

卵转铁蛋白对树突状细胞成熟的影响

赵曼云, 徐明生, 饶红花, 戴艺, 刘琳

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省天然产物与功能食品重点实验室, 江西南昌 330045)

摘要: 为考察卵转铁蛋白(OVT)对髓源性树突状细胞(BMDCs)成熟的影响。采用不同浓度 OVT 单独刺激和脂多糖(LPS)+不同浓度 OVT 共刺激第 6 d 小鼠 BMDCs 48 h, 通过倒置显微镜观察细胞形态, 并用流式细胞仪测定各组 CD11c⁺ 细胞比例以及 DCs 表面 MHC-II, CD80 和 CD40 分子表达量。结果表明, 不同浓度 OVT 组刺激的 DCs 周围毛刺状突起增加, 呈现典型的树突状细胞形态, 且上调 CD11c⁺ 细胞比例以及 DCs 表面 MHC-II、CD80 和 CD40 分子表达量。LPS+不同浓度 OVT 组中, 低浓度(≤25 μg/mL)组可提高 CD11c⁺ 细胞比例, 上调 MHC-II、CD80 和 CD40 表达量; 高浓度(>25 μg/mL)组则能下调 CD11c⁺ 细胞比例和 DCs 表面 MHC-II、CD80 和 CD40 表达量。因此, 不同浓度 OVT 均能刺激 DCs 的成熟; LPS+不同浓度 OVT 共刺激 DCs, 能显著提高 DCs 的成熟度, 但呈现剂量依赖型, 即低浓度时, 两者表现出协同作用, 高浓度时两者表现出拮抗作用。

关键词: 卵转铁蛋白; 树突状细胞; 骨髓; 表型

文章编号: 1673-9078(2015)8-37-41

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.007

Effects of Ovotransferrin on the Maturation of Mouse Bone Marrow-derived Dendritic Cells

ZHAO Man-yun, XU Ming-sheng, RAO Hong-hua, DAI Yi, LIU Lin

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Key Laboratory of Natural Product and Functional Food of Jiangxi, Nanchang 330045, China)

Abstract: To explore the effect of ovotransferrin (OVT) on the maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) *in vitro*, different concentrations of OVT as well as lipopolysaccharides (LPS) + different concentrations of OVT were used to stimulate a 6-day culture of BMDCs for 48 hours. Changes in DC morphology were observed using inverted phase microscopy, whereas the proportion of CD11c⁺ cells and expression of MHC-II, CD80, and CD40 molecules were determined by flow cytometry (FC). The results showed that different concentrations of OVT caused an increase in finer dendritic protrusions with the typical morphology of DCs compared to the negative control. The proportion of CD11c⁺ cells and expression of MHC-II, CD80, and CD40 molecules were all up-regulated as well. Low concentration (≤ 25 μg/mL) of OVT+LPS up-regulated the proportion of CD11c⁺ cells and the expression of MHC-II, CD80, and CD40, while high concentration (> 25 μg/mL) of OVT+LPS inhibited both, the proportion of CD11c⁺ cells and the expression of MHC-II, CD80, and CD40. In conclusion, different concentrations of OVT induced the maturation of DCs. LPS + low concentration of OVT induced a synergistic effect, while LPS + high concentration of OVT showed an antagonistic effect.

Key words: ovotransferrin; dendritic cell; bone marrow; phenotype

卵转铁蛋白(Ovotransferrin, OVT)是禽蛋蛋清中的重要生物活性物质之一, 约占蛋清中蛋白质含量的 12%, 是含有 686 个氨基酸残基的单链多肽, 分子量约为 70~78 ku, 结构与血清转铁蛋白(Serum Transferrin)和乳铁蛋白(Lactotransferrin, LF)相似。OVT 参与铁的运输与代谢, 还具有调节呼吸、细胞增殖和免疫系统

收稿日期: 2014-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260385)

