

三叶青提取物对体外培养 NK 细胞功能的影响

王 莹 章松平 俞 哲 徐爱芳

摘要 目的 三叶青提取物对体外培养 NK 细胞功能的影响。**方法** 用物理和化学方法分离和纯化三叶青中的有效成分,并用高效液相色谱(HPLC)法鉴定提取纯度。分离慢性乙肝患者外周血单个核细胞(PBMC);在体外用磁分法从 PBMC 中分离 NK 细胞;用 NK 细胞培养基将分离后的 NK 细胞进行定向培养。收集培养第 7 天的 NK 细胞给予不同浓度的三叶青提取液诱导 72h;用 CCK-8 法检测人 NK 细胞增殖率;流式细胞术(FCM)检测三叶青提取物作用前后 NK 细胞穿孔素(PFP)、颗粒酶 B(GrB)、CD107a 的表达;FCM 法检测三叶青提取物诱导 72h 后 NK 细胞的 IFN- γ 表达。**结果** 将三叶青根块分别提取 9 个部分(分别命名为 TH-t、TH-p、TH-a、TH-b、TH-w、TH-w1、TH-w2、TH-w3 和 TH-w4)。各部位三叶青提取物对 NK 细胞均有促进生长作用,差异有统计学意义($P < 0.05$),在药物浓度相同条件下,以水煮脱糖部位(Th-w3)时促 NK 细胞生长活性最强;总提取物(Th-t)、石油醚部位(Th-p)和水部位脱糖流分次之,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。三叶青总提取物作用 NK 细胞 72h 后,其穿孔素和颗粒酶 B 阳性表达均明显升高,以 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 三叶青总提取物组的穿孔素和颗粒酶 B 阳性表达率达到最明显,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。经三叶青提取物诱导的 NK 细胞其 IFN- γ 表达以浓度为 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时最高(99.01%),较对照组(88.46%)显著上升($P < 0.05$)。**结论** 三叶青提取物能促进慢性乙型肝炎患者 NK 细胞增殖和功能改变,上调 NK 细胞表面 PFP、GrB、CD107a 和 IFN- γ 的表达。

关键词 慢性乙型肝炎 NK 细胞 三叶青/提取物

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.037

Effect of the Extract of Radix Tetrastigmatis on the Function of NK Cells in vitro. Wang Ying, Zhang Songping, Yu Zhe, et al. Xixi Hospital of Hangzhou(The Sixth People's Hospital of Hangzhou), Zhejiang 310023, China

Abstract Objective To study the effect of the extract of radix tetrastigmatis on the function of NK cells in vitro. **Methods** The effective components of radix tetrastigmatis were separated and purified by physical and chemical methods, and the extraction purity were identified by HPLC. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated in patients with chronic hepatitis B. NK cells were separated from PBMC by magnetic separation in vitro. The separated NK cells were in orientational culture with NK cell medium. The NK cells cultured for seven days were collected and induced for 72 hours by the extract of radix tetrastigmatis at different concentrations. Human NK cell proliferation was detected by CCK-8 assay. The expression of NK cells perforin (PFP), granzyme B (GrB) and CD107a detected by flow cytometry (FCM) before and after the effect by the extract of radix tetrastigmatis. The expression of NK cells IFN- γ was detected by flow cytometry (FCM) after 72h-induced. **Results** Nine parts of the radix tetrastigmatis were extracted (named TH-t, TH-p, TH-a, TH-b, TH-w, TH-w1, TH-w2, TH-w3 and TH-w4). All parts of the extract could promote the growth of NK cells, and the differences were significant. Under the same conditions of concentration, water boiling desugar portion (Th-w3) promoted the growth most actively. Total extract (Th-t), petroleum ether (Th-p) and water fractions desugared followed, and the differences were significant with the control group ($P < 0.05$). After 72h induced by the total extract of radix tetrastigmatis on NK cells, the positive expression rate of perforin and granzyme B was significantly increased, and total extract group(0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$) reached the highest expression, compared with the control group ($P < 0.05$). The expression rate of IFN- γ was 99.01% with its concentration of 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$, which was significantly higher than the expression of control group (88.46%) ($P < 0.05$). **Conclusion** The extract of radix tetrastigmatis can promote the proliferation and function changes of NK cells in patients with chronic hepatitis B, and up-regulate the NK cell surface expression of PFP, GrB, CD107a and IFN- γ .

