

补骨脂乙醇提取物对人T细胞亚群活化增殖及AKT/NF- κ B信号通路的调节作用

李 菲, 万 龙, 姜明燕*

中国医科大学附属第一医院 药学部, 辽宁 沈阳 110001

摘要: 目的 探讨补骨脂乙醇提取物(PCEE)对人T细胞亚群增殖和活化的影响。方法 采集健康人EDTA抗凝血,分离外周血单个核细胞(PBMCs), ADD染色流式细胞术检测PCEE(1、2 mg/mL)对PBMCs的毒性; PBMCs分为对照组、模型组、PCEE(1 mg/mL)组,模型组和PCEE组用植物血凝素(PHA)5 μ g/mL刺激,对照组不加;3 d后PCEE组加入终质量浓度为1 mg/mL的PCEE作用48 h,对照组和模型加入等体积的PBS。48 h后收集细胞,用流式细胞术检测CD4⁺和CD8⁺T细胞亚群增殖(ADD染色)、活化(CD69和CD25)以及AKT、NF- κ B磷酸化水平。结果 PCEE 1 mg/mL组活细胞比例为(93.06 $\pm$ 2.12)%,与对照组(95.16 $\pm$ 1.39)%比较无显著差别;PCEE组CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖显著低于模型组($P < 0.001$);PCEE组CD69⁺CD4⁺、CD69⁺CD8⁺和CD25⁺CD4⁺、CD25⁺CD8⁺T细胞比例显著低于模型组($P < 0.05$);PCEE组pAKT⁺CD4⁺、pAKT⁺CD8⁺和pNF- κ B⁺CD4⁺、pNF- κ B⁺CD8⁺T细胞比例显著低于模型组($P < 0.05$)。结论 补骨脂通过抑制AKT/NF- κ B信号传导通路显著抑制T细胞增殖和活化。

关键词: 补骨脂; 乙醇提取物; T细胞亚群; T细胞活化; T细胞增殖; AKT; NF- κ B

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)10-2183-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.10.021

Effects of ethanol extract from *Psoralea corylifolia* on activation and proliferation of human T cell subsets and regulation of Akt/NF- κ B signaling pathway

LI Fei, WAN Long, JIANG Mingyan

Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: Objective To investigate the effects of ethanol extract from *Psoralea corylifolia* (PCEE) on proliferation and activation of T cell subsets. **Methods** EDTA anticoagulant blood was collected from healthy subjects, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, ADD staining flow cytometry was used to detect the toxicity of PCEE (1, 2 mg/mL) to PBMCs. PBMCs were divided into control group, model group, and PCEE (1 mg/mL) group. PBMCs in model group and PCEE (1 mg/mL) group were stimulated with phytohemagglutinin (PHA) 5 μ g/mL for 3 d, the control group was not added. PCEE group was added with a final mass concentration of 1 mg/mL for 48 h, control group and model were added with equal volume of PBS. Cells were collected 48 h later, and the proliferation (ADD staining), activation (CD69 and CD25), AKT and NF- κ B phosphorylation levels of CD4⁺ and CD8⁺T cell subsets were detected by flow cytometry. **Results** The proportion of living cells in PCEE 1 mg/mL group was (93.06 $\pm$ 2.12)%, which was not significantly different from that in control group (95.16 $\pm$ 1.39)%. The proliferation of CD4⁺ and CD8⁺T cells in PCEE group was significantly lower than that in model group ($P < 0.001$). The proportion of CD69⁺CD4⁺, CD69⁺CD8⁺ and CD25⁺CD4⁺, CD25⁺CD8⁺T cells in PCEE group was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$). The proportion of pAKT⁺CD4⁺, pAKT⁺CD8⁺ and pNF- κ B⁺CD4⁺, pNF- κ B⁺CD8⁺T cells in PCEE group was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** This study showed that PCEE significantly inhibited T cell proliferation and activation by inhibiting the Akt/NF- κ B signaling pathway.