作者简介: 赵曼云 (1991-), 女, 硕士研究生; 研究方向: 功能性食品开发

通讯作者: 徐明生 (1963-), 男, 教授, 研究方向: 畜产品加工的功能^[1]。徐明生等^[2]研究 OVT 体外免疫活性发现, OVT 能促进正常脾淋巴细胞分泌 IL-2, 在体外培养条件下, OVT 对正常小鼠免疫细胞的免疫作用有促进作用。林日新等^[3]研究发现, 口服 OVT 能有效促进环磷酰胺所致的免疫低下小鼠 T 细胞向 Th1 方向分化, 从而纠正免疫低下小鼠 Th1/Th2 比例的失衡, 表明 OVT 能显著调节 T 淋巴细胞的免疫作用。另有体外实验中, OVT 促使嗜异性粒细胞产生 IL-6 和 MMP, 但不会导致细胞失活, 表明 OVT 能够调节嗜异性粒细胞的功能^[4]。T 淋巴细胞表面存在的

多种表面抗原和表面受体^[5], 当 OVT 刺激细胞时, 细胞产生的上游信号分子传递给 T 淋巴细胞, 诱导 T 淋巴细胞向不同方向分化, 继而影响机体免疫效应。

DCs 是体内重要的抗原提呈细胞, 在体内分布广泛并多以不成熟的状态存在。未成熟 DCs (immature dendritic cells, iDCs) 受到外源抗原刺激时, iDCs 直接吞噬抗原或与其表面 Toll 样受体结合, 随后 iDCs 表型不断改变, iDCs 在表面趋化因子 CCR7 的作用下迁移到次级淋巴组织并成熟同时释放多种信号分子^[6-7], 接着次级淋巴组织中的 T 淋巴细胞接收上游信号刺激和抗原分子, 分化成相应的效应 T 细胞后发生免疫应答或免疫耐受, 保障机体健康。成熟的 DCs 为 CD11c⁺ 细胞, 因此 CD11c⁺ 细胞比例反映 DCs 的成熟度。同时, DCs 成熟也伴随表型的改变, 表面 MHC-II 型分子和共刺激分子 CD80, CD40 表达量会随着 DCs 的成熟度增加而上升^[8-9], 因而可用于判断 DCs 的成熟。

研究表明, DCs 能够有效将抗原提呈给 T 淋巴细胞, 诱发 T 淋巴细胞产生免疫作用, 且 OVT 能通过刺激细胞释放一系列信号分子诱导 T 淋巴细胞发挥免疫效应。但 OVT 是否能诱导 DCs 成熟, 释放一系列信号分子, 继而引发 T 淋巴细胞产生免疫调节作用, 目前在此方面报道尚属缺乏状态, 因而本文通过研究 OVT 对小鼠骨髓源 DCs 成熟的影响, 为 OVT 在免疫调节方面的进一步研究提供理论依据, 此外, 对禽蛋的深度开发利用也具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物实验

Km 小鼠, 清洁级, 4~6 周龄, 18~22 g, 雌性, 购于江西中医药大学实验动物中心。实验动物质量合格证号: JZDWNQ: 2014-0183。

1.1.2 试剂

RPMI1640 美国 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS) Biological Industries; PE-CD11c, FITC-MHCII, FITC-CD11c, PE-CD80, PE-CD40, BD Pharmingen 公司; 重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、重组小鼠白细胞介素 4 (IL-4), 美国 PeproTech 公司; 磷酸盐缓冲液(PBS), 北京全式金生物技术有限公司; 卵转铁蛋白, 纯度 99% 美国 Sigma 公司; 脂多糖(LPS), Solarbio 公司

1.1.3 主要仪器设备

CO₂ 培养箱, 美国 Thermo electron 公司; 3110 Series II 超净工作台, 新加坡 Streamline Laboratory; 低速离心机, 上海安亭科学仪器厂; XD-202 倒置生物显微镜, 南京江南永新光学公司; 流式细胞仪 (BD FACSCalibur), 美国 BD Biosciences 公司; Milli-Q50 超纯水净化系统 美国 Millipore 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂配制

OVT 溶液: 准确称取 144 mg 卵转铁蛋白标准品, 加入超纯水溶解, 稀释至 30 mL, 配制成 4.8 mg/mL 的 OVT 母液, 无菌条件下过 0.22 μm 滤膜。母液经不同的稀释度配制成 2.4、1.2、0.6、0.3、0.12 mg/mL 的 OVT 溶液分装备用。

