

复方甘草片水提物对细菌脂多糖诱导 树突细胞成熟的影响

罗娇娇 阿地拉·艾皮热 李金玉 袁鹏飞 张富春 李金耀*
(新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要 树突细胞(dendritic cell, DC)是专职的抗原递呈细胞,其成熟状态决定了免疫反应的强度及类型。复方甘草片具有镇咳祛痰的作用,但其对DC成熟的影响尚无报道。该研究探讨了复方甘草片水提物(compound liguoric tablets water extract, CLTE)对小鼠骨髓来源DC成熟、细胞因子表达的影响以及细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激DC成熟的影响。采用流式细胞术、ELISA分别对DC表面标志物的表达、细胞因子分泌进行了检测。结果发现,0.4 mg/mL CLTE减少了门控细胞的比例,但增加了DC的比例。CLTE在低于0.4 mg/mL浓度范围内剂量依赖性地抑制了DC的成熟,并抑制了LPS诱导的DC的成熟。CLTE没有显著改变DC分泌的细胞因子水平,但显著抑制了LPS诱导的IL-12p40和IL-6的表达。这些结果表明,CLTE抑制了DC的成熟,并且抑制了LPS诱导的DC的成熟及炎症细胞因子的表达,说明复方甘草片可能通过调节DC的成熟状态减轻了气道的反应,从而达到镇咳祛痰的作用。

关键词 树突细胞; 复方甘草片; 表面标志物; 白介素-12p40; 白介素-6; 脂多糖

The Effect of Compound Liguoric Tablets Water Extract on Maturation of Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cells

Luo Jiaojiao, Adila Aipire, Li Jinyu, Yuan Pengfei, Zhang Fuchun, Li Jinyao*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract Dendritic cell (DC) is professional antigen-presenting cell and links the innate and adaptive immune system. The strength and subtype of adaptive immune responses are dependent on the activated status of DC. Compound liguoric tablets (CLT) have been used to alleviate cough and phlegm. However, the effect of CLT on the maturation of DC need to be investigated. Here, we explored the effect of CLT water extract (CLTE) on the maturation and cytokine production of bone marrow-derived DC in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS). The levels of surface markers and the secretion of cytokines were detected by flow cytometry and ELISA, respectively. We found that 0.4 mg/mL CLTE decreased the proportion of gated cells, but increased the proportion of DCs in the gated cells. CLTE below 0.4 mg/mL concentrations inhibited the maturation of DC in a dose-dependent manner, especially LPS-induced DC maturation. CLTE did not change the secretion of cytokines in the absence of LPS, but significantly reduced the production of IL-12p40 and IL-6 induced by LPS. These results

收稿日期: 2015-08-28 接受日期: 2015-12-11

国家自然科学基金(批准号: 31460241)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0991-8583259, E-mail: ljyxju@xju.edu.cn

Received: August 28, 2015 Accepted: December 11, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31460241)

*Corresponding author. Tel: +86-991-8583259, E-mail: ljyxju@xju.edu.cn

网络出版时间: 2016-01-11 10:36:35 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160111.1036.002.html>

suggested that CLT might exert the effect on the cough and phlegm via regulation the maturation of DC to reduce the airway inflammatory responses.

Keywords dendritic cell; compound liguoric tablets; surface marker; IL-12p40; IL-6; LPS

树突细胞(dendritic cell, DC)作为专职的抗原递呈细胞, 分布于机体的外周, 可以感知“危险信号(danger signals)”, 连接固有免疫系统和获得性免疫系统^[1]。DC可以通过表面或胞内受体如Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)识别“危险信号”, 提高表面共刺激分子(如CD40、CD80、CD86)、主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子以及促炎细胞因子(如IL-12、IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的表达, 刺激DC的成熟^[2-3]。DC可以识别、捕获和加工抗原, 并迁移到二级淋巴器官, 将抗原递呈给naïve T细胞, 激活获得性免疫反应。在抗原递呈过程中, DC向T细胞提供3种信号, 信号1为MHC-多肽复合物与T细胞受体(T cell receptor, TCR)相互结合, 信号2为共刺激分子之间的相互作用, 信号3为DC表达的细胞因子, 这3种信号决定了抗原特异性T细胞的激活、增殖和分化成不同类型的免疫反应^[2]。不成熟DC分布于机体外周组织, 具有很强的抗原吞噬能力, 在感受“危险信号”后成为成熟的DC, 成熟DC表达趋化因子受体而获得迁移到淋巴结的能力, 把抗原呈递给naïve T细胞, 激活抗原特异性的免疫反应^[4]。

