

文章编号:1004-7220(2020)02-0202-06

渗透压对未成熟树突状细胞生物力学特性和免疫学功能的影响

石玉玲^{1,2}, 胡祖权², 闵海², 宋咏刚^{1,2}, 赵雪^{1,2}, 王贇^{1,2}, 邱炜², 吴宁^{1*}, 曾柱^{1,2*}
(贵州医科大学 1. 基础医学院; 2. 生物与工程学院, 贵州省免疫细胞与抗体工程研究中心/生物与医学工程重点实验室, 贵阳 550025)

摘要:目的 从力学生物学角度研究渗透压对未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDCs)生物力学特性和免疫功能的影响。**方法** 不同渗透压处理 imDCs 后, CCK-8 检测细胞存活率, 激光共聚焦显微镜观察细胞骨架结构的变化, 细胞电泳仪检测细胞电泳迁移率的改变, 荧光偏振法检测细胞的膜流动性, 实时荧光定量 PCR 检测免疫相关分子的表达变化, 流式细胞仪检测细胞的抗原吞噬能力。**结果** 高、低渗均会改变 imDCs 的 F-actin 结构, 甚至诱导细胞凋亡。低渗组电泳率显著高于等渗组, 高渗组电泳率低于等渗组 ($P < 0.05$)。荧光偏振结果显示, 高、低渗均会显著降低细胞的膜流动性 ($P < 0.05$); qPCR 结果发现, 高、低渗会显著上调 imDCs 免疫表型分子 CCR7、CD40、CD205、CD11a、CD11c 的表达和抗原吞噬能力 ($P < 0.05$)。**结论** 高、低渗应激会影响 imDCs 生物力学特性和免疫表型分子表达, 研究结果对深入理解 DCs 的免疫调节功能具有重要意义。

关键词: 树突状细胞; 渗透压; 生物力学特性; 免疫学功能

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2020.02.012

Effects of Osmotic Pressure on Biomechanical Properties and Immune Functions of Immature Dendritic Cells

SHI Yuling^{1,2}, HU Zuquan², MIN Hai², SONG Yonggang^{1,2}, ZHAO Xue^{1,2}, WANG Yun^{1,2}, QIU Wei², WU Ning^{1*}, ZENG Zhu^{1,2*}

(1. School of Basic Medical Sciences; 2. Immune Cells and Antibody Engineering Research Center of Guizhou Province/ Key Laboratory of Biological and Medical Engineering, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Objective To explore the effects of osmotic pressure on biomechanical properties and immune function of immature dendritic cells (imDCs) from mechanobiological viewpoint. **Methods** After treated with different osmotic pressures, the cell viability of imDCs was detected using cell counting kit-8 (CCK-8). The changes in morphology of imDCs were observed under laser scanning confocal microscope. Cell electrophoresis was applied to detect the changes in cell electrophoresis mobility. The membrane fluidity of the cells was detected by fluorescence polarization method, and the expression changes of immune-related molecules were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). The phagocytic ability of the cell was detected by flow cytometry. **Results** Both

收稿日期: 2019-03-12; 修回日期: 2019-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(11762006, 31771014, 31660258), 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2018]1412, 黔科合平台人才[2016]5676, 黔科合人才团队[2015]4021, 黔科合支撑[2019]2787号), 2011 协同创新中心(黔教合协同创新字[2015]04), 贵州省细胞与基因工程创新群体(黔教合 KY 字[2016]031)

通信作者: 曾柱, 教授, 博士生导师, E-mail: zengzhu100@sina.com; 吴宁, 副教授, 硕士生导师, E-mail: 1638210715@qq.com

* 为共同通信作者

hyperosmosis and hypoosmosis could remodel the cytoskeleton of cells, even induce apoptosis. The electrophoresis mobility of the hypoosmosis group was significantly higher than that of the normal osmolarity group, while that of the hyperosmosis group was lower than that of the normal osmolarity group ($P < 0.05$). Fluorescence polarization results showed that both hyperosmosis and hypoosmosis could significantly decrease the membrane fluidity of cells ($P < 0.05$). The results of qPCR detection showed that both hyperosmosis and hypoosmosis could significantly increase the expression of CCR7, CD40, CD205, CD11a, CD11c on the surface of DCs, and the phagocytosis of cell was increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Hypertonic and hypotonic stress can influence biomechanical properties of imDCs and expression of immune-related molecules. The research findings are important for further understanding the immune regulation function of DCs.

