

脂氧素 A₄ 抑制单核巨噬细胞源性树突状细胞的分化及成熟

陈样新¹, 罗年桑¹, 王晓俏², 林永青¹, 聂如琮¹, 王景峰¹

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院心内科, 广东省广州市 510120; 2. 广州市妇女儿童医疗中心麻醉科, 广东省广州市 510623)

[关键词] 脂氧素 A₄; 巨噬细胞; 树突状细胞; 炎症; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨内源性抗炎脂质介质脂氧素 A₄ 对巨噬细胞向树突状细胞分化及树突状细胞成熟的影响。方法 体外培养小鼠巨噬细胞(RAW264.7 细胞), 根据分组, 分别以 0 μg/L(对照组)、100 μg/L 的脂多糖、100 μg/L 的脂多糖联合 100 nmol/L 或 500 nmol/L 的脂氧素 A₄ 干预小鼠单核巨噬细胞 48 h, 以流式细胞仪测定细胞表面标记物 MHC-II、CD80 及 CD86 的表达, 并以激光共聚焦显微镜及相差显微镜观察细胞形态。结果 脂氧素 A₄ 能显著减少脂多糖刺激下 RAW264.7 细胞向树突状细胞的转化, 并抑制脂多糖刺激下 RAW264.7 细胞 MHC-II 及 CD86 的表达($P < 0.01$), 而对 CD80 表达无明显影响($P > 0.05$)。结论 脂氧素 A₄ 能抑制脂多糖刺激的小鼠巨噬细胞向树突状细胞转化及成熟, 可能通过负向调控免疫炎症反而抑制动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Lipoxin A₄ Inhibits Lipopolysaccharide-induced Differentiation of RAW264.7 Murine Macrophages into Dendritic-like Cells and Its Maturation

CHEN Yang-Xin¹, LUO Nian-Sang¹, WANG Xiao-Qiao², LIN Yong-Qing¹, and WANG Jing-Feng¹

(1. Department of Cardiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Anesthesiology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

[KEY WORDS] Lipoxin A₄; Macrophages; Dendritic Cells; Inflammation; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of lipoxin A₄ (LXA₄) on lipopolysaccharide (LPS)-induced differentiation and mature of RAW264.7 macrophages into dendritic like cells (DC). **Methods** RAW264.7 murine macrophages were respectively treated with LPS (0 μg/L and 100 μg/L), LPS (100 μg/L) together with LXA₄ (100 nmol/L and 500 nmol/L). Cells surface markers (CD80, CD86 and MHC-II) were analyzed by FACS, and cell morphology was observed by laser scanning confocal microscope and phase contrast microscope. **Results** LPS could significantly promote the differentiation of RAW264.7 murine macrophages into DC and the expression of surface molecules (CD80, CD86, MHC-II) ($P < 0.01$), and LXA₄ could inhibit the differentiation of LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophages and down-regulate the expression of CD86 and MHC-II, but had no significant effect on the expression of CD80. **Conclusion** LXA₄ could negatively regulate the differentiation of RAW264.7 into DC and inhibit the maturation of DC, which may inhibit the pathogenesis and development of atherosclerosis by negatively regulating immuno-inflammatory response.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症性疾病,炎症和免疫反应是 As 发生、发展的重要机制之一。树突状细胞(dendritic cell, DC)作为机体内功能最强大的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),在诱导和维持机体特异性免疫应答中具有重要作用。DC 的免疫刺激功能在很大程度上

取决于其成熟程度,成熟 DC(mature DC, mDC)因为其高表达多种共刺激分子和黏附分子,主要诱导免疫激活。研究证实 DC 在正常动脉数量较少,而在发生 As 的血管中则数量显著增加,越来越多的证据表明 DC 参与了 As 病变部位的抗原捕获和抗原递呈并与 As 的发生发展密切相关^[1, 2]。

