

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.01.007

穿龙薯蓣皂苷元对小鼠 T 淋巴细胞影响的体外研究

王 焯¹, 付聪敏¹, 贾丽荣¹, 李松燃², 党晓伟¹, 马秀芬¹, 秦博文^{1△}

(1. 承德护理职业学院, 河北承德 067000; 2. 空军军医大学, 陕西西安 710032)

[摘要] **目的** 研究穿龙薯蓣皂苷元(Dio)对小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖及白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ) mRNA 表达的影响, 探讨 Dio 的免疫调节机制。**方法** 以不同浓度 Dio 与刀豆蛋白 A(ConA) 刺激的 T 淋巴细胞共同培养, 用 CCK-8 检测 Dio 对 T 淋巴细胞增殖的影响, 反转录 PCR 法检测 Dio 对 IL-2、IFN- γ mRNA 表达的影响。**结果** Dio 浓度在 0.937 5~15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围, 对 T 淋巴细胞增殖有抑制作用, 在 3.750 0~15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围, 对 T 淋巴细胞 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达有抑制作用, 随 Dio 浓度增加抑制作用均增强 ($P < 0.05$), 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳抑制浓度, 超过此浓度抑制作用减弱。**结论** Dio 对 T 淋巴细胞的增殖及 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达均有抑制作用。

[关键词] 穿龙薯蓣皂苷元; T 淋巴细胞; 白细胞介素-2; 干扰素 II 型; mRNA

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)01-0020-03

In vitro study on effects of diosgenin from *Dioscorea nipponica* on mouse T lymphocytes

WANG Ye¹, FU Congmin¹, JIA Lirong¹, LI Songran², DANG Xiaowei¹, MA Xiufen¹, QIN Bowen^{1△}

(1. Chengde Nursing Vocational College, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of diosgenin(Dio) from *Dioscorea nipponica* on the proliferation in mouse spleen T lymphocytes and expressions of IL-2 and IFN- γ mRNA, in order to investigate the immunity regulatory mechanism of Dio. **Methods** T lymphocytes stimulated by different concentrations of Dio and concanavalin A(ConA) were co-cultured. CCK-8 was used to detect the Dio effects on T lymphocyte proliferation. The RT-PCR method was adopted to detect the effect of Dio on expression of IL-2 and IFN- γ mRNA. **Results** The Dio concentration in the range of 0.937 5—15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had the inhibiting effect on T lymphocyte proliferation, Dio concentration in the range of 3.750 0—15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had the inhibiting effect on IFN- γ and IL-2 expression in T lymphocytes. With the Dio concentration increase, the inhibition effect was enhanced ($P < 0.05$). 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was the best inhibition concentration. The inhibition effect was decreased when the concentration exceeding 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **Conclusion** Dio has the inhibiting effect on T lymphocyte proliferation and expressions of IL-2 and IFN- γ mRNA.

[Key words] diosgenin; T lymphocyte; interleukin-2; interferon type II; mRNA

穿龙薯蓣皂苷元(diosgenin, Dio)是从薯蓣科植物穿龙薯蓣的干燥根茎即穿山龙中提取、水解产生,是穿山龙的主要有效成分^[1-3]。现代药理学研究证明,Dio 具有抗肿瘤、调节免疫、祛痰平喘、抗变态反应、抗骨质疏松等多种药理作用^[4-9],还具有激素类作用,是合成甾体激素类药物的重要原料^[10]。本实验以正常小鼠脾脏 T 淋巴细胞为研究对象,研究 Dio 在体外对 T 淋巴细胞增殖活性的影响及对白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ) mRNA 表达的影响,为揭示 Dio 的免疫调节机制提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 受试动物 清洁级 C57 近交系小鼠,雄性,8~10 周龄,由中国医学科学院实验动物中心提供。

1.1.2 药品与试剂 Dio(南京泽朗医药科技有限公司,纯度 98%,批号:20132516),刀豆蛋白 A(ConA)(美国 Sigma 公司),氯化可的松(HC,天津生物化学制药有限公司),CCK-8 试剂(碧云天生物技术研究所),反转录 PCR 试剂盒[宝生物工

