

B1 和 B10 细胞在溃疡性结肠炎患者外周血中的表达及黄芩苷对其体外表达的影响

冯锦山^{1,2}, 王士群², 叶莹³, 周小戈⁴, 郑学宝^{1,2*}

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 广东医学院中医药研究室, 广东 湛江 524023; 3. 广东医学院附属廉江医院, 广东 廉江 524400; 4. 广东医学院附属湛江中心医院, 广东 湛江 524023)

[摘要] 目的:检测与分析溃疡性结肠炎(UC)患者外周血 CD19⁺CD5⁺B 细胞(B1)及 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺B 细胞(B10)的比例,探讨黄芩苷对其体外表达的影响。方法:收集并分离活动期 UC 患者其外周血单核细胞(PBMC),以年龄性别相匹配的正常人 PBMC 为对照,经脂多糖(LPS)+黄芩苷体外刺激淋巴细胞,流式细胞术检测刺激前后外周血 B1 和 B10 细胞比例。结果:UC 患者外周血中 B1 和 B10 细胞占 CD19⁺B 细胞的比例(4.83%±3.26%,0.97%±0.48%)低于正常对照组(16.16%±11.89%,5.99%±3.59%), $P<0.05$,LPS+黄芩苷体外刺激能上调 UC 患者 B10 淋巴细胞的比例($P=0.02$),但对正常人该淋巴细胞亚群未见明显影响。结论:B1 和 B10 细胞可能在 UC 病程中发挥免疫调节作用,黄芩苷可能对 UC 患者的 B10 细胞有上调作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎;黄芩苷;调节性 B 细胞;B1;B10;流式细胞术

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0245-04

[doi] 10.11653/syjf2013100245

Expression of B1 and B10 Cells in Peripheral Blood of Patients with Ulcerative Colitis and Baicalin Effect on its Expression *in vitro*

FENG Jin-shan^{1,2}, WANG Shi-qun², YE Ying³, ZHOU Xiao-ge⁴, ZHENG Xue-bao^{1,2*}

[收稿日期] 20130114(035)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(10152402301000003)

[通讯作者] *郑学宝,博士,教授,从事中药复方治疗消化道疾病的临床与实验研究, Tel:0759-2388502, E-mail: xuebaozheng@sina.com

药后 3 种递质均升高一致。

综上所述醒脑再造胶囊能够改善大鼠脑供血,提高脑组织的单胺类递质,使其学习记忆能力提高,为临床应用提供一定依据,由于其组方复杂,具体的作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Laukka E J, Jones S, Small B J, et al. Similar patterns of cognitive deficits in the preclinical phases of vascular dementia and Alzheimer's disease [J]. *Int Neuropsychol Soc*, 2004, 10:382.
[2] 中药有效成分治疗血管性痴呆的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(7):273.
[3] 王丽, 章军建, 刘涛. PKA-CREB 信号转导通路在大鼠慢性脑缺血所致认知功能障碍中的作用[J]. *中国临床神经科学*, 2006, 14(5):449.

[4] 刘斌, 马原源, 毛文静. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区细胞凋亡 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(6):176.
[5] Robert N Hughes. The value of spontaneous alternation behavior(SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004, 28:4972.
[6] 易传安, 岳晓玲, 王滨. 5-羟色胺与海马的学习记忆关系[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(23):3140.
[7] 谢婷婷, 王虹, 刘屏, 等. 中药石菖蒲对脑内单胺类神经递质 5-羟色胺水平的影响[J]. *中国药物应用与监测*, 2007, 4(3):15.
[8] 李伟荣, 姚丽梅, 宓穗卿, 等. 冰片开放血脑屏障作用与组胺和 5-羟色胺的关系[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(3):167.

