

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.30.008

## 间歇性低氧致树突状细胞迁徙能力改变及其通路机制探讨\*

胡柯<sup>1</sup>, 王光伟<sup>1△</sup>, 杨宇<sup>2</sup>, 徐国耀<sup>1</sup>, 李玉娴<sup>1</sup>

(1. 湖南医药学院临床医学院, 湖南怀化 418000; 2. 中南大学湘雅二医院老年病科, 长沙 410013)

**[摘要]** **目的** 通过模拟人阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAS)间歇性低氧(IH)环境, 观察其对入外周血来源树突状细胞(DCs)迁徙能力的影响, 并通过干预 RelB、p38 的表达探讨 IH 致 DCs 迁徙能力改变的可能通路机制。**方法** 培养前将 DCs 分为 RelB、p38 干扰及非干扰质粒组。利用间歇低氧舱设置低氧环境, 其中, 给氧浓度为 0.5%、1.5%、5.0%、10.0%, 低氧/再氧合时间比为 1:1、1:3、1:5、1:9, 常氧对照组予以持续 21.0% 氧浓度供应。体外培养结束后蛋白质印迹法检测 RelB、p38 的表达, 侵袭小室检测 DCs 的迁徙能力。**结果** 相对于常氧, 体外 IH 下 DCs 整体迁徙能力下降, 且 DCs 迁徙能力与 IH 环境下平均氧分压水平呈正相关( $r=0.867, P<0.05$ ), IH 可促进 DCs 胞内 RelB、p38 表达, 而干预二者表达均未逆转 IH 下迁徙能力的改变。**结论** 体外 IH 可导致 DCs 迁徙能力下降, 且可能与 RelB、p38 激活无关。

**[关键词]** 间歇性低氧; 树突状细胞; 迁徙能力; RelB; p38**[中图分类号]** R392.12**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)30-4200-03

## Study on the change of migration ability of dendritic cells induced by intermittent hypoxia and the mechanism of its pathway\*

Hu Ke<sup>1</sup>, Wang Guangwei<sup>1△</sup>, Yang Yu<sup>2</sup>, Xu Guoyao<sup>1</sup>, Li Yuxian<sup>1</sup>

(1. College of Clinical Medicine, Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China;

2. Department of Geratology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

**[Abstract]** **Objective** By simulating the intermittent hypoxia(IH) environment of human obstructive sleep apnea syndrome (OSAS), to reveal the effect of IH on migratory ability of human peripheral blood derived dendritic cells(DCs), and through the intervention of RelB, p38 expression in order to explore the possible mechanism of the change of DCs migration ability induced by IH. **Methods** DCs were divided into RelB, p38 siRNA interfering and non interfering plasmid group before cultivation. The environment of hypoxia was created by a intermittent hypoxia cabin, among them, oxygen concentration was 0.5%, 1.5%, 5.0%, 10.0%, hypoxia/reoxygenation time ratio was set as 1:1, 1:3, 1:5 and 1:9, while sustained oxygen was supplied to the contrast at a normal concentration of 21.0%. The content of RelB and p38 was tested by Western blotting after culture in vitro, migration ability of DCs was detected by invasion chamber. **Results** Compared with normoxia, DCs under IH tended to have declined migratory ability, which was confirmed to be correlated with the average oxygen partial pressure level under IH. IH could promote the expression of RelB and p38 in DCs, while the migratory ability of DCs was not reversed after intervening the expression of RelB and p38. **Conclusion** IH in vitro could cause a decline in migratory ability of DCs, which may not be induced by activation of RelB or p38 in DCs.

**[Key words]** intermittent hypoxia; dendritic cells; migratory ability; RelB; p38

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)的间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)往往刺激体内炎症及氧化应激, 造成动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)等血管并发症的发生、发展。树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为体内最重要的抗原提呈细胞, 很可能参与了 OSAS 致 AS 的过程。近来有研究报道, 较之常氧, IH 下 DCs 成熟表型及白细胞介素(IL)-12 分泌增加, 刺激 T 淋巴细胞反应(MLR)增强, 并可能与细胞内活性氧(ROS)/Toll 样受体 4 (TLR4)/RelB, p38 通路激活关联密切<sup>[1-2]</sup>。也有研究推断, DCs 致 AS 的发生、发展除了需要分化成熟及具备免疫调节功能, 还必须具备一定的迁徙能力, 这样才能定植于血管内皮或归巢淋巴结, 激活淋巴单核巨噬系统, 促进泡沫细胞及粥样斑块形成。而国内有研究报道, 持续低氧下 DCs 的迁徙能力明显下降<sup>[3]</sup>, 提示有必要明确 IH 对 DCs 迁徙能力的影响规律及

