

羧甲基茯苓多糖抑制人外周血源性树突状细胞凋亡的体外研究

钱高潮,丁志祥,潘薇,金文涛,张琪*

(南京中医药大学附属常州市中医医院检验科,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:探讨羧甲基茯苓多糖(carboxymethyl pachymaram, CMP)对人外周血源性树突状细胞(dendritic cells, DC)凋亡的影响。方法:人外周血单核细胞经 rhGM-CSF 和 IL-4 诱导分化为不成熟 DC。LPS 诱导成熟的基础上分别加入不同浓度的 CMP (终浓度为 10、50、100 mg/L),以不加 CMP 为对照组,应用流式细胞术检测细胞凋亡率和趋化因子受体 CCR7 表达情况, Q-PCR 检测 CCR7 基因表达情况, Western blot 检测磷酸化 Akt、Akt 蛋白表达情况。结果:经 CMP 处理后 DC 凋亡率低于对照组,而 CCR7 的表达高于对照组,磷酸化 Akt 蛋白表达亦增高,且呈剂量依赖趋势。100 mg/L CMP 处理组细胞凋亡率显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。50 mg/L 和 100 mg/L CMP 处理组 CCR7 的表达和磷酸化 Akt 蛋白均显著高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: CMP 能抑制成熟 DC 的凋亡,其机制可能是通过上调 CCR7 的表达,经 PI3K/Akt 信号通路发挥作用。

[关键词] 羧甲基茯苓多糖;树突状细胞;CCR7;细胞凋亡

[中图分类号] R446.63

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)02-164-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150205

Carboxymethyl pachymaram inhibits apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells

Qian Gaochao, Ding Zhixiang, Pan Wei, Jin Wentao, Zhang Qi*

(Department of Clinical Laboratory, Changzhou TCM Hospital Affiliated to Nanjing TCM University, Changzhou 213003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of carboxymethyl pachymaram (CMP) on inhibiting apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. **Methods:** Human dendritic cells were induced from the peripheral blood monocytes in vitro using recombinant human GM-CSF and interleukin(IL)-4, and culture in the presence of CMP at different concentrations (10, 50, and 100 mg/L). The percentage of apoptosis and phosphorylated Akt proteins in mature DCs was measured in the presence or absence of CMP by flow cytometry and Western blot, respectively; The expression of CCR7 in mature DCs was measured in the presence or absence of CMP by flow cytometry and Q-PCR, respectively. **Results:** In CMP-induced DC, the percentage of apoptosis was significantly lower (in the presence of 100mg/L CMP) and the expression of CCR7 and phosphorylated Akt protein significantly higher (in the presence of 50mg/L and 100mg/L CMP) than that of control group, both in a dose-dependent model. **Conclusion:** CMP can inhibit the apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells and its anti-apoptotic mechanism is probably mediated by CCR7 and PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] carboxymethyl pachymaram; dendritic cell; CCR7; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 164-168]

[基金项目] 国家自然科学基金(81372454);江苏省中医药管理局科技计划项目(LB11017)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: czzyzhangqi@126.com

羧甲基茯苓多糖(carboxymethyl pachymaram, CMP)是中药茯苓的提取物,具有明显的抗肿瘤和免疫调节作用^[1]。有研究表明 CMP 能明显促进树突状细胞(dendritic cells, DC)的成熟并增强白介素-12(IL-12)的分泌^[2]。然而, CMP 对 DC 凋亡方面的影响尚未见报道。本研究拟应用体外培养人外周血

单核细胞(peripheral blood monocytes, PBMC)源性成熟 DC, 观察 CMP 对成熟 DC 凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

