

# 合欢皮总皂苷对 H22 荷瘤小鼠细胞免疫功能的影响

俞琦\*, 蔡琨, 田维毅

(贵阳中医学院 基础医学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** **目的:**观察合欢皮总皂苷对 H22 荷瘤小鼠 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群、细胞因子白细胞介素-2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 凋亡诱导因子 (Fas), 凋亡诱导因子配体 (FasL) 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 蛋白表达的影响, 探讨其对细胞免疫功能的干预机制。**方法:**昆明种小鼠 60 只随机分为正常组、模型组、环磷酰胺组、合欢皮总皂苷高、中、低剂量组, 建立小鼠 H22 荷瘤模型。给药组分别按环磷酰胺 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 合欢皮总皂苷 4, 2, 1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ip, 连续治疗 11 d 后, 检测抑瘤率, 血清 IL-2, TNF- $\alpha$  水平, 免疫组化染色检测肿瘤细胞 Fas, FasL 和 PCNA 蛋白的表达; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肿瘤组织形态。**结果:**与模型组比较, 合欢皮总皂苷高、中、低剂量组小鼠移植瘤的平均质量均显著下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 合欢皮总皂苷中剂量组能明显提高 CD4<sup>+</sup> T 细胞, CD8<sup>+</sup> T 细胞数量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 对 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 无影响, 合欢皮总皂苷中、高剂量组 IL-2 水平明显上升 ( $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$  水平无变化, 合欢皮总皂苷各剂量组 FasL, PCNA 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 中、高剂量组 Fas 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。**结论:**合欢皮总皂苷能够调节细胞免疫功能, 其机制可能与其上调 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群, 促进 IL-2 分泌, 提高 Fas 蛋白表达并抑制 FasL, PCNA 蛋白表达有关。

**[关键词]** 合欢皮总皂苷; H22 荷瘤; 细胞免疫功能; T 淋巴细胞; 炎症因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0143-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.2016150143

## Effects of Total Saponins From Albiziae Cortex on Cellular Immunity in H22 Tumor-bearing Mice

YU Qi\*, CAI Kun, TIAN Wei-yi

(Basic Medical College, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of total saponins from Albiziae Cortex (SA) on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, levels of interleukin (IL) -2 and tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ , apoptosis inducing factor (Fas), apoptosis-induced ligand (FasL) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expressions in tumor-bearing mice, and to explore its intervention mechanism of cellular immune functions. **Method:** Totally 60 Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, cyclophosphamide (CTX) group, SA high, medium and low dose groups. The H22 tumor bearing mice models were established. CTX (20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), SA (4, 2, 1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) were given to the mice of experimental groups by intraperitoneal injection respectively. After continuous treatment for 11 days, the tumor inhibition rate, the levels of IL-2 and TNF- $\alpha$  in serum were detected, and the expressions of Fas, FasL and PCNA protein expressions in tumor cells were determined by immunohistochemical staining; tumor tissue morphology was observed by htoxylineosin (HE) staining. **Result:** As compared with the model group, the average weight of transplanted tumor in various dose groups of SA reduced significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was increased obviously in medium dose group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio was not affected. The levels of

**[收稿日期]** 20150612(015)

**[基金项目]** 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY2010-06)

**[通讯作者]** \*俞琦, 硕士, 副教授, 从事中西医结合研究, Tel:0851-88233065, E-mail:sgyq.a@163.com

IL-2 in medium and high dose groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the levels of TNF- $\alpha$  had no change. The FasL and PCNA protein expressions were significantly decreased in various dose groups of SA ( $P < 0.01$ ), and Fas expression level in medium and high dose groups was significantly elevated ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** SA have immunomodulatory effects on cellular immunity. The mechanisms may be associated with up-regulating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets, promoting IL-2 secretion, increasing Fas protein expressions and inhibiting FasL and PCNA protein expressions.

