

猪苓多糖通过 Toll 样受体 4 对小鼠骨髓来源树突状细胞作用研究

李心群¹, 许文^{2*}

1. 温州医学院附属第一医院, 浙江 温州 325035

2. 温州医学院 微生物学与免疫学教研室, 浙江 温州 325035

摘要: 目的 研究猪苓多糖 (*Polyporus umbellatus* polysaccharides, PPS) 活化小鼠骨髓来源树突状细胞 (bone marrow dendritic cells, BMDC) 功能调节的作用机制, 进一步阐明 PPS 的免疫学活性机制。方法 以 ³H-TdR 掺入法、ELISA 及流式细胞术检测 BMDC 表型和功能的各项指标。结果 PPS 刺激小鼠 BMDC 表达 CD11c、CD86 及白细胞介素-12、-10 (IL-12、IL-10) 产生, 并且具有剂量依赖效应。另外, 较阴性对照组, 经 PPS 诱导成熟的 BMDC 其活化初始 T 细胞的能力显著提高而吞噬能力显著下降。抗小鼠 Toll 样受体 4 (TLR4) 单抗可抑制 PPS 刺激 BMDC 产生 IL-12 p40 及阻断荧光标记猪苓多糖 (fluorescence-labeled PPS, f-PPS) 与 BMDC 的结合, 而抗 TLR2 及补体受体 3 (CR3) 单抗却无此效应。结论 PPS 可经 TLR4 活化小鼠 BMDC 发挥免疫调节活性。

关键词: 猪苓多糖; 树突状细胞; Toll 样受体 4 (TLR4); 免疫调节; 荧光标记

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0118-06

Effect of *Polyporus umbellatus* polysaccharides on activation of murine bone marrow dendritic cells via Toll-like receptor 4

LI Xin-qun¹, XU Wen²

1. First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

2. Department of Microbiology and Immunology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of immunomodulatory activity of *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PPS) on murine bone marrow dendritic cells (BMDC). **Methods** BMDC phenotype and the function indexes were observed by ³H-TdR incorporation, ELISA, and flow cytometry. **Results** Compared with the negative group, PPS could increase the co-expression of CD11c and CD86 molecules on dendritic cells (DC) surface and the production of IL-12 and IL-10 in a dose-dependent manner. PPS also enhanced matured BMDC capacity of T cell initial activation and decreased phagocytosis of BMDC. Anti-Toll-like receptor 4 (TLR4), but not anti-TLR2 or complement receptor 3 (CR3) monoclonal antibodies inhibited PPS-induced production of IL-12 p40 and blocked the combination between fluorescence-labeled PPS (f-PPS) and BMDC. **Conclusion** The data demonstrate that PPS could promote the activation of murine BMDC via TLR4 and maturation of immunomodulatory activity.

Key words: *Polyporus umbellatus* polysaccharide (PPS); dendritic cells (DC); Toll-like receptor 4 (TLR4); immunomodulation; fluo-rescence-labeled

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 是一种常用的中药材, 具有利尿、抗肿瘤及免疫增强的功效。猪苓多糖 (*polyporus umbellatus* polysaccharide, PPS) 是猪苓的活性成分之一, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老及免疫调节活性^[1-4]。树突状细胞 (dendritic cells, DC) 是目前所知功能最强的抗原提呈细胞, 有别于其他抗原提呈细胞, DC 最大特

点就是能够显著刺激初始 T 细胞增殖^[5-7]。推测 PPS 通过激活 DC 发挥免疫增强作用。为探讨其作用机制, 本研究观察了 PPS 对小鼠骨髓来源的 DC 表型及功能的影响, 并初步确定其作用受体。

1 材料

1.1 动物

雌性 6~8 周龄的 BALB/c 及 C57BL/6 小鼠,

收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 温州市科技局资助项目 (Y20080126); 温州医学院科研启动基金资助项目 (QTJ07021)