[收稿日期] 2010-10-16

[作者简介] 陈样新,医学博士,讲师,心内科主治医师,从事心血管疾病的临床与基础研究工作, E-mail 为 tjcyx1995@163.com。王晓俏,医学硕士,住院医师,主要从事麻醉及危重病学的临床和基础研究工作, E-mail 为 wangxiaqiao81126@163.com。通讯作者罗年桑,讲师,主治医师,主要从事心脏病介入诊断和治疗, E-mail 为 luons3@163.com。

许多大规模临床研究证实,他汀类药物通过其调脂作用使冠心病的发病率明显下降,并显著减低心脏事件发生率。近年来普遍认为,他汀类药物的上述效应除了与其降脂效应有关外,尚与其抗炎效应密切相关。因此,近年来抗炎治疗被认为是冠心病重要的潜在治疗靶点。脂氧素 A_4 (lipoxin A_4 , LXA_4) 是一种重要的内源性脂质介质,具有很强的抗炎效应,对多种炎症反应和有明显的负向调控作用。 LXA_4 可通过抑制炎症相关因子(如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 等)的表达和分泌,促进巨噬细胞吞噬凋亡的中性粒细胞,从而起到抗炎及促炎症消退作用^[3-5]。与树突状细胞为一样,巨噬细胞也是体内一种重要的抗原提呈细胞,它在炎症状态如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)等刺激下可分化为树突状细胞^[6-8],在炎症反应中扮演着重要作用。本实验拟观察 LXA_4 是否对 LPS 刺激的小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)向树突状细胞的分化及其成熟产生影响,以探讨 LXA_4 是否可通过对树突状细胞的免疫炎症调节机制来发挥其抗炎作用,以为进一步探讨 LXA_4 是否具有抗 As 效应提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

RPMI 1640 培养基(Gibco 公司)、LPS(Sigma 公司)、 LXA_4 (Cayman 公司)、MTT(Sigma 公司)、胎牛血清(Gibco 公司)、双抗(青霉素及链霉素, Promega 公司)、鼠抗人 CD80-FITC、CD86-FITC、MHC-II-FITC 单克隆抗体(BD 公司)。

1.2 细胞培养及药物干预

RAW264.7 小鼠巨噬细胞购自武汉中国典藏物培养中心(美国 ATCC 株亚型),复苏后悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中于 37℃、5% 的 CO_2 培养箱中培养。按照实验设计,分别设置空白对照组(对照组)、脂多糖组(LPS 组)、低 LXA_4 剂量组(LPS/ LXA_4 -L 组)及高 LXA_4 剂量组(LPS/ LXA_4 -H 组)。LPS 处理浓度为 100 $\mu g/L$, LXA_4 处理浓度分别为 100 nmol/L 和 500 nmol/L,干预时间均为 48 h。

1.3 显微镜观察细胞的方法

RAW264.7 小鼠巨噬细胞贴壁培养后,传代时先倒去旧培养液,补充 5~8 mL 新鲜培养液或磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS),再以细胞刮子(ATCC 建议,一般 RAW264.7 不采用胰酶消

化法传代)小心刮下贴壁细胞后移至离心管,以 1 000 r/min 低速离心 10 min,弃上清,再用 PBS 洗涤 2 次,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液重悬沉淀细胞制成单细胞悬液。在倒置显微镜下进行观察。

1.4 流式细胞仪检测分析

搜集各组细胞,PBS 洗涤后以 $1 \times 10^6/L$ 的细胞浓度重悬,取 100 μL 细胞悬液,加入 FITC 标记的抗鼠单克隆 CD80、CD86、MHC-II 抗体在 4℃ 下培养 30 min,再以 PBS 液洗去游离的抗体,取 100 μL 的 PBS 重悬后用流式细胞仪检测细胞 CD80、CD86、MHC-II 表达。

1.5 统计学分析

数据均以均数 \pm 标准差的形式表示,组间差异比较采用单因素方差分析(ANOVA),百分率比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

2.1 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,以圆形居多,部分呈梭形。经 LPS 处理后发现细胞体积增大,并出现长的伪足,出现树突状细胞形态,而 LXA_4 则能抑制 LPS 促进该细胞的树突状细胞转化效能(图 1、图 2)。

