

## 多糖激活巨噬细胞的信号转导通路

马志新, 赵鲁杭 综述

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 浙江 杭州 310058)

**[摘要]** 多糖是一类来源广泛,通过多途径多机制激活巨噬细胞而发挥免疫调节功能的天然活性物质。阐明来源不同(植物、真菌、藻类)的多糖激活巨噬细胞的信号传导通路,不仅有助于从分子水平了解其调节免疫功能的作用机制,也可为新型靶向免疫调节药物的开发提供新的方向。

**[关键词]** 多糖类/药理学;巨噬细胞/免疫学;信号传导

**[中图分类号]** Q 53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2011)05-0567-06

### Polysaccharides activate signaling pathways of macrophage

MA Zhi-xin, ZHAO Lu-hang (Department of Biochemistry and Genetics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

**[Abstract]** Polysaccharides extracted from various sources are natural active substances, which may lead to the activation of macrophage via multiple pathways and mechanisms. This article intends to illustrate the signaling pathways of polysaccharides from plants, fungi, algae and other sources, to indentify the mechanisms on the molecular level, and to explore the novel target immunomodulatory agents.

**[Key words]** Polysaccharides; Macrophages/immunol; Signal Transduction

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2011,40(5):567-572. ]

多糖是由单糖聚合成的线性或分支的聚合物,具有显著的免疫调节、抗肿瘤、抗炎症、抗病毒、抗辐射等多种生物学功能,已被应用于消化道黏膜损伤和溃疡、血液系统疾病、组织挫伤及烧伤等多种疾病的治疗中<sup>[1]</sup>。由于多糖具有显著的免疫调节功能临床应用广泛,而且相对低毒,已经成为新型免疫调节剂和基因辅助细胞治疗药物开发的重点领域<sup>[2]</sup>。巨噬细胞在真核生物种系间高度保守,发挥抗原递呈及协同T淋巴细胞调节适应性免疫反应<sup>[3]</sup>;它通过免疫监视、趋化作用、吞噬作用及对靶细胞的直接杀伤参与免疫调节,而且其与胚胎发生过程中的组织塑形、损伤修复和衰老细胞的清除有关<sup>[4]</sup>。研究证实,不同多糖由于其糖链结构

( $\alpha 1,6$ 、 $\alpha 1,4$ 、 $\beta 1,4$ )和组成(单糖种类和比例)的差异对巨噬细胞的激活效应也不同。多糖以半乳糖、鼠李糖和阿拉伯糖为主要成分,其分子量大于100 kD的多糖相对于低分子量多糖具有较高的生物活性,能显著促进巨噬细胞对一氧化氮(NO)和多种细胞因子的生成,以增强宿主的免疫力<sup>[5-6]</sup>。

收稿日期:2011-01-18 修回日期:2011-07-21

作者简介:马志新(1982-),男,硕士生,生物化学与分子生物学。

通讯作者:赵鲁杭(1962-),男,博士生,副教授,硕士生导师,主要从事糖生物学及免疫学研究;E-mail: zhaoluhang@263.net

多糖激活巨噬细胞的方式主要通过 2 条途径。第一,受体介导的激活作用:多糖经受体的介导,并经通路下游分子将活化信号传入巨噬细胞,启动免疫应答。巨噬细胞表面与多糖的识别相关受体主要有 Toll 样受体 (TLRs)、CD14、补体 3 受体 (CR3)、清道夫受体 (SR)、甘露糖受体 (MR)、Dectin-1 和 G 蛋白偶联受体。第二,内吞作用介导的巨噬细胞激活。前者在

巨噬细胞的激活中居主导地位,后者通常发挥协同作用。

### 1 多糖激活巨噬细胞的信号转导通路

多糖通过模式受体 (CR3、TLRs、Dectin-1、MR、SR)、CD14 及不同受体间通过形成信号转导复合物 (TLR4-CD14、CR3-CD14) 相互协作激活巨噬细胞的数条信号通路 (图 1)。

