

## · 论 著 ·

TNF- $\alpha$  和脂多糖刺激结核病患者树突状细胞成熟效果比较\*黄家禹<sup>1</sup>, 赵 岩<sup>2</sup>, 宋秀宇<sup>1△</sup>, 叶志忠<sup>3</sup>, 廖蕴惠<sup>1</sup>

(厦门大学附属第一医院:1. 检验科, 2. 中心实验室, 3. 杏林分院肺科, 福建厦门 361003)

**摘要:**目的 评价 TNF- $\alpha$  和 LPS 刺激结核病患者树突状细胞成熟效果。方法 采用密度梯度离心方法分离外周血单个核细胞, 并以 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导培养, 于培养第 7 天分别加入 rhTNF- $\alpha$  和 LPS, 培养至第 11 天提取细胞 RNA, 实时荧光定量 PCR 测定 IL-12p40、IL-12p35 和 CCR7 的 mRNA 表达情况; ELISA 法检测培养上清液 IL-12 水平。结果 树突状细胞经 LPS 刺激后, 其 IL-12p40、IL-12p35 和 CCR7 的 mRNA 表达量均高于经 TNF- $\alpha$  刺激后的表达量 ( $P < 0.05$ ); ELISA 法检测结果显示, LPS 刺激后 DC 分泌 IL-12p70 水平明显高于 rhTNF- $\alpha$  刺激后的分泌水平 ( $P < 0.05$ )。结论 对于结核病患者外周血树突状细胞, LPS 比 TNF- $\alpha$  有着更强的刺激作用, 能更好地刺激树突状细胞成熟。

**关键词:**树突细胞; 结核; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 脂多糖类

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.004

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2011)01-0009-02

**Comparison of effects on dendritic cells maturation stimulated by  
TNF-alpha and lip polysaccharide in patients with tuberculosis**

Huang Jiayu<sup>1</sup>, Zhao Yan<sup>2</sup>, Song Xiuyu<sup>1△</sup>, Ye Zhizhong<sup>3</sup>, Liao Yinhui<sup>1</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Xiamen First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Xiamen 361003, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the effects on dendritic cells maturation stimulated by TNF-alpha and lip polysaccharide in patients with tuberculosis. Methods The peripheral blood mononuclear cells were separated by using density gradient centrifugation and were cultured by addition of rhGM-CSF and rhIL-4. TNF-alpha and lip polysaccharide were added on the 7th day and total RNA was extracted on the 11th day. Expressions of IL-12p40, IL-12p35 and CCR7 mRNA were detected by using real time PCR, while amounts of IL-12 in the supernatant were detected by ELISA tests. Results dendritic cells expressed a higher IL-12p40, IL-12p35, CCR7 mRNA when stimulated by lip polysaccharide than they were when stimulated by TNF-alpha ( $P < 0.05$ ); ELISA tests showed higher IL-12 amounts in lip polysaccharide-stimulation group than it was in TNF-alpha-stimulation group. Conclusion with the higher stimulation ability, lip polysaccharide showed to be a better stimulator for the dendritic cells of tuberculosis patients.

**Key words:** dendritic cell; tuberculosis; tumor necrosis factor-alpha; lipo polysaccharides

根据世界卫生组织(WHO)2008 年报道, 结核分枝杆菌引起的各种结核病, 每年有近 920 万新发病例和 170 万死亡病例<sup>[1]</sup>。树突状细胞作为最有效的抗原提呈细胞, 其免疫中心地位日益受到重视<sup>[2]</sup>。体外树突状细胞诱导培养是研究其特性的重要方法, 目前多采用肿瘤坏死因子(rhTNF- $\alpha$ , 10 ng/mL)刺激外周血或骨髓来源细胞进行诱导培养<sup>[3]</sup>。现采用 rhTNF- $\alpha$  和脂多糖(lip polysaccharide, LPS)分别刺激结核病患者外周血树突状细胞成熟, 通过观察 IL-12p35、IL-12p40 的 mRNA 表达水平和 IL-12p70 分泌情况等成熟度指标变化, 来分析不同细胞因子的刺激效果, 为研究树突状细胞抗结核疫苗和免疫治疗提供依据。

