

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

鋰鹽對微膠細胞作用之分子機轉(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2314-B-038-007-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學細胞及分子生物研究所

計畫主持人：呂思潔

共同主持人：沈武典

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 9 月 26 日

## 摘要

雙極性情感性躁鬱症是一個非常普遍的精神疾病，在美國大約有 1.3-1.5% 的人口罹患。它的症狀包含憂鬱和躁症兩個時期。鋰鹽為治療雙極性情感性躁鬱症的首選藥物，但他們的作用機轉並不清楚。在神經系統上，鋰鹽可以保護神經系統及防止凋亡；在免疫系統上，雙極性情感性躁鬱症服用情緒穩定藥的病人，被檢測出較容易罹患自體免疫病人，而服用鋰鹽治療的病患罹患的機率比較小。因此，我們有興趣研究鋰鹽在免疫系統之鑰一樹突狀細胞分子及功能上所扮演的角色。自人類周邊血液分離出單核球，將之培養七天成未成熟樹突狀細胞，並在培養第一天便給予不同濃度的鋰鹽。實驗發現給予鋰鹽 2.5-10 mM 可有意義的增加樹突狀細胞 CD86 和 CD83 的表現。但對其他樹突狀細胞表面記號如 HLA-DR, CD80, CD40 和 CD14 並無影響。鋰鹽刺激的未成熟樹突狀細胞與控制組比起來有意義的增加 IL-8 和 TNF- $\alpha$  的分泌。這些實驗數據顯示鋰鹽在調控樹突狀細胞的功能和免疫調節中可能扮演重要的角色。

關鍵字: 鋰鹽，雙極性情感性躁鬱症，樹突狀細胞，免疫調節

Bipolar disorder is a common psychiatric disease in the world, its symptoms include alternating depressive and manic episodes. It affects 1.3-1.5 % of population in the U.S. lithium (Li) have been chosen as the first line medicine for bipolar disorder. However, their mechanisms remain unclear. Lithium could protect and prevent apoptosis of neuron cells. Patients with bipolar disorder have higher prevalence of autoimmune disease, but patients treated with LiCl have lower incidence. Therefore, we are interested in the effect of lithium on the functions of dendritic

cells (DC), which is a key regulator of immune responses. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) derived DCs were generated and treated with lithium for examination of change of surface molecules, mixed lymphocyte reaction and cytokine production. We found that lithium could significantly increase the expression of CD86 and CD83 expression on DCs to 2-3 folds as compared to control. Furthermore, IL-8 and TNF- $\alpha$  secretion were increased by lithium. These data suggest that lithium could modulate DC functions, and might have potential role in immunomodulation.

Key words: lithium, bipolar disorder, dendritic cell, immunoregulation

## 背景介紹

在美國大約有 1.3-1.5% 的人有精神方面的疾病，而其中又以雙極性情感躁鬱症為多。這是由躁症和鬱症所組成，週期性的呈現躁期及鬱期，且情感會有兩個極端的變化。發病真正原因並不清楚，有些科學家認為是基因上的突變、病毒感染、環境因素或是遺傳 (Manji et al., 1995)。傳統上對於這樣的一個疾病的治療大多是重於預防，以情緒穩定的藥物為首選，例如：鋰鹽，valproic acid、carbamazepine 等，這類的預防用藥已經獲得證實可以有效的控制躁鬱症的發生，即使發生了也可以縮短病程，減緩病情。而近幾年來它也被發現有神經保護之作用，使細胞免於受到外來毒素的攻擊。PI3K/Akt 的傳遞與細胞的存活有著很大的關係，而這個路徑活化最主要是藉由生長因子像是類胰島素生長因子及大腦衍生神經營養因子等 (Dudek et al., 1997)。而鋰鹽也被發現在神經細胞上它所誘導的 Akt 的活性會被 PI3K 抑制劑給阻斷，以及與 GSK-3 的磷酸化增加有關，證實了鋰鹽抑制 GSK-3 $\beta$  的能力是藉由活化 Akt，使得神經細胞

