

文章编号:1001-6880(2016)5-0745-05

# 粗根荨麻多糖对人脐血单核细胞源 树突细胞表面分子表达的影响

屈铭鸿,王崇静,梁月琴,夏洪颖,李仲昆\*

昆明医科大学附属延安医院,昆明 650051

**摘要:**研究粗根荨麻多糖在体外对人脐血单核细胞向树突细胞分化及成熟的作用。用淋巴细胞分离液分离脐血获得脐血单个核细胞,将获得的单核细胞分为3组,实验组:在含有粗根荨麻多糖(200 mg/L)的 RPMI1640 完全培养液中培养;阴性对照组:在无药物的 RPMI1640 完全培养液中培养;阳性对照组:在含有细胞因子(IL-4、GM-CSF、TNF- $\alpha$ )的 RPMI1640 完全培养液中培养;收集第10 d 细胞用流式细胞术检测 DCs 成熟表型(CD1a、CD80、CD83、CD86、HLA-DR)。结果表明,与阴性对照组比较,实验组和阳性对照组 CD80、CD83、CD86、HLA-DR、CD1a 的表达明显增加。粗根荨麻多糖可诱导脐血单核细胞分化成熟的 DCs。

**关键词:**树突细胞;粗根荨麻多糖;脐血单核细胞;细胞因子

中图分类号:R967

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.019

## *Urtica macrorrhiza* Hand-Mazz Polysaccharides Induce Cord Blood Monocytes into Mature Dendritic Cells(DCs) and Its Effect on Surface Molecules Expression of DCs

QU Ming-hong, WANG Chong-jing, LIANG Yue-qin, XIA Hong-ying, LI Zhong-kun\*

Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650051, China

**Abstract:** To study the effect of *Urtica macrorrhiza* Hand-Mazz polysaccharides on *in vitro* induction of cord blood monocyte into dendritic cells(DCs) as well as its effect on the maturation and differentiation of DCs. Cord blood mononuclear cells were separated by centrifuge in density gradient and were divided into three groups: cells cultured with *U. macrorrhiza* polysaccharides(200 mg/L) as experimental group, cells cultured with the cytokines of IL-4, GM-CSF and TNF- $\alpha$  as positive control group and cells cultured without either IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$  or *U. macrorrhiza* polysaccharides as negative control group. The phenotype of 10 days cultures of DCs(CD1a, CD80, CD83, CD86 and HLA-DR) were identified by flow cytometry. The results showed that compared with negative control group, cells of experimental group and positive group cultured for 10 days expressed significant increasing of the phenotypes of CD80, CD83, CD86, HLA-DR and CD1a by flow cytometry. Hence, it was concluded that *U. macrorrhiza* polysaccharides may induce the cord blood monocytes into mature DCs.

**Key words:**dendritic cells; *Urtica macrorrhiza* Hand-Mazz polysaccharide; cord blood monocytes; cytokin

树突状细胞(dendritic cell, DC)是机体功能最强的专职抗原递呈细胞(Antigen presenting cells, APC),它能高效地摄取、加工处理和递呈抗原,未成熟 DC 具有较强的迁移能力,成熟 DC 能有效激活初始型 T 细胞,处于启动、调控并维持免疫应答的中心环节<sup>[1]</sup>。荨麻多糖具有显著抗炎、镇痛和增强免疫的作用,但是目前基本只是对荨麻多糖进行了一

些简单的药理研究,证实荨麻多糖确有显著的抗炎作用<sup>[2]</sup>。粗根荨麻是云南特有的植物,产量大,易于人工栽培。本实验拟观察粗根荨麻多糖对树突细胞表面分子表达的影响,从调控树突细胞成熟和功能的角度来探讨粗根荨麻多糖的免疫调节机制。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

倒置相差显微镜(BDS200):重庆奥特光学仪器有限责任公司生产;超净工作台(SW-CJ-IF0):苏州

收稿日期:2015-07-23 接受日期:2016-04-06

基金项目:云南省应用基础研究-昆医联合专项(2014FB078)