作者简介: 李心群 (1979—), 女, 福建福州人, 护师, 主要从事护理理论与急重症护理研究。E-mail: lxq2006888@yahoo.com.cn

*通讯作者 许文 Tel: (0577)86689910 15057721988 E-mail: wenxu.cn@gmail.com

购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 药品与试剂

PPS 由江苏正大天晴公司提供, 苯酚-硫酸法检测多糖质量分数 $>95\%$ 。相对分子质量为 1.6×10^5 , 紫外与红外光谱分析 PPS 表现出 β -D-吡喃葡萄糖的特征吸收^[8]。经 LAL 法检测, $25 \mu\text{g/mL}$ PPS 含内毒素 $<0.01 \text{ ng/mL}$ 。胎牛血清 (FCS) 和 RPMI 1640 为 Hyclone 产品; 小鼠 IL-12 p40, IL-10 ELISA 试剂盒为 R&D 公司产品; 内毒素鲎试剂 (limulus amoebocyte lysate, LAL) 检测试剂盒购自 Sigma 公司。PE-标记抗小鼠 CD11c、FITC 标记抗小鼠 CD86 单抗及抗小鼠 CD16/32 购自 BD 公司。抗小鼠 TLR4、TLR2 及 CD11b (补体受体 3, CR3) 单抗购自 eBiosciences (抗体在用于细胞培养之前均用 PBS 透析以去除其中的叠氮钠)。RPMI 1640 完全培养基: 以 RPMI 1640 培养基为基础, 加入灭活的 10% 胎牛血清 (FCS), 100 U/mL 青霉素及 $100 \mu\text{g/mL}$ 链霉素。阴性对照多糖为葡聚糖, 相对分子质量 70 000, 购自 Sigma 公司。

1.3 主要仪器

流式细胞仪, FACScan (B-D 公司); 酶标仪 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 荧光标记 PPS 及葡聚糖的制备

荧光胺标记猪苓多糖 (f-PPS) 及葡聚糖 (f-Dextran), 采用 CNBr 活化的方法制备^[8]。即 0.2 mL CNBr (50 mg/mL) 加于 1 mL PPS 或葡聚糖 (20 mg/mL), 0.2 mol/L NaOH 调 pH 11, 反应 15 min, 然后以 pH 8.0 硼酸盐缓冲液透析 20 h。活化的 PPS 或葡聚糖与 2 mg 荧光胺反应 10 h 后, 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-50) 柱色谱分离标记多糖, 得到 f-PPS 及 f-Dextran。用于细胞试验的 PPS、f-PPS、葡聚糖及 f-Dextran 均溶于完全 RPMI 1640 培养基, 并经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器滤过除菌, 4°C 保存。

2.2 细胞增殖测定

脱颈处死小鼠, 无菌条件下取脾脏, 制成细胞悬液, 裂解红细胞, 用 RPMI 1640 调整细胞浓度为 $4 \times 10^6/\text{mL}$, $100 \mu\text{L}/\text{孔}$, 加入 96 孔板。加入葡聚糖 ($50 \mu\text{g/mL}$)、LPS ($5 \mu\text{g/mL}$) 或不同质量浓度的 PPS、f-PPS ($12.5 \sim 100 \mu\text{g/mL}$), $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ 于 96 孔板中, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 72 h, 于终止培养前 8 h, 每孔加入 $7.4 \text{ kBq } ^3\text{H-TdR}$, 收集细胞于玻璃纤维滤纸, β -计数器测定放射活性。

