

茶树油调控树突状细胞的表型和功能

唐永富^{1,2}, 李积华^{1,2}, 陈家翠¹, 林丽静¹, 韩志萍¹, 曹玉坡^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院农产品加工研究所/农业部热带作物产品加工重点开放实验室, 广东湛江 524001)

(2. 国家重要热带作物工程技术研究中心, 海南海口 571101)

摘要: 本文主要探讨了茶树油对树突状细胞表型和功能的影响。采用茶树油(0.005 μL/mL)干预未成熟的树突状细胞48h后, 流式细胞仪检测细胞表型, MTT法检测刺激淋巴细胞增殖能力。结果发现经茶树油干预后, 以CD11c设门, 树突状细胞高表达H-2Db(48.20%), I-Ab(6.60%)和CD86(41.00%), 和空白对照组比较分别达到1.28倍, 3.40倍和1.28倍的增长。混合淋巴培养实验发现茶树油能够增强DC刺激淋巴细胞增殖的能力, 降低树突状细胞的吞噬功能。初步表明茶树油可以促进树突状细胞的表型和功能成熟。

关键词: 茶树油; 树突状细胞; 表型; 吞噬活性

文章编号: 1673-9078(2012)6-606-609

Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil induced Phenotypic and Functional Maturation of Murine Bone Marrow-derived Dendritic Cells

TANG Yong-fu^{1,2}, LI Ji-hua^{1,2}, CHEN Jia-cui¹, LIN Li-jing¹, HAN Zhi-ping¹, CAO Yu-po^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Crop Products Processing of Ministry of Agriculture, Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, China)

(2. State Engineering and Technology Research Center for Key Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: The effect of tea tree oil on the phenotypic and functional maturation of dendritic cell was investigated *in vitro*. Dendritic cells treated with tea tree oil (0.005 μL/mL), were enlarged, suspended, and displayed typical stellate and aggregates like cells treated with LPS (positive controls). The levels of surface marker expression were monitored throughout the culture by flow cytometry using CD11c-PEcy7, I-Ab-FITC, CD86-FITC, and H-2Db-PE. Dendritic cells treated with tea tree oil expressed higher level of H-2Db (48.20%), costimulatory molecule I-Ab (6.60%) and CD86 (41.00%) with the cells gated by CD11c, being of 1.28, 3.40 and 1.28-fold higher for H-2Db, I-Ab and CD86, respectively compared with untreated cells. It was also found that tea tree oil could enhance the dendritic cell to induce proliferation of T lymphocyte. And it was reduced the endocytic activity of dendritic cell by tea tree oil. These results showed that tea tree oil had significant immunoenhancing activity by inducing the phenotypic and functional maturation of dendritic cells.

Key words: tea tree oil; dendritic cell; phenotypic; endocytic activity

茶树油作为外用药物已有很长历史^[1,2], 其作为外伤使用的突出效果备受关注。几年来对其抗炎及免疫调节活性报道较多, 研究发现其抗炎活性与含量丰富的倍半萜烯化合物有关。Brand 等^[3]在体外试验中证实, TTO水溶液能明显抑制被fMLP、LPS或PMA激活的单核细胞分泌超氧化物。在老鼠耳内^[4]和人体局部皮肤^[5]进行的试验中显示出TTO和Terpinol-4-ol

能减轻组胺引起的水肿反应, 这说明在许多瘙痒症状中, TTO及其组分可能是抑制感觉神经, 血管内皮细胞和某些血细胞在局部释放组胺或其他血管通透性物质。目前的观点认为, TTO和Terpinen-4-ol在急性炎症中能增强中性粒细胞的活性而加快外源性抗原的清除, 在慢性炎症中则是抑制单核细胞分泌超氧化物和炎症介质, 减轻炎症反应对机体的损伤^[6]。

树突状细胞(Dendritic cells, DC)是功能最强大的抗原呈递细胞, 可以完成体能抗原的摄取、加工, 并将抗原肽呈递给特异性T淋巴细胞^[7], 具有诱导初次免疫应答的独特功能, 能有效的刺激初始型T淋巴细胞的增殖^[8], 是免疫应答的始动着, 在机体细胞免疫和体液免疫调控中均起重要的作用^[9]。茶树油的抗

收稿日期: 2011-12-20

基金项目: 海南省自然科学基金(809025、311067); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ITBKF093)

