

胱天蛋白酶募集域蛋白 9 缺乏对小鼠烟曲霉角膜炎的影响

吴赛男, 齐晓暄, 杨雅淳, 熊丹瑜, 林步云, 张 青

(安徽医科大学第二附属医院眼科, 合肥 230601)

摘要 **目的** 研究胱天蛋白酶募集域蛋白 9(Card9)在烟曲霉性角膜炎中的作用,以及 Card9 缺乏对巨噬细胞抵御真菌感染的影响。**方法** ① 选择 6 ~ 8 周的 C57BL/7 小鼠,分别用 Card9 siRNA 和 Blank siRNA 进行预处理,通过 Western blot 和 RT-PCR 检测各组 Card9 的表达;siRNA 预处理 72 h 后刮去角膜上皮,注射烟曲霉孢子悬液,在感染后第 1、3、5、7 天记录角膜评分,通过 RT-PCR、免疫组化检测法(IHC)检测各组 Card9、核因子 κ B (NF- κ B)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达;② 体外培养人角膜上皮细胞(HCECs)、人单核巨噬细胞(THP-1 细胞),使用 RT-PCR 检测两种细胞的 Card9 基因的表达;使用 shRNA 载体对 THP-1 细胞构建稳转细胞系,通过 Western blot 和 RT-PCR 检测 Card9 的表达,诱导成巨噬细胞,烟曲霉刺激后用 RT-PCR 检测 Card9、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达。**结果** 小鼠烟曲霉性角膜炎中 Card9 表达增加,主要分布在免疫细胞的细胞质中;使用 Card9 siRNA 处理后的小鼠角膜中 Card9 表达明显减少;在抑制 Card9 基因的表达后,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、NF- κ B 的表达明显减少,其中以 IL-1 β 的变化最为显著。体外实验中,HCECs 中几乎不表达 Card9,而 THP-1 细胞中大量表达;诱导后的巨噬细胞在烟曲霉刺激下,Card9、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 均显著上调,抑制 Card9 表达后,刺激后的表达明显减少,以 IL-1 β 的变化最为显著。**结论** Card9 参与烟曲霉性角膜炎的炎症发展及愈合过程,Card9 缺乏可引起巨噬细胞功能受损,并抑制炎症因子表达,其中 IL-1 β 的影响最大。

关键词 Card9;烟曲霉菌;巨噬细胞;炎症因子;角膜炎

中图分类号 R 772.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)03-0446-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.009

真菌感染在机体抵抗力低下时常反复发作,其中烟曲霉引起的角膜炎不仅会导致角膜损伤,还会引发严重的局部和系统性免疫反应^[1-2]。深入了解真菌感染的免疫机制对治疗具有重要意义。真菌细胞壁上的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)被识别, C 型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLR)作为 PRRs 中的一种,主要在抗原提呈细胞中表达,能与病原体的聚

糖结构结合,对真菌识别至关重要^[3-4]。Card9 是 CLR 信号通路中的重要衔接蛋白,不仅参与激活 NF- κ B 通路,还促进炎症小体活化 IL-1 β 的生成^[5]。Card9 缺乏可能导致巨噬细胞对真菌的识别和清除功能受损,影响感染的控制^[6-7]。因此,Card9 在真菌感染中的作用机制值得深入研究。该研究以烟曲霉角膜炎为模型,聚焦于巨噬细胞,采用动物模型和体外实验相结合的方式,探讨了 Card9 在烟曲霉性角膜炎中的作用,通过研究炎症反应及免疫细胞参与,旨在为未来的治疗策略提供新的靶点并推动相关治疗方法的发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物、实验菌株及细胞 选择 27 只 6 ~ 8 周的野生型 C57BL/6 小鼠(雄性),体质量 25g 左右,购自合肥青源生物有限公司(伦理号:LLSC20221272);烟曲霉菌菌株(BNCC338385)购自北京北纳创联生物技术研究院;人角膜上皮细胞(HCECs)由厦门大学眼科研究所赠予;人单核巨噬细胞(THP-1 细胞)购自武汉普诺赛公司。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;DMEM/F-12 培养基购自美国

2024-10-22 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金项目(编号: KJ2020A0180);安徽省教育厅省级研究生学术创新项目(编号: 2022xscx059);安徽省卫生健康科研项目(编号: AHWJ2023A20229);安徽省教育厅省级研究生教育教学改革研究项目(编号: 2022jyxxggyj226);安徽医科大学第二附属医院首批国家自然科学基金培育计划(编号: 2019GQFY04);安徽医科大学第二附属医院第四批科技新星培优项目(编号: 2018KA08);2020 年高校优秀青年骨干人才国外访学研修项目(编号: gxgwf2020024)

作者简介:吴赛男,女,硕士研究生;

张 青,女,副教授,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: zhangqing@ahmu.edu.cn

Gibco 公司;siRNA 慢病毒载体购自上海吉玛基因有限公司;shRNA 慢病毒载体、引物购自滁州通用生物有限公司;嘌呤霉素购自美国 GlpBio 公司;佛波脂(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 购自美国 MedChemexpress 生物科公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂(用于 qPCR)以及 SYBR Green 试剂购自杭州艾科瑞生物科技有限公司; β -actin、IL-6、Card9 抗体购自北京 Affinity 公司;IL-1 β 、TNF- α 购自美国 Novus Biological 公司;NF- κ B 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 方法

1.3.1 烟曲霉培养与分生孢子的制备 烟曲霉菌株在沙氏培养基 37℃下培养 7 d,通过在培养基表面刮取分生孢子制备孢子悬液,用无菌纱布过滤去除菌丝,使用血细胞仪对样本进行定量,并使其终浓度调节至 1×10^7 CFU/L,于 4℃冰箱中保存备用。

