

狼毒多糖对 S180 荷瘤鼠免疫功能的调控作用

崔立然^{1,2}, 徐浩³, 刘吉成^{3*}, 孙永旭³, 蒋丽艳³

(1. 齐齐哈尔医学院第一附属医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161041;

2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 3. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的: 观察狼毒多糖(EFP-AW1)对 S180 荷瘤鼠免疫逃逸功能的影响。方法: 将 50 只雄性 ICR 小鼠随机分为空白对照组、模型组、狼毒多糖 100 mg·kg⁻¹组、环磷酰胺 100 mg·kg⁻¹组(CTX)、联合给药组(EFP-AW1 + CTX)。分组给药 10 d 后, 通过噻唑蓝(MTT)、酶联免疫吸附实验(ELISA)、流式细胞术(FCM)之方法, 检测荷瘤鼠脾淋巴细胞增殖情况、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、T 淋巴细胞亚群(CD4⁺T, CD8⁺T)表达。结果: 狼毒多糖可增加刀豆蛋白 A(ConA)/脂多糖(LPS)诱导的荷瘤鼠脾淋巴细胞增殖能力($P < 0.05$), 降低血清中 TGF- β_1 的分泌($P < 0.05$), 增加 CD8⁺T 细胞百分含量($P < 0.05$)。结论: EFP-AW1 可通过增强荷瘤鼠抗肿瘤免疫应答功能, 抑制肿瘤细胞在体内转移和复发。

[关键词] 狼毒多糖; 免疫逃逸; S180 肉瘤; 淋巴细胞; T 细胞亚群

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0255-04

Euphorbia Fischeriana Ploysaccharide Regulates Immune Function in S180 Tumor-bearing Mice

CUI Li-ran^{1,2}, XU Hao³, LIU Ji-cheng^{3*}, SUN Yong-xu³, JIANG Li-yan³

(1. First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161041, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

3. Institute of Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe euphorbia fischeriana polysaccharide (EFP-AW1) regulate the effect of immunologic function in S180 tumor-bearing mice. **Method:** Fifty male institute of cancer research (ICR) mice were randomly divided into 5 groups: control group, model group, EFP-AW1 group, CTX group, EFP-AW1 and CTX group. The mice were grouped and treated for 10 days by EFP-AW1. The splenocyte proliferation was measured by MTT in order to assess the effects on the immune activity by EFP-AW1; transforming growth factor (TGF- β_1) determination by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); CD4⁺T, CD8⁺T tumor detected by flow cytometry in peripheral blood. **Result:** EFP-AW1 could significantly enhance ConA/LPS-induced T lymphocyte proliferation, and reduce TGF- β_1 secretion, and increase the number of CD8⁺T lymphocytes in peripheral blood. **Conclusion:** EFP-AW1 can enhance immune response function in S180 tumor-bearing mice, inhibit tumor cell *in vivo* metastasis and recurrence.

[Key words] euphorbia fischeriana polysaccharide; immune escape; sarcoma180; lymphocyte; T-cell subsets

[收稿日期] 20120628(019)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973902)

[第一作者] 崔立然, 博士在读, 副主任药师, 从事中药多糖活性成分研究, Tel: 0452-6882623, E-mail: clrxh@126.com

[通讯作者] * 刘吉成, 博士, 教授, 从事中药抗肿瘤机制研究, Tel: 0452-2567759, E-mail: liukaoboba@126.com

狼毒大戟为大戟科多年生草本植物, 根部入药, 其味辛, 性平, 有毒。入肺、脾、肝经, 具有逐水祛痰, 散结杀虫的功效。中药治疗肿瘤讲求辨证施治整体调节的观点, 具有较少的副作用, 可较好的调整机体的免疫功能。近年来, 国内外学者对狼毒大戟做了大量的研究工作^[1-2], 但对于其抗肿瘤免疫逃逸作