Key words: *Psoralea corylifolia*; T cell subsets; T cell activation; T cell proliferation; AKT; NF- κ B

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,含香豆素类、萘酚类和黄酮类等多种活性成分,对免疫功能具有双向调控作用^[1],

能够增强免疫功能被抑制小鼠的免疫应答^[2],对免疫功能异常的白癜风患者也有明确疗效^[3]。T细胞的异常活化、各细胞亚群比例失衡可通过分泌相关

收稿日期: 2021-03-30

第一作者: 李 菲(1990—),女,主管药师,研究方向为临床药学与药理学。Tel: 15998233060 E-mail: lffreda819@163.com

*通信作者: 姜明燕(1961—),女,教授,硕士生导师,研究方向为临床药理学与药物分析学。Tel: (024)83282052 E-mail: ydyxyxb@163.com

细胞因子、趋化因子直接或通过影响B细胞分化及浆细胞分泌间接导致组织损害和功能障碍,进而导致自身免疫性疾病,如银屑病、艾滋病(HIV)等^[4]。研究发现,补骨脂对脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞RAW264.7活化具有抑制作用,抑制RAW264.7细胞产生白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子(TNF)- α ^[3]。但补骨脂对人T细胞功能的影响和机制尚不完全清楚^[5],探讨其对T细胞功能及其信号传导通路的影响,将有助于揭示补骨脂调节免疫功能的分子机制。本研究拟对补骨脂乙醇提取物(ethanol extract from *Psoralea corylifolia*, PCEE)对人T细胞功能的影响进行体外研究,采用流式细胞术检测T细胞增殖、活化以及AKT/NF- κ B信号通路的变化,为揭示补骨脂发挥免疫调节作用的机制及其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 PCEE的制备

补骨脂饮片购自中国医科大学附属第一医院中药房,经本院高级职称中药师何威鉴定,其性状、色泽、质地、气味均符合《中国药典》2020年版规定。生药于80℃下干燥后打成粗粉,取粗粉100 g,用90%乙醇100 mL室温下密闭浸泡并震荡,1周后收集提取液,再将沉渣用90%乙醇提取1次,将2次提取液混合;以3 000 r/min离心10 min取上清,置沸水浴中挥尽乙醇,浓缩至稠膏状。经高效液相色谱法测定,PCEE含补骨脂素和异补骨脂素的总量约为0.92%,符合《中国药典》2020年版含量测定标准(0.7%)。用含0.1%二甲基亚砜的PBS溶解后置4℃冰箱冻存储备,临用时用培养基稀释至设定浓度^[6]。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(FBS)、RPMI1640培养基,抗CD3-PerCP、抗CD4-APC-Cy7、抗CD8-FITC、抗CD69-PE-Cy7、抗CD25-PE荧光抗体(美国BD公司);抗pAKT-PE和抗pNF- κ B-PE抗体、7-AAD(美国Biolegend公司);荧光标记同型对照IgG1 κ -PerCP、IgG1 κ -APC-Cy7、IgG1 κ -PE(美国BD公司);荧光标记的同型对照IgG1 κ -FITC、IgG1 κ -PE-Cy7(美国Biolegend公司);CellTrace™ Violet细胞增殖试剂盒(美国Invitrogen公司);抗Phospho-NF- κ B p65(Ser529)抗体和打孔缓冲液(美国eBioscience公司);抗Phospho-AKT(Ser473)(美国CST公司);植物血凝素(PHA, Sigma公司,规格5 mg/支)。

流式细胞仪LSR-II(美国BD公司);CO₂培养箱(美国Thermo Fisher公司);离心机X-15R(美国

Beckman Coulter公司)。

2 方法

2.1 样本采集和外周血单个核细胞(PBMCs)的提取

样本供者9例,男性5例、女性4例,平均年龄(37.07±6.50)岁,排除乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病病毒感染者以及自身免疫性疾病患者,均来自中国医科大学附属第一医院。本研究课题通过了中国医科大学附属第一医院医学伦理委员会批准,样本供者均签署了知情同意书。9例用于细胞毒性检测,6例用于细胞活化、增殖以及NF- κ B和AKT磷酸化检测。采集EDTA抗凝外周血8 mL,用等体积PBS稀释。在50 mL离心管中加入10 mL Ficoll,用移液器将稀释后的全血缓慢加到Ficoll液面上,400×g离心30 min。用移液管吸取PBMCs层,PBS洗涤后计数细胞。

