

吗啡持续刺激对小鼠树突状细胞发育及分泌 IL-12 的影响*

路 海¹ 胡景霞² 陈 京¹ 白 波^{1△}

(¹ 济宁医学院神经生物学研究所, 山东 济宁 272067; ² 泰山医学院, 山东 泰安 271016)

摘 要 目的 吗啡持续刺激对 C57BL/6 小鼠骨髓来源的树突状细胞成熟的影响。方法 体外培养 C57BL/6 小鼠骨髓来源的树突状细胞, 培养过程中给予吗啡刺激, 观察细胞形态的变化; 应用酶联免疫吸附法检测树突状细胞分泌细胞因子 IL-12 水平的变化。结果 吗啡干预各组树突状细胞中细胞因子 IL-12 分泌水平较对照组显著升高。结论 吗啡持续刺激能够促进小鼠树突状细胞的成熟。

关键词 吗啡; 树突状细胞; 阿片受体; 白介素-12

中图分类号: R3381+2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2011)08-229-04

Effects of sustained morphine stimulation on dendritic cell development and IL-12 production

LU Hai, HU Jing-xia, CHEN Jing, et al

(Neurobiology Institute of Jining Medical University, Jining, 272067, China)

Abstract, Objective To investigate the effects of sustained morphine stimulation on the bone marrow-derived dendritic cell (DC) maturation. **Methods** The primary C57BL/6 mouse bone marrow-derived dendritic cells (4-6 weeks) were cultured in vitro. In course of cell culture morphine was added at the same time. The cell supernatants were collected at 7 days and interleukin-12 (IL-12) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The results showed that the secretion of IL-12 in LPS+morphine groups was significantly increased compared with blank control group and LPS control group ($P < 0.01$). But there was no difference between the LPS+morphine groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Sustained morphine stimulation on the mouse bone marrow-derived dendritic cells can promote dendritic cells to mature.

Key words: Morphine; Dendritic cell; Opioid receptor; IL-12

众多资料表明外源性阿片类药物, 如吗啡、海洛因等, 具有显著抑制机体的免疫系统的作用^[1]。然而, 有研究证明, 在一定条件下吗啡也可以发挥促进免疫的作用^[2]。

树突状细胞是机体内最强的抗原提呈细胞, 也是唯一能激活并活化初始 T 细胞的抗原提呈细胞, 是特异性免疫应答的启动因素。成熟 DC 表达高水平的主要组织相容复合体 (major histocompatibility complex, MHC-II)、共刺激分子和某些相关黏附分子^[3-4], 具有很强的抗原提呈功能, 能够活化初始 T 细胞; 在 IL-12, 肿瘤坏死因子 α (tumor

necrosis factor α , TNF- α) 等细胞因子诱导下, T 细胞能够进一步活化和增殖。

目前, 对于吗啡与 DC 之间关系的研究尚不多见。本实验在小鼠骨髓来源的 DC 成熟过程中持续加入不同浓度的吗啡动态观察, 从 DC 的大体形态、细胞因子 IL-12 分泌两方面的变化试图分析吗啡对 DC 产生的影响, 为吗啡与免疫系统之间的作用关系提供了新的实验资料。

1 材料与方法

1.1 材料

重组小鼠 GM-CSF (rmGM-CSF), IL-4 购自 Promega 公司; LPS (E. coli B4:O111), 购自 Sigma 公司; 小鼠 IL-12 (P70) ELISA 检测试剂盒为上海西唐生物科技有限公司。

* [基金项目] 国家自然科学基金项目 (编号: 30971081, 30870932, 81070961)

山东省自然科学基金资助项目 (编号: ZR2009DZ004)