[ **Key words** ] total saponins from Albiziae Cortex; H22 tumor-bearing; cellular immunity; T lymphocyte; inflammatory factor

合欢皮入药始载于《神农本草经》,具有解郁安神、活血消肿等功效。临床常配伍用于治疗失眠、焦虑、肿瘤等病症<sup>[1-3]</sup>。近年研究表明,合欢皮具有抗生育、抗癌、免疫干预等多种生物学活性,包括合欢皮三萜皂苷在内的多种物质是合欢皮发挥抗肿瘤作用的主要成分<sup>[4-6]</sup>。国内外学者对其抗癌活性的报道颇多,主要集中在体外的抑瘤效应、促进肿瘤细胞凋亡和对新生血管的影响等方面<sup>[7-9]</sup>。但对其抗肿瘤免疫机制,尤其是细胞抗肿瘤免疫缺乏深入的研究。T 淋巴细胞及其相关分子如白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),凋亡诱导因子配体(FasL)等是肿瘤免疫的核心成员,其水平变化与机体抗肿瘤免疫强弱密切相关。本研究通过制备 H22 荷瘤小鼠动物模型,分别观察合欢皮总皂苷对实验小鼠 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞亚群、细胞因子 IL-2 和 TNF- $\alpha$  水平,凋亡诱导因子(Fas),FasL 和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达的影响,探讨其抑制肿瘤的细胞免疫干预机制,为合欢皮抗肿瘤物质的研究和临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物及细胞株** SPF 级昆明种小鼠 60 只,体重(20 $\pm$ 2) g,雌雄各半,购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司,动物合格证号 SCXK(军)2012-0011。小鼠肝癌细胞株—H22 细胞株,购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

**1.2 药物及试剂** 合欢皮购自同仁堂贵阳药店,经贵阳中医学院生药教研室钟可副教授鉴定为豆科植物合欢 *Albizia julibrissin* 的干燥树皮。合欢皮总皂苷由贵阳中医学院中药化学实验室提取,按给药剂量稀释成 3 种不同的质量浓度 0.40, 0.20, 0.10 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>;注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 14101625), RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8114156);兔抗小鼠单抗 CD3-FITC, CD4-PE-Cy7, CD8-PE(美国 eBioscience 公司,批号分别为 E16592-104, E07501-1632, E01037-1636);小

鼠 IL-2 和 TNF- $\alpha$  检测试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,批号分别为 20130125, 20130315); Fas 抗体, FasL 抗体, PCNA 抗体, 盐酸二氨基联苯胺(DAB)显色试剂(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 BA0484, PB0042, BM0104, AR1000)。

**1.3 仪器** 3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司), FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司), ELX800 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), IX70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 模型建立与动物分组** 动物购回适应性饲养 1 周后,随机分为 2 组,1 组 10 只,为正常组,另 1 组 50 只,为模型组。参照文献[10]方法,选择腹腔接种 7~9 d 生长良好的 H22 肝癌小鼠,无菌抽取腹水,以生理盐水稀释,调整细胞密度为 1 $\times$ 10<sup>7</sup> 个/mL, 0.2% 台盼蓝染色,镜下瘤细胞存活率 >95% 时可用。模型组小鼠右前肢腋窝皮下接种瘤液 0.2 mL/只。接种 24 h 后,随机分为 5 组,分别为模型组、环磷酰胺组、合欢皮总皂苷高、中、低剂量组,每组 10 只。

**2.2 给药与血液标本采集** 合欢皮总皂苷各剂量组按每只小鼠 0.2 mL *ip* (3 种剂量依次为 4, 2, 1 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 根据皂苷含量换算,分别相当于生药剂量 20, 10, 5 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>);环磷酰胺组 *ip* 环磷酰胺 20 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 给药体积为 0.2 mL;模型组给予等体积生理盐水。以上各组均在实验第 2 天开始注射,每天 1 次,连续 11 d。于第 12 天,摘除眼球取血,常规制备血清备用。

**2.3 小鼠脾细胞悬液制备**<sup>[11]</sup> 各组动物采集血液标本后,脱颈处死小鼠,无菌摘取脾脏,于无牛血清 RPMI-1640 培养液中,置 100 目钢网上轻轻碾碎,离心收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,台盼蓝染色计数活细胞数在 95% 以上,用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液调整细胞密度为 4 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL 备用。