其通路机制, 以进一步阐明 DCs 在 OSAS 血管并发症中可能起到的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 胎牛血清, 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF), 重组人白细胞介素-4(rhIL-4), 淋巴细胞分离液, RPMI-1640, 重组人 RANTES(rhRANTES), 基质胶(matrigel), 考马斯亮蓝 G-250, 牛血清清蛋白(BSA)均为国产; p38 及 RelB 一抗, 电化学发光(ECL)显色试剂盒, 免疫磁珠, 过滤柱及 Boyden 小室均购自美国 Millipore 公司; RelB-Snail 及 p38-pGenesil 干扰质粒为武汉晶赛生物工程技术有限公司构建。

## 1.2 方法

**1.2.1 IH 环境设置** 由湖南省老年病学研究室提供整套设备, 包括气源与程控系统, 分别决定低氧程度及不同时间比的

低氧/再氧合循环。低氧→再氧合→低氧→再氧合模式循环，设置给氧浓度为 0.5%、1.5%、5.0%、10.0%，低氧/再氧合(IH/ROX)时间比为 1:1、1:3、1:5、1:9，共计 400 个循环，计时 240 min 后，继续在常氧(5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub>)条件下培养 240 min。常氧培养组(持续 21.0% 给氧浓度)作对照，常氧下维持培养 480 min。

**1.2.2 人外周血来源的 DCs 的获取** 健康志愿者抗凝外周血来自长沙市血液中心，采用梯度密度离心(Ficoll)获得单个核细胞。免疫磁珠阴性筛选法去除 CD3、CD14、CD19 和 CD56 细胞，再阳性筛选 CD34 细胞，含有 rhGM-CSF 及 rhIL-4 的 RPMI-1640 培养基继续培养，显微镜和电镜下继续观察，出现类似 DCs 形态的细胞时予 CD1a 纯度检测，比例大于 90% 可认定为初始 DCs。

**1.2.3 细胞分组与干预** DCs 分为 RelB、p38 siRNA 及非干扰质粒(Snail 及 pGenesil-1)组。培养前 30 min 分别转染 RelB-Snail(干扰序列: 5'-ATT CGT CGA TGA TTT CCA A-3')、p38-pGenesil-1(干扰序列: 5'-CGG ACT GGA TGG CCG TAC C-3') siRNA, Snail 或 pGenesil-1 质粒, 均为武汉晶赛生物技术有限公司构建, 转染液(100 μL) 为含 1.6 μg DNA 与 4 μL 脂质体的培养基, 根据分子克隆实验指南完成转染步骤。

**1.2.4 DCs 相关检测**

**1.2.4.1 DCs 胞内 RelB、p38 含量检测** 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 DCs 胞内 RelB 与 p38 含量, 按照蛋白提取、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜、抗原抗体反应、显影等步骤进行, AlphaEaseFC Version 4 软件分析目的条带的吸光度值。

**1.2.4.2 DCs 迁徙能力检测** 在侵袭小室下室加入 1 mL rhRANTES, 上下室之间放置直径 12 mm 的聚碳酸酯微孔膜, 其上加入无血清的 RPMI-1640 稀释的 matrigel。取 DCs(约 1×10<sup>5</sup>) 加入侵袭小室的上室中, 普通环境孵育 6 h, 取出聚碳酸酯微孔膜, 擦去未穿膜细胞及 matrigel, 甲醇中固定 30 min, Gimsa 染色后光镜下计数膜内细胞数并计算占总细胞数百分比, 代表迁徙能力。每张随机选取 5 个视野, 取平均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 计量资料  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 两两比较采用最小显著差异法(LSD); 采用 Pearson 秩相关分析培养仓平均氧分压与 DCs 迁徙能力的相关性。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

