

## TLR7 激动剂 Imiquimod 减弱转染 IL-10 的小鼠髓样树突状细胞的负向调节功能

弓 莉<sup>1,2\*</sup>, 王元占<sup>1</sup>, 卢 涛<sup>2,3</sup>, 白晓燕<sup>2</sup>, 朱玉峰<sup>1</sup>, 吴湘慧<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南方医科大学南方医院实验动物研究中心,<sup>2</sup>肾内科,广东 广州 510515;<sup>3</sup>海口市人民医院肾内科,海南 海口 570001)

**[摘要]** 目的:观察 Toll 样受体 7(Toll like receptor 7, TLR7)激动剂 Imiquimod 对白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)转染小鼠骨髓来源的树突状细胞(bone-marrow derived dendritic cell, mDC)免疫功能影响。方法:转染 IL-10 至小鼠 mDC, TLR7 激动剂 Imiquimod 刺激 48 h, 利用流式细胞仪检测 DC 表面标志 MHC II、CD80、CD86 及 FasL 等分子的表达;ELISA 检测细胞产生 IL-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )。结果:IL-10 抑制 mDC 表达 MHC II、CD80、CD86 分子,降低其分泌 IL-6、TNF- $\alpha$ , 促进其表达 FasL, 而 TLR7 激动剂刺激增加了 IL-10 转染 mDC 表达 MHC II、CD80、CD86 分子,促进其产生 IL-6、TNF- $\alpha$ , 抑制 FasL 表达。结论:TLR7 激动剂可逆转 IL-10 诱发的 DC 免疫应答低下。

**[关键词]** IL-10; 树突状细胞; TLR7 激动剂

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)10-1360-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20141005

## TLR7 agonist Imiquimod reduces the negative regulatory function of IL-10 transfected mouse bone marrow-derived dendritic cells

Gong Li<sup>1,2\*</sup>, Wang Yuanzhan<sup>1</sup>, Lu Tao<sup>2,3</sup>, Bai Xiaoyan<sup>2</sup>, Zhu Yufeng<sup>1</sup>, Wu Xianghui<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Center of Laboratory Animals, <sup>2</sup>Department of Nephrology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515; <sup>3</sup>Department of Nephrology, Haikou People's Hospital, Haikou 570001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of TLR7 agonist on the immune function of IL-10 transfected bone-marrow derived dendritic cell (mDC). **Methods:** The IL-10 plasmid was transfected to mouse mDC, and TLR7 agonist, Imiquimod, was added to mDC for 48 h. The expression of MHC II, CD80, CD86, FasL in mDC were detected with flow cytometry, and the production of the IL-6 and TNF- $\alpha$  was determined by ELISA. **Results:** IL-10 suppressed the expression of MHC II, CD80, CD86, decreased the production of IL-6 and TNF- $\alpha$ , and increased the expression of FasL on mDC. Imiquimod increased the expression of MHC II, CD80 and CD86, which enhanced the production of IL-6 and TNF- $\alpha$ , but inhibited of FasL expression by the IL-10 transfected mDC. **Conclusion:** TLR7 activation reverses IL-10 induced low response of mDC.

**[Key words]** IL-10; dendritic cell; TLR7 agonist

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1360-1363]

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前所知的功能最强的抗原提呈细胞,是连接固有免疫和适应性免疫的桥梁。一般情况下,DC 处于未成熟状态,未成熟的 DC(imDC)主要发挥抗原摄取作用,摄取抗原后 DC 成熟并由非淋巴器官归巢到淋巴结,活

化机体初始淋巴细胞,介导细胞免疫和体液免疫。而另一方面,DC 也可以诱导免疫耐受,这种 DC 被称为耐受性 DC (Tol-DC)。耐受性 DC 指表型未成熟,能抑制 T 细胞反应的 DC<sup>[1]</sup>。很多因素可以影响 DC 成熟,白细胞介素 10(IL-10)、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等可抑制其成熟。imDC 可分泌 IL-10,而 IL-10 可以诱导 T 细胞无能,抑制 T 细胞增殖。本研 究小组用骨髓来源的 DC 细胞(mDC)制备转染 IL-10 的 Tol-DC, 并尝试用模式识别受体激动剂刺激