Key words: dendritic cells; osmotic pressure; biomechanical properties; immune function

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是体内功能最强大的抗原提呈细胞,在启动和放大天然免疫和适应性免疫应答方面发挥着关键作用^[1]。从功能上来说,DCs具有未成熟DCs(imature DCs, imDCs)和成熟DCs(mature DCs, mDCs)两个分化阶段^[2]。imDCs位于皮肤、黏膜等外周组织,其主要功能是摄取和加工抗原;获取抗原后的imDCs通过血管或淋巴管向二级淋巴组织迁移,上调CD1a、CD11c、CD40、CD80、CD83、CD86、HLA-DR和CCR7等分子,细胞骨架发生明显重组,逐步分化为mDCs。mDCs在二级淋巴组织内与幼稚T细胞发生动态的物理性相互作用,并向后者提呈获取的抗原信息,从而诱导T细胞抗原特异性增殖,启动适应性免疫应答或耐受。在发挥免疫学功能的过程中,imDCs经历了复杂的化学和物理微环境。有关细胞因子等化学因素对imDCs功能的影响已经有报道^[3-4],而细胞外基质硬度和拓扑结构、液流剪切力和渗透压等物理因素还未引起足够的重视。在生理和病理生理条件下,细胞外物理环境存在较大差异,如肿瘤组织硬度及组织间隙压力增加、肿瘤微环境渗透压增高、血管源性脑水肿和细胞毒性脑水肿中渗透压降低等,这些因素参与细胞功能的调控及疾病的发生发展^[5-8]。渗透压是细胞质与胞外环境中可扩散溶质浓度差异产生的静水压力,可以调节细胞的形态与功能。渗透压对软骨细胞的形态、刚度和功能具有调控作用^[9-10],低渗可以增强骨髓来源巨噬细胞的吞噬功能^[11],高渗还会影响imDCs的分化过程^[12]。细胞生物力学特性能够反映其结构和功能之间的关系。但是,渗透压对imDCs生物力学特性的影响尚不清楚。本文通过检测不同渗透压对imDCs生物力学特性和免疫学功能的影响,以期深

入理解渗透压对imDCs免疫学功能的调控作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI1640、胎牛血清(GIBCO公司,美国);淋巴细胞分离液、CCK-8试剂盒(北京索莱宝试剂公司);重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF)、重组人白介素4(recombinant human interleukin 4, rhIL-4)购自美国PeproTech公司;FITC-Dextran(Sigma-Aldrich公司,美国);100 mg/L链霉素、100 U/mL青霉素购自美国Hyclone公司;TMA-DPH购自Cayman公司;RT-PCR试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司,美国);qPCR试剂盒购自Takara公司;qPCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 单核细胞和DCs表型鉴定

根据本课题组先前建立的实验方法分离CD14⁺单核细胞,再经细胞因子诱导,即可分化为imDCs,并对细胞的表型和形态进行鉴定^[13]。

1.3 细胞处理

配制355、325、295、265、235 mOsm/kg渗透压,分别作用imDCs 30、60 min,以295 mOsm/kg作为对照。

1.4 细胞F-actin结构观察

经不同渗透压处理后的细胞,用4.7%多聚甲醛固定20 min,PBS漂洗3次;加入200 μ L含0.1% Triton X-100作用5 min,PBS漂洗3次;加入200 μ L含1% BSA的PBS,室温孵育30 min,PBS漂洗3次;加入罗丹明标记的鬼笔环肽稀释液,混匀后,避光孵育20 min;PBS漂洗1次,将细胞重悬于50 μ L PBS中,4 $^{\circ}$ C避光保存样品;激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 细胞活性检测

