

文章编号:1001-6880(2016)10-1545-04

# 砂生槐多糖提取物对免疫抑制模型小鼠 Treg 和 Th17 的影响

雒艳萍<sup>1</sup>, 贾天玉<sup>1</sup>, 管彬<sup>1</sup>, 冯燕海<sup>1</sup>, 史彦斌<sup>2</sup>, 马兴铭<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup> 兰州大学基础医学院; <sup>2</sup> 兰州大学药学院; <sup>3</sup> 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 兰州 730000

**摘要:**为了开发藏药砂生槐的药用价值,本文拟研究其多糖提取物对免疫抑制小鼠调节性 T 细胞 (Treg) 和 Th17 的影响。水提醇沉法提取砂生槐枝条多糖物质,腹腔注射环磷酰胺建立免疫抑制小鼠模型,模型小鼠经砂生槐多糖灌胃干预后,分离脾细胞,流式细胞术检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例和 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比例;收集血清,ELISA 检测 IL-17 水平。结果显示,各剂量组砂生槐多糖均能够引起免疫抑制小鼠的脾脏 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞比例明显增多 ( $P < 0.05$ ), 同时明显抑制 IL-17 的产生 ( $P < 0.05$ )。以上结果提示砂生槐多糖可能通过上调 Treg 而抑制免疫功能,同时抑制 IL-17 的产生,发挥免疫抑制作用。

**关键词:**砂生槐;植物多糖;调节性 T 细胞;IL-17

中图分类号:R392; R932

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.008

## Effects of Polysaccharides Extract of *Sophora moorcroftiana* on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg and Th17 in Immunosuppressed Mice

LUO Yan-ping<sup>1</sup>, JIA Tian-yu<sup>1</sup>, GUAN Bin<sup>1</sup>, FENG Yan-hai<sup>1</sup>, SHI Yan-bin<sup>2</sup>, MA Xing-ming<sup>1,3\*</sup><sup>1</sup> School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University; <sup>2</sup> School of Pharmacy, Lanzhou University; <sup>3</sup> Key Lab of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

**Abstract:** *Sophora moorcroftiana* is the specific plant in Tibet and gets little development since grows in the remote place. In order to research its medicinal value, we firstly extract *Sophora moorcroftiana* polysaccharides (SMP) and investigate the effects on CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg) cells and Th17 cells in immunosuppressed mice. SMP was extracted from branch of *Sophora moorcroftiana* after water extraction and alcohol precipitation. The immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide were treated with SMP, then the ratio of CD4<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells were analyzed by flow cytometry and the serum interleukin-17 (IL-17) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that each dose SMP increased the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg in spleen and decreased the serum IL-17 production. In conclusion, SMP plays a role in immunosuppression by up-regulating Treg and suppressing IL-17 production.

**Key words:** *Sophora moorcroftiana*; Plant polysaccharide; Regulatory T cells; Interleukin-17

砂生槐 (*Sophora moorcroftiana*) 属豆科 (Leguminosae) 槐属 (*Sophora*), 生于山谷和溪边的林下或石砾灌木丛中, 海拔 3000 ~ 4500 m, 分布于我国西藏 (雅鲁藏布江流域), 印度、不丹、尼泊尔也有分布, 具有极强的抗旱、抗风沙功能<sup>[1]</sup>。据《中国民族药志要》记载, 砂生槐子在民间主要用于治疗白喉, 虫病, 黄疸性肝炎, 化脓性扁桃体炎<sup>[2]</sup>。现代医学药理学研究表明, 槐属植物中提取的活性成分生物碱对免疫功能多具有抑制作用, 而黄酮类化合物主

