

肺瘤平膏及其拆方含药血清对人外周血树突状细胞 迁移功能影响及机制研究

周雍明¹, 朴炳奎¹, 郑红刚¹, 熊露¹, 赵保胜^{2*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的:探讨中药肺瘤平膏及其拆方对树突状细胞(dendritic cell, DC)迁移功能的影响及分子机制。方法:采用transwell小室法测定DC的迁移能力;realtime-PCR法测定DC表面CCR7, CXCR4等趋化因子受体mRNA的表达。结果:解毒中药有抑制DC迁移的趋势,而肺瘤平膏、益气药物、活血药物则可促进DC迁移;在不同趋化因子作用下,药物对DC迁移的影响不同;不同药物作用下,DC表面趋化因子受体表达不同,益气组CCR7表达最高,活血组、肺瘤平组次之,解毒组最低,益气组、活血组与解毒组比较, $P < 0.05$; CXCR4在益气组、肺瘤平组表达最高,活血组次之,解毒组最低,肺瘤平组、益气组、解毒组与对照组比较, $P < 0.01$, 解毒组与其他各组比较, $P < 0.01$ 。结论:肺瘤平膏及益气组分、活血组分对DC的迁移有促进作用,解毒组分则明显抑制DC的迁移,不同中药作用下DC趋化能力的改变可能与趋化因子受体的表达有关。

[关键词] 肺瘤平膏; 树突状细胞; 迁移

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0152-04

Investigation on Migration Ability and Mechanism of Dendritic Cells by Feiliuping Extract and its Modified Formula

ZHOU Yong-ming¹, PIAO Bing-kui¹, ZHENG Hong-gang¹, XIONG Lu¹, ZHAO Bao-sheng^{2*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the migration ability and mechanism of dendritic cells (DC) by Feiliuping extract and its modified formula. **Method:** The migration ability of DCs were determined by transwell borders, the expression of CCR7, CXCR4 on surface of DC were detected by RT-PCR. **Result:** Different TCM has different influence on migration ability of DCs. And ability was different with different chemotactic factor. The expression of CCR7, CXCR4 on surface of DC were different with different TCM, CCR7 in Yiqi group was the highest, while Huoxue group, FLP group lower, Jiedu group is the lowest. Comparing with Yiqi group, Huoxue group & Jiedu group ($P < 0.05$). CXCR4 in Yiqi Group & FLP group was highest, Huoxue group is lower, Jiedu group is the lowest. Comparing with blank serum group and FLP group, Yiqi group, Jiedu group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Yiqi herbs strengthens migration ability of DCs, while Jiedu herbs inhibits. The difference was related to the expression chemotactic factor receptor on DCs surface.

[Key words] Feiliuping extract; dendritic cells; migration

树突状细胞(DC)是最有效的抗原提呈细胞之

一, DC体内迁移是DC发挥其生物学功能的关键步骤。其体内迁移主要受趋化因子、趋化因子受体及其它一些相关分子间的相互作用调控^[1]。该实验采用transwell小室的方法,选用白细胞介素-8(IL-8)和RANTES为趋化因子,检测不同中药含药血清对DC趋化作用的影响,并对DC表面趋化因子受体的

[收稿日期] 2009-11-06

[基金项目] 国家自然科学基金(30371821)

[通讯作者] * 赵保胜, Tel: (010)84738658, E-mail: zhaobs1973@163.com

表达进行分析,以期阐明中药对 DC 趋化影响的分子机制。

1 材料

1.1 动物与细胞 日本大耳白兔,雄性,体重(2.5 ± 0.5) kg,中国中医科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(京)2000-006。正常人外周血浓缩白细胞由北京红十字血站提供。

