

# 三叶青总提取物对人 $\gamma\delta$ T细胞功能影响

许青<sup>1</sup> 骆晓梅<sup>1</sup> 杨阳<sup>2</sup> 孙香香<sup>1</sup> 冯莉亚<sup>3</sup> 郭妙妙<sup>3</sup> 刘军权<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>中国人民解放军陆军第七十一集团军医院检验科, 徐州 221004;

<sup>2</sup>中国人民解放军陆军第七十一集团军医院药剂科, 徐州 221004; <sup>3</sup>杭州金域医学检验所有限公司, 杭州 310053)

**摘要** 该文旨在研究三叶青总提取物(TH-t)对人 $\gamma\delta$ T细胞功能的影响。用80%的乙醇提取三叶青干块根中的三叶青总提取物; 利用Ficoll分离液分离人静脉血单个核细胞(PBMC)。用异戊烯焦磷酸法进行 $\gamma\delta$ T细胞定向诱导培养。应用流式细胞分析技术检测PBMC培养前后的 $\gamma\delta$ TCR表面标记率, 用荧光标记的单克隆抗体检测 $\gamma\delta$ T细胞表面CD107a、granzymeB和Perforin的百分数。用乳酸脱氢酶释放法检测TH-t诱导后的 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞株杀伤活性。用CCK8法检测TH-t对 $\gamma\delta$ T细胞增殖能力。用MTT法检测TH-t对肝癌(HepG2)细胞株、胃癌(SGC-7901)细胞株和乳腺癌(MCF-7)细胞株的抑制率。PBMC培养前 $\gamma\delta$ TCR表达率为3.12%, 定向培养10天后为90.46%。在TH-t对 $\gamma\delta$ T细胞增殖能力影响的实验中, 经过诱导72 h后, 浓度为0.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TH-t促使 $\gamma\delta$ T细胞增殖最明显(增长率为44.50%), 显著高于对照组(3.50%)( $P<0.05$ )。当TH-t浓度为0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 诱导的 $\gamma\delta$ T细胞表面Perforin和granzymeB的阳性表达率可达到最高值, 分别为76.90% $\pm$ 2.30%和30.50% $\pm$ 1.30%), 显著高于对照组(65.40% $\pm$ 1.29%和25.10% $\pm$ 2.30%), 组与组之间的比较均存在统计学差异( $P<0.05$ )。经浓度为0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TH-t诱导后的 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株的杀伤活性最高(分别为72.10%、52.30%和79.10%), 显著高于对照组(分别为38.50%、30.50%和41.20%), 各组间的比较存在统计学差异( $P<0.05$ )。当Th-t浓度 $\geq$ 9.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对3株肿瘤细胞均有抑制作用。TH-t即能促进 $\gamma\delta$ T细胞增殖又能提高其杀伤肿瘤细胞活性; 一定浓度的TH-t能抑制肿瘤HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株的生长。

**关键词** 三叶青; 黄酮;  $\gamma\delta$ T细胞; 增殖; 杀伤活性; 抑制率

## Effects of *Tetrastigma hemsleyanum* Total Extraction on Human $\gamma\delta$ T Cells Function

XU Qing<sup>1</sup>, LUO Xiaomei<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>2</sup>, SUN Xiangxiang<sup>1</sup>, FENG Liya<sup>3</sup>, GUO Miaomiao<sup>3</sup>, LIU Junquan<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, the 71st Group Army Hospital of CPLA Army, Xuzhou 221004, China;

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, the 71st Group Army Hospital of CPLA Army, Xuzhou 221004, China;

<sup>3</sup>Hangzhou Golden Field Medical Laboratory Co., Ltd., Hangzhou 310053, China)

**Abstract** The purpose of this paper was to study the effect of *Tetrastigma hemsleyanum* total extraction (TH-t) on the function of human  $\gamma\delta$ T cells. *Tetrastigma hemsleyanum* total extraction (TH-t) was extracted from dried roots of *Tetrastigma hemsleyanum* with 80% ethanol. Human venous blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll separation solution. PBMCs were in orientational culture of  $\gamma\delta$ T cells with the isopentenyl pyrophosphate method. Flow cytometry was used to detect the surface labeling rate of  $\gamma\delta$ T CR before and after PBMC culture. And the percentage of CD107a, Granzyme B and Perforin on the surface of  $\gamma\delta$ T cells was detected by fluo-

收稿日期: 2019-12-26 接受日期: 2020-01-07

南京军区医学科技创新基金(批准号: 14MS032)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15952189799, E-mail: hz-liujunquan@kingmed.com.cn

Received: December 26, 2019 Accepted: January 7, 2020

This work was supported by Nanjing Military Region Medical Science and Technology Innovation Fund (Grant No.14MS032)

\*Corresponding author. Tel: +86-15952189799, E-mail: hz-liujunquan@kingmed.com.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5201>

