

杨梅素对淋巴细胞活化及增殖的影响

俞瑜; 曾耀英; 刘良; 季煜华; 邢飞跃; 肇静娴

Published in:
中国药理学通报

Published: 01/01/2006

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):
俞瑜, 曾耀英, 刘良, 季煜华, 邢飞跃, & 肇静娴 (2006). 杨梅素对淋巴细胞活化及增殖的影响. *中国药理学通报*, 22(1), 63-66.

General rights

Copyright and intellectual property rights for the publications made accessible in HKBU Scholars are retained by the authors and/or other copyright owners. In addition to the restrictions prescribed by the Copyright Ordinance of Hong Kong, all users and readers must also observe the following terms of use:

- Users may download and print one copy of any publication from HKBU Scholars for the purpose of private study or research
- Users cannot further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- To share publications in HKBU Scholars with others, users are welcome to freely distribute the permanent publication URLs

杨梅素对淋巴细胞活化及增殖的影响

俞 瑜¹, 曾耀英¹, 刘 良², 季煜华¹, 邢飞跃¹, 肇静娴¹

(1. 暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室, 广东 广州 510632; 2. 香港浸会大学中医药学院, 香港)

中国图书分类号: R-332; R 282.71; R 329.25; R 331.44; R 392.12; R 394.2

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2006)01-0063-04

摘要: **目的** 研究杨梅素(myricetin)对小鼠 T 细胞活化及增殖的影响, 探讨其作为免疫调节药物开发的可能性并提供相关实验依据。 **方法** 无菌分离小鼠淋巴细胞, 加入不同浓度的杨梅素预先孵育 1h, 用多克隆刺激剂刀豆蛋白(ConA)刺激 T 细胞活化, 利用荧光标记的单克隆抗体双染技术, 流式细胞仪检测杨梅素对小鼠 CD3⁺ T 细胞 CD69 表达的影响; 采用³H-TdR 参入法检测杨梅素对淋巴细胞增殖的影响,

采用半定量 RT-PCR 技术从 mRNA 水平检测杨梅素对 IL-2 mRNA 表达的影响。采用 ELISPOT 检测杨梅素对 IFN- γ 分泌的影响。 **结果** 杨梅素能抑制 T 细胞早期活化标志 CD69 的表达, 并能抑制淋巴细胞增殖反应, 同时对淋巴细胞活化后 IL-2 mRNA 的表达及 IFN- γ 的分泌也有抑制作用。 **结论** 杨梅素对淋巴细胞的活化增殖反应具有抑制作用。

关键词: 杨梅素; 淋巴细胞活化; 增殖; 细胞因子

杨梅素是一类广泛存在于双子叶植物, 特别是一些木本植物花和叶中的黄酮类化合物。近年来发现其具有抗自由基氧化、抗癌防癌、抗菌抗病毒、抗炎、防止血小板聚集等多种生物活性^[1]。但其对免疫系统的调节作用, 特别是对 T 细胞介导的免疫应答的影响却鲜有报道^[2]。本研究旨在观察杨梅素对 T 淋巴细胞活化及增殖的影响, 探讨其作为免疫调节药物开发的可能性并提供相关实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 实验动物: BALB/c 小鼠,

收稿日期: 2005-08-02, 修回日期: 2005-10-16

基金项目: 香港特区政府大学教育资助委员会基金资助项目 (No. 2144/03M); 广东省自然科学基金资助项目 (No. 04300653)

作者简介: 俞 瑜 (1972-), 女, 博士, 助理研究员, 现在暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室博士后流动站工作, Tel: 020-33035996, E-mail: gzyuyu@tom.com;

曾耀英 (1943-), 男, 教授, 研究方向: 免疫学, 通讯作者, E-mail: tzengyy@jnu.edu.cn

[9] 李云峰, 龚正华, 张汉霆 et al. 巴戟天寡糖对大鼠不同脑区腺苷酸环化酶活性 G α c、G α s mRNA 表达水平的调节 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(51): 125-7.

[10] 张黎明, 李云峰, 刘艳芹 et al. 槲皮素-3-O-芥菜糖基芦丁糖苷对大鼠海马神经前体细胞增殖的影响 [J]. 中国药理学通报, 待发表.