1.2 药物 肺瘤平膏由中国中医科学院广安门医院制剂室提供,批准文号(98)京卫药研字【058】DF-1657号,生产批号 06080927,250 g/瓶,生理盐水稀释为终浓度 1.71 g·mL⁻¹ 备用;将肺瘤平膏根据药物功效不同拆分为益气方(黄芪、党参)、解毒方(白花蛇舌草、草河车、败酱草)、活血方(桃仁、三七)。药材均购自广安门医院中药房,剂量按原方,由中国中医科学院广安门医院制剂室制成浸膏后备用,其终浓度分别为含生药 2.32,3.62,1.62 g·mL⁻¹。

1.3 试剂与仪器 注射用重组人白细胞介素-2(rh-IL2,10 万 U/支,北京远策药业有限责任公司);RPMI-1640,HEPES,胎牛血清(FCS)(美国 GIBCO);rh-IL-4,rhTNFα(天津 TBD 公司);GM-CSF(华北制药厂);淋巴细胞分层液(ρ = 1.077,天津灏洋生物制品科技有限公司);rhIL-8, rhRANTES(Cytolab Ltd/PEPROTECH ASIA 公司);RNA-OUT 总 RNA 提取试剂盒(北京天来生物医学科技有限责任公司);Erasol(北京赛百盛基因技术有限公司);M-MLV Reverse Transcriptase, M-MLV Reverse RT 5 × Buffer(Promega 产品);RNAsafe, Oligo(dT) 15, dNTP, RealMasterMix(北京天根生物科技有限公司);CCR7, CXCR4 和内参 GAPDH 引物(上海英骏生物技术有限公司合成);Transwell 细胞培养小室(Costar 公司);Gene Quant II 型核酸定量仪(英国 Pharmacia Biotech 公司);SYNGENE-GeneGenius 全自动凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司);IQ5 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

2.1 人外周血 DC 的分离、培养 取正常人外周血浓缩白细胞, PBS 稀释 2 倍;在离心管内加入人淋巴细胞分离液,将稀释的外周血浓缩白细胞按 1:1 比例,沿离心管侧壁缓缓移入,2 500 r·min⁻¹ 离心 20 min;用吸管沿管壁吸取界面白膜层细胞,移入离心管中,即得 DC 前体细胞;加入等体积的 PBS,1 500 r·min⁻¹ 离心 20 min,共 3 次,弃上清,洗脱红细胞和

血小板;以含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液调整细胞密度至 3 × 10⁶ mL⁻¹,加入无菌培养瓶,每瓶 5 mL,置入培养箱中培养 2 h,吸去非黏附细胞,用 PBS 轻洗 2 遍贴壁细胞,加入含 IL-4(100 U·mL⁻¹)、GM-CSF(150 ng·mL⁻¹)和 TNF-α(500 U·mL⁻¹)的完全 1640 培养液培养,隔日半量换液,培养备用。

2.2 含药血清的制备^[2] 大耳白兔 15 只,随机分 5 组:肺瘤平膏组、益气组、解毒组、活血组和空白对照组,每组 3 只,各组家兔 ig 相应药物,给药剂量分别为:肺瘤平膏组 4.64 g(生药含量) kg⁻¹,益气组 1.24 g·kg⁻¹,解毒组 1.49 g·kg⁻¹,活血组 0.23 g·kg⁻¹。空白对照组 ig 等量的蒸馏水,末次 ig 前 12 h 动物禁食、不禁水。末次 ig 后 2 h 经兔耳缘静脉采血,静置 3 h,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,分离含药血清。56 °C 水浴 30 min 灭活,0.22 微孔滤膜过滤除菌,-20 °C 保存备用。含药血清药物含量的计算与表述采用本研究室的方法,公式如下^[3]:

$$\text{含药血清药物含量(g 生药} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{U}^{-1}) = \frac{\text{剂量(g 生药} \cdot \text{kg}^{-1})}{\text{含药血清在体外试验系统的稀释倍数(U)}}$$

2.3 DC 的制备 于 DC 培养第 4 天,吸取中药含药血清,加入各组 DC 中,DC 对照组加入空白对照组血清,终浓度为 17%;隔日离心换液并加含药或空白血清 1 mL,培养第 8 天,1% 台盼蓝染色,细胞计数后,1 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清。完全 1640 液调整细胞浓度至 8 × 10³ mL⁻¹,经鉴定成熟度 99%,继续培养 1 d,备用。

