

鞣花酸对脾淋巴细胞增殖、自然杀伤细胞活性和 Th1/ Th2 细胞因子的影响

姜成哲^{1,2}, 张乾坤^{1,2}, 金庆日^{1,2}, 安仁波^{3,4}*

(1. 韩国化学研究院附属安全性评价研究所, 大田 305-343; 2. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133000; 3. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000; 4. 延边大学 长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002)

摘要:目的 通过鞣花酸对免疫细胞和细胞因子的定量化实验, 筛选新的免疫调节剂。方法 实验小鼠 ig 鞣花酸 (2、10、50 mg/kg) 10 d, 测定体质量变化、脾脏指数, 采用酶标法观察鞣花酸对脾淋巴细胞增殖的影响, 采用流式细胞仪测定脾脏中自然杀伤 (NK) 细胞的活性和辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 1 和 Th2 分泌的细胞因子的量。结果 鞣花酸对脾淋巴细胞的增殖无明显影响, 鞣花酸 (10、50 mg/kg) 明显增强 NK 细胞的活性, 对细胞因子的分泌有轻微影响。结论 鞣花酸主要通过影响 NK 细胞活性而起到一定的免疫调节作用。

关键词:鞣花酸; 脾淋巴细胞; 自然杀伤细胞; 免疫调节

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)02-0275-03

鞣花酸 (ellagic acid) 又称没食子酸、胡颓子酸, 是一种广泛存在于石榴、草莓、葡萄、苹果、蔓越桔、黑莓和胡桃中的一种天然多酚组分。其不仅以游离的形式存在, 而且更多的是以二聚体的形式存在, 表现出抗氧化、抗炎和抗突变的活性^[1-3]。近年来发现鞣花酸对正常细胞无细胞毒作用, 但对于某些癌细胞有细胞毒作用^[4,5]。目前只有鞣花酸免疫耐受和对外周血液淋巴细胞影响的研究报道^[6,7], 而鞣花酸对其他主要免疫因素的影响的研究报道则较少。

细胞因子是体内细胞之间相互作用的主要介质, 在机体的免疫应答、炎症反应等许多方面起重要作用。细胞因子的异常变化常常与疾病相关^[8]。本实验旨在研究不同浓度的鞣花酸对动物脾脏的 T 细胞和 B 细胞的增殖以及自然杀伤 (NK) 细胞活性的影响, 还对脾脏细胞分泌的细胞因子产物进行测定, 为进一步研究鞣花酸的免疫调节作用奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物: BALB/cj 雌性小鼠 (6 周龄), 由韩国 Orient 公司提供。实验期间, 小鼠自由饮食, 饮用灭菌后的自来水。小鼠饲养条件: 温度为 (24 ± 2) °C; 相对湿度为 (50 ± 10) %; 明暗周期为 12 h/12 h。

1.2 药物及试剂: 鞣花酸 (质量分数 96%)、丝裂霉素 C、细菌脂多糖 (LPS)、刀豆蛋白 A (Con A) 和碘化丙啶 (PI) 均购自 Sigma 公司; 牛血清

(FBS)、抗菌素 (青霉素 100 μg/mL、链霉素 100 μg/mL)、RPMI 1640 培养基、10 mmol/L HEPES 购自 Gibco 公司; CBA Kit 购自 BD 公司; Cell Counting Kit 8 购自日本 Dojindo Laboratories 公司。

1.3 实验仪器: 流式细胞仪、FACS Sort 为美国 Becton Dickinson 公司产品; ELISA Reader 为美国分子仪器公司产品; Beckman CS-6R 离心机为美国 Beckman 公司产品。

2 方法

2.1 动物实验: 将 BALB/cj 雌性小鼠按体质量随机分成 4 组, 每组 10 只, 分为对照组和鞣花酸低、中、高剂量组。各组小鼠均 ig 给药, 持续 10 d, 其中对照组给予蒸馏水, 其余 3 组分别给予鞣花酸 (2、10、50 mg/kg)。分别于第 1、4、7、10 天测定小鼠体质量。10 d 后, 对动物进行麻醉剖检, 取脾脏, 先称脏器质量, 计算脾脏指数。然后分别进行脾淋巴细胞增殖反应、NK 细胞活性和细胞因子的测定试验。

