

· 论 著 ·

依那普利对大鼠树突状细胞功能的干预效应^{*}

吕永恒, 陈 琪, 黎洪展, 黄光胜

(南方医科大学中医药学院中西医结合临床教研室, 广州 510315)

摘 要:目的 研究动脉粥样硬化(AS)大鼠树突状细胞(DC)的功能状态及血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的影响。方法 大鼠 30 只分组饲养后,分离外周血单个核细胞(PBMC),在含粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-4(IL-4)培养条件下制备 DC。用流式细胞仪检测 DC 表面共刺激分子 CD86(B7-2)的表达,混合淋巴细胞反应(MLR)检测 DC 对同种异体 T 淋巴细胞的刺激能力。酶联免疫吸附法(ELISA)测定 MLR 上清液中细胞因子水平。结果 与正常对照组比较,AS 大鼠 DC 表面 CD86 的表达明显增高,对 T 淋巴细胞刺激的能力增强,致炎细胞因子(IL-1 β 、TNF- α)分泌增多。与 AS 组比较,AS 应用依那普利组的 DC 表面 CD86 的表达明显降低,对 T 淋巴细胞刺激的能力下降,致炎细胞因子(IL-1 β 、TNF- α)分泌减少。结论 AS 大鼠 DC 处于激活状态,DC 可能参与了 AS 的发病。ACEI 对大鼠 DC 功能有明显的抑制作用,可能是其抗 AS 的作用机制之一。

关键词:树突状细胞;血管紧张素转化酶抑制剂;依那普利;动脉粥样硬化

中图分类号:R365.543

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)12-1489-03

Effects of angiotensin enzyme inhibitor on the function of dendritic cells of atherosclerotic mice^{*}

L.V Yong-heng, CHEN Qi, LI Hong-zhan, et al.

(Clinical Department of Combination of TCM with Western College of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315, China)

Abstract:Objective To investigate the functional state of dendritic cells(DCs) in atherosclerotic mice and the intervention effects of angiotensin enzyme inhibitor(ACEI). **Methods** 30 mice were divided into three groups and loaded with different diet. DCs were derived from monocytes of atherosclerotic mice upon culture with interleukin(IL)-4 and granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF). Surface co-stimulatory factor CD86(B7-2) of DCs were assessed by flow cytometry. Immunostimulatory capacity was measured by mixed lymphocyte reaction(MLR). ELISA was used to analyze the level of cytokines (IL-1 β , TNF- α) in the medium of MLR. **Results** Much more CD86 was expressed on DCs of atherosclerotic mice, and the stimulating capacity of DCs in MLR was higher, and inflammatory cytokines in the medium of MLR increased, compared with normal group. Compared with AS group, DCs differentiated in the presence of enalapril(enalapril DCs) had decreased expression of CD86, and allogenic T lymphocyte responses were markedly impaired when enalapril DCs were used as stimulator cells. Inflammatory cytokines in the medium of MLR were reduced. **Conclusion** DCs of atherosclerotic mice are activated, which may play an important role in the progress of AS. ACEI has a profound inhibitory effect on DCs function, which may be one of its mechanisms in the prevention of atherosclerosis(AS).

Key words:dendritic cell;angiotensin enzyme inhibitor;atherosclerosis;enalapril

目前研究认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)过程不仅是脂质在动脉壁中的积聚,而是一种慢性炎症疾病^[1],也有学者提出 AS 是一种自身免疫性疾病^[2]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强的专职性抗原提呈细胞,在特异性细胞免疫和体液免疫中均起着十分重要的作用^[3]。近年来研究发现 DC 在 AS 斑块中聚集增多,提示其免疫机制可能参与了 AS 的发生和发展,抑制免疫炎症反应可能是抗 AS 的新途径^[4]。临床及实验证实,血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的应用可部分逆转 AS 或对 AS 起到预防作用,但其机制尚未完全明确,ACEI 对炎症反应的抑制可能是其中之一^[5]。目前 ACEI 对 DC 的作用尚少有报道。本研究探讨了 AS 大鼠 DC 的功能状态,为 DC 参与 AS 的病理过程提供实验依据,并观察了 ACEI 类药物依那普利(Enalapril)对大鼠树突状细胞功能的影响,以进一步阐明 ACEI 对免疫功能的可能影响以及 ACEI 防治 AS 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 RPMI1640(L-glutamine)培养基、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司;四唑盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)购自广州威佳公司;重组鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、重组鼠白介素-4(rmIL-4)购自英国 Peprotech 公司;PE antimouse CD86(B7-2)单抗购自 Biolegend 公司;IL-1 β 、TNF- α 试剂盒购自深圳晶美公司;依那普利购自常州制药厂;Wistar 大鼠购自南方医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠 AS 模型 雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量(210 $\pm$ 10)g,随机分为 3 组,正常对照组($n=10$);AS 组($n=10$),口服依那普利组($n=10$)。大鼠分组后,饲以不同饮食,正常对照组为普通饮食;AS 组饲以高脂饮食(参考文献[6]方法造模,其饲料配制是:4%胆固醇、10%猪油、0.2%甲基硫氧嘧