2.2 PCEE的细胞毒性测定

调整PBMCs细胞浓度为 1×10^6 /mL,1 mL/孔接种于24孔培养板,给予PCEE 1.2 mg/mL^[6]作用48 h,对照组不加药。收集细胞,用7-AAD染色后,上流式细胞仪进行检测。

2.3 对T细胞增殖检测

将 1×10^6 /mL PBMCs细胞加入24孔培养板,1 mL/孔,分为对照组、模型组、PCEE治疗(1 mg/mL)组,模型组和PCEE组用PHA 5 μ g/mL刺激^[7],对照组不加;3 d后PCEE组加入终质量浓度为1 mg/mL的PCEE作用48 h,对照组和模型加入等体积的PBS。采用CellTrace™ violet细胞增殖试剂盒,按说明书进行操作。将被violet标记的PBMCs进行染色,加抗CD4-APC-Cy7、CD8-FITC,上样前加7-AAD,用流式细胞仪进行检测。

2.4 PCEE对PHA刺激T细胞活化检测

将 1×10^6 /mL PBMCs细胞加入24孔培养板,1 mL/孔,分为对照组、PCEE单给药(1 mg/mL)组、模型组、PCEE治疗(1 mg/mL)组,模型组和PCEE治疗组用植物血凝素(PHA) 5 μ g/mL刺激^[7],对照组和PCEE单给药组不加;3 d后PCEE单给药和治疗组加入终质量浓度为1 mg/mL的PCEE作用48 h,对照组和模型加入等体积的PBS。收集细胞,加入流式管,PBS洗涤后,加入荧光染料进行表面染色:抗CD3-PerCP、抗CD4-APC-Cy7、抗CD8-FITC、抗CD69-PE-Cy7、抗CD25-PE荧光抗体,5 μ L/管。混匀后,室温避光染色20 min。每管加入2 mL PBS,混匀后350×g离心7 min。离心后,弃上清,PBS重悬细胞,加多聚甲醛固定,用流式细胞仪进行检测,BD FACSDiva™软件分析结果。

2.5 T细胞AKT与NF- κ B磷酸化检测

细胞接种及给药操作同“2.3”项,按照Phosflow试剂盒按说明书进行操作,采用抗CD4-APC-Cy7和抗CD8-FITC抗体表面染色后,加固定缓冲液室温孵育30 min。洗涤2次后,加打孔缓冲液,加抗p65-PE或p-AKT,室温孵育30 min,上流式细胞仪检测。

2.6 统计学分析

采用SPSS 19.0和Graph prism 9软件进行数据分析。计数资料采用构成比,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用配对 t 检验分析细胞表面标志物、pNF- κ B、p-AKT水平的变化。

3 结果

3.1 PCEE的细胞毒性

7-AAD阴性的细胞为活细胞,结果显示,PCEE 1 mg/mL组活细胞比例为 $(93.06 \pm 2.12)\%$,与对照组 $(95.16 \pm 1.39)\%$ 比较无显著差别。2 mg/mL组活细胞比例 $(78.49 \pm 5.08)\%$ 显著低于对照组($P <$