收集细胞,在96孔板中接种细胞悬液(100 μL /孔),每孔加入10 μL CCK-8溶液,每个处理组做3个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养2 h后,用酶标仪检测不同处理组在450 nm处的吸光度。通过(处理组-空白组)/(对照组-空白组)计算细胞相对存活率。

1.6 细胞抗原吞噬功能检测

离心收集细胞,用培养液重悬细胞。取3组培养皿,分别为阴性对照组、空白组、实验组进行标记。在阴性对照组、实验组的平皿中分别加入0.4 mL细胞悬液和0.4 mL FITC-Dextrans进行混匀。空白组中加入0.4 mL细胞悬液和0.4 mL PBS混匀。空白组、实验组放置在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育1.5 h,阴性对照组放置在冰上,1.5 h后用0.8 mL 3.7%多聚甲醛在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中固定15~20 min,用PBS清洗两遍(1 500 r/min, 5 min),用0.4 mL PBS重悬细胞。将细胞悬液,移入流式管中,用流式细胞仪进行检测。

1.7 细胞电泳率的检测

1 000 r/min离心5 min收集细胞,用10%生理蔗糖溶液重悬,将细胞悬液注射入电泳槽中,通过显微细胞电泳系统检测不同渗透压处理后 imDCs泳动相同距离所需要的时间以及电压,通过公式计算细胞电泳迁移率(electrophoresis mobility, EPM):

$$EPM = (S/t) / (U/L)$$

式中: S 为细胞的泳动路程; t 为泳动所需要的时间, U 为电极两端电压; L 为电泳槽电极间的距离(4.2 cm)。

1.8 imDCs 细胞膜流动性检测

离心收集经不同渗透压处理30 min的细胞,各组用0.8 mL PBS重悬,避光加入相同体积2 $\mu\text{mol/L}$ DPH孵育30 min。PBS清洗两遍,1 mL PBS重悬细胞。用荧光光谱仪的时间扫描测定细胞在不同偏振角度时的荧光强度 I ,设置激发波长(λ_{ex})为360 nm,发射波长(λ_{em})为430 nm,发射狭缝(EM slit)为5 nm,激发狭缝(EX slit)为5 nm,电压设置为400 V,扫描时间为10 s,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴,每个样品设置扫描3次。根据公式计算荧光偏振度:

$$P = (I_{\text{W}} - GI_{\text{VH}}) / (I_{\text{W}} + GI_{\text{VH}})$$

其中:校正因子 $G = I_{\text{HV}}/I_{\text{HH}}$; I_{W} 为起偏和检偏器光轴同为垂直方向时测得的荧光强度; I_{VH} 为起偏和检偏器光轴分别为垂直和水平方向时测得的荧光强度;

I_{HV} 起偏和检偏器光轴分别为水平和垂直方向时测得的荧光强度; I_{HH} 起偏和检偏器光轴同为水平方向测得的荧光强度。

1.9 qPCR 检测基因相对表达量

采用Trizol法提取经不同渗透压处理的细胞mRNA,通过逆转录试剂盒将其反转录成cDNA,以此作为模板,进行qPCR反应。逆转录反应条件设置如下:42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min终止反应。PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$,30 s;95 $^{\circ}\text{C}$,10 s;60 $^{\circ}\text{C}$,30 s;72 $^{\circ}\text{C}$,30 s;40个循环。相对含量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta\Delta Ct = (CT_3 - CT_1) - (CT_2 - CT)$, CT_3 为非等渗处理组目的基因的 CT 值, CT_2 为等渗对照组目的基因的 CT 值, CT_1 、 CT 分别为非等渗组、等渗组内参基因的 CT 值。

