

文章编号:1001-6880(2015)1-0153-05

# 黄芪多糖对免疫抑制模型小鼠 Treg 细胞及 Th17 细胞亚群的影响

王雪梅<sup>1</sup>, 贾天玉<sup>2</sup>, 管彬<sup>2</sup>, 冯燕海<sup>2</sup>, 锤艳萍<sup>2</sup>, 曹明强<sup>2</sup>, 于红娟<sup>2</sup>, 马兴铭<sup>2,3\*</sup><sup>1</sup> 兰州大学口腔医学院; <sup>2</sup> 兰州大学基础医学院; <sup>3</sup> 甘肃省循证医学与临床转化重点实验室, 兰州 730000

**摘要:**本研究旨在探讨黄芪多糖对免疫抑制模型小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg 细胞)和 CD4<sup>+</sup>Th17 细胞亚群功能的影响。通过小鼠腹腔注射环磷酰胺建立免疫抑制动物模型, 应用黄芪多糖对免疫抑制小鼠进行治疗, 采用流式细胞仪分析脾脏中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的比例, ELISA 检测血清 IL-17 的水平。结果表明:与模型对照组比较, 黄芪多糖高、中剂量明显降低小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞数的比例( $P < 0.05$ ), 同时黄芪多糖上调小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞数的比例( $P < 0.05$ ), 降低免疫抑制小鼠血清 IL-17 的水平, 尤其 1.0 g/(kg·d) 剂量组的 IL-17 水平下降较为明显( $P < 0.01$ )。提示黄芪多糖具有提高免疫抑制小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞数的比例、降低 CD4<sup>+</sup>T 细胞的数量及抑制 IL-17 分泌活性的作用。

**关键词:**黄芪多糖;免疫抑制;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞;IL-17

中图分类号:R392

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.031

## Effects of Astragalus Polysaccharide on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg Cells and Th17 Cells in Immunesuppressed Mice

WANG Xue-mei<sup>1</sup>, JIA Tian-yu<sup>2</sup>, GUAN Bing<sup>2</sup>, FENG Yan-hai<sup>2</sup>,LUO Yan-ping<sup>2</sup>, CAO Ming-qiang<sup>2</sup>, YU Hong-juan<sup>2</sup>, MA Xin-ming<sup>2,3\*</sup><sup>1</sup> Lanzhou University School of Stomatology; <sup>2</sup> Basic Medical College of Lanzhou University;<sup>3</sup> Gansu Province Key Laboratory Medicine and Clinical Evidence Based Transformation, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** *Astragalus membranaceus* is a well-known traditional Chinese herbal medicine that has been used as a tonic herb in various immuno-deficient diseases. In order to investigate the effects of astragalus polysaccharides (APS) on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg) and CD4<sup>+</sup> Th17 cells in immunesuppressed mice, the immunesuppressed mouse models were established by intraperitoneal injection with cyclophosphamide. After the treatments with APS, the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells or CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells in spleen were analyzed by flow cytometry and the serum interleukin-17 (IL-17) factor was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Compared with the model control mice, the proportion of CD4<sup>+</sup> T cells obviously decreased and the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells significantly increased in mice of APS high-dose group and APS middle-dose group ( $P < 0.05$ ), and the level of serum IL-17 significantly reduced in mice of APS high-dose [1.0 g/(kg·d)] group ( $P < 0.01$ ). The results showed that APS can up-regulate the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells and inhibit the cytokine secretion of IL-17 in immunesuppressed mice.

**Key words:** Astragalus polysaccharides; immune suppression; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cell; IL-17

多糖是指由 10 个以上单糖分子链接成的碳水化合物, 天然活性多糖是一种良好的免疫增强剂, 能够显著提高机体的特异性或非特异性免疫<sup>[1]</sup>。黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)作为中药黄芪中重要的天然有效活性成分, 具有抗炎、抗肿瘤、

