

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- α 、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LTB₄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LTB₄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^[11],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^[12]。

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 A₄ 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¹, 朱炳喜^{2*}, 刘军权³, 周燊³, 吕小婷³, 周忠海³, 陈永强³ (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

和 Bcl-2 的表达情况。结果 葛根素作用人 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h 后,葛根素 $1.6\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 $\gamma\delta$ T 细胞增殖明显($P<0.05$),葛根素 $12.5\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组人 $\gamma\delta$ T 细胞 PFP、GraB 及 CD107a 表达明显高于对照组($P<0.05$),葛根素 $3.125\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组人 $\gamma\delta$ T 细胞 P-ERK1/2 和 Bcl-2 表达显著增高($P<0.05$),且葛根素 $3.125\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组人 $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞杀伤活性较对照组明显增强($P<0.05$)。结论 葛根素能够促进人 $\gamma\delta$ T 细胞增殖,并能够提高 $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤活性,其机制可能与上调 $\gamma\delta$ T 细胞表面的 PFP, GraB 和 CD107a 的表达及活化 P-ERK1/2 和 Bcl-2 的表达有关。

关键词: 葛根素; $\gamma\delta$ T 细胞; 肝癌 SMMC-7721 细胞; 杀伤活性

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)04-0419-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.008

Puerarin Influences the Cytotoxic Activity of $\gamma\delta$ T Cells Against Liver Cancer Cell Line SMMC-7721

YUAN Tao¹, ZHU Bingxi^{2*}, LIU Junquan³, ZHOU Yu³, LYU Xiaoting³, ZHOU Zhonghai³, CHEN Yongqiang³
(1.Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 2.The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China; 3.97th Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of puerarin on $\gamma\delta$ T cells and their cytotoxicity on human liver cancer cell line SMMC-7721. **METHODS** Amplification $\gamma\delta$ T cells of human peripheral blood *in vitro* by using isopentenylpyrophosphate(IPP). $\gamma\delta$ T cells were cultured with different concentrations of puerarin *in vitro*. CCK8 assay was used to measure the growth curve of $\gamma\delta$ T cells. The expression of perforin(PFP), Granzyme B(GraB) and CD107a on $\gamma\delta$ T cells were detected by FCM. The cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells to SMMC-7721 cells was detected by lactate dehydrogenase release(LDH). The expression of phosphorylation of kinase1/2(P-ERK1/2) and Bcl-2 of $\gamma\delta$ T cells was measured by Western blot. **RESULTS** After cultured with puerarin for 48 h, the proliferation rate of human $\gamma\delta$ T cells increased significantly with puerarin at concentrations from $1.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$); the expression of GraB, PFP, CD107a and P-ERK1/2, p-AKT of human $\gamma\delta$ T cells were significantly higher than that of control group with puerarin at concentrations from 12.5 to $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$) and 3.125 to $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$), respectively; the cytotoxic activity of human $\gamma\delta$ T cells against SMMC-7721 was remarkably higher than that of the control group with puerarin at concentrations from 3.125 to $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$). **CONCLUSION** Puerarin at a certain range of concentration could promote the growth of $\gamma\delta$ T cells and enhance the cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells to SMMC-7721 cells. The possible mechanism may be that puerarin could increase the expression of PFP, GraB, CD107a, P-ERK1/2 and Bcl-2.

KEY WORDS: puerarin; $\gamma\delta$ T cells; liver cancer cell line SMMC-7721; cytotoxic activity

