

非诺贝特部分阻断氧化型低密度脂蛋白诱导的人单核细胞源树突状细胞的免疫成熟

施鸿毓, 姚 康, 孙爱军, 黄榕翀, 贾庆哲, 王克强, 邹云增, 葛均波

(复旦大学附属中山医院心内科 上海市心血管病研究所, 上海市 200032)

[关键词] 内科学; 非诺贝特抑制树突状细胞; 流式细胞学; 树突状细胞; 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; 过氧化体增殖物激活型受体 α

[摘要] 目的 研究过氧化物酶体增殖物激活型受体 α 激动剂非诺贝特对氧化型低密度脂蛋白诱导的人单核细胞源树突状细胞的免疫成熟的影响。方法 采用免疫磁珠法分离人外周血 CD14⁺ 单核细胞, 经含重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和重组人白细胞介素 4 的 Cellgro 培养 5 天, 使其分化为未成熟树突状细胞。人单核细胞来源的树突状细胞经非诺贝特干预后, 加入氧化型低密度脂蛋白再干预, 流式细胞术检测树突状细胞表型 (CD1a、CD40、CD86 和 HLA-DR), FITC-右旋糖苷检测树突状细胞吞噬功能, 酶联免疫吸附法检测细胞培养上清细胞因子 (白细胞介素 12、白细胞介素 10 和肿瘤坏死因子 α) 浓度。结果 与氧化型低密度脂蛋白组比较, 非诺贝特组 CD1a、CD40、CD86 和 HLA-DR 分别为 46.50% \pm 11.39% 比 68.80% \pm 5.89% ($P < 0.05$)、56.76% \pm 11.16% 比 72.97% \pm 10.38% ($P < 0.05$)、65.74% \pm 9.94% 比 79.82% \pm 22.07% ($P > 0.05$) 和 60.72% \pm 11.85% 比 83.24% \pm 6.60% ($P < 0.05$); 非诺贝特部分抑制氧化型低密度脂蛋白减弱树突状细胞吞噬功能 (83.12% \pm 3.10% 比 57.78% \pm 23.28%, $P < 0.05$)。与氧化型低密度脂蛋白组比较, 非诺贝特组白细胞介素 12、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 10 分别为 64.9 \pm 18.5 ng/L 比 106.7 \pm 20.7 ng/L ($P < 0.05$)、26.0 \pm 8.8 ng/L 比 50.3 \pm 9.9 ng/L ($P < 0.05$) 和 33.4 \pm 13.4 ng/L 比 66.1 \pm 2.6 ng/L ($P < 0.05$)。结论 过氧化物酶体增殖物激活型受体 α 激动剂非诺贝特可以部分阻断氧化型低密度脂蛋白诱导的树突状细胞的免疫成熟, 这可能是它抗动脉粥样硬化的一个重要机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Fenofibrate Partly Prevents Oxidized-Low Density Lipoprotein Induced Immune Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cell

SHI Hong-Yu, YAO Kang, SUN Ai-Jun, HUANG Rong-Chong, JIA Qing-Zhe, WANG Ke-Qiang, ZOU Yun-Zeng, and GE Jun-Bo

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Human Monocyte-Derived Dendritic Cell; Atherosclerosis; Oxidized-Low Density Lipoprotein; Peroxisome Proliferator-Activated Receptors α ; Fenofibrate; Immune Maturation

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of peroxisome proliferator-activated receptors α (PPAR α) agonist fenofibrate on the immune maturation of monocyte-derived dendritic cell (DC) induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL).

Methods Monocytes were purified (over 98%) using Anti-CD14 microbeads. After cultured with DC Cellgro medium containing recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) (100 μ g/L) and recombinant human interleukin-4 (rhIL-4) (20 μ g/L) for 5 days, monocytes were derived into immature DC. Human monocyte-derived DC were incubated with fenofibrate (100 μ mol/L) for 24 hours, and subsequently stimulated with ox-LDL (50 mg/L) for another 48 hours. The immunophenotypic expressions (CD1a, CD40, CD86, and HLA-DR) were analyzed by FACS and endocytosis function by FITC-dextran, and the cytokines secretions of culture supernatants (IL-12, IL-10, TNF- α) were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results Fenofibrate reduced ox-LDL induced immunophenotypic expressions of DC (CD1a: 68.80% \pm 5.89% vs 46.50% \pm 11.39%, $P < 0.05$; CD40: 72.97% \pm 10.38% vs 56.76% \pm 11.16%, $P < 0.05$; CD86: 79.82% \pm 22.07% vs 65.74% \pm 9.94%, $P > 0.05$; HLA-DR: 83.24% \pm 6.60% vs 60.72% \pm 11.85%, $P < 0.05$). Ox-LDL inhibited the endocytosis of DC, which was partly prevented by fenofibrate (83.12% \pm 3.10% vs 57.78% \pm 23.28%, $P < 0.05$); fenofibrate attenuated ox-LDL induced cytokine secretions of DC (IL-12: 106.7 \pm 20.7 ng/L vs 64.9 \pm 18.5 ng/L, $P <$

