

芦荟大黄素对白细胞介素-2 引起大鼠 T 细胞增殖和细胞内 Ca^{2+} 浓度变化的影响

李 新, 温寅飞, 满 媛, 胡 芬, 王新宇, 李俊英*

(南开大学物理学院 生物物理系 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

摘 要:目的 研究芦荟大黄素对白细胞介素 2 (IL-2) 引起的 T 淋巴细胞增殖和细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 变化的影响, 探讨芦荟大黄素对淋巴细胞增殖的作用和机制。方法 采用 MTT 法检测细胞增殖, 用单细胞钙成像系统记录细胞胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。结果 芦荟大黄素对 IL-2 引起的 T 细胞增殖有显著抑制作用, 且抑制效果与剂量有关; IL-2 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 并持续维持高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平, 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的机制包括胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流; 芦荟大黄素显著抑制 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 作用途径包括抑制胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流。结论 芦荟大黄素对 IL-2 诱发的 T 细胞增殖有显著的抑制作用, 其作用机制可能与抑制细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高相关。

关键词: 芦荟大黄素; T 淋巴细胞; 增殖; $[\text{Ca}^{2+}]_i$

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2027-04

T 淋巴细胞活化和增殖是机体重要的免疫反应, 研究表明细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的升高在 T 细胞增殖过程中起重要作用, 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 可使钙调素 (CaM) 和蛋白激酶 C (PKC) 等活化, 继而激活 NFAT 等转录因子, 引起细胞增殖^[1-4]。抑制细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高可抑制 T 细胞的增殖^[5]。在体内, 白细胞介素 2 (IL-2) 是引起 T 淋巴细胞增殖的关键细胞因子, IL-2 与 T 细胞膜上的 IL-2 受体结合, 通过激活 STAT5 信号通路引发细胞增殖^[6], 但 IL-2 引起 T 细胞增殖是否涉及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化, 目前尚未见报道。

大黄有抗炎、抑菌、保肝等多种作用, 芦荟大黄素 (aloe emodin) 是大黄中的游离型单蒽醌类有效成分之一, 此类化合物有调节机体免疫、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性, 其作用机制与调节细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化相关^[7,8]。前期研究表明, 芦荟大黄素对植物血凝素 (PHA) 诱发的 T 细胞增殖和细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化均有抑制作用^[9]。由于 IL-2 是生理条件下引起 T 细胞增殖的关键因素, 为进一步探讨芦荟大黄素对免疫系统的作用和机制, 本实验检测了芦荟大黄素对 IL-2 诱导的大鼠脾 T 淋巴细胞增殖和细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物: Wistar 大鼠, 体质量 160~180 g, 雌雄兼用, 由中国医学科学院放射医学研究所提供(二级)。

1.2 药品与试剂: MTT、Fura2/AM、HEPES、

SDS、含酚红 RPMI 1640 培养基, 购自美国 Sigma 公司; L-谷氨酰胺购于美国 Gibco 公司; IL-2 购自北京双鹭公司; 芦荟大黄素由天津药物研究院提供, 质量分数 98%; 环孢霉素 A (cyclosporin A) 购自 Ruibio 公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.3 T 淋巴细胞的制备: T 淋巴细胞的制备参照文献方法^[10]。将大鼠脱颈处死后, 无菌条件下立即解剖取出脾脏, 置于 PBS 溶液中, 切碎后匀浆, 将匀浆液 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入红细胞裂解液 (NH_4Cl 140 mmol/L, Tris 21 mmol/L), 放置 10 min, 以去除红细胞, 然后于 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 将沉淀悬浮于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中。将细胞悬液通过尼龙毛柱, 分离出 T 淋巴细胞, 加入 PBS 液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 重复 3 次以充分洗涤 T 淋巴细胞, 加入 RPMI 1640 培养液配成细胞悬液待用。