中草药已经有几千年的应用历史, 对肿瘤、感染、自身免疫疾病等多种人类疾病具有预防和治疗作用。近年来的研究表明, 中草药及其有效成分对免疫系统具有调节作用, 包括固有免疫系统和获得性免疫系统^[5-7]。我们的研究表明, 阿魏菇水提物通过TLR4信号通路促进了DC的成熟, 增强了DC刺激CD8⁺T细胞增殖的能力和抗原递呈能力^[8]。复方甘草片是临床应用较广的祛痰镇咳药, 其主要成分为甘草浸膏, 甘草浸膏的主要活性成分为甘草酸^[9]。研究表明, 甘草酸能够抑制鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的气道阻力和嗜酸性粒细胞的增加, 降低了支气管肺泡灌洗液中IL-4、IL-5和IL-13的水平, 减轻了肺部和气道组织中嗜酸性粒细胞的浸润, 显著增加了CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)的数量^[10]。哮喘为慢性气道炎症反应, 肺部DC在调控获得性免疫反应, 保护肺部免受损害或避免产生过敏性气道炎症反应方面起着关键作用^[11]。不成熟DC可以诱导naïve T细胞成为Tregs, 而Tregs在

抑制过敏性炎症反应方面起着重要的作用^[12]。因此, 复方甘草片对DC的调节作用需要进一步的研究, 初步揭示复方甘草片的作用机理。本文对复方甘草片水提物(compound liguoric tablets water extract, CLTE)的多糖含量进行了测定, 并以不同浓度的CLTE对骨髓来源树突细胞(bone marrow-derived DC, BM-DC)进行处理, 检测CLTE对DC成熟的影响以及对LPS诱导的DC成熟的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

7周龄的C57BL/6小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于新疆大学标准的温控和光控动物饲养室, 并按照相关动物管理条例进行饲养, 实验过程严格遵循动物伦理相关规定。

RPMI-1640培养基、胎牛血清、DPBS及DMSO购于Gibco公司。GM-CSF购于Peprotech公司。IL-1 β 、IL-6、IL-12p40及TNF- α ELISA试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。FITC-CD80、PE-CD11c、APC-CD40、FITC-CD86、PE-MHC II及APC-CD11c购于BD Biosciences公司。

1.2 复方甘草片水提物的制备

配制100 mg/mL复方甘草片(国药集团新疆制药有限公司), 60 °C水浴2 h, 3 500 r/min离心10 min, 上清用0.22 μ m的滤器过滤除菌, 蒽酮硫酸法测定多糖含量, 分装, -20 °C保存, 使用时根据多糖含量稀释为10 mg/mL。

1.3 骨髓来源树突细胞的诱导培养

C57BL/6小鼠麻醉后, 颈椎脱臼处死, 放入酒精浸泡, 无菌取小鼠股骨和胫骨, 去掉肌肉组织, 75%酒精中浸泡3 min, 取出置于DPBS中洗3次, 将大腿骨与小腿骨从关节处分离, 用镊子夹住腿骨, 用剪刀剪去腿骨两端, 1 mL注射器吸取培养基, 从一端冲洗腿骨, 每根腿骨大约冲洗3~4次。将收集的骨髓用吸管或注射器反复吹打, 得到细胞悬液, 然后收集到15 mL离心管中, 1 200 r/min离心7 min, 弃上清, 重悬于RPMI-1640培养基(含有10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素、20 ng/mL GM-CSF)。放置于

37 °C、5% CO₂培养箱中培养。第3 d, 轻轻除去非贴壁细胞并加入新鲜培养液, 每隔一天补充一次新鲜培养液。第7 d, 用不同浓度CTLE(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL)处理DC, 或与20 ng/mL细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)联合(CLTE+LPS)处理DC。

1.4 流式细胞术检测DC表型

CLTE或CLTE+LPS处理细胞12 h后, 收集细胞, 1 200 r/min离心7 min, 收集上清检测细胞因子, 将细胞用含0.5% FBS的PBS洗涤, 对细胞状态进行分析。用APC-CD11c抗体对BM-DCs进行染色15 min。DC共刺激分子表达分析: 用PE-CD11c抗体、APC-CD40抗体和FITC-CD80抗体或用APC-CD11c抗体、PE-MHC II抗体和FITC-CD86抗体进行染色15 min, 加入10 mL PBS, 1 200 r/min离心7 min, 收集细胞, 然后用250 μL PBS悬细胞后铜网过滤。FACSCalibur流式细胞仪(BD Biosciences)进行检测, 采用FlowJo软件进行数据分析。

