

芍药苷抑制骨髓源性树突状细胞的成熟及功能

张 晗, 罗清琼, 朱丽萍, 丁洁颖, 陈福祥[△]

(上海交通大学医学院附属第九人民医院检验科, 上海 200011)

摘要:目的 探讨芍药苷对树突状细胞(DC)表型及功能的影响。方法 分离 C57BL/6 小鼠骨髓细胞, 体外加入粒单-集落刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素-4(IL-4)诱导骨髓源性 DC, 培养过程中加入不同浓度的芍药苷共培养。利用 CCK-8 实验检测芍药苷对细胞活力的影响; 流式细胞术检测不成熟 DC 表面共刺激分子 CD80、CD40 和 MHC II 的表达; FITC-Dextran 细胞摄取实验检测不成熟 DC 的吞噬功能; 混合淋巴细胞实验检测芍药苷对成熟 DC 诱导同种异型淋巴细胞增殖的影响。结果 芍药苷不影响细胞活性, 无明显毒性作用。芍药苷可抑制不成熟 DC 表面共刺激分子 CD80、CD40 和 MHC II 的表达, 抑制不成熟 DC 的吞噬功能。此外, 芍药苷还可明显抑制成熟 DC 介导的混合淋巴细胞反应。结论 芍药苷能够明显抑制 DC 的成熟和功能, 这为芍药苷在自身免疫病治疗中的应用提供了实验依据。

关键词:芍药苷; 树突状细胞; 共刺激分子; 吞噬功能; 混合淋巴细胞反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.24.007

中图法分类号:R392

文章编号:1673-4130(2018)24-3015-04

文献标识码:A

Paeoniflorin suppresses the maturation and function of bone marrow-derived dendritic cells

ZHANG Han, LUO Qingqiong, ZHU Liping, DING Jieying, CHEN Fuxiang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract: Objective To explore the effect of paeoniflorin on the phenotype and function of dendritic cells (DC). **Methods** Bone marrow cells isolated from C57BL/6 mice were stimulated with granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) to induce bone marrow-derived dendritic cells, and paeoniflorin of different concentrations was added into the culture system. The cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect cell viability. The expression levels of co-stimulatory molecules CD80, CD40 and MHC II on immature DC were analyzed by flow cytometer. Phagocytosis of immature DC was determined by measuring the cellular uptake of FITC-dextran. Mixed-lymphocyte reaction assay was used to investigate the effect of paeoniflorin on mature DC-dependent induction of allogeneic lymphocyte proliferation. **Results** Paeoniflorin did not affect the cell viabilities and had no obviously toxic effect. paeoniflorin inhibited the expression of CD40 and MHC II on immature DC, as well as the phagocytosis of immature DC. Furthermore, paeoniflorin suppressed mature DC-induced allogeneic lymphocyte proliferation. **Conclusion** Paeoniflorin significantly suppressed the maturation and function of DC, thus our present data may provide experimental evidences for the usage of paeoniflorin in treating autoimmune diseases.

Key words: paeoniflorin; dendritic cells; co-stimulatory molecule; phagocytosis; mixed-lymphocyte reaction

白芍总苷提取自中药白芍根, 已作为类风湿性关节炎的治疗药物进入临床。近年来, 随着白芍总苷的临床应用, 研究发现白芍总苷还能用于治疗自身免疫性肝炎、干燥综合征和口腔扁平苔藓等自身免疫病^[1-3]。芍药苷(paeoniflorin)是一种单萜类糖苷化合物(C₂₃H₂₈O₁₁), 占白芍总苷量的 90% 以上, 是白芍总苷的主要成分。近年来, 国内外学者对芍药苷的药理作用展开了较为深入研究, 发现药苷具有抗炎、保肝、

免疫调节和神经保护等作用^[4-6], 但具体作用机制仍有待阐明。

树突状细胞(DC)是唯一能够直接激活初始 T 细胞的专职抗原提呈细胞(APC), 在适应性免疫应答的启动和发展中起到重要作用。来源于骨髓的 DC 为不成熟 DC, 定位于外周组织。与成熟 DC 相比, 不成熟 DC 低表达 MHC II 和共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40, 但具有较强的吞噬能力。当不成熟 DC 摄取抗

作者简介: 张晗, 女, 检验技师, 主要从事自身免疫病发病机制及免疫干预的研究。 [△] 通信作者, E-mail: fuxiang_chen@hotmail.com。

本文引用格式: 张晗, 罗清琼, 朱丽萍, 等. 芍药苷抑制骨髓源性树突状细胞的成熟及功能[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(24): 3015-3018.

