

# 低浓度鱼藤素抑制活化 T 细胞增殖作用研究

赵克天<sup>1,3</sup>, 敬林<sup>2</sup>, 崔文杰<sup>3</sup>, 张佳庆<sup>3</sup>, 伍佳丽<sup>3</sup>, 何晶晶<sup>4</sup>, 赖翼<sup>5</sup>, 刘阳<sup>1</sup>, 罗兴燕<sup>1\*</sup> (1. 成都医学院科研实验中心, 成都 610500; 2. 广西大学医学院特色生物医药重点实验室, 南宁 530004; 3. 成都医学院药学院, 成都 610500; 4. 成都医学院临床医学院, 成都 610500; 5. 成都医学院检验医学院, 成都 610500)

**摘要:**目的 探究低浓度鱼藤素抑制活化 T 细胞增殖的作用特点。方法 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞, 免疫磁珠法纯化人 T 细胞, 抗人 CD3/CD28 抗体活化 T 细胞。流式细胞术测定 T 细胞存活率、增殖指数、凋亡进展、CD25 表达水平及分裂期比例; ELISA 检测细胞因子 IL-2、IL-4、IL-6、IL-17 及 IFN- $\gamma$  的分泌水平。结果 低浓度鱼藤素抑制抗人 CD3/CD28 抗体活化的 T 细胞增殖, IC<sub>50</sub> 为 (73 ± 12) nmol · L<sup>-1</sup>, 400 nmol · L<sup>-1</sup> 时无细胞毒性。低浓度鱼藤素不影响活化的 T 细胞表达 CD25 和分泌 IL-2, 但提高 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例。低浓度鱼藤素促进活化 T 细胞分泌抗炎细胞因子 IL-4, 并抑制促炎细胞因子 IL-6、IL-17 及 IFN- $\gamma$  的产生。结论 低浓度鱼藤素显著抑制 T 细胞增殖于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 并有效抑制促炎细胞因子分泌, 提示鱼藤素在自身免疫病的治疗中具有潜在作用。

**关键词:** 鱼藤素; T 细胞; 增殖抑制; 低浓度; 抗炎作用; 细胞因子

doi: 10. 11669/cpj. 2025. 05. 009 中图分类号: R282 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2025)05-0515-07

## Inhibitory Effect of Low Concentrations of Deguelin on Activated T Cell Proliferation

ZHAO Ketian<sup>1,3</sup>, JING Lin<sup>2</sup>, CUI Wenjie<sup>3</sup>, ZHANG Jiaqing<sup>3</sup>, WU Jiali<sup>3</sup>, HE Jingjing<sup>4</sup>, LAI Yi<sup>5</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, LUO Xingyan<sup>1\*</sup> (1. Center for Scientific Research, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Special Biomedicine, School of Medicine, Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 4. School of Clinical Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 5. School of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the characteristics of the inhibitory effect of low concentrations of deguelin on the proliferation of activated T cells. **METHODS** Human peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation, human T cells were purified using immunomagnetic beads, and T cells were activated with Anti-CD3/CD28 antibodies. Flow cytometry was used to detect T cell survival rate, proliferation index, apoptosis progression, CD25 expression level, and cell division ratio; ELISA was used to detect cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$  secretion levels. **RESULTS** Low concentrations of deguelin inhibit T cell proliferation activated by anti-human CD3/CD28 antibodies, with an IC<sub>50</sub> of (73 ± 12) nmol · L<sup>-1</sup>, and a concentration of 400 nmol · L<sup>-1</sup> has no cytotoxicity. Low concentrations of deguelin do not affect the expression of CD25 and secretion of IL-2 in activated T cells but increases the proportion of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells. Low concentrations of deguelin promote the secretion of anti-inflammatory cytokine IL-4 and inhibit the production of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$  in T cells. **CONCLUSION** Low concentrations of deguelin significantly inhibit T cell proliferation in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and effectively suppress the secretion of pro-inflammatory cytokines, suggesting its potential role in the treatment of autoimmune diseases.

**KEY WORDS:** deguelin; T cell; proliferation inhibition; low concentration; anti-inflammatory effect; cytokine

T 细胞是人免疫系统的重要组成部分, 受抗原刺激活化后, 通过克隆性扩增产生抗原特异性免疫, 在免疫反应过程中起重要作用。在 T 细胞活化增殖的过程中, CD3 和 CD28 双信号分子激活静息的 T 细胞, 通过钙调磷酸酶、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路诱导 T 细胞表达白细胞介素-2 (IL-2) 受体 CD25 及分泌 IL-2。

随后 IL-2 结合 CD25, 激活 Janus 激酶 3 (JAK3)/信号转导及转录激活蛋白 5 (STAT5)、磷酸酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (AKT) 与雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70S6K) 等信号通路启动细胞增殖<sup>[1]</sup>。然而 T 细胞的异常增殖也会导致自身免疫性疾病和机体对异体移植器官的排斥反应<sup>[2-5]</sup>, 因此抑制 T 细胞增殖能有效缓解这些

