

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.014

· 临床研究 ·

黄芪多糖促进急性髓细胞白血病患者浆细胞样树突状细胞成熟

刘立民, 张彦明, 陆沐华, 孙雨梅, 赵广圣, 张兴霞, 崔红霞(徐州医学院附属淮安市第二人民医院血液科, 江苏淮安 223002)

[摘要] 目的: 研究黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)对急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)成熟的影响。方法: 收集淮安市第二人民医院2009年10月至2010年2月23例AML患者外周血单个核细胞, 流式细胞仪分选pDC。APS刺激pDC 5 d后, 流式细胞术检测pDC表型、光镜观察pDC的形态、扫描电镜观察pDC的超微结构; 不同质量浓度APS(0、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理24 h后, ELISA检测pDC上清中IFN- α 、TNF- α 和IL-6的水平。结果: 光镜及扫描电镜结果显示, APS可使pDC的突起增多、变长, 呈现成熟形态特征。APS可促进pDC的分化和成熟, 使CD11c、CD80、CD86阳性率明显提高, 并呈APS浓度依赖性($P < 0.05$)。APS还可浓度依赖性地上调pDC分泌IFN- α 、TNF- α 和IL-6($P < 0.05$)。结论: APS能够增强AML患者pDC的功能, 并促进其分化和成熟。

[关键词] 黄芪多糖; 急性髓细胞白血病; 浆细胞样树突状细胞; 免疫治疗

[中图分类号] R733.7; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0657-04

Astragalus polysaccharide promotes maturation of plasmacytoid dendritic cells of patients with acute myeloid leukemia

LIU Li-min, ZHANG Yan-ming, LU Shu-hua, SUN Yu-mei, ZHAO Guang-sheng, ZHANG Xing-xia, CUI Hong-xia (Department of Hematology, Second People's Hospital of Huai'an City, Xuzhou Medical University, Huai'an 223002, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of astragalus polysaccharide (APS) on maturation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from acute myeloid leukemia (AML) patients. **Methods:** Twenty-three AML patients from Second People's Hospital of Huai'an City (Oct. 2009 to Feb. 2010) were used in this study. Peripheral mononuclear cells were obtained and were sorted by flow cytometry. pDCs were then stimulated with APS for 5 days; their phenotypes were analyzed by flow cytometry, morphology was observed under light microscope, and ultrastructure was observed under scanning electron microscope. pDCs were treated with different concentrations of APS (0, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h, and IFN- α , TNF- α and IL-6 levels in pDC supernatants were examined by ELISA. **Results:** Light microscope and scanning electron microscope results showed that APS-treated pDCs displayed mature morphology with more and longer dendritic spines. APS promoted differentiation and maturation of pDC by increasing the positive rates of CD11c, CD80 and CD86 in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). APS also dose-dependently up-regulated IFN- α , TNF- α , and IL-6 secretion in pDCs ($P < 0.05$). **Conclusion:** APS can enhance the function of pDCs of AML patients, and promote their differentiation and maturation.

[Key words] astragalus polysaccharide; acute myeloid leukemia; plasmacytoid dendritic cell; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 657-660]

生物免疫治疗是目前白血病治疗领域中的研究热点, 寻找有效的免疫细胞和刺激佐剂从而增强其抗肿瘤效应是亟待需要解决的重要问题之一。浆细胞样树突状细胞(plasmacytoid dendritic cell, pDC)是体内最主要的IFN- α 产生细胞, 其表面表达Toll样受体(Toll like receptor, TLR)7、9(TLR7, TLR9), 在病毒(如HSV)、细菌、CpG-DNA刺激后24 h可产

生大量IFN- α , 同时还产生一定数量的TNF- α 、IL-6, 然后pDC逐渐成熟, 向树突状细胞(dendritic cell, DC)分化。pDC紧密联系着固有免疫和适应性免

[作者简介] 刘立民(1977-), 男, 江苏省徐州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事血液肿瘤生物免疫治疗方面的研究