1.3.2 小鼠真菌性角膜炎的建立 选择 27 只 6~8 周的野生型 C57BL/6 小鼠(雄性),体质量 25 g 左右,随机分为 3 组,连续 3 d 使用左氧氟沙星滴眼液滴入结膜囊内,每天 4 次。第一组和第二组小鼠结膜下注射 30 μ l Blank-siRNA 载体;第三组小鼠进行结膜下注射 30 μ l Card9-siRNA 载体。72 h 后在体视显微镜下,刮去各组小鼠角膜上皮,在基质中注入 2 μ l 无菌 PBS 溶液(第一组)和 2 μ l 浓度为 1×10^7 CFU/L 的烟曲霉孢子悬液(第二组和第三组)。术后使用左氧氟沙星滴眼液,每日 4 次,预防细菌感染的发生。第 0、1、3、5、7 天,用裂隙灯显微镜观察角膜感染情况,拍照并予以评分。以溃疡面积、溃疡浑浊度以及溃疡形态为标准进行评分,最终角膜评分为以上 3 个得分的总和,最小为 0 分,最大为 12 分。

1.3.3 病理切片 烟曲霉感染后第 3 天处死小鼠收集眼球,置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定,24 h 后制作石蜡切片,HE 染色观察病理结构,免疫组化检测各组小鼠角膜中 Card9、NF- κ B、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达。

1.3.4 体外实验 使用含有 10% 胎牛血清(FBS)、 5×10^{-5} mol/L 的 β -巯基乙醇、1% 双抗的 RPMI-1640 培养基培养 THP-1 细胞。使用含有 10% FBS、1% P/S 的 DMEMF/12 培养基培养 HCECs 细胞。

1.3.5 shRNA 转染 通过慢病毒载体系统抑制 Card9 基因的表达。将 THP-1 细胞以 1×10^8 个/L 接种于 24 孔板,感染前用不含抗生素的培养基对病毒进行稀释,使感染复数达到 50(MOI = 50, MOI:感染时病毒与细胞数量的比值,即平均感染每个细胞病毒活性单位数),37℃孵育过夜。24 h 后,更换完全培养基。转染成功后,于感染 72 h 后加入嘌呤霉素(终浓度为 2 g/L)进行筛选。筛选后的 THP-1 细胞加入 PMA 诱导 48 h 后,加入烟曲霉孢子悬液处理 6 h。

1.3.6 细胞分组 将导入 Blank shRNA 载体和 Card9 shRNA 载体的 THP-1 细胞诱导为巨噬细胞后,分别加入处理后的烟曲霉孢子刺激 6 h,记为 A. fumigatus 组及 Card9 shRNA A. fumigatus 组,以同样的方法对另一组 Blank shRNA THP-1 细胞加入无菌 PBS 溶液作为空白对照组(PBS 组)。

1.3.7 基因表达检测 通过 Western blot 和荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测各组小鼠角膜组织中 Card9 的表达、各组细胞系中 Card9 的表达;通过 RT-PCR 检测各组小鼠角膜中、细胞中 Card9 以及相关炎症因子 mRNA 的表达。相关基因的引物序列见表 1,以 GAPDH 为内参基因。以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法

表 1 相关引物的序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Forward	Reverse
hGAPDH	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3'	5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'
hCard9	5'-ATGTCGGACTACGAGAACGAT-3'	5'-TGATGCGTGAGGGGTGCGAT-3'
hIL-1 β	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	5'-GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA-3'
hTNF- α	5'-CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3'	5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAG-3'
hNF- κ B	5'-AACAGAGAGGATTTCGTTTCCG-3'	5'-TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT-3'
hIL-6	5'-ACTCACCTCTTCAGACGAATTG-3'	5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG-3'
mGAPDH	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'
mCard9	5'-ACTATGAGAATGACGACGACTGC-3'	5'-GATCCGGGAGGGGTCAATG-3'
mIL-1 β	5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'	5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG-3'
mTNF- α	5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3'
mNF- κ B	5'-ATGGCAGACGATGATCCCTAC-3'	5'-CGGAATCGAAATCCCTCTGTT-3'
mIL-6	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'	5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'

计算各基因的相对表达量。

1.4 统计学处理 所有数据采用 Graphpad prism 8.0 软件进行统计分析,采用独立样本 *t* 检验比较两组之间的差异,采用单因素方差分析比较多组之间的差异,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。当 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Card9 缺乏可抑制烟曲霉角膜炎的发展 动物实验中,与其他两组相比,Card9 siRNA 组小鼠中的 Card9 蛋白表达明显减少(图 1A),同时 mRNA 水平也显著降低(图 1B),差异有统计学意义,表明小鼠体内 Card9 基因抑制模型创建成功。PBS 组小鼠仅见角膜上皮小片状缺损,无感染迹象,7 d 后无明显瘢痕遗留;烟曲霉感染后,小鼠角膜出现溃疡,基质层水肿,在第 3 天时感染最为严重,第 5 天时炎症逐渐减轻;Card9 siRNA *A. fumigatus* 组小鼠感染后第 3 天,角膜缘处血管充血,新生血管开始长入,以角膜中央溃疡处反应最为严重,有穿孔迹象,溃疡周围组织坏死程度较 *A. fumigatus* 组严重,第 5 天时未明显好转迹象,角膜表现如图 2A 所示。角膜临床评分结果见图 2, $P < 0.001$ 。Card9 siRNA 组的角膜溃疡程度比 *A. fumigatus* 组严重,且恢复速度较慢。总体而言,Card9 siRNA *A. fumigatus* 组小鼠的角膜溃疡程度要重于普通的烟曲霉角膜炎模型。

2.2 角膜病理改变及炎症因子的表达 对照组角膜结构完整,细胞排列整齐,无炎症细胞浸润;*A. fumigatus* 组角膜基质中可见炎症细胞浸润,结构相对完整;Card9 siRNA *A. fumigatus* 组角膜结构显著破