受到保護而不會走向死亡的路徑 (Grimes and Jope, 2001)。

Chuang et al. 長期的鑽研下，他們發現長期慢性的給予鋰鹽有保護神經的作用，可對抗外來毒素的入侵 (Chuang et al., 2002)；而在 2003 年，又更進一步的發現在體外腦部神經細胞的實驗當中，經過鋰鹽的刺激下甚至會使大腦皮質細胞 (cerebral cortical cell) 和小腦顆粒細胞 (cerebella granule cell) 產生增生的作用 (Hashimoto et al., 2003)，這對於科學史上是一個很大的突破，因為一般認為神經損傷之後就不會再生。而在 2005 年 Wendy Noble (Noble et al., 2005) 也證實了這項發現在動物實驗上也有同樣的作用，且鋰鹽可改善 Tau 蛋白在腦內聚集的現象，回復部分受損的神經功能。而 valproic acid (VPA) 跟鋰鹽一樣，在神經上面也扮演著保護的作用，可以對抗神經損傷後的凋亡反應：在老鼠中腦的巨噬細胞 (microglia) 長期給予 VPA 可以保護 LPS 等因子對腦部刺激所產生類多巴胺 (dopaminergic) 的神經損傷 (Peng et al., 2005)。而對於免疫方面的影響，有研究發現在服用抗癲癇藥物容易影響免疫系統，於是有研究者做了實驗發現，在人類單核性白血病細胞 (human monocytic leukemia cell, THP-1 cells) 中，如果給予不同種類的抗癲癇藥物，例如 VPA, carbamazepine, diazepam 等，發現當給予 VPA 治療過後的細胞可以抑制由 LPS 誘導的 NF- $\kappa$ B 的活化，進而抑制 IL-6 及 TNF- $\alpha$  的產生 (Ichiyama et al., 2000)。

鋰鹽真正的藥物作用機轉到現在仍不是那麼明確，本實驗想要探討的是：鋰鹽對於未成熟的樹突狀細胞和成熟的樹突狀細胞功能的影響

## 實驗方法

### 樹突狀細胞培養

自台北捐血中心取得的白血球濃厚液以 1:1 的方式加入 HBSS (Gibco,) 混合均勻後注入含 Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech) 之離心管離心。單核球細胞分離出來後，再利用 HBSS 將殘餘在細胞上之 Ficoll 洗淨。計算完後的細胞置於不含血清之培養液中如 X-vivo 15 (BioWhittaker, Walkersville,)，放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 之培養箱，利用其與淋巴球不同貼附培養皿的特性分離出所要的單核球。未貼附之細胞以 HBSS 洗淨移除，放入培養箱中 7 天，並在第四天補充半量的 GM-CSF 及 IL-4。7 天後隨著單核球分化成未成熟樹突狀細胞。在刺激樹突狀細胞成熟的過程，則可在第七天時加入 LPS 做刺激，培養一到兩天即可誘導成為成熟之樹突狀細胞。

### 藥物處理

未成熟樹突狀細胞分化過程中，在分離出單核球第一天即加入鋰鹽 (lithium chloride, LiCl, Sigma, St. Louis) 濃度分別為 1.25-10 mM，共同培養七天後測定表面記號或是細胞激素。

### 流式細胞儀分析樹突狀細胞表面分子

收集的樹突狀細胞平均分配置於尖底 96 孔盤，以 staining buffer 清洗兩次，加入含有螢光標記之抗體如下：anti-IgG1 FITC and anti-IgG2 PE, anti-HLA-DR FITC, anti-CD86 PE, anti-CD80 FITC and anti-CD83 PE (Immunotech, Marseille Cedex,)，anti-CD40 FITC (Serotech), anti-CD14 PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.)。避光 40 分鐘。以 staining buffer 清洗兩次，最後加入 fixation buffer 用流式細胞儀 (FACSCalibur, BD Biosciences.) 分析。

### 酵素連結免疫吸附分析

以 Human DuoSet ELISA Development Kit (R&D, Minneapolis) 測定。將96孔盤加入capture Antibody (Ab)，加入收集好之上清液或是 standard 30  $\mu\text{l}/\text{well}$  並做雙重覆，置於室溫2小時。用washing buffer洗淨3次，分別加入 30  $\mu\text{l}/\text{well}$  的 biotinylated anti-human Ab置於室溫2小時，用washing buffer洗淨3次，加入streptavidin horseradish peroxidase 加入TMB呈色劑，再以ELISA reader 測吸光值。

