

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.31.001

红树林淡紫拟青霉胞外多糖对小鼠 DCs 吞噬功能的影响*

胡海岩¹, 王华民², 林英姿², 杨文², 王永霞^{2△}

(海南医学院:1. 临床学院;2. 热带医学与检验学院,海口 571109)

[摘要] 目的 探讨红树林来源的淡紫拟青霉胞外多糖对小鼠骨髓源性树突细胞(DCs)功能成熟的影响。方法 从小鼠骨髓腔中分离获得骨髓细胞,加入重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素-4(rmIL-4)诱导分化为未成熟 DCs,用不同浓度淡紫拟青霉胞外多糖干预,流式细胞术检测 DCs 的表面标志 CD11c、主要组合相容性复合体(MHC II)类分子、CD80、CD86 的表达情况及吞噬葡聚糖(FITC-dextran)的能力,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测该多糖对 DCs Toll 样受体(TLR)2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达的影响。结果 经 300、400 μg/mL 多糖作用 48 h 后 DCs 表面分子 CD11c、MHC II 类分子、CD80、CD86 的表达较空白对照组显著上调($P<0.01$);经多糖作用的 DCs 吞噬 FITC-dextran 能力下降,尤其是 300、400 μg/mL 的多糖与空白对照组相比作用效果明显($P<0.05$);另外,该多糖还可下调 DCs TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 的表达,尤其经 100~400 μg/mL 多糖处理的 DCs 下调作用显著,与空白对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 淡紫拟青霉胞外多糖可上调小鼠骨髓源性未成熟 DCs 表面 CD11c、MHC II 类分子、CD80 和 CD86 的表达,降低其吞噬能力,下调 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 的表达,初步表明该多糖可刺激 DCs 分化成熟。

[关键词] 胞外多糖;淡紫拟青霉;树突细胞;成熟;免疫功能

[中图分类号] R392.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)31-4321-04

Effects of extracellular polysaccharides from Paecilomyces Lilacinus on phagocytosis function of mouse bone marrow-derived dendritic cells*

Hu Haiyan¹, Wang Huamin², Lin Yingzi², Yang Wen², Wang Yongxia^{2△}

(1. Clinical Medical College; 2. School of Tropical Medicine and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571109, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Paecilomyces Lilacinus extracellular polysaccharides on the phenotypic and function maturity of mouse dendritic cells. **Methods** Mononuclear cells were isolated from the mouse bone marrow cavity and added with cytokines for obtaining the recombinant mouse granulocyte-macrophagocyte colony stimulating factor(rmGM-CSF), recombinant mouse interleukin 4(rmIL-4) was induced to differentiated to immature DCs. Then different concentrations of extracellular polysaccharides were used to conduct the intervention. The mature DCs surface marker CD11c, major histocompatibility complex II (MHC II), CD80, CD86 molecular expression and phagocytosing FITC-dextran ability was detected by the flow cytometry. The effect of the polysaccharides on DCs Toll-like receptor(TLR)2 mRNA and TLR4 mRNA expression was detected by RT-PCR. **Results** After 400 μg/mL polysaccharides action for 48 h, the expression of DCs surface molecules such as CD11c, MHC II, CD80 and CD86 was significantly up-regulated compared with the blank control group ($P<0.05$); after the polysaccharides action, the ability of DCs phagocytosing FITC-dextran was decreased, especially the effects of 300, 400 μg/mL of polysaccharides were more significant compared with the control group ($P<0.05$). In addition, the polysaccharides could down-regulate the expression of TLR2 mRNA and TLR4 mRNA in DCs, the DCs down-regulation effect after 100-400 μg/mL polysaccharides treatment, the difference compared with the blank control group was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** The extracellular polysaccharides can up-regulate the expression of DCs surface CD11c, MHC II, CD80 and CD86 molecules, decreases the phagocytosis ability and down-regulates the expression of TLR2 mRNA and TLR4 mRNA, which preliminarily indicates that the polysaccharides could stimulate the differentiation and maturation of murine DCs.