* 基金项目:广东省医学科学基金资助项目(A2006163)。

啉、86% 基础饲料,基础饲料中面粉 20%、米粉 2%、玉米 20%、麸皮 25%、豆粕 20%、骨粉 2%、鱼粉 2%);口服依那普利组饲以高脂饮食同时予蒸馏水灌胃法饲以依那普利 0.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,4 周后实验。

1.2.2 DC 制备 抽取大鼠静脉血 20 mL,淋巴细胞分离液中离心(2 000 r/min,20 min),收集单个核细胞(PBMC),PBS 液冲洗 2 次,RPMI1640 冲洗 1 次,用完全 RPMI1640 培养基(含 10%FBS)在 6 孔培养板中培养 2 h(37 °C、5%CO₂),吸除非贴壁细胞。贴壁细胞用完全 RPMI1640 培养基(含 10%FBS、rmGM-CSF 100 ng/mL、rmIL-4 500 u/mL),置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 7 d,24 h 换液 1 次。收集第 7 天的悬浮细胞即 DC 进行实验。

1.2.3 DC 形态 于培养第 1、3、5、7 天在倒置显微镜下观察 DC 形态。

1.2.4 流式细胞学分析 收集 DC 细胞,用 PE 标记的 CD86 (B7-2)单抗标记细胞,用流式细胞仪(FACS,美国 Becton Dickinson)检测。

1.2.5 混合淋巴细胞反应(MLR) 反应中 T 淋巴细胞来自其他大鼠的 PBMC,经尼龙毛柱分离后,得到纯的 T 淋巴细胞。浓度为 2×10⁵/mL 的 T 淋巴细胞与浓度为 2×10⁴/mL 的 DC 各 100 μL 在 96 孔平底培养板中 37 °C、5% CO₂ 条件下混合培养,第 4 天吸取上清液,-20 °C 冻存待测细胞因子,沉淀细胞加 MTT 液(25 μL/孔),继续培养 4 h 后每孔加 DM-SO100 μL,波长 570 nm 处测 A 值(代表刺激 T 淋巴细胞增殖能力)。

1.2.6 细胞因子测定 酶联免疫吸附法(ELISA 法)分别检测保存的 MLR 上清液细胞因子 IL-1β 和 TNF-α 浓度,操作严格按试剂盒说明进行。

1.3 统计学方法 应用 SPSS10.0 软件系统分析,所有资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单向方差分析(One-way ANOVA),以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DC 形态学特点 本研究借鉴前人经验^[7],成功培养出 DC 并进行鉴定,培养第 7 天的 DC 表达 CD1a 阳性率为 92%。光学显微镜下可见细胞表面伸出树突样结构,长短不一,呈簇状生长,为典型的 DC 形态。3 组 DC 形态无差异。

2.2 CD86 表达率 结果显示,DC 培养第 7 天,AS 组 DC 表面 CD86 表达明显高于对照组(P<0.001);AS 经应用依那普利干预组的 DC 表面 CD86 表达明显低于 AS 组(P<0.001)(见表 1)。

2.3 MLR AS 组 DC 刺激 T 细胞增殖的能力明显高于对照组 DC(P<0.001);AS 经应用依那普利干预组 DC 刺激 T 细胞增殖的能力明显低于 AS 组 DC(P<0.001)(见表 1)。

表 1 依那普利对 DC 功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	CD86 表达率(%)	A 值
正常对照组	50.80±9.73	0.63±0.07
AS 组	81.65±6.65*	1.18±0.27*
口服依那普利组	59.40±9.95**	0.72±0.16**

