

芹菜素对脾细胞中树突状细胞的成熟和功能的影响

刘壹菲^{1,2†}, 薛晓旭^{3†}, 李正宜³, 王军朋^{1,2*}, 张祎捷^{1,2*}

(河南大学 1. 淮河医院转化医学中心, 2. 淮河临床学院转化医学中心, 3. 体育学院, 河南 开封 475001)

摘要: 探讨芹菜素对小鼠中抗原递呈细胞特别是树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 成熟和递呈抗原能力的影响。体外分离成年小鼠脾细胞后, 经脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 和芹菜素共培养 24 h 后, Cell Counting Kit (CCK)-8、酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和流式细胞术等方法分别检测芹菜素对脾细胞的毒性作用、分泌炎症细胞因子的作用、共刺激分子表达的影响; 分选芹菜素和/或 LPS 处理后的 DCs, 与卵清白蛋白 (ovalbumin, OVA)₃₂₃₋₃₃₉ 共孵育并过继转移到正常小鼠体内 7 天后, 分离 T 细胞并经 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 重新刺激后, CCK-8 法和流式细胞仪检测 OVA₃₂₃₋₃₃₉ 特异性 T 细胞的增殖和分泌炎症细胞因子的能力。结果显示, 芹菜素抑制 LPS 刺激的脾细胞分泌促炎症细胞因子白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 的产生, 但不影响抗炎细胞因子 IL-10 的产生, 而该效应并非依赖其毒性杀伤作用。进一步研究发现, 芹菜素抑制脾细胞 CD11c⁺ DCs 的共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 的表达, 提示芹菜素可能诱导 DCs 的不成熟或减弱其抗原递呈能力。体内功能实验结果显示, 芹菜素处理的 DCs 刺激抗原特异性 T 细胞的增殖及分泌细胞因子 [辅助性 T 细胞 (Th) 1: IFN- γ 和 Th2: IL-4] 的能力显著减弱。综上所述, 芹菜素的抗炎作用可能是通过调控脾细胞中 DCs 的成熟和递呈抗原的能力, 从而在一定程度上抑制炎症细胞因子的产生。

关键词: 芹菜素; 树突状细胞; 抗原递呈细胞; 细胞因子; 免疫耐受

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0397-06

Effect of apigenin on dendritic cells maturation and function in murine splenocytes

LIU Yi-fei^{1,2†}, XUE Xiao-xu^{3†}, LI Zheng-yi³, WANG Jun-peng^{1,2*}, ZHANG Yi-jie^{1,2*}

(1. Translational Medical Center of Huaihe Hospital, 2. Translational Medical Center of Huaihe Clinical College, 3. School of Physical Education, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: This study was designed to explore the effect of apigenin (Api) on dendritic cell (DCs) maturation and function in murine spleen cells. The single spleen cell was isolated, and then cultured with lipopolysaccharide (LPS) in the present and absence of apigenin. After 24 h, the toxicity of Api and the T cell proliferation were determined by CCK8 kit. In addition, we collected the cell-free supernatants to measure cytokine production using ELISA, collected the cells to determine the DC maturation using flow cytometry. Finally, we purified Api and/or LPS-treated CD11c⁺ DCs which were pulsed with ovalbumin (OVA)₃₂₃₋₃₃₉ and then were adoptive transferred into C57BL/6 mice to detect the OVA₃₂₃₋₃₃₉-specific T cell proliferation and T helper (Th1) and Th2 cell secreting IFN- γ and IL-4 production, respectively. We found that Api did not affect splenocyte viability, but

收稿日期: 2016-09-27; 修回日期: 2016-11-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81402677); 河南省科技攻关 (国际合作) 项目 (162102410008); 河南大学种子基金资助项目 (zzjj20140050).

