

# 聚酯型儿茶素对人外周血单核细胞免疫反应的影响

史霄燕<sup>1</sup>, 辛华雯<sup>2</sup>, 谢笔钧<sup>3</sup>, 曾繁典<sup>1\*</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院临床药理研究所, 湖北 武汉 430030; 2 广州军区武汉总医院 临床药理科, 湖北 武汉 430070; 3. 华中农业大学 食品科技系, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 目的 研究聚酯型儿茶素对人外周血单核细胞免疫反应的影响。方法 采用 MTT法测定淋巴细胞增殖反应和 IL-2活性, 采用免疫细胞化学和间接免疫荧光测定 IL-2R的水平, 采用放射免疫法测定细胞内 cAMP浓度。结果 50, 150, 500 μg/ml 聚酯型儿茶素对人外周血单核细胞增殖有明显的促进作用, 亦可促进经植物血凝素 (PHA) 活化的人外周血单核细胞产生 IL-2 及表达 IL-2R。此外, 聚酯型儿茶素可明显降低人外周血单核细胞内 cAMP 浓度, 也可对抗前列腺素 E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) 升高 cAMP 的作用。结论 聚酯型儿茶素对人具有明显的免疫增强作用, 其机制与促进 IL-2 的诱发及其受体的表达, 降低细胞内 cAMP 水平有关。

**关键词:** 聚酯型儿茶素; 淋巴细胞; 白细胞介素-2; 白细胞介素-2受体

中图分类号: R286.95 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)05-0432-03

## Immunomodulatory effects of theasinesin on human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*

SHI Xiao-yan<sup>1</sup>, XIN Hua-wen<sup>2</sup>, XIE Bi-jun<sup>3</sup>, ZENG Fan-dian<sup>1</sup>

(1. Institute of Clinical Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430030, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, Wuhan General Hospital in Guangzhou Military Region, Wuhan Hubei 430070, China; 3. Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan Hubei 430070, China)

**Abstract Object** To study the immunomodulatory effects of theasinesin (TS) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro*. **Methods** The proliferation response of lymphocytes and IL-2 production of human PBMC were detected by MTT method. IL-2R expression was determined by immunocytochemistry and indirect immunofluorescence. The intracellular cAMP level was assayed by radioimmunoassay. **Results** 50, 150, 500 μg/ml TS could enhance phytagglutinin (PHA)-induced human PBMC proliferation in a dose-dependent manner. The IL-2 production and IL-2R expression of PHA-activated PBMC were increased markedly under the presence of TS. TS also decreased cAMP level of PBMC and intensively weaken the cAMP upregulating effect of prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>). **Conclusion** TS possesses a potential immunoenhancing effect which might be made by decreasing the cAMP level of PBMC, promoting IL-2 production and IL-2R expression.

**Key words** theasinesin (TS); lymphocyte; IL-2; IL-2R

聚酯型儿茶素 (theasinesin, TS) 是从绿茶中提取的一种多酚类新型化合物<sup>[1]</sup>, 研究发现 TS 对小鼠免疫功能有明显的调节作用 (资料待发表)。本实验选用 T 淋巴细胞增殖反应、IL-2 诱发及 IL-2 受体 (IL-2R) 表达测定等细胞免疫功能指标, 研究 TS 对人外周血单核细胞免疫反应的影响, 为探讨其机制还观察了 TS 对细胞内第二信使环磷酸腺苷 (cAMP) 的影响。

### 1 材料和方法

1.1 主要药品与试剂: 聚酯型儿茶素 (华中农业大学食品科技系提供, 纯度 80%), 新生小牛血清 (杭州四季青生物工程材料研究所), 淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂), 植物血凝素 (PHA) (广州医药工业研究所), 鼠抗人 IL-2R 单抗 (Tac) 和异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记羊抗鼠 IgG (卫生部武汉生物制品所), SABC 免疫组化染色试剂盒和 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), <sup>125</sup>I-cAMP RIA kit (上海中医药大学同位素室)。

\* 收稿日期: 2001-08-24

基金项目: 湖北省“九五”重大科技攻关项目 (No. 972P1101)

作者简介: 史霄燕 (1973-), 女, 河北保定人, 医学博士, 1994 年同济医科大学获学士学位, 1999 年在该校获医学博士学位, 1999 年 10 月~2001 年 6 月在美国 Texas 州立大学西南医学中心做博士后研究, 2001 年 7 月至今在美国康奈尔大学从事博士后研究, 研究方向为免疫药理学。E-mail: shixy90@hotmail.com

