

· 基础论著 ·

生物活性透明质酸对脂多糖诱导的人树突状细胞和巨噬细胞炎症应答作用

尤娜¹ 褚萨萨¹ 朱进² 张馨³ 杨志国³ 汪茂荣^{1,3}

【摘要】目的 探讨经人透明质酸酶PH20特异处理的重组HA,即生物活性透明质酸(B-HA)对脂多糖(LPS)诱导的人树突状细胞(DC)和巨噬细胞炎症应答的影响。**方法** DC细胞和人急性单核细胞白血病单核细胞株(THP-1)经不同浓度的B-HA预先处理,加入LPS刺激不同时间,收集细胞和培养上清,采用实时荧光定量PCR和ELISA方法检测细胞因子mRNA和蛋白表达水平的变化。**结果** THP-1细胞实验中,与LPS组相比,B-HA 20 mg/ml不仅能够显著降低促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-8(IL-8)的表达量,同时能够显著增加抗炎因子白细胞介素-10(IL-10)的表达量。其细胞中TNF- α 、IL-8和IL-10 mRNA表达水平分别为 24.41 ± 1.94 、 35.76 ± 4.19 和 4.99 ± 0.07 ,而LPS组分别为 38.48 ± 1.47 、 62.7 ± 1.93 和 2.27 ± 0.16 ,差异均具有统计学意义($t = 5.781$ 、 $P = 0.0290$, $t = 5.695$, $P = 0.0300$, $t = 15.20$ 、 $P = 0.0040$)。细胞上清中三者蛋白表达水平分别为($1\ 609.00 \pm 75.66$) pg/ml、(213.10 ± 9.14) pg/ml和(496.3 ± 41.92) pg/ml, LPS组分别为($3\ 018 \pm 102.8$) pg/ml、(587.4 ± 3.140) pg/ml和(243.3 ± 20.23) pg/ml,差异均具有统计学意义($t = 11.04$ 、 $P = 0.0080$, $t = 38.74$ 、 $P = 0.0007$, $t = 5.434$ 、 $P = 0.0320$)。在人外周血分化的DC细胞实验中,B-HA对细胞因子TNF- α 、IL-8和IL-10的表达均无显著影响(P 均 > 0.05)。**结论** B-HA能有效调节人巨噬细胞炎症因子的表达,抑制其炎症反应;对人DC细胞的炎症反应无显著影响,提示B-HA对人炎症免疫细胞的炎症反应作用具有选择性。

【关键词】 生物活性透明质酸;脂多糖;炎症反应;树突状细胞;人急性单核细胞白血病单核细胞株

Bioactive hyaluronic acid (B-HA) on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human dendritic cells and macrophages You Na¹, Chu Sasa¹, Zhu Jin², Zhang Xin³, Yang Zhiguo³, Wang Maorong^{1,3}.

¹Department of Infectious Diseases, Anhui Medical University Affiliated Bayi Clinical College, Hefei 230032, China; ²Department of Microbiology, Center of Diseases Control of Nanjing Military District, Nanjing 210002, China; ³Institute of Liver Diseases, the 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

Corresponding author: Wang Maorong, Email: maorongwang@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of hyaluronidase PH20 processed recombinant human hyaluronic acid fragments (bioactive HA, B-HA) on lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in human dendritic cells (DC) and macrophages. **Methods** DC cells and human acute monocytic leukemia cells (THP-1) were pretreated with different concentrations of B-HA in absence or unabsence of LPS for different times. The levels of inflammatory cytokines in culture medium were measured by ELISA and inflammatory cytokines mRNA of cultured cells was detected by real-time PCR. **Results** Compared with

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.01.004

基金项目:“十二五”军队特需药品保密专项课题(No. 2013ZJ09J13110-05B)

作者单位:230032 合肥市,安徽医科大学附属解放军八一临床学院¹;210002 南京市,南京军区疾控中心流行病与微生物研究所²;210002 南京市,解放军第81医院全军肝病中心³

