

恒河猴 IL-4 与变异 IL-4 促进外周血单核细胞向树突状细胞转化功能的比较

袁竹青¹, 郭海萍¹, 莫薇¹, 麦璟莹¹, 吴忠道², 余新炳²

(1.广州医学院微生物学与免疫学教研室, 广东 广州 510182; 2. 中山大学中山医学院病原生物学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】比较重组的恒河猴 IL-4 与变异 IL-4 在促进外周血单核细胞向树突状细胞转化方面功能的异同。【方法】利用葡聚糖-泛影葡胺梯度离心法分离恒河猴外周血单个核细胞, 阴性筛选非 CD3⁺细胞, 随后贴壁分离外周血单核细胞并进行流式细胞技术确定筛选结果。将所分离的外周血单核细胞分为阴性对照组, IL-4+GM-CSF 组和 vIL-4+GM-CSF 组进行体外培养, 收集细胞并表面染色 CD14、CD1a、CD11c 和 CD83 进行流式细胞分析。【结果】利用三步分离的方法得到了纯度达 90% 的未激活的外周血单核细胞。培养后的细胞进行流式分析, 结果提示与阴性对照组相比, IL-4+GM-CSF 组和 vIL-4+GM-CSF 组细胞的 CD14 表达明显下降, 而 CD1a、CD11c 和 CD83 表达明显上调, 两实验组间无差别。【结论】与 IL-4 相同, vIL-4 亦能促进外周血单核细胞转化为树突状细胞。

关键词: 恒河猴, 变异 IL-4, 外周血单核细胞, 树突状细胞

中图分类号: R392 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)03-0311-05

Compare Effect of *Macaca Mulatta* IL-4 and Variant IL-4 on Transforming Peripheral Blood Monocytes to Dendritic Cells

YUAN Zhu-qing¹, GUO Hai-ping¹, MO Wei¹, MAI Jing-ying¹, WU Zhong-dao², YU Xin-bing²

(1.Department of Microbiology and Immunology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China; 2. Department of Parasitology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To compare effect of *Macaca mulatta* IL-4 and variant IL-4 (vIL-4) on transforming peripheral blood monocytes to dendritic cells. 【Methods】 *Macaca mulatta* PBMCs were isolated by Ficoll/Hypaque density gradient centrifugation, then magnetic activated cell sorter (MACS) CD3 MicroBead Kit (non-human primate) was used to negatively selected non-CD3⁺ cells, after that, peripheral blood monocytes were separated by attaching to plate wall and analyzed by flow cytometry to identify. Monocyte enriched cells were cultured by grouping as medium alone, IL-4+GM-CSF and vIL-4+GM-CSF. Cells were collected and surface marked with CD14, CD1a, CD11c, and CD83 then analyzed by flow cytometry. 【Result】 Up to 90% inactive peripheral blood monocytes were separated by the three steps used. Data of flow cytometry for cultured cells showed that compared to negative control group, CD14 expression from both IL-4+GM-CSF group and vIL-4+GM-CSF group were suppressed, but CD1a, CD11c, and CD83 markers were distinctly up-expressed, and no significant difference became obvious between those two groups. 【Conclusion】 Same with IL-4, vIL-4 transformed peripheral blood monocytes to dendritic cells.

Key words: *Macaca mulatta*, vIL-4, peripheral blood monocyte, dendritic cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(3): 311-315]

IL-4 是 Th2 类细胞因子的代表, 最初是从鼠胸腺瘤 EL-4 细胞株培养上清中发现并确定其可刺激 B 细胞的增殖, 因此也曾被称作 B 细胞刺激

因子^[1]。随后的研究发现它不仅作用于 B 细胞, 还影响 T 细胞、单核-巨噬细胞、肥大细胞等, 刺激它们的分化、成熟, 促进这些细胞的功能^[2-4], 更重

收稿日期: 2010-12-17

基金项目: 广州医学院博士启动基金(0106-LP51111); 广东省自然科学基金(845101820100993)