1.5 ELISA检测DC培养上清中细胞因子水平

将上述收集的DC培养上清, 用ELISA试剂盒

检测IL-1 β 、IL-6、IL-12p40及TNF- α 的含量, 根据ELISA试剂盒的操作步骤进行检测。反应终止后, 用酶标仪(Bio-Rad)检测450 nm吸光度(D_{450}), 以试剂盒提供的标准品进行标准曲线制备, 根据标准曲线计算出相应细胞因子的浓度。

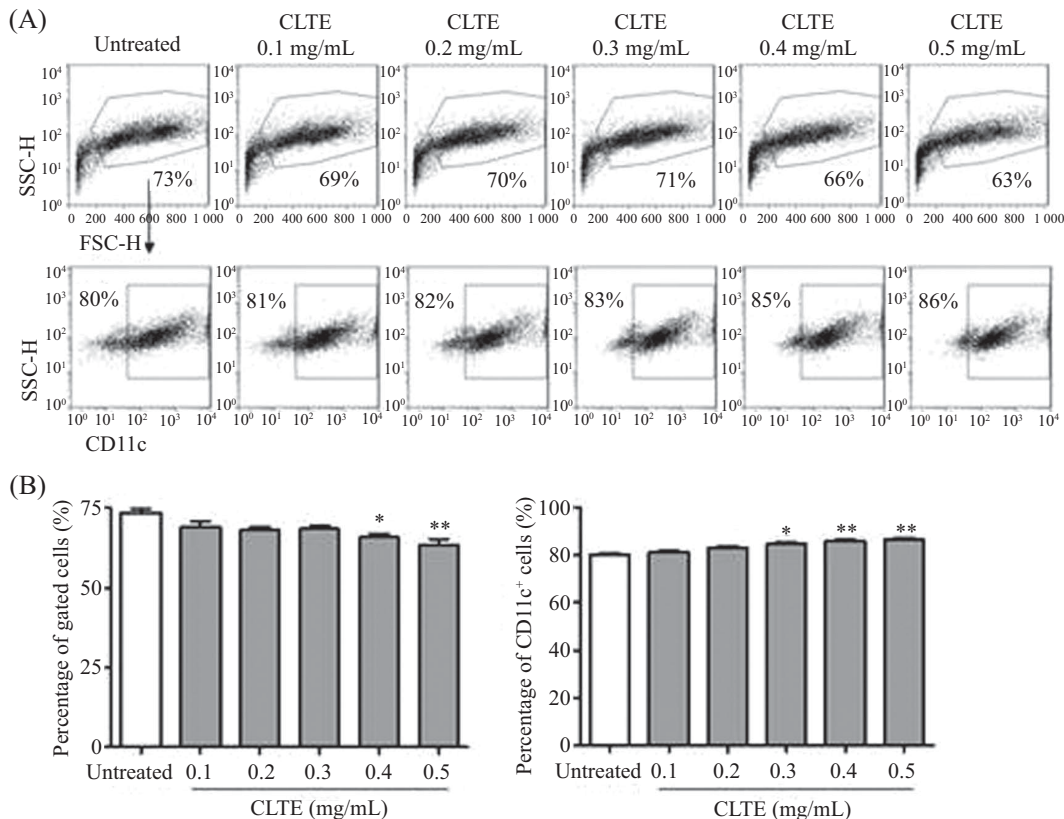
1.6 统计学分析

实验数据采用统计软件GraphPad Prism 5进行分析。实验数据采用One-Way ANOVA对处理组与对照组进行分析, 以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 复方甘草片水提物对CD11c⁺细胞比例的影响

为了检测CLTE对CD11c⁺细胞比例的影响, 用含不同多糖浓度的CLTE处理DCs, 12 h后采用APC-CD11c抗体进行染色, 流式细胞术进行分析。收集的细胞按照图1所示策略进行门控。首先用Side Scatter(SSC)和Forward Scatter(FSC)进行门控, 然后在该群细胞内对CD11c⁺细胞进行门控, 分析CLTE对诱导培养的骨髓细胞及CD11c⁺细胞比例的影响。结果



A: 诱导培养的骨髓细胞和CD11c⁺细胞的门控策略; B: 诱导培养的骨髓细胞和DC百分比统计数据($n=6$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与未处理组比较。
A: the gating strategy for bone marrow cells and CD11c⁺ cells; B: the data summary for the percentage of bone marrow cells and CD11c⁺ cells ($n=6$).
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untreated group.

