

紫杉醇对人单核细胞来源树突状细胞免疫功能的影响

骆高江,陈智理,姜昌浩

(浙江省义乌市中心医院心内科,322000)

[摘要] 目的 研究紫杉醇对人树突状细胞(DC)免疫功能的影响。方法 分离外周血单个核细胞,在含粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素4(IL-4)、胎牛血清及有或无紫杉醇的培养条件下制备DC。用流式细胞仪检测DC表型(CD1a、CD86、HLA-DR),混合淋巴细胞反应(MLR)检测DC对同种异体T淋巴细胞的刺激能力,流式细胞仪检测DC吞噬功能和凋亡细胞数,ELISA法测定MLR上清液细胞因子。结果 与对照组比较,经紫杉醇处理的DC表面CD1a、CD86、HLA-DR表达明显降低(均 $P < 0.01$),对T淋巴细胞刺激能力下降(均 $P < 0.01$),细胞吞噬能力下降(均 $P < 0.05$),凋亡细胞数增加(均 $P < 0.01$);MLR中细胞因子(IL-10、IL-12、TNF- α)浓度降低(均 $P < 0.01$)。结论 紫杉醇对DC免疫功能有明显抑制作用,可能是其防止支架术后再狭窄的机制之一。

[关键词] 紫杉醇;人单核细胞来源树突状细胞;免疫功能

[中图分类号] R979.1;R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2010)02-0165-04

Effects of Paclitaxel on Immune Function of Human Monocyte Derived Dendritic Cells

LUO Gao-jiang, CHEN Zhi-li, JIANG Chang-hao (Department of Cardiovascular, the Central Hospital of Yiwu City, Zhejiang Province, Yiwu 322000, China)

ABSTRACT Objective To study the effects of Paclitaxel on immune function of human monocyte derived dendritic cells. **Methods** Monocytes were isolated and fed with fetal bovine serum, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) and interleukin-4 (rhIL-4), paclitaxel or without paclitaxel, to prepare mature DC (mDC). The DCs immunophenotypic(CD1a、CD86、HLA-DR) expression, endocytic activity and apoptosis were measured by flow cytometry. Allogeneic T cell activation by DCs was tested by mixed lymphocyte reaction (MLR). Cytokines secretion of IL-10,IL-12,TNF- α were detected by ELISA. **Results** The level of CD86、CD1a、HLA-DR expression on DC in paclitaxel treated group was lower than those in the control group ($P < 0.01$); paclitaxel inhibited the endocytic and T-cell stimulating activity of DCs; induced DC apoptosis ($P < 0.01$);and reduced the secretion of IL-10、IL-12 and TNF- α of DC ($P < 0.01$). **Conclusion** Paclitaxel can inhibit immune function of human monocyte derived dendritic cells, which could be one of the mechanisms of preventing restenosis post stent implantation.

KEY WORDS Paclitaxel; Human monocyte derived dendritic cells;Immune function

近年来有学者认为,动脉粥样硬化(AS)属于慢性炎症和自身免疫性疾病,炎症和免疫是致AS发病的中心环节。最近,树突状细胞(dendritic cells,DCs)被发现存在于正常动脉壁中,而在粥样斑块中数量明显增多,提示DC可能在致AS炎症反应中起重要作用^[1]。笔者在本实验中通过研究紫杉醇对人单核细胞源DC表面标志物、成熟和抗原递呈功能、分泌细胞因子、凋亡的影响,探讨紫杉醇对DC分化、成熟及其免疫功能的影响,进一步探索紫杉醇在AS免疫炎症反应中的作用。

1 资料与方法

1.1 白细胞 健康志愿者白细胞悬液由浙江省义乌市血液中心提供,用于分离培养人外周血DC和T淋巴细胞。

1.2 仪器与试剂 超净台(中国苏净集团安泰公司),细胞培养箱(Forma),倒置显微镜(Olympus BX

50),TGC-16B 常温离心机 Anke(上海安亭科学仪器厂),-70℃低温冰箱(日本SANYO),-20℃低温冰箱(日本SANYO),4℃冰箱(中国海尔),制冰机(美国SCOTSMAN Inc),全自动生化分析用纯水机(杭州华新净水有限公司),24孔和6孔培养板(Coring),美国速离心管(美国Beckman),脱色摇床(上海医疗仪器厂),BP310S型电子天平(德国),流式细胞仪及软件(FACSCalibur仪、CellQuest软件)。