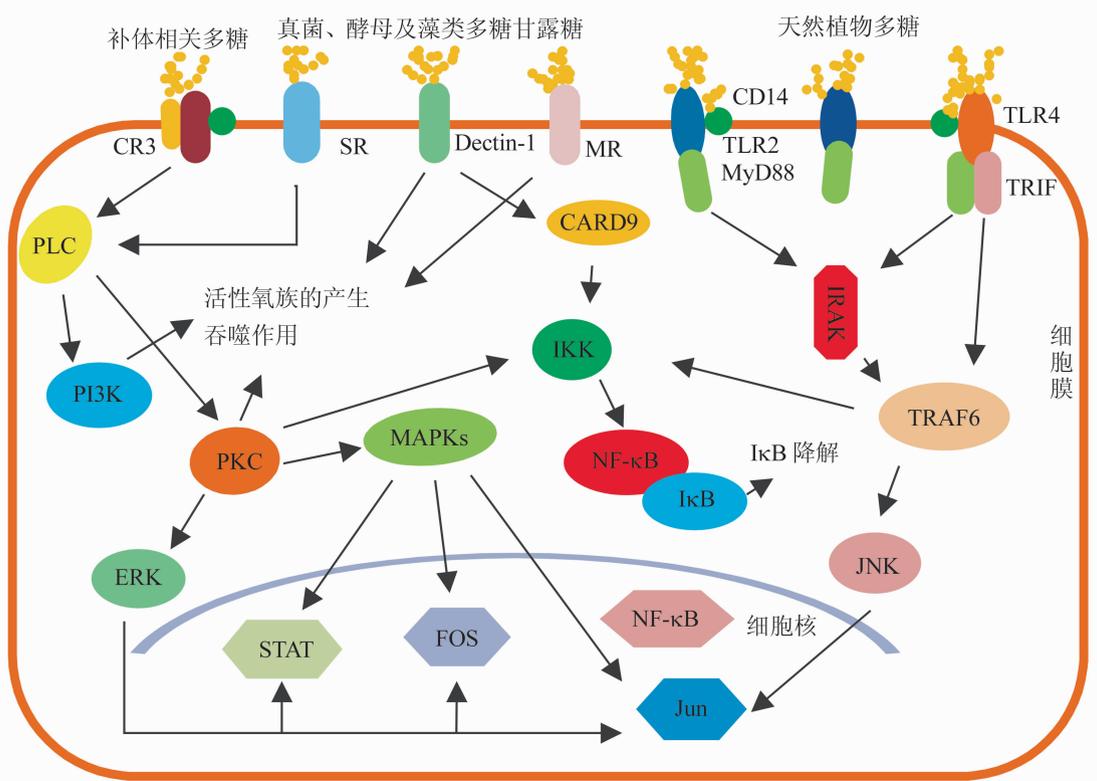


图 1 受体介导的多糖激活巨噬细胞的信号通路

Fig. 1 Signaling pathway of polysaccharide on macrophage mediated by receptors

**1.1 TLR4 介导的信号转导通路** TLRs 是一类新型跨膜蛋白样模式识别受体,广泛表达于树突状细胞、巨噬细胞,中性粒细胞和淋巴细胞的表面,是目前研究免疫功能调节的热点<sup>[7]</sup>。TLR4 作为 TLRs 家族的重要成员,是多糖、生物碱、植物黑色素等多种天然活性成分的识别位点<sup>[8]</sup>,TLR4 与配体结合后,在髓样分化蛋白 (MyD88) 的介导下启动 MyD88 依赖的信号传导通路,促进白细胞介素-1 (IL-1) 受体相关激酶 (IRAK) 发生自身磷酸化,激活肿瘤坏死因子

受体相关分子-6 (TRAF-6),使有丝分裂原激活酶家族 (MAPKs 包括 ErK1/2、JNK、P38) 活化,从而激活核转录因子-kappaB (NF-κB) 诱导激酶 (NIK),NIK 再激活 NF-κB 抑制蛋白 (IκB) 激酶 (IKK),使 IκB 降解并释放出 NF-κB,启动或增强靶基因的转录,提高巨噬细胞免疫功能<sup>[9]</sup>。