1.4 T 淋巴细胞增殖检测: 采用 MTT 比色法检测。将 T 淋巴细胞悬液调到浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 按每孔 100 μL 加入到 96 孔平底培养板中, 每组设 5 个复孔。实验分组为: 不加任何药物的对照组; 单独 IL-2 (250 U/mL) 处理组; 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 芦荟大黄素与 IL-2 (250 U/mL) 共处理组; 1、5 $\mu\text{mol/L}$ 环孢霉素 A 与 IL-2 (250 U/mL) 共处理组; 按以上分组每孔中加入药物后, 将 96 孔板置于 5% CO_2 的培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 72 h, 终止培养前 4 h 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL 。培养结束后每孔

收稿日期: 2010-02-01

作者简介: 李 新(1983—), 男, 天津市人, 硕士研究生, 研究方向为生物物理学。

* 通讯作者 李俊英 Tel: (022) 23508390 E-mail: jyli04@nankai.edu.cn

加入 100 μL SDS-DMF 溶解液 (含 10% SDS、50% DMF, pH 2.0) 过夜, 然后在酶联仪上测定各孔 570 nm 处的吸光度 (A) 值。

1.5 细胞胞浆内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化检测: 将盖玻片放入 6 孔板中, 每孔加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多聚赖氨酸液 50 μL , 使其均匀包被盖玻片。然后将 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 的 T 淋巴细胞悬液每孔 2 mL 培养于包被后的盖玻片上, 待细胞贴壁后, 每孔加入 2 mL 含 Fura2/AM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 HBSS 溶液 (NaCl 110 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, Na_2HPO_4 0.15 mmol/L, KH_2PO_4 0.4 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mmol/L, CaCl_2 1.3 mmol/L, NaHCO_3 4.2 mmol/L, 葡萄糖 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.5 mmol/L, HEPES 15 mmol/L, pH 7.2~7.4), 避光室温下放置 50 min 进行负载。负载后用 HBSS 洗涤 3 次, 去掉细胞外的 Fura2/AM, 每孔中加入 2 mL HBSS 液待测。细胞外无钙的条件下用不含 Ca^{2+} 的 HBSS 洗 3 次, 培养于含有 5 mmol/L EGTA 的无钙 HBSS 中。将负载好的细胞放于倒置显微镜上, 用单细胞钙离子成像分析系统检测细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化。由 CCD (型号: 480 TVL Colour Digital CCD) 实时拍摄细胞内荧光强度动态变化, 并用 Matefluor 分析软件 (美国通用公司) 进行实时采集和分析。先分别用 1、10、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 芦荟大黄素处理细胞 5 min, 然后再加入 250 U/mL IL-2, 以 Fura2/AM 作为探针, 分别测定 340 nm 和 380 nm 激发下的荧光强度 F_{340} 和 F_{380} , 其比值 (F_{340}/F_{380}) 表征细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化。

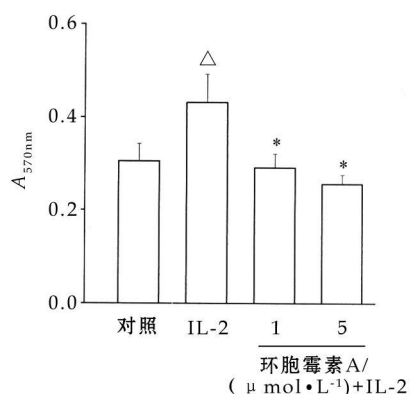
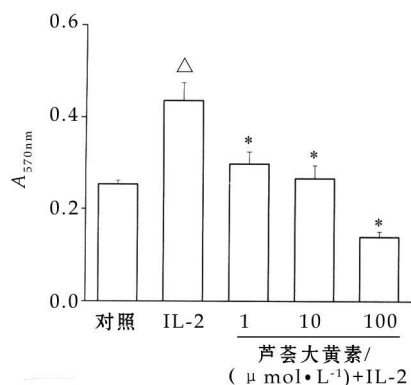
1.6 数据处理: 细胞增殖为相同条件下 3 次实验, 每次取 5 个孔数据的平均值。检测单细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的实验中, 每个实验条件均做 3 次取自不同动物的细胞检测, 检测 10 个左右细胞进行结果统计, 选取一例作为代表性结果示于图中。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 芦荟大黄素对 IL-2 引起 T 淋巴细胞增殖的影响: 在分离的 T 淋巴细胞培养液中加入 250 U/mL IL-2, 培养 72 h 后用 MTT 法检测存活细胞数量, 与不加 IL-2 的对照组进行比较, 结果显示 IL-2 处理组的 A 值显著高于对照组 (图 1), 表明 250 U/mL IL-2 可显著引起大鼠 T 淋巴细胞增殖。去除细胞培养液中的 Ca^{2+} , 在此条件下加入 IL-2 不能引起细胞增殖, 说明细胞培养液中的 Ca^{2+} 是细胞增殖的必要条件。

