

侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞功能的影响

李颖¹, 董武², 陈复兴³, 刘军权³, 周燊³, 杨琨⁴, 白枫^{2*}

(1. 大连医科大学, 辽宁 大连 116044; 2. 辽宁省人民医院, 沈阳 110016;

3. 中国人民解放军第 97 医院 肿瘤生物治疗中心, 江苏 徐州 221004;

4. 辽宁省人民医院 肿瘤生物治疗中心, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:探讨侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞功能的影响。方法:异戊烯焦磷酸/isopentenyl pyrophosphate (IPP) 法体外扩增人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞。各浓度侧柏酮作用人 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h, CCK-8 法检测其增殖力, 流式细胞术测其表型、细胞周期、细胞凋亡及表达 CD107a, 穿孔素(perforin), 粒酶 B(granzyme B) 的情况。结果:300 ~ 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 侧柏酮明显抑制人 $\gamma\delta$ T 细胞生长 ($P < 0.05$); 0.036 25 ~ 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 侧柏酮明显促进其生长 ($P < 0.05$), 9.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达增殖最高峰 (37.03 \pm 0.52)%, 且穿孔素表达率明显升高 (39.94 \pm 1.04) % ($P < 0.05$), 余与空白组相比无显著差异。结论:9.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 侧柏酮明显促进人 $\gamma\delta$ T 细胞增殖并上调其穿孔素的表达。

[关键词] 人 $\gamma\delta$ T 细胞; 侧柏酮; 穿孔素

[中图分类号] R284.1; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)23-0107-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230107

Effect of Thujone on Human Peripheral Blood $\gamma\delta$ T Cells Function *in Vitro*

LI Ying¹, DONG Wu², CHEN Fu-xing³, LIU Jun-quan³, ZHOU Yu³, YANG Kun⁴, BAI Feng^{2*}

(1. Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

2. The People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, China;

3. Department of Pharmacy, 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, China;

4. The People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of thujone on human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells function *in vitro*. **Method:** The human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells were expanded using *in vitro* isopentenyl pyrophosphate method. After culturing with different concentrations of thujone for 48 hours, the growth curve of $\gamma\delta$ T cells was tested using CCK-8 method; the cell phenotype, the cell cycle, the cell apoptosis, and the expression of CD107a, perforin, granzyme B were tested using flow cytometer. **Result:** Thujone could obviously suppress the $\gamma\delta$ T cells growth with the concentration range of 300-600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), while thujone could proliferate the $\gamma\delta$ T cells's growth obviously with the range of 0.036 25-150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). The peak of proliferation for thujone was (37.03 \pm 0.52)%, and the expression rate of perforin was increased by (39.94 \pm 1.04)% at the concentration of 9.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). **Conclusion:** Thujone can obviously proliferate the $\gamma\delta$ T cells and up-regulate the expression of perforin of $\gamma\delta$ T cells at the concentration of 9.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

[Key words] human $\gamma\delta$ T cells; thujone; perforin

随着肿瘤生物治疗研究的不断深入, 细胞免疫 治疗成为肿瘤治疗新热点。自 20 世纪 80 年代发现

[收稿日期] 20140121(001)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(201202109)

[第一作者] 李颖, 硕士, 医师, 从事妇科肿瘤研究, Tel:18740071321, E-mail:liying86101@163.com

[通讯作者] * 白枫, 硕士, 主任医师, 从事妇科内分泌及妇科肿瘤研究, Tel:13130215998, E-mail:niangao998@126.com

$\gamma\delta$ T 细胞具有 $\gamma\delta$ 受体以来,有关 $\gamma\delta$ T 细胞在免疫调节、肿瘤免疫监视和特异性初次免疫应答中所起的关键作用已不断地被认识^[1]。 $\gamma\delta$ T 细胞是一种重要的固有免疫 T 细胞,具有抗原提呈、杀伤肿瘤细胞和免疫调节等作用^[2]。近年来,各种中药单一成分在促进各种免疫细胞增殖、抑制肿瘤细胞生长方面的作用及其增强免疫细胞对肿瘤细胞杀伤活性方面的作用已有报道^[3-5]。侧柏酮是一种单萜酮,是从金钟柏中分离得到的酮类(TO Φ)和富含侧柏酮组分(TRF),能增强脾细胞和胸腺细胞增殖、增强细胞因子(如白介素-2、干扰素- γ)的作用^[6],具有抗肿瘤能力^[7],已被用作药物性植物而广泛研究^[8]。为此,本研究应用不同浓度侧柏酮体外作用于人 $\gamma\delta$ T 细胞,以探讨侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞功能的影响。