[通信作者] 刘立民(LIU Li-min, corresponding author), E-mail: liminliu2006@163.com

疫,在机体免疫反应中发挥着重要作用^[1-2]。急性髓细胞白血病(acute myelogenous leukemia, AML)是一种发生于造血干细胞的恶性克隆性疾病,疾病的复发与耐药以及微小残留病(minimal residual disease, MRD)的清除是治疗中的难点,IFN- α 在逆转 AML 的复发和耐药方面具有一定作用^[3]。黄芪多糖(as-tragalus polysaccharide, APS)是黄芪的主要有效成分之一,具有调节免疫、抗肿瘤、抗氧化、保护血管等功能^[4-6]。但是有关 APS 对 AML 患者 pDC 功能及成熟的影响目前尚无报道。本实验研究 APS 对 AML 患者外周血来源的 pDC 功能及成熟的影响,为以 pDC 为基础的白血病免疫治疗寻找新的免疫佐剂。

1 材料与方法

1.1 实验对象

急性髓细胞白血病外周血单个核细胞取自徐州医学院附属淮安第二人民医院血液科 2009 年 10 月至 2010 年 2 月收治的 23 例缓解期 AML 患者,其中 M1 2 例、M2 7 例、M3 4 例、M4 3 例、M5 6 例、M6 1 例;男 13 例,女 10 例;年龄 15 ~ 62 岁,中位年龄 33 岁。所有患者均签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

APS 购自美国泛华公司(生产批号 No. 091021)。RPMI 1640 为 Hyclone 公司产品,胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司产品,CD4-FITC、CD123-PE、BDCA-2-APC 单抗、MHC II (I-A/I-E)-PE、CD11c-FITC、CD80-PeCy5、CD86-APC 单克隆抗体购自 BD 公司,IFN- α 、TNF- α 、IL-6 的 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。流式细胞仪购自 BD 公司。

1.3 pDC 细胞的分选和 APS 刺激

外周血单个核细胞(PBMC)分离:采集 AML 患者外周血 20 ml(40 μ l/ml 肝素抗凝),经密度梯度离心(2 000 \times g, 20 min),收集单个核细胞(AML-PBMC),保存于 -196 $^{\circ}$ C 液氮中备用。pDC 分选:常规复苏冻存的 PBMC,加入适量 CD4-FITC、CD123-PE、BDCA-2-APC 单抗,用流式细胞仪从中分选出 pDC。分选出的 pDC 纯度为 95.8%,存活率为 96%。APS 刺激 pDC 细胞:将分选的 pDC 调整密度为 1 \times 10⁴/ml,接种于 24 孔平底培养板(1 ml/孔),分别向各组加入终质量浓度为 0、50、100、200 μ g/ml 的 APS,在 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度、5% CO₂ 孵箱中共孵育,24 h 后收集上清液, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.4 光镜和电镜观察 pDC 形态的变化

收集 APS 刺激 5 d 的不同质量浓度 APS 组 pDC 细胞,经瑞氏 - 吉姆萨染色,光镜下进行 pDC 形态学观察。经过常规扫描电镜制样流程,最后在扫描电镜(日本电子公司 JSM-6380Lv)下观察。

1.5 ELISA 法检测 pDC IFN- α 、TNF- α 、IL-6 的表达

测定不同质量浓度 APS 组 IFN- α 、TNF- α 、IL-6 水平,具体实验步骤按 ELISA 检测试剂盒说明书进行,显色后即刻用酶标仪检测 450 nm 波长的光密度 D 值,根据标准曲线计算 IFN- α 、IL-6、TNF- α 含量。

1.6 流式细胞术检测 pDC 的表型

收集 APS 刺激 5 d 的不同质量浓度 APS 组 pDC 细胞,用 FACS 缓冲液(含 2% FCS 和 0.1% 叠氮钠的 PBS)洗 2 遍,于 4 $^{\circ}$ C 下用 10% 的羊血清封闭细胞表面抗体 15 min,调整细胞密度至 1 \times 10³/ml,取 100 μ l 细胞悬液,加入 MHC II (I-A/I-E)-PE、CD11c-FITC、CD80-PeCy5、CD86-APC 单克隆抗体各 20 μ l,于 4 $^{\circ}$ C 下温育 30 min 后,行流式细胞术检测。

