

钟秋梅,张佳,李林英,等.  $\beta$ -glucan 诱导训练免疫及其在逆转免疫耐受中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1013-1022.

Zhong QM, Zhang J, Li LY, et al.  $\beta$ -glucan induces trained immunity and its application in reversing immune tolerance [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1013-1022.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.08.001

# $\beta$ -glucan 诱导训练免疫及其在逆转免疫耐受中的应用

钟秋梅<sup>1,2</sup>, 张佳<sup>1,2</sup>, 李林英<sup>1,2</sup>, 郑世进<sup>1,2\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361100; 2. 厦门大学细胞应激生物学国家重点实验室, 福建 厦门 361100)

**【摘要】** 目的 本研究拟通过在体内和体外诱导训练免疫反应,以探讨诱导训练免疫是否可能逆转免疫耐受状态。方法 以  $\beta$ -glucan 作为训练免疫诱导剂,建立体外小鼠胫骨来源的巨噬细胞 (bone marrow derived-macrophages, BMDM) 训练免疫模型:40  $\mu$ g/mL  $\beta$ -glucan 刺激 BMDM 24 h,随后用 PBS 洗涤后让 BMDM 在完全培养基中静息 6 d,在第 3 天的时候补充培养基,第 7 天收集细胞 100 ng/mL LPS 再刺激,4 h 后收集细胞抽提 RNA 和 24 h 后收集细胞上清;建立  $\beta$ -glucan 体内训练免疫模型:野生型 C57BL/6J 腹腔注射 1 mg  $\beta$ -glucan,对照组腹腔注射 200  $\mu$ L 的 PBS,7 d 后感染金黄色葡萄球菌(每只  $1 \times 10^4/200 \mu$ L PBS)。LPS 诱导体外免疫耐受,体外免疫耐受逆转通过在耐受的 BMDM 中加入 40  $\mu$ g/mL  $\beta$ -glucan 刺激 24 h,随后让细胞静息 1 d,通过促炎因子的恢复水平来反映耐受逆转情况。盲肠结扎穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) 诱导体内免疫耐受,体内免疫耐受逆转通过向 CLP 组腹腔注射 1 mg  $\beta$ -glucan,通过再次感染非致死剂量的细菌或真菌的生存率反映耐受逆转情况。结果 (1) 经过  $\beta$ -glucan 训练的 BMDM,在 LPS 再次刺激时产生更高水平的促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 NO。同时, $\beta$ -glucan 训练的 BMDM 通过激活 m-TOR 信号通路,导致细胞代谢模式向糖酵解转变,引起细胞内乳酸增多;(2)  $\beta$ -glucan 诱导的体内训练免疫具有保护作用;(3)  $\beta$ -glucan 在体外能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受,恢复 BMDM 促炎细胞因子的产生;(4) 目前我们的结果尚未证实  $\beta$ -glucan 在体内可以逆转 CLP 诱导的免疫耐受。结论 本研究成功地建立了  $\beta$ -glucan 体外和体内训练免疫模型,并证明了在体外  $\beta$ -glucan 能逆转 LPS 诱导的免疫耐受,但是目前结果尚未证实  $\beta$ -glucan 在体内能够逆转 CLP 诱导的免疫耐受,提高二次感染生存率。

**【关键词】**  $\beta$ -葡聚糖;训练免疫;CLP;免疫耐受;耐受逆转

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 08-1013-10

## $\beta$ -glucan induces trained immunity and its application in reversing immune tolerance

ZHONG Qiumei<sup>1,2</sup>, ZHANG Jia<sup>1,2</sup>, LI Linying<sup>1,2</sup>, CHENG Shihchin<sup>1,2\*</sup>

(1. Xiamen University School of Life Science, Xiamen 361100, China. 2. Xiamen University State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Xiamen 361100)

Corresponding author: CHENG Shihchin. E-mail: jamescheng@xmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to examine whether immune tolerance was reversed by trained immunity in both *in vivo* and *in vitro* models. **Methods** Glucan is a prototypical trained immunity inducer. To establish the *in vitro* trained immunity model, BMDMs were stimulated with 40  $\mu$ g/mL  $\beta$ -glucan for 24 h. BMDMs were washed once with warm PBS. After 24 h, they were incubated for 6 days in culture medium that was changed once at day 3. Trained BMDMs were stimulated with 100 ng/mL LPS at day 7. To establish the *in vivo* trained immunity model, wildtype C57BL/

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目面上项目 (32070904)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32070904).

**【作者简介】** 钟秋梅 (1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 先天免疫与免疫耐受。Email: 15882263246@163.com

**【通信作者】** 郑世进 (1979—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 先天免疫系统功能调控; 先天免疫耐受; 先天免疫与肿瘤治疗。

Email: jamescheng@xmu.edu.cn

6J mice were injected intraperitoneally with 1 mg  $\beta$ -glucan in 200 mL PBS. As a control, intraperitoneal injection of PBS alone was performed. After 7 days, mice were infected with *Staphylococcus aureus* intraperitoneally ( $1 \times 10^4/200$  mL PBS per mice). BMDMs were stimulated with LPS to induce immune tolerance *in vitro*.  $\beta$ -glucan was added at 24 h post-LPS stimulation to reverse immune tolerance. Cytokine production capacity was determined by LPS restimulation. CLP was carried out in mice to induce immune tolerance *in vivo*. Intraperitoneal injection of 1 mg  $\beta$ -glucan was performed to reverse CLP-induced tolerance. The efficacy of tolerance reversal was reflected by the survival rate post-reinfection with non-lethal doses of bacteria or fungi. **Results** (1) Glucan-trained BMDMs produced higher levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, and more nitric oxide. The energy metabolism of trained macrophages shifted to aerobic glycolysis, leading to lactate accumulation and enhanced m-TOR activation. (2)  $\beta$ -glucan-induced trained immunity was protective *in vivo*. (3)  $\beta$ -glucan reversed LPS-induced immune tolerance *in vitro*. (4) Administration of  $\beta$ -glucan did not reverse the CLP-induced immune tolerance in the current experimental setting. **Conclusion** This study successfully established  $\beta$ -glucan trained immune models *in vitro* and *in vivo*, and demonstrated that  $\beta$ -glucan can reverse LPS-induced immune tolerance *in vitro*. However, the current results have not confirmed that  $\beta$ -glucan can reverse CLP-induced immune tolerance *in vivo* and improve secondary infection survival.