[收稿日期] 2005-08-04 [修回日期] 2006-04-14

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划资助项目 (G2000056903); 上海市科委资助项目 (02JC14026)

[作者简介] 施鸿毓, 博士研究生, 研究方向为冠心病诊治和动脉粥样硬化, 联系电话为 021-64041990-2079, E-mail 为 shi-hy@hotmail.com。姚康, 博士研究生, 研究方向为冠心病诊治和动脉粥样硬化, 联系电话为 021-64041990-2079, E-mail 为 yaokangd@hotmail.com。葛均波, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 从事冠心病的介入治疗、干细胞移植以及动脉粥样硬化研究, 联系电话为 021-64041990-2745, E-mail 为 gejunbo@zhshospital.net。

0.05; TNF α : 50.3 \pm 9.9 ng/L vs 26.0 \pm 8.8 ng/L, $P < 0.05$; IL-10: 66.1 \pm 2.6 ng/L vs 33.4 \pm 13.4 ng/L, $P < 0.05$).

Conclusion PPAR α agonist fenofibrate partly inhibits ox-LDL induced immune maturation of DC, through which it may play an anti-atherosclerosis effect.

近年大量研究表明动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症免疫性疾病,其中外来病原体如微生物和内源性抗原如氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的识别和呈递被认为是As发生发展的关键^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是人体内最强大的专职抗原呈递细胞,具有诱导原发免疫反应的独特能力,在免疫过程中起着重要的调控作用,最近研究发现它在动脉粥样硬化中具有重要的作用^[2]。过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR)是一类由配体激活的核转录因子,是核受体超家族的成员,包括PPAR α 、PPAR β/δ 和PPAR γ 3个亚型。其中PPAR α 是脂质、脂肪酸和脂蛋白代谢的重要调节因子,大量临床研究发现其配体贝特类药物能延缓As的发生发展。进一步研究还发现PPAR α 在组成动脉粥样硬化斑块的各种炎症细胞和血管细胞中均有表达,包括单核巨噬细胞、T淋巴细胞和内皮细胞、血管平滑肌细胞,具有强大的直接抗炎作用^[3]。然而,PPAR α 对树突状细胞免疫成熟的影响目前尚无相关研究,为此,我们观察PPAR α 激动剂非诺贝特对ox-LDL诱导的树突状细胞的免疫成熟的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

CD14⁺免疫磁珠及相关产品购自Milteny Biotec公司,重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinated human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)和重组人白细胞介素4(recombinated human interleukin-4, rhIL-4)购自R&D公司,淋巴细胞分离液(Histopaque 1077)、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、ox-LDL和非诺贝特、异硫氰酸荧光素标志的右旋糖苷(FITC-Dextran)购自Sigma公司,单克隆抗人抗体CD1a、CD40、CD86、HLA-DR以及IgG荧光标记二抗购自BD公司,IL-12、IL-10和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)的ELISA检测试剂盒由Biosource公司提供。DC完全培养基包括DC Cellgro(Mediatech公司)和10%胎牛血清(Hyclone公司)。

1.2 人单核细胞源树突状细胞的分离培养

取正常人外周血,经淋巴细胞分离液(His-

topaque 1077)密度梯度离心分离出单个核细胞,无Ca²⁺、Mg²⁺ PBS洗3次后重悬,加入Fc拮抗剂和CD14⁺磁珠,4℃孵育20 min,经分离柱流洗,分选出纯度大于98%的CD14⁺单核细胞,于6孔培养板中,加入含rhGM-CSF(100 μ g/L)、rhIL-4(20 μ g/L)和10%胎牛血清的完全培养基DC Cellgro,调节细胞浓度为 2×10^9 个/L,隔天换液。第5天加入非诺贝特(100 μ mol/L)预干预24 h;第6天加入ox-LDL(50 mg/L)再干预48 h,以PBS和LPS(500 μ g/L)作为阴性和阳性(成熟)对照。每日观察细胞生长情况,第8天后收集悬浮细胞。采用台盼蓝染色测定,各干预组细胞活性均在90%以上。