recently labeled monoclonal antibody. The effect of  $\gamma\delta$ T cells induced by TH-t on the killing activity of tumor cell lines was examined by lactate dehydrogenase release assay. The CCK8 method was used to detect the effect of TH-t on the proliferation of  $\gamma\delta$ T cells. MTT assay was used to detect the inhibition rate of TH-t on liver cancer (HepG2) cell line, gastric cancer (SGC-7901) cell line and breast cancer (MCF-7) cell line. The expression rates of  $\gamma\delta$ TCR before PBMC culture were 3.12% and 90.46% after 10 days of directional culture. In the experiment of the effect of TH-t on the proliferation of  $\gamma\delta$ T cells, TH-t at a concentration of 0.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  induced the most obvious proliferation of  $\gamma\delta$ T cells (44.50%) after 72 h of induction, which was significantly higher than that of the control group (3.50%) ( $P < 0.05$ ). When the TH-t concentration was 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the positive expression rates of Perforin and granzymeB on the surface of induced  $\gamma\delta$ T cells reached the highest values (76.90% $\pm$ 2.30% and 30.50% $\pm$ 1.30%, respectively), which was significantly higher than that of the control group was 65.40% $\pm$ 1.29% and 25.10% $\pm$ 2.30%, and there was a statistically significant difference between the groups ( $P < 0.05$ ). After induction by TH-t at a concentration of 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\gamma\delta$ T cells had the highest cytotoxic activity against tumor HepG2, SGC-7901 and MCF-7 cells (72.10%, 52.30% and 79.10%, respectively), which was significantly higher than the control group (38.50%, 30.50% and 41.20%, respectively), there was a statistically significant difference between the groups ( $P < 0.05$ ). When the concentration of Th-t was  $\geq 9.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ , it inhibited the three tumor cells. TH-t can promote the proliferation of  $\gamma\delta$ T cells and increase the activity of killing tumor cells. A certain concentration of TH-t can inhibit the growth of HepG2, SGC-7901 and MCF-7 cells.

**Keywords** *Tetrastigma hemsleyanum*; flavonoids;  $\gamma\delta$ T Cells; proliferation; cytotoxicity; inhibition rate

三叶青, 又名金丝吊葫芦, 为葡萄科(Vitaceae)植物三叶崖爬藤(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg), 主要分布在我国的浙、闽、粤、滇、桂等地区<sup>[1]</sup>。块根入药, 是一种珍贵的中草药, 性寒味苦、无毒, 具有祛风化痰、活血散结、消炎止痛和清热解毒等功效, 常用于喉痒肿痛、咽喉炎、咳嗽、肺炎、支气管炎、肝炎、肠炎、痢疾和小儿高热惊厥等疾病的治疗<sup>[2]</sup>。黄酮类化学成分是三叶青药用的重要成分。国内有研究报道, 高浓度(3~15  $\text{mg}/\text{mL}$ )三叶青黄酮类物质能抑制多种肿瘤细胞增殖<sup>[3-7]</sup>。 $\gamma\delta$ T细胞是有别于 $\alpha\beta$ TCR受体的T淋巴细胞亚群之一, 主要分布于黏膜内及表皮组织内, 能发挥抗肿瘤效应<sup>[8-9]</sup>。本研究应用三叶青总提取物(*Tetrastigma hemsleyanum* total extract, TH-t)作用于人 $\gamma\delta$ T细胞, 发现极低浓度(0.002 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) TH-t能够促进 $\gamma\delta$ T细胞增殖、提高杀伤肿瘤细胞活性。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器 电子分析天平(型号Quintix 224-1CN, 分度值为0.1 mg)购自德国Sartorius公司。全自动生化分析仪(Abbott Laboratories C16000)购自美国芝加哥公司。流式细胞仪、流式细胞仪分析软件购自美

国BD公司, 每次检测样本细胞数 $\geq 2 \times 10^4$ 。7230G可见分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司。

1.1.2 药材 三叶青块根购自宁波鄞州医药药材公司, 经陆军第七十一集团军医院药剂科朱斌副主任药师鉴定, 为葡萄科植物三叶崖爬藤(*Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg)的干燥块根。

1.1.3 试剂 AB-8大孔吸附树脂(规格为HG2-885-76, 批号为20120314)购自天津市光复精细化工研究所。薄层色谱高效硅胶G板(HS-GF254, 规格为10 mm $\times$ 20 mm, 批号为20140610)购自烟台江友硅胶开发有限公司。无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、硝酸钠、三氯化铝均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。无血清培养基购自浙江博纳生物科技有限公司。异戊烯焦磷酸(isopentenylpprophosphate, IPP)、二甲基亚砜、四甲基偶氮唑蓝、儿茶素购自Sigma公司。Ficoll分离液购自中科院血液病研究所。重组IL-2购自厦门特宝生物工程股份有限公司。胎牛血清、RPML1640、胰蛋白酶购自Gibco公司。FITC标记的 $\gamma\delta$ TCR和PE标记的CD3抗体、APC标记的CD107a及PE标记的granzymeB和穿孔素(Perforin)购自杭州联科生物技术股份有限公司。水为纯化水。芦丁标准品(序列号为PCM-MA-005, 纯度 $\geq 97\%$ )购自天津士兰科技有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 三叶青总提取物的提取制备与水溶液配制 按照浙江省食品药品监督管理局和本课题组前期研究方法进行提取制备<sup>[2,10]</sup>, 取三叶青干燥块根药材 200 g, 除去杂质, 洗净, 润软, 切片机切薄片后用加热回流法提取, 按照1:5比例加入1 000 mL 80%的乙醇水溶液浸泡24 h后, 80 °C条件下加热回流提取, 共3次, 每次40 min, 合并提取液, 过滤, 减压回收蒸干, 制备得到三叶青总提取物(TH-t) 21.6 g, 得率10.8%。精密称取TH-t 0.55 g, 用DMSO配成100 mg/mL的贮存液, 再用纯化水稀释, 分别配制成需要量的三叶青总提取物水溶液。

1.2.2 三叶青总黄酮的检测 采用亚硝酸钠-三氯化铝法测定。室温下将10  $\mu$ L NaNO<sub>2</sub>(0.066 mol/L)分别加入96孔板中, 标准孔中分别加入25  $\mu$ L不同浓度的儿茶素标准品溶液; 测定管中加入25  $\mu$ L三叶青总提取物水溶液。混合反应5 min, 然后每孔加入15  $\mu$ L AlCl<sub>3</sub>(0.75 mol/L)溶液, 反应6 min。最后加入100  $\mu$ L NaOH(0.5 mol/L)溶液后混匀在510 nm下测定吸光度(*D*)值。儿茶素标准溶液系列浓度为31.25、62.5、125、250和500  $\mu$ g/mL, 样品总黄酮以mg表示。每样本设置3个复孔。结果以*D*值为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线, 通过标准曲线查找测定样本总黄酮含量。

