

黄芪多糖对黑色素瘤小鼠调节性 T 细胞的作用

孙舒玉¹, 何小鹃², 柴旺¹, 吕诚², 王萍³, 吕爱平², 喻长远^{1*}

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029;

2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

3. 中日友好医院临床医学研究所免疫室, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨黄芪多糖对黑色素瘤小鼠调节性 T 细胞(Treg)免疫活性的影响。方法: 建立 B16-F10 荷瘤小鼠模型, C57BL/6 小鼠随机分为正常组、模型组、环磷酰胺 (CTX) 组、黄芪多糖低剂量组 (0.15 g·kg⁻¹)、黄芪多糖高剂量组 (0.3 g·kg⁻¹)。造模后第 2 天开始 ig 给药, 给药 14 d 后处死各组小鼠, 取肿瘤称重计算抑瘤率, 取脾脏制备单细胞悬液, 采用流式细胞术检测小鼠脾脏中 Treg 的比例, 通过实时定量 PCR 检测小鼠脾脏中转化生长因子-β (TGF-β)mRNA, 白细胞介素-10 (IL-10) mRNA 的表达。结果: 黄芪多糖能够抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长 (P < 0.05), 降低脾脏中 Treg 的比例 (P < 0.01), 降低脾脏中 TGF-β mRNA, IL-10 mRNA (P < 0.05) 的表达。结论: 黄芪多糖可能通过降低荷瘤小鼠脾脏中 Treg 数目, 抑制 TGF-β, IL-10 分泌, 从而实现其抑瘤作用。

[关键词] 黄芪多糖; 调节性 T 细胞; 肿瘤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0176-03

[doi] 10.11653/syjf2013120176

Effects of Astragalus Polysaccharide on Treg Cells in Tumor-bearing Mice

SUN Shu-yu¹, HE Xiao-juan², CHAI Wang¹, LV Cheng², WANG Ping³, LV Ai-ping², YU Chang-yuan^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing

100700, China; 3. Institute of Clinical Medical Science, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of astragalus polysaccharide (APS) on regulatory T cells (Treg) in tumor-bearing mice. **Method:** Mice were subcutaneously implanted with B16-F10 cells in the right back region. Then these mice were randomly divided into model group, cyclophosphamide (CTX) group, APS low dose group (0.15 g·kg⁻¹), APS high dose group (0.3 g·kg⁻¹). Another ten normal mice were used as normal control. After 24 h, intragastric administration was performed. After 14 days of intragastric administration, tumors were removed and weighed, Treg of spleen were detected by flow cytometer (FCM), mRNA expression of transforming growth factor-β (TGF-β) and interleukin-10 (IL-10) in spleen was measured by real-time PCR. **Result:** The results showed that APS could inhibit the B16-F10 tumor growth, reduce the proportion of Treg in spleen (P < 0.01), decrease mRNA expression of TGF-β and IL-10 in spleen (P < 0.05). **Conclusion:** The results indicated that APS might inhibit tumor growth partly by reducing the proportion of Treg in spleen and decreasing mRNA expression of TGF-β and IL-10 in spleen.

[Key words] astragalus polysaccharide; regulatory T cells; tumor

黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 是黄芪中含量最多、免疫活性最强的一类物质, 具有增强

免疫系统功能、抗肿瘤、保肝、降血糖、抗病毒、延缓衰老等作用^[1-5]。调节性 T 细胞 (regulatory T cells,

[收稿日期] 20130121(003)

[基金项目] 科技部国家“重大新药创制”科技重大专项项目 (2009ZX09502-019), 国家自然科学基金 (81001676, 81273631, 30902000)

[第一作者] 孙舒玉, 硕士研究生, 从事药理学研究, Tel: 15201554471, E-mail: ssy_1015@163.com

[通讯作者] * 喻长远, 教授, Tel: 010-64448589, E-mail: yuchangy@sohu.com

Treg)是能够识别靶细胞主要组织相容性复合体分子所提呈的 T 细胞受体-抗原肽,并发挥一定免疫抑制功能的 T 细胞^[6],它具有免疫抑制性,能够强有力地抑制效应性 T 淋巴细胞的活化、增殖及功能^[7]。但到目前为止,还未见有黄芪多糖对荷瘤鼠 Treg 免疫活性影响的报道。为此,本研究通过建立 B16-F10 荷瘤鼠模型,ig 黄芪多糖,用流式细胞术检测脾脏中 Treg 的比例,实时定量 PCR 法检测脾脏中转化生长因子 β (TGF- β) mRNA,白细胞介素-10 (IL-10) mRNA 的表达。

1 材料

1.1 动物 50 只 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,20 ~ 22 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物许可证 SCXK(军)2007-004。

