

抗炎调节物对人树突状细胞表型及致炎细胞因子分泌的影响

周同* 孙桂芝 张玉梅 赵亚鹏 张雁云¹ 张冬青¹ 陈楠

(上海交通大学医学院瑞金医院肾内科, 上海 200025; ¹上海交通大学医学院上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要 观察了抗 P-选择素凝集素-EGF 功能域单抗(PsL-EGFmAb)和 IL-10 两种抗炎物质对体外培养人树突状细胞(DC)表型以及致炎细胞因子 IL-12 分泌的影响, 并初步探讨其作用机制。通过 SCF、GM-CSF、TGF- β_1 、Flt-3L 和 TNF- α 体外培养体系, 从脐血 CD34⁺ 造血干细胞中诱导扩增获得 DC, 并于成熟过程中分别用 PsL-EGFmAb 和 IL-10 进行干预。采用流式细胞仪分析细胞表型 CD1a、CD11c、CD83、CD80、CD86 和 HLA-DR; 采用 RT-PCR 检测 IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 表达; 以及 ELISA 法测定 IL-12 p70 分泌的含量。结果显示, PsL-EGFmAb 和 IL-10 对 DC 表面 CD11c、CD83、CD80、CD86 表达均有抑制作用, 且 PsL-EGFmAb 可下调 HLA-DR 表达, 同时两者也能抑制 DC 内 IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 的转录和 IL-12 p70 的分泌。研究结果表明, PsL-EGFmAb 和 IL-10 对 DC 黏附共刺激分子表达和致炎细胞因子合成具有抑制作用, 由此可能影响和调抑 DC 成熟及其递呈抗原功能。

关键词 树突状细胞; 细胞表型; 白细胞介素-12; 抗 P-选择素凝集素-EGF 功能域单

树突状细胞(dendritic cell, DC) 是功能最强和唯一能诱导机体初始免疫应答的抗原递呈细胞, 其在自身免疫病等免疫相关性疾病的发生发展中起重要作用^[1,2]。作为免疫调节细胞, 其既有免疫激活作用, 也可诱导免疫耐受, 与其发育成熟状态密切相关^[3]。DC 在发育成熟过程中, 表面黏附分子和共刺激分子表达上调, 以及 IL-12 分泌增加, 这些均对其功能发挥起着至关重要的作用^[2]。未成熟 DC 可在黏附分子选择素以及趋化与细胞因子共同作用下, 由血循环迁移至炎症部位, 捕获与加工抗原并产生抗原递呈效应, 启动局部免疫炎症反应^[4,5]。故干预和调抑 DC 成熟或抗原递呈功能, 对免疫炎症性疾病防治具有重要意义^[6]。我们研究发现, 肾炎组织中可见大量 DC 分布, 其浸润积聚与 P-选择素炎性介导有关, 针对 P-选择素的单抗抑制可明显阻抑 DC 肾炎组织的黏附聚集^[7,8]。IL-10 也是目前公认的免疫炎症病理损伤中负调节因子, 在抑制 Th1 为主的细胞免疫中具有重要作用^[9]。为此我们在以往工作基础上, 进一步体外观察了抗 P-选择素凝集素-EGF 功能域单抗(anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody, PsL-EGFmAb)和 IL-10 这两种抗

炎调节物质对 DC 表型和 IL-12 分泌的影响, 拟为免疫炎症性疾病的防治进一步提供实验依据和新手段。

1 材料与方法

1.1 试剂

IMDM 购自 Gibco 公司, CD34 抗人磁珠标记抗体购自 Miltenvi Biotec 公司, 淋巴细胞分离液 Ficol1 购自上海生化试剂二厂, rhSCF、rhGM-CSF、rhTGF- β_1 、rhFlt-3L、rhTNF- α 、rhIL-10、rhIL-12 p70 ELISA 试剂盒均购自 Biosource 公司, FITC 标记的鼠抗人 CD83、CD86 单抗, PE 标记的鼠抗人 CD80 单抗, CY-CHROME 标记的鼠抗人 HLA-DR、CD1a 单抗均购自 BD 公司, PE 标记的鼠抗人 CD11c 单抗购自 Biosource 公司, 羊抗鼠 Ig-PE、Ig-FITC 和 Ig-CY 购自 SouthernBiotech 公司,