†共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-371-23906957, Fax: 86-371-23906058, E-mail: jpwangchina@henu.edu.cn;

Tel: 86-371-23906909, Fax: 86-371-23906058, E-mail: 13903782431@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0949

inhibited the production of pro-inflammatory cytokine IL-1 β , IL-6 and TNF- α , not anti-inflammatory cytokine IL-10. In addition, Api inhibited the expression of co-stimulatory CD80, CD86 and MHCII of CD11c⁺ DCs. Finally, compared to LPS+OVA DCs group, DCs from Api and LPS co-treated splenocytes (Api+LPS+DCs) impaired OVA₃₂₃₋₃₃₉-specific T cell proliferation and the production of IFN- γ and IL-4 in CD4⁺ T cells, which had the similar responses with OVA+DCs. These data suggest that Api exhibits anti-inflammatory properties *via* inhibiting DC activation and function, as a new immune-modulator, which may induce immune-tolerance with a benefit to those with chronic inflammation.

Key words: apigenin; dendritic cell; antigen-presenting cell; cytokine; immune tolerance

树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 是机体免疫系统最重要的抗原递呈细胞 (antigen-presenting cells, APCs), 在建立先天免疫和获得性免疫反应中发挥至关重要的作用^[1,2]。根据 DCs 所介导的免疫反应程度分为未成熟树突状细胞 (imDCs) 和成熟 DCs (mDCs)。imDCs 分布于全身, 具有强大的捕获和处理抗原的能力。在捕获和加工抗原后, imDCs 迁移到淋巴器官的 T 细胞区域, imDCs 变为 mDCs^[3]。DCs 的成熟是诱发机体产生抗原特异性 T 细胞免疫应答的关键, 在发挥抗肿瘤和介导免疫耐受中具有重要作用^[1,4]。而 imDCs 作用于 T 细胞可以诱导 T 细胞所介导的免疫耐受, 将有助于缓解自身免疫病^[5]。因此, 如何阻止 imDCs 转变为 mDCs, 已成为研究防治自身免疫病和移植免疫的研究热点。

研究发现, 中药及其主要活性成分已被应用于治疗人类的多种疾病。本课题组和其他课题组的研究发现, 中药或食物本身或其中的主要植物化合物 (活性成分) 可以调节 DCs 的成熟和抗原递呈能力, 影响炎症细胞因子的表达, 并进一步影响 T 细胞介导的免疫应答, 包括辅助性 T 细胞 (T helper, Th) 1 和 Th2 细胞^[6-11]。芹菜素 (apigenin, Api) 是一种天然来源的黄酮类化合物, 存在于多种水果、蔬菜、中药材中^[12]。研究证实, 芹菜素具有抗氧化、抗炎、抗诱变、抑制肿瘤发生、增生和转移、抑制血管生成等作用^[13]。此外, 芹菜素可以抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的人肺腺癌细胞系 A549 分泌产生的诱导型一氧化氮合酶和环氧化酶-2 的 mRNA 表达、NO 的产生和促炎症细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α) 的 mRNA 表达^[14]。而动物实验发现芹菜素预处理 C57BL/6 小鼠, 可以减少 LPS 引起的实验动物死亡^[15]。然而, 芹菜素是否直接影响脾细胞中炎症细胞因子的分泌及 DCs 的成熟和抗原呈递功能, 仍未见报道。

本研究旨在研究芹菜素对脾细胞中炎症细胞因子及 DCs 的作用, 以期为其潜在的临床应用价值提

供理论依据。

材料与方法

实验动物 所用雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠由南京大学模式动物研究所提供, 合格证号为 SCXK (苏) 2015-0001。小鼠均为 SPF 级, 并用普通饲料在 12 h 光/12 h 无光中饲养。

药品与试剂 芹菜素购自西安开来生物工程有限公司, 纯度>98%; 丙二醇甲酸乙酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、inomycin、莫能菌素、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和 LPS 均为 Sigma 公司产品; 荧光标记的单克隆抗体 CD4、CD11c、CD80、CD86、MHCII、IL-4、IFN- γ 、非特异性封闭抗体 CD16/CD32 及 IL-6、IL-10 和 TNF- α ELISA 定量试剂盒、CD11c 阳性选择分选试剂盒均购自美国 eBioscience 公司; 胎牛血清和 RPMI 1640 培养基购自 GIBCO 公司。IL-1 β ELISA 试剂盒购自美国 RND Systems 公司。细胞活性检测试剂盒 CCK-8 购自日本同仁化学研究所。卵清蛋白 (OVA)₃₂₃₋₃₃₉ 由上海吉尔生化有限公司合成。将芹菜素溶解于 DMSO, 储备液浓度为 200 mmol·L⁻¹。