**1 资料与方法**

**1.1 一般资料** 2009 年 4~8 月就诊于本院的结核病患者 22 例, 均符合《新编结核病学》的诊断标准。其中男 14 例, 女 8 例, 平均年龄 41.4 岁(18~73 岁); 其中肺结核 16 例, 结核性胸膜炎 1 例, 淋巴结核 2 例, 盆腔结核 1 例, 血性播散性结核 1 例, 胸椎结核 1 例。

**1.2 仪器及试剂** 淋巴细胞分离液(上海生化试剂公司), RPMI 1640 培养基(Hyclone, 美国), rhGM-CSF、rhIL-4 和 rhTNF- $\alpha$ (Peprotech, 美国), LPS(Sigma, 美国), Penicillin-Streptomycin Solution(Hyclone, 美国), 胎牛血清(PAA, 奥地利), RNA 提取试剂盒(Tiangen, 中国), SYBR PrimeScript™

逆转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, 日本); Human IL-12p70 ELISA Kit (Bender Medsystems, 奥地利); 逆转录 PCR 扩增仪(Bio-Rad, 美国), Light Cycler 480 荧光定量 PCR 扩增仪(Roche, 瑞士)。

**1.3 PCR 引物设计** 按 GeneBank 中 GAPDH(NM002046.3)、IL-12p35(NM000882.2)、IL-12p40(NM002187.2) 和 CCR7(NM001838.2) 的 mRNA 序列设计 PCR 反应引物, 以 GAPDH 为内参照, 正、反向引物由 Invitrogen 公司合成。见表 1。

表 1 各引物序列及扩增片段长度

引物名称	引物序列	扩增片段(bp)
GAPDH-F	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	
GAPDH-R	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	226
IL-12p35-F	GAT GGC CCT GTG CCT TAG TA	
IL-12p35-R	TCA AGG GAG GAT TTT TGT GG	195
IL-12p40-F	AAG GAG GCG AGG TTC TAA GC	
IL-12p40-R	AAG AGC CTC TGC TGC TTT TG	213
CCR7-F	GTC GCC CTC CCA GGC TCT CA	
CCR7-R	CTT GGG CGG CCA CTG TCA CC	194

**1.4 树突状细胞诱导培养** 取肝素抗凝静脉血 10 mL, Ficoll

\* 基金项目: 福建省卫生厅青年课题(2008-2-40, 2009-2-74)。

△ 通讯作者, E-mail: songxyxm@hotmail.com。

密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。用 RPMI 1640 调整细胞密度为  $2 \times 10^6$  个/毫升, 每例标本接种 2 孔 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下贴壁培养 6 h 后, 吸取上清液及未贴壁细胞, 再加入含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 RPMI 1640 以及 rhGM-CSF(100 μg/L) 和 rhIL-4(100 μg/L), 隔日半量换液并同时补充相应的细胞因子, 培养第 7 天时分别加入 TNF-α(10 μg/L) 和 LPS(10 μg/L), 培养第 11 天时加入 1 mL RZ 裂解液裂解培养细胞。

**1.5 总 RNA 提取** 加入 200 μL 氯仿至细胞的 RZ 裂解液中, 剧烈震荡 15 s, 室温放置 3 min, 4 °C 时以离心半径 8 cm 13 400 r/min 离心 10 min, 吸出上层水相后加入 0.5 倍体积无水乙醇, 4 °C 时以离心半径 8 cm 13 400 r/min 离心 30 s; 加入 500 μL 和 700 μL RD 液, 4 °C 时以离心半径 8 cm 13 400 r/min 离心 30 s, 各洗涤 1 次; 加入 500 μL RW 液, 4 °C 时以离心半径 8 cm 13 400 r/min 离心 2 min。通风干燥后加入 30 μL RNase-free dH<sub>2</sub>O, 紫外分光光度计检测 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长处的 A 值, 并计算比值。

**1.6 逆转录 cDNA 合成** 逆转录严格按照试剂说明书操作, 10 μL 反应体系为: 5×PrimeScript Buffer 2 μL, Random 6 mers 0.5 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5 μL, Oligo dT Primer 0.5 μL, 500 ng 总 RNA 并加 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 10 μL。反应条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s; 产物 cDNA 存于 -20 °C 保存备用。

