

[文章编号] 1007-3949(2007)15-05-0329-04

• 实验研究 •

9-顺式维甲酸部分抑制脂多糖诱导小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 向树突样细胞分化

沈玲红¹, 王彬尧¹, 何 奔¹, 曾锦章², 周 磊¹, 胡刘华¹, 王 力², 卜 军¹

(1 上海交通大学附属仁济医院心内科, 上海市 200001; 2. 中国科学院上海生命科学研究院, 上海市 200233)

[关键词] 内科学; 视黄醇类 X 受体; 脂多糖; 巨噬细胞; 树突状细胞; 动脉粥样硬化; 免疫成熟

[摘要] 目的 探讨激活视黄醇类 X 受体对脂多糖诱导巨噬细胞向树突状细胞分化的影响及其机制。方法

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 经脂多糖诱导 48 h 后分化为树突样细胞, 观察同时给予视黄醇类 X 受体激动剂 9-顺式维甲酸对脂多糖诱导分化的干预作用并检测细胞内活性氧的生成, 相差显微镜观察细胞形态, 流式细胞仪检测与树突状细胞免疫成熟和激活有关的细胞表面标志物 (CD40、CD86 和 CD83), CM-H2DCFDA 荧光探针测定细胞内活性氧浓度。结果 9-顺式维甲酸部分抑制脂多糖诱导出现的树突样细胞形态改变, 使被脂多糖诱导上调的细胞表面标志物 CD40、CD86 和 CD83 分别下降约 50%、40% 和 38%, 作用表现剂量依赖性; 脂多糖引起细胞内活性氧浓度显著升高 (平均荧光强度 98.9 ± 9.6 比 12.3 ± 1.8 , $P < 0.05$), 9-顺式维甲酸在 10^{-8} mol/L 和 10^{-7} mol/L 剂量水平分别降低平均荧光强度到 69.4 ± 5.8 和 37.0 ± 4.2 , 较脂多糖单独处理组差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 激活视黄醇类 X 受体能够部分抑制脂多糖诱导巨噬细胞向树突状细胞分化, 其机制可能与减轻细胞氧化应激损伤有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

9-cis Retinoid Acid Partly Prevents Lipopolysaccharide Induced Cell Differentiation of RAW264.7 Murine Macrophage Cell Line into Dendritic Like Cells

SHEN Ling-Hong¹, WANG Bin-Yao¹, HE Ben¹, ZENG Jin-Zhang², ZHOU Lei¹, HU Liu-Hua¹, WANG Li², and BU Jun¹

(1. Department of Cardiology, Ren Ji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200001, China; 2. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

[KEY WORDS] Retinoid X receptor; Lipopolysaccharide; Macrophages; Dendritic Cells; Atherosclerosis; Immune Maturation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of retinoid X receptor agonist 9-cis retinoid acid on the differentiation of macrophage into dendritic cell induced by LPS. **Methods** LPS-treated RAW264.7 murine macrophage cell line differentiated into dendritic like cells after 48h. The effect of 9-cisRA on the differentiation induced by LPS was studied. Cell morphology was observed by phase contrast microscope and cell surface markers involved in dendritic cell immune maturation and activation (CD40, CD86, CD83) was analyzed by FACS. Cellular reactive oxygen species production was detected by CM-H2DCFDA fluorescent probe. **Results** 9-cisRA partly prevented dendritic like morphology induced by LPS. Upregulated cell surface markers CD40、CD86 and CD83 by LPS were decreased about 50%、40% and 38% respectively by 9-cisRA. And the effect of 9-cisRA was dose dependent. LPS-treated RAW264.7 acquired significantly increasing cellular reactive oxygen species (MFI 98.9 ± 9.6 vs 12.3 ± 1.8 , $P < 0.05$), which was significantly reduced by 9-cisRA at 10^{-8} M and 10^{-7} M to 69.4 ± 5.8 and 37.0 ± 4.2 respectively. **Conclusion** RXR agonist 9-cisRA partly inhibits the differentiation of macrophage into dendritic cell induced by LPS, which may be related to reducing oxidative stress injury.