原后发生迁移,进入局部淋巴结并分化为成熟 DC,后者提呈抗原并提供 T 细胞的活化信号,从而激发 T 细胞介导的免疫应答^[7-8]。由于 DC 在免疫应答中的重要作用,使得 DC 成为治疗自身免疫病的一个重要靶点^[9-10]。因此,本文旨在探讨芍药苷对 DC 功能的影响,为研发治疗自身免疫病的药物提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 C57BL/6 小鼠,雄性,体质量(20±1)g; BALB/c 小鼠,雄性,体质量(20±1)g,均购自中国科学院实验动物中心,饲养于上海交通大学医学院动物科学部无特定病原体环境内。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 实验试剂 芍药苷(纯度≥95%)购自上海一林生物科技有限公司;RPMI-1640 培养液、胎牛血清、L-谷氨酰胺及 β-巯基乙醇购自美国 Invitrogen GIBCO 公司;小鼠细胞因子粒单-集落刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素-4(IL-4)购自美国 Peprotech 公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司;抗鼠 CD11c-PE、抗鼠 CD80-FITC、抗鼠 CD40-APC 和抗鼠 MHC II-PECy7 流式抗体购自美国 eBioscience 公司;FITC-Dextran 购自美国 Sigma 公司。

1.2.2 实验仪器 生物安全柜(HF-safe-1200,上海)、高速台式离心机(Eppendorf,美国)、FACS Canto II 流式细胞仪(BD,美国)、Max250 全波自动酶标检测仪(Molecular Device,美国)、同位素测定仪(PerkinElmer,芬兰)。

1.3 方 法

1.3.1 骨髓源性 DC 诱导培养 分离 C57BL/6 小鼠股骨和胫骨,收集骨髓腔中骨髓细胞,并用红细胞裂解液裂解红细胞。用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液重悬细胞,并调整细胞浓度为 1×10⁶/mL,培养液中加入细胞因子 GM-CSF 和 IL-4(终浓度均为 10 ng/mL)。骨髓细胞悬液铺 24 孔板培养,每孔 1 mL,并根据需要加入不同浓度的芍药苷,置 5%CO₂、

37℃培养,2~3 d 半换液,5~6 d 收集细胞,即为不成熟 DC。加入 LPS(1 μg/mL)继续培养 18 h,即可获得成熟 DC。

1.3.2 芍药苷对细胞毒性检测 收集 C57BL/6 小鼠不成熟 DC,铺 96 孔板,加入不同浓度的芍药苷共培养 24、48、72 h,每孔加入 10 μL CCK-8,4 h 后酶标仪检测吸光度。

1.3.3 流式检测不成熟 DC 表面共刺激分子和 MHC II 收集不同芍药苷浓度共培养的不成熟 DC,表面标记染色 CD11c、CD80、CD40 及 MHC II。FlowJo 软件分析 CD11c⁺ 细胞表面 CD80、CD40 和 MHC II 表达。

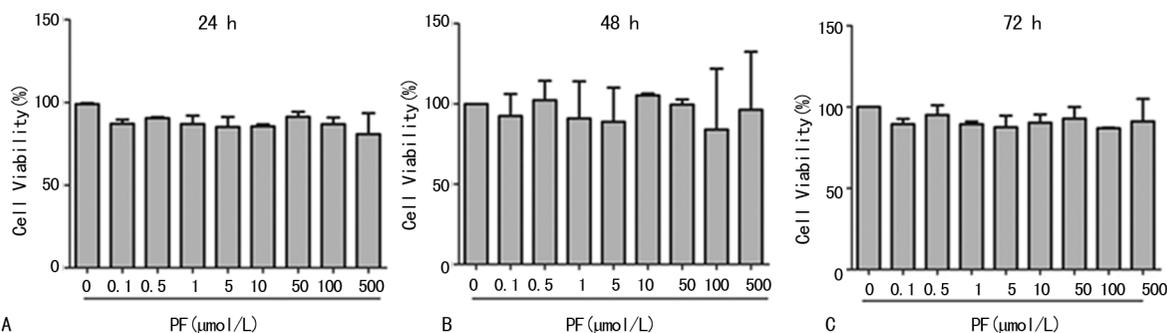
1.3.4 流式分析不成熟 DC 的吞噬功能 收集不同芍药苷浓度共培养的 DC,置于冰浴 30 min。离心去上清后加入含 FITC-Dextran 的 RPMI-1640 培养液,实验组置 37℃孵育,对照组放入 4℃冰箱。1 h 后洗去未被吞噬的 FITC-Dextran,并置于冰上,即刻流式检测。

