



钩吻素子对免疫磁珠分离纯化的小鼠CD4⁺ T细胞体外增殖的影响

钩吻素子(koumine, Kou) [1]系马钱科胡蔓藤属植物钩吻(*Gelsemium elegans* Benth)根中的主要生物碱,是一种有效的抗炎、抗肿瘤活性成分。由于毒性较大,不能广泛应用于临床。近年来研究发现, Kou具有一定的免疫抑制作用。CD4⁺T细胞发育、活化、分化的研究是目前免疫学研究的热点之一[2]。我们采用免疫磁珠法分离和纯化小鼠脾脏CD4⁺ T淋巴细胞,流式细胞术检测所得细胞的纯度,并比较不同浓度的Kou对小鼠CD4⁺ T细胞在体外增殖的影响程度。

1 实验材料

1.1 药品

Kou根据文献方法提取[3][4]。取Kou结晶,用1 mol/L HCl溶解,配成5 mg/ml的贮存液。RPMI 1640培养液配成相应的浓度,1 mol/L NaOH调pH值至7.2~7.4。

1.2 实验动物

近交系清洁级BALB/C小鼠,体质量(20±2)g,雌雄不拘,购自第一军医大学实验动物中心。

1.3 试剂

CD4⁺ T细胞分离试剂盒(含生物素标记抗体Cocktail和抗生物素标记的磁性微珠)为德国Miltenyi公司产品;小鼠IL-2 ELISA试剂盒为Bender公司产品,批号20040905;缓冲液:含牛血清白蛋白(BSA, Sigma)0.5 g,乙二胺四乙酸(EDTA, 上海)0.075 g的PBS(pH 7.2, Sigma)100 ml;小鼠抗大鼠CD3-CY5、CD4-FITC单抗(B&D公司);红细胞溶解液(0.83% Tris-NH₄Cl溶液);小牛血清(杭州四季青),刀豆蛋白A(ConA)、植物血凝素(PHA)、3-溴化四唑(MTT)、二甲亚砜、RPMI 1640培养基均购自Sigma公司。

1.4 仪器与设备

免疫磁珠分选(MACS)磁力架、MS磁性分离柱(德国Miltenyi公司);流式细胞仪(FACS Calibur型),为美国Becton Dickinson公司产品;酶标仪(南京华东电子集团有限公司)。

2 实验方法

2.1 小鼠脾脏淋巴细胞悬液制备

颈椎脱臼法处死小鼠,无菌分离小鼠脾脏放于冷Hank's液中,剪碎并反复碾磨通过100目的无菌铜网,收集悬液再用200目的尼龙网过滤并离心。用红细胞溶解液去除红细胞,大量Hank's液去除低渗环境,离心,用含有10%小牛血清的RPMI 1640培养液重悬,转移至培养瓶中,37 °C, 5% CO₂孵箱中培养2 h后去除贴壁细胞,计数。

2.2 MACS纯化CD4⁺ T细胞

取 4×10^7 细胞, 500 g离心, 去上清后用160 μl 缓冲液重悬, 加40 μl 抗体Cocktail充分混匀, $4 \sim 8$ $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min; 加入160 μl 缓冲液, 500 g离心, 去上清, 再加入320 μl 缓冲液、80 μl 磁性微珠, 充分混匀, $4 \sim 8$ $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min; 用适量缓冲液冲洗, 300 g离心10 min; 吸除上清, 用500 μl 缓冲液重悬细胞, 200目筛网过滤成无气泡的单细胞悬液; 将MS细胞分离柱置于MiniMACS磁力架上, 先用500 μl 缓冲液洗柱, 再将细胞悬液通过MS柱, 1 500 μl 缓冲液洗涤, 收集流出液体; 离心收集细胞, 计数。以上使用的缓冲液均为 $2 \sim 8$ $^{\circ}\text{C}$ 的冷溶液。

2.3 分离前后CD4⁺ T细胞纯度检测

分别取上述经MACS分离前后的细胞 1×10^5 , 离心, 弃上清, 加入PBS 80 μl 、抗CD3 mAb-CY5和抗CD4 mAb-FITC各10 μl , 混匀, 室温避光放置30 min后上流式细胞仪检测分析。

2.4 细胞活力检测

将0.5%台盼兰和分离前后的CD4⁺ T细胞, 按1:1体积比混合后加盖玻片, 1 min后计数100~200个细胞, 观察细胞活力。

2.5 细胞增殖程度测定

用含10%小牛血清的RPMI 1640调整分离后的CD4⁺ T细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 将细胞悬液吸入Nunc 96孔细胞培养板中(定期观察细胞生长), 每孔200 μl 。Kou设10、20、40、80、160、320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (终浓度)6个剂量。试验分组: 设Kou组、Kou+ConA组、Kou+PHA组进行试验。同时设空白、ConA(终浓度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、PHA(终浓度1 mg/ml)对照组。每种药物浓度均设8个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养72 h。在培养结束前4 h每孔加5 mg/ml MTT 10 μl , 培养结束时离心, 弃上清, 每孔加DMSO 100 μl , 振荡10 min, 于570~630 nm处测各孔A值。