作者简介: 袁竹青, 医学博士, 研究方向为分子免疫学, E-mail: yuanbamboo@hotmail.com

要的是 IL-4 是维持机体免疫系统平衡的关键细胞因子^[5]。

树突状细胞(dendritic cells, DC)是免疫系统中最强的抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APCs),其最大的特点是能够显著刺激初始 T 细胞进行增殖因而被认为是机体免疫应答的始动者。由单核细胞转化的髓细胞系树突状细胞(myeloid DC)可表达髓细胞类抗原,激发 Th1 和 Th2 类反应,在固有和适应性免疫过程中均起重要作用^[6]。已确定,在粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)维持细胞生存的条件下,IL-4 可促进人类外周血单核细胞转化为髓系树突状细胞^[7]。我们已有的研究发现,少数 BCG 感染的恒河猴的 IL-4 序列发生了变异,产生的新蛋白中除含有原 IL-4 外显子的序列外还表达了其部分内含子的序列,是 IL-4 基因选择性 mRNA 剪接(alternative splicing of mRNA)的产物,因而被命名为变异 IL-4(variant IL-4, vIL-4)。初步证明 vIL-4 仅能与 IL-4 受体 α 链结合而不能与 IL-4 受体公用 γ 链结合;与 IL-4 不同, vIL-4 可刺激 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖并促进其分泌细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α , 在抗结核分枝杆菌感染中起重要作用,提示 vIL-4 的产生可能是宿主 (BCG 感染的恒河猴)主动性选择对抗细菌感染感染的结果^[8]。本研究的目的是比较恒河猴 vIL-4 与 IL-4 在促进外周血单核细胞向髓系 DC 转化功能方面的异同,进一步明确 vIL-4 在对抗结核分枝杆菌/BCG 感染中的作用。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

根据能与恒河猴交叉反应的鼠抗人单克隆抗体的信息选择相应克隆号的抗体 (<http://nhpreagents.bidmc.harvard.edu>):PE-标记鼠抗人 CD1a 单克隆抗体(克隆号 SK9),FITC-标记鼠抗人 CD83 单克隆抗体(克隆号 HB15e),APC-标记鼠抗人 CD11c 单克隆抗体(克隆号 S-HCL-3),PB-标记鼠抗人 CD14 单克隆抗体(克隆号 M5E2),APC-标记鼠抗人 CD3 单克隆抗体(克隆号 SP34-2),以上均为 BD Biosciences 公司产品。PE-标记鼠抗人 CD20 单克隆抗体(克隆号 LT20)为 Miltenyi Biotec Inc. 公司产品。Ficoll-Paque 分

离液产自 GE Healthcare 公司,灵长类 MACS CD3 MicroBead 试剂盒为 Miltenyi Biotec Inc. 公司产品,人重组 GM-CSF 购自 Sigma-aldrich 公司。

1.2 实验动物

恒河猴外周血由广东省昆虫研究所提供。

1.3 恒河猴外周血单核细胞的分离

1.3.1 外周血细胞培养液的制备 将胎牛血清于 65℃水浴 30 min 灭活,按 10%的比例加入到 RPMI 1 640 培养液中,抽滤除菌后 4℃保存。

1.3.2 葡聚糖-泛影葡胺(Ficoll-Paque)梯度离心法分离外周血单个核细胞 新鲜抽取的 10 mL 静脉血于 1 000 $\times g$ 离心 20 min,取中间白膜层重悬于 8 mL 培养液中,将混合液加到 4 mL Ficoll-Paque 分离液之上,1 000 $\times g$ 离心 20 min。取中间细胞层,重悬于 8 mL 培养液中,300 $\times g$ 离心 5 min。弃上清,细胞沉淀重悬于 5 mL 红细胞裂解液中,室温作用 10 min 后加入 10 mL 培养液,1 300 $\times g$ 离心 5 min。细胞沉淀重悬于 5 mL 培养液中。取 10 μ L 细胞悬液,按 1:1 与台盘蓝混合,显微镜下细胞计数。