2.4 DC 迁移功能测定 采用 24 孔 transwell 嵌套培养板(多聚碳酸盐膜,膜直径 6.5 μm)测定 IL-8 和 RANTES 对 DC 的迁移功能。培养板中加入 10% 小牛血清 RPMI1640 细胞培养液,上室 100 μL,下室 600 μL,置 37 °C,5% CO₂ 培养箱孵育 4 h;弃培养液,下室加入含 IL-8(100 ng·mL⁻¹)或 RANTES(10 ng·mL⁻¹)的 RPMI1640 培养液 600 μL/室,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中备用;将各组 DC 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,培养液重悬,调密度为 1 × 10⁶ mL⁻¹;在上室内加入 DC 悬液,100 μL/孔,培养箱中孵育 4 h;反应结束后取出 transwell 嵌套,分离滤膜;将滤膜用 95% 酒精固定 30 min,HE 染色,水洗,用棉签轻轻擦去未穿过膜的细胞,用 Eukitt 将膜封于载玻片;倒置显微镜下(×400)观察,每膜取上下左右及中间 5 个视野计数,取平均值;计算趋化指数(CI)^[4]。

$$CI = \frac{\text{受趋化因子刺激后游走过滤膜的细胞数}}{\text{未经趋化因子刺激的随机游走过滤膜的细胞数}}$$

2.6 趋化因子受体 CCR7, CXCR4 的 Real-time PCR 检测 药物干预 24 h 后, 吸弃上清液, 细胞板用 PBS 冲洗 3 次, 提出 mRNA, 行逆转录, 荧光定量 PCR 法测定 CCR7, CXCR4 mRNA 的表达, 同时以 GAPDH 做为内参照做平行管。IQ5 荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 反应条件^[4]为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 60 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 55 个循环, 72 °C 延伸 10 min 结束反应。并做熔点曲线。采用相对定量法进行数据处理和分析, 其计算公式如下:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{t, Target} - Ct_{t, GAPDH})_X - (Ct_{t, Target} - Ct_{t, GAPDH})_{Control}$$

X 表示任意组, Control 表示经 GAPDH 校正后 1 倍量的目标基因表达。

引物序列、产物长度如下表^[5-6]:

表 1 引物序列一览

引物	意义链	序列(5'-3')	产物长度/bp
CCR7	sense:	TCC TTC TCA TCA GCA AGC TGT C	530
	antisense:	GAG GCA GCC CAG GTC CTT GAA G	
CXCR4	sense:	AAG AAA CTG AGA AGC ATG ACG	413
	antisense:	GAA ACT GGA ACA CAA CCA CC	
GAPDH	sense:	GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA	226
	antisense:	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著统计学差异。

3 结果

3.1 各组 DC 在趋化因子作用下的趋化活性变化 IL-8 作用下, DC 的趋化指数从高到低依次为: 益气组、活血组、肺癌平组、对照组、解毒组。其中, 两两比较, 益气组与对照组比较, $P < 0.05$; 益气组、活血组与解毒组比较, $P < 0.05$, 其余组间两两比较均无统计学差异。RANTES 作用下, DC 的趋化指数从高到低依次为: 肺癌平组、活血组、益气组、对照组、解毒组。两两比较, 肺癌平组与对照组、解毒组比较, $P < 0.05$, 其余组间两两比较无明显统计学差异。

3.2 中药含药血清对 DC 趋化因子受体 CCR7, CXCR4 表达的影响 由表 3 可见, CCR7 益气组表达最高, 活血组、肺癌平组次之, 解毒组最低, 但各组与对照组比较均无统计学差异; 益气组、活血组与解毒组比较, $P < 0.05$ 。CXCR4 在益气组、肺癌平组表达最高, 活血组次之, 解毒组最低。肺癌平组、益气