**基金项目:** 国家级大学生创新项目资助 (202217305005); 四川省科技厅应用基础面上项目资助 (2023NSFC0624)

**作者简介:** 赵克天, 男, 学士 研究方向: 自身免疫性疾病发病机制与药物筛选 \* **通讯作者:** 罗兴燕, 女, 博士 研究方向: 自身免疫性疾病发病机制与药物筛选 Tel: (028)62739161

疾病。临床上,对 T 细胞增殖具有抑制作用的药物如他克莫司和雷帕霉素均已作免疫抑制剂<sup>[6-7]</sup>。但现有的免疫抑制剂尚存在治疗窗窄、不良反应多等问题<sup>[8-9]</sup>,寻找潜在药物能为临床治疗提供新的选择并优化治疗方案,具有重要研究意义。

鱼藤素(deguelin)是一种鱼藤酮类天然异黄酮化合物(图1),广泛分布于鱼藤属和灰叶属植物中。已有研究表明,鱼藤素可通过多种途径发挥抗肿瘤作用,它可促进胆囊癌细胞 SGC-996、人结肠癌细胞 RKO 和 B-慢性淋巴白血细胞的凋亡<sup>[10-12]</sup>,抑制胃癌细胞 SNU-484 中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达<sup>[13]</sup>,抑制人 HTLV-1 转化细胞 KUT-1 增殖<sup>[14]</sup>等。同时,鱼藤素还具有抗炎作用,可减轻过敏性哮喘的炎症反应<sup>[15]</sup>。

本研究建立了 T 细胞增殖抑制活性筛选平台,并发现了一系列免疫抑制小分子如 BD759、BD690 等<sup>[16-17]</sup>,筛选发现鱼藤素可在低于既往研究中其抑制肿瘤细胞的浓度下抑制 T 细胞增殖,数据库检索尚未发现研究鱼藤素具有免疫抑制活性文献报道。鱼藤素的结构完全不同于临床使用的免疫抑制剂,新结构化合物可作为分子探针,探索疾病的发病机制,而发病机制的阐明可提供新的靶点,为发现新的具有应用价值的小分子药物奠定基础。本实验将从 T 细胞的活化和增殖阶段着手,探究低浓度鱼藤素抑制 T 细胞增殖的作用及其潜在应用。

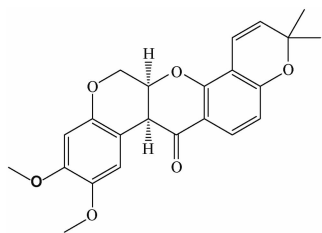


图1 鱼藤素的结构式

Fig. 1 Chemical structure of deguelin

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

药品与试剂:鱼藤素(批号:29258,纯度:99.20%),他克莫司(tacrolimus, FK506)(批号:125434,纯度:99.93%),雷帕霉素(rapamycin, Rapam)(批号:260297,纯度:99.94%)均来源于美国 MedChemexpress 公司;LY294002(美国 Cayman 公司,货号:70920-10,纯度:≥98%);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 ZETA 公司,批号:

120214018-4S);RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司,批号:AK30771821);青霉素-链霉素(批号:227766),羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)(批号:705638),抗人 CD3 抗体(批号:2851410),抗人 CD28 抗体(批号:2564462),抗人 CD3-PE 流式检测抗体(批号:E124848-163),人细胞因子 IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 及干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )酶联包被、检测抗体等试剂均来源于美国 Thermo Fisher 公司;抗人 CD25-APC 流式检测抗体(美国 Biolegend 公司,批号:B335172);人 Pan T 细胞分离试剂盒(德国 Miltenyl Biotec 公司,批号:5170711130);人淋巴细胞分离液(挪威 Axis-Shield 公司,批号:00422);细胞凋亡检测试剂盒(批号:120722230314),细胞周期检测试剂盒(批号:092723240313)均来源于上海碧云天生物技术公司。

仪器:Novo Express 流式细胞仪(艾森生物杭州有限公司);酶联免疫检测仪(美国 BioTek 公司);II 级 A2 型生物安全柜,离心机,5% CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 T 细胞分离纯化

人外周血来源于知情同意的健康人[经成都医学院生物医学伦理委员会批准(2024 No. 109)],通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离出人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。具体方法为:采集健康人外周血与 PBS 溶液等体积稀释混匀,先后加入淋巴分离液与 2 倍体积血液,确保分层。1 850 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min,吸取中间白膜层。加入 5 倍体积的 PBS 溶液吹洗吸取的细胞,1 300 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,重复洗涤 3 次并重悬于含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基中。

分离后的 PBMC 按人 Pan T 细胞分离试剂盒说明分离 T 细胞。具体方法为:PBMC 细胞悬液经 1 300 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 后保留细胞沉淀,据说明书每 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞加入 40 μL 缓冲液和 10 μL 标记抗体,混匀后冰上孵育 10 min。加入 1 mL 缓冲液冲洗细胞,1 300 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min 去除游离的标记抗体。每 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞加入 30 μL 缓冲液和 20 μL 抗体微球,混匀后冰上孵育 15 min 结合标记抗体。重复上述洗涤步骤去除游离抗体微球,再加入 200 μL 缓冲液并充分重悬。用缓冲液冲洗分离柱后分批加入处理的细胞,收集柱中自然流下细胞悬液分离出 T 细胞。将收集到的细胞悬液 1 300 r·min<sup>-1</sup>

离心 10 min, 去上清后使用完全培养基重悬细胞。

抗人 CD3-PE 抗体分别染色纯化前后的 T 细胞, 结合流式细胞术检测分离效果和纯度, 达 95% 以上再用于后续实验。

### 1.3 细胞毒性检测

不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于静息 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 48 h 后结合流式细胞术检测静息 T 细胞的绝对数量 (abs. count), 以未加药的 T 细胞作为细胞阴性对照组, 计算不同浓度鱼藤素作用下 T 细胞的存活率 (公式 1)。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{加药组}/\text{细胞阴性对照组}}{100\%} \quad \text{公式(1)}$$

