

• 研究报告 •

## 鼻敏感颗粒对变应性鼻炎小鼠树突状细胞 免疫调节机制的研究\*

吴继勇<sup>1</sup> 严道南<sup>2</sup> 马华安<sup>1</sup> 朱芸<sup>2</sup> 张世中<sup>2</sup> 胡瑶<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:研究鼻敏感颗粒对变应性鼻炎小鼠树突状细胞(DC)发挥免疫调节作用的具体机制。方法:分离出小鼠骨髓细胞,使用 rGM-CSF 和 rIL-4 共培养骨髓细胞,刺激骨髓细胞向 DC 转化。然后加入脂多糖和不同浓度的鼻敏感颗粒共刺激未成熟 DC,12 h 后检测 DC 中 MHC II、CD80、CD86 表面分子以及细胞上清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 的表达。结果:鼻敏感颗粒能够显著抑制成熟 DC 标志细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-1 $\beta$  的生成和成熟 DC 标志物 MHC II、CD80 和 CD86 的表达。结论:鼻敏感颗粒能够显著抑制未成熟 DC 向成熟 DC 的分化。

**[关键词]** 鼻炎,变应性;树突状细胞

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.13.018

**[中图分类号]** R765.4 **[文献标志码]** A

### Research of bimingan granule on dendritic cell in allergic rhinitis mice

WU Jiyong<sup>1</sup> YAN Daonan<sup>2</sup> MA Hua'an<sup>1</sup> ZHU Yun<sup>2</sup> ZHANG Shizhong<sup>2</sup> HU Yao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China; <sup>2</sup>The First Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine)

Corresponding author: YAN Daonan, E-mail: yandaon2006@163.com

**Abstract Objective:** To investigate the mechanism. **Method:** We isolate the mouse bone marrow cells and cultured with rGM-CSF and rIL-4 to stimulate bone marrow cells to transfer to immature dendritic cells. And then the immature dendritic cells were costimulated with LPS and different concentrations of Bimingan Granule. **Result:** MHC II, CD80, CD86 were detected by flow cytometer and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were quantified by ELISA. **Conclusion:** Our results showed that Bimingan Granule may significantly inhibit the differentiation of immature dendritic cells to mature dendritic cells.

**Key words** rhinitis, allergic; dendritic cells

鼻敏感颗粒来源于国家“十一五”科技支撑计划项目“变应性鼻炎中医治疗方案研究”,是严道南教授多年治疗变应性鼻炎的经验总结“益气温阳方”,临床上用于治疗变应性鼻炎肺脾虚寒证有显著疗效。前期研究表明,鼻敏感颗粒能够通过调节 T 细胞活化从而发挥作用<sup>[1]</sup>。树突状细胞(dendritic cells, DC)能够调节 T 细胞的活化,为了深入研究鼻敏感颗粒发挥作用的具体机制,本文对鼻敏感颗粒调节 DC 的分化机制进行了研究,现报告如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 实验材料

C57BL/6 小鼠(购自上海斯莱克实验动物有

限责任公司);RPMI-1640(购自 Gibco);Penicillin (100 U/ml, Sigma); Streptomycin (100 mg/L, Sigma); L-glutamin (2 mmol/L, Sigma);胎牛血清(购自 Gibco);rmGM-CSF (415-ML-010)和 rmIL-4 (404-ML-010)购自 R&D; TNF- $\alpha$  (DY410)、IL-1 $\beta$  (DY201)、IL-6 (DY206)、IL-10 (DY417) ELISA 试剂盒购自 R&D;抗 MHC II (558593)、CD80 (562239)、CD86 (561963)抗体购自 BD。

鼻敏感颗粒中药配方颗粒(处方:生黄芪 10 g、党参 10 g、干姜 9 g、桂枝 12 g、麻黄 6 g、五味子 6 g、辛夷 6 g、乌梅 9 g、地龙 10 g、甘草 3 g)由江阴天江药业有限公司提供,批号 0911104。

#### 1.2 实验方法

体外培养小鼠骨髓来源 DC:6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠,10 只。断颈处死,置于 75%乙醇溶液中浸泡 3~5 min 后用 PBS 液清洗。无菌剥离股骨,用 RPMI1640 培养液培养骨髓细胞,反复冲

