

• 论 著 •

EGCG 对体外诱导小鼠 Th17 细胞的产生及促炎因子调控的影响

利基林¹, 沈筱芸¹, 易 海², 梁新强¹, 容敏华¹, 唐艳萍¹, 罗小玲^{1△}

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部, 南宁 530021; 2. 中国人民解放军

成都军区总医院血液内科, 成都 610083)

摘要:目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对体外诱导小鼠 Th17 细胞的产生及促炎因子白细胞介素(IL)-17 和肿瘤抑制因子(TNF)- α 的表达和分泌的影响。**方法** 分离小鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞, 加入刺激体系诱导体外培养的淋巴细胞活化分化成 Th17 细胞。设立对照组和不同剂量 EGCG 组(100、200、400 ng/mL), 分别培养 72 h 后, 采用流式细胞仪检测 Th17 细胞。分别采用荧光定量 PCR 和 ELISA 法检测培养细胞 IL-17、TNF- α 的基因表达和蛋白分泌水平。**结果** EGCG 能够抑制体外诱导的 Th17 细胞的产生, IL-17 和 TNF- α 的基因表达和蛋白分泌水平均受到显著抑制, 且其抑制作用呈剂量依赖性。**结论** EGCG 可抑制体外诱导的小鼠 Th17 细胞产生, 抑制 IL-17 和 TNF- α 的表达和分泌。

关键词: Th17 细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 表没食子儿茶素没食子酸酯

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)15-1668-02

Effects of EGCG on proliferation of Th17 cell and inflammatory factors in vitro

Li Jilin¹, Shen Xiaoyun¹, Yi Hai², Liang Xinqiang¹, Rong Minhua¹, Tang Yanping¹, Luo Xiaoling^{1△}

(1. Research Department, Affiliated Cancer Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Department of Hematology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of epigallocatechin-3-gallate(EGCG) on proliferation of Th17 cells and the contents of interleukin-17(IL-17) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in vitro. **Methods** Splenic CD4⁺ T cells in BALB/c mice were activated and divided into control group(without EGCG) and experiment groups(with 100, 200, 400 ng/mL EGCG respectively). Each group was incubated for 72 h. Th17 cells were measured by flow cytometry(FCM) method. The levels of IL-17 and TNF- α mRNA were detected by real time-PCR. The levels of IL-17 and TNF- α in supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbant assay(ELISA). **Results** EGCG could inhibit the growth of Th17 cells. In addition, EGCG could also decrease the mRNA and the supernatant protein levels of IL-17 and TNF- α in a dose-dependent manner. **Conclusion** EGCG can significantly inhibit Th17 cell growth and the expression of IL-17 and TNF- α in vitro.

Key words: inter leukin-17; tumor necrosis factor-alpha; epigallocatechin-3-gallate

Th17 细胞是由 Th0 细胞在白细胞介素(IL)-6 和 IL-23 的刺激下分化而成的一类 T 淋巴细胞亚群, 主要分泌 IL-17、IL-22、干扰素(INF)- γ 和肿瘤抑制因子(TNF)- α 等促炎因子^[1]。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是从绿茶中提取的一种水溶性成分, 具有非常强的抗氧化、抗突变、抗癌等活性^[2-4]。此外 EGCG 还具有很强的抗炎作用, 但其抗炎活性的作用机制仍未明确。本研究探讨了在体外 EGCG 对小鼠 Th17 细胞的产生及 IL-17 和 TNF- α 表达和分泌的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 6~8 周龄 BALB/c 雄性小鼠, 体质量约 18~22 g, 购自广西医科大学实验动物中心。

1.2 仪器与试剂 EGCG 购自 Sigma 公司, 纯度 95%。RPMI-1640 培养基和胎牛血清均购自美国 HyClone 公司。抗鼠 CD4-FITC(IgG2a)、抗鼠 IL-17-PE, CD3、CD28、转化生长因子(TGF)- β 、IL-6、IL-1 β 、IL-2、INF- γ 、IL-23 单抗均购自 BioLegend 公司。小鼠 IL-17、TNF- α ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。Simply P 总 RNA 提取试剂盒购自杭州博日科技有限公司, ReverTra Ace- α -RNA 逆转录试剂盒购自日本 Toyobo 公司, SYBR Premix Ex Taq 荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合