坏,细胞间隙增大,基质层紊乱,并出现组织坏死(图 3)。在正常小鼠角膜组织中,Card9 及炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、NF- κ B)表达极少。烟曲霉感染后,Card9 及这些炎症因子的表达升高,其中 IL-1 β 和 TNF- α 升高最为明显。Card9、IL-6、NF- κ B 主要分布在角膜基质中,为胞质蛋白;IL-1 β 定位在细胞核中,并主要分布在基质中。与 *A. fumigatus* 组相比,Card9 siRNA *A. fumigatus* 组小鼠的角膜中 Card9、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 NF- κ B 的表达显著减少,IL-1 β 降幅最为显著(图 4)。这些结果与 mRNA 表达数据一致(图 5)。

2.3 Card9 主要在免疫细胞中表达 实时荧光定量 PCR 结果显示,在人 HCECs 细胞中几乎不表达 Card9,而在 THP-1 细胞中表达 Card9,两种细胞中 Card9 的表达有显著差异,如图 6A 所示。巨噬细胞为终末分化细胞,无法建立稳定增殖的细胞系,因此,本研究通过 Card9 shRNA 载体对 THP-1 细胞构建稳转细胞系(图 6B、C),继而诱导 THP-1 细胞转化为巨噬细胞,深入探索 Card9 缺乏对巨噬细胞抵抗烟曲霉刺激的影响。

2.4 Card9 缺乏抑制巨噬细胞分泌炎症因子 使用实时荧光定量 PCR 技术检测各组细胞中相关 mRNA 的表达,结果如图 7 所示。在烟曲霉刺激后,THP-1 巨噬细胞的 Card9 表达明显升高,同时,IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、NF- κ B 的表达也相应升高,其中以 IL-1 β 升高最为显著。在 Card9 敲低后,NF- κ B 和这 3 种炎症因子的表达明显减少。该结果表明巨噬细胞中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、NF- κ B 的分泌在一定程度上依赖于 Card9 的存在。细胞实验中炎症因子的变

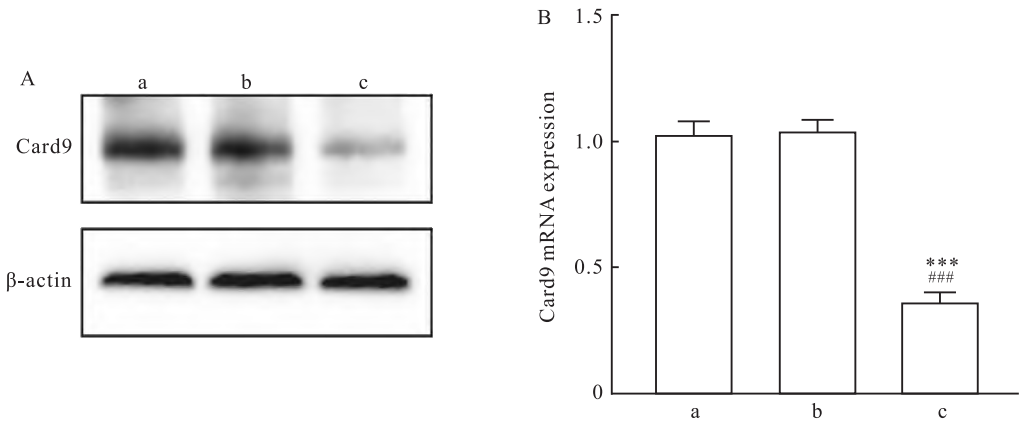


图 1 C57 小鼠 Card9 siRNA 干扰效果验证

Fig.1 Verification of Card9 siRNA interference effect in C57 mice

A: Western blot was used to verify the protein level; B: Real-time fluorescent quantitative PCR was used to verify the mRNA level. a: PBS group; b: *A. fumigatus* group; c: Card9 siRNA *A. fumigatus* group; *** $P < 0.001$ vs *A. fumigatus* group, #### $P < 0.001$ vs PBS group.

