

## ZYMOBAN KÍCH THÍCH HOẠT ĐỘNG CỦA STAT1 TRONG MACROPHAGE THÔNG QUA THỤ THỂ DECTIN-1

TRỊNH TẮT CƯỜNG, PHAN TUẤN NGHĨA

*Trường đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN*

VŨ TIẾN CHÍNH

*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật*

Zymosan, một chất được tách ra từ thành tế bào của nấm là một chất kích thích tiềm năng hoạt động của macrophage trong quá trình biểu hiện nhiều gen cần thiết đối với điều hành chức năng bảo vệ của vật chủ [1]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, Dectin-1 là một thụ thể tín hiệu đầu tiên có thể nhận ra zymosan [2]. Thụ thể Dectin-1 có một đoạn giống như lectin loại C liên kết với màng loại II và một đoạn cytoplasma cùng với một phần hoạt động như thụ thể có hoạt tính tyrosinase [1]. Dectin-1 được biểu hiện trong dòng tế bào myeloid, monocytes, macrophage, neutrophil, dendritic cell [2]. Dectin-1 thực hiện một vai trò cơ bản như một thụ thể nhận dạng trong quá trình nhiễm nấm và mycobacteria [2]. Hơn nữa, Dectin-1 có thể hợp tác cùng với họ toll like (TLRs) trong quá trình phát hiện nấm. Chẳng hạn, Dectin-1 cùng với TLR2 và TLR6 nhận ra zymosan hoặc nấm *Candida albicans* điều hòa hoạt động của yếu tố nhân của tế bào T hoạt động (NFAT) và quá trình sản xuất các interleukin (IL)-2, IL-10 trong tế bào dendritic [2].

STAT (Signal transducers and Activator of transcription proteins) tham gia trong quá trình điều hòa sinh trưởng, phân chia và sự tồn tại của tế bào [3]. Các yếu tố phiên mã của STAT được kích hoạt bằng Janus Kinase (JAK) và khi phá hủy quá trình điều hòa của STAT thường dẫn tới sự tăng cường angiogenesis, tăng cường khả năng sống của các tế bào ung thư và ức chế quá trình miễn dịch [3]. Con đường tín hiệu của JAK/STAT đã được chỉ ra là một con đường tín hiệu cơ bản đối với các gen biểu hiện cytokine trong đáp ứng miễn dịch [3]. Hơn nữa, vai trò quan trọng đối với STAT1 trong đáp ứng sinh học phụ thuộc Interferon đã được chứng minh [4]. Mặc dù, STAT1 thực hiện vai trò cơ bản

trong rất nhiều dạng của miễn dịch bẩm sinh. Tuy nhiên, vai trò hoạt động của STAT1 được kích hoạt bởi zymosan vẫn chưa được làm rõ. Mục đích của nghiên cứu này là chứng minh vai trò của STAT1 trong quá trình sản xuất các cytokine tiền viêm dưới tác động của zymosan (phối tử của Dectin-1) trong tế bào macrophages tách ra từ tủy xương chuột (BMDMs).

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Zymosan được phân từ *Saccharomyces cerevisiae* (cấu tử của thụ thể Dectin-1 và TLR2) được mua từ Sigma; Lipopolysaccharides - LPS (cấu tử của TLR4) được mua từ Invivo Gen (San Diego, CA); BLP - Bacterial lipoprotein (cấu tử của TLR2) mua từ Sigma; CWS-BCG - The cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (cấu tử của TLR2 hoặc TLR4) là quà của giáo sư Eun-Kyeong Jo. Các kháng phospho của Tyr-701 và Ser-727 được mua từ Cell Signaling Technology (Beverly, MA) actin (I-19) mua từ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Dimethyl sulfoxide (DMSO), laminarin, and polysaccharide galactan được mua từ Sigma.