**【Keywords】**  $\beta$ -glucan; trained immunity; CLP; immune tolerance; tolerance reversal

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

免疫记忆指当机体初次刺激时能产生一个免疫反应,当再次遇到同种刺激时机体能产生更强大的免疫反应。1950 ~ 1960 年,免疫学家一直认为只有具有 T/B 淋巴细胞的脊椎动物才具有免疫记忆<sup>[1]</sup>。后天免疫反应依赖于 T/B 淋巴细胞,特异性识别病原体并建立该特定感染的免疫记忆。在第 2 次遇到相同的病原体时,记忆 T/B 细胞的克隆扩增会诱导快速有效的反应。然而,在后面的研究当中发现在一些植物或非脊椎动物,甚至一些细菌和古细菌中也有免疫记忆,但显然它们的免疫记忆并不是由 T/B 淋巴细胞介导的<sup>[1]</sup>。研究报道,缺乏 T/B 细胞的 *Rag1*<sup>-/-</sup> 小鼠初次感染过非致死剂量的白色念珠菌(*Candida albicans*),当再次感染时能够抵抗感染而存活下来<sup>[2]</sup>。这说明先天免疫系统也能介导一种免疫记忆的产生,后来免疫学家将这种先天免疫介导的保护作用定义为训练免疫(trained immunity)<sup>[3]</sup>。训练免疫是指先天免疫系统在首次遇到刺激后,经过急性反应回到稳态后,当再次遇到同源或异源刺激时,机体能产生更快速的免疫应答,从而保护机体。 $\beta$ -葡聚糖( $\beta$ -glucan)是训练免疫的典型诱导剂, $\beta$ -glucan 训练免疫模型最开始在人源单核细胞中建立。先天免疫细胞如单核细胞和巨噬细胞,当第 1 次遇到  $\beta$ -glucan 时,细胞内糖代谢途径向有氧糖酵解转变,同时促进附近的组蛋白甲基化进行重编程,细胞内的 Akt-mTOR 信号通路也会被激活等<sup>[4]</sup>。当再次遇到同源或异源刺激时,巨噬细胞会产生更迅速和更强大的免疫反应以抵抗感染,保护机体。这表明训练免疫可赋予先天免疫细胞产生免疫记忆,对后续的细菌感染等能做出

及时有效的免疫应答<sup>[5]</sup>。

败血症(sepsis)指致病菌进入血液并在其中繁殖,通过血液循环向全身扩散,从而引发全身性感染。败血症每年造成 20 万 ~ 30 万人死亡,是导致发达国家和发展中国家人口死亡的主要因素之一<sup>[6]</sup>。败血症的病理进程分为两个部分,主要由细菌感染引发,首先是进入急性期,引发多种组织损伤和多器官衰竭,从而导致全身性功能障碍,该阶段称为全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS);急性期过后机体将产生抗炎因子以限制炎症反应的损害,该阶段称为代偿性抗炎综合征(compensatory anti-inflammatory syndrome, CARS)<sup>[7]</sup>。在败血症晚期阶段的抗炎反应会压倒宿主,抵消宿主的初始反应,并可能导致全身性的免疫耐受。这种败血症引起的免疫耐受可以持续多年,使患者容易发生持续性和继发性感染,从而增加死亡率。

为了研究败血症的临床发病机制,并开发有效的治疗方式,需要使用一些有效的实验模型来模拟复制临床败血症患者的病症。以下几种模型常用来研究败血症:静脉注射脂多糖(LPS)、腹腔注射大肠杆菌(*E. coli*)以及盲肠结扎穿刺(CLP)<sup>[8]</sup>。目前使用最广泛的是 CLP 模型,与临床败血症病症具有高度的相容性。在该模型中,败血症起源于腹腔内的多种细菌感染,随后细菌易位进入血液,然后引发全身性的炎症反应<sup>[9]</sup>。CLP 模型可重复性高,可以通过控制针头尺寸、盲肠穿刺次数和抗生素的使用来改变败血症的严重程度<sup>[10]</sup>。

目前败血症的治疗仍旧是一个难题,找到确切

的分子机制有效治疗败血症是首要任务。训练免疫和免疫耐受是两种功能状态相反的免疫应答,目前鲜有研究报道通过诱导训练免疫来逆转败血症引发的免疫耐受状态。Novakovic 等<sup>[11]</sup>发现  $\beta$ -glucan 加入到免疫系统不再发挥功能的受试者的血液样品中,这些单核-巨噬细胞的免疫应答可于体外被重新激活。这表明应用训练免疫逆转免疫耐受状态可能是治疗败血症的可行策略。因此,本研究通过建立  $\beta$ -glucan 训练免疫模型以及小鼠的 CLP 引起的免疫耐受模型,拟通过诱导训练免疫逆转免疫耐受并阐明其中的分子机制,为败血症治疗提供一种可行策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

本论文涉及的所有雄鼠(86只)均是 SPF 级的 C57BL/6J 背景,平均周龄为 8 周,体重约为 22 g,购买于厦门大学实验动物中心【SCXK(闽)2018-0003】。饲养于厦门大学实验动物中心的屏障环境中【SYXK(闽)2018-0009】。饲养期间各组小鼠自由饮水,保持 pH = 6.0 ~ 8.5,饲喂由厦门大学实验动物中心提供的普通饲料。饲养环境:白光和暗光各 12 h 循环照射,温度恒定,温度控制在 25℃ 左右,湿度:45% ~ 55%,换气:每小时 6 ~ 15 次。所有小鼠实验操作均通过动物保护与使用委员会审核批准,严格执行厦门大学实验动物中心(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)制定的动物福利保障条例,并履行动物实验伦理承诺(XMULAC20200219)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

$\beta$ -glucan(实验室从白色念珠菌中自提), LPS (Invitrogen, tlr1-pb5lps), Mouse TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (Invitrogen, 88-7324-76), Mouse IL-6 ELISA 试剂盒 (Invitrogen, 88-7064-76), SYBR Green 染料 (AG, AG11701)。酶标仪 (Biotek, 美国), 凝胶成像仪 (赛智, 中国), CFX Connect<sup>TM</sup> 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\beta$ -glucan 在 BMDM 中训练免疫模型的建立

为了在体外建立训练免疫模型,因此分离 C57BL/6J 小鼠的胫骨,外源添加 M-CSF 刺激分化为成熟的巨噬细胞 (bone marrow derived-macrophage, BMDM),随后向成熟分化的 BMDM 中加入 40  $\mu$ g/mL 的  $\beta$ -glucan, 24 h 后换液,加入含 10

ng/mL M-CSF 的 DMEM 再培养 6 d, 中间第 3 天需补加一半含 10 ng/mL M-CSF 的 DMEM。6 d 后将细胞消化,用 100 ng/mL LPS 再次刺激 4 h 和 24 h。

#### 1.2.2 $\beta$ -glucan 诱导的体内训练免疫模型

感染前的第 7 天和第 4 天采用腹腔注射的方式注射 200  $\mu$ L 体积 1 mg 的  $\beta$ -glucan, 共注射 2 次,在 7 d 的时候感染致死剂量 10<sup>4</sup> CFUs 的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 115-69)。

#### 1.2.3 CLP 模型

为了探究如何改善败血症引发的免疫耐受, CLP 手术在本研究用于建立败血症免疫耐受模型,操作与先前文献报道一致<sup>[9]</sup>。简单来说,手术前给小鼠腹腔注射与体重相适应的 1% 的戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 以麻醉 (单位:  $\mu$ L)。腹部的毛发用剃毛器剃除以暴露腹部皮肤,随后依次剪开表皮和内皮,伤口大小为 1 cm 左右,找到盲肠,随后用医用真丝编织线 (上海金环医疗用品股份有限公司) 结扎,然后用注射器对穿一次后挤出 1 mm 的粪便。结扎的位置和穿刺注射器的大小根据实验所需要的死亡率而定。随后将盲肠还原至腹腔,然后依次缝合内皮和外皮。手术结束,背部皮下注射 1 mL 37℃ 的生理盐水,以面部朝下的姿势,热照灯照射小鼠 1 ~ 3 h 左右,以恢复麻醉引起的常规体温过低。