### 1.4 细胞增殖检测

T 细胞增殖检测的方法为两种, 结合流式细胞术计算细胞增殖指数并拟合曲线以计算细胞增殖指数为 50% 时的药物浓度, 即半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ), 以及流式细胞术结合 CFSE 染色。

计算 T 细胞增值指数 (公式 2) 以及药物  $\text{IC}_{50}$  值的方法为: 不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于活化 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 96 h 后结合流式细胞术检测 T 细胞的绝对数量 (abs. count), 以未活化且未加药的 T 细胞作为细胞阴性对照组, 以活化而未加药的 T 细胞作为细胞阳性对照组。

$$\text{增值指数}(\%) = \frac{(\text{加药组} - \text{细胞阴性对照组}) / (\text{细胞阳性对照组} - \text{细胞阴性对照组}) \times 100\%}{\text{公式(2)}}$$

在 Graphpad Prism 7 中利用得到的增值指数拟合曲线并计算鱼藤素抑制活化 T 细胞增殖的  $\text{IC}_{50}$  值。

流式细胞术结合 CFSE 染色的方法为: 在给药前向 T 细胞悬液中加入 CFSE (终浓度为  $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 10 min 后  $1700 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 洗涤 2 次, 重悬后调整密度至  $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ , 加入不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用 96 h 后结合流式细胞术分析鱼藤素对细胞增殖的影响, 对照组同上。

其中活化 T 细胞的方法为: 先将  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  抗人 CD3 抗体包被在细胞培养板中于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  静置过夜, 待抗体吸附于孔底部后吸出多余液体, 加入静息 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 后再加入  $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  抗人 CD28 抗体活化。

### 1.5 T 细胞活化检测

不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用抗人

CD3/CD28 抗体活化 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 24 h 后, 取出部分细胞悬液, 用 PBS 按 1:10 稀释抗人 CD25-APC 抗体后再按 1:5 加入到细胞悬液, 混匀后避光孵育 5 min。流式细胞术检测细胞 CD25 的表达情况。LY294002 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为阳性药物对照组。

### 1.6 细胞凋亡检测

采用碧云天细胞凋亡检测试剂盒检测不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于抗人 CD3/CD28 抗体活化的 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 48 h 后的凋亡情况。具体方法为: 取  $50 \mu\text{L}$  细胞悬液加入到  $100 \mu\text{L}$  结合液中, 混匀后先后加入  $1 \mu\text{L}$  膜联蛋白 V (Annexin V)-FITC 和  $2 \mu\text{L}$  碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色液, 避光孵育 5 min。流式细胞术检测细胞凋亡进展。FK506 ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为阳性药物对照组。

### 1.7 细胞周期检测

采用碧云天细胞周期检测试剂盒结合流式细胞术检测不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于抗人 CD3/CD28 抗体活化的 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 72 h 后的细胞周期进展。具体方法为: 取出细胞悬液滴加至无水乙醇中, 置于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下静置过夜固定。  $4600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 沉淀细胞, 加入已按说明书配置好的 PI 染色液, 避光孵育 15 min 后使用 200 目尼龙网过滤, 流式细胞术检测细胞周期进展。Rapa ( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为阳性药物对照组。

### 1.8 细胞因子检测

酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 结合双抗夹心法检测不同浓度鱼藤素 ( $16 \sim 400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于抗人 CD3/CD28 抗体活化的 T 细胞 ( $2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 24 h 后 IL-2 的分泌水平和 48 h 后 IL-4、IL-6、IL-17 及 IFN- $\gamma$  的分泌水平。LY294002 ( $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作为阳性药物对照组。

### 1.9 统计学处理

采用 GraphPad Prism 7 进行统计分析并计算药物抑制细胞增殖的  $\text{IC}_{50}$  值。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间差异采用 GraphPad Prism 7 Column analyses 中 *t* tests 进行分析, 以  $P < 0.05$  有统计学意义。