1.3.3 灵长类 MACS CD3 MicroBead 试剂盒阴性筛选非 CD3 细胞 将新鲜分离的外周血单个核细胞用 MACS 分离缓冲液调整至 10^7 细胞/40 μ L,每 10^7 细胞中加入 10 μ L CD3-Biotin 标记的微磁珠混合均匀,4℃作用 10 min,随后再加入 30 μ L 分离缓冲液及 20 μ L 抗 Biotin 的微磁珠,混匀后 4℃作用 15 mins。用 1 mL 分离缓冲液洗涤细胞 2 次,细胞沉淀按 $10^8/500 \mu$ L 比例重悬于分离缓冲液中。将 LD 柱置于磁性分离架上,在柱中加入细胞悬液,收集流出的未标记的细胞。用 1 mL 分离缓冲液洗涤 LD 柱 3 次,同样收集流出的未标记的细胞,台盘蓝染色细胞计数。

1.3.4 贴壁分离外周血单核细胞 将用上述方法分离出的细胞调整至 $5 \times 10^6/mL$,0.5 mL/孔加入 6 孔平底细胞培养板,放置于 37℃,体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中 2 h;用室温培养液轻柔地冲洗掉未贴壁的细胞,随后用冰冻培养液剧烈冲洗并收集贴壁的细胞并计数。表面染色 APC-CD3、PE-CD20、PB-CD14 后进行流式细胞分析,确定单核细胞所占百分比。

1.4 细胞表面染色

细胞中加入 2 mL 染色洗液(PBS 中加入 50 mL/L 灭活的胎牛血清),300 $\times g$ 离心 5 min。弃上清,细

胞沉淀重悬于 200 μ L 洗液中,加入 5 μ L 荧光标记的鼠抗人单克隆抗体,混匀,室温作用 10 min。加入 2 mL 洗液,300 $\times g$ 离心 5 min,将细胞沉淀重悬于 2 mL 染色固定液中,300 $\times g$ 离心 5 min。细胞沉淀重悬于 200 μ L 染色固定液 (PBS 中加入 2% 的福尔马林),密封、避光 4 $^{\circ}$ C 保存,进行流式细胞分析。

1.5 恒河猴重组 IL-4 与 vIL-4 的获得

参照文献[8]的方法纯化、定量。

1.6 单核细胞转化树突状细胞实验

将所分离的单核细胞如下分 3 组:阴性对照组;IL-4 (10 ng)+GM-CSF (400U) 组和 vIL-4 (15ng)+GM-CSF(400 U)组,每组 4 孔,1 $\times 10^5$ 细胞/孔。培养 3 d 后进行表面染色;PB-CD14,PE-CD1a,APC-CD11c 及 FITC-CD83,并进行流式细胞分析。

1.7 流式细胞仪结果分析

利用 DakoCytomation 软件对流式细胞仪结果进行分析,以大细胞团射门。

1.8 统计学分析

利用 *t* 检验对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 恒河猴外周血单核细胞分离结果

利用本实验的方法,从外周血中分离得到了高比例的单核细胞,如图 1 所示,作为单核细胞标志的表面分子 CD14 的百分比达到 90%,基本无 T 细胞和 B 细胞的存在。

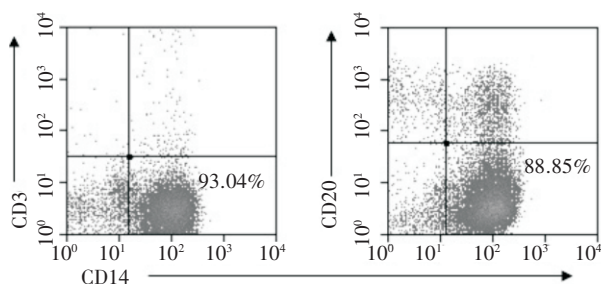


图 1 单核细胞纯化结果

Fig.1 Result of purified monocyte

Shown with CD3 cells, CD14 positive cells were 93.4% and with CD20 cells, CD14 positive cells were 88.85%.

