

芒果苷对慢性支气管炎大鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞的影响卫智权¹, 阎莉^{1*}, 邓家刚^{1*}, 邓静²¹广西中药药效研究重点实验室 广西中医药大学, 南宁 530001;²哈佛大学医学院 Dana-Farber 癌症研究所, 马萨诸塞州 02115

摘要:本研究旨在探讨芒果苷对香烟烟熏诱导慢性支气管炎大鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞比例及其产生淋巴因子白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 4(IL-4) 的影响。大鼠随机分为正常组、模型组与芒果苷 200、100 mg/(kg·d) 组, 香烟烟熏 6 周建立慢性支气管炎大鼠模型, 随后灌胃给药 4 周。以流式细胞术检测 CD4⁺ T 淋巴细胞比例; 流式分选获得 CD4⁺ T 淋巴细胞, 酶联免疫吸附法(ELISA)测定其 IL-2、IL-4 水平, 实时荧光 RT-PCR 检测其 IL-2、IL-4 基因表达; HE 染色检测支气管炎病理形态。实验结果显示, 与模型组比较, 芒果苷组 CD4⁺ T 淋巴细胞比例明显降低, IL-2、IL-4 基因与蛋白表达水平显著下调, 慢性支气管炎显著减轻。该结果提示, 芒果苷可下调 CD4⁺ T 淋巴细胞比例并减少淋巴因子 IL-2、IL-4 的产生, 此作用可能与其减轻慢性支气管炎有关。

关键词: 芒果苷; 慢性支气管炎; CD4⁺ T 淋巴细胞; 白细胞介素 2; 白细胞介素 4

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.008

Effect of Mangiferin on CD4⁺ T Lymphocytes in Rats with Chronic BronchitisWEI Zhi-quan¹, YAN Li^{1*}, DENG Jia-gang^{1*}, DENG Jin²¹Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;²Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

Abstract: This study was designed to investigate the effect of mangiferin on CD4⁺ T lymphocyte percentage and its producing interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4) lymphokine in rats with cigarette smoke-induced chronic bronchitis. The rat model with chronic bronchitis was established by daily exposure to cigarette smoke for 6 weeks. The rats were randomly divided into normal control, model control and mangiferin group [200, 100 mg/(kg·d), gavage administration within following 4 weeks]. The percentage of CD4⁺ T lymphocyte was analyzed by flow cytometry assay. CD4⁺ T lymphocytes were sorted with flow sorter and followed by a measurement for IL-2 and IL-4 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was executed to evaluate the gene expression of IL-2 and IL-4 in CD4⁺ T lymphocyte. The histopathological images were obtained by lung tissue HE staining microscopy, and then proceed the observation to pathology morphological characteristics of bronchial inflammation. The results showed that the percentage of CD4⁺ T lymphocyte was markedly lowered in mangiferin-treated group compared with the model group. Both of the gene and the protein expressions of IL-2, IL-4 was down regulated in CD4⁺ T lymphocyte. Following the previous changes, the alleviated chronic bronchial inflammation was noticed. These results suggested that mangiferin can notably down-regulate the percentage of CD4⁺ T lymphocyte and then decrease the productions of IL-2 and IL-4, and this regulation might be linked to an amelioration of chronic bronchiolar inflammation by mangiferin.

Key words: Mangiferin; chronic bronchitis; CD4⁺ T lymphocyte; Interleukin-2; Interleukin-4

芒果叶为漆树科植物芒果 *Mangifera indica* L. 的叶, 芒果苷 (mangiferin) 是芒果叶中的主要活性成

分, 是一种天然多酚类化合物, 分子式 C₁₉H₁₈O₁₁, 分子量 422, 化学结构见图 1。

芒果叶在广西民间用于治疗咳嗽、咳痰已有多年历史, 成药芒果苷片对于支气管炎的咳嗽、咳痰、喘息、发热等症状具有显著疗效且安全性良好^[1]。芒果苷对多种急慢性炎症具有较好抗炎作用, 其作用机制与其明显抑制单核-巨噬细胞的活化密切相关

