

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

王志睿, 黄昌全, 张忠义, 张兰兰, 林敬明(南方医科大学珠江医院药剂科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 探讨小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞的分离方法, 观察钩吻素子(Kou)对小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞体外增殖的影响。方法 以免疫磁珠分选法从小鼠脾脏细胞中分离 CD4⁺ T 细胞, 流式细胞术检测所得细胞的纯度, 台盼蓝法检测细胞活力。将 10~320 μg/ml Kou 分别作用于经刀豆蛋白 A 或植物血凝素刺激的小鼠 T 淋巴细胞, 四唑盐比色法检测细胞增殖情况, 用酶联免疫法检测细胞上清中 IL-2 的含量。结果 经过流式细胞仪测定分离后的小鼠脾脏 CD4⁺ T 细胞纯度达到 90.3%±5.8%; 0.2% 台盼兰染色细胞活力为 94.9%±3.6%; 增殖试验表明分离后未加 Kou 的 CD4⁺ T 细胞对刀豆蛋白 A、植物血凝素的刺激保持了良好的增殖能力, 当浓度范围为 20~320 μg/ml 时, Kou 均能抑制淋巴细胞的增殖 ($P<0.05$), 且表现出一定的剂量相关性; 不同浓度的 Kou (20、100、200 μg/ml) 作用后, CD4⁺ T 细胞培养上清中的 IL-2 水平明显低于对照组 ($P<0.05$)。结论 免疫磁珠阴性分选法操作简单、快速, 可获得较高纯化率、有活性的 CD4⁺ T 细胞; Kou 明显抑制小鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞增殖反应, 此抑制作用可能与 Kou 抑制小鼠 CD4⁺ T 细胞 IL-2 的分泌及免疫抑制作用相关。

关键词: CD4⁺ T 细胞; 免疫磁珠分选; 钩吻素子

中图分类号: R329.24; R967 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)05-0562-03

Effect of koumine on proliferation of murine CD4⁺ T cells purified by magnetic-activated cell sorting *in vitro*

WANG Zhi-rui, HUANG Chang-quan, ZHANG Zhong-yi, ZHANG Lan-lan, LIN Jing-ming

Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To assess the separation efficiency of magnetic-activated cell sorting in the purification of CD4⁺ T cells from murine spleen, and observe the effects of koumine on the proliferation of the separated cells. **Methods** CD4⁺ T cells were isolated from murine spleen by magnetic-activated cell sorting (MiniMACS). Fluorescence-activated cell sorting was employed to determine the purity of CD4⁺ T cells before and after the separation procedure followed by evaluation of the cell viability using trypan blue staining. Concanavalin A- (ConA, 5 μg/ml) or phytohemagglutinin (PHA, 1 mg/ml)-induced murine T cells were treated with different concentrations of koumine (10-320 μg/ml), and their proliferation was determined by MTT colorimetry, and enzyme-linked immunosorbent assay was used to measure IL-2 level in the cell culture supernatant. **Results** The purity of CD4⁺ T cells reached (90.3±5.8)% after the purification with a cell viability of (94.9±3.6)%. Koumine (20-320 μg/ml) dose-dependently inhibited ConA- or PHA-induced proliferation of murine lymphocytes as compared with the controls ($P<0.05$). Koumine (20, 100, and 200 μg/ml) significantly decreased the level of IL-2 in comparison with the control group ($P<0.05$). **Conclusions** CD4⁺ T cells of high purity can be obtained from murine spleen using MiniMACS without impairing the viability of the cells. Koumine significantly inhibits the proliferation of murine CD4⁺ T cells due to its immunosuppressive effect and inhibition of IL-2 secretion.

Key words: CD4⁺ T cells; magnetic-activated cell sorting; koumine

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。

收稿日期: 2004-11-26

基金项目: 广东省科技攻关项目 (C30801)

Supported by the Key Sci-tech Research Project of Guangdong Province (C30801)

作者简介: 王志睿(1978-), 女, 在读硕士研究生, 药师, E-mail: wangzr@fimmu.com

通讯作者: 林敬明(1964-), 男, 硕士导师, 副教授, 副主任药师, 电话: 020-61643556

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℃,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 4×10⁷ 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,4~8℃ 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,4~8℃ 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 2~8℃ 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 1×10⁵,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 2×10⁶/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 μg/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 μg/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℃、5% CO₂ 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 5×10⁶/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 μg/ml 的 ConA 活化,24 h 后各组加入终浓度为 20、100、200 μg/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±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%±5.8%,而分离前混合细胞中 CD4⁺T 细胞的比例为 29.7%±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 5~160 μg/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 μg/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 5~160 μg/ml 时能抑制 PHA

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 ($n=4, D_{570nm}/630nm, Mean \pm SD$)

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

* $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.01$ vs control. Kou: Koumine; ConA: Concanavalin A; PHA: Phytohematoagglutinin

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 $\mu\text{g/ml}$,与 ConA 诱导的细胞增殖反应的最低抑制浓度相近(表 1)。

3.4 Kou 对 ConA 刺激小鼠 CD4⁺T 细胞 IL-2 的影响

Kou 浓度在 20~200 $\mu\text{g/ml}$ 时,与对照组相比,经或未经 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA 刺激的小鼠 CD4⁺T 细胞产生 IL-2 水平均呈下降趋势(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 ($n=3, Mean \pm SD$)

Group	IL-2(pg/ml)	
	Inactive	Active
Control	6.06 \pm 1.96	250.18 \pm 23.97
Kou ($\mu\text{g/ml}$)		
20	6.01 \pm 1.13	99.67 \pm 20.94*
100	4.07 \pm 0.86	89.41 \pm 15.63**
200	1.66 \pm 0.40	56.21 \pm 5.95**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs corresponding control; Active: stimulated by ConA (5 $\mu\text{g/ml}$)

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 $\mu\text{g/ml}$ 时,与对照组细胞相比,能使经 5 $\mu\text{g/ml}$ 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.