2.2 树突状细胞表型的检测

脂多糖能显著增强 RAW264.7 细胞 MHC-II、CD80 及 CD86 的表达, LXA_4 则能明显抑制 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞 MHC-II 及 CD86 的表达($P < 0.01$), LXA_4 轻微抑制 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞 CD80 的表达但未达统计学意义($P > 0.05$)(表 1、图 3)。

表 1. LPS 对 DC 表面分子 CD80、CD86、MHC-II 的影响及 LXA_4 的干预效应

Table 1. Effects of LPS on the expression of dendritic cell surface molecules (CD80, CD86, MHC-II) and the regulation effects of LXA_4 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	CD80	CD86	MHC-II
对照组	46.6 \pm 3.68	56.5 \pm 4.18	26.5 \pm 2.12
LPS 组	73.3 \pm 5.23 ^a	81.6 \pm 5.71 ^a	46.8 \pm 3.62 ^a
LPS + LXA_4 -H 组	65.8 \pm 4.85 ^c	65.6 \pm 5.12 ^b	35.7 \pm 3.21 ^b
LPS + LXA_4 -L 组	68.6 \pm 5.05 ^c	71.2 \pm 5.80 ^b	39.6 \pm 3.54 ^b

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与 LPS 组比较;c 为 $P > 0.05$,与 LPS 组比较。

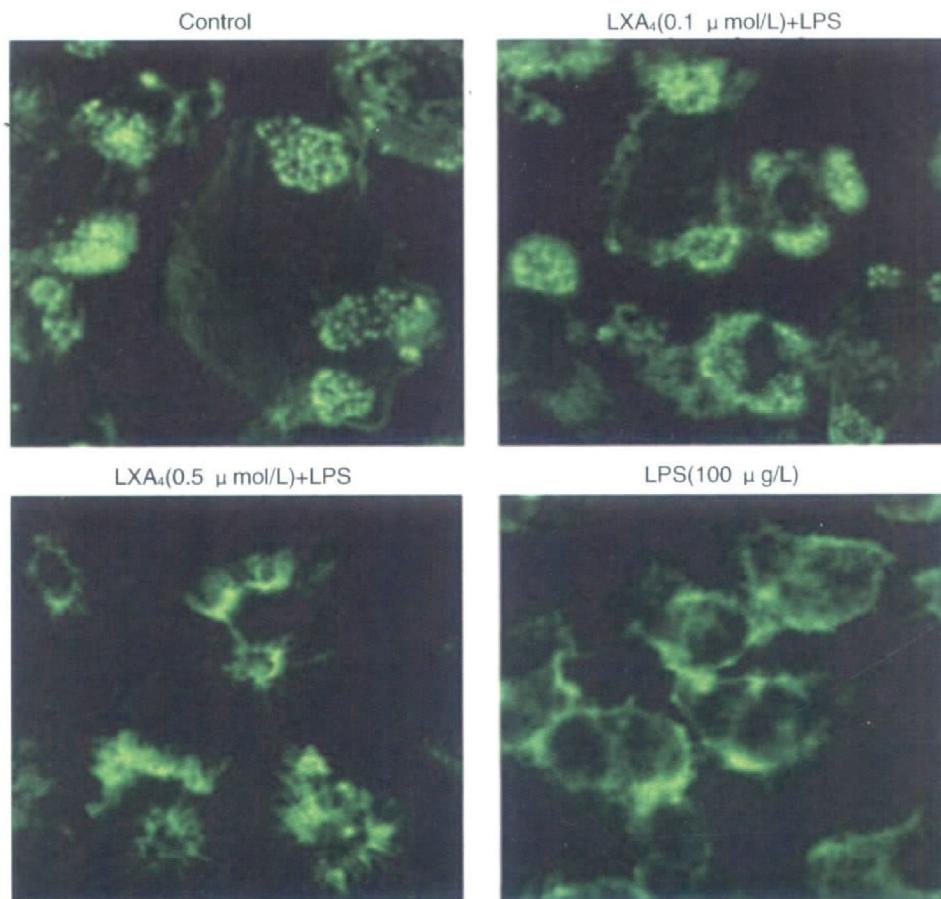


图 1. 共聚焦显微镜下树突状细胞形态

Figure 1. The dendritic cell morphology observed by laser scanning confocal microscope