收稿日期: 2005-11-04 接受日期: 2005-12-12

国家自然科学基金(No.39970340, No.30570865, No.30471593)和上海市自然科学基金(No.02ZB14041, No.034119916)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-64370045, E-mail: zhoutong_cn@hotmail.com

RNA 抽提液 Trizol 购自 Invitrogen 公司, TaqE、dATP、dCTP、dGTP、dTTP, RT 试剂盒购自 Promega 公司, 抗人 P-选择素凝集素-EGF 功能域单抗(PsL-EGFmAb)由本科室自制^[10]。

1.2 细胞来源

脐血样品采自瑞金医院产科, 肝素抗凝终浓度为 10~20 IU/ml, 平均采血量为 30~50 ml, 样品在采集 2~6 h 内分选, 细胞经 PBE 缓冲液稀释, Ficoll 梯度离心, 收集界面层单个核细胞, PBE 洗涤备用。

1.3 DC 诱导分化

利用抗 CD34⁺ 吸附单克隆抗体-磁珠分离系统(MACS)从脐血单个核细胞中分离出 CD34⁺ 细胞, 用 20% IMDM 培养液调整其浓度为 0.5×10^6 个/ml, 接种于 24 孔板中, 分为 4 组。①未成熟组: 加 SCF (50 ng/ml)、GM-CSF (100 ng/ml)、TGF- β_1 (0.5 ng/ml)、Flt-3L (75 ng/ml) 培养至 7 天; ②成熟组: 在未成熟组培养基础上于第 12 天加入 TNF- α (100 ng/ml), 培养至 14 天; ③ PsL-EGFmAb 抑制组: 在未成熟组培养的基础上于第 7 天加入不同浓度的 PsL-EGFmAb (5, 10, 50, 100 μ g/ml), 且于收集前 48 h 加 TNF- α (100 ng/ml); ④ IL-10 抑制组: 在未成熟组培养的基础上于第 7 天加入不同浓度的 IL-10 (10, 50, 100, 200 ng/ml), 也于收集前 48 h 加 TNF- α (100 ng/ml)。未成熟组于第 7 天, 成熟组、PsL-EGFmAb 抑制组和 IL-10 抑制组于第 14 天分别收获细胞, 进行相关检测。

1.4 DC 形态及表型分析

倒置显微镜(Olympus 公司)及电镜下观察培养细胞的形态、数目和活力。另收集 0.5×10^6 个细胞, 分别加入上述荧光标记的细胞表型单抗各 20 μ l, 同时以羊抗鼠 Ig-R-PE、Ig-FITC 和 Ig-CY 抗体为同型对照, 进行常规步骤后, 用流式细胞仪检测细胞表型。

1.5 IL-12 p70 含量检测

收集各组 DC 培养上清液, 采用 ELISA 试剂盒按说明书检测 IL-12 p70 的含量。

1.6 IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 表达检测

1.6.1 引物设计 参考人 IL-12 p35、IL-12 p40 和 β 肌动蛋白基因序列, 应用 Primer Designer 3.0 软件设计引物。IL-12 p35 引物序列: 正链 5'-TCT CCA TTC CCC ATT CTC AG-3', 负链 5'-ATG TGG CAG AAT TTG CAT GA-3', 扩增产物长度为 200 bp; IL-12 p40 引物序列: 正链 5'-CAT GGG CCT TCA TGC TAT TT-3', 负链 5'-TGA TGT ACT TGC

AGC CTT GC-3', 扩增产物长度为 203 bp; β 肌动蛋白引物序列: 正链 5'-TGC TAT CCC TGT ACG CCT CT-3', 负链 5'-AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA -3', 扩增产物长度为 597 bp。引物由上海生物工程公司合成。