**1.7 实时荧光定量 PCR 检测基因 mRNA 表达** 将 cDNA 稀释 5 倍后, 在荧光定量 PCR 扩增仪上检测。20 μL 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II 10 μL, 上、下游引物各 0.8 μL, cDNA 模板 2.0 μL, dH<sub>2</sub>O 6.4 μL; 扩增反应条件为 95 °C 5 s, 60 °C 15 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。

**1.8 结果记录** 采用相对定量法测定目标基因与其内参基因比值, 并采用内标法将 1 号标本标为 1, 记录各测定值与 1 号标本测定值之间的比值。

**1.9 ELISA 法检测上清液 IL-12p70 水平** 96 微孔板中分别加入标准品和待测样本, 加入 100 μL 生物素-酶结合物后室温孵育 2 h; 洗板 4 次, 拍干后, 加入 100 μL 抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶, 室温孵育 1 h 后, 洗板 4 次并拍干; 加入 100 μL 底物液, 室温避光反应 10 min 后终止反应, 于 450 nm 和 630 nm 双波长读取吸光度, 并绘制标准曲线。

**1.10 统计学处理** 数据分析使用 SPSS13.0 统计软件。正态分布的数据采用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用配对资料的 t 检验; 偏态分布的数据采用中位数(M)及四分位间距(QR), 组间比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 细胞总 RNA 提取结果** 取 5 μL 总 RNA 经紫外分光光度计测定其 A 值; 并将 RNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰 RNA 条带, 说明 RNA 提取过程中无降解。见图 1。

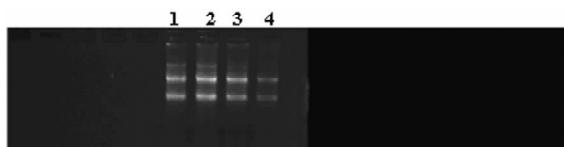


图 1 样本总 RNA 提取电泳图

**2.2 PCR 扩增产物特异性** GAPDH、IL-12p35、IL-12p40 和 CCR7 的 mRNA 荧光定量 PCR 产物溶解曲线分析显示, 曲线

均呈 2 个明显主峰, 无杂峰出现, 说明扩增产物的特异性较好, 体系中无明显引物二聚体形成。

**2.3 实时荧光定量 PCR 检测结果** 通过荧光定量 PCR 分析, 与内参基因 GAPDH 相比较, TNF-α 刺激后 DC 的 IL-12p40、CCR7 和 IL-12p35 mRNA 表达量分别为 0.50 (1.17)、0.63 (0.47)、(3.50 ± 2.15), 均低于 LPS 刺激后 DC 的 IL-12p40 [1.29 (1.81)]、CCR7 [1.03 (1.14)] 和 IL-12p35 (4.99 ± 2.82) 的 mRNA 表达量, Wilcoxon 符号秩和检验和配对资料的 t 检验显示, 其 Z 值或 t 值分别为 -3.56、-3.85 和 -3.94 ( $P < 0.01$ )。

**2.4 ELISA 法检测 IL-12p70 结果** LPS 刺激组第 7 天上清液检测结果为 (1.81 ± 0.15) ng/L, 与 TNF-α 刺激组结果 (1.73 ± 0.16) ng/L 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而第 9 天和第 11 天上清液检测结果分别为 (2.41 ± 0.65) ng/L 和 (2.10 ± 1.73) ng/L, 明显高于 TNF-α 刺激组的 IL-12p70 水平 (1.73 ± 0.10) ng/L 和 (1.64 ± 0.14) ng/L, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

树突状细胞作为最有效的抗原提呈细胞, 其在感染免疫和肿瘤免疫中的作用日益受到关注<sup>[4]</sup>。体内 DC 可分为 DC<sub>1</sub> 和 DC<sub>2</sub>, 前者主要活化 Th<sub>1</sub> 细胞, 与介导细胞免疫应答有关, 后者主要活化 Th<sub>2</sub> 细胞, 与介导体液免疫应答有关<sup>[5]</sup>。正常情况下, 体内大多数 DC 为未成熟 DC (immature DC, iDC), 其高表达 FCR、补体受体、甘露糖受体等与吞噬有关的受体以及 CD86 和 HLA-DR 等, 具有较强的抗原内吞和加工处理能力。iDC 摄取抗原成分或受到 LPS、IL-1b、TNF-α 等炎性因子刺激后, 可发育成为成熟 DC (mature DC, mDC)。mDC 高表达 MHC II 类分子和 CD83、CD25、CD40、CCR7 等共刺激分子及黏附分子, 诱导效应性 T 细胞反应<sup>[6]</sup>。CCR7 是 DC 成熟的重要标志, 其在介导 DC 由外周炎性组织携带抗原迁移至淋巴结过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。