\* 通讯作者 Tel:86-871-63211154; E-mail:yayylzk@163.com

净化设备集团生产;低速自动平衡离心机(DT5-2):北京时代北利离心机有限公司生产; $\text{CO}_2$ 恒温培养箱:美国 Thermo 公司生产;流式细胞仪(FC-500):美国 BECKMAN 公司生产。

## 1.2 材料

### 1.2.1 药物

粗根荨麻(*Urtica macrorrhiza* Hand-Mazz):采自云南宾川鸡足山,经昆明植物研究所李锡文教授鉴别。水提物的制备方法为将干燥后的粗根荨麻粉碎后,经过2次水提取,合并提取液,干燥后即得,一般可以得到10%的干燥品,即1 g相当于10 g生药。多糖的制备方法为,将干燥的水提物25 g,加水70 mL溶解,加95%乙醇350 mL,搅拌,倾去上层液体。沉淀加水50 mL溶解,加95%乙醇250 mL,搅拌,倾去上层液体,此步骤重复3次,沉淀干燥后即得,测定后含多糖为62%。试验用粗根荨麻多糖用含双抗、不含血清的 RPMI1640 培养液于每次实验前配制成浓度为200 mg/L工作液,经0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜滤过除菌。

### 1.2.2 试剂

改良型-RPMI1640 培养基:赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,生产批号:NZK1234;胎牛血清(FBS):法国 Biowest,生产批号:020413-UY;人外周血淋巴细胞分离液:天津市灏洋生物制品科技有限责任公司生产,生产批号:LTS1077;青霉素钠:哈药集团制药总厂生产,生产批号:A130806510;链霉素:山东鲁抗医药股份有限公司生产,生产批号:130818;双抗的配制:用 RPMI1640 配制成含青霉素钠6 mg/mL、链霉素10 mg/mL的双抗,用0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤;人抗CD80-FITC:美国 BD 公司产品,生产批号:4189753;人抗CD86-FITC:美国 BD 公司产品,生产批号:4080689;人抗CD83-FITC:美国 BD 公司产品,生产批号:3352891;人抗HLA-DR:美国 BD 公司产品,生产批号:4052956;重组人类白介素-4(rhIL-4):艾美捷科技有限公司产品,生产批号:cyt-211-b;重组人类粒细胞集落刺激因子(rhGM-CSF):哈药集团生物工程有限公司,生产批号:20130401;重组人类肿瘤坏死因子- $\alpha$ (rhTNF- $\alpha$ ):艾美捷科技有限公司产品,生产批号:ctt-223-a。脐血:在无菌条件下,采集健康孕妇脐带血,脐带血70 mL,肝素抗凝(40 U/mL)。脐血来自昆明市延安医院妇产科。

## 2 实验方法

### 2.1 脐血单个核细胞的提取制备

采集无菌脐血,在超净工作台下,按照脐血:

PBS 为1:1的比例稀释,用移液管吹打均匀,按照稀释血:淋巴细胞分离液之比为2:1的比例缓缓加到淋巴细胞分离液上层,常温下1500 rpm 离心20 min;取中间界层面细胞即为脐血单个核细胞加入 PBS,室温下1500 rpm 离心10 min,重复洗涤三次弃上清。用空白的 RPMI1640 调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ ,接种于24孔培养板中每孔1 mL,37 °C饱和湿度、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养。培养3 h后去除悬浮细胞保留贴壁细胞,然后分组进行培养。

## 2.2 实验分组

阴性对照组:在培养的细胞中每隔一日更换1/2量含10%胎牛血清(FBS)、1%双抗的 RPMI1640 完全培养液。实验组:在培养的细胞中每隔一日更换1/2量含有荨麻多糖(200 mg/L)、10%胎牛血清(FBS)、1%双抗的 RPMI1640 完全培养液;阳性对照组:在培养的细胞中1~6 d 每隔一日更换1/2量含有10%胎牛血清(FBS),1%双抗、重组人类粒细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)100 ng/mL 和人类白介素-4(rhIL-4)50 ng/mL 的 RPMI1640 完全培养液,至第7 d 在培养液中再加入重组人类肿瘤坏死因子- $\alpha$ (rhTNF- $\alpha$ )50 ng/mL 进行培养。

