

蜂毒肽对成熟树突细胞诱导 T 细胞分化的免疫调节的影响

熊浪平¹, 贺守第², 关彤³, 莫丽华², 杨平常², 刘志刚², 吉琼梅², 黄胜光^{2*}¹广州中医药大学, 广州 510405; ²深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060;³广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405

摘要:通过蜂毒肽(Melittin, MT)干预脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)刺激树突细胞(Dendritic Cell, DC)与淋巴细胞共培养,以探究MT对Th1/Th2分化的影响。用MTS检测LPS、MT对DC与淋巴细胞共培养活性;流式细胞术检测MT对LPS刺激DC与淋巴细胞共培养中Th1、Th2比例;ELISA检测LPS刺激DC与淋巴细胞共培养中细胞上清液中IL-4、INF- γ 浓度。结果显示MT、LPS在一定浓度下刺激DC与淋巴细胞共培养的活性;在成熟的DC诱导下,MT能上调Th1/Th2比例、Th1百分率($P < 0.05$)及INF- γ 浓度($P < 0.01$);对IL-4浓度、Th2百分率无影响($P > 0.05$)。本研究说明MT通过上调Th1细胞比例,INF- γ 浓度,促进Th1/Th2细胞向Th1方向分化途径对T细胞起免疫调节作用。

关键词:蜂毒肽;树突细胞;T细胞;免疫调节

中图分类号:R593.22

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.11.001

Immune Regulation Influence of Melittin on T Cells Induced Differentiation by Mature Dendritic Cells

XIONG Lang-ping¹, HE Shou-di², GUAN Tong³, MO Li-hua², YANG Ping-chang²,
LIU Zhi-gang², JI Qiong-mei², HUANG Sheng-guang^{2*}

¹Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

²Institute of Allergy and Immunology, Shenzhen University School of Medicine, Shenzhen 518060, China;

³The NO. 1 Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: To study the intervention of melittin (MT) on dendritic cells (DC) co-cultured with lymphocytes stimulated by lipopolysaccharide (LPS), the impact of MT on the differentiation of Th1/Th2 was investigated. MTS was used to detect the activity of DC co-cultured with lymphocytes by LPS and MT; Flow cytometry was used to detect the ratio of Th1 and Th2 in the co-culture of DCs stimulated by MT and LPS; ELISA was used to detect the concentration IL-4, INF- γ in cell supernatant of MT and LPS stimulated co-cultured DC and lymphocyte. The results showed that a certain concentration of MT and LPS can stimulate the co-cultured activity of DC with lymphocytes. In the induction of mature DC, MT can increase the Th1/Th2 ratio, the Th1 percentage ($P < 0.05$) and the INF- γ ($P < 0.01$). But it had no effect on the concentration of IL-4 and Th2 ($P > 0.05$). The study demonstrated that through upregulating the expression of Th1 cell ratio and INF- γ concentration, MT promoted the differentiation of Th1/Th2 cells to the Th1 pathway, thus playing immunomodulatory effects on T cells.

Key words: melittin; dendritic cell; T cell; immune regulation

T细胞调节是人体内细胞调节的重要部分,在T细胞调节中存在一个重要的平衡:Th1/Th2平衡, Th1细胞分泌的INF- γ 具有抗肿瘤作用,而Th2细胞分泌的IL-4具有促进炎症作用^[1,2]。在Th1/Th2

平衡中,通过调节Th1/Th2的比例来调节抗炎、抗肿瘤的效果。树突状细胞(Dendritic Cell, DC)是激活初始型T细胞的关键因素,活化的DC能激活免疫细胞中的抗原特异性淋巴细胞,被称为循环T细胞高效的抗原呈递细胞^[3],因此活化的DC能激活T细胞,促进T细胞向Th1和Th2分化。众所周知,脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分及致病物质,可以通过多条途径