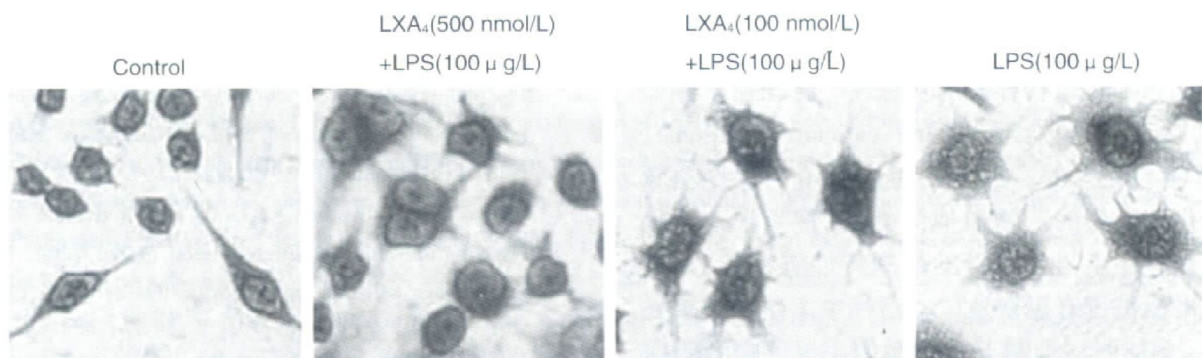


图 2. 相差显微镜下树突状细胞形态

Figure 2. The dendritic cell morphology observed by phase contrast microscope

2.3 脂氧素 A₄ 对脂多糖刺激的小鼠单核巨噬细胞转化为树突状细胞的影响

脂多糖 LPS 组 RAW264.7 向 DC 转化比率显著高于对照组 (18.3% 比 87.6%, $P < 0.01$), 而 LXA₄ 组转化比率则明显低于 LPS 组 (61.3% 比 87.6%, $P < 0.01$)。因此 LPS 能促进 RAW264.7 细胞向 DC 转化, 而 LXA₄ 则能明显抑制其转化。

3 讨论

树突状细胞是目前已知的功能最强大的专职抗原递呈细胞, 也是目前发现唯一能激活原始型 T 细胞的抗原递呈细胞, 具有诱导原发免疫反应的独特能力, 对免疫炎症反应有着重要的调节作用。研究显示 LPS 能促进树突状细胞的分化及成熟^[9,10]。此外, 病理研究表明, 树突状细胞主要分布于动脉粥样硬化病变炎症入侵的地方, 特别是在斑块破裂最常