1.2 实验对象: 正常人外周血取自武汉市中心血站

1.3 淋巴细胞增殖实验: 用淋巴细胞分离液制备人外周血单核细胞 (PBMC), 于 96孔板中每孔加  $\times 10^7$  /mL PBMC细胞悬液 100 $\mu$  L, 再加 100 $\mu$  L培养液或含有不同浓度 TS和亚适浓度 PHA ( $\mu$  g/mL) 的培养液, 每一样品设 3复孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>环境培养 68 h, MTT法测定各孔的吸光度值 ( $A_{570\text{nm}}$ ), 计算细胞增殖百分率

1.4 IL-2的诱生和活性检测

1.4.1 IL-2的诱生<sup>[2]</sup>: 将  $\times 10^6$  /mL人 PBMC加入 24孔培养板中, 每孔 1 mL, 然后分别加入内含 50 $\mu$  g/mL PHA或 PHA和 TS的 RPMI-1640培养液 1 mL, 以及单独加入培养液作为阴性对照。培养 24 h离心取上清液, 用 Con A活化的小鼠脾细胞 MTT法测定 IL-2活性 部分细胞继续培养至 48 h, 检测细胞膜 IL-2R

1.4.2 Con A活化脾细胞的 MTT法检测 IL-2活性: 常规制备小鼠脾细胞悬液, 且 RPMI-1640培养液配成  $\times 10^6$  /mL, 取 10 mL置培养瓶中, 加入 Con A (终浓度 5 $\mu$  g/mL), 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养 72 h, 轻轻摇瓶, 离心 (1 500 r/min, 8 min) 取细胞, 分别加到 2管各盛有 4 mL质量体积比为 1.063的 FI分层液上; 离心 (1 500 r/min, 20 min), 吸出单核细胞层。用含 10 mg /mL $\alpha$ -甲基甘露糖苷 ( $\alpha$ -MM) 的 BSS液洗涤细胞 2次, 再用 10% NBS-1640培养液洗 1次, 并配成  $\times 10^6$  /mL的细胞悬液。按每孔 100 $\mu$  L加入 96孔细胞培养板, 再加入待测样品 100 $\mu$  L 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养 48 h 吸弃上清液, 每孔加入 5 mg /mL MTT溶液 100 $\mu$  L继续培养 2 h 离心, 弃上清液, 每孔加入酸化异丙醇 120 $\mu$  L, 振荡使充分溶解, DG3022型酶联免疫检测仪 (南京华东电子管厂) 测定各孔的吸光度值 ( $A_{570\text{nm}}$ )

1.5 IL-2R的免疫细胞化学法检测<sup>[3]</sup>: 细胞样品涂片后, 纯丙酮 4 $^{\circ}$ C 固定 20 min 滴加适当稀释的鼠抗人 Tac, 4 $^{\circ}$ C 过夜 加生物素化羊抗鼠 IgG工作液 10 $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C, 20 min 再加生物素化 SABC, 最后 DAB显色。在显微镜下, 每张玻片随机选取 10个图像并转入图象分析仪, 用 HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文档系统测定 100~ 150个细胞 (每张涂片), 计数阳性细胞百分率, 并测定积分吸光度, 然后计算出细胞平均吸光度值。

1.6 细胞表面 IL-2R间接免疫荧光测定方法<sup>[4]</sup>: 收集培养后的细胞每试管  $\times 10^6$  个, 用冷 1.5% 小

牛血清 PBS洗涤, 离心弃上清液后, 每管加入 1: 40稀释的鼠抗人 Tac (IL-2R位点之一) 单抗 200 $\mu$  L, 同时设二抗对照, 混匀, 置水浴 30 min 用冷 1.5% 小牛血清 PBS洗 3次, 最后一次离心弃上清液后, 加入 1: 40稀释的 FITC羊抗鼠 IgG荧光抗体 200 $\mu$  L, 混匀, 置冰浴 30 min 冷 1.5% 小牛血清 PBS洗 3次后, 以每管 0.2 mL冷 PBS悬浮细胞, 置冰浴中送流式细胞仪 (FACS) 测定。每管样品分析 10 000个细胞得出表面 IL-2R阳性细胞的百分率。

1.7 细胞内 cAMP的检测<sup>[6]</sup>: 用煮沸法提取 cAMP样品, 置 - 20 $^{\circ}$ C 保存待测。采用放射免疫法 (RIA法) 以 FJ-2011 $\gamma$  免疫计数器 (国营西安 262厂) 测定细胞内 cAMP浓度, 严格按试剂盒说明书进行测定。