0.01)。在后续的实验中采用1 mg/mL的PCEE处理细胞。结果见图1。

3.2 PCEE对T细胞增殖的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组CD4⁺T、

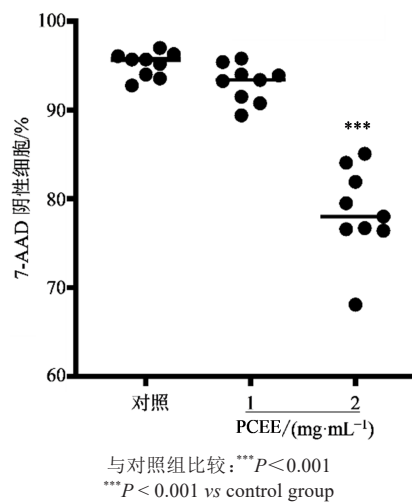
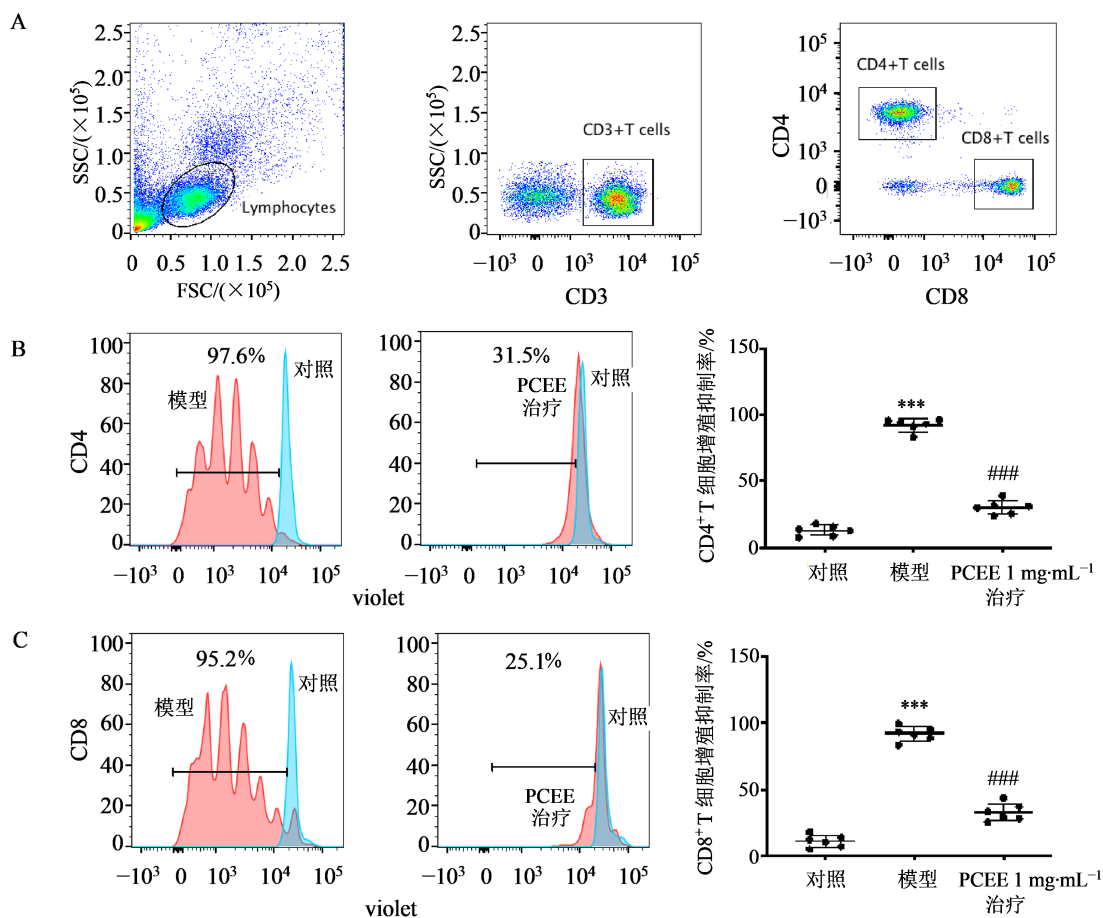


图1 PCEE对T细胞存活的影响
Fig. 1 Effect of PCEE on T cell survival



A-从CD3⁺T细胞群圈出CD4⁺T与CD8⁺T细胞的画门策略;B-CD4⁺T细胞增殖流式细胞术检测结果;C-CD8⁺T细胞增殖流式细胞术检测结果;
与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:### $P < 0.001$

A-strategy for gating CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CD3⁺ T-cell population; B-flow diagram of CD4⁺ T cell proliferation; C-flow diagram of CD8⁺ T cell proliferation; *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

