

· 基础研究 ·

## 花姜酮对小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞分化功能的影响及机制

陈菲菲, 毛山, 史莹, 周丹阳, 张金梅, 谷伟\*

南京医科大学附属南京医院呼吸科, 江苏 南京 210006

**[摘要]** **目的:**建立小鼠 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的体外诱导及培养方法,同时探讨花姜酮(Zerumbone)对 Treg 细胞的分化、分泌功能的影响及其机制。**方法:**从 BALB/c 小鼠的脾脏分离、纯化 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 细胞,加入转化生长因子(transforming growth factor, TGF)-β(5 ng/mL)、白细胞介素(interleukin, IL)-2(30 μg/mL)促进 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 细胞向 Treg 细胞分化。Treg 细胞被分为 5 组:正常组、模型对照组、Zerumbone(1 μmol/L)组、Zerumbone(10 μmol/L)组、Zerumbone(30 μmol/L)组。流式细胞术检测各组 Treg 细胞的比例,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测 IL-10 含量, Foxp3、IL-10 mRNA 的表达用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测。**结果:**本实验方法使 Treg 细胞的诱导比例明显升高( $P < 0.01$ )。与模型对照组相比, Zerumbone 组的 Treg 细胞比例呈剂量依赖性升高( $P$  均  $< 0.05$ )。IL-10 蛋白的表达与模型对照组比较也呈剂量依赖性升高( $P$  均  $< 0.05$ ), Foxp3、IL-10 mRNA 的表达同样升高( $P < 0.05$ ),其中 Zerumbone(30 μmol/L)组升高最明显( $P < 0.01$ )。**结论:**在体外实验中, Zerumbone 可以促进 BALB/c 小鼠体内的 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 细胞向 Treg 细胞分化,并促进 IL-10 蛋白的表达,其机制可能与诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 特异性转录因子 Foxp3 的表达有关。

**[关键词]** 花姜酮; CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 细胞; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg; 白细胞介素-10

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)02-205-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190209

## The effects of Zerumbone on the differentiation and functions of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells

Chen Feifei, Mao Shan, Shi Ying, Zhou Danyang, Zhang Jinmei, Gu Wei\*

Department of Respiratory Medicine, Nanjing First Hospital, NMU, Nanjing 210006, China

**[Abstract]** **Objective:** To explore an induced and culture method for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells *in vitro*, study the effect of Zerumbone about the differentiation and secretion functions of Treg cells and explore the mechanisms included. **Methods:** CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T cells were isolated from BALB/c mice spleen and purified with magnetic bead methods. CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T cells were co-cultured with transforming growth factor(TGF)-beta(5 ng/mL), interleukin(IL)-2(30 μg/mL) for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg polarization. The cultured CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells were divided into five groups: the normal group; the induced group, which were cultured with the above protocol; Zerumbone(1 μmol/L) group; Zerumbone(10 μmol/L) group; Zerumbone(30 μmol/L) group. Flow cytometry was used to detect the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells. The ELISA method was detected the levels of IL-10. Reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)was detected the level of IL-10 mRNA and Foxp3 mRNA. **Results:** The proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells cultured with the protocol were significantly higher compared with the normal group ( $P < 0.05$ ). The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells proportion in Zerumbone(1 μmol/L), Zerumbone(10 μmol/L), Zerumbone(30 μmol/L) groups were significantly increased compared with group model, there is dose dependent( $P < 0.05$ ). The protein level of IL-10 was increased by Zerumbone and that was also dose-dependent. Zerumbone increased the expression of IL-10 mRNA and Foxp3 mRNA ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Zerumbone can increase the differentiation of splenic CD4<sup>+</sup>CD62L Zerumbone into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells and induce the expressions of IL-10 protein *in vitro*. The results may be thought the activation of Foxp3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells.