新鲜人外周血取自常州市中心血站,均在献血后 2 h 内进行外周血单个核细胞分离;CMP(浙江金源真菌多糖制品有限责任公司),分子量约为 9 500,含量为 93.3%,水分含量 6.5%,砷含量 < 0.05%,铅含量 < 0.1%。用前以 Hanks 液溶解并稀释至所需浓度;RPMI-1640 干粉、L-谷氨酰胺、青霉素-链霉素(P-S)双抗(Gibco 公司,美国);胎牛血清(FBS,杭州四季青公司);Ficoll 淋巴细胞分离液(Lymphoprep™ 公司,挪威);rhGM-CSF、rhIL-4(R&D 公司,美国);PE 标记小鼠抗人 CD83 和 HLA-DR、FITC 标记小鼠抗人 CD80 和 CD86 荧光单克隆抗体、PE 标记小鼠抗人 CD11c、APC 标记的小鼠抗人 CCR7 单克隆抗体(BD 公司,美国);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(北京宝赛公司);兔抗磷酸化 Akt(Ser473)、Akt(Cell Signaling Technology 公司,美国);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体及 ECL 化学发光底物(武汉博士德生物有限公司);RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国);逆转录试剂盒 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司,加拿大);引物合成(上海生工公司);荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR Green qPCR Master Mix (Roche 公司,德国);实时定量 PCR 仪(ABI 公司,美国);FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 DC 的培养及鉴定

用 Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC, PBS 洗涤 2 次,用 RPMI-1640 培养基(含 10% 灭活胎牛血清, 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺, 100 U/ml P-S 双抗)将 PBMC 密度调节至 5×10^6 个/ml, 加入 25 cm² 培养瓶, 37°C 5% CO₂ 培养 2 h, 洗去非贴壁细胞作为同种异体淋巴细胞保存备用。贴壁细胞用含 1 000 U/ml rhGM-CSF 和 500 U/ml rhIL-4 的 RPMI-1640 培养基培养, 第 3 天加入新培养基及 rhGM-CSF 和 rhIL-4。第 6 天收获未成熟 DC 按 1×10^6 个/ml 浓度接种 24 孔板, 每孔体积 1 ml, 继续用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 培养, 并加入 200 ng/ml LPS 刺激成熟, 同时分别加入不同浓度的 CMP(10、50、100 mg/L)。各组均在诱导 24 h 后收获 DC, 应用流式细胞仪检测

DC 表面标志 CD80 和 CD86 进行鉴定。DC 经 LPS 诱导成熟后, 细胞改换 0.1% 牛血清 RPMI-1640 培养液, 分别加入不同浓度的 CMP(10、50、100 mg/L)继续培养, 以不加 CMP 为对照组, 1 h 后收集培养细胞用于 RT-PCR 和 Western blot 检测; 培养 6 h 后收集细胞用于流式细胞术检测。

1.2.2 流式细胞术检测 DC 凋亡及 CCR7 表达

调细胞密度为 1×10^6 个/ml, PBS 洗 2 次, 重悬于 200 μ l 的结合缓冲液。加 FITC 标记的 Annexin V 10 μ l 和 PI 5 μ l, 轻轻混匀, 4°C 反应 30 min, 加入 300 μ l 结合缓冲液, 立即在流式细胞仪上检测, Cell Quest 软件分析细胞凋亡率。加 PE 标记小鼠抗人 CD11c 和 APC 标记的 CCR7 10 μ l, 4°C 反应 30 min, 加入 300 μ l 结合缓冲液, 立即在流式细胞仪上检测, 以 CD11c 阳性细胞设门, Cell Quest 软件分析 DC 表面 CCR7 表达阳性细胞率。每个样本都用荧光标记同型 IgG 作为相应的阴性对照。

1.2.3 RT-PCR 检测

用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 溶于 DEPC 水中, 紫外分光光度计测定 $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 的比值在 1.8~2.0 之间, 并计算 RNA 浓度。取总 RNA 2 μ l(约 2 μ g), 逆转录合成 cDNA。CCR7 上游引物 5'-GACCGATACCTACCTGCTCAAC-3', 下游引物 5'-AAAGTGGACACCGAAGACCC-3'。 β -actin 上游引物 5'AGTTGCGACACCCTTTCTTG-3', 下游引物 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。PCR 反应体系: SYBR Green Master Mix 10 μ l, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l, cDNA 1 μ l, 加灭菌双蒸水至 20 μ l。PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 20 s \rightarrow 60°C 20 s \rightarrow 72°C 20 s(收集荧光), 共反应 45 个循环, 循环后设置 55~90°C 每隔 0.3°C 读荧光值生成溶解曲线。每样本重复测定 3 次, 以 β -actin 为内参, 实验结果采用相对定量法, 计算各样本 ΔC_t 值(目的基因 C_t 值-内参基因 C_t 值), 各样本目的基因相对定量以 $2^{-\Delta C_t}$ 表示。