抗应激、抗氧化、增强免疫功能等的免疫调节效应<sup>[2-4]</sup>。近年发现一种主要分泌 IL-17 的特殊 CD4<sup>+</sup>Th 细胞亚群, 即 Th17 细胞亚群, 降低或阻断 Th17 细胞的活性可缓解炎症反应的发生和发展<sup>[5]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(Treg)是一类发挥免疫抑制功能的 T 细胞, 能够有效抑制和调节机体效应淋巴细胞的增殖、活化<sup>[5]</sup>。我们的前期实验研究发现黄芪多糖药物能够促进口腔粘膜上皮的再生与增殖, 减小口腔溃疡面积、减少黏膜组织的淋巴细胞浸

收稿日期:2014-08-04

接受日期:2014-11-19

基金项目:兰州大学“国家级大学生创新创业训练计划”项目  
(201310730157); 兰州大学口腔医学扶持基金项目  
(533000-432378)

\* 通讯作者 Tel:86-931-8289562; E-mail:mingxm@163.com

润,具有缓解口腔黏膜的炎症反应的活性<sup>[3]</sup>,降低哮喘模型大鼠支气管中的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞以及巨噬细胞数量,减轻支气管及肺泡的炎症反应<sup>[4]</sup>,缓解炎症反应的机制尚不清楚。因此,本实验建立免疫抑制小鼠模型,用流式细胞仪分析小鼠脾脏中 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的比例,ELISA 检测小鼠血清 IL-17 的含量,首次研究黄芪多糖对免疫抑制模型 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞亚群及 Th17 细胞活化的影响,进一步揭示黄芪多糖缓解炎症反应的免疫调节机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

清洁级昆明种雌性小鼠 50 只,体重(20±2)g,由兰州大学实验动物中心提供(合格证号:医动字第 14-005 号),饲养环境温度 22±1℃,自由进食、饮水。黄芪多糖购陕西创升生物科技有限公司(多糖含量 40%)。抗鼠 CD4-FITC(eBioscience)、抗鼠 CD25-APC(eBioscience)、IL-17 ELISA 试剂盒、淋巴细胞分离液购自达科为生物工程有限公司。RPMI-1640 培养基为 Gibco 产品。环磷酰胺注射液由山西普德药业股份有限公司(批号:04130901)。

### 1.2 动物模型的建立与给药

小鼠随机分为模型对照组、黄芪多糖高、中、低剂量组和空白对照组,每组 10 只。模型对照组和黄芪多糖药物组小鼠于第 1 d、第 2 d、第 3 d、第 10 d 腹腔注射环磷酰胺 80 mg/(kg·d),建立免疫抑制模型<sup>[6]</sup>。模型对照组于建模第 4 d 灌服生理盐水 0.2 mL/20 g·d;黄芪多糖药物组于建模第 4 d 灌服不同剂量黄芪多糖,药物剂量分别为 1.0 g/(kg·d)(高剂量组)、0.5 g/(kg·d)(中剂量组)、0.25 g/(kg·d)(低剂量组);空白对照组在相同时间点分别注射和灌服等体积生理盐水,连续给药 10 d。次日眼球后采血,分离血清并经 56℃ 30 min 灭活,-20℃ 保存备用。分离胸腺和脾脏并称量湿重,分别计算胸腺或脾脏指数,同时制备脾淋巴细胞悬液。

### 1.3 淋巴细胞悬液制备与流式细胞仪检测

无菌取脾,剪碎研磨,加入适量不完全 1640 培养液,过 200 目尼龙网,制备脾细胞悬液,用淋巴细胞分离液(2000 rpm 离心 40 min)密度梯度离心法,分离脾脏淋巴细胞,PBS 缓冲液洗涤细胞一次,调整淋巴细胞悬液浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL。取淋巴细胞

悬液 100 μL,按照试剂盒说明分别加入荧光素标记的 FITC-CD4 与 APC-CD25 单克隆抗体,避光 4℃ 孵育 30 min,加入预冷 PBS 1 mL 重悬细胞,2400 rpm 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀重悬于 500 μL 缓冲液,经 400 目尼龙网过滤细胞后上机,BD LSRFortessa 型流式细胞仪(美国 BD 公司)检测并分析小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞/淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞/淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞/CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比。

