

## • 研究简报 •

## 延胡索酸酯对吞噬细胞产生超氧阴离子的调节作用

朱可建, 岑建萍, 林爱华, 金 纳, 程 浩\*

(浙江大学 医学院 附属邵逸夫医院 皮肤科, 浙江 杭州 310016)

关键词: 延胡索酸酯; 地塞米松; 单核细胞; 中性粒细胞; 超氧阴离子

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)11 - 1215 - 03

## Modulatory effect of fumaric acid esters on superoxide-anion generation in human phagocytes

ZHU Ke-jian, CEN Jian-ping, LIN Ai-hua, JIN Na, CHENG Hao\*

(Department of Dermatology, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

**Abstract:** Fumaric acid esters (FAE), mainly dimethylfumarate (DMF), have been shown to be highly efficacious in the treatment of psoriasis. Among the potential side effects of FAE therapy, lymphocytopenia is sometimes observed. In order to address the question whether FAE may interfere with systems of the innate defense, the modulatory role of FAE on the generation of superoxide-anion by human monocytes and neutrophils was studied by measuring the reduction of cytochrome c. Various concentrations of DMF and its metabolite methylhydrogenfumarate (MHF) were used to observe their modulatory effect on superoxide-anion generation by monocytes and neutrophils in response to bacteria (*S. aureus* and *E. coli*) and candida (*C. albicans*). Dexamethasone (DXM,  $1 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ) was also studied at the same time. We found that DXM significantly inhibited superoxide-anion generation from monocytes in response to bacteria and *C. albicans*, whereas DMF and MHF ( $10 - 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) significantly increased the production of superoxide-anion in monocytes in response to the above mentioned bacteria. DXM, DMF and MHF did not affect superoxide-anion generation of neutrophils. Our data indicate that DMF and MHF enhance superoxide-anion generation in human monocytes as one of the important mechanisms of innate defense against microorganisms.

**Key words:** fumaric acid esters; dexamethasone; monocyte; neutrophil; superoxide-anion generation

银屑病是一种常见的慢性炎症性皮肤病。对于中重度患者一般多用甲氨喋呤、环孢素和糖皮质激素等治疗,但这些药物有较多的副作用如增加感染风险和恶性肿瘤的发生等,而这些副作用与药物引起的淋巴细胞数量减少和功能降低有关<sup>[1]</sup>。延胡索酸酯(fumaric acid esters, FAE)是近年来成功治疗中重度银屑病的新药,在欧洲已成为系统用药的一线药物。临床上发现该药可降低外周血淋巴细胞的

数量,但至今没有感染机会增加的报道,其原因是值得研究的问题。

单核细胞和中性粒细胞在机体防御各种病原体引起的感染中起重要的作用。体内外研究发现,用环孢素和糖皮质激素的患者容易发生感染的部分原因是这些细胞的吞噬能力下降从而导致机体的天然免疫机制受损<sup>[2]</sup>。

为了研究FAE对天然防御系统的影响,作者分析了FAE的主要成分二甲基延胡索酸盐(dimethylfumarate, DMF)及其在体内的主要代谢产物甲基氢化延胡索酸盐(methylhydrogenfumarate, MHF)对人

收稿日期: 2007-02-27.

\* 通讯作者 Tel: 86 - 571 - 86006040, Fax: 86 - 571 - 86044817,

E-mail: kehao@mail.hz.zj.cn

外周血单核细胞和中性粒细胞的吞噬功能的影响,并同时以地塞米松(dexamethasone, DXM)作为免疫抑制对照药物。

## 材料和方法

**药物** DMF和MHF均购自德国Merck公司。DMF用DMSO溶解并用培养液稀释,MHF用培养液溶解。溶液在实验前新鲜配制并用 $0.2\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤。DXM(美国Sigma公司)用DMSO溶解,配成 $1 \times 10^{-3}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,临用前用培养液稀释。实验中用DMF、MHF和DXM处理的细胞为处理组,DMSO处理的细胞为溶剂对照组,仅用培养液处理的细胞为空白对照组。

**单核细胞和中性粒细胞的获取** 用Ficoll Paque(德国Biochrom公司)梯度离心和反向淘洗离心法(用Beckman J2-21M/E离心机离心)从EDTA抗凝的正常人外周血获取纯化的单核细胞。在以上梯度离心过程中取红细胞上面的白膜层,用0.86%氯化铵溶解破坏掺杂的红细胞,经反复离心洗涤后得到中性粒细胞。用台盼蓝染色评价两种细胞的活力均大于95%。均用RPMI 1640培养液调整细胞数为 $4 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**真菌和细菌的制备** 白色念珠菌(*C. albicans*)从一例口腔念珠菌病患者分离得到,用沙堡氏培养基培养。金葡菌(*S. aureus*, ATCC6538)和埃希氏大肠杆菌(*E. coli*, ATCC11303)生长于Muller-Hinton Bouillon(Merck公司,德国),以 $4 \times 10^8\ \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶解于胰蛋白酶肉汤培养液(Difco公司,德国)中,储存于 $4\ ^\circ\text{C}$ 。临用前用PBS反复洗涤,重悬于含0.25%胎牛血清蛋白的Hanks液中。

