

白藜芦醇对人 $\gamma\delta$ T 细胞生长和杀伤功能的影响

陈 玲, 陈复兴, 刘军权, 周忠海, 吕小婷, 朱 云*, 张 娟

中国人民解放军第九七医院 中心实验科, 江苏 徐州 221004

摘 要: **目的** 探讨白藜芦醇对人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞生长和杀伤功能的影响。**方法** 用异戊烯焦磷酸法体外扩增人 $\gamma\delta$ T 细胞, 不同浓度的白藜芦醇作用 $\gamma\delta$ T 细胞后, MTT 法检测 $\gamma\delta$ T 细胞生长情况, 流式细胞术检测给药前后 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能相关标志物颗粒酶 B、穿孔素和 CD107a 的表达。**结果** 人外周血单核细胞 (PBMC) 培养 10 d 后, $\gamma\delta$ T 细胞比例从扩增前的 3.12% 增至 80.46%; 白藜芦醇浓度为 0.2~12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时能促进 $\gamma\delta$ T 细胞生长, 其中以 1.56 $\mu\text{mol/L}$ 作用最明显, 使细胞增殖率高出对照约 15.90%; 白藜芦醇 1.56 $\mu\text{mol/L}$ 可上调 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能相关标志物颗粒酶 B、穿孔素、CD107a 表达, 随着给药浓度增高, $\gamma\delta$ T 增殖及其颗粒酶 B、穿孔素、CD107a 表达逐渐降低。**结论** 白藜芦醇在一定浓度范围内可促进 $\gamma\delta$ T 细胞增殖, 且增强 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能相关标志的表达, 这可能是其抗肿瘤作用机制之一。

关键词: 白藜芦醇; $\gamma\delta$ T 细胞; 细胞生长; 颗粒酶 B; 穿孔素; CD107a

中图分类号: R282.710.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)10-2056-04

Effects of resveratrol on human $\gamma\delta$ T cell growth and killing function

CHEN Ling, CHEN Fu-xing, LIU Jun-quan, ZHOU Zhong-hai, LV Xiao-ting, ZHU Yun, ZHANG Juan

Department of Central Laboratory, 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of resveratrol on human $\gamma\delta$ T cell growth and killing function. **Methods** Using the isopentenylpyrophosphate method to cultivate human peripheral blood $\gamma\delta$ T cell *in vitro*. Effect of resveratrol on $\gamma\delta$ T cell growth at different concentrations was observed by MTT, flow cytometry was used to detect the $\gamma\delta$ T cell granzyme B, perforin, and CD107a related to killing function before and after administration. **Results** $\gamma\delta$ T cells were amplified from 3.12% to 80.46% after human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) being cultured for 10 d. The certain concentration (0.2—12.50 $\mu\text{mol/L}$) of resveratrol could promote the growth of $\gamma\delta$ T cell. At the concentration of 1.56 $\mu\text{mol/L}$, resveratrol could promote $\gamma\delta$ T cells most significantly with proliferation rate 15.90% higher than that in the control group, and at this concentration resveratrol could significantly up-regulate the expression of granzyme B, perforin, and CD107a related to killing function of $\gamma\delta$ T cells. With the increasing concentration of resveratrol, the proliferation of $\gamma\delta$ T cells and the expression of granzyme B, perforin, and CD107a were reduced. **Conclusion** Resveratrol at certain concentration could promote $\gamma\delta$ T cell proliferation and enhance the expression of its related markers with killing function, which is one of the antitumor mechanisms.

Key words: resveratrol; $\gamma\delta$ T cell; cell growth; granzyme B; perforin; CD107a

白藜芦醇是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物, 广泛存在于葡萄、虎杖、决明子和花生等天然植物中^[1]。白藜芦醇对多种肿瘤细胞有较强抑制作用^[2-3], 随着对白藜芦醇抗肿瘤作用的深入研究, 发现其不仅能直接抑制肿瘤生长, 还能促进机体淋巴细胞增殖, 增强其杀伤肿瘤细胞的活性。 $\gamma\delta$ T 细胞主要分布于黏膜和上皮组织内, 具有较强的抗感染、抗肿瘤、维持免疫耐受和调节免疫应答等作

用。本实验观察白藜芦醇对体外培养的 $\gamma\delta$ T 细胞生长的影响, 并通过检测 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能相关标志物穿孔素 (perforin)、颗粒酶 B (granzyme B)、CD107a 的表达, 研究白藜芦醇对 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂

白藜芦醇 (质量分数 >99%, 批号 038k5202)、

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 南京军区科技创新经费资助项目 (08MA039)

作者简介: 陈 玲 (1985—), 女, 山东人, 检验师, 学士学位, 从事肿瘤生物治疗工作。Tel: 13645225827 E-mail: chenlingcl2@yahoo.cn