1.2.3  $\gamma\delta$ T细胞的培养和鉴定 取健康自愿者外周抗凝血10 mL, 使用Ficoll分离液分离人外周血单个核细胞(human venous blood mononuclear cells, PBMC)。用 $\gamma\delta$ T细胞培养基[无血清培养基中加入终浓度200 U/mL rhIL-2和2 ng/mL IPP(isopentenyl pyrophosphate)]配成密度为 $5\times 10^5$ 个/mL的细胞悬液, 按每孔5 mL量加入到6孔细胞培养板内, 置于5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱内培养, 每2天用 $\gamma\delta$ T细胞培养基半量替换培养基, 同时将细胞密度调整至 $1\times 10^6$ 个/mL。收集培养10天 $\gamma\delta$ T细胞, 用流式细胞仪检测 $\gamma\delta$ TCR细胞纯度。

1.2.4  $\gamma\delta$ T细胞增殖实验 收集培养10天 $\gamma\delta$ T细胞, 用 $\gamma\delta$ T细胞培养基配成细胞密度为 $1\times 10^5$ 个/mL的细胞悬液, 按照每孔180  $\mu$ L量分别加入96孔培养板中, 再分别加入终浓度为0(含0.1% DMSO的 $\gamma\delta$ T细胞培养基的对照组, 下同)、0.0025、0.01、0.039、0.155、0.62、2.44、9.76、39.9、156  $\mu$ g/mL的TH-t, 每组实验重复5孔, 置细胞培养箱中培养, 在分别培养24、48、72 h后, 每孔加入20  $\mu$ L CCK8显色液, 继续放置在5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。4 h后用酶标仪检测各孔

吸光度(*D*)值, 设波长为450 nm, 同时记录结果。相同实验重复3次。

$\gamma\delta$ T细胞增殖率(%)=[(实验*D*值)/(对照*D*值)-1] $\times 100\%$

1.2.5 乳酸脱氢酶释放法(LDH)检测经TH-t诱导的 $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性 收集经终浓度分别为0(对照组)、0.0025、0.01、0.039、0.155、0.62、2.44、9.76和39.9  $\mu$ g/mL TH-t诱导48 h后的 $\gamma\delta$ T细胞, 用无血清培养基液洗涤2次, 将细胞配成密度为 $2\times 10^6$ 个/mL的细胞悬液, 并将其作为效应细胞; 收集对数生长期的靶细胞(HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株), 无血清培养基液洗涤2次, 分别配成密度为 $2\times 10^5$ 个/mL的细胞悬液; 分别取效应细胞和靶细胞各0.5 mL, 轻轻混合(效靶细胞比例为10:1), 同时设置对照组。置于5% CO<sub>2</sub>和37 °C细胞箱中培养, 6 h后, 取出重悬细胞, 1 500 r/min离心10 min, 收集离心上清液。按刘军权等<sup>[11]</sup>报告方法用LDH试剂盒严格按照操作说明书上的要求进行检测, 自动生化分析仪在340 nm波长下测定LDH单位(U/L)。每次检测样本设3个复管, 相同实验重复3次, 取平均结果进行杀伤活性换算。

$\gamma\delta$ T细胞杀伤活性(%)=(测定管LDH单位-效应细胞自然释放LDH管)/(靶细胞最大释放LDH管-靶细胞自然释放LDH管) $\times 100\%$ 。

1.2.6 流式细胞法检测 $\gamma\delta$ T细胞CD107a、granzymeB和Perforin表面标记 收集培养10天的 $\gamma\delta$ T细胞, 用无血清培养基液洗涤2次, 将细胞配成密度为 $5.0\times 10^5$ 个/mL悬液, 按照每孔3 mL量接种于12孔细胞培养板, 分别加入终浓度为0(对照组)、0.0025、0.01、0.039、0.155、0.62、2.44、9.76和39.9  $\mu$ g/mL的TH-t, 每组设制3个复孔。放置于CO<sub>2</sub>培养箱中诱导培养, 48 h后分别收集细胞, PBS洗涤2次, 将细胞用PBS配成 $1.0\times 10^7$ 个/mL的细胞悬液, 分别吸取100  $\mu$ L于测试管中, 加入5  $\mu$ L FITC标记的anti- $\gamma\delta$  TCR试剂, 避光, 常温孵育30 min。每管加入100  $\mu$ L固定液, 在室温下置避光处孵育15 min, PBS缓冲液洗涤1次。分别加入100  $\mu$ L破膜剂、20  $\mu$ L anti-Perforin-PE抗体、20  $\mu$ L PE标记的anti-granzyme B抗体和10  $\mu$ L APC标记的CD107a抗体, 常温避光孵育15 min, PBS洗涤1次, 加入0.5 mL PBS混匀后, 用流式细胞仪检测 $\gamma\delta$ T细胞Perforin、CD107a和granzymeB的表达率。