#### 2. Phương pháp

##### a. Nuôi cấy tế bào BMDMs

Chuột đột biến gen STAT1 và chuột bình thường được cung cấp từ Khoa Y học- Đại học Chungnam Hàn Quốc. Các loại chuột này được nuôi trong môi trường đạt tiêu chuẩn của bệnh viện Quốc gia Chungnam Hàn Quốc. BMDMs được tách ra từ xương đùi sau của chuột. Sau đó, tế bào được phân chia từ 5 đến 7 ngày trong môi

trường DMEM có chứa M-CSF (colony-stimulating factor), 10% FBS, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/ml penicillin.

*b. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

BMDMs được xử lý như chỉ định, sau đó được phân tích bằng ELISA như miêu tả [6]. Mức độ của cytokine tiết ra trong tế bào nuôi cấy được phân tích bằng kit ELISA của hãng BD Pharmingen để phát hiện TNF- $\alpha$  và IL-6 Tất cả các bước phân tích được thực hiện như chỉ dẫn của nhà sản xuất.

*c. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Đối với phân tích RT-PCR, tổng số ARN được phân tách từ BMDMs sử dụng TRIzol (Invitrogen). Các đầu mỗi có trình tự như sau:

mTNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  mRNA): (forward: 5'-CGGACTCCGCAAAGTCTAAG-3', reverse: 5'-ACGGCATGGATCTCAAAGAC-3'), mL-6 (IL-6 mRNA) (forward: 5'-GGAAATTGGG GTAGGAAGGA-3', reverse: 5'-CCGAGAG GAGACTTCACAG-3'),  $\alpha$ -actin (forward: 5'-T CATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT-3', reverse: 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGC ACGATG-3').

Điều kiện chạy PCR được miêu tả [7] sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1,5% và được nhuộm cùng với ethidium bromide.

*d. Western blot*

BMDMs được xử lý như chỉ định trong phần chú thích tại hình 3 và quá trình phân tích Western blott được miêu tả [6]. Kháng thể kháng phospho STAT1 (Tyr-701 và ser-727 là vị trí đòi hỏi khi STAT1 hoạt động [8]) đã được pha loãng với tỉ lệ 1: 1000. Màng chuyển protein được phát hiện bằng chemiluminescence (ECL; Amersham- Pharmacia).

*e. Phân tích thống kê*

Đối với phân tích thống kê, các số liệu được lấy từ các kết quả độc lập, được thể hiện ý nghĩa bằng  $\pm$  SD và được phân tích bằng student's t-test cùng với điều chỉnh Bonferroni hoặc ANOVA đối với nhiều phép so sánh. Sự khác nhau có ý nghĩa thống kê khi  $P < 0,05$ .

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. STAT1 thực hiện vai trò cơ bản đối với quá trình biểu hiện các cytokine tiền viêm trong macrophage do zymosan kích thích