1.6.2 RT-PCR 分别收集各组细胞(1×10^6 个细胞), 总 RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明书进行。应用 RT 试剂盒进行 cDNA 第一链合成, Olig(dT) 为引物, RNA 样品 3.0 μ l, 总体积为 20 μ l。PCR 反应体系为: 5 μ l 10 \times RT 缓冲液, 2.5 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ l 25 mmol/L dNTP, 0.2 μ l 50 pmol/L IL-12 引物, 0.1 μ l 50 pmol/L β 肌动蛋白引物, 1 μ l cDNA, 0.25 μ l 1 U/ μ l TaqE, 反应总体积为 25 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 34 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭显色, 紫外灯下观察并用计算机图像分析系统扫描和分析。

1.7 数据处理

每组实验均重复 3 次, 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。各组间指标比较用方差分析或 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

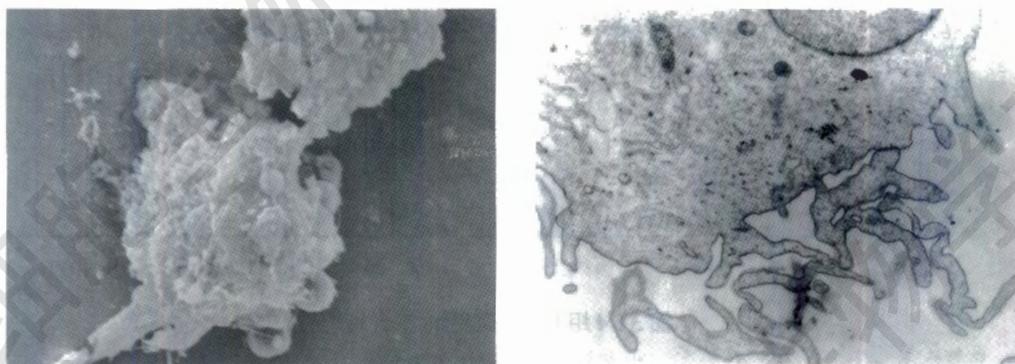
2 结果

2.1 DC 形态学及活力变化

倒置显微镜及电镜下观察可见, 人脐血 CD34⁺ 细胞经 GM-CSF、SCF、Flt-3L、TGF- β_1 联合诱导培养的第 5 天起, 细胞表面开始出现明显的树突状改变, 呈典型的 DC 形态特征, 并呈半悬浮状态生长, 但未成熟组、成熟组、PsL-EGFmAb 抑制组、IL-10 抑制组的 DC 形态无明显差异(图 1)。此外发现, 4 组 DC 分别于培养第 7 天后数目增加最为明显, 至第 14 天可增加到细胞培养起始的 12 倍; 另经台盼蓝染色的细胞活力判断, 4 组 DC 活细胞均大于 90%, 且 4 组之间 DC 活力以及扩增数目无显著不同。

2.2 DC 表型变化

流式细胞仪分析发现, 未成熟组 DC 低表达 CD1a、CD11c、CD83、CD80、CD86, 呈现未成熟 DC 的表型; 成熟组经 TNF- α 诱导培养后细胞表面 CD11c、CD83、CD80、CD86 的表达明显增高($P < 0.05$), 此外 CD1a 较未成熟组亦有增高, 表



扫描电镜 (3 000×)

透射电镜 (15 000×)