△ [通信作者] 白波, E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn

其它试剂:盐酸吗啡购自沈阳第一制药厂; RPMI-1640 完全培养基(含 L-谷氨酰胺),购自 Hyclone 公司,试剂测试内毒素小于 5pg/ml;胎牛血清由德国 PAA 公司提供;Tris-NH₄Cl 红细胞裂解液(Tris ammonium chloride buffer): Tris 1.03g, NH₄Cl 3.375g,加蒸馏水溶解后用 5mol/L 的 HCl 调节 pH=7.2。加蒸馏水定容至 500ml。

实验对象:选用 C57BL/6 小鼠,4~6 周龄,雌雄不限,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 颈椎脱臼法处死 C57BL/6 小鼠,无菌状态下取股骨和胫骨,1ml 注射器冲洗 4~6 遍,收集培养皿中的骨髓细胞悬液,1500 rpm × 10min 离心,弃去上清,加入 5ml 无菌 Tris-NH₄Cl 溶液溶解红细胞,于室温下静置 2min 后再次离心,1500 rpm × 5min,弃上清。洗涤后将细胞用完全培养基悬浮,分至 6 孔培养板中,37℃,5% CO₂ 的孵箱中培养;48h 后,加入新鲜的含相同浓度的 rmGM-CSF 和 IL-4 的 RPMI-1640 完全培养基,继续培养 3d 后半量换液。培养至第 7 天,收集所有悬浮细胞,即为富集的小鼠骨髓来源的树突状细胞(Bone marrow-derived dendritic cell, BM-DC)。经流式细胞仪鉴定, BMDC 的纯度可达 90% 以上。

1.2.2 实验分组 在培养的过程中,将细胞分为 6 组,施以不同的刺激条件。1) LPS 实验对照组(培养的第 5 天加入 LPS); 2) LPS + 10⁻⁶ M 吗啡组(培养的第 5 天加入 LPS,第 1、3、5 天加入吗啡终浓度 10⁻⁶ M); 3) LPS + 10⁻⁸ M 吗啡组(培养的第 5 天加入 LPS,第 1、3、5 天加入吗啡终浓度 10⁻⁸ M); 4) LPS + 10⁻¹⁰ M 吗啡组(培养的第 5 天加入 LPS,第 1、3、5 天加入吗啡终浓度 10⁻¹⁰ M); 5) LPS + 10⁻¹² M 吗啡组(培养的第 5 天加入 LPS,第 1、3、5 天加入吗啡终浓度 10⁻¹² M); 6) 培养过程中不加 LPS 及吗啡,作为空白对照。

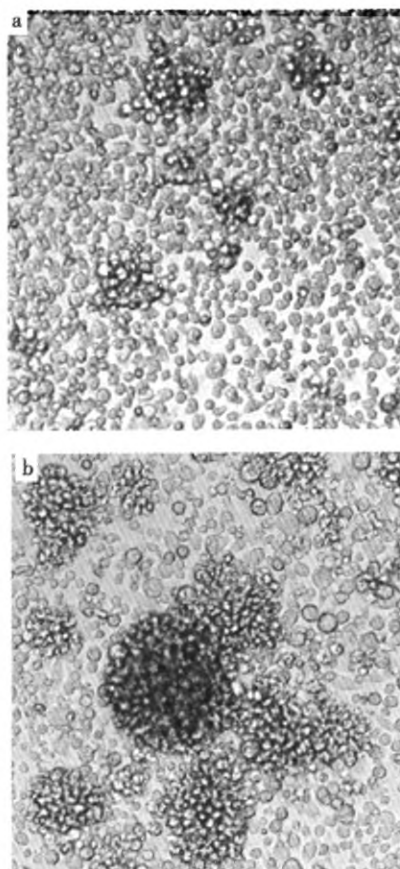
1.2.3 统计学分析 计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 培养至第 7 天的各组 BMDC 的形态