图2 PCEE对T细胞增殖的影响

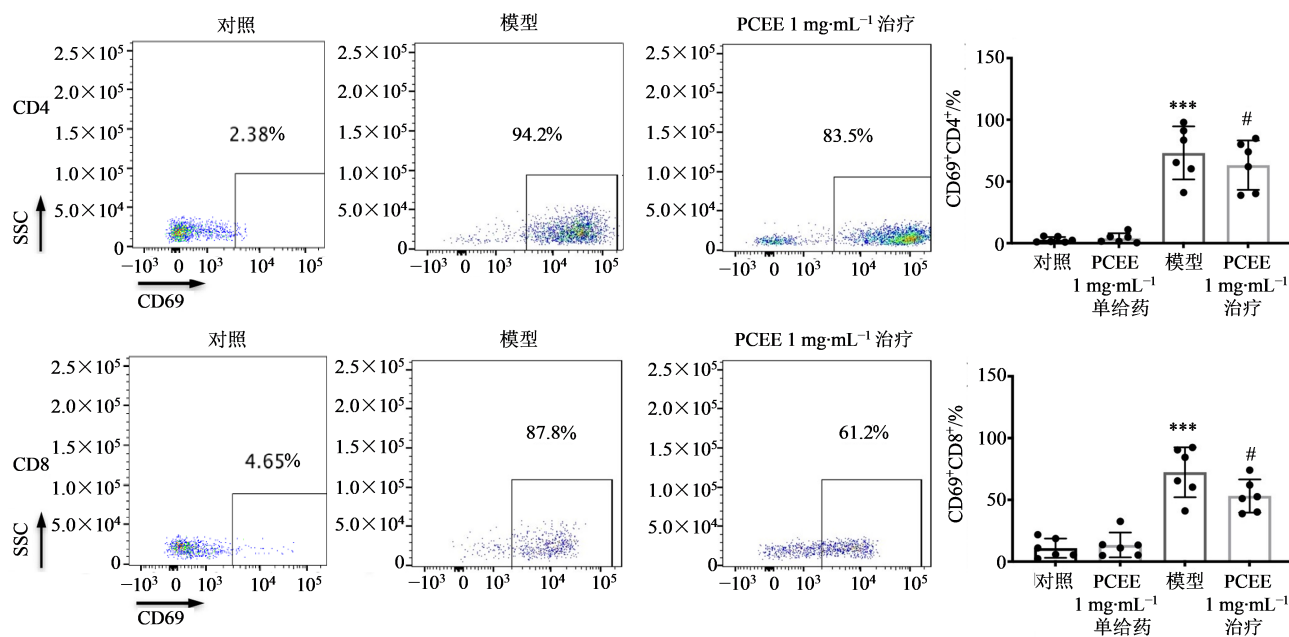
Fig. 2 Effect of PCEE on T cell proliferation

CD8⁺ T细胞比例显著增加($P<0.001$);PCEE组增殖CD4⁺ T细胞比例($30.11\pm 5.38\%$)显著低于模型组($92.55\pm 4.71\%$)($P<0.001$);PCEE组增殖CD8⁺ T细胞比例($32.43\pm 6.67\%$)显著低于模型组($91.92\pm 5.65\%$)($P<0.001$)。

3.3 PCEE对T细胞活化的影响

与对照组比较,PCEE单给药组CD69⁺CD4⁺ T、

CD69⁺CD8⁺ T细胞比例没有明显变化,模型组CD69⁺CD4⁺ T、CD69⁺CD8⁺ T细胞比例显著增加($P<0.001$);PCEE治疗组CD69⁺CD4⁺ T细胞比例($63.33\pm 19.88\%$)显著低于模型组($73.22\pm 21.47\%$)($P<0.05$);PCEE治疗组CD69⁺CD8⁺ T细胞比例($53.13\pm 13.41\%$)显著低于模型组($66.7\pm 20.25\%$)($P<0.05$)。结果见图3。



与对照组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较: # $P<0.05$

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group

图3 PCEE对T细胞CD69表达的影响

Fig. 3 Effect of PCEE on CD69 expression in T cells

与对照组比较,PCEE单给药组CD25⁺CD4⁺ T、CD25⁺CD8⁺ T细胞比例没有明显变化,模型组CD25⁺CD4⁺ T、CD25⁺CD8⁺ T细胞比例显著增加($P<0.001$);PCEE治疗组CD25⁺CD4⁺ T细胞比例($53.07\pm 25.02\%$)显著低于模型组($66.92\pm 22.45\%$)($P<0.05$);PCEE治疗组CD25⁺CD8⁺ T细胞比例($21.32\pm 15.88\%$)显著低于模型组($53.51\pm 10.47\%$)($P<0.05$)。结果见图4。