Key words Chronic Hepatitis B; NK cell; Radix Tetrastigmatis/Extract

国内外相关资料表明,在研究慢性乙型病毒性肝

炎发病机制过程中,慢性乙型肝炎患者久治不愈与机体免疫状态失衡密切相关,其中自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)的功能缺陷为主要因素之一^[1-3]。三叶青是我国特有的植物,具有较好的抗肿

作者单位:310023 杭州市西溪医院(杭州市第六人民医院)检验科
通讯作者:章松平,电子邮箱:zsp103cn@163.com

瘤、抗炎、镇痛及解热等作用。有体外研究结果显示,三叶青乙酸乙酯能明显降低慢性乙型肝炎患者体内病毒复制水平^[4]。本研究拟采集慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞(PBMC),分离、培养NK细胞,观察经三叶青提取物诱导后的NK细胞的增殖能力、分泌细胞因子、杀伤活性和细胞的功能改变。初步探讨三叶青提取物对慢性乙型肝炎患者NK细胞功能的影响。

材料与方 法

1. 研究对象:按2015年WHO关于慢性乙型病毒性肝炎诊断标准,选择6例笔者医院住院与门诊患者,均为慢性乙型肝炎,其中女性3例,男性3例,患者年龄28~58岁。所有患者HBV-DNA和HBsAg均阳性;所有患者1年内均未行抗病毒治疗。

2. 材料:三叶青干燥块根(宁波市鄞州医药药材公司);Varian MAT-212型质谱仪,Bruker-specko-spin AC-600P型核磁共振仪,流式细胞仪(美国BD公司),FITC和PE标记的CD3、FITC标记的CD56、PE标记的穿孔素(pore-forming protein, PFP)、颗粒酶B(Granzyme B, GrB)、APC标记的CD107a(联科生物有限公司)。

3. 研究方法:(1)三叶青提取物分组:根据提取时所选用的制剂将三叶青提取物分为9组,分别命名为TH-t、TH-p、TH-a、TH-b、TH-w、TH-w1、TH-w2、TH-w3和TH-w4。(2)各组三叶青提取物的提取方法:三叶青提取物参照杨阳等^[5]文献分离纯化得到,经高效液相色谱(HPLC)分析。TH-t部分21.6g,得率10.8%;TH-p部分0.15g,得率0.075%;TH-a部分0.58g,得率0.29%;TH-b部分2g,得率1%;TH-w部分18.9g,得率9.45%;TH-w1部分0.14g,得率0.07%;TH-w2部分0.3g,得率0.15%;TH-w3部分2.1克;TH-w4部分:将上述经有机溶剂提取后的三叶青药材用减压回收蒸干脱水,再使用10%、30%、60%、95%乙醇水溶液分别依次脱糖。(3)NK细胞的分离纯化:用淋巴细胞分离液常规分离慢性乙肝患者PBMC,经PBS洗涤配成细胞悬液,加入20 μ l抗CD56免疫磁珠,4 $^{\circ}$ C避光孵育15min后,离心处理,进行磁珠分离,获得CD3⁻/CD56⁺的细胞即为NK细胞。(4)NK细胞培养:取经磁分选的NK细胞,用NK细胞培养基将细胞配成 5×10^5 的细胞悬液,加入rhIL-2、rhIL-15、rhIL-18、rhIL-21和人AB血清等培养,用FITC标记的CD56和PE-标记的CD3抗体标记NK细胞,流式细胞仪检测。(5)CCK8法检测不同三叶青提取物对慢性乙肝