图1 CLTE对CD11c⁺细胞比例的影响

Fig.1 Effects of CLTE on the percentage of CD11c⁺ cells

显示, 0.1 mg/mL及0.2 mg/mL CLTE对门控细胞及门控细胞内CD11c⁺细胞的比例均无显著影响。0.3 mg/mL CLTE对门控细胞比例也无显著影响, 但增加了门控细胞内CD11c⁺细胞的比例。0.4 mg/mL及0.5 mg/mL CLTE处理组与对照组(0 mg/mL)相比减少了门控细胞的比例, 但增加了门控细胞内CD11c⁺细胞的比例(图1)。后续实验我们选择了不影响门控细胞比例的CLTE浓度进行研究。

2.2 CLTE对DC成熟及细胞因子表达的影响

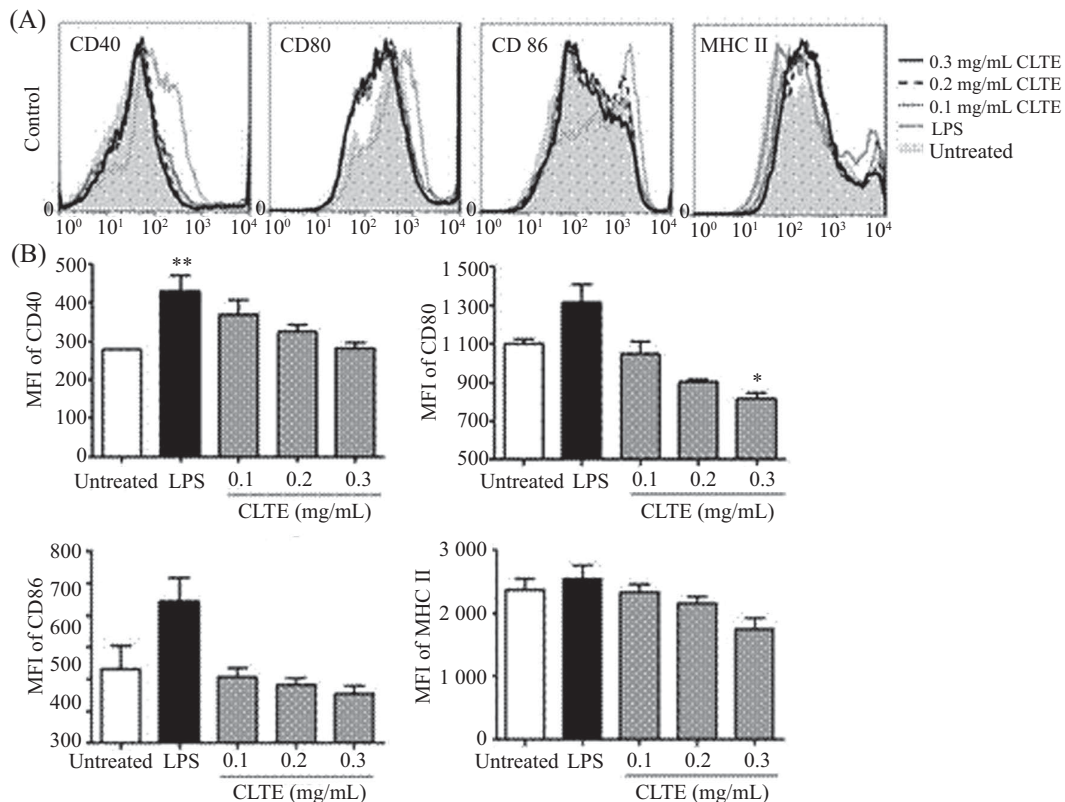
DC的成熟状态及其分泌的细胞因子种类和水平决定了免疫反应的类型和强度。哮喘为慢性气道炎症反应, DC在炎症反应中起着重要作用, 不成熟DC通过诱导Tregs, 从而抑制过敏性炎症反应。为了检测CLTE对DC成熟的影响, 我们用不同浓度的CLTE(0、0.1、0.2、0.3 mg/mL)对DC进行处理, 12 h后, 收集细胞, 用相应的荧光标记的抗体进行染色, 流式细胞术检测共刺激分子(CD40、CD80及CD86)及MHC II水平。结果显示, LPS增强了DC的成熟, 显