要具有抗菌、抗炎、抗肿瘤活性, 对多糖的研究则较少。调节性 T 细胞 (regulatory T lymphocyte, Treg) 能够抑制免疫而参与疾病的发生发展, 已成为目前预防和治疗许多疾病的靶点之一<sup>[3,4]</sup>。新近发现的主要分泌 IL-17 为主的 T 细胞亚群 Th17 细胞 (T helper cell 17, Th17) 与 Treg 之间存在复杂的关系, 在发育及功能上相互拮抗。由于西藏能源短缺, 当地老百姓将砂生槐连根挖下当柴烧, 对植被的破坏性极大, 不但造成草地植物的退化, 而且使沙漠化面积不断扩大, 导致生态失衡, 为了保护我国这一特有植株和开发砂生槐的药用价值, 本实验首次从砂生槐地上枝条部分提取多糖, 研究其对免疫抑制小鼠 Treg 及 Th17 的影响, 为开发砂生槐植物资源的药用价值提

收稿日期:2016-05-26 接受日期:2016-06-29

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)

\* 通讯作者 Tel: 86-931-8289562; E-mail: maxm@lzu.edu.cn

供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及材料

砂生槐地上枝条部分采自西藏林芝地区;环磷酰胺为山西普德药业股份有限公司产品(批号:04130901);FITC-抗CD4(克隆号RM4-5)和APC-抗CD25(克隆号PC61.5)购自eBioscience(美国),EZ-SepTM MOUSE 1×淋巴细胞分离液和小鼠IL-17预包被ELISA试剂盒为深圳达科为生物技术有限公司产品。

### 1.2 主要仪器

旋转蒸发器RE-52AA,上海亚荣生化仪器厂;分光光度计,上海现科分光仪器有限公司;LFRFortessa流式细胞仪,BD公司;ST-360酶标仪,上海科华实验系统有限公司。

### 1.3 砂生槐多糖提取及浓度测定

从西藏林芝获得砂生槐地上枝条部分药材234.00 g,用常规水提醇沉法得到多糖10.96 g,产率4.68%。苯酚浓硫酸法测得提取物中多糖的含量为26.19%。

### 1.4 动物、分组及给药

昆明种小鼠,雌性,重18~22 g,购自兰州大学医学实验中心(动物合格证号:62000800000103)。随机分为正常对照组、模型组、砂生槐多糖低剂量组、砂生槐多糖中剂量组、砂生槐多糖高剂量组,每组10只。给药如下,正常对照组:生理盐水0.2 mL/d,腹腔注射,连续3 d,第4 d给予生理盐水灌胃0.2 mL/(20 g·d),连续10 d;模型组:环磷酰胺80 mg/(kg·d)腹腔注射,连续3 d,以后每周腹腔注射一次环磷酰胺80 mg/kg,在此基础上第4 d灌胃给予生理盐水,用量、给药天数同正常对照组;砂生槐多糖干预组:环磷酰胺80 mg/(kg·d)腹腔注射,连续3 d,以后每周腹腔注射一次环磷酰胺80 mg/kg,在此基础上第4 d灌胃给予砂生槐多糖,药物浓度分别为250 mg/(kg·d)(低剂量组)、500 mg/(kg·d)(中剂量组)、1000 mg/(kg·d)(高剂量组),连续10 d。

### 1.5 小鼠脾细胞悬液制备

颈椎脱臼处死小鼠,取脾脏,剪碎后置于200目尼龙网,用玻璃注射器内芯研压脾脏,使其成为单个细胞,分散的单细胞透过尼龙网进入淋巴细胞分离液中,把含有脾细胞的淋巴细胞分离液立即转移到

离心管,小心加入200 μL不完全1640培养液,800 g离心40 min,用巴氏吸管吸出单个核细胞层的细胞,转移至新的离心管,用流式洗液洗涤细胞后,250 g离心10 min,弃去上清,加入2 mL流式洗液重悬细胞,细胞计数,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL,用于荧光抗体染色。