LPS 溶液: 向装有 10 mg 脂多糖粉末管中加入适量的超纯水, 充分溶解后稀释到 50 mL, 无菌条件下过 0.22 μm 滤膜即得 0.2 mg/mL LPS 母液。该 LPS 母液稀释到 0.012 mg/mL 分装备用。

红细胞裂解液: 150 mM NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA。

1.2.2 DCs 的分离纯化

参照 Ina^[10]等与郑磊^[11]等方法, 并稍微有点改进。取 4~6 周龄 Km 小鼠, 颈部脱臼处死, 无菌条件下取出股骨和胫骨, 1 mL 一次性注射器吸取 PBS 冲洗骨髓至发白, 得到的细胞悬液过 200 目尼龙网筛后收集, 1200 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 沉淀加入 10 倍体积的红细胞裂解液, 反复吹打混匀, 静置, 8 min 后立即加入 3 倍体积的 PBS 溶液, 混匀, 1200 r/min, 离心 5 min。弃上清, PBS 溶液清洗 3 次。RPMI1640 培养液调整细胞密度为 4×10⁶/mL, 接种到 24 孔培养板中, 每孔 1 mL, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 h 后全量换液以除去未贴壁细胞, 并用含以下细胞因子的 RPMI1640 完全培养基 (10% 已灭活 FBS, 20 ng/mL rm GM-CSF 和 IL-4, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素) 培养。第 3 d 半量换液。

1.2.3 OVT 对 DCs 细胞毒性试验

第 6 d, 收集 iDCs 接种到 96 孔板上, 调整细胞浓度为 5×10⁵ cells/mL, 随后加入不同浓度 OVT 溶液, 每孔 100 μL, 使终浓度分别为 10、25、50、100、200 和 400 μg/mL, 37 °C, 5% CO₂ 孵育 48 h, 然后每孔加入 20 μL MTT, 继续培养 4 h 后, 吸出孔中的液体, 每孔加入 150 μL DMSO 溶解产生的蓝紫色结晶, 随后立即在 570 nm 处测吸光度。

活率Vitality / % = 实验组OD / 对照组OD值

1.2.4 OVT 对细胞表型的影响

实验分为 OVT 组、LPS+OVT 组、阳性和阴性对照组。取培养 6 d 的细胞，OVT 组：每孔分别加入 100 μL 浓度为 0.12、0.3、0.6、1.2、2.4 mg/mL 的 OVT 溶液，再每孔加入 100 μL RPMI1640 培养液，得到每孔 OVT 终浓度分别为 10、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ ；LPS+OVT 组：每孔先加 100 μL 浓度为 0.012 mg/mL 的 LPS 溶液，再分别加入 100 μL 浓度为 0.12、0.3、0.6、1.2、2.4 mg/mL 的 OVT 溶液，得到 LPS+OVT 终浓度分别为：1 $\mu\text{g/mL}$ (LPS) + 10 $\mu\text{g/mL}$ (OVT)、1 $\mu\text{g/mL}$ (LPS) + 25 $\mu\text{g/mL}$ (OVT)、1 $\mu\text{g/mL}$ (LPS) + 50 $\mu\text{g/mL}$ (OVT)、1 $\mu\text{g/mL}$ (LPS) + 100 $\mu\text{g/mL}$ (OVT)、1 $\mu\text{g/mL}$ (LPS) + 200 $\mu\text{g/mL}$ (OVT)；阳性对照组：加入 100 μL 浓度为 0.012 mg/mL 的 LPS 溶液和 100 μL RPMI1640 培养液，得到终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 处理组；阴性对照组：加入 200 μL RPMI1640 培养液。各组细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养箱中培养。48 h 后将各孔中细胞轻轻吹打下来，收集到 EP 管中，1200 r/min，离心 5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，吸出上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用，细胞用 PBS 清洗 2 次，染色缓冲液重悬，调整细胞密度为 5×10^5 cells/mL，细胞先用 10% (V/V) 山羊血清在 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 15 min，后加入 PE-CD11c，FITC-MHC-II；FITC-CD11c，PE-CD80，PE-CD40 单克隆抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，各单克隆抗体用纯细胞单染为后续分析做准备。最后，抗体标记的细胞用染色缓冲液清洗 3 次，并用 500 μL 染色缓冲液重悬，随后上流式细胞仪检测细胞表型（若不能马上测定，可加入 0.5 mL 1% 的多聚甲醛固定）。