红花多糖、刺五加多糖、猪苓多糖、桔梗多糖和云芝多糖都是经该受体激活巨噬细胞。上述多糖作用于 TLR4 野生型和 TLR4 缺陷型巨

噬细胞的研究发现,后者对多糖的刺激呈低反应性,免疫活性分子的生成明显受阻,这可能与TLR4表达的缺失密切相关<sup>[10-14]</sup>。

### 1.2 CD14和CR3介导的信号转导通路

CD14对脂多糖(LPS)有高度亲和力;CR3是由CD11b和CD18两个亚基组成的黏附分子,能识别 $\beta$ -葡聚糖。在巨噬细胞活化的信号传导通路中CD14和CR3通常与其他多种受体(例如Dectin-1、TLRs)形成信号传导复合体,跨膜传递活化信号<sup>[15]</sup>。CD14和CR3与多糖识别结合后激活磷脂酶C(PLC),产生蛋白激酶C(PKC)和磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),使MAPKs发生磷酸化,进而活化信号传导及转录激活因子(STAT)和NF- $\kappa$ B,上调多种细胞因子的基因表达和释放<sup>[16]</sup>。

茯苓多糖与巨噬细胞表面CD14及CR3相结合后,通过上调诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,增强巨噬细胞的免疫活性;而CD14及CR3特异性抗体可以使该激活效应降低39%。这说明除CD14和CR3外,茯苓多糖还通过其它途径活化巨噬细胞<sup>[17]</sup>。非水溶性的大分子酵母 $\beta$ -葡聚糖(WGP)能使巨噬细胞内酪氨酸激酶(Syk)磷酸化水平显著升高,促进多种免疫活性分子的释放。进一步研究发现,WGP可以增加CR3基因缺陷型巨噬细胞对细胞因子的释放,而MyD88基因缺陷型巨噬细胞对其却呈现低反应性。所以CR3不是WGP的重要模式识别受体,而有可能是通过MyD88依赖性通路或者Syk途径来激活巨噬细胞。这虽然与传统认为的CR3是 $\beta$ -葡聚糖受体相悖,但是这为研究非水溶性大分子多糖激活巨噬细胞的机制提供了新的方向<sup>[18]</sup>。

**1.3 SR介导的信号转导通路** SR由2个跨膜结构域、2个膜内结构域和1个膜外结构域构成;其与巨噬细胞吞噬清除功能及分泌细胞因子相关,是褐藻多糖硫酸酯、墨角藻聚糖发挥抗炎作用的有效靶点。目前研究显示,SR可能与CR3通过相同的通路激活巨噬细胞<sup>[19-20]</sup>。

Nakamura首次发现,墨角藻聚糖能刺激野生型(SR<sup>+/+</sup>)巨噬细胞释放NO,而对SR基因缺陷型(SR<sup>-/-</sup>)巨噬细胞则无诱导作用。经SR活化的巨噬细胞通过P38和NF- $\kappa$ B,这2条

相互独立的信号通路诱导巨噬细胞iNOS活性增强,促进NO释放。通过阻断SR膜内结构域可以完全抑制墨角藻聚糖诱导的巨噬细胞P38磷酸化,阻断NF- $\kappa$ B与DNA的结合,使细胞因子相关基因的表达受限,这说明墨角藻聚糖只通过SR一种受体与巨噬细胞结合<sup>[21]</sup>。随后,Jin等证实墨角藻聚糖通过SR可以选择性地抑制蛋白活化因子-1的激活,下调LPS诱导的iNOS基因表达,起到阻断NO释放和抗炎作用。这说明SR在启动免疫应答的过程中也参与了免疫负反馈调节,避免免疫反应过强造成的细胞毒性反应<sup>[22]</sup>。

**1.4 Dectin-1介导的信号转导通路** Dectin-1由4亚基组成,是酵母多糖、真菌多糖及 $\beta$ -葡聚糖的模式识别受体。其通常与TLRs协同激活巨噬细胞,经多条通路启动巨噬细胞的吞噬作用、活性氧族(ROS)的产生及细胞因子的合成释放<sup>[23-25]</sup>。Dectin-1与配体结合后其胞浆侧免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)激活Syk,Syk促进天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶-9(CARD9)结构域发生变化,进而调节与CARD9结合的IKK磷酸酶激活复合体,通过IKK降解I $\kappa$ B,释放NF- $\kappa$ B,启动对巨噬细胞的活化作用<sup>[26]</sup>。灵芝孢子多糖(GSG)对Dectin-1通路缺陷型巨噬细胞激活能力远低于其对野生型的作用,GSG还通过TLRs使MAPKs磷酸化,促进细胞因子的释放<sup>[27]</sup>。虫草多糖(SCG)诱导的细胞因子分泌在Dectin-1敲除巨噬细胞中被完全阻断,但却不受MyD88缺陷的影响。这表明与GSG同时启动Dectin-1和TLRs不同,SCG对巨噬细胞激活是单一依赖Dectin-1的,这可能是由于SCG与GSG组成成分差异所致<sup>[28]</sup>。