作者简介: 唐永富, 男, 助理研究员, 研究方向为天然产物分离及药理活性研究

通讯作者: 李积华, 男, 副研究员, 研究方向为农产品加工与新材料研究

炎及免疫调节机制可能与影响机体 DC 的抗原加工和提呈及功能调节有关,但目前未见相关的研究报道。因此,本实验通过研究茶树油对树突状细胞表型和诱导 T 淋巴细胞增殖能力,初步分析茶树油的免疫调节机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, BALB/cj, 4 周龄, 由中山大学实验动物中心提供 (Center of Experiment Animal of Sun Yat-sen University), 许可证号: SCXK (粤) 2004-0011, 粤监证字 2008A060。

1.2 主要试剂

CD11c-PEcy7、H-2Db-PE、I-Ab-FITC 和 CD86-FITC 为美国 BD Pharmingen 产品, 胎牛血清, RPMI 1640 液体培养基为美国 Gibco 产品, MTT 为美国 Sigma 公司产品, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 溶解, 浓度为 5 mg/mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 一周内有效。重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (rmGM-CSF)、重组小鼠白细胞介素 4 (rmIL-4) 购自 R&D 公司, 用 RPMI 1640 完全培养基 (含 2mmol/L L-谷氨酰胺, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-巯基乙醇, 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 体积分数为 10% 的胎牛血清) 配制。

1.3 试验药物

Tea Tree Oil 购于广西南宁万家辉, 用 DMSO 溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 主要仪器

流式细胞分析仪 (美国 Beckman coulter 公司 EPICS XL) 酶标仪 (美国 Thermo electron corporation), 高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司), 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司 E-330), CO_2 培养箱 (美国 Thermo electron corporation), 超净工作台 (新加坡 ESO), Milli-Q50 超纯水净化系统 (美国 Millipore 公司)。

1.5 树突状细胞的分离纯化

树突状细胞的培养是参照文献^[8-9]的方法, C57BL/6 小鼠无菌取股骨和胫骨, 收集骨髓细胞, 红细胞裂解液裂解红细胞, 调细胞密度为 2×10^6 个/mL, 培养瓶中贴壁培养 2 h 后去除悬浮细胞, 加入含 rmGM-CSF 和 rmIL-4 浓度均为 20 ng/mL 的 RPMI 1640 完全培养基, 第 3 d 半量换液, 第 6 d 收集 DCs 接种于 96 孔板, 5×10^4 个/孔, 按照试验设计加入含有 TTO、Terpin-4-ol、1.8-Cineole 或者 Terpinolene 的培养基, 最终体积 200 μL /孔。

1.6 茶树油对树突状细胞表型的影响

为了测定 TTO 对 DC 表型成熟的影响, 我们用流式细胞仪检测了 DC 表面 H-2Db、I-Ab、CD86 类分子和共刺激分子 CD11c 的表达。首先用 rmGM-CSF (20 ng/mL) 和 rmIL-4 (20 ng/mL) 诱导 C57BL/6 小鼠来源骨髓细胞分化成未成熟 DC, 于第 6 d 收集悬浮和轻轻粘附的 DC, 调细胞密度为 5×10^5 /mL, 加入 TTO, 浓度为 0.005 μL /mL, 以 RPMI 1640 基础培养基作为阴性对照, LPS (100 ng/mL) 为阳性对照, 刺激 48 h 后, 流式检测。

细胞样品的直接免疫荧光染色: 收集 DC 1×10^6 个/mL, 用 staining buffer 离心洗 2 次 (4 $^{\circ}\text{C}$, 300 \times g, 5 min), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用 10% (V/V) 的羊血清封闭细胞表面 Fc 受体 10 min, 然后加入 CD11c-PEcy7、H-2Db-PE、I-Ab-PE 和 CD86-FITC, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光染色 30 min, 用 staining buffer 洗 3 次, 然后用 staining buffer 重悬细胞, 配成 2×10^7 个/mL 的悬液于流式细胞检测仪测定细胞表型。