## 2.3 光学显微镜动态观察细胞生长情况

倒置光学显微镜下连续观察细胞生长情况,观察细胞形态学变化并于第3、10 d拍照。

## 2.4 细胞免疫表型检测

收集各组已经培养10 d的细胞,用PBS液调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,加入离心管100  $\mu\text{L}/\text{管}$ ,分别加入 FITC 荧光标记的单克隆抗体 CD80、CD83、CD86、CD1a、人 HLA-DR;终浓度为5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,置暗处,4 °C标记45 min,PBS液洗涤2次,用流式细胞仪检测细胞表型,每个细胞均根据 FITC 的荧光激发特性进行单标记参数分析。

## 2.5 细胞免疫表型结果分析

使用 SPSS Statistics 17.0 对计量资料进行统计学分析,采用配对 t 检验对阴性对照组和实验组进行比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 培养过程中光学显微镜下形态学观察

培养的细胞在3 h后贴壁,呈圆形;培养3 d后阴性对照组细胞增殖缓慢,形态无明显变化,实验组、阳性对照组出现少量悬浮细胞,细胞从圆形变成多边形,并伸出许多分枝;随着培养时间的延长,树突状结构更加明显,培养的第5~10 d由贴壁细胞

聚集成团变为悬浮细胞,表现为树突状外形。而整个培养过程中,阴性对照组细胞生长缓慢,细胞无聚集现象,培养至第 10 d 形态大部分呈圆形或梭形。见图 1。

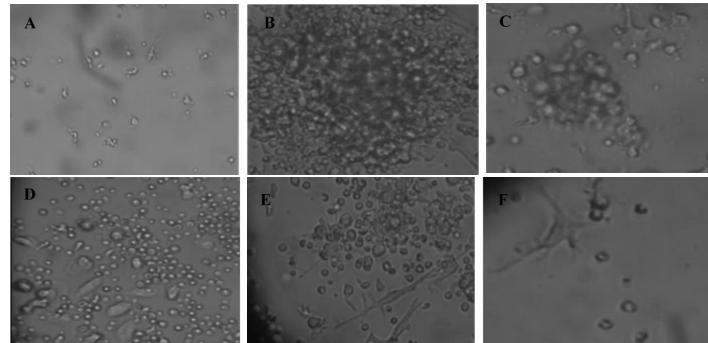


图 1 阴性组(A)、阳性组(B)和实验组(C)培养 3d 以及阴性组(D)、阳性组(E)和实验组(F)培养 10 d 的细胞形态( $\times 200$ )

Fig. 1 Cell morphologies of negative group (A), positive group (B) and experimental group (C) cultured 3 d as well as negative group (D), positive group (E) and experimental group (F) cultured 10 d ( $\times 200$ )

### 3.2 细胞免疫表型影响

实验组与阴性对照组相比,DCs 表面分子 CD83、CD86、CD80、CD1a 的表达明显增加,HLA-DR 的表达轻度增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 蕈麻多糖对 DCs 表型的影响( $\bar{x} \pm s$ ,%, $n=5$ )

Table 1 The effect of *U. macrorrhiza* polysaccharides on surface molecule expression of DCs( $\bar{x} \pm s$ ,%, $n=5$ )

组别 Group	CD83	CD86	CD80	HLA-DR	CD1a
阴性对照组 Negative control group	$0.02 \pm 0.001$	$3.50 \pm 0.042$	$8.49 \pm 0.035$	$94.96 \pm 0.207$	$49.80 \pm 0.412$
实验组 Experimental group	$18.07 \pm 0.177$	$14.62 \pm 0.311$	$18.48 \pm 0.192$	$98.26 \pm 0.351$	$60.44 \pm 0.241$
阳性对照组 Positive control group	$54.48 \pm 0.286$	$96.64 \pm 0.241$	$73.54 \pm 0.241$	$98.50 \pm 0.224$	$90.56 \pm 0.230$

