

流式微球技术检测参芪扶正注射液对化疗小鼠 Th1/Th2 平衡状态的影响

丁治国¹, 史晓光¹, 李兰芳², 汪唐顺¹, 陈振宙¹, 张建松¹, 叶广铎¹, 李乃卿^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究参芪扶正注射液对化疗小鼠 Th1/Th2 平衡状态的影响。方法: 57 只荷瘤小鼠随机分成 5 组, 分别为荷瘤对照组、环磷酰胺组、参芪扶正注射液高剂量组(8 g·kg⁻¹组)、临床等效剂量组(4 g·kg⁻¹组)和低剂量组(2 g·kg⁻¹组)。后 4 组给予环磷酰胺 ip 2 次造模。荷瘤对照组及环磷酰胺组 ip 生理盐水, 1 次/d, 其他 3 组 ip 相应剂量参芪扶正注射液。9 d 后摘小鼠眼球取血约 0.5 mL 进行流式微球(CBA)检测, 再脱颈处死小鼠, 称取肿瘤重量, 计算肿瘤系数。结果: 参芪扶正注射液临床等效剂量组(4 g·kg⁻¹)可显著降低化疗小鼠的肿瘤重量和肿瘤系数($P < 0.01$), 提高化疗小鼠的 TNF- α 及 IL-2 的浓度($P < 0.01 \sim 0.05$)。结论: 参芪扶正注射液 4 g·kg⁻¹可诱导化疗小鼠的 Th1/Th2 平衡向 Th1 细胞占优势的方向转化。

[关键词] 参芪扶正注射液; S₁₈₀ 细胞; 化疗; Th1/Th2; 流式微球技术(CBA)

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)05-0039-03

Determination of the Effect of Shenqi Fuzheng Injection on the Balance of Th1/Th2 by Cytometric Bead Array in S₁₈₀-bearing Mice with Chemotherapy

DING Zhi-guo¹, SHI Xiao-guang¹, LI Lanfang², WANG Tang-shun¹, CHEN Zhen-zhou¹
ZHANG Jian-song¹, YE Guang-duo¹, LI Nai-qing^{1*}

(1. Dong Zhi Men Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Shenqi Fuzheng Injection on the balance of Th1/Th2 in S₁₈₀-bearing mice with chemotherapy. **Methods:** 45 of 57 tumor-bearing mice were given cyclophosphamide twice by intraperitoneal injection, and then randomly divided into four groups: the model group, the high dose group (8 g·kg⁻¹), the clinical equivalent dose group (4 g·kg⁻¹) and the low dose group (2 g·kg⁻¹) of Shenqi Fuzheng Injection. The model group and the 12 tumor-bearing mice without cyclophosphamide injection were given physiological saline by intraperitoneal injection once a day, while the others were given Shenqi Fuzheng Injection in the same way. 9 days later, the eyes and 0.5 mL blood were obtained before each mouse was sacrificed. The blood was for cytometric bead array (CBA) test. The tumors were weighed, and the tumor index was calculated. **Results:** Shenqi Fuzheng Injection, in the clinical equivalent dose, could significantly depress the weights of tumors and the tumor indexes ($P < 0.01$), and elevate the contents of TNF- α and IL-2 ($P < 0.01 \sim 0.05$) in S₁₈₀-bearing mice with chemotherapy. **Conclusion:** In clinical equivalent dose (4 g·kg⁻¹), Shenqi Fuzheng Injection could make Th1 cells to be predominant to Th2 cells in S₁₈₀-bearing Mice with chemotherapy.

[Key words] Shenqi Fuzheng Injection; S₁₈₀ Cells; Chemotherapy; Th1/Th2; cytometric bead array (CBA)

[收稿日期] 2008-10-21

[基金项目] 教育部产学研综合项目 (2006D90504018)

[通讯作者] * 李乃卿, Tel: (010) 84013403, E-mail: 13301119560@m165.com

临床研究^[1]证实:参芪扶正注射液对化疗具有显著的增效减毒作用。目前临床上主要用于恶性肿瘤的辅助治疗。参芪扶正注射液的作用机理已进行了多角度的研究^[2-3],但药物对化疗状态下机体 Th1/Th2 平衡状态的影响尚未研究,本实验通过构建化疗干预下荷 S₁₈₀ 小鼠模型,采用流式微球技术(CBA)等检测方法,揭示参芪扶正注射液对化疗干预下机体免疫平衡状态的影响。