[Key words] extracellular polysaccharides; Paecilomyces Lilacinus; murine dendritic cells; maturation; immunologic function

树突细胞(DCs)作为体内最重要的抗原提呈细胞,不仅是介导固有免疫和适应性免疫的桥梁,也是唯一能活化初始 T 细胞的抗原提呈细胞^[1-3]。未成熟 DCs 由于高表达 Toll 样受体(TLR)等^[4],获取抗原的能力较强,但刺激 T 细胞活化的能力弱;病原体等抗原刺激可活化 DCs,促使其分化成熟,成熟

DCs 识别抗原能力减弱,但由于高表达主要组合相容性复合体(MHC II)类分子、CD86、CD80 等分子,提呈抗原的能力及活化 T 细胞的能力增强^[5-6]。因此,通过调控体内 DCs 的成熟状态,可调节机体的免疫功能,达到预防或治疗疾病的目的。

课题组前期从海南沿海红树林中分离获得一株真菌,鉴定

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260225);海南省自然科学基金资助项目(813248);海南医学院科研培育基金资助项目(HY2014-015)。 作者简介:胡海岩(1979-),讲师,本科,主要从事感染免疫及免疫调节研究。 △ 通信作者,E-mai:492608405@qq.com。

为淡紫拟青霉,体外试验证实其产生的胞外多糖有较好的免疫调节作用,可促进小鼠吞噬细胞的吞噬功能并刺激 T 淋巴细胞分泌细胞因子^[7]。本实验将进一步探讨该多糖对小鼠骨髓源性 DCs 成熟及功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 动物 由本校实验动物中心提供 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,雄性。

1.2 试剂及药物 胞外多糖用 ddH₂O 配成 20 g/L 母液,0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装,-20℃冻存。APC 标记的抗小鼠 CD11c 单克隆抗体、PE 标记的抗小鼠 MHC II 单克隆抗体、PE 标记的抗小鼠 CD80 单克隆抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD86 单克隆抗体及 FITC-dextran 购自美国 Ebioscience 公司。Trizol 试剂、反转录试剂盒、RPMI-1640 培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。

1.3 仪器 流式细胞仪(美国 BD 公司),TC-512 型 PCR 仪(英国 Techne 公司),DYY-12C 型稳压稳流电泳仪(北京六一生物技术有限公司),凝胶图像分析仪(英国 Syngene 公司),生物安全柜(SG403A-HE,美国),CO₂ 培养箱(NU-4750E,美国),倒置显微镜(深圳拓天仪器设备有限公司),电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂),细胞培养板(美国 Corning 公司)等。

1.4 方 法

1.4.1 小鼠骨髓源性 DCs 诱导 取 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠 40 只,SPF 级,颈椎脱臼处死,浸泡于 75% 乙醇中,10 min 后无菌手术取股骨和胫骨,磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗骨髓腔以获取骨髓细胞,细胞悬液离心后重悬细胞,红细胞裂解液裂解红细胞,PBS 洗 3 次,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液(含 10 ng/mL rmGM-CSF 和 10 ng/mL rmIL-4)调整细胞浓度至 2×10⁶/mL,加入 6 孔板,每孔 3 mL,置 37℃、5% CO₂ 培养箱吸附 3 h 后除掉未贴壁细胞,加入新的培养液,隔日半量换液,培养至第 6 天收集诱导的未成熟 DCs 进行后续实验。

1.4.2 多糖对 DCs 表面分子表达的影响 将获得的小鼠骨髓细胞用 RPMI-1640 维持液稀释成 1×10⁶/mL,接种于 12 孔板,每孔 2 mL。用 5 个不同浓度梯度的多糖干预,即用终浓度分别为 50、100、200、300、400 μg/mL 的多糖处理细胞,每一浓度设 8 个复孔,阴性对照孔加等量的 RPMI-1640 维持液,隔天观察细胞形态,48 h 后收获细胞,PBS 洗涤 3 次,其中每一浓度中 4 复孔细胞用于 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达的检测,其余细胞调整浓度为 1×10⁶/mL,于细胞悬液中分别加入 PE-CD80、FITC-CD86 和 APC-CD11c、PE-MHC II,4℃染色标记