2.3 骨髓树突状细胞 (BMDC) 制备

将小鼠脱颈处死, 无菌条件下剥离股骨, PBS 冲洗骨髓腔, 获得骨髓细胞混合液, 离心弃上清, 洗 2 次。用红细胞裂解液 (Tris NH_4Cl) 裂解红细胞后, 以完全 RPMI 1640 培养基调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 加入到 6 孔培养板中, 贴壁 2 h, 去除悬浮细胞, 加入含细胞因子 rmGM-CSF (20 ng/mL) 和 IL-4 (20 ng/mL) 的完全培养基, 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养, 隔天半量换液, 补加细胞因子。培养第 5 天, 非黏附细胞以磁珠 (Miltenyi) 分选, 收集 CD11c⁺ 细胞, 加入葡聚糖、PPS 或 LPS 继续培养 48 h。

2.4 BMDC 细胞表面分子检测

于第 5 天收集 BMDC, 分别加入不同质量浓度 (12.5 、 25 、 50 、 $100 \mu\text{g/mL}$) PPS 及 $50 \mu\text{g/mL}$ 葡聚糖、 100 ng/mL LPS, 继续培养 48 h, 每管 5×10^5 BMDC 中加入抗小鼠 CD16/32 抗体以封闭 Fc 受体。然后加入 $1 \mu\text{g}$ FITC-标记的 anti-CD11c、PE-标记的 anti-CD86 单克隆抗体或同型对照抗体。 4°C 孵育 30 min, 流式细胞仪检测, Cell Quest 软件分析。

2.5 ELISA 检测细胞因子

BMDC 中加入 $50 \mu\text{g/mL}$ 葡聚糖、 100 ng/mL LPS 或不同质量浓度 PPS。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下培养 48 h, 收集培养上清, 依试剂盒说明书操作, 酶标仪检测 IL-12 p40 及 IL-10 水平。

2.6 吞噬试验

未成熟 DC 经 PPS ($50 \mu\text{g/mL}$)、葡聚糖 ($50 \mu\text{g/mL}$) 及 LPS (100 ng/mL) 作用 24 h 后, 加入 1 mg/mL f-PPS, 37°C 作用 1 h 后, 流式细胞仪分析。同样试验于 4°C 下操作, 作为对照, 以观察低温对 DC 吞噬功能的影响。

2.7 混合淋巴细胞反应

用 T 细胞分离剂盒 (Miltenyi Biotec) 自 H-2d BALB/c 小鼠脾细胞中分离 $\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$ T 细胞。 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 置于 96 孔板中, 分别加入不同稀释度的 30 Gy 射线照射的 BMDC, 培养 72 h, 于终止培养前 8 h, 每孔加入 $7.4 \text{ kBq } ^3\text{H-TdR}$, 收集细胞于玻璃纤维滤纸, β -计数器测定放射活性。

2.8 抗体中和试验

BMDC 先与 $20 \mu\text{g/mL}$ 的抗 TLR4、TLR2 及 CR3 抗体作用 1 h, 再加入 $50 \mu\text{g/mL}$ PPS。培养 24 h 后, 检测上清中 IL-12 p40 水平。

2.9 BMDC 表面受体分析

5×10^5 BMDC 中加入 $1 \mu\text{g/mL}$ f-PPS 或 f-Dextran $50 \mu\text{L}$, 4°C 冰箱中避光反应 30 min, PBS 洗 2 遍, 流式细胞仪检测细胞表型。进行竞争抑制试验时, BMDC 先与 $100 \mu\text{g/mL}$ 未标记 PPS, $200 \mu\text{g/mL}$ 抗 TLR4、TLR2 或 CR3 抗体反应 30 min, 再加入 f-PPS。

2.10 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行组间方差分析 (One-way-ANOVA)。

3 结果

3.1 PPS 刺激小鼠脾细胞增殖

PPS 可以显著刺激小鼠脾细胞增殖, 与葡聚糖及对照组相比具有显著差异 ($P < 0.05$), 并具有剂量依赖效应 (图 1), 经 LAL 法检测排除了 LPS 污染的可能。另外, 与 PPS 组相比较, f-PPS 的活性并无显著变化 (图 1), 说明所制备的 f-PPS 生物活性未发生明显改变, 可用于后续试验。