程(大连)有限公司],IL-2、IFN- γ 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.1.3 仪器 DNP-9052 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)、YT-CJ-1N 超净工作台(北京亚泰科隆实验科技开发中心)、Multiskan MK3 酶联仪(芬兰雷勃公司)、PTC-100PCR 仪(美国 MJ RESEARCH 公司)、反转录扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制 (1)Dio 溶液配制:将 Dio 干粉加入无水乙醇,充分溶解混匀制成原液。按比例加入 RPMI-1640 培养基及用 RPMI-1640 培养基配置的 15%乙醇进行稀释,制成(终浓度分别为:0.937 5、1.875 0、3.750 0、7.500 0、15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)工作液,工作液中乙醇浓度为 0.5%。(2)ConA 溶液配制:称取 3 mg ConA 干粉,加入 RPMI-1640 培养基 10 mL,充分溶解混匀,制成工作液,终浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(3)完全培养液配制:按比例在 RPMI-1640 培养基中加入 10%的胎牛血清、1%的青霉素溶液,混合均匀,制成完全培养液。

表 1 Dio 对各组 T 淋巴细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	指标	对照组	ConA 组	阳性对照组	0.937 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组
24 h	A 值	0.626 \pm 0.730	1.405 \pm 1.320	0.875 \pm 0.060	1.237 \pm 0.170
	抑制率(%)	—	124.40 \pm 2.45	96.40 \pm 0.02	50.00 \pm 0.32 ^{ab}
48 h	A 值	0.646 \pm 0.250	1.503 \pm 0.130	0.816 \pm 0.090	1.448 \pm 0.750
	抑制率(%)	—	132.70 \pm 0.08	96.90 \pm 0.04	23.10 \pm 0.89 ^{ab}
72 h	A 值	0.630 \pm 0.370	1.567 \pm 2.150	0.722 \pm 0.110	1.425 \pm 1.480
	抑制率(%)	—	148.80 \pm 3.23	96.90 \pm 0.06	21.90 \pm 3.08 ^{ab}

续表 1 Dio 对各组 T 淋巴细胞增殖抑制率比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

观察指标	1.875 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3.750 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	
24 h	A 值	1.208 \pm 1.230	1.084 \pm 1.050	0.972 \pm 0.620	1.056 \pm 0.020
	抑制率%	53.60 \pm 1.45 ^{ab}	69.60 \pm 3.08 ^{abc}	83.90 \pm 0.84 ^{ab}	73.20 \pm 0.02 ^{abc}
48 h	A 值	1.316 \pm 0.120	1.106 \pm 0.890	0.828 \pm 0.020	1.067 \pm 0.090
	抑制率%	38.50 \pm 0.05 ^{ab}	63.00 \pm 1.09 ^{abc}	95.40 \pm 0.04 ^{ab}	67.70 \pm 0.09 ^{abc}
72 h	A 值	1.249 \pm 0.150	1.088 \pm 1.270	0.708 \pm 0.030	0.898 \pm 0.120
	抑制率%	40.60 \pm 0.09 ^{ab}	57.80 \pm 2.89 ^{abc}	98.40 \pm 0.01 ^{ab}	78.10 \pm 0.06 ^{abc}

^a: $P < 0.01$, 与 ConA 组比较; ^b: $P < 0.01$, 与阳性对照组比较; ^c: $P < 0.01$, 与 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较

表 2 Dio 对 IFN- γ mRNA、IL-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	对照组	ConA 组	阳性对照组	3.750 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组
IFN- γ mRNA	0.37 \pm 0.02	0.64 \pm 0.05 ^a	0.10 \pm 0.01 ^b	0.24 \pm 0.03 ^{bc}	0.07 \pm 0.04 ^b	0.63 \pm 0.03 ^{bc}
IL-2 mRNA	0.13 \pm 0.01	0.21 \pm 0.03 ^a	0.15 \pm 0.04 ^b	0.17 \pm 0.05 ^{bc}	0.14 \pm 0.01 ^b	0.19 \pm 0.02 ^{bc}

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, 与 ConA 组比较; ^c: $P < 0.01$, 与 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组比较

1.2.2 T 淋巴细胞制备 断颈处死小鼠, 无菌取脾, 制备脾淋巴细胞混悬液, 用尼龙毛柱对其进行分离, 收取 T 淋巴细胞, 台盼蓝染色判断细胞存活率(要求存活率均在 97% 以上)。调整 T 淋巴细胞密度为 2×10^6 个/mL^[11]。