图 1 成熟组第 14 天培养 DC 形态

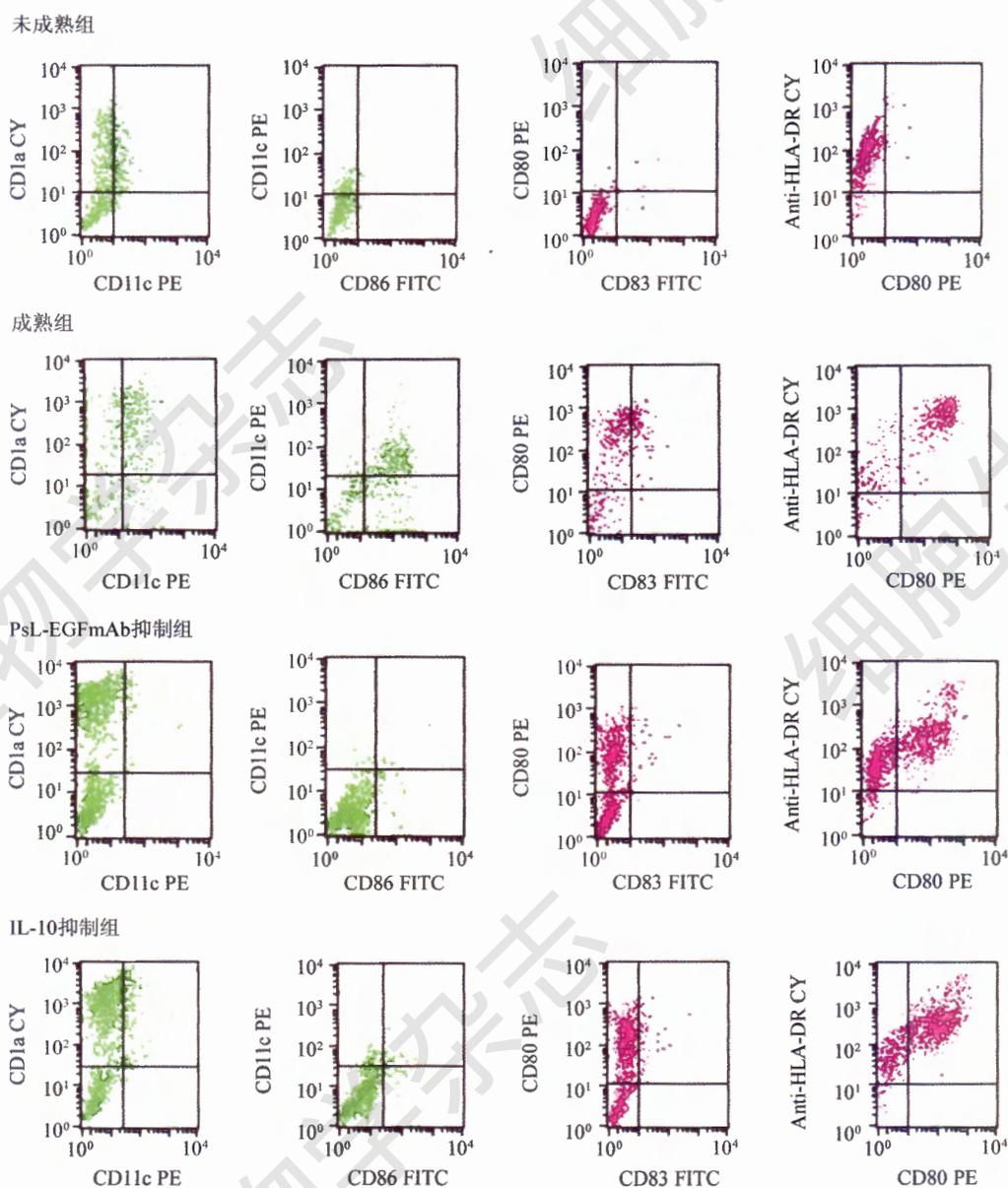


图 2 4 组 DC 表面标志的 FACS 分析结果

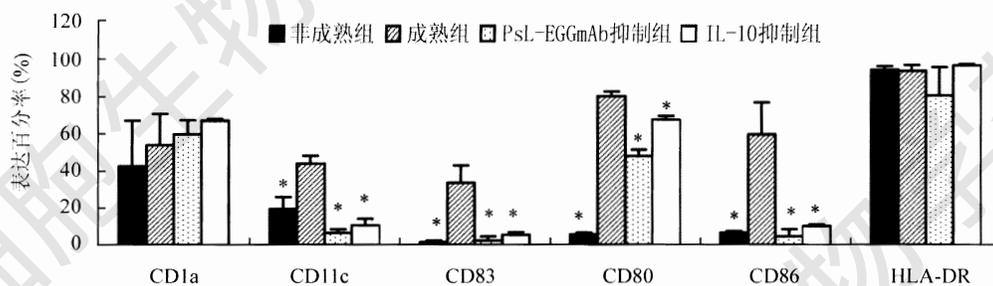


图3 4组DC表型变化($\bar{x} \pm s$)
与成熟组比较, * $P < 0.05$ 。

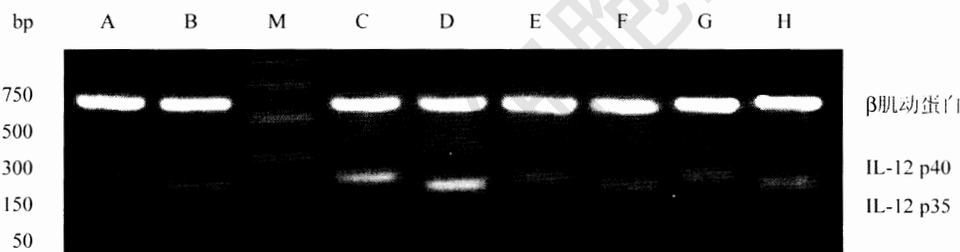


图4 DC IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 表达

A、B: 未成熟组; M: marker; C、D: 成熟组; E、F: PsL-EGFmAb 抑制组; G、H: IL-10 抑制组。

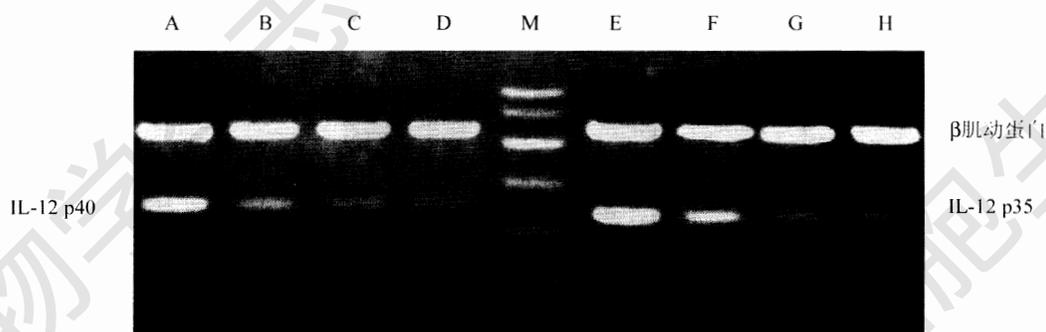


图5 不同浓度PsL-EGFmAb对DC IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA表达的影响

A、E: 5 $\mu\text{g/ml}$ PsL-EGFmAb; B、F: 10 $\mu\text{g/ml}$ PsL-EGFmAb; C、G: 50 $\mu\text{g/ml}$ PsL-EGFmAb; D、H: 100 $\mu\text{g/ml}$ PsL-EGFmAb; M: marker。

表1 DC IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 转录水平检测结果
(IL-12 p35、IL-12 p40/ β 肌动蛋白, $\bar{x} \pm s$)

	IL-12 p35 mRNA	IL-12 p40 mRNA
未成熟组	0.1226 \pm 0.0752*	0.0899 \pm 0.0479*
成熟组	0.3761 \pm 0.1642	0.2889 \pm 0.1520
PsL-EGFmAb 抑制组	0.1651 \pm 0.1020*	0.0942 \pm 0.0659*
IL-10 抑制组	0.1649 \pm 0.1108*	0.1091 \pm 0.1062*

与成熟组比较, * $P < 0.05$ 。

现为特征性的成熟DC表型;两个抑制组DC的CD11c、CD83、CD80、CD86表达较成熟组明显减低($P < 0.05$),且PsL-EGFmAb抑制组HLA-DR表达也低于成熟组DC(图2、图3)。

