

苯并噁唑衍生物 PO-296 对树突状细胞分化及相关指标的影响[△]

朱薪颖^{1*}, 杨苗², 徐灿², 彭旭¹, 段佳毅¹, 刘丹¹, 王衍堂^{1,3#} (1. 成都医学院药学院, 成都 610083; 2. 成都医学院临床医学院, 成都 610083; 3. 成都医学院基础医学院免疫教研室, 成都 610083)

中图分类号 R967 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2474-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.05

摘要 目的: 探讨苯并噁唑衍生物 2-(氯苯并噁唑基-2 基)-4, 5, 6, 7-四氢-二氢-吡啶-3-醇(PO-296)对小鼠骨髓来源树突状细胞(DC)分化及其特异性表面分子、炎症细胞因子等相关指标的影响。方法: 分离小鼠骨髓核细胞, 以重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和重组小鼠白细胞介素 4 刺激获取未成熟 DC(imDC); 经低、中、高剂量(1、5、25 μmol/L)PO-296 预处理后, 以脂多糖诱导获取 DC。应用流式细胞术检测 DC 特异性表面分子[即 II 类主要组织相容性复合物(MHC II)、CD80、CD86 和趋化因子受体 7(CCR7)阳性细胞比例]的表达以及 imDC 吞噬能力(即葡聚糖阳性细胞比例)和 DC 存活情况(即存活细胞比例), 采用酶联免疫吸附测定法检测 DC 培养液中炎症细胞因子[白细胞介素 10(IL-10)、IL-12、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)]水平。结果: 与 imDC 组比较, 空载组 MHC II、CD80、CD86 阳性细胞比例均显著升高($P < 0.05$)。与空载组比较, PO-296 各剂量组细胞培养液中 IL-10 水平均显著升高, 阳性组以及 PO-296 中、高剂量组细胞 MHC II、CD80、CD86 阳性细胞比例以及各给药组细胞培养液中 IL-12、TNF-α 水平均显著降低($P < 0.05$); 而各给药组 CCR7 阳性细胞、葡聚糖阳性细胞和存活细胞比例与空载组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论: PO-296 无明显的细胞毒性, 亦不影响 imDC 的吞噬功能; 同时, 该化合物可抑制 DC 特异性表面分子的表达, 调控其炎症细胞因子的分泌。

关键词 PO-296; 树突状细胞; 特异性表面分子; 炎症细胞因子; 吞噬功能; 细胞毒性

Effects of Benzoxazole Derivative PO-296 on Dendritic Cell Differentiation and Related Indexes

ZHU Xinying¹, YANG Miao², XU Can², PENG Xu¹, DUAN Jiayi¹, LIU Dan¹, WANG Yantang^{1,3} (1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 2. School of Clinical Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China; 3. Dept. of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of benzoxazole derivative 2-(chlorobenzoxazolyl-2-yl)-4, 5, 6, 7-tetrahydro-dihydro-indazole-3-ol (PO-296) on the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells(DC) and their related indexes as specific surface molecules and inflammatory cytokines. METHODS: Bone marrow nuclear cells of mice were isolated, and immature DC (imDC) was obtained by recombinant mice granulocyte macrophage colony-stimulating factor and recombinant mice IL-4. After pretreated with low-dose, medium-dose and high-dose (1, 5, 25 μmol/L) of PO-296, DC was obtained by lipopolysaccharide induction. Flow cytometry was used to detect the expression of DC specific surface molecules [i.e. the proportion of class II major histocompatibility complex (MHC II), CD80, CD86 and chemokine receptor 7 (CCR7) positive cells], imDC phagocytosis (i.e. the proportion of dextran positive cells) and DC survival (i.e. the proportion of survival cells). ELISA method was used to detect the levels of inflammatory cytokines (IL-10, IL-12 and TNF-α) in cell culture medium. RESULTS: Compared with imDC group, the proportion of MHC II, CD80 and CD86 positive cells were increased significantly in non-loading group ($P < 0.05$). Compared with non-loading group, the levels of IL-10 in cell culture medium were increased significantly in PO-296 groups. The proportions of MHC II, CD80 and CD86 positive cells in positive group and PO-296 medium-dose and high-dose groups as well as the levels of IL-12 and TNF-α in cell culture medium in administration groups were decreased significantly ($P < 0.05$). There was no statistical significance in the proportion of CCR7 positive cells, dextran positive cells and survival cells in administration groups, compared with non-loading group ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: PO-296 has no obvious cytotoxicity and does not affect the phagocytic function of imDC. At the same time, the compound can inhibit the expression of DC specific surface

molecules and regulate the secretion of inflammatory cytokines.

