

枸杞多糖联合趋化因子对肝癌小鼠 T 辅助淋巴细胞分化的影响

余燕玲, 何彦丽*, 杜标炎, 徐谦, 罗慧, 苏宁, 苏俊芳, 刘娟
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探讨枸杞多糖(LBP)及枸杞多糖联合趋化因子(CXCL10)对实验性肝癌荷瘤小鼠辅助性 T 细胞分化的影响。**方法:**建立 H22 肝癌小鼠皮下移植瘤模型,分为模型组、LBP 高剂量组(ig 100 mg·kg⁻¹)、LBP 低剂量组(ig 50 mg·kg⁻¹)、LBP + CXCL10 组(ig 100 mg·kg⁻¹ + 15 μg·kg⁻¹)、CTX 组(ip 20 mg·kg⁻¹),另设正常对照组。连续给药 2 周后小鼠眼球取血,颈椎脱臼处死。分离小鼠肿瘤、脾脏、胸腺,计算肿瘤抑制率、胸腺指数、脾指数,流式细胞术检测小鼠外周血 T 辅助细胞 1/T 辅助细胞 2(Th1/Th2)分化情况。**结果:**与模型组相比,LBP 低、高剂量组、LBP + CXCL10 组对肿瘤抑制率分别为 37.83%、12.50%、14.14%; Th1/Th2 分别 4.44 ± 3.05, 2.48 ± 2.93, 4.36 ± 1.96, 其中 LBP 低剂量组及 LBP + CXCL10 组 $P < 0.05$ 。**结论:**低剂量 LBP 及 LBP + XCL10 能显著提高 H22 肝癌荷瘤小鼠 Th1/Th2 比率。

[关键词] 枸杞多糖; 干扰素诱导蛋白 10; T 辅助淋巴细胞 1/T 辅助淋巴细胞 2; H22 肝癌细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0208-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjzz2013070208

Influence of *Lycium bararum* Polysaccharide with Interferon-inducible Protein 10 on the Differentiation of Helper T Cells in Bearing Mice

SHE Yan-ling, HE Yan-li*, DU Biao-yan, XU Qian, LUO Hui, SU Ning, SU Jun-fang, LIU Juan
(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of *Lycium bararum* polysaccharide (LBP) and LBP with interferon-inducible protein 10 (CXCL10) on the differentiation of helper T cells in bearing mice. **Method:** H22 bearing mice model was established and randomized into six groups: the model group, high-and low dose group, LBP with CXCL10 group, CTX group, control group. Serum was separated from eye ball after two weeks of treatment. tumors, spleen, thymus were separated and calculated anti-tumor rate, thymus index and spleen index. Flow cytometry was used to detect the differentiation of Th1/Th2 in mice peripheral blood. **Result:** Compared with model group, tumor inhibitory rate in low-and high dose group, LBP with CXCL10 group was 37.83%, 12.50%, 14.14%; the rate of Th1/Th2 was 4.44 ± 3.05, 2.48 ± 2.93, 4.36 ± 1.96, among them LBP low dose group and LBP with CXCL10 group was obvious ($P < 0.05$). **Conclusion:** Low dose of LBP and LBP with CXCL10 can increase the rate of Th1/Th2 markedly in bearing mice.

[Key words] *Lycium bararum* polysaccharide; interferon-inducible protein 10; Th₁/Th₂; H22 hepatocarcinoma cell

1986 年 Mosmann 等^[1]发现 CD4⁺ T 细胞、T 辅助细胞(Th)可分为两种功能不同的亚群,一种是以

[收稿日期] 20120924(007)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2011010003455);广东省重点实验室“中医病机与治法研究”实验室开放基金资助

[第一作者] 余燕玲,硕士研究生,从事中医药防治肿瘤及糖尿病肾病研究,Tel:020-39358017,E-mail:yanling88@yeah.net

[通讯作者] * 何彦丽,医学博士,副教授,从事中医药防治肿瘤研究及免疫相关性疾病,Tel:020-39358015,E-mail:yanlihe16@163.com

分泌干扰素- γ (IFN- γ)、白介素(IL)-2 等为主的 T 辅助细胞 1(Th1)细胞,一种是以分泌 IL-4,IL-5,IL-10 等为主的 T 辅助细胞 2(Th2)细胞。正常情况下,机体 Th1/Th2 细胞处于动态平衡状态,一旦机体发生异常,这种平衡状态就会发生偏离,即 Th1/Th2 平衡漂移^[2]。研究表明,很多肿瘤患者包括肝癌、非小细胞肺癌、直肠癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤等,均存在 Th1 细胞分化受抑而 Th2 细胞优势分化的现象,且 Th1/Th2 分化偏移程度与肿瘤的恶性程度呈正相关^[3-4]。