**[Key words]** Zerumbone; CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T cells; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg cells; IL-10

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02):205-209]

**[基金项目]** 南京市卫计委杰出青年基金(JQX16028)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: guw2001@126.com

哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,目前Th1/Th2失衡学说已经被广泛接受,但人们逐渐发现它并不能完全解释哮喘的发病机制。近年来,人们发现CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞与自身免疫性疾病、过敏性疾病及肿瘤等发生密切相关,尤其在哮喘发病机制中的作用受到广泛关注。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞可以分为两类:nTreg(natural Tregs)亚群和iTreg(inducible Tregs)亚群。nTregs在胸腺中发育,而iTregs在外周由幼稚细胞或者其他分化细胞经TGF-β、IL-2和抗原的共同刺激诱导发育而来<sup>[1]</sup>。nTregs主要通过细胞膜表面分子间相互接触实现免疫抑制作用<sup>[2]</sup>。另一方面,iTregs主要通过分泌细胞因子如IL-10、TGF-β等实现免疫抑制作用。

植物来源的天然产物被当作药用已有千年历史,姜艳山姜油提取物的主要成分花姜酮(Zerumbone,2,6,9,9-四甲基环十一碳-2,6,10-三烯-1-酮)是含有共轭二烯酮结构的单环倍半萜类物质<sup>[3]</sup>。在许多体外及动物模型实验中已经证明它具有抗炎和抗肿瘤特性。研究发现,花姜酮的抗炎作用是通过抑制前炎症基因和抗氧化途径实现的。本研究旨在探讨在体外花姜酮能否通过促进Foxp3的表达来促进iTregs细胞的分化及IL-10的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

6~8周BALB/c SPF级雌性小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),花姜酮(Zerumbone,Sigma公司,美国),RPMI-1640培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(FBS,Hyclone公司,美国),LS column、MS column、CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T Cell Isolation Kit II(美天妮,德国),TGF-β、IL-2(R&D公司,美国),anti-mouse CD28、anti-mouse CD3、anti-CD4-FITC、Foxp3 Staining Buffer Set、Protein Transport Inhibitor Cocktail、Cell Stimulation Cocktail(eBioscience公司,美国),淋巴细胞分离液(深圳达科为公司),小鼠IL-10 ELISA试剂盒(R&D公司,美国),流式细胞仪(BD公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分离纯化BALB/c小鼠脾脏CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T细胞

用颈椎脱臼方法处死小鼠,将其置于75%酒精中浸泡5~10 min,无菌分离小鼠脾脏,放于无菌PBS中洗涤后,加入淋巴细胞分离液,置于200目筛网研磨,使用30 μmol/L pre-separation Filter过滤,然后收集细胞悬液,离心30 min,用Buffer洗涤后,PBS重悬计数。按照Mini MACS CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T Cell Iso-

lation Kit II说明书分离纯化CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T细胞。

#### 1.2.2 Treg细胞体外培养

收集分离纯化的CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T细胞,细胞密度调整为1×10<sup>6</sup>个/mL,将细胞接种在提前包被好抗CD28抗体(3 pg/mL)、抗CD3抗体(10 pg/mL)的96孔板中,同时加入IL-2(30 μg/mL)、TGF-β(5 ng/mL)促进CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T细胞向Treg细胞的分化。将其放于培养箱(37℃、21%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>)中培养72 h后收集细胞,用流式细胞仪分析Treg细胞的分化情况,RT-PCR检测细胞Foxp3、IL-10 mRNA的表达水平。ELISA检测上清液中IL-10的表达情况。

#### 1.2.3 实验分组

CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T细胞分为5组。正常组(不加诱导因子)、模型对照组(按1.2.2方案培养)、Zerumbone(1 μmol/L)、Zerumbone(10 μmol/L)、Zerumbone(30 μmol/L)。

#### 1.2.4 流式细胞仪检测

收集各组细胞分别用磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,离心后用100 μL Buffer重悬,加入FITC标记的抗CD4抗体(1.25 pg/mL),APC标记的抗CD25抗体(0.6 pg/mL)于4℃避光孵育30 min。用4℃PBS冲洗后加入固定、破膜剂4℃避光再次孵育30 min。PBS冲洗2遍,加入PE标记的抗Foxp3抗体,再次避光孵育30 min。PBS冲洗2遍后,进行流式细胞检测。

#### 1.2.5 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)

采用以上方法培养细胞72 h后,收集上清液,采用ELISA法,检测各组上清液中IL-10的水平。

#### 1.2.6 实时荧光定量PCR(RT-PCR)的方法检测Foxp3、IL-10 mRNA的表达

应用TRIzol(Invitrogen公司,美国)方法提取每组细胞总RNA。使用Prime Script™ RT Master Mix Perfect Real Time试剂盒(TaKaRa公司,日本),将RNA逆转录为cDNA。Foxp3的引物序列:上游:5'-CTGCCTTGGTACATTCGTGAAC-3',下游:5'-ATGT-TGTGGGTGAGTGCTTTG-3'。IL-10的引物序列:上游:5'-ACAGCCGGGAAGACAATAAC-3',下游:5'-CAGCTGGTCCTTTGTTTGAAG-3'。β-actin上游:5'-GCGTGACATCAAAGAGAAGCT-3',下游:5'-ATGCCACAGGATTCATACC-3'。PCR反应体系(20 μL):SYBR®PremixExTaq™(2×,TaKaRa公司,日本)10 μL,上游引物(10 μmol/L):0.4 μL,下游引物(10 μmol/L):0.4 μL,ROX Reference Dye II(TaKaRa公司,日本)0.4 μL,模板cDNA:2.0 μL,DEPC水