\* 基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目“变应性鼻炎中医治疗方案研究”(No:2007BAI20B037);江苏省中医院科技基金项目(No:Y11001)

<sup>1</sup> 江苏省中医院耳鼻咽喉科(南京,210029)

<sup>2</sup> 南京中医药大学第一临床医学院

通信作者:严道南, E-mail: yandaon2006@163.com

洗。冲洗液过 200 目细胞筛网后收集于 50 ml 离心管中, 239  $g/min$  离心 7 min, 弃上清, 加 4~5 倍体积的红细胞裂解液混匀, 静置 5 min 以裂解红细胞(可重复)。RPMI1640 培养液洗涤 2 次, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/L, 接种于 6 孔板, 1 ml/孔(第 0 天)<sup>[2-4]</sup>, 并加入细胞因子  $1 \times 10^6$  U/L (100  $\mu g/L$ )、rm GM-CSF 和 100  $\mu g/L$  (或  $5 \times 10^5$  U/L) rm IL-4。

DC 培养: 第 3 天轻轻摇动培养板, 吸走大部分悬浮细胞, 加入等量的培养液并补足细胞因子。第 5、7 天收集细胞培养液, 离心并重悬 DC 小球, 于原皿中加入等量培养液, 并补足细胞因子。第 10 天轻轻收集非贴壁细胞, 300  $g/min$ , 室温离心 5 min, 然后重悬细胞于培养液中, 即为非成熟 DC(imDC)。

鼻敏感颗粒对 im DC 的刺激: 将 imDC 培养于 6 孔板中 (3 复孔)。实验组用含脂多糖 (LPS) (1 mg/L) 及 (或) 不同剂量鼻敏感颗粒 (25 mg/L 和 50 mg/L) 共培养细胞, 12 h 后收集细胞上清, 测定细胞因子, 并且检测细胞表面标志物。