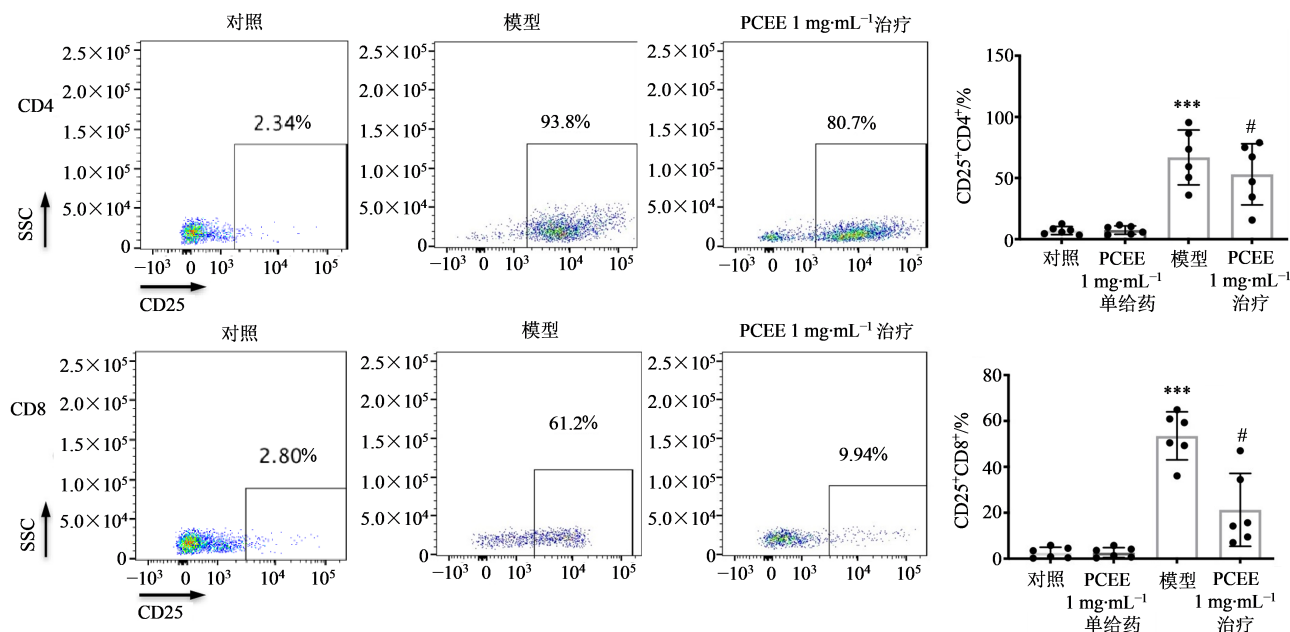
3.4 PCEE对T细胞AKT和NF-κB磷酸化的影响

与对照组比较,模型组pAKT⁺CD4⁺ T、pAKT⁺CD8⁺ T细胞比例显著增加($P<0.001$);PCEE治疗组pAKT⁺CD4⁺ T细胞比例($36.77\pm 12.82\%$)显著低于模型组($54.22\pm 13.01\%$)($P<0.05$);PCEE治疗组pAKT⁺CD8⁺ T细胞比例($31.43\pm 10.45\%$)显著低于模型组($51.92\pm 13.72\%$)($P<0.05$)。结果见图5。

与对照组比较,模型组pNF-κB⁺CD4⁺ T、pNF-κB⁺CD8⁺ T细胞比例显著增加($P<0.001$);PCEE治疗组pNF-κB⁺CD4⁺ T细胞数量($27.6\pm 6.19\%$)显著低于模型组($42.17\pm 13.66\%$)($P<0.05$);PCEE治疗组pNF-κB⁺CD8⁺ T细胞数量($31.97\pm 12.6\%$)显著低于模型组($45.08\pm 12.79\%$)($P<0.05$)。见图6。

