

# 米诺环素对 5-LOX 通路及动脉粥样硬化中炎症反应的抑制作用

陈莉<sup>1</sup>, 刘玲<sup>2</sup> (1.苏州市食品药品检验所, 江苏 苏州 215104; 2.河南科技大学, 河南 洛阳 471023)

**摘要:** 目的 米诺环素对 5-LOX 通路及动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)中炎症反应的抑制作用。方法 以高脂喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠建立 AS 模型, 同时给予米诺环素或辛伐他汀治疗 12 周。比较各组小鼠的血脂水平, 5-LOX 的表达及其代谢物 LTB<sub>4</sub> 的含量; 测定小鼠主动脉 AS 斑块的面积及斑块组成(脂质、胶原和巨噬细胞含量); PCR 方法比较小鼠主动脉中相关炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VCAM-1、MMP-2、MMP-9 mRNA 的含量。结果 米诺环素能显著减少主动脉中 5-LOX 的表达及血液中 LTB<sub>4</sub> 的含量; 降低小鼠主动脉中相关炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、VCAM-1、MMP-2、MMP-9 mRNA 的含量。在 AS 斑块的形成和发展中, 米诺环素显著降低了 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块的面积, 减少斑块中巨噬细胞的含量并增加胶原的含量, 提高斑块的稳定性。但是米诺环素没有改变 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血脂水平。结论 米诺环素有抗 AS 的作用, 其作用可能与其对 5-LOX 通路及炎性细胞和炎症介质的抑制作用有关。

**关键词:** 米诺环素; 动脉粥样硬化; 5-LOX

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)04-0415-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.007

## Minocycline Suppresses Vascular Inflammation and Atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice Via 5-LOX Pathway

CHEN Li<sup>1</sup>, LIU Ling<sup>2</sup> (1.Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou 215104, China; 2.Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the mechanism of minocycline on inflammation and atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. **METHODS** Eight-week old ApoE<sup>-/-</sup> mice were assigned randomly into two groups: model group, minocycline (12 mg·kg<sup>-1</sup>) and simvastatin group (5 mg·kg<sup>-1</sup>). The mice were sacrificed after 12 weeks. The plasma total cholesterol, triglyceride, HDL and LDL concentration were measured. The lesion of atherosclerosis was observed pathological staining. Inflammatory cytokines were measured by real-time PCR. The plasma concentration of LTB<sub>4</sub> and expression of 5-LOX was also measured by ELISA and Western blotting. **RESULTS** Minocycline significantly ameliorated the formation of typical atheromatous lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice, and reduced macrophage content in the atheromatous lesions of the aortic arch concomitant with upregulation the amount of collagen, which lead to stable atheromatous plaques. These findings were supported by results showing that aortic MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , VCAM-1, MMP-2 and MMP-9 expression was decreased by minocycline. Minocycline also reduced the plasma concentration of LTB<sub>4</sub> and aortic expression of 5-LOX. **CONCLUSION** Minocycline effectively attenuated atherosclerosis in mouse model, suggesting its therapeutic potential for atherosclerosis. The anti-atherogenic effect of minocycline might be associated with its inhibition on 5-LOX pathway.

**KEY WORDS:** minocycline; atherosclerosis; 5-LOX

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病, 炎症参与了 AS 斑块的形成和进展<sup>[1]</sup>。5-脂氧酶通路(5-LOX)是炎症反应的重要机制之一, 5-LOX 通路的终产物白三烯(LTs)是参与炎症反应的重要炎性介质。过去的研究主要集中在白三烯在哮喘、类风湿关节炎、炎症性肠病等疾病中的作用<sup>[2]</sup>。近年来研究表明 LTs 还参与了 AS 及血管重塑, 是引发 AS 发生、发展以及降低斑块稳定性的重要物质<sup>[3]</sup>。

米诺环素是一种广谱抗菌的四环素类抗菌药物, 近年来的研究发现, 米诺环素还具有其他作用, 如在神经退行性疾病中对神经细胞的保护作

用以及在血管损伤与炎症方面的保护作用, 其机制可能与其对 5-LOX 通路的抑制作用有关<sup>[4-5]</sup>。

为了进一步研究米诺环素对 5-LOX 通路的作用及其在血管损伤与炎症方面的作用, 本研究运用高脂诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠建立 AS 模型, 研究米诺环素对 5-LOX 通路及 AS 中炎症的抑制作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物