枸杞多糖(LBP)是枸杞子的主要生物活性成分。研究证明,LBP 能明显调节 T 细胞、B 细胞且无毒性,在抗癌辅助用药上展示出了广阔的应用前景。趋化因子 10(CXCL10)是由干扰素(IFN- γ)诱导产生的,又称为 IP-10。Luster 等^[5]发现 CXCL10 能够通过募集淋巴细胞而发挥抗肿瘤作用。有报道,单独应用 CXCL10 在多种动物模型中成功抑制了肿瘤的形成,促进了肿瘤组织坏死,并延长荷瘤小鼠的存活时间。但 LBP 及 LBP 联合 CXCL10 应用对荷瘤机体免疫系统中 Th1/Th2 分化的作用研究国内外尚未见报道。

1 材料

1.1 动物和细胞株 昆明种小鼠 60 只,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,SPF 级,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(粤)2008-0020;H22 细胞株由广州中医药大学西医基础公共实验室保存。

1.2 药物与试剂 枸杞多糖(多糖含量 > 30%):上海康舟真菌多糖有限公司,批号 KZ20120305; anti-mouse-IL-4-PE: eBioscience,批号 E02066-1630; anti-mouse IFN- γ -PE: eBioscience,批号 E02134-1630; anti-mouse-CD3e-PE-Cy5: eBioscience,批号 E06066-1630; anti-mouse-CD8a-FITC: eBioscience,批号 E00115-1631; FIX&PERM Kit: MultiSciences,批号 22042018; Rat IgG1-PE: MultiSciences,批号 11150001; BrefeldinA (BFA): MultiSciences,批号 1155042; Ionomycin Calcium (离子霉素): MultiSciences,批号 2154918; PMA: MultiSciences,批号 2154821; Recombinant Murine IP-10 (CXCL10): Peprotech,批号 104153E1310; RPMI1640 培养液:杭州吉诺生物医药技术有限公司,批号 11122601; 优质胎牛血清:浙江天杭生物技术有限公司,批号 1111110; 注射用环磷酰胺 (CTX):山西普德药业股份有限公司,批号 H14023686。

1.3 仪器 YJ-875 系列超净台工作台(苏州净化

设备厂); Galaxy 系列 CO₂ 培养箱 (RS-Biotech); XB 系列原装分析天平(瑞士 Precisa); 飞鸽 TDL-40B 低速台式离心机(中国飞鸽仪器工厂); YT219 数显电子卡尺(一途电子有限公司); CX21 显微镜(奥利巴斯); LAC-5040S 高压蒸气灭菌锅 (LabTech); HH-W 三用恒温水箱(江苏省金坛市医疗仪器厂); Quanta-SC-MPL 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司)。

2 方法

2.1 荷瘤小鼠模型建立 无菌条件下抽取第 3 代 H22 小鼠腹水,显微镜下计数,用 1640 培养液稀释细胞至 1×10^7 个/mL。台盼蓝染色,活细胞总数大于 95%。随机抽取 10 只小鼠作为正常对照组。其余 50 只左腋 75% 乙醇消毒后接种 0.2 mL 肿瘤细胞(2×10^6 个)。将接种瘤液的小鼠随机分成 5 组,每组 10 只。分别为肿瘤模型组、LBP 高剂量组、LBP 低剂量组、LBP + CXCL10 组、CTX 组。

2.2 给药 从第 3 天开始,LBP 高、低剂量组分别 ig 给予 LBP 100, 50 mg·kg⁻¹, LBP + CXCL10 组 ig 给予 100 mg·kg⁻¹ LBP,同时左肋 sc 给予 CXCL10 蛋白 15 μ g·kg⁻¹, CTX 组 ip 给予环磷酰胺 20 mg·kg⁻¹,每天 1 次,连续 2 周。每日观察小鼠的毛发、营养、体重、精神情况,肿瘤生长及死亡等情况。第 15 天小鼠眼球取血后脱颈处死,解剖动物,分离肿瘤、脾脏、胸腺,计算抑瘤率。

抑瘤率 = (肿瘤模型组肿瘤质量 - 荷瘤用药组肿瘤质量) / 肿瘤模型组肿瘤质量 $\times 100\%$

胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量(mg) / 体质量(g)