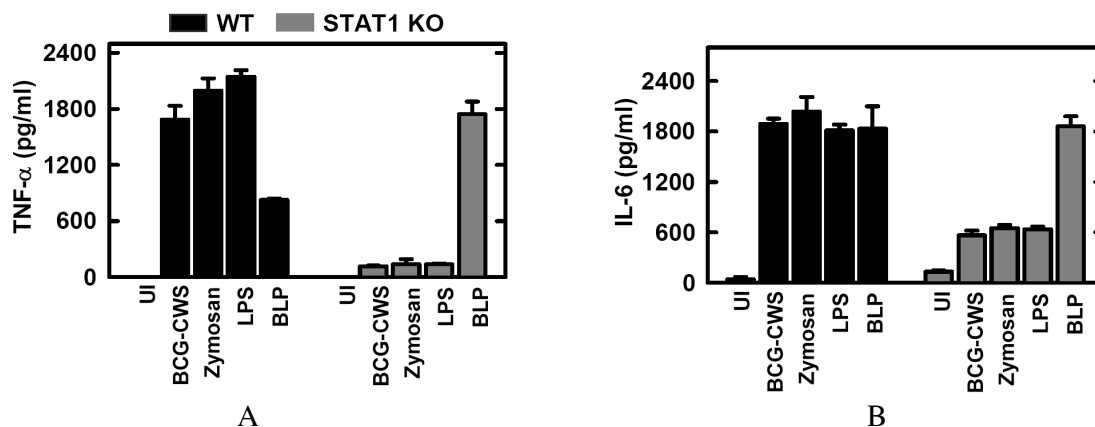
STAT1 đã được chứng minh là có vai trò cơ bản trong quá trình đáp ứng viêm gây ra bởi LPS nhưng đối với quá trình kích thích tế bào bằng zymosan thì vẫn chưa được đánh giá. Do vậy, BMDMs từ chuột đột biến gen STAT1 và chuột bình thường được tách và nuôi cấy. Sau đó, BCG-CWS (C, cấu tử của thụ thể TLR4 và TLR2), zymosan (Z, cấu tử của Dectin-1 và TLR2), BLP (B, cấu tử của TLR2), LPS (L, cấu tử của TLR4) được xử lý cùng với BMDMs. Sau 18 giờ, dịch nuôi cấy của BMDMs này được tách ra bằng ly tâm và phân tích bằng kit ELISA. Kết quả trên hình 1 cho thấy, TNF- $\alpha$  (hình 1A) và IL-6 (hình 1B) của tế bào tách ra từ chuột bình thường đã biểu hiện mạnh hơn rất nhiều so với chuột bị đột biến gen STAT1. Hình 1A và 1B cũng chỉ ra rằng TNF- $\alpha$  và IL-6 ở BMDMs được xử lý bằng BLP không có sự khác nhau giữa hai loại chuột. Từ những kết quả trên gợi ý rằng STAT1 đã tham gia vào quá trình sản xuất cytokine tiền viêm và chỉ có thụ thể Dectin-1 hoặc TLR4 là được đòi hỏi trong quá trình đáp ứng viêm sản xuất cytokine trong macrophage được kích thích bằng zymosan. Kết quả này cũng phù hợp với các công bố khác về vai trò của STAT1 đối với quá trình sản xuất cytokine tiền viêm bằng macrophage thông qua LPS.

### 2. STAT1 tham gia trong quá trình biểu hiện mARN của cytokine tiền viêm trong macrophage được kích thích bởi Zymosan

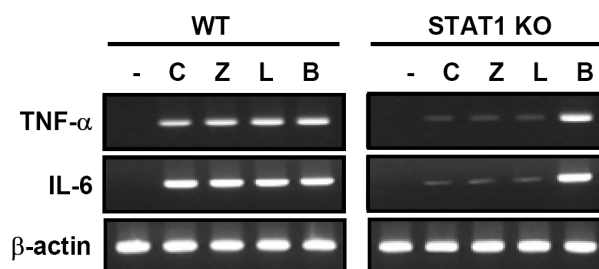
Để đánh giá vai trò của STAT1 ở mức độ phiên mã trong quá trình sản xuất cytokine tiền viêm. BMDMs từ chuột đột biến gen STAT1 và chuột bình thường được xử lý bằng C, Z, L, B. Như kết quả chỉ ra ở hình 2, mARN của TNF- $\alpha$  và IL-6 đã biểu hiện ở mẫu BMDMs của chuột bình thường nhưng điều đó lại không thấy xuất hiện ở mẫu BMDMs của chuột bị đột biến STAT1 khi xử lý bằng C, Z, L. Hơn thế nữa, các kết quả này cũng cho biết không có sự khác biệt giữa BMDMs được xử lý bằng B của chuột đột biến gen STAT1 và chuột bình thường. Từ kết quả ở trên ta thấy trùng hợp với kết quả nghiên cứu trước đây về sự tham gia của STAT1 trong

quá trình phiên mã của các cytokine tiền viêm trong macrophage được kích thích bằng LPS. Điều này nói rằng, STAT1 đã tham gia vào quá

trình sản xuất cytokine tiền viêm trong tế bào macrophage khi được kích thích bởi zymosan ở mức độ phiên mã.