收稿日期:2017-03-06 接受日期:2017-05-09

基金项目:国家自然科学基金(81271950);深圳市科技计划(JCYJ20130402151227168;JCYJ20150402152130192;005177);深圳市南山区科技项目(2014046)

*通信作者 E-mail:incg57@163.com

上调树突状细胞表面共同分子、趋化因子的表达,是 DC 细胞的重要促成成熟剂^[4]。

蜂毒肽(Melittin, MT)是蜂毒的主要成分,约占蜂毒的(40%~45%),是蜂毒中主要的作用成分。研究发现蜂毒(bee veem)作为蜜蜂分泌的一种毒液,具有很好的抗炎、调节免疫作用^[5],而现代动物和细胞实验研究发现其具有强大抗炎、抗菌、抗肿瘤的作用^[6,7]。而在免疫调节方面研究比较少。因此本实验目的首先了解 LPS 活化的 DC 对淋巴细胞影响,在此基础上研究 MT 对 T 细胞的调节作用,研究 MT 对免疫系统的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与小鼠 DC 系

健康 BALB/c 雌性小鼠 4 只,SPF 级,体重 18~20 g,广东省实验动物中心提供。RAW2.4DC,深圳大学变态免疫室提供。

1.2 主要试剂

MT(98%,北京中科亚光生物科技有限公司合成),LPS(Sigma),MTS(Promegag),小鼠 IL-4、IFN- γ ELISA 试剂盒(北京四正柏公司),1640 培养基(Gbico),anti-mouse-IL-4-PE、anti-mouse-IFN- γ -FITC(biolegend),anti-mice-CD4-APC、cell stimulation cocktail、IC Fixation Buffer、Permeabilization Buffer、流式缓冲液(ebioscience)。

1.3 小鼠淋巴细胞提取、DC 系培养

乙醚麻醉并脱颈处死小鼠;酒精消毒后,无菌条件下分离小鼠组织,取出脾脏,取少量脾脏组织,放入尼龙网中,加入淋巴细胞分离液,充分碾磨脾脏组织至无块状物,取尼龙网过滤液 4 mL,加入 1 mL 1640 培养基,放入离心机(20℃,800G \pm 4)离心 30 min,吸取中间雾状单核细胞层,完全培养基洗涤离心,用含 10% 的 FBS 完全 1640 培养基重悬细胞,血球计数板测量细胞个数;复苏冻存的 RAW2.4 DC,于 1640 培养基培养,使状态恢复最佳状态;取等量的小鼠淋巴细胞与 DC 共培养。

1.4 不同浓度 MT、LPS 对 DC 与淋巴细胞共培养活性的测定

实验设置空白对照组,不同浓度 MT 组、LPS 组(0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μ g/mL),每组设 4 个复孔,收集状态好的 DC 与淋巴细胞,将细胞数调至 2×10^5 个/mL,分别加入以上不同浓度 LPS、MT,细胞箱孵育 24 h,每孔加入 20 μ L

试剂,37℃避光孵育 2 h,酶标仪读取 A₄₉₀ 吸光值。

1.5 细胞上清液 IL-4、IFN- γ 测定

根据 LPS、MT 对细胞活性结果,实验设置空白组,LPS(1 μ g/mL)组,LPS(1 μ g/mL) + MT(5 μ g/mL)组。取 2×10^5 个/mL DC 与淋巴细胞混悬液至六孔板,加入上述浓度药物,培养 72 h,离心,取细胞上清液,根据 IFN- γ 、IL-4 的 ELISA 试剂盒说明书,检测细胞因子 IFN- γ 、IL-4 浓度。