3.2 PPS 上调 BMDC 表面共刺激分子表达

BMDC 于第 5 天加入 PPS 继续培养 48 h, 流式细胞仪检测细胞表面 CD11c 和 CD86 的表达情况, 分别以 LPS 及葡聚糖为阳性及阴性对照。图 2 说明 PPS 与 LPS 相似, 能够上调 CD11c 和 CD86 的表达, 即 PPS 能够促进 BMDC 的表型成熟。用不同质量

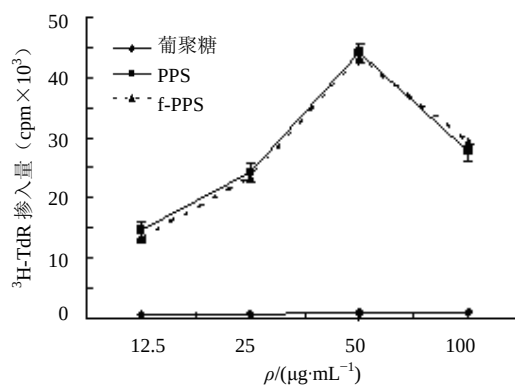


图 1 PPS 诱导小鼠脾细胞增殖

Fig. 1 PPS-induced proliferation of mouse splenic cells

浓度 (12.5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的 PPS 处理 BMDC, 结果显示具有浓度依赖性, 且 $50 \mu\text{g/mL}$ 为最适宜的质量浓度, 因为增加质量浓度并不能大幅增加 CD11c 和 CD86 的表达。

3.3 猪苓多糖增加 IL-12 p40 及 IL-10 表达

IL-12 是 DC 活化时产生的一个较为特异的产物。为检测 PPS 能否刺激 BMDC 产生细胞因子, 经不同质量浓度的 PPS 作用 48 h 后, 收集培养上清, ELISA 检测细胞因子浓度。如图 3 所示, PPS 能够诱导 BMDC 产生高水平 IL-12 p40, 且均具有剂量依赖效应。另外 PPS 亦可刺激 BMDC 产生低水平的 IL-10, 亦具有剂量依赖效应。