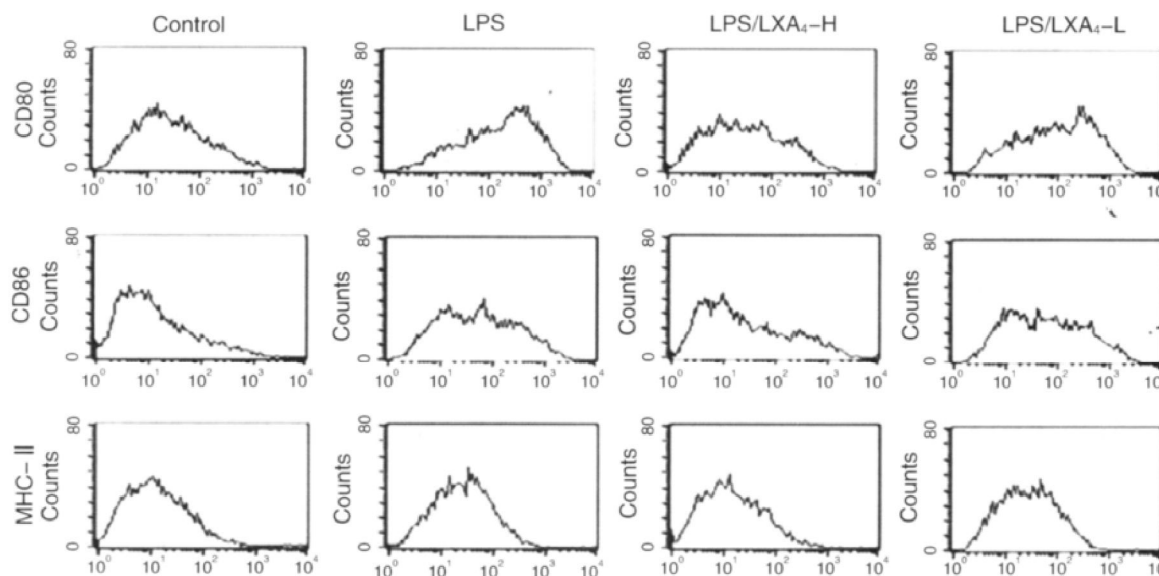


图3. LPS对DC表面分子的影响及LXA₄的干预效应

Figure 3. Effects of LPS on the expression of dendritic cell surface molecules and the regulation effects of LXA₄

发生的肩部区域,树突状细胞聚集成簇,数量比其它部位明显增加,而这些树突状细胞数量明显增加的区域同时也是巨噬细胞分布最密集的区域。因此,树突状细胞的数量及功能状态与动脉粥样硬化性疾病的发生、发展密切相关。当外界因素导致巨噬细胞向树突状细胞转化加快并促进其成熟则可能会促进动脉粥样硬化的发展并可能导致斑块的不稳定。

本研究发现小鼠单核巨噬细胞在LPS刺激下可转化为树突状细胞,并进一步促进其成熟。而炎症状态下冠心病患者容易出现急性心脏缺血事件如急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)可能与此有关。目前认为许多用于治疗动脉粥样硬化性疾病的药物如他汀类、血管紧张素转化酶抑制剂等除了与其本身的药理特性有关外,其抗炎效应可能也占有重要地位。治疗中本研究结果显示LXA₄则能明显抑制LPS刺激的小鼠巨噬细胞向树突状细胞的转化及其成熟,这提示LXA₄可能通过抑制巨噬细胞向树突状细胞的转化和成熟,从而抑制病变部位的免疫炎症反应,从而达到稳定斑块,防止动脉粥样硬化进展的目的,这可能为动脉粥样硬化的防治提供了新的潜在治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Bobryshev YV. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance [J]. *Eur Heart J*, 2005, 26 (17): 1 700-704.
- [2] Kawahara I, Kitagawa N, Tsutsumi K, et al. The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38 (9): 1 378-385.
- [3] Baker N, O'Meara SJ, Scannell M, et al. Lipoxin A₄: anti-inflammatory and anti-angiogenic impact on endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2009, 182 (6): 3 819-826.
- [4] Schwab JM, Serhan CN. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6 (4): 414-420.
- [5] Goh J, Godson C, Brady HR, et al. Lipoxins: pro-resolution lipid mediators in intestinal inflammation [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124 (4): 1 043-054.
- [6] Cho HY, Choi EK, Lee SW, et al. Programmed death-1 receptor negatively regulates LPS-mediated IL-12 production and differentiation of murine macrophage RAW264.7 cells [J]. *Immunol Lett*, 2009, 127 (1): 39-47.
- [7] Saxena RK, Vallyathan V, Lewis DM. Evidence for lipopolysaccharide-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic like cells [J]. *J Biosci*, 2003, 28 (1): 129-134.
- [8] Lee YN, Lee HY, Kang HK, et al. Phosphatidic acid positively regulates LPS-induced differentiation of RAW264.7 murine macrophage cell line into dendritic-like cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (4): 839-845.
- [9] Cho YS, Challa S, Clancy L, et al. Lipopolysaccharide-induced expression of TRAIL promotes dendritic cell differentiation [J]. *Immunology*, 2010, 130 (4): 504-515.
- [10] Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, et al. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2001, 166 (9): 5 688-694.

(此文编辑 曾学清)