#### 1.2.4 抗生素治疗

CLP 手术 2 h 后小鼠接受 1 次抗生素治疗,随后在手术后的第 1 天和第 2 天 (共 3 次),背部皮下注射 1 mL 25 mg/kg 的抗生素亚胺培南 (源叶, S26289)。对照组注射 1 mL 的含 5% 葡萄糖的乳酸林格氏液 (5% dextrose in lactated ringer's solution, D5W)。亚胺培南的使用能够有效减少 CLP 后血液中细菌的数量,其剂量依照先前 CLP 模型和临床使用情况<sup>[12-13]</sup>。

#### 1.2.5 蛋白质免疫印迹

10<sup>6</sup> 个细胞加入 150  $\mu$ L 蛋白裂解液 (1 mmol/L tris-HCl, 0.3 mol/L NaCl, 0.01% SDS, 1.5% NP40, 120 mmol/L deoxycholate, 1 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 含蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 20 min 后离心取上清。加入上样缓冲液制备蛋白样品, 95℃ 加热使其变性。加入 10  $\mu$ L 的蛋白样品到 10% 的 SDS-PAGE 凝胶中, 90 ~ 130 V 的电压值跑样。湿法转膜, 恒压 100 V 转膜 90 min。转膜结束后用 5% BSA 室温封闭 1 h, 之后敷上相应一抗于 4℃ 摇床上, 过夜。使用的一抗包括 p70 S6 Kinase Antibody (Rabbit, CST, 9202S), Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody (Rabbit, CST, 9205S), 4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb

(Rabbit, CST, 9644S), Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb (Rabbit, CST, 2855L), m-TOR Antibody (Rabbit, CST, 2972S), Phospho-mTOR (Ser2448) Antibody (Rabbit, CST, 2971S), 稀释比为 1 : 1000,  $\beta$ -tubulin (Mouse, SAB, 48352) 的稀释比为 1 : 5000。第 2 天室温孵育对应一抗来源的辣根过氧化物 (HRP) 标记的二抗, 最后使用 ECL (四正柏, 4AW012-500) 显色。

### 1.2.6 细胞因子、乳酸和 NO 测定

细胞上清液中的细胞因子使用商业化的 TNF- $\alpha$  (Invitrogen, 88-7324-76) 和 IL-6 (Invitrogen, 88-7064-76) ELISA 试剂盒, 操作按照说明书。乳酸测定方案中, 乳酸与酶混合物 (乳酸氧化酶和 HRP) 特异性反应生成产物, 该产物与 Amplex red (sigma, 119171-73-2) 相互作用生成颜色和荧光 (Ex/Em = 535/590 nm)。NO 测定按照 Griess 法。

### 1.2.7 mRNA 的提取和 RT-PCR

在第 6 天, 经训练后的细胞用 100 ng/mL LPS 刺激 4 h 后收集 RNA。mRNA 的提取采用磁珠法,  $10^5$  个细胞中加入 150  $\mu$ L 裂解液 (100 mmol/L Tris-HCl pH = 7.5, 0.5 mol/L LiCl, 10 mmol/L EDTA, 1.5% SDS, 5 mmol/L DTT), 取 120  $\mu$ L 加入 6  $\mu$ L 磁珠 (Biotin-oligo dT streptavidin magnetic beads) 室温结合 5 min; 置磁力架上待液体澄清, 弃掉上清; 随后用洗涤液 A (10 mmol/L Tris-HCl pH = 7.5, 0.15 mol/L LiCl, 1 mmol/L EDTA, 0.1% SDS) 洗涤 1 次, 洗涤液 B (10 mmol/L Tris-HCl pH = 7.5, 0.15 mol/L LiCl, 1 mmol/L EDTA) 洗 2 次, 最后加入 15  $\mu$ L Tris-HCl (10 mmol/L, pH = 7.5) 于 80 $^{\circ}$ C 加热 2 min 洗脱。cDNA 合成使用碧云天 dNTP (D7366), RNase 抑制剂 (AG11608) 和逆转录酶 (AG11605)。RT-PCR 使用 SYBR Green 染料 (AG, AG11701), 操作按照说明书进行。

## 1.3 统计学分析

所有实验均采用随机分配的小鼠进行, 不设研究者盲法。实验的细节可以在结果中找到。所有数据点和“*n*”值反映了生物复制 (即小鼠)。使用 GraphPad Prism 8.0.3.2 软件进行统计分析, 结果用平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。以  $P < 0.05$  表示差异具有显著性。