患者NK细胞生长的影响:取培养7天的NK细胞配成 5×10^4 /ml的细胞悬液,加入不同浓度的三叶青提取物培养后于酶标仪450nm处检测各孔吸光度值(A)记录结果。增殖率(%)=[(实验A值)-(对照A值)]/(对照A值) $\times 100\%$ 。(6)流式细胞仪检测NK细胞上穿孔素、颗粒酶B和CD107a的表达:将培养成功的NK细胞配成浓度为 1.0×10^5 /ml的细胞悬液,加入不同浓度的三叶青提取物,培养72h收集细胞洗涤2、避光孵育,加100 μ l破膜液,100 μ l anti-Perforin抗体及anti-granzyme B-PE抗体和APC标记的CD107a抗体,室温避光孵育15min,PBS洗涤后,重悬于0.5ml的PBS溶液中,分别用流式细胞术检测穿孔素、颗粒酶B和CD107a的表达。(7)FCM法检测三叶青提取物诱导72h后NK细胞IFN- γ 表达:将培养10天的NK细胞离心、洗涤、孵育,按要求收集细胞,配制0.5ml PBS重悬细胞,上机检测。

4. 统计学方法:采用SPSS 13.0统计学软件进行统计分析处理,计量资料使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. NK细胞鉴定:培养前外周血单个核细胞中CD3⁻CD56⁺的NK细胞为4.5%。培养10天时的NK细胞用流式细胞仪检测其细胞表型,结果显示,CD3⁻CD56⁺的NK细胞高达93.1%,见图1。

2. 不同三叶青提取物对NK细胞生长影响:各提取阶段三叶青提取物对NK细胞生长影响有较大差异,在药物浓度相同条件下,以水煮脱糖部位(Th-w3)时促NK细胞生长活性最强;总提取物(Th-t)、石油醚部位(Th-p)和水部位脱糖流分次之,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其他结果均有一定的促NK细胞增殖作用。提取物Th-w4部分对NK细胞生长无明显影响。各三叶青提取物对NK细胞生长均有时间依赖性,药物诱导时间越长,促进细胞增殖越明显,组与组之间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图2~图9。

3. 三叶青提取物对乙肝患者NK细胞中颗粒酶B、穿孔素和CD107a表达的影响:与0 μ g/ml对照组相比,2.440~0.039 μ g/ml的三叶青提取物作用NK细胞72h后,其穿孔素、颗粒酶B和CD107a阳性表达均明显升高,其中以0.62 μ g/ml组阳性表达达最高,而浓度超过9.76 μ g/ml时穿孔素、颗粒酶B和CD107a阳性表达率均明显下降。结果见图10。