通信作者:汪茂荣,Email: maorongwang@126.com

LPS-only group, the expression of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-8 were significantly inhibited by B-HA 20 mg/ml in THP-1 cells, while the expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 was significantly elevated. The mRNA levels of TNF- α , IL-8 and IL-10 were 24.41 ± 1.94 , 35.76 ± 4.19 and 4.99 ± 0.07 in B-HA treated group, respectively, while the LPS-only group were 38.48 ± 1.47 , 62.7 ± 1.93 and 2.27 ± 0.16 , with significant differences ($t = 5.781$, $P = 0.0290$; $t = 5.695$, $P = 0.0300$; $t = 15.20$, $P = 0.0040$). The TNF- α , IL-8 and IL-10 protein levels in culture medium were $(1\ 609.00 \pm 75.66)$ pg/ml, (213.10 ± 9.14) pg/ml and (496.30 ± 41.92) pg/ml, while the LPS-only group were $(3\ 018 \pm 102.8)$ pg/ml, (587.4 ± 3.140) pg/ml and (243.3 ± 20.23) pg/ml, with significant differences ($t = 11.04$, $P = 0.0080$; $t = 38.74$, $P = 0.0007$; $t = 5.434$, $P = 0.0320$). Unfortunately, no effect of B-HA was observed in human PBMC differentiated DC cells (all $P > 0.05$).

Conclusions B-HA was effective on regulating inflammatory cytokines and could inhibit the inflammatory response in human macrophage. There was no significant effect on the inflammatory response in human PBMC-differentiated DC cells. The effect of B-HA on regulating inflammatory response is selective.

【Key words】 Bioactive hyaluronic acid; Lipopolysaccharide; Inflammatory response; Dendritic cells; Human acute monocytic leukemia cell line

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是由重复的聚合二糖D-葡萄糖醛酸和N-乙酰基-D-葡萄糖胺以葡萄糖醛酸 $\beta(1 \rightarrow 3)$ 键连接组成的非硫酸化糖胺聚糖,是细胞外基质的重要组成部分。其在人体各种组织广泛存在,如眼睛的玻璃体、心脏瓣膜、脐带、关节滑液、皮肤以及乳液等^[1-2]。正常生理条件下,HA以大于1 000 kDa的高分子量聚体复合物形式存在,在组织水合、组织结构的支持和弹性中起关键作用^[3-4]。当发生组织损伤和炎症时,高分子量HA被降解成分子量不等的片段,这些小分子HA片段具有一定的生物活性,可进一步引起炎症反应,参与血管生成和免疫调节的过程^[5-7]。近年来,小分子HA参与引发炎症反应的研究逐渐增加,有研究观察到小分子HA在某些组织中具有抗炎作用,如人软骨细胞^[5],但其具体机制尚未明确。也有报道认为,经过修饰的小分子HA的生物活性能显著提高^[8]。本文应用经人透明质酸酶PH20特异处理的重组HA(分子量为10~50 kDa),即生物活性HA(bioactive HA, B-HA),观察其对LPS诱导的人树突状细胞和巨噬细胞炎症反应的影响,现报道如下。

材料与方法

一、实验试剂

B-HA由安普(杭州)生物科技有限公司惠觅宙教授惠赠,其内毒素含量 < 0.5 EU/ml。外周血由江苏省血液中心提供。人急性单核细胞白血病单核细胞株(human acute monocytic leukemia cell

line, THP-1)细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。LPS(*E. coli*, 011:B4)购自美国Sigma公司。佛波醇12-豆蔻酸酯13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、2.0 mmol/L L-谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES和RPMI-1640培养液均购自美国Gibco公司。Ficoll分离液(中国GE Healthcare公司),人CD14免疫磁珠试剂盒(德国Miltenyi Biotec公司),人GM-CSF和人IL-4(美国Pepro Tech公司),RNA试剂盒(美国Omega公司),逆转录试剂盒和SYBR Green PCR试剂盒(日本TaKaRa公司),引物序列(南京金斯瑞生物科技公司)合成,ELISA试剂盒(美国R&D Systems公司)。

