

· 论 著 ·

枸杞多糖对诱导树突状细胞成熟和增强 T 细胞增殖的影响

张纯清¹, 单铁英¹, 杨书良², 袁 征³

(河北工程大学医学院:1. 人体解剖学与组织胚胎学系;2. 病理学系;3. 生理学系, 邯郸 056002)

摘要:目的 观察枸杞多糖对诱导树突状细胞(DC)成熟和 T 细胞增殖的作用。方法 通过密度梯度离心法分离人外周血单核细胞,采用细胞因子体外培养 7 d 后分别加入枸杞多糖,观察细胞形态变化,用免疫细胞化学法检测 DC 分子的表达,通过混合淋巴细胞反应检测细胞提呈抗原的能力。结果 经枸杞多糖诱导的 DC 分子表达有明显变化(MHC II⁺、CD86⁺、CD83⁺),差异有统计学意义($P < 0.05$),而经 RPMI 1640 培养的 DC 分子表达与培养前无明显变化。经枸杞多糖诱导的 DC 能促进 T 细胞增殖能力($P < 0.05$)。结论 枸杞多糖能促进 DC 成熟和增强 T 细胞增殖能力。

关键词:枸杞多糖;树突状细胞;抗肿瘤;人

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.011

中图分类号:R282.71;R392.32

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2117-02

Effect of inducing dendritic cell mature and stimulating T cell proliferation by lycium bararum polysaccharides

ZHANG Chun-qing¹, SHAN Tie-ying¹, YANG Shu-liang², et al.

(1. Department of Human Anatomy and Histo-Embryology; 2. Department of pathology; 3. Department of Physiology, College of Medical Sciences, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056002, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of inducing dendritic cell mature and stimulating T cell proliferation by lycium bararum polysaccharides. **Methods** Monocytes obtained from human peripheral blood by density gradient centrifugation had been cultured in the presence of cytokines in vitro for seven days, and then was cultured in the presence of lycium bararum polysaccharides. Morphologic changes and molecule express of DC were observed by immunocytochemical method. The ability of antigenic presentation was examined by mixed lymphology reaction. **Results** DC molecule express had marked change by lycium bararum polysaccharides; MHC II⁺, CD86⁺, CD83⁺ ($P < 0.01$), DC molecule express has not marked change by RPMI 1640. DC induced by lycium bararum polysaccharides could reinforce effective T cells proliferation ($P < 0.01$). **Conclusion** Lycium bararum polysaccharides can promote the maturity of DC and reinforce proliferation of T cells.

Key words: lycium bararum polysaccharides; dendritic cell; anti-tumor; human

枸杞多糖(lycium bararum polysaccharides, LBP)是传统中药材枸杞的主要成分之一,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖等 6 种单糖组成。近年来对 LBP 的药理作用进行了广泛的研究,发现 LBP 具有调节机体免疫、抗肿瘤等功能^[1-4]。LBP 的研究已成为当前热门课题,但国内外还未见 LBP 对人树突状细胞(dendritic cell, DC)成熟和功能影响的报道。本研究观察 LBP 诱导 DC 成熟和增强 T 细胞增殖作用,研究其具体作用机制,为进一步研究 LBP 调节特异性免疫应答机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 新鲜人外周血购自北京市血库,淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂, rhGM-CSF、rhIL-2 和 rhIL-4 购自德国 R&D 公司, 尼龙毛购自 FENWAL USA, 鼠抗人 MHC II、CD86、CD83 即用型二步法生物素检测试剂盒(PV9000), FITC 标记二抗购自北京中山生物技术有限公司, LBP 购自美国泛华公司。

1.2 实验方 法

1.2.1 DC 诱导培养 取正常人外周血 200 mL, 以淋巴细胞分离液分离单个核细胞于培养皿培养 2 h 后, 取贴壁细胞即单核细胞, 加入 GM-CSF 1 mL (1 000 u/mL)、IL-4 1 mL (500 u/mL) 培养 7 d 后, 收获的细胞加入终浓度为 100 μg/mL 的 LBP, 加入等量 RPMI 1640 作为对照; 37 °C 培养 48 h 后收集

