

# 内脂素对小鼠 DC2.4 细胞成熟及功能的影响

侯宁宁, 王昌安, 孙晓东

(潍坊医学院临床学院附属医院内分泌科, 山东省潍坊市 261031)

[关键词] 内脂素; 树突状细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 评价内脂素对小鼠树突状细胞(DC)系 DC2.4 细胞的活化作用, 探讨内脂素在动脉粥样硬化发病机制中的作用机理。**方法** 将 DC2.4 细胞分 4 组: 正常对照组、脂多糖组(LPS, 1 mg/L)、低剂量内脂素组(100 μg/L)、高剂量内脂素组(200 μg/L)。流式细胞仪检测各组 DC2.4 细胞表面 MHC-II 类分子、CD86 和 CD80 的表达, 酶联免疫法检测各组细胞培养上清液肿瘤坏死因子 α(TNF-α)与白细胞介素 12(IL-12)水平的变化, 通过混合淋巴细胞反应检测内脂素对同种异体 T 淋巴细胞的刺激能力。**结果** 与对照组比较, 低剂量内脂素组、高剂量内脂素组、脂多糖组细胞突触增多增粗, 细胞体积增大, 呈现成熟 DC2.4 细胞形态。细胞表面 MHC-II 类分子、CD80 和 CD86 分子表达水平增高, 上清液的 TNF-α、IL-12 水平明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 刺激细胞: 效应细胞的比例为 1:10 和 1:25 时, 低剂量内脂素组、高剂量内脂素组和 LPS 组刺激指数明显升高( $P$  均  $< 0.05$ )。**结论** 内脂素可能通过激活 T 淋巴细胞, 启动免疫炎症反应, 参与并促进动脉粥样硬化发生及发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effect of Visfatin on Maturity and Function of DC2.4 Cells from Mice

HOU Ning-Ning, WANG Chang-An, and SUN Xiao-Dong

(Department of Endocrinology, Clinical College, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261031, China)

[KEY WORDS] Visfatin; DC2.4; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of visfatin on the maturity of DC2.4 cells and the mechanism of visfatin in the pathogenesis of atherosclerosis. **Methods** The DC2.4 cells were divided into four groups: normal control group, LPS group (LPS, 1 mg/L), low-dose visfatin group (100 μg/L) and high-dose visfatin dose group (200 μg/L). MHC-II, CD86 and CD80 expression were detected by flow cytometry. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-12 (IL-12) levels in cell culture supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The ability of visfatin to stimulate allogeneic T lymphocytes was measured by mixed lymphocyte reaction assay. **Results** Compared with the control group, the synaptic of cells enlarged and cell volume increased in low-dose visfatin group, high dose visfatin group and LPS group. The levels of MHC-II, CD80 and CD86 molecule expression increased, the supernatant TNF-α, IL-12 levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, when stimulating cell: effector cell ratio was 1:10 and 1:25, visfatin low dose group and high dose group and visfatin stimulation index LPS group was significantly higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results suggested that visfatin could participate in the development of atherosclerosis by activating T lymphocytes and initiating the immune inflammation response.

“血管相关性淋巴组织学说”是动脉粥样硬化的发病机制之一。该学说认为, 致病相关抗原可活化处于外周的未成熟树突状细胞(dendritic cell, DC), 并促进其成熟, 继而激活初始 T 淋巴细胞诱发

免疫和炎症反应, 从而参与并促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生和发展过程<sup>[1-4]</sup>。内脂素(visfatin)是一种脂肪因子, 可由免疫细胞产生, 可刺激前 B 细胞转化为 B 细胞, 参与机体免疫炎症反

[收稿日期] 2013-11-11

[基金项目] 山东省卫生厅资助项目(2011HW094)

[作者简介] 侯宁宁, 博士, 副教授, 研究方向为糖尿病大血管病变。王昌安, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病大血管病变。通讯作者孙晓东, 博士, 研究方向为代谢综合征/糖尿病血管病变, E-mail 为 sxdfriend@sina.com。

应;最近研究发现内脂素可能为联系 As 发生中代谢紊乱和慢性炎症反应的关键中间环节<sup>[5-6]</sup>。内脂素在冠心病患者粥样斑块的泡沫细胞中有较高的表达,同时发现在破裂斑块局部的富含脂质区中内脂素水平也是显著升高<sup>[6]</sup>。本研究以小鼠 DC2.4 细胞作为目标细胞,给予不同浓度内脂素进行刺激,观察细胞形态学变化、评价细胞表面分子表达情况和测定细胞因子分泌水平,探讨内脂素在活化 DC 与 As 机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