收稿日期: 2014-10-10 接受日期: 2015-01-06

基金项目: 国家自然科学基金 (81260666); 广西自然科学基金 (2012GXNSFAA053093); 广西中药药效研究重点实验室建设 (10-046-04)

* 通讯作者 Tel: 86-771-3134025; E-mail: mimaotoo@163.com; dengjg@tom.com

关^[2,3]。CD4⁺ T 淋巴细胞对于慢性支气管炎的病理进程具有重要影响,活化的 CD4⁺ T 淋巴细胞产生 IL-2、IL-4 等淋巴因子并进而活化 B 细胞、NK 细胞、单核-巨噬细胞等重要的炎症细胞,是参与支气管及其周围组织慢性炎症的主要的炎症细胞之一。迄今尚无芒果苷影响慢性支气管炎中的 CD4⁺ T 淋巴细胞的研究报道。香烟烟熏能够建立类似于人慢性支气管炎的动物模型,本研究拟以香烟烟熏诱导慢性支气管炎大鼠为研究对象,观察芒果苷对慢性支气管炎大鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞的影响。

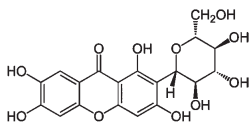


图1 芒果苷的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of mangiferin

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,6 周龄,体重 160 ~ 180 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[实验动物生产许可证号 SCXK(湘)2011-0003]。

1.2 药品及试剂

芒果苷由广西中医药大学中药药效研究重点实验室惠赠,经高效液相色谱法检测纯度为 97.5%,色谱图见图 2。香烟(广西卷烟总厂,焦油含量 12 mg/支)。IL-2 与 IL-4 ELISA Kit(武汉华美公司)。Anti-rat CD3-PE 抗体、Anti-rat CD4-APC 抗体(美国 Life technologies 公司),10 × RBC Lysis Buffer (Multi-species) 红细胞裂解液(美国 eBioscience 公司),RNeasy Plus Mini Kit(德国 Qiagen 公司),RNAstore 样本保存液、RNAsafe RNase 抑制剂、Quant cDNA 第一链合成试剂盒、Real Master Mix (Probe) 预混试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。

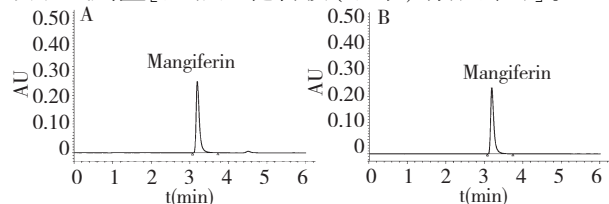


图2 芒果苷标准品(A)与样品(B)的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of mangiferin standard (A) and mangiferin sample (B)

PCR 引物、TaqMan 荧光探针、质粒 DNA 标准品由美国 Invitrogen 公司设计、合成。

1.3 仪器设备

美国 Thermo Fisher Scientific 公司 Multiskan Spectrum1500 酶标仪,德国 Qiagen 公司 QIAcube 核酸纯化仪,美国 ABI 公司 7500 型实时荧光 PCR 仪,德国 Eppendorf 公司 5430R 高速冷冻离心机,美国 Becton Dickinson 公司 LSR Fortessa 多色分析流式细胞仪与 FACS Aria 高速流式细胞分选仪。

2 实验方法

2.1 动物分组、给药与标本采集

大鼠 40 只随机均分为 4 组:正常(Control)组、模型(Model)组及芒果苷高、低剂量(MFH、MFL)组。除正常组外,在 0.25 立方米玻璃仓内每次用 10 支香烟烟熏各组大鼠,每天 2 次,上下午各 1 h,连续 6 周。烟熏 6 周后开始灌胃给药,正常组、模型组给生理盐水,根据参考文献报道的药物剂量设置其余各组大鼠给药剂量^[4]:芒果苷高、低剂量组分别为芒果苷 200、100 mg/(kg · d),给药时间 4 周,每天给药后照常烟熏。