用,特别是从其根部提取的多糖 EFP-AW1 抗肿瘤免疫逃逸的研究未见报道。本实验初步观察 EFP-AW1 调控 S180 荷瘤小鼠免疫逃逸作用的机制,为中药狼毒在临床上的抗肿瘤作用的开发提供依据。

1 材料

1.1 药物 狼毒大戟购于齐齐哈尔市药材公司,经齐齐哈尔医学院郭丽娜教授鉴定为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud 的干燥根,EFP-AW1 为本实验室从狼毒大戟中新发现的低分子多糖化合物^[1]。分子量为 10.830 Da,结构式见图 1。

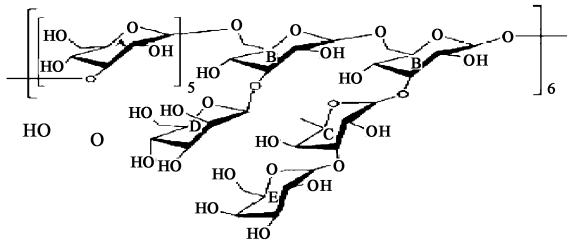


图 1 EFP-AW1 结构式

环磷酰胺 (CTX):山西普德药业股份有限公司,批号 04110603。

1.2 动物 清洁级雄性 ICR 小鼠,体重(20 ± 2) g,6~8 周龄,由吉林大学白求恩医学院动物实验中心提供,动物许可证号 SCXK-(吉)2007-0003。购买后饲养 1 周进行实验。

1.3 细胞株 小鼠实体移植肉瘤 S180 购自中国科学院上海细胞库。

1.4 试剂 FITC 标记的抗小鼠单克隆抗体 CD4 (美国 BD Pharmingen 公司,批号 55501);PE 标记的抗小鼠单克隆抗体 CD8a (美国 BD Pharmingen 公司,批号 24529);FITC 标记的大鼠 IgG2a (美国 BD Pharmingen 公司,批号 85505);TGF-β₁ ELISA 试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司,批号 M110923-17a);ConA,LPS (均为美国 Sigma 公司生产)。

2 方法

2.1 分组及给药 无菌取接种 S180 第 8 天的小鼠腹水,用 0.4% 台盼蓝计数,RPMI 1640 液调细胞密度至 1 × 10⁶/mL。取 ICR 小鼠 50 只,除正常对照组小鼠外,其余每只小鼠右侧腋下皮下注射 0.2 mL 瘤细胞悬液。于接种后第 2 天将荷瘤小鼠随机分成 3 组,每组 10 只,分别为模型组、中药组、环磷酰胺组。正常组和模型组:0.9% NaCl 注射液 0.02 mL · g⁻¹,ig;多糖组(EFP-AW1):EFP-AW1 100 mg · kg⁻¹,ig;环磷酰胺组(CTX):0.9% NaCl 注射液 0.02 mL · g⁻¹,ig,第 3 天注射 1 次 CTX,100 mg · kg⁻¹,ip;联合

用药组(EFP-AW1 + CTX):EFP-AW1 100 mg · kg⁻¹,ig,第 3 天注射 1 次 CTX,100 mg · kg⁻¹,ip。连续给药 10 d 后禁食,第 11 天颈椎脱臼处死动物取血、剥离瘤组织、取脾。

2.2 抑瘤作用 剥离瘤组织,称重,计算各组抑瘤率。

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

2.3 淋巴细胞转化实验 取给药 10 d 的荷瘤鼠脾脏,制备脾淋巴细胞悬液,各孔加等体积的 ConA 诱导的 T 细胞刺激组溶液(终质量浓度为 5 mg · L⁻¹),或 LPS 诱导的 B 细胞刺激组(终质量浓度为 10 μg · mL⁻¹),重复 6 孔,37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 60 h 后,酶标仪 570 nm 处测定吸光度(A)。并按下式计算刺激指数(SI)