6.8 μL。每个样本设3个复孔,于7500RT-PCR机(ABI PRISM<sup>®</sup>)行PCR反应。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS19.0对数据进行统计分析,定量数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组均数间差异的显著性用单因素方差分析,两两比较采用SNK法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

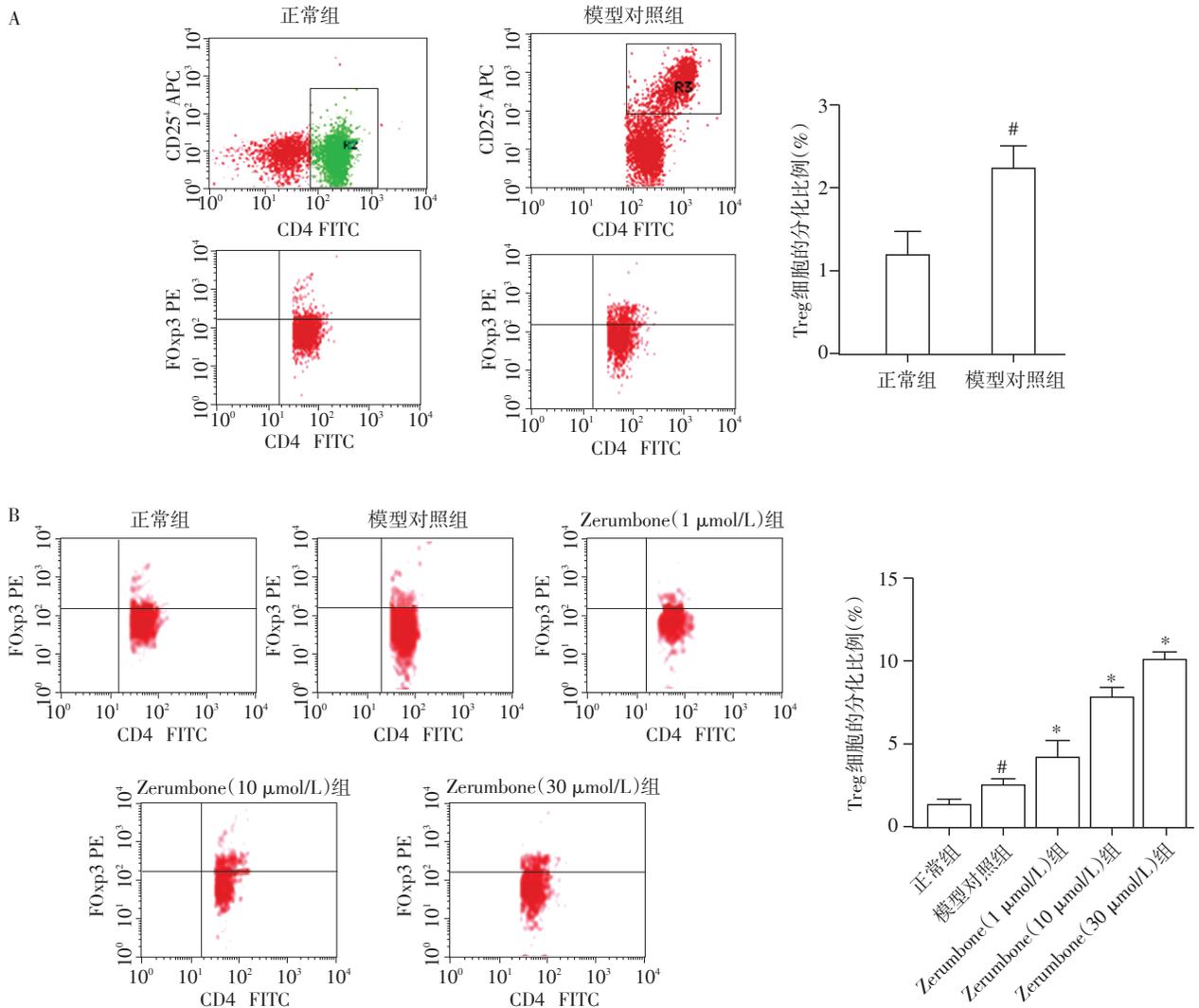
### 2.1 体外培养小鼠Treg细胞

新鲜分离的CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T淋巴细胞群经过本实验方案培养后,模型对照组Treg细胞的分化比例为(2.02 ± 0.56)%。Zerumbone(1、10、30 μmol/L)剂量依赖性提高Treg细胞的数量。Zerumbone