脾细胞分离 C57BL/6 小鼠 CO₂ 处死后, 取出脾脏。将分离后的脾脏研碎后, 通过 200 目的铜网过滤, 通过流式细胞仪 (中国迈瑞公司) 进行细胞计数。

脾细胞的体外培养 将分离后的脾细胞与不同浓度的芹菜素 (0、1、2.5、5、10、20 μ mol·L⁻¹) 共孵育 2 h, 然后将细胞以每孔 2×10^6 个的浓度置于 24 孔细胞培养板, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 20 h, 加入 CCK8 培养 4 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。细胞存活率计算公式为: 细胞存活率 = (实验组 - 对照组) / (对照组 - 溶剂组) \times 100%。经不同浓度芹菜素孵育后的脾细胞与 LPS (1 mg·L⁻¹) 共培养 24 h, 收集细胞后用流式细胞仪检测树突状细胞共刺激分子的变化, 并收集细胞上清用 ELISA 检测炎症细胞因子的变化情况。

CD11c⁺ DC 的分选 C57BL/6 脾细胞经 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素和 LPS 共培养 24 h 后, 根据 eBioscience 公司 CD11c 阳性分选试剂盒的说明书经磁珠分选获得纯度>95%的 CD11c⁺ DCs。

过继转移实验 将纯化的 CD11c⁺ DCs 与 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ OVA₃₂₃₋₃₃₉ 肽共同孵育 2 h 后, 静脉注射 3×10^5 个细胞到 C57BL/6 小鼠体内。小鼠被分为四组: ① Api 处理的 DCs (Api); ② 未处理 DCs+OVA 组 (OVA); ③ Api+LPS 处理 DCs+OVA (Api+LPS+OVA); ④ LPS 处理 DCs+OVA (LPS+OVA)。注射 1 周后, CO₂ 处死小鼠, 分离脾细胞。脾细胞与不同浓度的 OVA₃₂₃₋₃₃₉ (0、1、10、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 共培养 72 h, 最后 4 h 加入 CCK-8 检测 T 细胞增殖情况。另外, 脾细胞与 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ OVA₃₂₃₋₃₃₉ 共培养 68 h, 加入 PMA、inomycin 和莫能菌素再培养 4 h 后, 用流式细胞术检测 CD4⁺ T 细胞中 IL-4 和 IFN- γ 的表达情况^[16]。

ELISA 检测脾细胞分泌炎症细胞因子情况 根据 eBioscience IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的说明书, 检测细胞上清中细胞因子的表达。将捕获抗体在包被液中过夜结合到 ELISA 板上, 经 BSA 封闭后, 加入标准品和待检验品 2 h, 再加入对应的检测抗体, 经 TMB 显色和终止液终止后, 酶标仪 (美国 BioTek 公司) 测定 450 nm 和参考波长 630 nm 的 OD 值, 并用 Gen5 软件计算出各种炎症细胞因子的浓度。

统计学分析 用 GraphPad Prism5.0 软件对相关数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较用 one-way ANOVA dunnett 检验, 两两之间的比较采用 LSD 法。P<0.05 差异显著。

结果

1 芹菜素对脾细胞分泌促炎症细胞因子的影响

如图 1 所示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 比, 芹菜素抑制脾细胞分泌的促炎症细胞因子 IL-1 β (A)、IL-6 (B) 和 TNF- α (C) 的产生, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素具有最强的抑制作用。然而并没有观察到芹菜素改变脾细胞分泌的抗炎细胞因子 IL-10 的表达 (图 1D)。这些结果提示, 芹菜素并非通过增加 IL-10 的表达而发挥其对促炎症细胞因子的抑制作用, 推测芹菜素可能是直接通过其特定的方式而发挥该抑制效应。

