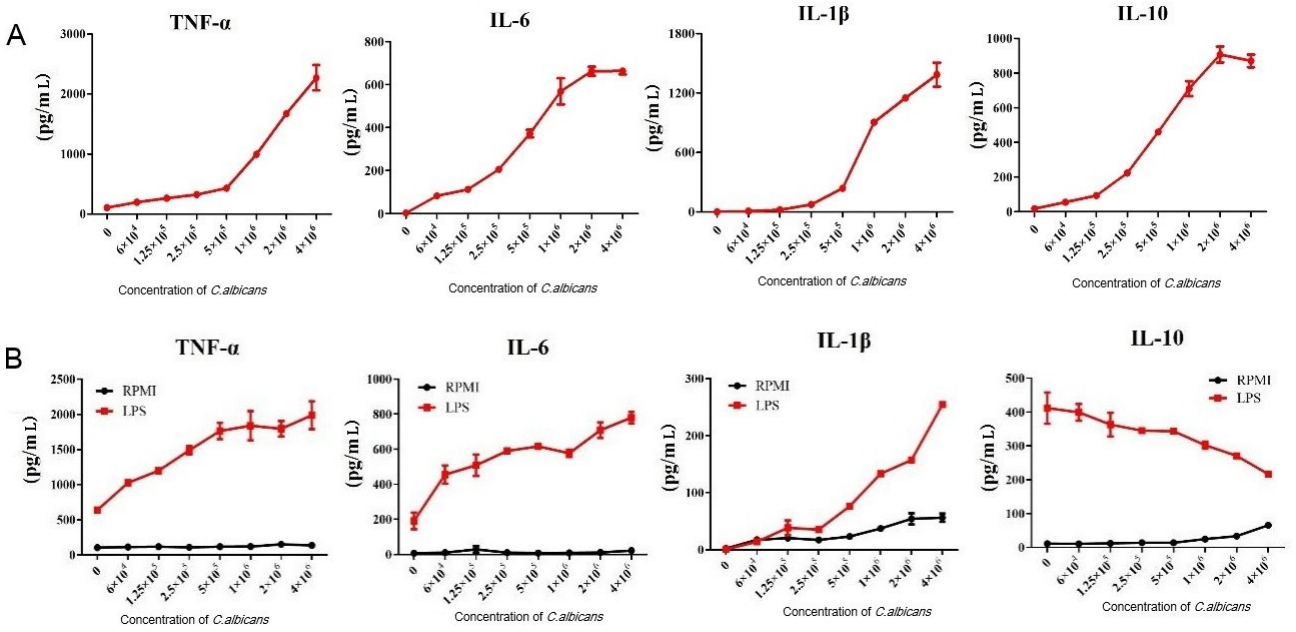
注:A 为白色念珠菌处理后的 M2 再次接受 LPS 刺激,其两轮上清液中细胞因子的含量;B 为大肠杆菌(*E. coli*)预刺激的 M2 再次接受其他刺激物处理,两轮上清液中细胞因子 TNF- α 的含量变化;RPMI 为 RPMI 1640 培养基;* $P < 0.05$ 。

图 2 白色念珠菌刺激 M2 细胞诱导其释放大量炎性细胞因子

2.3 白色念珠菌对 M2 巨噬细胞的刺激具有剂量依赖性 首先将 M2 巨噬细胞培养于 96 孔板,每孔铺 5×10^4 个细胞。用不同浓度 (0.6×10^4 、 1.2×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 /mL) 的白色念珠菌处理 18 h 后收集其上清液,同时再用 10 ng/mL 的 LPS 对其进行二轮刺激 24 h,再收集上清液。利用 ELISA 试剂盒对以上两轮上清液中细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10) 的释放进行检测,结果如下:随着白色念珠菌浓度升高,M2 巨噬细胞释放的促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度逐渐升高,而抑炎性细胞

将 M2 巨噬细胞培养于 96 孔板,每孔铺 5×10^4 个细胞。用浓度为 5×10^5 个/毫升的白色念珠菌处理 M2 巨噬细胞 18 h 后收集其上清液,同时再用 10 ng/mL 的 LPS 对其进行二轮刺激 24 h,再收集上清液。利用 ELISA 试剂盒对以上两轮上清液中细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10) 的分泌进行检测,结果如下:经过白色念珠菌预处理的 M2 巨噬细胞,再次接受 LPS 的刺激时,促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的释放都有明显的升高,而抑炎性细胞因子 IL-10 的释放却有明显的降低。随后,又用大肠杆菌 (*E. coli*) 对 M2 巨噬细胞进行预处理 18 h,再用不同的刺激剂如 LPS、酵母聚糖 (zymosan)、白色念珠菌、大肠杆菌 (*E. coli*) 对其进行二轮刺激 24 h,检测其上清液中 TNF- α 的释放,结果表明只有白色念珠菌预处理的 M2 巨噬细胞再次接受其他刺激时才能释放大量的 TNF- α 。以上结果显示了白色念珠菌能促进 M2 巨噬细胞产生更多的促炎性细胞因子,见图 2A 和图 2B。