### 1.6 流式细胞术检测脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞比例

取100 μL细胞悬液,加荧光素标记抗体FITC-抗CD4和APC-抗CD25,混匀后在4 °C条件下避光孵育30 min,直接加入预冷流式缓冲液1 mL,重悬细胞,400 g离心5 min,吸弃上清,将沉淀细胞重悬在500 μL流式缓冲液中,上机检测CD4<sup>+</sup>和CD25<sup>+</sup>细胞,FlowJo软件分析CD4<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞占淋巴细胞的比例及CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞占CD4<sup>+</sup>T细胞的比例。

### 1.7 ELISA测定血清IL-17水平

眼球采血,37 °C放置1 h后,500 g离心15 min,收集上清,采用商品化试剂盒通过酶联免疫吸附试验双抗体夹心法检测IL-17水平,试验过程严格按照试剂盒说明书进行。

### 1.8 统计处理

所有数据以均数±标准差表示,采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以P<0.05作为统计学意义的标准。

## 2 实验结果

### 2.1 砂生槐多糖对小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞比例的影响

通过流式细胞术检测脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞,分析其占脾脏淋巴细胞或CD4<sup>+</sup>T细胞的比例。结果发现,与正常对照组小鼠比较,模型组和各剂量砂生槐多糖处理组CD4<sup>+</sup>T细胞占脾淋巴细胞比例均明显下降(P<0.01);与模型组比较,经砂生槐多糖处理后,CD4<sup>+</sup>T细胞占脾淋巴细胞比例都有不同程度下降,但仅低剂量组经统计具有显著性差异(P<0.05)(图1)。说明砂生槐多糖协同环磷酰胺,降低CD4<sup>+</sup>T细胞产生。分析CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞占脾淋巴细胞比例表明,仅砂生槐低剂量组与正常对照组比较明显降低,差异具有统计学意义(P<0.05);而与模型组比较,各剂量砂生槐多糖处理组对CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞占脾淋巴细胞比例无明显影响(图2)。进一步分析CD4<sup>+</sup>

CD25<sup>+</sup> Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例, 与正常对照组相比, 尽管模型组脾脏 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg 细胞占 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例有升高趋势, 但无统计学差异, 而

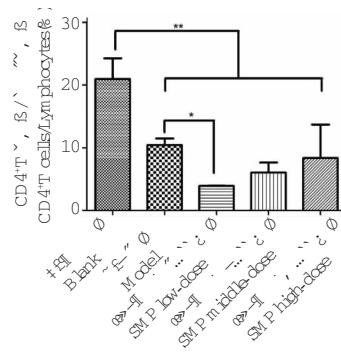


图 1 砂生槐多糖对小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> T 细胞/淋巴细胞比值的影响

Fig. 1 Effect of SMP on the ratio of CD4<sup>+</sup> T cells to spleen lymphocytes in mice

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

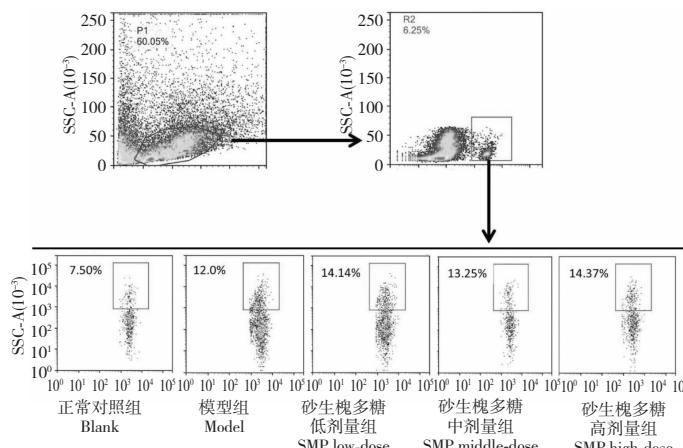


图 3 砂生槐多糖对小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/CD4<sup>+</sup> T 细胞比值的影响

Fig. 3 Effect of SMP on the ratio of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells to spleen CD4<sup>+</sup> T cells in mice