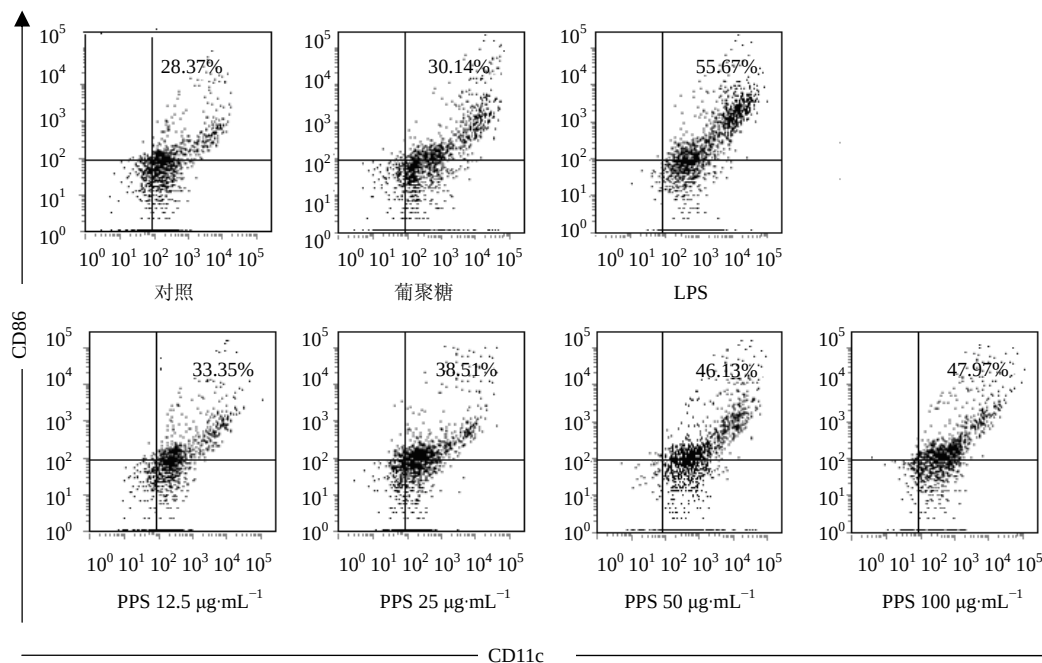


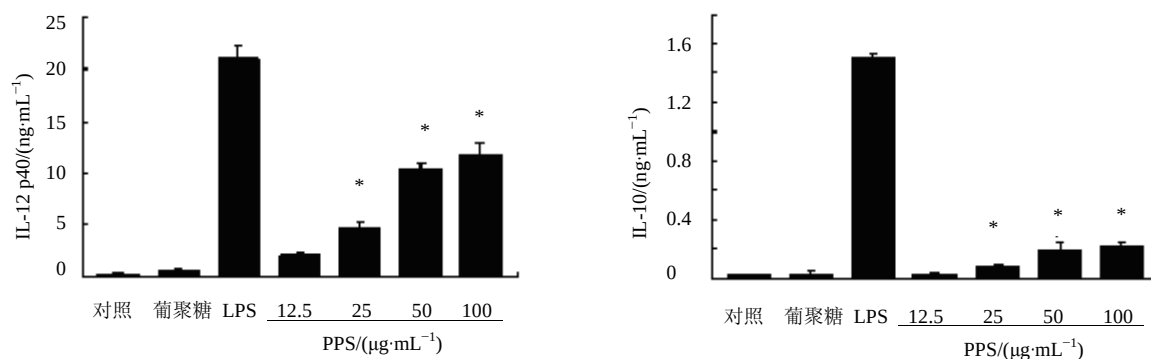
图 2 PPS 对 BMDCs 细胞膜表面分子表达的影响

Fig. 2 Effect of PPS on surface molecules expression of BMDCs

3.4 PPS 降低 BMDC 的吞噬活性

未成熟的 DC 具有较强的吞噬能力, 而成熟的 DC 吞噬能力较弱。经 LPS 诱导的 DC 吞噬能力明显下降。为检测 PPS 是否具有相似的作用, 于培养第 5 天加入 PPS 及 LPS, 48 h 后, 加入荧光标记的

葡聚糖孵育 1 h, 然后收集细胞, 流式细胞仪检测阳性细胞所占比例。结果显示(图 4)经 PPS 及 LPS 处理的 BMDC 与对照组比较吞噬能力显著下降。由于低温(4 °C)能够抑制 DC 的吞噬功能, 因此在 4 °C 条件下重复上述试验, 作为对照。