### 1.4 血清 IL-17 含量检测

酶联免疫吸附法(ELISA)测定各组小鼠血清 IL-17 含量,操作按说明书进行。

### 1.5 统计学方法

实验数据用 SPSS17.0 软件的 One-Way 方差分析(ANOVA),以平均值±标准差即±SD 表示,最小显著差(LSD)进行统计处理。

## 2 实验结果

### 2.1 黄芪多糖对小鼠免疫器官质量的影响

各组小鼠的胸腺指数和脾脏指数变化无统计学差异,表明 0.25~1.0 mg/(kg·d) 剂量范围的黄芪多糖对免疫抑制小鼠的胸腺和脾脏质量无明显影响。

### 2.2 黄芪多糖对小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞亚群比例的影响

流式细胞分析仪检测免疫抑制模型小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞/淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞/淋巴细胞及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞/CD4<sup>+</sup>T 细胞的百分比的结果见图 1~3。与空白对照组比较,免疫抑制各组小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞数占淋巴细胞数的比例均显著降低( $P < 0.05$ );与模型对照组比较,黄芪多糖高、中剂量组小鼠 CD4<sup>+</sup>T 细胞数的比例明显降低,具有显著性差异( $P < 0.05$ )(图 1 左)。模型对照组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞占淋巴细胞数的比例升高,与空白对照组比较无统计学意义( $P > 0.05$ ),但经黄芪多糖药物作用后,高、中剂量组小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞数的比例降低( $P < 0.05$ )(图 1 右)。模型对照组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup>T 细胞数的比例显著升高,与空白对照组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ),经黄芪多糖药物作用后,小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的比例均升高,尤其以高、中剂量组升高最明显(图 2、图 3)。表明黄芪多糖未显示出拮抗环磷酰胺诱导的 Treg 细胞上升,而与环磷酰胺

协同上调小鼠脾脏  $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞数/ $CD4^+ T$  细胞数的比例, 降低  $CD4^+ T$  细胞的比例, 提示黄

芪多糖具有提高小鼠脾脏 Treg 细胞数而下调免疫功能的活性。

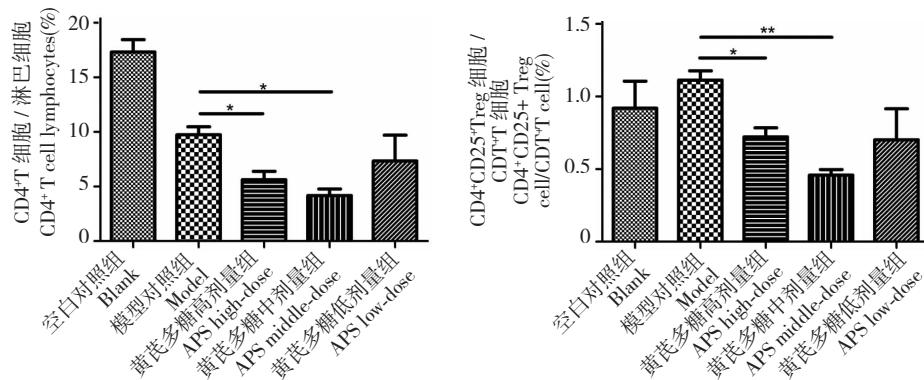


图 1  $CD4^+ T$  细胞、 $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞占淋巴细胞的比例 ( $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ )

Fig. 1 The proportion of  $CD4^+ T$  cells or  $CD4^+ CD25^+$  Treg cells among lymphocytes ( $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ )

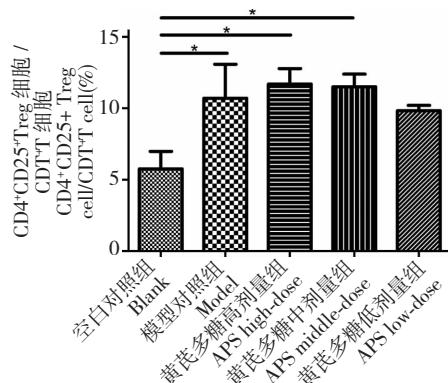


图 2  $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞占  $CD4^+ T$  细胞的比例 ( $* P < 0.05$ )