1.6 Th1、Th2 百分率测定

取培养 72 h 的上述浓度药物干预 DC 与淋巴细胞共培养细胞,加入 2 μ L/mL cell stimulation cocktail,培养箱孵育 16 h;胰酶消化后,放入流式上样管,离心收集细胞,加入 anti-mice-CD4-APC 抗体,4℃孵育 30 min;1400 rpm,离心 5 min,加入 1 mL 的 IC Fixation Buffer,室温孵育 20 min 后,洗涤、重悬细胞后,加入 1 mL Permeabilization Buffer,室温孵育 15 min,离心,加入 anti-rat-IL-4-PE、anti-rat-IFN-r-FITC 抗体,4℃避光孵育 30 min,1 mL Permeabilization Buffer 混匀后,离心去上清,加入 1 mL 流式细胞缓冲液重悬细胞。并上机检测并分析,应用 Flowjo 7.61 分析数据。

1.7 统计学方法

所得数据应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理,计量资料 $\bar{X} \pm SD$ 表示,两组间比较采用 t 检验、非参数检验分析, $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 MT、LPS 对 DC 与淋巴细胞活性影响比较

0~15 μ g/mL 浓度的 MT 和 0~20 μ g/mL 浓度的 LPS 能促进 DC 与淋巴细胞活性,其中 15 μ g/mL MT 对 DC 和淋巴细胞活性最大(2.34 \pm 0.22)(a),1 μ g/mL LPS 对 DC 与淋巴细胞活性最大(1.84 \pm 0.36)(表 1)。

2.2 MT 对细胞上清液 IFN- γ 、IL-4 浓度的影响

LPS 组上调 IL-4 浓度,下调 IFN- γ 浓度($P < 0.05$);LPS + MT 组上调 IFN- γ 浓度($P < 0.01$),而对 IL-4 浓度无明显影响($P > 0.05$);MT 组都对 IFN- γ 、IL-4 无明显影响($P > 0.05$)(图 1)。

2.3 MT 对 Th1、Th2 调节影响

LPS 组上调 Th2 百分率($P < 0.05$),对 Th1 百分率无影响($P < 0.05$);LPS + MT 组上调 Th1 浓度($P < 0.05$),而对 Th2 百分率无影响($P > 0.05$);MT 组都对 Th1、Th2 百分率都无影响($P > 0.05$)(图 2)。

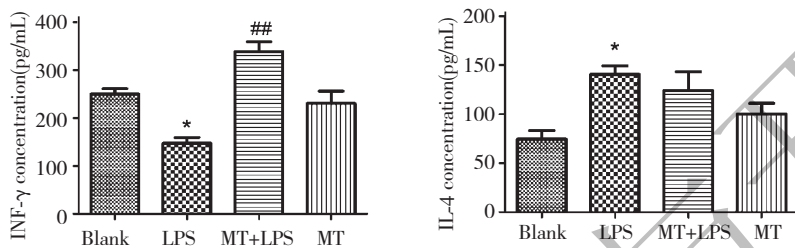
表 1 MT、LPS 对 DC 细胞活性影响

Table 1 The effect of melittin and LPS on the activity of DC cells

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)								
	0	0.25	0.5	1	2	5	10	15	20
蜂毒肽组 Melittin	1.42 \pm 0.11	1.85 \pm 0.14	1.89 \pm 0.13	1.73 \pm 0.17	1.84 \pm 0.25	2.34 \pm 0.22 ^a	1.68 \pm 0.24	1.73 \pm 0.13	1.30 \pm 0.34
LPS 组 LPS	1.42 \pm 0.11	1.55 \pm 0.12	1.54 \pm 0.36	1.84 \pm 0.36 ^b	1.62 \pm 0.13	1.49 \pm 0.18	1.50 \pm 0.18	1.70 \pm 0.25	1.45 \pm 0.11

注:与不加 MT 组比较,^a $P < 0.05$;与不加 LPS 组比较,^b $P < 0.05$ 。

Note: compared without MT group, ^a $P < 0.05$; compared without LPS group, ^b $P < 0.05$.