实验第 10 周末,各组大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,下腔静脉穿刺取血,用于分选 CD4⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺ T 淋巴细胞比例检测;取左肺组织用于 HE 染色观察支气管炎病理形态变化。

2.2 外周血 CD4⁺ 淋巴细胞比例检测

取 EDTA-K₂ 抗凝全血 100 μL,加入 Anti-rat CD3-PE 抗体、Anti-rat CD4-APC 抗体各 5 μL,混匀,置 4 °C 避光反应 30 min。加入红细胞裂解液溶解红细胞,反应 10 min 后,1000 rpm 离心 5 min,弃上清,加 PBS 洗涤 2 次去除细胞碎片和未结合的抗体。缓慢加入 1% 多聚甲醛固定液 0.5 mL,4 °C 避光固定 30 min,过 400 目细胞筛,立即上机检测。

2.3 CD4⁺ T 淋巴细胞分选

取适量 EDTA-K₂ 抗凝全血,加入 Anti-rat CD3-PE 抗体、Anti-rat CD4-APC 抗体,混匀,置 4 °C 避光反应 30 min,加入红细胞裂解液溶解红细胞,反应 10 min 后,1000 rpm 离心 5 min 弃上清,加 PBS 洗涤 2 次去除细胞碎片和未结合的抗体,少量 PBS 重悬,立即上机进行细胞分选,以 CD3-PE⁺ 并 CD4-APC⁺ 设门圈选 CD4⁺ T 淋巴细胞。分选所得细胞悬液调整细胞浓度至 5 × 10⁶/mL,置于 -70 °C 保存备用。

2.4 ELISA 检测 CD4⁺ T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 蛋白表达水平

取 CD4⁺ T 淋巴细胞悬液标准样品 2 mL, 4 ℃ 离心 (10000 rpm, 1 min), 吸去上清, 加入 4 ℃ 预冷的细胞裂解匀浆缓冲液 (pH 6.8 的 1.0 mmol/L Tris-HCl 20 mL, 10% SDS 120 mL, β-巯基乙醇 4 mL, 双蒸水 56 mL, 混匀即得), 超声冰浴匀浆破碎细胞, 然后 4 ℃ 离心 (12000 rpm, 15 min), 取上清液作为待测样品。采用 IL-2、IL-4 的 ELISA Kit, 严格按照试剂盒说明书操作, 以 Curve Expert 1.3 曲线拟合软件计算标准曲线的回归方程, 计算样品中 IL-2、IL-4 的含量。

2.5 Real-time RT-PCR 检测 CD4⁺ T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 基因表达水平

取 CD4⁺ T 淋巴细胞悬液标准样品 2 mL, 以

RNeasy Plus Mini Kit 总 RNA 提取试剂盒与 QIAcube 核酸纯化仪提取总 RNA。在 RNA 溶液中加入 1/20 体积的 RNAsafe, 60 ℃ 处理 20 min 以使污染的 RAase 失活, 冷却至室温后置于 -70 ℃ 保存。提取的总 RNA 以 Quant cDNA 第一链合成试剂盒逆转录获得 cDNA, 于 -70 ℃ 保存供下游 PCR 用。

目的基因 IL-2 与 IL-4 引物序列、TaqMan 荧光探针序列列表 1。每个 PCR 反应体系内容如下: 2.5 × Real Master Mix 20 μL, 20 × Probe Enhancer solution 2.5 μL, 上、下游引物各 2 μL, cDNA 或质粒 DNA 标准品 4 μL, TaqMan 荧光探针 2 μL, ddH₂O 加至 50 μL。PCR 反应条件: 95 ℃ 预变性 2 min, 95 ℃ 变性 20 s, 60 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 1 min, 40 个循环。