**2.4 对 H22 荷瘤的抑制作用** 完整剥取瘤组织称质量,按公式计算抑瘤率。称质量后瘤体以 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋备用。

$$\text{肿瘤抑瘤率} = (1 - \text{给药组平均瘤重} / \text{模型组平均瘤重}) \times 100\%$$

**2.5 流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群** 取脾细胞悬液 0.3 mL 于试管内,分别加入 CD3-FITC, CD4-PE-Cy7, CD8-PE 单抗各 1 μL,振荡混匀,室温避光放置 30 min,用 PBS 洗涤后重悬,流式细胞术检测分析脾淋巴细胞 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 表达率,计算 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>。

**2.6 IL-2, TNF-α 水平的测定** 取上述小鼠血清,酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法测定 IL-2 和 TNF-α 水平,具体操作按试剂盒说明书进行。

**2.7 H22 瘤细胞 Fas, FasL 和 PCNA 表达的检测** 石蜡切片免疫组化染色按 SP 法进行, Fas, FasL 和 PCNA 抗体以 1:100 稀释,用 PBS 替代一抗作为阴性对照,辣根过氧化物酶标记的二抗以 1:200 稀释, DBA 显色,以苏木精复染,乙醇梯度脱水,中性树脂封片,显微镜下观察。以胞质(膜)、胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性。随机选取 10 个高倍视野,观察每个视野下 100 个肿瘤细胞的阳性细胞数,计算阳性表达率。

**2.8 肿瘤组织的病理学检查** 肉眼观察各实验组小鼠的移植瘤大体形态,瘤组织切片进行苏木素-伊红 (HE) 染色,镜下观察肿块组织特性,并进行组间比较。

**2.9 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,计算结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 2 合欢皮总皂苷对 H22 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of SA on T cell subsets of H22 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> / %	CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> / %	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
正常	-	21.74 ± 2.95 <sup>2)</sup>	13.32 ± 1.84 <sup>2)</sup>	1.64 ± 0.19
模型	-	15.43 ± 3.00 <sup>3)</sup>	10.37 ± 2.16 <sup>3)</sup>	1.50 ± 0.19
环磷酰胺	20	11.28 ± 1.90 <sup>2)</sup>	7.63 ± 2.03 <sup>2)</sup>	1.52 ± 0.24
合欢皮总皂苷	1	14.23 ± 3.47	9.55 ± 1.78	1.49 ± 0.22
	2	18.90 ± 2.95 <sup>2)</sup>	12.46 ± 1.68 <sup>1)</sup>	1.53 ± 0.25
	4	17.76 ± 2.09	11.74 ± 1.86	1.54 ± 0.24

**3.4 对 H22 荷瘤小鼠血清 IL-2, TNF-α 水平的影响** 与正常组比较,模型组小鼠血清 IL-2, TNF-α 水平明显下降 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,环磷酰胺组小鼠血清 IL-2, TNF-α 水平明显低下 ( $P < 0.01$ ); 合

### 3 结果

**3.1 小鼠一般状况观察** 小鼠接种 H22 细胞后,最早第 3 天、最晚第 5 天时出现肉眼可见的肿瘤,成瘤率 100%。接种第 12 天,模型组皮下移植瘤的平均瘤重为 2.11 g > 1 g,表明移植瘤模型建立成功。小鼠均未出现不良反应,注射部位无溃烂和坏死现象。

**3.2 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用** 与模型组比较,各用药组小鼠移植瘤的平均质量均显著减小 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。合欢皮总皂苷对 H22 肿瘤的抑瘤率有随着剂量增加而上升的趋势,最高抑瘤率达 27.96%。见表 1。

表 1 合欢皮总皂苷对 H22 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 1 Inhibiting effect of total saponins from Albiziae Cortex (SA) on tumor in H22 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

