

芒果苷、高良姜素对 BCBL-1 细胞形态及其分泌 IL-4 的影响^①

张锡平,唐华英,赵丽娟,刘海霞,曾怡^②

(右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

摘要: **目的** 观察芒果苷、高良姜素对 BCBL-1 细胞形态及其分泌 IL-4 的影响。**方法** 将培养的 BCBL-1 细胞分为不加药物的空白对照组、0.1% 二甲基亚砷(DMSO)组、芒果苷组和高良姜素组,观察药物作用 24 h 对细胞形态的影响;收集不同时间段的各处理组的细胞培养上清液,利用 ELISA 法检测细胞培养上清液中白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)的浓度。**结果** 与相应的对照组相比,BCBL-1 细胞培养液中加入药物后,芒果苷组细胞形态无明显变化,细胞培养液中 IL-4 蛋白含量有上升的趋势 ($P < 0.01$);高浓度高良姜素组(25 $\mu\text{mol/L}$)细胞出现细胞皱缩、折光度下降、数量变少,细胞培养液中 IL-4 蛋白含量在低浓度时有上升的趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而在高浓度时有下降的趋势 ($P < 0.01$)。**结论** 芒果苷、高良姜素可以调节 BCBL-1 细胞分泌 IL-4。

关键词: 芒果苷;高良姜素;BCBL-1;IL-4

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0563-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.003

The effects of mangiferin and galangin on BCBL-1 cell configuration and its IL-4 secretion

Zhang Xiping, Tang Huaying, Zhao Lijuan, Liu Haixia, Zeng Yi

(College of Basic Medical Sciences, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of mangiferin and galangin on BCBL-1 cell configurations and its IL-4 secretion. **Methods** The cultured BCBL-1 cells were divided into a blank control group without giving drugs, a 0.1% DMSO group, a mangiferin group and a galangin group. Cell morphologic features were observed with microscopy in 24 hours after drug administration. The cell culture supernatants in each administration group at different time were collected and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to detect the concentrations of interleukin-4 (IL-4) in cell culture supernatants. **Results** By comparing with corresponding control group, cells configurations in the mangiferin group had no obvious changes after the BCBL-1 cells culture were added with drugs, and the amount of IL-4 protein in cell cultures tended to increase ($P < 0.01$). Cells in the high concentration galangin (25 $\mu\text{mol/L}$) group showed wizened, and that the diopter declined and cells amount decreased. The amount of IL-4 protein in cells culture by treating with low concentration of galangin tended to increase ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but tended to decrease by treating with high concentration ($P < 0.01$). **Conclusion** Mangiferin and galangin play a role of regulation of BCBL-1 cells in IL-4 secretion.

Key words: mangiferin; galangin; BCBL-1; IL-4

卡波西肉瘤相关性疱疹病毒(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus, KSHV)又称人类疱疹病毒 8 型(HHV-8),是一类疱疹病毒,感染后可以导致卡波西

肉瘤(Kaposi sarcoma, KS)、多中心性卡斯特莱曼病(multicentric Castleman disease, MCD)和原发性渗出性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL)等。艾

① 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160535)

② 通信作者, E-mail: zengyirr@163.com

滋病患者易感染 KSHV 等致癌病毒,可引起艾滋病相关的卡波西肉瘤(AID-KS)等肿瘤。在我国,艾滋病病毒(HIV)感染人群中同时感染 KSHV 的比例是 39%,而艾滋病人群中有 12%死于 AID-KS^[1];同样在北美地区 AIDS 患者中同时患有 AID-KS 的比率为 20%^[2]。BCBL-1 细胞是从 PEL 组织中分离出来的、KSHV 呈阳性、EB 病毒呈阴性、B 淋巴细胞源性的细胞系,是 KSHV 和 KS 相关研究的常用细胞系。白细胞介素 4(IL-4)是一种多功能性的细胞因子,参与免疫系统的调节,可以对 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞等多种细胞的生长、增殖、分化产生重要的影响。芒果苷是芒果叶中含量丰富的双苯吡酮类黄酮化合物,高良姜素是一种主要从姜科植物高良姜中提取黄酮类的天然化合物,两者都具有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗炎等生物作用。目前芒果苷和高良姜素对 BCBL-1 细胞的作用报道很少。本实验从形态学观察芒果苷、高良姜素对 BCBL-1 细胞的影响,并用 ELISA 试剂盒检测其对 IL-4 蛋白分泌的影响。

1 实验材料与方法

1.1 主要试剂 芒果苷(美国 Sigma 公司)、高良姜素(上海源叶生物技术公司)、RPMI1640 基础培养基(美国 Gibco 公司生产)、胎牛血清 FBS(美国 Gibco 公司生产)、二甲基亚砷(DMSO,美国 Sigma 公司)、ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)。