*通讯作者 朱 云 Tel: (0516)83349005 E-mail: Zhuyun65@126.com

异戊烯焦磷酸 (IPP)、MTT、二甲基亚砜 (DMSO), Sigma 公司产品; 胰蛋白酶、RPMI 1640, Gibco 公司产品; 人 AB 血清, 徐州市血站提供; 胎牛血清和淋巴细胞分离液, 中国科学院血液病研究所提供; 白细胞介素-2 (IL-2), 厦门特宝生物公司产品; 异硫氰酸荧光素标记的抗人 $\gamma\delta$ T 细胞受体 (TCR- $\gamma\delta$ -FITC)、藻红蛋白 (PE) 标志的穿孔素、颗粒酶 B 和 CD107a 均购自杭州联科生物公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 日本世诺临床诊断制品株式会社产品。

1.2 仪器

ST-360 酶标仪, 上海科华实验系统有限公司; Encore 自动生化分析仪, 北京希亚克技术有限公司; 流式细胞仪 (分析软件 CellQuest), 美国 BD 公司。

2 方法

2.1 $\gamma\delta$ T 细胞培养与鉴定

按文献方法^[4]培养 $\gamma\delta$ T 细胞。取健康献血者外周静脉血 100 mL, 抗凝, 分离白细胞层后置于淋巴细胞分离液上, 以 1 800 r/min 离心 15 min, 吸取单个核细胞层, 用生理盐水洗 3 次 (1 500 r/min 离心, 每次 10 min), 加入到 RPMI 1640 培养液中 (含 IL-2 2×10^5 U/L、100 ml/L 胎牛血清、50 ml/L 人 AB 血清和 IPP 3 mg/L), 调整细胞密度为 1×10^8 /L, 置 75 cm^2 细胞培养瓶中, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 根据细胞生长情况及时添加培养液。收集培养 10 d 的贴壁生长细胞进行细胞检测和其他实验。

2.2 对 $\gamma\delta$ T 细胞生长的影响

将培养 10 d 的 $\gamma\delta$ T 细胞配成 5×10^7 /L 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 200 μL /孔, 再加入不同浓度的白藜芦醇 (终浓度分别为 100、50、12.5、1.56、0.2 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度设 5 个复孔, 另设不加药物的对照组及无细胞的空白孔。继续培养 48 h 后, 每孔加入 MTT 20 μL , 37°C 培养 4 h 后弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μL , 轻轻震荡 10 min 充分溶解, 在酶标仪上于 540 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值, 按上述方法重复操作 5 次, 求平均值, 计算细胞生长率。

$$\text{生长率} = A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}}$$

2.3 对 $\gamma\delta$ T 细胞颗粒酶 B、穿孔素的影响

将培养 10 d 的 $\gamma\delta$ T 细胞配成 1×10^8 /L 的细胞悬液, 接种于 6 孔培养板中, 5 mL/孔, 再加入不同浓度的白藜芦醇 (终浓度分别为 12.5、1.56、0.2、0 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度设 3 个复孔。48 h 后收集 $\gamma\delta$ T

细胞, PBS 洗 3 次后再用 PBS 调整细胞数为 1×10^7 /mL, 取 100 μL , 加入抗人 TCR- $\gamma\delta$ -FITC 20 μL , 室温避光培养 15 min, 用 PBS 洗涤, 加入 100 μL 破膜剂 A, 室温避光培养 15 min, PBS 再洗后每管加入破膜剂 B 100 μL 、颗粒酶 B-PE 抗体 5 μL (或加入穿孔素-PE 抗体 20 μL 用于穿孔素的检测), 共同培养 15 min, PBS 洗涤, 加入 PBS 400 μL 后用流式细胞仪检测, 每个标本分析细胞 $\geq 1 \times 10^4$ 个。

2.4 对 $\gamma\delta$ T 细胞 CD107a 的影响

将培养 10 d 的 $\gamma\delta$ T 细胞配成 1×10^8 /L 的细胞悬液, 分别接种于 6 孔细胞培养板中, 5 mL/孔, 加入不同浓度的白藜芦醇 (终浓度分别为 12.5、1.56、0.2 $\mu\text{mol/L}$), 每个浓度设 3 个复孔。48 h 后收集 $\gamma\delta$ T 细胞, PBS 洗涤 3 次后再用 PBS 调整细胞数为 1×10^7 /mL, 取 100 μL , 加入抗人 TCR- $\gamma\delta$ -FITC 20 μL 、抗人 PE-CD107a 5 μL , 室温避光培养 15 min, PBS 洗涤, 加入 PBS 400 μL 后用流式细胞仪检测。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 $\gamma\delta$ T 细胞形态学观察和纯度检测

