

不同免疫抑制剂对全血细胞单核细胞趋化蛋白1分泌的影响*

王 明, 何 懿, 刘占国, 罗宇维, 武 凯, 孙尔维, 赵 明

Influence of different immunosuppressants on monocyte chemoattractant protein-1 secretions in the whole blood

Wang Ming, He Yi, Liu Zhan-guo, Luo Yu-wei, Wu Kai, Sun Er-wei, Zhao Ming

Abstract

Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Wang Ming★, Studying for master's degree, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
wzlm2010@163.com

Correspondence to: Zhao Ming, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
Sun Er-wei, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Received:2010-02-19
Accepted:2010-03-17

BACKGROUND: In the field of organ transplantation, patients often take immunosuppressants after organ transplantation, such as CsA, FK506, DEX and MPA. However, their mechanisms of immunosuppression are different. The effect of immunosuppressive drugs on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) remains poorly understood.
OBJECTIVE: To investigate the effects of different immunosuppressants on the secretions of MCP-1 in whole blood.
METHODS: The whole blood of healthy volunteers was mixed with different immunosuppressants for 6 hours, such as CsA, FK506, DEX and MPA, which included low, middle and high concentrations, followed by PMA and IONO stimulation for 6 hours. MCP-1 levels in whole blood samples were compared. The whole blood cultured alone served as control.
RESULTS AND CONCLUSION: MCP-1 secretion was inhibited by DEX (1, 10 mg/L) and CsA (0.25, 1.25 mg/L). However, FK and MPA exhibited no such effect. Therefore, DEX and CsA may inhibit the function of monocytes and macrophages in immune system by diminishing the secretion of MCP-1. The combination of FK (5 μg/L), MPA (10 mg/L) and DEX (1mg/L) or CsA (0.25 mg/L), MPA (10 mg/L) and DEX (1 mg/L) can inhibit the secretion of MCP-1, but only DEX among all the immunosuppressants mentioned above exhibited significant effect on inhibiting the secretion of MCP-1 when using alone.

Wang M, He Y, Liu ZG, Luo YW, Wu K, Sun EW, Zhao M. Influence of different immunosuppressants on monocyte chemoattractant protein-1 secretions in the whole blood. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(18):3314-3317. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 器官移植后的患者常规使用地塞米松、他克莫司、环孢素 A 和麦考酚酸等临床常用的免疫抑制剂, 其作用机制各不相同。有关不同免疫抑制剂对单核细胞趋化蛋白 1 的作用尚未见报道。
目的: 观察不同免疫抑制剂对全血细胞分泌单核细胞趋化蛋白 1 的影响。
方法: 取健康志愿者全血与不同免疫抑制剂(他克莫司, 环孢素 A, 地塞米松, 麦考酚酸, 每种免疫抑制剂又分为低、中、高 3 个质量浓度)作用 6 h 后, 用佛波酯联合离子霉素刺激 6 h, 比较不同免疫抑制剂组及免疫抑制剂联合使用单核细胞趋化蛋白 1 的水平。以全血单独培养作为对照。
结果与结论: 麦考酚酸和他克莫司不能有效抑制单核细胞趋化蛋白 1 的分泌; 1, 10 mg/L 地塞米松、0.05, 1.25 mg/L 环孢素 A 均能够显著抑制单核细胞趋化蛋白 1 的分泌。因此, 地塞米松和环孢素 A 可能通过抑制单核细胞趋化蛋白 1 的水平抑制单核巨噬细胞在免疫系统中发挥作用的。联合使用 5 μg/L 他克莫司、10 mg/L 麦考酚酸和 1 mg/L 地塞米松或者联合使用 0.25 mg/L 环孢素 A、10 mg/L 麦考酚酸和 1 mg/L 地塞米松都可以有效抑制单核细胞趋化蛋白 1 的分泌, 而上述免疫抑制剂单用时, 仅地塞米松能有效抑制单核细胞趋化蛋白 1 的分泌。
关键词: 免疫抑制剂; 单核细胞趋化蛋白 1; 全血; 刺激; 器官移植
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.18.020