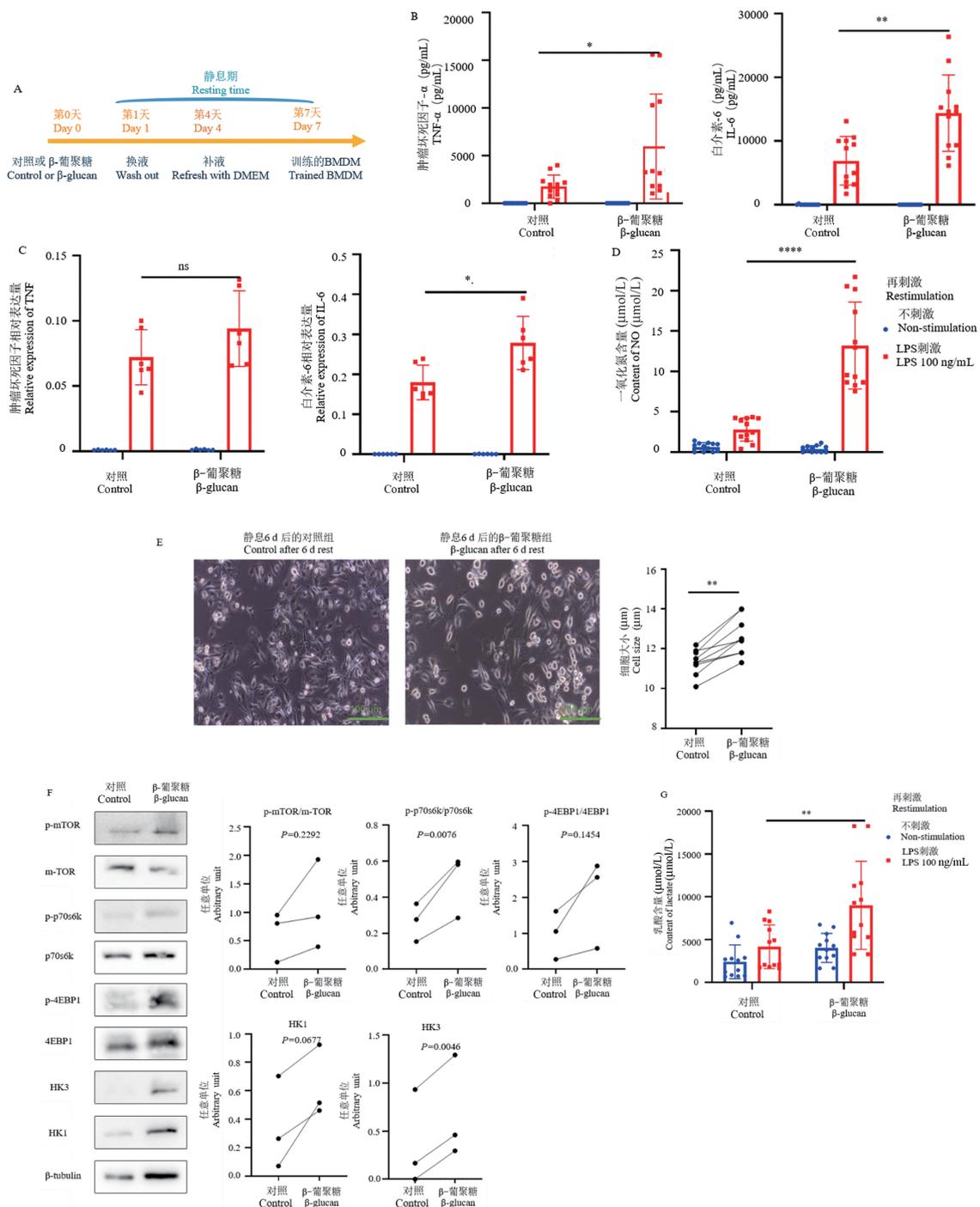
## 2 结果

### 2.1 $\beta$ -glucan 在 BMDM 中训练免疫模型的建立

虽然先前科学家们在人源单核细胞中已成功

建立训练免疫模型, 但是为了进一步理清训练免疫模型的机制, 小鼠作为比较好的模式动物, 建立小鼠训练免疫模型能够为研究训练免疫机制带来便利。因此, 首要目标是在 BMDM 中建立一个细胞模型来验证训练免疫反应的形成 (图 1A)。训练免疫能够促进先天免疫细胞炎症因子的表达。先前研究表明, 在败血症的早期阶段, 训练免疫能够促进巨噬细胞发生 M1 型极化<sup>[14]</sup>。结果表明,  $\beta$ -glucan 训练增强 BMDM 促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的产生 (图 1B)。同时, 通过 qPCR 检测 LPS 刺激 4 h 后抽提的 mRNA 在 TNF 和 IL-6 在转录水平上的差异。结果表明, 在转录水平上经  $\beta$ -glucan 训练的 BMDM 炎症因子 TNF 并没有显著性差异, 然而 IL-6 显著高于未被训练的 BMDM (图 1C)。在先天免疫细胞中, 巨噬细胞使最早观察到产生一氧化氮 (NO) 的细胞, NO 发挥其抗菌抗炎的作用以清除病毒、细菌和真菌等感染<sup>[15]</sup>。因此, 通过 Griess 法检测了训练前后 BMDM 产生 NO 的水平差异。结果表明, 与未训练的 BMDM 相比, 当 LPS 再次刺激时, 训练后的 BMDM 产生 NO 的水平明显高于未被训练的 BMDM (图 1D)。从形态学上观察,  $\beta$ -glucan 训练后使 BMDM 增大。同时, 将细胞消化下来用自动细胞计数仪 (Automated Cell Counter LUNA II) 检测细胞直径。从数值上看, 经过  $\beta$ -glucan 训练的 BMDM 直径明显大于对照组 (图 1E)。提示细胞内的 m-TOR 信号通路有可能被活化, 因此通过蛋白质免疫印迹法检测了 m-TOR 及其下游调控蛋白质合成的靶蛋白磷蛋白 70 核糖体蛋白 S6 激酶 (phosphoprotein 70 ribosomal protein S6 kinase-1, p70s6k) 和真核细胞翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (4EBP1), 该通路的活化表现为 p70s6k 和 4EBP1 磷酸化。结果显示,  $\beta$ -glucan 训练会增强 m-TOR、p70s6k 和 4EBP1 的磷酸化。考虑到训练免疫的代谢基础是有氧糖酵解, 研究也聚焦于糖酵解相关蛋白即己糖激酶-1 (Hexokinase-1, HK1) 和己糖激酶-3 (Hexokinase-3, HK3) 的变化, 结果表明  $\beta$ -glucan 训练增加 HK1 和 HK3 的表达 (图 1F)。除此之外, 乳酸在免疫调节中也能够发挥重要作用, 研究也关注乳酸的变化。结果表明,  $\beta$ -glucan 训练使 BMDM 产生更多的乳酸分泌于上清中 (图 1G)。

以上结果表明, 在体外 BMDM 中成功建立了训练免疫模型, 并且与先前人源单核细胞训练免疫模型一致<sup>[4]</sup>。



注：A：体外β-glucan训练免疫模式图；B：ELISA测定细胞上清液中促炎因子TNF-α和IL-6，样品为LPS再刺激24h收集；C：qPCR测定促炎因子TNF和IL-6的转录水平差异，样品为LPS再刺激4h收集的；D：Griess法检测细胞上清液中NO的分泌水平，样品为LPS再刺激24h收集的；E：当细胞用RPMI（阴性对照）、β-glucan训练时，训练24h并休息6d后的细胞形态。在第6天再刺激前拍摄照片，放大倍数为20倍；F：Western Blot检测m-TOR、4EBP1、p70s6k、HK1和HK3训练后的蛋白水平变化；G：测定细胞上清液中乳酸的分泌水平，样品为LPS再刺激24h时收集。

图1 β-glucan在BMDM中诱导的训练免疫

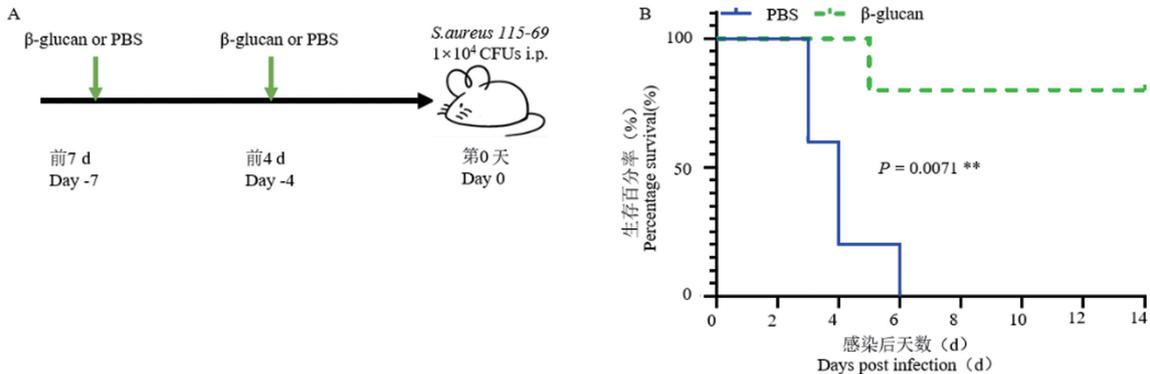
Note. A. Schematic of *in vitro* β-glucan induced trained immunity experimental setup. B. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured by TNF-α and IL-6 commercial ELISA kit. C. mRNA level of TNF and IL-6 were measured by qPCR, cells collected from 4 h LPS re-stimulation. D. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured following Griess assay protocol. E. After RIMI or β-glucan trained, the cell images were snapped by microscope at a 20 fold magnification. F. Western Blot analysis the protein level of m-TOR, 4EBP1, p70s6k, HK1 and HK3. G. Supernatants collected from 24 h LPS re-stimulation were measured following lactate assay protocol.