1.2.4 Western blot 检测磷酸化 Akt(p-Akt)、Akt 蛋白表达

收集细胞后用冷 PBS 洗 3 次, 细胞裂解后抽提总蛋白, Bradford 法定量, 加热变性, 等量蛋白上样行 SDS-PAGE。电转至 PVDF 膜, 用 TBS 配制的 5% 脱脂奶粉封闭过夜。加入兔抗磷酸化 Akt (1:1 000)、Akt(1:1 000)一抗室温孵育 2 h, TTBS(TBS 加入 0.1% Tween-20)洗膜, 羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, 洗膜后经 ECL 放射自显影, 曝光于 Kodak

胶片。以 Akt 为参照,用图像分析软件 GELpro3.0 对条带吸光度值进行分析。

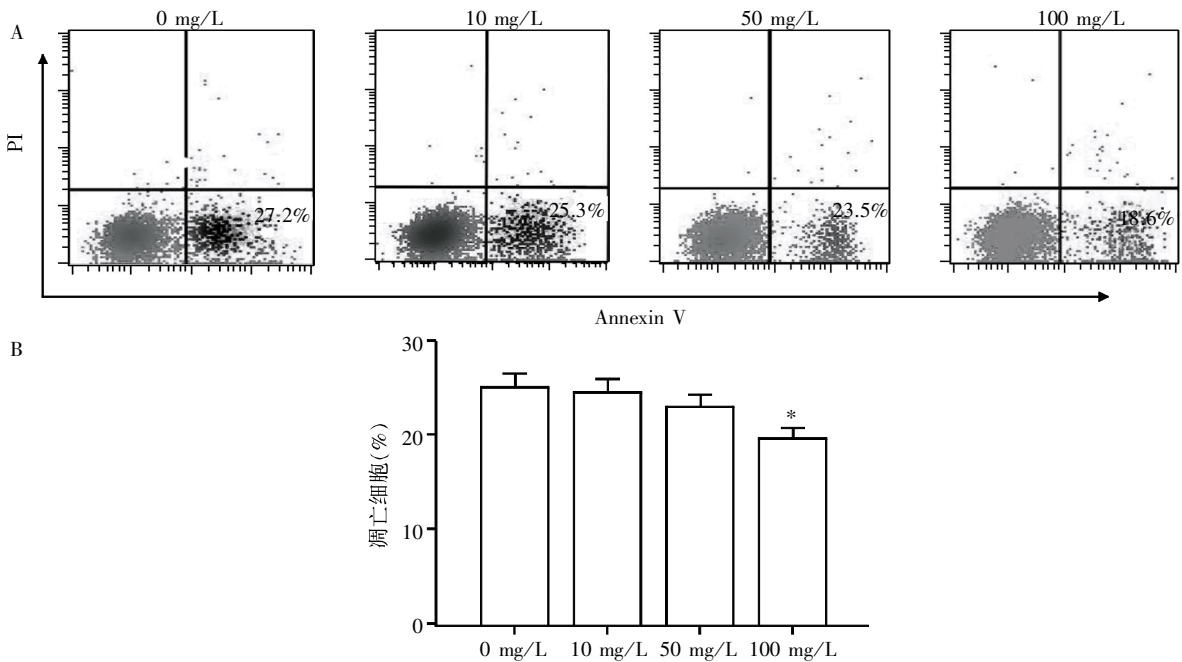
1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件包进行统计学分析。由于实验数据呈正态分布,各组数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMP 的抗凋亡作用

经 LPS 刺激培养后,DC 细胞经流式细胞术检测 CD80、CD86 及 HLA-DR 阳性表达率分别为 $(67.4 \pm 7.3)\%$ 、 $(76.4 \pm 7.8)\%$ 、 $(97.6 \pm 3.2)\%$ ($n=5$),结合倒置显微镜下细胞形态,说明为成熟 DC。流式细胞术检测结果显示,DC 在含 CMP(终浓度为 10、50、100 mg/L)的 0.1% 牛血清培养液培养 6 h 后,细胞凋亡率分别为 $(24.56 \pm 2.25)\%$ 、 $(23.06 \pm 2.24)\%$ 、 $(19.58 \pm 2.19)\%$,对照组细胞凋亡率为 $(25.18 \pm 1.94)\%$ 。100 mg/L CMP 刺激组细胞凋亡率显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$,图 1)。