葛根为常用中药之一,在我国具有悠久的历史。《本经》、《别录》、《本草纲目》等均有记载,具有解肌退热,生津、透疹、升阳止泻之功。葛根素(puerarin)是葛根的主要活性成分,其化学名为 8- β -D 葡萄糖吡喃糖-4, 7 二羟基异黄酮,分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$, 分子量为 416^[1-2]。现代药理实验研究表明,葛根素具有降低血压、减慢心率、降低心肌耗氧量、保护心肌、肾脏、抗缺血再灌注损伤、防治糖尿病及其并发症等作用^[3-5]。 $\gamma\delta$ T 细胞是机体的一种免疫细胞,主要以非 MHC 限制方式识别抗原,可以分泌多种细胞因子诱发获得性免疫反应,被认为是联系机体固有免疫和适应性免疫的一种非传统 T 细胞,在机体的抗感染、抗肿瘤等方面发挥重要作用^[6-7]。本实验主要研究葛根素在体外作用于人 $\gamma\delta$ T 细胞前后 $\gamma\delta$ T 细胞功能及蛋白水平表达的变化,探讨葛根素对人 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肝癌 SMMC-7721 细胞的影

响及其可能的机制,为葛根素用于抗肿瘤治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人肝癌细胞株 SMMC-7721(解放军第九七医院中心实验室);葛根素(美国 Sigma 公司,批号:031M1302V);异戊烯焦磷酸(isopentenylpymphosphate, IPP)、RPMI1640 培养基、小牛血清均购自 Gibco 公司;anti- $\gamma\delta$ TCR-FITC、anti-GraB-PE 及 anti-PFP-PE 均购自 Ebioscience 公司;anti-CD107a-APC(美国 BD 公司);CCK8 试剂(碧云天生物技术研究所);兔抗人 P-ERK1/2 和 Bcl-2 单克隆抗体(Cell Signaling Technology,批号分别为 0005, 0014)。

D-37520 型离心机(德国 Eppendorf 公司);CK50-F200 型倒置显微镜(德国 Wilovert 公司);流式细胞检测仪(美国 BD 公司);DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 葛根素溶液的配制

称取葛根素 100 mg, 加样枪取 DMSO 6 mL 溶解葛根素, 充分混匀, 配成浓度为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 分装入试剂瓶中, 每瓶 3 mL, 贴上标签, -20°C 保存, 使用时采用等比稀释法稀释。

1.3 人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的培养和鉴定

按陈复兴等^[8]的方法进行培养, 抽取健康人外周血 20 mL, 以淋巴细胞分离液分离出末梢血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 将 PBMC 加入含白细胞介素-2(IL-2)、小牛血清和 IPP 的 RPMI1640 培养液中, 置于 75 cm^2 细胞培养瓶, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 根据细胞生长情况及时添加培养液。收集培养 10 d 的贴壁生长细胞进行细胞表面标志检测和相关实验。

1.4 肝癌细胞株 SMMC-7721 的培养

将肝癌 SMMC-7721 细胞用 RPMI1640 培养基于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 2~3 d, 待细胞铺满瓶底时用胰蛋白酶消化收集细胞, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃去上清, PBS 吹打, 计数后用于实验。

1.5 CCK8 法检测不同浓度葛根素对人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞生长的影响

取培养 10 d 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 加入葛根素, 终浓度分别为 0.8, 1.6, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设不加药对照组, 每组设 5 个复孔, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中继续培养 24, 48, 72 h 后, 每孔加入 CCK8 20 μL , 继续培养 4 h 后弃去上清, 于酶标仪 450 nm 处检测各孔吸光值(OD), 求其平均值, 同时计算细胞生长增殖率。 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞增殖率 = $(\text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{对照组}}) / \text{OD}_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.6 FCM 法检测葛根素作用 48 h 后 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞中穿孔素(perforin, PFP)、颗粒酶 B(granzyme B, GrB)、CD107a 的表达

将培养 10 d 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞铺入 6 孔板, 每孔 2 mL, 加入不同浓度葛根素, 终浓度分别为 0.8, 3.125, 12.5, 50、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个浓度设 3 个复孔, 并设不加药对照组, 用 PBS 洗涤 3 次, 调整细胞数至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每管加入相应流式抗体, 设置同型对照抗试管, 孵育、洗涤后用流式细胞仪检测和分析。