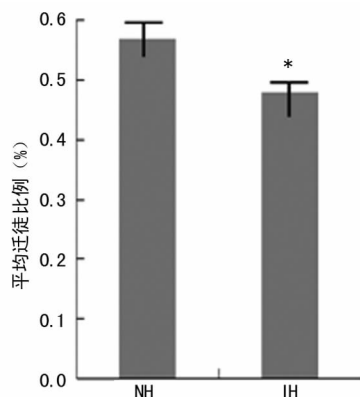
**2.1 不同给氧浓度 IH/ROX 时间比培养后 DCs 的迁徙能力** 表 1 显示不同低氧程度, IH/ROX 时间比的 IH 环境下聚碳酸酯微孔膜中的细胞/总细胞数比例, 代表 DCs 迁徙能力。16 种 IH 条件下的平均迁徙比例为(0.48±0.06)%, 正常对照下的比例为(0.57±0.05)%, 二者相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 1。图 2 为各种 IH 条件的平均氧分压(APO<sub>2</sub>)与 DCs 迁徙能力的相关性分析情况, 以 APO<sub>2</sub>(单位: mm Hg)为自变量 X, 迁徙 DCs 比例为应变量 Y, 可得出回归方程  $Y = 0.009X - 0.043$  ( $r = 0.867, P < 0.05$ )。

**2.2 各组 DCs RelB、p38 的表达检测** Western blotting 检测 DCs 胞内 RelB、p38 蛋白表达结果分别见图 3a、b, 与正常对照比较, IH(给氧浓度 1.5%, HO/ROX 1:5)可诱导 RelB、p38

合成( $P < 0.05$ ); 预先使用 RelB-Snail 及 p38-pGenesil siRNA 可有效干扰 IH 下 RelB、p38 的合成( $P < 0.05$ )。

表 1 不同低氧程度 IH/ROX 时间比条件下 DCs 的迁徙比例( $\bar{x} \pm s$ )

IH/ROX 时间比	给氧浓度(%)			
	0.5	1.5	5.0	10.0
1:1	0.35±0.05	0.40±0.06	0.47±0.05	0.49±0.07
1:3	0.42±0.04	0.44±0.04	0.52±0.05	0.54±0.10
1:5	0.43±0.05	0.45±0.06	0.52±0.04	0.56±0.07
1:9	0.55±0.06	0.50±0.05	0.54±0.04	0.57±0.06



\*:  $P < 0.05$ , 与 NH 比较。

图 1 IH 与 NH 环境下 DCs 的平均迁徙能力

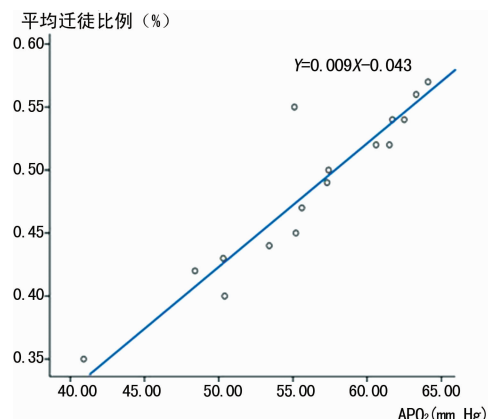
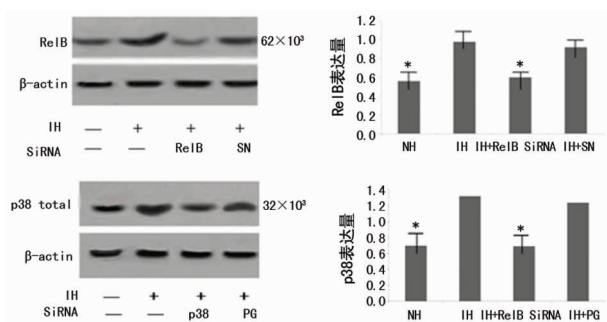


图 2 IH 条件下 APO<sub>2</sub> 与 DCs 迁徙能力的相关性分析



\*:  $P < 0.05$ , 与 IH 环境比较。

图 3 Western blotting 检测各组 RelB、p38 的表达

**2.3 DCs 的迁徙能力** 图 4 中细胞质淡染, 细胞核染色较深

的细胞即为聚碳酸酯微孔膜中 DCs。各组 DCs 的迁徙比例见图 5, 显示较常氧培养, IH 可抑制 DCs 迁徙 (0.45% vs. 0.62%,  $P < 0.05$ ), RelB 干扰 (0.44%) 或 p38 干扰 (0.47%) 对 IH 下 DCs 迁徙能力未造成明显影响。

