

· 论 著 ·

阿托伐他汀对大鼠树突状细胞吞噬功能及共刺激分子表达的影响

黄光胜, 吕永恒[△], 陈 琪, 黎洪展

(南方医科大学中医药学院中西医结合医院, 广州 510315)

摘要:目的 探讨阿托伐他汀对大鼠单核细胞源性树突状细胞(DCs)吞噬功能及表面共刺激分子表达的影响。方法 密度梯度离心法分离大鼠外周血单个核细胞,经含重组鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)100 ng/mL、重组鼠白介素-4(rmIL-4)20 ng/mL的完全 RPMI 1640 培养基培养,使其分化为 DCs。以磷酸盐缓冲液(PBS)组作阴性对照,将 DCs 与 50 μg/mL 1,1'-二(十八烷基)3,3',3',3'四甲基咪唑羰基花青高氯酸盐(DiI)染料标记的氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)共同孵育 48 h(加或不加 100 μmol/L 阿托伐他汀)作为实验组,流式细胞术检测 DCs 表面共刺激分子 CD86、CD40 的表达,同时镜下观察 DCs 吞噬 ox-LDL 的形态变化。结果 ox-LDL 上调 DCs 表面共刺激分子 CD86、CD40 的表达,经阿托伐他汀处理的 DCs 可下调 CD86、CD40 的表达,对 ox-LDL 的吞噬作用受到抑制。结论 阿托伐他汀可明显抑制 DCs 的吞噬功能及表面共刺激分子表达。

关键词:树突状细胞;共刺激分子;吞噬作用;阿托伐他汀

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.23.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)23-2313-02

Study of atorvastatin's effects on phagocytosis and the expression of co-stimulatory factors of mice monocyte derived dendritic cells

Huang Guangsheng, Lv Yongheng[△], Chen Qi, Li Hongzhan

(College of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315)

Abstract:Objective To investigate the effects of atorvastatin on phagocytosis and co-stimulatory factor of monocyte derived dendritic cells(DCs). **Methods** Density gradient centrifugation was used to isolate peripheral blood mononuclear cell from rats. DCs were derived from monocytes of mice upon culturing with rmGM-CSF(100 ng/mL) and rmIL-4(20 ng/mL). PBS was as the negative control, and in two experimental groups, antigen as ox-LDL labelled with 50 μg/ml DiI were added into the medium incubating with DCs, while 100 μmol/L atorvastatin was only added to one group. Surface co-stimulatory factors CD86 and CD40 of DCs were measured by flow cytometry after 48 hours. The progress of phagocytosis was observed in microscope. **Results** ox-LDL upregulated expression of surface co-stimulatory factors CD86 and CD40 of DCs. Atorvastatin reduced expression of surface co-stimulatory factors CD86 and CD40 of DCs, and inhibited DCs phagocytosis of ox-LDL. **Conclusion** Atorvastatin significantly inhibits immune activity and the function of phagocytosis of DCs, which may be a new immune regulating mechanism of statins series.

Key words: Dendritic cell; Co-stimulatory factor; Phagocytosis; Atorvastatin

目前研究认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)不仅是脂质在动脉壁中的积聚,而且是一种慢性炎症性疾病^[1],也有学者提出 AS 是一种自身免疫性疾病^[2]。越来越多的证据显示,他汀类药物具有独立于降脂作用外的多向性效应^[3]。本研究旨在探讨阿托伐他汀(atorvastatin)对在免疫调控中起重要作用的抗原递呈细胞——树突状细胞(dendritic cells, DCs)的吞噬和抗原递呈功能的影响,以期发现他汀类药物免疫调节的新靶点、新机制。

1 材料与与方法

1.1 主要材料与试剂 Wistar 大鼠购自南方医科大学动物实验中心;RPMI 1640(含 L-谷氨酰胺)培养基、胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自 Gibco 公司;1,1'-二(十八烷基)3,3',3',3'四甲基咪唑羰基花青高氯酸盐(DiI)荧光染料购自美国 Biotium 公司;重组鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(recombinant murine granulocyte macrophage colony stimulating factor, rmGM-CSF)、重组鼠白介素-4(recombinant murine interleukin-4, rmIL-4)为英国 Peptotech 公司产品;淋巴细胞分离液来自天津灏洋生物制品有限公司;藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记单克隆抗鼠 CD86、CD40 抗体购自 BD 公司;阿托伐他汀购自辉瑞制药厂。