王明, 何懿, 刘占国, 罗宇维, 武凯, 孙尔维, 赵明. 不同免疫抑制剂对全血细胞单核细胞趋化蛋白 1 分泌的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(18):3314-3317. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

单核细胞趋化蛋白1是CC族趋化因子中的主要成分, 由机体免疫细胞产生, 其主要功能是趋化并激活单核-巨噬细胞, 同时也可趋化并激活嗜碱性粒细胞, 在免疫系统功能的调节和执行中起重要作用^[1-4]。单核细胞趋化蛋白1结合受体包括: CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CC CKR2A和CC CKR2B; 其中CCR2是其主要受体, 在单核细胞的重组和调节炎症因子的产生方面发挥重要作用^[5-6]。有大量研究表明, 单核细胞趋化蛋白1的水平和动脉硬化、狼疮

性肾炎、糖尿病大血管病变、糖尿病肾病等疾病密切相关^[5-9]。

在器官移植领域, 器官移植后的患者常规使用免疫抑制剂, 地塞米松、他克莫司、环孢素A和麦考酚酸是目前临床常用的免疫抑制剂, 其作用机制各不相同。糖皮质激素类药物可以通过增加信号蛋白 I kB的基因转录, 从而影响胞浆内转录因子NF-kB, 阻止多种细胞因子产生; 同时通过阻断Ca²⁺载体对单核和其他淋巴细胞起作用, 抑制单核细胞向炎症区移动等作用, 从而抑制免疫系统功能^[10]。他克莫司主要通过结合细胞内结合蛋白, 抑制白细胞介素 2 基因转录, 抑制免疫细胞的增殖、活化, 从而

抑制免疫系统的功能^[11-12]。环孢素A主要通过抑制T辅助细胞的活化、白细胞介素2的分泌以及细胞毒性T细胞的激活来抑制免疫系统^[13]。麦考酚酸主要通过抑制嘌呤合成途径中次黄嘌呤核苷酸脱氢酶的活性和T、B淋巴细胞的增殖反应发挥免疫抑制作用^[14]。而目前不同免疫抑制剂对单核细胞趋化蛋白1的作用尚未见报道。

本实验以此为出发点, 研究不同免疫抑制剂或者同一免疫抑制剂不同浓度条件下对单核细胞趋化蛋白1的作用。

1 材料和方法

设计: 以单核细胞趋化蛋白1浓度为观察指标, 分组观察实验。

时间及地点: 于2009-01/08在南方医科大学珠江医院器官移植免疫研究所完成。

材料: 人外周血来自20~30岁健康志愿者。实验经医院伦理委员会批准。

主要试剂及药品:

试剂及药品	来源
佛波酯	美国Sigma公司
离子霉素IONO	美国Sigma公司
地塞米松	美国Sigma公司
环孢素A	华东制药有限公司
麦考酚酸	美国Alexis公司
他克莫司	日本Astellas公司
RPMI1640基础培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.3)	美国Bio-Rad公司
Bio-Plex™ human cytokine 17-plex panel	美国Bio-Rad公司
Bio-Plex Reagent kit	美国Bio-Rad公司

实验仪器和设备:

仪器	来源
96孔细胞培养板	苏州净化设备有限公司
SW-CJ-10 型超净工作台	苏州净化设备有限公司
3111 型水套式CO ₂ 细胞培养箱	Thermo Forma 公司
微量高速离心机	美国KENDRO
Bio-Plex悬浮蛋白芯片系统	美国Bio-Rad公司

实验方法:

全血细胞的培养及刺激: 抽取健康志愿者空腹外周静脉全血3 mL, 肝素抗凝。再将全血加入96孔培养板(200 μL/孔)。将样本分为4组, 每组3例: ①全血单独培养, 作为对照组。②加入