表 1 引物序列和探针序列

Table 1 Primer and probe sequence used in real-time RT-PCR

Gene 基因	Primer 引物	Probe 探针
IL-2	Forward GCATGCAGCTCGCATCCT	TGTGCACTGACGCTTGCTCCTTG
	Reverse TTGAAGTGGGTGCGCTGTT	
IL-4	Forward CAGGGTGCTTCGCAAATTTTA	TTCCCACGTGATGTACCTCCGTGCTT
	Reverse CCGAGAACCCAGACTTGTTCC	

2.6 HE 染色细支气管炎病理形态观察

各组大鼠左肺组织标本行常规石蜡包埋、切片、脱水, HE 染色, 光镜下观察细支气管炎病理改变。

2.7 统计学处理

所有计量资料均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 SPSS 13.0 统计软件进行多个样本间均数比较。方差齐性数据采用单因素方差分析 LSD 检验,

方差不齐数据采用 Kruskal Wallis 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 芒果苷对外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞比例的影响

与正常组比较, 模型组大鼠外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞比例明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,

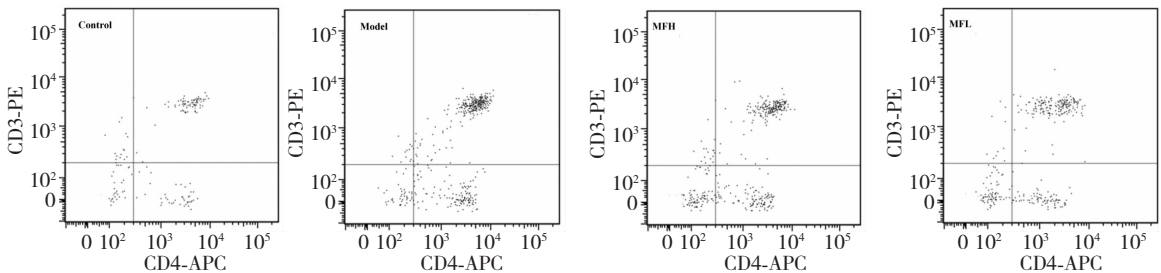


图 3 各组大鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞分析流式散点图

Fig. 3 CD4⁺ T lymphocyte analysis flow cytometry scatter plot of rats in each group

200 mg/(kg·d)、100 mg/(kg·d) 芒果苷均可抑制烟熏引起的 CD4⁺T 淋巴细胞比例升高($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见图 3、图 4。

3.2 芒果苷对 CD4⁺T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 基因与蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠 CD4⁺T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 基因表达水平及蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较,200 mg/(kg·d)、100 mg/(kg·d) 芒果苷可抑制烟熏引起的 CD4⁺T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 的基因与蛋白表达水平上调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见图 5。

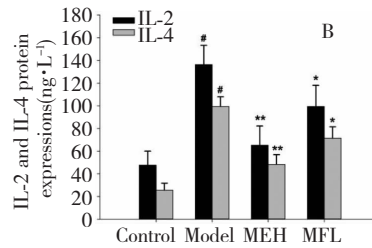
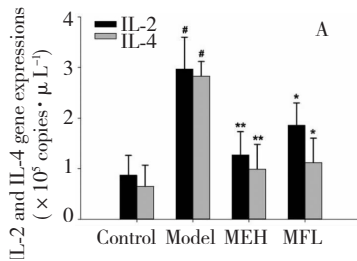


图 5 各组大鼠 CD4⁺T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 基因和蛋白表达水平

Fig. 5 IL-2 and IL-4 expressions of CD4⁺T lymphocyte of rats in each group

3.3 HE 染色支气管炎病理形态观察

正常组细支气管的管壁结构完整,无明显淋巴细胞浸润。模型组细支气管壁可见多量淋巴细胞浸润甚至淋巴滤泡形成,管壁结构有局灶性肿胀、增

厚、断裂。200 mg/(kg·d) 芒果苷组细支气管结构大致完整,少量淋巴细胞浸润。100 mg/(kg·d) 芒果苷组细支气管结构也存在局灶性肿胀、增厚、断裂,中度淋巴细胞浸润。结果见图 6。