炎症和免疫反应是动脉粥样硬化的重要病理机制, 作为目前已知的功能最强大的抗原递呈细胞,

树突状细胞(dendritic cell, DC)在动脉粥样硬化发病和斑块稳定性中的作用日益受到重视。最近发现, 过氧化物酶体增生物激活受体 α (PPAR α) 和 γ 受体激动剂及他汀类药物均能够明显抑制树突状细胞的免疫成熟和抗原递呈^[1-3], 提示影响树突状细胞功能可能与上述药物抗动脉粥样硬化作用密切相关。

视黄醇类 X 受体(retinoid X receptors, RXR)属于核受体超家族成员, 已知对心血管功能具有重要调控作用的核受体如 PPAR、LXR, 在大多数情况下都需要与 RXR 形成异源二聚体后才能够调控基因转

[收稿日期] 2006-12-26

[修回日期] 2007-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30670880, 30600242); 上海市科委基础研究重点项目(05JC14037)

[作者简介] 沈玲红, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为核受体与动脉粥样硬化, 联系电话为 021-58752345-2324, E-mail 为 shenlinghong@medmail.com.cn。通讯作者王彬尧, 硕士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊治与动脉粥样硬化, 联系电话为 021-58752345-2324, E-mail 为 wbinyao@163.com。何奔, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的介入治疗及核受体在动脉粥样硬化中的作用机制, 联系电话为 021-58752345-2324, E-mail 为 heben@medmail.com.cn。

录^[4]。本研究观察 RXR 的天然配体 9 顺式维甲酸 (9-cis retinoid acid, 9-cisRA) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 向树突状细胞分化的影响,旨在从炎症和免疫反应的角度,探讨调控 RXR 抗动脉粥样硬化的作用机理。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

脂多糖购自 Merck 公司, 9-cisRA 购自 Sigma 公司。抗小鼠 CD16/32 封闭 Fc 受体抗体(克隆 93)、染色缓冲液、FITC 耦联的抗小鼠 CD40 单克隆抗体(克隆 HM40-3)、FITC 耦联的抗小鼠 CD83 单克隆抗体(克隆 Michel-17)、FITC 耦联的抗小鼠 CD86(B7-2)单克隆抗体(克隆 GL1)及相应的同型对照抗体购自 eBioscience 公司。细胞内活性氧(ROS)测定试剂盒购自 GENMED 公司。胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 细胞培养

小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 来自 ATCC, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养。6 孔板, 5×10^5 个细胞/孔铺板, 铺板后 24 h 加药。加药后 48 h 在相差显微镜(OLYMPUS, CKX31SF 型)下观察细胞形态。

1.3 细胞表型检测

消化细胞, 离心(4℃, 250 r/min, 5 min), 弃上清, 染色缓冲液重悬, 计数, 调整细胞浓度为 2×10^7 个/

mL。抗小鼠 CD16/32 抗体封闭巨噬细胞表面 Fc 受体(4℃, 10 min), 离心, 弃上清。分别加入标记 FITC 的抗小鼠单克隆抗体 CD40、CD83、CD86(B7-2), 4℃ 孵育 30 min, 染色缓冲液洗涤 3 次后送流式细胞仪检测。

1.4 活性氧簇检测

加药后 4 h 消化细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 重悬, 取 1×10^6 个细胞, 37℃ 下避光与 CM-H2DCFDA 荧光探针共同孵育 20 min, 离心(4℃, 250 r/min, 5 min), 弃上清, 加入预冷的保存液重悬, 送流式细胞仪检测。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件包分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 均数间比较用 Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 相差显微镜观察细胞形态变化

正常 RAW264.7 细胞形态介于单核细胞和巨噬细胞之间, 细胞体积较小, 以球形为主, 少量呈梭形。脂多糖(100 μg/L) 处理 48 h 后, 出现树突状细胞形态改变, 细胞体积增大, 胞浆较多长的突起; 如同时给予 RXR 特异性配体 9-cisRA (10^{-7} mol/L) 和脂多糖(100 μg/L), 细胞形态介于上述两者之间(图 1)。

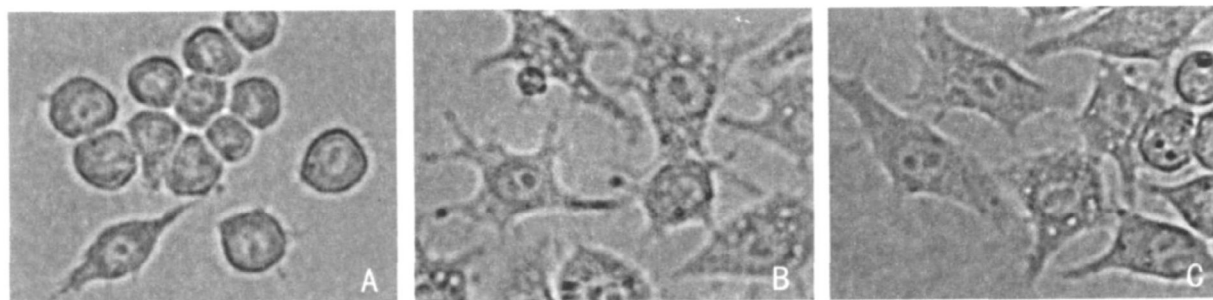


图 1. 9-cisRA 部分抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞向树突状形态分化(200×) A 为对照组, B 为脂多糖组, C 为脂多糖+ 9-cisRA 组。