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2013B060300012; 2014A030304024);南方医院院长基金(201213006)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: gzgongli@163.com

Tol-DC, 观察对其免疫功能的影响。

Toll 样受体 7 (Toll like receptor 7, TLR7) 是一种表达于细胞内涵体膜表面的跨膜信号转导受体, 能识别某些小分子的抗病毒化合物和病毒单链 RNA (single-stranded RNA, ssRNA), 广泛存在于体内免疫细胞中, 尤以 DC 为主。本研究用 TLR7 的激动剂: 人工合成的咪唑并喹啉化合物咪喹莫特 (Imiquimod) 来刺激小鼠骨髓树突状细胞, 观察其对 IL-10 转染的树突状细胞的表型及分泌细胞因子功能的影响<sup>[2]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠重组 IL-4、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 购自美国 Preprotech 公司, pcDNA3.1-mIL-10 质粒为南方医科大学基础医学院免疫教研室馈赠。PE 标记的小鼠 CD11c、IA/IE、CD80、CD86、FasL 抗体购自美国 Biolegend 公司。检测 IL-10、IL-6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的 ELISA 试剂盒购自美国 eBioscience 公司, 转染用脂质体购自美国 Invitrogen 公司。完全培养基 RPMI1640 及新生小牛血清均购自美国 Gibco 公司, TLR7 激动剂 Imiquimod 购自美国 Invivogen 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠 mDC 的制备与转染

断颈处死 6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠, 无菌取股骨髓细胞并调整为  $1 \times 10^6$  个/mL, 加入含 10 ng/mL IL-4 及 GM-CSF, 10% 胎牛血清的 RPMI1640 于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养 3 d 后半量换液, 7 d 后利用 PE 标记抗小鼠 CD11c 抗体进行标记, 流式细胞仪检测 mDC 纯度。诱导前后检测 IA、CD80、CD86 表达。

#### 1.2.2 pcDNA3.1/pcDNA3.1-mIL-10 转染 mDC

收集培养 7 d 的 mDC 用 PBS 洗涤后, 按  $1 \times 10^9$  个/L 的细胞密度分成 3 组, 每组设 3 个复孔, 加入到 24 孔培养板中。当细胞融合至 50%~60% 用于转染。第 1 组为未转染的对照组, 第 2 组加入 100  $\mu$ g/L pcDNA3.1 空质粒, 第 3 组加入 100  $\mu$ g/L pcDNA3.1-mIL-10。用于转染的质粒与脂质体的比例为 1:4, 将质粒与脂质体轻轻混合均匀, 室温放置 15 min, 以形成包裹复合物。将质粒-脂质体复合物吸入培养板中混合均匀, 另外加入新鲜的无血清、无抗生素的 RPMI1640 培养基, 在 37°C 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 48 h 后, ELISA 检测细胞培养上清中 IL-10 浓度以判断转染的效果。上述实验均重复了 3 次。

#### 1.2.3 TLR7 激动剂 Imiquimod 刺激 DC

于培养的 DC 细胞中加入 5  $\mu$ g/mL Imiquimod 培养 48 h, PBS 洗 3 次待检。

#### 1.2.4 流式细胞仪检测

调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 分别标记抗体 PE-IA/IE、PE-CD80、PE-CD86、PE-FasL。室温孵育 30 min, PBS 洗 2 遍, 加入 0.5 mL PBS 重悬, 上流式细胞仪进行分析, 上述实验均重复了 3 次。

#### 1.2.5 细胞因子检测

根据试剂盒说明书检测 DC 培养上清中的 IL-6、IL-10 和 TNF- $\alpha$ , 上述实验均重复了 3 次。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS13.0 统计软件进行分析。数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用方差分析。P  $\leq$  0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-10 转染 mDC 的制备