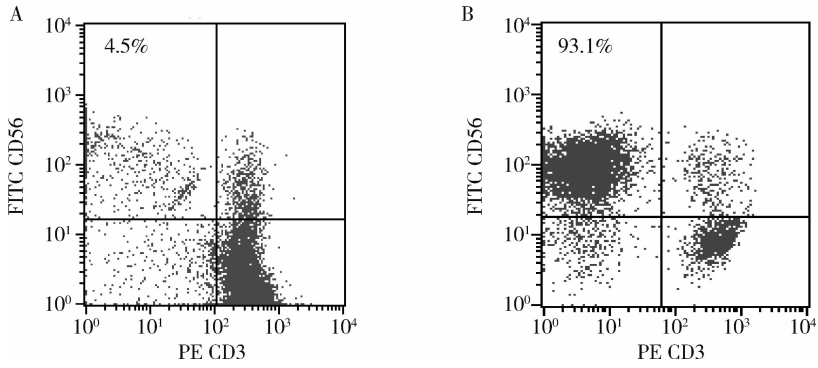


图1 NK细胞的表型

A. 培养前; B. 培养后

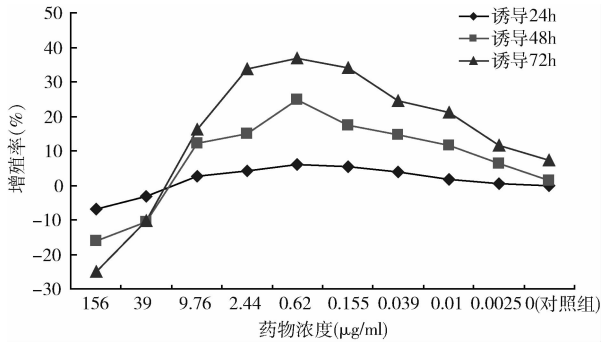


图2 三叶青提取液 Th-t 对 NK 细胞生长的影响

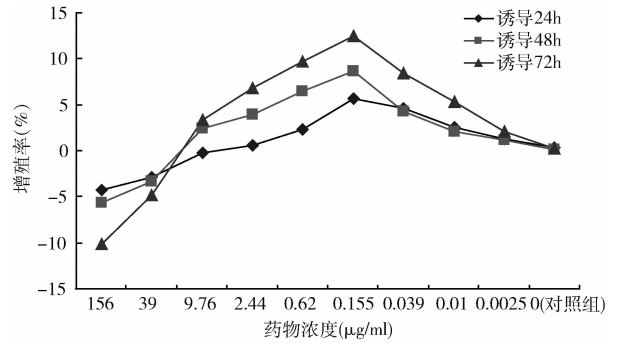


图5 三叶青提取液 Th-b 对 NK 细胞生长的影响

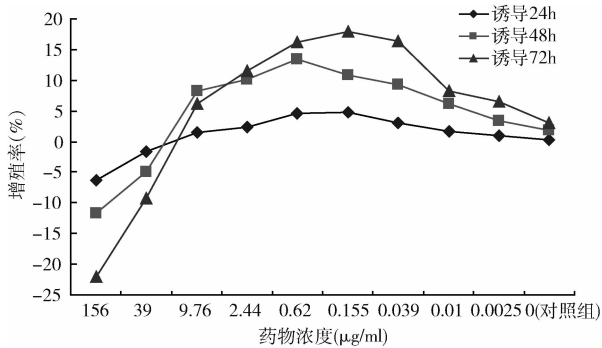


图3 三叶青提取液 Th-p 对 NK 细胞生长的影响

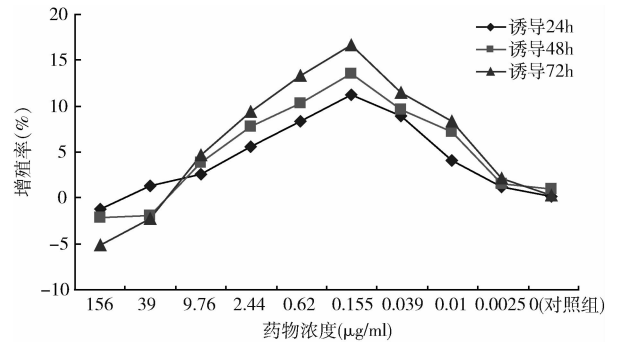


图6 三叶青提取液 Th-w 对 NK 细胞生长的影响

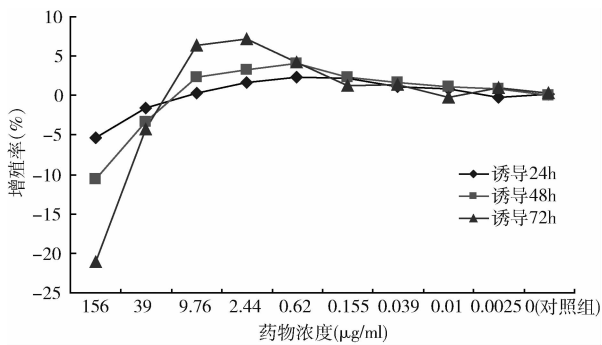


图4 三叶青提取液 Th-a 对 NK 细胞生长的影响

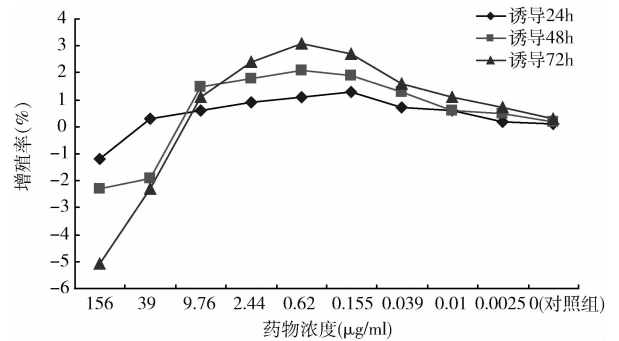


图7 三叶青提取液 Th-w1 对 NK 细胞生长的影响

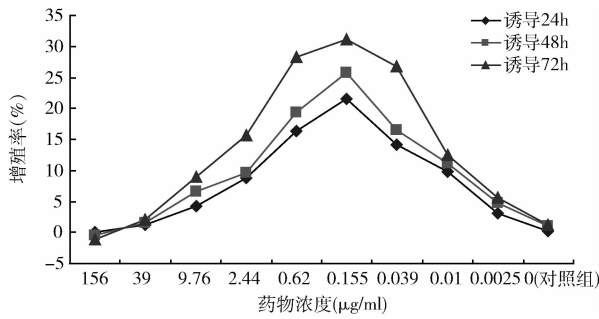