8 周龄的 ApoE<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠 45 只, ♂, 质量为 18~22 g, 购自北京大学医学部, 实验动物合格证号: SCXK(京)2011-0012。高脂饮食: 包含脂肪 15%, 胆固醇 3%, 0.5%胆酸钠和 5%白糖,

作者简介: 陈莉, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0512)68222721

E-mail: chenli-wx@hotmail.com

由江苏省协同生物工程有限责任公司提供。实验室严格消毒,保持室内安静,通风良好,饲养温度为(22±2)℃,相对湿度为 50%,光/暗周期为 12 h,自由进食、饮水。

1.2 药品与试剂

米诺环素(美国 Sigma 公司,批号: 014K1207 078K1053); 辛伐他汀(杭州默沙东制药有限公司,批号: 130222); Oil red O(美国 Sigma 公司,批号: 00625); 血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)检测试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司; LTB<sub>4</sub> ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号: 201312); Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号: 15596-026); cDNA 第一链合成试剂盒(Fermentas 公司,批号: K0171); Taq DNA Polymerase(Fermentas 公司,批号: K1621); Realltime PCR Master Mix(SYBR Green, 日本 TOYOBO 公司,批号: 65510N2)。

1.3 仪器

OLYMPUS BX51 荧光正置显微镜(日本 OLYMPUS); 全自动生化分析仪(日本日立公司); 冰冻切片机(德国 LEICA-820); 荧光实时定量 PCR(美国 BIO-RAD 公司)。

2 方法

采用公认的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠加高脂喂养建立 AS 模型。将 45 只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为模型组、米诺环素组、辛伐他汀组,每组 15 只,分别灌胃给予溶剂 0.5% CMC-Na,米诺环素 12 mg·kg<sup>-1</sup>和辛伐他汀 5 mg·kg<sup>-1</sup>,灌胃体积为 0.1 mL·(10 g)<sup>-1</sup>,连续灌胃 12 周。

2.1 动物处死及取材

小鼠禁食过夜,5%戊巴比妥钠(40 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉后迅速开腹经腹主动脉取动脉血约 0.5~0.8 mL,离心分离血清,-20℃冰箱保存用于

测定血脂及 LTB<sub>4</sub>。剪取主动脉,部分用 OCT 组织固定液包埋固定,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,进行冰冻切片及油红 O,部分主动脉用 4%多聚甲醛固定,做成石蜡切片,进行免疫组化染色,其余主动脉组织用锡纸包好编号后置于液氮转-80℃冰箱保存,用于 RT-PCR 检测相关炎症因子的表达。

2.2 血液指标的测定

采用全自动生化分析仪测定 TC、TG、HDL 和 LDL 含量。采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中 LTB<sub>4</sub> 的含量。

2.3 5-LOX 蛋白表达及其代谢产物 LTB<sub>4</sub> 含量的测定

每组取 5 根血管组织匀浆后提取总蛋白,以牛血清白蛋白作标准曲线,BCA 法测定蛋白浓度。常规电泳,转膜,封闭后加入 5-LOX 抗体及 β-actin,4℃轻摇过夜,洗膜,加入辣根过氧化物酶标记二抗,将混合好的发光液滴加到膜上,Gel Catcher 2850 凝胶扫描成像系统下进行扫描,Chemi Scope analysis 软件系统检测目的条带的光密度值,分析 Western blot 结果。

2.4 主动脉斑块内炎症因子 mRNA 水平的检测

采用改良的 Trizol 法抽提主动脉斑块组织总 RNA,并测定其浓度及纯度,取 3 g 总 RNA 逆转录合成 cDNA,逆转录反应体系为 20 μL,实时荧光定量 PCR 总体积为 20 μL 的反应体系,组成为: 2×Realtime PCR Master Mix(SYBR Green) 10 μL,模板(cDNA 稀释 10 倍)1 μL,引物 MIX(F/R 各为 10 μmol·L<sup>-1</sup>)2 μL,DEPC 7 μL,反应条件设定为 95℃ 5 min,95℃ 15 s,56℃ 20 s,40 cycles,72℃ 42 s,45℃ 30 s,95℃ 30 s,反应结束后,采用电脑自动分析软件检测各组目的基因及 β-actin 基因的 Ct 值,二者的比值即为各组 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