图 1 蜂毒肽对细胞上清液 IFN- γ 、IL-4 浓度的影响Fig. 1 The effect of melittin on cell supernatant IFN- γ and IL-4 concentration

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与 LPS 组比较,## $P < 0.01$

Note: compared with blank group, * $P < 0.05$; compared with LPS group, ## $P < 0.01$

2.3 MT 对 Th1/Th2 比例调节影响

LPS 组和 MT 组对 Th1/Th2 比例无影响 ($P > 0.05$), LPS + MT 组上调 Th1/Th2 比例 ($P < 0.05$) (图 3)。

3 讨论与结论

DC 是目前为止发现的功能最强的抗原呈递细胞 (Antigen presenting cell, APC)。它能通过 MHCII 类分子表达,高效的激活 CD4⁺、CD8⁺、CTL 等 T 细胞,可活化初始 T 细胞,是机体免疫应答的启动者^[9,10]。研究表明,在自身免疫性疾病中如哮喘,由 APC 如 DC 等抗原呈递给辅助性 T 细胞,使 CD4⁺ 初始型辅助性 T 细胞活化,并在各种因素下使辅助性 T 细胞向 Th2 分化增多,导致体内 Th1/Th2 比例失衡,进而导致 Th2 类细胞因子 IL-4 分泌增多。LPS 作为细胞的主要抗原物质,能通过 TLR 信号途径促进 DC 成熟。研究已证明 LPS 通过结合 TLR4/5 后激活 NF- κ B 及 MAPK 途径调节多种基因转录,促进 DC 成熟^[11]。其中 LPS 在 DCs 受抗原刺激过程早期可使 DCs 产生高水平 IL-12,但在 DCs 受抗原刺激过程晚期 LPS 却只能使 DCs 产生低水平的 IL-12,从而间接的使 Th0 细胞向 Th2 分化。本实验中无 LPS 刺激时,未成熟的 DC 对 Th1、Th2 无明显影响,而在 LPS 刺激下,DC 能促进 IL-4 的分泌,抑

制 IFN- γ 产生,说明本实验可能是 LPS 刺激 DC 晚期,引起 Th1/Th2 向 Th2 偏移。

T 细胞介导免疫反应是机体抗肿瘤、抗感染、抗炎的最重要组成部分。在成熟 DC 的抗原信号和刺激分子信号作用下,CD4⁺ 细胞可以分为 Th1、Th2 细胞,对各种免疫性疾病起调节作用^[12,13]。Th1 细胞通过分泌 IFN- γ 、IL-12 等介导抗肿瘤、抗感染和细胞免疫;Th2 细胞通过分泌 IL-4、IL-10 等刺激免疫 B 细胞分泌抗体来介导慢性炎症和体液免疫反应^[14,15]。本实验结果发现在 LPS 诱导 DC 成熟基础上,MT 能促进 Th1 比例、IFN- γ 上调,说明 MT 促进 IFN- γ 分泌,抑制感染、抗肿瘤;同时能间接抑制 Th2 产生 IL-4,说明可能对炎症也有一定的抑制作用。

通过不同浓度 MT 能促进 DC 和小鼠淋巴细胞共培养的活性,说明 LPS 和 MT 能不同程度激活免疫细胞。通过使用 5 $\mu\text{g/mL}$ MT 与 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的共同干预,发现单用 MT 对 DC、T 细胞活性及分化无明显影响,而在 LPS 干预下,MT 能明显上调 Th1 细胞比率和 IL-4、IFN- γ 浓度,同时升高 Th1/Th2 比例,说明 MT 能使 T 细胞向 Th1 分化,同时能降低 IL-4 炎症因子浓度。从实验结果可知,MT 能够提高 Th1 细胞的比例,而 IFN- γ 浓度的上升,可能与 Th2 细胞比例有关;同时我们发现 MT 能降低 IL-4 浓度,而 Th2 的细胞比例并没有增加,可能是 MT 并