与葡聚糖组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Dextran group

图 3 PPS 诱导 DC 产生 IL-12 和 IL-10

Fig. 3 PPS-induced production of IL-12 and IL-10 in DC

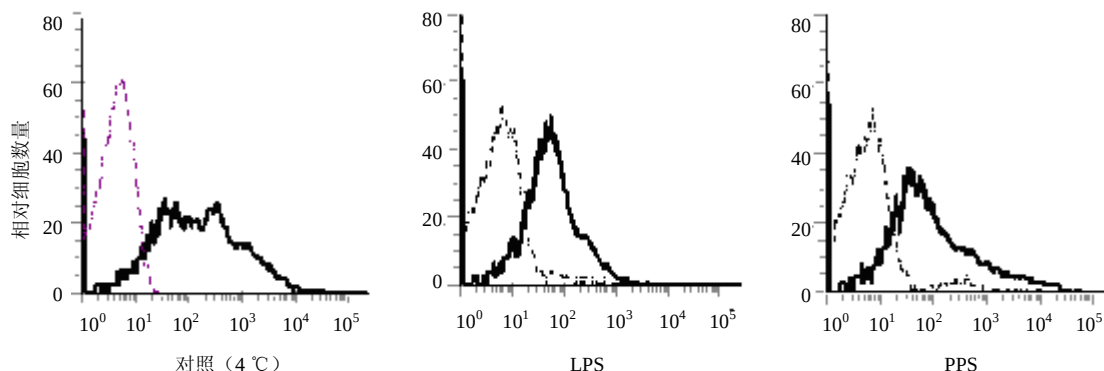


图 4 流式细胞仪检测 BMDC 抗原吞噬能力

Fig. 4 Phagocytosis of BMDC antigen detected by flow cytometry

3.5 PPS 增强 BMDC 活化 T 细胞的能力

成熟的 DC 较未成熟 DC 吞噬抗原的能力下降, 而提呈抗原的能力显著增强。因而刺激同种异基因淋巴细胞增殖的能力可反映 DC 提呈抗原的能力。图 5 显示, 经 PPS 处理的 BMDC 活化初始 T 细胞的能力显著增强。综合细胞因子及吞噬试验结果, 可认为 PPS 具有促进 BMDC 功能成熟的作用。

3.6 TLR4 与 PPS 诱导 BMDC 产生 IL-12 有关

图 6 结果表明, PPS 诱导 BMDC 产生 IL-12 与 TLR4 受体有关。

3.7 PPS 与 BMDC 特异结合

采用 CNBr 活化的方法制备 f-PPS 及 f-Dextran, 并以此为探针检测 f-PPS 与 BMDC 细胞膜分子的相互作用。结果显示, f-PPS 可与 BMDC 特异结合(图 7), 增加 f-PPS 浓度并不能增强其与 BMDC 的结合(结果未显示), 且未标记的 PPS 可以阻断 f-PPS 与 BMDC 的结合(图 7), 说明 BMDC 表面存在 PPS 特异的受体。用抗小鼠 TLR4 单抗可以显著抑制 f-PPS 与 BMDC 的结合, 而抗 TLR2 及抗 CR3 抗体无此作用, 说明 TLR4 是 PPS 的一个受体。

4 讨论

DC 的成熟是启动特异免疫应答的一个关键步

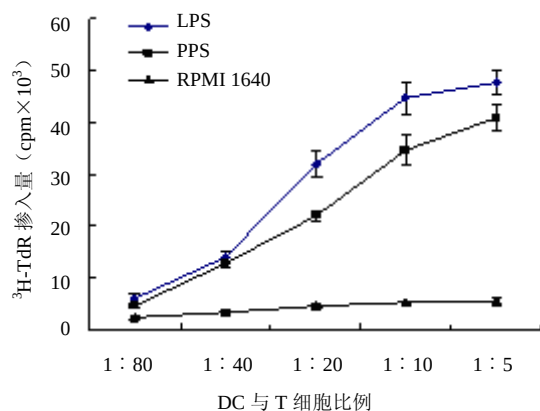
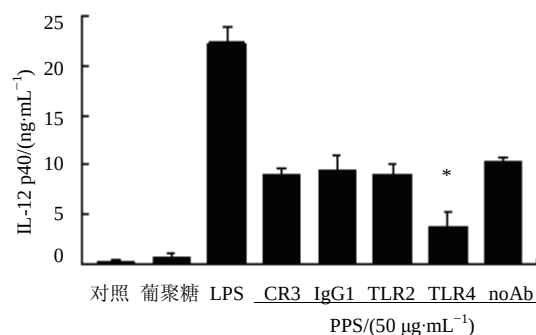


图 5 PPS 处理的 BMDCs 刺激 T 淋巴细胞增殖能力

Fig. 5 Comparison of T lymphocyte proliferation induced by BMDCs in different PPS treatment groups