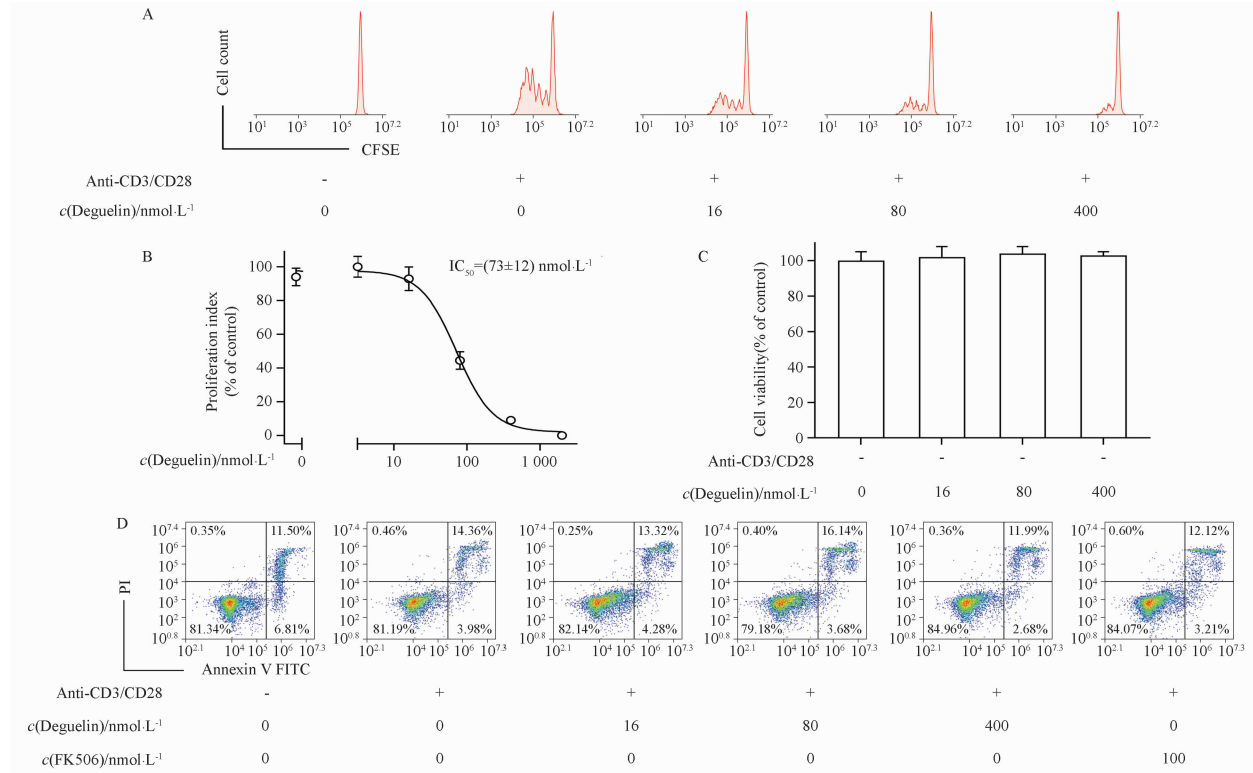
## 2 结果

### 2.1 低浓度鱼藤素对 T 细胞增殖和存活的影响

CFSE 染色结合流式细胞术明确鱼藤素是否抑制 T 细胞的增殖。经抗人 CD3/CD28 抗体刺激活化 T 淋巴细胞后, 随着鱼藤素浓度升高, 子代峰高逐渐降低, 这表明鱼藤素对 T 细胞的增殖分

裂具有显著的抑制作用(图 2A)。GraphPad Prism 7 分析鱼藤素对活化 T 细胞的作用,鱼藤素  $IC_{50}$  值为  $(73 \pm 12) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 2B)。流式细胞术检测经鱼藤素处理的静息 T 细胞的存活率以及活化 T 细胞凋亡情况。不同浓度鱼藤素作用下,细胞存

活率与对照组无明显差异,且活细胞所占比例与对照组也无明显差异,即鱼藤素不杀死静息 T 细胞也不诱导活化 T 细胞凋亡(图 2C ~ D)。因此,低浓度鱼藤素作用于 T 细胞增殖的活性是免疫抑制活性,而非细胞毒性。



A - 羧基荧光素乙酰乙酸琥珀酰亚胺脂(CFSE)染色检测活化 T 细胞增殖情况;B - 拟合 T 细胞增殖指数曲线计算半抑菌浓度( $IC_{50}$ )值;C - 细胞计数计算静息 T 细胞存活率;D - 膜联蛋白-V (Annexin-V) 和碘化丙啶(PI) 双染色检测活化 T 细胞的凋亡情况。

A - CFSE staining detects the proliferation of activated T cells; B - calculate the  $IC_{50}$  value by fitting the T cell proliferation index curve; C - calculate the resting T cell survival rate through cell count; D - Annexin-V and PI double staining detect the apoptotic status of activated T cells.

图 2 低浓度鱼藤素对 T 细胞增殖和存活的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Effects of low concentrations of deguelin on T cell proliferation and survival.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