1.3.5 混合淋巴细胞实验 收集不同芍药苷浓度共培养的成熟 DC,并用 γ 射线照射后备用。收集 BALB/c 小鼠的脾脏细胞,将照射后的树突状细胞与 BALB/c 小鼠的脾脏细胞分别按 1:10、1:20 和 1:40 混合后,置 5%CO₂、37℃培养,60 h 后加入³H-TdR 后继续培养 12 h,同位素测定仪检测 cpm 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计学处理,Student's t 检验分析组间差异,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 芍药苷对细胞无明显毒性作用 收集不成熟 DC 与不同浓度的芍药苷共培养,培养 24、48、72 h 后 CCK-8 检测细胞活力。与未加药组相比,不同剂量的芍药苷对细胞无明显的毒性作用(P>0.05)。见图 1。



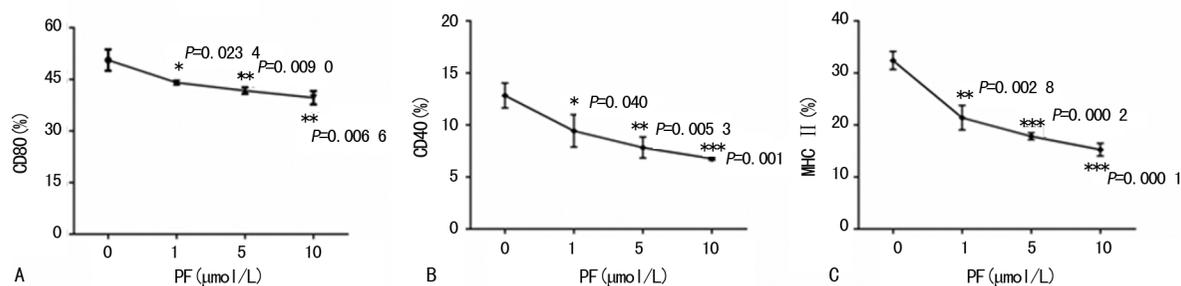
注:A、B、C 分别代表不成熟 DC 在不同浓度芍药苷下分别培养 24、48 和 72 h 后,CCK-8 检测吸光度值

图 1 芍药苷对细胞活力的影响

2.2 芍药苷抑制不成熟 DC 共刺激分子和 MHC II 表达 体外诱导培养不成熟 DC,培养过程中加入不同浓度的芍药苷,芍药苷终浓度分别 0、1、5、10

μmol/L,流式检测细胞表面共刺激分子 CD80、CD40 和 MHC II 表达。加药组随着芍药苷浓度的增加 CD80、CD40 和 MHC II 表达明显降低。结果见图 2。

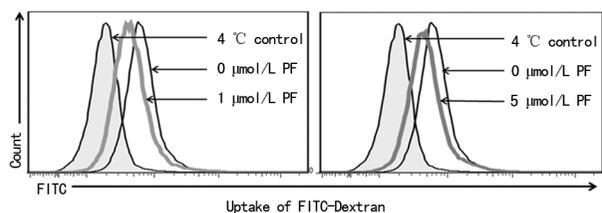
这一结果表明, 芍药苷能明显抑制不成熟 DC 表面 CD80、CD40 和 MHC II 表达。



注: A、B、C 分别代表流式细胞术检测不同浓度芍药苷培养条件下, DC 表面共刺激分子 CD80、CD40 和 MHC II 的表达。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所示数据为 3 次独立实验的代表性结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 2 芍药苷对不成熟 DC 共刺激分子和 MHC II 表达的影响