A: 流式细胞术检测结果; B: 凋亡情况比较,与 0 mg/L 比较, * $P < 0.001$ ($n=5$)。

图 1 不同浓度 CMP 对人外周血源性树突状细胞凋亡的影响

Figure 1 The effect of CMP at different concentrations in inhibiting the apoptosis of human monocyte-derived dendritic cells *in vitro*

2.2 CMP 对 CCR7 表达的影响

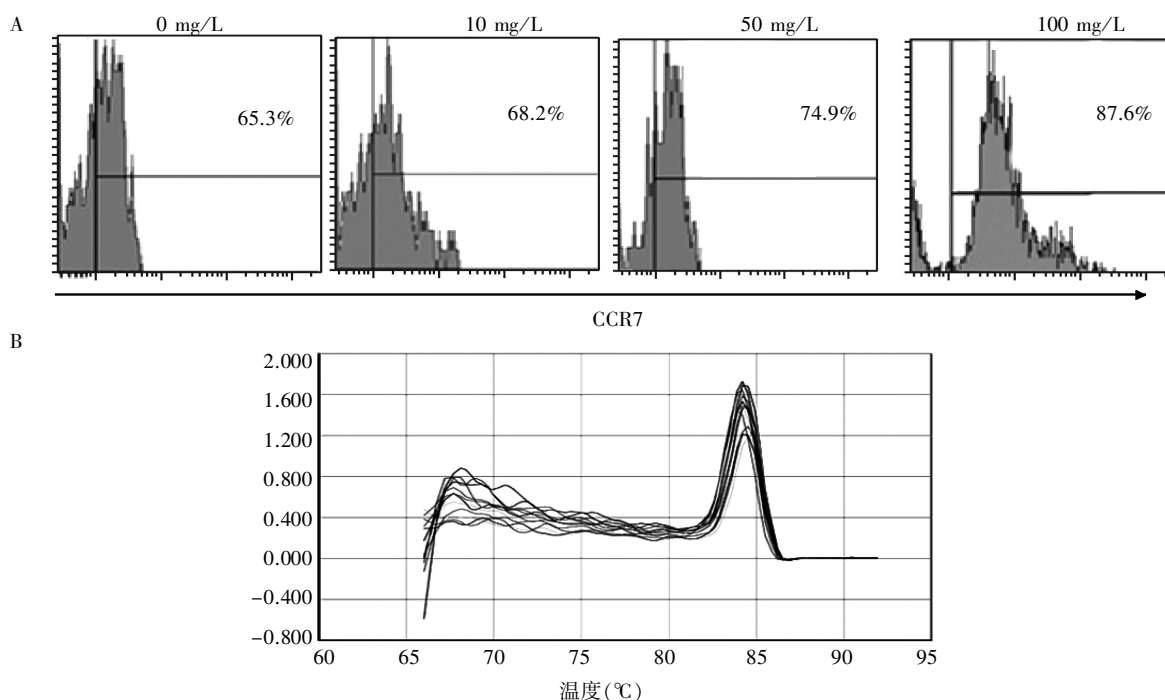
流式细胞术检测结果显示,DC 在含 CMP (终浓度为 10、50、100 mg/L) 的 0.1% 牛血清培养液培养 6 h 后,细胞表面 CCR7 的表达阳性率分别为 $(68.56 \pm 6.25)\%$ 、 $(74.58 \pm 7.25)\%$ 、 $(82.59 \pm 7.64)\%$,对照组细胞 CCR7 的表达阳性率为 $(65.18 \pm 5.94)\%$ 。50 mg/L 和 100 mg/L CMP 刺激组 CCR7 表达阳性率显著高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $n=5$,图 2A);Q-PCR 结果显示,CCR7/ β -actin 比值分别为 1.08 ± 0.12 、 1.26 ± 0.13 、 1.35 ± 0.13 ,对照组细胞 1.00 ± 0.10 。50 mg/L 和 100 mg/L CMP 刺激组 CCR7/ β -actin 表达水平显著高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $n=5$)。