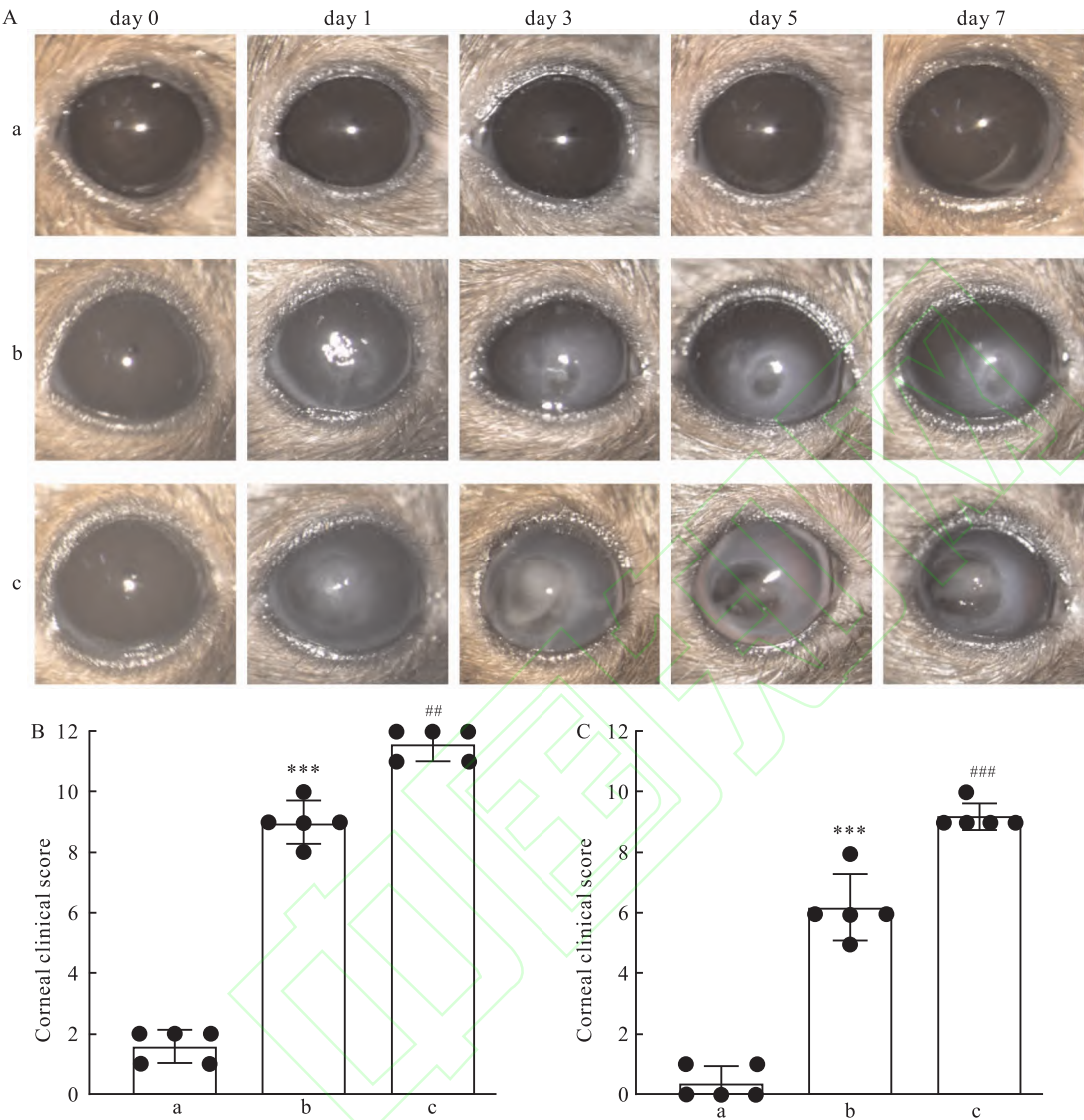


图2 各组小鼠感染前后的角膜表现

Fig.2 Corneal manifestations of mice in each group before and after infection

A: corneal ulcer results; B: Corneal score on day 3 after infection; C: Corneal score on day 5 after infection; a: PBS group; b: *A. fumigatus* group; c: Card9 siRNA *A. fumigatus* group; *** $P < 0.001$ vs PBS group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs *A. fumigatus* group.

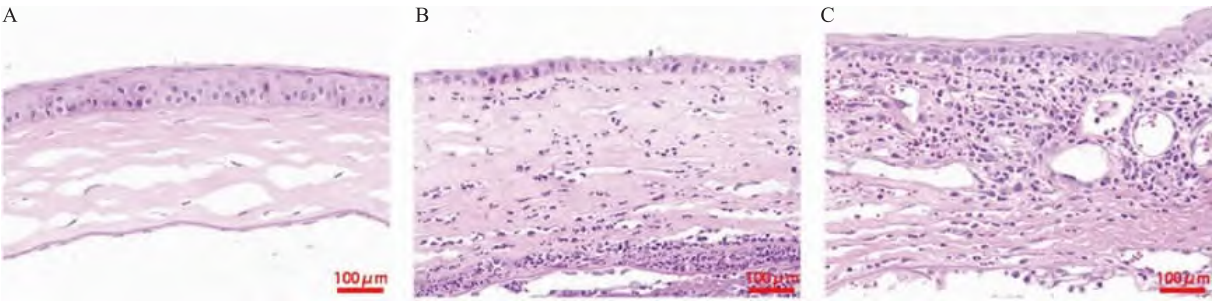


图3 各组小鼠角膜组织的 HE 染色 ×200

Fig.3 HE staining of corneal tissue of mice in each group ×200

A: PBS group; B: *A. fumigatus* group; C: Card9 siRNA *A. fumigatus* group.