1.7 统计学处理

采用 SPSS11.5 软件行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析,进一步组间比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度 APS 处理后 pDC 形态的变化

不同质量浓度 APS 处理后 pDC 细胞的突起增多、变长,呈现 DC 成熟的特征。由此说明 APS 可以促进 pDC 向 DC 的分化,并使其形态上更加成熟(图 1、图 2)。

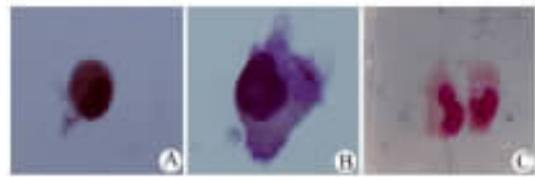


图 1 光镜观察 APS 处理后 pDC 的形态(\times 1 000)

Fig. 1 Morphology of pDC after APS treatment under light microscope (\times 1 000)

A: Before APS treatment; B: 5 d pDC without APS treatment; C: APS treatment for 5 d

2.2 不同质量浓度 APS 处理后 pDC 细胞 IFN- α 、IL-6 和 TNF- α 的表达

加入不同质量浓度 APS 后, pDC 细胞上清中 IFN- α 、IL-6 和 TNF- α 分泌水平明显增加,且不同质

量浓度 APS 组间亦有显著差异 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性(表 1)。

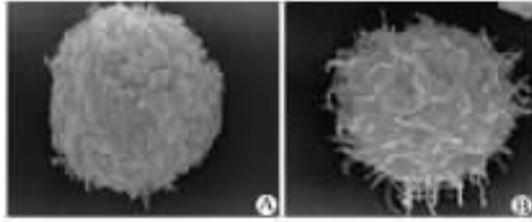


图 2 电镜观察 APS 处理前 (A) 后 (B) pDC 的形态 ($\times 7650$)

Fig. 2 Scanning electron microscope showing morphology of pDC before (A) and after (B) APS treatment ($\times 7650$)

表 1 不同质量浓度 APS 处理后 pDC 细胞上清中 IFN- α 、IL-6 和 TNF- α 的表达 ($n = 23, \bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

Tab. 1 IFN- α , IL-6 and TNF- α levels in pDC supernatants before and after treatments with different concentrations of APS ($n = 23, \bar{x} \pm s, \rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)

APS ($\rho_B / \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	IFN- α	IL-6	TNF- α
0	432.3 \pm 78.2	87.8 \pm 17.5	166.4 \pm 28.3
50	506.4 \pm 93.6*	143.4 \pm 32.7*	188.3 \pm 30.7*
100	617.5 \pm 105.8*	164.7 \pm 40.1*	214.7 \pm 35.9*
200	706.5 \pm 127.8**	219.3 \pm 51.3**	246.3 \pm 45.6**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APS group

2.3 不同质量浓度 APS 处理后 pDC 的表型

流式细胞仪检测结果显示, 加入 APS 组均较未加 APS 组 pDC 细胞的 CD11c、CD80、CD86 表达阳性率明显增加, 且不同浓度 APS 组间亦有显著差异 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性(表 2)。

表 2 不同质量浓度 APS 处理后 pDC 的表型

Tab. 2 Phenotypes of pDC after treatments with different concentrations of APS ($\bar{x} \pm s, \%$)

APS ($\rho_B / \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	CD11c	CD80	CD86
0	33.9 \pm 11.4	34.7 \pm 13.8	42.6 \pm 15.3
50	44.3 \pm 15.8*	49.1 \pm 17.8*	50.1 \pm 19.4*
100	55.4 \pm 17.5*	56.2 \pm 20.5*	59.7 \pm 21.7*
200	67.3 \pm 22.4**	64.8 \pm 22.5**	69.7 \pm 24.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APS group