**1.5 MR介导的信号转导通路** MR是由5亚基组成的C型凝集素,胞外结构域能够识别甘露糖、L-岩藻糖及N-乙酰葡萄糖氨,在TLR2的协同下参与巨噬细胞的抗原递呈,启动免疫应答,目前关于MR通路下游的分子机制还不明确<sup>[29]</sup>。

芦荟多糖含有91.5%的甘露糖,经MR激活巨噬细胞,引起巨噬细胞表面主要组织相容性抗原II类分子(MHC-II)和IgGfC段受体

(Fc $\gamma$ R)的表达上调,MHC-II 可以提高巨噬细胞的抗原呈递能力,Fc $\gamma$ R 则增强巨噬细胞清除抗原抗体复合物或者抗体肿瘤细胞复合物<sup>[30]</sup>。

**1.6 G 蛋白偶联受体介导的信号转导通路**  
多糖与 G 蛋白偶联受体胞外结构域识别结合后,受体胞内结构域通过与 G 蛋白偶联调节相关酶活性,在胞内产生第二信使,从而将胞外信号跨膜转入胞内。G 蛋白偶联受体所介导的细胞信号转导包括 cAMP 信号通路和磷脂酰肌醇信号通路。

灵芝多糖(GLB7)能引起小鼠腹腔巨噬细胞中 cAMP 浓度快速升高,蛋白激酶 A(PKA)活性也明显上升<sup>[31]</sup>。这表明 GLB7 与 G 蛋白偶联受体结合后,激活胞内腺苷酸环化酶(AC)催化 ATP 脱去一个焦磷酸生成 cAMP,而 cAMP 作为第二信使激活 PKA,促进细胞 DNA 的合成,巨噬细胞的分裂增殖。此外,灵芝多糖还能引起小鼠腹腔巨噬细胞内三磷酸肌醇(IP3)和二酰甘油(DG)浓度的升高,证明 IP3/Ca<sup>2+</sup> 和 DG/PKC 两条通路均参与了灵芝多糖对巨噬细胞免疫功能的调节<sup>[32]</sup>。

**1.7 多糖激活巨噬细胞的其它通路** 除了受体介导的激活通路外,多糖还可以通过巨噬细胞的吞噬作用直接入胞,被吞噬的多糖分子不易完全酶解进而保留其免疫原性,可以协同受体介导的信号通路共同激活巨噬细胞。此外,有报道证实,部分多糖还可以通过 TLR6、TLR2 及糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(GITR)激活巨噬细胞<sup>[33-34]</sup>。

SR 和 CR3 通过活化通路下游信号分子 PLC、PKC 及 PI3K 激活 MAPKs、STAT、NF- $\kappa$ B,最终触发相关基因转录的起始。Dectin-1、MR 信号通路的激活可以促进巨噬细胞吞噬作用、ROS 的产生和 NF- $\kappa$ B 的释放。TLRs 在 MyD88 的介导下激活 IRAK,进而活化 TRAF-6 和 MAPKs,最终激活 NF- $\kappa$ B。JNK 主要存在于胞质内,在细胞受到刺激后,JNK 迅速聚积于核内,并导致相应基因表达改变,FOS 是一类参与转录的调节蛋白。多糖经上述通路激活炎症细胞因子前体和 iNOS 基因的表达,调节巨噬细胞的免疫功能。