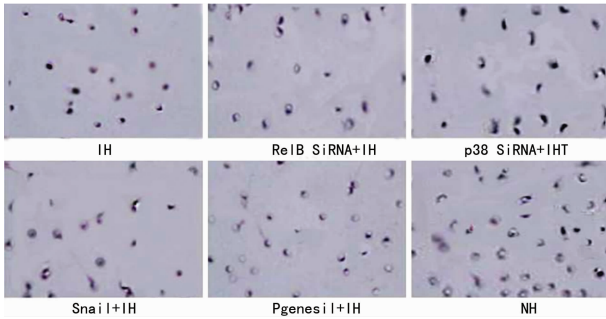
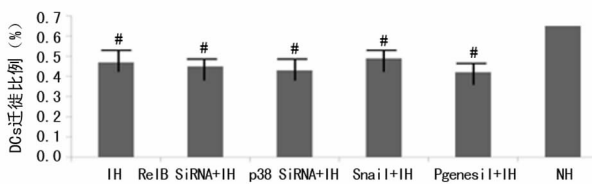


图 4 微孔膜中 DCs 的 Gimsa 染色 ( $\times 100$ )



# :  $P < 0.05$ , 与 NH 比较。

图 5 DCs 迁徙能力

### 3 讨论

OSAS 目前并不鲜见, 其最重要的致病机制为 IH, 可导致氧化应激及炎症泛滥, 是造成血管并发症的重要原因。近来有研究报道, 较之常氧, 体外 IH 环境可导致 DCs 成熟表型及 IL-12 产生增加, 刺激 MLR 增强, 提示 DCs 很可能是异常炎症反应的介导者; 且 DCs 参与冠状动脉病变进展的设想亦得到了临床研究的证实<sup>[4]</sup>。最近亦有研究报道, 作为 DCs 的活性表现形式, 高脂饮食大鼠的外周血成熟树突状细胞 (mDCs) 分布下降, 而其主动脉管壁上的 mDCs 比例上升, 外周血 mDCs 可能加速迁徙入动脉壁, 提示作为 AS 发生过程中最重要的始动因素, AS 模型外周血 DCs 比例下降可能并非其生成减少, 而是其分布异常, 迁徙到血管壁的 DCs 数量增加<sup>[5]</sup>。从上述研究结果可以推断 DCs 致 AS 过程除了需要分化成熟及具备适当的免疫调节功能, 迁徙能力同样很重要, 这样 DCs 才能定植于血管内皮或归巢淋巴结, 带来靶器官的损伤。因此, 探讨 IH 下 DCs 迁徙能力的改变特征及通路机制可以更全面地揭示 DCs 在 OSAS 血管并发症中可能的作用, 为干预 OSAS 并发症提供新的防治策略。

有关体外持续低氧情况对 DCs 的迁徙能力的研究已有报道, 如有研究者发现持续低氧下 DCs 的迁徙能力明显下降, 可能与低氧所导致的 DCs 表面基质金属蛋白酶及其组织抑制剂 (MMPs/TIMPs) 家族的表达失衡有关<sup>[3,6-7]</sup>。而 OSAS 造成的缺氧为典型的 IH, 与持续低氧存在本质差别, 所以本研究采用 IH 环境模拟人类 OSAS 气相环境, 并探讨体外该环境对 DCs 迁徙能力的影象特征, 这在国内外还鲜有报道, 是本研究的新意之处。结果提示与常氧条件比较, 体外 IH 可导致 DCs 迁徙能力下降, 且迁徙能力与培养环境 APO<sub>2</sub> 呈正相关。结合以往的研究, IH 环境虽可刺激 DCs 的成熟并增强 MLR, 但下降的迁徙能力可能影响 DCs 致损伤能力的发挥, 提示 IH 可能存在