表1 引物序列

Tab.1 Real time qPCR primers

| 基因 | 引物(5'-3') | 扩增长度/bp |
|-------|----------------------------|---------|
| CCR7 | 上游:AGACCATGACCCGATACCTACC | 119 |
| | 下游:GCAAAAGTGGACACCCGAAGA | |
| CD40 | 上游:TCACCTCGCTATGGTTCGTC | 192 |
| | 下游:GGAAGGCATTCCGTTTCAGT | |
| CD205 | 上游:AGATGTGGAGGTGGTTGTCA | 173 |
| | 下游:TGGGCGTCTTATTGTAGGGA | |
| CD11a | 上游:TGAGAGCAGGCTATTTGGGTTAC | 100 |
| | 下游:CGGCCCATGTGCTGGTAT | |
| CD11c | 上游:AGCAGCCACGAACAATTCAC | 182 |
| | 下游:GAGACCTCCACATCCATCCA | |
| GAPDH | 上游:GCACCGTCAAGGCTGAGACC | 138 |
| | 下游:TGCTGAAGACGCCACTGGA | |

1.10 统计学分析

所有实验独立至少重复3次。实验结果以均数 \pm 标准差形式表示。两组数据采用统计学软件SPSS 20.0分析。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞活性检测

imDCs经不同渗透压处理30、60 min后,通过CCK-8法检测细胞存活率。与对照组相比,高渗、低渗均会使得细胞存活率降低($P < 0.05$),见图1。

2.2 细胞骨架

imDCs经不同渗透压处理30 min后,通过激光共聚焦显微镜观察细胞骨架结构的变化。经高、低渗处理后的imDCs细胞骨架结构发生明显的重塑,F-actin表达上调($P < 0.05$),见图2。

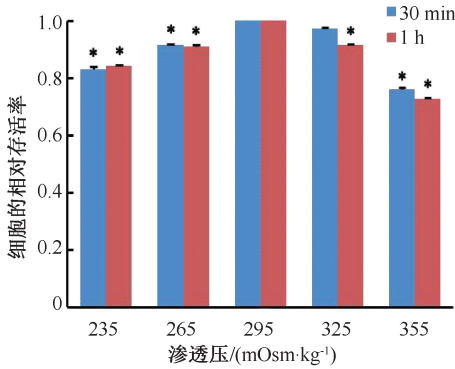
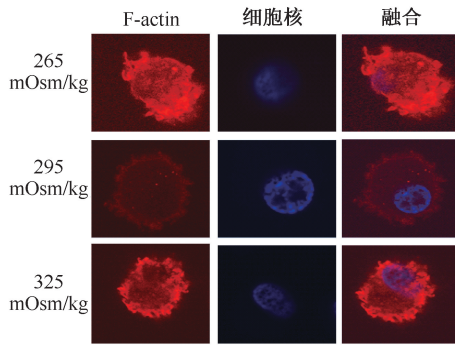
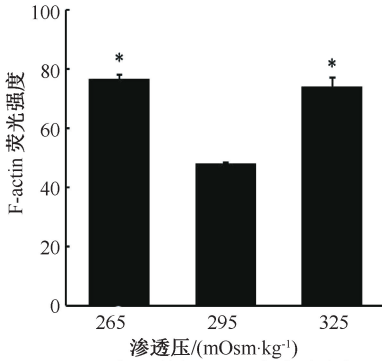


图1 imDCs 细胞相对存活率 ($n=4$, $*P<0.05$)

Fig.1 Relative viability of imDCs



(a) 细胞骨架变化 ($\times 600$)



(b) 细胞骨架F-actin表达量改变

图2 渗透压重组 imDCs 的细胞骨架结构 ($n=3$, $*P<0.05$)

Fig.2 F-actin cytoskeleton of imDCs reorganized by osmotic pressure (a) Changes of the cytoskeleton ($600\times$), (b) Changes in the expression of F-actin cytoskeleton