1 材料

侧柏酮、IPP(均购于美国 Sigma 公司),细胞周期试剂盒, FITC-Anti-HumanTCR- $\gamma\delta$, APC Mouse Anti-Human CD107a, PE-Conjugated Anti-Human NKG2D(均购于美国 BD 公司),细胞凋亡试剂盒, PE Conjugated-Anti Human perforin, Anti-Mouse/Human GranzymeB-PE(均购于 Ebio Science 公司)。

CK50-F200 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),ST-360 酶标仪(上海科华实验系统有限公司)。

2 方法

2.1 $\gamma\delta$ T 细胞的培养和鉴定 取健康人末梢抗凝血 5 mL,淋巴细胞分离液分离单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),生理盐水离心洗涤 3 遍,置于含 10% 新生牛血清(NBS),5% 人 AB 血清, rhIL-2(100 U \cdot mL⁻¹)和 IPP(2 μ g \cdot L⁻¹)的 RPMI 1640 培养液中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 细胞培养箱中 9 d。流式细胞仪检测。

2.2 侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响 收集对数生长期人 $\gamma\delta$ T 细胞,无血清培养基洗涤 3 次,配成 2 \times 10⁵/mL 细胞悬液,接种于 96 孔板中,200 μ L/孔。加侧柏酮 0.036 25~600 μ mol \cdot L⁻¹,各设 5 个复孔,并设不加药及无细胞空白组。孵育 48 h,每孔加入 CCK-8 液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,450 nm 波长酶标仪测定各孔吸光度(A),求平均值。

$$\text{增殖率 (PR)} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.3 CD107a, 穿孔素(perforin), 颗粒酶 B 及 NKG2D 含量的检测 取经侧柏酮处理的人 $\gamma\delta$ T 细胞,生理盐水洗涤 3 次,调整细胞数至 1 \times 10⁷/mL,

各取 100 μ L 细胞悬液,加入 Anti-TCR- γ/δ -FITC 20 μ L,室温避光孵育 15 min,PBS 洗涤后,分别按 APC-Anti-Human CD107a, PE-Anti-Human Perforin, PE-Anti-Human Granzyme B 和 PE-Anti-Human NKG2D 的操作说明进行,共同室温避光孵育 15 min,PBS 洗涤后加入 500 μ L PBS,流式细胞仪检测。

2.4 细胞周期检测 收集培养 9 d 的人 $\gamma\delta$ T 细胞,按上述方法用侧柏酮处理,生理盐水洗涤 3 次,调整细胞数至 1 \times 10⁶/mL,1 500 r \cdot min⁻¹室温离心 5 min,小心吸除上清,加入 1 mL PBS 吹打细胞沉淀后转移至流式上样管,离心并吸除上清。按细胞周期试剂盒操作说明进行,用 300 目尼龙筛网过滤一下,4 $^{\circ}$ C 避光保存等待上机检测。

2.5 凋亡情况检测 取经侧柏酮处理的人 $\gamma\delta$ T 细胞,生理盐水洗涤 3 次,调整细胞数至 1 \times 10⁵/mL,2 000 r \cdot min⁻¹室温离心 5 min,弃上清,按细胞凋亡试剂盒操作说明进行。加 10 μ L 碘化丙啶/propidium iodide(PI)染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置,随即检测。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行数据处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组与组之间的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响 侧柏酮处理 48 h,300~600 μ mol \cdot L⁻¹侧柏酮抑制人 $\gamma\delta$ T 细胞生长,低于 150 μ mol \cdot L⁻¹侧柏酮促进其生长,与空白组相比具有显著差异($P < 0.05$);9.4 μ mol \cdot L⁻¹侧柏酮时,人 $\gamma\delta$ T 细胞达增殖高峰(37.03 \pm 0.52)% (图 1)。

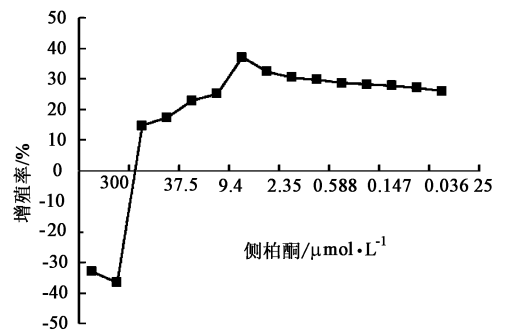


图 1 侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响

3.2 流式细胞仪检测人 $\gamma\delta$ T 细胞的功能 150, 9.4, 0.588 μ mol \cdot L⁻¹侧柏酮作用 48 h,流式细胞仪检测显示,9.4 μ mol \cdot L⁻¹时,人 $\gamma\delta$ T 细胞穿孔素表达明显升高(39.94 \pm 1.04)% ($P < 0.05$);150 μ mol \cdot L⁻¹时,G₀/G₁ 期(63.71 \pm 0.49)% 和 S 期