2 芹菜素对脾细胞活性的影响

如图 2 所示, 在脾细胞中加入不同浓度的芹菜素处理 24 h 后, CCK-8 检测脾细胞存活的数量结果显示, 即使较高浓度 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的芹菜素也不影响脾细胞的存活率, 但具有最强的抑制功能。因此, 选

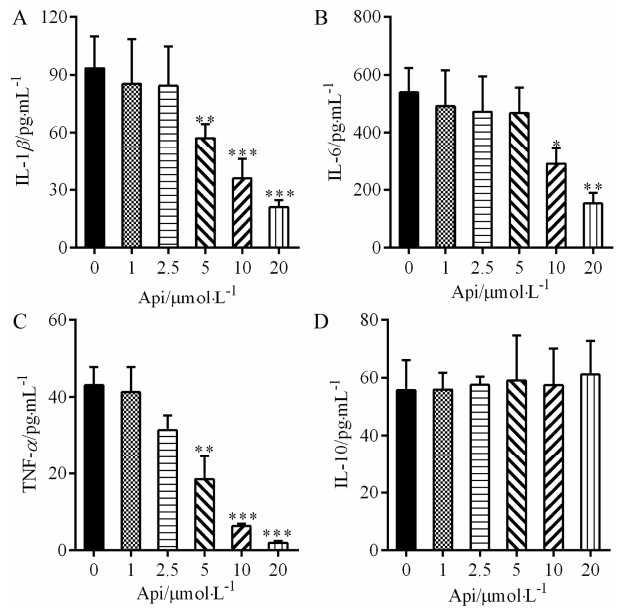


Figure 1 Effect of apigenin (Api) on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines from spleen cells. After spleen cells were treated with different concentration of Api (0, 1, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h, they were co-cultured with lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. Then the cell-free supernatants were collected to analyze the production of IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C) and IL-10 (D) using quantity ELISA assay. $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

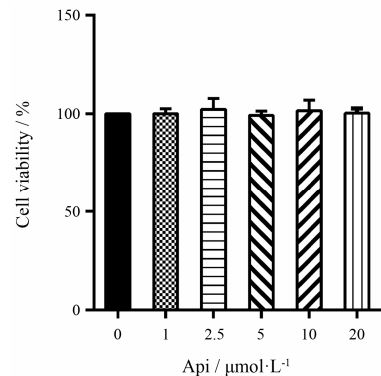


Figure 2 Effect of apigenin on spleen cell viability. After spleen cells were treated with different concentration of apigenin (0, 1, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 20 h, the CCK-8 was added to culture for another 4 h. The OD₄₅₀ values were acquired using Bio-Rad Plate reader. The cell viability was determined as described in the Materials and Methods. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

用 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的芹菜素进行后续研究。

3 芹菜素对脾细胞中共刺激分子表达的影响

在一定程度上, 炎症细胞因子可以通过反馈的方式调控 APCs 表面共刺激分子的表达。上述研究结果表明: 芹菜素能显著抑制促炎症细胞因子的产生, 而 TNF- α 和 IL-6 是 APCs (包括 B 细胞、DCs 和巨噬细胞) 分泌的主要细胞因子。因此, 本研究检测了总

APCs 表面共刺激分子的表达。实验结果显示, 芹菜素抑制脾细胞中表面共刺激分子 CD80 (A)、CD86 (B) 和 MHCII (C) 的表达 (图 3), 提示芹菜素可能通过抑制 APCs 的成熟而减少促炎症细胞因子的表达。