3 讨论

人体内 DC 主要分为两个亚型, 即髓样 DC (myeloid DC, mDC) 和 pDC, 通常所说的以 DC 为基础的抗肿瘤免疫是指基于 mDC 的免疫治疗。pDC 作为 DC 的一种亚型, 是启动固有性免疫应答的关键, 也是连接固有性免疫和适应性免疫的桥梁。

pDC 在病毒和 CpG 刺激下分泌大量 IFN- α 及一定数量的 IL-6、TNF- α , 同时其自身逐渐成熟, 向 DC 分化。IFN- α 可以诱导自身及其他细胞分泌细胞因子, 如干扰素调节因子-7 (IRF-7) 等^[1], 抑制病毒复制, 增强巨噬细胞的细胞毒活性, 增强记忆性 CD8⁺ T 细胞在 IL-15 诱导下的增殖, 增加 T 细胞的生存和 NK 细胞活性^[1,7-8]。TNF- α 可以促进非成熟 DC 的成熟, 同时在诱导 pDC 向成熟的抗原呈递细胞分化中也起一定作用。IL-6 联合 IFN- α 可以诱导 B 细胞向分泌抗体的浆细胞分化, 增加免疫球蛋白的分泌^[1,9], 增强白血病患者抗感染能力。本研究发现, APS 可以促进缓解期 AML 患者 pDC 分泌 IFN- α 、IL-6、TNF- α , 促进 pDC 向 DC 的分化, 并使 DC 在形态上更加成熟。由此提示, APS 可以通过 pDC 途径来增强 AML 患者的体液免疫和细胞免疫, 有望成为以 pDC 为基础的免疫治疗中的有效佐剂。

目前成人 AML 的完全缓解 (complete remission, CR) 率为 60% ~ 80%, 但 50% ~ 60% 缓解患者会复发, 因此, 白血病复发是 AML 治疗最常见的失败原因。复发性 AML 的治疗效果差, 一部分患者成为难治性 AML。AML 的复发与难治和微小残留病灶 (minimal residual disease, MRD) 以及发生多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 有关。免疫治疗在清除 MRD 方面已显示出可喜的临床效果^[10-11], 干扰素在逆转 MDR 方面有确切作用^[12-14]。APS 增强 AML 患者 pDC 的功能和成熟, 这对于 AML 的治疗具有重要意义: pDC 作为人体内 IFN- α 的专职产生细胞, 其产生的 IFN- α 在逆转 AML 的复发和耐药方面具有一定作用; 提高 AML 患者的体液免疫和细胞免疫, 活化 B 细胞和巨噬细胞、刺激 NK 细胞增殖、增强树突状细胞的功能, 从而增强抗肿瘤效应, 有利于清除微小残留病; IL-6 联合 IFN- α 可以诱导 B 细胞向分泌抗体的浆细胞分化, 增加免疫球蛋白的分泌, 从而增强 AML 患者的抗感染能力。

APS 在免疫调节方面有重要作用, 包括提高体液免疫和细胞免疫, 活化 B 细胞和巨噬细胞、刺激 NK 细胞增殖、增强树突状细胞的功能^[15-17], 并对细胞因子有一定调节作用^[18]。pDC 分泌的细胞因子

亦有相似作用,因此,推测 APS 的免疫增强作用可能通过增强 pDC 的功能来实现。

APS 增强 pDC 功能的机制可能与 pDC 上的 TLR 表达有关^[1-2,19,20]: 刺激物通过刺激 TLR7 或 TLR9 使 pDC 产生 IFN- α 。经刺激后,TLR 通过胞质转换转录处理器(包括 MyD88、TRAF6、IRAK-4、IRAK-1)的信号转导通路使干扰素调节因子(IRF,如 IRF-5,IRF-7,IRF-8)磷酸化和 NF- κ B 活化,分别导致 IFN- α 和 TNF- α 、IL-6 的分泌,同时上调共刺激分子的表达^[1,19]。本研究发现,APS 可以增加缓解期 AML 患者 pDC 分泌 IFN- α 、TNF- α 、IL-6 的量,可能是 APS 增强了对 TLR 的刺激,从而增强 IRF 磷酸化和 NF- κ B 活化;APS 促进 pDC 向 DC 的分化并促进其成熟可能与 APS 增加 pDC 分泌的细胞因子有关,其确切机制尚需进一步的研究。