C57BL/6 小鼠,雄性,8 周龄,体重 30 g 左右,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。DC2.4 细胞系(来自于 C57BL/6 小鼠的 DC)由上海赛尔顿公司提供。RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,胰酶、PBS、脂多糖(LPS)均购自 Sigma 公司,重组小鼠内脂素购自以色列 Prospec 公司,TNF- $\alpha$  与 IL-6 的 ELISA 法检测试剂盒购自济南凯晨生物科技有限公司,PE 标记的抗小鼠 MHC-II 类分子 mAb、抗小鼠 CD80mAb 和抗小鼠 CD86mAb 购自 eBioscience 公司。

### 1.2 DC2.4 细胞培养与分组

用台盼蓝染色计数并测活力大于 95%,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6/L$ ,并接种于 24 孔细胞培养板中,设置 4 个实验组,对照组不加任何试剂,LPS 组(阳性对照)加入 1 mg/L LPS,高剂量内脂素组和低剂量内脂素组分别加入重组小鼠内脂素并调节至相应浓度(100  $\mu g/L$  和 200  $\mu g/L$ ,每组 5 个复孔。放置于 37 $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  培养箱中进行培养,培养 48 h,待细胞生长至满 50% ~ 60% 视野时,收集各组细胞,制备悬液做各种检测,流式细胞仪分析对各组细胞进行表型分析。

### 1.3 DC2.4 细胞表面分子表达

取各实验组 DC2.4 细胞,用 PBS 洗涤 2 次,并用 PBS 调节细胞密度至  $1 \times 10^9/L$ ,向各管加入 DC2.4 细胞悬液 200  $\mu L$ ,继而分别加入 PE 标记的抗小鼠 MHC-II 类分子 mAb 1  $\mu L$ 、抗小鼠 CD80 mAb 1  $\mu L$  和抗小鼠 CD86 mAb 1  $\mu L$ 。4 $^{\circ}C$  避光放置 30 min,2 kr/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤 2 次,加入 1% 多聚甲醛固定,使用流式细胞仪检测各组 DC2.4 表面 MHC-II 类分子、CD86 和 CD80 的表达。

### 1.4 炎症因子测定

取各实验组细胞培养上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作要求,检测各组 IL-12 和 TNF- $\alpha$  水平。

### 1.5 混合淋巴细胞反应

收集各实验组的细胞悬液,加入终浓度为 30 mg/L 的丝裂霉素 C,置于水浴箱调节温度至 37 $^{\circ}C$ ,离心后(1 kr/min,5 min)提取细胞沉淀,加入适量 RPMI 1640 培养液,调节细胞密度为  $1 \times 10^8/L$ ,作为刺激细胞。同时提取小鼠单核细胞,加入小鼠淋巴细胞分离液,分离获得 T 淋巴细胞,重悬作为效应细胞。按照比例配制刺激细胞与效应细胞的混合液(1:10、1:25、1:100),分别置于细胞培养板中,每组设置 3 个复孔,并放置于细胞培养箱中培养 72 h。培养终止前 4 h,加入 CCK-8 工作液检测,结束培养后,离心,弃上清培养结束后,使用酶标仪于 570 nm 波长测量各组吸光度值,并分别计算各组的刺激指数(SI)。SI = (混合细胞孔  $\Delta A$  - 空白孔  $\Delta A$ ) / (T 淋巴细胞孔  $\Delta A$  - 空白孔  $\Delta A$ )。

### 1.6 统计学分析

所有数据应用 SPSS 17.0 统计软件包进行处理。计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DC2.4 细胞形态变化

细胞培养 48 h 后,倒置显微镜下观察 DC2.4 细胞形态学变化,对照组细胞体积较小、树枝样树突较少,呈现不成熟 DC2.4 细胞形态;低剂量内脂素组和高剂量内脂素组,细胞突触增多增粗,细胞体积增大,呈现成熟 DC2.4 细胞形态,但高剂量内脂素组细胞形态更为成熟;LPS 组细胞突触增多、增粗,细胞体积增大,细胞成熟度高于其他 3 组(图 1)。

### 2.2 DC2.4 细胞表面分子表达

用流式细胞仪检测 DC2.4 细胞表面 MHC-II 类分子、CD80 和 CD86 分子表达水平,对照组细胞表面表达水平较低,低剂量、高剂量内脂素组、脂多糖组细胞表面表达水平高于对照组( $P < 0.05$ ;表 1)。

### 2.3 细胞上清液 TNF- $\alpha$ 、IL-12 水平

与对照组比较,LPS 组、低剂量内脂素组和高剂量内脂素组上清液的 TNF- $\alpha$ 、IL-12 水平明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;表 2)。