不同免疫抑制剂作为实验组, 同一免疫抑制剂又分为低、中、高3个质量浓度: 他克莫司(终质量浓度为1, 5, 20 μg/L); 环孢素A(终质量浓度为0.05, 0.25, 1.25 mg/L); 地塞米松(终质量浓度为0.1, 1, 10 mg/L); 麦考酚酸(终质量浓度为1, 10, 30 mg/L)。③联合用药为“1 mg/L地塞米松+0.25 mg/L环孢素A+10 mg/L麦考酚酸”和“1 mg/L地塞米松+5 μg/L他克莫司+10 mg/L麦考酚酸”。培养6 h (37 °C, 体积分数5% CO₂)后实验组和对照组均加入10 μL佛波酯(0.15 mg/L)和10 μL离子霉素(2.5 mg/L), 再培养6 h (37 °C, 体积分数5% CO₂)后离心(300 g, 5 min), 收集上清, -20 °C保存待测。

Bio-Plex悬浮蛋白芯片系统检测细胞因子水平: 根据Bio-Plex™ human cytokine 17-plex panel说明书, 按照步骤要求, 使用Bio-Plex悬浮蛋白芯片系统检测细胞因子, 系统自动生成详细的检测报告。

主要观察指标: 细胞因子单核细胞趋化蛋白1水平。

设计、实施、评估者: 设计为第六、七作者, 实施及评估为第一、二作者。

统计学分析: 采用SPSS 10.0统计分析软件对数据进行统计分析。采用单向方差分析和LSD检验比较实验组与对照组之间的差异。统计学处理由第一作者完成。

2 结果

2.1 不同免疫抑制剂对单核细胞趋化蛋白1的作用 实验中发现麦考酚酸和他克莫司对单核细胞趋化蛋白1无抑制作用, 而中、高质量浓度的地塞米松(1, 10 mg/L)能够显著抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌($P < 0.05$, 图1); 中、高质量浓度环孢素A(1.25, 0.05 mg/L)也能够显著抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌, 而低质量浓度地塞米松(0.1 mg/L)组和低质量浓度环孢素A组(0.25 mg/L)均不能抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌。

2.2 不同免疫抑制剂联用对单核细胞趋化蛋白1的作用 比较免疫抑制剂联用和单用免疫抑制剂作用有无区别。实验发现同对照组相比, 5 μg/L他克莫司、10 mg/L麦考酚酸和1 mg/L地塞米松三联用药, 或者0.25 mg/L环孢素A、10 mg/L麦考酚酸和1 mg/L地塞米松三联用药能显著抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌, 而单用免疫抑制剂组, 仅地塞米松能抑制单核细胞趋

南方医科大学珠江医院器官移植科, 广东省广州市510282

王明★, 男, 1983年生, 宁夏回族自治区青铜峡市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事移植免疫研究。
wizlm2010@163.com