流式检测显示 90% 以上为 CD11c 阳性细胞, DC 诱导前后均表达 IA、CD80、CD86 (图 1)。IL-10 转染 DC 48 h 后, ELISA 检测  $1 \times 10^6$  个细胞上清中 IL-10 含量约为 300 pg/mL, 明显高于转染前 (20 pg/mL), 提示已成功建立了可分泌 IL-10 的 DC (P < 0.05, n = 3)。

### 2.2 Imiquimod 刺激后 DC 表面共刺激分子的变化

转染 IL-10 的 DC 表面协同刺激分子 CD80 和 CD86 表达明显低于未转染组与空载体对照组 (P < 0.05, n = 3); 经过 Imiquimod 刺激 48 h 后, 各组 DC 表达 CD80 和 CD86 明显升高, 甚至 IL-10 转染组 CD80 表达高于 DC 组与空载体对照组 (P < 0.05, n = 3, 图 2)。

### 2.3 Imiquimod 对转染 IL-10 的 DC 细胞合成 IL-6 及 TNF- $\alpha$ 的影响

转染 IL-10 的 DC 分泌 IL-6 及 TNF- $\alpha$  减少 (P < 0.01, n = 3), 但经过 Imiquimod 刺激 48 h 后, IL-10 转染 DC 合成 IL-6 及 TNF- $\alpha$  明显增加 (P < 0.01, n = 3, 图 3)。

### 2.4 Imiquimod 刺激后 DC 表面 FasL 类分子表达

IL-10 转染 DC 的 FasL 表达明显升高, 经过 Imiquimod 刺激 48 h 后, IL-10 转染 DC 组 FasL 表达明显降低 (P < 0.01, n = 3, 图 4)。

## 3 讨论

DC 由于其强大的抗原递呈以及免疫调节能力日益受到人们的重视。根据 DC 在免疫反应中的作用和成熟状态不同将 DC 分为未成熟和成熟 DC, 其

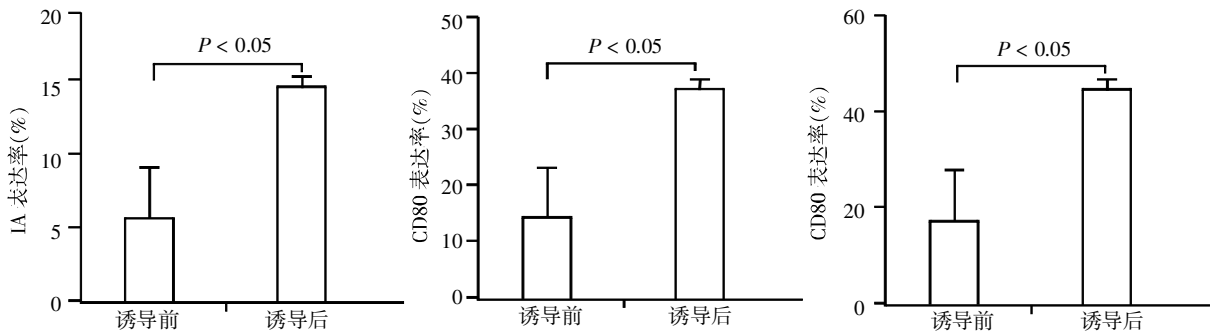


图 1 IL-4、GM-CSF 诱导 DC 成熟后 IA、CD80、CD86 表达变化

Figure 1 Changes of IA, CD80 and CD86 expression after induction by IL-4 and GM-CSF