1.7 LDH 释放法检测葛根素作用 48 h 后的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞杀伤活性

将培养 10 d 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞铺入 6 孔板, 每孔

2 mL, 培养 24 h 后加入不同浓度的葛根素, 终浓度分别为 0.8, 3.125, 12.5, 50, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续培养 48 h, 同时设不加药对照组。收集 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞为效应细胞和肝癌 SMMC-7721 细胞为靶细胞, 将效靶细胞分别配成 $1.2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液, 效靶细胞等体积混合(效靶细胞数比例=10:1), 置 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 6 h 后, 再以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液。340 nm 波长下全自动生化分析仪测定吸光度值(A), 每检测样本设 3 个复管。 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的杀伤活性 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{效应细胞自然释放组}}) / (A_{\text{靶细胞最大释放组}} - A_{\text{靶细胞自然释放组}}) \times 100\%$ 。每检测样本重复 3 遍, 取平均值。

1.8 Western blot 法测葛根素作用 48 h 后的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞 P-ERK1/2 和 Bcl-2 蛋白的表达

取培养 10 d 的 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞, 配成 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液, 分别接种于 6 孔板, 2 mL/孔⁻¹, 加入葛根素, 终浓度分别为 0.8, 3.125, 12.5, 50, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 同时设不加药对照组。继续培养 48 h 后收集 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞, 提取蛋白, 电泳分离、转膜、封闭后, 加入 1:500 稀释的 P-ERK1/2 抗体和 Bcl-2 抗体, 置于 4°C 冰箱孵育过夜, 加入相应的二抗孵育, 显色后上机扫描条带。用 Image J 图像分析软件进行分析。

1.9 统计方法

所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞的培养及鉴定

FCM 检测结果显示, 人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞在体外培养 10 d 后, 比例由培养前的 3.20% 增加到培养后的 89.95%。结果见图 1。

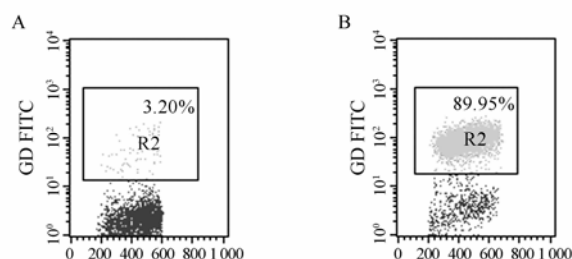


图 1 培养 10 d 前后人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞 FCM 检测结果

A—培养前; B—培养 10 d 后。

Fig. 1 The proportion of $\gamma\delta\text{T}$ cells before and after incubation were analysed by the flow cytometry

A—before incubation; B—after incubation.

2.2 CCK8 法检测不同浓度葛根素对 $\gamma\delta$ T 细胞生长的影响

葛根素作用 $\gamma\delta$ T 细胞 24, 48, 72 h 后, 葛根素 1.6~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 $\gamma\delta$ T 细胞增殖率均较对照组显著升高($P<0.05$); 作用 24 h 后的 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组、作用 48 h 后的 400~800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组和作用 72 h 后的 200~800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 $\gamma\delta$ T 细胞抑制率分别与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$), 相同浓度(1.6~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的葛根素作用 $\gamma\delta$ T 细胞后, $\gamma\delta$ T 细胞增殖率在 48 h 达最高峰, 并且在浓度为 12.5~25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组时, 与 24, 72 h 组比较有统计学意义($P<0.05$); 作用 48 h 时, 葛根素浓度为 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞增殖率(39.73%±3.50%)最高。结果见表 1。

表 1 不同浓度葛根素对 $\gamma\delta$ T 细胞增值率的影响($n=3$)

Tab. 1 Effect of different concentrations puerarin on $\gamma\delta$ T cell proliferation rate($n=3$)