在细胞培养液中同时加入 IL-2 (250 U/mL)

和不同浓度的芦荟大黄素, 培养 72 h 后检测细胞增殖情况, 结果表明, 在芦荟大黄素存在的条件下, IL-2 诱发 T 细胞增殖的作用明显下降, 与单独 IL-2 组相比, 芦荟大黄素 1、10、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 分别使 A 值下降了 31%、39%、68%, 前期研究结果表明用单独的芦荟大黄素处理 T 细胞后, 细胞数目无显著变化^[9], 所以本实验结果表明芦荟大黄对 IL-2 引起的淋巴细胞增殖有显著抑制作用, 且其抑制效果与药物剂量相关。环孢霉素 A 是已知的抑制细胞增殖的药物, 以此作为阳性对照药物, 在本实验条件下, 环孢霉素 A 显著抑制了 IL-2 诱发的细胞增殖。



与对照组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 IL-2 组比较: $* P < 0.05$

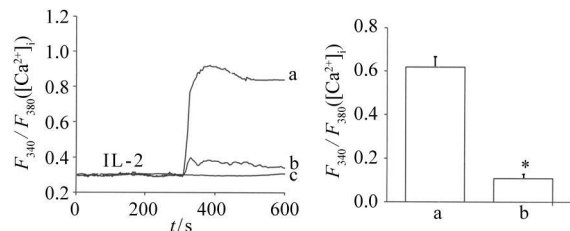
$\Delta P < 0.05$ vs control group; $* P < 0.05$ vs IL-2 alone group

图 1 芦荟大黄素对 IL-2 引起的 T 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 1 Effects of aloe emodin on IL-2 induced T lymphocytes proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

2.2 IL-2 对 T 淋巴细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响: 在正常细胞外液条件下加入 250 U/mL IL-2, 250~300 s 后 T 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高, 并持续维持细胞内高浓度 Ca^{2+} 的状态, 形成平台。统计结果显示, IL-2 可使细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高至基础值的 2.8 倍。为研究 IL-2 引起的 Ca^{2+} 升高的来源, 去除细胞外 Ca^{2+} , 在此条件下 IL-2 仍可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 但升高的程度显

著低于正常条件。比较正常和无 Ca^{2+} 情况下的 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化, 说明 IL-2 引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的途径包括胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流两种机制, 结果见图 2。



a 正常培养液 b 无 Ca^{2+} 培养液 c 对照

与 a 比较: * $P < 0.05$ ($n = 10$)

a normal HBSS solution b Ca^{2+} -free HBSS solution c control

* $P < 0.05$ vs a ($n = 10$)

图 2 IL-2 引起 T 淋巴细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化

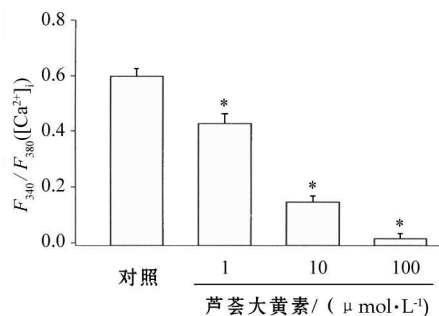
Fig. 2 IL-2 induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ change in T lymphocytes

2.3 芦荟大黄素对 T 淋巴细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的影响: 为研究芦荟大黄素抑制 T 细胞增殖与调节淋巴细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的关系, 检测了药物对 IL-2 引起的淋巴细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响。在正常细胞外液条件下, 先加入不同浓度的芦荟大黄素处理细胞 5 min, 然后再加入 IL-2, 在此条件下 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高显著降低或消失 (图 3)。统计加入 IL-2 后 300 s 时细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的值, 并与不加芦荟大黄素的比较, 结果表明, 1 $\mu\text{mol/L}$ 芦荟大黄素组的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高程度为对照组的 70%, 100 $\mu\text{mol/L}$ 芦荟大黄素则完全抑制了 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。前期研究结果显示, 芦荟大黄素本身不会引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化^[9], 因此以上结果表明芦荟大黄素对 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有抑制作用, 并且药物的作用与剂量有关。