1.2 方法

1.2.1 氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的制备与 DiI 标记 采用超高速密度梯度离心法从大

鼠新鲜血液分离出低密度脂蛋白,采用铜诱导法氧化修饰低密度脂蛋白,修饰程度的鉴定采用硫代巴比妥酸反应物质测定法,修饰后的 ox-LDL 加 DiI 贮液标记,用平衡盐缓冲液透析备用。

1.2.2 DCs 的培养及干预 抽取大鼠静脉血 20 mL,肝素抗凝,淋巴细胞分离液中离心(2 000 r/min, 20 min),收集单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗 2 次, RPMI 1640 冲洗 1 次,用完全 RPMI 1640 培养基(含 10% FCS)在 6 孔培养板中培养 2 h(37 °C、5% CO₂),吸除非贴壁细胞。贴壁细胞用完全 RPMI 1640 培养基(含 10% FCS、rmGM-CSF 100 ng/mL、rmIL-4 20 ng/mL),置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 5 d,隔天半量换液 1 次。培养第 5 天的 DCs 加入 DiI 标记 ox-LDL(终浓度 50 μg/mL),另一组加入阿托伐他汀(终浓度 100 μmol/L)和 DiI 标记 ox-LDL(终浓度 50 μg/mL),以 PBS 为对照,培养 48 h 后收集悬浮细胞。在倒置相差显微镜和荧光显微镜下观察 DCs 形态和 ox-LDL 摄取情况。

1.2.3 流式细胞仪分析 DCs 表面共刺激分子表达情况 收集的细胞调整浓度为 5×10⁶ 个/mL,分别加入 PE 标记的兔抗鼠 CD86 和 CD40 单克隆抗体,孵育 30 min, PBS 洗 2 遍,用流式细胞仪(美国 Becton Dickinson)荧光激活细胞分选术(fluorescence-activated cell sorter, FACS)检测。Cellquest 分析软件分析检测结果。

[△] 通讯作者, Tel:13189088617; E-mail:lvyh12321@126.com.

1.3 统计学处理 应用 SPSS10.0 软件系统分析,所有资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单向方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCs 的培养和观察 倒置相差显微镜观察:培养第 3 天可见细胞成簇生长,由圆形变为不规则形,并长出一些小刺状结构,细胞质变得丰富。培养第 5 天,树突样结构更加明显,胞质更加丰富。荧光显微镜下观察:DCs 与 DiI 标记的 ox-LDL 混合孵育 48 h 后,DCs 逐渐发育变大,胞浆逐渐丰富,变得红染。DCs 与阿托伐他汀及 DiI 标记的 ox-LDL 混合孵育 48 h 后,吞噬 ox-LDL 的 DCs 数目减少,胞浆红染程度减轻,提示阿托伐他汀可部分抑制 DCs 吞噬 ox-LDL 的功能。

2.2 ox-LDL、阿托伐他汀对 DCs 表型的影响 收集干预 48 h 的悬浮细胞,经 FACS 分析显示,与阴性对照 PBS 组相比,经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 处理的 DCs 表面共刺激分子 CD86 和 CD40 的表达明显增加($P < 0.05$);而阿托伐他汀处理的 DCs 表面共刺激分子 CD86 和 CD40 的表达明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同处理组对 DCs 共刺激分子表达的影响

组别	CD86(%)	CD40(%)
PBS 组	61.30 \pm 10.20	70.50 \pm 11.30
ox-LDL 处理组	80.84 \pm 11.20*	92.30 \pm 5.00*
ox-LDL+atorvastatin 处理组	75.74 \pm 9.60**	66.80 \pm 5.80**

*: $P < 0.05$,与 PBS 组比较;**: $P < 0.01$,与 ox-LDL 组比较。

3 讨论

体内外研究均显示,AS 的不稳定斑块中含有大量活化 T 淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞,在 AS 斑块中 DCs 聚集,提示 AS 与自身免疫密切相关^[4];而抗原递呈细胞是启动免疫应答的起始环节。DCs 是体内效应最强的专职性抗原递呈细胞,原始 T 细胞被激活的前提是 DCs 递呈的主要组织相容性复合物抗原的识别^[5-6],以及共刺激分子与其在 T 表面的受体的配对^[7],共刺激分子的缺乏可诱导特异性 T 淋巴细胞的免疫耐受,使局部炎症细胞对特异性抗原无反应^[8]。