肿瘤坏死因子- α (rhTNF- α , Pepretech, 美国),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), Hyclone(美国),脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 美国Sigma公司),人重组集落刺激因子(recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)、人重组白介素-4(recombinant human interleukin-4, rhIL-4, 美国R&D Systems, Inc), RPMI1640培养基, HLA-DR-FITC、CD86-FITC、CD1a-FITC(美国Caltag),丝裂霉素C(浙江海正药业股份有限公司),人淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司),二甲基亚砜(DMSO, Amresco Inc 原产,上海生工生物工程有限公

[收稿日期] 2009-05-15

[作者简介] 骆高江(1977-),男,浙江义乌人,硕士,主治医师,从事心血管临床工作。电话:(0)13516891066。

司分装), 5 × RT buffer, Propidium Iodide(上海生工生物工程公司), CD1a、CD86、HLA-DR(美国 Caltag), 紫杉醇(paclitaxel, 美国 ALEXIS BIOCHEMICALS), 人重组白介素 12(IL-12)、人重组 IL-10、TNF-αELISA 试剂盒(美国 Biosource)。

1.3 实验方法^[2]

1.3.1 DC 的培养 取新鲜分离的健康成人外周血白细胞悬液, 用淋巴细胞分离液收集单个核细胞, 再用 CD14⁺ 磁珠分选出纯度 >98% 的 CD14⁺ 单核细胞, 种于含 20 ng · mL⁻¹ rhGM-CSF、2 ng · mL⁻¹ rhIL-4、15% 胎牛血清的完全培养基 RPMI1640 中, 隔天半量换液, 第 5 天收集悬浮细胞作为未成熟 DC (immature DC, imDC), 加 100 ng · mL⁻¹ LPS 继续培养 2 d, 收集作为成熟 DC (mature DC, mDC)。

1.3.2 DC 的成熟 分别将 100, 10, 1 nmol · L⁻¹ 紫杉醇和 100 ng · mL⁻¹ LPS 加入 DC 作用 24 h, 同时以只加完全培养基的细胞做对照, 然后进行以下实验。

1.3.3 DC 的促淋巴细胞反应 用混合淋巴细胞反应检测 DC 刺激 T 淋巴细胞增殖的能力, ELISA 法检测上述培养上清液中 IL-12、IL-10、TNF-α 含量。

1.3.4 DC 表型的检测 收集干预 24 h 的细胞, 分别加入单克隆抗人抗体 CD1a、CD86、HLA-DR, 孵育 30 min, PBS 洗 2 遍, 加入 FITC 荧光标的二抗, 孵育 20 min, PBS 洗 2 遍后悬于荧光标记液中, 用流式细胞仪检测数据。

1.3.5 DC 吞噬功能的检测 收集干预 24 h 的 DC, 加入 1 mg · mL⁻¹ FITC-Dextran 在 4 °C (阴性对照) 或 37 °C 孵育 30 min, 用含 5% FBS 的 PBS 洗涤细胞 2 次, 最后用 PBS 200 μL 重悬, 用流式细胞仪检测荧光值。

1.3.6 DC 凋亡的检测 收集干预 24 h 的 DC, 重悬于 Binding Buffer 500 μL, 再加入 Annexin-FITC 和 Propidium Iodide 各 5 μL 充分混匀, 避光, 反应 10 min, 在 1 h 内流式细胞仪检测。

1.4 统计学方法 数据全部用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS

12.0 统计学软件包进行单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组细胞表面分子表达情况 结果见表 1。mDC 表面 CD86、HLA-DR 表达较 imDC 明显升高, CD1a 无明显变化; 不同浓度紫杉醇干预后, imDC 细胞表面分子 CD1a、CD86、HLA-DR 表达均明显下降 (均 $P < 0.01$)。

2.2 各组细胞吞噬能力测定结果 mDC 吞噬能力较 imDC 明显下降 ($P < 0.01$), 紫杉醇干预后, imDC 细胞吞噬能力明显降低 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