(33.43 ± 0.78)% 与空白组 G_0/G_1 期 (56.20 ± 0.53)% 和 S 期 (39.19 ± 1.22)% 相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 余与空白组相比均无显著性差异 (表 1)。

表 1 流式细胞仪检测不同浓度侧柏酮作用 48 h 人 $\gamma\delta$ T 细胞的功能及周期情况比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	穿孔素	CD107a	Granzyme B	凋亡情况	周期		
						G_0/G_1	S	G_2/M
侧柏酮	150	29.94 ± 0.36	65.04 ± 1.85	82.22 ± 1.28	14.05 ± 0.73	63.71 ± 0.49 ²⁾	33.43 ± 0.78 ²⁾	2.87 ± 0.29
	9.4	39.94 ± 1.04 ¹⁾	67.89 ± 1.04	85.21 ± 0.88	13.77 ± 1.73	55.82 ± 0.77	41.01 ± 1.61	3.18 ± 0.83
	0.588	29.66 ± 0.59	65.86 ± 1.14	84.79 ± 0.89	15.91 ± 1.09	57.50 ± 3.25	40.65 ± 0.33	3.36 ± 0.79
空白	-	30.60 ± 0.63	67.66 ± 0.34	84.11 ± 0.94	14.34 ± 1.64	56.20 ± 0.53	39.19 ± 1.22	4.62 ± 1.76

注:与其余项目组比较¹⁾ $P < 0.05$;与其余周期组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

侧柏酮存在于芳香油类和部分蒿属、鼠尾草属、金钟柏属和刺柏属类植物中的类单萜酮,是一种 α -(-) 和 β -(+) 的非对映异构体的混合物^[9]。侧柏酮油已经被作为药物性植物,能显著增强机体的细胞免疫应答,用于治疗肿瘤^[10]。

$\gamma\delta$ T 细胞属于固有免疫细胞,是 T 细胞中的一个小亚群,能直接识别和杀伤某些病毒和胞内寄生菌感染的靶细胞,以及一些表达热休克蛋白和异常表达 CD1d 分子的靶细胞,通过释放细胞毒性效应分子,表达 Fas/FasL 以及分泌干扰素- γ (IFN- γ),最终清除感染细胞和病原微生物,在免疫监视、对肿瘤细胞的识别和清除阶段起着关键作用。活化的 $\gamma\delta$ T 细胞可在局部迅速释放多种细胞因子,参与免疫调节,增强机体非特异性免疫防御功能。Perforin 是存在于细胞毒性 T 淋巴细胞、NK 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞胞质的细胞毒颗粒中的一种糖蛋白,当这些细胞与靶细胞接触后可释放 perforin,在靶细胞膜上形成多聚 perforin 管状通道,可与其他蛋白(如粒酶 A 和粒酶 B)一起,导致靶细胞溶解破坏^[11]。因此,增加 $\gamma\delta$ T 细胞数量、增加 $\gamma\delta$ T 细胞释放蛋白的含量均可增强杀伤肿瘤细胞的作用。

本研究显示,经不同浓度侧柏酮处理人 $\gamma\delta$ T 细胞 48 h 发现, >300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的侧柏酮抑制人 $\gamma\delta$ T 细胞生长, <150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的侧柏酮促进人 $\gamma\delta$ T 细胞生长,其增殖率明显高于空白组 ($P < 0.05$), 9.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到增殖最高峰 (37.03 ± 0.52)%, 提示一定浓度的侧柏酮能促进人 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖,这与 Siveen K S 的报道相一致^[3],为单独应用侧柏酮促进人体免疫细胞增殖、增强杀伤肿瘤细胞的作用、提高人体免疫能力提供了实验依据。与空白组 (30.60 ± 0.63)% 相比, 9.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 侧柏酮时,人 $\gamma\delta$ T 细胞中 perforin 的表达 (39.94 ± 1.04)% 显著

升高 ($P < 0.05$), 余与空白组相比均无显著性差异,提示一定浓度的侧柏酮能显著上调人 $\gamma\delta$ T 细胞中 perforin 的表达,而 perforin 的释放可以导致靶细胞的溶解破坏,这可能是侧柏酮能增强人 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肿瘤细胞的机制之一。