1.2.7 TH-t抑制肿瘤细胞株生长实验 取对数生长期的HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株, 用无血清培



培养基分别配制成 $5 \times 10^4$ 个/mL的悬液,按照每孔180  $\mu$ L量加入到96孔细胞板中,每个样品重复5次;将细胞培养板置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,实验组加入终浓度分别为0(对照组)、0.036、0.155、0.62、2.44、9.75、39.9和156  $\mu$ g/mL的TH-t。置于CO<sub>2</sub>培养箱中培养孵育48 h;每孔加入20  $\mu$ L MTT,继续于CO<sub>2</sub>培养箱中培养孵育4 h,弃上清,每孔加入150  $\mu$ L DMSO,混匀致甲赞完全溶解,用波长495 nm的酶标仪测定各孔吸光度(D)值。相同实验重复3次,求平均值。细胞抑制率(%)=[1-(实验D值)/(对照D值)] $\times$ 100%。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差,计量数值使用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,检验水准 $\alpha=0.05$ , $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三叶青总提取物中总黄酮含量

应用亚硝酸钠-三氯化铝法检测本次三叶青总提取物中总黄酮含量为2.3 mg/g。

### 2.2 $\gamma\delta$ T细胞鉴定

流式细胞法检测结果如图1显示, $\gamma\delta$ T细胞 $\gamma\delta$ TCR表达率在培养前外周血中为3.12%,培养10天后 $\gamma\delta$ TCR表达率为90.46%。

### 2.3 总提取物(Th-t)对 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响

我们在前期预实验中发现,三叶青各个提取阶段的提取物对 $\gamma\delta$ T细胞生长的影响有较大差异,其中以Th-t促进 $\gamma\delta$ T细胞增殖能力最强。因此,本研究选用Th-t进行相关实验。图2结果表明:诱导72 h、浓度为0.62  $\mu$ g/mL的Th-t对 $\gamma\delta$ T细胞的作用最明显(增

殖率达44.5%),显著高于对照组(0)(增殖率达3.5%),组与组之间比较有统计学差异( $P < 0.05$ ),Th-t浓度过高可抑制 $\gamma\delta$ T细胞生长。在Th-t浓度为0.01~9.76  $\mu$ g/mL范围时,诱导时间越长, $\gamma\delta$ T细胞增殖率升高越明显,组与组之间比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。

### 2.4 TH-t对 $\gamma\delta$ T细胞granzymeB、CD107a和Perforin表达的影响

图3和表2结果所示,与0  $\mu$ g/mL(对照组)相比,浓度为0.002 5、0.01、0.039、0.155、0.62、2.44、9.76和39.9  $\mu$ g/mL的TH-t作用 $\gamma\delta$ T细胞48 h后,其granzymeB、CD107a和Perforin阳性明显升高,在0.01~2.44  $\mu$ g/mL浓度间,有一定的剂量相关性。三叶青总提取物TH-t浓度为0.15  $\mu$ g/mL时,诱导的 $\gamma\delta$ T细胞granzymeB、CD107a和Perforin阳性表达率达到最高值(分别为76.90% $\pm$ 2.30%、81.40% $\pm$ 6.70%和30.50% $\pm$ 1.30%),显著高于对照组(65.40% $\pm$ 1.29%、75.30% $\pm$ 6.60和25.10% $\pm$ 2.30%),组间相比有统计学差异( $P < 0.05$ );当TH-t浓度高于0.62  $\mu$ g/mL时, $\gamma\delta$ T细胞granzymeB、CD107a和Perforin阳性表达率逐渐降低。

### 2.5 TH-t诱导后 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞株杀伤活性

图4实验结果表明,经TH-t浓度为0.01~2.44  $\mu$ g/mL诱导72 h后的 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株杀伤活性显著高于对照组,每组间比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。经0.125  $\mu$ g/mL TH-t诱导后的 $\gamma\delta$ T细胞杀伤肿瘤HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株的活性最高(分别为72.1%、52.3%和79.1%),显著高于对照组(分别为38.5%、30.5%和41.2%),组间比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。TH-t浓度高于2.44  $\mu$ g/mL时, $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性随浓度增高而降低,且过高的

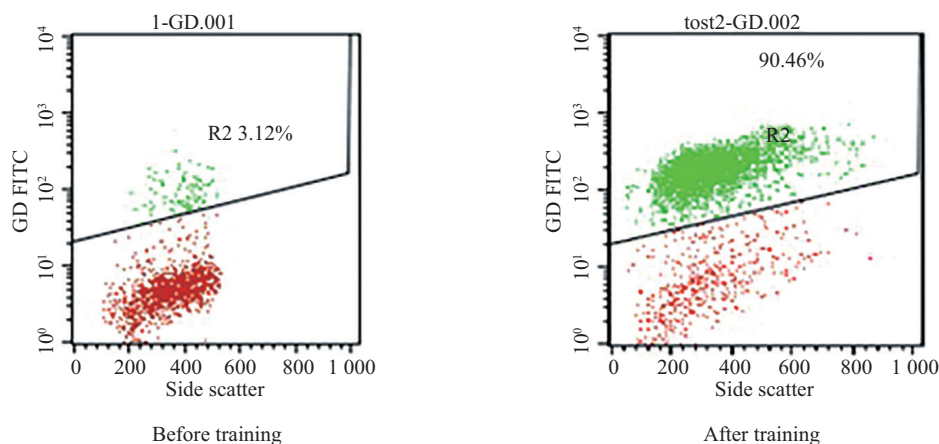
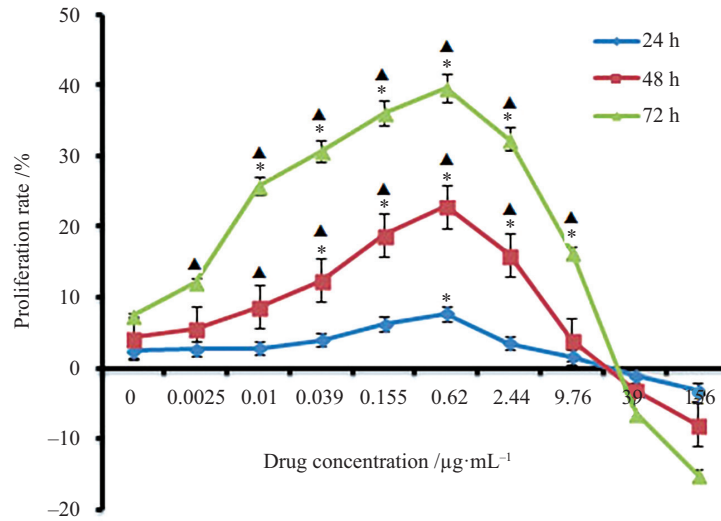