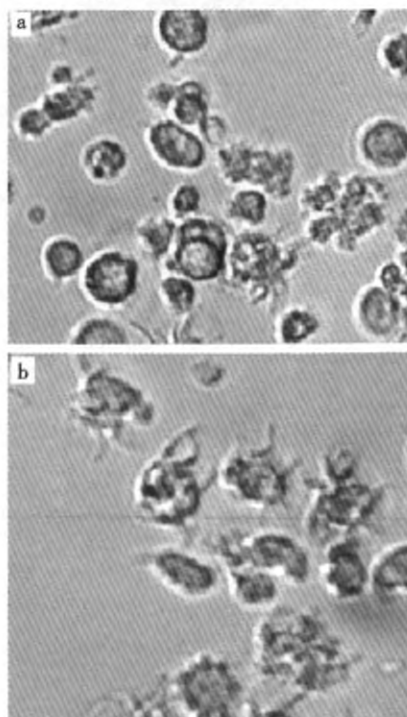
我们在培养过程中按照上述试验分组,加或不加 LPS 和吗啡,各组在培养的第 3 天均形成明显的细胞集落,在第 7 天各组细胞均出现突起,但是

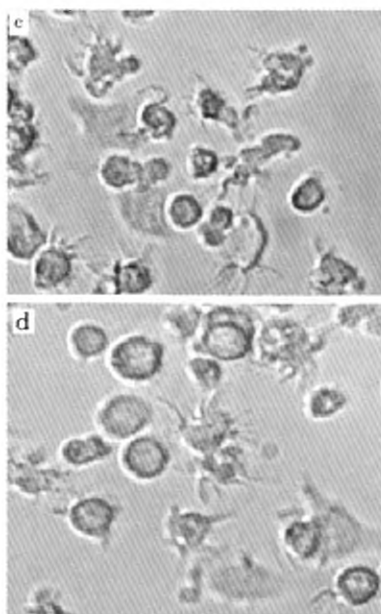
LPS 组和 LPS + 吗啡组与空白对照组相比,树突样形态更典型,显示其较高的成熟度(图 1,2)。



a: 为培养第 1 天细胞形态,无集落形成
b: 细胞培养第 3 天,开始形成大量集落

图 1 培养至第 1 天和第 3 天在光镜下观察到 DC 集落形态(×100)





a:空白对照组;b:LPS 对照组;c,d:LPS+吗啡组。

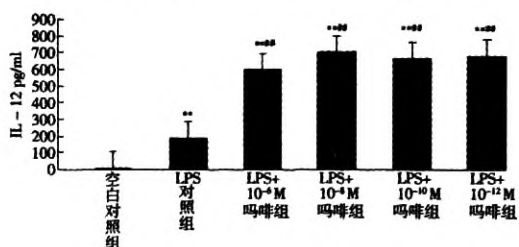
图中可以看出,c,d 图中 BMDC 的突起较 a 为多,且较长,提示其成熟度更高。

图 2 各组培养至第 7 天的 BMDC 光镜下形态($\times 400$)

2.2 吗啡持续刺激对 DC 分泌细胞因子的影响

实验从细胞形态方面分析吗啡持续刺激对 DC 的影响。成熟的 DC 分泌多种细胞因子,其中 IL-12 和 TNF- α 作用于干细胞和 NK 细胞等免疫效应细胞,调节机体免疫应答,具有一定代表性。本实验通过收集各组细胞上清,用 ELISA 试剂盒进行检测其中细胞因子 IL-12 的含量。结果显示,与空白对照组(6.08 ± 0.53)相比,吗啡干预组中 IL-12 水平均有显著增高($P < 0.01$);与 LPS 组(187.08 ± 23.65)相比,吗啡干预组中 IL-12 水平亦增高显著($P < 0.01$;图 3,表 1)。

取 10^{-10} M 吗啡组,在加吗啡同时加入相应浓度的纳洛酮(10^{-8} M),培养 7d 后收集上清,检测其中 IL-12 含量,发现与 LPS+ 10^{-10} M 吗啡组(651.3 ± 29.12)相比,吗啡+纳洛酮组(29.25 ± 2.87)中 IL-12 水平显著降低($P < 0.01$;图 4,表 2)。