1.2.3 CCK-8 检测 Dio 对 T 淋巴细胞增殖的影响^[11-12] 实验设对照组: T 细胞悬液 + 完全培养液, ConA 组: T 细胞悬液 + ConA 溶液 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 完全培养液, 阳性对照组: T 细胞悬液 + ConA 溶液 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + HC 溶液 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 完全培养液, 药物组: T 细胞悬液 + ConA 溶液 (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Dio 溶液 (0.937 5、1.875 0、3.750 0、7.500 0、15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 完全培养液, 每组 6 个复孔, 将铺好的 96 孔培养板放置于培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2) 中培养, 总时间分别为 24、48、72 h, 待培养至 20、44、68 h 时取出, 加入 CCK-8 试剂, 充分混匀后置培养箱中继续培养 4 h。用酶联仪测定各组吸光度值 (OD 值): 450 nm 处, 计算 Dio 对 T 淋巴细胞增殖的抑制率 (PI): $\text{PI} = [1 - (A_{\text{ConA} + \text{Dio}} - A_{\text{对照组}}) / (A_{\text{ConA}} - A_{\text{对照组}})] \times 100\%$ 。

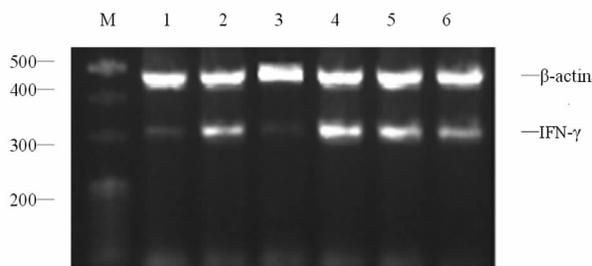
1.2.4 反转录 PCR 法检测 Dio 对 IL-2、IFN- γ mRNA 表达的影响 实验设对照组、ConA 组、阳性对照组、药物组 (Dio 溶液浓度 3.750 0、7.500 0、15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每组 6 个复孔, 将铺好的培养板置于培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2) 中, 48 h 后离心收集 T 淋巴细胞, 洗涤后以 TRizol 提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 用反转录 PCR 试剂盒检测各组 T 淋巴细胞 IL-2、IFN- γ mRNA

的表达情况^[13-14]。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Dio 对 T 淋巴细胞增殖的影响 Dio 浓度在 0.937 5 ~ 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 对 T 淋巴细胞增殖有抑制作用, 随药物浓度递增抑制作用增强, 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最佳抑制浓度, 超过最佳抑制浓度后抑制作用逐渐减弱, 见表 1。

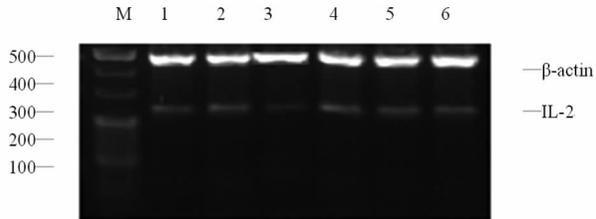


M: Mark; 1: 对照组; 2: ConA 组; 3: 阳性对照组; 4: 15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; 5: 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; 6: 3.750 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组

图 1 各组 IFN- γ mRNA 的表达

2.2 Dio 对 IL-2、IFN- γ mRNA 的影响 Dio 浓度在 3.750 0 ~ 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 T 淋巴细胞 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达具有抑制作用, 随药物浓度增加抑制作用增强, Dio

7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制作用最明显,为最佳抑制浓度。超过最佳抑制浓度后,对 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达抑制作用逐渐减弱,见表 2,图 1、2。



M: Mark; 1: 对照组; 2: ConA 组; 3: 阳性对照组; 4: 15.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; 5: 7.500 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; 6: 3.750 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组

图 2 各组 IL-2 mRNA 的表达

3 讨论

T 淋巴细胞可介导细胞免疫应答,对机体免疫应答的调节起着至关重要的作用,其活化和增殖是执行免疫功能的基础,但过度活化增殖有可能导致自身免疫性疾病和器官移植排斥反应的发生,以 T 淋巴细胞为靶向的免疫干预能有效地控制对机体有害的免疫应答^[15]。因此,能抑制 T 淋巴细胞活化增殖的药物在控制对机体有害的免疫应答方面具有积极的作用。本研究先用 ConA 作为刺激剂,使 T 淋巴细胞在体外显著增殖,再用 Dio 进行干预,结果显示 Dio 各浓度组对 T 淋巴细胞增殖均有抑制作用,且抑制作用随浓度增加而增强,并具有一定的量效关系。