(1 μmol/L)组Treg细胞的分化比例为(4.75 ± 0.87)% ,Zerumbone(10 μmol/L)组Treg细胞的分化比例为(8.67 ± 0.76)% ,Zerumbone(30 μmol/L)组Treg细胞的分化比例为(10.75 ± 0.79)%。Zerumbone 3个剂量组与模型对照组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图1)。

### 2.2 上清液中IL-10的表达水平

正常组基本测不出IL-10,模型对照组IL-10的含量(17.12 ± 3.98)pg/mL,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Zerumbone(1 μmol/L)组(29.65 ± 2.35)pg/mL, Zerumbone(10 μmol/L)组(44.58 ± 5.60)pg/mL, Zerumbone(30 μmol/L)组(64.85 ± 3.79)pg/mL。Zerumbone不同剂量组IL-10的表达与模型对照组



A: 正常组和模型对照组中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞比例;B: 加入不同浓度Zerumbone(1、10、30 μmol/L)后各组CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞比例。与正常组相比, # $P < 0.05$ ;与模型对照组相比, \* $P < 0.05$ 。

图1 不同组细胞中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg细胞的比例

Figure 1 Percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg cells in different groups

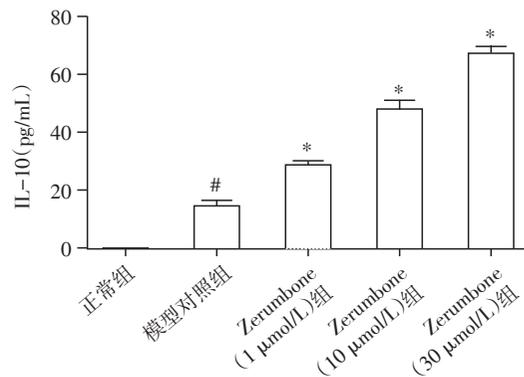
相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图2)。

### 2.3 各组细胞 Foxp3、IL-10 mRNA 的表达水平

正常 BALB/c 小鼠脾脏细胞经磁珠筛选的 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 淋巴细胞,再经过诱导分化或不同浓度 Zerumbone 处理后,各组 Foxp3、IL-10 mRNA 的含量显著高于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图3)。

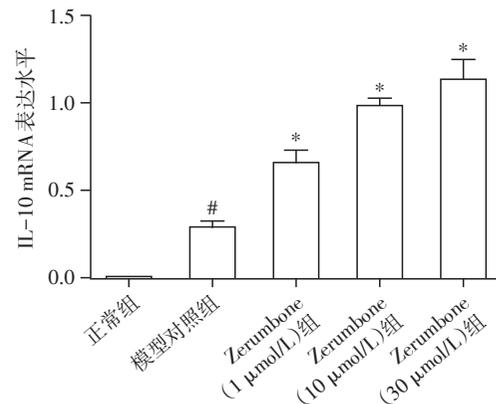
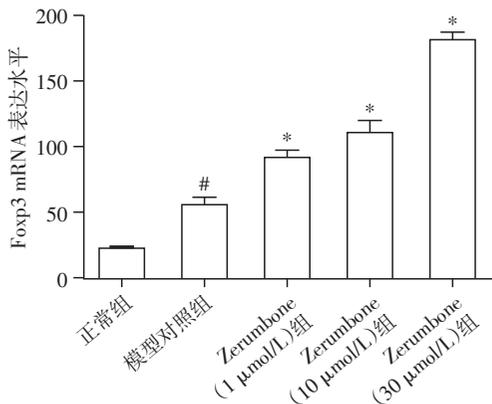
## 3 讨论

Treg 细胞是 CD4<sup>+</sup>T 细胞家族的一个亚群,近来受到越来越多的关注。它们有强大的免疫抑制功能,并且在多个方面起抑制作用,通过阻止 T 细胞的活化来抑制自身免疫性和变态反应疾病的发生。