1.7 茶树油对树突状细胞诱导同种淋巴细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测经 TTO 刺激后 DC 诱导同种异体淋巴细胞增殖的能力。取正常 BALB/cj (I-Ad) 小鼠脾脏, 制备单个脾细胞悬液, 用 RPMI-1640 基础培养基洗 2 次 (200 \times g, 5min)。加入红细胞裂解液破除红细胞, 离心洗 2 次, 重悬, 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 磁珠分选 CD4⁺T 细胞, 配成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 以 100 μL /孔加入圆底 96 孔板。收集经药物干预的 DC, 以 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 mitomycin C 灭活 30 min, RPMI-1640 基础培养液洗涤 3 次。以 10^5 、 5×10^4 、 2.5×10^4 、 1.25×10^4 个/孔, 将灭活 DC 分别加入各孔中, 总体积 200 μL /孔, 每组设 4 个复孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱培养 72 h, 于最后 4 h 加入 MTT (5 mg/mL), 20 μL /孔。离心 (300 \times g, 5 min) 去上清, 加入 DMSO 150 μL /孔, 震荡 10 min, 在酶标仪上于 570 nm 下检测 OD 值, 按公式 (Proliferation Ration(%)) = [(OD_{实验组} - OD_{淋巴细胞组}) \times 100 / OD_{淋巴细胞组}] 计算 DC 的增殖率, 结果以 4 孔均值表示。

1.8 茶树油对树突状细胞吞噬功能的影响

收集未成熟 DC 分配在 12 孔培养板中, 加入茶树油 (浓度为 0.005 μL /mL) 和 LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$), 培养 40 h, 收集细胞。每个样收集 2×10^5 个细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 加入 1 mg/mL 的 FITC-dextran, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 加入冷的洗液停止反应, 洗液洗 3 次, 然后加入 PEcy7-CD11c, 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色标记 30 min, 洗液洗 3 次, 流式检测双染色细胞。

1.9 数据处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据之间的比较采用 t 检验, $p < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 茶树油对树突状细胞表型的影响