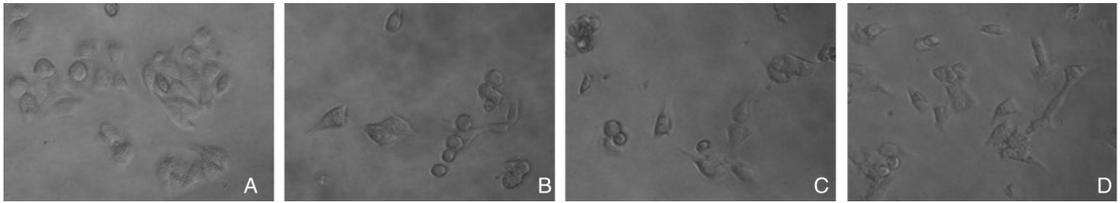


图 1. DC2.4 细胞形态 ( $\times 400$ ) A 为对照组, B 为 LPS 组, C 为低剂量内脂素组, D 为高剂量内脂素组。

Figure 1. DC2.4 cell morphology ( $\times 400$ )

表 1. 不同处理组 DC2.4 细胞表面标志变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Changes of DC2.4 cell surface markers in different groups

| 分 组     | MHC-II 类分子                    | CD80                          | CD86                          |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组     | 18.5% $\pm$ 5.6%              | 25.3% $\pm$ 5.3%              | 19.2% $\pm$ 3.2%              |
| 低剂量内脂素组 | 26.2% $\pm$ 5.7% <sup>a</sup> | 35.8% $\pm$ 6.2% <sup>a</sup> | 24.3% $\pm$ 4.1% <sup>a</sup> |
| 高剂量内脂素组 | 30.5% $\pm$ 6.3% <sup>a</sup> | 44.5% $\pm$ 4.7% <sup>a</sup> | 43.7% $\pm$ 4.9% <sup>a</sup> |
| LPS 组   | 42.7% $\pm$ 6.4% <sup>a</sup> | 56.7% $\pm$ 5.5% <sup>a</sup> | 63.4% $\pm$ 5.9% <sup>a</sup> |

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

表 2. 各组 IL-12 与 TNF- $\alpha$  的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. IL-12 and TNF- $\alpha$  levels in different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组     | IL-12 (ng/L)                   | TNF- $\alpha$ (ng/L)           |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照组     | 45.51 $\pm$ 3.07               | 56.35 $\pm$ 3.72               |
| 低剂量内脂素组 | 139.80 $\pm$ 4.13 <sup>a</sup> | 147.49 $\pm$ 4.31 <sup>a</sup> |
| 高剂量内脂素组 | 167.42 $\pm$ 3.52 <sup>a</sup> | 173.14 $\pm$ 4.00 <sup>a</sup> |
| LPS 组   | 193.67 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup> | 217.36 $\pm$ 4.72 <sup>a</sup> |

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 2.4 混合淋巴细胞反应

与对照组比较,刺激细胞:效应细胞的比例为 1:10 和 1:25 时,低剂量内脂素组、高剂量内脂素组和 LPS 组刺激指数明显升高 ( $P < 0.05$ );刺激细胞:效应细胞比例为 1:100 时,LPS 组刺激指数明显升高 ( $P < 0.05$ ;表 3)。

表 3. 各组 DC2.4 对同种异体 T 淋巴细胞的刺激指数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. The stimulation index of DC2.4 cells on T lymphocytes ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组     | SI(1:10)                     | SI(1:25)                     | SI(1:100)                    |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照组     | 1.32 $\pm$ 0.10              | 1.15 $\pm$ 0.11              | 1.01 $\pm$ 0.09              |
| LPS 组   | 2.86 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | 2.29 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 1.83 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> |
| 低剂量内脂素组 | 1.97 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup> | 1.83 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup> | 1.17 $\pm$ 0.09              |
| 高剂量内脂素组 | 2.47 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 2.07 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup> | 1.23 $\pm$ 0.11              |

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

## 3 讨 论

小鼠 DC2.4 细胞,是 GM-CSF 转染 C57BL/6 小鼠骨髓细胞,进而转染 myc 和 raf 癌基因建立的小鼠骨髓树突状细胞系所得,不仅保留了 DC 的重要生物学特性,而且还具有强大的增殖能力<sup>[7]</sup>;作为一种未成熟 DC 细胞,可由多种促成熟因子促进成熟。常见的促成熟因子基本可分为炎症因子、Toll 样受体配体、肿瘤坏死因子超家族成员等。本研究以小鼠 DC2.4 细胞为研究对象,研究发现对照组细胞体积较小,细胞突触较少,呈未成熟 DC 细胞形态;而内脂素组、LPS 组细胞突触明显增多、增粗,细胞体积增大,呈现成熟 DC 细胞形态。以上结果表明内脂素可显著促进 DC 细胞的成熟,但与 LPS 组比较,促成熟能力可能相对较弱。