二、细胞的分离与培养

健康人外周血经1640培养液稀释,混匀。Ficoll密度梯度离心法分离人外周血单核细胞(human peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)细胞。采用抗-CD14磁珠偶联法,获取PBMCs细胞中CD14⁺的细胞^[9]。将分离的CD14⁺细胞加入含人GM-CSF(100 ng/ml)和人IL-4刺激因子(20 ng/ml)的10%胎牛血清RPMI-1640中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养,使其分化成树突状细胞(dendritic cell, DC)^[10]。

THP-1细胞在37℃、5% CO₂的条件下,用含有10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素、2.0 mmol/L L-谷氨酰胺和10 mmol/L HEPES的RPMI-1640完全培养基培养,每2~3天换液1次,当细胞生长浓度达 1×10^6 个/ml时进行传代培养。

三、细胞处理与实验分组

将最佳生长状态的DC细胞和THP-1细胞铺入24孔板,每孔 3.5×10^5 个细胞。其中THP-1细胞需用PMA (10 ng/ml) 刺激48 h,使其分化成巨噬细胞^[11]后进行分组实验。在细胞上清中加入不同浓度B-HA预处理2 h,随后加或不加LPS (100 ng/ml),继续培养,分别于2 h、4 h或者8 h收集细胞上清和细胞,储存至 -20°C 备用。

为探究不同浓度B-HA对LPS诱导的DC和THP-1细胞中细胞因子的影响,培养细胞设空白组、LPS组、LPS + B-HA 5 mg/ml、10 mg/ml和20 mg/ml组。观察B-HA作用不同时间对LPS诱导的THP-1细胞的影响时,选择预实验中最适浓度B-HA 20 mg/ml,将实验分为LPS组、LPS + B-HA组和B-HA组。每组均设3个复孔。

四、实时荧光定量PCR和ELISA检测细胞因子的表达

收集的细胞按照快速提取法(具体参照试剂盒说明书)提取细胞总RNA,用逆转录试剂盒按说明书将RNA反转录成cDNA。以cDNA作模板,用定量PCR仪器(瑞士Roche公司生产)进行扩增,引物序列见表1。经变性、退火、延伸,共40个循环完成扩增。GAPDH作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 的方法测定TNF- α 、IL-8和IL-10 mRNA的相对表达量。

ELISA法检测细胞培养上清中细胞因子TNF- α 、IL-8和IL-10的蛋白浓度,其操作步骤参照说明书。

五、统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行分析数据。TNF- α 、IL-8和IL-10 mRNA相对表达量等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用成组设计资料的 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同浓度B-HA对LPS诱导的DC细胞和THP-1细胞中细胞因子mRNA的影响

在THP-1细胞实验中,促炎因子TNF- α 和IL-8 mRNA表达量随B-HA浓度增加而降低,20 mg/ml达最高强度且具有统计学意义($t = 5.781$ 、 $P = 0.0290$, $t = 5.695$ 、 $P = 0.0300$); IL-10 mRNA表达量随B-HA浓度增加而增加,差异均具有统计学意义($t = 7.026$ 、 $P = 0.0059$, $t = 6.874$ 、 $P = 0.0205$, $t = 15.23$ 、 $P = 0.0040$),详见表2。

在DC细胞实验中,不同浓度的B-HA组中TNF- α 、IL-8和IL-10 mRNA的表达与LPS组相比差异无统计学意义(P 均 > 0.05),详见表3。

二、B-HA处理不同时间对LPS诱导的THP-1细胞中细胞因子mRNA的影响

选用B-HA 20 mg/ml组,观察了不同处理时间对LPS诱导的THP-1细胞炎性因子的表达的影响

表1 实时荧光定量PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
GAPDH	
上游引物	GGCATTACAGACACCTAC
下游引物	CGACATGACGTTGTGGCATA
人TNF- α	
上游引物	CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG
下游引物	GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
人IL-8	
上游引物	ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC
下游引物	AACCCTCTGCACCCAGTTTTC
人IL-10	
上游引物	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG
下游引物	TCACATGCGCCTTGATGTCTG

表2 THP-1 细胞中各组细胞因子 mRNA 的表达量 ($\bar{x} \pm s$)