1.2.5 统计学分析

采用 DPS 数据处理系统 Duncan 新复极差多重比较法进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 OVT 对 DCs 的细胞毒性实验

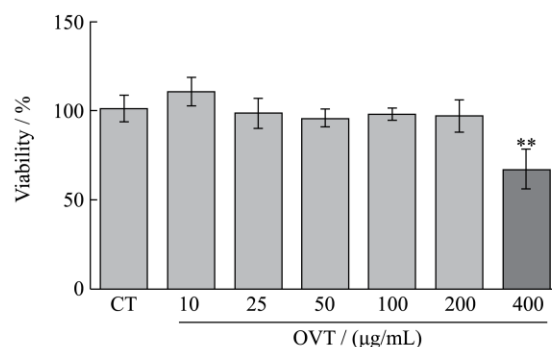


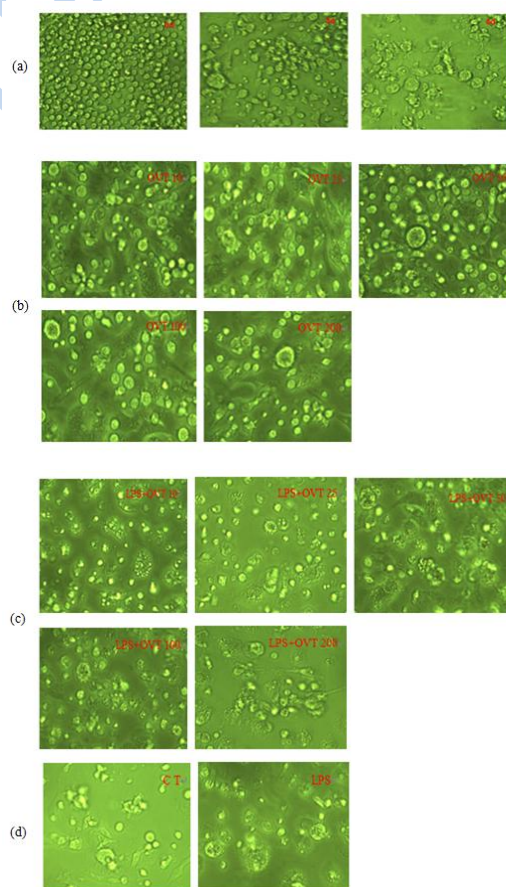
图 1 不同浓度 OVT 对 DCs 的活力影响

Fig.1 Effects of different concentrations of OVT on the viability of DCs

注：与阴性对照组(CT)比较，*表示 $p < 0.05$ ；**表示 $p < 0.01$ 。

从图 1 可以看出，当 OVT 浓度 $\leq 200 \mu\text{g/mL}$ 时，细胞活率在 100% 左右，当 OVT 浓度为 $400 \mu\text{g/mL}$ 时，细胞活率下降到 85%，说明，浓度 $> 400 \mu\text{g/mL}$ 时，细胞死亡率大大增加，因而选用 OVT 的最高浓度为 $200 \mu\text{g/mL}$ 。

2.2 OVT 对 DCs 形态的影响



倒置相差显微镜 $\times 400$

图 2 不同组刺激后 DCs 的形态

Fig.2 Morphology of BMDC groups stimulated by different reagents

注: (a)细胞培养阶段, 0, 3, 6 d; (b)OVT 组, 6 d+48 h; (c)LPS+OVT 组, 6 d+48 h; (d)阴性和阳性对照组, 6 d+48 h。