与不加抗体组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs noAb group

图 6 抗 TLR4 单抗抑制 BMDCs 合成 IL-12 p40

Fig. 6 Inhibition on synthesis of IL-12 p40 in PPS-treated BMDCs by monoclonal antibody of TLR4

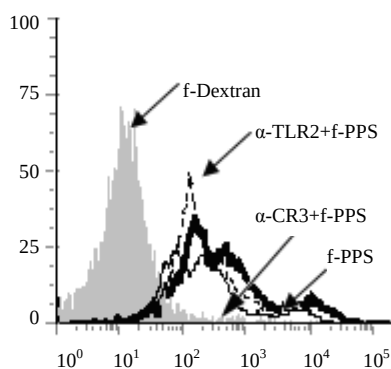
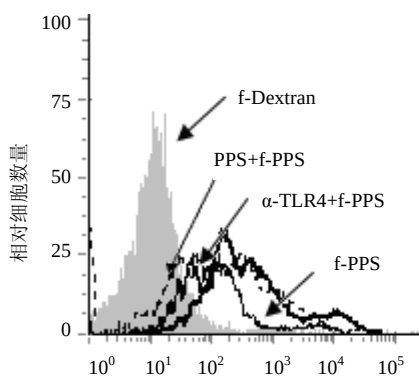


图 7 f-PPS 与 BMDC 表面 TLR4 特异结合

Fig. 7 TLR4 specific binding between f-PPS and BMDC

骤^[9]。各种因素,包括细胞因子(如 TNF)、细菌代谢产物(如 LPS)及膜分子(如 CD40L)均可调控 DC 的成熟。DC 成熟伴随着一系列形态、表型与功能的改变^[10-11]。成熟的 DC 摄取抗原的能力下降,而高表达 MHC II 分子、共刺激分子(如 CD80、CD86)及黏附分子,并且分泌包括 IL-12 在内的多种细胞因子,因而具有较强的提呈抗原、刺激初始 T 细胞活化的能力^[12-13]。

本研究结果发现,经 PPS 作用后, BMDC 高表达 CD86,其摄取 f-Dextran 能力下降,产生高水平的 IL-12 说明 PPS 能够诱导 BMDC 表型与功能的成熟。有证据表明 DCs 有 2 个亚群,亚群 1 (DC1)分泌 IL-12 诱导 Th0 细胞向 Th1 方向分化,而 DC2 则诱导 Th0 向 Th2 方向分化。IL-12 是由 40 000 的 p40 亚基及 35 000 的 p35 亚基组成的相对分子质量为 70 000 的杂二聚体 (p70)。p40 主要由活化的单

核细胞、DC 等产生。IL-12 是最强的 NK 细胞激活因子,能促进 CD4⁺Th0 细胞分化为 Th1 细胞,刺激 NK 和 T 细胞产生多种细胞因子,如 IFN-γ、IL-2 等,再通过这些递质发挥作用。PPS 能够诱导 BMDC 产生高水平的 IL-12,说明 PPS 在诱导 DC 成熟的同时,诱导 DC 向 DC1 分化,进而激活 NK、Th1 细胞发挥免疫增强及抗肿瘤活性。DC 与其他抗原提呈细胞最大的区别在于其能活化初始 T 细胞 (CD45RA⁺T)。经 MLR 证实 PPS 处理的 BMDC 具有活化 CD4⁺CD45RA⁺T 的功能,亦说明 PPS 具有诱导 DC 功能成熟的作用。

PPS 是通过何种途径,即其识别的靶分子是什么也是本研究的重点内容。TLR4 分布于多种组织细胞中,能够识别包括 LPS 等多种模式分子,从而在病原体入侵机体的早期即启动天然免疫,在抗感染中具有重要作用。另外,TLR4 在促进细胞因子