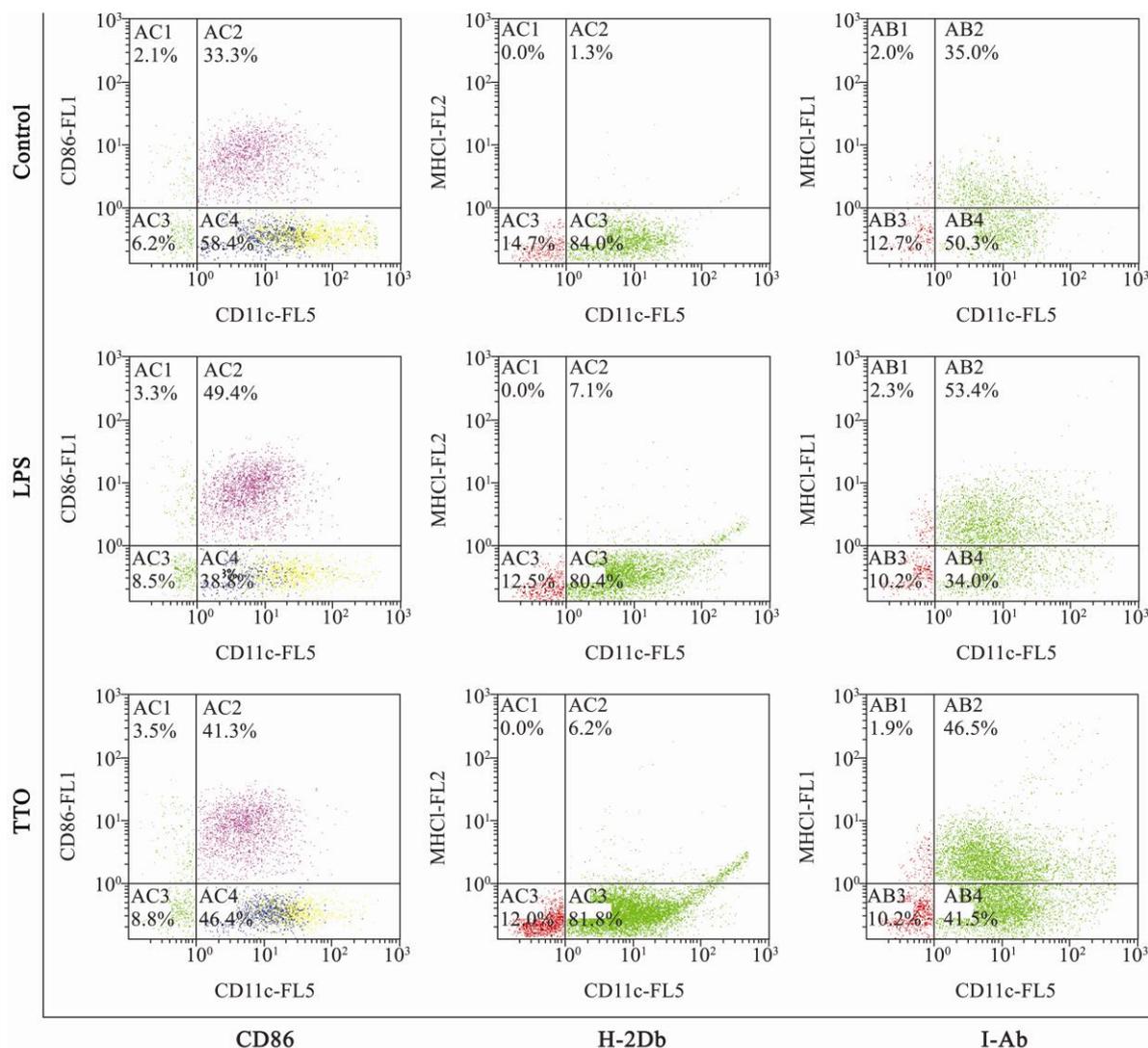


图1 茶树油对树突状细胞表面分子表达的影响

Fig.1 Effect of TTO on the expression of surface molecules of BMDC

一些体外试验证实 TTO 及其组分通过抑制单核细胞分泌超氧化物和炎症介质而抑制炎症反应, TTO 和 Terpinen-4-ol 可通过调控中性粒细胞和单核细胞的活性完成对外源物的炎症反应^[6]。树突状细胞是免疫应答的始动着, 在机体细胞免疫和体液免疫调控中均起重要的作用。针对外源及炎性因子的免疫反应可能与树突状细胞的功能变化有关^[10]。DC 受外界刺激后(比如病原体产物或 LPS)可由未成熟状态转化为成熟状态, 表面高表达 MHC II 类分子、共刺激分子和黏附分子, 包括 CD40、CD80、CD83、CD86 等。实验发现, 茶树油干预未成熟的树突状细胞 48h 后, 流式检测以 CD11c 设门, 发现高表达 I-Ab(48.20%), H-2Db (6.60%)和 CD86 (41.00%), 达到阳性对照组

LPS 的作用效果, 和空白对照组比较分别达到 1.28 倍, 3.40 倍和 1.28 倍的增长, 见图 1。茶树油上调表面 MHC II 类分子和共刺激分子的表达, 说明能够促进 DC 表型的成熟。

2.2 茶树油对树突状细胞诱导同种淋巴细胞增殖的影响

DC 成熟后丧失抗原摄取加工能力, 但是抗原提呈能力增强, 可以激活初始型 T 淋巴细胞而诱发免疫应答。免疫应答最终的效应者是淋巴细胞, 成熟 DC 可以在次级淋巴器官中提呈抗原, 诱导抗原特异性 T 淋巴细胞活化, 扩增, 进一步通过混合淋巴细胞培养实验验证 DC 对效应细胞的作用, 结果可反映经过干预后的 DC 对免疫应答水平的影响。为比较药物处理

组和对照组 DC 的免疫刺激活性，以同种异体的淋巴细胞作为反应细胞，TTO 干预的 DC 作为刺激细胞与淋巴细胞混合培养，检测 DC 对同种异基因淋巴细胞增殖的影响^[11]。