KEYWORDS PO-296; Dendritic cell; Specific surface molecules; Inflammatory cytokines; Phagocytic function; Cytotoxicity

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81871300); 四川省省级科技计划项目(No.2018JY0481)

* 硕士研究生。研究方向: 临床药物评价。电话: 028-62739161。E-mail: zhuxinying06@163.com

通信作者: 副研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 免疫药理学。电话: 028-62739161。E-mail: yantang-wang@163.com

树突状细胞(Dendritic cell, DC)作为机体内功能最强的抗原呈递细胞,在表型和功能上均具有较强的可塑性,可直接活化幼稚T细胞,在诱导T细胞免疫应答或免疫耐受的过程中发挥了十分重要的作用^[1-2]。有研究指出,DC表型、成熟度及功能的异质性是免疫反应平衡和免疫耐受的重要因素,其中成熟DC可表达高水平的共刺激分子,分泌T细胞刺激因子[如白细胞介素6(IL-6)、IL-12、IL-15、IL-18等],选择性激活相应受者的T细胞,从而诱发免疫反应;而未成熟DC(imDC)则可表达低水平的共刺激分子,通过诱导T细胞无能、免疫偏离、T细胞凋亡或者调节性T细胞(Treg细胞)产生等途径而形成免疫耐受^[3]。药物诱导的调节性树突状细胞(DCreg)更为稳定,不会因脂多糖(LPS)等抗原刺激而分化成熟,其经典表型和功能与imDC相似,可正常表达DC特征性抗原CD11c,而低水平表达共刺激分子;同时,其炎症细胞因子IL-12、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)分泌水平降低,抗炎细胞因子IL-10分泌水平升高^[4-5]。如,干扰素 β (IFN- β)可干预体外培养的imDC分化成熟,抑制或减少其IL-12、干扰素 γ (IFN- γ)的分泌,进而对辅助性T细胞1型(Th1)的极化起到负向调控作用;同时,IFN- β 可刺激Treg细胞的增殖,该作用也是其对多发性硬化症有效的原因之一^[6]。目前,国内外研究团队以过继转移自身抗原负载的DCreg干预胶原诱导的关节炎、实验性自身免疫性脑脊髓炎以及炎性肠病等自身免疫性疾病动物模型为对象进行相关研究,发现DCreg可明显减轻上述模型动物体内炎症细胞浸润程度以及炎症活动度^[7-10]。由于干预自身免疫性疾病动物模型所需DCreg的用量较大(约为 1×10^7 个/只)^[11],因此建立获取大量DCreg的有效方法无疑是其临床应用的重要前提和基础。本课题组前期通过对一系列小分子化合物的高通量筛选发现,苯并噁唑啉生物2-(氯苯并噁唑啉基-2基)-4,5,6,7-四氢-二氢-吡啶-3-醇(PO-296,结构式见图1)可经Janus激酶3/信号转导及转录激活因子5(Jak3/Stat5)信号通路显著抑制活化的人T细胞增殖^[12]。而近期研究发现,Jak3是DC成熟分化的关键调控因子,该因子缺陷的DC将无法在混合淋巴细胞反应中有效刺激抗原特异性T细胞的增殖^[13-14]。因此,本研究拟初步探讨PO-296是否可经Jak3/Stat5信号通路调控DC成熟分化、诱导DCreg的产生;同时,建立骨髓来源的DC体外诱导模型,在予以不同剂量的PO-296预处理后,检测其特异性表面分子[II类主要组织相容性复合物(MHC II)、CD80、CD86、趋化因子受体7(CCR7)]以及炎症细胞因子(IL-12、IL-10、TNF- α)的表达水平,以期后续PO-296诱导DCreg对自身免疫疾病动物模型的体内干预研究提供更为完善和可靠的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

ACEA NovoCyte型流式细胞仪[艾森生物(杭州)有

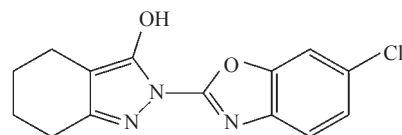


图1 PO-296的结构式

Fig 1 Structure of PO-296

限公司]; PowerWave XS型全波长酶标仪(美国BioTek公司); 371型CO₂培养箱、Sorvall型台式高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司); IX71型倒置显微镜(日本Olympus公司); Mini MACS™型磁珠分选系统(德国Miltenyi公司); 5424R型小型高速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

PO-296原料药(地奥集团成都药业股份有限公司,批号:1711012-296,纯度:≥98%); 托法替尼对照品(阳性对照,美国Sigma公司,批号:PZ0017,纯度:≥98%); 重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素4(rmIL-4)(美国Peprotech公司,批号分别为315-03、214-14); LPS、异硫氰酸荧光素(FITC)-葡聚糖(美国Sigma公司,批号分别为L4516、53379); 链霉亲和素微球(德国Miltenyi公司,批号:130-048-102); 荧光素标记的大鼠抗小鼠流式检测抗体Brilliant violet 421-MHC II (BV 421-MHC II)、FITC-CD80、藻红蛋白(PE)-CD86、Alexa Fluor 647-CCR7以及红细胞裂解液(美国BioLegend公司,批号分别为107632、561954、553692、560766、420301); 生物素(Biotin)-CD11c染色试剂、IL-10试剂盒、7-氨基放线菌素(7AAD)/PE-膜联蛋白V(Annexin V)凋亡检测试剂盒(美国BD Pharmingen公司,批号分别为117303、555157、559763); IL-6、TNF- α 试剂盒(美国eBioscience公司,批号分别为BMS603-2、BMS607-3); RPMI 1640培养基(美国HyClone公司,批号:SH30809.01); 胎牛血清(澳大利亚Bovogen公司,批号:50615); 其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