2.2 脾淋巴细胞增殖反应: 对照组及各实验组小鼠剖检, 按常规方法制备淋巴细胞悬液, 用 RPMI 1640 培养液稀释调成 1×10^6 / mL, 然后分别接种于 96 孔板, 并使淋巴细胞的浓度为 2×10^5 / 孔。各组用 LPS 和 ConA 各处理 3 个复孔。培养基置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 72 h, 然后各孔加入 Cell Counting Kit 8 试剂, 孵育 2 ~ 4 h 后, 用 ELISA Reader 在 450 nm 波长处测吸光度 (A) 值, 计算出各实验组和对照组之间的百分比。

* 收稿日期: 2009-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860343); 吉林省科技发展计划资助项目 (200705427)

作者简介: 姜成哲 (1966 -), 男, 博士, 副教授, 现任延边大学农学院教师, 主要从事动物药理与毒理学的研究。

E-mail: ksc66@yeah.net

* 通讯作者 安仁波 Tel: (0433) 2660568 E-mail: anrb@ybu.edu.cn

2.3 NK 细胞活性测定:以脾淋巴细胞中的 NK 细胞为效应细胞,以 YAC-1 细胞株为靶细胞,效应细胞和靶细胞的比例 (E:T) 分别为 10:1 和 50:1,利用 PI 染料排斥法,在 488 nm 波长下产生绿色荧光,再用流式细胞仪测定受 NK 细胞作用后靶细胞的死亡率,从而反映出 NK 细胞的活性^[9]。

2.4 辅助性 T 淋巴细胞 (Th)1 和 Th2 细胞因子的测定:根据 BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Multiplex Assays,将上述制备的淋巴细胞悬液 (1 × 10⁶/mL) 采用 Con A (1 μg/mL) 诱导小鼠脾细胞产生 Th1/Th2 细胞因子,用流式细胞仪测定 IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4 和 IL-5 的量,采用 Cell-Quest 软件程序进行分析^[9]。

2.5 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用 ONE-WAY ANOVA 分析,选择 LSD 和 Dannett's T3 进行组间多重比较。

3 结果

3.1 体质量变化:结果见表 1。对照组和各实验组动物在实验期间没有出现异常症状,饮食和饮水等无特殊变化。各组动物平均体质量没有明显的差异 ($P < 0.05$),鞣花酸高剂量组在第 4 天体质量有下降趋势,但第 7 天至第 10 天已恢复正常生长趋势。

3.2 脾脏指数:测定对照组和鞣花酸各剂量组小鼠脾脏指数,分别是 (0.60 ± 0.12) %、(0.62 ± 0.07) %、

表 1 实验期间动物体质量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes of mice body weight during experiment period ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	体质量/g			
		第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天
对照	-	20.96 ± 2.62	21.34 ± 1.00	20.12 ± 1.00	20.44 ± 1.61
鞣花酸	2	21.40 ± 1.56	21.74 ± 1.18	20.44 ± 1.06	20.84 ± 1.57
	10	20.88 ± 1.42	20.68 ± 0.94	20.04 ± 1.36	19.92 ± 1.85
	50	21.47 ± 1.39	19.72 ± 1.07	18.74 ± 0.76	20.56 ± 1.75

表 3 鞣花酸对 Con A 刺激脾细胞 Th1/Th2 细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Effects of ellagic acid on Th1/Th2 cytokines production by Con A-stimulated splenic cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	TNF-α / (pg · mL ⁻¹)		IFN-γ / (pg · mL ⁻¹)		IL-2 / (pg · mL ⁻¹)		IL-4 / (pg · mL ⁻¹)		IL-5 / (pg · mL ⁻¹)	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
对照	-	350.46 ± 92.76	571.33 ± 129.19	591.96 ± 54.81	6 841.81 ± 3 912.33	500.44 ± 168.33	442.14 ± 51.78	16.36 ± 7.26	31.31 ± 13.24	5.08 ± 4.71	11.50 ± 9.35
鞣花酸	2	298.71 ± 91.33	382.93 ± 137.37	830.83 ± 440.30	5 798.11 ± 291.55	474.11 ± 195.41	335.94 ± 127.19	28.11 ± 10.11	36.28 ± 18.07	4.16 ± 1.16	9.34 ± 1.42
	10	404.82 ± 79.32	508.89 ± 194.50	1 289.10 ± 429.15	9 005.67 ± 2 559.02	545.50 ± 54.37	470.56 ± 198.25	41.61 ± 31.40	42.01 ± 30.77	7.76 ± 2.72	21.74 ± 1.85
	50	281.98 ± 230.76	402.38 ± 375.80	528.86 ± 649.41	6 137.17 ± 5 071.76	358.13 ± 273.43	369.86 ± 332.58	28.23 ± 17.56	43.11 ± 17.18	3.85 ± 1.78	8.90 ± 4.61