2.3 DC IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 表达变化

经观察,用PsL-EGFmAb和IL-10处理后,DC细胞内的IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA表达受到抑制($P < 0.05$)(图4,表1)。且不同剂量PsL-EGFmAb对DC IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA表达的抑制作用呈剂量依赖关系(图5)。

2.4 DC IL-12 p70 分泌变化

ELISA检测结果显示,未成熟组DC培养上清液中检测到极微量的IL-12 p70(0.42 ± 0.04) $\mu\text{g/ml}$;成熟组DC的IL-12 p70含量(364.75 ± 22.81) $\mu\text{g/ml}$ 明显增高($P < 0.01$);而PsL-EGFmAb抑制组DC的IL-12 p70含量(10.95 ± 9.76) $\mu\text{g/ml}$,和IL-10抑制组IL-12

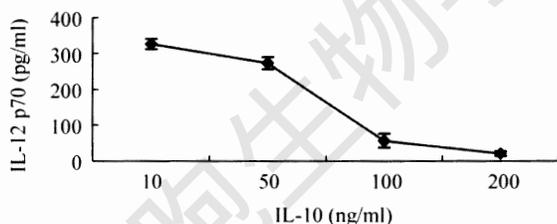


图6 不同浓度 IL-10 对 DC IL-12 p70 分泌的影响($\bar{x} \pm s$)

p70 含量(168.66 ± 140.14) pg/ml 均明显低于成熟组($P < 0.01$)。进一步发现, 不同剂量 IL-10 对 DC IL-12 p70 分泌的抑制作用呈剂量依赖关系(图 6)。

3 讨论

DC 是一类形态、结构和功能异质性的专职抗原递呈细胞, 能够启动和维持组织器官的免疫炎症反应, 是免疫应答强有力的启动者和参与者^[1-3,11], 其免疫调节作用与发育成熟状况密切相关^[3]。随着近年对 DC 及其在免疫炎症反应及多种相关疾病中作用的重视, 对于 DC 炎症组织溢出/迁移中伴随着由未成熟向成熟细胞分化, 拟或由炎症细胞向抗原递呈细胞转化等机制, 以及对之的干预和调抑拟用于免疫炎症性疾病的防治, 也已引起人们关注^[4,12]。已发现未成熟 DC 炎症组织迁移主要依赖黏附分子选择素介导^[4]。前者可在黏附分子、趋化和细胞因子共同作用下, 于迁移同时摄取和处理抗原并发育为成熟 DC, 递呈外来或自身抗原并激活于 T 细胞, 启动或维持免疫炎症反应^[4,5]。然而 DC 过度的迁移成熟及递呈抗原功能上调, 则是免疫炎症反应和免疫调节机制失调和紊乱的关键因素。

黏附分子 P-选择素是炎症早期介导 DC 等白细胞黏附级联反应的重要分子和初始基础^[13], 其分子结构中的凝集素和表皮生长因子共同区域, 是 P-、E-、L-选择素 3 种成分识别黏附的功能结构域^[14], 针对该功能域的抗 P-选择素单抗不仅具有良好的靶向抗黏附/抗炎效应, 且发现对免疫细胞功能也具有调节作用^[15]。结合我们研究发现, 肾炎时伴随着 P-选择素以肾小管上皮细胞为主表达上调, DC 则以肾小管间质为主分布聚集增多, 出现了明显的小管间质损害及肾功能改变。利用单抗抑制 P-选择素, 对此可显著抑制 DC 肾内浸润及改善病理损伤与肾功能^[7,8]。目前已知, DC 成熟后可分泌 IL-12, 而后者是诱导 T 细胞向 Th1 分化的关键炎症细胞因子, 并可能在 Th1 型为主免疫反应的调节中起关键作用。资料显示, 以 IL-12 为主的 Th1 型免疫反应