葛根素浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\gamma\delta$ T 细胞增殖率/%		
	24 h	48 h	72 h
0(对照组)	0	0	0
0.8	2.31±0.72	4.23±1.08	2.91±1.49
1.6	15.50±2.94 ¹⁾	16.67±3.27 ¹⁾	10.48±1.74 ¹⁾
3.125	23.89±2.84 ¹⁾	26.26±2.24 ¹⁾	17.59±1.77 ¹⁾
6.25	30.08±2.70 ¹⁾	32.51±3.44 ¹⁾	25.64±2.49 ¹⁾
12.5	33.62±1.73 ¹⁾	39.73±3.50 ¹⁾²⁾	30.62±1.37 ¹⁾
25	28.44±1.77 ¹⁾	33.57±3.28 ¹⁾²⁾	22.35±1.95 ¹⁾
50	18.93±1.54 ¹⁾	22.27±2.66 ¹⁾	8.23±0.99 ¹⁾
100	11.26±3.60 ¹⁾	10.80±2.79 ¹⁾	3.69±0.90 ¹⁾
200	3.36±2.07	1.15±0.55	-5.28±1.13 ¹⁾
400	1.19±0.31	-10.77±3.50 ¹⁾	-15.40±3.01 ¹⁾
800	-6.63±1.87 ¹⁾	-17.45±3.08 ¹⁾²⁾	-32.15±2.98 ¹⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 同时与 24 h 和 72 h 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with 24 h and 72 h groups, ²⁾ $P<0.05$.

2.3 葛根素对人 $\gamma\delta$ T 细胞 GraB、PFP、CD107a 表达的影响

葛根素作用于人 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h 后, 人 $\gamma\delta$ T 细胞 GraB、PFP 和 CD107a 的表达不同程度升高, 12.5~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组与对照组比较均有统计学意义($P<0.05$), 且当葛根素浓度为 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 种标志物表达率达到最大值, 当葛根素浓度 >12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 3 种标志物的表达率开始下降。结果见表 2。

2.4 葛根素对人 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肝癌 SMMC-7721 细胞活性的影响

浓度为 0.8~12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葛根素作用 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h 后, 对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤活性随着葛根素浓度的增加而增强, 浓度为

12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤活性(60.83%±0.92%)达到最大, 当葛根素浓度超过 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\gamma\delta$ T 细胞的杀伤活性随药物浓度的增加而下降, 结果见表 2。

表 2 葛根素诱导 $\gamma\delta$ T 细胞 PFP、GraB、CD107a 的表达及其对 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肝癌 SMMC-7721 细胞活性($n=3$)

Tab. 2 The expression levels of PFP, GraB and CD107a of $\gamma\delta$ T cells, and the cytotoxic activity of $\gamma\delta$ T cells on SMMC-7721 liver cancer cultured with puerarin($n=3$)

葛根素/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PFP/%	GraB/%	CD107a/%	杀伤 SMMC- 7721 细胞活性/%
0(对照组)	73.55±4.42	54.73±1.76	86.11±1.65	47.73±1.31
0.8	84.73±1.87 ¹⁾	58.27±2.23	87.52±1.31	51.02±1.26
3.125	85.70±2.08 ¹⁾	63.77±2.90 ¹⁾	88.41±1.19	57.57±1.79 ¹⁾
12.5	90.02±1.72 ¹⁾	70.95±2.40 ¹⁾	91.44±1.34 ¹⁾	60.83±0.92 ¹⁾
50	86.96±1.08 ¹⁾	65.60±2.85 ¹⁾	89.35±1.83 ¹⁾	57.75±1.79 ¹⁾
200	62.46±4.67 ¹⁾	54.71±3.74	85.97±1.35	50.01±1.85

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

2.5 葛根素对人 $\gamma\delta$ T 细胞 P-ERK1/2 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

不同浓度葛根素作用人 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h 后, $\gamma\delta$ T 细胞中的 P-ERK1/2 和 Bcl-2 蛋白表达存在差异, 灰度值分析结果显示, 葛根素浓度 3.125~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, P-ERK1/2 的表达高于对照组($P<0.05$); 葛根素浓度 0.8~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Bcl-2 的表达高于对照组($P<0.05$); 并且 2 种蛋白量均在葛根素浓度 12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最大值。结果见图 2。