图1 培养前后 $\gamma\delta$ T细胞的表型变化

Fig.1 Phenotypic changes of  $\gamma\delta$ T cells before and after culture



▲ $P < 0.05$ , 与相同TH-t浓度不同诱导时间的结果比较; \* $P < 0.05$ , 与诱导时间相同的对照组(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )比较。

▲ $P < 0.05$  compared with the results of different induction time at the same TH-t concentration; \* $P < 0.05$  compared with the control group (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with the same induction time, respectively.

图2 TH-t不同浓度和诱导时间对 $\gamma\delta$ T细胞生长影响

Fig.2 Effect of different concentrations of TH-t and induction time on the growth of  $\gamma\delta$ T cells

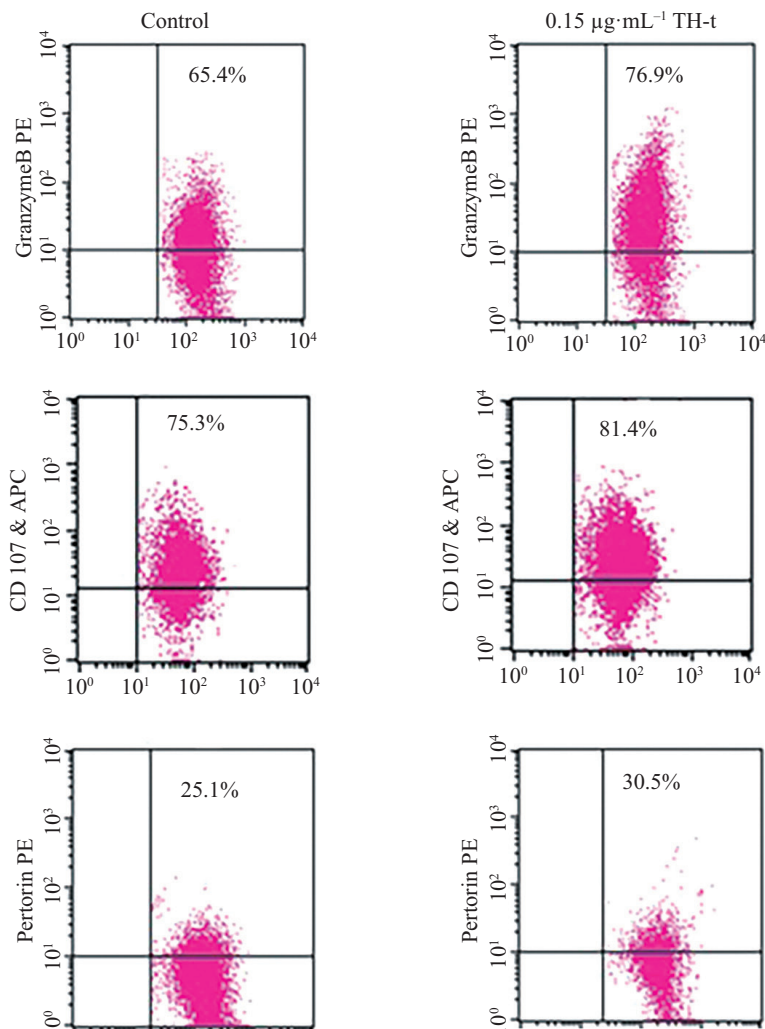
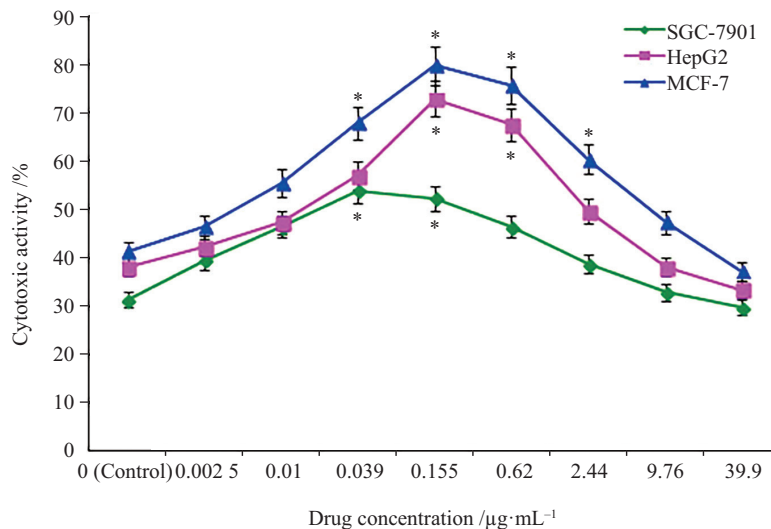


图3 浓度为0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TH-t诱导的 $\gamma\delta$ T细胞granzymeB、CD107a和Perforin阳性表达率

Fig.3 Positive expression rates of granzymeB, CD107a, and Perforin in  $\gamma\delta$ T cells after induction at TH-t concentration of 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$

表2 不同浓度TH-t诱导的 $\gamma\delta$ T细胞粒酶B, CD107a和穿孔素的表达率Table 2 Positive expression rates of granzymeB, CD107a and Perforin in  $\gamma\delta$ T cells induced by TH-t at different concentrations