2.2 恒河猴外周血单核细胞转化树突状细胞结果

本研究选择观察单核细胞特异性表面标志

CD14 以及树突状细胞(Dendritic Cell, DC)重要表面标志 CD1a、CD11c 和 CD83 在不同实验组中表达的差别。结果如图 2 所示,与仅含有培养液的阴性对照组相比,CD14 在两个实验组的表达均明显下降,从阴性对照组的 60%降至实验组的 13%和 18%;实验组 CD1a 的表达明显上升至 14%及 16%;CD11c 分子表达亦从阴性对照组的 1%上升至 21%和 14%;同时,另一个 DC 细胞的重要表面标志 CD83 的表达量也明显提高至 18%及 19%。统计学分析说明:与阴性对照组相比,两个实验组的差异数值均有意义($P < 0.05$)而实验组间的差异不具显著意义($P > 0.05$)。此结果显示,在 GM-CSF 维持细胞存活的情况下,IL-4 和 vIL-4 均可促进外周血来源的单核细胞表达树突状细胞的表面标志。

3 讨论

外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中主要为淋巴细胞(包括 T 细胞和 B 细胞),它们约占 90%,余下的为单核细胞及微量的 NK 细胞。单核细胞所占比例很小,并只在外周血存在很短的时间(12 ~ 24 h),因此得到高纯度的、未被激活并具有活性的单核细胞是本实验首先要解决的关键技术问题。

外周血中各有形成分的比重存在差异,因此用葡聚糖-泛影葡胺(Ficoll-hypaque)密度梯度离心的方法可分离得到较高纯度的单个核细胞,为分离外周血单核细胞的第一步。在利用磁激活细胞分选法(magnetic-activated cell sorter, MACS)进行分离时,考虑到本实验的目的是比较 IL-4 与 vIL-4 促进外周血单核细胞向 DC 转化的功能,因此必须保证单核细胞处于“原始”状态。如果选用 CD14 MicroBead 试剂盒阳性筛选单核细胞,则单核细胞很可能被抗体非特异性激活,而失去实验意义。针对此情况,本研究选用灵长类 MACS CD3 MicroBead 试剂盒阴性筛选非 CD3 细胞,即,去除了 T 细胞。随后利用单核细胞对玻璃表面有很强黏附能力的特性,采用贴壁的方法去除 B 细胞和 NK 细胞。利用本实验所设计的 3 步方法得到了满意的结果,单核细胞的比例高达 90%。