4 芹菜素对 DCs 共刺激分子表达的影响

DCs 是机体内最主要的 APCs, 是建立先天免疫

和获得性免疫反应的重要细胞。由于上述结果显示, 芹菜素抑制所有抗原递呈细胞表面共刺激分子的表达, 推测其可能影响 DCs 的成熟。因此, 进一步流式细胞术分析 DCs 表面共刺激分子的表达情况。图 4 结果显示, 芹菜素的确抑制 CD11c⁺ DCs 的共刺激分子 CD80 (A)、CD86 (B) 和 MHCII (C) 的表达。这些

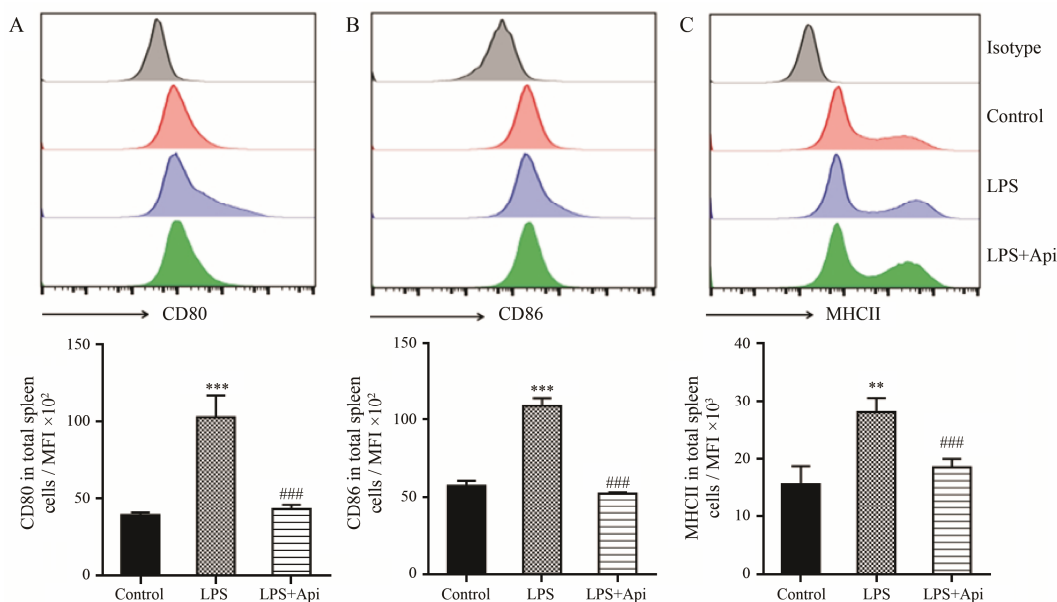


Figure 3 Effect of apigenin on the expression of co-stimulatory on total spleen cells. After spleen cells were treated without or with apigenin (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h, they were co-cultured with LPS for 24 h and the cells were collected to measure the expression of co-stimulatory. The histograms show a representative experiment (above) and bar figures are $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments (below). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs LPS. MFI: Mean fluorescence intensity. Control: 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Api treated; LPS: 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Api+LPS; LPS+Api: 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Api+LPS