2.2 树突状细胞表型检测

脂多糖(100 μg/L) 处理 48 h 后, 流式细胞仪检测发现, 表达与树突状细胞激活和免疫成熟有关的细胞表面标志物 CD83、CD86(B7-2) 和 CD40 的 RAW264.7 细胞百分比明显升高, 如同时给予 9-cisRA (10^{-7} mol/L) 和脂多糖(100 μg/L), 上述比例分别下降 50%、40% 和 38%。观察不同剂量 9-cisRA 与脂多糖(100 μg/L) 共同处理后 48 h 的作用, 发现

10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L 和 10^{-7} mol/L 浓度分别降低脂多糖诱导 CD86(B7-2) 表型上调约 8%、16% 和 37%, 存在剂量依赖关系(表 1)。在给药后 12 h、24 h、48 h 检测表达 CD86(B7-2) 的阳性细胞百分率, 发现脂多糖(100 μg/L) 处理组分别约为 66%、84%、85%, 脂多糖(100 μg/L) 和 9-cisRA (10^{-7} mol/L) 共同处理组分别约为 30%、47%、48%, 两组在各时间点差异均有显著性意义(表 2)。

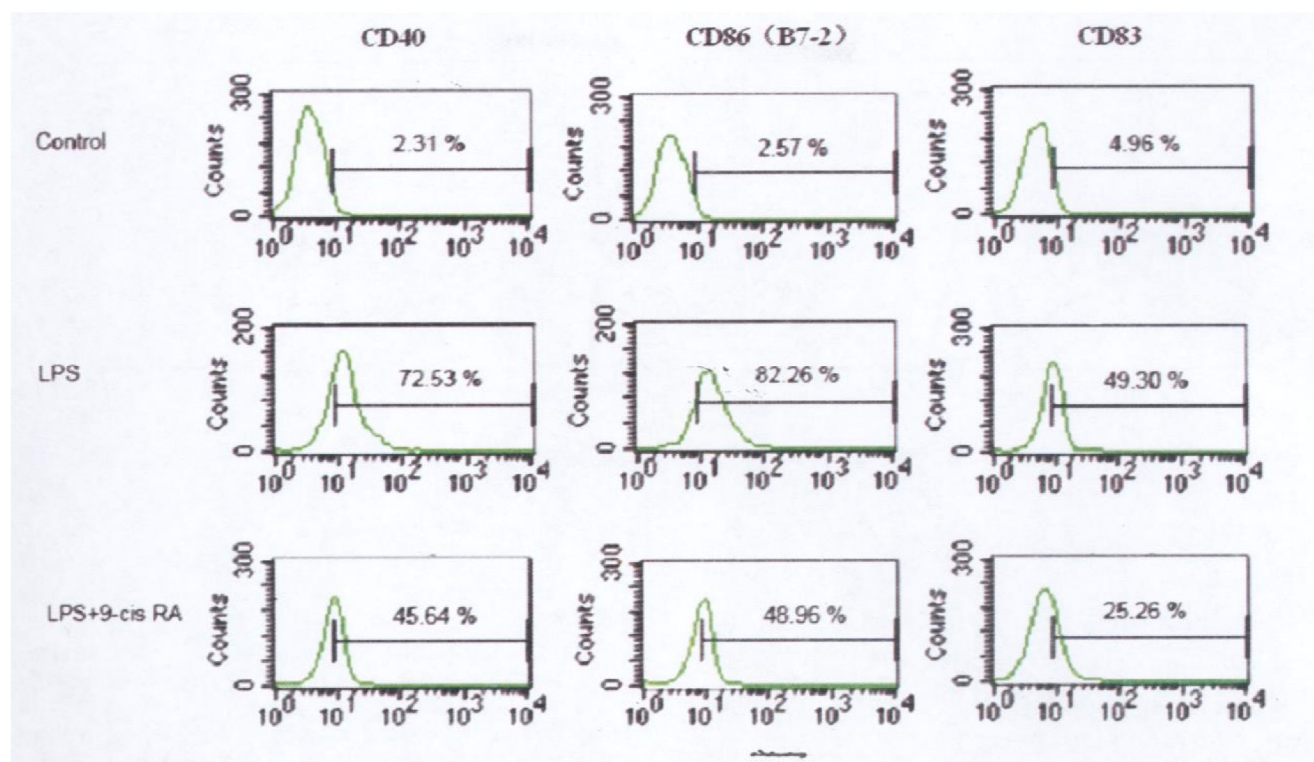


图 2. 9-cisRA 部分抑制脂多糖诱导 RAW264.7 细胞表达树突状细胞表型(图示代表 4 次重复实验的结果)。

表 1. 不同剂量 9-cisRA 对脂多糖诱导树突状细胞标志物表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	CD86(B7-2) 阳性细胞百分率
对照组	3.14% \pm 0.40%
脂多糖	83.80% \pm 7.76%
脂多糖+ 9-cisRA(10^{-9} mol/L)	76.06% \pm 5.89%
脂多糖+ 9-cisRA(10^{-8} mol/L)	65.41% \pm 5.72% ^a
脂多糖+ 9-cisRA(10^{-7} mol/L)	47.78% \pm 4.26% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与脂多糖组比较。

表 2. 9-cisRA 作用不同时间对脂多糖诱导树突状细胞标志物表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