单核细胞表面高效表达 CD14 分子并且在单核细胞转变为巨噬细胞的过程中始终保持稳定表

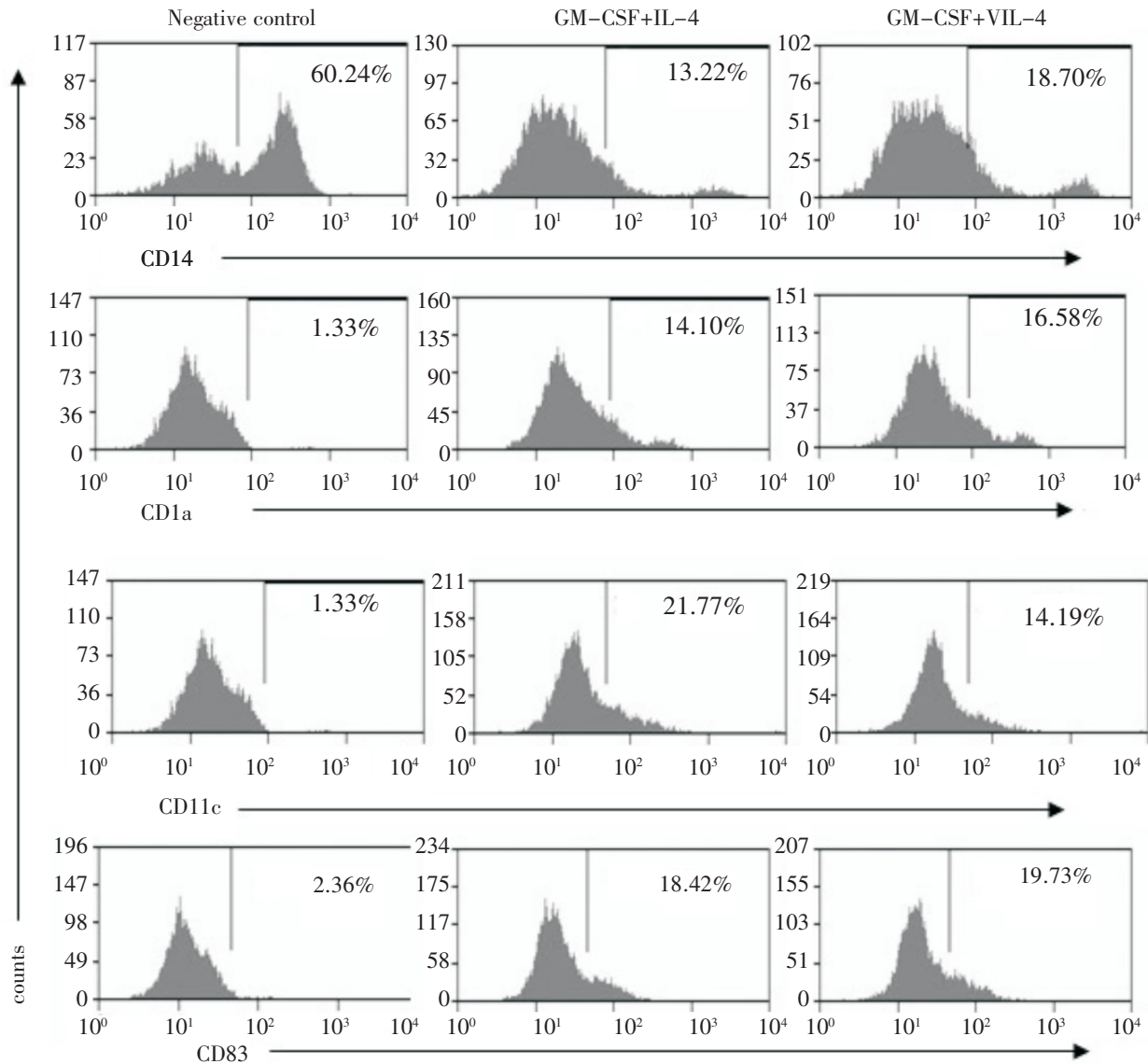


图 2 外周血单核细胞转化树突状细胞实验结果

Fig.2 Result of peripheral blood monocytes transforming to dendritic cell

Compared with negative control group, percentage of CD14 positive cells of GM-CSF +IL-4 group and GM-CSF +vIL-4 group decreased; percentage of CD1a, CD11c, CD83 positive cells all increased.

达,因而可作为单核细胞的标志^[9]。经 GM-CSF 和 IL-4 共培养后,人类外周血单核细胞可转化为髓系树突状细胞,主要表现为 CD14 分子表达的下调和 DC 主要特征性标志:CD1a、CD1c、CD83 等的上调,其中 IL-4 不仅能抑制单核细胞向巨噬细胞的转化从而产生更多的 DC,其本身也下调单核细胞 CD14 的表达,而 CD14 表达的下降是 IL-4 刺激单核细胞凋亡的表现,并且 CD1a、CD11c、CD83 等 DC 分子表达的上调也依赖于 IL-4 的作用^[10-11]。IL-4 功能的发挥是通过与靶细胞表面的 IL-4 受体结合而实现的。IL-4 受体为异源二聚体,有两种类

型: I 型和 II 型。I 型由 IL-4R α 链和公用 γ 链组成,其中 α 链以高亲和力与 IL-4 结合;公用 γ 链与 IL-4 的亲和力较低,它识别 IL-4 与 IL-4 受体 α 链结合的复合物,进一步提高两者间的结合并且是信号传导过程中必不可少的成分。II 型则由 IL-4R α 链和 IL-13R α 1 链组成。B 细胞,单核-巨噬细胞、肥大细胞同时表达 IL-4 受体 I 型和 II 型,而 T 细胞只表达 IL-4 受体 I 型。IL-4 可以与 I 型和 II 型受体结合而 IL-13 只能与 II 型受体作用,这是 IL-4 多细胞效应的基础也是它与 IL-13 功能有部分交叉的原因^[12]。

