

姬松茸多糖对树突状细胞 Dectin-1、Syk 及 CARD9 基因表达和 T 淋巴细胞增殖的影响

董海影^{1,2}, 高志影¹, 荣华¹, 金铭¹, 王俊平¹, 牛英才², 刘吉成^{2*}

(1. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 151100; 2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的:探讨低相对分子质量姬松茸多糖(low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* Murill, LMPAB)对树突状细胞 C 型植物血凝素 1(Dectin-1), 脾酪氨酸激酶(Syk)和胱天蛋白募集域蛋白 9(CARD9) 基因表达和 T 淋巴细胞增殖的影响。方法:体外培养 ICR 小鼠骨髓来源的树突状细胞;通过流式细胞术检测树突状细胞表面 CD11c 和 CD86 分子的表达;采用 WST 方法检测 LMPAB 增强树突状细胞对 T 淋巴细胞的增殖作用;应用实时定量 PCR 方法检测 Dectin-1, Sky 和 CARD9 mRNA 的表达水平。结果:树突状细胞表面 CD11c 表达 98.6%, CD86 表达 96.97%;与正常组(4.84 ± 0.21)比较, LMPAB + OVA 组(6.59 ± 0.19)可增强树突状细胞对 T 淋巴细胞的增殖作用($P < 0.05$);与正常组 Dectin-1(6.13 ± 0.27), Sky(0.36 ± 0.11)和 CARD9(1.85 ± 0.20)比较, LMPAB + OVA 组 Dectin-1(8.25 ± 0.19), Sky(1.63 ± 0.16)和 CARD9(4.40 ± 0.19)明显升高, 统计学具有显著意义($P < 0.05$)。结论:所培养的髓系细胞为树突状细胞;LMPAB 可通过调控树突状细胞 Dectin-1, Sky 和 CARD9 mRNA 的表达增强树突状细胞的免疫效能。

[关键词] 低相对分子质量姬松茸多糖; 树突状细胞; C 型植物血凝素 1; 脾酪氨酸激酶; 胱天蛋白募集域蛋白 9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0180-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100180

Effect of Polysaccharide Isolated from *Agaricus Blazei* Murill on mRNA Expression Levels of Dectin-1, Syk and CARD9 from Dendritic Cells

DONG Hai-ying^{1,2}, GAO Zhi-ying¹, RONG Hua¹, JIN Ming¹, WANG Jun-ping¹,
NIU Ying-cai², LIU Ji-cheng^{2*}

(1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 151100, China;
2. Institute of Pathology, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer, 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of low molecular weight polysaccharide isolated from *Agaricus blazei* Murill (LMPAB) on Dectin-1, Syk and CARD9 mRNA expression of dendritic cells. **Method:** Dendritic cells derived from bone marrow of ICR mice were cultured *in vitro*; the expression of CD11c and CD86 molecule on the surface of dendritic cells was detected by flow cytometry; the effect of LMPAB on the proliferation of T lymphocytes stimulated by dendritic cells was detected by WST. Real-time quantitative PCR detect Dectin-1 mRNA, Sky mRNA and CARD9 mRNA expression levels. **Result:** CD11c and CD86 protein expression were expressed by 98.6% and 96.97% respectively; compared with the control group (4.84 ± 0.21), LMPAB + OVA group (6.59 ± 0.19) enhances the effect of dendritic cells on stimulating T lymphocytes' proliferation ($P < 0.05$); compared with the control group Dectin-1(6.13 ± 0.27), Sky(0.36 ± 0.11) and CARD9(1.85 ± 0.20) compared, LMPAB + OVA group Dectin-1(8.25 ± 0.19), Sky(1.63 ± 0.16) and CARD9(4.40 ± 0.19) significantly increased, statistical significance ($P < 0.05$).

[收稿日期] 20131202(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173609)

[第一作者] 董海影,在读博士, Tel:0452-2663483, E-mail:yhd8238@163.com

[通讯作者] *刘吉成,博士,教授,博士生导师,黑龙江省齐齐哈尔医学院,从事中医药抗肿瘤研究, E-mail:qyblu@126.com

2.6 统计方法 所有数据运用 SPSS13.0 软件包进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 DC 表面 CD11c 和 CD86 分子的表达检测 流式检测结果显示,体外培养的髓系细胞表面高表达 CD11c(98.6%)与 CD86(96.97%),CD11c 与 CD86 是小鼠 DC 表面主要标志分子,表明本次培养的髓系细胞为 DC。