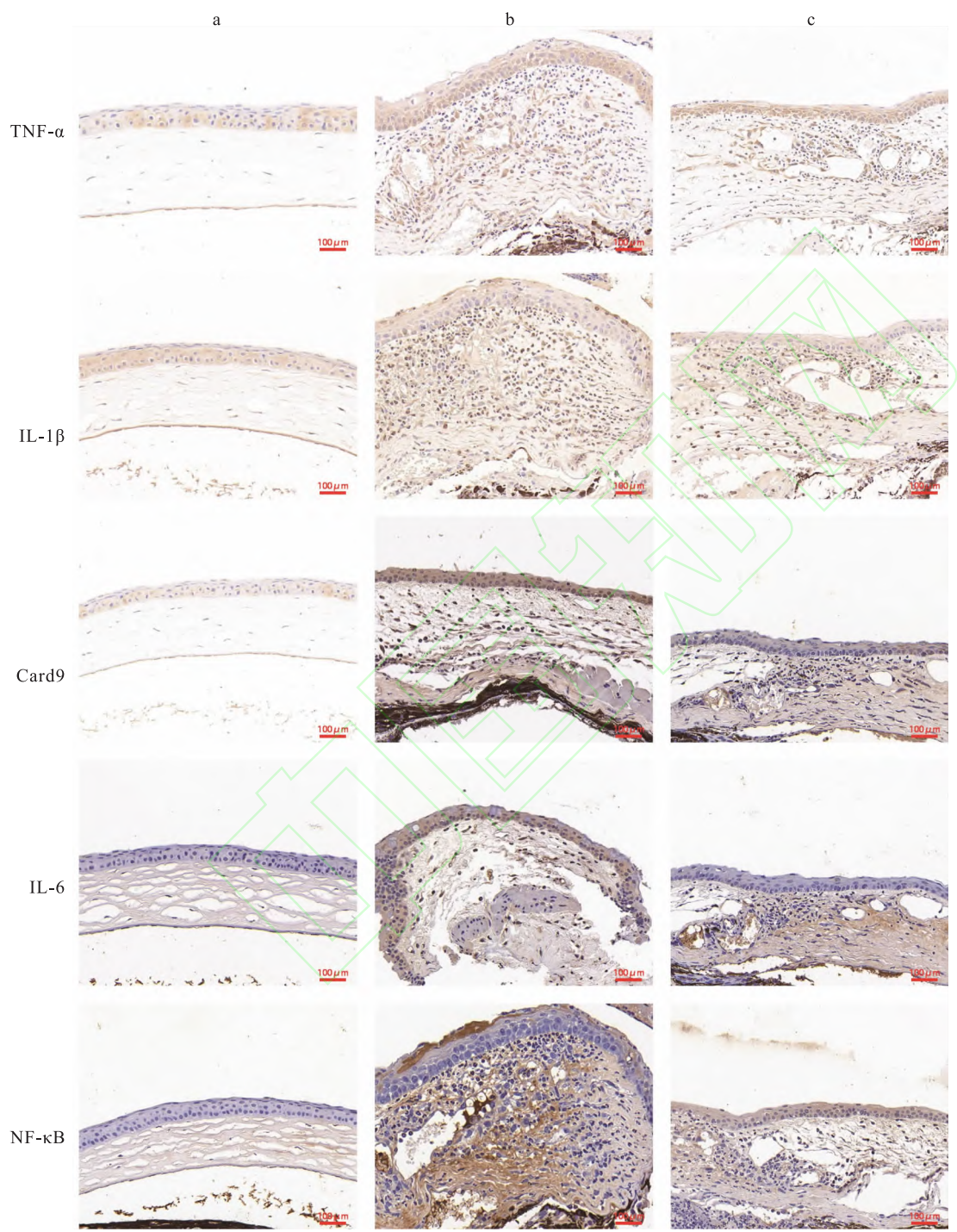


图 4 各组使用免疫组化法检测各组角膜组织中 Card9 和 IL-1β、TNF-α、IL-6、NF-κB 的表达 ×200

Fig.4 The expressions of Card9, IL-1β, TNF-α, IL-6 and NF-κB in corneal tissues of each group detected by immunohistochemical method ×200

A:PBS group;B:A. fumigatus group;C:Card9 siRNA A. fumigatus group.

化趋势与小鼠模型中的基本一致。

3 讨论

角膜是一透明组织,能够有效组织外来微生物

和有害物质进入眼内,角膜中央没有血管,几乎没有常驻的免疫细胞,而角膜缘和周边富含免疫细胞、毛细血管和淋巴管^[8]。在角膜感染时,角膜缘会募集大量炎症细胞,尤其是中性粒细胞和巨噬细胞,后者

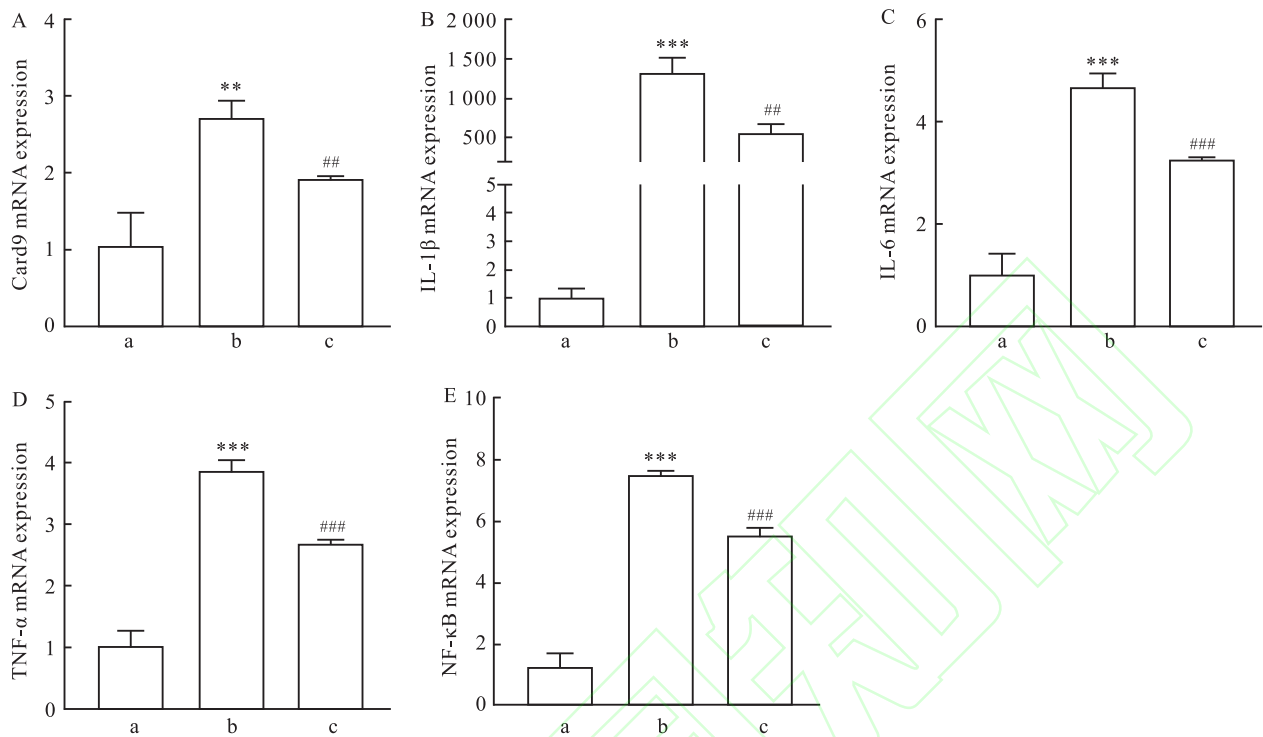


图5 各组小鼠角膜组织中的相关 mRNA 表达

Fig.5 mRNA expression in corneal tissue of mice in each group

A :Card9;B:IL-1β;C :IL-6;D :TNF-α;E :NF-κB;a: PBS group; b: *A. fumigatus* group; c: Card9 siRNA *A. fumigatus* group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs *A. fumigatus* group.