第 0 d 取的骨髓干细胞贴壁 3 h 后, 去除未贴壁的粒细胞和淋巴细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态, 细胞形态均一, 呈圆形; 完全培养基培养到第 3 d, 半量换液, 可见细胞由贴壁变为半悬浮, 少量聚集成簇, 细胞体积变大, 边缘不规整, 有少量树突出现。第 6 d 发现, 大量细胞半悬浮生长, 簇状细胞数增多, 细胞边缘更加不规整, 呈星形或梭形不规则形状。这些细胞即为 iDCs 或 DCs 的前体细胞, 如图 2(a)。第 6 d 加入 OVT 刺激 48 h 后, DCs 周围毛刺状突起增加, 表面变得不平整, 个别细胞变大, 呈现出典型的树突状细胞形态。第 6 d 加入 LPS+不同浓度 OVT 共刺激 48 h 后, 细胞边缘更加不规整, 表面凹凸不平的现象更加明显, 细胞边缘变得不明显, 但是随着剂量的增加, 这种现象稍有缓解, 如图 2(c)。阴性对照中, 细胞体积较两种刺激组的小, 表面也较光滑, 个别细胞呈现树突状细胞形态, 说明未进行刺激时, DCs 细胞生长发育较慢。阳性对照为 LPS 刺激的反应, 与低浓度的共刺激组 (OVT 浓度 $\leq 10 \mu\text{g/mL}$) 比较可以看出, 两者细胞活率相当, 细胞不规则程度以低浓度共刺激组较高, 细胞边缘已经模糊, 与高浓度共刺激组 (OVT 浓度 $> 10 \mu\text{g/mL}$) 比较可以看出, 细胞的成熟形态以 LPS 刺激组较显著。

2.3 OVT 对 DCs 表型的影响

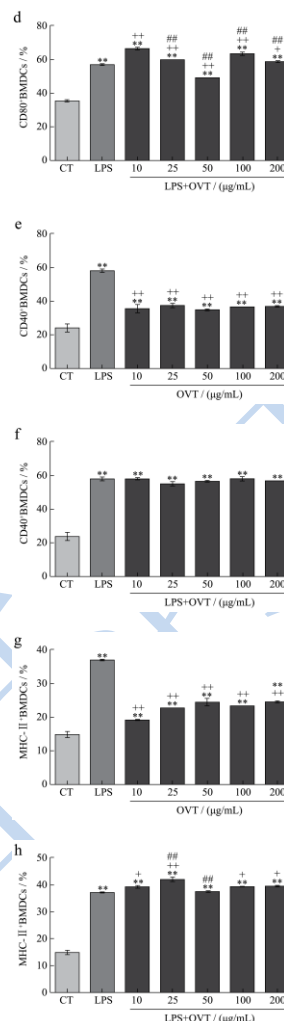
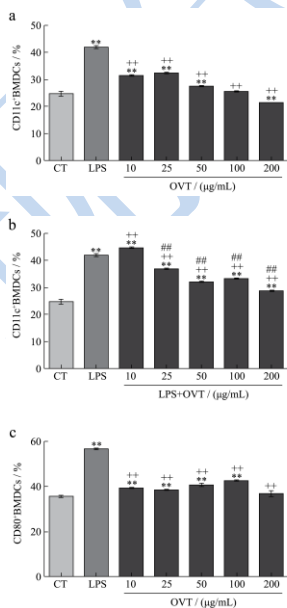


图 3 不同浓度 OVT 和 LPS+不同浓度 OVT 对 DCs 表型的影响

Fig.3 Effect of OVT and LPS+OVT stimulation on the proportion of CD11c⁺ cells

注: 与阴性对照组(CT)组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$; 与 LPS+OVT (10 $\mu\text{g/mL}$) 比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; OVT 单独刺激 DCs, CD11c⁺ 细胞比例(a), CD40(c), CD80(e), MHC- II 分子(g)表达量和 LPS+OVT 共刺激 DCs, CD11c⁺ 细胞比例(b), CD40(d), CD80(f), MHC- II 分子(h)表达量。

DCs 受到抗原刺激后成熟, 变成 CD11c⁺ 细胞, 并伴随表型 MHC-I 型分子向 MHC- II 型分子转变, 同时表面共刺激因子 CD80, CD40 表达量升高。研究发现多糖, 蛋白质, 细菌等抗原均能引发 DCs 的成熟。Danfei Huang^[12]等研究茶叶糖蛋白(TGP)刺激髓源性 DCs 中形态及表型变化, 发现髓源性 DCs 的成熟度显著增加。唐永富^[13]等研究表明, 车前子多糖能有效刺激 DCs 的成熟, 增加 CD11c⁺MHC- II⁺ 细胞的表达量。OVT 是一种糖蛋白, 因而可能对 DC 成熟有影响。从图 3a 可看出, LPS 和不同浓度的 OVT 均可上调 CD11c⁺ 细胞的比