著增加了CD40及CD86的水平, 对CD80及MHC II的水平也有一定的增强作用。CLTE对DC表面CD40及CD86的水平没有显著影响, 但是剂量依赖性地抑制了CD80及MHC II的水平, 抑制了DC的成熟(图2)。

我们进一步检测了CLTE对DC细胞因子表达的影响, 收集上述处理后DC的培养上清, 采用ELISA检测IL-1 β 、IL-6、IL-12p40及TNF- α (tumor necrosis factor- α)的蛋白质水平。结果表明, 阳性对照LPS显著增强了IL-1 β 、IL-6、IL-12p40及TNF- α 的水平(图3), 促进了DC的成熟; 但CLTE没有增强这些细胞因子的表达, 进一步说明CLTE没有促进DC成熟。结合CLTE对DC表面分子表达的影响, 结果表明, CLTE一定程度上抑制了未处理DC的成熟。

2.3 CLTE抑制LPS诱导的DC的成熟

越来越多的证据显示, 中草药可以通过调节DC的成熟状态来调控Th1/Th2的平衡及过激性免疫反应^[7]。我们用LPS刺激模拟处于炎症反应的DC, 检测了CLTE对LPS诱导的DC成熟的影响, 采用LPS

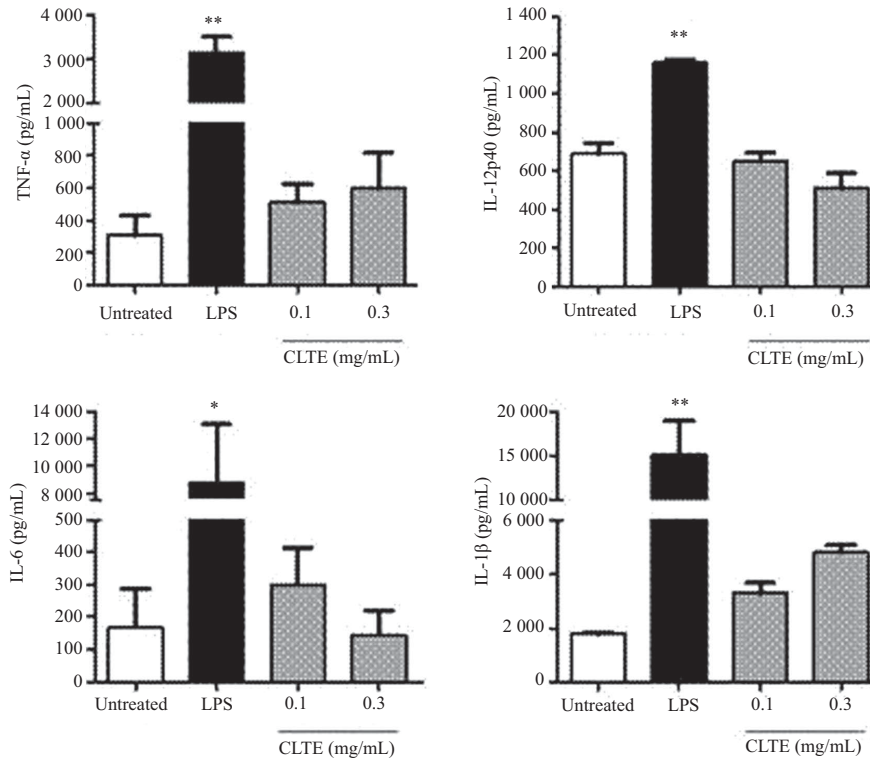


A: DC表面共刺激分子及MHC II的水平; B: 共刺激分子及MHC II平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)统计数据($n=3$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与未处理组比较。

A: the levels of co-stimulatory molecules and MHC II on DC; B: MFI of co-stimulatory molecules and MHC II ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs untreated group.