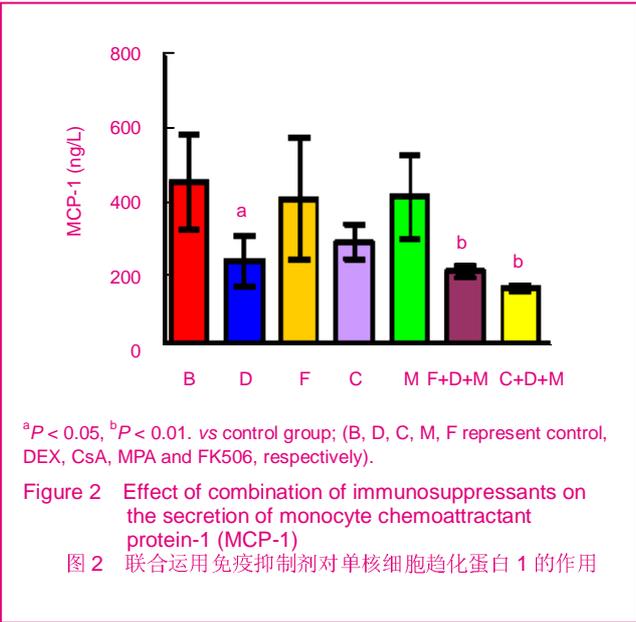
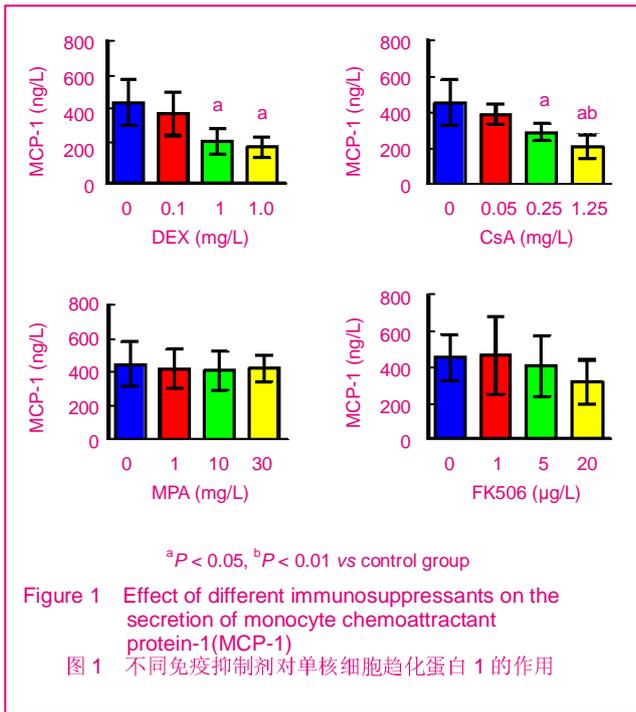
通讯作者: 赵明, 教授, 主任医师, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院器官移植科, 广东省广州市510282;

通讯作者: 孙尔维, 主任医师, 博士生导师, 南方医科大学珠江医院器官移植科移植免疫研究所, 广东省广州市510282

中图分类号: R617
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)18-03314-04

收稿日期: 2010-02-19
修回日期: 2010-03-17
(20100302012/
GW - A)

化蛋白1分泌($P < 0.05$, 图2)。



3 讨论

他克莫司、地塞米松、环孢素A和麦考酚酸是目前器官移植常用的免疫抑制制剂, 它们通过不同途径, 不同的细胞作用机制来抑制免疫细胞功能, 比如地塞米松可以通过增加信号蛋白 I κ B 的基因转录, 同时通过阻断 Ca^{2+} 载体对单核和其他淋巴细胞起作用, 抑制单核细胞向炎症区移动等作用, 从而抑制免疫系统功能^[10]; 他克莫司主要通过结合细胞内结合蛋白, 抑制白细胞介素2基因转录, 进而抑制免疫系统的功能^[11-12]。环孢素A则

主要通过抑制T辅助细胞的活化等来抑制免疫系统^[13]。麦考酚酸主要是通过次黄嘌呤核苷酸脱氢酶的活性和T、B淋巴细胞的增殖反应发挥免疫抑制作用^[14]。单核细胞趋化蛋白1是CC族趋化因子中的主要成分, 由机体免疫细胞产生, 其主要功能是趋化并激活单核-吞噬细胞。单核-吞噬细胞是免疫系统的重要组成部分。单核-吞噬细胞具有趋化性, 同时具有吞噬作用、胞毒作用, 可以有效的吞噬、消化外来抗原、异物等。巨噬细胞还具有抗原提呈能力, 能够有效的提呈抗原给T淋巴细胞。因此, 单核-吞噬细胞在免疫系统中发挥了重要作用^[15-16]。而单核细胞趋化蛋白1的主要功能是趋化并激活单核-吞噬细胞, 因此本文以单核细胞趋化蛋白1为出发点, 研究不同免疫抑制制剂对单核细胞趋化蛋白1分泌的影响, 从而间接地反应不同免疫抑制制剂对单核-吞噬细胞的影响。