30 min,洗涤 3 次,流式细胞术检测细胞表型,实验重复 3 次。

1.4.3 多糖对未成熟 DCs 吞噬功能的影响 将小鼠骨髓细胞配制成 1×10⁶/mL,加入 12 孔板中,每孔 2 mL,分别加入不同浓度多糖,使终浓度分别为 50、100、200、300、400 μg/mL,每一浓度设 4 个复孔,37℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h,收集各孔细胞置 37℃孵育 30 min,加入终浓度为 1 mg/mL 的葡聚糖(FITC-dextran),置 37℃孵育 4 h,再于 4℃作用 1 h 后流式检测结果,实验重复 3 次。

1.4.4 淡紫拟青霉胞外多糖对 DCs TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达的影响 总 RNA 抽提及 cDNA 制备:取 1.2.2 中收获的细胞,按 Trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA。反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)获得 cDNA,-20℃保存备用。

常规 PCR:按下表配制 PCR 反应体系并进行 PCR 扩增,TLR2、TLR4 和 β-action 反应体系均为(引物序列见表 1,由上海 Sangon 公司合成):10×buffer 2.5 μL,dNTP 0.5 μL,上、下游引物各 1 μL,cDNA 2 μL,2.5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.3 μL,ddH₂O 12.6 μL;反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 8 min,PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外凝胶成像系统检测各条带光密度值,分析目的基因条带与内参条带光密度值的比值。

表 1 TLR2、TLR4 和 β-action 引物序列

基因	引物序列	方向	长度
TLR2	5'-TTTGCTCCTGCGAACTCCTA-3'	正	295 bp
	5'-GCTTCTTTGGGCTTCCTCTT-3'	反	
TLR4	5'-GGGTCAAGGAACAGAAGCA-3'	正	349 bp
	5'-TGAAGGCAGAGGTGAAAGC-3'	反	
β-action	5'-GCTACAGCTCACCACCACAG-3'	正	288 bp
	5'-GGTCTTTACGGATGTCAACGTC-3'	反	

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,细胞表型差异采用秩和检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠骨髓源性 DCs 诱导 小鼠贴壁的骨髓细胞经 rmGM-CSF 和 rmIL-4 诱导 24 h 后,可见圆形、大小均匀的悬浮细胞。培养至第 3 天,可见疏松黏附与贴壁的细胞集落产生,细胞形态不规则。培养至第 5 天,部分细胞呈不规则状,见图 1。

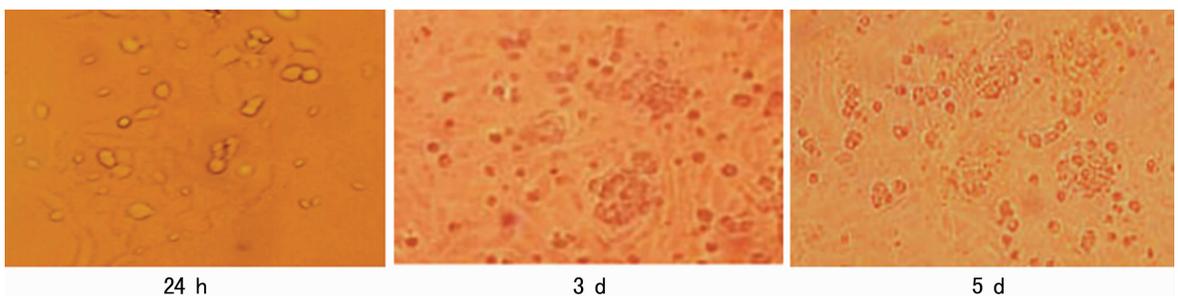
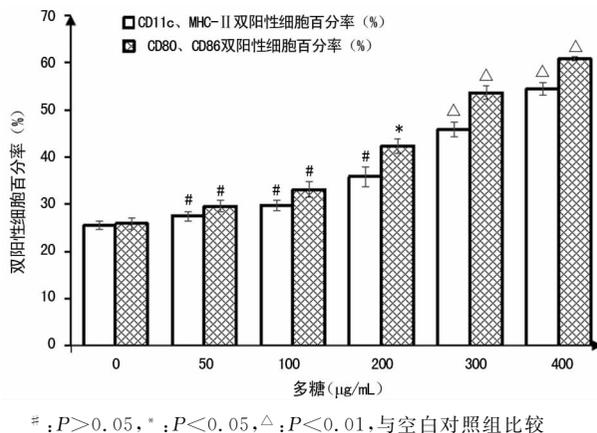