## 2.2 低浓度鱼藤素对 T 细胞活化的影响

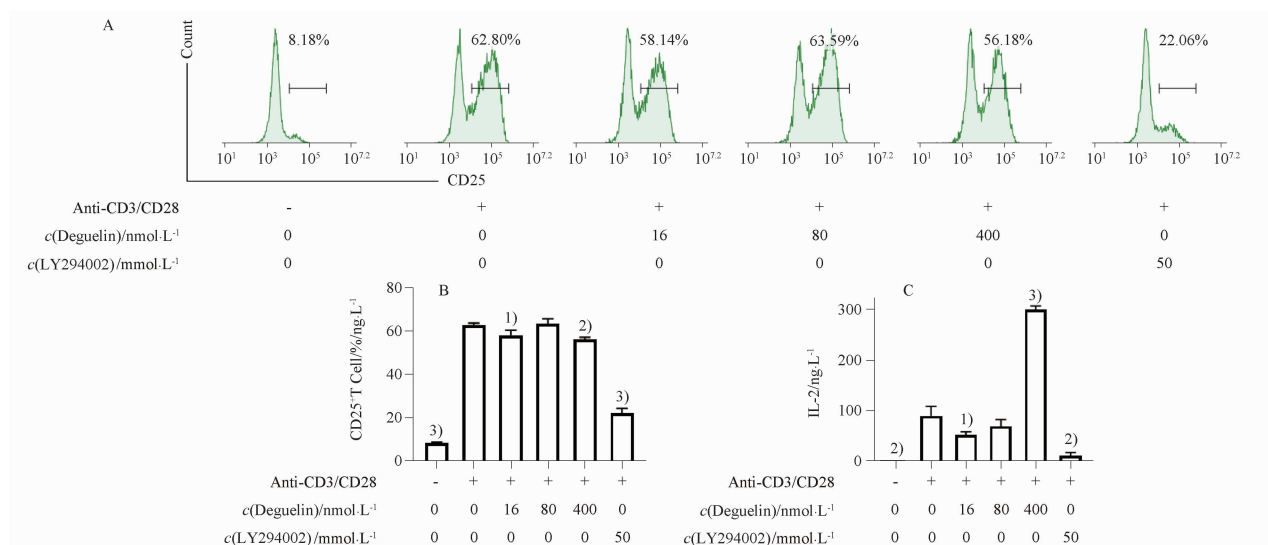
CD25 是 T 细胞活化的表面标记,可与 IL-2 结合推动 T 细胞活化增殖<sup>[18]</sup>。流式细胞术检测鱼藤素作用后的 T 细胞中 CD25 分泌水平,见图 3A、B。与未给药激活组相比,经 16 和 80  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤素作用的 T 细胞中 CD25<sup>+</sup> 比例无显著变化,经 400  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤素作用的 T 细胞中 CD25<sup>+</sup> 比例显著降低( $P < 0.01$ )。同时,与未给药激活组相比,经 16 和 80  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  鱼藤素作用后,T 细胞 IL-2 分泌水平无显著变化,但当鱼藤素浓度达 400  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,T 细胞 IL-2 分泌水平显著提高( $P < 0.0001$ ),即鱼藤素在低浓度下不影响 CD25 的表达和 IL-2 的分泌(图 3C)。

## 2.3 低浓度鱼藤素对活化 T 细胞周期的影响

细胞周期进程是 T 淋巴细胞增殖过程中极重要的部分。通过流式细胞术检测 PI 的荧光强度。结果见图 4A、B,随着鱼藤素浓度升高,细胞处于  $G_0/G_1$  期的比例逐渐扩大,处于  $G_2/M$  期的比例逐渐缩小,并在鱼藤素为 80  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  有显著性差异( $P < 0.001$ ),表明鱼藤素将细胞阻滞于  $G_0/G_1$  期,效果同 Rapam 相似。

## 2.4 低浓度鱼藤素对活化 T 细胞分泌细胞因子的影响

ELISA 双抗夹心法检测不同浓度鱼藤素作用下活化 T 细胞 IL-4、IL-6、IL-17A 和 IFN- $\gamma$  的分泌程度。结果见图 5,鱼藤素在 16 和 80  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时

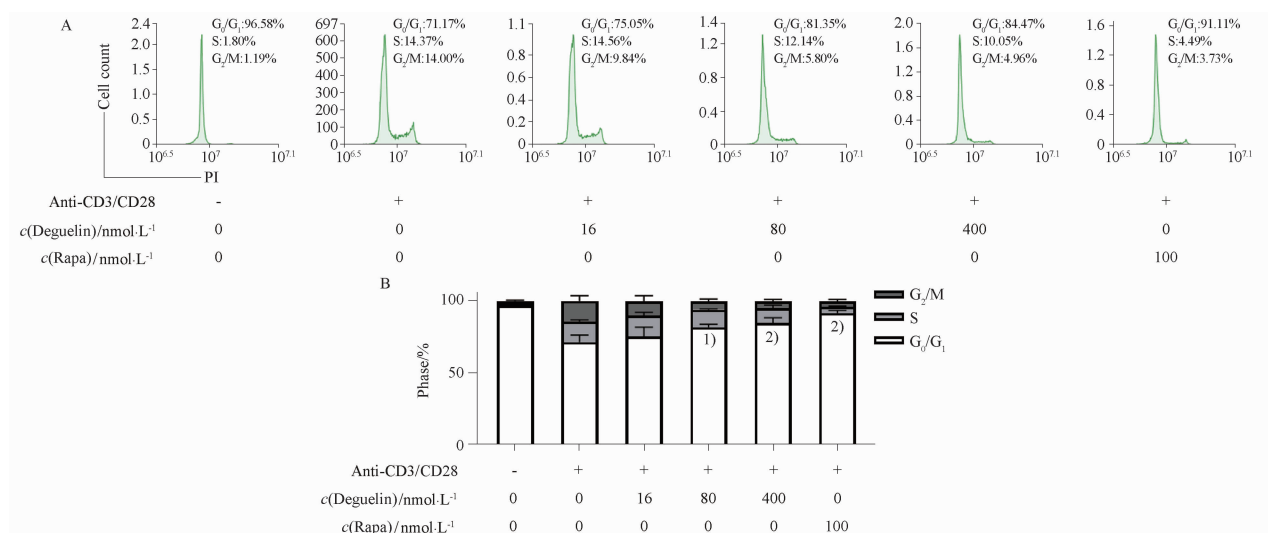


A - 抗人 CD25-APC 抗体单染色检测 T 细胞活化情况; B - 统计分析活化 T 细胞比例; C - Elisa 检测 T 细胞 IL-2 分泌水平。与未给药激活组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与未给药激活组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与未给药激活组相比,<sup>3)</sup> $P < 0.0001$ 。

A - detect T cell activation by single staining with anti-human CD25-APC antibody; B - the cell proportion was analyzed statistically; C - Elisa detects the secretion levels of IL-2 in T cells. <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , compared with the activated group without medication; <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , compared with the activated group without medication; <sup>3)</sup> $P < 0.0001$ , compared with the activated group without medication.