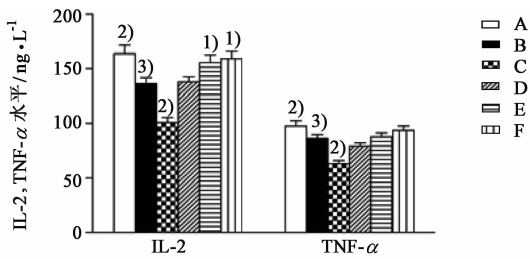
组别	剂量 / mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	瘤重 / g	抑瘤率 / %
模型	-	2.11 ± 0.46	-
环磷酰胺	20	1.31 ± 0.24 <sup>2)</sup>	37.91
合欢皮总皂苷	1	1.74 ± 0.39 <sup>1)</sup>	17.54
	2	1.58 ± 0.32 <sup>2)</sup>	25.12
	4	1.52 ± 0.28 <sup>2)</sup>	27.96

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与正常组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 2, 3 及图 1 同)。

**3.3 对 H22 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响** 模型组荷瘤小鼠脾脏 T 细胞亚群明显低于正常组 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,环磷酰胺组小鼠 CD4<sup>+</sup> T 细胞, CD8<sup>+</sup> T 细胞数量均明显下降 ( $P < 0.01$ ); 合欢皮总皂苷中剂量组 CD4<sup>+</sup> T 细胞, CD8<sup>+</sup> T 细胞数量明显上升 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ); 各组荷瘤小鼠 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 均无明显差异。见表 2。

欢皮总皂苷中、高剂量组 IL-2 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 各剂量组 TNF-α 水平无明显变化。见图 1。

**3.5 对 H22 瘤细胞 Fas, FasL 和 PCNA 蛋白表达的影响** Fas, FasL 蛋白阳性染色位于细胞质和细胞

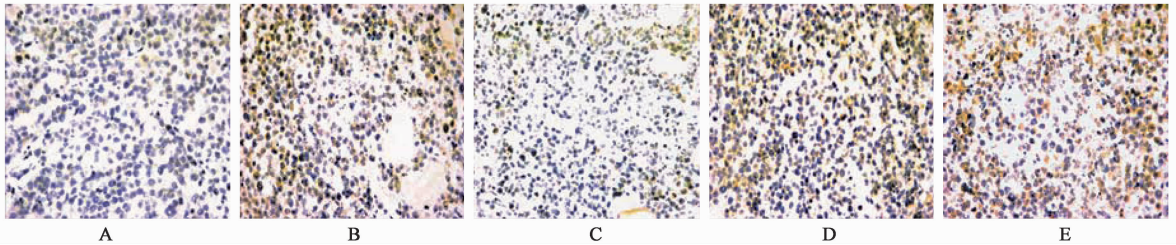


A. 正常组; B. 模型组; C. 环磷酰胺; D. 合欢皮总皂苷 1 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. 合欢皮总皂苷 2 mg·kg<sup>-1</sup>组; F. 合欢皮总皂苷 4 mg·kg<sup>-1</sup>组  
图 1 合欢皮总皂苷对 H22 荷瘤小鼠血清 IL-2, TNF-α 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effect of SA on IL-2 and TNF-α levels in serum of H22 tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

表 3 合欢皮总皂苷对 H22 细胞 Fas, FasL 和 PCNA 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / mg·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	Fas 阳性表达率	FasL 阳性表达率	PCNA 阳性表达率
模型	-	5.58 ± 1.15	33.42 ± 4.05	58.29 ± 7.61
环磷酰胺	20	13.01 ± 2.52 <sup>2)</sup>	16.71 ± 3.34 <sup>2)</sup>	27.51 ± 4.63 <sup>2)</sup>
合欢皮总皂苷	1	7.14 ± 1.58	26.06 ± 4.66 <sup>2)</sup>	49.62 ± 7.24 <sup>2)</sup>
	2	12.77 ± 2.98 <sup>2)</sup>	22.53 ± 4.77 <sup>2)</sup>	36.88 ± 4.34 <sup>2)</sup>
	4	11.10 ± 2.73 <sup>2)</sup>	18.63 ± 3.10 <sup>2)</sup>	39.79 ± 6.45 <sup>2)</sup>