2.3 DC 与 T 淋巴细胞比例为 1 : 5 与对照组比较, mDC 产生 MLR 差异有极显著性 ($P < 0.01$), 紫杉醇产生 MLR 差异有极显著性 ($P < 0.01$)。将经不同浓度紫杉醇刺激的 imDC 与 T 淋巴细胞以 1 : 5 比例混合培养 96 h, MTT 法检测对 MLR 的影响。结果, DC 与 T 淋巴细胞的 1 : 5 时, 与对照组比较, mDC 产生 MLR 差异有极显著性 ($P < 0.01$), 成熟 DC 可使 T 淋巴细胞增殖反应增强; 与对照组比较, 100, 10, 1 nmol · L⁻¹ 紫杉醇干预 imDC 产生 MLR 均差异有极显著性 (均 $P < 0.01$), 提于紫杉醇可使 T 淋巴细胞增殖反应增强。

2.4 对细胞上清液 IL-10、IL-12、TNF-α 分泌的影响

ELISA 细胞因子定量检测表明, mDCs 分泌细胞因子 IL-10、IL-12 和 TNF-α 明显高于 imDC (均 $P < 0.01$); 用紫杉醇干预 imDC 后, IL-10、IL-12 和 TNF-α 均明显低于对照组 (均 $P < 0.01$)。结果见表 3。

2.5 紫杉醇诱导 imDC 凋亡情况 紫杉醇可诱导 imDC 凋亡 ($P < 0.01$), mDC 与 imDC 差异无显著性。用 100, 10, 1 nmol · L⁻¹ 紫杉醇干预 imDC 后, 细胞凋亡率分别为 (11.980 ± 0.299)%, (13.597 ± 1.175)%, (11.327 ± 1.138)%, 均明显高于对照组。提示紫杉醇可诱导 imDC 凋亡 ($P < 0.01$), mDC 与 imDC 差异无显著性。

表 1 各组细胞表面分子表达情况

Tab. 1 The expression of surface molecules of DCs

$\bar{x} \pm s, n = 4$

组别	CD1a	CD86	HLA-DR
紫杉醇			
100 nmol · L ⁻¹	44.753 ± 6.020 ^{*1}	22.688 ± 3.826 ^{*1}	32.898 ± 4.488 ^{*1}
10 nmol · L ⁻¹	45.755 ± 5.846 ^{*1}	19.698 ± 3.774 ^{*1}	28.268 ± 4.232 ^{*1}
1 nmol · L ⁻¹	58.630 ± 7.243 ^{*1}	25.935 ± 4.020 ^{*1}	37.413 ± 4.125 ^{*1}
mDC	87.105 ± 12.075	77.472 ± 10.988 ^{*1}	68.790 ± 9.216 ^{*1}
imDC	82.534 ± 11.248	38.075 ± 5.370	50.432 ± 8.329

与 imDC 组比较, ^{*1} $P < 0.01$

Compared with imDC, ^{*1} $P < 0.01$

表 2 6 组树突状细胞吞噬能力测定结果

Tab.2 Endocytic capacity of DCs $\bar{x} \pm s, n = 4$

组别	FITC-Dextram 阳性率/%
紫杉醇	
100 nmol · L ⁻¹	7.25 ± 1.931 ^{*1}
10 nmol · L ⁻¹	30.00 ± 4.376 ^{*1}
1 nmol · L ⁻¹	36.00 ± 2.646 ^{*1}
mDC	17.00 ± 2.582
imDC(4 °C)	3.25 ± 0.323
imDC(37 °C)	69.25 ± 4.785

与 imDC 组(4 °C) 比较, ^{*1}P < 0.05

Compared with imDC, ^{*1}P < 0.05

3 讨论

AS 性心脏病是目前人类死亡率最高的疾病之一。有关 AS 发病机制研究的主要理论有损伤反应学说^[3], 脂蛋白改变反应学说^[4], 以及近年来的免疫反应假说等^[5]。虽然 AS 的具体发病机制目前尚未完全明确, 但近期研究普遍认为, AS 发生的最初是一种免疫炎症性反应^[6,7]。1995 年 DC 被发现存在于动脉壁中^[8], 之后越来越多的研究表明 DC 在 AS 的发生发展中具有重要作用。1997 年, WICK 等^[9] 提出关于 AS 炎症机制的全新假说——血管相关性淋巴样组织(vascular-associated lymphoid tissue, VALT)学说: 由 DC、T 细胞、巨噬细胞等的聚集物组成, 沿血管腔分布于动脉内膜的内皮下层, 是血管组织的屏障, 当有害抗原激活 VALT, 继而诱发局部血管壁免疫炎症反应, 最终将导致 AS 发生。后来研究又发现, 在冠状 AS 性心脏病患者外周血中, 骨髓来源的 DC 数量明显减少, 而在 AS 斑块中 DC 数量较正常血管壁明显增加, 尤其是在炎症浸润区域与 T 淋巴细胞聚集在一起^[10], 提示 DC 迁移进入局部病变血管壁, 既而提呈抗原, 激活 T 淋巴细胞启动免疫炎症反应, 可能是导致 AS 发生发展非常重要的机制之一。