2.3 细胞电泳率检测

imDCs 经 325、295、265 mOsm/kg 分别处理 30 min 后,高渗透压导致细胞的电泳率降低 ($P<0.05$),而低渗透压则使电泳率升高 ($P<0.05$),见图 3。

2.4 细胞膜流动性的检测

imDCs 经 325、295、265 mOsm/kg 分别作用

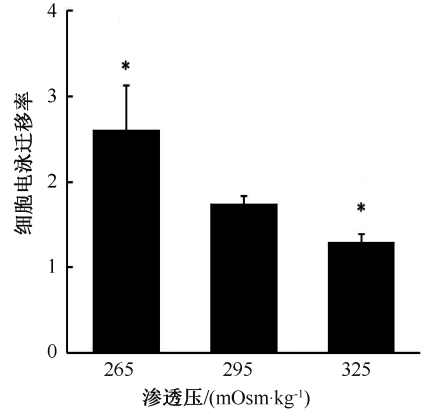


图3 渗透压对 imDCs 电泳率的影响 ($n=5$, $*P<0.05$)

Fig.3 Effect of osmotic pressure on the electrophoretic mobilities of imDCs

30 min 后,细胞的荧光偏振度 P 值增大,即非等渗使得细胞膜流动性降低,膜分子运动变慢 ($P<0.05$),见图 4。

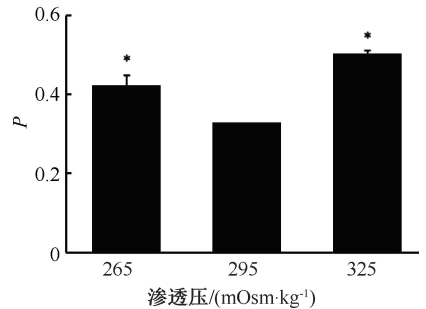


图4 渗透压对 imDC 荧光偏振度的影响 ($n=5$, $*P<0.05$)

Fig.4 Effects of osmotic pressure on fluorescence polarization of imDCs

2.5 细胞吞噬功能检测

imDCs 的主要功能是摄取并吞噬抗原,将细胞经不同渗透压处理 30 min 后,结果显示低渗、高渗会使得 imDCs 的抗原吞噬能力不同程度增加 ($P<0.05$),见图 5。

2.6 细胞免疫相关基因表达的检测

imDCs 经不同渗透压处理 30 min 后,imDCs 表面分子 CCR7、CD40、CD205、CD11a、CD11c 表达显著上调 ($P<0.05$),见图 6。

3 讨论与结论

DCs 在免疫系统中的独特地位使其成为免疫相关疾病的逻辑治疗靶点。近年来,基于 DCs 的免疫治疗被认为是最有可能攻克肿瘤的治疗方法之

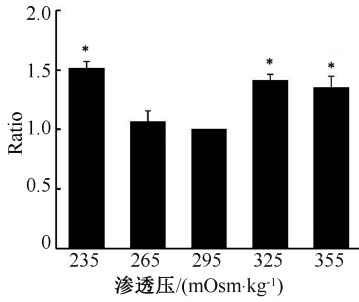


图5 渗透压对 imDCs 抗原吞噬能力的影响 ($n=3$, $*P<0.05$)