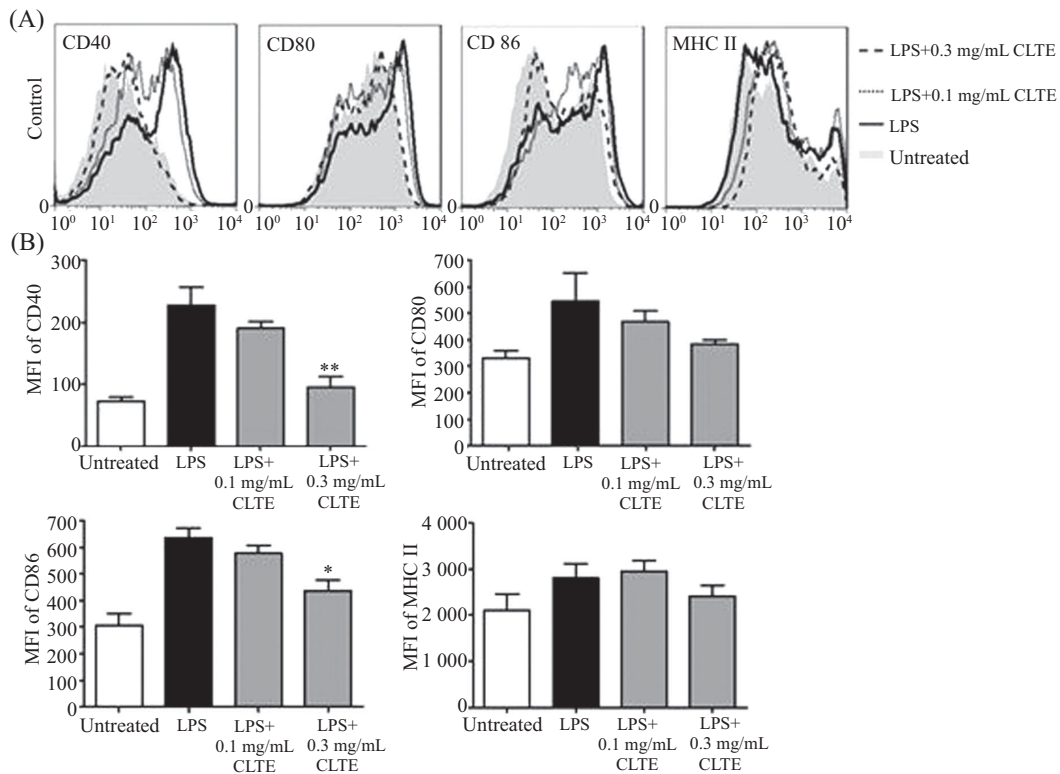
图2 CLTE对DC成熟的影响

Fig.2 Effects of CLTE on the maturation of DC



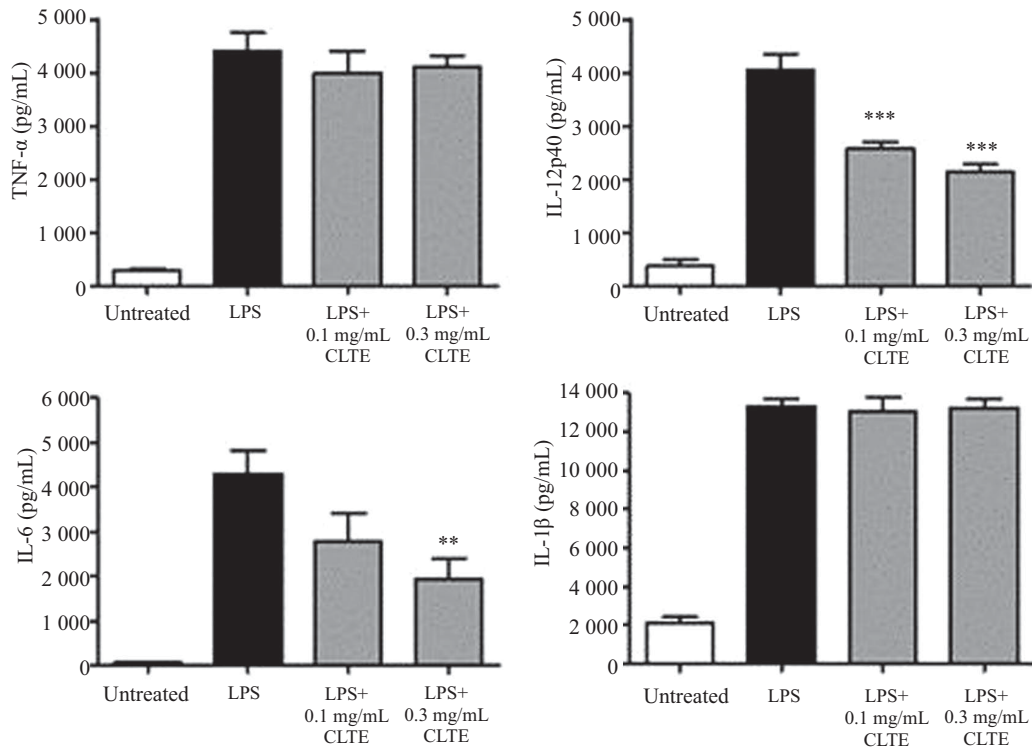
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与未处理组比较。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untreated group.