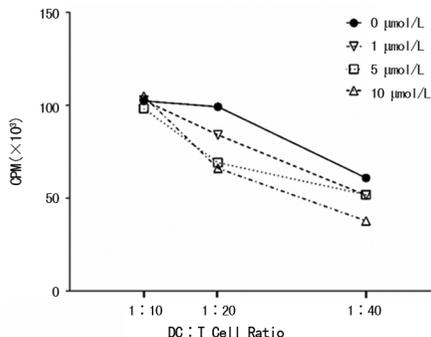
2.3 芍药苷抑制不成熟 DC 的吞噬功能 不同芍药苷浓度条件下体外诱导培养不成熟 DC, 在 37 °C 条件下细胞吞噬 FITC-Dextran, 同时采用 4 °C 条件下吞噬作为阴性对照, 然后流式检测每组细胞的 FITC 荧光强度。在培养过程中加入芍药苷可抑制不成熟 DC 的吞噬功能。结果见图 3。



注: 流式细胞术检测不同浓度芍药苷培养条件下, 不成熟 DC 对 FITC-Dextran 的吞噬能力。所示数据为 3 次独立实验的代表性结果

图 3 芍药苷对不成熟 DC 的吞噬功能的影响

2.4 芍药苷抑制成熟 DC 介导的混合淋巴细胞反应 成熟 DC 具有诱导同种异型淋巴细胞增殖的能力。为了检测芍药苷对成熟 DC 功能的影响, 取不同浓度芍药苷诱导培养下的成熟 DC 照射后与 BALB/c 小鼠的脾脏细胞分别按 1 : 10、1 : 20 和 1 : 40 的比例共培养, 采用 ³H-TdR 掺入法检测细胞增殖。芍药苷处理的 DC 诱导混合淋巴细胞反应的能力明显低于不处理组。结果见图 4。这一结果表明, 芍药苷能明显抑制 DC 介导的同种异型淋巴细胞增殖, 但无明显的剂量依赖性。



注: ³H-TdR 掺入法检测不同浓度芍药苷培养下, DC 诱导同种异型淋巴细胞增殖的能力。所示数据为 3 次独立实验的代表性结果

图 4 芍药苷对成熟 DC 功能的影响

3 讨论

APC 和 T 细胞之间的相互作用是适应性免疫应答启动的基础, 其中 DC 是唯一可以直接激活初始 T 细胞的 APC。不成熟 DC 多分布于非淋巴组织, 具有很强的抗原吞噬能力, 但低表达共刺激分子和 MHC 分子。当不成熟 DC 摄取抗原(或受到炎症刺激)后从非淋巴组织迁移到次级淋巴组织而逐渐成熟, 成熟后的 DC 高表达 MHC 分子和共刺激分子, 具有很强的抗原提呈功能, 能够激活 T 细胞介导适应性免疫应答。

本文研究发现, 芍药苷能明显抑制 DC 表面共刺激分子 CD80、CD40 和 MHC II 的表达。表明芍药苷对 DC 的成熟具有一定的抑制作用。有研究指出, CD40 介导的 DC 分泌 IL-6 在 Th17 细胞分化中起到重要作用^[11-12]。BARTHELIS 等^[13]报道, 抑制肠道中 DC 的 CD40 通路可抑制 Th17 细胞反应、促进 Treg 细胞产生, 从而抑制肠道过激的免疫反应和肠炎。因此, 芍药苷对树突状细胞 CD40 表达的抑制作用可能为 Th17 介导的自身免疫病的治疗提供新的靶点。

作为专职 APC, 不成熟 DC 具有很强的抗原吞噬能力。DC 与 T 细胞的相互作用提供了 T 细胞的活化信号, 不成熟 DC 吞噬抗原变为成熟 DC, 并将抗原信息提呈给 T 细胞识别^[14]。实验结果显示, 芍药苷可明显抑制不成熟 DC 的吞噬功能。DC 吞噬功能的减弱使得 DC 不能有效地将抗原提呈给初始 T 细胞而减弱免疫应答。为了进一步检测芍药苷对 DC 抗原提呈能力的影响^[15], 本研究进行了混合淋巴细胞实验。结果显示, 芍药苷明显抑制成熟 DC 刺激同种异型淋巴细胞增殖的能力。因此本组猜测, 芍药苷对自身免疫病的缓解作用, 可能与芍药苷抑制了 DC 对 T 细胞的激活能力有关。