1.3 动物

SPF级C57BL/6小鼠,雄性,6~8周龄,体质量21~23 g,由成都医学院SPF实验动物中心提供,动物使用许可证号:SYXK(川)2015-196。

2 方法

2.1 DC分离与培养

取雄性C57BL/6小鼠,以脱臼法处死,分离其双侧股骨,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)反复吹打,制得骨髓细胞悬液,经200目筛网滤过后,以 $300 \times g$ 离心5 min,弃去上清液,沉淀用红细胞裂解液裂解,计数后用含10%胎牛血清、20 ng/mL rmGM-CSF、10 ng/mL rmIL-4的RPMI 1640培养基(以下简称“完全培养基”)重悬,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,接种于100 mm平皿(接种体积:10 mL)内,置于37℃、5% CO₂培养箱(下同)中培养。于培养的第3、5天使用上述完全培养基进行半量换

液(即吸出原培养基5 mL,再加入新培养基5 mL)。于培养的第7天收集细胞,加入Biotin-CD11c染色,结合链霉亲和素微球后,借助磁珠分选系统筛选、纯化后得到CD11c阳性imDC(CD11c+imDC)(经流式细胞仪检测CD11c阳性细胞比例超过95%)。将上述经纯化的CD11c+imDC重悬于完全培养基中,以 1×10^6 个/mL的密度按1 mL/孔重新接种于24孔板中,用最终质量浓度为0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激24 h后,即得成熟DC(成熟DC在显微镜下呈现树突样特征,且经流式细胞仪检测其MHC II、CD80、CD86呈高表达)。

2.2 DC特异性表面分子检测

采用流式细胞术检测。取“2.1”项下经纯化的CD11c+imDC适量,以 1×10^6 个/mL的密度按1 mL/孔接种于24孔板中,将细胞随机分为imDC组、空载组、阳性组(托法替尼,1 $\mu\text{mol/L}$;剂量设置参考既往研究^[14],为最大安全、有效剂量)以及PO-296低、中、高剂量组(1、5、25 $\mu\text{mol/L}$;剂量设置参考本课题组前期预试验结果),每组设3个复孔。吸弃上清液,imDC组和空载组加入完全培养基1 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基1 mL。培养6 h后,除imDC组外,其余各组均加入最终质量浓度为0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激24 h。收集细胞,以300 \times g离心5 min后,弃去上清液,沉淀用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS 1 mL清洗,以300 \times g离心5 min,沉淀分别加入BV 421-MHC II、FITC-CD80、PE-CD86、Alexa Fluor 647-CCR7适量,于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS 1 mL清洗,以300 \times g离心5 min,弃去上清液。细胞用PBS 200 μL 重悬后,使用流式细胞仪检测MHC II、CD80、CD86和CCR7阳性细胞比例。上述试验重复3次,数据采用NovoExpress 1.3.0软件分析。

2.3 imDC吞噬功能检测

采用流式细胞术检测。取“2.1”项下经纯化的CD11c+imDC适量,以 1×10^6 个/mL的密度按1 mL/孔接种于24孔板中,将细胞随机分为空载组、阳性组以及PO-296低、中、高剂量组(剂量设置同“2.2”项),每组设3个复孔。吸弃上清液,空载组加入完全培养基1 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基1 mL。培养48 h后,各组均加入FITC-葡聚糖适量(使后者最终质量浓度为1 mg/mL),孵育60 min,经4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS清洗后,采用流式细胞仪检测imDC的抗原摄取能力(即其吞噬功能,以葡聚糖阳性细胞比例表示)。上述试验重复3次,数据采用NovoExpress 1.3.0软件分析。

2.4 DC存活情况检测

采用流式细胞术检测。取“2.1”项下经纯化的CD11c+imDC适量,以 1×10^6 个/mL的密度按1 mL/孔接种于24孔板中,按“2.3”项下方法分组、给药,培养6 h后,各组均加入最终质量浓度为0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激48 h。收集细胞,按照7AAD/PE-Annexin V凋亡检测试

剂盒说明书操作,采用流式细胞仪检测存活DC细胞的比例(即7AAD/PE-Annexin V双阴性活细胞的比例)。上述试验重复3次,数据采用NovoExpress 1.3.0软件分析。