图 1 倒置显微镜下不同时间 DCs 形态变化

2.2 多糖对 DCs 表面分子表达的影响 未成熟 DCs 经不同浓度多糖干预 48 h 后,经流式细胞仪检测发现所用浓度多糖均可刺激 DCs 对 CD11c、MHC-II 类分子、CD80 和 CD86 的表达,且刺激效果呈剂量依赖性。经终浓度为 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖刺激后,CD11c、MHC II 双阳性细胞百分率分别为 $(27.5 \pm 1.0)\%$ 、 $(29.7 \pm 1.1)\%$ 、 $(35.9 \pm 2.1)\%$,与空白对照组 $(25.5 \pm 0.9)\%$ 相比无明显差异 ($P > 0.05$),当多糖终浓度达 300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 CD11c、MHC II 双阳性细胞百分率达 $(45.8 \pm 1.6)\%$ 和 $(54.4 \pm 1.3)\%$,明显高于空白对照组 ($P < 0.01$);该多糖亦可刺激 DCs CD80 和 CD86 的表达,糖终浓度为 50、100、200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 CD80、CD86 双阳性细胞百分率分别为 $(29.6 \pm 1.2)\%$ 、 $(33.1 \pm 1.7)\%$ 、 $(42.3 \pm 1.5)\%$ 、 $(53.6 \pm 1.4)\%$ 、 $(60.8 \pm 0.5)\%$,其中 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 终浓度多糖作用下 CD80、CD86 双阳性细胞百分率与空白对照组 $[(25.9 \pm 1.2)\%]$ 差异无统计学意义 ($P > 0.05$);200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用下 CD80、CD86 双阳性细胞百分率与空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用下

CD80、CD86 双阳性细胞百分率与空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明终浓度为 200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖对 DCs 分化成熟的刺激作用较好,结果见图 2。



: $P > 0.05$, * : $P < 0.05$, Δ : $P < 0.01$,与空白对照组比较

图 2 淡紫拟青霉胞外多糖对 DCs 表达 CD11c、MHC-II、CD80 和 CD86 分子的影响

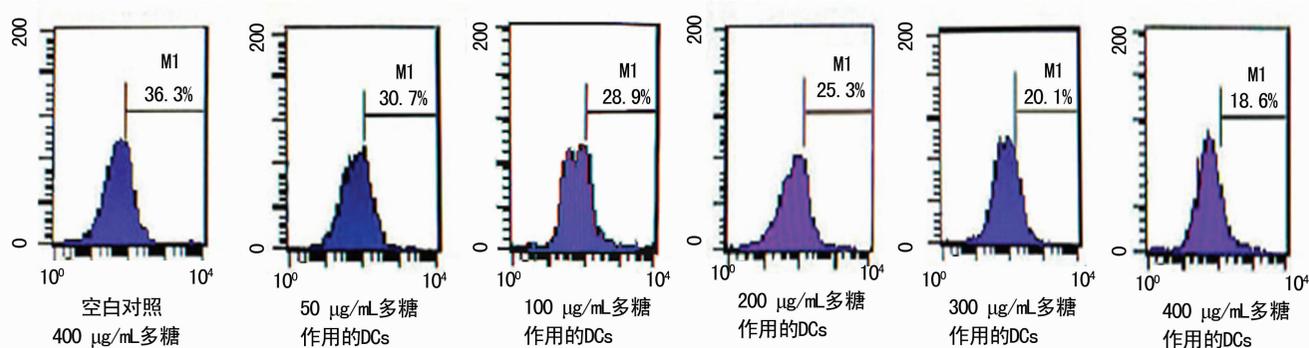
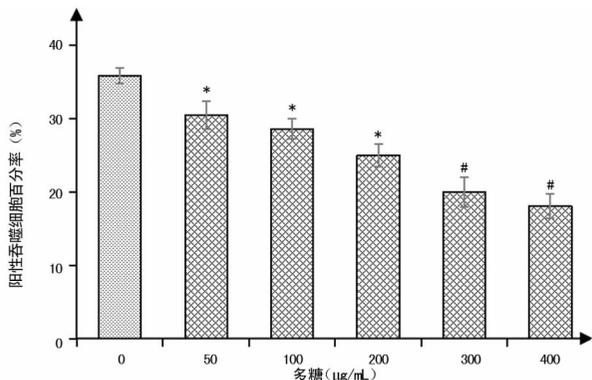