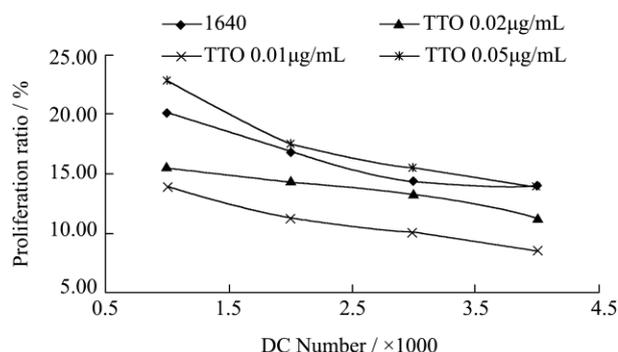


图2 茶树油对树突状细胞诱导 T 淋巴细胞增殖能力的影响

Fig.2 Effect of TTO on DC-mediated CD4+ T cells activation

从图2中可以看出 DC 经 TTO 干预后，具有很强的诱导同种淋巴细胞增殖的能力，并且发现刺激能力随刺激细胞数量的增大而增强。同种异基因的 MHC II

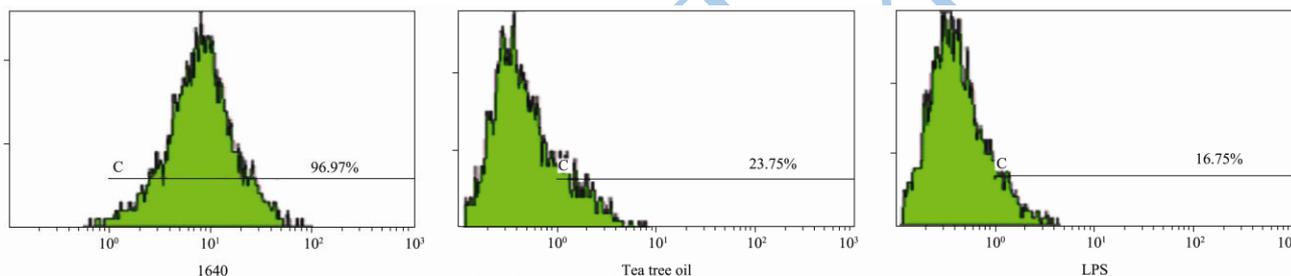


图3 茶树油对树突状细胞吞噬功能的影响

Fig.3 Effect of TTO on endocytic activity of immature and mature dendritic cell

3 结论

茶树油干预树突状细胞后，能够促进表面分子的表达，增强刺激同种淋巴细胞增殖的能力，降低吞噬抗原的能力，初步表明茶树油可以促进 DC 的成熟，下一步实验可以从对 DC 的细胞因子分泌能力的影响方面进行分析，对茶树油调控 DC 的功能开展进一步研究。

参考文献

[1] Carson CF, Riley TV. The antimicrobial activity of tea tree oil [J]. Med J Aust, 1994, 160: 236

[2] Altman PM. Australia tea tree oil-a natural antiseptic [J]. Aust J Biotechnol, 1989; 3: 247-248

[3] C Brand, A Ferrante, RH Prager, et al. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro [J].

分子通过分子模拟发挥直接提呈作用而被异基因 T 细胞的 TCR 识别，从而诱导 T 细胞活化和增殖。因此刺激同种异基因淋巴细胞增殖反映了 DC 表达功能性 MHC II 分子的水平，能间接反映其表面功能性 MHC II 类分子表达水平升高，这一结果与细胞流式分析的结果一致。

2.3 茶树油对树突状细胞吞噬功能的影响

流式分析发现未成熟树突状细胞经过 0.005 μL/mL 的茶树油干预后，吞噬 FITC-dextran 的能力显著下降 (23.75%)，吞噬能力相较 1640 组 (96.97%) 的降低幅度达到 75.51%，接近 LPS 对照组 (16.75%)。

未成熟的 DC 有很强的摄取 FITC-dextran 的能力，可以通过胞吞饮和甘露糖受体结合摄取 FITC-dextran。报道表明在成熟过程中，DCs 经 LPS 作用后的吞噬功能显著降低。该实验研究发现茶树油干预后，DC 的吞噬能力较未处理组显著降低，且接近 LPS 处理组，说明茶树油可以诱导 DC 细胞功能活化，由未成熟状态转变为成熟状态。

Inflamm Res, 2001, 50(4): 213-219

[4] C Br, S L Townley, J J Finlay-Jones, et al. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears [J]. Inflamm Res, 2002, 51(6): 283-289

[5] K J Koh, A L Pearce, G Marshman, et al. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation [J]. Bri J Dermatol, 2002, 147(6): 1212-1217

[6] PH Hart, C Brand, CF Carson, et al. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes [J]. Inflamm Res, 2000, 49(11): 619-626

[7] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. Nature. 1998; 392(6673): 245-252.

[8] Pierre Guermonprez, Jenny Valladeau, Laurence Zitvogel, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells [J]. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 621-667.

- [9] Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 767-811.
- [10] Pisapia L, Pozzo G Del, Barba P L, et al. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation [J]. *General and Comparative Endocrinology*. 2012, 178(1): 54-63
- [11] Liu Yaling, Xing Xin, Wang Juan, et al. Sterigmatocystin alters the number of FoxP3+ regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells in BALB/c mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50 (6):1920-1926

现代食品科技