检测项目 Test items	TH-t浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TH-t concentration / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$							
	0 (Control)	0.002 5	0.01	0.15	0.62	2.44	9.76	39.9
Granzyme B	65.4±6.8	65.5±6.6	70.5±6.1	76.9±7.1*	73.4±6.8*	69.3±6.1	63.8±6.2	54.9±6.2
Perforin	25.1±2.2	25.3±2.3	28.9±2.1*	30.5±3.1*	29.5±2.5	27.8±2.2	25.0±1.8	20.3±1.7
CD107a	75.3±6.6	75.1±7.9	78.4±8.3	81.4±6.7	80.6±8.3	79.5±6.7	74.3±6.7	70.7±6.5

\* $P<0.05$ , 与相同标记物的对照组(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )相比。\* $P<0.05$  compared with the control group with the same label (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).\* $P<0.05$ , 与相同肿瘤株的对照组结果(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )比较。\* $P<0.05$  compared with control group results (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the same tumor strain.图4 TH-t诱导后的 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞杀伤活性结果Fig.4 Result of killing activity of  $\gamma\delta$ T cells on tumor cells induced by TH-t

TH-t浓度可抑制 $\gamma\delta$ T细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。

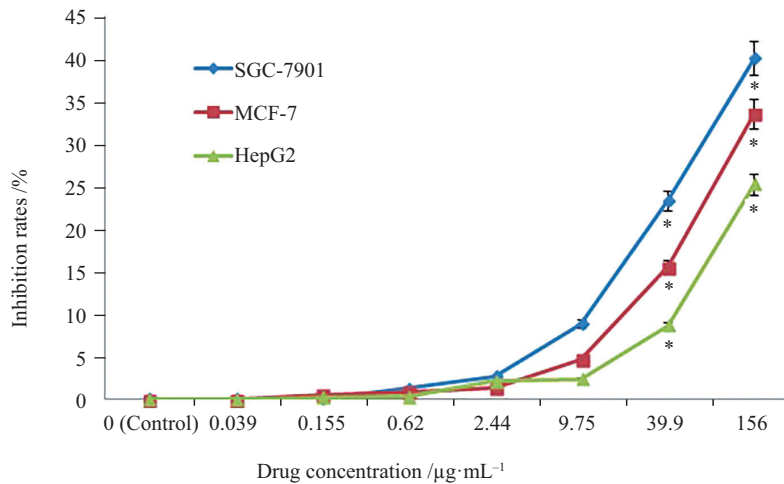
## 2.6 TH-t对肿瘤细胞生长的抑制作用

图5结果所示,将肿瘤HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株分别用不同浓度的TH-t进行诱导,72 h后,TH-t浓度 $\geq 9.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ 对三株肿瘤细胞均有抑制作用,随着TH-t浓度的增加肿瘤细胞抑制越明显。浓度低于 $9.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时TH-t对各肿瘤细胞株无明显抑制作用。TH-t浓度高于 $39 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时对肿瘤细胞的抑制率与相同肿瘤细胞株的对照组比较有统计学差异( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

近年来,肿瘤生物治疗受到越来越多关注。其中细胞免疫治疗是生物治疗的重要组成部分。 $\gamma\delta$ T细胞主要分布于人上皮组织和黏膜内,抗肿瘤作用较强,以MHC非限制性识别肿瘤<sup>[12]</sup>,通过granzyme B和Perforin等途径杀伤肿瘤细胞<sup>[13]</sup>。 $\gamma\delta$ T细胞介与

固有免疫细胞和适应性免疫细胞之间,能相互辅助机体细胞免疫发挥抗肿瘤作用。 $\gamma\delta$ T细胞CD107aPb分子与 $\gamma\delta$ T细胞活化以后脱颗粒相关,其表达率直接反应其细胞的杀伤活性。 $\gamma\delta$ T细胞CD107a的表达与 $\gamma\delta$ T细胞抗肿瘤能力呈正相关<sup>[14]</sup>。 $\gamma\delta$ T细胞临床治疗中有特定的应用途径,杜玉林等<sup>[15]</sup>研究发现,水飞蓟宾能够增强 $\gamma\delta$ T细胞对胃癌SGC-7901细胞杀伤活性。SUGIE等<sup>[16]</sup>报道,较低数量 $\gamma\delta$ T细胞联合唑来膦酸可使患者从中受益。TERUKI等<sup>[17]</sup>发现, $\gamma\delta$ T细胞结合联合低剂量吉西他滨膀胱内灌注可以提高膀胱癌的疗效,其机理可能是吉西他滨上调肿瘤细胞主要组织相容性复合体-I类分子链相关蛋白A和B(MICA/B)的表达,而MICA和MICB是 $\gamma\delta$ T细胞可以识别的肿瘤相关抗原。PAULINE等<sup>[18]</sup>发现,黑色素瘤患者肿瘤浸润性 $\gamma\delta$ T细胞数量与临床进程直接相关,可能与肿瘤浸润的 $\gamma\delta$ T和 $\delta 2^+$ 子集的高比例及允许免疫逃逸和肿瘤进展的关键检查点有关。BECK



\* $P < 0.05$ , 与相同肿瘤细胞株的对照组结果( $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ )比较。

\* $P < 0.05$  compared with control group results ( $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the same tumor strain.