为研究芦荟大黄素对 IL-2 引起的细胞内 Ca^{2+} 释放的影响, 去除细胞外液中的 Ca^{2+} , 并加入 EGTA, 在此条件下检测芦荟大黄素对 250 U/mL IL-2 诱发 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响。如图 4 所示, 1 $\mu\text{mol/L}$ 的芦荟大黄素使 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高显著下降, 10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的芦荟大黄素则能完全抑制 IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。因为在胞外无钙的条件下, IL-2 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是由胞内钙释放所致, 以上结果表明芦荟大黄素能够阻断 IL-2 引起的胞内钙释放。

3 讨论

IL-2 是引起 T 淋巴细胞增殖的关键细胞因子, T 细胞被有丝分裂原活化后首先合成 IL-2, IL-2 通



与对照组比较: * $P < 0.05$ ($n = 10$), 图 4 同

* $P < 0.05$ vs control group ($n = 10$), Fig. 4 is same

图 3 芦荟大黄素对 IL-2 引起的 T 淋巴细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响

Fig. 3 Effect of aloe emodin on IL-2 induced Ca^{2+} mobilization of T lymphocytes

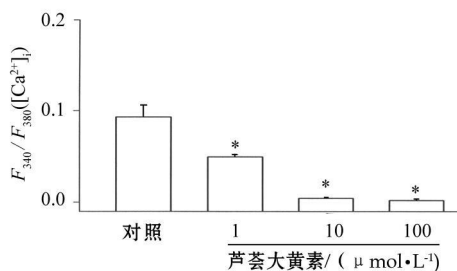


图 4 无钙条件下芦荟大黄素对 IL-2 引起的 T 淋巴细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响

Fig. 4 Effect of aloe emodin on IL-2 induced Ca^{2+} mobilization of T lymphocytes in Ca^{2+} -free solution

过自分泌的方式排出到细胞外后与 T 细胞膜上的 IL-2 受体结合, 通过活化 JAK 激酶, 激活 STAT 5 信号通路, 继而引起 $c\text{myc}$ 、 $c\text{fos}$ 等与细胞周期相关基因的转录上调, 引发细胞增殖。除了上述的信号通路外, 另有文献报道 p38/MAPK、PI3K 等也参与 IL-2 的信号转导过程^[6,11-12]。细胞内游离 Ca^{2+} 是重要的第二信使, 在淋巴细胞活化与增殖中起重要作用^[1-2]。本实验结果显示, IL-2 能够引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 其途径包括胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流两种机制, 而对于 T 细胞增殖, 在正常培养液条件下 (有细胞外 Ca^{2+}), IL-2 可以引起细胞增殖, 去除细胞培养液的 Ca^{2+} , IL-2 则不能引起细胞增殖, 对比 IL-2 引起细胞增殖和细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的结果, 说明 Ca^{2+} 内流, 而不是 Ca^{2+} 释放, 在 IL-2 引起细胞增殖中起关键作用。

芦荟大黄素属于大黄蒽醌类化合物, 该类化合物有抗炎和调节免疫的作用。曾报道过芦荟大黄素对植物血凝素 (PHA) 引起的 T 细胞增殖有抑制作用^[9], 本研究结果表明, 芦荟大黄素对于生理性 T

细胞增殖因素 IL-2 诱发的细胞增殖同样有显著的抑制作用。虽然芦荟大黄素对 IL-2 引起胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流均有抑制作用,但由于单纯内 Ca^{2+} 释放不能引起细胞增殖,而 Ca^{2+} 内流在 IL-2 引起细胞增殖中起关键作用,所以推测芦荟大黄素抑制 IL-2 引起细胞增殖与其抑制 IL-2 引起的胞外 Ca^{2+} 内流有关。Kuo 等^[13]报道过大黄素对 T 淋巴细胞增殖的影响,发现大黄素对 T 淋巴细胞的增殖有抑制作用,其作用机制与降低细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有关,这与本研究结果有一定的相似性,提示这一类药物可能有相似的作用机制。