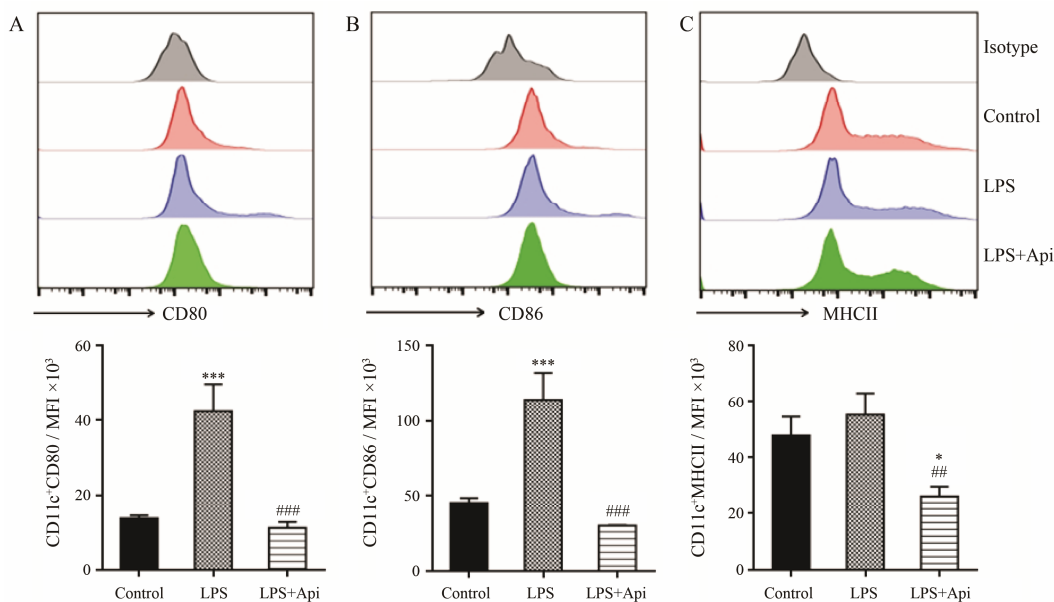


Figure 4 Effect of apigenin on the expression of co-stimulatory on DCs. After spleen cells were treated without or with apigenin (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 2 h, they were co-cultured with LPS for 24 h and the cells were collected to measure the expression of co-stimulation molecules using flow cytometry. After cells were gated into CD11c, the CD80, CD86 and MHCII expressions were analyzed using FlowJo7.6 software. The histograms show a representative experiment (above) and bar figures are $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments (below). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS

结果提示, 芹菜素可能抑制 imDCs 转化为 mDCs, 进而抑制其抗原递呈能力。

5 芹菜素处理的 DCs 对体内抗原特异性 T 细胞增殖的影响

DCs 作为主要的 APCs, 主要功能是加工抗原并递呈给 T 细胞, 从而使 T 细胞活化并发挥其效应功能 (获得性免疫应答)。在发现芹菜素可抑制 CD11c⁺ DCs 的活化后, 进一步研究芹菜素对 DCs 的成熟抑制是否导致其抗原递呈能力的改变。过继转移实验发现, 与 LPS 处理的 DCs 相比, 经芹菜素和 LPS 共处理的 DCs 抑制抗原特异性 T 细胞的增殖 (图 5A)、CD4⁺ T 细胞分泌的细胞因子 IFN- γ (图 5B) 和 IL-4 (图 5C) 的产生, 而该作用与 OVA 单独处理的 DCs 具有相似的 T 细胞增殖和分泌细胞因子的能力。这些结果提示芹菜素可以抑制脾细胞中 DCs 的抗原递呈能力, 从而诱导弱的抗原特异性 T 细胞的效应性作用, 包括 Th1 和 Th2 细胞介导的免疫应答。

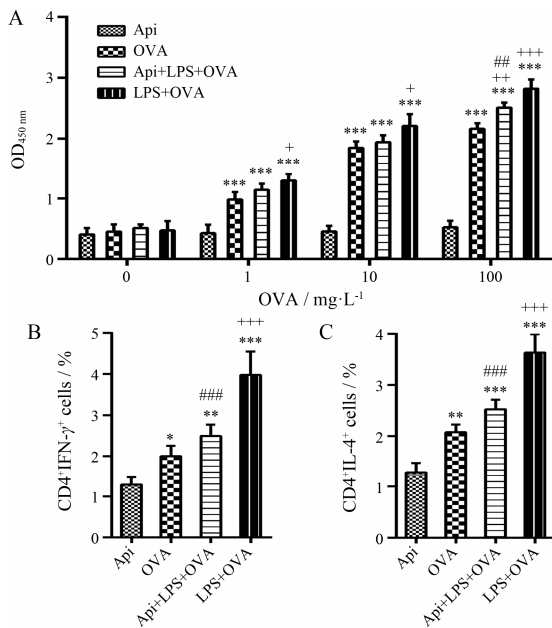


Figure 5 Api-treated DCs from C57BL/6 mice impaired antigen-specific T cell response *in vivo*. Splenocytes from the DC adoptive transfer recipient mice were re-stimulated *in vitro* with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide to determine OVA₃₂₃₋₃₃₉-specific T cell proliferation (A) and production of cytokine IFN- γ (B) and IL-4 (C) by CD4⁺ T cells. $n=5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Api; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$ vs OVA; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LPS+OVA