3.2 LMPAB 对 DC 的 Dectin-1, Syk 和 CARD9 mRNA 表达的影响 分别扩增 GAPDH, Dectin-1, Syk 和 CARD9,每样本作 2 复孔,得到 Ct 平均值。通过 Dectin-1, Syk 和 CARD9 mRNA 计算 Dectin-1, Syk 和 CARD9 mRNA 相对 mRNA 表达水平, $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ target gene} - Ct \text{ GAPDH}) - (Ct \text{ control} - Ct \text{ GAPDH})$, Dectin-1, Syk 和 CARD9 mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,见表 1。

表 1 各组 DC 的 Dectin-1, Syk 和 CARD9 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Dectin-1	Syk	CARD9
正常	1.13 ± 0.67	1.01 ± 0.20	1.19 ± 0.88
OVA	1.57 ± 0.31	0.91 ± 0.15	1.97 ± 0.24
β -葡聚糖 + OVA	6.19 ± 0.39 ¹⁾	1.87 ± 0.19 ¹⁾	4.88 ± 0.45 ¹⁾
LMPAB + OVA	5.74 ± 0.34 ¹⁾	2.05 ± 0.27 ¹⁾	4.48 ± 0.53 ¹⁾

注:与 OVA 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

与正常组比较, OVA 组 Dectin-1, Syk 和 CARD9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均无显著性差异,表明 OVA 组 Dectin-1, Syk 和 CARD9 mRNA 表达没有变化;而与 OVA 组比较, β -葡聚糖 + OVA 组和 LMPAB + OVA 组的 Dectin-1, Syk 和 CARD9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 均有显著性差异($P < 0.05$),表明 β -葡聚糖 + OVA 组和 LMPAB + OVA 组 mRNA 表达上调。从倍数关系来看,与 OVA 组相比, β -葡聚糖 + OVA 组 Dectin-1 mRNA 表达增高了约 3.94 倍、Syk mRNA 表达增高了约 2.05 倍、CARD9 mRNA 表达增高了约 2.48 倍, LMPAB + OVA 组 Dectin-1 mRNA 表达增高了约 3.66 倍、Syk mRNA 表达增高了约 2.25 倍、CARD9 mRNA 表达增高了约 2.27 倍。

3.3 DC 对 T 淋巴细胞增殖作用的影响 与正常组(4.84 ± 0.21)比较, OVA 组(4.95 ± 0.67), DC 对 T 淋巴细胞的增殖作用无显著性差异,而与 OVA 组比较, β -葡聚糖 + OVA 组(7.78 ± 0.24)和 LMPAB + OVA 组(6.59 ± 0.19) DC 对 T 淋巴细胞的增殖作用具有显著性差异($P < 0.05$)。

4 讨论

本实验主要是探讨 LMPAB 对 DC 的影响。DC 可以激活初始 T 细胞,桥接固有性免疫与获得性免疫、初次免疫应答和再次免疫应答。Dectin-1 是 DC 特异性受体,可以特异性识别 β -葡聚糖, β -葡聚糖是优良的免疫激活剂,可介导生物体产生抗肿瘤、抗感染等生物效应, Dectin-1 识别 β -葡聚糖后不仅可以促进 DC 的成熟,同时可诱导大量细胞因子和趋化因子的产生^[4-6]。Syk 是目前发现的唯一具有抑癌作用的蛋白酪氨酸激酶,参与多种信号转导途径,影响免疫细胞的增殖、分化及吞噬等功能,是一种新型的候选抑癌基因^[7]。CARD9 既是 NF- κ B 信号通路的活化剂,也是 Dectin-1 信号通路的传感器^[8]。Dectin-1 主要是在 Syk 磷酸化作用下,通过 CARD9,启动 Syk-CARD9-NF- κ B 级联途径诱导 IL-6, IL-23, TNF 和 IL-12 等细胞因子的释放^[9]。研究发现, Dectin-1 能够促进 CD8⁺ T 细胞反应,促进体内抗体反应^[10]。因此,增强 Dectin-1 的刺激可促进各种适应性免疫反应,它将成为一个新的免疫治疗靶点^[11]。