1.2 主要仪器 CO₂ 培养箱(香港力康生物医疗科技控股集团)、倒置光学显微镜(德国 Leica 公司)、酶标仪(Thermo Electron Corporation)。

1.3 药物溶液配置 利用 DMSO 溶液和 RPMI1640 基础培养基配置成 20% DMSO 混合液,再利用其溶解芒果苷,配置成浓度为 67.57 mg/ml。直接用 DMSO 溶液溶解高良姜素,分别配置药物浓度为:6.76 mg/ml、3.38 mg/ml、1.69 mg/ml 和 0.84 mg/ml。

1.4 BCBL-1 细胞株及细胞培养 BCBL-1 细胞株是本实验室长期保存的细胞株,取传代稳定的 BCBL-1 细胞用 10%灭活的胎牛血清、链霉素(100 μg/ml)、青霉素(100 U/ml)和 L-谷氨酰胺(2 mmol/L)的 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C、5%CO₂ 的培养箱中进行培养。并用倒置光学显微镜观察细胞生长情况。

1.5 ELISA 试剂盒检测细胞培养液中的 IL-4 蛋白含量 实验前一天对 BCBL-1 细胞进行换液,使其处于对数生长期。用无血清的 RPMI1640 基础培养基培养 BCBL-1 细胞 24 h 使细胞周期同步化。同步化后用新配置的 10% FBS 完全培养基重悬细胞,调整细胞浓度约为 1×10⁶ 个/ml,将细胞接种于六孔板中(2 ml/孔)。芒果苷实验:空白对照组;0.1% DMSO 组;芒果苷组,终浓度调节为 800 μmol/L。高良姜素

实验:空白对照组;0.1% DMSO 组,每孔加入 2 μl 的 DMSO 溶液;高良姜素组,终浓度为 25 μmol/L、12.5 μmol/L、6.25 μmol/L 和 3.125 μmol/L。将加入相应浓度药物的 BCBL-1 细胞分别于 CO₂ 培养箱中培养不同的时间后,于倒置显微镜下观察细胞形态,并离心收集上清液进行 ELISA 检测 IL-4 含量,最后立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的 OD 值(光密度)。

1.6 统计学方法 利用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 在倒置光学显微镜下观察芒果苷和高良姜素对 BCBL-1 细胞形态学的影响 如图 1 所示,药物作用 24 h 后当芒果苷浓度为 800 μmol/L 时,与对照组相比,细胞密度、细胞形态无明显变化;而当高良姜素浓度为 25 μmol/L 时,细胞密度明显减少,细胞皱缩变小破碎,细胞折光率下降变黑,大量的细胞出现死亡。

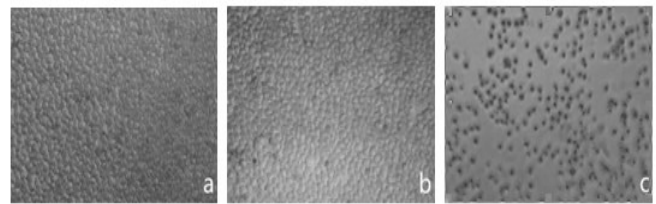


图 1 芒果苷组、高良姜素组作用 24 h 时 BCBL-1 细胞形态学改变

注:a 为 0.1% DMSO 对照组;b 为 800 μmol/L 芒果苷组;c 为 25 μmol/L 高良姜素组

2.2 芒果苷对 BCBL-1 细胞的 IL-4 蛋白分泌的影响

如表 1 所示,本实验中各组的 IL-4 随着细胞培养时间的增加(12 h、24 h),其浓度也在不断升高。在同一个培养时间段中,空白对照组与 0.1% DMSO 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示本研究所用的药物溶剂对 IL-4 表达无明显影响;芒果苷组与 0.1% DMSO 组 IL-4 分泌水平比较有上升的趋势,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 芒果苷对 BCBL-1 细胞表达 IL-4 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IL-4(pg/ml)	
	12 h	24 h
空白对照组	182.26±8.48	399.45±29.45
0.1% DMSO 组	175.20±9.04	395.06±20.56
芒果苷组(800 μmol/L)	290.03±4.96 ^a	534.15±23.31 ^a