药物涂层支架(drug-eluting stent, DES)用于心脏疾病的临床治疗, 是心脏介入治疗领域的一个巨大飞跃。药物涂层支架通过持续地向靶标血管壁平滑肌细胞释放抗狭窄药物, 抑制血管平滑肌细胞过度增生, 预防了

支架内再狭窄的形成。涂层支架药物释放的靶向性特点也增加了局部损伤血管处的给药浓度, 减少了全身性药物毒性, 较全身给药预防支架内再狭窄的效果理想^[11]。目前, 紫杉醇 DES 在全世界广泛使用。紫杉醇主要影响细胞周期的有丝分裂期(M 期), 使细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期-G₁/M 期, 通过中心小体缺失、异常纺锤体诱导形成, 以及纺锤体微管动力学抑制等作用, 使纺锤体失去正常功能, 从而阻断细胞有丝分裂, 使细胞死亡, 也抑制平滑肌细胞增生和迁移, 发挥较强的抗细胞增生、移行和信号转录作用。到目前为止, 大多数研究主要关注紫杉醇对内皮细胞和平滑肌细胞的抑制作用, 但很少有人关注紫杉醇对免疫炎症性细胞的直接作用, 尤其是对 DC 的作用。笔者在本实验中通过查找文献, 紫杉醇取 100, 10, 1 nmol · L⁻¹ 3 个浓度, 采取干预 imDC, 用不加药物的 imDC 做空白对照, 同时添加 100 ng · mL⁻¹ LPS 后培养为成熟 DC 亦进行比较。用流式细胞术检测经紫杉醇干预后, imDC 细胞表面分子 HLA-DR、CD86、CD1a 表达明显下降, 不同浓度紫杉醇干预后, CD86、CD1a、HLA-DR 表达无明显差异, 说明紫杉醇能够在一定程度上抑制 DC 分化和成熟, 但无浓度梯度差异。用流式细胞术检测 DC 吞噬 Dextran 的浓度, 经 LPS 干预 DC 吞噬能力明显低于对照组, 说明成熟 DC 吞噬能力较未成熟 DC 降低; 用紫杉醇干预 imDC, 细胞的吞噬能力均明显下降, 但没有随浓度增加而吞噬能力下降, 说明紫杉醇能够抑制 DC 吞噬功能, 而抑制 DC 吞噬功能无浓度差异。用流式细胞术检测 DC 凋亡, 紫杉醇可以诱导 imDC 凋亡, 但无明显浓度差异, mDC 和 imDC 比较, 无明显差异。ELISA 细胞因子定量检测表明, 成熟 DC 分泌细胞因子 IL-10、IL-12 能力较未成熟 DC 强, 紫杉醇能够明显抑制 imDC 分泌细胞因子 IL-10、IL-12 和 TNF-α。用 MTT 法来检测对 MLR 的影响时, 根据相关文献, 取 DC 与 T 淋巴细胞比例为 1 : 5^[12], mDC 可以产生与对照有差异的 MLR, 经紫杉醇干预的 imDC 可以产生与对照有差异的 MLR, 说明紫杉醇可以使 DC 对 T 淋巴细

表 3 细胞上清液中 IL-10、IL-12 与 TNF-α 测定结果

Tab.3 Level of IL-10, IL-12 and TNF-α in the cell supernatants

pg · mL⁻¹, $\bar{x} \pm s, n = 4$

组别	IL-10	IL-12	TNF-α
紫杉醇			
100 nmol · L ⁻¹	140.19 ± 9.94 ^{*1}	29.05 ± 3.83 ^{*1}	412.37 ± 27.75 ^{*1}
10 nmol · L ⁻¹	158.59 ± 7.93 ^{*1}	34.32 ± 3.12 ^{*1}	484.02 ± 25.89 ^{*1}
1 nmol · L ⁻¹	157.26 ± 7.83 ^{*1}	35.55 ± 5.39 ^{*1}	510.41 ± 22.11 ^{*1}
mDC	1389.03 ± 41.45	557.86 ± 44.17	1096.61 ± 67.96
imDC	1039.72 ± 85.18	534.70 ± 27.33	920.66 ± 55.32