## 4 讨论

树突状细胞(DCs)是体内作用最强的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC),属于异质性细胞群体,其具有双向免疫调节功能,既可提呈抗原、激活 T 细胞,诱导免疫应答,又可使 T 细胞清除或促进调节性 T 细胞增殖,诱导免疫耐受<sup>[3]</sup>。其抗原提呈能力为其他提呈细胞的数百倍,可激活幼稚 CD4<sup>+</sup> T 辅助细胞和未接触过抗原的 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞。基于 DC 的免疫治疗已经被用于产生肿瘤特异性抗原提呈并生成细胞毒性 T 淋巴(cytotoxic T lymphocytes, CTL)是对抗肿瘤细胞的有效手段<sup>[4]</sup>。

目前培养和扩增 DCs 的基本方法是联合细胞因子 rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF-a 体外诱导 DC<sup>[5]</sup>。细胞因子是树突状细胞体外培养必不可少的物质,对树突状细胞的分化成熟起到关键作用。rhGM-

阳性对照组与阴性对照组相比,DCs 表面分子 CD83、CD86、CD80、CD1a 的表达明显增加,HLA-DR 的表达轻度增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1、图 2。

表 1 蕈麻多糖对 DCs 表型的影响( $\bar{x} \pm s$ ,%, $n=5$ )

CSF 可促进髓系细胞发育,是维持树突状细胞分化发育的最根本细胞因子;rhIL-4 可抑制巨噬细胞、粒细胞增生,而有利于向树突状细胞分化并维持树突状细胞成熟,二者是树突状细胞发育成熟的决定性细胞因子;rhTNF-a 主要作用是刺激树突状细胞成熟,也可阻止粒系的分化,并可抑制树突状细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

荨麻属植物具有增强免疫功能的作用。研究表明,荨麻根乙醇提取物具有抑制白细胞蛋白酶活性,增强 T 细胞介导的免疫反应及自然杀伤细胞(NK 细胞)活性,诱导产生  $\gamma$ -干扰素、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),从而具有免疫增强活性<sup>[7]</sup>。荨麻多糖类成分,能调节 T 淋巴细胞免疫功能,阻止上皮组织癌细胞的分化与扩散<sup>[8]</sup>。基于其免疫增强功能,我们在本实验中以云南特有粗根荨麻多糖代替细胞因子体外诱导培养 DC,目前国内文献尚未见同类研