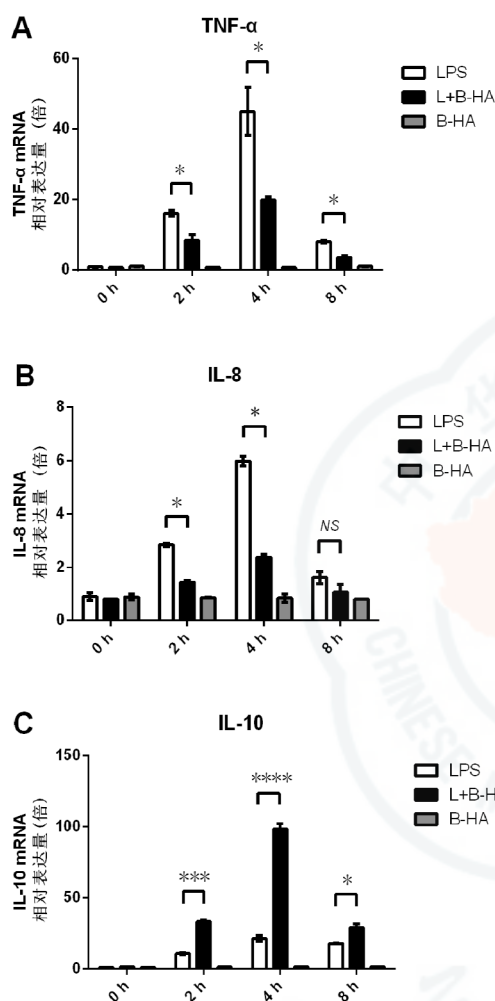
组别	TNF- α	IL-8	IL-10
空白组	1.11 \pm 0.08	1.33 \pm 0.20	0.99 \pm 0.00
LPS组	38.48 \pm 1.47	62.07 \pm 1.93	2.27 \pm 0.16
LPS + B-HA 5 mg/ml组	35.74 \pm 2.86	56.87 \pm 4.52	3.28 \pm 0.05
LPS + B-HA 10 mg/ml组	33.57 \pm 1.37	56.35 \pm 3.63	3.77 \pm 0.14
LPS + B-HA 20 mg/ml组	24.41 \pm 1.94	35.76 \pm 4.19	4.99 \pm 0.07
t 值	5.7810	5.6950	15.2300
P 值	0.0290	0.0300	0.0040

(图1)。结果表明,与LPS组相比,L+B-HA组TNF- α 、IL-8的表达量显著下降,IL-10的表达显著增加,且均在4 h达高峰,分别为 19.91 ± 0.88 、

2.23 ± 0.13 和 98.41 ± 3.82 (P 均 < 0.05)。

三、B-HA对LPS诱导的THP-1细胞培养上清中细胞因子在蛋白表达水平的影响

本研究除观察B-HA不同浓度和不同作用时间对细胞炎症因子mRNA的影响,还测定了THP-1细胞培养上清中细胞因子蛋白的表达水平。结果表明,L+B-HA20 mg/ml组中TNF- α 和IL-8蛋白表达较LPS组显著下降,分别为 $(1\ 609.00 \pm 75.66)$ pg/ml和 (213.10 ± 9.14) pg/ml;IL-10蛋白表达量显著增高,为 (496.30 ± 41.92) pg/ml,差异均具有统计学意义(图2)。



注: A图: 与LPS组比, 4 h达高峰 ($t = 5.17$ 、 $P = 0.0354$); B图: 与LPS组比, 4 h达高峰 ($t = 23.47$ 、 $P = 0.0018$); C图: 与LPS组比, 4 h达高峰 ($t = 29.71$ 、 $P = 0.0000$)