2.5 DC培养液中炎症细胞因子水平检测

采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测。取“2.1”项下经纯化的CD11c+imDC适量,以 1×10^6 个/mL的密度按1 mL/孔接种于24孔板中,按“2.3”项下方法分组、给药,培养6 h后,各组均加入最终质量浓度为0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的LPS刺激24 h。收集细胞培养液,参照相关试剂盒说明书,采用ELISA法以全自动酶标仪检测各组细胞培养液中IL-10、IL-12、TNF- α 水平。上述试验重复3次。

2.6 统计学方法

采用Graphpad Prism 6.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用Dunnnett's *t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 PO-296对DC特异性表面分子表达的影响

与imDC组比较,空载组MHC II、CD80、CD86阳性细胞比例均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空载组比较,阳性组以及PO-296中、高剂量组MHC II、CD80、CD86阳性细胞比例均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而空载组CCR7阳性细胞比例与imDC组比较,PO-296低剂量组MHC II、CD80、CD86阳性细胞比例以及各给药组CCR7阳性细胞比例与空载组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见图2、表1。

3.2 PO-296对imDC吞噬功能及DC存活情况的影响

各给药组葡聚糖阳性细胞比例以及存活细胞比例与空载组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见图3、表2。

3.3 PO-296对DC炎症细胞因子水平的影响

与空载组比较,PO-296各剂量组细胞培养液中IL-10水平均显著升高,各给药组细胞培养液中IL-12、TNF- α 水平均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表3。

4 讨论

近年来,随着细胞免疫治疗在感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等领域的快速发展,DC已逐渐成为过继转移治疗研究的热点。因自身免疫性疾病相关的自身抗原尚不明确,在临床试验中DCreg不能负载有效的自身抗原,从而诱导自身抗原特异性T细胞耐受,因此无法重复DCreg对动物疾病模型的干预效果^[14,15]。而新近发现和鉴定的自身抗原(如寻常性天疱疮相关的Desmoglein-3;多发性硬化相关的B-crystallin、Anoctamin 2和KIR4.1等)为DCreg过继转移治疗自身免疫性疾病带来了新的希望^[16-17]。继往获取DCreg的主要手段包括免疫