2 结果

2.1 TS对人 PBMC增殖反应的影响: 见表 1 TS从 50 $\mu$  g /mL开始对 PHA诱导的人 PBMC增殖有明显促进作用, 细胞增殖百分率明显增加, TS浓度为 150 $\mu$  g /mL时, 细胞增殖百分率高达 137.8%。表明 TS可促进活化 PBMC的增殖反应

表 1 TS对外周血单核细胞增殖反应的影响 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	$A_{570\text{nm}}$	增殖百分率 (%)
培养液对照	0.37 $\pm$ 0.13	
PHA 50 $\mu$ g/mL	0.44 $\pm$ 0.16	118.9
PHA+ TS 50 $\mu$ g/mL	0.47 $\pm$ 0.12	127.0
PHA+ TS 150 $\mu$ g/mL	0.51 $\pm$ 0.08*	137.8
PHA+ TS 500 $\mu$ g/mL	0.51 $\pm$ 0.10*	137.7

与 PHA组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

2.2 TS对人 PBMC产生 IL-2的影响: 见表 2 50, 150, 500 $\mu$  g /mL TS组 IL-2水平均显著高于 PHA组 ( $P < 0.05$ ), 且有明显的浓度依赖性 表明 TS可促进 PHA刺激的人外周血单核细胞产生 IL-2, 提高 IL-2水平。

表 2 TS对人 PBMC产生 IL-2的影响 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	$A_{570\text{nm}}$
培养液对照	0.19 $\pm$ 0.03
PHA 50 $\mu$ g/mL	0.25 $\pm$ 0.02 $\Delta\Delta$
PHA+ TS 50 $\mu$ g/mL	0.34 $\pm$ 0.04* $\Delta\Delta$
PHA+ TS 150 $\mu$ g/mL	0.42 $\pm$ 0.07* $\Delta\Delta$
PHA+ TS 500 $\mu$ g/mL	0.51 $\pm$ 0.07* $\Delta\Delta$

与培养液对照组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$

与 PHA组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.3 TS对人 PBMC表达 IL-2R的影响 (免疫细胞化学及间接免疫荧光法): 见表 3 IL-2R在细胞膜表达, 染色阳性信号均呈棕黄色, 阴性细胞未着色

或着淡黄色。PBMC与 PHA (50 $\mu$ g /mL) 共育 48 h 后可明显表达 IL-2R, Tac 阳性细胞达 33%。未经 PHA 活化的 PBMC 培养 48 h 不表达 Tac 抗原。在 PHA 与 PBMC 的培养系统中加入 TS 可明显增强 IL-2R 表达,且呈浓度依赖性,与 PHA 对照组比较均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),表明 TS 能促进活化淋巴细胞的 IL-2R 表达。结合 FACS 图形分析发现 TS 作用组的 IL-2R 检测图形和高峰值峰位明显向高荧光强度方向迁移,表明 TS 对活化淋巴细胞的 IL-2R 的表达量有促进作用。

表 3 TS 对人 PBMC 表达 IL-2R 的影响

组别	细胞平均吸光度	IL-2R <sup>+</sup> (Tac) %
空白对照	0.022 $\pm$ 0.015	0
PHA 50 $\mu$ g /mL	0.054 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$	33.0
PHA+ TS 50 $\mu$ g /mL	0.129 $\pm$ 0.029 * $\Delta\Delta$	43.5
PHA+ TS 150 $\mu$ g /mL	0.174 $\pm$ 0.069 * $\Delta\Delta$	54.9
PHA+ TS 500 $\mu$ g /mL	0.200 $\pm$ 0.042 * $\Delta\Delta$	60.4

与空白对照组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$

与 PHA 组比较: \* \*  $P < 0.01$

2.4 TS 对人 PBMC 细胞内 cAMP 水平的影响: 见表 4 经 PHA 活化 48 h 的 PBMC 的 cAMP 水平与培养液对照组比较无明显差别,表明 PHA 单独作用不影响淋巴细胞内 cAMP 的合成。培养体系中加入 TS 50, 150, 500 $\mu$ g /mL, 对其 cAMP 水平呈剂量依赖性的降低作用。培养体系中加入前列腺素 E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>), 细胞内 cAMP 含量剧烈升高。当 TS 和 PGE<sub>1</sub> 同时作用时, 则 cAMP 升高作用明显减弱, 和 PHA+ PGE<sub>1</sub> 组比较有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )

表 4 TS 对人 PBMC 细胞内 cAMP 浓度的影响 (n= 5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	cAMP (pmol/10 <sup>6</sup> 细胞)
空白对照组	2.62 $\pm$ 0.77
PHA	2.82 $\pm$ 1.03
PHA+ TS 50 $\mu$ g /mL	2.27 $\pm$ 0.10
PHA+ TS 150 $\mu$ g /mL	1.60 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>
PHA+ TS 500 $\mu$ g /mL	0.98 $\pm$ 0.29 *
PHA+ PGE <sub>1</sub>	9.72 $\pm$ 0.78 *
PHA+ PGE <sub>1</sub> + TS 50 $\mu$ g /mL	2.75 $\pm$ 0.22 $\Delta\Delta$
PHA+ PGE <sub>1</sub> + TS 150 $\mu$ g /mL	1.87 $\pm$ 0.03 $\Delta\Delta$
PHA+ PGE <sub>1</sub> + TS 500 $\mu$ g /mL	1.63 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$

与 PHA 组比较: \*  $P < 0.05$  \* \*  $P < 0.01$

与 PHA+ PGE<sub>1</sub> 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$

### 3 讨论

IL-2 是一种与免疫系统的各种功能密切相关的细胞因子, 主要是由 T 细胞在抗原或丝裂原刺激下和 IL1 诱导下分泌的, 在免疫应答网络中起着中心的调节作用, 对机体免疫功能的发挥影响广泛。它

对 T 细胞 B 细胞和 NK 细胞都有明显的刺激作用, 并可诱生 LAK 细胞、干扰素等。IL-2 还可调节 IL-2R 表达。而 IL-2 是通过与靶细胞表达的 IL-2R 结合而发挥效应的。因此 IL-2 及其受体系统是免疫调节的重要环节。

本研究提示 TS 对 PHA 活化 PBMC 的 IL-2 产生水平有明显促进作用, TS 对人活化淋巴细胞的 IL-2R 表达有促进作用, 表明 TS 可增加 Tac 抗原基因的活化, 细胞膜表面活化分子 IL-2 产生增加, 使细胞由 G1 期进入 S 期, 促进 T 细胞克隆性增殖, T 细胞集落形成增加。提示 TS 可以增强细胞免疫功能, 提高机体的基础免疫力。TS 调节 IL-2 水平, 增强 IL-2R 的表达, 可能是其免疫增强作用的重要机制之一。

cAMP 一直被认为是激素作用及调控细胞增殖的第二信使<sup>[6]</sup>。cAMP 增高可抑制包括淋巴细胞在内的多种细胞增殖。前列腺素 (PG) 对免疫系统有很强作用。PGE 通过特异受体作用于 PBMC, 使腺苷酸环化酶激活, 导致 cAMP 增加, 从而抑制 IL-2 产生等<sup>[7]</sup>。TS 50, 150, 500 $\mu$ g /mL 可对抗 PGE 升高 cAMP 的作用。

研究表明 TS 具有明显的免疫增强作用, 其机制与促进 IL-2 的诱生及其受体的表达, 降低细胞内 cAMP 水平有关。TS 可能通过降低细胞内 cAMP 水平, 引起 IL-2 产生增多, 同时增强 IL-2R 表达, 产生一种自泌性和旁泌性促生长态势, 而后者又成为 T 细胞增殖的基础。

参考文献:

- [1] 辛华雯, 谢笔钧, 曾繁典. 聚酯型儿茶素对 HL-60 细胞的诱导分化作用及其机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2000, 16(4): 462-466.
- [2] 匡彦德, 张 骅, 秦万章, 等. 雷公藤对 IL-2 的产生和 IL-2 受体表达的抑制作用 [J]. 上海免疫学杂志, 1988, 8(4): 250-253.
- [3] 胡国俊, 白惠卿, 杜守英, 等. 枸杞对 IL-2 产生和 IL-2 受体表达的调节 [J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(4): 253-256.
- [4] 范勇毅, 崔光辉, 管远志. 雷公藤单体 T4 体外给药对 IL-2R 表达的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12(3): 171-173.
- [5] 章 翰, 李天宪, 张昌菊, 等. 单个核细胞内 cAMP 提取方法的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 1988, 4: 42-43.
- [6] Wang T, Sheppard J R, Foker J E. Rise and fall of cyclic AMP required for onset of lymphocyte DNA synthesis [J]. Science, 1978, 201: 155-157.
- [7] Goodwin J S, Bromberg S, Mesner R P. Studies on the cyclic AMP response to prostaglandin in human lymphocytes [J]. Cell Immunol, 1981, 60: 298-303.