讨论

研究发现芹菜素具有免疫调节功能, 而其作用方式可能是通过调控炎症细胞对炎症细胞因子的分泌作用。脾脏作为机体最大的免疫器官, 是成熟 T 和

B 细胞对病原微生物的抗原以及自身抗原刺激产生免疫应答的场所; 同时也是大量捕捉和处理抗原的 APCs 存在的场所, 包括 DCs 和巨噬细胞等, 这类细胞的特点就是迅速捕获和处理抗原, 并将处理后的抗原呈递给 T 细胞。APCs 或巨噬细胞在受到抗原刺激后, 会快速产生分泌促炎症细胞因子如 IL-1 β 、IL-6、IL-12 和 TNF- α 等, 这些炎症细胞因子将进一步促进 APCs 的成熟和抗原递呈能力^[17]; 而抗炎细胞因子 IL-10, 有助于诱导 APCs 的不成熟进而诱导免疫耐受^[18,19]。除此之外, APCs 不仅可以通过炎症细胞因子诱导或辅助 Th0 细胞分化为不同的效应性 Th 细胞, 如 IL-1 β 和 IL-6 诱导 Th17 的产生, 而 TNF- α 扩增 Th9 细胞, IL-10 诱导 1 型调节性 T 细胞的产生^[9]; 也可通过 APCs 的状态及递呈抗原的能力影响 T 细胞的表型和不同效应性 Th 细胞的产生^[20]。这些促炎症 Th 细胞除了发挥其抗病毒作用外, 也介导自身免疫病的发生发展。当前的研究发现, 芹菜素抑制 LPS 刺激脾细胞对促炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的分泌, 而不影响 IL-10 的产生。这些结果提示, 芹菜素可能通过抑制促炎症细胞因子来发挥两方面的免疫调节作用: 其一, 改变巨噬细胞的吞噬功能或 DCs 的成熟进而减少抗原特异性的免疫应答, 其二, 可能有助于改善效应性 T 细胞的平衡。

除了脾脏中存在的大量 DCs 外, DCs 也可以从骨髓发育分化产生, 从而发挥其抗原递呈的能力。前期研究发现^[21,22], 芹菜素可以抑制骨髓来源的 DCs 的成熟和抗原递呈能力进而缓解小鼠关节炎的发生发展, 但并没有观察是否影响脾细胞中 DCs 的成熟及功能状态。在本研究中发现, 芹菜素可以抑制脾细胞中所有 APCs 的共刺激分子 CD80、CD86 和 MHCII 的表达, 尤其是能够抑制 CD11c⁺ (DC 的标记物) 的 DCs 表面共刺激分子的表达。这些结果提示, 芹菜素可能有助于诱导免疫耐受或削弱机体抗原特异性的免疫应答。

本研究发现芹菜素抑制了 DCs 的成熟标记物 CD80、CD86 和 MHCII 的表达, 为考察它是否改变 DCs 的抗原递呈能力, 进一步筛选芹菜素和/或 LPS 处理后的 CD11c⁺ DCs, 经 OVA 处理后, 过继转移到正常的小鼠体内, 评价抗原特异性的免疫应答。分离过继转移的小鼠脾细胞后, 体外经特异性抗原 OVA 刺激, 检测 OVA 特异性的 T 细胞增殖的结果发现, 与 LPS 和 OVA 共培养的 DCs 相比, 添加芹菜素可以显著抑制 OVA 特异性 T 细胞的增殖。进一步研究发现, 添加芹菜素也可以抑制 OVA 特异性的 CD4⁺ T

细胞表达的 IFN- γ 和 IL-4 的产生。这些结果提示, 芹菜素可能通过调控脾细胞中 DCs 的抗原递呈功能而削弱抗原特异性的 Th1 (IFN- γ) 和 Th2 (IL-4) 细胞免疫应答。