本实验观察了单核细胞的特异性表面标志 CD14, 以及树突状细胞的主要标志 CD1a、CD11c 和 CD83。与阴性对照组相比, CD14 的表达在两个实验组: GM-CFS+IL-4 和 GM-CFS+vIL-4 中均明显下调而 CD1a、CD11c 及 CD83 的表达则显著上调, 实验组间的微小差异不具有显著性。这一结果有二方面的意义: ①证实了在促进外周血单核细胞向树突状细胞转化方面, 恒河猴 IL-4 与人类 IL-4 具有相同的作用; ②与 IL-4 相同, vIL-4 也可促进外周血单核细胞向树突状细胞转化, 两者之间没有差异。已证明, vIL-4 也能与 IL-4 受体的 α 链结合, 但因为序列发生变异而可能无法与 IL-4 受体的公用 γ 链结合, 因此在刺激 $\gamma\delta$ T 细胞增值方面存在差异^[8]。有研究显示, IL-4 上调 DC 分子的表达是与 II 型受体结合的结果, 没有公用 γ 链的参与^[13-14], 本实验结果也支持这一结论。

结合本研究之前的结果, vIL-4 不仅可以促进 $\gamma\delta$ T 细胞的增值及其抗结核感染的功能^[8], 并且同样可促进外周血单核细胞向树突状细胞的转化, 而在对抗结核感染的细胞免疫应答中 DC 起重要的抗原呈递作用, 提示 vIL-4 可能从 $\gamma\delta$ T 细胞和树突状细胞两个方面发挥对抗结核或 BCG 感染的作用。

参考文献:

- [1] Howard M, Farrar J, Hilfiker M, et al. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2 [J]. *J Exp Med*, 1982, 155(3):914-923.
- [2] Banchereau J, Briere F, Galizzi JP, et al. Human interleukin 4 [J]. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1994, 9(1):43-53.
- [3] Speiran K, Bailey DP, Fernando J, et al. Endogenous suppression of mast cell development and survival by IL-4 and IL-10[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 85(5):826-836.
- [4] Gilmour J, Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells [J]. *Immunology*, 2008, 124(4):437-444.
- [5] Chapoval S, Dasgupta P, Dorsey NJ, et al. Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6 [J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 87(6):1011-1018.
- [6] León B, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity [J]. *Immunol Cell Biol*, 2008, 86(4):320-324.
- [7] Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, et al. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(10):1513-1537.
- [8] Zhu QY, Richard W, Yuyang L, et al. Tuberculosis-Induced Variant IL-4 mRNA Encodes a Cytokine Functioning As Growth Factor for (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphate-Specific V2V2 T Cells [J]. *J Immuno*, 2009, 182(2):811-819.
- [9] Ziegler HL, Ulevitch RJ. CD14: Cell surface receptor and differentiation marker [J]. *Immuno Today*, 1993, 14(3):121-125.
- [10] Egan BS, Abdolrasulnia R, Shepherd VL. IL-4 modulates transcriptional control of the mannose receptor in mouse FSDC dendritic cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 428(2):119-130.
- [11] Den DE, Grefte S, Huijs T, et al. Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2008, 180(6):3680-3688.
- [12] Wills KM, Finkelman FD. Untangling the complex web of IL-4 and IL-13 mediated signaling pathways [J]. *Sci Signal*, 2008, 1(51):pe55.
- [13] Ahn JS, Agrawal B. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells [J]. *Int Immunol*, 2005, 17(10):1337-1346.
- [14] Webb DC, Cai Y, Matthaei KI, et al. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4+ Th2 cell function [J]. *J Immunol*, 2007, 178(1):219-227.

(编辑 孙慧兰)