| 基因      | 正向引物                           | 反向引物                           |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|
| TNF-α   | 5'-GGGCAGGTCTACTTTGGAG-3'      | 5'-AGCCCATTTGAGTCCTTGAT-3'     |
| MCP-1   | 5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3'      | 5'-TGTCTGGACCCATTCCTTCT-3'     |
| IL-6    | 5'-AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGATAC-3' | 5'-AATTGGATGGTCTTGGTCCTTAGC-3' |
| VCAM-1  | 5'-TGAACCCAAACAGAGGCAGA-3'     | 5'-CGGAATCGTCCCTTTTGTAG-3'     |
| MMP-2   | 5'-CAAAGAAAGGTGCTGACTGT-3'     | 5'-GAAGGAAACGAGCGAAGG-3'       |
| MMP-9   | 5'-CAGCCAACATGACCAGGAT-3'      | 5'-TGCCGTCTATGTCGTCTTTA-3'     |
| β-actin | 5'-GGGAAATCGTGCGTGACA-3'       | 5'-CAAGAAGGAAGGCTGGAAAA-3'     |

2.5 统计学处理

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Graphpad 5.0 进行统计学分析, 采用方差分析,  $P < 0.05$  认为有统计学差异。

3 结果

3.1 各组小鼠的体质量和血脂的比较

与模型组比较 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠给予米诺环素及辛伐他汀后, 在体质量、血清 TC、TG、HDL 和 LDL

的水平无统计学差异, 可见米诺环素及辛伐他汀并不能改变 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的血脂水平, 结果见表 2。

3.2 各组小鼠血清 LTB<sub>4</sub> 及血管中 5-LOX 表达的比较

LTB<sub>4</sub> 是 5-LOX 通路的代谢物。米诺环素能够减少血清中 LTB<sub>4</sub> 的含量及 5-LOX 的表达, 结果见图 1, 说明米诺环素能够抑制 5-LOX 的表达。

表 2 对小鼠的体质量和血脂的比较( $n=15$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Effects on body weight, serum total cholesterol, triglyceride, HDL-C and LDL-C levels( $n=15$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 体质量/g    | TC/mg·dL <sup>-1</sup> | TG/mg·dL <sup>-1</sup> | HDL-C/mg·dL <sup>-1</sup> | LDL-C/mg·dL <sup>-1</sup> |
|-------|----------|------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型组   | 29.4±1.2 | 797.1±230.4            | 123.7±29.8             | 141.9±32.4                | 206.5±39.2                |
| 米诺环素组 | 27.9±1.8 | 785.3±259.8            | 114.1±26.7             | 152.8±41.6                | 186.4±38.2                |
| 辛伐他汀组 | 28.1±1.2 | 820.0±194.4            | 120.3±30.3             | 148.2±33.3                | 212.5±36.4                |

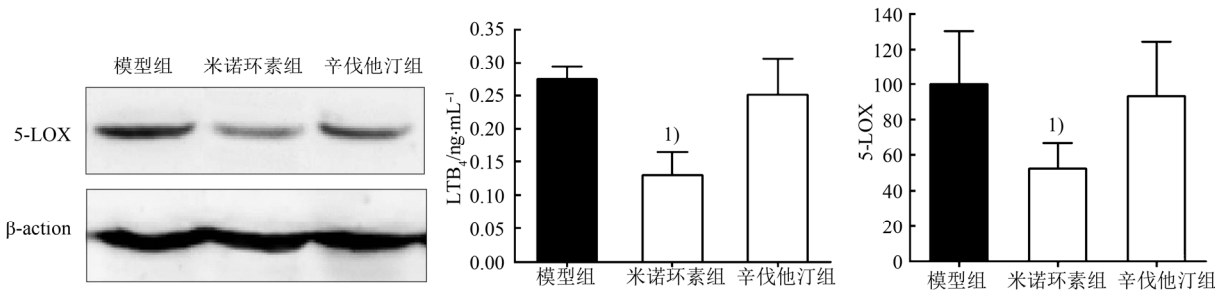


图 1 小鼠血清 LTB<sub>4</sub> 及血管中 5-LOX 的表达的比较( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与模型组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effect on plasma concentrations of LTB<sub>4</sub> and aortic expression of 5-LOX( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with control group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