图 8 三叶青提取液 Th - w2 对 NK 细胞生长的影响

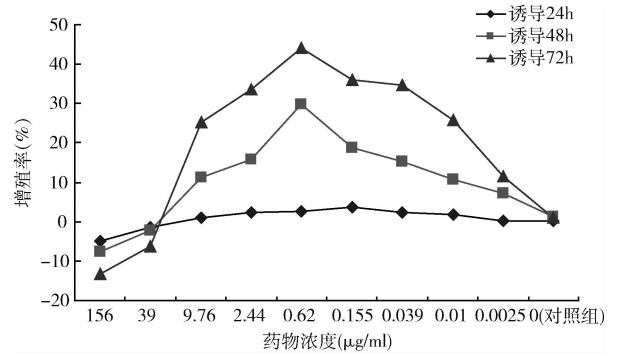


图 9 三叶青提取液 Th - bm1 对 NK 细胞生长的影响

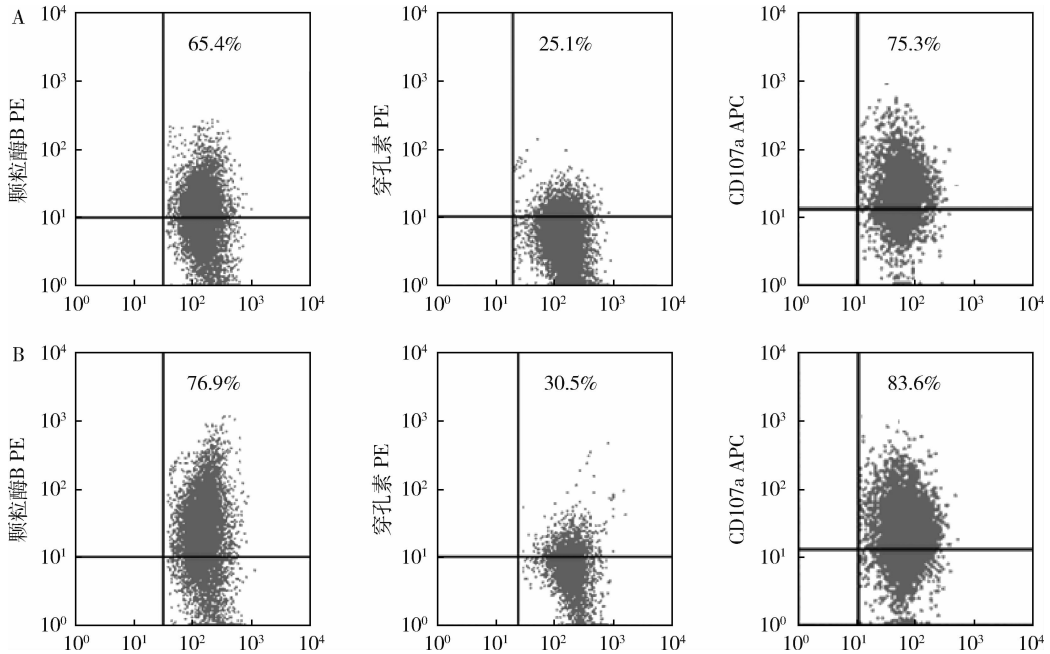


图 10 TH - t 诱导后的 NK 细胞颗粒酶、穿孔素和 CD107a 的表达

A. 对照组; B. 三叶青总提取物组 (0.62 μg/ml)

4. NK 细胞 IFN - γ 的表达结果: 不同浓度三叶青总提取物处理 NK 细胞 72h 后, 浓度为 9.76、2.44、0.62、0.155 μg/ml 时均不同程度上升, 其中浓度在 0.62 μg/ml 时, NK 细胞的 IFN - γ 表达最高, 较对照

组 (90.52%) 显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。当浓度 $\geq 2.44 \mu\text{g/ml}$ 浓度时, NK 细胞 IFN - γ 的表达下降。结果见图 11。

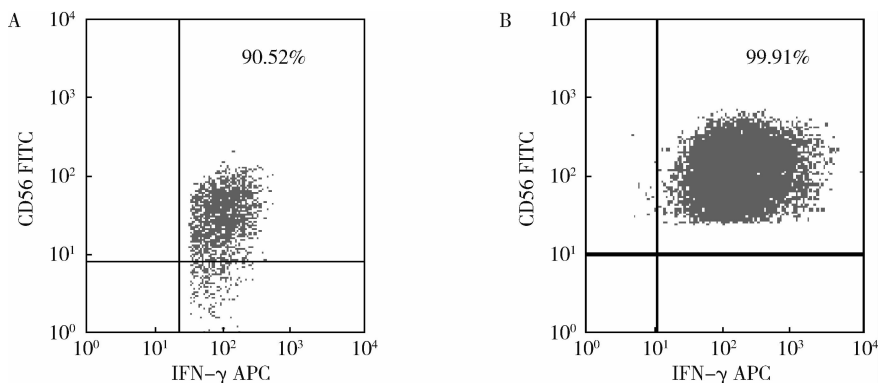