IL-2 是引起 T 淋巴细胞增殖的主要细胞因子,可通过提高 T 淋巴细胞的数量和功能达到增强机体免疫功能的效果,在机体复杂的免疫网络中起调节作用^[15]。IFN- γ 即 II 型干扰素,具有促进 T 淋巴细胞的分化、激活单核巨噬细胞、诱导和增加组织相容性复合体(MHC)分子的表达等功能,可以介导并且调节机体的特异性免疫^[15]。IL-2、IFN- γ mRNA 的表达水平与 IL-2、IFN- γ 水平呈正相关,因此可间接反映 T 淋巴细胞增殖的情况。在本研究中,T 淋巴细胞经 ConA 刺激、Dio 干预后,各浓度组 T 淋巴细胞 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达与 ConA 组相比较均有明显下降,且抑制作用随药物浓度增加而增强。经 Dio 干预后 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达情况与 T 淋巴细胞增殖实验中的结果相符,从而进一步印证了 Dio 对 T 淋巴细胞增殖影响的结果。

综上所述,Dio 对 T 淋巴细胞的增殖及对 IL-2、IFN- γ mRNA 的表达均有抑制作用。研究 Dio 在体外对正常 T 淋巴细胞的增殖、活化的影响,以及其对 IL-2、IFN- γ mRNA 表达的影响,可反映出 Dio 发挥免疫调节功能的过程及机制,其结果为揭示 Dio 的免疫调节机制奠定基础,并为进一步开发其作为免疫调节剂应用于自身免疫性疾病的治疗提供实验依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:

中国医药科技出版社,2010:250.

- [2] 庞晓东,庞发忠,林耀庚,等. 穿地龙的成分、药理及临床应用[J]. 山西中医,2002,18(5):50-51.
- [3] 赵景婵,郭治安,成小飞,等. 穿山龙薯蓣中薯蓣皂苷元的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志,2000,20(1):27.
- [4] 张数鑫,周录英,于元杰. 穿山龙薯蓣研究进展[J]. 分子植物育种,2005,3(1):107-111.
- [5] 宋宇,梁长青,何忠梅,等. 薯蓣皂苷元体外抗肿瘤作用的研究[J]. 中国肿瘤,2004,13(10):651-653.
- [6] MOALIC S, LIAGRE B, CORBIÈRE C, et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells[J]. FEBS Lett, 2001, 506(3):225-230.
- [7] 高志捷,陈信义,刘江涛,等. 薯蓣皂苷元体外抑制白血病细胞增殖研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2003,9(8):17-19.
- [8] 江洋珍,王俊俊,梁继超,等. 薯蓣皂苷元对大鼠成骨细胞增殖、分化及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2010,25(1):134-136.
- [9] 雷励. 穿山龙注射液穴位注射治疗重症支气管哮喘临床观察[J]. 中国中医急症,2005,14(5):419-419,424.
- [10] HAFEZ N A, BENGHUZZI H, TUCCI M. Histomorphometric evaluation of renal glomeruli exposed to sustained delivery of estrogen using adult ovariectomized rats[J]. Biomed Sci Instrum, 2003, 39(1):487-492.
- [11] 郝树彬,温红玲,尹玉霞,等. BALB/c 鼠脾脏 T 淋巴细胞体外转化试验条件的优化研究[J]. 中国医疗器械信息, 2011, 17(8):31-34.
- [12] 侯春梅,李新颖,叶伟亮,等. MTT 法和 CCK-8 法检测悬浮细胞增殖的比较[J]. 军事医学科学院院刊, 2009, 33(4):400.
- [13] 林仁勇,丁剑冰,温浩,等. 半定量反转录 PCR 检测细胞因子表达的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(5):427-429.
- [14] 唐微,景冬梅,董兰,等. 小鼠 IL-2 基因的反转录 PCR 克隆[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(14):3367-3369.
- [15] 陈慰峰. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:27-33.

(收稿日期:2017-07-06 修回日期:2017-09-12)