2.6 细胞上清IL-2含量测定

调整分离后的CD4⁺ T细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 将细胞悬液分别吸入两组培养瓶中, 其中一组加入终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的ConA活化, 24 h后各组加入终浓度为20、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的Kou, 同时设空白对照, 作用24 h后取培养上清液200 μl 测IL-2含量。严格按照操作说明进行, 采用ELISA法, 最后置酶标仪450~630 nm处双波长测各孔吸光度(A)值, 用标准品浓度及对应的A值(复孔均值)绘制标准曲线, 从中求得IL-2含量(pg/ml)。

2.7 统计学处理

各组检测结果以均数 \pm 标准差表示, 组间差别采用t检验进行统计学差异性分析, 以($P < 0.05$)为差异显著。

3 结果

3.1 分离前后CD4⁺ T细胞的纯度

MACS法分离小鼠CD4⁺ T细胞, 以流式细胞仪检测细胞纯度达到 $90.3\% \pm 5.8\%$, 而分离前混合细胞中CD4⁺ T细胞的比例为 $29.7\% \pm 9.9\%$ 。

3.2 细胞活力测定

分离前细胞活力为(97.3 ± 2.4)%, 分离后细胞活力为(94.9 ± 3.6)%, 细胞在分离前后均保持了良好的活性。二者无显著差异 $P > 0.05$ 。

3.3 增殖试验

3.3.1 Kou对ConA诱导的小鼠CD4⁺ T细胞增殖反应的影响 Kou浓度为 $5 \sim 160$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时均能不同程度的抑制ConA诱导的小鼠CD4⁺ T细胞增殖反应, 具有统计学意义($P < 0.05$)的最低抑制浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 随着浓度增加抑制作用增强(表1)。

3.3.2 Kou对PHA诱导的小鼠CD4⁺ T细胞增殖反应的影响 Kou浓度为 $5 \sim 160$ $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时能抑制PHA诱导的小鼠CD4⁺ T细胞增殖反应, 具有统计学意义($P < 0.05$)的最低抑制浓度为20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 与ConA诱导的细胞增殖反应的最低抑制浓度相近(表1)。

表1 MTT 法测定 Kou 对小鼠 CD4⁺T 细胞增殖反应的影响Tab.1 Effects of koumine on the proliferation of CD4⁺T cells of mice (n=4, D_{570nm/630nm}, Mean±SD)

Dose(μg/ml)	Group		
	Kou	Kou+ConA	Kou+PHA
Control	0.21±0.009	0.59±0.096	0.53±0.047
10	0.18±0.017	0.54±0.084	0.49±0.069
20	0.18±0.016	0.42±0.072	0.48±0.064
40	0.18±0.012	0.31±0.051*	0.31±0.072*
80	0.17±0.028	0.23±0.033**	0.27±0.036**
160	0.16±0.030	0.22±0.046**	0.17±0.069**
320	0.12±0.04*	0.2±0.049**	0.16±0.047**

*P<0.05 vs control, **P<0.01 vs control.Kou:Koumine;ConA:

ConcanavalinA;PHA:Phytahematoagglutinin

3.4 Kou对ConA刺激小鼠CD4⁺ T细胞IL-2的影响

Kou浓度在20~200 μg/ml时, 与对照组相比, 经或未经5 μg/ml ConA刺激的小鼠CD4⁺ T细胞产生IL-2水平平均呈下降趋势(表2)。

表2 Kou 对小鼠 CD4⁺T 细胞产生 IL-2 的作用(n=3, $\bar{x}\pm s$)Tab.2 Effects of koumine on IL-2 production of CD4⁺T cells of mice (n=3, Mean±SD)

Group	IL-2(pg/ml)	
	Inactive	Active
Control	6.06±1.96	250.18±23.97
Kou(μg/ml)		
20	6.01±1.13	99.67±20.94*
100	4.07±0.86	89.41±15.63**
200	1.66±0.40	56.21±5.95**

*P<0.05, **P<0.01 vs corresponding control; Active: stimulated by ConA(5 μg/ml)