Figure 1 β-glucan induced trained immunity in BMDM

## 2.2 $\beta$ -glucan 体内诱导的训练免疫具有保护作用

先前研究成功在体外建立了训练免疫模型,因此进一步研究拟在体内建立训练免疫模型。以 8 周龄大的野生型 C57BL/6J 雄鼠作为实验对象,在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 115-69,

*S. aureus* 115-69) 感染的前 7 d 和前 4 d 腹腔注射  $\beta$ -glucan, 每次每只为 1 mg (见图 2A)。结果表明,  $\beta$ -glucan 在体内诱导的训练免疫能保护致病菌 *S. aureus* 115-69 诱导的感染, 提高小鼠的生存率 (见图 2B)。



注: A:  $\beta$ -glucan 体内训练免疫模式图; B: 腹腔感染 *S. aureus* 115-69 的生存曲线图。

图 2  $\beta$ -glucan 在体内诱导的训练免疫能抵抗 *S. aureus* 的感染 ( $n = 5$ )

Note. A. The scheme of  $\beta$ -glucan induced trained immunity *in vivo*. B. The survival curve of *S. aureus* 115-69 in abdominal infection.

Figure 2  $\beta$ -glucan induced trained immunity protected from *S. aureus* infection ( $n = 5$ )

## 2.3 $\beta$ -glucan 在体外可逆转 LPS 诱导的免疫耐受

由于训练免疫能够促进免疫应答, 因此对诱导训练免疫是否能够逆转免疫耐受进行了研究。首先, LPS 刺激成熟分化的 BMDM 24 h 以引起巨噬细胞产生免疫耐受。随后, 再用  $\beta$ -glucan 刺激 BMDM 24 h, 换上含 10 ng/mL M-CSF 的 DMEM 静置培养 BMDM 1 d。最后, 再次用 LPS 刺激 BMDM (图 3A)。通过检测促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的变化水平来反映耐受的逆转情况。与耐受的 BMDM 相比,  $\beta$ -glucan 逆转组产生的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 更高, 甚至比原始状态下的 BMDM 还产生更多的促炎细胞因子 (图 3B, 3C)。从 RNA 水平分析 TNF 和 IL-6 的变化也观察到一样的趋势,  $\beta$ -glucan 逆转组 TNF 和 IL-6 基因表达在一定程度上得到恢复 (图 3D, 3E)。同时检测了 NO 的分泌水平,  $\beta$ -glucan 逆转组产生的一氧化氮明显高于耐受组, 甚至比原始状态下的 BMDM 还要产生更多 (图 3F)。上述结果一致表明, 在体外  $\beta$ -glucan 能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受。

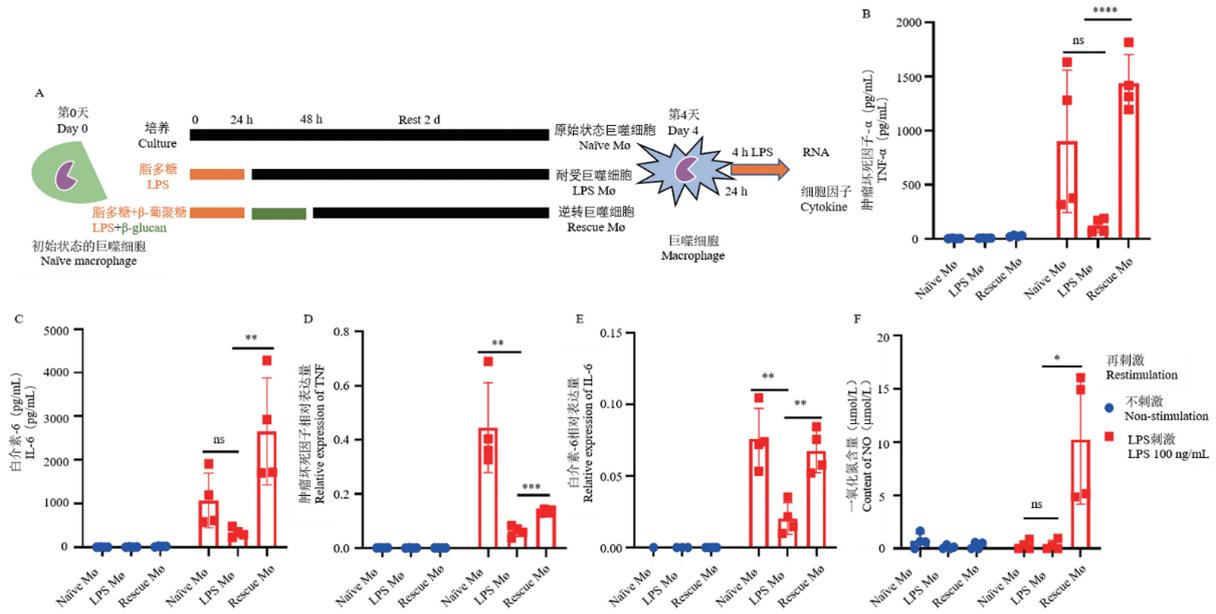
## 2.4 体内免疫耐受模型的建立

鉴于训练免疫能够在体外逆转免疫耐受, 因此研究提出假设训练免疫同样能够逆转体内免疫耐受。通过给小鼠实施 CLP 手术引起多种微生物感染导致免疫耐受作为动物模型。在 CLP 手术 (25 G, 20%) 7 d 后, 使小鼠感染一个非致死剂量的白色

念珠菌 (*Candida albicans* ATCC MTA-3573 (UC 820)), 观察小鼠在此情形下是否处于免疫耐受状态 (图 4A)。结果显示, 在 CLP 第 7 天感染时, CLP 组的存活率都明显低于 Sham 组 (图 4B)。之前的报导显示血液中 IL-6 浓度可作为败血症死亡率的最佳预测因子<sup>[16]</sup>, 因此对术后 6、24 和 48 h 尾静脉采血分离的血清中 IL-6 的水平进行检测。结果表明, CLP 组的 IL-6 会在术后 6 h 立即升高, 在 24 h 后这种细胞因子引起的细胞风暴已经减少, 直至 48 h 细胞因子风暴消失 (图 4C)。考虑到在 CLP 手术 7 d 后, 小鼠大约有 20% 的致死率 (图 4D), 因此改变盲肠结扎的位置以降低 CLP 组的致死率, 同时 CLP 手术 3 d 后就感染剂量减半的 *C. albicans*, 以明确机体免疫耐受出现的最早时间 (图 5A)。结果显示, CLP 组的存活率明显低于 Sham 组, 而且在术后 3 d 感染减半的 *C. albicans* 致死现象比术后 7 d 感染更严重 (图 5B)。因此, CLP 3 d 后的体内免疫耐受模型, 可用于免疫耐受逆转的后续研究。

## 2.5 $\beta$ -glucan 在体内逆转免疫耐受的功能探索

构建体内免疫耐受模型选择的是在感染前 3 d 进行 CLP 手术, 条件是在盲肠 10% 处结扎及用 25 G 的穿刺针对穿。 $\beta$ -glucan 的治疗设为 3 组, 分别为术后第 1 天、术后第 2 天、术后第 1 天和第 2 天同时给药, 然后在术后的第 3 天进行非致死剂量的