是诱发或参与肾脏疾病的关键因素^[16-19]。IL-10 作为重要抗炎因子, 其在病理情况下肾脏分布主要位于病变肾小球及小管间质部位^[20], 并可能在抑制炎症反应中起重要作用。为进一步探讨, 本研究在首先获得 PsL-EGFmAb 基础上^[10], 利用人脐血 CD34⁺细胞来源的 DC, 体外观察了 PsL-EGFmAb 和 IL-10 对 DC 黏附共刺激分子表型和炎症细胞因子 IL-12 分泌的影响。

本研究结果显示, 细胞培养的 5 至 7 天, 形态学上虽已出现典型的 DC 形态, 但细胞表面 CD1a、CD11c、CD83、CD80 及 CD86 低表达, 且 IL-12 的分泌水平亦低, 表现为未成熟 DC 特征。经炎症因子 TNF- α 刺激诱导后, 细胞表面黏附共刺激分子表达明显增强, 表现出特征性成熟 DC 的表型; 此外细胞内 IL-12 两个单体即 IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 明显表达, 且培养上清液中其具生物活性异二聚体的 IL-12 p70 含量也明显增高。已知许多抗原递呈细胞可以产生 IL-12, 但 DC 是 IL-12 产生的主要细胞, 且认为 DC 必须发育到一定程度才能产生 IL-12, 我们的实验结果亦与此相符合。本研究进一步发现, 在 TNF- α 作用的炎性状态下, 经过 PsL-EGFmAb 和 IL-10 处理后的 DC 其形态和细胞活力均无明显变化, 但其 CD11c、CD83、CD80、CD86 的表达较成熟组明显减低, 且细胞内 IL-12 p35、IL-12 p40 mRNA 的表达显著减少, 两组培养上清液中 IL-12 p70 的含量也明显低于成熟组。此外, PsL-EGFmAb 和 IL-10 对 IL-12 表达分泌的抑制作用呈剂量依赖关系。表明 PsL-EGFmAb 和 IL-10 对 DC 黏附共刺激分子表达和致炎细胞因子合成具有调抑作用。对此分析推测, 两种药物可能通过抑制 DC 表面黏附共刺激分子表达, 进而抑制 DC 的抗原递呈功能, 并相应使 T 细胞缺乏必需的第二信号而不能被充分活化, 以此可调节 DC 诱发的 T 细胞免疫应答。与此同时, 两种药物可在基因转录和翻译水平上调抑 DC 的 IL-12 分泌, 相应可阻抑初始 CD4⁺ T 细胞过多分化为 Th1 细胞, 从另一个方面调节了机体的细胞免疫反应。至于两种药物通过何种途径和机制影响 DC 黏附共刺激分子及炎症细胞因子合成尚不清楚。推测它们抑制由 TNF- α 诱导的 DC 活化成熟, 可能与抑制 DC 内与 NF- κ B 相关信号途径有关, 且 PsL-EGFmAb 的作用靶点可能是与选择素同属 C 型凝集素家族, 参与免疫炎症反应的 DC 模式识别受体 DC-SIGN/CD209^[20] (待发表资料)。有待作进一步探讨。此外, 研究表明 IL-10 过多产生则

与活动性和 / 或进行性肾小球及小管间质损伤有关^[21], 这可能与此时 IL-10 抑制细胞免疫, 促进抗体形成及体液免疫有关, 进而对机体产生不利的影 响。PsL-EGFmAb 对体外培养 DC 的抑制作用与 IL-10 相类似, 但前者具有良好的靶向抗黏附 / 抗炎效 应, 可能在抑制细胞免疫及炎症反应的同时对体液 免疫的影响较小, 故更具有安全性。因此, 利用 抗黏附干预手段来调节 DC 成熟和抗原递呈功能, 这 可能不失为一个防治免疫炎症性疾病新的思路和途 径。但如何进行合适的免疫干预, 尚有待进一步研 究。

参考文献 (References)