图5 TH-t对HepG2、SGC-7901和MCF-7细胞株的抑制率

Fig.5 Inhibition rates of TH-t on HepG2, SGC-7901 and MCF-7 cell lines

等<sup>[19-20]</sup>通过同基因乳腺癌小鼠模型和人乳腺癌移植小鼠模型证明, $\gamma\delta$ T细胞在体内具有抗肿瘤作用,他们从外周血PBMC分离扩增的 $\gamma\delta$ T细胞与多种人乳腺癌细胞共孵育后观察到 $\gamma\delta$ T细胞能显著抑制和杀伤肿瘤细胞。业内也有将 $\gamma\delta$ T细胞通过嵌合抗原制备成 $\gamma\delta$ TCART效应细胞,应用于实验和临床研究<sup>[21]</sup>。目前, $\gamma\delta$ T细胞已经成为肿瘤患者过继免疫治疗的一个新的候选免疫效应细胞,为了更好地满足临床过继细胞免疫治疗的需要,在实验室内扩增出高活性且有较多数量的 $\gamma\delta$ T细胞是细胞免疫治疗领域共同研究方向。

三叶青为我国特有珍稀植物,根据当地民间经验,长期以来使用三叶青治疗发热、疼痛、感染等疾病,收到良好疗效。三叶青中含有黄酮类、氨基酸类、萜类、强心苷类、甾体类、多糖类、有机酸类、挥发油和油脂以及丰富的微量元素,但是三叶青中重要的成分是总黄酮。近年来,三叶青抗肿瘤研究多集中于总黄酮及其他有效成分,YANG等<sup>[22-23]</sup>发现,黄酮具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡等作用。文献记载,临床应用发现,三叶青能够抑制肿瘤细胞生长,延长患者生存期,改善生命质量<sup>[24-26]</sup>。因此,深入研究三叶青抗肿瘤有效成分,以及抗肿瘤活性机制,对于进一步阐明并推动三叶青的临床抗肿瘤应用具有重要的意义。本课题组前期研究发现,三叶青总提取物(Th-t)、石油醚萃取部位(Th-p)、水部位脱糖流分(Th-w2)、水煮脱糖部位(Th-w3)能够在体外诱导扩增自然杀伤细胞,从而获

得大量的、应用安全、纯度较高以及杀伤活性强的自然杀伤细胞<sup>[1-2]</sup>;还发现低浓度三叶青正丁醇提取部位能显著促进人树突状细胞吞噬功能,促进其表面标志物CD80和CD86表达,提高树突状细胞成熟标记和IL-12分泌能力<sup>[3]</sup>。本研究表明,只需很低的剂量TH-t即可明显促进人 $\gamma\delta$ T细胞增殖,提高 $\gamma\delta$ T细胞的杀瘤活性。

本实验结果提示,Th-t诱导的 $\gamma\delta$ T细胞 granzymeB、CD107a和Perforin表达率明显高于对照组,浓度在 $0.15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,Th-t增加 $\gamma\delta$ T细胞 granzymeB、CD107a和Perforin表达最明显;本研究通过乳酸脱氢酶释放法检测 $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性,佐证了 $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性增强与 granzymeB、CD107a和Perforin表达比例增高相关。并且 $\gamma\delta$ T细胞杀伤活性和扩增倍数增高的趋势与TH-t作用于时间成正相关。本次实验研究还发现,TH-t浓度在 $0.125 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时诱导的 $\gamma\delta$ T细胞对HepG2、SGC-7901和MCF-7肿瘤细胞株杀伤活性可达到66.4%、75.1%和79.7%显著高于对照组( $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (分别为38.4%、41.8%和41.2%)。由此提示,应用三叶青为主药治疗肿瘤时,其作用原理可能是通过发挥和增强机体的抗肿瘤免疫细胞而发挥作用。本次实验也进一步证明,低浓度( $0.0025 \mu\text{g}/\text{mL}$ 左右) Th-t能明显促进人 $\gamma\delta$ T细胞的增殖,提高 $\gamma\delta$ T细胞的杀伤活性;高浓度的Th-t抑制 $\gamma\delta$ T细胞对三株肿瘤细胞的杀伤活性可能与过量药物的细胞毒性有关。