**超氧阴离子产量测定** 根据Mrowietz法<sup>[3]</sup>通过测定受超氧化物歧化酶抑制的细胞色素c的减少来分析单核细胞和中性粒细胞产生的超氧阴离子。先将单核细胞或中性粒细胞悬浮于完全缓冲液(含0.25%小牛血清、 $0.9\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{CaCl}_2$ 和 $0.5\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$ 的磷酸盐缓冲液)中,加入 $5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞松弛素B(Sigma公司),在 $37\ ^\circ\text{C}$ 预先孵育5 min,之后再加入含酵母多糖(Sigma公司)和细胞色素c(Sigma公司)的完全缓冲液,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴孵育30 min后立即放入冰水停止反应。用双光束光谱测定仪(Bio-Rad公司)选450 nm和492 nm发射波长测定细胞色素c的减少量来反映细胞产生的超氧化物量,结果以经过酵母多糖刺激后的细胞产生的超氧化物量与自发产生的(未经酵母多糖刺激,

只用完全缓冲液)超氧化物量之间的差异来表示。

为了评价DMF、MHF和DXM对单核细胞和中性粒细胞在受微生物(真菌或细菌)作用后超氧阴离子产生能力的影响,将DMF、MHF或DXM加入 $4 \times 10^6$ 个单核细胞或中性粒细胞中,在 $37\ ^\circ\text{C}$ 共同孵育3 h,然后用 $4 \times 10^8\ \text{cfu}$  *C. albicans*、*S. aureus*或*E. coli*刺激。真菌或细菌与细胞的比例为10:1。以不受真菌或细菌刺激的单核细胞或中性粒细胞为空白对照。结果以经过真菌或细菌刺激的细胞产生的超氧化物量与空白对照细胞产生的超氧化物量之间的差异来表示。

**统计学处理** 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用GraphPad Prism 5.0统计软件(美国)进行t检验。

## 结果

### 1 DMF、MHF和DXM对单核细胞产生超氧阴离子的影响

为了研究DMF和MHF对单核细胞在受酵母多糖和微生物刺激后产生超氧阴离子能力的影响,分别将溶剂DMSO(0.1%)、不同浓度的DMF或MHF加入单核细胞作用3 h,收获单核细胞,再用酵母多糖( $625\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )或微生物(真菌和细菌)刺激。如表1显示,DMF和MHF均以剂量依赖的方式上调酵母多糖和细菌刺激的单核细胞产生超氧阴离子。受酵母多糖刺激时,高浓度(20和 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的DMF和MHF组与DMSO处理组和空白对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ );受细菌刺激时,DMF(20和 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )以及MHF(20,10和 $1.0\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )均显著提高单核细胞产生超氧阴离子的水平( $P < 0.05$ )。然而,DMF和MHF的以上调节作用并非其对细胞的直接作用所致,因为作者发现无论是 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  DMF还是 $20\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  MHF对不受任何物质(酵母多糖、微生物)刺激的单核细胞产生超氧阴离子没有调节作用。另外,当单核细胞受*C. albicans*刺激时,DMF和MHF对其产生的超氧阴离子均无调节作用。在实验中还选择了DXM作为对照药物,结果发现 $1 \times 10^{-7}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DXM对酵母多糖刺激的单核细胞产生超氧阴离子没有调节作用,但显著下调受*S. aureus*和*E. coli*刺激的细胞产生的超氧阴离子水平( $P < 0.05$ )。

### 2 DMF、MHF和DXM对中性粒细胞产生超氧阴离子的影响

采用研究单核细胞的同样方法对中性粒细胞进行了研究。结果发现无论细胞受何种刺激,DMF、

MHF和DXM对其产生的超氧阴离子水平均无调节作用。

**Table 1** Effect of DMF, MHF and DXM on superoxide-anion generation in monocytes

Treatment	C/ μg·mL <sup>-1</sup>	Stimulant		
		Zymosan	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Medium		9.29 ± 4.60	9.33 ± 4.21	10.76 ± 4.55
DMSO	0.01%	11.43 ± 3.83	13.17 ± 3.27	14.72 ± 1.90
DMF	20	22.16 ± 9.39*	31.41 ± 8.06*	33.60 ± 6.88*
	10	20.94 ± 5.31*	27.15 ± 7.18*	27.74 ± 3.86*
	1.0	17.15 ± 6.31	18.54 ± 3.75	20.05 ± 1.81*
	0.1	16.81 ± 4.67	10.78 ± 2.06	12.71 ± 3.55
MHF	20	24.00 ± 8.31*	30.83 ± 12.19*	33.81 ± 9.44*
	10	18.90 ± 4.55*	25.18 ± 12.69*	24.23 ± 14.03*
	1.0	16.95 ± 5.01	26.39 ± 11.25*	23.77 ± 2.94*
	0.1	14.84 ± 5.08	16.97 ± 3.97	19.35 ± 6.91
	0.01	8.22 ± 1.79	12.91 ± 6.94	16.65 ± 4.02
DXM	1 × 10 <sup>-7</sup> mol·L <sup>-1</sup>	18.80 ± 6.04	1.13 ± 0.88*	2.60 ± 1.26*