Studies on the antidepressant effect of total flavone extracted from cotton seeds

LI Yun-feng YUAN Li YANG Ming HUANG Shi-jie XU Yu-kun ZHAO Yin-in

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract **Aim** To explore the antidepressant effect of total flavone extracted from cotton seeds (CTN-T). **Methods** Using the suspension test, forced swim test, 5-hydroxy-L-tryptophan (5-HTP) induced head twitch response test, yohimbine toxicity potentiation test in mice and the forced swim test in rats, the antidepressant effect of CTN-T was measured. **Results** In the suspension test, single dose of administration (160~320 mg·kg⁻¹, po) or repeated administration (60 mg·kg⁻¹, po, twice per day for 4 d) with CTN-T reduced the immobility time in mice. CTN-T (40~60 mg·kg⁻¹, po, twice per day for 7 d) reduced the immobility time in the forced swim test in mice. CTN-T

(20~60 mg·kg⁻¹, po, twice per day for 4 d) had the same effect in rats. Furthermore, CTN-T in a single dose 160 mg·kg⁻¹ or repeated doses (80 mg·kg⁻¹, po, twice per day for 4 d) increased the 5-HTP induced head twitch response in mice, while it (60~180 mg·kg⁻¹, po, twice per day for 4 d) had no effect on the yohimbine toxicity in mice. **Conclusion** CTN-T has significant antidepressant effect which may be related to the potentiation of brain serotonergic function.

Key words: total flavone extracted from cotton seeds; antidepressant; serotonin

♂, 7~8 wk, 购自广东医学院实验动物中心。药物: 杨梅素 (Myricetin) 购自 Sigma 公司。主要试剂: 刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 购自 Sigma 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自杭州四季青公司, β -巯基乙醇等细胞培养试剂购自 GibcoBRL 公司。RT-PCR 试剂盒购自 Fermentants 公司。IFN- γ ELISPOT 试剂盒购自 U-CYTECH 公司, anti-CD3-FITC 和 anti-CD69-PE 单克隆抗体购自 Pharmingen 公司。

1.2 小鼠淋巴结细胞分离及活化 无菌分离小鼠下颌部、腋窝、肠系膜和腹股沟淋巴结, 于 200 目金属网滤过, 收集细胞用冷 RPMI 1640 培养液洗涤细胞 2 次 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min) 后, 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养液重悬细胞, 调细胞浓度为 $2 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$, 每孔加入不同浓度杨梅素于 37°C 、5% CO_2 的环境下培养 1 h, 而后加入多克隆刺激剂 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ConA 后, 置于 37°C 、5% CO_2 环境下培养。

1.3 双色荧光抗体标记分析 CD69 和 CD25 的表达 细胞活化 6 h 后, 离心收集细胞, 加入 anti-CD3-FITC 和 anti-CD69-PE 各 $0.5 \mu\text{g}$ 混匀后室温下避光放置 15 min, 经 PBS 洗涤后, 流式细胞仪分析。细胞活化 24 h 后, 收集细胞加入 anti-CD3-FITC 和 anti-CD25-PE 各 $0.5 \mu\text{g}$, 混匀后室温下避光放置 15 min, 经 PBS 洗涤后, 流式细胞仪分析。

1.4 流式细胞仪分析 全部数据经 FASStarPLUS 流式细胞仪获取和分析。在前散射 (FSC) 和侧散射 (SSC) 二维散点图中划出淋巴细胞区 R1 (region 1), 然后对淋巴细胞进行 FITC、PE 荧光强度检测。其中 FITC 为荧光 1 (FL1), PE 为荧光 2 (FL2)。所获数据用 CellQuest 软件分析^[3]。

1.5 ^3H -TdR 检测淋巴细胞增殖 细胞培养 48 h 后, 每孔加入 $37 \text{ kBq}/\text{ml}$ 的 ^3H -TdR, 继续培养 6 h, 以 ^3H -TdR 的参入量为增殖指标。检测方法参照 Wal-lac 提供的操作程序。

1.6 RT-PCR 检测 IL-2 mRNA 的表达 TRIzol 分离总 RNA, 取 $0.5 \mu\text{g}$ 进行 RT-PCR 扩增, 引物序列为 sense: AACAGCGCA CCCACTTCAA; antisense: TTGAGATGATGCTTTGACA。以 β -actin 为内参 (sense: ATGGATGACGATATCGCT; antisense: ATGAGG TAGTCTGTCAGGT)。PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 1.5% 的琼脂糖电泳分析 RT-PCR 产物。