Fig. 2 The proportion of  $CD4^+ CD25^+$  Treg cells among  $CD4^+ T$  cells ( $* P < 0.05$ )

### 2.3 黄芪多糖对小鼠血清 IL-17 水平的影响

黄芪多糖对免疫抑制模型小鼠血清 IL-17 水平的影响见图 4。模型对照组小鼠血清 IL-17 的含量明显升高, 与空白对照组比较有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 经过黄芪多糖药物作用后, 黄芪多糖各剂量组小鼠血清 IL-17 的含量均降低, 尤其高、中剂量组小鼠血清 IL-17 的含量降低显著 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ) (图 4)。表明黄芪多糖能够拮抗环磷酰胺促小鼠分泌 IL-17 的作用, 对小鼠的 Th17 细胞的功能具有下调作用, 抑制其分泌 IL-17。

## 3 讨论

$CD4^+ T$  细胞在适应性免疫应答、炎症反应中发挥重要作用, 根据其生物学功能和产生细胞因子的

不同, 主要包括 Th1 细胞亚群、Th2 细胞亚群、Th17 细胞亚群和  $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞亚群<sup>[5,7,8]</sup>。既往认为 Th1/Th2 细胞亚群功能失调, 会引起严重的炎症反应并诱导产生多种自身免疫病。自从 2005 年 Th17 细胞作为一个新的  $CD4^+ T$  细胞亚群被确认之后, 发现 Th17 细胞介导炎性反应、参与多种自身免疫病、移植排斥等的发生和发展, Th17 细胞主要的效应分子是其分泌 IL-17, IL-17 能有效地介导中性粒细胞动员、募集活化过程, 促进炎症反应, 通过抑制  $CD4^+ Th17$  细胞活化或拮抗 IL-17, 可有效缓解炎症反应的发生和发展<sup>[5,9]</sup>。 $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞是一类在维持免疫耐受和免疫应答的负调节中发挥作用, 能够抑制和调节机体  $CD4^+$  效应 Th 细胞的增殖、活化<sup>[5,8]</sup>, 已有多项研究将 Treg 细胞用于自身免疫性病、超敏反应性疾病的治疗, 并取得了良好的结果, 通过上调体内 Treg 细胞的数量, 从而抑制机体 T 细胞活化, 可有效缓解炎症损伤<sup>[10]</sup>。本实验研究发现黄芪多糖具有提高脾脏 Treg 细胞数, 抑制  $CD4^+ Th17$  细胞活化, 降低血清 IL-17 的水平, 是其有效缓解炎症损伤的机制之一。

黄芪是一味药用历史悠久、临床应用广泛的传统补益类中药。黄芪多糖是从中药黄芪中分离提纯的主要天然有效活性成分, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、抗应激、抗氧化等多种活性<sup>[11]</sup>。黄芪多糖作为一种免疫调节剂, 能明显升高大鼠淋巴细胞活性, 促进 IL-1、IL-2、TNF- $\alpha$  等细胞因子的分泌及抗体的产生, 从而发挥显著增强免疫作用<sup>[11]</sup>。另一方面, 研究发现黄芪多糖药物能够促进口腔黏膜