与空白对照组比较:*** $P < 0.01$;

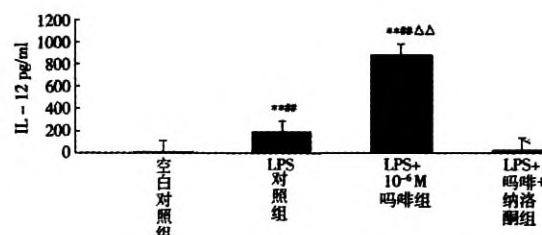
与 LPS 对照组比较:## $P < 0.01$

图 3 吗啡持续干预下对 IL-12 分泌量的影响

表 1 各组 DC 分泌 IL-12 的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	IL-12(pg/ml)
空白对照组	6.08 ± 0.53
LPS 组	$187.08 \pm 23.65^{**}$
LPS+ 10^{-6} M 吗啡组	$597.75 \pm 88.07^{***\#\#}$
LPS+ 10^{-8} M 吗啡组	$706.17 \pm 88.66^{***\#\#}$
LPS+ 10^{-10} M 吗啡组	$640.96 \pm 107^{***\#\#}$
LPS+ 10^{-12} M 吗啡组	$679.44 \pm 97.97^{***\#\#}$

与空白对照组比较:*** $P < 0.01$;与 LPS 对照组相比:## $P < 0.01$



与空白对照组比较:*** $P < 0.01$;

与 LPS 对照组相比:△△ $P < 0.01$;

与 LPS+morphine+naloxone 组比较:## $P < 0.01$

图 4 纳洛酮阻断后 DC 分泌 IL-12 的变化

表 2 纳洛酮阻断 DC 中 IL-12 变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	IL-12(pg/ml)
空白对照组	5.61 ± 1.78
LPS 对照组	$188.88 \pm 5.46^{***\#\#}$
LPS+吗啡组	$651.3 \pm 29.12^{***\#\#\Delta\Delta}$
LPS+吗啡+纳洛酮组	29.25 ± 2.87

与空白对照组比较:*** $P < 0.01$;与 LPS 对照组相比:△△ $P < 0.01$;与 LPS+吗啡+纳洛酮组比较:## $P < 0.01$

3 讨论

吗啡作为一种外源性阿片类药物,具有强烈镇痛作用,被广泛应用于临床治疗中,在其应用过程中能够抑制一系列免疫反应,包括大鼠 T 细胞和 NK 细胞,巨噬细胞,大鼠和猿类的单核细胞,以及猿类的淋巴细胞循环等。然而,关于阿片类药物与树突状细胞方面的文献报道并不多见。

树突状细胞(dendritic cell, DC)是一种专职的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),在免疫应答的启动和调控中发挥中心作用^[5]。同时,DC 具有分泌 IL-12 的作用。IL-12 最早被称为 NK 细胞刺激因子(natural killer cell stimulatory factor, NKSF),是由分子量分别 (下转第 235 页)

时也可分泌 IL-10 减少中性粒细胞聚集,减轻气道炎症。但黄芪注射液上调 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的具体机理有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] 王耀丽,钱桂生,程晓明.调节性 T 细胞在支气管哮喘中的作用[J].中华结核和呼吸杂志,2005,28(12):856-858.
- [2] 刘启,熊南山,程斌.黄芪免疫药理学研究进展[J].中国中医药杂志,2004,2(6):321-322.
- [3] 董宗祈.小儿过敏性哮喘的发病机制及其治疗[J].实用儿科临床杂志,2000,15(3):174-176.
- [4] Ziegler SF. Regulatory T cells and inflammation: better late than never[J]. Immunity,2008,29(1):5-7.