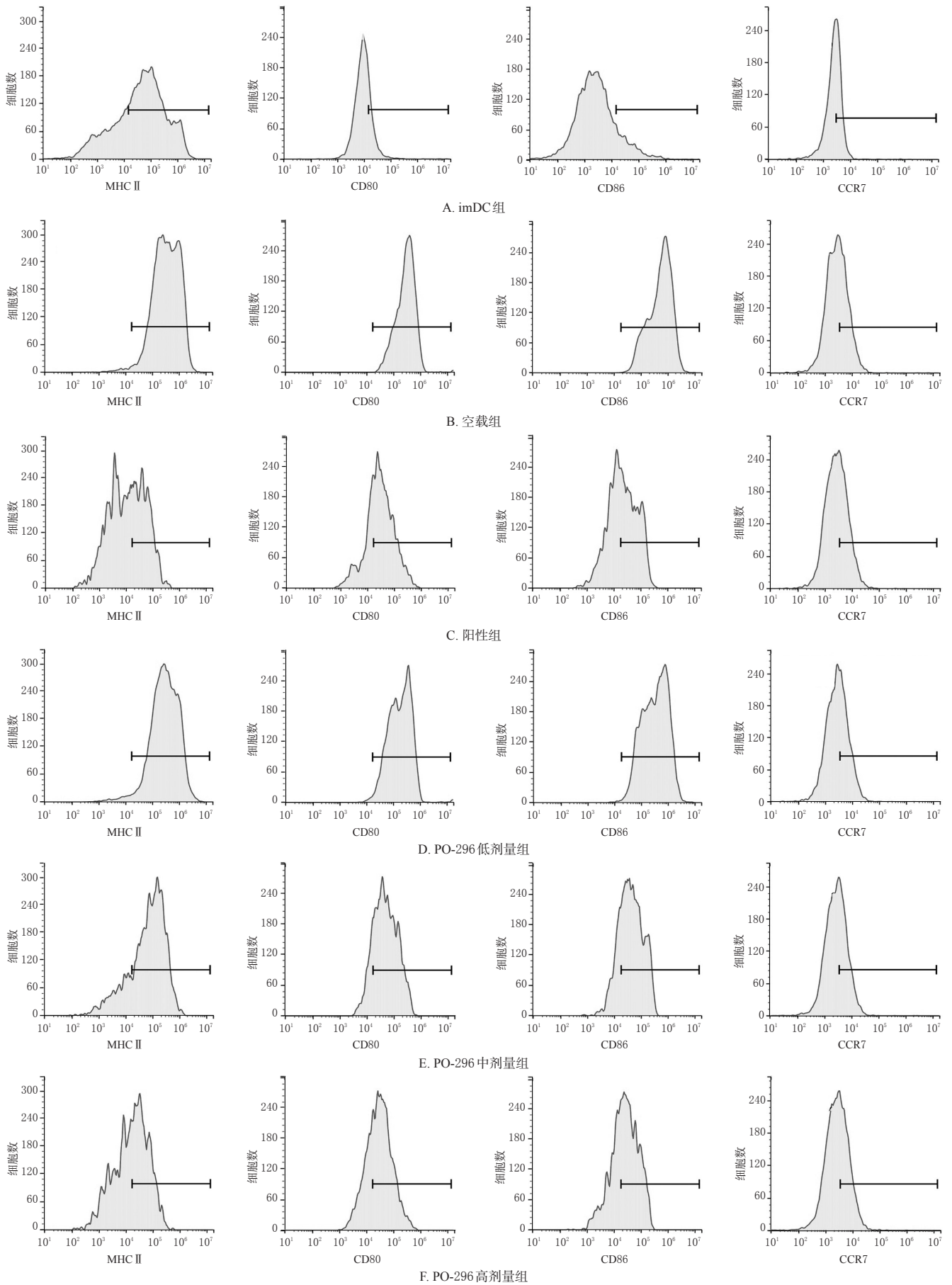


图2 PO-296对DC特异性表面分子表达影响的流式细胞图

Fig 2 Flow cytograms of the effects of PO-296 on the expression of DC specific surface molecules

表1 PO-296对DC特异性表面分子表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

Tab 1 Effects of PO-296 on the expression of DC specific surface molecules($\bar{x} \pm s$, $n=3$, %)

组别	MHC II 阳性细胞	CD80 阳性细胞	CD86 阳性细胞	CCR7 阳性细胞
imDC组	68.52 ± 1.25	24.68 ± 0.84	13.58 ± 1.12	41.89 ± 2.55
空载组	98.61 ± 2.85*	99.55 ± 3.85*	99.68 ± 0.29*	41.83 ± 1.25
阳性组	43.78 ± 4.45*	69.49 ± 3.02*	55.01 ± 3.56*	40.40 ± 1.86
PO-296低剂量组	97.68 ± 2.32	97.01 ± 3.56	99.18 ± 0.56	41.23 ± 2.56
PO-296中剂量组	78.98 ± 3.65*	85.08 ± 2.45*	77.84 ± 2.98*	40.98 ± 1.85
PO-296高剂量组	51.48 ± 5.58*	69.33 ± 3.96*	61.92 ± 3.56*	41.23 ± 1.96

注:与imDC组比较, * $P < 0.05$;与空载组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. imDC group, * $P < 0.05$; vs. non-loading group, # $P < 0.05$

抑制剂类药物诱导^[18]、细胞凋亡分子表达^[19]、细胞因子培养体系建立^[20]以及基因工程技术等^[21],但现有临床试验的某些免疫抑制类诱导药物(如阿司匹林、*N*-乙酰半胱氨酸以及环孢素A等)诱导的DCreg特异性较差,细胞毒性较大,且上述方法存在研究成本较高、周期较长等缺点,导致其后续深入研究受到了一定的限制^[22]。因此,亟需寻找安全、高效的DCreg新型小分子诱导药物。

本课题组前期对抑制T细胞增殖的小分子化合物进行了筛选,发现了一系列具有抑制活性的苯并噁唑衍生物。其中,PO-296可经Jak3/Stat5信号通路有效抑制人T细胞增殖,是一种新型的免疫抑制剂^[12]。而近期国外研究发现,Jak3在DC的分化成熟过程中非常重要,当胞外配体与DC膜受体结合后可激活Jak3,继而引起Stat5的酪氨酸磷酸化,启动下游的一系列炎症细胞因子(如IL-10、IL-12、TNF- α)和共刺激分子(如,即特异性表面分子MHC II、CD80和CD86)的转录,从而发挥对T细胞增殖的抑制作用^[13-14]。因此,本课题组推测PO-296有可能经Jak3/Stat5信号通路调控DC的成熟分化,并诱导免疫耐受的发生。托法替尼由美国Pfizer公司研发,并于2012年11月获美国FDA批准上市,对Jak3/Stat5信号通路具有明显的抑制作用,故本研究将其作为阳性对照药物^[14]。

本研究以骨髓来源的DC体外诱导模型为对象,初步探讨了经PO-296预处理后DC特异性表面分子MHC II、CD80、CD86、CCR7以及炎症细胞因子IL-10、IL-12、TNF- α 的表达情况。其中,MHC II是DC向辅助T细胞呈递自身抗原肽的关键分子,CD80、CD86则是DC活化自反应性T细胞的重要共刺激分子,三者的表达水平在DC成熟分化后均明显升高,是DC成熟分化的重要标志物^[4]。CCR7是成熟DC和imDC重要的趋化因子受体,与DC的归巢以及其向非淋巴组织的迁移密切相关^[3]。此外,成熟DC通过分泌IL-12、TNF- α 等炎症细胞因子来调控Th1的分化以及自身免疫性炎症反应的发生^[6]。而IL-10则是重要的免疫负调控因子,可抑制单核巨噬细胞炎症细胞因子的分泌以及自身免疫性T细胞的增殖活化^[23]。本研究结果显示,空载组MHC II、CD80、CD86