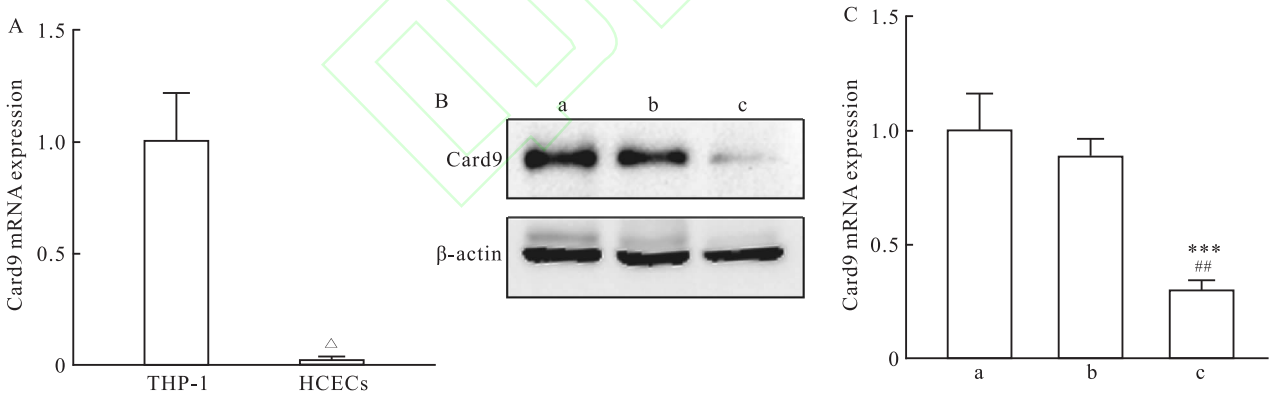


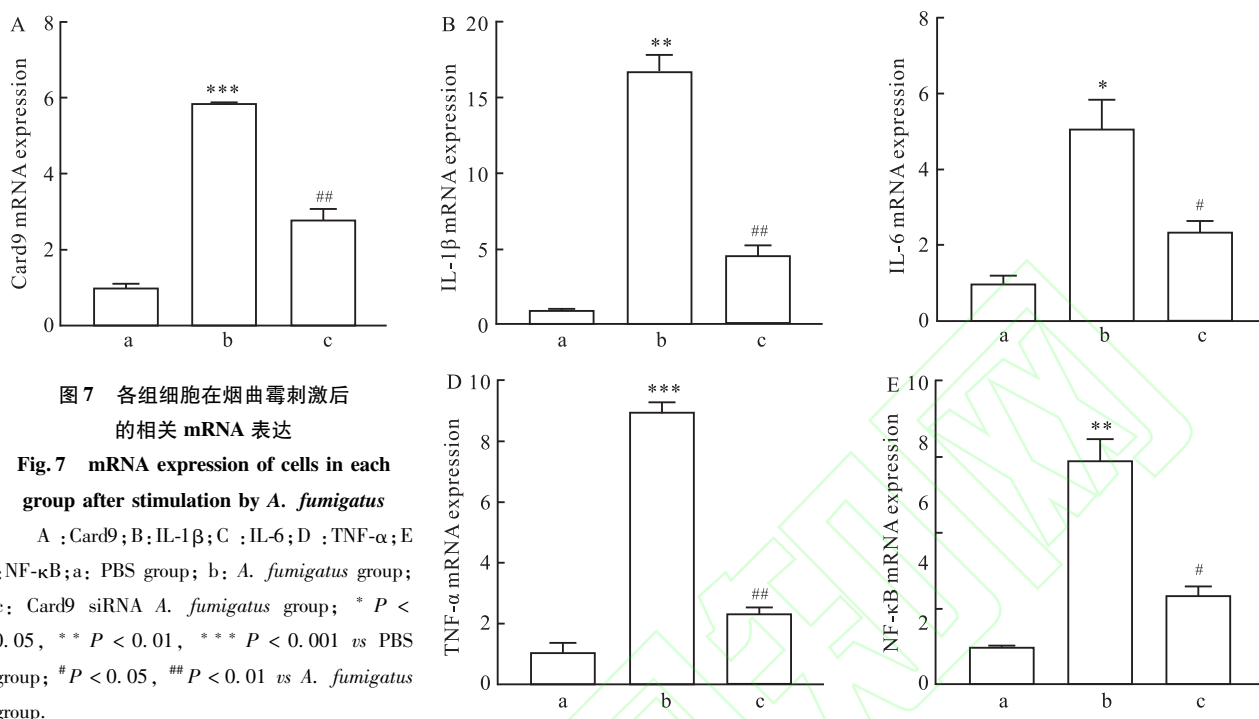
图6 各组细胞中 Card9 的表达

Fig.6 Expression of Card9 in cells of each group

A: mRNA expression of Card9 in THP-1 cells and human HCECs cells; B: After the construction of THP-1 stable transmutation cell line, the expression of Card9 protein in each group was detected by Western blot, and the protein level was verified; C: After the construction of THP-1 stable cell line, RT-PCR was used to detect Card9 expression in each group of cells, and the mRNA level was verified; a: PBS group; b: *A. fumigatus* group; c: Card9 siRNA *A. fumigatus* group; $\triangle P < 0.05$ vs THP-1; *** $P < 0.001$ vs *A. fumigatus* group; ## $P < 0.01$ vs PBS group.