2.3 测定外周血 Th1/Th2 细胞比率 小鼠眼球取血,取全血标本 100 μ L 于试管中,用 RPMI 1640 培养液(不含胎牛血清)稀释至 300 μ L;加入 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PMA 工作液 7.5 μ L, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Ionomycin Calcium 工作液 6 μ L, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BFA 工作液 6 μ L,混匀; 37°C , 5% CO₂ 培养箱培育 4 ~ 6 h;混匀,加入 0.75 μ g CD3-PE-Cy5 和 1.5 μ g-CD8-FITC,室温避光孵育 15 min;分成 3 管,分别标记 A1, A2, A3;每管加入 100 μ L Fix&Perm 中的 Reagent A(即固定液),室温孵育 15 min;每管加入 3 mL PBS, $1\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液;每管加入 100 μ L Fix&Perm 中的 Reagent B(即破膜和溶血液),同时各管分别加入 0.5 μ g Rat-IgG1-PE, IFN- γ -PE, IL-4-PE,室温避光孵育 15 min;每管加入 3 mL PBS, $1\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液;0.5 mL PBS 重悬细胞,上机检测。以 CD3, CD8 反设门,即 CD3 + CD8-IFN- γ 代表 Th1,

CD3 + CD8-IL-4 代表 Th2。

2.4 统计学处理 所有数据用 SPSS 13.0 软件进行统计处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对荷瘤小鼠体重、免疫器官指数、肿瘤生长的影响 从结果上看,模型组荷瘤小鼠出现脱毛,行动迟缓现象。与模型组比较,用药组均有抑瘤作用,其中 CTX 组差异明显 ($P < 0.05$),LBP + CXCL10 组个别小鼠肿瘤体积较大,肿瘤组织周围及切开时有明显的血性液体渗出,因此该组肿瘤体质量均值较模

型组没有明显的差别。见表 1。

3.2 外周血 T 细胞分化结果 与模型组比较,LBP 低剂量组 Th1 显著性提高 ($P < 0.05$),LBP 高剂量组、LBP + CXCL10 组 Th1 有上升趋势。治疗组 Th2 均下降明显。LBP 低剂量组 Th1/Th2 非常显著差异 ($P < 0.01$),LBP + CXCL10 组显著差异 ($P < 0.05$)。与 CTX 组比较,LBP 低剂量组、LBP + CXCL10 组 Th1 表达上升 ($P < 0.01$),LBP 高剂量组 ($P < 0.05$)。LBP 低剂量组、LBP + CXCL10 组 Th1/Th2 比值上升,分别为 ($P < 0.01$), ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 LBP 及 LBP 联合 CXCL10 对荷瘤小鼠体重、免疫器官指数、肿瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /mg·kg ⁻¹	体质量/g		胸腺指数 /mg·g ⁻¹	脾指数 /mg·g ⁻¹	肿瘤质量 /g	抑瘤率 /%
			实验前	实验后				
正常	10	-	21.41 ± 2.02	36.04 ± 4.57	3.82 ± 1.41	3.12 ± 0.61 ¹⁾	-	-
模型	7	-	20.99 ± 0.96	38.26 ± 5.78	6.07 ± 5.86	7.02 ± 2.80	3.04 ± 1.06	-
LBP	10	50	20.70 ± 1.12	35.45 ± 4.81	2.95 ± 1.33 ¹⁾	5.76 ± 2.24	1.89 ± 1.21	37.83
		100	20.82 ± 1.48	35.79 ± 5.31	2.29 ± 0.81	8.98 ± 5.91	2.66 ± 1.68	12.50
LBP + CXCL10	9	100 + 1.5 × 10 ⁻²	21.34 ± 1.32	39.73 ± 3.96	2.61 ± 1.11	9.76 ± 2.73	2.61 ± 0.95	14.14
CTX	9	20	20.99 ± 0.96	38.26 ± 5.78	2.11 ± 0.70 ¹⁾	5.54 ± 2.78	1.24 ± 0.84 ²⁾	59.21

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 LBP 及 LBP 联合 CXCL10 外周血 Th1, Th2 及 Th1/Th2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Th1/%	Th2/%	Th1/Th2
正常	-	10.61 ± 4.72	7.75 ± 3.52	1.08 ± 1.31
模型	-	12.35 ± 7.74	21.48 ± 23.23 ³⁾	0.87 ± 0.42
LBP	50	28.38 ± 21.98 ^{1,4)}	7.71 ± 5.24 ¹⁾	4.44 ± 3.05 ^{2,3)}
	100	18.58 ± 7.61 ³⁾	18.88 ± 13.69 ^{1,3)}	2.48 ± 2.93
LBP + CXCL10	100 + 1.5 × 10 ⁻²	24.46 ± 13.86 ⁴⁾	5.46 ± 2.90 ¹⁾	4.36 ± 1.96 ^{1,3)}
CTX	20	4.05 ± 3.16	2.83 ± 2.05 ²⁾	1.48 ± 0.54

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 CTX 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