此外, 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 侧柏酮时, G_0/G_1 期 (63.71 ± 0.49)% 和 S 期 (33.43 ± 0.78)% 与空白组的 G_0/G_1 期 (56.20 ± 0.53)% 和 S 期 (39.19 ± 1.22)% 相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 余与空白组 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期相比均无显著性差异;细胞凋亡在 (13.77 ± 1.73)% ~ (15.91 ± 1.09)%, 与空白组 (14.34 ± 1.64)% 相比均无显著性差异,提示侧柏酮不影响人 $\gamma\delta$ T 细胞的分化功能。

综上所述,一定浓度的侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞的增殖具有促进作用,上调 perforin 的表达水平,并不影响 $\gamma\delta$ T 细胞的分化功能;侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞的用量存在一个最适浓度,为侧柏酮在肿瘤细胞免疫治疗的应用提供了实验依据,也为中药单一成分在免疫细胞培养应用提供示例;而侧柏酮对人 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤某一肿瘤细胞的作用及其机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘刚,陈复兴,刘军权,等. 根皮素对人 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤胃癌 SGC-7901 细胞的影响及机制探讨[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(7): 602.
- [2] Kang N, Zhou J, Zhang T, et al. Adoptive immunotherapy of lung cancer with immobilized anti-TCR $\gamma\delta$ antibody-expanded human $\gamma\delta$ T-cells in peripheral blood [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(16): 1540.
- [3] Shirley S A, Montpetit A J, Lockey R F, et al. Curcumin prevents human dendritic cell response to immune stimulants [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(3): 431.

HPLC-MS-MS法测定大鼠血浆中6种CYP450探针药物 及甘草对CYP450酶活性的影响

武洁, 钟荣玲, 王大为, 黄厚才, 沈红, 李松林*

(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

[摘要] 目的:建立高效液相色谱-二级质谱联用(HPLC-MS-MS)法同时测定大鼠血浆中6种细胞色素P450(CYP450)探针药物,即非那西丁、甲苯磺丁脲、奥美拉唑、酒石酸美托洛尔、氯唑沙宗和睾酮,并用于体内评价甘草对CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4酶活性的影响。方法:采用汉邦C₁₈柱(2.0 mm × 150 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(70:30),流速为0.2 mL·min⁻¹,柱温35℃。电喷雾离子化,检测方式为多反应离子监测。大鼠分为2组,分别ig生理盐水和甘草提取液,连续10 d,于第11天给予大鼠探针药物,用HPLC-MS-MS法测定6种探针药物的血药浓度,并分析比较其药动学参数。结果:HPLC-MS-MS方法的灵敏度、精密性、回收率及稳定性良好。甘草能明显诱导大鼠体内CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1的活性,抑制CYP3A4的活性。结论:本法简便、准确,适用于甘草或其他药物对CYP450同工酶活性的研究。

[关键词] 高效液相色谱-二级质谱联用; 细胞色素P450; 探针药物; 甘草

[中图分类号] R284.1; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0110-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230110

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141027.1529.011.html>

[网络出版时间] 2014-10-27 15:29

[收稿日期] 20140121(003)

[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(LZ11064)

[第一作者] 武洁, 硕士, 主管药师, 从事中药质量标准及药代动力学研究, Tel:025-85608675, E-mail:wujie613@hotmail.com

[通讯作者] *李松林, 博士, 研究员, 从事中药分析及代谢组学研究, Tel:025-85639640, E-mail:songlinli64@126.com

- [4] Wu C H, Ho Y S, Tsai C Y, et al. *In vitro* and *in vivo* study of phloretin induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(9):2210.
- [5] Lu C C, Chen J K. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(2):343.
- [6] Siveen K S, Kuttan G. Augmentation of humoral and cell mediated immune responses by thujone [J]. *Immunopharm*, 2011, 11(12):1967.
- [7] Biswas R, Mandal S K, Dutta S, et al. Thujone-rich fraction of *Thuja occidentalis* demonstrates major anti-cancer potentials: evidences from *in vitro* studies on A375 cells[J]. *Evid-Bas Complem Altern Med*, 2011, 10(3):42.
- [8] Pelkonen O, Abass K, Wiesner I. Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: toxicological assessment[J]. *Regul Tox Pharm*, 2013, 65(1):100.
- [9] Lopes-Lutz D, Alviano D S, Alviano C S, et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia essential* oils[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(8):1732.
- [10] National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of alpha, beta-thujone (CAS No. 76231-76-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)[J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2011, (570):1.
- [11] Bi E, Huang C, Hu Y, et al. Functional assessment of perforin C2 domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function[J]. *Blood*, 2009, 113(2):338.

[责任编辑 邹晓翠]