注:与 0.1% DMSO 组相比,a: $P < 0.01$

2.3 高良姜素对 BCBL-1 细胞的 IL-4 蛋白分泌的影响 如表 2 所示,在 24 h 和 48 h 时间段中,空白对照组与 0.1% DMSO 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示本研究所用的药物溶剂对 IL-4 表达无明显影响。高良姜素作用时间为 24 h 时,空白对照组、0.1% DMSO 组、3.125 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组、6.25 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组各组之间 IL-4 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$);而当高良姜素浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,与 0.1% DMSO 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$),IL-4 蛋白分泌有下降的趋势。当高良姜素作用时间为 48 h 时,与 0.1% DMSO 组相比,3.125 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组和 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组 IL-4 蛋白分泌有上升的趋势,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组和 25 $\mu\text{mol/L}$ 高良姜素组的 IL-4 蛋白分泌有下降的趋势,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 高良姜素对 BCBL-1 细胞表达 IL-4 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	IL-4(pg/ml)	
		12 h	24 h
空白对照组	—	372.94 \pm 17.43	1005.91 \pm 85.59
0.1%DMSO 组	—	362.49 \pm 11.45	1095.41 \pm 77.97
高良姜素组	3.125	349.81 \pm 26.69	1281.82 \pm 79.96 ^a
	6.25	369.00 \pm 25.02	1565.18 \pm 65.43 ^b
	12.5	391.41 \pm 31.92	472.39 \pm 35.40 ^b
	25	196.86 \pm 44.20 ^b	295.14 \pm 43.81 ^b

注:与 0.1%DMSO 组相比,a: $P < 0.05$,b: $P < 0.01$

3 讨论

感染人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus, HIV-1)容易诱发特殊类型的肿瘤,大多数与致癌病毒感染有关,其中就包括 KSHV,可诱发 KS 等肿瘤疾病,其属于嗜淋巴细胞的 γ -2 型疱疹病毒。芒果苷和高良姜素都可从多种植物中提取,自然界含量丰富。近年来,由于其具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等方面的作用,成为研究的热点。如国内外报道芒果苷具有抑制流感病毒、单纯性疱疹病毒(HSV-1 和 HSV-2)的作用;Takeda T 等^[3]研究表明,芒果苷通过抑制 NF- κ B 诱导激酶(NIK)的激活而阻断 NF- κ B 通路,从而抑制肿瘤的增殖和迁移。高良姜素不仅具有抗菌、抗炎、抗氧化的作用,而且其抗肿瘤的生物学作用受到关注,可以使肿瘤细胞发生凋亡、抑制肿瘤细胞的侵袭等^[4]。IL-4 是 T 细胞产生的一种细胞因

子,可以调控多种淋巴细胞,调节免疫系统的作用。有研究表明:KSHV 可以抑制 IL-4 对 B 淋巴细胞增殖分化的激活作用^[5],同时在体内 IL-4 可抑制 AID-KS 肿瘤的细胞增殖作用^[6]。IL-4 在体内外还具有抑制其他一些肿瘤的作用,如急性淋巴母细胞性白血病、髓母细胞白血病等。BCBL-1 细胞也是 B 淋巴细胞源性的肿瘤细胞,因而通过本研究来检测芒果苷和高良姜素对 BCBL-1 细胞表达 IL-4 的影响。本实验结果显示芒果苷和高良姜素都能够调节 BCBL-1 细胞 IL-4 的表达。芒果苷可正向调节 BCBL-1 细胞 IL-4 的表达,但其细胞毒作用较弱。高良姜素对 BCBL-1 细胞有较强的损伤作用,细胞密度减少,高良姜素在低浓度时 IL-4 表达有上升的趋势,但在高浓度时 IL-4 表达有下降的趋势,推测可能是由于高浓度药物导致细胞出现大量死亡,从而 IL-4 的含量出现显著下降。因此本文使用的芒果苷和高良姜素均调节 BCBL-1 细胞 IL-4 的表达,均有抑制肿瘤细胞的作用。此外,这两种药物对 BCBL-1 细胞凋亡、自噬及 BCBL-1 细胞携带的 KSHV 抑制作用还需进一步研究探索。

参考文献:

- [1] 王岚,王璐,丁正伟,等. 中国 1995~2009 年艾滋病哨点监测主要人群艾滋病病毒感染流行趋势分析[J]. 中华流行病学杂志,2011,32(1):20-24.
- [2] Moore PS, Gao SJ, Dominguez G, et al. Primary characterization of herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma [J]. J Virol, 1996, 70(1):549-558.
- [3] Takeda T, Tsubaki M, Sakamoto K, et al. Mangiferin, a novel nuclear factor kappa B-inducing kinase inhibitor, suppresses metastasis and tumor growth in a mouse metastatic melanoma model [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 306:105-112.
- [4] Cao J, Wang H, Chen F, et al. Galangin inhibits cell invasion by suppressing the epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis in renal cell carcinoma [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(5):4238-4244.
- [5] Cai Q, Verma SC, Choi JY, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits interleukin-4-mediated STAT6 phosphorylation to regulate apoptosis and maintain latency [J]. J Virol, 2010, 84(21): 11134-11144.
- [6] Miles SA, Testa M, Huang J, et al. Lack of antitumor activity and intolerance of interleukin-4 in patients with advanced HIV disease and Kaposi's sarcoma [J]. J Interferon Cytokine Res, 2002, 22(11):1143-1148.

收稿日期:2016-11-14;修回日期:2016-12-15