A. 模型组; B. 环磷酰胺 20 mg·kg<sup>-1</sup>组; C. 合欢皮总皂苷 1 mg·kg<sup>-1</sup>组; D. 合欢皮总皂苷 2 mg·kg<sup>-1</sup>组; E. 合欢皮总皂苷 4 mg·kg<sup>-1</sup>组 (图 3 ~ 5 同)

图 2 合欢皮总皂苷对小鼠 H22 肿瘤组织 Fas 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of SA on expression of Fas protein in H22 tumor tissues in mice (IHC, ×400)

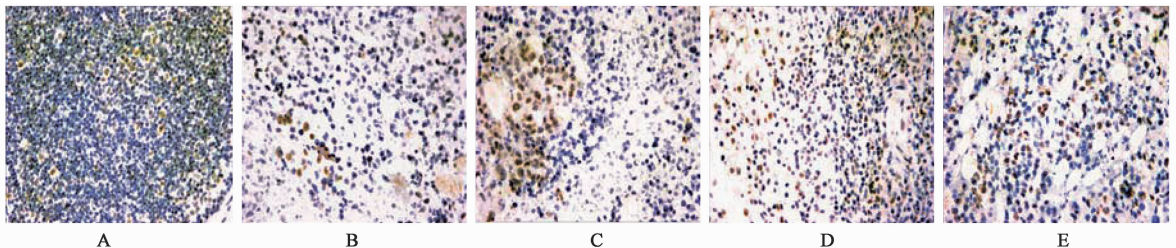


图 3 合欢皮总皂苷对小鼠 H22 肿瘤组织 FasL 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of SA on expression of FasL protein in H22 tumor tissues in mice (IHC, ×400)

#### 4 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类生命健康的疾病,其死亡率仅次于心脑血管病,且发生率有逐年上升的

膜,以弥漫性分布为主,PCNA 蛋白阳性染色位于细胞核内。与模型组比较,环磷酰胺组、合欢皮总皂苷中、高剂量组肿瘤细胞 Fas 表达水平显著升高;经环磷酰胺、合欢皮总皂苷各剂量干预后, FasL, PCNA 蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3,图 2 ~ 4。

**3.6 对 H22 移植瘤组织病理形态学的影响** 肉眼见 H22 移植瘤呈块状,质嫩,色灰白,模型组移植瘤的体积明显大于各用药组。镜下见模型组肿瘤细胞排列紊乱,细胞密度大,核染色深且细胞核固缩多见;环磷酰胺组及合欢皮总皂苷各剂量组肿瘤细胞排列疏松,瘤细胞大小不一,染色质粗细不均、淡染,有不同程度的坏死。见图 5。

趋势<sup>[12]</sup>。作为肿瘤治疗主要手段的化疗虽然有较高的治愈率,但是常引起骨髓抑制、免疫功能低下等副反应,使患者难以坚持治疗。大量临床及实验研

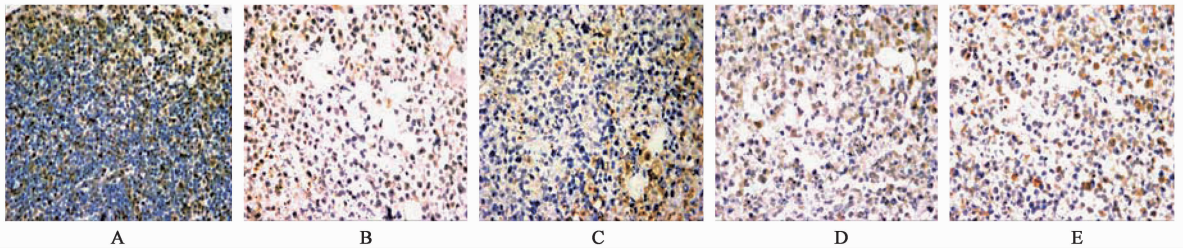


图 4 合欢皮总皂苷对小鼠 H22 肿瘤组织 PCNA 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig.4 Effect of SA on expression of PCNA protein in H22 tumor tissues in mice(IHC, ×400)