作用时间	CD86(B7-2) 阳性细胞百分率	
	脂多糖组	脂多糖+ 9-cisRA 组
0 h	4.05% \pm 0.45%	3.65% \pm 0.39%
12 h	66.30% \pm 6.80%	30.47% \pm 4.56% ^a
24 h	84.00% \pm 6.51%	47.72% \pm 4.81% ^a
48 h	85.13% \pm 4.75%	48.12% \pm 4.76% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与脂多糖组比较。

2.3 细胞内活性氧簇检测

脂多糖(100 μ g/L)或脂多糖(100 μ g/L)与 9-cisRA 共同处理 4 h 后,标记 CM-H2DCFDA 探针送流式细胞仪检测,用平均荧光强度(MFI)反映细胞内活性氧簇(ROS)水平,正常 RAW264.7 细胞 ROS 较低

(MFI 12.3 ± 1.8),给予脂多糖(100 μ g/L)4 h 后 ROS 显著升高(MFI 98.9 ± 9.6 , $P < 0.05$),联合给予 9-cisRA,在 10^{-8} mol/L 和 10^{-7} mol/L 浓度 MFI 分别下降至 69.4 ± 5.8 和 37.0 ± 4.2 ,与脂多糖单独处理组相比差异均有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

树突状细胞是人体内功能最强大的专职抗原递呈细胞,具有诱导原发免疫反应的独特能力,在先天性和适应性免疫应答中均发挥重要作用。近年来发现,在人体有动脉粥样硬化倾向和已经发生粥样硬化病变的血管部位,树突状细胞数量明显增加,特别是炎症入侵和富含 T 细胞的区域,树突状细胞大量聚集成簇。越来越多的证据表明,树突状细胞在斑块局部被激活,参与抗原捕获和递呈,促进炎症和免疫反应,在动脉粥样硬化病理过程中起了重要作用^[5]。

树突状细胞的免疫成熟和激活是其发挥抗原递呈功能的前提和关键。最近研究证实,PPAR α 和 γ 受体激动剂能够明显抑制树突状细胞的免疫成熟^[1,2]。作为 PPAR 在细胞核内转录激活必须的,也是唯一的异源二聚体搭档,RXR 是否也参与了对树突状细胞的功能调控,还没有相关报道。RXR 属于核受体超家族成员,介导视黄醛信号转导途径,对多种生物途径均有潜在的多向性效应。很早以前就发