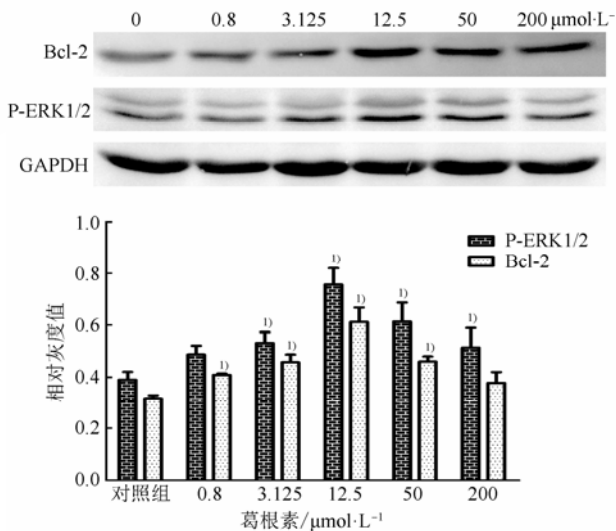


图 2 不同浓度葛根素作用人 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h 后的 P-ERK1/2 和 Bcl-2 蛋白表达

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 The expression of P-ERK1/2 and Bcl-2 in the $\gamma\delta$ T cells cultured with different concentrations of puerarin at 48 h Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$.

3 讨论

原发性肝癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一^[9-10]。大部分患者在确诊肝癌时已失去手术时机, 其他治疗方法效果也较差, 临床上急需寻找一些新的药物及方法来提高肝癌的治疗效果, 提高肝癌患者的生存率。

$\gamma\delta$ T 细胞是 T 淋巴细胞的一个亚群, 在调节免疫应答、抗微生物感染和抗肿瘤免疫方面发挥重要作用^[11-12]。研究表明, $\gamma\delta$ T 细胞对包括肝细胞癌、大肠癌、肺癌、前列腺癌在内的多种类型的肿瘤细胞都表现出较强的细胞毒性^[13-14]。夏莉等^[15]发现体外诱导培养的 $\gamma\delta$ T 细胞对人肝癌 SMMC-7721 细胞有明显杀伤作用。Cai 等^[16]研究发现肝癌癌周组织中的 $\gamma\delta$ T 细胞数量多少可影响肝癌患者术后的复发率, 并认为提高 $\gamma\delta$ T 细胞的数量及功能可能成为今后治疗肝癌的一种方法。

近年来研究显示葛根素对多种肿瘤细胞具有抗肿瘤活性, 如食管癌、结肠癌和胃癌等^[17-19]。本实验研究显示, 葛根素在浓度为 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、作用 48 h 时对 $\gamma\delta$ T 细胞具有最大的促增殖作用, 但是超过特定浓度也能观察到葛根素对 $\gamma\delta$ T 细胞抑制作用, 因此推测葛根素对 $\gamma\delta$ T 细胞具有双向调节作用, 在适宜的浓度下可促进 $\gamma\delta$ T 细胞增殖。

本研究结果提示, 葛根素对人 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖与活化作用可能与激活 P-ERK1/2 通路及提高 Bcl-2 蛋白表达有关。细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2) 是 ERK 家族的重要成员, 属于 MAPK 家族成员之一, 活化的 ERK1/2 即 P-ERK1/2, 可作用于多种核转录因子和蛋白激酶, 参与细胞的增殖、分化和凋亡^[20]。Dumont 等^[21]将研究发现 ERK1/2 信号通路可影响 T 淋巴细胞的增殖。Bcl-2 蛋白是 Bcl-2 蛋白家族中一种重要的抗凋亡蛋白, 其表达水平增高可抑制细胞的凋亡, 与细胞凋亡有着密切的关系。Charo 等^[22]研究发现, Bcl-2 的高表达可促进 T 细胞的增殖与活化。本实验通过 Western blot 法检测, 葛根素可提高 P-ERK1/2 及 Bcl-2 蛋白的表达, 葛根素浓度 $12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 2 种蛋白均表达最高, 且该浓度下 $\gamma\delta$ T 细胞增殖率最高。