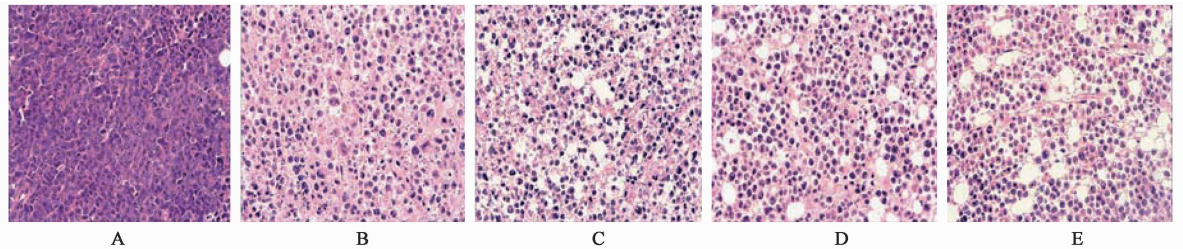


图 5 合欢皮总皂苷对小鼠 H22 移植瘤肿瘤组织的影响(HE, ×400)

Fig.5 Effect of SA on H22 transplanted tumor tissues in mice(HE, ×400)

究表明,许多中药具有明显抗肿瘤作用,尤其在减轻临床症状、缓解化疗毒副作用等方面有很好效果。合欢皮为常见中药,具有解郁安神、活血消肿的功效。近年药理研究表明,合欢皮及其提取物具有较强的抑制癌细胞的活性<sup>[4-5,8,13]</sup>,以合欢皮三萜皂苷为主的多种物质是合欢皮发挥抗肿瘤作用的主要成分。

目前认为,细胞免疫是抗肿瘤免疫的主要方式。CD8<sup>+</sup>T 细胞是抗肿瘤免疫的主要效应细胞,可直接杀伤带有致敏抗原的肿瘤细胞;CD4<sup>+</sup>T 细胞可通过分泌多种细胞因子,激活 B 细胞,巨噬细胞,NK 细胞等发挥抗肿瘤作用,二者具有协同作用。IL-2 主要由 T 淋巴细胞产生,以自分泌或旁分泌方式发挥效应,可促进 NK 细胞的细胞毒活性和细胞因子的分泌,并通过激活单核/巨噬细胞,增强后者的肿瘤免疫活性。T 淋巴细胞受到刺激后分泌产生的 TNF- $\alpha$ ,具有杀伤或抑制肿瘤细胞的活性。Fas,FasL 是细胞免疫的重要分子,活化的 T 淋巴细胞表达 FasL 与肿瘤细胞表面的 Fas 分子结合,可诱导肿瘤细胞凋亡。Fas 蛋白的数量或功能异常是恶性肿瘤发生和发展的原因之一,肿瘤细胞常以下调 Fas,高表达 FasL 的方式逃避淋巴细胞的杀伤,并得以不断增殖。PCNA 在细胞核内阳性表达的高低与细胞增殖活性密切相关,PCNA 的免疫活性能较好地反映细胞的增殖活性。

本研究结果显示,各实验组小鼠接种 H22 细胞后,均生长出肉眼可见的肿瘤,H22 移植瘤造模成

功。经合欢皮治疗后,小鼠移植瘤的平均质量均显著下降,且合欢皮总皂苷对 H22 肿瘤的抑瘤率有随剂量增加而上升的趋势,提示合欢皮总皂苷能抑制小鼠 H22 肿瘤的生长,其抑制作用具有一定量效关系。与正常组比较,模型组小鼠脾脏 T 细胞亚群、血清 IL-2,TNF- $\alpha$  水平均明显下降,提示荷瘤小鼠免疫应答减弱。合欢皮总皂苷可在一定剂量下增加荷瘤鼠 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群的数量,但对 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>无影响,表明合欢皮总皂苷对 T 细胞免疫功能的调节作用是通过增加 T 细胞数量来实现的,与 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>无关。合欢皮总皂苷中、高剂量组 IL-2 水平明显升高,TNF- $\alpha$  水平无明显变化,提示合欢皮可促进细胞分泌 IL-2,从而间接增强 NK 细胞、单核/巨噬细胞的抗肿瘤效应,而对细胞表达的 TNF- $\alpha$  无调节作用。合欢皮总皂苷各剂量组 FasL,PCNA 蛋白表达较模型组明显降低,中、高剂量组 Fas 表达水平显著升高,提示合欢皮可通过促进肿瘤细胞 Fas 蛋白表达,降低 FasL,PCNA 蛋白表达,从而达到诱导肿瘤细胞凋亡,并抑制其在体内增殖的效果。HE 染色病理学检查结果显示合欢皮总皂苷能有效破坏肿瘤细胞,其效果接近环磷酰胺。