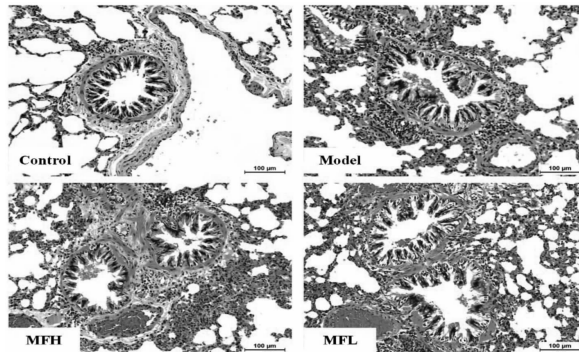


图 6 HE 染色支气管炎病理组织镜检(×400)

Fig. 6 Rat histologic section of chronic bronchitis in each group (HE staining, ×400)

4 讨论

目前制备慢性支气管炎模型的方法有二氧化硫吸入法、香烟烟熏法、脂多糖气管内注入法等,其中二氧化硫吸入法、脂多糖气管内注入法存在较多并

发症,与人类慢性支气管炎在病因学、病理学与病理生理学方面均存在较大差距,且无法直接反映吸烟与慢性支气管炎的关系,故近年已较少用于制备慢性支气管炎动物模型,因而本实验采用了已被广泛应用的香烟烟熏法制备慢性支气管炎动物模型。对

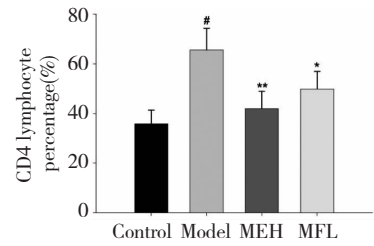


图 4 各组大鼠 CD4⁺T 淋巴细胞比例

Fig. 4 CD4⁺T lymphocyte percentage of rats in each group
注:与正常组比较, # $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,下同。

Note: # $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group, same as below.

照组大鼠在接受 10 周的香烟烟熏之后,其肺组织的 HE 染色病理观察表现出了较为明显的慢性支气管炎的特征性变化:多量淋巴细胞浸润甚至淋巴滤泡形成,管壁结构有局灶性肿胀、增厚、断裂。因而可以认为香烟烟熏制备慢性支气管炎大鼠模型是成功的。

世界卫生组织和世界银行的资料显示,因慢性支气管炎导致的慢性阻塞性肺病的死亡率居所有死因的第 4 位,且有逐年增加的趋势^[5]。慢性支气管炎的基本病理基础是气道炎症,涉及 IL-2、IL-4 等多种炎症细胞因子,其介导的细支气管炎在慢性支气管炎的发病中发挥了重要的作用。IL-2、IL-4 是由活化的 CD4⁺T 淋巴细胞产生的促炎细胞因子,可活化更多的 CD4⁺T 淋巴细胞,促进 B 细胞增殖、分化,增强 NK 细胞杀伤活性,激活单核-巨噬细胞^[6]。此外,IL-2、IL-4 可协同 IL-3 刺激肥大细胞增殖,诱导 IgG、IgE 大量产生,从而介导气道高反应性的病理过程,与喘息性慢性支气管炎密切相关^[7]。因此,CD4⁺T 淋巴细胞产生 IL-2、IL-4 的多寡往往与慢性支气管炎的 CD4⁺T 淋巴细胞活化程度呈同向性变化,成为考察慢性支气管炎的 T 淋巴细胞活化程度的有效指标。本研究中的模型组大鼠在接受长达 10 周的香烟烟熏之后,其 CD4⁺T 淋巴细胞的 IL-2、IL-4 基因与蛋白表达水平均持续于较高水平,表明其 CD4⁺T 淋巴细胞活化也较为剧烈。