[责任编辑] 聂淑琴

- (1. School of Traditional Chinese Medicine of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. Traditional Chinese Medicine Institute of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;
3. Guangdong Medical College Affiliated Lianjiang Hospital, Lianjiang 524400, China;
4. Guangdong Medical College Affiliated Zhanjiang Central Hospital, Zhanjiang 524023, China)

[Abstract] **Objective:** The detection and analysis the proportion of CD19⁺ CD5⁺ B cells (B1) and CD19⁺ CD5⁺ CD1d⁺ B cells (B10) in peripheral blood of patients with ulcerative colitis (UC), exploring the effect of baicalin on up-regulating both the two subpopulations expression *in vitro*. **Method:** Separate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of UC patients, using the PBMCs of age and gender-matched healthy people as normal control, lymphocytes were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) + baicalin *in vitro*, B1 and B10 cells proportion were detected by the flow cytometry before and after stimulation. **Result:** The proportion of B1 and B10 cells are decrease in UC patients peripheral blood compare to the normal control group ($P = 0.029, 0.049$). *In vitro*, LPS + baicalin stimulation raised the proportion of B10 lymphocytes of UC patients ($P = 0.02$), but no significant impact on normal subjects. **Conclusion:** UC may be related to the expression of B1 and B10 cells, baicalin might upregulates the proportion of B10 cells of UC patients.

[Key words] ulcerative colitis; baicalin; regulatory B cells; B1; B10; flow cytometry

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因未明的,以侵犯结肠为主的慢性炎症,是炎症性肠病(IBD)的一种。在发病机制中,免疫学因素占有重要分量。近年来有研究表明,在溃疡性结肠炎患者及动物模型体内存在对结肠炎起保护作用的调节性 B 细胞(Breg)^[1-2], CD19⁺ CD5⁺ CD1d⁺ B 细胞(B10)是 Breg 的一种,笔者应用流式细胞技术检测了 UC 患者外周血单核细胞(PBMC)中的 CD19⁺ CD5⁺ B (B1)及 B10 细胞的比例,旨在进一步探讨 UC 发病中的免疫学机制。

黄芩是黄芩汤的君药,其有效成分黄芩苷有抗炎、抗菌、抗氧化、抗病毒、抑制变态反、抗肿瘤等多种功效^[3]。黄芩汤被誉为“万世治病之祖方”,千百年来对痢疾的治疗功效显著。近年来国外有学者证实了黄芩汤对化疗引起的肠道损伤的保护作用^[4],目前国内外不少学者正深入研究黄芩苷的抗炎作用及机制^[5-8]。因此,探讨黄芩苷对 UC 患者免疫细胞的作用,对进一步明确中药黄芩汤治疗 UC 的作用机制有重要意义。

1 材料和方法

1.1 对象 活动型 UC 患者 17 例,男 7 例,女 10 例,平均年龄 46.8 岁,均符合 2008 年中华医学会制订的溃疡性结肠炎诊断标准。所有患者均于入院时取空腹外周血。正常对照组 17 例,男 7 例,女 10 例,平均年龄 42.6 岁,均为体检健康者。

1.2 试剂与仪器 单克隆抗体 anti human CD1d (PE 标记)、CD5 (FITC 标记)、CD19 (PE-cy5 标记),

阴性对照分别为 FITC, PE 及 PE-cy5 标记的 IgG1, 所有抗体购自美国 EBioscience 公司,黄芩苷(95%, 南京泽朗医药科技有限公司),脂多糖(LPS, Sigma-Aldrich Co. LLC.),红细胞裂解液(Sigma-Aldrich Co. LLC.),人淋巴细胞分离液(HISTOPAQUE® - 1077, Sigma-Aldrich Co. LLC.),流式细胞仪(FACS Canto II, Becton Dickinson)。

1.3 样品处理

1.3.1 人体外周血 B1 及 B10 细胞检测样品制备 取患者新鲜外周血 100 μ L 置于 1.5 mL EP 管中,分别加入 anti-human CD1d, CD5, CD19 3 个荧光标记抗体(剂量依照说明书),室温暗置 30 min,裂解红细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,调整细胞数至 1×10^6 /mL,加 2% 多聚甲醛稀释至 0.5 mL,上机检测。