### 統計方法

統計分析是用 SPSS 11.0 for windows 軟體。所有的資料統計都是根據 Mann-Whitney test 計算出 p 值，以 p 小於 0.05 作為具有統計學上意義。

### 實驗結果

#### 鋰鹽可增加單核球分化成未成熟樹突狀細胞聚集現象

培養細胞系統中，與控制組相比我們發現隨著鋰鹽濃度增加，細胞的聚集情形也隨之增加 (Fig. 1)，這表示經過鋰鹽刺激的細胞有能力從單核球分化為未成熟樹突狀細胞，並增加它的移動能力使它在顯微鏡視野下呈現聚集狀。

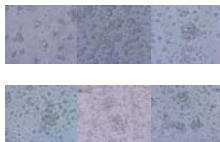


Fig. 1. Morphology of iDC with different concentration of LiCl.

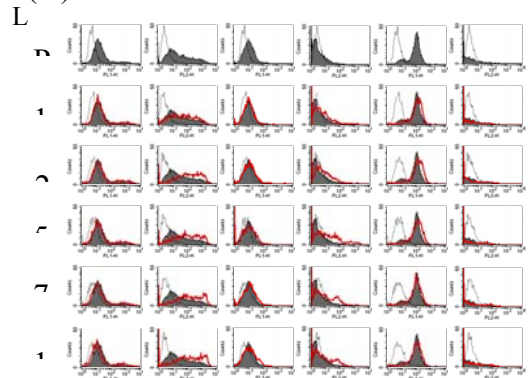
#### 鋰鹽可增加單核球分化成未成熟樹突狀細胞 CD86 和 CD83 之表現

我們利用流式細胞儀測試了 HLA-DR, CD14, CD40, CD80,

CD83, CD86 等細胞表面標記表現，以判斷樹突狀細胞之分化。實驗結果以螢光強度 (MFI)表示，發現隨著鋰鹽濃度增高，CD86 的表現也隨之增加 (Fig. 2A)。在百分比 (positive percentage) 統計方面，CD86 的表現在控制組為:  $44.90 \pm 4.27$ ,  $n = 20$ ，鋰鹽濃度 10 mM ( $75.30 \pm 8.89$ ,  $p = 0.012$ ,  $n = 7$ ) 與控制組相比皆有意義的上升約 2 倍 (Fig. 2B)。

而樹突狀細胞表面另一個與成熟有關的表面記號 CD83 在控制組為:  $6.02 \pm 0.94$ ,  $n = 20$ ，在經過鋰鹽的刺激下，可以發現在 10 mM ( $15.49 \pm 4.50$ ,  $p = 0.044$ ,  $n = 7$ ) 與控制組相比有意義的上升 (Fig. 2B)。其餘樹突狀細胞表面記號如 HLA-DR, CD80, CD40, CD14 以百分比並用柱狀表示之 (Fig. 2B)，發現其表現不會受到鋰鹽之調節。

### (A)



### (B)

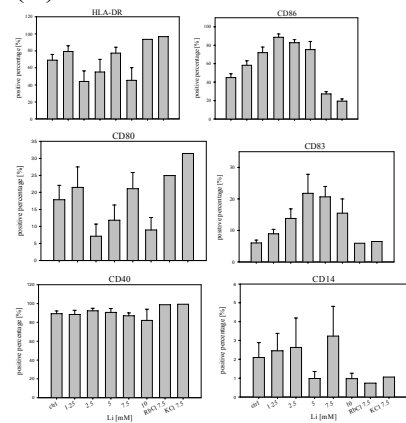


Fig 2. Effects of LiCl on the generation of monocyte-derived iDC.