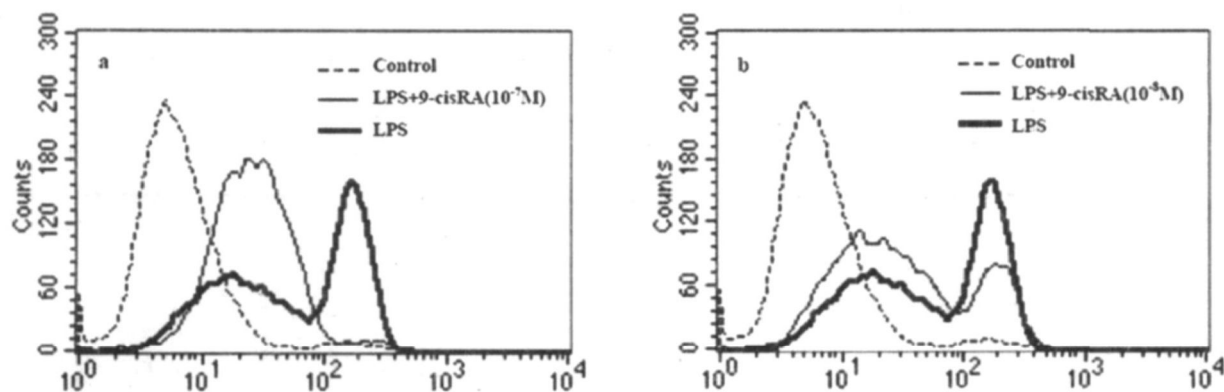


图3. 9-cisRA 抑制脂多糖引起的细胞内活性氧浓度的升高(图示代表4次重复实验的结果)。

现, RXR 对心脏和血管的发育至关重要^[4]。2001年, Thierry Claudel 等^[6]首次报道 RXR α 特异性激动剂可以明显减轻载脂蛋白 E^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化进程。此后的研究表明, RXR 在调控脂质代谢和降低胰岛素抵抗方面具有重要作用^[7,8], 但对其在动脉粥样硬化相关的炎症和免疫反应方面的研究很少。

RXR 在巨噬细胞有较高表达。目前研究认为, 除了经典的单核细胞相关途径和淋巴途径外, 在炎症刺激下, 成熟的巨噬细胞也可以分化为树突状细胞^[9]。Rajiv K Saxena 等^[10]报道, 重要的炎症来源——内毒素能够诱导小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 向树突样形态细胞分化, 并显著上调与抗原递呈和 T 细胞激活有关的树突状细胞表面标志物。应用这一模型, 本研究探讨了 RXR 的天然配体 9-cisRA 对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞向树突样细胞分化的影响。结果发现, 9-cisRA 部分抑制脂多糖诱导的树突样形态变化, 同时下调标志树突状细胞成熟和激活的细胞表面标志物 CD40、CD86 (B7-2) 和 CD83, 作用具有剂量依赖性。Hiroko 等^[11]曾经报道, 脂多糖通过增加细胞内的氧化应激水平促进树突状细胞的成熟。本研究检测了细胞内活性氧浓度, 发现 9-cisRA 明显抑制脂多糖引起的细胞内活性氧增加, 推测 9-cisRA 阻碍脂多糖诱导的树突状细胞成熟和激活可能与减轻细胞氧化应激损伤有关。

综上所述, 本研究结果表明, RXR 的天然配体 9-cisRA 能够部分抑制脂多糖诱导小鼠巨噬细胞系 RAW 264.7 向树突样细胞分化, 提示影响树突状细胞的免疫成熟和激活可能是 RXR 抗动脉粥样硬化

作用机制之一。

[参考文献]

- [1] Luo Y, Liang C, Xu C, Jia Q, Huang D, Chen L, et al. Ciglitazone Inhibits oxidized-low density lipoprotein induced immune maturation of dendritic cells [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, **44** (3): 381-385.
- [2] 施鸿毓, 姚康, 孙爱军, 黄榕种, 贾庆哲, 王克强, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (6): 475-478.
- [3] Yilmaz A, Relss 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** (1): 85-93.
- [4] Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray I, Davies P, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho) physiological functions [J]. *Cell Death Differ*, 2004, **11** (Suppl 2): S126-S143.
- [5] Yuri V, Bobryshev. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance [J]. *European Heart Journal*, 2005, **26** (17): 1700-704.
- [6] Claudel T, Leibowitz M, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ, et al. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98** (5): 2610-615.
- [7] Uehara Y, Miura SI, von Eckardstein A, Abe S, Fujii A, Matsuo Y, et al. Unsaturated fatty acids suppress the expression of the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and ABCA1 genes via an LXR/RXR responsive element [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **191** (1): 11-21.
- [8] Li X, Hansen PA, Xi L, Chandraratna RA, Burant CF. Distinct mechanisms of glucose lowering by specific agonists for peroxisomal proliferator activated receptor gamma and retinoic acid X receptors [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (46): 38317-327.
- [9] Haneman JA, Aderem A. Functional transitions in macrophages during in vivo infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin [J]. *J Immunol*, 2001, **167** (4): 2227-233.
- [10] Saxena RK, Vallyathan V, Lewis DM. Evidence for lipopolysaccharide induced differentiation of RAW264.7 murine macrophages cell line into dendritic like cells [J]. *J Biosci*, 2003, **28** (1): 129-134.
- [11] Hiroko Y, Toshiyuki A, Nobuyuki E. LPS induced ROS generation and changes in glutathione level and their relation to the maturation of human monocyte derived dendritic cells [J]. *Life Sci*, 2006, **78** (9): 926-933.

(此文编辑 李玲玲)