4 讨论

补骨脂含有种类丰富的活性化合物,具有耐药性低、不良反应少,毒副作用小等优点。中药补骨脂已越来越多地应用于抗肿瘤、促进骨组织再生,对过敏反应、移植排斥反应等疾病均有显著的治疗效果。补骨脂在免疫调节中的重要作用也逐渐被人们所认识和重视,对免疫器官、免疫细胞及免疫分子既可以发挥促进作用,也可以发挥抑制作用。补骨脂的多重药理作用已被现代研究证实,具有很高的药用价值^[8]。深入探讨补骨脂的作用及其机制

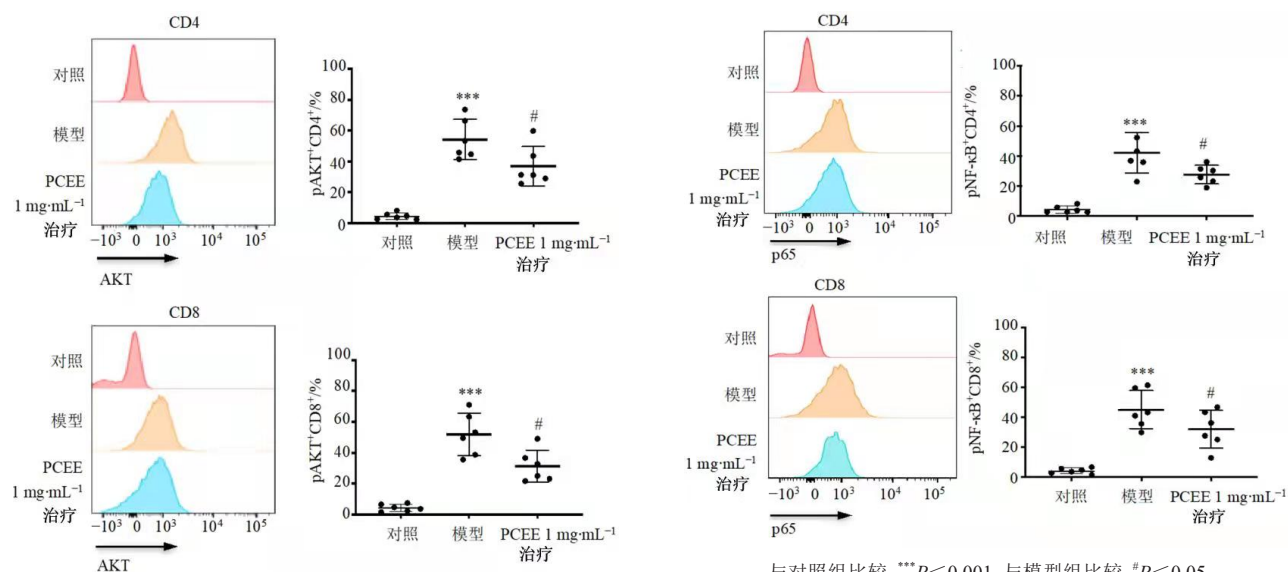


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图4 PCEE对T细胞CD25表达的影响

Fig. 4 Effect of PCEE on CD25 expression in T cells



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图5 PCEE对T细胞Akt磷酸化的影响

Fig. 5 Effect of PCEE on Akt phosphorylation in T cells

将为进一步开发提供科学依据。

从调整免疫机制的角度探讨中医药疗效的研究目前尚处于起步阶段。T细胞是重要的免疫细胞之一,在细胞免疫应答中发挥重要作用。T细胞功能异常是银屑病、红斑狼疮、类风湿等多种免疫性疾病的致病机制之一^[9-11]。而补骨脂对T细胞的免疫调节作用研究甚少,其分子机制尚未见报道。

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group

图6 PCEE对T细胞NF-κB磷酸化的影响

Fig. 6 Effect of PCEE on NF-κB phosphorylation in T cells

本研究采用流式细胞仪对PHA活化的人T细胞研究结果显示,使用适当浓度的PCEE,且不会导致T细胞死亡的前提下,可显著抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞增殖,提示PCEE对T细胞有明显的免疫调节作用。为进一步探讨PCEE对刺激活化的T细胞发挥免疫调节作用的机制,采用流式细胞仪对2个早期活化指标CD69和CD25的表达水平进行了检测,结果显示,PCEE处理48 h后,CD4⁺和CD8⁺T细胞