总之, 本研究证实芹菜素在体外可以直接抑制脾细胞分泌的促炎症细胞因子的产生, 而该作用可能是由于改变脾细胞中 APCs 的成熟所介导。进一步的研究发现, 芹菜素抑制 DCs 的成熟和呈递抗原的能力, 并抑制抗原特异性的 T 细胞增殖和 Th 细胞相关细胞因子的产生。这些结果提示, 芹菜素可作为中药或食物来源的新型免疫调节剂, 用于防治炎症和免疫相关的疾病等。

References

- [1] Koski GK, Cohen PA, Roses RE, et al. Reengineering dendritic cell-based anti-cancer vaccines [J]. *Immunol Rev*, 2008, 222: 256–276.
- [2] Guerder S, Joncker N, Mahiddine K, et al. Dendritic cells in tolerance and autoimmune diabetes [J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25: 670–675.
- [3] Chung CY, Ysebaert D, Berneman ZN, et al. Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 972865.
- [4] Dudek AM, Martin S, Garg AD, et al. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 438.
- [5] Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23: 445–449.
- [6] Chirumbolo S. Plant phytochemicals as new potential drugs for immune disorders and cancer therapy: really a promising path? [J]. *J Sci Food Agric*, 2012, 92: 1573–1577.
- [7] Wang J, Niu X, Du X, et al. Dietary supplementation with white button mushrooms augments the protective immune response to Salmonella vaccine in mice [J]. *J Nutr*, 2014, 144: 98–105.
- [8] Wang J, Ren Z, Xu Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering balance among CD4⁺ T-cell subsets [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180: 221–234.
- [9] Wu D, Wang J, Pae M, et al. Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases [J]. *Mol Aspects Med*, 2012, 33: 107–118.
- [10] Niu X, Huang Z, Zhang L, et al. Auraptene has the inhibitory property on murine T lymphocyte activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 750: 8–13.
- [11] Li T, Chen H, Liu XG, et al. Immunoregulatory effect of artesunate on allergic contact dermatitis and its mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 884–889.
- [12] Qu LB, Wang L, Yang R, et al. Interaction of bovine serum albumin with luteolin and apigenin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 352–357.
- [13] Birt DF, Walker B, Tibbels MG, et al. Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol [J]. *Carcinogenesis*, 1986, 7: 959–963.
- [14] Patil RH, Babu RL, Naveen Kumar M, et al. Anti-inflammatory effect of apigenin on LPS-induced pro-inflammatory mediators and AP-1 factors in human lung epithelial cells [J]. *Inflammation*, 2016, 39: 138–147.
- [15] Nicholas C, Batra S, Vargo MA, et al. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality *in vivo* and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- κ B through the suppression of p65 phosphorylation [J]. *J Immunol*, 2007, 179: 7121–7127.
- [16] Wang J, Pae M, Meydani SN, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate modulates differentiation of naive CD4⁺ T cells into specific lineage effector cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91: 485–495.
- [17] Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, et al. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells [J]. *Nature*, 1992, 360: 258–261.
- [18] Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells [J]. *Blood*, 2005, 105: 1162–1169.
- [19] Chen L, Zheng L, He W, et al. Cotransfection with IL-10 and TGF- β 1 into immature dendritic cells enhances immune tolerance in a rat liver transplantation model [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306: G575–G581.
- [20] de Lastic AL, Rodi M, Mouzaki A. Effect of dendritic cell state and antigen-presentation conditions on resulting T-cell phenotypes and Th cytokine profiles [J]. *Immunobiology*, 2016, 221: 862–870.
- [21] Yoon MS, Lee JS, Choi BM, et al. Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: implication of immunotherapeutic adjuvant [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1033–1044.
- [22] Li X, Han Y, Zhou Q, et al. Apigenin, a potent suppressor of dendritic cell maturation and migration, protects against collagen-induced arthritis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 170–180.