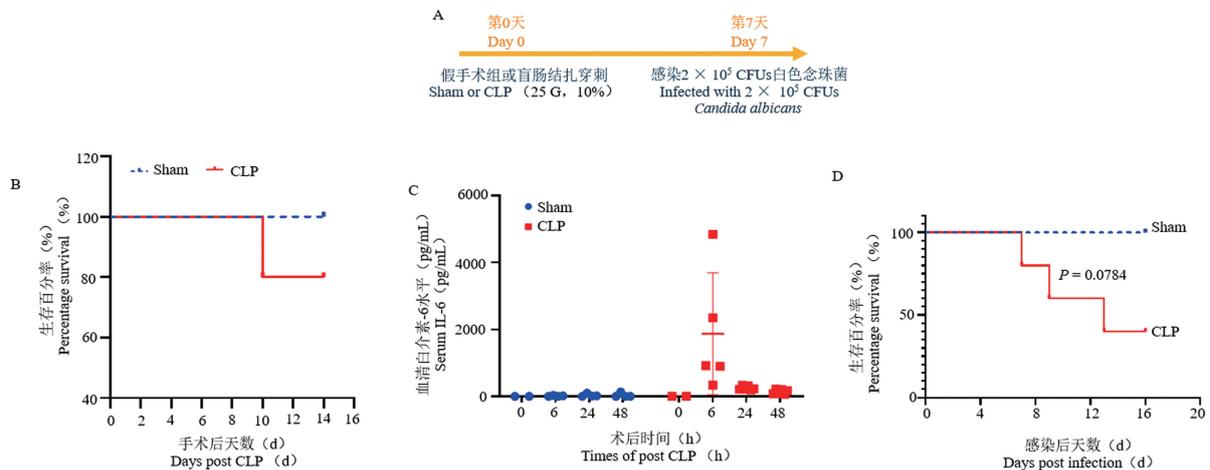


注:A:体外 BMDM 耐受逆转模型,β-glucan 在 100 ng/mL LPS 刺激 24 h 后加入,刺激 24 h 后去除培养基中的 β-glucan,让细胞静息 1 d 再次 100 ng/mL LPS 刺激;B,C:ELISA 测定细胞上清液中促炎因子 TNF-α 和 IL-6,样品为 LPS 再刺激 24 h 收集;D,E:qPCR 测定促炎因子 TNF-α 和 IL-6 的转录水平差异,样品为 LPS 再刺激 4 h 收集;F:Griess 法检测细胞上清液中 NO 的分泌水平,样品为 LPS 再刺激 24 h 收集。

图 3 β-glucan 逆转 LPS 诱导的免疫耐受

Note. A. The *in vitro* BMDM tolerance reversal model, with β-glucan added therapeutically after 24 h of 100 ng/mL LPS exposure, let BMDM rested for 1 day and re-stimulated with LPS. B, C. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured by TNF-α and IL-6 commercial ELISA kit. D, E. mRNA level of TNF-α and IL-6 were measured by qPCR, cells collected from 4 h LPS re-stimulation. F. Supernatant collected from 24 h LPS re-stimulation were measured following Griess assay protocol.

Figure 3 β-glucan can reverse LPS-induced immune tolerance

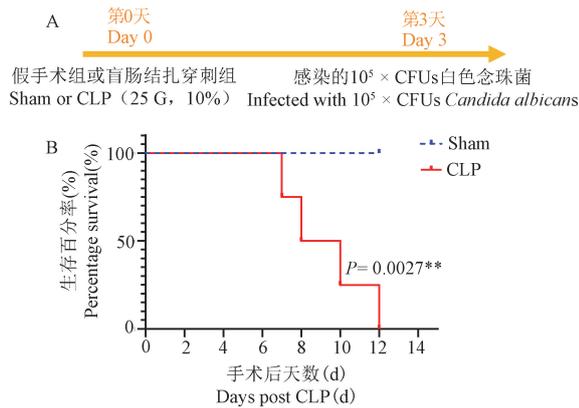


注:A:体内免疫耐受模式图,CLP 手术使用 25 G 的穿刺针穿刺,在盲肠的 20% 处结扎;B:CLP 术后 7 d 内的生存曲线;C:CLP 术后 6、24 和 48 h 尾静脉采血分离血清中的 IL-6 水平测定;D:CLP 手术 7 d 后尾静脉感染 *C. albicans* 的生存曲线。

图 4 体内免疫耐受模型的建立 (n = 5, 7 d)

Note. A. The scheme of immune tolerance model *in vivo*, cecum was ligated (20%) and punctured once with a 25 G needle. B. The survival curve post CLP. C. The serum IL-6 measured by ELISA, isolated from tail vein blood at 6, 24 and 48 h after CLP. D. The survival curve after infecting with *C. albicans* through tail vein.

Figure 4 Establishment of an *in vivo* immune tolerance model (n = 5, 7 d)



注:A:体内免疫耐受模式图,CLP手术使用25 G的穿刺针穿刺,在盲肠的10%处结扎;B:CLP术后3 d尾静脉感染*C. albicans*的生存曲线。

图5 体内免疫耐受模型的建立( $n = 5, 3$  d)

Note. A. The scheme of immune tolerance model *in vivo*, cecum was ligated (10%) and punctured once with a 25 G needle. B. The survival curves of *C. albicans* for tail vein infection 3 days after CLP.

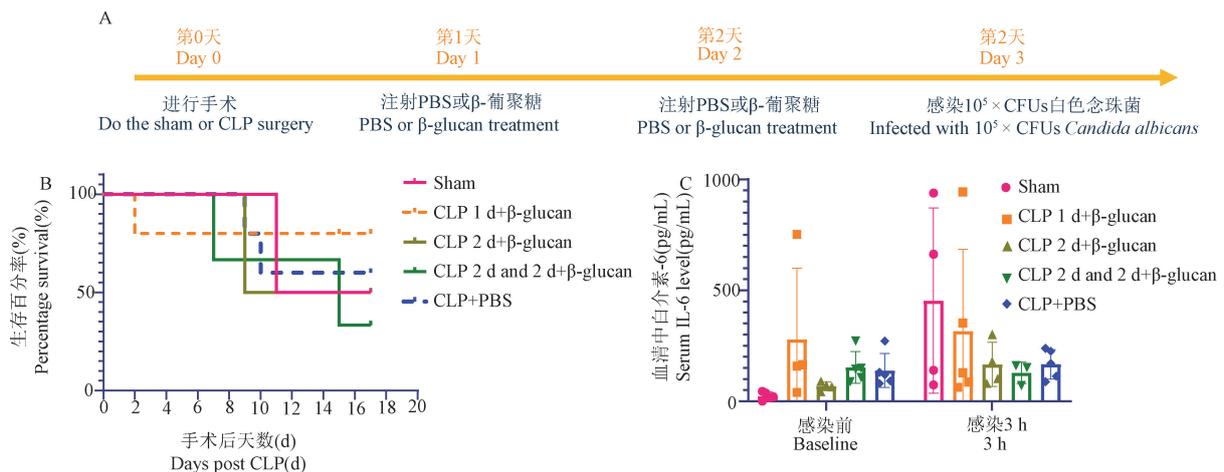
Figure 5 Establishment of an *in vivo* immune tolerance model ( $n = 5, 3$  d)