2.3 CMP 对 DC 中 Akt 磷酸化的影响

细胞在 0.1% 牛血清培养液饥饿 1 h,检测磷酸化 Akt 蛋白表达。结果显示,DC 中磷酸化 Akt 水平随 CMP 浓度增加而增加,与对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$,图 3)。总 Akt 蛋白表达无明显变化。

3 讨论

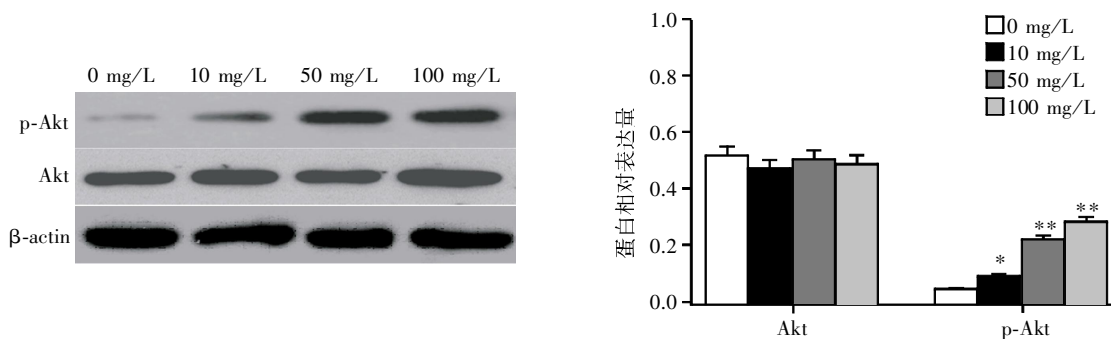
DC 作为已知功能最强的抗原递呈细胞,可通过摄取、加工处理和递呈抗原,诱导 T 细胞分化,因此在诱导、调节、维持机体免疫反应中起核心作用^[3]。近年来以 DC 疫苗治疗肿瘤的生物疗法在临床和科研中均取得了可喜成绩^[4-9]。DC 疫苗的成熟与否是 DC 疫苗疗效的关键,但如何减少其在向淋巴组织迁移过程中产生的凋亡,保证有足够量 DC



A: 流式细胞术检测结果; B: 不同浓度 CMP 培养条件下人外周血源性 DC CCR7 基因 Q-PCR 荧光值生成熔解曲线。

图 2 不同浓度 CMP 对人外周血源性树突状细胞 CCR7 表达的影响

Figure 2 The effect of CMP at different concentrations in expression of CCR7 on human monocyte-derived dendritic cells *in vitro*



与 0 mg/L 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=5$)。

图 3 不同浓度 CMP 培养后人外周血源性树突状细胞磷酸化 Akt 蛋白表达变化

Figure 3 The effect of CMP at different concentrations in phosphorylated Akt proteins in mature human monocyte-derived dendritic cells

到达淋巴组织也是值得研究的一个重要环节。引起 DC 凋亡的因素很多, 感染因素、肿瘤等均可引起 DC 凋亡, 促成熟剂 LPS 也会引起 DC 凋亡^[10]; CCR7 主要介导淋巴细胞的迁移归巢, 近来报道 CCR7 可介导 DC 细胞内抗凋亡信号的转导。CCL21 作用于 CCR7 后, 通过 PI3K/Akt 信号通路促进细胞存活, 阻止细胞凋亡^[11]。

本研究选用 CMP 作为研究对象, 观察其对人外周血源性 DC 凋亡的影响。结果显示, 不同浓度 CMP 体外均能抑制 DC 的凋亡, 经 CMP 处理后 DC 凋

亡率低于对照组, 且呈剂量依赖趋势。其中 100 mg/L CMP 处理组细胞凋亡率显著低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明在 LPS 刺激人外周血源性 DC 成熟的同时加入一定浓度的 CMP 共同培养能明显抑制 DC 的凋亡。随后我们对其可能存在的机制进行了进一步探讨, 发现经 CMP 培养的人外周血源性 DC 趋化因子 CCR7 的表达均有不同程度的上升, 其中 50 mg/L 和 100 mg/L CMP 处理组 CCR7 的表达显著高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。PI3K/Akt 通路是介导细胞存活的