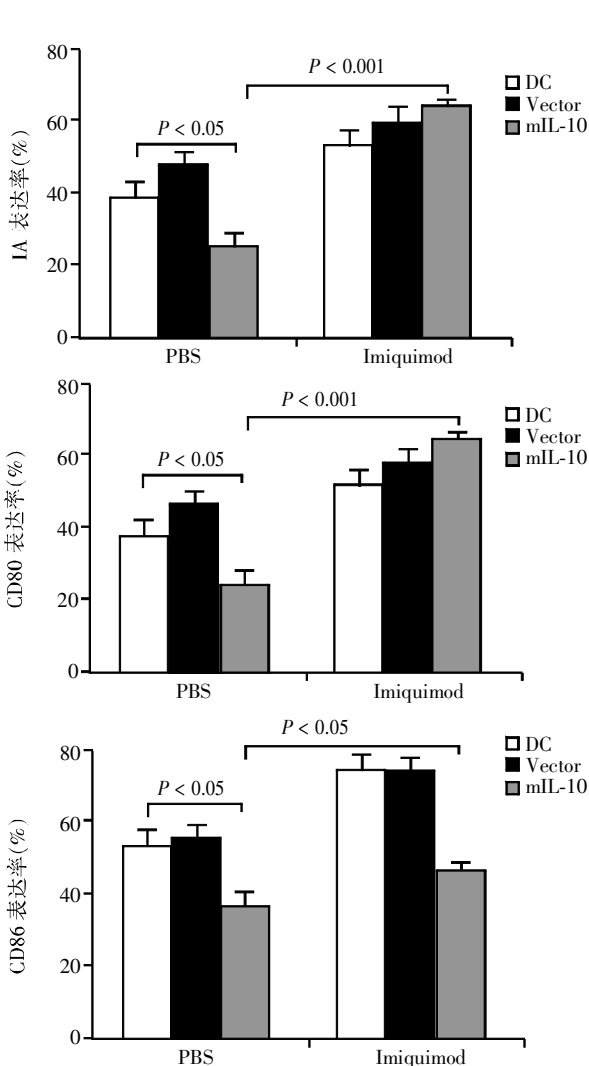


图 2 Imiquimod 刺激对 DC 表达 IA、CD80、CD86 的影响  
Figure 2 The effects of imiquimod on the expression of the IA, CD80, CD86 in the DCs

中未成熟 DC 在感染免疫、自身免疫性疾病、免疫缺陷、肿瘤治疗、器官移植等方面得到广泛的应用<sup>[34]</sup>。已经发现淋巴细胞活化信号的分子表达,程序性细胞死亡配体(PDL-1)和免疫球蛋白样转录体(ILT)家族(ILT-3/ILT4)的抑制受体与 DC 的耐受性有关<sup>[56]</sup>,另