例, 对照组中 CD11c⁺细胞比例为 23.9% 左右, 阳性对照组 (LPS 组) 为 41.33%。表明 LPS 可显著提高 CD11c⁺细胞的比例, 刺激树突状细胞成熟。OVT 各浓度刺激 DCs 结果表明 CD11c⁺细胞比例和表面共刺激分子 CD40, CD80 及 MHC-II 分子的表达量显著升高, 均高于对照组(p<0.01), 但仍低于 LPS 刺激组, 图 3a、c、e、g。因此, OVT 刺激 DCs 能够提高其成熟度。OVT 各浓度与 LPS 共刺激组的 CD11c⁺细胞比例均显著高于 CT 组(p<0.01), 并随着 OVT 浓度的升高基本呈现下降趋势, 在 OVT 浓度为 10 μg/mL 时显著高于 LPS 组(p<0.01), 其余各浓度均低于 LPS 组(p<0.01), 图 3b; 共刺激组 DCs 表面 CD80 表达量与 CT 组相比, 均显著提高(p<0.01), 随着 OVT 浓度增加呈现先下降后升高再下降的趋势, 与 LPS 组相比, OVT 浓度为 10、25、100 μg/mL 时显著升高(p<0.01), 并在 10 μg/mL 时表达量最高, 在 OVT 浓度为 200 μg/mL 时略有升高(p<0.05), 其余浓度刺激下 CD80 表达量低于 LPS 组(p<0.01), 图 3d; LPS+各浓度 OVT 共刺激的 DCs 表面 CD40 表达量显著高于 CT 组(p<0.01), 但与 LPS 组表达量无显著差异, 图 3f; 共刺激组 DCs 表面 MHC-II⁺分子表达量与 CT 组相比, 随着 OVT 浓度的升高呈现先上升后下降再略有上升的趋势, 与 LPS 组相比, 当 OVT 浓度为 10、100、200 μg/mL 时, 略高于 LPS 组表达量(p<0.05), 在 OVT 浓度为 25 μg/mL 时与 LPS 共刺激表达量显著高于 LPS 组, 达到最大(p<0.01), 其余浓度刺激下 MHC-II⁺分子表达量与 LPS 组无差异, 图 3h。以上结果表明低浓度 OVT(≤ 25 μg/mL)能与 LPS 协同刺激 DCs 的成熟, 而高浓度 OVT (>25 μg/mL) 则抑制 LPS 刺激 DCs 成熟的作用。Ren-Yeong Huang^[14]等研究槲皮黄酮对髓源性 DCs 的免疫作用时发现, 槲皮黄酮与 LPS 共刺激 DCs 时, 能降低 LPS 的刺激, 起到抑制的作用。研究表明^[15], 乳铁蛋白(LF)通过竞争 LPS 上的结合蛋白, 有效中和 LPS 毒性部分, 从而保护机体免受因内毒素所导致的致死休克。因为 OVT 与 LF 的生物活性相似, 我们猜测, 低剂量 OVT 与 LPS 共刺激 DCs 时, 可能发生了促炎反应, DCs 大量成熟, 而当剂量提高后, 可能出现了抗炎作用, 即 OVT 可能会与 LPS 上的某些蛋白竞争结合, 降低 LPS 对机体的毒害作用, 机体得到保护, 成熟 DCs 的量也随之下降, 具体机理需要进一步探索。

3 结论

OVT 对髓源性 DCs 成熟影响的研究结果表明,

不同浓度 OVT 组可刺激细胞周围毛刺状突起大量增加, 呈现出典型的树突状细胞形态, 且上调 CD11c⁺细胞比例, DCs 表面 MHC-II、CD80 和 CD40 表达量显著增加。LPS+不同浓度 OVT 组中, 低浓度(≤ 25 μg/mL) OVT 与 LPS 共刺激可提高 CD11c⁺细胞比例, 上调 MHC-II、CD80 和 CD40 表达量; 而高浓度(>25 μg/mL) OVT 与 LPS 共刺激则能下调 CD11c⁺细胞比例和 MHC-II、CD80 和 CD40 的表达量。因而, 我们认为不同浓度 OVT 均能刺激 DCs 的成熟; LPS+不同浓度 OVT 共刺激 DCs, 能显著提高 DCs 的成熟度, 在低剂量时, 两者表现为协同作用, 高剂量时, 两者表现为拮抗作用。我们猜测, 不同剂量可能会引发机体的促炎反应也可能引发抗炎反应, 需要后续试验进一步探索。