*C. albicans* 感染(图6A)。从感染后的生存状况来看,与PBS组相比, $\beta$ -glucan治疗组的生存率没有显著改变,并且与 $\beta$ -glucan干预治疗的时间前后或者次数没有太大相关性(图6B)。感染3 h后尾静脉采血,检测小鼠体内促炎细胞因子IL-6的产生水平,与PBS组相比, $\beta$ -glucan治疗组的小鼠产生的IL-6也没有改变(图6C)。这个结果与生存曲线一致,说明在体内 $\beta$ -glucan的治疗并不能像体外一样通过恢复促炎细胞因子的产生来逆转免疫耐受状

态,从而提高抗感染时的生存率。

在败血症患者的急性期,为了控制病情医生会考虑给予抗生素治疗。为了更密切的模拟临床败血症,研究采用了另外一种CLP模型。在盲肠20%处结扎,用23 G的穿刺针对穿,致死率大约为40%的CLP模型<sup>[17]</sup>。然后在CLP手术后的2 h,第1天和第2天分别给抗生素治疗。抗生素亚胺培南(imipenem)对革兰氏阳性、阴性的需氧和厌氧菌具有抗菌作用,可用于敏感菌引起的败血症等<sup>[12]</sup>。在该CLP模型中亚胺培南的确能够减少死亡率,但对CLP引起的体重减轻症状没有缓解(图7A,7B)。根据2.2结果中证明了 $\beta$ -glucan在感染前7 d和前4 d的两次给药,能有效抵抗感染,具有保护作用,所以在感染前7 d和前4 d(即CLP手术后的第5天和第8天)给 $\beta$ -glucan治疗,在CLP手术后第12天进行再次细菌感染(图7C)。结果表明,在此模型条件下, $\beta$ -glucan的治疗也并不能完全逆转小鼠的免疫耐受状态,提高再次感染时的生存率(图7D,7E,7F)。

总的来讲,目前探究从 $\beta$ -glucan治疗后小鼠的生存情况虽然没有得到改善,但是我们推测训练免疫的诱导可能通过改变体内先天免疫细胞的比例组成,进而改善体内免疫耐受状态,只是不足以从生存率上面体现。因此,关于 $\beta$ -glucan在体内是否能够逆转免疫耐受以及逆转耐受的机理还得需要继续探究。

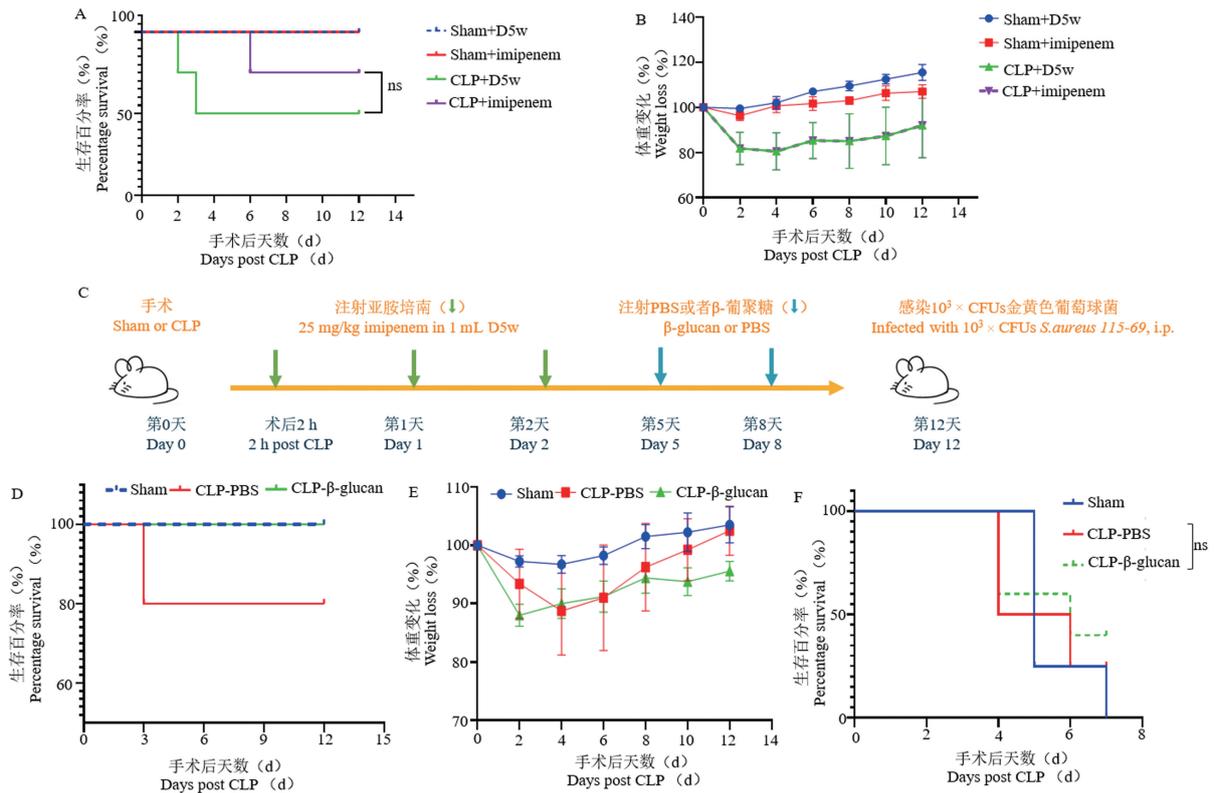


注:A:实验设计模式图;B:CLP 3 d后尾静脉感染 $10^5$  *C. albicans*的生存曲线;C:感染*C. albicans* 3 h后的血清IL-6水平。

图6  $\beta$ -glucan在体内逆转免疫耐受的功能探索( $n = 4 \sim 5$ )

Note. A. Diagram of experimental design model. B. The survival curve 3 days post CLP after infected with  $10^5$  CFUs *C. albicans* through tail vein. C. The serum IL-6 level 3 h after infected with *C. albicans*.

Figure 6 Functional exploration of  $\beta$ -glucan in reversing immune tolerance *in vivo* ( $n = 4 \sim 5$ )



注:A:CLP 术后给 imipenem 治疗后的生存曲线,CLP 手术条件为在盲肠的 20% 处结扎,23 G 的穿刺针对穿一次 (n=4); B:CLP 术后给 imipenem 治疗后的体重 (n=4); C:体内免疫耐受逆转模式图;D:CLP 术后 12 d 内的生存曲线 (n=5); E:CLP 术后 12 d 内的体重 (n=5); F:CLP 12 d 后腹腔感染  $10^3 \times$  CFUs 的 *S. aureus* 的生存线 (n=5)。

图 7  $\beta$ -glucan 在体内逆转免疫耐受的功能探索

Note. A. The survival curve after treatment with imipenem, CLP condition was cecum was ligated (20%) and punctured once with a 23 G needle (n=4). B. Weight loss after treatment with imipenem (n=4). C. The *in vivo* tolerance reversal model. D. The survival curve within 12 days after CLP (n=5). E. Weight loss within 12 days after CLP (n=5). F. The survival curve of  $10^3 \times$  CFUs *S. aureus* in abdominal infection (n=5).