1.3 树突状细胞表型的检测

收集的细胞调整浓度为 5×10^8 个/L,分别加入单克隆抗人抗体CD1a、CD40、CD86和HLA-DR,孵育30 min, PBS洗2遍,加入FITC荧光标记的二抗,孵育20 min, PBS洗2遍后悬于荧光标记液中,用流式细胞仪FACS calibur检测,Cellquest分析软件分析检测结果。

1.4 树突状细胞吞噬实验

收集干预48 h的DC,重悬于RPMI 1640培养基,调整细胞浓度为 2×10^9 个/L,加入FITC-Dextran,终浓度为1 g/L,37℃孵育1 h, PBS洗2遍,流式细胞仪测定荧光值。

1.5 细胞因子检测

干预48 h后收集细胞培养上清,-70℃储存,按照说明书用ELISA检测试剂盒测定IL-10、IL-12和TNF α 浓度。

1.6 统计学处理

所有实验至少重复3次,数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,配对 t 检验比较统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 树突状细胞的培养和观察

CD14⁺免疫磁珠阳性分选的单核细胞均匀一致,纯度大于98%,加入细胞因子rhGM-CSF和rhIL-4培养一天后可见成集落样生长,集落逐渐增大,呈半悬浮样生长,第3天在相差显微镜下即可见细胞有大量毛刺生成(图1)。

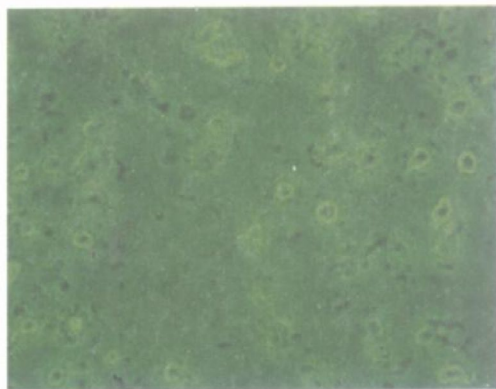


图 1. 树突状细胞光镜下形态($\times 400$, 培养 7 天)

2.2 氧化型低密度脂蛋白影响树突状细胞表型

与阴性对照 PBS 组相比, 经 $\alpha\omega$ -LDL 处理的 DC 表面分子 CD1a、CD40、CD86 和 HLA-DR 的表达明显增加; 而非诺贝特可部分抑制 $\alpha\omega$ -LDL 诱导的 DC 表

面分子 CD1a、CD40 和 HLA-DR 的表达增加, 对 CD86 的表达有降低趋势, 但无统计学意义。与氧化型低密度脂蛋白组比较, 非诺贝特组 CD1a、CD40、CD86 和 HLA-DR 分别为 $46.50\% \pm 11.39\%$ 比 $68.80\% \pm 5.89\%$ ($P < 0.05$)、 $56.76\% \pm 11.16\%$ 比 $72.97\% \pm 10.38\%$ ($P < 0.05$)、 $65.74\% \pm 9.94\%$ 比 $79.82\% \pm 22.07\%$ ($P > 0.05$) 和 $60.72\% \pm 11.85\%$ 比 $83.24\% \pm 6.60\%$ ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 树突状细胞吞噬功能的检测

吞噬作用是 DC 的主要功能之一, 成熟后的树突状细胞其吞噬功能明显减弱。 $\alpha\omega$ -LDL 干预后的树突状细胞吞噬 Dextran 的能力明显弱于 PBS 组, 而非诺贝特可部分抑制 $\alpha\omega$ -LDL 诱导的树突状细胞吞噬功能的减弱 ($83.12\% \pm 3.10\%$ 比 $57.78\% \pm 23.28\%$, $P < 0.05$) (图 3)。