在伤口愈合和抗真菌感染中起到关键作用^[9]。真菌感染引起角膜结构破坏和炎症细胞的浸润会导致角膜变得浑浊。因此,角膜在真菌性角膜炎过程中起到物理屏障的作用,能够募集和迁移免疫细胞参与清除感染源和调节炎症反应,并维持角膜的透明

度。
Card9 作为一种信号转导蛋白,参与多种 PRRs 的信号转导并激活细胞内级联反应,是抗真菌反应中的关键激活剂^[10-11]。Card9 参与多种免疫细胞的信号转导,激活免疫炎症反应和抗真菌免疫的作



用^[12]。大多数 PAMP 通过激活 NF- κ B 参与炎症反应的上调,Card9 是 NF- κ B 激活中重要的衔接分子,通过巨噬细胞和树突状细胞中的 CLR 触发,与相应的配体结合后引起 Card9 依赖性信号级联反应,从而激活 NF- κ B,引起炎症细胞的聚集和 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等炎症因子的表达^[6, 12]。这些炎症因子在真菌感染中起到促进炎症反应和组织修复的作用^[13-14]。

Card9 对中性粒细胞的募集至关重要,缺陷会影响其对真菌的清除能力^[9, 15],缺陷的小鼠更容易受到白色念珠菌、烟曲霉、新型隐球菌以及一些罕见的真菌的攻击,导致炎症因子的表达减少,难以控制体内真菌的生长^[16]。为了深入探索 Card9 的作用机制,本研究通过建立烟曲霉角膜炎模型,以揭示在 Card9 缺陷的情况下,烟曲霉性角膜炎的发生发展及炎症因子的表达改变。

本研究中,小鼠在烟曲霉感染后,角膜中 Card9 表达明显增加,当抑制 Card9 基因的表达,在烟曲霉感染后 NF- κ B 和 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的表达明显减少,小鼠表现出更为严重的角膜溃疡,并且愈合缓慢,角膜组织结构破坏更为显著,组织坏死明显。在体外实验中,本研究使用 shRNA 载体沉默巨噬细胞的 Card9 基因,建立 THP-1 细胞稳转细胞系,并使用 PMA 诱导成巨噬细胞后,使用烟曲霉刺激建立感染模型,结果指出 Card9 被沉默的巨噬细胞在烟曲霉

感染后 NF- κ B 和炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的表达明显减少,尤其是 IL-1 β 的改变更为显著。这些结果表明 Card9 在巨噬细胞的抗真菌反应和促愈合作用中起着关键作用。当 Card9 的表达被抑制时,NF- κ B 及其下游的炎症因子的表达受到明显影响,说明 NF- κ B 信号通路的激活在一定程度上依赖于 Card9。该结果结合前人研究表明 Card9 在巨噬细胞的促愈合反应中起重要作用,并影响烟曲霉性角膜炎的发展,Card9 缺乏可引起真菌易感性增加以及降低机体抗真菌反应。靶向 Card9 结合位点或调节其下游信号分子的激活来增强免疫反应或许可以成为抗烟曲霉感染治疗的一个新思路,这需要后续更多的研究进行探索 Card9 信号通路及其下游机制。

参考文献

- [1] Li C, Li C, Lin J, et al. The role of autophagy in the innate immune response to fungal keratitis caused by *Aspergillus fumigatus* infection[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(2): 25. doi: 10.1167/iovs.61.2.25.
- [2] Manikandan P, Abdel-Hadi A, Randhir Babu Singh Y, et al. Fungal keratitis: epidemiology, rapid detection, and antifungal susceptibilities of *Fusarium* and *Aspergillus* isolates from corneal scrapings[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 6395840. doi:10.1155/2019/6395840.
- [3] Elizabeth Deerhake M, Danzaki K, Inoue M, et al. Dectin-1 limits autoimmune neuroinflammation and promotes myeloid cell-astro-

- cyte crosstalk *via* Card9-independent expression of Oncostatin M [J]. *Immunity*, 2021, 54(3): 484–98. e8. doi:10.1016/j.immuni.2021.01.004.
- [4] 石瑞峰, 唐明娜, 邓大同. 血清 C 型凝集素结构域家族 11 成员 A 在糖尿病肾脏病进展中的变化及在骨代谢评估中的意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(7): 1280–4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.07.027.
- [4] Shi R F, Tang M N, Deng D T. Changes of serum Clec11a in the progression of diabetic kidney disease and its significance in bone metabolism assessment [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(7): 1280–4. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.07.027.
- [5] Dasari T K, Geiger R, Karki R, et al. The nonreceptor tyrosine kinase SYK drives caspase-8/NLRP3 inflammasome-mediated autoinflammatory osteomyelitis [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(11): 3394–400. doi:10.1074/jbc.RA119.010623.
- [6] Campuzano A, Castro-Lopez N, Martinez A J, et al. CARD9 is required for classical macrophage activation and the induction of protective immunity against pulmonary cryptococcosis [J]. *mBio*, 2020, 11(1): e03005–19. doi:10.1128/mBio.03005–19.
- [7] Drummond R A, Desai J V, Hsu A P, et al. Human Dectin-1 deficiency impairs macrophage-mediated defense against phaeohyphomycosis [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(22): e159348. doi:10.1172/JCI159348.
- [8] Gueudry J, Majo F, Delcampe A, et al. Panorama of limbal changes [J]. *J Fr Ophthalmol*, 2019, 42(3): e83–94. doi:10.1016/j.jfo.2019.02.001.
- [9] Sun L, Zhang S, Wan Z, et al. *In vivo* and *in vitro* impairments in T helper cell and neutrophil responses against *Mucor irregularis* in Card9 knockout mice [J]. *Infect Immun*, 2021, 89(5): e00040–21. doi:10.1128/IAI.00040–21.
- [10] Staal J, Driege Y, Van Gaever F, et al. Chimeric and mutant CARD9 constructs enable analyses of conserved and diverged autoinhibition mechanisms in the CARD-CC protein family [J]. *FEBS J*, 2024, 291(6): 1220–45. doi:10.1111/febs.17035.
- [11] Holliday M J, Witt A, Rodríguez Gama A, et al. Structures of autoinhibited and polymerized forms of CARD9 reveal mechanisms of CARD9 and CARD11 activation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3070. doi:10.1038/s41467–019–10953–z.
- [12] Liu X, Jiang B, Hao H, et al. CARD9 signaling, inflammation, and diseases [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 880879. doi:10.3389/fimmu.2022.880879.
- [13] Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer [J]. *Int Immunol*, 2021, 33(3): 127–48. doi:10.1093/intimm/dx-aa078.
- [14] Mantovani A, Dinarello C A, Molgora M, et al. Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of inflammation and immunity [J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 778–95. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012.
- [15] Elaine Cagnina R, Michels K R, Bettina A M, et al. Neutrophil-derived tumor necrosis factor drives fungal acute lung injury in chronic granulomatous disease [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224(7): 1225–35. doi:10.1093/infdis/jiab188.
- [16] Tian C, Yuan H, Lu Y, et al. CARD9 deficiency promotes pancreatic cancer growth by blocking dendritic cell maturation via SLC6A8-mediated creatine transport [J]. *Oncoimmunology*, 2023, 12(1): 2204015. doi:10.1080/2162402X.2023.2204015.