组、解毒组与对照组比较, $P < 0.01$; 其他各组与解毒组比较, $P < 0.01$ 。

表 2 中药含药血清干预 DC 在趋化因子作用下的 CI 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/g 生药 · kg ⁻¹ · U ⁻¹	CI	
		IL-8	RANTES
对照	0	1.006 ± 0.121	1.007 ± 0.196
肺癌平	27.3	1.027 ± 0.116	1.185 ± 0.120 ^{1,3)}
益气	7.3	1.112 ± 0.145 ^{1,2)}	1.048 ± 0.068
解毒	8.8	0.874 ± 0.116	0.917 ± 0.089
活血	1.4	1.084 ± 0.233 ²⁾	1.075 ± 0.191

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.05$; 与解毒组比较, ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)。

表 3 中药含药血清对 DC 趋化因子受体 CCR7, CXCR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度/g 生药 · kg ⁻¹ · U ⁻¹	2 ^{-ΔΔCt}	
		CCR7	CXCR4
对照	0	1.02 ± 0.24	1.01 ± 0.13 ⁴⁾
肺癌平	27.3	1.11 ± 0.14	2.19 ± 0.27 ^{2,4)}
益气	7.3	1.39 ± 0.31 ³⁾	2.24 ± 0.43 ^{2,4)}
解毒	8.8	0.86 ± 0.21	0.72 ± 0.06 ^{2,4)}
活血	1.4	1.23 ± 0.14 ³⁾	1.31 ± 0.34 ^{2,4)}

4 讨论

树突状细胞(DC)是机体免疫系统中功能最强的抗原提呈细胞, 现已证明抗原致敏的 DC 是一种非常希望的新型疫苗。DC 摄取抗原后经历成熟过程并移行至二级淋巴器官以激发 T 细胞的免疫应答反应。大部分的初始 T 淋巴细胞很少进入周围组织, 因而获得性免疫反应主要是在引流淋巴结内。DC 是具高度活动性的免疫细胞, 迁移贯穿 DC 的分化发育过程及整个生命周期, 也是其完成抗原递呈所必需的重要环节, 抗原信息只有通过 DC 的处理及携带转运从外周传递到淋巴器官如淋巴结、脾脏等免疫细胞富集区才能完成有效递呈而激活免疫反应。趋化因子是趋化性细胞因子的简称, 是细胞因子中分出的一个亚类, 可趋化白细胞沿其浓度梯度移动。至今已经发现 50 多种人类趋化因子和 18 种趋化因子受体^[7]。趋化因子其主要的共同的生物学功能是对白细胞的趋化作用, 趋化白细胞从血流进入细胞并在组织中定位^[8]。

DC 从外周迁移至淋巴器官以发挥抗原提呈作用的过程中, DC 和淋巴器官所表达的趋化因子及受体的种类、水平和相互作用又起了关键作用^[9]。在受到抗原和炎症介质、病毒和细菌产物的不断刺激下, DC 自身以自分泌方式下调识别受体, 对外周组

织 CC 族趋化因子反应性下降,而 CCR7, CXCR4 等受体大量表达,对淋巴结 T 区趋化因子的反应性明显上升,受它们的趋化吸引,DC 迁移进入淋巴管,并移行进入淋巴结,这是该阶段迁移的基础^[10-11]。CCR7 对于引导成熟的树突状细胞进入淋巴管尤为重要,这是因为淋巴管内皮能够产生 CCR7 的同族配体——次级淋巴组织趋化因子(SLC),树突状细胞从淋巴管引流到局部淋巴结,淋巴结中固有的成熟树突状细胞可产生另一种 CCR7 配体 EBI1 配体趋化因子 MIP-3 β (ELC),随着 CXCR4 和 CCR7 的表达增多,成熟的树突状细胞表现出对趋化因子 SDF-1 α 和 SLC、ELC 反应性升高,继而在这些细胞因子的趋化下迁移至淋巴结 T 区,与 T 细胞相互作用,将抗原提呈给 T 细胞,启动各类 T 细胞发生免疫应答,并最终达到真正的成熟^[12]。DC-CCR7 的高表达最终促使 DC 向二级淋巴器官迁移,目前认为外周 DC 向淋巴组织的迁移动力都是通过 MIP-3 β /SLC 作用于 CCR7 这条途径^[13-14]。CXCR4 可作为判断树突状细胞成熟程度的指标,研究表明树突状细胞发育得越成熟,树突状细胞膜上 CXCR4 的表达就越高^[15-16]。