与 imDC 组比较, ^{*1}P < 0.01

Compared with imDC, ^{*1}P < 0.01

胞增殖反应下降。本实验中紫杉醇都只选了 3 个浓度,而且药物作用只选了 24 h,故实验结果只能代表紫杉醇作用 24 h 的结果。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.02.010

[参考文献]

- [1] BOBRYSHV Y V. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance[J]. *Eur Heart J*, 2005, 26: 1700 - 1704.
- [2] LUTZ M B, KUKUTSCH N, OGILVIE A L, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow[J]. *J Immunol Methods*, 1999, 223: 77 - 92.
- [3] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801 - 809.
- [4] STEINBERG D, WITZTUM J L. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts [J]. *JAMA*, 1990, 264 (23): 3047 - 3052.
- [5] WICK G, SCHETT G, AMBERGER A, et al. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? [J]. *Immunol Today*, 1995, 16(1): 27 - 33.
- [6] HANSSON G K. Immune mechanisms in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12): 1876 - 1890.
- [7] WICK G, KNOFLACH M, XU Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 361 - 403.
- [8] BOBRYSHV Y V, LORD R S. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta [J]. *Arch Histol Cytol*, 1995, 58(3): 307 - 322.
- [9] WICK G, ROMEN M, AMBERGER A, et al. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue [J]. *FASEB J*, 1997, 11(13): 1199 - 1207.
- [10] LORD R S, BOBRYSHV Y V. Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta [J]. *Atherosclerosis*, 1999, 146(1): 197 - 198.
- [11] STONE G W, ELLIS S G, COX D A, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(3): 221 - 223.
- [12] GEIJTENBEEK T B, KWON D S, TORENSMA R. Van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-sign, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells [J]. *Cell*, 2000, 100: 587 - 597.

芍药苷对肝纤维化模型大鼠血清 TNF- α 、IL-6 与 IL-10 的影响

赵建学, 郭海燕, 陆玮婷, 邵 铭, 陆 原

(江苏省中医院感染性疾病科, 南京 210029)

[摘要] 目的 探讨芍药苷对四氯化碳所致肝纤维化大鼠血清 α 肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6) 和 IL-10 的影响。方法 Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 随机分成正常对照组(A 组), 模型组(B 组), 芍药苷小、中、大剂量组(C1, C2, C3 组), 水飞蓟素对照组(D 组)各 10 只。除 A 组外, 其他各组采用四氯化碳制备肝纤维化模型。C1, C2, C3 组分别灌胃给予芍药苷 1.2, 2.5 和 5.0 g \cdot kg⁻¹, D 组灌胃给予水飞蓟素 50 mg \cdot kg⁻¹。均连续给药 8 周。ELISA 法检测大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-10。结果 与 B 组比较, A 组 TNF- α 、IL-6 显著降低(均 $P < 0.01$), C1, C2, C3, D 组 TNF- α 和 IL-6 亦明显降低(均 $P < 0.05$); A 组 IL-10 明显升高($P < 0.01$), C1, C2, C3, D 组亦显著升高(均 $P < 0.05$)。结论 芍药苷能通过降低血清 TNF- α 、IL-6, 提高血清 IL-10 发挥抗肝纤维化作用, 且量效关系明显。

[关键词] 芍药苷; 四氯化碳; 肝纤维化; TNF- α ; IL-6; IL-10

[中图分类号] R268; R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004 - 0781(2010)02 - 0168 - 03

Effects of Paeoniflorin on Serum Levels of TNF- α 、IL-6、IL-10 in Rat Hepatic Fibrosis Model

ZHAO Jian-xue, GUO Hai-yan, LU Wei-ting, SHAO Ming, LU Yuan (Department of Infectious Diseases, Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of paeoniflorin on serum levels of TNF- α 、IL-6、IL-10 in rat hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride. **Methods** Sixty Sprague-Dawley rats were divided into 6 groups: normal control group