成。分选器、LD/MS 分选柱及 CD4⁺ T 细胞磁珠分选试剂盒购自德国 Miltenyi Biotec 公司。

1.3 方法

1.3.1 Th17 细胞的培养 无菌条件下分离小鼠脾淋巴细胞, 磁珠分选 CD4⁺ T 细胞, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 5×10^6 /mL, 按 200 微升/孔铺于 96 孔, 每孔分别加入抗 CD3 抗体 0.5 μ g/mL(铺板前包被 2 h)、抗 CD28 抗体 2 μ g/mL、抗 TGF- β 抗体 5 ng/mL、抗 IL-6 抗体 60 ng/mL、抗 IL-1 β 抗体 10 ng/mL、抗 IL-23 抗体 10 ng/mL、抗 INF- γ 抗体 10 μ g/mL、抗 IL-4 抗体 5 μ g/mL 刺激细胞活化诱导 Th17 细胞产生。按对照组、不同 EGCG 剂量组(100、200、400 ng/mL)分组处理, 每组均设 3 个复孔, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中共培养 72 h(检测前 12 h 加入佛波酯 20 ng/mL、离子霉素 500 ng/mL、布雷菲德菌素 3 μ g/mL 继续刺激)。

1.3.2 检测 Th17 细胞 收集细胞, 细胞内染色固定液室温固定 20 min, 打孔液洗涤, 离心, 去上清液, 打孔液 50 μ L 重悬, 加入抗鼠 CD4-FITC(0.3 μ L)、抗鼠 IL-17-PE(0.5 μ L), 室温避光标记 40 min, 打孔液 200 μ L 洗涤, 离心去上清液, 磷酸盐缓冲液(PBS) 200 μ L 重悬, 流式细胞术(FCM)检测 IL-17 细胞。

$\triangle$ 通讯作者, E-mail: lxllc001@sina.com.cn.

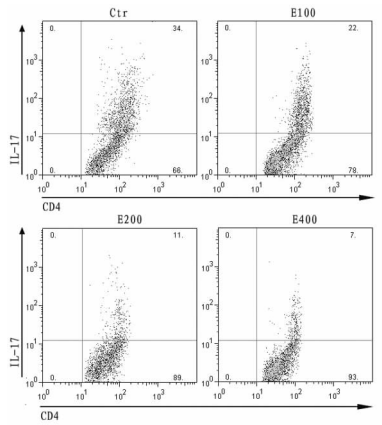
1.3.3 检测 IL-17 和 TNF- α 基因表达水平 收集细胞, 抽提细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA 后, 按实时荧光定量 PCR 试剂盒说明配成反应液, 上机扩增 IL-17 和 TNF- α 目的基因, 细胞内 mRNA 表达水平以相应标本内 GAPDH mRNA 为基准采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[5], 并将对照组标本内目的基因表达水平设为 1, 对其他组标本内目的基因表达水平进行标准化。

1.3.4 检测上清液中 IL-17 和 TNF- α 水平 收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 法检测 IL-17 和 TNF- α 水平, 按试剂盒说明书操作, 并按每孔细胞数为 1×10^6 个来校正所得数据。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件包进行处理, 率的比较用 χ^2 检验, 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行方差分析和 Student-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

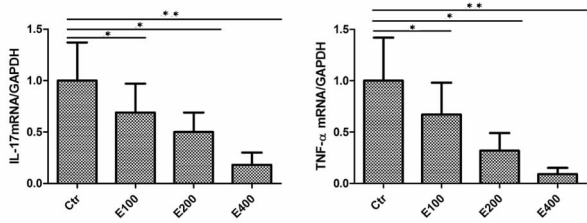
2 结果

2.1 EGCG 抑制 Th17 细胞产生 与对照组相比, EGCG 明显抑制 Th17 细胞产生, 并呈剂量依赖效应, 见图 1。



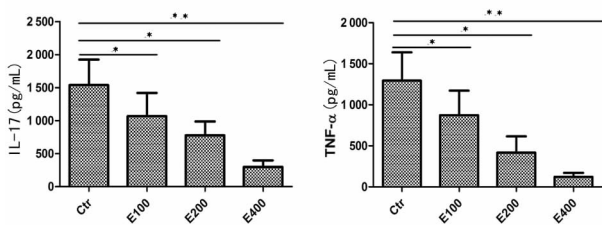
Ctrl: 对照组; E100: EGCG (100 ng/mL) 组; E200: EGCG (200 ng/mL) 组; E400: EGCG (400 ng/mL) 组。

图 1 EGCG 对 Th17 细胞产生的作用



Ctrl: 对照组; E100: EGCG (100 ng/mL) 组; E200: EGCG (200 ng/mL) 组; E400: EGCG (400 ng/mL) 组。* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2 EGCG 对 IL-17 和 TNF- α 基因表达的影响