细胞因子检测: 按照 R&D 试剂盒标准流程进行 ELSIA 操作, 每样本设 3 个复孔, 数据经 GraphPad Prism5 进行统计分析。

流式细胞仪检测细胞表面标志物: 按照 BD 抗体的推荐方法, 对细胞进行收集、染色, 使用 BD ARIA II 进行分析, 将取得数据进行处理, 获得点状图。

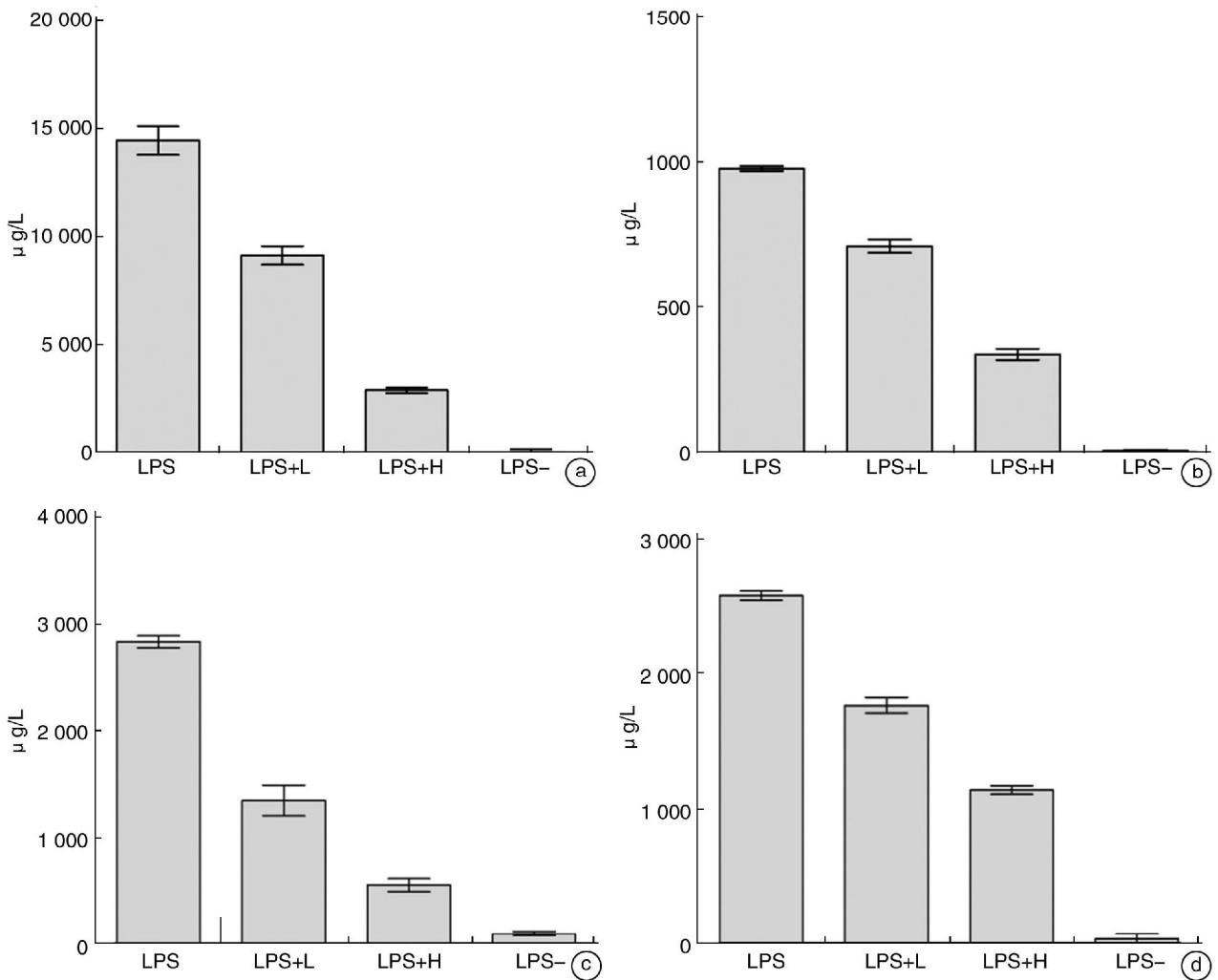
## 2 结果

### 2.1 细胞因子的测定

不同浓度鼻敏感颗粒对原代成熟 DC 细胞因子的影响见图 1。从细胞因子水平来看, 鼻敏感颗粒能够显著抑制成熟 DC 标志性细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-1 $\beta$  的生成, 说明其能够抑制 DC 的成熟。

### 2.2 细胞表面标志物检测

鼻敏感颗粒对成熟 DC 表面标志物 CD80、CD86 和 MHC II 的影响见表 1。可以看出, 鼻敏感颗粒能够显著抑制 MHC II、CD80 和 CD86 的表达, 进一步验证了其可以抑制 DC 的成熟。



a: 对 IL-6 的影响; b: 对 IL-10 的影响; c: 对 TNF- $\alpha$  的影响; d: 对 IL-1 $\beta$  的影响。

图 1 不同浓度鼻敏感颗粒 (L: 25 mg/L, H: 50 mg/L) 对原代成熟 DC 标志性细胞因子的影响

表 1 鼻敏感颗粒对成熟 DC 表面标志物 CD80、CD86 和 MHC II 的影响 %

| 标志物    | LPS— | LPS+ | 鼻敏感颗粒   |         |
|--------|------|------|---------|---------|
|        |      |      | 25 mg/L | 50 mg/L |
| CD80   | 0.1  | 65.2 | 45.6    | 32.8    |
| CD86   | 0.1  | 66.4 | 47.8    | 32.8    |
| MHC II | 0.1  | 68.8 | 44.1    | 39.9    |

由表 1 可见,使用 LPS 和鼻敏感颗粒诱导 DC 细胞向成熟细胞分化,不加 LPS 组(LPS—)成熟 DC 细胞的比例很低(0.1%),加入 LPS 后,能够诱导产生成熟的 DC 细胞(65%左右)。与 LPS 组比较,鼻敏感颗粒组成熟 DC 细胞比例下降,并呈浓度依赖性,即浓度越高,成熟 DC 细胞比例越低。