注: 与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs blank

## 2.2 砂生槐多糖对小鼠血清 IL-17 水平的影响

由图 4 可以看出, 注射环磷酰胺后建立的模型组小鼠血清 IL-17 水平较正常组明显升高 ( $P < 0.01$ ), 然而经过不同浓度砂生槐多糖处理后, IL-17 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 恢复至正常水平, 说明砂生槐多糖对免疫抑制模型小鼠的 Th17 细胞有抑制作用。

## 3 讨论与结论

关于藏药砂生槐药用价值的研究较少, 近年来我们实验室从砂生槐子中提取不同成分研究药物活

砂生槐多糖各剂量组均明显增高 ( $P < 0.05$ ), 尤其砂生槐多糖高剂量组升高最明显 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。以上数据表明, 砂生槐多糖对环磷酰胺引起的免疫抑制具有协同作用。

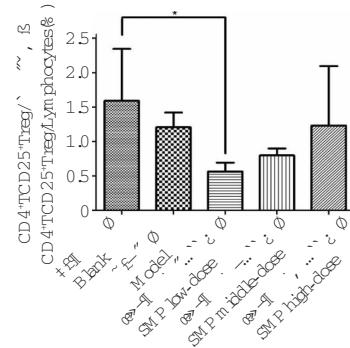
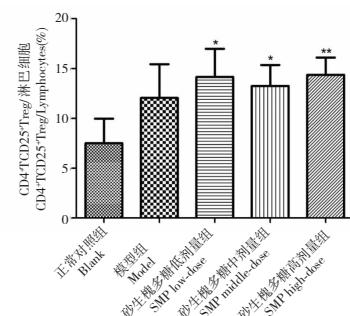


图 2 砂生槐多糖对小鼠脾脏 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg/淋巴细胞比值的影响

Fig. 2 Effect of SMP on the ratio of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells to spleen lymphocytes in mice

注: \*  $P < 0.05$



性, 发现亲脂性总生物碱具有抑菌、抗肿瘤和驱杀虫活性<sup>[5]</sup>, 水提物能够提高环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠的 B 细胞和 T 细胞功能<sup>[6]</sup>, 也能促进荷瘤小鼠的免疫功能, 95% 乙醇提取物对肿瘤细胞具有细胞毒活性<sup>[7]</sup>。有学者从砂生槐地上部分提取黄酮类化合物, 发现其对抗生素的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌效应有协同效应<sup>[8]</sup>。本研究首次从砂生槐地上枝条部分提取多糖成分, 发现其对 Treg 细胞具有上调作用, 同时抑制 IL-17 产生, 是潜在的免疫抑制调节剂。