1.7 ELISPOT 分析 IFN- γ 的表达^[4] 将抗小鼠

IFN- γ 抗体预先包被于 96 孔 ELISPOT 板上, 4°C 孵育过夜。次日将板用 PBS 洗 3 遍, 再用含体积比 10% 的 FCS 室温下封闭 1 h。每孔加入 5×10^4 淋巴细胞, 分别加入 1, 10 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的杨梅素孵育 1 h 后, 加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ConA, 于 37°C 、体积比为 5% CO_2 环境中培养 24 h, 用含体积比 0.01% Tween-20 的 PBS 洗 6 次, 以弃去细胞, 加入生物素化抗 IFN- γ 的抗体孵育 2 h。再洗 6 次后, 加入 HRP 标记的链亲和素, 室温孵育 2 h。再洗 5 次, 加入 BCIP/NBT 底物, 室温下显色, 立体解剖显微镜或计算机辅助成像分析系统计算斑点数, 每一个斑点代表一个分泌特异抗体的细胞。

2 结果

2.1 杨梅素对小鼠 T 细胞表达 CD69 的抑制作用

CD69 是 T 细胞活化的早期标志, 结果显示 Fig 1, ConA 刺激后 CD69 阳性细胞细胞表达率明显增高, 而杨梅素在不同浓度 ($5 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 CD69 阳性细胞的表达率具有一定的抑制作用, 且存在剂量依赖性。

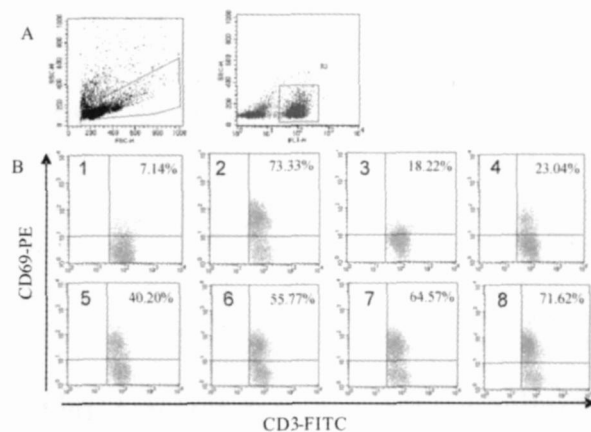


Fig 1 Effects of myricetin on CD69 expression of activated mouse T cells determined by flow cytometry

(A): lymphocytes were stained with FITC conjugated anti-CD3 and subjected to FACS analysis to identify the T cell population to be gated (B): T cell population was examined for cell surface expression of CD69 with a PE conjugated anti-CD69 antibody 1: Cell were left with same volume DMSO in media; 2: Cells were stimulated with ConA. 3~8: Cells were stimulated with ConA in the presence of 100, 50, 25, 12.5, 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ myricetin

2.2 杨梅素对小鼠淋巴细胞增殖的影响 结果显示 Fig 2, ConA 可刺激淋巴细胞增殖反应, 与对照组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.01$), 多个浓度的杨梅素 ($12.5 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能抑制 ConA 刺激的淋巴细胞的增殖反应, 与 ConA 刺激组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.01$)。

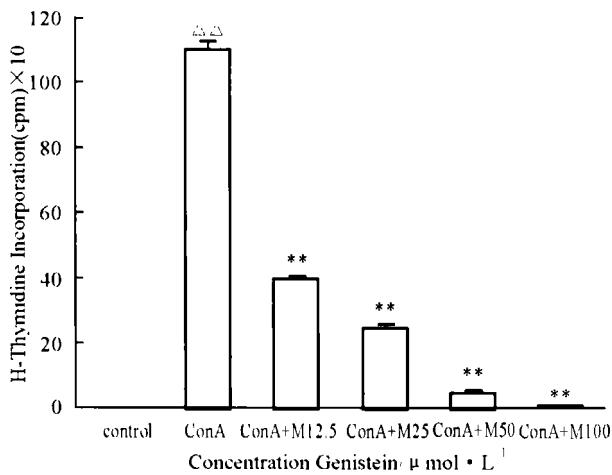


Fig 2 Effect of myricetin on the proliferation of lymphocytes were stimulated with ConA via ³H-TdR incorporation assay
 ΔΔ p < 0.01 vs control; * p < 0.01 vs ConA group

2.3 杨梅素对小鼠淋巴细胞 IL-2 mRNA 表达的影响

如 Fig 3 所示:以多克隆刺激剂 ConA 刺激后, IL-2 mRNA 呈高丰度表达,加入 100 μmol · L⁻¹ 的杨梅素可以完全抑制 IL-2 mRNA 的表达, 50 μmol · L⁻¹ 和 10 μmol · L⁻¹ 的杨梅素对 IL-2 mRNA 的抑制作用也很强。