图 11 三叶青总提取物作用 72h 后 NK 细胞内的 IFN - γ 表达

A. 对照组; B. 三叶青总提取物组 (0.62 μg/ml)

讨 论

三叶青为葡萄科崖爬藤属,主要分布于我国东南地区,其有效成分主要为含黄酮类化学成份,临床上常用于治疗高热惊厥,小儿感冒发热、喉痒肿痛、咳嗽、肺炎、肝炎、肠炎、痢疾等^[6]。现代药理相关研究表明,三叶青提取物具有较好的抗炎、镇痛、护肝及抗肿瘤作用等^[7-9]。研究结果表明,各提取阶段三叶青提取物对NK细胞生长影响有较大差异,在药物浓度相同条件下,以水煮脱糖部位时促NK细胞生长活性最强。

国内许多研究发现^[1],乙肝慢性转换后,患者均出现T细胞亚群异常,患者体内IL-2R增高,尤其是NK比例和细胞活性明显降低。有研究通过HBV感染者自然杀伤细胞活性分析发现,慢性乙型肝炎患者NK细胞分泌IFN- γ 和TNF- α 的能力明显低于健康对照组^[10,11]。Anita等^[12]研究发现,NK细胞不仅具有抗病毒的功能,还能恢复由HBV特异性CD8⁺T细胞缺失,调节适应性免疫应答,经NK细胞体外诱导后CD8⁺T细胞更有助于促进HBV特异性免疫细胞清除病毒。