因子 IL-10 浓度逐渐降低。当再次接受 LPS 的刺激后,其促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的释放随着白色念珠菌的浓度升高而升高;反之,抑炎性细胞因子 IL-10 的释放却随着白色念珠菌的浓度升高而降低。以上结果说明了白色念珠菌处理后的 M2 巨噬细胞,其极化状态发生了明显改变,由抑炎性的状态逐渐转变为促炎性的状态。这意味着经过白色念珠菌的刺激,M2 巨噬细胞的极化状态发生了逆转,见图 3A 和 3B。

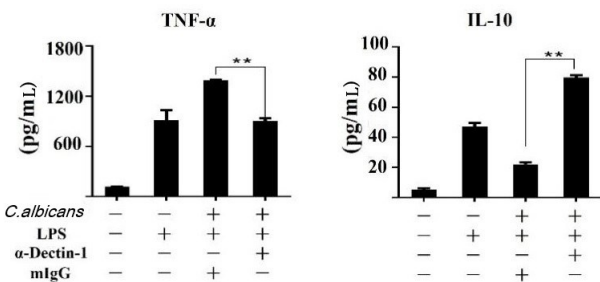


注：A 为不同剂量的白色念珠菌刺激 M2 后其上清液中各细胞因子的分泌量；

B 为再次接受 LPS 刺激时，其上清液中各细胞因子的分泌量。

图 3 白色念珠菌对 M2 巨噬细胞的刺激具有剂量依赖性

2.4 Dectin-1 对热处理白色念珠菌介导的 M2 巨噬细胞极化逆转的影响 为了阐明加热白色念珠菌对 M2 巨噬细胞极化逆转作用的机制，首先关注到 β-葡聚糖受体 Dectin-1，通过使用抗 Dectin-1 抗体来测定 Dectin-1 对热处理白色念珠菌介导的 M2 巨噬细胞极化逆转的影响。首先将 M2 巨噬细胞培养于 96 孔板，每孔铺 5 × 10⁴ 个细胞，将细胞与抗 Dectin-1 (30 μg/mL) 抗体和同型对照 mIgG (30 μg/mL) 共培养 2 h，再加入热处理的白色念珠菌刺激 18 h 后收集其上清液，同时用 10 ng/mL 的 LPS 进行二次刺激 24 h，之后收集上清液。利用 ELISA 试剂盒对以上两轮上清液中细胞因子 (TNF-α、IL-10) 的释放进行检测，结果发现抗 Dectin-1 抗体明显消除了白色念珠菌介导的 M2 巨噬细胞 TNF-α 释放增加以及 IL-10 释放降低的现象，说明了 Dectin-1 参与了此过程，为后续机制层面的研究提供了新的靶点，见图 4。



注：* * P < 0.01.

图 4 加入抗 Dectin-1 抗体后上清液中细胞因子含量的变化

3 讨论

白色念珠菌是人类共生微生物群不可分割的一部分。据报道，在肠炎模型中遇到白色念珠菌会导致肠道炎症的严重程度增加^[9]，β-葡聚糖受体 Dectin-1 参与了这种作用，该受体的多态性与溃疡性结肠炎的严重程度有关^[10]，但与溃疡性肠炎或克罗恩病易感性无关^[11]。有文献报道，白色念珠菌之所以可以和人类共生，其原因在于白色念珠菌可以诱导且增强单核细胞的促炎反应^[12]，并且白色念珠菌还可以驯化单核细胞，使其在预先接触白色念珠菌或 β-葡聚糖后对微生物成分表现出增强和持续的反应。这种作用是由 Dectin-1 受体/Rf-1 通路介导的，致使 p38 等信号分子能更快、更有效地激活^[5]。微生物对宿主免疫细胞的慢性刺激导致免疫增强功能状态，从而增加对感染的抵抗力或免疫耐受性，后者可能在预防组织损伤方面发挥作用。了解这两种影响之间的相互作用可以让人们更好地了解真菌是如何适应人体免疫系统的。白色念珠菌可能通过促进耐受性或通过扩大炎症，导致克罗恩病的产生^[13]。在近期研究中，白色念珠菌并不能诱导细胞产生耐受，相反它可以促进人单核细胞对细菌菌落的炎性增强反应。这种促进可能与单核细胞内的白色念珠菌相关的表观遗传学重编程有关^[5]。因此，真菌微生物可能对黏膜部位的宿主防御状态产生积极影响。当先前由白色念珠菌引起的黏膜部位的白细胞遇到潜在的病原定植时，宿主通过增强炎症反应（即通过募集和激活活性免疫细胞以及通过诱导黏膜炎的扩张）来增强防御。