图 3 淡紫拟青霉胞外多糖对 DCs 吞噬能力影响的部分流式图

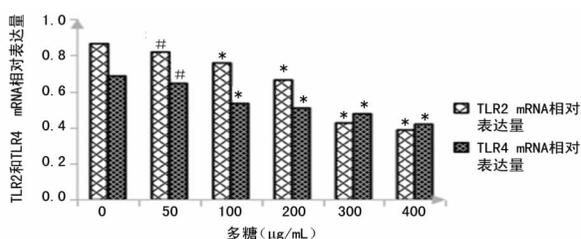
2.3 多糖对未成熟 DCs 吞噬功能的影响 小鼠骨髓细胞经不同浓度多糖处理 48 h 后,吞噬 FITC-dextran 的能力逐渐下降,50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 糖浓度时阳性吞噬细胞百分率分别为 $(31.5 \pm 1.3)\%$ 、 $(28.9 \pm 1.4)\%$ 和 $(26.0 \pm 1.4)\%$,与空白对照组 $[(34.6 \pm 1.1)\%]$ 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$);当糖浓度达 300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时阳性吞噬细胞百分率明显降低,分别为 $(20.6 \pm 1.0)\%$ 、 $(17.8 \pm 1.5)\%$,与空白对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),说明终浓度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖对 DCs 成熟的刺激作用较强,结果见图 3。

2.4 淡紫拟青霉胞外多糖对 DCs TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达的影响 将不同浓度多糖作用于未成熟 DCs 48 h 后 RT-PCR 检测 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达情况,结果发现经终浓度为 50~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用的 DCs TLR2、TLR4 mRNA 表达逐渐降低,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用下 DCs TLR2、TLR4 mRNA 相对表达量分别为 0.818 ± 0.112 、 0.644 ± 0.083 ,与空白对照组相比 $(0.864 \pm 0.071, 0.685 \pm 0.002)$,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),100、200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用下 TLR2、TLR4 mRNA 相对表达量分别为 0.757 ± 0.062 、 0.533 ± 0.096 、 0.663 ± 0.053 、 0.508 ± 0.023 、 0.425 ± 0.081 、 0.482 ± 0.041 、 0.386 ± 0.121 、 0.425 ± 0.078 ,与空白对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 5、6。



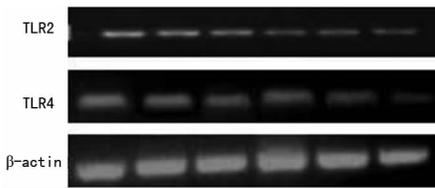
* : $P > 0.05$; # : $P < 0.05$,与空白对照组比较

图 4 淡紫拟青霉胞外多糖对 DCs 吞噬能力的影响



: $P > 0.05$; * : $P < 0.05$,与空白对照组比较

图 5 淡紫拟青霉胞外多糖对 DCs TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达的影响



泳道 1:空白对照组,泳道 2~6:50、100、200、300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖处理组