Ctrl: 对照组; E100: EGCG (100 ng/mL) 组; E200: EGCG (200 ng/mL) 组; E400: EGCG (400 ng/mL) 组。* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 EGCG 对 IL-17 和 TNF- α 蛋白分泌的影响

2.2 EGCG 抑制 IL-17 和 TNF- α 基因表达 与对照组相比, 不同 EGCG 剂量组 IL-17 和 TNF- α 基因表达水平均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 EGCG 抑制 IL-17 和 TNF- α 蛋白分泌 与对照组相比, 不同 EGCG 剂量组细胞 IL-17 和 TNF- α 蛋白分泌水平均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

3 讨论

EGCG 具有抗自由基 DNA 损害、抗脂质过氧化、抗突变、抗炎、抗病毒、增强机体免疫功能等多种生物学效应^[3-4,6]。目前研究发现, EGCG 的生物学效应与其抑制炎症因子的作用是密不可分的^[7], EGCG 可抑制 IL-6、IL-1、TNF- α 等细胞因子的活性, 抑制单核趋化蛋白-1 (MCP-1) 的分泌, 从而抑制单核巨噬细胞的趋化, 减轻炎症损伤的程度^[8]。此外, EGCG 还可抑制佛波酯诱导的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和核因子 (NF)- κ B 的活化, 抑制 MCP-1 的表达及 MCP-1 对单核细胞的活化作用, 从而发挥抗炎活性^[9]。

Th17 细胞可以通过分泌 IL-21、IL-22 等因子, 诱导炎症因子, 通过募集其他效应性细胞和与其他基质细胞相互作用, 参与慢性炎症进程^[10-12]。抑制 Th17 细胞的产生则有望减轻 Th17 诱导的慢性炎症损伤。EGCG 对 Th17 细胞是否具有抑制作用, 目前尚无相关报道, 因此, 笔者研究了 EGCG 对 Th17 细胞的产生及其对 Th17 细胞分泌促炎因子的作用, 结果发现 EGCG 可明显抑制体外诱导的小鼠 Th17 细胞的产生, 抑制 IL-17 和 TNF- α 的表达和分泌。鉴于 EGCG 是绿茶中的天然成分, 安全性高、副作用小, 进一步探讨 EGCG 在炎症损伤过程中的作用机制对指导治疗 Th17 细胞诱导的相关疾病具有重要科学意义。

参考文献

- [1] 陈怡丽, 姜悦. Th17 细胞及其在神经免疫疾病中的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 242-244.
- [2] Tanaka T, Watarumi S, Matsuo Y, et al. Production of theasinensins A and D, epigallocatechin gallate dimers of black tea, by oxidation-reduction dismutation of dehydrotheasinensin A[J]. Tetrahedron, 2003, 59(40): 7939-7947.
- [3] 宛晓春. 茶叶生物化学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 8.
- [4] Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea[J]. J Nutr Biochem, 2001, 12(7): 404-421.
- [5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [6] Butt MS, Sultan MT. Green tea: nature's defense against malignancies[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2009, 49(5): 463-473.
- [7] Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, et al. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(3): 659-665.
- [8] Ahn HY, Xu Y, Davidge ST. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits TNF α -induced monocyte chemotactic protein-1 production from vascular endothelial cells[J]. Life Sci, 2008, 82(17/18): 964-968.
- [9] Hong MH, Kim MH, Chang HJ, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression in endothelial cells via blocking NF- κ B signaling(下转第 1672 页)

蛋白的赖氨酸残基或其他氨基发生反应,形成稳定的不可逆结合。当细胞分裂时,其标记物可平均分配到 2 个子代细胞中,使荧光强度呈对半递减,可提供多达 8 代的细胞分裂信息。此外,传统的细胞增殖测定法只能对活细胞进行检测,而无法与某些已经分裂又发生死亡的细胞区别。而使用 CFSE 标记,死亡的细胞在几天内可保持荧光强度基本不变,并可使用其他染料将其与活细胞区分开来,为增殖分析提供了更加全面的资料^[5]。不仅如此,CFSE 还可稳定地存在于细胞内长达数月之久,并且不会使临近细胞染色,不会影响细胞功能。因此已经被广泛应用于体内和体外细胞的示踪实验。

Siglec-1(CD169)特异性表达于特定组织巨噬细胞上,而健康人外周血单核细胞上并不表达^[6-7]。当巨噬细胞受到炎症反应刺激时,Siglec-1 表达迅速上调,在巨噬细胞促炎反应中起重要作用。在多种炎症反应和自身免疫性疾病中均发现 Siglec-1 在外周血及病变组织表达增高,并参与炎症反应及 T 淋巴细胞激活等过程。而 Siglec-1 在冠心病中的具体作用尚未见报道。