图3 低浓度鱼藤素对 T 细胞活化的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effects of low concentrations of deguelin on T cell activation.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



A - PI 单染色检测 T 细胞周期情况; B - 统计分析细胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S 期和 G<sub>2</sub>/M 期的比例; 与未给药激活组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.001$ ; 与未给药激活组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.0001$ 。

A - PI staining assay to detect T cell cycle status; B - the cell proportion in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, S phase and G<sub>2</sub>/M phase were analyzed statistically; <sup>1)</sup> $P < 0.001$ , compared with the activated group without medication; <sup>2)</sup> $P < 0.0001$ , compared with the activated group without medication.

图4 低浓度鱼藤素对活化 T 细胞周期的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

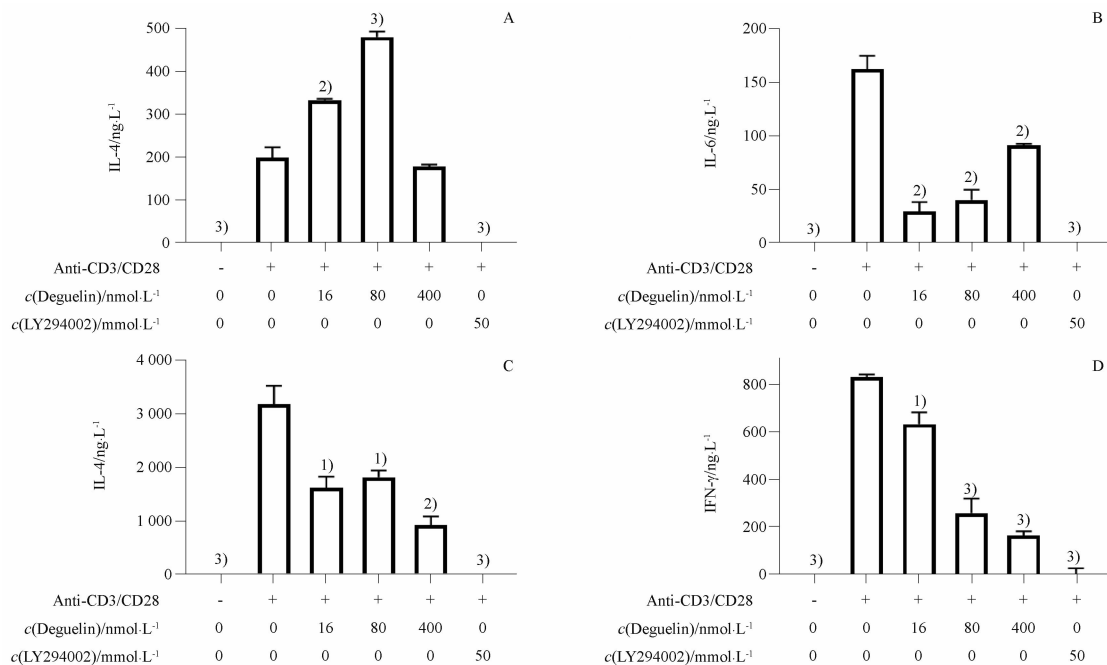
Fig. 4 Effects of low concentrations of deguelin on the cell cycle in activated T cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

显著促进 IL-4 的分泌 ( $P < 0.001$ ), 同时抑制 IL-6、IL-17 和 IFN- $\gamma$  的分泌 ( $P < 0.01$ ), 表明低浓度鱼藤素促进调节性 T 细胞抗炎细胞因子的释放, 且主要抑制 Th1/17 细胞的促炎细胞因子释放。

### 3 讨论

T 细胞作为机体产生免疫反应的重要细胞, 在

自身对异体器官的排斥反应、自身免疫调节紊乱所致的疾病中发挥重要作用。本研究发现低浓度鱼藤素对活化 T 细胞具有增殖抑制作用, 初步筛选时鱼藤素在  $10 \sim 1\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  内对活化 T 细胞的增殖均有抑制作用, 作用浓度较宽, 其 IC<sub>50</sub> 值在  $80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  左右。因此在上述浓度范围内选定 16、80 和  $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  为代表浓度, 测定其 IC<sub>50</sub> 值为



A ~ D - Elisa 检测活化 T 细胞细胞因子 IL-4、IL-6、IL-17 和 IFN- $\gamma$  分泌水平;与未给药激活组相比,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与未给药激活组相比,<sup>2)</sup> $P < 0.001$ ;与未给药激活组相比,<sup>3)</sup> $P < 0.0001$ 。

A ~ D - Elisa detects the secretion levels of cytokines IL-4, IL-6, IL-17, and IFN- $\gamma$  in activated T cells; <sup>1)</sup> $P < 0.01$ , compared with the activated group without medication; <sup>2)</sup> $P < 0.001$ , compared with the activated group without medication; <sup>3)</sup> $P < 0.0001$ , compared with the activated group without medication.