与正常对照组比较,* :P<0.001;与 AS 组比较,** :P<0.001。

2.4 细胞因子测定 AS 组 MLR 上清液中促炎细胞因子 IL-1β、TNF-α 高于对照组(P<0.001),AS 组和依那普利组 MLR

上清液中促炎细胞因子 IL-1β、TNF-α 低于 AS 组(P<0.001)(见表 2)。

表 2 MLR 上清液中细胞因子浓度(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β	TNF-α
正常对照组	13.4±5.12	9.5±2.18
AS 组	22.2±4.40*	18.2±6.52*
口服依那普利组	15.6±5.38**	13.6±5.88**

与正常对照组比较,* :P<0.001;与 AS 组比较,** :P<0.001。

3 讨 论

目前研究认为免疫机制参与了 AS 的发生发展,在 AS 斑块中有大量免疫炎性细胞如 T 淋巴细胞、巨噬细胞等^[8]。最近发现在 AS 斑块中 DC 亦聚集增多^[4]。DC 是体内效应最强的专职性抗原呈递细胞,原始 T 细胞被激活的前提是 DC 提呈的 MHC 抗原的识别^[9-10],以及共刺激分子 CD86(B7-2)与其在 T 细胞表面的受体 CD28 的配对^[11],共刺激分子的缺乏可诱导特异性 T 淋巴细胞的免疫耐受,使局部炎性细胞对特异性抗原无反应^[12]。

已有研究表明^[13-14],ACEI 具有抗 AS 作用。ACEI 是通过抑制循环和组织局部的血管紧张素转化酶(ACE)使血管紧张素 II(Ang II)水平降低而发挥效应的。研究表明,几乎所有的 RAS 成分均在免疫细胞中表达,Ang II 可以由免疫细胞产生并直接作用于免疫细胞,通过自分泌方式调节免疫细胞功能,干预 RAS 可以调节 T 淋巴细胞的增生、凋亡,甚至抗原递呈细胞的抗原递呈作用;在体内,ACEI 类药物卡托普利对一些免疫介导的疾病有保护作用,如心肌炎、慢性移植排斥反应等,说明 ACEI 对免疫功能有一定的调节作用。有研究认为 Ang II 及其受体在 DC 中有高表达,Ang II 可能介导了先天及获得性免疫反应的起始过程^[15]。Danilov 等^[16]研究认为 ACE 可能参与了 DC 抗原的提呈。以上研究结果提示 ACEI 可能对 DC 的作用有一定影响。但其具体作用目前尚未见报道。本研究结果表明,DC 在 AS 时处于激活状态。表现在 DC 表面共刺激分子 CD86 表达的明显升高,对同种异体 T 淋巴细胞的促增殖能力增强,T 淋巴细胞分泌炎性因子增加。由于 DC 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖作用的强度与其表面共刺激分子表达有关,共刺激分子表达率越高,对 T 淋巴细胞的刺激能力越强^[17],因而 AS 时可能通过 DC 表面 CD86 等共刺激分子的差异表达,从而使抗原递呈功能增强,T 淋巴细胞过度活化,激活局部免疫反应。

本研究结果显示,应用依那普利并不影响单个核细胞向 DC 的分化,但可抑制 AS 大鼠 DC 表面共刺激分子 CD86 的表达,从而抑制其成熟和抗原呈递功能。经依那普利处理的 DC 对同种异体 T 淋巴细胞的促增殖能力下降,从而避免了 T 细胞在局部的聚积,同时促炎性因子分泌明显减少。低表达 CD86 的 DC 可诱导特异性 T 淋巴细胞的免疫耐受,使局部炎性细胞对特异性抗原无反应^[11]。低表达 CD86 的 DC 诱导 T 淋巴细胞分泌活动降低,表现在促炎性细胞因子 IL-1β、TNF-α 等分泌减少,通过抑制局部平滑肌增生,单核巨噬细胞的聚集、泡沫细胞的形成等作用,影响 AS 的发生发展过程^[18]。由于 DC 对损伤抗原提呈不足,相应的免疫炎性反应受到抑制,对血管壁的损伤相应降低,AS 斑块的稳定性增加,动脉斑块进展得以减缓,从而延缓了 AS 的进展过程。本实验结果表明,

ACEI 可通过降低 DC 表面共刺激分子的表达从而抑制 DC 介导的免疫炎症反应,进一步达到干预 AS 的发生与发展的目的。基于 ACEI 对 ACE 及 Ang II 的影响,推测此作用的机制可能是 ACEI 通过拮抗 DC 细胞内的 ACE,细胞内 Ang II 水平降低,抑制了 DC 的抗原提呈能力,甚至引起 T 淋巴细胞的免疫耐受,从而抑制了 DC 引起的免疫损伤反应。但其确切机制尚需进一步研究。