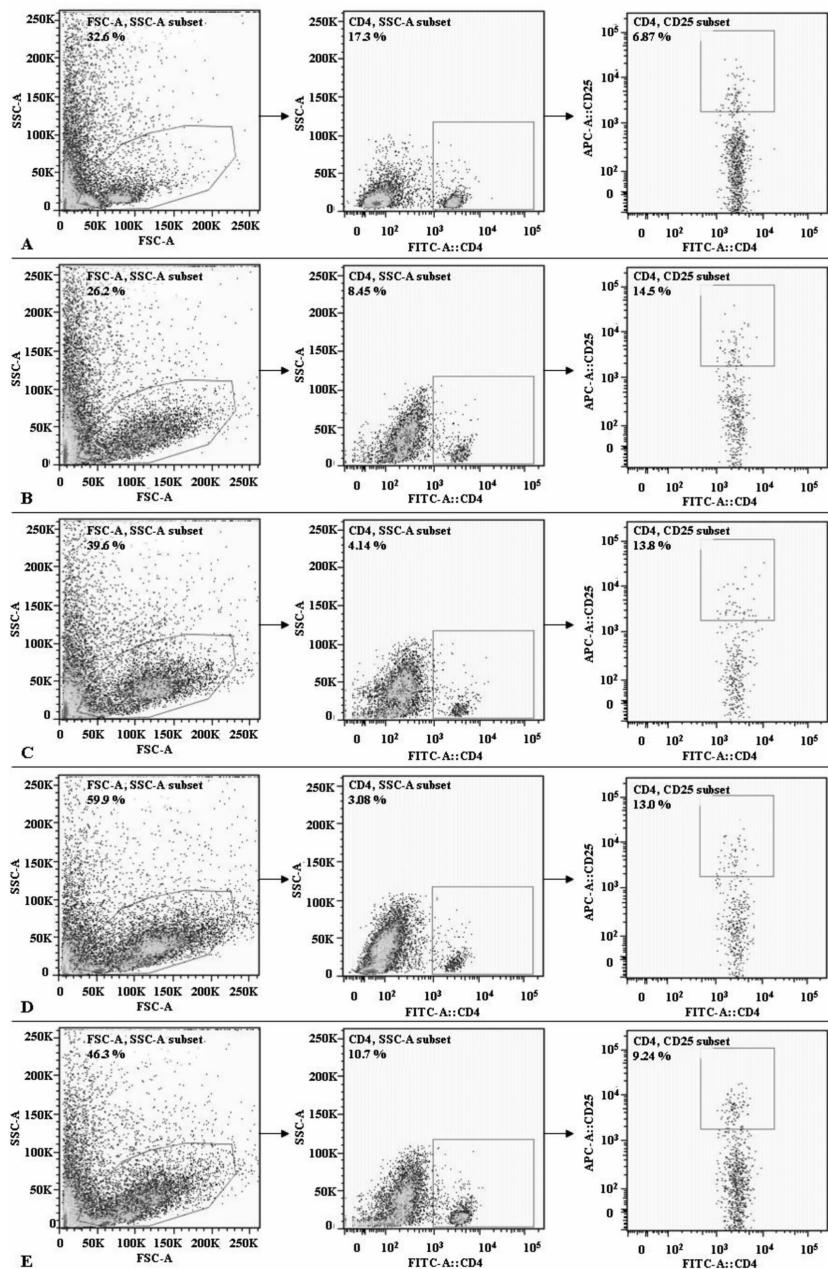


图3 流式细胞仪检测小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞百分比

Fig. 3 Flow cytometric examination of CD4<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells proportion

注:A:空白对照组,B:模型对照组,C:黄芪多糖高剂量组,D:黄芪多糖中剂量组,E:黄芪多糖低剂量组

Note: A: Blank control, B: Model control, C: APS high-dose group, D: APS middle-dose group, E: APS low-dose group

上皮细胞增殖,减少黏膜组织的淋巴细胞浸润,缓解口腔黏膜的炎症损伤,促进溃疡愈合<sup>[3]</sup>;黄芪多糖具有降低哮喘模型大鼠支气管中的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞以及巨噬细胞数量,减轻支气管及肺泡的炎症,可用于治疗哮喘<sup>[4]</sup>;黄芪多糖能够降低1型糖尿病模型小鼠胰岛组织中炎症细胞的浸润,使其炎性细胞因子 IL-1、IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$  和 INF- $\gamma$  的表达水

平明显下调,用于预防1型糖尿病的发生<sup>[12]</sup>。表明黄芪多糖具有双向的调节作用,对口腔溃疡、哮喘、糖尿病等炎症损伤具有缓解作用,减少炎症组织的淋巴细胞浸润。本实验利用免疫抑制剂环磷酰胺建立免疫抑制模型小鼠,用黄芪多糖连续灌胃干预10天后,黄芪多糖未显示出拮抗环磷酰胺诱导的Treg细胞上升<sup>[13]</sup>,而与环磷酰胺发挥协同效应,明显上