的CD69和CD25表达水平均显著下降,提示PCEE很可能是通过抑制T细胞活化导致T细胞增殖受到抑制。AKT是T细胞活化非常重要的信号传递通路之一^[12]。为揭示PCEE发挥免疫调节作用、抑制T细胞增殖和活化的机制,本研究采用流式细胞仪对AKT的磷酸化水平进行检测,结果显示,PCEE组CD4⁺和CD8⁺T细胞的AKT磷酸化水平显著降低。NF- κ B是AKT信号传递通路下游的一个信号转导蛋白,采用流式细胞仪对NF- κ B的磷酸化水平进行的检测,结果显示,PCEE组CD4⁺和CD8⁺T细胞的NF- κ B磷酸化水平显著降低。提示抑制CD4⁺和CD8⁺T细胞的AKT/NF- κ B信号通路的信号传递是PCEE抑制T细胞增殖活化、发挥免疫调节作用的分子机制。

本研究结果显示,PCEE对PHA活化的人T细胞亚群有显著的免疫调节作用,下调AKT/NF- κ B信号传递通路是其分子机制,揭示了补骨脂发挥免疫调节作用的新机制,为补骨脂的临床应用提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周刘华,姚涛,郭爱灵,等.近十年中药免疫双向调节研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(7): 1016-1020.
Zhou L H, Yao T, Guo A L, et al. Research progress on bidirectional immunity regulation of traditional Chinese medicine in recent ten years [J]. Chin J Bas Med Tradit Chin Med, 2020, 26(7): 1016-1020.
- [2] Latha P G, Evans D A, Panikkar K R, et al. Immunomodulatory and antitumour properties of *Psoralea corylifolia* seeds [J]. Fitoterapia, 2000, 71(3): 223-231.
- [3] 陈梦娇,杨莉莉,竺炯,等.中医药对白癫风免疫调节作用的研究进展[J].浙江中医杂志,2015,50(10): 769-770.
Chen M J, Yang L L, Zhu J, et al. Study on the immune regulation of vitiligo by traditional Chinese medicine [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2015, 50(10): 769-770.
- [4] Zhang X M, Liu C Y, Shao Z H. Advances in the role of helper T cells in autoimmune diseases [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(8): 968-974.
- [5] 李笑甜,宋忠臣.补骨脂及其活性成分免疫调节作用研究进展[J].现代免疫学,2017,37(1): 80-83.
Li X T, Song Z C. Research progress on immunoregulation of *Psoralea corylifolia* [J]. Cur Immunol, 2017, 37(1): 80-83.
- [6] 王鹰,李海东,孙仁美,等.补骨脂对SCF/Kit/MITF信号通路的调控作用[J].中国皮肤性病杂志,2011,25(9): 657-660.
Wang Y, Li H D, Sun R M. Effects of *Psoralea psoraleae* on SCF/Kit/MITF signaling pathway [J]. Chin J Derm Venereol, 2011, 25(9): 657-660.
- [7] 朱云,邵春艳,彭志伟,等.乙醇降低人外周血T淋巴细胞活化并增加其凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2019,35(10): 872-877.
Zhu Y, Shao C Y, Peng Z W, et al. Ethanol reduces the activation of human peripheral blood T lymphocytes and increases their apoptosis [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2019, 35(10): 872-877.
- [8] 陈莹,吴玥,宋金春.补骨脂化学成分及生物活性研究进展[J].实用药物与临床,2016,19(9): 1184-1188.
Chen Y, Wu Y, Song J C. Research progress on chemical constituents and biological activity of *Psoralea psoralea* [J]. Pract Pharm Clin Rem, 2016, 19(9): 1184-1188.
- [9] Katsuyama T, Tsokos G C, Moulton V R. Aberrant T cell signaling and subsets in systemic lupus erythematosus [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1088-1097.
- [10] Wehr P, Purvis H, Law S C. Dendritic cells, T cells and their interaction in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 2019, 196(1): 12-27.
- [11] Sabat R, Wolk K, Loyal L. T cell pathology in skin inflammation [J]. Semin Immunopathol, 2019, 41(3): 359-377.
- [12] Pompura S L, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function [J]. J Leukoc Biol, 2018, 12(9): 132-143.

[责任编辑 兰新新]