外周血单核细胞 (PBMC) 在 $\gamma\delta$ T 细胞培养基中培养 24 h 即可见贴壁生长, 48 h 后集落开始变大, 培养 10 d 可见大的集落和单个贴壁生长的细胞, 单个细胞可见其呈条梭状, 也有少量呈悬浮状 (图 1)。收集培养前后细胞进行 mAb 荧光标志后用流式细胞术检测。培养前 $\gamma\delta$ T 细胞为 3.12%; 培养 10 d 后 $\gamma\delta$ T 细胞为 80.46%。

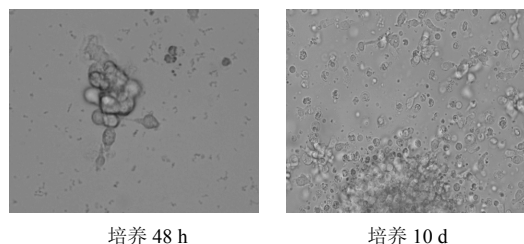


图 1 $\gamma\delta$ T 细胞形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of $\gamma\delta$ T cells

3.2 对 $\gamma\delta$ T 细胞生长的影响

白藜芦醇浓度为 0.2~12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 促进 $\gamma\delta$ T 细胞生长, 其中以 1.56 $\mu\text{mol/L}$ 作用最明显, 使细胞增殖增加 (15.90 ± 5.44)%, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$); 当白藜芦醇浓度高于 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,

对 $\gamma\delta$ T 细胞生长表现出抑制作用, 浓度升高至 100 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制率达 $(78.89 \pm 4.74)\%$ 。结果见图 2。

3.3 对 $\gamma\delta$ T 细胞的颗粒酶 B、穿孔素、CD107a 的影响

经白藜芦醇 0.2~12.5 $\mu\text{mol/L}$ (在此浓度范围促进 $\gamma\delta$ T 细胞生长) 作用 48 h 后, $\gamma\delta$ T 细胞中颗粒酶 B、穿孔素、CD107a 的表达均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

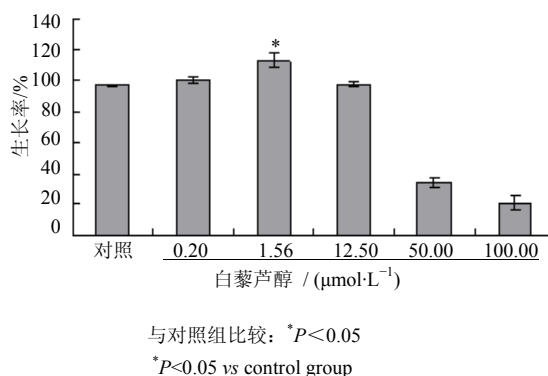


图 2 白藜芦醇对 $\gamma\delta$ T 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of resveratrol on $\gamma\delta$ T cells growth ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 1 白藜芦醇对 $\gamma\delta$ T 细胞穿孔素、颗粒酶 B 和 CD107a 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of resveratrol on granzyme B, perforin, and CD107a in $\gamma\delta$ T cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	穿孔素/ %	颗粒酶 B/ %	CD107a/ %
对照	—	51.78 ± 3.53	72.76 ± 3.66	31.97 ± 3.60
白藜芦醇	0.20	$91.03 \pm 2.79^{**}$	$91.32 \pm 3.62^{**}$	$77.34 \pm 3.25^{**}$
	1.56	$98.18 \pm 1.33^{**}$	$98.03 \pm 1.06^{**}$	$81.39 \pm 4.12^{**}$
	12.50	$95.35 \pm 3.32^{**}$	$95.85 \pm 2.53^{**}$	$79.14 \pm 2.64^{**}$

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

白藜芦醇是一种天然化合物, 结构类似于雌激素己烯雌酚, 是植物为抵抗外界刺激, 如紫外线、真菌与病毒感染或机械损伤而产生的一种植物抗毒素^[1]。白藜芦醇具有抗氧化作用, 可调节脂类代谢、保护心脑血管, 还具有抗炎、抗菌、抗过敏、抗肿瘤等多种药理作用, 且无明显不良作用, 具有重要的药用价值。有研究表明, 白藜芦醇通过阻断多种炎症反应信号通路的分子表达^[5]和降低细胞的 COX-2 活性^[6]发挥抗肿瘤作用; Fulda 等^[7-9]进行的体外研究也证实, 白藜芦醇能诱导多种肿瘤细胞凋

亡。随着研究的不断深入, 人们发现白藜芦醇还能通过促进淋巴细胞增殖、多种细胞因子释放^[10-12], 上调免疫细胞中 NKG2D 的表达^[13], 来增强免疫细胞的杀伤功能。