细胞。观察 DC 形态变化。

1.2.2 免疫细胞化学法检测 DC 分子表达 取固定好的 DC 细胞涂片, DC 纯度为 90%。用 3% H₂O₂ 甲醇溶液室温孵育 5~10 min, 以消除内源性过氧化酶。蒸馏水冲洗, 0.01 M PBS (pH 7.3) 浸洗 3 次, 每次 5 min。0.1% Triton X-100 室温孵育 5 min。0.01 M PBS (pH 7.3) 浸洗 3 次, 每次 5 min。滴加一抗(鼠抗人 MHC II、CD86、CD83 抗体), 反应 1 h 后, 0.01 M PBS (pH 7.3) 浸洗 3 次, 每次 5 min。滴加 PV9000 试剂盒内试剂 1, 37 °C 孵育 10~30 min。用 0.01 M PBS (pH 7.3) 浸洗 3 次, 每次 5 min。滴加 PV9000 试剂盒内试剂 2, 37 °C 孵育 10~30 min。用 0.01 M PBS (pH 7.3) 浸洗 3 次, 每次 5 min。滴加 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) 浸泡 5 min。DAB 显色, 显色时间 5~10 min。用自来水充分冲洗, 复染核后, 脱水、透明、封片、光镜观察。

1.2.3 T 细胞的获得 取同种异体外周血, 按以上方法获得单个核细胞于培养皿培养 2 h 后, 收集非贴壁细胞即为淋巴细胞, 将 3×10⁷ 个/mL 淋巴细胞注入尼龙毛柱, 放入培养箱静置 1 h。用培养液洗柱, 洗下的即为 T 细胞。

1.2.4 T 细胞的激活和增殖 调节按以上方法获得的 T 细胞浓度为 2×10⁵ 个/100 μL, 以每孔 100 μL 加入 96 孔板, 作为反应细胞。收集按以上方法获得的两组 DC 作为刺激细胞。调整 DC 浓度为 2×10³、1×10⁴、2×10⁴ 个/孔, 分别与 T 细胞

混合,总体积为每孔 200 μL ,每组设 5 个复孔。培养 120 h,于最后 18 h 加入 10 μL MTT(5 mg/mL)离心,弃上清液,加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)。用酶标仪检测 OD 值,并计算细胞增殖指数。增殖指数=(实验组 OD 值-反应细胞对照组 OD 值-刺激细胞对照组 OD 值)/反应细胞对照组 OD 值。

1.3 统计学方法 所得数据用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DC 的体外诱导与培养 在倒置相差显微镜下可见正常人外周血分离的单核细胞在培养过程中体积逐渐增大,细胞形态由圆形变为逗点状、蝌蚪状、长梭形或不规则形,并向四周伸出不规则状的突起。经 LBP 作用的 DC 呈悬浮状生长,体积较大,大小不等,呈圆形,细胞表面有突起且在培养液中可摆动或伸缩。而经 RPMI 1640 培养的 DC 对照组与培养前无明显变化。

2.2 LBP 对 DC MHC II、CD86、CD83 等分子表达的影响 经 LBP 诱导培养的 DC 分子表达有明显变化(MHC II⁺、CD86⁺、CD83⁺),而经 RPMI 1640 培养的 DC 分子表达与培养前变化不明显(表 1)。

表 1 两组培养 2 d 后 DC 分子表达的图像分析结果($\bar{x} \pm s$)

分子表达	实验组 MOD(n=20)	对照组 MOD(n=20)	P
MHC II	0.287 4 \pm 0.014 5	0.027 9 \pm 0.016 3	<0.05
CD86	0.186 0 \pm 0.004 6	0.012 8 \pm 0.003 2	<0.05
CD83	0.192 6 \pm 0.003 8	0.025 3 \pm 0.001 9	<0.05

2.3 T 细胞增殖实验结果 培养液中有 LBP 时 DC 激发 T 细胞增殖的能力进一步增强($P < 0.05$),且在此浓度范围内随着 DC 浓度增加 T 细胞增殖指数也增加(表 2)。

表 2 T 细胞增殖指数($\bar{x} \pm s, n=10$)