CD4⁺T 淋巴细胞是人体免疫系统的重要组成部分,不仅在慢性支气管炎的急性发作期,在慢性迁延期浸润支气管粘膜与粘膜下组织的 CD4⁺T 淋巴细胞数量也是增加的^[8]。慢性迁延期的患者肺内仍存在一定程度的炎症活动,外周血 CD4⁺T 淋巴细胞增加,机体仍然持续处于不同程度的炎症损伤之下^[9,10]。这些 T 淋巴细胞亚群的病理性变化也是慢性支气管炎能够持续存在并反复发作的重要原因之一。本研究中的模型组大鼠的 CD4⁺T 淋巴细胞比例明显升高,显然与其支气管炎持续活跃密切相关,其 HE 染色细支气管炎病理形态观察可见多量淋巴细胞浸润的结果也支持此推论。

在本研究中,接受芒果苷干预的大鼠其 HE 染色组织病理形态观察均可见到较为明显的细支气管炎减轻,其抗炎效果呈明显的剂量依赖性,较高的芒果苷剂量可带来更好的抗炎效果。同时观察到的芒果苷干预抑制 CD4⁺T 淋巴细胞活化,包括 CD4⁺T 淋巴细胞比例以及 CD4⁺T 淋巴细胞 IL-2、IL-4 基因与蛋白表达水平显著下调,也呈现不同程度的剂量依赖性。上述结果提示,芒果苷能够以剂量依赖

性的方式抑制 CD4⁺T 淋巴细胞活化,显著减轻香烟烟熏诱导的大鼠慢性支气管炎的炎症细胞浸润、支气管及其周围组织的损伤,具有较为良好的抗炎及组织保护作用,这些新的实验证据显著增加了芒果苷在慢性支气管炎治疗新药研发领域的潜在价值。

参考文献

- 1 Deng JG(邓家刚), Zheng ZW(郑作文), Hao EW(郝二伟), *et al.* pharmacodynamics study of mangiferin tablet on acute bronchitis. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32: 300-303.
- 2 Wei ZQ(卫智权), Deng JG(邓家刚), Yan L(阎莉), *et al.* Effect of mangiferin on the expression of myeloid differentiation factor 88 of peripheral blood mononuclear cell in rats with chronic inflammation. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2013, 29:482-486.
- 3 Wei ZQ(卫智权), Yan L(阎莉), Deng JG(邓家刚), *et al.* Mangiferin protects rats against chronic bronchitis via regulating NF- κ B (P65) and I κ B α expression in mononuclear cells. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2014, 49:596-601.
- 4 Wei ZQ(卫智权), Yan L(阎莉), Deng JG(邓家刚), *et al.* Effects of mangiferin on MAPK signaling pathway in chronic inflammation. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36:1798-1802.
- 5 Kurmi OP, Semple S, Simkhada P, *et al.* COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*, 2009, 65: 221-228.
- 6 Mier-Cabrera J, Gonzalez-Gallardo S, Hernandez-Guerrero C. Effect of nitric oxide and TH1/TH2 cytokine supplementation over ectopic endometrial tissue growth in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci*, 2013, 20:1332-1338.
- 7 Nafe LA, DeClue AE, Lee-Fowler TM, *et al.* Evaluation of biomarkers in bronchoalveolar lavage fluid for discrimination between asthma and chronic bronchitis in cats. *Am J Vet Res*, 2010, 71:583-591.
- 8 Hukkinen M, Korhonen T, Broms U, *et al.* Long-term smoking behavior patterns predicting self-reported chronic bronchitis. *COPD*, 2009, 6:242-249.
- 9 Hodge G, Hodge S, Chambers D, *et al.* Bronchiolitis obliterans syndrome is associated with absence of suppression of peripheral blood Th1 proinflammatory cytokines. *Transplantation*, 2009, 88:211-218.
- 10 Hodge G, Hodge S, Li-Liew C, *et al.* Lymphocytic bronchiolitis is associated with inadequate suppression of blood T-cell granzyme B, IFN-gamma, and TNF-alpha. *Transplantation*, 2010, 89:1283-1289.