$$SI = \text{加有丝分裂原培养物的 } A \text{ 均值} / \text{不加有丝分裂原培养物 } A \text{ 均值}$$

2.4 血清 TGF-β₁ 测定 给药后取荷瘤小鼠血清按试剂盒说明书测定血清中 TGF-β₁ 含量。

2.5 外周血 CD4⁺T,CD8⁺T 细胞检测 给药后荷瘤小鼠抗凝血 100 μL 加入流式管中,加入 FITC 标记的 CD4⁺ 抗体和 PE 标记的 CD8a⁺ 各 20 μL 混匀,上 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测,利用 BD CBA 软件分析。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 S180 荷瘤小鼠体内生长的抑制效应 EFP-AW1 组与模型组比较有较好的抑制作用(P < 0.05)。EFP-AW1 对小鼠 S180 肉瘤抑瘤率达到 31.55%,EFP-AW1 + CTX 组抑瘤率为 59.89%,说明 EFP-AW1 具有体内抗肿瘤作用(表 1)。

表 1 EFP-AW1 对 S180 荷瘤鼠抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	瘤重/g	抑瘤率/%
模型	-	1.87 ± 0.32	-
EFP-AW1	0.1	1.28 ± 0.21 ¹⁾	31.55
CTX	0.1	0.68 ± 0.14 ¹⁾	63.64
EFP-AW1 + CTX	0.1 + 0.1	0.75 ± 0.16 ¹⁾	59.89

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05。

3.2 脾淋巴细胞转化能力 EFP-AW1,EFP-AW1 + CTX 联合免疫组能够促进 ConA/LPS 诱导的 T/B 淋巴细胞有丝分裂的作用,可显著增强有丝分裂原

诱导的 T/B 淋巴细胞增殖,增强荷瘤小鼠免疫功能(表 2)。

表 2 EFP-AW1 对 S180 荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ConA 刺激	LPS 刺激
空白	-	2.28 ± 0.42	1.73 ± 0.33
模型	-	1.21 ± 0.26 ¹⁾	1.28 ± 0.29 ¹⁾
EFP-AW1	0.1	1.92 ± 0.31 ²⁾	1.69 ± 0.26 ²⁾
CTX	0.1	1.18 ± 0.29 ¹⁾	1.27 ± 0.21 ¹⁾
EFP-AW1 + CTX	0.1 + 0.1	1.62 ± 0.36 ²⁾	1.59 ± 0.35 ²⁾

注:与空白组比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比²⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

3.3 血清 TGF- β_1 含量 与空白组比较,模型组、CTX 组 TGF- β_1 分泌显著高于正常组($P < 0.05$);与模型组比较,EFP-AW1 组和 EFP-AW1 + CTX 组 TGF- β_1 分泌显著低于模型组($P < 0.05$);模型组与 CTX 组比较无显著性差异。EFP-AW1 组与空白组比较无显著性差异。EFP-AW1 可降低免疫抑制小鼠 TGF- β_1 的分泌水平(表 3)。

表 3 EFP-AW1 对 S180 荷瘤小鼠产生 TGF- β_1 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	A	TGF- β_1 /μg·L ⁻¹
空白	-	1.53 ± 0.25	5.37 ± 0.59
模型	-	2.28 ± 0.33 ¹⁾	8.18 ± 0.89 ¹⁾
EFP-AW1	0.1	1.34 ± 0.21 ¹⁾	4.66 ± 0.44 ²⁾
CTX	0.1	2.21 ± 0.16 ¹⁾	7.92 ± 0.25 ¹⁾
EFP-AW1 + CTX	0.1 + 0.1	1.78 ± 0.28 ²⁾	6.31 ± 0.70 ²⁾