**Hình 1.** Quá trình sản xuất TNF và IL-6 đã được biểu hiện ở chuột không bị đột biến gen thông qua một số cấu tử đặc hiệu của các thụ thể. BMDMs từ chuột không đột biến gen và chuột đột biến gen STAT1 được kích thích bằng BCG-CWS (20 mg/ml), Zymosan (100 mg/ml), BLP (100 ng/ml), hoặc LPS (100 ng/ml) trong 18 giờ. Dịch nuôi cấy BMDMs sau được ly tâm và đánh giá bằng ELISA kit. A. TNF- $\alpha$  và B. IL-6.

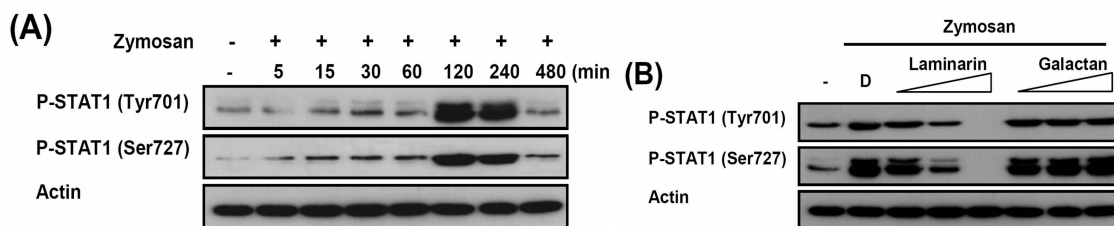


**Hình 2.** STAT1 tham gia trong quá trình hoạt động phiên mã của cytokine tiền viêm. BMDMs từ chuột bình thường và chuột đột biến gen STAT1 được ủ cùng với BCG-CWS (C, 20mg/ml), zymosan (Z, 100mg/ml), BLP (B, 100 ng/ml), hoặc LPS (L, 100 ng/ml) trong 6 giờ. Sau đó, những tế bào này được tách ra bằng ly tâm và phân tích RT-PCR. Kết quả thu được từ ít nhất 3 thí nghiệm riêng biệt.

### 3. Hoạt động của STAT1 được kích thích bằng Zymosan là phụ thuộc vào Dectin-1

Zymosan là phối tử đặc hiệu của thụ thể Dectin-1. Nhưng vai trò của thụ thể này trong quá trình hoạt động của STAT1 vẫn chưa được khẳng định. Do vậy, BMDMs được xử lý cùng với Zymosan tại một số thời gian khác nhau. Sau đó, các tế bào này được phân tích bằng Western blot. Kết quả chỉ ra ở hình 3A là quá trình phosphoryl hóa của STAT1 tại các vị trí Tyr 701 và Ser727 bắt đầu biểu hiện sau 15 phút và kết thúc ở 480 phút cũng được xử lý cùng với Zymosan. Đặc biệt là quá trình phosphoryl hóa mạnh nhất sau 120 phút xử lý cùng với Zymosan. Để khẳng định Dectin-1 có tham gia

vào quá trình hoạt động của STAT1, BMDMs đã được tiền xử lý cùng laminarin (một chất ức chế hoạt động Dectin-1) ở một số nồng độ khác nhau hoặc với galactan cùng nồng độ giống như laminarin (một chất làm đối chứng). Kết quả chỉ ra ở hình 3B cho thấy, quá trình phosphoryl hóa của STAT1 (tyr701 và ser727) đã biểu hiện giảm dần khi tăng nồng độ laminarin và quan trọng hơn là không thấy bằng xuất hiện tại nồng độ cao của laminarin. Ngược lại, đối với BMDMs xử lý với galactan thì biểu hiện này vẫn xảy ra bình thường. Từ những kết quả này cho thấy rằng, Dectin-1 đã tham gia vào hoạt động của STAT1 khi được kích thích bằng zymosan trong tế bào macrophage.