Effect of caspase recruitment domain-containing protein 9 deficiency on aspergillus fumigatus keratitis in mice

Wu Sainan, Qi Xiaoxuan, Yang Yachun, Xiong Danyu, Lin Buyun, Zhang Qing

(Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the role of caspase recruitment domain-containing protein 9 (Card9) in *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) keratitis and the effect of its deficiency on macrophage resistance to fungal infection. **Methods** ① C57BL/7 mice aged 6–8 weeks were selected and the mice pretreated Card9 siRNA and Blank siRNA, respectively, and the expression of Card9 in each group was detected by Western blot and RT-PCR. The corneal epithelium of the mice was scraped away 72 hours later, and *A. fumigatus* spore suspension was injected into the corneal stroma. The corneal scores were recorded at 1d, 3d, 5d and 7d after infection. The expression of Card9, nuclear factor κ B (NF- κ B), interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) in each group was detected by RT-PCR and immunohistochemical (IHC). ② Human corneal epithelial cells (HCECs) and human monocytic-leukemia cells (THP-1) *in vitro*, RT-PCR was used to examine the expression of Card9 gene in the two cells, and a stable cell line of THP-1 cells was constructed using shRNA vectors. The expression of Card9 in the cell line was detected by Western Blot and RT-PCR. The cells were induced into macrophages and stimulation by *A. fumigatus*, and the expression of Card9, NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α was detected by RT-PCR. **Results** Card9 expression increased in *A. fumigatus* keratitis, mainly distributed in cytoplasm of

immune cells. The expression of Card9 in the cornea of mice treated with Card9 siRNA was significantly reduced. After inhibiting the expression of Card9 gene, the expressions of Card9, NF- κ B, IL-1 β , IL-6 and TNF- α significantly decreased and the changes of IL-1 β were most significant. In *in vitro* studies, Card9 exhibited negligible expression in human corneal epithelial cells, contrasting with its pronounced expression in THP-1 cells. After the induction of macrophages, Card9, NF- κ B, IL-1 β , IL-6, and TNF- α were significantly upregulated under the stimulation of *A. fumigatus*. After inhibiting the expression of Card9, the stimulated expression of these factors was significantly reduced, with the most notable change observed in IL-1 β . **Conclusion** Card9 is involved in the inflammatory development and healing process of *A. fumigatus* keratitis. Card9 deficiency can cause functional impairment of macrophages and inhibit the expression of inflammatory factors to a certain extent, in which IL-1 β has the greatest effect.

Key words Card9; *Aspergillus fumigatus*; macrophage; inflammatory factor; keratitis

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2020A0180); Provincial Graduate Academic Innovation Project of Anhui Provincial Department of Education (No. 2022xscx059); Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2023A20229); Provincial Graduate Education and Teaching Reform Research Project of Anhui Provincial Department of Education (No. 2022jyjxggj226); National Natural Science Foundation Incubation Plan of the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. 2019GQFY04); Science and Technology Nova Incubation Project of the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. 2018KA08); Outstanding Young Core Teachers Overseas Visiting Project for Colleges and Universities in Anhui Province (No. gxgwx2020024)

Corresponding author Qing Zhang, E-mail: zhangqing@ahmu.edu.cn

(上接第 445 页)

mice. Luxol Fast Blue myelin staining was employed to evaluate myelin sheath morphology in the prefrontal cortex, and immunofluorescence staining was utilized to quantify the protein expression levels of silencing information regulator (SIRT2), ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1), and interleukin-1 β (IL-1 β) in the prefrontal cortex. **Results** In the long-term experiment, the LPS group exhibited a significant reduction in shuttle times ($P < 0.05$), an increase in immobility time ($P < 0.01$), and a decrease in the number and length of myelin sheaths ($P < 0.05$) compared to the Con group. Compared to the LPS group, the depressive behaviors in the CBD, NCBD, and SER groups were significantly alleviated ($P < 0.01$), and the number and length of myelin sheaths increased ($P < 0.05$). In the short-term experiment, compared to the Con group, the LPS group exhibited significantly increased anxiety- and depression-like behaviors ($P < 0.05$), downregulated SIRT2 expression ($P < 0.01$), and upregulated Iba-1 and IL-1 β expression ($P < 0.01$). The CBD and NCBD groups demonstrated a reduction in anxiety and depression-like behaviors ($P < 0.05$), an increase in SIRT2 expression ($P < 0.01$), and a decrease in Iba-1 and IL-1 β expressions ($P < 0.05$) compared to the LPS group. **Conclusion** CBD and its nano-formulations effectively mitigate anxiety and depression-like behaviors in mice. The underlying mechanisms may be associated with the reversal of SIRT2 protein expression, demyelination changes, microglial activation, and the levels of inflammatory factors in the prefrontal cortex.

Key words depression-like behaviors; cannabidiol; silent information regulator 2; interleukin-1 β ; myelin sheath; nano-cannabidiol; ionized calcium binding adapter molecule-1

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82060650); Yunnan Provincial Youth Academic and Technical Leaders Training Program (No. 202405AC350045)

Corresponding authors Guo Ying, E-mail: guoying@kmmu.edu.cn.; Xie Jianping, E-mail: 26328188@qq.com