重要通路,Akt 也称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),是 PI3K 的主要下游靶目标,Akt 磷酸化激活后通过参与多条信号转导途径促进细胞增殖和阻止细胞凋亡,p-Akt 可以作为衡量该通路活化的指标^[12]。本研究通过 Western blot 检测发现人外周血源性 DC 经 CMP 处理后,p-Akt 蛋白均有明显增加,Akt 蛋白变化不明显。

综上所述,CMP 在体外可抑制成熟 DC 的凋亡,其机制很可能是通过上调 CCR7 的表达,经 PI3K/Akt 信号通路发挥作用。由于 CMP 相对廉价、安全,因此在抗肿瘤免疫治疗中具有一定临床应用价值。

[参考文献]

[1] 冯亚龙,赵英永,丁凡,等. 茯苓皮的化学成分及药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):1098-1102

[2] 侯安继,杨占秋,黄菁,等. 羧甲基茯苓多糖上调 HBV 转基因小鼠树突状细胞功能[J]. 武汉大学学报:理学版,2006,52(6):778-782

[3] Hancock DG,Guy TV,Shklovskaya E,et al. Experimental models to investigate the function of dendritic cell subsets:challenges and implications[J]. Clin Exp Immunol,2013,171(2):147-154

[4] Cintolo JA,Datta J,Mathew SJ,et al. Dendritic cell-based vaccines:barriers and opportunities[J]. Future Oncol,2012,8(10):1273-1299

[5] Xie S,Wu X,Zhang G,et al. Remarkable regression of a lung recurrence from an undifferentiated embryonal sar-

coma of the liver treated with a DC vaccine combined with immune cells:A case report[J]. Cell Immunol,2014,290(2):185-189

[6] Jung ID,Shin SJ,Lee MG,et al. Enhancement of tumor-specific T cell-mediated immunity in dendritic cell-based vaccines by Mycobacterium tuberculosis heat shock protein X [J]. J Immunol,2014,193(3):1233-1245

[7] Zhang J,Yu J,Yang L,et al. Enhanced activation of human dendritic cells by silencing SOCS1 and activating TLRs simultaneously [J]. Cancer Immunol Immunother,2012,61(10):1653-1661

[8] Hong B,Ren W,Song XT,et al. Human suppressor of cytokine signaling 1 controls immunostimulatory activity of monocyte-derived dendritic cells[J]. Cancer Res,2009,69(20):8076-8084

[9] Wimmers F,Schreibelt G,Sköld AE,et al. Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy:From in vitro generated Monocyte-Derived DCs to naturally circulating DC subsets[J]. Front Immunol,2014,5:165

[10] 曹承楼,孙克伟. 树突状细胞凋亡的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2013,29(1) 102-105

[11] Liu C,Lin J,Zhao L,et al. Gamma-ray irradiation impairs dendritic cell migration to CCL19 by down-regulation of CCR7 and induction of cell apoptosis[J]. Int J Biol Sci,2011,7(2):168-179

[12] Zhang L,Zhao H,Zhang X,et al. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt,p-CREB,BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat[J]. Brain Res Bull,2013,96(1):45-53

[收稿日期] 2014-06-29

(上接第 163 页)

genic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth[J]. PLoS One,2008,3(7):e2557

[13] Akao Y,Nakagawa Y,Naoe T. microRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers [J]. Oncol Rep,2006,16(4):845-850

[14] Shi B,Sepp-Lorenzino L,Prisco M,et al. microRNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells[J]. J Biol Chem,2007,282(45):32582-32590

[15] Sachdeva M,Zhu S,Wu F,et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145 [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106(9):3207-3012

[16] Chen X,Gong J,Zeng H,et al. MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression [J].

Cancer Res,2010,70(7):2728-2738

[17] Sachdeva M,Mo YY. microRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1 [J]. Cancer Res,2010,70(1):378-387

[18] 王家琪,高悠水,梅炯,等. Ad-VEGF-siRNA 抑制荷人骨肉瘤裸鼠血管生成的形态学研究[J]. 癌症,2009,28(6):581-586

[19] Fan L,Wu Q,Shao ZW,et al. MicroRNA-145 targets vascular endothelial growth factor and inhibits invasion and metastasis of osteosarcoma cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin,2012,44(5):407-414

[20] Charity RM,Foukas AF,Deshmukh NS,et al. Vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma [J]. Clin Orthop Relat Res,2006,448(1):193-198

[收稿日期] 2014-04-29