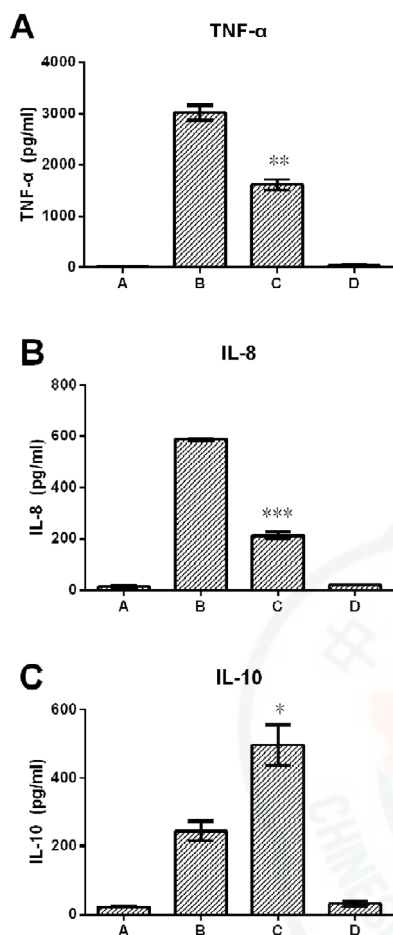
图1 B-HA 20 mg/ml在不同时间点对LPS诱导的THP-1细胞中细胞因子mRNA的影响

讨 论

多项研究表明,炎症和组织损伤产生的HA片段被广泛看作是一种内源性的“危险信号”或“损伤相关的分子模式”^[12],能够启动固有免疫和适应性免疫。HA片段对炎症反应的作用取决于HA的分子量及组织来源^[13-17]。有学者发现,200~500 kDa的HA片段能增加炎症因子的释放^[14],HA低聚体(50 kDa)能促进TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达^[18]。而在LPS诱导的小鼠模型中,低于500 kDa的HA片段能明显抑制支气管肺泡液中炎症细胞的募集和炎症因子的表达,减轻肺损伤严重程度^[19]。本研究应用经人透明质酸酶PH20处理的重组B-HA,观察其对LPS诱导的人树突状细胞和巨噬细胞炎症反应的影响。结果表明,B-HA对LPS诱导的人巨噬细胞炎症反应具有明显的抑制作用。而对人DC细胞的炎症反应无显著影响,提示B-HA对人炎性细胞的抗炎作用具有一定的选择性。其机制可能与DC细胞的主要作用是抗原提呈,而巨噬细胞作为效应细胞^[20]能释放大量炎症因子、H₂O₂和NO等有关。

表3 DC中各组细胞因子mRNA的表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-8	IL-10
空白组	0.93 ± 0.06	0.94 ± 0.04	0.94 ± 0.05
LPS组	192.00 ± 0.66	34.42 ± 2.85	2.41 ± 0.14
LPS + B-HA 5 mg/ml组	257.70 ± 32.36	38.98 ± 2.80	1.92 ± 0.30
LPS + B-HA 10 mg/ml组	143.80 ± 10.89	32.64 ± 1.20	2.60 ± 0.28
LPS + B-HA 20 mg/ml组	183.00 ± 6.98	27.63 ± 1.82	3.00 ± 0.09
t 值	1.9060	1.3590	1.6860
P 值	0.1970	0.3071	0.1904



注: A: 空白组; B: LPS组; C: LPS + B-HA组; D: B-HA组; A图: 与LPS组比较, $t = 11.04$, $P = 0.0080$; B图: 与LPS组比较, $t = 38.74$, $P = 0.0007$; C图: 与LPS组比较, $t = 5.434$, $P = 0.0320$

图2 B-HA对LPS诱导的THP-1细胞培养上清中细胞因子蛋白表达水平的影响

炎症反应是病原体、各种理化损伤或炎症诱导剂所诱发的一系列病理生理反应, 其最终结局取决于促炎因子和抗炎因子相互调节的动态平衡^[21]。TNF- α 、IL-1和IL-8为常见的炎症促炎因子, 在炎症发生初期和进展期其水平明显增高, 主要促进炎症的进展; IL-10是免疫细胞(如巨噬细胞)产生的一种强有力的抗炎因子, 在炎症和适应性免疫应答调节过程中起重要作用^[22-24]。IL-10水平在炎症过程的后期显著增高, 主要限制炎症进展。本研究表明, THP-1细胞经B-HA处理后, LPS诱导的促炎因子得到有效抑制, 抑炎因子水平明显提高, 提示B-HA是通过抑制促炎因子和抗炎因子的双重调节而发挥较强的抗炎作用。