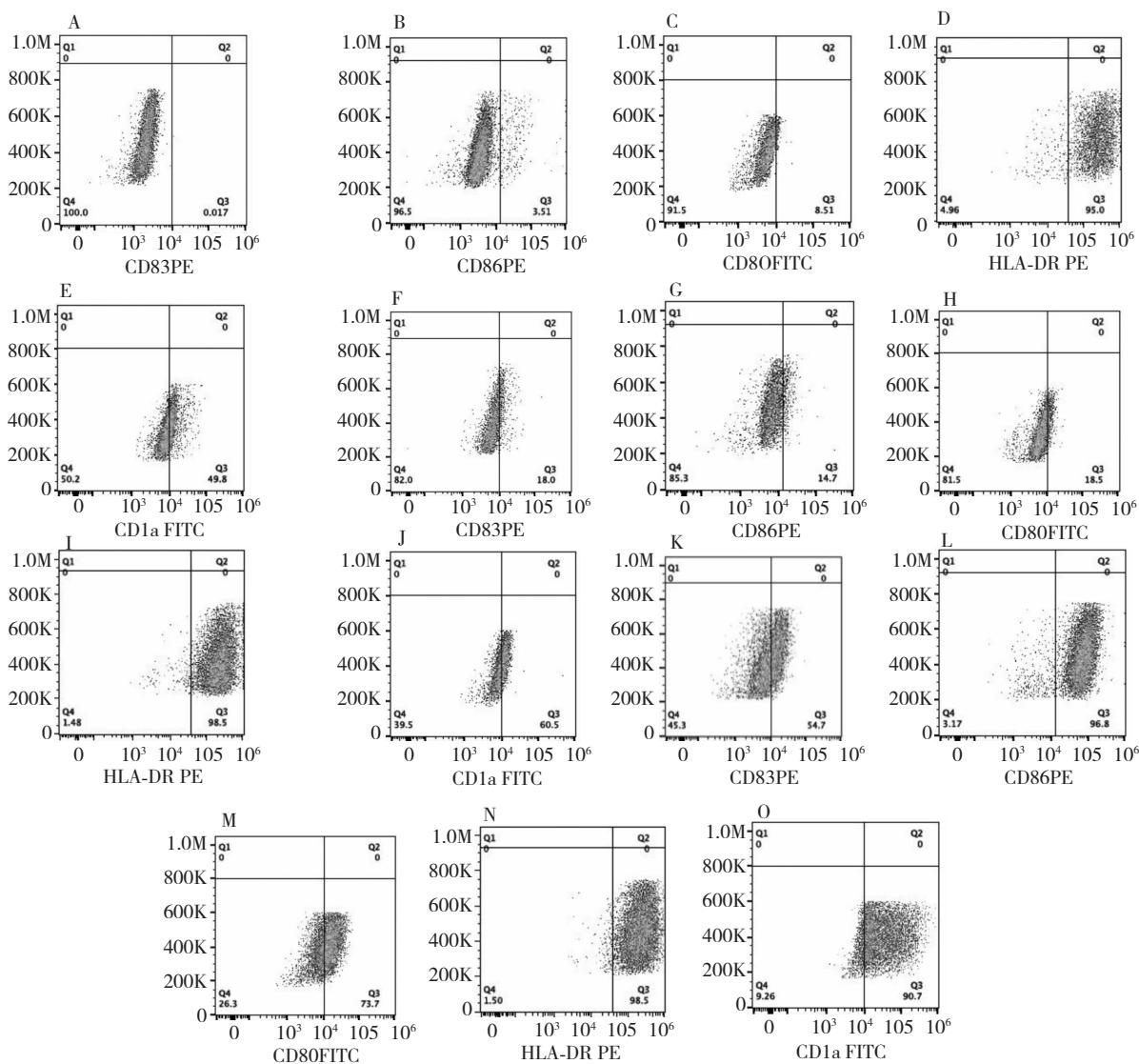


图2 阴性对照组 CD83(A)、CD86(B)、CD80(C)、HLA-DR(D)、CD1a(E)、实验组 CD83(F)、CD86(G)、CD80(H)、HLA-DR(I)、CD1a(J)和阳性对照组 CD83(K)、CD86(L)、CD80(M)、HLA-DR(N)、CD1a(O)细胞免疫表型分析

Fig. 2 Expression analysis of CD83(A), CD86(B), CD80(C), HLA-DR(D) and CD1a(E) of negative control group, CD83(F), CD86(G), CD80(H), HLA-DR(I) and CD1a(J) of experimental control group as well as CD83(K), CD86(L), CD80(M), HLA-DR(N) and CD1a(O) of positive control group in DCs surface molecules by flow cytometry

究报道。

实验发现粗根荨麻多糖代替细胞因子可以培养出形态与常规细胞因子培养体系相似的细胞,实验组与阴性对照组相比,DCs 表面分子 CD83、CD86、CD80、CD1a 的表达明显增加,HLA-DR 的表达轻度增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。阳性对照组与阴性对照组相比,DCs 表面分子 CD83、CD86、CD80、CD1a 的表达明显增加,HLA-DR 的表达轻度增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。由此可见粗根荨麻多糖能诱导或促进脐血单核细胞分化为较成

熟的树突细胞,虽然与阳性对照组仍有一定差距,但表达比阴性对照组高,其确切的机制还有待于进一步研究。

#### 参考文献

- Pan LF(潘丽芳),Zheng AW(郑爱文). Research on presenting function of apoptotic ovarian cancer dendritic cells induced by paclitaxel and cisplatin. *China Modern Doctor*(中国现代医生),2011,49(18):18-20.

(下转第 734 页)