图3 CLTE对DC细胞因子表达的影响
 Fig.3 Effects of CLTE on the expressions of cytokines of DC



A: DC表面共刺激分子及MHC II的水平; B: 共刺激分子及MHC II平均荧光强度(MFI)统计数据($n=3$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与LPS处理组比较。
 A: the levels of co-stimulatory molecules and MHC II on DC; B: MFI of co-stimulatory molecules and MHC II ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS group.

图4 CLTE对LPS诱导的DC成熟的影响
 Fig.4 Effects of CLTE on the maturation of LPS-induced DC



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与LPS处理组比较。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs LPS group.

图5 CLTE对LPS诱导的DC细胞因子表达的影响

Fig.5 Effects of CLTE on LPS-induced cytokine production of DC

单独处理, LPS+0.1 mg/mL CLTE及LPS+0.3 mg/mL CLTE处理DC, 12 h后检测DC表面分子水平及细胞因子水平。如图4所示, 0.3 mg/mL CLTE显著下调了LPS诱导的CD40及CD86的水平, 对LPS诱导的CD80及MHC II的水平也有一定的下调作用。

我们进一步检测了CLTE是否能够下调LPS诱导的炎症细胞因子的水平, 收集上述处理DC的培养上清, 通过ELISA试剂盒检测细胞因子水平。如图5所示, CLTE显著下调了LPS诱导的IL-12p40和IL-6的水平, 对LPS诱导的TNF- α 的水平也有一定的下调作用, 但没有下调LPS诱导的IL-1 β 水平。结果显示, CLTE可以抑制DC的成熟, 并显著下调了LPS诱导的DC的成熟及炎症细胞因子的水平。

3 讨论

DC的成熟状态决定了获得性免疫反应的性质, 如免疫反应的强度及类型^[13]。DC的成熟伴随着共刺激分子(如CD40、CD80、CD86)、MHC分子及细胞因子(如IL-12、IL-1 β 、IL-6、TNF- α)水平的上调及抗原递呈能力的增加。哮喘是一种高发的慢性炎症疾病, 与气道高反应有关, 常常导致呼吸

困难、胸闷、咳嗽等症状^[14-15]。很多中草药可以减轻哮喘的气道高反应, 抑制炎症细胞对肺部的浸润, 抑制炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)的表达等, 从而对哮喘具有一定的治疗效果^[16-19]。甘草是一种常用的治疗哮喘的中草药, 常与其他中草药联合使用。研究证明, 甘草提取物对免疫系统具有调节作用^[20], 可能是治疗哮喘的作用机理之一。甘草素通过抑制LPS激活的巨噬细胞(RAW264.7)中的TLR4信号通路, 减少了炎症因子IL-6和TNF- α 的表达, 同时可以抑制小鼠体内LPS诱导的TNF- α 的表达^[21]。甘草查耳酮A具有抗炎功能, 能够显著降低LPS诱导的TNF- α 、IL-6及IL-1 β 的水平, 减轻LPS诱导的急性肺部损伤, 减少炎症细胞的浸润, 这些作用是通过抑制NF- κ B(nuclear factor kappa B)的活性及p38/ERK(extracellular regulated protein kinase) MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号通路实现的^[22]。复方甘草片的主要成分为甘草浸膏, 我们发现, 复方甘草片水提物显著下调了DC表面CD80及MHC II的水平, 抑制了DC的成熟, 尤其是LPS诱导的DC的成熟, 同时显著下调了LPS诱导的IL-12p40及IL-6的水平, 对LPS诱导的TNF- α 的表达也有一定的

抑制作用, 该结果与之前的研究结果相似, 说明复方甘草片的部分药效可能与其对DC的调节作用相关。后续实验需要对复方甘草片通过何种机制抑制LPS诱导的DC的成熟以及是否通过抑制炎症反应达到部分药效进行深入研究。

参考文献 (References)