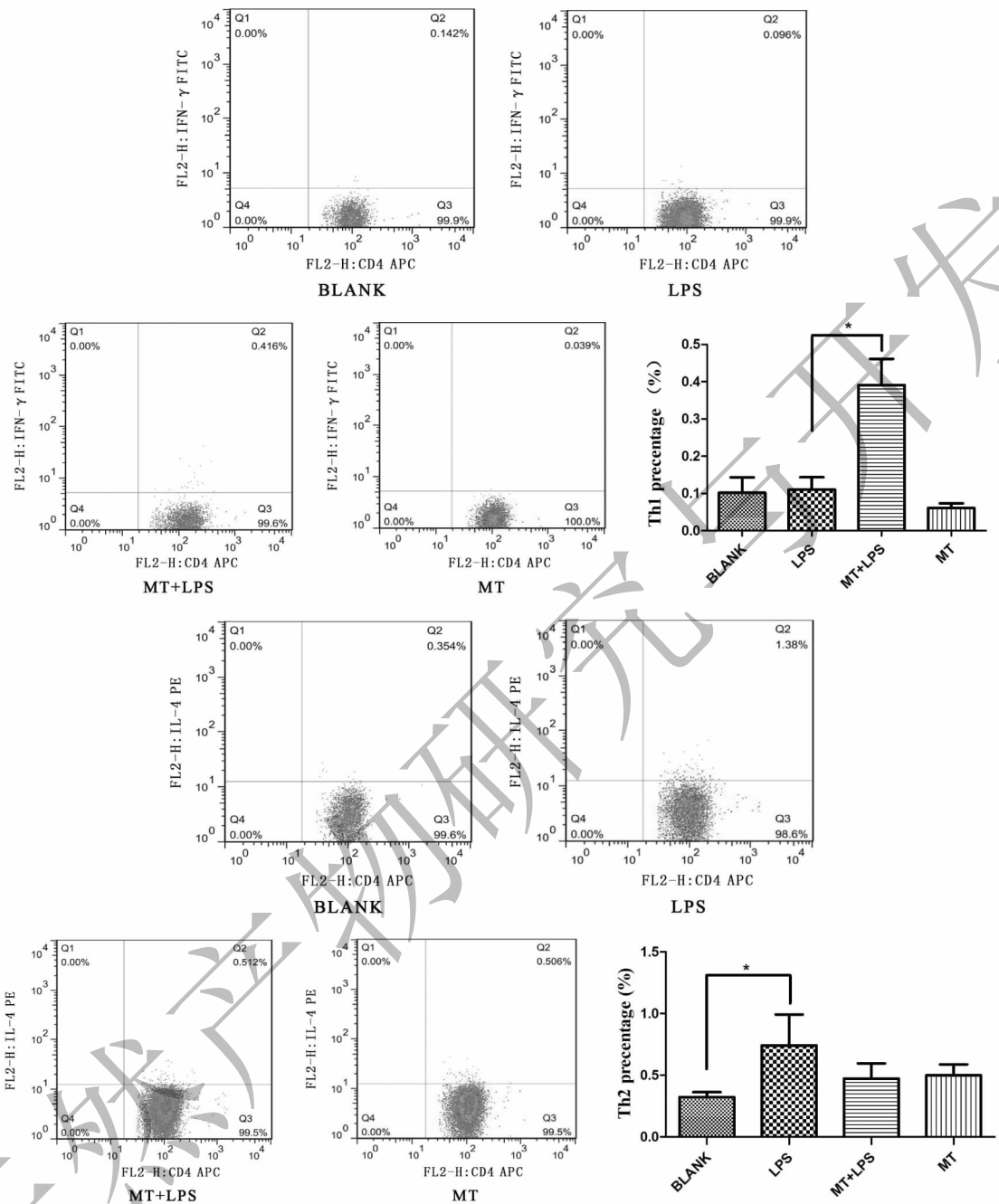


图2 MT对Th1和Th2细胞比率的影响

Fig. 2 The effect of melittin on Th1 and Th2 cell ratio

注:与LPS组比较, * $P < 0.05$

Note: compared with LPS group, * $P < 0.05$

非通过降低Th2细胞数来降低IL-4的浓度,而通过其他途径起到抗炎作用。既往研究发现,蜂毒具有通过Th1/Th2途径调节免疫作用^[16],MT作为蜂毒的主要作用成分,体外和体内研究已确切证实它具有抗炎,抗肿瘤,抗感染的作用,本实验从细胞学水