## 2 多糖对巨噬细胞功能的影响

激活的巨噬细胞的吞噬能力和对外源性物质的清除杀伤能力均显著增强,对肿瘤细胞的细胞毒性作用明显提高,细胞因子的分泌和细胞表面相关模式受体的表达上调,总体上提高其免疫应答能力。例如,人参多糖不仅能促进腹腔巨噬细胞产生 ROS、NO、TNF- $\alpha$  和 IL-6,还能明显增强其对中性粒细胞的吞噬及细胞表面 CD68 的表达,提高对 K562、HL-60 及 KC1 $\alpha$  肿瘤细胞的细胞毒性作用<sup>[35]</sup>。酵母多糖激活肺泡巨噬细胞,产生 TNF- $\alpha$  和 IL-10,并且上调 TLR4、TLR2 及 Dectin-1 的表达<sup>[36]</sup>。近年来多糖衍生物对免疫功能调节的研究也受到众多学者的关注,多糖经化学修饰后对巨噬细胞的激活作用显著增强,但是,衍生所得多糖的生物安全性还需进一步验证<sup>[37]</sup>。

综上所述,多糖对巨噬细胞免疫功能调节的高效性和低毒性使其在免疫药物开发领域备受关注。多糖活化巨噬细胞的通路十分复杂,而且不同受体介导的通路之间往往相互调控。从细胞整体水平上来看,一种多糖可能同时与多种受体结合,激活数条信号传导通路,同时又由于多糖与受体的亲和力的差异,导致不同传导通路对巨噬细胞激活效应的不同。目前对于多糖的研究还处于起始阶段,由于其分子自身结构的复杂性和多样性,对多糖结构测定,表征鉴定都提出了巨大挑战,多糖分子不同结构域及糖链中不同手性的碳原子与受体结合的特异性还鲜为了解。进一步深入了解多糖分子的组成和结构,并阐明其激活巨噬细胞信号通路,对于多糖类靶向免疫调剂的开发有指导意义。

## References:

- [1] LEUNG M Y, LIU C, KOON J C, et al. Polysaccharide biological response modifiers [J]. *Immunol Lett*,2006,105(2):101-114.
- [2] DONG L, XIA S H, LUO Y, et al. Targeting delivery oligonucleotide into macrophages by cationic polysaccharide from *bletilla striata* successfully inhibited the expression of TNF-alpha [J]. *Journal of Controlled Release*,2009,134(3):214-220.
- [3] BIRK R W, GRATCHEV A, HAKIY N. et al.

- Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance [J]. **Hautarzt**, 2001, 52(3):193-200.
- [4] BEUTLER B. Innate immunity: an overview [J]. **Molecular Immunology**, 2004, 40(12):845-859.
- [5] LO T C T, JIANG Y H, CHAO A L J, et al. Use of statistical methods to find the polysaccharide structural characteristics and the relationships between monosaccharide composition ratio and macrophage stimulatory activity of regionally different strains of *Lentinula edodes* [J]. **Analytica Chimica Acta**, 2007, 584(1):50-56.
- [6] KRALOVEC J A, METERA K L, KUMAR J R, et al. Immunostimulatory principles from *Chlorella pyrenoidosa* - Part 1: Isolation and biological assessment in vitro [J]. **Phytomedicine**, 2007, 14(1):57-64.
- [7] ROEDER A, KIRSCHNING C J, RUPEC R A, et al. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity [J]. **Medical Mycology**, 2004, 42(6):485-498.
- [8] OBERG F, HASEEB A, AHN FELT M, et al. Herbal melanin activates TLR4/NF-kappa B signaling pathway [J]. **Phytomedicine**, 2009, 16(5):477-484.
- [9] PARK H J, HONG J H, KWON H J, et al. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C) [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2010, 396(3):721-725.
- [10] ANDO I, TSUKUMO Y, WAKABAYASHI T, et al. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF-kappa B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages [J]. **International Immunopharmacology**, 2002, 2(8):1155-1162.
- [11] HAN S B, YOON Y D, AHN H J, et al. Toll-like receptor-mediated activation of B cells and macrophages by polysaccharide isolated from cell culture of *acanthopanax senticosus* [J]. **International Immunopharmacology**, 2003, 3(9):1301-1312.
- [12] LI X, W X U. TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *polyporus umbellatus* (pers.) fries [J]. **J Ethnopharmacol**, 2010, 3(6):168-176.
- [13] YOON Y D, HAN S B, KANG J S, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum* [J]. **Int Immunopharmacol**, 2003, 3(13-14):1873-1882.
- [14] LISA A PRICE, CYNTHIA A WENNER, DANIEL T SLOPER, et al. Role for toll-like receptor 4 in TNF-alpha secretion by murine macrophages in response to polysaccharide Krestin, a *Trametes versicolor* mushroom extract [J]. **Fitoterapia**, 2010, 81(2):914-919.
- [15] YIN X L, CHEN L, LIU Y, et al. Enhancement of the innate immune response of bladder epithelial cells by astragalus polysaccharides through upregulation of TLR4 expression [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2010, 397(2):232-238.
- [16] TAKEUCHI O, S AKIRA. Pattern recognition receptors and inflammation [J]. **Cell**, 2010, 140(6):805-820.
- [17] SCHEPETKIN I A, M T QUINN. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. **Int Immunopharmacol**, 2006, 6(3):317-333.
- [18] LI B, CRAMER D, WAGNER S, et al. Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88- and Syk kinase-dependent pathways [J]. **Clinical Immunology**, 2007, 124(2):170-181.
- [19] ACTON S L, SCHERER P E, LODISH H F, et al. Expression cloning of Sr-Bi, a Cd36-related class-B scavenger receptor [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1994, 269(33):21003-21009.
- [20] IICHMANN A, BURGDORF S, SCHEURER S, et al. Glycation of a food allergen by the maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: Role of macrophage scavenger receptor class a type I and II [J]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010, 125(1):175-183.
- [21] NAKAMURA T, SUZUKI H, WADA, Y, et al. Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2006,