综上所述,Th-t不仅能促进 $\gamma\delta$ T细胞的增殖,而



且低浓度的用量还可以增强 $\gamma\delta$ T细胞杀伤肿瘤细胞的能力。本实验结果可为三叶青提取物应用临床某些疾病的治疗提供理论依据。

### 参考文献 (References)

- [1] 袁雨, 朱炳喜, 刘军权, 等. 三叶青水提取物对NK细胞杀伤胃癌BGC-823细胞的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志(YUAN Y, ZHU B X, LIU J Q, et al. Effect of the water extract of tetragium hemsleyani on the cytotoxic activity of NK cells against gastric cancer cell lines BGC-823 [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology Chin J Gastroenter Hepatol), 2016, 25(6): 633-7.
- [2] 刘军权, 陈锦阳, 杨阳. 一种体外诱导扩增NK细胞的方法[S]. 中国专利, 专利号(LIU J Q, CHEN J Y, YANG Y. A method to induce and expand NK cells *in vitro*. Chinese patent: patent number): CN201510090232.5, 2015-05-27.
- [3] 廖雨琴, 许青, 祝宇翀, 等. 三叶青提取物对人树突状细胞功能的影响[J]. 中华临床实验室管理电子杂志(LIAO Y Q, XU Q, ZHU Y Q, et al. Effects of tetragium hemsleyanum extract on human dendritic cells function [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Management), 2019, 7(3): 150-5.
- [4] CHEN S P, LUO M X, M L, et al. Ethylacetate extract from tetragium hemsleyanum inhibits proliferation and induces apoptosis in HepG2 and SMMC-7721 cells [J]. Cancer Manag Res, 2018, 21(10): 3793-9.
- [5] XIA G S, LI S H, ZHOU W. Isoquercitrin, ingredients in tetragium hemsleyanum dielset gilg, inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced tumor cell migration and invasion [J]. Cell Adh Mig, 2018, 12(5): 464-71.
- [6] LIN Z, CNEN L, QIU Q. Isolation and identification of antiproliferative compounds from the roots of tetragium hemsleyanum against MDA-MB-435S cell lines [J]. Pak J Pharm Sci, 2016, 29(4): 1171-5.
- [7] PENG X, ZHANG Y Y, WANG J. Ethylacetate extract from tetragium hemsleyanum induces apoptosis via the mitochondrial caspase-dependent intrinsic pathway in HepG2 cells [J]. Tumor Biol, 2016, 37(1): 865-76.
- [8] SILVA-SANTOS B, MENSURADO S, COFFELT S B.  $\gamma\delta$  T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(7): 392-04.
- [9] 刘军权, 陈复兴, 巩新建, 等. 自身 $\gamma\delta$ T细胞联合阿司匹林治疗晚期胃癌的实验研究和临床疗效观察[J]. 医学研究杂志(LIU J Q, CHEN F X, GONG X J, et al. Experimental and clinical study on advanced gastric cancer with autologous  $\gamma\delta$ T cell combined with aspirin [J]. Journal of Medical Research), 2009, 38(12): 32-6.
- [10] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范[M], 2015版. 北京: 中国医药科技出版社, 2016: 18-9.
- [11] LIU J Q, HAN H M, CHEN F X. Cytotoxicities of LAK cell using the LDH kits [J]. Chin Clin Lab Sci, 1995, 13: 83.
- [12] WESCH D, PETERS C, OBERG H H. Modulation of  $\gamma\delta$  T cell responses by TLR ligands [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(14): 2357-70.
- [13] LEGUT M, COLE D K, SEWELL A K. The promise of  $\gamma\delta$  T cells and the  $\gamma\delta$  T cell receptor for cancer immunotherapy [J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12(6): 656-68.
- [14] NOREMBERG J, MEGGYES M, JAKSO P, et al. TIM-3 and TIM-1 could regulate decidual  $\gamma\delta$ TCR bright T cells during murine pregnancy [J]. J Immunol Res, 2019, 20: 1-12.
- [15] 杜玉林, 王莹, 刘军权, 等. 水飞蓟宾对 $\gamma\delta$ T细胞杀伤胃癌细胞SG-7901的影响及其机制初探[J]. 现代免疫学(DU Y L, WANG Y, LIU J Q, et al. The effect of silibinin on  $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity against gastric cancer SGC-7901 cells and the mechanism [J]. Current Immunol), 2015, 35(4): 289-93.
- [16] SUGIE T, SUZUKI E, YAMAUCHI A, et al. Combined effects of neoadjuvant letrozole and zoledronic acid on  $\gamma\delta$ T cells in postmenopausal women with early-stage breast cancer [J]. Breast, 2018, 38(2018): 114-9.
- [17] SHIMIZU T, TOMOGANE M, MIYASHITA M, et al. Low dose gemcitabine increases the cytotoxicity of human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells in bladder cancer cells in vitro and in an orthotopic xenograft model [J]. Oncoimmunol, 2018, 7(5): 1-12.
- [18] GIRARD P, CHARLES J, CLUZEL C, et al. The features of circulating and tumor-infiltrating  $\gamma\delta$  T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome [J]. Onco Immunol, 2019, 8(8): 1601483.
- [19] BECK B H, KIM H G, KIM H, et al. Adoptively transferred ex vivo expanded gammadelta-T cells mediate *in vivo* antitumor activity in preclinical mouse models of breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 122(1): 135-44.
- [20] AGGARWAL R, LU J, KANJI S, et al. Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells limit breast cancer growth by modulating cell survival-apoptosis-related molecules and microenvironment in tumors [J]. Int J Cancer, 2013, 133(9): 2133-44.
- [21] ROTOLO R, LEUCI V, DONINI C, et al. CAR-based strategies beyond t lymphocytes: integrative opportunities for cancer adoptive immunotherapy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2839): 1-23.
- [22] YANG X, YANG Z, CHENG X, et al. Analysis on phenotypic diversity of tetragium hemsleyanum from different provenances [J]. J Plant Res Environment, 2019, 28(3): 78-83.
- [23] ZHONG L R, WEI K M. Radix tetragium hemsleyani flavone suppresses human lung carcinoma A549 cell by regulating MAPKs pathway [J]. Chin Pharmacol Bull, 2014, 30(1): 101-4.
- [24] 罗梅秀, 马良, 林文俊, 等. 三叶青乙酸乙酯提取物对肝癌细胞HepG2凋亡的影响及机制[J]. 武汉大学学报(医学版)(LUO M X, MAL, LIN W J, et al. Effect of ethyl acetate extract of tetragium hemsleyanum on apoptosis of HepG2 and its mechanism [J]. Medical Journal of Wuhan University), 2019, 40(1): 37-41.
- [25] 李礼斌, 杨絮, 胡轶娟, 等. 不同提取方法对三叶青乙醇浸提物含量及肺癌细胞A549增殖抑制的影响[J]. 浙江中医杂志(LI L B, YANG S, HU Y J, et al. Effects of different extraction methods on ethanol extract content of tetragium hemsleyanum dielset gilg and proliferation inhibition of lung cancer cell A549 [J]. Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine), 2019, 54(5): 384-5.
- [26] 郭菁菁, 赵英杰, 李伟, 等. 三叶青地上部分多糖对乳腺癌小鼠的抗肿瘤作用[J]. 中成药(GUO J J, ZHAO Y J, LI W, et al. Antitumor effect of polysaccharides from above-ground cloverleaf on breast cancer mice [J]. Chinese Traditional Patent Medicine), 2019, 41(4): 916-9.