靶器官损伤的保护机制, 以上使笔者对 DCs 在 OSAS 致血管内皮损伤中的真实地位产生怀疑。但仔细推敲, 本实验采用的是体外 IH 环境, 与 OSAS 体内 IH 仍然存在差别。根据实验结果, IH 虽可能导致 DCs 迁徙能力下降, 但 IH 同时造成的炎症激活及 AS 病灶形成, 可能又有利于趋化 DCs<sup>[8-9]</sup>, 故有必要开展进一步研究揭示 DCs 在 OSAS 人群体内真实的迁徙能力。

前期本研究人员利用基因芯片, IH 下 DCs 胞内明显表达上调的基因家族为核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK), 其中, 最为显著的分别为 RelB 和 p38。本实验采用 RNA 干扰特异性干预 IH 环境下 DCs RelB, p38 的表达, 结果提示对其迁徙能力的改变无明显影响, 提示 IH 可能通过其他通路 (如 MMPs/TIMPs 家族) 的表达来调节 DCs 的迁徙。但也有研究支持在特定刺激下, 细胞内 Toll 样受体 (TLRs)、NF- $\kappa$ Bs 及 MAPKs 的激活亦可能参与了 MMPs 表达的调节过程, 从而影响迁徙<sup>[10-12]</sup>。本研究只选取了 1 种 IH 环境及 1 个观察时间点, 加之使用体外环境, 故对 OSAS 人群体内 DCs 迁徙能力的改变情况及具体机制还未能完全揭示。研究结果虽未能系统阐述体外 IH 下 DCs 迁徙能力的改变与 OSAS 血管并发症的关系, 但这些遗留的问题值得在今后进一步挖掘探讨, 为预防 OSAS 血管并发症提供全新的视角。

### 参考文献

- [1] Hu K, Yang Y, Tu Q, et al. The alteration on phenotype, function of human dendritic cells caused by intermittent hypoxia[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 121(3): 96-102.
- [2] 胡柯, 涂秋云, 杨宇, 等. ROS/TLR4/RelB, P38 通路激活在间歇低氧致树突状细胞表型以及功能改变中的作用[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(6): 468-473.
- [3] Song HB, Qu X, Yang MX, et al. Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2005, 83(6): 668-673.
- [4] 李传昶, 刘薇, 易军, 等. 树突状细胞与冠状动脉严重狭窄的关系及辛伐他汀的干预作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(1): 57-62.
- [5] 傅强, 李志梁, 雷霄, 等. 急性冠状动脉综合征患者外周血树突状细胞亚群数量及比例的变化[J]. *中华心血管病杂志*, 2008, 25(3): 209-211.
- [6] Osman M, Tortorella M, Londeri M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases define the migratory characteristics of human monocyte-derived cells[J]. *Immunol*, 2002(105): 73-82.
- [7] Koropatnick T, Goodson MS, Heath-Heckman EA, et al. Identifying the cellular mechanisms of symbiont-induced epithelial morphogenesis in the squid-vibrio association[J]. *Biol Bull*, 2013, 226(1): 56-68.
- [8] Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking[J]. *J Leukoc Biol*, 1999(66): 1-9.
- [9] Schekman R. Discovery of the cellular and molecular basis of cholesterol control[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110(37): 14833-4836.

GA 具备优异的生物相容性、可控生物降解性、良好成球或成膜性能。PLGA 表面 PEG 化可使微泡更长时间停留在血液中,便于载体系统积聚到已受损(漏)血管的各种病理部位。PEG 所构成的亲水微环境还有利于基因类药物保持活性。Patel 等<sup>[12]</sup>通过比较分析 PLGA 与 PEG-PLGA 不同多聚物类型的各种物理特性,证实了 PEG-PLGA 的优势。本研究体外酶切保护实验同样显示 PEG-PLGA 能较长时间抵抗酶切作用,保持 DNA 结构。证明该 TSVP-UM 具备应用于体内的潜能。

通过双乳化法制备的靶向载基因微泡组,其粒径相较于载基因微泡组增加了 40 nm 左右,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。可能是由于 TATp 与 SDF-1 微泡壳层上的连接增加了粒径。最终平均粒径为 $(9\ 536.00 \pm 16.55)$ nm,分布较窄,能够顺利通过癌组织脉管系统中内皮细胞之间的窗孔尺寸 $300 \sim 4\ 700$  nm<sup>[13]</sup>,并增强了渗透性和滞留效应来特异性地靶向肿瘤组织细胞的能力,提示能够用于静脉给药。体外成像实验显示,TSVP-UM 在二次谐波模式下,具有良好的显影效果。因此,本实验制备的 TSVP-UM,兼具诊断和治疗的理想载药超声造影剂系统的基本性能。