本研究结果显示,不同浓度的三叶青提取物作用于NK细胞72h后,当三叶青提取物浓度在0.01~9.76 $\mu\text{g/ml}$ 范围内时,NK细胞的增殖率逐渐上升,浓度超过9.76 $\mu\text{g/ml}$ 时,NK细胞的增殖率逐渐下降,提示三叶青提取物在一定浓度下促进NK细胞的增殖具有量效关系。三叶青提取总物能增强NK细胞的杀伤活性,可能与三叶青提取物诱导后NK细胞PFP、GraB、CD107a和IFN- γ 高表达有关。PFP存在于NK细胞和 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞等胞质的细胞颗粒中,当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^[13]。GraB是具有天冬氨酸酶活性的丝氨酸蛋白酶^[14]。CD107a是溶酶体膜糖蛋白的一种,与T细胞和NK细胞介导的靶细胞溶解密切相关,已有实验证明CD107a的表达可作为其细胞毒活性的一个敏感指标。IFN- γ 主要由活化的T细胞和NK细胞产生,具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用,尤其在抗病毒的免疫应答中为节点性细胞因子,三叶青有可能通过提高IFN- γ 水平来发挥抗肿瘤及调节机体免疫功能的作用亦被不少学者关注^[15]。

本实验结果提示三叶青提取物能在体外促进慢性乙型肝炎患者NK细胞增殖和功能改变,上调NK

细胞表面PFP、GrB、CD107a和IFN- γ 的表达,这可能与抑制乙型肝炎病毒复制作用相关,但尚需进一步研究证实。

参考文献

- 于晓辉,朱自江,李晓云,等.乙型肝炎肝硬化患者外周血T淋巴细胞亚群和NK细胞的变化及临床意义[J].肝脏,2014,19(4):254-256
- Shabani Z, Bagheri M, Zare-Bidaki, *et al.* NK cells in hepatitis B virus infection: a potent target for immunotherapy [J]. Arch Virol, 2014, 159(7): 1555-1565
- Heiberg IL, Pallett LJ, Winther TN, *et al.* Defective natural killer cell anti-viral capacity in paediatric HBV infection [J]. Clin Exp Immunol, 2015, 179(3): 466-476
- 杨雄志,巫军.三叶青提取物抗乙肝病毒活性的研究[J].南京中医药大学学报,2009,25(4):294-296
- 杨阳.甘西鼠尾草及头花蓼化学成分研究.第二军医大学硕士学位论文[D].上海:第二军医大学,2009
- 资古明,吉兰,胡建成,等.金钱吊葫芦消炎镇痛的药理研究[J].中草药,1989,20(2):27-29
- Cai X. Study of Tetrastigma hemsleyanum on liver functions of rabbit by the application of 131 I-rose bengal [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1980, 11(1): 38-41
- 丁丽,纪其雄,吕雯婷,等.三叶青水提物体内、体外抗肿瘤作用的研究[J].中成药,2013,35(5):1076-1078
- 钟良瑞,魏克民.三叶青黄酮对肺癌A549细胞生长抑制与MAPKs通路关系的研究[J].中国药理学通报.2014,30(1):101-104
- 李媛,王久君,高珊,等.HBV感染者自然杀伤细胞活性分析[J].肝脏,2011,17(4):269-273
- 蔡鹏威,林芸,窦敏,等.乙型肝炎病毒导致慢性乙型肝炎患者血中CD56dimNK细胞亚群数量下降[J].免疫学杂志,2006,22(5):559-562
- Anita S, Alexander H, Robert T, *et al.* The Role of Natural Killer Cells and CD8⁺ T Cells in Hepatitis B Virus Infection [J]. Immunol, 2014, 5: 258-268
- 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
- Prakash MD, Bird CH, Bird PI. Active and zymogen forms 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
- 王明仪,陈伟芳,陈宇,等.三叶青乙酸乙酯提取物对裸鼠人肝癌细胞HepG-2皮下移植瘤生长抑制作用的研究.中国中药药科技,2014,21(2):157-163

(收稿日期:2016-11-09)

(修回日期:2017-06-02)