3.3 各组小鼠 AS 斑块形成的比较

油红 O 能特异地结合脂质形成肉眼可见的红色。各组主动脉头臂干部位的油红 O 染色结果显示, 模型组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉弓管腔内可见明显脂质斑块形成, 米诺环素组和辛伐他汀组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉中亦可见脂质斑块形成, 但红染脂质少于模型组。对斑块面积进行半定量分析, 米诺环素和辛伐他汀治疗组脂质斑块面积明显减少 ( $P < 0.05$ )。结果见图 2。

3.4 各组小鼠 AS 斑块稳定性比较

油红 O 的染色结果显示, 模型组小鼠的斑块中含有大量的脂质, 给予米诺环素与辛伐他汀均能降低小鼠主动脉斑块中的脂质含量 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 3。

用 Mac-3 抗体标记巨噬细胞, 结果显示模型组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块处可见大量巨噬细胞沉积, 米诺环素组主动脉斑块中的巨噬细胞明显减少 ( $P < 0.01$ ), 而辛伐他汀组小鼠 AS 斑块中有所减少, 但与模型组比较差异不具有统计学意义, 结果见图 3。

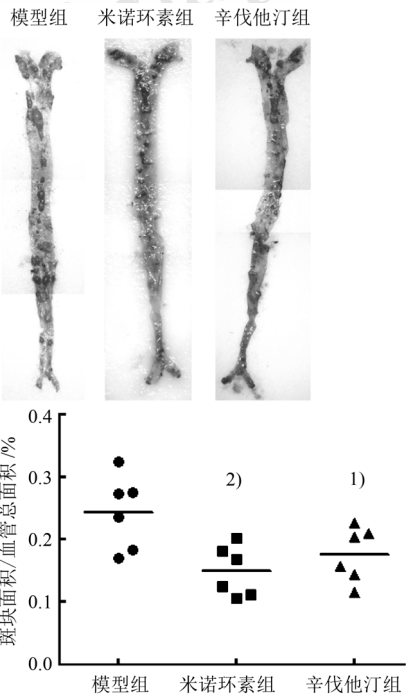


图 2 小鼠动脉粥样硬化斑块的形成的比较( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与模型组比较 <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effect on the atherosclerotic area( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ .

用 Sirius Red 染色标记斑块中的胶原, 结果显示, 与模型组 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠相比, 米诺环素组小鼠的 AS 斑块的胶原显著增加( $P<0.01$ ), 而辛伐他汀组小鼠 AS 斑块中胶原含量虽然有所增加, 但是与模型组比较没有显著性差异, 结果见图 3。

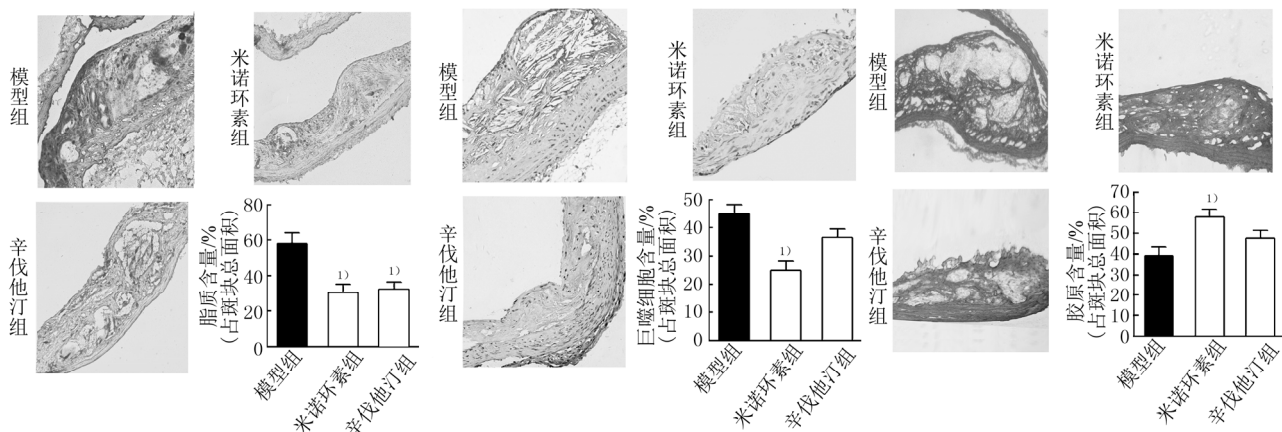


图3 各组小鼠动脉粥样硬化斑块稳定性的比较( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $100\times$ )

与模型组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect on the stability of atheromatous plaques( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $100\times$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ .

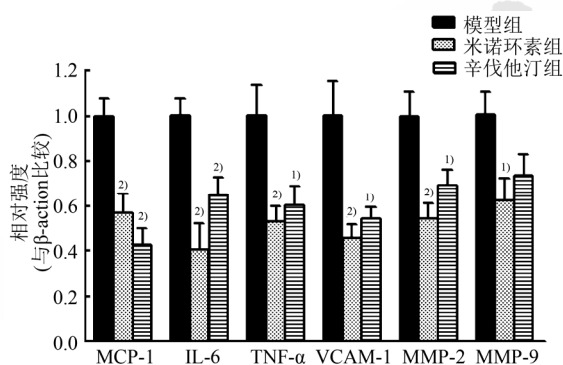


图4 小鼠主动脉中炎症因子的表达的比较( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

与模型组比较, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect on the expression of proatherogenic genes in the aorta( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Compared with control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , <sup>2)</sup> $P<0.01$ .

#### 4 讨论

AS 是一种涉及募集单核细胞侵入动脉壁的炎症性疾病, 当前用于治疗 AS 的药物主要以他汀类药物的降脂作用为主。米诺环素的抗菌外作用虽已有广泛的作用, 但是其用于 AS 治疗的机制还有待于进一步的研究。本研究应用 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠制作 AS 动物模型, 进一步论证了米诺环素对 AS 发生发展的作用及其可能的机制。

实验发现, 辛伐他汀未能降低 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 模型中的血脂水平, 原因可能与 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型

#### 3.5 各组小鼠主动脉中炎症因子表达的比较

与模型组相比, 米诺环素组和辛伐他汀组 ApoE<sup>-/-</sup>缺陷型小鼠血管组织中炎症因子 MCP-1、IL-6、TNF-α、VCAM-1、MMP-2 和 MMP-9 mRNA 水平显著下降, 结果见图 4。

本身有关, 他汀类药物降低 LDL 的作用依赖于肝脏通过上调 LDL 受体的表达以及减少胆固醇的合成, 而 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠模型中 ApoE 的缺失使 LDL 受体及其相关蛋白缺少关键的配体 LDL, 从而损害了他汀类药物的降脂效果, 这一结果与 Sparrow、Monetti、Schroete 等的研究相一致<sup>[6-8]</sup>。

本实验中, 米诺环素有效的抑制了高脂诱导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块的形成与发展。小鼠主动脉油红 O 大体染色结果显示, 米诺环素能够显著的减少斑块的形成, 减少斑块面积, 说明米诺环素在斑块形成的起始阶段就能发挥抑制作用。

米诺环素不仅减少了斑块的面积, 还改变了 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 AS 斑块的组成。油红 O 染色显示, 米诺环素可减少 AS 斑块中脂质含量, 使粥样物质减少, 斑块稳定。Masson 染色显示, 米诺环素可以增加 AS 斑块中胶原含量, 使纤维帽稳定, 斑块不易脱落。

AS 是血管壁的亚急性炎症反应, 以巨噬细胞等炎性细胞浸润为特点<sup>[9]</sup>。炎症反应贯穿了 AS 发生和发展的整个过程, 既参与 AS 的形成, 又可以影响斑块的稳定性。在炎症反应中, 众多细胞因子、粘附因子、趋化因子、生长调节因子相互作用, 产生级联放大反应, 推动 AS 不断进展<sup>[10]</sup>。本

实验中,米诺环素能够显著的减少斑块中巨噬细胞的含量,并且减少主动脉中相关炎症因子TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-6、VCAM-1、MMP-2、MMP-9的表达,提示米诺环素具有抑制AS中炎症反应的作用,有利于AS的治疗。并且米诺环素在抑制AS炎症的作用比辛伐他汀更显著,主要表现在显著的减少斑块中巨噬细胞的含量及主动脉炎症因子的表达、增加胶原的含量,从而增加斑块的稳定性。