Fig.5 Effects of osmotic pressure on endocytotic activities of imDCs

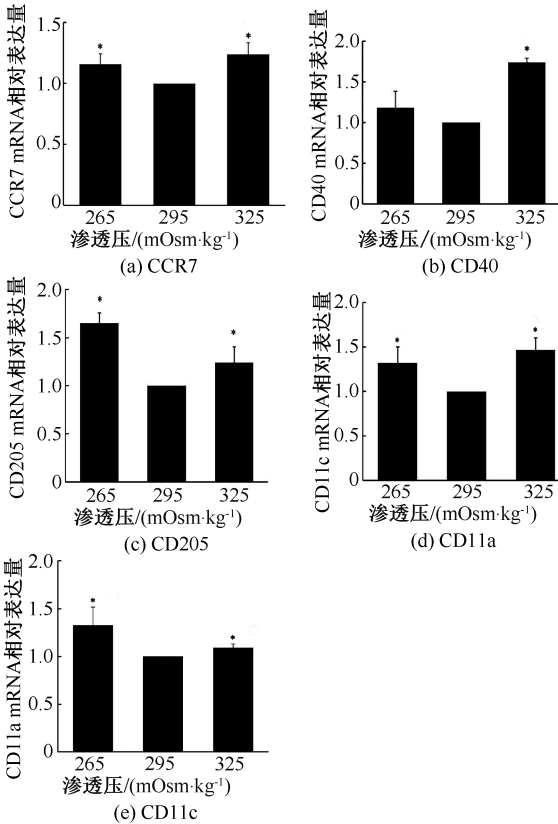


图6 渗透压对 imDCs 表面分子表达的影响 ($n=5$, $*P<0.05$)

Fig.6 The effect of osmotic pressure on the expression levels of immune phenotype molecules on imDCs (a) CCR7, (b) CD40, (c) CD205, (d) CD11a, (e) CD11c

—^[14],但是其临床试验效果与理论预期相差甚远,诸如肿瘤抗原的选择、过继回输的位点和时间间隔、肿瘤免疫逃逸和 DCs 迁移能力低下等问题还有待深入研究^[14]。目前,针对这些问题的研究主要集中在肿瘤来源的抑制性细胞因子等化学因素对 DCs 功能的影响。从生物力学角度来看,细胞的生物力学特性可以反映其结构和功能之间的关系,但是如

流体剪切力、细胞外基质硬度、静压力等体内物理因素对细胞功能的调控作用尚不清楚,特别是在特定病理生理条件下,机体生物力学环境变化导致的细胞功能变化值得深入研究^[15-17]。本文研究了高、低渗对 imDCs 存活率、物理特性(电泳率、膜流动性)、免疫功能(吞噬能力、表面分子表达)及细胞骨架结构的影响。

无论是低渗还是高渗环境下,imDCs 存活率都出现了明显的下降,说明细胞在渗透压的作用下可能发生了破裂,但是 70%~80% 细胞仍然存活;同时,imDCs 的细胞骨架 F-actin 结构发生重塑,并上调表达量,这可能是细胞为了平衡细胞内外压力的变化并保持细胞质膜完整性而表现出的应激反应。细胞骨架与其生物力学特性、免疫功能密切相关。生理条件下,细胞膜表面带负电,主要来源于唾液酸水解后剩余的羧基,可以用 EPM 来反映。在高渗和低渗环境下,imDCs 的 EPM 分别增加和减少,说明细胞膜表面的负电荷分别增加和减少,提示 imDCs 膜表面唾液酸水解效率发生显著变化,可能会影响其在体内的迁移过程。膜流动性是指细胞膜脂分子的运动快慢,可以用荧光偏振度来反映,与脂质成分、脂质分子和蛋白质分子的相互作用以及环境因素等有关^[18]。高渗、低渗均使得细胞的荧光偏振度升高,说明其膜脂分子运动变慢,可能会影响 imDCs 与其他细胞的相互作用和抗原吞噬过程。在机体内,imDCs 的主要功能是发现、摄取和处理抗原。在低渗、高渗环境下,imDCs 抗原吞噬能力和免疫表型分子都不同程度地上调,可能与静压力导致 imDCs 的抗原摄取效率和应激反应有关,但是其潜在的机制还需要进一步深入研究。

渗透压可以影响 imDCs 的生物力学特性和免疫学功能^[4,19-20]。本文结果表明,渗透压等物理因素也是调控 imDCs 免疫功能的一个重要方面,对深入理解 DCs 免疫调节功能和提高基于 DCs 免疫相关疾病的临床治疗意义重大。

参考文献:

[1] MILDNER A, JUNG S. Development and function of dendritic cell subsets [J]. *Immunity*, 2014, 40 (5): 642-656.
 [2] 胡祖权, 夏雪, 杨晓芳, 等. 基于树突状细胞的抗肿瘤免疫治疗[J]. *贵阳医学院学报*, 2014, 39 (6): 783-787.
 [3] XIA L, DONG Z, ZHANG Y, *et al*. Interleukin-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediates the

- upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in RAW264.7 cells: A process in which p38 mitogen-activated protein kinase signaling has an important role [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2016, 49 (3): 344-351.
- [4] ZENG Z, XU XF, CHEN D. Dendritic cells: Biophysics, tumor microenvironment and chinese traditional medicine [M]. Netherlands; Springer, 2015.
- [5] TUNKEL AR, SCHELD WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1993, 6(2): 118-136.
- [6] VOUTOURI C, STYLIANOPOULOS T. Evolution of osmotic pressure in solid tumors [J]. *J Biomech*, 2014, 47 (14): 3441-3447.
- [7] NAJAFI M, GORADEL NH, FARHOOD B, *et al.* Tumor microenvironment: Interactions and therapy [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5700-5721.
- [8] STYLIANOPOULOS T, JAIN RK. Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110 (46): 18632-18637.
- [9] NGUYEN TD, OLOYEDE A, SINGH S, *et al.* Investigation of the effects of extracellular osmotic pressure on morphology and mechanical properties of individual chondrocyte [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2016, 74 (2): 229-240.
- [10] MENNENS SFB, BOLOMINI-VITTORI M, WEIDEN J, *et al.* Substrate stiffness influences phenotype and function of human antigen presenting dendritic cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 17511.
- [11] YAN Y, DING Y, MING B, *et al.* Increase in hypotonic stress-induced endocytic activity in macrophages via CIC-3 [J]. *Mol Cells*, 2014, 37 (5): 418-425.
- [12] CHESSA F, MATHOW D, WANG S, *et al.* The renal microenvironment modifies dendritic cell phenotype [J]. *Kidney Int*, 2016, 89 (1): 82-94.
- [13] 郑勤妮, 许筱莉, 胡祖权, 等. 转化生长因子- β 1 对人成熟树突状细胞生物物理特性和迁移能力的影响 [J]. *贵阳医学院学报*, 2014, 39 (6): 788-793.
- [14] HYI D, APPEL S. Current status and future perspectives of dendritic cell-based cancer immunotherapy [J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78 (2): 167-171.
- [15] STEINMAN RM, JACQUES B. Taking dendritic cells into medicine [J]. *Nature*, 2007, 449 (9): 419-426.
- [16] 郭萌萌, 余洋, 叶重阳, 等. 流体剪应力对成骨分化不同阶段细胞 Piezo1 基因表达的影响 [J]. *医用生物力学*, 2018, 33 (6): 537-543.
- GUO MM, YU Y, YE CY, *et al.* Effects of fluid shear stress on gene expression of piezo1 in the cells during osteogenic differentiation [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33 (6): 537-543.
- [17] 刘思璐, 刘晓玲, 吴建华, 等. 流体剪应力作用下 VWF-A1A2A3 介导的血小板 P-选择素的原位表达 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32 (2): 188-193.
- LIU SL, LIU XL, WU JH, *et al.* VWF-A1A2A3-mediated expression of P-selectin in platelets under flow shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32 (2): 188-193.
- [18] 吴翠芳. 生理层流来源剪切力对树突状细胞的生物物理特性和免疫功能的影响 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2016.
- [19] WANG J, LU D, MAO D, *et al.* Mechanomics: An emerging field between biology and biomechanics [J]. *Protein Cell*, 2014, 5(7): 518-531.
- [20] PAGEON SV, GOVENDIR MA, KEMPE D, *et al.* Mechanoimmunology: Molecular-scale forces govern immune cell function [J]. *Mol Biol Cell*, 2018, 29(16): 1919-1926.