近年研究表明, 应用活化的人体细胞外基质片段来调节机体的炎症反应可能是比较安全有效的治疗手段^[25]。本研究应用的经过特殊修饰处理的重组B-HA片段分子量小, 可显著抑制炎症反应, 并可大量生产, 有可能成为临床上治疗炎症反应性疾病的新的抗炎药物, 尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Hill DR, Rho HK, Kessler SP, et al. Human milk hyaluronan enhances innate defense of the intestinal epithelium[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(40):29090-29104.
- [2] Liang J, Jiang D, Noble PW. Hyaluronan as a therapeutic target in human disease[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 97:186-203.
- [3] Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1):221-264.
- [4] Walicová V, Gajdziok J, Gajdošová M, et al. The influence of hyaluronan addition on thickness, weight, uniformity of mass and water content of mucoadhesive films[J]. *Ceska Slov Farm*, 2016, 65(3):94-98.
- [5] Campo GM, Avenoso A, Campo S, et al. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(4):480-490.
- [6] Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair[J]. *Matrix Biol*, 2002, 21(1):25-29.
- [7] Wang Y, Han G, Guo B, et al. Hyaluronan oligosaccharides promote diabetic wound healing by increasing angiogenesis[J]. *Pharmacol Rep*, 2016, 68(6):1126-1132.
- [8] 赵含丹, 惠觅宙. 生物活性透明质酸片段治疗慢性咽炎初步探讨[J]. *临床军医杂志*, 2014, 42(8):864-865.
- [9] 陈丹, 王小东, 童静植, 等. 三种分离人外周血单核细胞方法的比较[J]. *天津医科大学学报*, 2014, 20(6):483-485.
- [10] 姚康, 葛均波, 孙爱军, 等. 高糖对人单核细胞源树突状细胞分化成熟和免疫功能的影响及其机制研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(1):60-64.
- [11] Park EK, Jung HS, Yang HI, et al. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli[J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(1):45-50.
- [12] Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(12):826-837.
- [13] Kolar SL, Kyme P, Tseng CW, et al. Group B *Streptococcus* evades host immunity by degrading hyaluronan[J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18(6):694-704.
- [14] Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(25):18265-18275.
- [15] Huang Z, Zhao C, Chen Y, et al. Recombinant human hyaluronidase PH20 does not stimulate an acute inflammatory response and inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil

- recruitment in the air pouch model of inflammation[J]. *J Immunol*,2014,192(11):5285-5295.
- [16] Dong Y, Arif A, Olsson M, et al. Endotoxin free hyaluronan and hyaluronan fragments do not stimulate TNF- α , interleukin-12 or upregulate co-stimulatory molecules in dendritic cells or macrophages[J]. *Sci Rep*,2016,6:36928.
- [17] Wakao N, Imagama S, Zhang H, et al. Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *Neur Lett*,2011,488(3):299-304.
- [18] Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury[J]. *J Biol Chem*,2009,284(19):12762-12771.
- [19] Xu C, Chen G, Yang W, et al. Hyaluronan ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice via Toll-like receptor (TLR) 4-dependent signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*,2015,28(2):1050-1058.
- [20] Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, et al. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2[J]. *J Biol Chem*,2007,282(25):18265-18275.
- [21] Tao L, Ding Q, Gao C, et al. Resveratrol attenuates neuropathic pain through balancing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines release in mice[J]. *Int Immunopharmacol*,2016,34:165-172.
- [22] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells[J]. *Nat Rev Immunol*,2010,10(3):170-181.
- [23] Ray A, Dittel BN. Mechanisms of regulatory B cell function in autoimmune and inflammatory diseases beyond IL-10[J]. *J Clin Med*,2017,6(1):12.
- [24] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. *Annu Rev Immunol*,2001,19:683-765.
- [25] Muto J, Morioka Y, Yamasaki K, et al. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin [J]. *J Clin Invest*,2014,124(3):1309-1319.
- (收稿日期: 2016-11-20)
(本文编辑: 孙荣华)

尤娜, 褚萨萨, 朱进, 等. 生物活性透明质酸对脂多糖诱导的人树突状细胞和巨噬细胞炎症应答作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(1): 14-19.