PFP 和 GraB 是反映效应细胞细胞毒性的两类重要的效应分子, 主要存在于活化的细胞毒 T 细胞和 NK 细胞的胞浆颗粒中, GraB 与 PFP 杀伤靶

细胞时具有协同作用, GraB 可通过 PFP 形成的孔道进入靶细胞, 进一步导致靶细胞的死亡^[23-25]。

笔者早期研究显示, CD107a 是 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤活性的一个重要标志, $\gamma\delta$ T 细胞 CD107a 的表达与其抗肿瘤能力具有正相关性^[26]。不同浓度葛根素作用于 $\gamma\delta$ T 细胞后, PFP、GraB、CD107a 的表达均有不同程度的增加, 这与葛根素作用后的 $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞杀伤活性的峰值一致, 表明葛根素增强 $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤活性可能与上调 PFP、GraB、CD107a 的表达有关。并且实验表明, 葛根素作用后的 $\gamma\delta$ T 细胞增殖趋势与葛根素作用后的 $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞杀伤活性的增长趋势高度一致, 进而说明葛根素可能通过促进 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖增强对肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制。

综上所述, 葛根素能够促进人 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖并提高其杀伤活性, $\gamma\delta$ T 细胞增殖机制可能与葛根素激活 P-ERK1/2 信号通路与增加 Bcl-2 表达有关, 提高 $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌 SMMC-7721 细胞杀伤活性可能与提高 $\gamma\delta$ T 细胞 GraB、PFP 和 CD107a 表达有关, 以上实验结果为葛根素用于肝癌的免疫治疗提供了一定实验依据。

REFERENCES

- [1] QIN F, HUANG X, ZHANG H M, et al. Pharmacokinetic comparison of puerarin after oral administration of Jiawei-Xiaoyao-San to healthy volunteers and patients with functional dyspepsia: influence of disease state [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(1): 125-129.
- [2] SEITZ H K, STICKEL F. Alcoholic liver disease in the elderly [J]. *Clin Geriatr Med*, 2007, 23(4): 905-921.
- [3] LIU X J, ZHAO J, GU X Y. The effects of genistein and puerarin on the activation of nuclear factor-kappaB and the production of tumor necrosis factor-alpha in asthma patients [J]. *Pharmazie*, 2010, 65(2): 127-131.
- [4] TAN Y, LIU M, WU B. Puerarin for acute ischaemic stroke [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(1): CD004955. doi: 10.1002/14651858.CD004955.pub2.
- [5] 徐杰. 葛根素新型给药途径的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(14): 1184-1187.
- [6] KABELITZ D, PETERS C, WESCH D, et al. Regulatory functions of gammadelta T cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(3): 382-387.
- [7] WU Y L, DING Y P, TANAKA Y, et al. Gammadelta T cells and their potential for immunotherapy [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(2): 119-135.
- [8] 陈复兴, 刘军权, 冯霞, 等. 一种体外扩增人 $\gamma\delta$ T 细胞的新方法[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(7): 662-664.
- [9] EL-SERAG H B, RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroentero-*