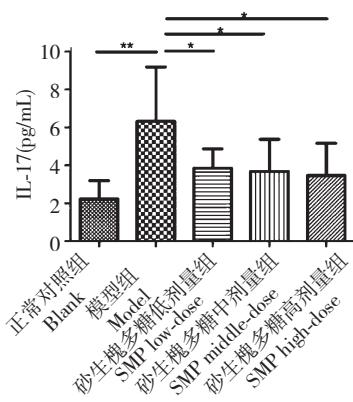


图 4 砂生槐多糖对小鼠血清 IL-17 水平的影响

Fig. 4 Effect of SMP on the level of serum IL-17 in mice

注:与模型组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs model control

进入外周免疫器官的初始  $CD4^+$  T 细胞除了分化为传统的 Th1 和 Th2 细胞外,还可以分化为 Th17 和 Treg 细胞。TGF- $\beta$  和 IL-6 共同作用于初始  $CD4^+$  T 细胞,通过激活 STAT3,促使其表达转录因子 ROR $\gamma$ t 而分化为 Th17 细胞,产生 IL-17、IL-22 而参与炎症与损伤,同时抑制了以 Foxp3 表达为特征的 Treg 细胞的分化。而初始  $CD4^+$  T 细胞在 TGF- $\beta$  单独作用下,促使初始  $CD4^+$  T 细胞表达转录因子 Foxp3 而分化为 Treg 细胞,产生 TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-35 而发挥免疫抑制功能,维持机体的稳定状态,在避免自身免疫病的发生方面起了积极的作用<sup>[9]</sup>。因此, Th17 和 Treg 在分化的过程中相互抑制。此外, Th17 细胞不稳定,具有可塑性<sup>[10]</sup>,可能分化为 Treg 细胞<sup>[11]</sup>。在正常机体,Treg 细胞和 Th17 细胞相互拮抗,保持平衡,维持稳定状态。近年来多项研究发现,Treg 细胞降低和 Th17 细胞升高为特征的功能失衡与人类多种重大疾病,如自身免疫性疾病、过敏性疾病、移植排斥反应等疾病关系非常密切<sup>[12]</sup>,逆转 Treg/Th17 失衡是治疗免疫性疾病的有效措施之一<sup>[13,14]</sup>。本实验中,在环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠模型,砂生槐多糖提取物能够促进 Treg 比例升高,降低 IL-17 水平,从而抑制炎症,有望作为免疫调节剂用于治疗出现 Treg/Th17 失衡的疾病。

综上,砂生槐多糖可通过上调 Treg 细胞,下调 Th17 细胞而调节免疫功能,推测是一种潜在的免疫调节剂,但其促进 Treg 细胞产生和下调 Th17 细胞的机制有待于进一步研究。

## 参考文献

1 Zhang S (张胜), Zhao KT (赵垦田), Xiang R (向瑞).

- Review on *Sophora moorcroftiana* in Tibet. *J Inner Mongolia Forest Sci Technol* (内蒙古林业科技), 2009, 35:57-59.
- 2 Jia MR (贾敏如), Li XW (李星炜). Chinese national drug records (中国民族药志要). Beijing: China Medical Science Press, 2005:578.
  - 3 Morrow MP, Pankhong P, Ladd DJ, et al. Comparative ability of IL-12 and IL-28B to regulate Treg populations and enhance adaptive cellular immunity. *Blood*, 2009, 113: 5868-5877.
  - 4 Schreiber TH, Wolf D, Tsai MS, et al. Therapeutic Treg expansion in mice by TNFRSF25 prevents allergic lung inflammation. *J Clin Invest*, 2010, 120:3629-3640.
  - 5 Ma XM, Bao G, Wan JM, et al. Therapeutic effects of *Sophora moorcroftiana* alkaloids in combination with albendazole in mice experimentally infected with protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Braz J Med Biol Res*, 2007, 40:1403-1408.
  - 6 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: 477-479.
  - 7 Ma X, Luo Y, Yu H, et al. Ethanolic extracts of *Sophora moorcroftiana* seeds induce apoptosis of human stomach cancer cell line SGC-7901 *in vitro*. *African J Biotechnol*, 2006, 18:1669-1674.
  - 8 Wang SY, Sun ZL, Liu T, et al. Flavonoids from *Sophora moorcroftiana* and their synergistic antibacterial effects on MRSA. *Phytother Res*, 2013, 28:1071-1076.
  - 9 Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 2010, 140:845-858.
  - 10 Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of  $CD4^+$  T cell lineage differentiation. *Immunity*, 2009, 30:646-655.
  - 11 Gagliani N, Amezcu Vesely MC, Iseppon A, et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 2015, 7559:221-225.
  - 12 Afzali B, Lombardi G, Lechner RI, et al. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 2007, 148:32-46.
  - 13 Chen YL (陈玥琳), Shen H (沈洪), Yao HF (姚宏凤), et al. Regulation of Th17/Treg by Qingchang Huashi Fang on trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis in mice. *J Nanjing Univ TCM* (南京中医药大学学报), 2014, 30: 130-123.
  - 14 Wang SJ (王十锦), Zhang B (张蓓), Wang L (王丽), et al. The imbalance between Th17 and Treg in liver injury model of rats. *Immun J* (免疫学杂志), 2014, 30:133-138.