双乳化法制备工艺受到制备过程中多因素的影响,本实验制得的 TSVP-UM,平均 DL 和 IE 均处于较低水平,与近年来 Liu 等<sup>[14]</sup>、Zhao 等<sup>[15]</sup>所制备的高分子载基因纳米粒子 IE $(80.9 \pm 6.7)\%$ 、 $(91.8 \pm 0.3)\%$ 有较大差距。有待进一步优化制备工艺以提高 DL 及 IE。对舌鳞癌细胞及其淋巴道转移组织的靶向释药性能、治疗需更深入的研究,为临床试验打下基础。

#### 参考文献

- [1] Dai J, Zou S, Pei Y, et al. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly(L-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1694-1705.
- [2] Ahmed A, Gianpiero G, Chung WY, et al. Targeted microbubbles in the experimental and clinical setting[J]. *Am J Surg*, 2012, 204(3): 355-366.
- [3] Delilbasi CB, Okura M, Iida S, et al. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue[J]. *Oral Oncology*, 2004, 40(2): 154-157.
- [4] Trabulo S, Cardoso AL, Mano M, et al. Cell-penetrating peptides-mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems[J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(4): 961-993.
- [5] Rollano Peñaloza OM, Lewandowska M, Stetefeld J, et al. Apoptins: selective anticancer agents[J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(9): 519-528.
- [6] Li J, Feng L, Fan L, et al. Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(21): 4943-4950.
- [7] Albert S, Riveiro ME, Halimi C, et al. Focus on the role of the CXCL12/CXCR4 chemokine axis in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck*, 2013, 35(12): 1819-1828.
- [8] Walentowicz-Sadlecka M, Sadlecki P, Bodnar M, et al. Stromal derived factor-1 (SDF-1) and its receptors CXCR4 and CXCR7 in endometrial cancer patients[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84629.
- [9] Chittasupho C, Lirdprapamongkol K, Kewsuwan P, et al. Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 88(2): 529-538.
- [10] Mei L, Liu Y, Zhang Q, et al. Enhanced antitumor and anti-metastasis efficiency via combined treatment with CXCR4 antagonist and liposomal doxorubicin[J]. *J Control Release*, 2014(196): 324-331.
- [11] 许婷婷, 吴凤林. 超声激励微泡“空化效应”增敏肿瘤化疗现状与进展[J]. *临床超声医学杂志*, 2012, 14(11): 756-758.
- [12] Patel B, Gupta V, Ahsan F. PEG-PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin[J]. *J Control Release*, 2012, 162(2): 310-320.
- [13] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(4): 1363-1380.
- [14] Liu P, Yu H, Sun Y, et al. A mPEG-PLGA-b-PLL copolymer carrier for adriamycin and siRNA delivery[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(17): 4403-4412.
- [15] Zhao K, Li W, Huang T, et al. Preparation and Efficacy of Newcastle Disease Virus DNA Vaccine Encapsulated in PLGA Nanoparticles[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82648.

(收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-06-24)

(上接第 4202 页)

- [10] Osborne JK, Larsen JE, Shields MD, et al. NeuroD1 regulates survival and migration of neuroendocrine lung carcinomas via signaling molecules TrkB and NCAM[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(16): 6524-6529.
- [11] Lee Y, Kim H, Kim KH, et al. Activation of toll-like receptor 2, 3 or 5 induces matrix metalloproteinase-1 and 9 expression with involvement of MAPKs and NF- $\kappa$ Bs in

human epidermal keratinocytes[J]. *Exp Dermatol*, 2010, 19(8): e44-49.

- [12] Morrell NW, Archer SL, Albert D, et al. Anticipated classes of new medications and molecular targets for pulmonary arterial hypertension[J]. *Pulm Circ*, 2013, 3(1): 226-244.

(收稿日期:2016-04-02 修回日期:2016-07-10)