图 5 低浓度鱼藤素对活化 T 细胞分泌细胞因子的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Effects of low concentrations of deguelin on cytokine secretion in activated T cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

( $73 \pm 12$ )  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并验证了鱼藤素在浓度为  $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  以下对静息 T 细胞无明显细胞毒性。在既往研究中,鱼藤素抗肿瘤作用的起效浓度多在  $10 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是本实验中鱼藤素抑制 T 细胞增殖  $\text{IC}_{50}$  值的 150 倍左右。同时,本实验证明了低浓度的鱼藤素有不同于高浓度的作用机制,对拓展鱼藤素药理作用研究和丰富自身免疫性疾病治疗策略具有重要意义。因此,鱼藤素具有免疫抑制剂的应用潜力。鱼藤素已有的抗肿瘤研究发现,其阻滞非小细胞肺癌细胞 A549、胃癌细胞 SNU-484 和急性髓性白血病细胞 KG-1a 周期于  $G_2/M$  期<sup>[13,19-20]</sup>。既往研究发现免疫抑制剂 Rapa 能阻滞 T 细胞于  $G_0/G_1$  期<sup>[21]</sup>, 故选择它作为阳性对照药物以探究鱼藤素对 T 细胞周期进展的影响。本实验发现,低浓度鱼藤素也阻滞 T 细胞于  $G_0/G_1$  期。因此,低浓度鱼藤素可能会通过新的靶点发挥免疫抑制作用。我们下一步将探究低、高剂量鱼藤素作用的信号通路,对比鱼藤素在低、高剂量作用机制的差异,并结合既往研究,进一步发掘低浓度鱼藤素的特点和优势。

作为 T 细胞活化的标志,CD25 所代表的  $\alpha$  链是白细胞介素 2 受体的重要组成部分。LY294002 已被证明能抑制 T 细胞活化<sup>[22]</sup>, 因此将其作为阳性

对照药物用以考察鱼藤素对 T 细胞活化的影响。本研究发现低浓度鱼藤素不影响 T 细胞活化。同时结果显示,鱼藤素在  $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  下存在抑制 T 细胞 CD25 的表达和促进 IL-2 分泌的现象,可能的原因在于,该浓度下鱼藤素阻碍了 IL-2 与 CD25 的结合,致使 T 细胞表面的 CD25 表达水平降低,培养基中游离的 IL-2 增多,进而 ELISA 检测到了更多的 IL-2,在数据上体现出了促进的结果,该原因仍需等待后续实验的证明。

细胞因子在细胞增殖分化和发挥效应的过程中起着不可或缺的调节控制作用。本实验探索了鱼藤素对活化 T 细胞分泌 IL-4、IL-6、IL-17A 和 IFN- $\gamma$  的调节作用。IL-4 属于抗炎细胞因子,能调节淋巴细胞的增殖分化,也在肿瘤和自身免疫性疾病中发挥治疗作用<sup>[23-25]</sup>。IL-6、IL-17A 和 IFN- $\gamma$  属于促炎细胞因子。IL-6 具有调节免疫、促进炎症和癌症的发生及发展的作用。它能激活 JAK/STAT3 信号通路,促进结直肠癌、肝癌、非小细胞肺癌和胶质瘤等癌症的发展<sup>[26]</sup>。IL-17 能协同其他细胞因子加重局部炎症反应,在自身免疫性疾病发生发展中起重要作用<sup>[27-29]</sup>。IFN- $\gamma$  也同 IL-6、IL-17 一起,在类风湿关节炎的发展中起关键作用<sup>[30]</sup>。以往研究发现

LY294002 能显著抑制上述细胞因子的分泌<sup>[31]</sup>。因此,在探究鱼藤素对这些细胞因子分泌的影响时,将其作为阳性对照药物。本实验发现鱼藤素促进 IL-4 的分泌,抑制 IL-6、IL-17A 和 IFN- $\gamma$  的分泌,提示低浓度鱼藤素可能通过对细胞因子的影响而调节 T 细胞分化,并在自身免疫病的治疗中发挥作用。

综上所述,低浓度鱼藤素显著抑制 T 细胞增殖,IC<sub>50</sub>为(73 ± 12) nmol · L<sup>-1</sup>,且在完全抑制细胞增殖浓度下无细胞毒性,不影响 T 细胞活化但阻滞细胞周期,促进活化 T 细胞分泌抗炎细胞因子 IL-4,并抑制促炎细胞因子 IL-6、IL-17 及 IFN- $\gamma$  的产生,展现了其高药效以及可作为免疫抑制剂应用于自身免疫性疾病的潜力。因此,低浓度鱼藤素有望用于开发新的免疫抑制剂,拓展治疗自身免疫性疾病和缓解器官抑制排斥反应的药物选择。