4 讨论

目前国内外在研究中药免疫调节剂时,大多还是直接使用粗制剂,使得要在分子水平上阐明其药理作用机制受到了很大的限制^[10]。本实验研究了纯的鞣花酸对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。鞣花酸

(0.68 ± 0.10) %、(0.70 ± 0.07) %,表明脾脏指数各组间没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

3.3 脾淋巴细胞增殖反应:鞣花酸各剂量组与 LPS 诱导的脾脏 B 淋巴细胞增殖对照组的百分率分别为 (140.40 ± 19.72) %、(103.17 ± 36.36) %、(107.37 ± 27.01) %;与 Con A 诱导的脾脏 T 淋巴细胞增殖对照组的百分率为 (124.10 ± 14.51) %、(115.75 ± 22.0) %、(112.13 ± 11.34) %,对照组和各组间比较没有显著差异 ($P > 0.05$)。

3.4 NK 细胞活性:结果见表 2。鞣花酸 10 mg/kg 剂量组中,当 E:T 为 10:1 时能显著增强 NK 细胞的活性 ($P < 0.01$);鞣花酸 50 mg/kg 剂量组中,E:T 分别为 10:1 和 50:1 时,与对照组相比能显著增强 NK 细胞杀死 YAC-1 细胞株的能力 ($P < 0.01$)。

3.5 Th1/Th2 细胞因子测定结果:结果见表 3。在 ConA 刺激下,鞣花酸 10 mg/kg 剂量组的脾细胞在 24 和 48 h,IFN-γ、IL-2、IL-4 和 IL-5 的量与对照组相比均有一些增加,说明在本实验的条件下,适量的鞣花酸能够同时作用于 Th1 和 Th2 细胞。可推测鞣花酸可能通过影响细胞因子的分泌来发挥作用。

表 2 鞣花酸对 NK 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of ellagic acid on NK cell activities

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	细胞毒性/ %	
		(E:T = 10:1)	(E:T = 50:1)
对照	-	4.50 ± 1.00	23.30 ± 5.41
鞣花酸	2	5.68 ± 1.47	20.04 ± 7.05
	10	8.46 ± 2.25**	17.84 ± 4.18
	50	11.94 ± 4.79**	31.04 ± 4.62

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

对小鼠脾淋巴细胞有无丝裂酶原样作用,只是在低剂量 (2 mg/kg) 时对 LPS 诱导的 B 淋巴细胞增殖有轻微的促进作用 (140.40 ± 19.72) %,而对 Con A 诱导的 T 淋巴细胞增殖则没有明显的影响。

在免疫系统中,NK 细胞起重要的作用。NK

细胞具有细胞介导的细胞毒作用,能直接杀伤靶细胞。本实验结果显示,鞣花酸 10 mg/kg 剂量的 NK 细胞在效应细胞和靶细胞比例为 10 : 1 时,细胞毒性作用与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$);鞣花酸 50 mg/kg 剂量组的 NK 细胞在效应细胞和靶细胞比例为 10 : 1 和 50 : 1 时,细胞毒性作用与对照组相比差异均显著 ($P < 0.01$),并且 50 : 1 时的作用比 10 : 1 时大了约 3 倍。因为 NK 细胞是第 3 类淋巴细胞,不依赖于抗原刺激,能自发地发挥细胞毒效应,肿瘤患者免疫功能状态评价指标中包括 NK 细胞的功能及血清中抗体、补体和某些细胞因子水平等^[11]。因此能影响 NK 细胞活性的药物历来受到人们的重视。而细胞因子又能够调节 NK 细胞对靶细胞的杀伤作用。辅助 T 细胞 (Th1/Th2) 在某些疾病时体内细胞因子及其受体的表达可发生异常,与机体免疫功能低下或发生病理损伤有关。IL-2 作为重要的细胞因子参与 T 细胞的活化,大部分 T 细胞的活化途径需要 IL-2 参与,而 NK 细胞的细胞溶解作用能被 IL-2 等细胞因子激活。Th1 细胞分泌 IFN- γ 和 IL-2。Th1 细胞可辅助促进细胞介导的免疫应答和炎症反应。