IL-12 是由 p35 和 p40 2 个亚基组成, 相对分子质量为  $70 \times 10^3$  的异源二聚体, IL-12 在活化 Th<sub>1</sub> 型细胞、调节 NK 细胞和 Mφ 等方面发挥重要作用。体内 IL-12 分泌受多种因素影响, 尤其以细菌 LPS 和 DNA 模序, 其通过 CD40-CD40L 途径活化初始 T 细胞等分泌 IL-12; 此外, IL-12 的分泌还受多种细胞因子 (如 IFN-γ、IL-4 和 GM-CSF 等) 影响<sup>[8]</sup>。

LPS 是 G<sup>-</sup> 细菌的胞壁成分, 是常见的外源性致病因子。感染时, 在组织损伤、TNF-α 或 LPS 等炎性因子的刺激下, 血液中未成熟 DC 聚集到炎性反应局部摄取抗原, 逐渐成熟和迁移至次级淋巴器官, 并在次级淋巴器官中活化初始 T 细胞, 诱导特异性免疫应答<sup>[9]</sup>。LPS 主要被 DC 表面 TLR4 受体识别, 通过 MyD88 依赖性途径刺激 DC 成熟。Kaisho 等<sup>[10]</sup>研究发现, TLR4 敲除后的 DC 失去了对 LPS 刺激成熟的反应性。TNF-α、结核杆菌 ManLAM 等成分主要被 DC-SIGN 受体识别<sup>[11]</sup>。

本研究采用两种细胞因子同时刺激体外诱导 DC, 结果表明 LPS 在短期刺激 DC 成熟效果比 TNF-α 效果更为明显。本组从基因及蛋白水平检测结果表明, LPS 刺激组中 IL-12p35、IL-12p40 和 CCR7 mRNA 表达水平明显高于 TNF-α 刺激组, 并且培养上清液中 IL-12p70 水平亦明显升高。由于 DC 在结核病免疫中发挥重要作用, 基于体外诱导培养技术的 DC 疫苗研究和 DC 免疫治疗研究逐渐受到重视。在 DC 诱导培养中, 目前广泛采用 TNF-α 刺激 DC 成熟, 由于其体外诱导刺激难以达到稳定效果<sup>[12-13]</sup>。因此, LPS 作为更佳的刺(下转第 13 页)

(上接第 10 页)  
激剂应予以重视。

## 参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing[S]. Geneva, WHO, 2008.
- [2] Escors D, Lopes L, Lin R, et al. Targeting dendritic cell signaling to regulate the response to immunization[J]. Blood, 2008, 111(6):3050-3061.
- [3] Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, et al. Mycobacterium leprae inhibits dendritic cell activation and maturation [J]. J Immunol, 2007, 178(5):338-344.
- [4] Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, et al. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells[J]. J Leukoc Biol, 2007, 82(12):1365-1374.
- [5] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(10):767-811.
- [6] Coutant F, Perrin-Cocon L, Agaague S, et al. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine[J]. J Immunol, 2002, 169(4):1688-1695.
- [7] Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, et al. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes[J]. J Immunol, 2006, 176(4):803-810.
- [8] Wesa AK, Galy A. IL-1 induces Dendritic cells to produce IL-12[J]. Int Immunol, 2001, 13(8):1053-1061.
- [9] 庄奕宏, 李春妹. 外周血单核细胞来源树突状细胞体外扩增及诱导抗乳腺癌免疫的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1):3-6.
- [10] Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, et al. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells[J]. J Immunol, 2001, 166(5):5688-5694.
- [11] Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, et al. DC-SIGN is the major mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells[J]. J Exp Med, 2003, 197(1):121-127.
- [12] Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nunez GJ, et al. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo[J]. J Immunol, 2007, 179(8):2509-2519.
- [13] 朱远丰, 陈东晓, 陈慎仁. 脐血 CD34<sup>+</sup> 细胞体外扩增诱导成熟树突状细胞实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(9):777-779.

(收稿日期:2010-02-15)