- Duluc D, Gannevat J, Joo HM, Ni L, Upchurch K, Boreham M, *et al.* Dendritic cells and vaccine design for sexually-transmitted diseases. *Microb Pathog* 2013; 58: 35-44.
- Huang D, Nie S, Jiang L, Xie M. A novel polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. induces dendritic cells maturation through toll-like receptor 4. *Int Immunopharmacol* 2014; 18(2): 236-43.
- Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol* 2014; 5: 7.
- Kalinski P. Dendritic cells in immunotherapy of established cancer: Roles of signals 1, 2, 3 and 4. *Curr Opin Invest Drugs* 2009; 10(6): 526-35.
- Chen X, Yang L, Howard OM, Oppenheim JJ. Dendritic cells as a pharmacological target of traditional Chinese medicine. *Cell Mol Immunol* 2006; 3(6): 401-10.
- Li J, Li J, Zhang F. The immunoregulatory effects of Chinese herbal medicine on the maturation and function of dendritic cells. *J Ethnopharmacol* 2015; 171(2015): 184-95.
- Li J, Zhang F, Li J. The immunoregulatory effects of traditional chinese medicine on treatment of asthma or asthmatic inflammation. *Am J Chinese Med* 2015; 43(6): 1-23.
- Li J, Wang X, Wang W, Luo J, Aipire A, Li J, *et al.* Pleurotus ferulae water extract enhances the maturation and function of murine bone marrow-derived dendritic cells through TLR4 signaling pathway. *Vaccine* 2015; 33(16): 1923-33.
- 黄子桐, 马晓璐, 刘晶华, 谭无名, 宋平, 宋元德. 复方甘草片中甘草酸的含量测定方法的改进研究. *中外健康文摘 (Huang Zitong, Ma Xiaolu, Liu Jinghua, Tan Wuming, Song Ping, Song Yuande. Study on the improvement of the method for determining the content of licorice acid in compound licorice tablets)* 2013; 43: 157-8.
- Ma C, Ma Z, Liao XL, Liu J, Fu Q, Ma S. Immunoregulatory effects of glycyrrhizic acid exerts anti-asthmatic effects via modulation of Th1/Th2 cytokines and enhancement of CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol* 2013; 148(3): 755-62.
- Lambrecht BN, Hammad H. Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: From protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 243-70.
- Kearley J, Robinson DS, Lloyd CM. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122(3): 617-24.
- Garg R, Shrivastava P, van Drunen Littel-van den Hurk S. The role of dendritic cells in innate and adaptive immunity to respiratory syncytial virus, and implications for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2012; 11(12): 1441-57.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global initiative for Asthma (GINA) Program. The global burden of asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004; 59(5): 469-78.
- Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, *et al.* Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31(1): 143-78.
- Huang TP, Liu PH, Lien AS, Yang SL, Chang HH, Yen HR. Characteristics of traditional Chinese medicine use in children with asthma: A nationwide population-based study. *Allergy* 2013; 68(12): 1610-3.
- Srivastava K, Sampson HA, Emala CW, Li XM. The anti-asthma herbal medicine ASHMI acutely inhibits airway smooth muscle contraction via prostaglandin E2 activation of EP2/EP4 receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305(12): L1002-10.
- Fu PK, Yang CY, Tsai TH, Hsieh CL. Moutan cortex radices improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through anti-inflammation. *Phytomedicine* 2012; 19(13): 1206-15.
- Shi D, Zheng M, Wang Y, Liu C, Chen S. Protective effects and mechanisms of mogrosin V on LPS-induced acute lung injury in mice. *Pharm Biol* 2014; 52(6): 729-34.
- Jayaprakasam B, Yang N, Wen MC, Wang R, Goldfarb J, Sampson H, *et al.* Constituents of the anti-asthma herbal formula ASHMI™ synergistically inhibit IL-4 and IL-5 secretion by murine Th2 memory cells, and eotaxin by human lung fibroblasts *in vitro*. *J Integr Med* 2013; 11(3): 195-205.
- Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Saitoh S, Akashi-Takamura S, Hayashi H, *et al.* Glycyrrhizin and isoliquiritigenin suppress the LPS sensor toll-like receptor 4/MD-2 complex signaling in a different manner. *J Leukoc Biol* 2012; 91(6): 967-76.
- Chu X, Ci X, Wei M, Yang X, Cao Q, Guan M, *et al.* Licochalcone A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem* 2012; 60(15): 3947-54.