3.4 外周血 T 淋巴细胞表型 CD4⁺, CD8⁺ 模型组 CD4⁺T 细胞与空白组比虽有降低,但无统计学意义;模型组、CTX 组 CD8⁺T 分子与空白组相比,有非常显著性差异($P < 0.05$);EFP-AW1 组与 EFP-AW1 + CTX 组均可以提高 S180 荷瘤鼠 CD8⁺T 分子的表达,与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$),说明 EFP-AW1 可以提高荷瘤鼠 CD8⁺T 分子的表达,拮抗 CTX 的抑制作用(表 4)。

4 讨论

许多实验证明,肿瘤可通过多种免疫逃避机制来抵抗机体的免疫应答。如抑制抗肿瘤 T 细胞的活化和分化。在肿瘤微环境中避免效应淋巴细胞浸润肿瘤组织并抑制淋巴细胞的功能^[3,4]。机体的免疫功能随着肿瘤的不断生长呈进行性下降,许多肿

表 4 EFP-AW1 对荷瘤鼠外周血中 CD4⁺T, CD8⁺T 淋巴细胞亚群含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T
空白	-	34.37 ± 5.29	21.99 ± 3.22
模型	-	28.14 ± 4.03	8.92 ± 1.12 ¹⁾
EFP-AW1	0.1	36.33 ± 5.36	19.78 ± 0.82 ²⁾
CTX	0.1	30.05 ± 6.48	9.56 ± 0.94 ¹⁾
EFP-AW1 + CTX	0.1 + 0.1	33.23 ± 1.27	20.12 ± 2.43 ²⁾

瘤患者都存在肿瘤微环境的免疫抑制,构成了肿瘤发展过程中恶性转化链中的重要环节^[5],很大程度上决定各种治疗方案的成败。

中药多糖在提高免疫力方面有着较强的活性^[6-8]。多糖是狼毒的主要成分之一^[9],对于狼毒多糖成分分离鉴定少见报道^[9-10],其药效活性仅有樊俊杰研究表明瑞香狼毒多糖可明显改善环磷酰胺抑制的小鼠免疫功能^[8]。课题组从中药狼毒大戟根部发现了新的多糖成分 EFP-AW1,并观察其对 S180 荷瘤小鼠抗肿瘤免疫逃避机制,研究表明其对荷瘤鼠脾淋巴细胞增殖有促进作用,并可明显下调血清中 TGF- β_1 含量,增加外周血中淋巴细胞 CD8⁺T 分子的表达。TGF- β_1 已被证实为 1 种强效免疫抑制物质,是抑制 T 细胞增殖及其细胞毒活性的主要介导者,因而也被称为 T 细胞抑制因子^[11]。课题组研究发现,EFP-AW1 及其联合西药组免疫抑制因子 TGF- β_1 的含量较模型组明显的降低,说明 EFP-AW1 对肿瘤中的免疫抑制因子有抑制作用,另外各组给药 10 d 后,MTT 实验显示 EFP-AW1 可提高有丝分裂原刺激的免疫器官脾淋巴细胞的增殖,具有提高机体免疫应答能力。结果提示 EFP-AW1 在诱导免疫应答的同时,可能也对肿瘤细胞形成了免疫病理损伤。进一步的流式细胞术结果提示 EFP-AW1 可增加荷瘤鼠外周血中细胞毒 T 淋巴细胞 CD8⁺T 的表达,CD8⁺T 细胞是特异性杀伤肿瘤细胞,其作用强,可连续杀伤,EFP-AW1 可通过刺激免疫抑制荷瘤鼠细胞的数目。揭示 EFP-AW1 可通过激活免疫细胞,调控免疫分子的表达,增强特异性细胞的抗肿瘤免疫应答功能,从而初步验证了我们提出的狼毒多糖可通过调控肿瘤免疫逃逸以增强荷瘤机体的免疫监视功能,进而抑制肿瘤细胞在体内的转移和复发,为临床探索肿瘤综合治疗提供实验依据。