首先, 作者选择健康志愿者静脉全血作为研究样本, 同分离的外周血单个核细胞、稀释的全血细胞分离的外周血单个核细胞或稀释的全血细胞相比, 使用静脉全血作为研究样本能够减少样本的处理程序, 从而减少了样本中重要分子或细胞的损失。因此使用全血作为研究样本, 能更真实、更准确的反应机体内实际情况, 模拟机体的内环境状态^[17-18]。

佛波酯联合离子霉素是一类常用的免疫刺激剂组合, 通过快速有效的活化细胞内蛋白激酶C途径, 增加胞内 Ca^{2+} 浓度从而快速活化免疫细胞^[19]。同其他免疫刺激剂相比, 佛波酯联合离子霉素活化细胞更快, 刺激全血细胞分泌的细胞因子更多^[20]。因此在本实验中, 作者选用佛波酯联合离子霉素作为全血细胞的免疫刺激剂。

根据实验结果发现, 麦考酚酸和他克莫司不能抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌; 中浓度、高质量浓度的地塞米松组和环孢素A组均能够显著抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌。这可能和地塞米松、环孢素A抑制了免疫细胞内某些信号蛋白有关, 比如c-Jun N末端激酶, 是免疫细胞分泌单核细胞趋化蛋白1的一个重要蛋白分子。而地塞米松、环孢素A对单核细胞趋化蛋白1分泌的抑制作用, 可能通过抑制c-Jun N末端激酶信号传导通路起作用^[21]。而通过抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌, 地塞米松和环孢素A对单核-吞噬细胞也存在间接地抑制作用, 从而抑制免疫系统功能。作者联合使用他克莫司(5 μ g/L)、麦考酚酸(10 mg/L)和地塞米松(1 mg/L), 或者联合使用环孢素A(0.25 mg/L)、麦考酚酸(10 mg/L)和地塞米松(1 mg/L)都可以有效抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌, 而上述免疫抑制制剂单用时, 仅地塞米松能有效抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌。

根据以往研究发现, 单核细胞趋化蛋白1和多种疾病的发生发展有关, 如动脉硬化、狼疮性肾炎、糖尿病大血管病变、某些自身免疫病等^[5-9]。而本实验结果也为

这些疾病的治疗提供了新的方向。如在狼疮性肾炎或者某些自身免疫病中, 患者本身需要使用免疫抑制剂, 而目前在临床治疗中, 有多种免疫抑制剂可以选择使用。本实验结果提示, 在治疗和单核细胞趋化蛋白1相关的疾病, 同时需要使用免疫抑制剂时, 可以选择对单核细胞趋化蛋白1有抑制作用的药物, 比如激素类药物地塞米松或者环孢素A。这类免疫抑制剂不仅能够抑制免疫系统, 同时可以有效抑制单核细胞趋化蛋白1的分泌, 这更有利于疾病的治疗, 这也为这类疾病的治疗提供了新的思路。