机体的免疫功能与肿瘤的发生发展密切相关。正常情况下,机体 Th1 和 Th2 类细胞及其细胞因子处于平衡状态,一旦平衡被破坏,则会产生免疫紊乱^[6]。近年来,肿瘤患者 Th1/Th2 免疫应答功能变化与肿瘤的形成、发展、逃逸等之间的联系已成为国内外研究热点之一^[7]。乔治等^[8]研究发现胃癌患者 Th1 及 Tc1 细胞比例减少,并出现 Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 漂移现象,提示胃癌患者免疫状态低下,机体抗肿瘤免疫功能抑制,常导致肿瘤细胞免疫逃逸。基于 Th1/Th2 漂移理论,如若能使荷瘤机体由 Th2 向 Th1 逆转,则可促进机体免疫功能恢复,为肿瘤的治疗提供新思路。

Yamazaki 等^[9]认为,可通过检测患者血清 IFN- γ 和 IL-4 来评价机体 Th 细胞的抗肿瘤效应,若细胞因子中以 IFN- γ 占优势,患者极少发生淋巴结转移;若以 IL-4 占优势则相反。本实验采用流式细胞术,以 CD3 和 CD8 反设门,即 CD3 + CD8-IFN- γ 代表 Th1,CD3 + CD8-IL-4 代表 Th2 检测荷瘤小鼠外周血。结果显示,LBP 低剂量、高剂量以及 LBP 联合 CXCL10 均能使 Th2 向 Th1 逆转,其中,LBP 低剂量及 LBP 联合 CXCL10 作用明显。从理论上讲,LBP 联合 CXCL10 用药组对肿瘤有明显的抑制作用,但本实验结果并未显示出明显的抑瘤效应,分析原因可能由于皮下注射 CXCL10 刺激了多种炎症细胞活化,引起局部炎症细胞浸润以及明显的炎症反应,

造成炎性渗出,影响到皮下种植瘤的体质量。也可能是肿瘤细胞分泌 CXCR3 配体,淋巴细胞持续暴露于肿瘤细胞分泌的配体并与之结合,使 CXCR3 处于一种脱敏状态,此时的 CXCR3 表达不但没有随 CXCL10 表达的上调而增高,反而可能表达降低^[10]。肿瘤细胞也有可能通过补体系统逃逸免疫,促进肿瘤生长^[11]。此外,具有抗原提呈作用的巨噬细胞,在肿瘤微环境中转化为肿瘤相关巨噬细胞,抑制 T 细胞和自然杀伤细胞,巨噬细胞对肿瘤由免疫刺激转为免疫抑制,促进肿瘤发生。肿瘤微环境极其复杂,对肿瘤微环境中 Th1/Th2 细胞的分化平衡检测可更直接反映机体的抗肿瘤状况,有待进一步验证。

肿瘤的发生、发展与自身的免疫功能有关,把握肿瘤与免疫系统间的相互作用对肿瘤的治疗至关重要。结果表明:LBP 及 LBP 联合趋化因子 CXCL10 能够驱使荷瘤机体由 Th0 分化 Th2 向 Th0 分化 Th1 逆转,增加肿瘤特异性免疫反应。相信对 LBP 与趋化因子 CXCL10、肿瘤及肿瘤微环境的进一步研究,定能为肿瘤的免疫治疗提供新手段。

[参考文献]

[1] Mosmann T R, Cherwinsre H, Bond M W, et al. Two types of murine helper T cell clone I definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins [J]. Immunol, 1986, 136:2348.

[2] 曾荣,杨静,曹保利,等. 复方莪术汤对子宫内膜异位症大鼠 Th1/Th2 平衡的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):246.

[3] Abbas A K, Murphy K M, Sher A. Function diversity of helper T lymphocytes [J]. Nature, 1996, 383

(6603):787.

[4] Agarwal A, Verma, S, Burra. Flow cytometric analysis of Th1 and Th2 cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder [J]. Cancer Immunol Immunother,2006,55(6):734.

[5] Luster A D, Leder P. IP-10, a CXC chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response *in vivo* [J]. J Exp Med JT,1993,178(3):1057.

[6] 丁文君,靳锋,沈明霞,等. 醒脑降糖灵对实验性糖尿病大鼠血糖及免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,13(16):180.

[7] Lin W C, Lin J Y. Berberine down-regulates the Th1/Th2 cytokine gene expression ratio in mouse primary splenocytes in the absence or presence of lipopolysaccharide in a preventive manner [J]. Int Immunopharmacol,2011,11(12):1984.

[8] 乔治,李荣,徐迎新,等. Th1/Th2 及 Tc1/Tc2 在胃癌患者外周血中的漂移及意义[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(12):1238.

[9] Yamazaki K, Yano T, Kameyama T. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma [J]. Surgery,2002,131(1):236.

[10] Liu Y Q, Poon R T, Hughes J, et al. Desensitization of T lymphocyte function by CXCR3 ligands in human hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2005,11(2):164.

[11] Maciej M Markiewski, John D Lambris. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma [J]. Cell Press,2009,30(6):286.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国中药杂志》2013 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2013 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjmm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。