综上所述,作为最强的抗原提呈细胞,DC 介导的免疫机制参与了 AS 的发生与发展,ACEI 对 DC 的抑制可能是其抗 AS 的机制之一。但 DC 参与 AS 发病的具体过程,AS 时 DC 激活,迁移以及 ACEI 对其影响的机制等需要深入的研究探讨。

参考文献:

- [1] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease[J]. *Am Heart J*,1999,138(5):419.
- [2] Wick G, Xu Q. Atherosclerosis is a paradigmatic disease of the elderly, the roots of which are laid in youth, whereas the clinically manifested consequences become evident at old age[J]. *Exp Gerontol*,1999,34(4):559.
- [3] Cao X, Zhang W, He L, et al. Lymphotoxin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity[J]. *J Immunol*,1998,161(11):6238.
- [4] Bobryshev YV, Lord RS. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions[J]. *Cardiovasc Res*,1995,29(5):689.
- [5] Cunha V, Tham DM, Martin-McNulty B, et al. Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation[J]. *Atherosclerosis*,2005,178(1):9.
- [6] 苗明三. 实验动脉和动物实验技术[M]. 北京:中国中医药出版社,1997:199.
- [7] Chapuls F, Rosenzweig M. Differentiation of human dendritic cell from monocytes in vitro[J]. *Eur J Immunol*,1997,27(2):431.
- [8] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Circ Res*,2002,91:281.
- [9] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*,1998,392:245.
- [10] 蒋东波,杨锡强. 哮喘患儿外周血树突状细胞共刺激分子表达研究[J]. *重庆医学*,2003,32(4):396.
- [11] Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses[J]. *Annu Rev Immunol*,2002,20:29.
- [12] Steinman RM, Hawiger D, Liu K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance[J]. *Ann NY Acad Sci*,2003,987:15.
- [13] 廖宏荣,龚建平. 血管紧张素所致炎症机制研究新进展[J]. *重庆医学*,2006,35(15):1409.
- [14] 苏江利,郭春杰. 动脉粥样硬化药物治疗进展[J]. *山东医药*,2006,46(5):77.
- [15] Lapteva N, Nieda M, Ando Y, et al. Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2001,285(4):1059.
- [16] Danilov SM, Sadovnikova E, Scharenborg N, et al. Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells[J]. *Exp Hematol*,2003,31(12):1301.
- [17] Wolfrum S, Richard G, Dominiak P, et al. Apstatin, a selective inhibitor of aminopeptidase, reduces myocardial infarction size by a kinin dependent pathway[J]. *Br J Pharmacol*,2001,134(2):370.
- [18] Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, et al. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells[J]. *Blood*,1999,93(5):1634.

(收稿日期:2009-09-02 修回日期:2009-12-16)

(上接第 1488 页)

- [5] Xi GM, Wang HQ, He GH, et al. Evaluation of murine models of permanent focal cerebral ischemia[J]. *Chinese Medical Journal*,2004,117(3):389.
- [6] Mackay KB, Bailey SJ, King PD, et al. Neuroprotective effect of recombinant neutrophil inhibitory factor in transient focal cerebral ischaemia in the rat[J]. *Neurodegeneration*,1996,5(4):319.
- [7] Arslantas A. Development of functional models for a SOD[J]. *Met Based Drugs*,2002,9(1):9.
- [8] 柯尊平,王家宁,郭凌郎,等. PEP-1 肽介导 Cu, Zn-SOD 转导入大鼠离体缺血/再灌注损伤心脏[J]. *武汉大学学报(医学版)*,2007,28(4):450.
- [9] 吴江. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:150.
- [10] 严丽荣,周宏图,陈爱娟,等. 老年脑梗死患者高压氧治疗

前后血清一氧化氮、过氧化物歧化酶、丙二醛含量的变化[J]. *重庆医学*,2004,33(3):330.

- [11] 劳之勇,曾琦,邢柏. 依达拉奉联合纤溶酶治疗急性脑梗死的临床效果和分析[J]. *山东医药*,2009,49(24):78.
- [12] Eum WS, Kim DW, Hwang IK, et al. In vivo protein transduction: biologically active intact pep-1-superoxide dismutase fusion protein efficiently protects against ischemic insult[J]. *Free Radic Biol Med*,2004,37(10):1656.
- [13] 蔡志友,余昌胤,张骏,等. 美满霉素对脑缺血再灌注大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响[J]. *重庆医学*,2007,36(17):1746.

(收稿日期:2009-07-27 修回日期:2009-11-17)