DC 浓度	实验组	对照组	P
2 \times 10 ³	0.362 \pm 0.019	0.213 \pm 0.011	<0.05
1 \times 10 ⁴	0.486 \pm 0.018	0.296 \pm 0.013	<0.05
2 \times 10 ⁴	0.667 \pm 0.014	0.412 \pm 0.009	<0.05

3 讨 论

肿瘤患者在接受放、化疗时,射线和药物对机体的免疫系统有抑制作用,致使机体的免疫功能进一步下降,影响了治疗效果并可导致一些不良反应,所以解决肿瘤患者免疫功能低下问题成为肿瘤治疗非常关键的环节。最近国内外学者提出生物反应调节剂(biological response modifier, BRM)的概念,强调在肿瘤放、化疗及手术治疗的同时应用 BRM,不但能提高患者的免疫功能,还可减轻上述治疗对免疫系统及造血系统的损害,从而提高治疗效果。在我国中药取自天然,来源广泛,容易获得,不良反应小。因此从中药中提取有效成分作为 BRM 显示其明显优势。为此作者对 LBP 免疫调节作用进行了研究,

显示了很好的免疫促进作用,为进一步研究其作用机制,作者进一步研究了 LBP 对外周血巨噬细胞增殖及功能的影响。

LBP 已经很多实验证明具有调节免疫功能和抗肿瘤的功能。已有文献报道了 TBP 对巨噬细胞、T 淋巴细胞、NK 细胞的影响^[2],但对 DC 的表型和功能的影响却未见报道。

DC 是一种重要的专职抗原提呈细胞,对启动辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的免疫应答具有重要作用^[3-5]。imDC 俘获和处理外源性抗原后成为 mDC,通过主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈抗原多肽激活 T 细胞,启动特异性免疫应答。有实验证明,DC 的成熟状态与其功能有关,imDC 有较强的抗原摄取和加工能力^[6-10]。MHC II、CD86、CD83 分子是与 DC 抗原提呈作用密切相关的分子,也是与 DC 对 T 细胞的激活作用密切相关的分子。本实验结果显示,经过 LBP 刺激作用后的 DC, MHC II、CD86、CD83 的表达水平明显增高,且 DC 激活 T 细胞能力及 T 细胞增殖能力增强,说明 LBP 能诱导 DC 成熟,同时刺激 T 细胞增殖能力增强。

本实验从 DC 形态、表面抗原、抗原提呈功能方面显示了 LBP 对人 DC 成熟的影响。LBP 促进 DC 成熟的机制是什么、是否与多糖的种类、结构、剂量有关等尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Gon GH, Shen P, Jin L, et al. Therapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide(LBP) on irradiation or chemotherapy-induced myelosuppressive mice [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2007, 20(2): 155.
- [2] Gan L, Zhan GSH, Yan GXL, et al. Immunomodulation and antitumor activity by apolysaccharide protein complex from Lyciumbarbarum [J]. Int Immuno Pharmacol, 2006, 4(4): 563.
- [3] 古赛, 蒋小黎. 枸杞多糖治疗酒精性脂肪肝大鼠的实验研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(1): 60.
- [4] 方晓松, 周颢. 注射用黄芪多糖治疗原发性肝癌的疗效观察[J]. 重庆医学, 2009, 38(8): 935.
- [5] Ke-jian ZHU. Dendritic cell and autoimmune diseases [J]. Journal of Zhejiang University: Medical Sciences, 2003, 32(1): 81.
- [6] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells [J]. Cell, 2004, 106(3): 263.
- [7] Go Idman R. Characteristics of the α -glucan receptor of murine macrophages [J]. Exp Cell Res, 1988, 17(4): 481.
- [8] 谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 等. 树突状细胞介导的肝癌免疫治疗实验研究 [J]. 广西医学, 2005, 27(8): 1133.
- [9] 唐国全. 树突状细胞疫苗的研究与肿瘤的免疫治疗 [J]. 广西医学, 2006, 28(12): 1930.
- [10] 刘剑勇. 树突状细胞与肝癌治疗研究进展 [J]. 广西医学, 2004, 26(11): 1578.

(收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2010-01-23)