$\gamma\delta$ T 细胞最早从肺癌浸润淋巴细胞中发现, 随着研究的不断深入, 发现其主要分布在皮肤、小肠、食管、肺等上皮组织内, 在免疫调节、肿瘤免疫监视和特异性初次免疫应答中起重要作用^[14]。 $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肿瘤细胞的主要机制是通过识别表达在肿瘤细胞表面的磷酸化抗原和 NKG2D、MICA/B、uLBP、FI-ATP 合酶等配体识别肿瘤细胞, 再释放穿孔素、颗粒酶 B 和 Fas/FasL 杀伤肿瘤细胞。穿孔素存在于细胞毒性 T 淋巴细胞、天然杀伤 (NK) 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞胞质的细胞毒颗粒中, 当这些细胞与靶细胞接触后可释放穿孔素, 在靶细胞膜上形成多聚穿孔素管状通道, 导致靶细胞溶解破坏^[15]。颗粒酶 B 是杀伤性 T 淋巴细胞和 NK 细胞颗粒中最重要的丝氨酸蛋白酶, 其通过 caspases 依赖途径直接进入核途径及不依赖 caspases 的胞质途径杀伤靶细胞^[16]。CD107a 与 T 细胞和 NK 细胞介导的靶细胞溶解密切相关, 实验证明 CD107a 的表达可作为其细胞毒活性的一个敏感指标^[17]。

本实验结果显示, 白藜芦醇为 0.20~12.5 $\mu\text{mol/L}$ 能促进 $\gamma\delta$ T 细胞增殖, 当浓度大于 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制 $\gamma\delta$ T 细胞生长, 且抑制率随浓度的升高而增加, 这与 Boscolo^[12]报道的相一致。当白藜芦醇浓度低于 1.56 $\mu\text{mol/L}$ 时, 经流式细胞仪检测发现穿孔素、颗粒酶 B、CD107a 的表达均增高, 且具有浓度相关性; 大于 1.56 $\mu\text{mol/L}$, $\gamma\delta$ T 细胞免疫表型的表达随浓度的升高而递减, 这种“浓度窗”现象为该药的临床应用提供了参考。本实验证实白藜芦醇抗肿瘤作用存在着多种作用机制, 为今后白藜芦醇在肿瘤免疫治疗中的应用提供依据。低浓度白藜芦醇诱导 $\gamma\delta$ T 细胞提高杀伤活性除与颗粒酶 B、穿孔素、CD107a 表达增强外, 是否还与白藜芦醇促进细胞 ICAM-1 高表达等其他因素有关尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 赵荣国, 姜涛. 白藜芦醇的制备方法研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(5): 362-365.
- [2] 刘宏胜. 白藜芦醇抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 312-314.
- [3] 刘宏胜, 王金环, 徐新女, 等. 白藜芦醇抑制人脑胶质

- 瘤 U251 细胞增殖及诱导其凋亡的实验研究 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 1375-1377.
- [4] 陈复兴, 刘军权, 冯霞, 等. 一种体外扩增人 $\gamma\delta$ T 细胞的新方法 [J]. 细胞与分子免疫杂志, 2007, 23(7): 662-664.
- [5] Kaha N, Roy P, Prasad S, *et al.* Resveratrol induces apoptosis involving mitochondrial pathways in mouse skin tumorigenesis [J]. *Life Sci*, 2008, 82(7/8): 348-358.
- [6] Hussain S P, Harris C C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(11): 2373-2380.
- [7] Fulda S, Debetin K M. Senescence for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(1): 337-346.
- [8] Zheng Q, Tang X, Lu Q Y, *et al.* Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(10): 1465-1474.
- [9] 孙春艳, 胡豫, 刘新月. 白藜芦醇对多发性骨髓瘤细胞的体外抗癌作用 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 80-84.
- [10] Gao X, Xu Y X, Janakiraman N, *et al.* Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 62: 1299-1308.
- [11] Falchetti R, Fuggetta M P, Lanzilli G, *et al.* Effects of resveratrol on human immune cell function [J]. *Life Sci*, 2001, 70(1): 81-96.
- [12] Boscolo P, del Signore A, Sabbioni E, *et al.* Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2003, 33(2): 226-231.
- [13] Lu C C, Chen J K. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(2): 343-351.
- [14] Brandes M, Moser B. $\gamma\delta$ T cells: an alternative type of professional APC [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(3): 112-118.
- [15] Bi E, Huang C, Hu Y, *et al.* Functional assessment of perforin C2 domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function [J]. *Blood*, 2009, 113(2): 338-346.
- [16] Prakash M D, Bird C H, Bird P I. Active and zymogens of granzyme B are constitutively released from cytotoxic lymphocytes in the absence of target cell engagement [J]. *Immunol Cell Biol*, 2009, 87(3): 249-254.
- [17] Aktas E, Kucuksezer U C, Bilgic S, *et al.* Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity [J]. *Cell Immunol*, 2009, 254(2): 149-154.