1.2 细胞 B16-F10 小鼠黑色素瘤细胞株,购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.3 药物与试剂 黄芪多糖(纯多糖,以葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖为主,占整个糖组成的 90% 以上,天津赛诺制药有限公司,批号 8J01101);环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 10101721);RPMI 1640 培养基(Gibco 公司,批号 833138);胎牛血清(Gibco 公司,批号 788097);双抗(Sigma 公司,批号 773147);磷酸盐缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 20110612);0.05% 胰酶-乙二胺四乙酸(Gibco 公司,批号 862531);PE anti-mouse CD25 抗体(Bio Legend 公司,批号 B120592);PE/Cy5 anti-mouse CD4 抗体(Bio Legend 公司,批号 B122257);Alexa Fluor@488 anti-mouse Foxp3 抗体(Bio Legend 公司,批号 B125785);Trizol Reagen RNA 提取试剂盒、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒、RealSYBR Mixture(北京康为世纪生物技术有限公司,编号 CW0581, CW0744, CW 0760)。

2 方法

2.1 培养 B16-F10 细胞 RPMI 1640 完全培养基(RPMI 1640 + 10% FBS + 1% PS),37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。待 B16-F10 细胞长满培养瓶后,用 0.05% Trypsin-EDTA 消化,传代培养,并选用对数生长期的细胞进行实验。

2.2 建立 B16-F10 荷瘤鼠模型 调整对数生长期的 B16-F10 细胞密度为 5×10^6 /mL,将 40 只 C57BL/6 小鼠用戊巴比妥钠麻醉后,按照 0.1 mL/只接种于小鼠右侧背部皮下。将造模后的 40 只小鼠随机分为 4 组:模型组、环磷酰胺(CTX)组、黄芪多糖低、高剂量组,每组 10 只;剩余 10 只用 PBS 做同样的处理,作为正常组。造模后第 2 天开始给药。

正常组和模型组 ig 生理盐水,0.2 mL/只,CTX 组 0.01 g·kg⁻¹,ip 给药,每天 1 次,连续 7 d;黄芪多糖低、高剂量组 0.15,0.3 g·kg⁻¹,0.2 mL/只,ig 给药,每天 1 次,连续给药 14 d。给药期间,每 3 天测量 1 次各组肿瘤大小。给药 14 d 后处死小鼠,取肿瘤并称重,计算抑瘤率。

抑瘤率 = [(模型组平均瘤重 - 用药组平均瘤重) / 模型组平均瘤重] × 100%

然后取脾脏制备单细胞悬液,用于流式细胞术及实时定量 PCR 检测。

2.3 检测脾脏中 Treg 的比例 用注射器针芯研磨小鼠脾脏,200 目滤布过滤,吹散,离心(1 000 r·min⁻¹,6 min)。将所得细胞加入 5 mL 裂红液裂解红细胞,4 min 后加入 PBS 终止,吹散,离心(1 000 r·min⁻¹,8 min)。调整细胞液密度 1×10^7 /mL,取 100 μ L 到 1.5 mL 管中,1% BSA 洗涤 2 次,然后将细胞重悬在 100 μ L BSA 中,分别加入抗小鼠 PE/CY5-CD4,PE-CD25 抗体,4 °C 避光孵育 30 min。用预冷的 BSA 洗涤细胞,重悬细胞后加入 1 mL 的固定/破膜工作液并再次混匀,4 °C 避光孵育 30 min。加入 2 mL 破膜缓冲工作液,离心洗涤细胞并弃去上清液,直接加入提前稀释好的荧光标记 Foxp3 抗体 5 μ L,4 °C 避光孵育 30 min。加入 4 mL 破膜缓冲工作液离心洗涤细胞并弃去上清液,最后将细胞重悬于 500 μ L 1% 多聚甲醛中,上机检测 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T/CD4⁺T 细胞比值。

2.4 脾脏中 TGF- β mRNA, IL-10 mRNA 的表达 分离得到脾细胞后,采用 Trizol 提取总 RNA,1% 电泳检测 RNA 的完整性和纯度。取 2 μ g 总 RNA 按试剂盒操作说明进行逆转录反应。取 cDNA 为模板,分别建立 TGF- β , IL-10, GAPDH 的 PCR 反应体系。引物序列分别为 TGF- β -F: 5'-TGCCCTCAACCAACACAACCCG-3', TGF- β -R: 5'-AACTGCTCCACCTTGGGCTTGC GA-3'; IL-10-F: 5'-GCTG-GACAACATACTGCTAACCGACTC-3'; IL-10-R: 5'-CCTTGATTCTGGCCATGCTTCTC-3'; GAPDH-F: 5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3', GAPDH-R: 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'。扩增循环程序为:94 °C 2 min;(94 °C 10 min,60 °C 30 s) × 40 个循环。实验结果以 CT 值表示,以 2^{- $\Delta\Delta$ CT}方法进行相对定量,其中 $\Delta\Delta$ CT = (待测样本目的基因平均 CT 值 - 待测样本内参基因平均 CT) - (对照样本目的基因平均 CT 值 - 对照样本内参基因平均 CT)。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学