4 讨论

我们采用免疫磁珠分选小鼠脾脏CD4⁺ T细胞, 该方法抗体标记于非目的细胞, 使分离的CD4⁺ T细胞保留了正常细胞的活力和增殖能力, 但相应地影响了细胞分离效率。本实验所获细胞纯度与文献报道[5]有一些差别, 可能是混合细胞中待标记抗体细胞总数超过了MS分离柱所要求的极限(1×10^7), 孵育温度及时间影响细胞与抗体的特异性结合, 从而导致一些未结合抗体的细胞混入目的细胞, 影响纯度, 但所获细胞可以满足下一

步研究的需要。

近年来钩吻的研究取得进展，现已从钩吻中分离出多种生物碱，目前的免疫研究多集中在其主要成分Kou [6]。从本实验结果可以看出，Kou对不同因素诱导的小鼠脾脏CD4⁺ T细胞增殖反应均有显著的抑制作用，且随剂量增加抑制作用增强；而对未经诱导增殖的细胞的抑制作用无显著性差异。ConA是T细胞促有丝分裂剂，能够在体外刺激多克隆淋巴细胞活化增殖。IL-2是一种具有广泛生物活性的细胞因子，主要参与免疫反应，促进T淋巴细胞的增殖与分化，增强机体的免疫功能。Kou浓度在20~200 μg/ml时，与对照组细胞相比，能使经5 μg/ml ConA刺激的小鼠CD4⁺ T细胞产生IL-2的水平呈显著下降趋势；而未经刺激的小鼠CD4⁺ T细胞产生IL-2水平的下降趋势无显著性差异。因此Kou对体外诱导的小鼠CD4⁺ T淋巴细胞增殖反应有一定的抑制作用，此抑制作用可能与其抑制小鼠CD4⁺ T细胞IL-2的分泌及免疫抑制作用相关。根据Kou的这一作用原理可以设想将Kou应用于自身免疫性疾病的治疗。

参考文献：

- [1] 全国中草药汇编编写组主编. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983. 118-21.
- [2] Pompos LJ, Fritsche KL. Antigen-driven murine CD4⁺ T lymphocyte proliferation and interleukin-2 production are diminished by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids[J]. Am Soc Nutr Sci, 2002, 11(132): 3293-300.
- [3] 张兰兰, 黄昌全, 张忠义, 等. 均匀设计与正交设计在钩吻生物总碱提取工艺筛选研究中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 914-5.
Zhang LL, Huang CQ, Zhang ZY, et al. Comparative study of uniform design and orthogonal design in the extraction of Gelsemium alkaloids[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 914-5.
- [4] 张兰兰, 王志睿, 黄昌全, 等. 钩吻总生物碱中钩吻素子的提取与分离[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(9):1006-8.
Zhang LL, Wang ZR, Huang CQ, et al. Extraction and separation of koumine from Gelsemium alkaloids[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(9): 1006-8.
- [5] Chen YH, Kuchroo VK, Inobe JI, et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis[J]. Science, 1994, 8(265): 1237-40.
- [6] 迟德彪, 雷林生, 金宏, 等. 钩吻素子体外诱导人结肠腺癌LoVo细胞凋亡的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 911-3.
Chi DB, Lei LS, Jin H, et al. Study of koumine-induced apoptosis of human colon adenocarcinoma LoVo cells in vitro [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 911-3.

参考文献：

- [1] 全国中草药汇编编写组主编. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983. 118-21.
- [2] Pompos LJ, Fritsche KL. Antigen-driven murine CD4⁺ T lymphocyte proliferation and interleukin-2 production are diminished by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids[J]. Am Soc Nutr Sci, 2002, 11(132): 3293-300.
- [3] 张兰兰, 黄昌全, 张忠义, 等. 均匀设计与正交设计在钩吻生物总碱提取工艺筛选研究中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 914-5.
Zhang LL, Huang CQ, Zhang ZY, et al. Comparative study of uniform design and orthogonal design in the extraction of Gelsemium alkaloids[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 914-5.
- [4] 张兰兰, 王志睿, 黄昌全, 等. 钩吻总生物碱中钩吻素子的提取与分离[J]. 第一军医大学学报,

2004, 24(9):1006-8.

Zhang LL, Wang ZR, Huang CQ, et al. Extraction and separation of koumine from Gelsemium alkaloids[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(9): 1006-8.

[5] Chen YH, Kuchroo VK, Inobe JI, et al. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis[J]. Science, 1994, 8(265): 1237-40.

[6] 迟德彪, 雷林生, 金宏, 等. 钩吻素子体外诱导人结肠腺癌LoVo细胞凋亡的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 911-3.

Chi DB, Lei LS, Jin H, et al. Study of koumine-induced apoptosis of human colon adenocarcinoma LoVo cells in vitro [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9): 911-3.

[回结果列表](#)