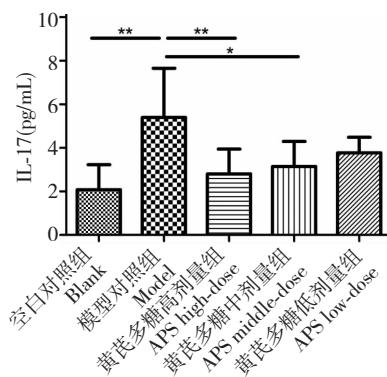


图 4 小鼠血清 IL-17 含量 ( $* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ )

Fig. 4 The serum IL-17 levels in immunesuppressed mice  
( $* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ )

调小鼠脾脏  $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞数/ $CD4^+$  T 细胞数的比例,尤其以高、中剂量组升高最明显。 $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞比例的升高,有效抑制机体效应淋巴细胞的增殖、活化,导致  $CD4^+$  T 细胞的比例的降低,抑制小鼠的 Th17 细胞的活化,对抗环磷酰胺促进小鼠分泌 IL-17 的作用,从而抑制 Th17 细胞分泌 IL-17。因此,黄芪多糖具有提高脾脏 Treg 细胞数、抑制 Th17 细胞活化的作用,可作为一种潜在的用于治疗和预防炎症损伤性疾病的中药调节剂,但其上调节  $CD4^+ CD25^+$  Treg 细胞数和抑制 Th17 细胞活化的分子机制仍需进一步研究。

## 参考文献

- He WJ (何文涓), Yuan ZJ (袁志坚), He XS (何晓升). Research progress on pharmacological effects of Astragalus polysaccharide. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2012, 33:692-694.
- Dou H (窦辉), Fu TJ (付铁军), Zhang F (张帆), et al. Chemical constituents of Huangqi injection. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2002, 14:14-17.
- Wang XM (王雪梅), Bo L (薄磊), Qi J (祁晶), et al. Therapeutic effects of astragalus polysaccharides on oral ulcers in rats. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:321-324.
- Li CD (李承德), Zhou WB (周文宾), Sun Y (孙艳), et al. Effects of astragalus polysaccharide on Th17/Treg associated cytokines and airway inflammation in OVA-induced asthmatic rats. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2013, 29: 1275-1279.
- Xin CH, Joost J. Oppenheim. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J Leukocyte Biol*, 2014, 95:723-731.
- Tian WH (田卫花), Ma XM (马兴铭), Liu Y (刘英), et al. Effects of aqueous extracts from *Sophora moorcroftiana* on cellular immunological functions in the immunosuppressive mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2009, 21: 472-479.
- He Y (何英), Zheng CQ (郑长青), Lin Y (林艳), et al. Research on Th17 cell and its biological effect. *Prog Mod Biomed* (现代生物医学进展), 2009, 9:1769-1772.
- Ma XM (马兴铭), Ding JB (丁剑冰). *Medical Immunology* (医学免疫学). Beijing: Tsinghua University Press, 2013. 127-128.
- Hu JH (胡锦辉), Bi SL (毕胜利), Lv Y (吕元). The Th17 cell is gradually gaining in-depth study. *Chin J Immu* (中国免疫学杂志), 2012, 28:372-378.
- Cheng JY (程佳音), Lv XX (吕小迅). Research progress in regulatory T cells. *Acad J Guangdong Pharm Coll* (广东药学院学报), 2012, 28:102-107.
- Li R, Chen W, Wang W, et al. Extraction, characterization of *Astragalus* polysaccharide and its immune modulating activities in rats with gastric cancer. *Carbohydr Polym*, 2009, 78: 738-742.
- Chen W (陈蔚), Li YM (李益明), Yu MH (俞茂华), et al. Immunoregulation effects of *Astragalus* polysaccharides on T helper lymphocyte subgroups in nonobese diabetic mice. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 2007, 17:28-32.
- Yuan XJ (苑晓娟), Fan WP (樊卫平), Zhang K (张凯), et al. Regulatory effect of low dose cyclophosphamide on  $CD4^+ CD25^+$  Treg cells in mice. *Imm J* (免疫学杂志), 2011, 27:292-296.