APS 应用于临床的有效性及安全性已被证实。本实验进一步阐明了 APS 对 pDC 的免疫调节作用,APS 有望成为增强 AML 患者 pDC 疫苗功效的免疫佐剂,为 AML 的免疫治疗提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19(1): 3-19.
- [2] Liu YJ. IPC: Professional type I interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 275-306.
- [3] 唐义平, 邓承祺, 缪世锬, 王春森. 干扰素逆转复发难治性急性白血病的临床观察 [J]. 白血病·淋巴瘤, 2001, 10(3): 160-161.
- [4] Yu SY, Ouyang HT, Yang JY, Huang XL, Yang T, Duan JP, et al. Subchronic toxicity studies of radix astragali extract in rats and dogs [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 110(2): 352-355.
- [5] 王海燕, 李惊子, 潘缉圣, 邹万忠, 李晓玫, 章友康, 等. 中药黄芪当归合剂对肾病综合征肾损伤的保护作用及对代谢紊乱的影响 [J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(5): 542-552.
- [6] 俞 雷, 李惊子, 洪健美, 蔡松敏, 王海燕. 黄芪当归合剂降低肾病综合征大鼠血脂机制的探讨 [J]. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(6): 337-339.
- [7] Kadowaki N, Liu YJ. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity [J]. Hum Immunol, 2002, 63(12): 1126-1132.
- [8] Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells [J]. Leukoc Biol, 2004, 75(3): 504-514.
- [9] Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chaloumi C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6 [J]. Immunity, 2003, 19(2): 225-234.
- [10] Ossenkoppele GJ, Stam AG, Westers TM, de Gruijl TD, Janssen JJ, van de Loosdrecht AA, et al. Vaccination of chronic myeloid leukemia patients with autologous *in vitro* cultured leukemic dendritic cells [J]. Leukemia, 2003, 17(7): 1424-1426.
- [11] Laupeze B, Amiot L, Bertho N, Grosset JM, Lehne G, Fauchet R, et al. Differential expression of the efflux pumps P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in human monocyte-derived dendritic cells [J]. Hum Immunol, 2001, 62(10): 1073-1080.
- [12] Stein U, Walther W, Shoemaker RH. Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: An approach for reversal of multidrug resistance [J]. Cancer, 1996, 74(9): 1384-1391.
- [13] Fogler WE, Pearson JW, Volker K, Ariyoshi K, Watabe H, Riggs CW, et al. Enhancement by recombinant human interferon alpha of the reversal of multidrug resistance by MRK-16 monoclonal antibody [J]. Natl Cancer Inst, 1995, 87(2): 94-104.
- [14] 平宝红, 周淑芸, 刘启发, 杨纯正. 干扰素逆转白血病多药耐药性的研究及机制的初步探讨 [J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(1): 13-15.
- [15] Wang YP, Li XY, Song CQ. Effect of astragaloside IV on T, B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(3): 263-266.
- [16] Shao BM, Xu W, Dai H, Tu P, Li Z, Gao XM. A study on the immune receptors for polysaccharides from the roots of astragalus membranaceus, a Chinese medicinal herb [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320(4): 1103-1111.
- [17] Liu QY, Yao YM, Zhang SW, Sheng ZY. Astragalus polysaccharides regulate T cell-mediated immunity via CD11c (high) CD45RB (low) DCs *in vitro* [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 7(8): 674-681.
- [18] 涂文伟, 杨锡强, 王莉佳, 张远维, 沈 锦. 黄芪调节 IgG 亚类缺陷病人 IL-2、BCGF、IL-6 活性的体外观察 [J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(1): 34-37.
- [19] Jähn PS, Zänker KS, Schmitz J, Dzionek A. BDCA-2 signaling inhibits TLR-9-agonist-induced plasmacytoid dendritic cell activation and antigen presentation [J]. Cell Immunol, 2010, 265(1): 15-22.
- [20] Kaisho T. Molecular mechanisms for plasmacytoid dendritic cell function and development [J]. Vaccine, 2010, 17(9): 783-788.
- [21] Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signalling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(43): 15416-15421.

[收稿日期] 2010-07-24

[修回日期] 2010-08-27

[本文编辑] 王 莹