本课题组以前的研究发现,Siglec-1 在 AS 患者外周血单核细胞表达增高^[3],血清中高浓度的 ox-LDL 可能是 Siglec-1 表达增高的原因之一^[2],但 Siglec-1 在 AS 中的确切作用尚未阐明。为探讨 Siglec-1 在单核细胞促淋巴细胞增殖和活化中的作用,进行了单核细胞-淋巴细胞混合培养实验,并分别用抗 Siglec-1 单抗阻断的方法抑制单核细胞 Siglec-1 发挥作用,用 INF- α 刺激促进单核细胞高表达 Siglec-1^[8-10],以探讨 Siglec-1 表达增强或抑制后对单核细胞刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖能力的变化。实验发现,ACS 患者 CD14⁺ 单核细胞具有比健康人单核细胞更强的刺激 T 细胞增殖的作用。当用 INF- α 上调健康人单核细胞 Siglec-1 表达后,单核细胞刺激 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖能力增强,并且这种作用可通过抗 Siglec-1 单抗靶向阻断而减弱。同样的,当用抗 Siglec-1 单抗靶向阻断 Siglec-1 后,ACS 患者单核细胞刺激 T 细胞增殖能力也有所减弱。因此,可以得出结论,ACS 患者增强的 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖能力部分是由于激活的单核/巨噬细胞高表达 Siglec-1 引起。Siglec-1 可通过外周血单核细胞-淋巴细胞或斑块局部巨噬细胞-淋巴细胞相互作用介导 AS 全身或局部炎症反应。

本研究成功建立了 CFSE 标记结合流式细胞术检测外周血 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖的实验方法,该方法简单、实用、灵敏度高,结果稳定可靠,可以取代 3HTdR 掺入法或 MTT 法用于不同免疫刺激情况下淋巴细胞增殖的检测。并结合单核细胞 Siglec-1 高表达或低表达后刺激 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞对其增殖反应进行了检测,验证了该方法的可靠性。

总之,笔者认为在高浓度的 ox-LDL 刺激下,ACS 患者外

周血单核细胞被激活,Siglec-1 表达增高,单核细胞摄取 ox-LDL 后转变成泡沫细胞,将脂质抗原提呈给 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞^[11],并刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖,最终影响 AS 的炎症反应过程。通过 Siglec-1 特异性抗体靶向阻断其功能可减轻淋巴细胞增殖反应。因此,对外周血单核细胞或粥样斑块巨噬细胞上 Siglec-1 的调节治疗有望成为一种治疗 AS 的新方法。

参考文献

[1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(16):1685-1695.

[2] 熊怡淞, 朱烨, 陆慧琦, 等. 氧化型低密度脂蛋白对 RAW264. 7 细胞 Siglec-1 表达及分泌细胞因子的影响[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2010, 30(1):51-55.

[3] Xiong YS, Zhou YH, Rong GH, et al. Siglec-1 on monocytes is a potential risk marker for monitoring disease severity in coronary artery disease[J]. Clin Biochem, 2009, 42(10/11):1057-1063.

[4] Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry[J]. J Immunol Methods, 1994, 171(1):131-137.

[5] Thompson BS, Mitchell TC. Measurement of daughter cell accumulation during lymphocyte proliferation in vivo[J]. J Immunol Methods, 2004, 295(1/2):79-87.

[6] Crocker PR, Paulson JC, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(4):255-266.

[7] Hartnell A, Steel J, Turley H, et al. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations [J]. Blood, 2001, 97(1):288-296.

[8] Rempel H, Calosing C, Sun B, et al. Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity[J]. PLoS One, 2008, 3(4):e1967.

[9] Delputte PL, Van Breedam W, Barbe F, et al. IFN-alpha treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin[J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 27(9):757-766.

[10] York MR, Nagai T, Mangini AJ, et al. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(3):1010-1020.

[11] Barral P, Polzella P, Bruckbauer A, et al. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes[J]. Nat Immunol, 2010, 11(4):303-312.

(收稿日期:2011-06-10)

(上接第 1669 页)

[J]. Life Sci, 2007, 80(21):1957-1965.

[10] Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(2):155-174.

[11] Lee J, Ho WH, Maruoka M, et al. IL-17 E, a novel proinflamma-

tory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(2):1660-1664.

[12] Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(1):1-8.

(收稿日期:2011-06-10)