参苓白术散对体外艰难梭菌生长的影响

舒青龙*, 徐刚, 叶荷平, 章喜林, 封勇, 魏娜
(江西中医学院基础医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 探讨参苓白术散对抗生素相关性腹泻(AAD)主要致病菌艰难梭菌的体外抑菌作用。方法: 按正常培养组(脑心浸液培养基培养)和加药培养组(脑心浸液培养基中加入不同稀释梯度的参苓白术散水煎剂, 加药体积分别为体积比为: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), 应用连续采样和分光光度法, 测定 4 株艰难梭菌(NC-1, NC-2, SH182, 和 SH186, 其中 2 株为 A^+B^+ , 2 株为 A^-B^+)的体外生长曲线。结果: 加药(参苓白术散水煎剂)体积比为: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 的培养基对艰难梭菌 NC-1, 以及加药体各为 10^{-1} 的参苓白术散水煎剂对艰难梭菌 NC-2 有明显的抑制作用($P < 0.05$), 不同稀释度的加药培养基对 4 种不同的艰难梭菌均有一定的影响, 艰难梭菌最大生长细菌菌落均有一定程度的减少。结论: 参苓白术散对 AAD 病主要致病菌艰难梭菌在体外具有一定的抑制作用。

[关键词] 艰难梭菌; 参苓白术散; 抗生素相关性腹泻; 抑菌作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0258-05

Influences of Shenglin Baizhu Powder on *in vitro* Growth of *Clostridium difficile*

SHU Qing-long*, XU Gang, YE He-ping, ZHANG Xi-lin, FENG Yong, WEI Na
(School of Basic Medicine Sciences, Jiangxi University of Traditional
Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[收稿日期] 20120616(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001680); 江西省自然科学基金项目(20122BAB205073)

[通讯作者] *舒青龙, 博士, 副教授, 从事中药微生态工作, Tel: 791-87118921, E-mail: shuqinglong@yahoo.com.cn

[参考文献]

- [1] Liu Jicheng, Sun Yongxu, Liu Lei, et al. A water-soluble polysaccharide (EFP-AW1) from the alkaline extract of the roots of a traditional Chinese medicine, *Euphorbia fischeriana*: Fraction and Characterization [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(3): 1299.
- [2] 林宇, 崔红霞, 许惠玉, 等. 岩大戟内酯 B 对人乳腺癌 Bcap37 细胞凋亡的影响 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(7): 780.
- [3] 刘东岳, 刘安军. T 细胞死亡途径及其相关的肿瘤免疫逃避 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(8): 963.
- [4] 雷萍, 关洪全, 王昊. 不同产地人参水煎剂对免疫抑制小鼠细胞免疫功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8): 218.
- [5] Michal Baniyash. Chronic inflammation, immunosuppression and cancer: New insights and outlook [J]. *Semin in Cancer Biol*, 2006, 16(7): 80.
- [6] 李世刚, 陈燕. 资本瓜多糖对小鼠佐剂性关节炎的作用及其机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12): 159.
- [7] 崔维, 吴国学, 张振凌. 牛膝饮片及牛膝多糖对小鼠免疫抑制调节作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(16): 141.
- [8] 樊俊杰, 贾正平, 谢景文, 等. 狼毒多糖对环磷酰胺处理小鼠免疫功能的影响 [J]. *西北国防医学杂志*, 2000, 21(4): 263.
- [9] 孙志忠, 黎勇, 赫文辉, 等. 瑞香狼毒与大戟狼毒糖类成份的比较研究 [J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 1996, 13(4): 88.
- [10] 孙志伟, 王延宝, 白新伟. 瑞香狼毒多糖中单糖组成的毛细管区带电泳分析 [J]. *分析试验室*, 2010, 29(6): 7.
- [11] Gaelic L. Flarell R A. Abrogation of TGF- β_1 signaling in T cells leads to spontaneous T cells differentiation and autoimmune disease [J]. *Immunity*, 2000, 12(2): 171.

[责任编辑 李玉洁]