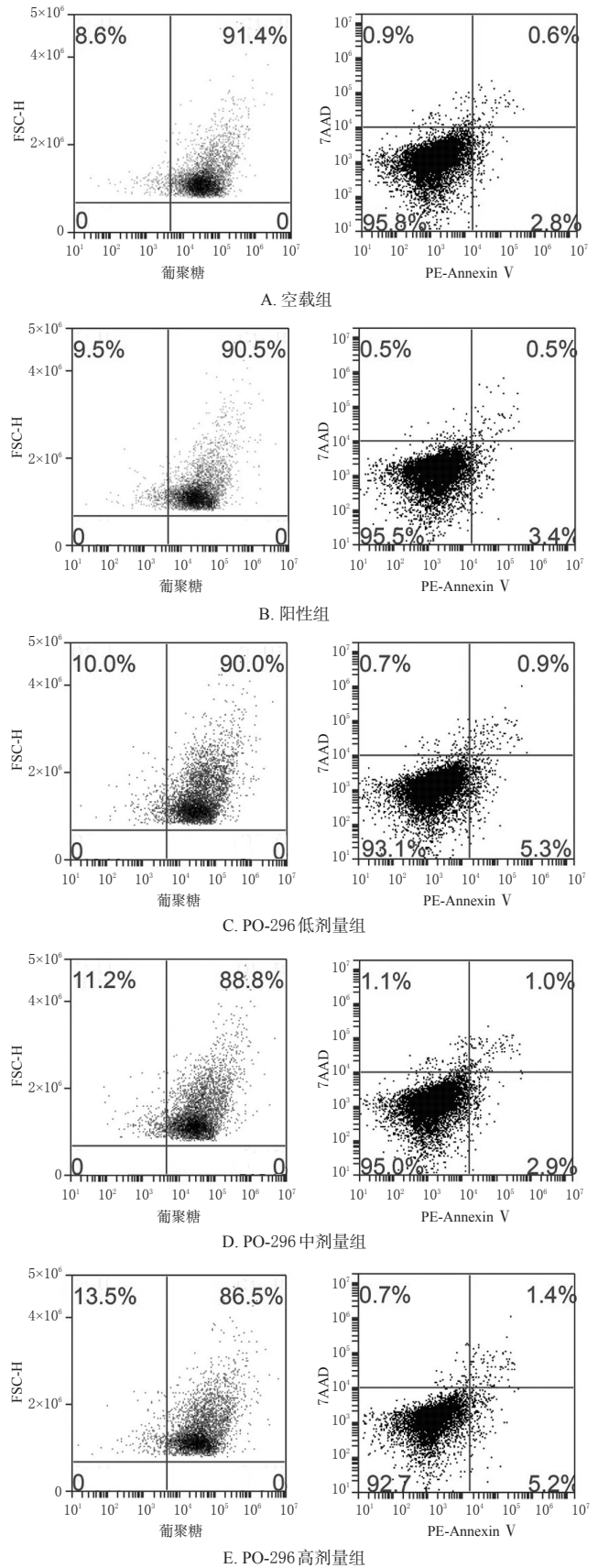


图3 PO-296对imDC吞噬功能及DC存活情况影响的流式细胞图

Fig 3 Flow cytograms of the effects of PO-296 on imDC phagocytic function and DC survival

表2 PO-296对imDC吞噬功能及DC存活情况的影响
($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Effects of PO-296 on imDC phagocytic function and DC survival($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	葡聚糖阳性细胞比例	存活细胞比例
空载组	91.12±2.89	95.16±3.03
阳性组	90.53±1.46	95.54±1.18
PO-296低剂量组	90.04±0.79	93.09±1.16
PO-296中剂量组	88.82±1.59	95.52±1.83
PO-296高剂量组	87.85±3.70	93.77±3.45

表3 PO-296对DC炎症细胞因子水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

Tab 3 Effects of PO-296 on DC inflammatory cytokines($\bar{x} \pm s, n=3, \text{pg/mL}$)

组别	IL-10	IL-12	TNF- α
空载组	468.22±20.94	1 230.04±86.34	3 852.46±298.39
阳性组	508.18±20.13	232.21±26.26*	1 804.77±189.58*
PO-296低剂量组	580.49±68.78*	900.54±51.33*	3 101.31±102.10*
PO-296中剂量组	689.01±46.81*	421.19±92.91*	2 400.41±75.44*
PO-296高剂量组	890.04±72.78*	292.24±46.31*	2 004.78±189.62*