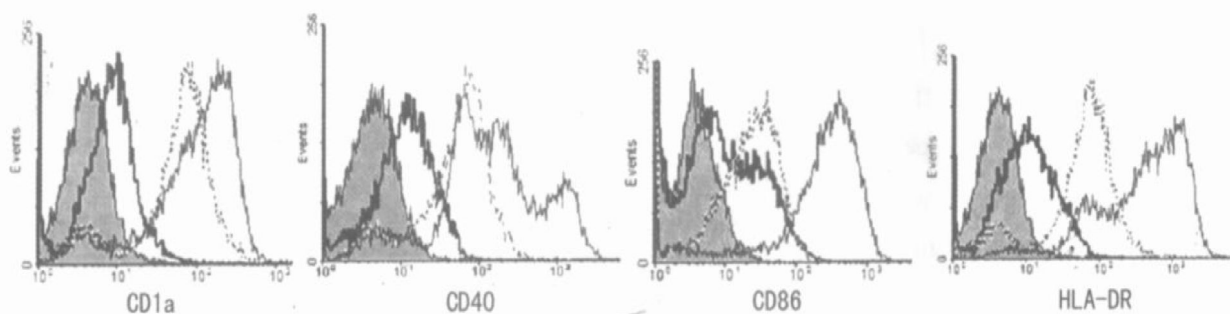


图 2. 氧化型低密度脂蛋白对树突状细胞表型的影响

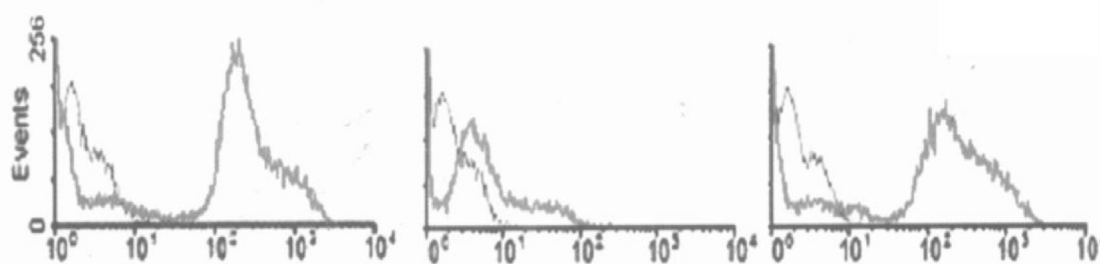


图 3. 树突状细胞内吞功能检测

2.4 细胞培养上清中细胞因子的检测

氧化型 LDL 干预后的 DC 分泌细胞因子 IL-10、IL-12 和 TNF α 增加, 而非诺贝特可减弱 $\alpha\omega$ -LDL 诱导 DC 分泌细胞因子 IL-10、IL-12 和 TNF α 增加的作用 ($P < 0.05$, 表 1)。

3 讨论

最近研究发现体内最强大的专职抗原呈递细胞

表 1. 各种干预对树突状细胞细胞因子分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	IL-12 (ng/L)	TNF α (ng/L)	IL-10 (ng/L)
PBS 组	35.2 \pm 12.9	18.6 \pm 8.4	23.1 \pm 12.6
$\alpha\omega$ -LDL 组	106.7 \pm 20.7 ^a	50.3 \pm 9.9 ^a	66.1 \pm 2.6 ^a
$\alpha\omega$ -LDL+ 非诺贝特组	64.9 \pm 18.5 ^b	26.0 \pm 8.8 ^b	33.4 \pm 13.4 ^b

a 为 $P < 0.05$, 与 PBS 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 $\alpha\omega$ -LDL 组比较。

树突状细胞(DC)与动脉粥样硬化具有密切的关系。我们研究发现无论在人As早期病变还是晚期的复合斑块中,血管DC的聚集都明显增加,并与T淋巴细胞相邻,ox-LDL可促进DC的免疫成熟^[4],进一步研究还发现ox-LDL的这种作用可为PPAR γ 激动剂和他汀类药物所抑制^[5,6]。本研究发现ox-LDL促进DC免疫成熟作用也可部分被PPAR α 激动剂非诺贝特所抑制。

过氧化物酶体增殖物激活型受体是一类由配体激活的核转录因子,是核受体超家族的一个成员,包括3个亚型:PPAR α 、PPAR β/δ 和PPAR γ 。其中PPAR α 是脂质、脂肪酸和脂蛋白代谢的重要调节因子。进一步研究发现它在包括单核巨噬细胞、T淋巴细胞和内皮细胞、血管平滑肌细胞在内的组成动脉粥样硬化斑块的各种炎症细胞和血管细胞中均有表达,可减少这些细胞中IL-2、干扰素(Interferon, IFN)- γ 、TNF- α 、金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和组织因子(tissue factor, TF)的分泌,具有直接抗炎的作用^[3]。PPAR α 的抗炎机制目前还未完全明确,最近研究提示它可能作用于信号转导途径如核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和激活蛋白因子(activator protein, AP)1而影响炎症相关基因的合成而发挥其抗炎作用^[7,8]。我们的研究提示,PPAR α 可能通过抑制DC免疫成熟从而抑制免疫炎症反应而发挥其抗As作用。