Figure 7 Functional exploration of  $\beta$ -glucan in reversing immune tolerance *in vivo*

### 3 讨论

$\beta$ -glucan 是体外和体内训练免疫的典型诱导剂,其刺激可使巨噬细胞具有长期的促炎表型,从而增强机体对再感染的免疫应答<sup>[5,18]</sup>。在这项研究结果中,证实了 BMDM 经  $\beta$ -glucan 训练之后,当二次遇到同源或异源刺激时细胞内能产生更高水平的促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6,分泌更多的 NO;细胞代谢模式发生重要改变即向糖酵解转变,分泌更多的乳酸;细胞内的 m-TOR 信号通路活化。同时,经过  $\beta$ -glucan 训练的小鼠能够有效抵抗 *S. aureus* 的感染。

与训练免疫相反的功能状态是免疫耐受,耐受细胞的基因转录处于无法激活的状态,并且再刺激时无法发挥其功能。败血症在细胞因子风暴结束后,进入第二阶段免疫耐受。免疫耐受状态的逆转引起了研究者的关注,因为从炎症阻断治疗方面来

降低败血症的整体死亡率的成功案例有限,并且因为大多数败血症的死亡往往发生在耐受阶段期间的医院二次感染<sup>[19]</sup>。巨噬细胞经训练免疫诱导可以对继发感染产生更强的吞噬反应,这种反应可以由多种微生物相关分子模式 (MAMP) 诱导,例如白色念珠菌、卡介苗 (BCG) 和  $\beta$ -glucan<sup>[2,11]</sup>。根据训练免疫和免疫耐受的功能特点,想通过在已经处于免疫耐受的细胞中,加入能够诱导训练免疫的物质,探究细胞的免疫耐受状态是否可以被逆转。假设  $\beta$ -glucan 是可以逆转免疫耐受的。在免疫耐受逆转的体外研究结果中, $\beta$ -glucan 在一定程度上确实能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受。已有研究发现,LPS 诱导耐受的巨噬细胞和  $\beta$ -glucan 训练过的巨噬细胞具有不同的表观遗传和代谢模式<sup>[11]</sup>。

有研究表明,IFN- $\gamma$  可以部分恢复从败血症患者体内分离的耐受单核细胞的代谢功能<sup>[20]</sup>。因此,想在体内探究  $\beta$ -glucan 是否能够改变由 CLP 诱导

的免疫耐受状态,从而提高再次感染时的存活率。进一步用 CLP 模型模拟败血症,在感染金黄色葡萄球菌之前给  $\beta$ -glucan 治疗,但  $\beta$ -glucan 并没有提高 CLP 组再感染时的存活率。随之,又重新建立一种联合抗生素亚胺培南治疗的 CLP 模型,在此情形下, $\beta$ -glucan 治疗的 CLP 组的生存率与 PBS 治疗的 CLP 组相比,没有显著性差异。虽然在体内应用  $\beta$ -glucan 逆转没有得到预期的实验结果,但是证实了先天免疫“训练者” $\beta$ -glucan 在体外可以逆转巨噬细胞免疫耐受。

针对进一步体内免疫耐受逆转的研究,考虑是否  $\beta$ -glucan 改变了一些免疫细胞如单核细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞等的比例组成,以及这些细胞的反应性改变。有研究表明,在由 *E. coli* 感染引起的腹膜炎中,经酵母聚糖训练的小鼠,其腹腔细胞组成由维持稳态的大腹腔巨噬细胞向促炎的小腹腔巨噬细胞转变<sup>[5]</sup>。此外,宿主的单核细胞数目增多可介导白色念珠菌诱导的训练免疫,增强宿主二次感染免疫应答能力<sup>[2]</sup>。因此,我们提出假设细胞群表型和特定细胞群数量的改变可能在介导训练免疫反应中起关键作用。

综上所述,成功地在小鼠 BMDM 中用  $\beta$ -glucan 建立了体外训练免疫模型。之后建立了 CLP 免疫耐受模型,确定一个能够导致免疫耐受但致死率低的条件,以及致死率过半但联合抗生素治疗能够减少死亡率的条件。在体外中证明了  $\beta$ -glucan 能够逆转 LPS 诱导的免疫耐受,验证了  $\beta$ -glucan 在体内能够有效抵抗金黄色葡萄球菌的感染。但是目前结果尚未证明  $\beta$ -glucan 能够逆转 CLP 诱导的免疫耐受,提高二次感染时的存活率。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] Sharrock J, Sun JC. Innate immunological memory: from plants to animals [J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 62: 69–78.
- [ 2 ] Quintin J, Saeed S, Martens JHA, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes [J]. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(2): 223–232.
- [ 3 ] Netea MG, Quintin J, van der Meer JWM. Trained immunity: a memory for innate host defense [J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 9(5): 355–361.
- [ 4 ] Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, et al. mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity [J]. *Science*, 2014, 345(6204): 1250684.
- [ 5 ] Ciarlo E, Heinonen T, Th roude C, et al. Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections [J]. *J Infect Dis*, 2020, 222(11): 1869–1881.
- [ 6 ] Martin GS. Sepsis, severe Sepsis and septic shock; changes in incidence, pathogens and outcomes [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2012, 10(6): 701–706.
- [ 7 ] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach [J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(3): 260–268.
- [ 8 ] Sun Z, Qu J, Xia X, et al. 17 $\beta$ -estradiol promotes LC3B-associated phagocytosis in trained immunity of female mice against sepsis [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(2): 460–474.
- [ 9 ] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31–36.
- [ 10 ] Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(11): 4733–4738.
- [ 11 ] Novakovic B, Habibi E, Wang SY, et al.  $\beta$ -glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance [J]. *Cell*, 2016, 167(5): 1354–1368.
- [ 12 ] Newcomb D, Bolgos G, Green L, et al. Antibiotic treatment influences outcome in murine sepsis: mediators of increased morbidity [J]. *Shock*, 1998, 10(2): 110–117.
- [ 13 ] Iskander KN, Vaickus M, Duffy ER, et al. Shorter duration of post-operative antibiotics for cecal ligation and puncture does not increase inflammation or mortality [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0163005.
- [ 14 ] Sun Z, Pan Y, Qu J, et al. 17 $\beta$ -estradiol promotes trained immunity in females against Sepsis via regulating nucleus translocation of RelB [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1591.
- [ 15 ] Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 157(1): 87–94.
- [ 16 ] Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, et al. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days [J]. *Shock*, 2002, 17(6): 463–467.
- [ 17 ] Bomans K, Schenz J, Sztwiertnia I, et al. Sepsis induces a long-lasting state of trained immunity in bone marrow monocytes [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2685.
- [ 18 ] Dos Santos JC, Barroso de Figueiredo AM, Teodoro Silva MV, et al.  $\beta$ -glucan-induced trained immunity protects against *Leishmania braziliensis* infection: a crucial role for IL-32 [J]. *Cell Rep*, 2019, 28(10): 2659–2672.
- [ 19 ] Lee J, Levy MM. Treatment of patients with severe Sepsis and septic shock: current evidence-based practices [J]. *R I Med J* (2013), 2019, 102(10): 18–21.
- [ 20 ] Cheng SC, Scicluna BP, Arts RJW, et al. Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(4): 406–413.

[ 收稿日期 ] 2022-04-14