**Hình 3.** Quá trình phospho hóa của STAT1 được kích thích bởi zymosan phụ thuộc vào thụ thể Dectin-1

*Ghi chú:* A. BMDMs được xử lý cùng với zymosan (100 g/ml) đối với các thời gian khác nhau và các tế bào được phân tích bằng Western blot đối với phosphoryl hóa của STAT1. Những mẫu này đã được so sánh bằng STAT1 tổng số; B. BMDMs được tiên xử lý cùng với laminarin (0,1; 0,25; 0,5 mg/ml), galactan (0,1; 0,25; 0,5 mg/ml). Sau đó được xử lý cùng với Zymosan (100 g/ml) trong 120 phút. Và tiếp theo các tế bào được xử lý và phân tích bằng Western blot đối với phospho hóa của STAT1. Các mẫu này được so sánh bằng STAT1 tổng số. Các kết quả này được chỉ ra bằng ba thí nghiệm độc lập có các kết quả giống nhau.

### III. KẾT LUẬN

Quá trình sản xuất cytokine tiền viêm gây ra bởi zymosan là phụ thuộc vào hoạt động của STAT1, bởi vì mRNA của cytokine đã bị phá hủy trong BMDM của chuột bị đột biến gen STAT1. Hơn nữa, Zymosan kích thích hoạt động của STAT1 thông qua Tyr-701 và Ser-727 trong BMDMs và hoạt động này đã bị ức chế bởi laminarin, do vậy, hoạt động của STAT1 được kích thích bởi zymosan là phụ thuộc vào Dectin-1. Từ các kết quả nghiên cứu ở trên đã chỉ ra rằng, hoạt động của STAT1 tham gia vào quá trình kích thích đáp ứng miễn dịch dưới sự kích thích bởi zymosan thông qua Dectin-1.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **G. D. Brown**, 2006: Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor, *Nature* 6.
2. **L. Sun, Y. Zhao**, 2007: *International Reviews of Immunology*, 26: 349-364.
3. **B. N. Gantner et al.**, 2003: *J. Exp. Med.*, 197(9): 107-17.
4. **X. Hu et al.**, 2007: *J. Leukoc. Biol.*, 82: 237-243.
5. **Y. Ohmori et al.**, 2001: *J. Leukoc. Biol.*, 69: 598-604.
6. **C. S. Yang et al.**, 2007: *J. Exp. Med.*, 204: 583-594.
7. **T. T. Cuong et al.**, 2009: *Life Sciences*, 85: 625-633.
8. **Ramsauer K.**, 2002: *PNAS*, 99(20): 12859-12864.

## SIGNAL TRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION PROTEIN 1 (STAT1) IS ACTIVATED IN MACROPHAGES BY ZYMOSAN THROUGH DECTIN-1

TRINH TAT CUONG, PHAN TUAN NGHIA, VU TIEN CHINH

### SUMMARY

Zymosan, an insoluble preparation of yeast cell, has been shown to recognized by Dectin-1, a phagocytic receptor expressed on macrophages and dendritic cells, which collaborates with toll-like receptor (TLR) 2 and

TLR6 enhancing the immune responses triggered by the recognition of zymosan by each receptor. Although zymosan has been reported as a target molecule for TLR signaling, the role(s) of signal transducers and activators of transcription protein (STAT) 1 on the innate immune responses induced by zymosan remain elusive. In the present study, we investigate the role of STAT1 on the zymosan-induced production of proinflammatory cytokines by murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs). Zymosan-induced proinflammatory cytokine production was dependent on the activation of STAT1, because the mRNA of cytokines and chemokines were totally abrogated in STAT1-deficient BMDMs. In addition, zymosan actively induced the activation of STAT1 through both Tyr-701 and Ser-727 phosphorylation by BMDMs. Furthermore, Dectin-1 was required for zymosan-induced STAT1 activation in macrophages. Taken together, these results indicate that STAT1 activation plays an essential role in the induction of innate immune responses to zymosan-induced innate immune responses *via* Dectin-1.

Keywords: STAT1, Zymosan, Dectin-1.

*Ngày nhận bài: 1-7-2010*