## REFERENCES

- [ 1 ] LUO X Y, ZHOU H, WANG S Y, *et al.* A benzoxazole derivative PO-296 inhibits T lymphocyte proliferation by the JAK3/STAT5 signal pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9193-9202.
- [ 2 ] CHEN H, YUAN Y, REN Y W, *et al.* The role of T lymphocytes in the pathogenesis of primary immune thrombocytopenia [J]. *China Med Pharm*(中国医药科学), 2022, 12(23): 47-58.
- [ 3 ] XIE W H, ZHANG Z L. Update on novel pharmacologic therapies for rheumatoid arthritis [J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 2023, 39(14): 2111-2115.
- [ 4 ] SUN L J. The protective effect and mechanism of the immunosuppressive compound secoemestrin C on Con A-induced autoimmune hepatitis in mice [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2021.
- [ 5 ] TAN X, SUN Y Q, CHEN L, *et al.* Research progress of novel immunosuppressive agents for organ transplantation [J]. *Pract J Clin Med*(实用医院临床杂志), 2024, 21(3): 194-198.
- [ 6 ] DU M, JIANG Z Z, ZHANG L Y. Research progress on liver injury caused by commonly used immunosuppressants [J]. *Drug Eval Res*(药物评价研究), 2022, 45(5): 982-988.
- [ 7 ] XU L. Mechanism of Immunosuppressant in the Treatment of Multiple Sclerosis by Interfering with Gut Microbiota [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2020.
- [ 8 ] GUO P P, ZHANG R, LIU Y N, *et al.* Research progress on the correlation of tacrolimus concentration in peripheral blood mononuclear cells and transplanted biopsy tissue with whole blood concentration, adverse reactions, and clinical efficacy [J]. *Her Med*(医药导报), 2023, 42(6): 898-903.
- [ 9 ] WANG H, XU X F, LI R. Therapeutic drug monitoring in the individualized administration of cyclosporin A: application and research progress [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学), 2021, 26(6): 707-713.
- [ 10 ] WANG Y L. Deguelin suppresses the progression of gallbladder carcinoma cells via inhibition of the PTEN/PI3K/Akt pathway [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [ 11 ] CHEN L B, JIANG K, CHEN H Y, *et al.* Deguelin induces apoptosis in colorectal cancer cells by activating the p38 MAPK pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 95-105.
- [ 12 ] TULI H S, MITTAL S, LOKA M, *et al.* Deguelin targets multiple oncogenic signaling pathways to combat human malignancies [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 166: 105-487.
- [ 13 ] LEE H, LEE J H, JUNG K H, *et al.* Deguelin promotes apoptosis and inhibits angiogenesis of gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(4): 957-963.
- [ 14 ] ITO S, OYAKE T, MURAI K, *et al.* Deguelin suppresses cell proliferation via the inhibition of survivin expression and STAT3 phosphorylation in HTLV-1-transformed T cells [J]. *Leukemia Res*, 2010, 34(3): 352-357.
- [ 15 ] BAO Z, ZHANG P, YAO Y N, *et al.* Deguelin attenuates allergic airway inflammation via inhibition of NF-kappaB pathway in mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(4): 492-504.
- [ 16 ] LUO X Y, ZOU Q, SUN H, *et al.* Suppressive effect of a novel benzothiazole derivative BD759 on T cell proliferation [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2015, 50(15): 1313-1318.
- [ 17 ] LAI Y, XIA C Y, ZHOU H, *et al.* Research on the mechanism of benzothiazole derivative BD960 on T cell proliferation [J]. *J Med Postgrad*, 2016, 29(2): 138-143.
- [ 18 ] YU S H, MA X X, WEI T, *et al.* Expression and significance of CD25 in peripheral blood in purpura nephritis [J]. *Chin J Pract Pediatr*(中国实用儿科杂志), 2023, 38(1): 52-57.
- [ 19 ] LV M X, FANG Q T, CHEN Y J, *et al.* Effect of deguelin on proliferation of non-small cell lung cancer cell *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2020, 36(1): 26-31.
- [ 20 ] ZHAO X Q, WU Y L, TONG J Y, *et al.* Effect of deguelin on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia KG-1 $\alpha$  cells and its mechanism [J]. *J Xixiang Med Univ*(新乡医学院学报), 2021, 38(12): 1121-1127.
- [ 21 ] LI M. Mechanism of action and clinical applications of rapamycin [J]. *Foreign Med Sci Sect Pharm*(国外医学 药学分册), 2002, 29(3): 162-165.
- [ 22 ] WU J Y, LI B Q, HOU Y Q, *et al.* Role of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) in the intracellular signaling transduction pathways mediated by TCR and CD28 of  $\gamma\delta$  T cell [J]. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 2003, 23(2): 123-126.
- [ 23 ] REN X H. Study on the levels of IL-4, IL-17 and TNF- $\alpha$  in cervical tissues of patients with cervical lesions [D]. Yan'an: Yan'an University, 2020.
- [ 24 ] KIM H D, YU S, KIM H S, *et al.* Interleukin-4 induces senescence in human renal carcinoma cell lines through STAT6 and p38 MAPK [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(40): 28743-28754.
- [ 25 ] ZHANG X H. The mechanism of vitamin D alleviates Con A-induced autoimmune hepatitis of mice [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2021.
- [ 26 ] LI F Y, HUO D, LUAN S J, *et al.* The role of the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in tumors [J]. *Chem Life*(生命的化学), 2021, 41(3): 535-540.
- [ 27 ] BERRY S P D, DOSSOU C, KASHIF A, *et al.* The role of IL-17 and anti-IL-17 agents in the immunopathogenesis and management of autoimmune and inflammatory diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 102: 108-402.
- [ 28 ] MOULTON V R, TSOKOS G C. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(6): 2220-2227.
- [ 29 ] HUANG J J. The Function and Underlying Mechanism of IL-17 Family Cytokines in Autoimmune Diseases [D]. Beijing: Tsinghua University, 2019.
- [ 30 ] JIANG P, CHANG C, XU L S, *et al.* Progresses and challenges in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2024, 59(3): 200-209.
- [ 31 ] LIU Y, LAI Y, LI H, *et al.* A novel water-soluble benzothiazole derivative BD926 inhibits human activated T cell proliferation by down-regulating the STAT5 activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 761: 36-43.

(收稿日期:2024-05-30)