注:与空载组比较,* $P<0.05$

Note: vs. non-loading group,* $P<0.05$

阳性细胞比例均较imDC显著升高;经药物预处理后,PO-296各剂量组细胞培养液中IL-10水平均较空载组显著升高,阳性组以及PO-296中、高剂量组细胞MHC II、CD80、CD86阳性细胞比例以及各给药组细胞培养液中IL-12、TNF- α 均较空载组显著降低;而各给药组CCR7阳性细胞比例均未见显著差异。这提示该化合物诱导的DC呈现出经典的DCreg表型^[4-5],且所得DCreg在抗原呈递及共刺激作用明显增强的同时,其趋化因子受体的表达并未受到明显影响,该DCreg可正常趋化转移至炎症组织以发挥免疫调控作用^[3]。

本研究还考察了PO-296对imDC吞噬功能(imDC表达低水平的共刺激因子,刺激T细胞免疫应答的能力较低,但具有极强的抗原吞噬能力,因此吞噬功能的考察主要以imDC为主^[3])及DC存活情况的影响。结果显示,经不同剂量PO-296预处理后,DC葡聚糖阳性细胞比例以及存活细胞比例与空载组比较差异均无统计学意义。这提示不同剂量的PO-296不会影响imDC的吞噬功能,且无明显细胞毒性,证实PO-296对DC成熟分化的干预作用与药物影响DC抗原摄取和细胞毒性无关。

综上所述,苯并噁唑衍生物PO-296无明显的细胞毒性,亦不影响imDC的吞噬功能,同时其可抑制特异性表面分子的表达,调控炎症细胞因子的分泌,继而诱导DCreg的形成。这一发现为PO-296诱导的DCreg在负载自身抗原后对自身免疫性疾病动物模型的干预研究提供了实验依据。未来本课题组将深入探讨PO-296诱导的DCreg干预自身免疫性疾病发生发展的过程,以及其免疫调控作用的具体机制,为其在免疫耐受以及自身免疫性疾病治疗中的应用奠定基础。

参考文献

- [1] SOZZANI S, DEL PRETE A, BOSISIO D. Dendritic cell recruitment and activation in autoimmunity[J]. *J Autoimmun*, 2017. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.07.012.
- [2] HUBER A, DAMMEIJER F, AERTS JGJV, et al. Current state of dendritic cell-based immunotherapy: opportunities for in vitro antigen loading of different DC subsets? [J]. *Front Immunol*, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02804.
- [3] BU N, WU HQ, ZHANG GL, et al. Immature dendritic cell exosomes suppress experimental autoimmune myasthenia gravis[J]. *J Neuroimmunol*, 2015. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2015.04.009.
- [4] RAÍCH-REGUÉ D, GLANCY M, THOMSON AW. Regulatory dendritic cell therapy: from rodents to clinical application[J]. *Immunol Lett*, 2014, 161(2): 216-221.
- [5] MASCARELL L, AIROUCHE S, BERJONT N, et al. The regulatory dendritic cell marker C1q is a potent inhibitor of allergic inflammation[J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(3): 695-704.
- [6] CHEN M, CHEN G, DENG S, et al. IFN- β induces the proliferation of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells through upregulation of GITRL on dendritic cells in the treatment of multiple sclerosis[J]. *J Neuroimmunol*, 2012. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2011.10.014.
- [7] JAUREGUI-AMEZAGA A, Cabezón R, Ramírez-Morros A, et al. Intraperitoneal administration of autologous tolerogenic dendritic cells for refractory Crohn's disease: a phase I study[J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9(12): 1071-1078.
- [8] STOOP JN, HARRY RA, VON DELWIG A, et al. Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(12): 3656-3665.
- [9] GROSS CC, JONULEIT H, WIENDL H. Fulfilling the dream: tolerogenic dendritic cells to treat multiple sclerosis[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(3): 569-572.
- [10] NING B, WEI J, ZHANG A, et al. Antigen-specific tolerogenic dendritic cells ameliorate the severity of murine collagen-induced arthritis[J]. *PLoS One*, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0131152.
- [11] PRICE S. Therapeutic effects of tolerogenic dendritic cells [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2010. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.184.
- [12] LUO XY, ZHOU H, WANG SY, et al. A benzoxazole derivative PO-296 inhibits T lymphocyte proliferation by the JAK3/STAT5 signal pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9193-9202.
- [13] RIVAS-CAICEDO A, SOLDEVILA G, FORTOUL TI, et al. Jak3 is involved in dendritic cell maturation and CCR7-dependent migration[J]. *PLoS One*, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007066.