- 343(1):286-294.
- [22] YANG J W, YOON S Y, OH S J, et al. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2006, 346(1):345-350.
- [23] UNDERHILL D M, ROSSNAGLE E, LOWELL C A, et al. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production [J]. **Blood**, 2005, 106(7):2543-2550.
- [24] BROWN G D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor [J]. **Nature Reviews Immunology**, 2006, 6(1):33-43.
- [25] HARADA T, N OHNO. Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of beta-glucan [J]. **International Immunopharmacology**, 2008, 8(4):556-566.
- [26] GUO L, XIE J H, RUAN Y Y, et al. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum* [J]. **International Immunopharmacology**, 2009, 9(10):1175-1182.
- [27] CHAUNG H C, HUANG T C, YU J H, et al. Immuno-modulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells [J]. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2009, 131(3-4):147-157.
- [28] SAIJO S, FUJIKADO N, FURUTA T, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans* [J]. **Nature Immunology**, 2007, 8(1):39-46.
- [29] GAZI U, L MARTINEZ-POMARES. Influence of the mannose receptor in host immune responses [J]. **Immunobiology**, 2009, 214(7):554-561.
- [30] LIU C, LEUNG M Y K, KOON J C M, et al. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg [J]. **International Immunopharmacology**, 2006, 6(11):1634-1641.
- [31] LI MING, CHUN L D S, et al. Effect of ganoderma polysaccharides on cAMP in murine peritoneal macrophages China [J]. **Journal of Materia Medica**, 2000, 25(1):40-43.
- [32] LI MING, CHUN L L S, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on inositol trisphosphate and diacylglycerol in murine T cells [J]. **China Pharm J**, 2001, 36(8):522-526.
- [33] BELSKA N V, GURIEV A M, DANILETS M G, et al. Water-soluble polysaccharide obtained from *acorus calamus* L. classically activates macrophages and stimulates Th1 response [J]. **International Immunopharmacology**, 2010, 10(8):933-942.
- [34] WEI S D, YANG K, GONG J P. Effect of GITR/GITRL signaling system on macrophage [J]. **Cell and Molecular Immunology**, 2009, 25(12):1207-1209.
- [35] CHAUNG H C, HUANG T C, YU J H, et al. Immunomodulatory effects of beta-glucans on porcine alveolar macrophages and bone marrow haematopoietic cell-derived dendritic cells [J]. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2009, 131(3-4):147-157.
- [36] WANG J, ZUO G, LI J, et al. Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide [J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2010, 46(4):389-395.
- [37] DERGUNOVA M A, ALEXEENKO T V, ZHANAIEVA S Y, et al. Characterization of the novel chemically modified fungal polysaccharides as the macrophage stimulators [J]. **International Immunopharmacology**, 2009, 9(6):729-733.

[责任编辑 黄晓花]