DC 具有极强的抗原提呈能力,是人体内专职的抗原提呈细胞。DC 可以通过表面受体与抗原结合,加工处理后可将抗原提呈给 T 淋巴细胞,启动和诱导 T 淋巴细胞的增殖和分化,也可以直接激活 B 细胞以诱发免疫反应的产生。未成熟 DC 细胞具有较强迁移能力,其表面分子表达水平较低;摄取和加工抗原后,在促成熟因子作用下发生活化,可以高表达 CD80、CD86 等表面分子,同时 MHC-I 类分子和 MHC-II 类分子等抗原提呈分子表达水平也明显升高<sup>[8]</sup>。成熟的 DC 通过表面分子与 T 淋巴细胞表面受体结合,二者相互作用形成免疫突触,形

成的 MHC 抗原复合物在刺激分子协调下,促进 T 淋巴细胞增殖<sup>[9]</sup>。在 1997 年, Wick 等<sup>[1]</sup>提出了 As 发病机制的血管相关性淋巴组织学说。该学说认为致病相关抗原可活化 DC,促进 DC 的成熟,进而活化 T 淋巴细胞而诱发免疫炎症反应,从而启动和促进了动脉粥样硬化的发生与发展过程。本研究采用内脂素作为刺激因子作用于 DC,发现内脂素组 DC 表面 MHC-II 类分子、CD80 和 CD86 分子表达显著升高,且明显高于对照组。该实验表明内脂素可显著活化 DC 细胞,提高 CD80、CD86 和 MHC-II 类分子等表面分子的表达,具有较强的促 DC 细胞成熟能力,以及增强 DC 促进 T 淋巴细胞增殖的能力。混合淋巴细胞反应实验中,刺激细胞:效应细胞比例为 1:10 和 1:25 条件下,与对照组比较,低剂量内脂素组、高剂量内脂素组和 LPS 组刺激指数明显升高,进一步支持了 Wick 的观点,表明内脂素可活化 DC,进而激活 T 淋巴细胞,进而参与动脉粥样硬化的发生和发展过程。

在动脉粥样硬化的血管炎症免疫应答中,细胞炎症因子起关键作用<sup>[10-11]</sup>。TNF- $\alpha$  作为一种重要的细胞炎症因子,其异常分泌能够诱导炎症反应的发生,参与疾病的发生和发展过程<sup>[12]</sup>。IL-12 是由 DC 分泌的一种重要细胞炎症因子,在活化 T 淋巴细胞和诱发免疫炎症反应过程中发挥着重要作用。IL-12 可促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化,进而调节 Th1 和 Th2 之间的平衡关系<sup>[9,13]</sup>。本研究发现内脂素组 DC 表达 TNF- $\alpha$  与 IL-12 水平明显高于对照组,表明内脂素可通过促进 DC 分泌炎症因子,进而可能参与 As 的血管炎症免疫应答。

综上所述,内脂素可能参与了 As 的发生、发展过程,其机制可能与内脂素活化 DC2.4 细胞,进而激活 T 淋巴细胞,启动免疫炎症反应有关。DC 细胞具体通过何种途径被激活,仍需进一步研究。内脂素对 DC2.4 细胞的作用将为冠心病和 2 型糖尿病大血管病变防治提供新的思路。

#### [参考文献]

[1] Wick G, Romen M, Amberger A, et al. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue [J]. *FASEB J*, 1997, 11: 1 199-207.

- [2] Bobryshev YV. Dendritic cells and their role in atherogenesis [J]. *Lab Invest*, 2010, 90(7): 970-984.
- [3] 赵凯, 徐兴晟, 张运. 单核细胞自体吞噬相关基因蛋白表达与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(1): 37-38.
- [4] Amodio G, Gregori S. Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses [J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 233.
- [5] Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(4): 804-816.
- [6] Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis possible role in inflammation and plaque destabilization [J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 972-980.
- [7] Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, et al. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules [J]. *J Immunol*, 1997, 158(6): 2 723-730.
- [8] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392(6 673): 245-252.
- [9] Pearce EJ, Kane CM, Sun J. Regulation of dendritic cell function by pathogen-derived molecules plays a key role in dictating the outcome of the adaptive immune response [J]. *Chem Immunol Allergy*, 2006, 90: 82-90.
- [10] 蒲强红, 吕秋菊, 王莉莉. 巨噬细胞移出动脉粥样硬化斑块调控机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, (12): 1 145-148.
- [11] 刘兆奕, 刘丽敏. 老年冠心病患者炎症因子水平与冠状动脉病变严重程度相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, (13): 2 843-844.
- [12] Koltsova EK, Garcia Z, Chodaczek G, et al. Dynamic T cell-APC interactions sustain chronic inflammation in atherosclerosis [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3 114-126.
- [13] Chen XQ, Yang J, Hu SP, et al. Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1-and Th2-type cytokine balance [J]. *Respiration*, 2006, 73(1): 34-40.

(此文编辑 李小玲)