综上所述,合欢皮总皂苷对小鼠 H22 肿瘤细胞的生长具有明显抑制作用。其机制可能与调节荷瘤鼠的细胞免疫功能有关。通过上调 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群,促进细胞分泌 IL-2,及提高 Fas 蛋白表达并抑制 FasL,PCNA 蛋白,一方面促进肿瘤细胞的杀伤和凋亡,另一方面抑制其增殖。此外,合欢皮总

皂苷对细胞免疫的干预机制还存在多靶点、多途径的可能,其效应有待于进一步研究。

中药作为肿瘤治疗的辅助手段,可通过对机体免疫功能的调节,有效缓解放化疗过程中产生的免疫抑制等副反应,从而提高疗效、延长患者生存期,其肿瘤免疫效应日益受到关注<sup>[14]</sup>。本研究对合欢皮总皂苷抗肿瘤的细胞免疫调节效应进行了初步探讨,为扩展该药的临床应用范围积累了一定的实验依据。

#### [参考文献]

[1] 杨援朝,傅培生. 解郁安神汤治疗更年期失眠 48 例 [J]. 陕西中医,2008,29(7):783-784.

[2] 李丽娜,高凌云. 龙胆夜安汤治疗失眠伴焦虑 60 例 [J]. 河南中医,2015,35(5):1055-1057.

[3] 方青,莫剑翎. 参芪贞精汤治疗晚期癌症 27 例 [J]. 浙江中医杂志,2003,38(7):293.

[4] 韩莉,崔景荣,李敏,等. 合欢皮皂苷对 S180 实体瘤小鼠的抑瘤作用的研究 [J]. 实用医学进修杂志,1999,27(3):152-154.

[5] 田维毅,马春玲,刘芬,等. 合欢皮乙醇提取物在荷瘤小鼠体内抗肿瘤作用的研究 [J]. 临沂医学专学报,2000,22(1):5-6.

[6] 田维毅,冯济凤,武孔云,等. 合欢皮总皂甙对小鼠

NK 细胞杀伤活性的影响 [J]. 贵阳中医学院学报,2003,25(3):47-48.

[7] 陈丽敏,康晓星,王华,等. 合欢皮不同路线提取皂苷对小鼠移植瘤的影响 [J]. 海峡药学,2010,22(1):36-39.

[8] 蔡兵,张华风,张冬云. 光叶合欢提取物诱导细胞凋亡的研究 [J]. 癌症,2002,21(4):373-378.

[9] 易清清,刘玲艳,冯磊,等. 合欢皮中抗肿瘤新生血管高效低毒组分的筛选及药效学研究 [J]. 天然产物研究与开发,2013,25(8):1046-1051.

[10] 刘瑾. 白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性小鼠肝癌肿瘤组织 Bcl-2, Bax 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):227-230.

[11] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京:人民军医出版社,2000:3.

[12] Shastri A, Shastri S S. Cancer screening and prevention in low-resource settings [J]. Nat Rev Cancer,2014,14(12):822-829.

[13] 邹坤,崔景容,冉福香,等. 合欢皮中两个新八糖苷的分离鉴定和活性研究 [J]. 有机化学,2005,25(6):654-659.

[14] 赵冬耕,孙佳,王明艳,等. 抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):136-139.

[责任编辑 周冰冰]