与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

图2 IL-10蛋白的表达情况  
Figure 2 IL-10 protein expression levels in different groups



与正常组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

图3 不同组 Foxp3 mRNA 和 IL-10 mRNA 的表达情况

Figure 3 Foxp3 mRNA and IL-10 mRNA expression levels in different groups

因此,它们在自身免疫耐受方面起重要作用<sup>[4]</sup>。Treg/Th17 cells 的失衡可以引起自身免疫系统的紊乱,从而引起自身免疫性和变态反应性疾病的发生,比如哮喘<sup>[5]</sup>。Treg 细胞分化成熟过程和功能很大程度上与 Foxp3 相关,减少或移除 Foxp3 可导致 Treg 细胞功能下降,Foxp3 移入效应 T 细胞可使后者具有免疫抑制功能<sup>[6]</sup>。有文献报道哮喘发作患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞明显低于正常对照组,并且 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞抑制功能亦明显弱于正常对照组<sup>[7]</sup>。

本文通过探讨 Zerumbone 诱导 Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 的分化,增加 IL-10 的分泌以拮抗哮喘气道炎症的作用。用磁珠分选的方法分选出高纯度的 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T 细胞(95%以上),接种于提前包被好抗 CD3 抗体(10 pg/mL)、抗 CD28 抗体(3 pg/mL)的 96 孔板中,同时加入 TGF-β(5 ng/mL)、IL-2(30 μg/mL)

促进 T 细胞向 Treg 细胞的分化。实验结果表明:Zerumbone 可诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞 Foxp3 的表达;激活 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞,增加 IL-10 的分泌。体外研究表明,Foxp3 不仅是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞特异性的标志,更是活化的标志<sup>[8-10]</sup>。因此检测 Foxp3 mRNA 的水平,更能直接反映 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞的功能。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞发挥调节作用主要通过两种途径:依靠细胞与细胞直接接触过程中细胞毒性 T 淋巴细胞抗原-4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4)信号;分泌细胞因子 IL-10 和 TGF-β<sup>[11]</sup>。IL-10 是一种抗炎细胞因子,有明显的免疫抑制作用和抗炎作用。研究表明,哮喘发作时 IL-10 的产生和含量均相对不足<sup>[12]</sup>。而 IL-10 和 TGF-β 又能促进 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞转化为 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞。

由此进一步推测 Zerumbone 可能通过细胞因子 IL-2 和 TGF-β 的共同刺激上调 Foxp3 的表达,激活

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg细胞,增加IL-10和TGF-β的分泌以调节免疫反应。为此,同时检测了细胞培养液IL-10水平,结果发现CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg经Zerumbone刺激后,上清液IL-10水平显著增加,并且呈剂量依赖性。Zerumbone可能通过增加IL-10和TGF-β的分泌,抑制自身变态反应,有望在哮喘治疗中起到一定作用。有关Zerumbone上述作用的详细分子机制及其他可能通路仍需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity 1[J]. Nat Rev Immuno, 2007, 7(11): 875-888
- [2] Sakaguchi S, Setoguchi R, Yagi H, et al. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 305(1): 51-66
- [3] Kitayama T. Attractive reactivity of a natural product, zerumbone[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2011, 75(2): 199-207
- [4] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance [J]. Cell, 2008, 133(5): 7757-7787
- [5] Ji L, Zhan Y, Hua F, et al. The ratio of Treg/Th17 cells correlates with the disease activity of primary immune thrombocytopenia[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e50909
- [6] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 [J]. Science, 2003, 299(5609): 1057-1061
- [7] Shi HZ, Li S, Xie ZF, et al. Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma[J]. Clin Immunol, 2004, 113(2): 172-178
- [8] Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, et al. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(1): 108-116
- [9] Manjeet S, Sim MK. Atropine- and scopolamine-resistant subtypes of muscarinic receptors in the rabbit aorta [J]. Eur J Pharmacol, 1989, 174(1): 99-105
- [10] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336
- [11] Kipnis J, Avidan H, Caspi RR, et al. Dual effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in neurodegeneration: a dialogue with microglia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(Suppl 2): 14663-14669
- [12] Kearley J, Barker JE, Robinson DS, et al. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after *in vivo* transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is interleukin 10 dependent[J]. J Exp Med, 2005, 202(11): 1539-1547

[收稿日期] 2017-09-17



欢迎关注本刊微博、微信公众号!