1.3.2 细胞培养 受试者淋巴细胞分为两组,即单纯 LPS 刺激组(I组)和 LPS + 黄芩苷共培养组(II组)。实验共有 4 组:正常 I, II, UC-I, UC-II 组。每组细胞加入相应的刺激物后置于 37 $^{\circ}$ C 孵育箱中培养 48 h,再按上述步骤加入 3 种荧光抗体,上机检测。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件处理数据资料,计量资料用单因素方差分析进行检验,方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常人及 UC 患者 B1, B10 和 CD19⁺ CD5⁺ CD1d⁺ B 细胞占 CD19⁺ B 细胞的比例比较 UC 患者 PBMC 中 B1, B10 占 CD19⁺ B 细胞的比例均较正

常人低 ($P < 0.05$), CD19⁺ CD5⁻ CD1d⁺ B 细胞所占比例与正常人相比未见显著差异,见表 1。

表 1 正常人及 UC 患者 B1, B10 和 CD19⁺ CD5⁻ CD1d⁺ B 细胞占 CD19⁺ B 细胞的比例比较 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	B1	B10	CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD1d ⁺
正常	16	16.16 ± 11.89	5.99 ± 3.59	31.86 ± 21.35
UC	12	4.83 ± 3.26 ¹⁾	0.97 ± 0.48 ¹⁾	15.63 ± 11.92

注:与正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

2.2 受试者 CD19⁺, CD5⁺, CD1d⁺ 细胞占淋巴细胞比例比较 UC 患者 CD19⁺ 细胞比例与正常人无显著差别, CD5⁺ 细胞表达较正常人降低 ($P < 0.05$), CD1d⁺ 细胞表达与正常人无显著差异,见表 2。

表 2 受试者 CD19⁺, CD5⁺, CD1d⁺ 细胞占淋巴细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	CD19 ⁺	CD5 ⁺	CD1d ⁺
正常	16	7.61 ± 5.62	63.36 ± 14.22	2.64 ± 1.93
UC	12	7.18 ± 5.35	45.17 ± 21.86 ¹⁾	4.22 ± 3.54

2.3 体外药物干预后受试者 B1, B10 和 CD19⁺ CD5⁻ CD1d⁺ B 细胞占 CD19⁺ B 细胞的比例比较 黄芩苷能在体外上调 UC 患者 B10 比例 ($P < 0.02$, 表 3), 其对 UC 患者 B1 和 CD19⁺ CD5⁻ CD1d⁺ B 细胞的比例以及正常人群各细胞比例未见明显影响。

表 3 体外药物干预后受试者 B1, B10 和 CD19⁺ CD5⁻ CD1d⁺ B 细胞占 CD19⁺ B 细胞的比例比较 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	B1	B10	CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD1d ⁺
正常 I	16	11.92 ± 7.95	5.28 ± 4.06	34.85 ± 13.5
正常 II	16	12.15 ± 7.23	6.57 ± 5.72	35.42 ± 14.22
UC-I	12	2.60 ± 2.23	0.64 ± 0.43	8.21 ± 6.90
UC-II	12	4.38 ± 2.12	1.66 ± 1.04 ¹⁾	10.12 ± 8.35

2.4 体外药物干预后受试者 CD19⁺, CD5⁺, CD1d⁺ 细胞占淋巴细胞比例比较 黄芩苷能上调 UC 患者 CD1d⁺ 细胞比例 ($P < 0.05$), 其对 UC 患者 CD19⁺, CD5⁺ 细胞的比例及正常人 CD19⁺, CD5⁺, CD1d⁺ 细胞未见明显影响, 见表 4。