本研究中,根据流式细胞仪的检测结果,可判定本次原代培养的细胞为 DC,而且具有比较高的纯度,并且还能保持体内 DC 的生物学特性^[12]。LMPAB 作为一种优良的抗肿瘤多糖,可通过增强宿主免疫力而发挥抗肿瘤作用,或直接杀伤肿瘤细胞,或诱导肿瘤细胞凋亡,进而杀伤肿瘤细胞,但其具体作用机制还不清楚。本实验通过采用 WST 方法检测,发现 LMPAB 干预的 DC 能够增强 T 淋巴细胞增殖的功能,同时,实时定量 PCR 检测结果表明, LMPAB 能够分别上调 DC 的 Dectin-1、Syk 和 CARD9 mRNA 表达,进一步增强 DC 的生物学功能。因此,综合上述实验结果,似能得出以下结论: LMPAB 可通过调节 Dectin-1-Syk-CARD9-NF- κ B 信号通路来增强 DC 的免疫功能,进而发挥其抗肿瘤作用。

[参考文献]

[1] Hideki U, Eynav K, Nathalie S, et al. Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines[J]. Semin Immunol, 2011, 23(1):21.

[2] 林俊,李萍,陈靠山. 近 5 年多糖抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8):1116.

[3] Kasai H, He L M, Kawamura M, et al. IL-12 production induced by agaricus blazei fraction H (ABH) involves Toll-like receptor (TLR) [J]. Evidence Based Complement Alternate Med, 2004, 11(3):259.

芪苈强心胶囊对改善慢性心力衰竭大鼠心功能及 AQP-2 表达的影响

张健^{1,2}, 崔向宁^{1*}, 曹戩¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**探讨芪苈强心胶囊对改善慢性心衰(CHF)大鼠的心功能及水通道蛋白-2(AQP-2)表达的影响及其改善慢性心力衰竭水代谢紊乱的机制。**方法:**结扎冠脉左前降支,建立急性心肌梗死(AMI)模型,存活者随机分为模型组(等体积水),芪苈强心组($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),缬沙坦组($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),另设假手术组(等体积水)。给药4周后,应用超声心动图检测大鼠的心功能;并通过免疫组化和 Western blotting 检测大鼠肾集合管 AQP-2 表达。**结果:**与假手术组相比,模型组左心室舒张末期内径(LVEDD)和左心室舒张末期内径(LVESD)明显增加,射血分数(EF)和短轴缩短分数(FS)显著降低($P < 0.05$),证实造模成功;与模型组相比,芪苈强心组和缬沙坦组 LVEDD 和 LVESD 均明显减小,EF 和 FS 均显著升高($P < 0.05$);芪苈强心组与缬沙坦组比较,差异无统计学意义;与假手术组相比,模型组 AQP-2 表达水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,芪苈强心和缬沙坦组 AQP-2 表达均显著降低($P < 0.05$),两组 AQP-2 表达比较,差异亦无统计学意义。**结论:**芪苈强心可有效下调 AQP-2 的表达水平,调节由慢性心衰导致的水代谢紊乱,改善水肿症状、从而提高慢性心衰患者的生存质量。

[关键词] 慢性心力衰竭; 芪苈强心胶囊; 水通道蛋白-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0183-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100183

[收稿日期] 20140225(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273945)

[第一作者] 张健,硕士,从事中西医结合心脑血管疾病基础与临床的研究, Tel:18613828731, E-mail:zhangjian1281015@163.com

[通讯作者] *崔向宁,博士,主任医师,从事中西医结合心脑血管疾病基础与临床的研究, Tel:010-88001246, E-mail:cuixiangning@126.com

- [4] Steinman R M, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006, 311: 17.
- [5] 杨小舟, 曾富华, 饶力群. 模式识别受体 Dectin-1 与 β -葡聚糖的免疫识别作用 [J]. *生命的化学*, 2008, 28(5): 556.
- [6] Vautier S, Sousa Mda G, Brown G D. C-type lectins, fungi and Th17 responses [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(6): 405.
- [7] Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, et al. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling [J]. *Immunol Today*, 2000, 21: 148.
- [8] 孙水林, 罗杰, 张吉翔. CARD9 蛋白与先天性免疫 [J]. *生命的化学*, 2007, 27(6): 514.
- [9] Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, et al. The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 619.
- [10] Leibund Gut-Landmann S, Gross O, Robinson M J, et al. Syk and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17 [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 630.
- [11] Carter R W, Thompson C, Reid D M, et al. Preferential induction of CD4⁺ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-I [J]. *J Immunol*, 2006, 177(4): 2276.
- [12] Babatz J, Röllig C, Oelschlägel U, et al. Large-scale immunomagnetic selection of CD14⁺ monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study [J]. *J Hematother Stem Cell Res* 2003, 12(5): 515.

[责任编辑 顾雪竹]