树突状细胞是机体内功能最强的专职抗原呈递细胞。极少量的DC即可强烈激活T淋巴细胞启动特异性细胞免疫反应,其激活T淋巴细胞的能力是巨噬细胞或B细胞的数十至数百倍。而且它还具有诱导原发免疫反应的独特作用。DC的成熟是其发挥免疫作用的关键。我们研究发现致As因素ox-LDL、糖基化终末产物和高糖可诱导DC的成熟^[4,9,10],国外的研究采用热休克蛋白和尼古丁刺激也取得类似的结果^[11,12]。成熟DC表达高水平的CD1a、CD40、CD86和HLA-DR。其中CD1a是其成熟的较特异的标志,CD86和HLA-DR是其激活T淋巴细胞的基础,而CD40的表达在动脉粥样硬化中具有重要的作用。我们的研究观察到ox-LDL可增加DC的CD1a、CD40、CD86和HLA-DR的表达,降低DC

的吞噬作用,增加DC分泌细胞因子IL-2、IL-12和TNF α 。ox-LDL可以促进DC的免疫成熟,这可能是ox-LDL导致动脉粥样硬化的一个机制。而PPAR α 激动剂可抑制ox-LDL诱导的CD1a、CD40和HLA-DR表达增加的作用,恢复ox-LDL降低的DC内吞功能,降低DC诱导的DC细胞因子的分泌,提示PPAR α 可抑制DC的免疫成熟,这可能参与了PPAR α 抗动脉粥样硬化的过程。

本研究提示PPAR α 激动剂非诺贝特可部分抑制ox-LDL诱导的DC的免疫成熟,这可能参与了PPAR α 抗动脉粥样硬化的机制。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Link A, Bohm M. Potential role of dendritic cell in atherogenesis[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **55**: 708-709
- [3] Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis regulators of gene expression in vascular cell[J]. *Circ Res*, 2004, **94**: 1 168-178
- [4] 罗育坤, 梁春, 黄东, 许从峰, 贾庆哲, 葛均波, 等. 氧化修饰低密度脂蛋白促进人单核细胞源树突状细胞的成熟及活化[J]. *复旦学报(医学版)*, 2004, **31** (5): 441-444
- [5] Luo YK, Liang C, Xu CF, Jia QZ, Huang D, Ge JB. Ciglitazone Inhibits oxidized low density lipoprotein induced immune maturation of dendritic cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, **44**: 381-385
- [6] Yilmaz A, Reiss C, Tantawi O, Weng A, Stumpf C, Raaz D, et al. HMG-CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2004, **172**: 85-93
- [7] Sonoki K, Iwase M, Iino K, Ichikawa K, Yoshinari M, Ohdo S, et al. Dilazep and fenofibric acid inhibit MCP-1 mRNA expression in glycoxidized LDL-stimulated human endothelial cells[J]. *European J Pharmacology*, 2003, **475**: 139-147
- [8] Ryoo S, Won M, Kim DU, Kim L, Han G, Park SK, et al. PPARalpha activation abolishes LDL-stimulated IL-8 production via AP-1 deactivation in human aortic smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318**: 329-334
- [9] Ge JB, Jia QZ, Liang C, Luo Y, Huang D, Sun A, et al. Advanced glycosylation end products might promote atherosclerosis through inducing the immune maturation of dendritic cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (10): 2 157-163
- [10] 姚康, 葛均波, 孙爱军, 施鸿毓, 王克强, 邹云增, 等. 高糖对树突状细胞成熟和免疫功能的影响[J]. *中国微循环*, 2005, **9** (3增刊): 121-124
- [11] Flohe SB, Bruggemann J, Lendemann S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohe S, et al. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype[J]. *J Immunol*, 2003, **170** (5): 2 340-348
- [12] Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, Cooke JP, Zeiher AM, Dimmeler S. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions[J]. *Circulation*, 2003, **107**: 604-611

(此文编辑 朱雯霞)