- [1] von Bubnoff D *et al.* *J Allergy Clin Immunol*, 2001, **108**: 329
- [2] Lipscomb MF *et al.* *Physiol Rev*, 2002, **82**: 97
- [3] Steinman RM *et al.* *Ann. NY Acad Sci*, 2003, **987**: 15
- [4] Pendl GG *et al.* *Blood*, 2002, **99**: 946
- [5] Sanchez-Sanchez N *et al.* *Blood*, 2004, **104**: 619
- [6] 孙桂芝等. *上海免疫学杂志*, 2003, **23**: 425
- [7] 周 同等. *上海第二医科大学学报*, 2004, **24**: 501
- [8] 孙桂芝等. *上海第二医科大学学报*, 2004, **24**: 174
- [9] Choi YK *et al.* *Gene Ther*, 2003, **10**: 559
- [10] 周 同等. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35**: 172
- [11] Banachereau J *et al.* *Annu Rev Immunol*, 2000, **18**: 767
- [12] 刘 巍等. *生命科学*, 2002, **14**: 379
- [13] Ogawa D *et al.* *Clin Exp Immunol*, 2002, **129**: 43
- [14] Mcever RP. Selectin. In: Beckerle MC (ed.) *Cell Adhesion*, Oxford: Oxford University Press, 2001, 30
- [15] 周 同等. *上海第二医科大学学报*, 2004, **24**: 518
- [16] Macdougall IC *et al.* *Nephrol Dial Transplant*, 2002, **17**(Suppl 1): 48
- [17] Kitching AR *et al.* *Eur J Immunol*, 1999, **29**: 1
- [18] Timoshanko JR *et al.* *J Am Soc Nephrol*, 2001, **12**: 464
- [19] Uhm WS *et al.* *Rheumatology (Oxford)*, 2003, **42**: 935
- [20] Geijtenbeek TB *et al.* *Cell*, 2000, **100**: 575
- [21] Niemir ZI *et al.* *Am J Kidney Dis*, 1998, **32**: 80

The Influence of Anti-inflammatory Agents upon the Phenotype and Proinflammatory Cytokine Secretion of Cultured Human Dendritic Cells

Tong Zhou*, Gui-Zhi Sun, Yu-Mei Zhang, Ya-Peng Zhao, Yan-Yun Zhang¹, Dong-Qing Zhang¹, Nan Chen
(Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China;
¹Shanghai Institute of Immunology, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract To observe the influence of anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody (PsL-EGFmAb) and interleukin-10 (IL-10) upon the morphologic features of cultured human dendritic cells (DCs), as well as IL-12 secretion. Cord blood CD34⁺ stem cells were isolated and cultured in 20% IMDM medium with SCF, GM-CSF, TGF- β_1 , Flt-3L, TNF- α . DCs were interfered by PsL-EGFmAb and IL-10. HLA-DR, CD1a, CD11c, CD83, CD80 and CD86 was assayed by flow cytometry. IL-12 p35, IL-12 p40 mRNA was detected by RT-PCR, IL-12 p70 secreted in culture medium was detected by ELISA. The expression of CD11c, CD83, CD80, CD86 was lower in PsL-EGFmAb and IL-10 groups than mature DCs group, and HLA-DR was lower in PsL-EGFmAb group compared with mature group. The mRNA level of IL-12 p35, IL-12 p40 and the secretion of IL-12 p70 was suppressed with PsL-EGFmAb or IL-10 treated, respectively. It showed PsL-EGFmAb and IL-10 might inhibit the expression of adhesion and co-stimulation molecules, and inhibit the secretion of proinflammatory cytokine. PsL-EGFmAb and IL-10 might adjust the antigen presenting function of DCs.

Key words dendritic cells; phenotype; interleukin-12; anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody; interleukin-10

Received: November 4, 2005 Accepted: December 12, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.39970340, No.30570865, No.30471593) and Natural Science Foundation of Shanghai (No.02ZB14041, No.034119916)

*Corresponding author. Tel: 86-21-64370045, E-mail: zhoutong_cn@hotmail.com