参考文献

- [1] Mazurier J, Metz-Boutigue MH, Jolles J, et al. Human lactotransferrin: molecular, functional and evolutionary comparisons with human serum transferrin and hen ovotransferrin [J]. *Experientia*, 1983, 39(2): 135-141
- [2] 徐明生, 林日新, 汤群, 等. 卵转铁蛋白体外免疫活性研究[J]. *食品与机械*, 2012, 28(2): 115-118
XU Ming-sheng, LIN Ri-xin, TANG Qun, et al. Study on immune activity of ovotransferrin in vitro [J]. *Food and Machinery*, 2012, 28(2): 115-118
- [3] 林日新, 徐明生, 杜华英, 等. 卵转铁蛋白对免疫低下小鼠 Th1/Th2 细胞平衡的影响 [J]. *食品科学*, 2011, 32(21): 243-246
LIN Ri-xin, XU Ming-sheng, DU Hua-ying, et al. The effect of ovotransferrin on the balance of Th1/Th2 cells in low immune mouse [J]. *Food Science*, 2012, 32(21): 243-246
- [4] Hang Xie, Gerry R, William E, et al. Effects of ovotransferrin on chicken macrophage and heterophil-granulocytes [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, 26: 805-815
- [5] 汪道鑫, 虞春华, 叶颖俊, 等. T 淋巴细胞的研究进展[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(24): 3193-3195
WANG Dao-xin, YU Chun-hua, YE Ying-jun, et al. The research progress of T lymphocytes [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2009, 30(24): 3193-3195
- [6] Mar á Mittelbrunn, Gloria Martínez del Hoyo, Mar á López-Bravo, et al. Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells [J]. *Blood*, 2009, 113(1):

- 75-84
- [7] Kristin M. Ser é Qiong Lin, Piritta Felker, et al. Dendritic cell lineage commitment is instructed by distinct cytokine signals [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2012, 91: 515-523
- [8] Azad Saei, Roobina Boghazian, Reza Mirzaei, et al. *Listeria monocytogenes* protein fraction induces dendritic cells maturation and T helper 1 immune responses [J]. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2014, 13(1): 1-10
- [9] Yin Shuyi, Wang Chienyu, Yang Ningsun. Interleukin-4 enhances trafficking and functional activities of GM-CSF-stimulated mouse myeloid-derived dendritic cells at late differentiation stage [J]. *Experiment Cell Research*, 2011, 317(15): 2210-2221
- [10] Kayo Inaba, Muneo Inaba, Nikolaus Romani, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor [J]. *J Exp. Med.*, 1992, 176: 1693-1702
- [11] 郑磊,顾春瑜,王前,等.基于手法筛选的小鼠骨髓树突状细胞的体外培养方法[J].*中国临床康复*,2011,9(35): 102- 105
ZHENG Lei, GU Chun-yu, WANG Qian, et al. Dendritic cells generated from mouse bone marrow in vitro based on maneuver screening [J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2011, 9(35): 102-105
- [12] Huang Dan-fei, Nie Shao-ping, Han Cheng, et al. Regulation of maturation and function of dendritic cells by tea glycoprotein[J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, 235: 1023-1032
- [13] 唐永富,黄丹菲,殷君艺,等.车前子多糖对骨髓来源树突状细胞表型和吞噬功能的影响[J].*食品科学*, 2007, 28(10): 517-520
TANG Yong-fu, HUANG Dan-fei, YIN Jun-yi, et al. Effects of semen plantaginis polysaccharides on phenotypic and endocytosis of murine dendritic cells [J]. *Food Science*, 2007, 28(10): 517-520
- [14] Ren-Yeong Huang, Yen-Ling Yu, Wan-Chien Cheng, et al. Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function [J]. *The Journal of Immunology*, 2010, 184: 6815-6821
- [15] Domenico Caccavol, Nelly M.Pellegrino, Maria Altamura, et al. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application [J]. *Journal of Endotoxin Research*, 2002, 8(6): 403-417