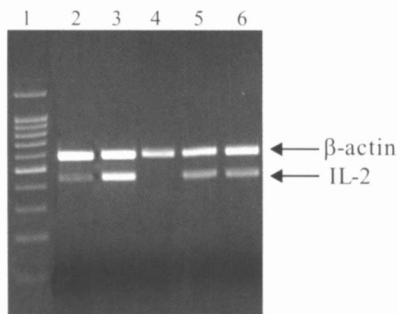


Fig 3 The effects of myricetin inhibition upon IL-2 mRNA expression of activated mouse lymphocytes via RT-PCR
 lane 1, 100bp ladder; lane 2 normal lymphocytes; lane 3 lymphocytes stimulated with ConA; lane 4 to 6, lymphocytes stimulated with ConA in the presence of myricetin at 100, 50, 10 μmol · L⁻¹

2.4 杨梅素对小鼠淋巴细胞分泌 IFN-γ 的影响

结果显示 Fig 4, ConA 刺激淋巴细胞活化后分泌大量的 IFN-γ, 而 100 μmol · L⁻¹ 的杨梅素能抑制 IFN-γ 的分泌, 10 μmol · L⁻¹ 及 1 μmol · L⁻¹ 的杨梅素对 IFN-γ 的抑制作用不明显。

3 讨论

杨梅素是类黄酮类化合物, 黄酮化合物在心脑缺血损伤、肝损伤、心律失常中的保护作用及其镇痛、抗自由基和抗肿瘤等方面的作用较为突出, 但对黄酮类化合物在免疫系统所起的作用却研究不多。本研究发现杨梅素具有一定的免疫调节作用, 特别是对 T 淋巴细胞的增殖及活化具有一定的抑制作用。由于 T 细胞是整个免疫应答的中心环节, 它在感染免疫、肿瘤免疫及移植免疫中都起着非常重要的作用^[5,6]。因此, 我们选择 T 淋巴细胞为体外研究对象, 探讨杨梅素对 T 淋巴细胞活化及增殖的影响。

T 细胞的活化增殖是免疫反应成功的第一步。T 细胞活化后可诱发静止 T 细胞分泌淋巴因子, 同时表达一系列新的表面分子 (包括高亲和力 CD25 和 CD69) 等^[7]。这些分子被称为活化标志, 其中最早表达的是 CD69。目前, 已有多种方式可以诱导 T 细胞活化, 刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 可以与 TCR 结合刺激细胞内钙离子释放, 从而诱导 T 细胞活化, 和对 B 细胞的效应相比, ConA 是选择性 T 细胞丝裂原。T 细胞激活后 1~2 h 即可检测到 CD69 的表达, 并且迅速达到高峰, 可持续 18~24 h。实验结果显示杨梅素能抑制 CD3⁺ T 细胞 CD69 的表达, 因此可以推测其对 T 细胞早期活化信号通道有抑制作用。

淋巴细胞活化后的另一关键事件是分泌细胞因子 (如 IL-2 和 IFN-γ), 有关的基因表达也因此而开始, 其中最明显的是 IL-2 基因的表达。IL-2 与其受体的结合以及由此引发的信号传导事件在大多数免

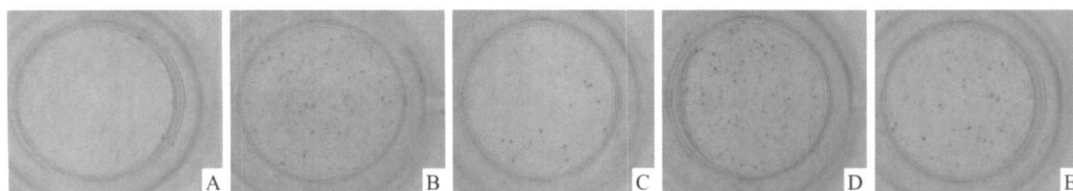


Fig 4 Effects of myricetin on IFN-γ secretion of activated mouse lymphocyte cells detected by ELISOPT assay

(A): lymphocytes were left with same volume DMSO. (B): lymphocytes were stimulated with ConA cell were left with same volume DMSO in media; (C~E): Cells were stimulated with ConA in the presence of 100, 10, 1 μmol · L⁻¹ myricetin