4 参考文献

- [1] Arefieva TI, Kukhtina NB, Antonova OA, et al. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. *Cytokine*.2005; 31(6): 439-446.
- [2] Ousman SS, David S. MIP-1alpha, MCP-1, GM-CSF, and TNF-alpha control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2001; 21(13): 4649-4656.
- [3] Khan WI, Motomura Y, Wang H, et al. Critical role of MCP-1 in the pathogenesis of experimental colitis in the context of immune and enterochromaffin cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 291(5): G803-181.
- [4] Kim B, Sarangi PP, Lee Y, et al. Depletion of MCP-1 increases development of herpetic stromal keratitis by innate immune modulation. *J Leukoc Biol*.2006; 80(6): 1405-1415.
- [5] Kanamori H, Matsubara T, Mima A, et al. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360(4): 772-777.
- [6] Giunti S, Pinach S, Arnaldi L, et al. The MCP-1/CCR2 system has direct proinflammatory effects in human mesangial cells. *Kidney Int*.2006; 69(5): 856-863.
- [7] Cho M, Park JS, Nam J, et al. Association of abdominal obesity with atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Korea[J]. *J Korean Med Sci* 2008; 23(5): 781-788.
- [8] Zoja C, Liu XH, Donadelli R, et al. Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice. *J Am Soc Nephrol*.1997; 8(5): 720-729.
- [9] Hoogeveen RC, Morrison A, Boerwinkle E, et al. Plasma MCP-1 level and risk for peripheral arterial disease and incident coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Atherosclerosis*.2005; 183(2): 301-307.
- [10] Ray A. Glucocorticoids. *Science*.1995; 270(5239): 1103.
- [11] Du S, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. Suppression of NF-kappaB by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J Immunol*.2009; 182(11): 7201-7211.
- [12] James DG. A new immunosuppressant: tacrolimus. *Postgrad Med J*.1996; 72(852): 586.
- [13] Zamauskaite A, Cohen S, Sweny P, et al. FK506 and CsA differ in their effect on intracellular cytokine expression following kidney transplantation. *Transplant Proc*.2001; 33(1-2): 1046-1047.
- [14] Allison AC, Eugui EM. Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant*. 1996; 10(1 Pt 2): 77-84.
- [15] Mazzarella G, Petillo O, Margarucci S, et al. Role of monocyte/macrophage population in immune response. *Monaldi Arch Chest Dis*.1998; 53(1): 92-96.
- [16] Taubert A, Behrendt JH, Suhwold A, et al. Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet Parasitol* 2009; 164(2-4): 141-153.
- [17] Petrovsky N, Harrison LC. Cytokine-based human whole blood assay for the detection of antigen-reactive T cells. *J Immunol Methods*.1995; 186(1): 37-46.
- [18] van Crevel R, van der Ven-Jongekrijg J, Netea MG, et al. Disease-specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production: applications in the study of tuberculosis. *J Immunol Methods*.1999; 222(1-2): 145-153.
- [19] Chatila T, Silverman L, Miller R, et al. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol*.1989; 143(4): 1283-1289.
- [20] Liu Z, Yuan X, Luo Y, et al. Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. *Cytokine*. 2009; 45(2): 141-147.
- [21] Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002; 110(2): 163-175.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突

课题的创新点: ①使用的 BIORAD 液态芯片系统检测细胞因子水平和传统的 ELISA 技术相比, 能够同时检测一份微量样本中数十种细胞因子水平, 节约时间, 并节省样本用量。②同时在样本选择上, 未采用分离单个核细胞的方法, 而是直接使用全血样本在体外培养, 该方法能够更好的模拟体内微环境状况, 使检测结果更加接近体内的实际情况。③选择佛波酯联合离子霉素作为免疫刺激剂, 是因为同植物血凝素, 酯多糖等刺激剂相比, 佛波酯联合离子霉素能够更快速, 更有效地刺激全血细胞分泌细胞因子。

课题评估的“金标准”: 细胞因子浓度可以通过多种方法检测, 本实验中使用的的方法是液态芯片悬浮技术, 该方法获得美国 FDA 认证, 可以用于本实验中评估细胞因子浓度。

提供临床借鉴的价值: 课题提示在单核细胞趋化蛋白1相关疾病治疗中, 如狼疮肾病, 自身免疫病等, 需要免疫抑制剂治疗, 可以选择对单核细胞趋化蛋白1有抑制作用的免疫抑制剂, 如地塞米松或环孢素A 而避免使用他克莫司或麦考酚酸。