巨噬细胞作为机体重要的免疫细胞之一,在免疫应答中发挥着非常重要的作用。血液中的单核细胞受体内不同微环境的影响下,能够分化成具有不同形态和功能的表型,主要包括两大类,即经典活化型巨噬细胞 M1 和替代活化型巨噬细胞 M2。在机体正常情况下,M1/M2 细胞处于动态平衡,调节机体免疫应答有条不紊地进行。当 M1/M2 细胞数量出现失衡,就会导致机体的病理变化。当 M1 型巨噬细胞数量显著增加时,会引起机体产生慢性炎症性疾病,而当 M2 型巨噬细胞数量增加时,则会导致机体产生严重的免疫抑制^[1]。但在近年的许多文献报道中发现 M2 型巨噬细胞在某些疾病的发展过程中扮演着促炎性的角色。在类风湿性关节炎病人关节滑膜组织中,有相当一部分的 M2 细胞能够产生促炎性细胞因子 TNF- α ^[2];除此之外,在肿瘤微环境中,肿瘤相关巨噬细胞的某些表型也更类似于具有强大免疫抑制活性的 M2 巨噬细胞^[14]。据报道^[15], β -葡聚糖可通过激活 Dectin-1 将肿瘤相关巨噬细胞转化为 M1 样巨噬细胞,因此是癌症免疫治疗药物的一个有吸引力的靶点。所有这些都表明 M2 细胞在某些特定的病理条件下是活跃的而不是抑制性的,这值得进一步探索。

本次研究证明了人类单核细胞来源的 M2 巨噬细胞与白色念珠菌预培养后再次接受外界刺激时可以产生大量的促炎细胞因子。由此可知,白色念珠菌可能诱导 M2 巨噬细胞从抑炎型到促炎型的“炎症转换”,并在 LPS 和其他刺激物刺激后表现出促炎细胞因子的产生增强。这种作用是剂量依赖性的,且该途径与白色念珠菌细胞壁成分 β -葡聚糖的结合受体 Dectin-1 有关。这一现象为后续探究真菌感染等疾病提供了潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] LUO M,ZHAO F K,CHENG H,et al. Macrophage polarization:an important role in inflammatory diseases[J]. Front Immunol,2024,15:1352946.

[2] CUTOLO M,CAMPITIELLO R,GOTELLI E,et al. The role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis[J]. Front Immunol,2022,13:867260.

[3] FUNES S C,RIOS M,ESCOBAR-VERA J,et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. Immunology,2018,154(2):186-195.

[4] ARKOWITZ R A,BASSILANA M. Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth [J].

F1000Res,2019,8:F1000 Faculty Rev-700.

- [5] LEONHARDT J,GROBE S,MRRX C,et al. *Candida albicans* β -glucan differentiates human monocytes into a specific subset of macrophages[J]. Front Immunol,2018,9:2818.
- [6] MATA-MARTÍNEZ P,BERGÓN-GUTIÉRREZ M,DEL FRESNO C. Dectin-1 signaling update: new perspectives for trained immunity [J]. Front Immunol, 2022, 13: 812148.
- [7] LIU X H,XU Y J,LI Y,et al. Ferumoxytol- β -glucan inhibits melanoma growth via interacting with dectin-1 to polarize macrophages into M1 phenotype[J]. Int J Med Sci,2021,18(14):3125-3139.
- [8] SAHASRABUDHE N M, DOKTER-FOKKENS J, DE VOS P. Particulate β -glucans synergistically activate TLR4 and Dectin-1 in human dendritic cells[J]. Mol Nutr Food Res,2016,60(11):2514-2522.
- [9] POULAIN D, SENDID B, STANDAERT-VITSE A, et al. Yeasts: neglected pathogens [J]. Dig Dis, 2009, 27 (Suppl. 1):104-110.
- [10] ILIEV I D,FUNARI V A,TAYLOR K D,et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis[J]. Science, 2012, 336 (6086):1314-1317.
- [11] DE VRIES H S,PLANTINGA T S,VAN KRIEKEN J H,et al. Genetic association analysis of the functional c. 714T>G polymorphism and mucosal expression of dectin-1 in inflammatory bowel disease [J]. PLoS One, 2009,4(11):e7818.
- [12] BAYS D J,JENKINS EN,LYMAN M,et al. Epidemiology of invasive candidiasis[J]. Clin Epidemiol,2024,16: 549-566.
- [13] BONIFAZI P,ZELANTE T,D'ANGELO C,et al. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*[J]. Mucosal Immunol,2009,2(4):362-374.
- [14] DONG H L,YANG Y Y,GAO C H,et al. Lactoferrin-containing immuno complex mediates antitumor effects by resetting tumor-associated macrophages to M1 phenotype[J]. J Immunother Cancer,2020,8(1):e000339.
- [15] LIU M,LUO F L,DING C L,et al. Dectin-1 activation by a natural product β -glucan converts immunosuppressive macrophages into an M1-like phenotype[J]. J Immunol,2015,195(10):5055-5065.

收稿日期:2024-06-25;修回日期:2024-09-23

(本文编辑 覃洪含)