米诺环素增加斑块稳定性的机制可能与其对主动脉中5-LOX的表达的抑制及血液中LTB<sub>4</sub>含量的减少作用有关。5-LOX催化花生四烯酸转化成白三烯,白三烯产物是引发AS炎症发生、发展的重要物质,其中的LTB<sub>4</sub>就是一种有效的中性粒细胞化学诱导物,它能改变血管通透性,可使白细胞黏附于内皮细胞,此过程是早期血管炎症反应和损伤的关键步骤,对炎症反应起到放大作用。临床研究也证实了AS患者的主动脉、冠状动脉和颈动脉的血管斑块的损伤时发现巨噬细胞、泡沫细胞、树突细胞以及嗜中性白细胞的5-LOX的表达明显增加。在AS患者中,有临床症状者粥样硬化斑块的5-LOX表达水平较之无症状者明显升高,MMP-2和MMP-9表达水平和活性水平均增加,并与5-LOX表达明显相关<sup>[11]</sup>,免疫组化结果显示,不稳定性斑块以及容易破裂的斑块纤维帽肩部均有大量的5-LOX表达,表明5-LOX与AS斑块稳定性有着密切联系<sup>[12]</sup>。

这些结果都表明,米诺环素能够抑制AS的发生和发展,这种作用与其对5-LOX通路和炎性细胞及炎症介质的抑制作用有关。

## REFERENCES

- [1] HANSSON G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [2] SHARMA J N, MOHAMMED L A. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets [J]. *Inflammopharmacology*, 2006, 14(1/2): 10-16.
- [3] JAWIEN J, KORBUT R. The current view on the role of leukotrienes in atherogenesis [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2010, 61(6): 647-650.
- [4] CHU L S, FANG S H, ZHOU Y, et al. Minocycline inhibits 5-lipoxygenase activation and brain inflammation after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 763-772.
- [5] OHSHIMA S, FUJIMOTO S, PETROV A, et al. Effect of an antimicrobial agent on atherosclerotic plaques: assessment of metalloproteinase activity by molecular imaging [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(12): 1240-1249.
- [6] SPARROW C P, BURTON C A, HERNANDEZ M, et al. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(1): 115-121.
- [7] MONETTI M, CANAVESI M, CAMERA M, et al. Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and anti-inflammatory properties in apoE-deficient mice [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(5): 441-449.
- [8] SCHROETER M R, HUMBOLDT T, SCHAFFER K, et al. Rosuvastatin reduces atherosclerotic lesions and promotes progenitor cell mobilisation and recruitment in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 205(1): 63-73.
- [9] MAGRONE T, JIRILLO E. A broad variety of antigens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis: how to neutralize noxious reactions in the host [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2010, 10(2): 149-160.
- [10] TEDGUI A, MALLAT Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways [J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 515-581.
- [11] CIPOLLONE F, MEZZETTI A, FAZIA M L, et al. Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(8): 1665-1670.
- [12] QIU H, GABRIELSEN A, AGARDH H E, et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(21): 8161-8166.

收稿日期: 2014-08-14

## 葛根素对 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肝癌 SMMC-7721 细胞的影响

袁涛<sup>1</sup>, 朱炳喜<sup>2\*</sup>, 刘军权<sup>3</sup>, 周燊<sup>3</sup>, 吕小婷<sup>3</sup>, 周忠海<sup>3</sup>, 陈永强<sup>3</sup> (1.徐州医学院, 江苏 徐州 221002; 2.徐州医学院附属医院, 江苏 徐州 221002; 3.中国人民解放军第九七医院, 江苏 徐州 221004)

**摘要:** 目的 探讨葛根素对人  $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肝癌 SMMC-7721 细胞的影响及机制。方法 异戊烯焦磷酸法(isopentenylpyrophosphate, IPP)体外扩增人外周血  $\gamma\delta$ T 细胞, 不同浓度葛根素作用于  $\gamma\delta$ T 细胞 24, 48, 72 h, CCK8 法检测葛根素对  $\gamma\delta$ T 细胞增殖率的影响, FCM 检测  $\gamma\delta$ T 细胞穿孔素(perforin, PFP)、颗粒酶 B(granzyme B, GrB)及 CD107a 的表达情况, LDH 释放法检测  $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤活性, Western blot 法检测  $\gamma\delta$ T 细胞中 P-ERK1/2

作者简介: 袁涛, 男, 硕士生 Tel: 18796249189 E-mail: 578495234@qq.com \*通信作者: 朱炳喜, 男, 副教授, 硕士 Tel: (0516)85806250 E-mail: 82200496@163.com