表 4 体外药物干预后受试者 CD19⁺, CD5⁺, CD1d⁺ 细胞占淋巴细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	CD19 ⁺	CD5 ⁺	CD1d ⁺
正常 I	16	6.18 ± 1.97	66.70 ± 8.42	1.77 ± 0.71
正常 II	16	6.92 ± 2.80	67.19 ± 12.00	1.74 ± 0.85
UC-I	12	8.62 ± 5.35	48.94 ± 21.86	3.23 ± 2.73
UC-II	12	6.90 ± 3.89	50.80 ± 23.90	6.35 ± 4.73 ¹⁾

3 讨论

CD5 的表达被认为是 B 淋巴细胞活化的标

志^[9], B1 细胞具有免疫调节作用^[10], 产生白细胞介素-10(IL-10)的 CD5⁺ B 细胞被称为 1 型调节性 B 细胞(regulatory B cell 1, Br1)^[11]。CD5 分子能通过抑制 TCR 和 BCR 信号、调节 IL-10 基因的表达等机制来调节免疫反应^[12]。本实验中 UC 患者 B1 细胞的表达较正常组减少 ($P < 0.05$, 表 1), 以 CD5 分子表达减少为显著 ($P < 0.05$)。国外学者研究发现, 无论是否接受过手术治疗的 UC 患者, 外周血 B1 细胞都较正常人及家族性腺瘤性息肉病患者低^[13], 提示了 B1 细胞可能在免疫调节及肿瘤逃逸中发挥作用, 其表达减少可能是 UC 发病机制中免疫功能紊乱的因素之一。

CD1d 分子主要表达于胸腺细胞、树突状细胞(DC), 郎罕巨细胞、肠上皮细胞和部分 B 淋巴细胞, 主要功能是为 T 淋巴细胞提呈脂类或糖脂类抗原, 可激活 NKT 细胞使其分泌多种细胞因子, 直接或间接参与免疫应答。当炎症发生时, MHC-I 和 MHC-II 类分子在细胞表的表达被广泛抑制, 但 CD1d 并未发生广泛变化, 因而认为 CD1d 是炎症调控的目标分子。研究表明, 系统性红斑狼疮(SLE)患者 B 细胞介导的 iNKT 细胞刺激缺陷与 CD1d 分子的再循环利用有关, 根据标准化的 CD1d 表达量给予 SLE 重注 B 细胞后, 患者 iNKT 细胞数量和功能得到恢复, 可见 CD1d⁺ B 细胞对于 iNKT 细胞的平衡起到了关键作用^[14]。动物实验表明, IL-10 水平的增加与肠系膜淋巴结 B 细胞 CD1d 表达的增加有关, 而 CD1d^{-/-} 小鼠会发生严重的肠道炎症^[15]。有学者认为, CD1d 分子的交联导致肠上皮细胞和 DC 分泌 IL-10 和 IL-12。相应地, 肠上皮细胞和 DC 与 NKT 细胞相互作用产生了结肠炎的保护和活化两种相反的作用^[16-17]。有研究表明, IBD 患者结肠上皮 CD1d 的表达较正常结肠上皮有所增加^[16, 18]。本实验中, UC 患者淋巴细胞表面 CD1d 分子比例较正常人有增高趋势, 但未见明显差异, 其与肠上皮 CD1d 分子表达的关系尚待进一步研究。

UC 病程中免疫反应属 Th2 样反应, 同时伴有 Th17 反应^[19-20], 研究表明, B10 能直接与 Th17 细胞作用, 抑制其反应^[21]。中药黄芩具有多种有效成分和药理作用^[22], 其中黄芩苷能有效抑制 Th17 细胞^[23], 上调血清 IL-10 水平^[24]。本课题组研究发现, 黄芩汤可能通过调节 CD4⁺ T 细胞 CSF 的表达来发挥对 UC 的免疫调节作用^[25]。本实验中 UC 患者 PBMC 在 LPS 和黄芩苷的共同刺激下, B10 细胞比例上调 ($P = 0.02$), 而 UC 患者 B1 细胞及健康人

B1, B10 细胞未见明显变化,提示黄芩苷对疾病状态下的 B10 细胞可能具有靶向调控作用。

[参考文献]

[1] Noh J, Choi W S, Noh G, et al. Presence of Foxp3-expressing CD19⁺ CD5⁺ B Cells in human peripheral blood mononuclear cells: Human CD19⁺ CD5⁺ Foxp3⁺ regulatory B cell (Breg)[J]. *Immune Netw*, 2010, 10(6):247.