差异。

3 结果

3.1 对荷瘤鼠肿瘤的影响 与模型组相比,黄芪多糖能够抑制肿瘤的生长 ($P < 0.05$),且与黄芪多糖的剂量成正相关。见表 1。

表 1 黄芪多糖对荷瘤鼠肿瘤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	-	3.101 ± 0.461	-
CTX	0.01	1.432 ± 0.333 ²⁾	53.82
黄芪多糖	0.15	2.008 ± 0.307 ¹⁾	35.25
	0.30	1.556 ± 0.337 ²⁾	49.82

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对荷瘤鼠脾脏中 Treg 比例的影响 模型组 Treg 比例明显升高,与正常组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。黄芪多糖作用后,脾脏中 Treg 比例明显下降,与模型组相比有显著性差异 ($P < 0.01$),且与黄芪多糖的给药浓度成负相关。见表 2。

3.3 对荷瘤鼠脾脏中 TGF- β mRNA, IL-10 mRNA 表达的影响 与正常组相比,模型组脾脏中 TGF- β mRNA 水平明显升高,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。如表 2 所示,黄芪多糖作用后,与模型组相比,黄芪多糖高剂量组 TGF- β mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与正常组相比,模型组脾脏中 IL-10 mRNA 水平明显升高,具有统计学差异 ($P < 0.05$)。黄芪多糖作用后,脾脏中 IL-10 mRNA 水平降低,与模型组相比具有统计学差异。见表 2。

表 2 黄芪多糖对荷瘤鼠调节性 T 细胞的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Treg 比例	TGF- β mRNA	IL-10 mRNA
		/%	相对含量	相对含量
正常	-	7.26 ± 0.24	1.02 ± 0.03	1.00 ± 0.00
模型	-	10.92 ± 0.22	2.56 ± 0.15	6.25 ± 0.25
CTX	0.01	8.00 ± 0.02 ²⁾	1.28 ± 0.02	0.18 ± 0.00 ²⁾
黄芪多糖	0.15	8.90 ± 0.29 ²⁾	1.87 ± 0.10	1.00 ± 0.00 ¹⁾
	0.30	8.23 ± 0.30 ²⁾	0.34 ± 0.11 ²⁾	0.42 ± 0.05 ²⁾

4 讨论

调节性 T 细胞是一群具有抑制其他免疫细胞功能的负调控细胞,如今研究进展最快的是 CD4⁺CD25⁺Treg。近年来,Treg 在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用及其机制得到了更为深入的研究,在肿瘤免疫逃逸过程中,Treg 不仅能通过细胞间的直接接触抑制效应 T 细胞的功能,还能通过分泌细胞因子等多种方式发挥抑制作用^[8-11]。因此,如何有效清除和控制 Treg 已经成为肿瘤免疫研究的热点之一。本研究显示,黄芪多糖作用后,荷瘤鼠脾脏中的 Treg 数目明显降低,从而能够解除其抑制 T 细胞的抗肿瘤免疫,

使肿瘤细胞不容易逃逸杀伤细胞的攻击。

TGF- β , IL-10 属于免疫负调控细胞因子,研究表明,Treg 可通过分泌 TGF- β , IL-10 抑制 T 细胞的活化和增殖,并且 Treg 与 T 细胞的直接接触可提升上述细胞因子对 T 细胞的抑制作用^[12]。本研究显示,黄芪多糖作用后,脾脏中 TGF- β mRNA, IL-10 mRNA 水平降低,提示黄芪多糖能够抑制 TGF- β , IL-10 分泌及其介导的免疫抑制,进一步表明黄芪多糖具有抑瘤作用。本研究结果表明黄芪多糖能够通过降低荷瘤鼠脾脏中 Treg 数目及抑制 TGF- β , IL-10 分泌来抑制荷瘤鼠肿瘤的生长,这为黄芪多糖的抗肿瘤机制研究提供了新的依据,而其对 Treg 更深入的作用机制还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 孔令梅. 黄芪的免疫调节作用[J]. 内蒙古医学杂志, 2007, 39(1): 73.
- [2] 何文涓,袁志坚,何晓升. 黄芪多糖的药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 692.
- [3] 王宏艳. ERK1/2 在黄芪多糖促进 HepG2 细胞凋亡中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 235.
- [4] 吴瑕,杨薇,张磊,等. 不同分子量段黄芪多糖对整体及黏膜免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 169.
- [5] 柴旺,何小鹏,朱军璇,等. 黄芪多糖对 B16-F10 荷瘤鼠髓样抑制细胞免疫活性的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(1): 63.
- [6] Lifeng H, Yongming Y. T cells in the suppression of immune responses[J]. Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(2): 93.
- [7] Khazaie K, Von Boehmer H. The impact of CD4⁺CD25⁺Treg on tumor specific CD8⁺ T cell cytotoxicity and cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(2): 124.
- [8] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(4): 295.
- [9] Sakaquchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self[J]. Nat Immunol, 2005, 6(4): 345.
- [10] 于益芝,曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 22.
- [11] 李晓冰,何小鹏,刘彪,等. 甘草多糖对 H22 荷瘤小鼠的免疫调节作用[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(4): 363.
- [12] 李颖. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞的新进展[J]. 现代免疫学, 2010, 30(6): 520.

[责任编辑 聂淑琴]