在人的 AS 病变中已有 ox-LDL 存在的证据^[9]。ox-LDL 除了损伤内皮细胞和平滑肌细胞外,还对其他的单核细胞具有趋化性能,通过刺激机体产生自身抗体、触发免疫系统的表达、增加粥样斑块脂质含量等多种机制促进斑块的不稳定,使斑块易于破裂^[10]。有研究结果表明 ox-LDL 通过影响 DC 免疫功能,参与 AS 的病理过程^[11-12]。本研究发现,体外培养的 DCs 与 ox-LDL 共同孵育后,DCs 可摄取 ox-LDL,同时使 DCs 表面共刺激因子(CD86 和 CD40)的表达上调。这与上述文献报道的通过激活 DCs 介导的获得性免疫反应结果相似。

他汀类药物用于治疗急性冠状动脉综合征已有肯定疗效,近年来,他汀类药物的非调脂作用越来越引起人们的关注^[13-14]。临床研究发现^[15-16],心脏移植患者经阿托伐他汀治疗后,1 年成活率明显增加,移植血管病事件和急性重症移植排斥事件明显减少,提示他汀类药物具有免疫调节作用。本研究结果表明,阿托伐他汀可明显抑制 DCs 摄取 ox-LDL 的能力,同时可明显抑制 DCs 表面共刺激分子的 CD40 和 CD86 的表达。共刺激分子的低表达可诱导特异性 T 淋巴细胞的免疫耐受,使局部炎症细胞对特异性抗原无反应,同时 DCs 对损伤抗原摄取下降,导致 AS 抗原递呈不足,相应的免疫炎症反应受到抑制,对血管壁的损伤相应降低,AS 斑块的稳定性增加,从而延缓了 AS 的进展过程。

综上所述,作为功能最强的抗原递呈细胞,DCs 介导的免疫机制参与了 AS 的发病,阿托伐他汀对 DCs 功能的抑制推测是其抗 AS 的机制之一。但阿托伐他汀抑制 DCs 吞噬 ox-LDL 的过程是否通过某种抗体的途径,从而抑制 DCs 的免疫活性和功能,达到抗 AS 和稳定斑块的目的? 这些问题还有待深入的研究。

参考文献:

- [1] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009 (27): 165-197.
- [2] Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease: heterogeneity of leukocyte subsets participating in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ J*, 2009, 73(6): 994-1001.
- [3] Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 21(11): 1712-1719.
- [4] Niessner A, Weyand CM. Dendritic cells in atherosclerotic disease [J]. *Clin Immunol*, 2010, 134(1): 25-32.
- [5] Iruretagoyena MI. The dendritic cell-T cell synapse as a determinant of autoimmune pathogenesis [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(2): 131-147.
- [6] 蒋东波, 杨锡强. 哮喘患儿外周血树突状细胞共刺激分子表达研究 [J]. *重庆医学*, 2003, 32(4): 396-398.
- [7] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002(20): 29-53.
- [8] Steinman RM, Hawiger D, Liu K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2003(987): 15-25.
- [9] Itabe H. Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2007, 37(1): 4-11.
- [10] Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Oxmarks the spot [J]. *Circulation*, 2001, 104(22): 2638-2640.
- [11] Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11(324): 93-102.
- [12] 傅强, 李志樑. 氧化低密度脂蛋白对大鼠树突状细胞趋化因子分泌及趋化因子受体表达的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2008, 24(7): 497-499.
- [13] 孙姗, 吴尚勤. 阿托伐他汀非调脂作用的最新进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, 11(2): 141-144.
- [14] 赵清珍, 刘坤申. 他汀类药物调脂以外的有益作用 [J]. *山东医药*, 2008, 48(13): 114-115.
- [15] Mach F. Immunosuppressive effects of statins [J]. *Atheroscler Suppl*, 2002, 3(1): 17-20.
- [16] 吴春雷, 朱成楚. 他汀类药物在心脏围术期的临床和实验研究进展 [J]. *重庆医学*, 2009, 38(6): 724-725.