[2] Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, et al. IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(2):735.

[3] 高中洪, 黄开勋, 徐辉碧, 黄芩中黄酮类生物活性的研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 1998(12):705.

[4] Lam W, Bussom S, Guan F, et al. The four-herb Chinese medicine PHY906 reduces chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 45(2):45.

[5] Lin L, Wu X-D, Davey A K, et al. The Anti-inflammatory effect of baicalin on hypoxia/reoxygenation and TNF-alpha induced injury in cultured rat cardiomyocytes[J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 24(3):429.

[6] Jung M A, Jang S E, Hong S W, et al. The role of intestinal microflora in anti-inflammatory effect of baicalin in mice [J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2012, 20(1):36.

[7] Zhu J, Wang J, Sheng Y, et al. Baicalin improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis via suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e35523.

[8] Dai S X, Zou Y, Feng Y L, et al. Baicalin Down-regulates the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) effectively for rats with ulcerative colitis [J]. *Phytother Res*, 2011, 37(6):581.

[9] Werner-Favre C, Vischer T L, Wohlwend D, et al. Cell surface antigen CD5 is a marker for activated human B cells[J]. *Eur J Immunol*, 1989, 19(7):1209.

[10] Jensen F, Wallukat G, Herse F, et al. CD19⁺ CD5⁺ cells as indicators of preeclampsia [J]. *Hypertension*, 2012, 59(4):861.

[11] Mizoguchi A, Bhan A K. A case for regulatory B cells [J]. *J Immunol*, 2006, 176(2):705.

[12] Dalloul A. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells[J]. *Autoimmun Rev*, 2009, 8(4):349.

[13] Polese L, De Franchis G, Scarpa M, et al. B1a

lymphocytes in ulcerative colitis [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2007, 22(9):1005.

[14] Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg D A, et al. Lipid-antigen presentation by CD1d⁺ B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells [J]. *Immunity*, 2012, 36(3):477.

[15] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation [J]. *Immunity*, 2002, 16(2):219.

[16] Colgan S P, Hershberg R M, Furuta G T, et al. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, 96(24):13938.

[17] Yue S C, Shaulov A, Wang R, et al. CD1d ligation on human monocytes directly signals rapid NF-kappaB activation and production of bioactive IL-12 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(33):11811.

[18] Page M J, Poritz L S, Tilberg A F, et al. Cd1d-restricted cellular lysis by peripheral blood lymphocytes: relevance to the inflammatory bowel diseases [J]. *J Surg Res*, 2000, 92(2):214.

[19] Geremia A, Jewell D P. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 6(2):223.

[20] Monteleone I, Sarra M, Pallone F, et al. Th17-related cytokines in inflammatory bowel diseases: friends or foes? [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(5):592.

[21] Zhang M, Zheng X, Zhang J, et al. CD19⁺ CD1d⁺ CD5⁺ B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses [J]. *Cell Immunol*, 2012, 274(1/2):89.

[22] 徐丹洋, 陈佩东, 张丽, 等, 黄芩的化学成分研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1):78.

[23] Yang J, Yang X, Chu Y, et al. Identification of baicalin as an immunoregulatory compound by controlling T(H)17 cell differentiation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e17164.

[24] Chang C P, Huang W T, Cheng B C, et al. The flavonoid baicalin protects against cerebrovascular dysfunction and brain inflammation in experimental heatstroke [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(3):1024.

[25] 郑学宝, 封艳玲, 刘洪波, 等, 黄芩汤对湿热型溃疡性结肠炎大鼠 CD4⁺ T 细胞及其共刺激分子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1):169.

[责任编辑 邹晓翠]