4 结论

本文研究表明芍药苷能明显抑制 DC 的成熟和功能, 这为芍药苷作用机制的阐明提供了实验基础, 也为自身免疫病治疗药物的研发提供了新的研究方向。

参考文献

- [1] ZHANG W, DAI S M. Mechanisms involved in the therapeutic effects of *Paeonia lactiflora* Pallas in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(1): 27-31.
- [2] ZHOU Y B, JIN L, KONG F F, et al. Clinical and immunological Consequences of total glucosides of paeony treatment in Sjögren's syndrome: a randomized controlled pilot trial[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 39(39): 314-319.
- [3] ZHAO Z F, HAN Y, ZHANG Z H, et al. Total glucosides of paeony improves the immunomodulatory capacity of MSCs partially via the miR-124/STAT3 pathway in oral lichen planus[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105(105): 151-158.
- [4] HE D Y, DAI S M. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *paeonia lactiflora* pall. , a traditional Chinese herbal medicine[J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2, 10.
- [5] WANG C, YUAN J, WU H X, et al. Paeoniflorin inhibits inflammatory responses in mice with allergic contact dermatitis by regulating the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines[J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(12): 1035-1044.
- [6] NAM K N, YAE C G, HONG J W, et al. Paeoniflorin, a monoterpene glycoside, attenuates lipopolysaccharide-induced neuronal injury and brain microglial inflammatory response[J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(8): 1183-1189.
- [7] MACAGNO A, NAPOLITANI G, LANZAVECCHIA A, et al. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation[J]. *Trends Immunol*, 2007, 28(5): 227-233.
- [8] 罗道升, 戴宇平. 树突状细胞相关基础研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2005, 28(1): 51-55.
- [9] 袁欣然, 王丹丹, 孙凌云. 树突状细胞与自身免疫病研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(11): 766-770.
- [10] TAI Y, WANG Q T, KORNER H, et al. Molecular mechanisms of T cells activation by dendritic cells in autoimmune diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(9): 642.
- [11] PERONA-WRIGHT G, JENKINS S J, O'CONNOR R A, et al. A pivotal role for CD40-mediated IL-6 production by dendritic cells during IL-17 induction in vivo[J]. *J Immunol*, 2009, 182(5): 2808-2815.
- [12] IEZZI G, SONDEREGGER I, AMPENBERGER F A, et al. CD40-CD40L cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of IL-17-producing CD4(+) T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(3): 876-881.
- [13] BARTHEL C, OGRINC A, STEYER V, et al. CD40-signalling abrogates induction of ROR γ ⁺ Treg cells by intestinal CD103⁺ DCs and causes fatal colitis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15439.
- [14] 李玲霞, 吴锦艳, 杜国玉, 等. 小反刍兽疫病毒对鼠源树突状细胞成熟分化的影响[J]. *免疫学杂志*, 2018(5): 369-377.
- [15] 刘天明, 刘英博, 付越, 等. 淫羊藿苷对小鼠骨髓树突状细胞分化及成熟的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2015, 47(7): 75-79.
- (收稿日期: 2018-05-16 修回日期: 2018-07-28)
-
- (上接第 3014 页)
- Hung, 2006, 53(1): 95-104.
- [7] OLIVE D M, BEAN P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1661-1669.
- [8] BOU G, CERVERO G, DOMINGUEZ M A, et al. PCR-based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem-and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2000, 6(12): 635-643.
- [9] GRISOLD A J, ZARFEL G, STRENGER V, et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks[J]. *J Infect*, 2010, 60(1): 44-51.
- [10] Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit: a novel system to study clonal relationship among the isolates [J]. *BMC Infect Dis*, 2008, 8: 79.
- [11] FLUIT A C, TERLINGEN A M, ANDRIESEN L, et al. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11): 3979-3989.
- [12] BARTUAL S G, SEIFERT H, HIPPLER C, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(9): 4382-4390.
- [13] WISPLINGHOFF H, HIPPLER C, BARTUAL S G, et al. Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(7): 708-715.
- [14] MITTAL S, SHARMA M, YADAV A, et al. *Acinetobacter lwoffii* an emerging pathogen in neonatal ICU infect disord drug targets[J]. *Infect Disord Drug Targets*, 2015, 15(3): 184-188.
- [15] ANTUNES L, VISCA P, TOWNER K J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen [J]. *Pathog Dis*, 2014, 71(3): 292-301.
- [16] RAFEI R, KEMPF M, EVEILLARD M, et al. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii* [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(10): 1179-1194.
- (收稿日期: 2018-06-11 修回日期: 2018-08-28)