Purified monocytes obtained from PBMC were exposed to DMF, MHF and DXM for 3 h before they were stimulated with zymosan particles, *S. aureus* and *E. coli*. Superoxide-anion production was determined by cytochrome c reduction. Results are  $\bar{x} \pm s$  from five independent experiments with duplicates. \*  $P < 0.05$  vs medium control group or solvent DMSO control group

## 讨论

FAE是多种延胡索酸酯的混合物,淋巴细胞和树突状细胞是其作用的主要靶细胞<sup>[4,5]</sup>,用于银屑病的治疗效果良好,尤其对较严重的银屑病更有价值。但在临床上发现部分患者外周血淋巴细胞减少。Hoenagel等<sup>[6]</sup>曾经对41例用FAE治疗1年和12例用FAE治疗长达10~14年的患者的长期随访研究,发现有76%的患者发生不同程度的外周血淋巴细胞的减少,但未发现这些患者对细菌感染的易感性增加。

天然免疫系统的细胞为防御微生物的感染提供主要的屏障。单核/巨噬细胞和中性粒细胞是天然免疫系统最重要的效应细胞,其主要功能是通过有氧和无氧机制吞噬并杀灭细菌。单核细胞能够吞噬并消化异物或微生物病原体,在此过程中会发生呼吸爆发,产生反应性氧中间产物包括超氧阴离子和过氧化氢等。作者通过测定单核细胞和中性粒细胞产生的超氧阴离子水平来评价在免疫防御机制中起关键作用的吞噬相关性反应性氧中间产物的激活。结果发现,DMF和MHF都以剂量依赖的方式上调受酵母多糖和细菌(*S. aureus*和*E. coli*)刺激的

单核细胞产生超氧阴离子;但当细胞受*C. albicans*刺激时,DMF和MHF对产生超氧阴离子没有调节作用。无论细胞受何种刺激,DMF和MHF对中性粒细胞产生超氧阴离子没有任何调节作用。地塞米松具有免疫抑制和抗炎作用,皮肤和系统感染是其常见的副作用,尤其是长期应用更易发生感染。已有一些体内和体外研究都发现,地塞米松能抑制吞噬细胞受酵母多糖、细菌和念珠菌刺激时产生的超氧阴离子<sup>[7]</sup>,认为这是导致地塞米松易诱发感染的原因之一。因此,在研究中纳入地塞米松作为DMF和MHF的对照药物。作者发现当单核细胞受细菌和念珠菌刺激时地塞米松显著降低细胞产生超氧阴离子的水平,与以上文献报道一致。有文献<sup>[8]</sup>报道,另一个常用于治疗严重银屑病的药物甲氨喋呤可明显降低单核细胞产生超氧阴离子。

由上可见,延胡索酸酯能增加细胞产生抗细菌超氧阴离子的产生,从而在机体天然防御微生物侵袭中起增强和保护作用。与其他治疗严重银屑病的药物如甲氨喋呤和地塞米松相比不易发生细菌感染,在临床上应用更安全。

## References

- [1] McClure SL, Valentine J, Gordon KB. Comparative tolerability of systemic treatments for plaque-type psoriasis [J]. *Drug Saf*, 2002, 25: 913 - 927.
- [2] Zaczynska E, Olszewska ZB. Effect of cyclosporine A on the non-specific, innate antiviral immunity of mice [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2001, 49: s53 - s57.
- [3] Mrowietz U, Christophers E. Modulation of human monocyte functions during acute bacterial infection [J]. *Scand J Immunol*, 1988, 28: 139 - 146.
- [4] Treumer F, Zhu K, Glaser R, et al. Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121: 1383 - 1388.
- [5] Zhu KJ, Mrowietz U. Inhibition of dendritic cell differentiation by fumaric acid esters [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 116: 203 - 208.
- [6] Hoenagel JJ, Thio HB, Willemze R, et al. Long-term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis [J]. *Br J Dermatol*, 2003, 149: 363 - 369.
- [7] Webb DS, Roth JA. Relationship of glucocorticoid suppression of arachidonic acid metabolism to alteration of neutrophil function [J]. *J Leukocyte Biol*, 1987, 41: 156 - 164.
- [8] Neshor G, Moore TL, Damer RW. *In vitro* effects of methotrexate on peripheral blood monocytes: modulation by folic acid and S-adenosylmethionine [J]. *Ann Rheum Dis*, 1991, 50: 637 - 641.