3 讨论

变应性鼻炎属于中医“鼻鼽”范畴,发病率相当高。“正气内存,邪不可干”,“邪之所凑,其气必虚”,现代中医学认为禀赋不足,脏腑失调,特别是肺、脾、肾三脏虚损为“鼻鼽”的发病基础;风寒、异气之邪侵袭鼻窍为致病原因<sup>[5]</sup>。临床上肺脾虚寒证较多见。在前期研究中,严道南等<sup>[6]</sup>通过安慰剂对照、多中心分层、随机双盲研究方法临床治疗变应性鼻炎 100 例,表明鼻敏感颗粒有显著疗效。其后又进行多中心、西药对照,发现鼻敏感颗粒组总有效率达 94.32%<sup>[7]</sup>。同时发现变应性鼻炎肺脾虚寒证患者免疫功能状态失衡<sup>[1]</sup>,这在变应性鼻炎复合大鼠模型中也得到了验证<sup>[8]</sup>。

变应性鼻炎是一种免疫反应失衡引起的鼻黏膜炎症反应性疾病,Th2 细胞的过度活化是其主要原因。DC 在免疫反应中发挥主要作用,骨髓来源的 DC 在体内分化成成熟 DC,进而分泌 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 等细胞因子,诱导 T 细胞分化成熟。

DC 抗原提呈功能与其表面免疫分子的表达密切相关。MHC-II 分子是 DC 抗原递呈的物质基础,CD80 可作为 DC 成熟的标志,CD40 是 DC 表达的另一种协同刺激分子,DC 的活化有赖 CD40/CD40L 结合,从而启动 DC 的成熟,激活抗原提呈。因此,表面免疫分子的检测可以反映 DC 的抗原提呈功能。有报道称变应性哮喘患儿 imDC 存在 CD80 的表达异常,而在小鼠变应性鼻炎模型中,imDC 经 LPS 共刺激培育成为成熟的 DC,CD80 和 CD86 表达明显增多,通过阻断 CD80 和 CD86 的表达即可抑制小鼠变应性鼻炎的病情进展<sup>[9]</sup>。

为研究鼻敏感颗粒发挥调节作用的具体机制,

我们分离出小鼠骨髓细胞,用 rGM-CSF 和 rIL-4 共培养骨髓细胞,刺激骨髓细胞向 DC 转化。然后加入 LPS 和不同浓度的鼻敏感颗粒共刺激 im DC,于 12 h 后检测 DC 中 MHC II、CD80、CD86 表面分子以及细胞上清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 IL-10 的表达。

本研究表明,鼻敏感颗粒能显著抑制成熟 DC 标志性细胞因子 IL-6、TNF-α、IL-10、IL-1β 的生成及成熟 DC 标志物 MHC II、CD80 和 CD86 的表达。从两方面验证了鼻敏感颗粒能够显著抑制未成熟 DC 向成熟的分化,从而发挥免疫调节作用。本研究为鼻敏感颗粒在临床大规模推广提供了科学依据,同时为中药现代化、走向国际提供了坚实的依据。

参考文献

[1] 吴继勇,马华安,朱珠,等.益气温阳方对变应性鼻炎患者外周血 IL-4、IFN-γ 等细胞因子的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志,2011,21(5):311-313.

[2] JØRGENSEN T N, HAASE C, MICHELSEN B K. Treatment of an immortalized APC cell line with both cytokines and LPS ensures effective T-cell activation in vitro[J]. Scand J Immunol,2002,56:492-503.

[3] JIN Y, FULLER L, CIANCIO G. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow[J]. Hum Immunol, 2004,65:93-103.

[4] KONDO Y, TACHIKAWA E, OHTAKE S. Inflammatory cytokines decrease the expression of nicotinic acetylcholine receptor during the cell maturation[J]. Mol Cell Biochem, 2010,333:57-64.

[5] 李云英,刘森平.耳鼻咽喉科专病中医临床诊治[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2005:141-141.

[6] 严道南,马华安,郭小红,等.益气温阳方对变应性鼻炎肺脾虚寒证的临床疗效[J]. 南京中医药大学学报, 2011,27(1):19-21.

[7] 严道南,吴继勇,马华安,等.益气温阳方治疗变应性鼻炎肺脾虚寒证的临床研究[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(6):509-512.

[8] 王宇,严道南.脾气虚与变应性鼻炎模型大鼠相关机理的研究[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(2): 140-143.

[9] OKANO M, AZUMA M, YOSHINO T, et al. Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phase of allergic rhinitis in mice [J]. Am J Respir Care Med,2001,164:1501-1507.

(收稿日期:2013-07-26)