平初步探究到MT提高淋巴细胞IFN- γ 浓度,IFN- γ 作为Th1细胞分泌的细胞因子,具有广泛的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用,所以我们猜想MT在体内实验也许通过调节机体免疫细胞产生IFN- γ 浓度间接达到抗病毒、抗肿瘤的目的,同时IFN- γ 上升能相

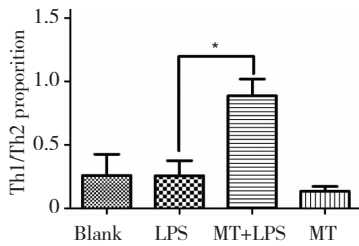


图3 MT对Th1/Th2细胞比例的影响

Fig. 3 The effect of melittin on Th1/Th2 cell proportion

注:与LPS组比较,* $P < 0.05$

Note: compared with LPS group, * $P < 0.05$

应的减少IL-4而减轻炎症作用,需要我们进一步研究。本实验不足是从细胞水平粗略探讨LPS诱导DC成熟对T细胞的影响和MT对Th1、Th2的影响,未深入研究其机制,具体机制是否是通过激活淋巴细胞表面的受体或者影响细胞内的信号传导通路实现我们将进一步研究。但本实验总体从细胞水平说明发现MT在免疫细胞激活的状态下上调Th1比例、IFN- γ 浓度,下调IL-4浓度对免疫细胞产生影响,在抗肿瘤、抗炎症、抗感染等方面的研究具有一定的价值。

参考文献

- Chen ZM, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I, *et al.* IL-10 and TGF- β induce alloreactive CD4 + CD25-T cells to acquire regulatory cell function. *Blood*, 2003, 101 :5076-5083.
- Matsuda C, Ito T, Song J, *et al.* Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Clin Exp Immunol*, 2007, 148 :348-359.
- Hammer GE, Ma A. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31 :743-791.
- Wang J, Qin Y, Mi X. The protective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BMSC) on LPS-induced acute lung injury via TLR3-mediated IFNs, MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Biomed Pharmacother*, 2016, 79 :176-187.

- Son DJ, Lee JW, Lee YH, *et al.* Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Therapeutics*, 2007, 115 :246-270.
- Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36 :697-705.
- Lambrecht BN, Hoogsteden HC, Pauwels RA. Dendritic cells as regulators of the immune response to inhaled allergen: recent findings in animal models of asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 124 :432-446.
- Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, *et al.* CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature*, 2009, 460 (7252) :264-268.
- Ganguly D, Haak S, Sisirak V, *et al.* The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 :566-577.
- Tan L, Huang Y, Pan X, *et al.* Administration of bone marrow stromal cells in sepsis attenuates sepsis-related coagulopathy. *Ann Med*, 2016, 48 (4) :235-245.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, *et al.* Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 2000, 1 :311-316.
- Gaffen SL, Hajishengallis G. A new inflammatory cytokine on the block; re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *J Dent Res*, 2008, 87 :817-828.
- Xia N, Zhou S, Liang Y, *et al.* CD4 + T cells and the Th1/Th2 imbalance are implicated in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Int J Mol Med*, 2006, 17 :911-916.
- Davies JM, Macsharry J, Shanahan F. Differential regulation of Toll-like receptor signaling in spleen and Peyer's patch dendritic cells. *Immunology*, 2010, 131 :438-448.
- Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 17 (1) :3-9.
- Lee H, Lee E, Kim H, *et al.* Bee venom-associated Th1/Th2 immunoglobulin class switching results in immune tolerance of NZB/W F1 murine lupus nephritis. *Am J Nephrol*, 2011, 34 :163-172.