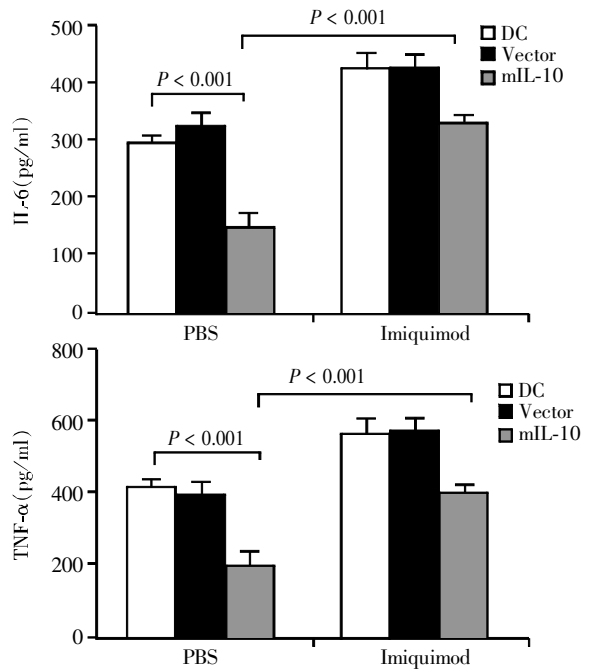


图 3 Imiquimod 刺激对 DC 分泌 IL-6 及 TNF-α 的影响

Figure 3 The effects of imiquimod on the production of IL-6 and TNF-α by the DCs

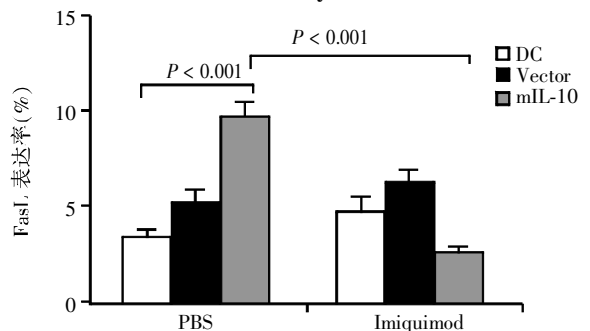


图 4 Imiquimod 刺激对 DC 表达 FasL 的影响

Figure 4 The effects of imiquimod on the expression of the FasL in the DC

外,通过一些细胞因子的刺激,DC 同样也能够获得致免疫耐受表型。其中 IL-10 可以诱导鼠 mDC 向不成熟 DC 极化,从而介导效应性 T 细胞无能。本研究选用 IL-10 作用的小鼠 mDC 为研究对象,通过 TLR7 激动剂 Imiquimod 作用于 DC 细胞以及转染

IL-10 的 DC 细胞,发现相关分子 CD80、CD86、MHC II 等分子表达降低,TNF- $\alpha$  分泌减少,表明 IL-10 降低其抗原提呈能力和免疫应答,FasL 表达增加,表明其清除 Fas 活化 T 细胞的能力同样增强,有利于免疫耐受的形成。

TLR7 是 TLRs 家族中的重要成员,主要表达在 DC、B 细胞和巨噬细胞等抗原提呈细胞。参与对细菌、病毒、寄生虫和真菌感染的免疫应答,用 TLR7 配体刺激 DC 或巨噬细胞可以活化 MyD88、IRAK、NF- $\kappa$ B、MAPK 等<sup>[7]</sup>,诱导促炎症因子产生,在天然免疫和获得性免疫方面发挥重要作用。TLR7 的天然配体是病毒 ssRNA,通过活化 TLR7 途径发挥抗病毒和免疫调节作用。某些小分子抗病毒化合物,如 imiquimod 等,也是 TLR7 的激动剂,这些 imidazoquinoline 还可以 TLR7 依赖的方式促进 DC 上调共刺激分子 CD40、CD80、CD86、MHC I 和 MHC II 类分子表达。最近的体外实验发现,在不添加外源性刺激的情况下,通过 TLR7 通路活化而成熟的脾脏浆细胞样 DCs 仍然可以显著促使 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 细胞的增殖,而成熟 CD4<sup>+</sup> DCs、CD4<sup>-</sup> DCs 以及经其他 TLR 通路活化而成熟的脾脏浆细胞样 DCs 却不能使 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T 细胞增殖,说明 TLR7 激动剂刺激参与 DC 耐受的产生和维持<sup>[8]</sup>。

在本研究中,TLR7 激动剂不仅使小鼠树突状细胞免疫应答能力增强,而且使 IL-10 诱导的耐受型 DC 表面共刺激分子表达明显增强,同时合成 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子增强,有利于免疫应答的产生;另外,TLR7 激动剂使转染了 IL-10 的耐受型 DC 的免疫功能发生改变,影响了 DC 介导的免疫负向

调节作用。

#### [参考文献]

- [1] Mosmann TR, Livingstone AM. Dendritic cells: the immune information management experts[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(6): 564-566
- [2] Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5598-5603
- [3] Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells: All present and correct[J]. *Am J Transplant*, 2010, 10(2): 214-219
- [4] Diana J, Moura IC, Vaugler C, et al. Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice[J]. *J Immunol*, 2013, 191(1): 2335
- [5] Ju XS, Hacker C, Scherer B, et al. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation[J]. *Gene*, 2004, 331(4): 159-164
- [6] Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, et al. Tolerization of dendritic cells by T cell: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(3): 237-243
- [7] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 Myd88-dependent signaling pathway[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(3): 196-200
- [8] Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, et al. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2008, 180(9): 5862-5870

[收稿日期] 2013-12-01