- logy, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [10] JIANG S M, CHEN Z X, CAI L. Effect of FGF21 on TGF- β signaling pathway in rat liver cancer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(3): 261-265.
- [11] 王孟, 马钰, 陈姣, 等. $\gamma\delta$ T 细胞在病毒感染性疾病中的研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2012, 19(4): 181-185.
- [12] KISIELOW J, KOPF M. The origin and fate of gammadeltaT cell subsets [J]. Curr Opin Immunol, 2013, 25(2): 181-188.
- [13] TOUTIRAIS O, CABILLIC F, LE FRIEC G, et al. DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells [J]. Eur J Immunol, 2009, 39(5): 1361-1368.
- [14] ZHAO H, XI X, CUI L, et al. CDR3 δ -grafted $\gamma\delta$ 2T cells mediate effective antitumor reactivity [J]. Cell Mol Immunol, 2012, 9(2): 147-154.
- [15] XIA L, YU H, LIU Y X. Experimental study of $\gamma\delta$ T cells killing effect on liver cancer cells [J]. Chin J Immunol(中国免疫学杂志), 2014, 30(3): 357-359.
- [16] CAI X Y, WANG J X, YI Y, et al. Low counts of gammadelta T cells in peritumoral liver tissue are related to more frequent recurrence in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(2): 775-780.
- [17] WANG Y, MA Y, ZHENG Y, et al. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of a novel puerarin nanosuspension against colon cancer, with high efficacy and low toxicity [J]. Int J Pharm, 2013, 441(1/2): 728-735.
- [18] LI X R, ZHANG Q Q, CUI Y H, et al. The growth influence on human esophageal cancer cells EC9706 induced by puerarin [J]. J Mod Oncol(现代肿瘤医学), 2010, 18(10): 1922-1924.
- [19] MA X L, YU Y X, ZHANG Y, et al. Effect of puerarin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer MGC-803 and AGS cells [J]. Cancer Res Clin(肿瘤研究与临床), 2013, 25(9): 585-587.
- [20] KARIN M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases [J]. J Biol Chem, 1995, 270(28): 16483-16486.
- [21] DUMONT F J, STARUCH M J, FISCHER P, et al. Inhibition of T cell activation by pharmacologic disruption of the MEK1/ERK MAP kinase or calcineurin signaling pathways results in differential modulation of cytokine production [J]. J Immunol, 1998, 160(6): 2579-2589.
- [22] CHARO J, FINKELSTEIN S E, GREWAL N, et al. Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival [J]. Cancer Res, 2005, 65(5): 2001-2008.
- [23] EL-MESALLAMY H O, HAMDY N M, EL-ETRIBY A K, et al. Plasma granzyme B in ST elevation myocardial infarction versus non-ST elevation acute coronary syndrome: comparisons with IL-18 and fractalkine [J]. Mediators Inflamm, 2013(2013): 343268. doi: 10.1155/2013/343268.
- [24] VOSKOBOINIK I, DUNSTONE M A, BARAN K, et al. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology [J]. Immunol Rev, 2010, 235(1): 35-54.
- [25] TRAPANI J A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases [J]. Genome Biol, 2001, 2(12): REVIEWS3014.
- [26] ZHOU Z H, CHEN F X, LV X T, et al. Relationship of CD107a expression with cytotoxic activity of human peripheral $\gamma\delta$ T cells [J]. Chin J Cancer Biother(中国肿瘤生物治疗杂志), 2011, 18(3): 301-305.

收稿日期: 2014-09-18

黄芩对大黄蒽醌在提取精制过程中转化的影响

田杰, 刘喜纲, 常金花, 刘沛, 李忠思, 刘丽艳, 刘翠哲* (河北省中药研究与开发重点实验室 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

摘要: 目的 探讨黄芩对大黄中 5 种蒽醌类成分在提取精制过程中相互转化的影响。方法 HPLC 测定药材和提取物中 5 种成分的含量, 比较药材和提取物中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的相对比例; 再分别用 5 种蒽醌的对照品加入和不加黄芩药材提取液模拟提取精制过程, 考察 5 种蒽醌成分之间的转化情况。结果 大黄药材和提取物中 5 种成分的相对比例有明显变化, 大黄酸在提取物中的比例增高; 同时采用对照品模拟提取精制过程时各个成分并无转化, 而加入黄芩药材提取液后, 大黄酸经过提取精制处理后能部分转化为大黄素, 其余 4 种成分之间无转化。结论 黄芩和大黄药材配伍提取可以使大黄蒽醌类成分发生转化。

关键词: 大黄; 蒽醌; 黄芩; 提取; 转化

中图分类号: R284.1, R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0424-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.009

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073146, 81341143); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZH2012050); 河北省高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4 号)

作者简介: 田杰, 男 Tel: (0314)2290629 E-mail: tianjie006@163.com *通信作者: 刘翠哲, 女, 博士, 研究员, 博导 Tel: (0314)2290359 E-mail: liucuihexy@163.com