的合成与释放,引发炎症反应,促进免疫细胞膜表面表达相关免疫分子,促进免疫细胞的成熟和功能化,抗病毒感染,调节免疫应答等方面亦发挥重要的作用。已有研究证实灵芝多糖等可以通过TLR4活化DC。故推测PPS亦可能经此途径活化DC。通过抗体中和试验,发现抗TLR4抗体可以抑制BMDC产生IL-12,说明TLR4与PPS的生物学活性有关。为进一步证实这个猜想,制备f-PPS,并以此为探针研究PPS与BMDC细胞膜分子的相互作用。研究多糖的生物学活性往往受制于其结构的复杂性及靶分子的多样性。而多糖荧光标记技术的应用可以直接观察多糖-配体的相互作用及其存在的部位。采用CNBr活化的方法可以将荧光素引入多糖分子,但并不影响其活性,是较好的标记多糖的方法。采用此法制备了荧光胺标记的PPS,经流式细胞仪分析证实f-PPS可以特异地与BMDC结合,抗TLR4单抗可以阻断这种结合。结合细胞因子阻断实验,说明TLR4可以作为PPS的受体,在PPS诱导BMDC活化的过程中发挥重要作用。由于抗TLR4单抗并不能完全抑制BMDC产生IL-12及阻断f-PPS与BMDC的结合,因此并不排除还存在其他的受体,而这正是需要进一步完成的工作。

总之,本研究从DC表面抗原、细胞因子产生、抗原摄取能力及刺激初始T细胞增殖几方面证实了PPS能够诱导BMDC表型与功能的成熟,且其功能的发挥与TLR4有关。这些结果为进一步揭示PPS抗肿瘤及免疫调节机制打下了基础。

参考文献

- [1] 郭随章. 中药多糖的抗癌研究与临床应用进展 [J]. 医药导报, 2004, 23(11): 847-848.
- [2] 杜肖娜, 王润田, 刘殿武, 等. 中药猪苓多糖抑瘤作用机理的初探 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(3): 296-297.
- [3] 张皖东, 吕 诚, 刘振丽, 等. 人参多糖和猪苓多糖对大鼠肠道黏膜淋巴细胞功能的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 221-224.
- [4] 陶遵威, 郑 夺, 邸明磊, 等. 植物多糖的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 148-152.
- [5] Pahuja A, Makj R A, Hevezi P A, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis develops in CC chemokine receptor 7-deficient mice with altered T-cell responses [J]. *Scand J Immunol*, 2006, 64(4): 361-369.
- [6] Ureta G, Osorio F, Morales J, et al. Generation of dendritic cells with regulatory properties [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(3): 633-637.
- [7] Qian Y Y, Zhang H, Yuan L, et al. Enhancement of extracts from *Celastrus orbiculatus* on maturation and function of dendritic cells [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 195-203.
- [8] Glabe C G, Harty P K, Rosen S D, Preparation and properties of fluorescent polysaccharides [J]. *Anal Biochem*, 1983, 130(2): 287-294.
- [9] Aalamian M, Pirtskhalaishvili G, Nune Z A, et al. Human prostate cancer regulates generation and maturation of monocyte-derived dendritic cells [J]. *Prostate*, 2001, 46(1): 68-75.
- [10] Fina D, Sarra M, Fantini M C, et al. Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21 [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(4): 1038-1048.
- [11] Istrate C, Douagi I, Charpilienne A, et al. Bone marrow dendritic cells internalize live RF-81 bovine rotavirus and rotavirus-like particles (RF 2/6-GFP-VLP and RF 8*2/6/7-VLP) but are only activated by live bovine rotavirus [J]. *Scand J Immunol*, 2007, 65(6): 494-502.
- [12] Acosta C, Davies A. Bacterial lipopolysaccharide regulates nociceptin expression in sensory neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(5): 1077-1086.
- [13] Ashtekar A R, Zhang P, Katz J, et al. TLR4-mediated activation of dendritic cells by the heat shock protein DnaK from *Francisella tularensis* [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(6): 1434-1446.