- [5] Stock P, Akbari O, Berry G, et al. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express FoxP3 and protect against airway hyper-reactivity. Nat Immunol, 2004, 5 (11): 1149-1156.
- [6] Venet F, Chung CS, Huang X, et al. Lymphocytes in the development of lung in? animation; a role for regulatory CD4⁺ T Cells in indirect pulmonary lung injury[J]. J Immunol, 2009,183(5):3472-3480.
- [7] 张磊,曲书强,张凤莲.白细胞介素-10 对支气管哮喘小鼠肺部炎症的影响[J].实用儿科临床杂志,2010,25(9):634-636.
- [8] 刘莎,符州.黄芪免疫调节作用及其临床应用[J].国际中医中药杂志,2006,28(4):203-205.

(收稿日期 2011-06-03)

(上接第 231 页)为 40 KD(p40)和 35 KD(p30)的两条肽链经二硫键共价连接而成的异二聚体糖蛋白。IL-12 具有多种生物学特性,能显著增强 NK 细胞和特异性细胞毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)的细胞毒性^[6];诱导辅助性 T 细胞(help T cell,Th)向 Th1 方向的分化;刺激 T 细胞及 NK 细胞分泌多种细胞因子,特别是干扰素 γ (IFN- γ),能激活巨噬细胞的溶细胞膜的作用,能诱导干扰素诱导蛋白 10(interferon inducible protein 10,IP-10)而发挥抑制肿瘤血管形成的作用,显示出其在肿瘤的免疫治疗中将起重要作用^[7]。

晚期肿瘤患者常用吗啡等阿片药物镇痛,我们的实验显示,吗啡能够刺激 DC 成熟^[8],成熟的 DC 通过增强 CTL 细胞毒性及增加 IFN- γ 等细胞因子的分泌来发挥抗肿瘤免疫作用。提示吗啡在发挥镇痛作用的同时,是否也存在延缓或阻止肿瘤进展的可能性。

吗啡影响 DC 的作用途径尚无定论,文献报道,在小鼠的 DC 中存在 μ 、 α 和 δ 3 种阿片受体^[9]。本实验通过阿片受体阻断剂纳洛酮阻断阿片受体后,吗啡对 IL-12 分泌的影响变弱乃至消失,提示吗啡可能通过阿片受体来发挥对 DC 的影响。当然,关于吗啡与免疫系统之间的研究仍在进行中,其作用机制在不远的未来将被揭开。

参考文献:

- [1] Vojdani Z, Dehghani F, Seyedi F, et al. Quantitative study of

- the effects of morphine on the mouse spleen and inguinal lymph node[J]. Arch Iran Med,2010,13(4):294-300.
- [2] Olin MR, Roy S, Molitor T. In vivo morphine treatment synergistically increases LPS-induced caspase activity in immune organs[J]. J Neuroimmune Pharmacol,2010,5(4):546-52.
- [3] Segura E, Amigorena S, Théry C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses[J]. Blood Cells Mol Dis,2005,35(2):89-93.
- [4] Véron P, Segura E, Sugano G, et al. Accumulation of MFG-E8 /lactadherin on exosomes from immature dendritic cells [J]. Blood Cells Mol Dis,2005,35(2):81-88.
- [5] Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311:17-58.
- [6] Bai B, Song W, Ji Y, et al. Microglia and microglia-like cell differentiated from DC inhibit CD4 T cell proliferation[J]. J PLoS One,2009,4(11):e7869.
- [7] Monti P, Leone BE, Zerbi A, et al. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10 high IL-12 low regulatory dendritic cells [J]. J Immunol, 2004,172(12):7341-7349.
- [8] 路海,胡景霞,白波.吗啡持续刺激对小鼠树突状细胞成熟的影响[J].现代免疫学,2011,31(2):126-129.
- [9] Kirst A, Wack C, Lutz WK, et al. Expression of functional kappa-opioid receptors on murine dendritic cells[J]. Immunol Lett,2002,84(1):41-48.

(收稿日期 2011-06-21)