鋰鹽對於樹突狀細胞的影響在於未成熟樹突狀細胞分化階段

在樹突狀細胞分化過程，我們加入先加入鋰鹽或是 PBS 培養七天，之後用 LPS 刺激樹突狀細胞成熟 2 天。在成熟過程中，我們選擇不加 (Fig. 3A)或是加入鋰鹽 (Fig. 3B)，兩天後將細胞收下觀察細胞表面分子，以百分比方式表示。我們發現在成熟過程中沒有加入鋰鹽或 PBS 的情況，樹突狀細胞 CD86 表現情形與控制組差異不大。

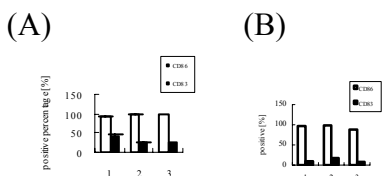


Figure 3. Effects of LiCl on the maturation of immature DCs.

鋰鹽可以增加單核球分化成未樹突狀細胞 IL-8, TNF- $\alpha$ 之分泌量

IL-8 分泌量的檢測結果發現控制組為  $10.976 \pm 1.849$  ng/ml, Li 10 mM ( $161.016 \pm 17.480$ ,  $p = 0.014$ ) 皆能有效增加 IL-8 的分泌量，且與控制組相比約有 5-16 倍的上升 (Fig. 4A)。在檢測 TNF- $\alpha$  的結果發現控制組分泌量為  $249.342 \pm 57.408$  pg/ml, Li 10 mM ( $3338.502 \pm 695.198$  pg/ml,  $p = 0.018$ ) 與控制組相比可意義增加 TNF- $\alpha$  的釋放，且達 8-13 倍 (Fig. 4B)。

(A) (B)

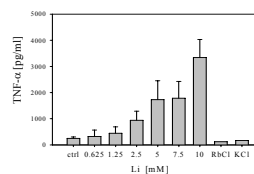
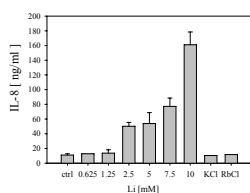


Fig 4. LiCl enhanced cytokines production on iDCs.

### 討論

我們證實了鋰鹽可以增加樹突狀細胞 CD86 和 CD83 之分子表現 (Fig. 2A-B)，以及增加 IL-8, TNF- $\alpha$  的分泌量。鋰鹽增加發炎細胞激素 (inflammation cytokine) 這樣的一個結果，與先前學者在腸道上皮細胞 (intestinal epithelial cells, IEC) 做的研究吻合。他們發現鋰鹽可增加 IEC 的 IL-8 製造量。鋰鹽可以增加樹突狀細胞上共同刺激分子 CD86 的表現，這樣的結果和 Esther. M.K. et al (Knijff et al., 2006) 的結果並無太大差異。這可能代表鋰鹽所影響 CD marker 表現的可能並有免疫調節的機制。

### 參考資料

1. Chuang, D. M., Chen, R. W., Chalecka-Franaszek, E., Ren, M., Hashimoto, R., Senatorov, V., Kanai, H., Hough, C., Hiroi, T., and Leeds, P. (2002). Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord* 4, 129-136.
2. Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R., and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.
3. Grimes, C. A., and Jope, R. S.

- (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65, 391-426.
4. Hashimoto, R., Senatorov, V., Kanai, H., Leeds, P., and Chuang, D. M. (2003). Lithium stimulates progenitor proliferation in cultured brain neurons. *Neuroscience* 117, 55-61.
  5. Ichiyama, T., Okada, K., Lipton, J. M., Matsubara, T., Hayashi, T., and Furukawa, S. (2000). Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB. *Brain Res* 857, 246-251.
  6. Manji, H. K., Potter, W. Z., and Lenox, R. H. (1995). Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions. *Arch Gen Psychiatry* 52, 531-543.
  7. Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., *et al.* (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6990-6995.
  8. Peng, G. S., Li, G., Tzeng, N. S., Chen, P. S., Chuang, D. M., Hsu, Y. D., Yang, S., and Hong, J. S. (2005). Valproate pretreatment protects dopaminergic neurons from LPS-induced neurotoxicity in rat primary midbrain cultures: role of microglia. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 162-169.
  9. MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol* 33, 564-572.