我们的研究结果显示在 IL-8 的作用下,益气组 DC 趋化性最强,活血组、肺癌平组次之,而解毒组 DC 趋化性最低,益气组与空白血清组比较, $P < 0.05$; 益气组、活血组与解毒组比较, $P < 0.05$ 。在 RANTES 的作用下肺癌平组 DC 趋化性最强,依次为活血组、益气组次之,而解毒组 DC 趋化性最低,肺癌平组与空白血清组、解毒组比较, $P < 0.05$ 。趋化因子受体的研究表明,CCR7 在益气组表达最高,活血组、肺癌平组次之,解毒组最低,其中,益气组、活血组与解毒组比较, $P < 0.05$ 。CXCR4 在益气组、肺癌平组表达最高,活血组次之,解毒组最低,肺癌平组、益气组、解毒组与空白血清组比较, $P < 0.01$, 解毒组与其他各组比较, $P < 0.01$ 。

综上,肺癌平膏、益气药、活血药对 DC 的迁移有不同促进作用,解毒药物则明显抑制 DC 的迁移,而益气组和肺癌平组 CCR7, CXCR4 表达最高,解毒组最低,基本与趋化指数趋势相同,因此推测不同中药作用下 DC 趋化能力的改变可能与趋化因子受体的表达有关,但关于中药调节 DC 趋化因子受体的机制仍需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 曹雪涛. 树突状细胞、趋化因子与肿瘤免疫治疗 [C]. 第七届全国肿瘤生物治疗学术会议论文集, 2001.
- [2] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题 [J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95.
- [3] 姜廷良, 霍海如, 李兰芳, 等. 15 种中西药物含药血清对大鼠成骨细胞增殖成熟的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8(4): 342.
- [4] Wietz U, Christophers E. Modulation of human monocyte functions during acute bacterial infection [J]. Scand J Immunol, 1998, 28: 139.
- [5] 温国明, 郭悦青. 趋化因子受体 CCR7 及 CXCR4 在胃癌中的表达 [J]. 广东医学, 2006, 27(7): 968.
- [6] 高云霞, 关明, 苏兵, 等. SYBR Green I 实时定量 PCR 检测脑胶质瘤中 RASSF1A mRNA [J]. 复旦学报: 医学版, 2004, 31(6): 575.
- [7] Balkwill. Cancer and chemokine network [J]. Nature Rev Cancer, 2004, 4(6): 540.
- [8] R McCOLL. Chemokines and dendritic cell: A cercial alliance [J]. Immunol Cell Biology, 2002, 80(5): 489.
- [9] Cyster J G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymph-oid organs. [J]. J Exp Med, 1999, 189(3): 447.
- [10] Campbell D J, Kim C H, Butcher E C. Chemokines in the systemic organization of immunity [J]. Immunol Rev, 2003, 195: 58.
- [11] Hirao M, Onai N, Hiroishi K, et al. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes [J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2209.
- [12] Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites [J]. J Exp Med, 1998, 188(2): 373.
- [13] Cyster J G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs [J]. J Exp Med, 1999, 189(3): 447.
- [14] Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, et al. Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages [J]. Int Immunol, 2001, 13(2): 167.
- [15] Xia C Q, Kao K J. Effect of CXC chemokine platelet factor 4 on differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells [J]. Int Immunol, 2003, 15(8): 1007.
- [16] Jourdan P, Vendrell J P, Huguette M F, et al. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4⁺ CCR7⁺ human memory T cells [J]. J Immunol, 2000, 165(2): 716.

[责任编辑 何伟]