关于 PHA 引起胞内 Ca^{2+} 升高的机制已经有较清楚的认识,PHA 结合于 T 细胞受体后激活 G 蛋白偶联的磷酸肌醇通路,引起胞内钙库释放 Ca^{2+} ,使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, Ca^{2+} 释放继而引起 T 细胞膜上 CRAC 通道开放,胞外 Ca^{2+} 流入,导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 进一步升高^[14]。本研究结果表明 IL-2 引起的 Ca^{2+} 升高由胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流组成,这一点与 PHA 相似,但 IL-2 引起的胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高发生在加入 IL-2 约 250~300 s 后,这与 PHA 不同,提示 IL-2 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的作用过程可能与 PHA 有差别,推测 IL-2 受体活化后可能需要通过细胞内一系列信号转导过程引起 IP₃ 产生,最终引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,该过程的详细机制还需要进一步的实验研究。芦荟大黄素对 IL-2 引起的胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流均有抑制作用,但药物作用具体的靶点和分子机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Lewis R S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19(1): 497-521.
- [2] György P, Zoltón V, Rezső G. Ionchannels and lymphocyte activation [J]. *Immunol Lett*, 2004, 92(1): 55-66.
- [3] Dolmetsch R E, Lewis R S, Goodnow C C, *et al.* Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration [J]. *Nature*, 1997, 386(6627): 855-858.
- [4] Winslow M M, Neilson J R, Crabtree G R, *et al.* Calcium signaling in lymphocytes [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(3): 299-307.
- [5] Zitt C, Strauss B, Schwarz E C, *et al.* Potent inhibition of Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channels and T lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12427-12437.
- [6] Kovanen P E, Leonard W J. Cytokines and immunodeficiency disease: critical roles of the γ_c dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15 and 21, and their signaling pathways [J]. *Immunol Rev*, 2004, 202: 67-83.
- [7] 李淑娟,董晓华,武海霞,等. 大黄及其有效成分药理作用研究进展 [J]. 医学综述, 2005, 11(1): 76-78.
- [8] 王辉,董志勇,余奕,等. 大黄素影响巨噬细胞升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和释放 TNF α 的作用特征 [J]. 生物物理学报, 2002, 18(3): 345-349.
- [9] 李臣宇,李新,刘丽军,等. 芦荟大黄素对 T 淋巴细胞增殖和细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 876-880.
- [10] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] Gaffen S L, Liu K D. Overview of interleukin 2 function, production and clinical applications [J]. *Cytokine*, 2004, 28: 109-123.
- [12] Wan Y Y, Flavell R A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory of T cells [J]. *Immunol Rev*, 2006, 211: 114-130.
- [13] Kuo Y C, Meng H C, Tsai W J. Regulation of cell proliferation inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi [J]. *Inflam Res*, 2001, 50(1): 73-82.
- [14] Kotturi M F, Hunt S V, Jefferies W A. Roles of CRAC and Ca^{2+} -like channels in T cells: more than one gatekeeper [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(7): 360-367.

六味地黄方及其配伍对血小板聚集的影响

赵越,叶宏军,余黎,卞慧敏*

(南京中医药大学药学院 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室,江苏 南京 210029)

摘要:目的 研究六味地黄方及其配伍对血小板聚集率的影响。方法 以比浊法测定六味地黄方及其配伍对二磷酸腺苷(ADP)、血小板活化因子(PAF)、花生四烯酸(AA)诱导的家兔体外血小板聚集率的影响,运用荧光法

收稿日期:2010-02-11

基金项目:江苏省中医药局科技项目(LZ09002);康缘中医药科技创新基金(HZ0814KY)

作者简介:赵越(1986—),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士研究生,主要从事中药心血管药理研究。

Tel: 15996254322 E-mail: hope.zy@163.com

* 通讯作者 卞慧敏 E-mail: hmbian@sina.com