壮通饮对冠心病模型大鼠心功能及血管舒缩功能的影响^Δ

张世田^{1*}, 庞路路², 唐汉庆^{1#}, 黄小珊², 冯悦², 黄岑汉¹(1.右江民族医学院基础医学院, 广西百色 533000; 2.广西中医药大学基础医学院, 南宁 530001)

中图分类号 R289.5; R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)18-2480-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.18.06

摘要 目的:观察壮通饮水提物对冠心病(CHD)模型大鼠心功能及血管舒缩功能的影响及其可能机制。方法:将SD大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组、阳性组(复方丹参滴丸, 0.08 g/kg)以及壮通饮水提物低、中、高剂量组(6.8、13.6、27.2 g/kg, 以水提物浸膏质量计), 每组10只。除对照组(不手术)和假手术组(只开胸不结扎)外, 其余各组大鼠均通过结扎左心室回旋支末梢建立CHD模型。造模1周后, 对照组、假手术组和模型组大鼠均灌胃等体积水, 各给药组大鼠均灌胃相应药物; 每日1次, 连续4周。末次给药2 h后, 检测各组大鼠心功能指标[左室舒张末期容积(LVEDV)、左室收缩末期容积(LVESV)、每搏量(SV)、左室射血分数(LVEF)], 采用酶联免疫吸附测定法检测其心肌组织炎症因子[C反应蛋白(CRP)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、干扰素 γ (IFN- γ)]和内皮素1(ET-1)水平, 采用苏木精-伊红染色法观察其心肌组织形态学特征。结果:对照组和假手术组大鼠心肌纤维结构清晰、排列整齐, 两组大鼠各项指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较, 模型组大鼠心肌纤维排列紊乱, 可见断裂、溶解、坏死等现象, 并伴有炎症细胞浸润, 其LVEDV、LVESV以及CRP、IL-1 β 、ET-1、IFN- γ 水平均显著升高, SV、LVEF均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠上述症状均有不同程度的改善, 其中阳性组大鼠LVEDV、LVESV和CRP、IL-1 β 、ET-1、IFN- γ 水平, 壮通饮水提物中、高剂量组大鼠LVEDV以及壮通饮水提物各剂量组大鼠LVESV和CRP、IL-1 β 、ET-1、IFN- γ 水平均显著降低, 阳性组大鼠SV、LVEF, 壮通饮水提物各剂量组大鼠SV以及壮通饮水提物中、高剂量组大鼠LVEF均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:壮通饮水提物可通过作用于炎症环节而降低ET-1水平, 从而改善CHD模型大鼠的血管舒缩功能, 恢复其心肌组织血液供应, 改善其心功能。

关键词 壮通饮; 水提物; 冠心病; 心功能; 血管舒缩功能; 炎症因子; 内皮素1; 大鼠

- [14] ZHOU Y, LENG X, LUO S, et al. Tolerogenic dendritic cells generated with tofacitinib ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis through modulation of Th17/treg balance[J]. *J Immunol Res*, 2016. DOI: 10.1155/2016/5021537.
- [15] KHAN S, GREENBERG JD, BHARDWAJ N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2009, 5(10): 566-571.
- [16] BRICKSHAWANA A, HINSON SR, ROMERO MF, et al. Investigation of the KIR4.1 potassium channel as a putative antigen in patients with multiple sclerosis: a comparative study[J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(8): 795-806.
- [17] ELLEBRECHT CT, BHOJ VG, NACE A, et al. Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease[J]. *Science*, 2016, 353(6 295): 179-184.
- [18] HACKSTEIN H, THOMSON AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(1): 24-34.
- [19] BUONOCORE S, FLAMAND V, GOLDMAN M, et al. Bone marrow-derived immature dendritic cells prime in vivo alloreactive T cells for interleukin-4-dependent rejection of major histocompatibility complex class II antigen-disparate cardiac allograft[J]. *Transplantation*, 2003, 75(3): 407-413.
- [20] GAO J, WANG X, WANG Y, et al. Murine sertoli cells promote the development of tolerogenic dendritic cells: a pivotal role of galectin-1[J]. *Immunology*, 2016, 148(3): 253-265.
- [21] ROHN TA, BOES M, WOLTERS D, et al. Upregulation of the CLIP self peptide on mature dendritic cells antagonizes T helper type 1 polarization[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(9): 909-818.
- [22] YOSHIMURA S, BONDESON J, BRENNAN FM, et al. Role of NF- κ B in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI[J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(6): 1883-1893.
- [23] ZHOU Y, LENG X, LI H, et al. Tolerogenic dendritic cells induced by BD750 ameliorate proinflammatory T cell responses and experimental autoimmune encephalitis in mice[J]. *Mol Med*, 2017. DOI: 10.2119/molmed.2016.00110.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460658)

* 主治医师, 硕士。研究方向:冠心病中西医结合治疗的基础与临床。电话:0776-2802593。E-mail: 93625430@qq.com

通信作者:教授, 博士。研究方向:民族医药与中西医结合基础。电话:0776-2849479。E-mail: phdtanghanqing@163.com

(收稿日期:2019-01-07 修回日期:2019-06-14)

(编辑:张元媛)