疫应答中起核心作用^[8]。本研究发现在淋巴细胞受 ConA 刺激后的 4~8 h 内其 IL-2 mRNA 表达达最高水平。不同浓度的杨梅素能抑制 IL-2 的基因表达,某些免疫抑制药物如环孢霉素 A、FK506 等也能抑制 IL-2 的转录及表达,从而抑制活化 T 细胞的克隆扩增^[9]。ELISPOT 实验结果显示 ConA 刺激 T 细胞活化后能分泌大量的 IFN- γ ,众所周知,IFN- γ 是 Th1 细胞分泌的主要淋巴因子^[10],目前的观点认为, Th1 与 Th2 两类辅助性 T 细胞之间的动态平衡对维持机体正常的免疫功能起重要作用,已有的研究显示 Th1 细胞功能亢进可促进某些器官特异性自身免疫病的发展^[11,12]。实验结果显示杨梅素能同时抑制 Th1 型细胞因子 IL-2 mRNA 的表达及 IFN- γ 的分泌,因此杨梅素可能具有抑制 Th1 型细胞功能亢进的作用。

本文初步探讨了杨梅素对 T 细胞活化增殖的抑制作用,但 T 细胞在免疫系统中的作用是极其复杂的动态过程,因此杨梅素对 T 细胞的免疫调控机制有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Voskresensky ON, Levitsky AP. QSAR aspects of flavonoids as a plentiful source of new drugs[J]. *Curr Med Chem*. 2002, **14**: 1367-83.

[2] Ong KC, Khoo HE. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats[J]. *Life Sciences* 2000, (67): 1695

-705.

[3] 彭桢平,曾耀英,俞瑜 et al 紫杉醇对小鼠 T 细胞 CD69、CD25 表达及增殖作用的流式细胞术分析[J]. *中国药理学通报*, 2005, **21**(6): 705-7.

[4] Van Besouw NM, Vaessen LMB, Zuidenwijk JM et al The frequency of interferon- γ producing cells reflects alloreactivity against minor histocompatibility antigens[J]. *Transplantation* 2003, **75**: 1400-4.

[5] Davids SJ, Ikemizu S, Evans EJ et al The nature of molecular recognition by T cells[J]. *Nat Immunol* 2003, **4**: 217.

[6] Allison AC. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward[J]. *Immunopharmacology* 2000, **47**: 63-83.

[7] Gonzalez S, Beck L, Wilson N, Spiegelberg HL. Comparison of interferon- γ and interleukin-4 production by peripheral blood mononuclear cells and isolated T cells after activation with polyclonal T cell activators[J]. *J Clin Lab Anal* 1994, **8**: 277-83.

[8] Waldmann TA. The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention[J]. *Immunol Today* 1993, **14**: 264-70.

[9] Taupin JL, Merville P, McBride T et al Functional quantification of cyclosporine A and FK506 in human whole blood by flow cytometry using the green fluorescent protein as an interleukin-2 reporter gene[J]. *J Immunol Methods* 2001, **256**(1-2): 77-87.

[10] Paludan SR. Interleukin-4 and interferon- γ : the quintessence of a mutual antagonistic relationship[J]. *Scand J Immunol* 1998, **48**: 459-68.

[11] Pulendran B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes dendritic cells and pathogen recognition receptors[J]. *Immunol Res* 2004, **29**: 187-96.

[12] Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells[J]. *Crit Rev Immunol* 1998, **18**: 275-303.

The effects of myricetin on inhibition of mouse lymphocytes activated in vitro

YU Yu¹, ZENG Yao-ying¹, LIU Liang², JI Yu-hua¹, XING Fei-yue¹, ZHAO Jing-xian¹

(1. Key Laboratory of Tissue Transplantation and Immunology of Ministry of Educational Specialized

Laboratory, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. School of Chinese Medicine HKBV, Hongkong, China)

Abstract **Aim** To study the effects of myricetin on murine lymphocytes activated. **Methods** We isolated and cultured the mouse lymphocytes from lymph nodes of mice in vitro. The lymphocytes were pre-treated with myricetin for 1 h prior to activation with ConA. After 6 hour stimulation, IL-2 mRNA expression was determined using semi-quantitative RT-PCR. CD69 expression of mouse CD3⁺ T cell was determined using multi-color flow cytometric analysis. T cells proliferation was detected using ³H-TdR incorporation and IFN- γ secretion is determined with ELISPOT assay. **Results** 5~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin inhibited CD69 expression of

mouse CD3⁺ T cell. 12.5~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin inhibited proliferation of mouse lymphocytes. 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin completely inhibited IL-2 mRNA expression of mouse lymphocytes. 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin also inhibited IL-2 mRNA expression. 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ myricetin also inhibited IFN- γ secretion stimulated by ConA. **Conclusion** Myricetin may has the inhibitory effects on lymphocyte activation and proliferation. **Key words** myricetin; lymphocyte activation; proliferation; cytokines