图 6 DCs TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA RT-PCR 电泳图

3 讨论

多糖类化合物含有丰富的生物信息,被认为是除肽链、核苷酸链之外具有重大意义的第 3 链,几乎参与了细胞所有生命活动。作为红树林生态系统中的第二大微生物资源,红树林真菌长期生活在强酸、寡营养、高盐的海洋环境中,必然有其独特的分子适应机制,具备产生不同于陆生微生物的独特新颖代谢产物的潜能,成为活性多糖的新来源^[8-10]。本研究用红树林来源的淡紫拟青霉胞外多糖刺激小鼠骨髓源性 DCs,观察其对 DCs 成熟的诱导作用,发现多糖在所用浓度范围内均可刺激 DCs 分化成熟,具体表现为促进 DCs 表面分子 CD11c、MHC II 类分子及协同刺激分子 CD80、CD86 的表达,终浓度 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖刺激作用最强,CD11c、MHC II 双阳性细胞和 CD80、CD86 双阳性细胞百分率与空白对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),CD11c 为 DCs 特征性标志,MHC II 类分子参与抗原肽的提呈并诱导 T 细胞免疫应答的发生,CD80、CD86 作为协同刺激分子,是 T 细胞活化的第二信号,DCs 成熟时显著上调 MHC II 类分子、CD80、CD86 等表面分子的表达,说明多糖对 DCs 的成熟具有刺激作用^[11-12]。随着 DCs 成熟其吞噬异物的能力大大降低,本研究发现经该多糖处理的 DCs 吞噬 FITC-dextran 的能力降低,尤其经 300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用的 DCs 阳性吞噬细胞百分率与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 300、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多糖可显著促进 DCs 成熟。该多糖还可下调 DCs TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 的表达,尤其 100~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多糖作用效果明显,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),而 TLR2 和 TLR4 作为 TLRs 家族的成员,为重要的模式识别受体,部分多糖刺激的非特异性免疫反应可能通过 TLR2 和/或 TLR4 介导^[13-14]。另外,课题组还发现该多糖可刺激 IL-12 分泌,IL-12 可诱导 Th0 分化为 Th1,参与 Th1 反应^[15],进一步说明该多糖能刺激 DCs 成熟。

总之,本研究初步发现红树林淡紫拟青霉胞外多糖具有刺激小鼠骨髓源性 DCs 分化成熟的作用,不仅可刺激 DCs 表面分子 CD11c、MHC II 类分子的表达,还可刺激协同刺激分子 CD80 和 CD86 分子的表达,抑制其对异物的吞噬作用,下调 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 的表达,但作用机制不明,仍需进一步研究。

参考文献

[1] Jacques B, Ralph M. Dendritic cell and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392(19): 252-254.

[2] Nicoletti C, Regoli M, Bertelli E. Dendritic cells in the gut: to sample and to exclude? [J]. Mucosal Immunol, 2009, 2(5): 462.

[3] Klechevsky E, Kato H, Sponaas AM. Dendritic cells star in Vancouver [J]. J Exp Med, 2005, 202(1): 5-10.

[4] Yoon YD, Han SB, Kang JS, et al. Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of Platycodon grandiflorum [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(13/14): 1873-1882.

[5] Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands [J]. Folia Biol, 2005, 51(5): 148-157.

[6] Gianotti L, Sargenti M, Galbiati F, et al. Phenotype and function of dendritic cells and T-lymphocyte polarization in the human colonic mucosa and adenocarcinoma [J]. Eur J Surg Oncol, 2008, 34(8): 883-889.

[7] 饶明毓, 陈政良, 林英姿, 等. 一株具免疫增强活性红树林真菌的筛选及鉴定 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(6): 683-685.

[8] Chen YL, Mao WJ, Tao HW, et al. Preparation and characterization of a novel extracellular polysaccharide with antioxidant activity, from the mangrove-associated fungus *Fusarium oxysporum* [J]. Mar Biotechnol, 2015, 17(2): 219-228.

[9] Chi ZM, Fang Y. Exopolysaccharides from Marine bacteria [J]. J Ocean Univ Chin, 2005, 4(1): 67-74.

[10] Alsayed HA, Ghanem EH, Saleh KM. Bacterial community and some physico-chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain [J]. Mar Pollut Bull, 2005, 50(2): 147-155.

[11] Kumaran S, Ramaprasanna D, Murugaiyan K. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from mangrove filamentous fungus, *Syncephalastrum* sp [J]. Afr J Microbiol Res, 2014, 8(21): 2155-2161.

[12] Yan M, Mao W, Chen C, et al. Structural elucidation of the exopolysaccharide produced by the mangrove fungus *Penicillium solitum* [J]. Carbohydr Polym, 2014, 111(1): 485-491.

[13] Beutle B, Hoebe K, Du X, et al. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers [J]. J Leukoc Biol, 2003, 74(4): 479-485.

[14] Visintin A, Mazzone A, Spitzer JH. Regulation of toll-Like receptors in human monocytes and dendritic cells [J]. J Immunol, 2001, 166(1): 249-255.

[15] Giermasz AS, Urban JA, Nakamura Y, et al. Type-1 polarized dendritic cells primed for high IL-12 production show enhanced activity as cancer vaccines [J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(8): 1329-1336.