本实验在不同时间段检测培养液中细胞因子的活性,属于目前国外应用较多的在蛋白质水平上检测(不包括膜表面受体),得到的一些数据对于筛选一些具有免疫调节作用的中草药,可作为对比性的数据。由于细胞因子由各种细胞合成、表达和分泌,所以有多种存在形式,大多数细胞因子被分泌到体液中,是液相的可溶性细胞因子。本实验所用的免疫检测法能够检测到细胞因子的蛋白质特性,而脾细胞增殖和 NK 细胞活性测定等生物学活性检测法相互印证是最理想的,但是这两者的检测结果只在一定的条件下才有相关性,两者不能互相替代。

本实验结果显示,脾脏指数各实验组与对照组比较没有统计学上的显著差异,而且从脾细胞的增殖反应中未能见到淋巴细胞的明显增殖,提示鞣花酸可能不是通过增加辅助 T 细胞的数量,而是通过增强 NK 细胞的活性和轻微影响细胞因子分泌的途径发挥作用,而且与其所作用的剂量有密切关系。

参考文献:

- [1] Talcott S T, Lee J H. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(11): 3186-3192.
- [2] Rogerio A P, Fontanari C, Borducchi E, et al. Anti-inflammatory effects of *Lafroensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. [J]. *Eur J Pharm*, 2008, 580 (1-2): 262-270.
- [3] Soong Y Y, Barlow P J. Quantification of gallic acid and ellagic acid from lonan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed and mango (*Mangifera indica* L.) kernel and their effects on antioxidant activity [J]. *Food Chem*, 2006, 97(3): 524-530.
- [4] Mertens-Talcott S U, Percival S S. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells [J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(2): 141-151.
- [5] Jack N L, Rishipal R B, Alfred T, et al. *In vitro* anti-proliferative activities of ellagic acid [J]. *J Nut Biochem*, 2004, 15: 672-678.
- [6] Kang E H, Kwon T Y, Oh G T, et al. The flavonoid ellagic acid from a medicinal herb inhibits host immune tolerance induced by the hepatitis B virus e antigen [J]. *Antiviral Res*, 2006, 72(2): 100-106.
- [7] Khanduja K L, Avti P K, Kumar S, et al. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: A Bcl-2 independent mechanism [J]. *Biochem Biophys Acta (BBA) - Gen Subj*, 2006, 1760(2): 283-289.
- [8] 骆和生, 罗鼎辉. 免疫中药学——中药免疫药理与临床 [M]. 北京: 北京中医药大学中国协和医科大学联合出版社, 1999.
- [9] BD Biosciences. *Techniques for Immune Function Analysis* [A]. *Application Handbook* [M]. San Diego: BD Biosciences.
- [10] 田庚元. 中药免疫调节剂的研究和开发 [J]. 中国新药杂志, 1999, 8(11): 721-723.
- [11] 吕世静. 免疫学检验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

《中草药》杂志列中文核心期刊中国医学类第一位

中国医学类核心期刊表

序号	刊名	序号	刊名
1	中草药	11	针刺研究
2	中国中药杂志	12	中药新药与临床药理
3	中国中西医结合杂志	13	南京中医药大学学报
4	中国针灸	14	中国实验药理学杂志
5	中成药	15	辽宁中医杂志
6	北京中医药大学学报	16	时珍国医国药
7	中药材	17	中医杂志
8	中国中医基础医学杂志	18	新中医
9	中药药理与临床	19	中国中西医结合急救杂志
10	中华中医药杂志	20	中国天然药物

摘自《中文核心期刊要目总览》2008 年版(第五版)