1 材料

1.1 动物 BALB/C 小鼠 57 只,SPF 级,雄性,体重 16~18 g,由中国医学科学院动物实验中心提供。合格证:SCXK(京)2004-0001。实验动物使用许可证:SYXK(京)2004-0009。动物饲料为 Co60 灭菌的 SPF 级大小鼠维持饲料,由中国医学科学院动物实验中心提供。

1.2 瘤株 S₁₈₀ 细胞株,中国中医科学院中药研究所提供。

1.3 主要药物 参芪扶正注射液,丽珠集团利民制药厂(批号:071001),规格 10 mL/支,质量浓度为 1 g·mL⁻¹;注射用环磷酰胺,山西普德药业有限公司(批号 20070202),规格 0.2 g/支。

1.4 主要试剂 BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit, BD CaliBRITE 3 Beads, 购自美国 BD 公司。

1.5 仪器及软件 美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪, SORVAL SUPER T21 离心机, BD CBA 软件, The SAS System for Windows v8 软件。

2 方法

2.1 肿瘤细胞悬液的制备 取生长良好的 S₁₈₀ 传代小鼠,无菌条件下抽取小鼠腹水液,用生理盐水将腹水液稀释,1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min,反复 2 次,然后将细胞吹散至单个细胞,将细胞调至 1×10⁶·mL⁻¹。

2.2 分组 将 BALB/C 小鼠 57 只按体重均匀分为 5 组,分别为:荷瘤对照组,12 只;环磷酰胺组(简称模型组),15 只;环磷酰胺+参芪扶正注射液高剂量组(8 g·kg⁻¹),10 只;环磷酰胺+参芪扶正注射液临床等效剂量组(4 g·kg⁻¹),10 只;环磷酰胺+参芪扶正注射液低剂量组(2 g·kg⁻¹),10 只。

2.3 给药方法 化疗药给药(除荷瘤组外):取注射用环磷酰胺 0.2 g,溶于 100 mL 生理盐水中,混匀,每次按照 75 mg·kg⁻¹ ip,共 2 次。荷瘤对照组及模型组:无菌生理盐水,按照 0.02 mL·g⁻¹ ip;环磷酰胺+

参芪扶正注射液高、中、低剂量组:各组分别取参芪扶正注射液 4 mL, 2 mL, 1 mL 各加无菌生理盐水稀释至 10 mL,混匀,按照 0.02 mL·g⁻¹ ip,1 次/d,连续 9 d。

2.4 荷瘤与取材 于第 2 次常规给药后 12 h 右腋部常规消毒,皮下接种 S₁₈₀ 瘤细胞液 0.2 mL/只,于第 5 次常规给药后 12 h,给予第 1 次 ip 化疗,于第 7 次常规注射后 12 h,给予第 2 次 ip 化疗,第 9 次给药后 12 h,摘取眼球取血 0.5 mL,收集后 4 ℃ 静置 30 min,3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,收集上层血清 50 μL,运用 CBA 技术进行 Mouse Th1/Th2 Cytokine 检测。将小鼠脱颈处死后,剖取肿瘤,吸去血液,去除脂肪、系膜,用电子天平称取其湿重,按下列公式计算肿瘤系数:肿瘤系数=肿瘤重量/体重×100%。

2.5 流式微球法检测细胞因子 用检测稀释剂(D)溶解细胞因子标准品(C)(15 min),用 D 将标准品连续稀释,取 10 μL/test 捕获微球悬液(A1~A5)混合(取前剧烈振荡),每一检测管中加入 50 μL 微球混合液,在相应样品管中加稀释好的标准品和待测样本,50 μL/管,50 μL/管加入 PE 检测试剂(B):50 μL/test,室温下避光孵育 2 h,用 1 mL 洗涤缓冲液(F)洗涤,离心,每管加 300 μL 洗涤缓冲液(F)重悬微球,美国 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪检测, BD CBA 软件分析检测结果。

2.6 统计学方法 各组均数用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 The SAS System for Windows v8 进行统计处理,多组均数比较用方差分析及 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 对化疗小鼠肿瘤重量的影响 结果显示模型组瘤重和肿瘤系数显著低于荷瘤对照组($P < 0.01$),提示化疗小鼠造模成功;同时参芪扶正注射液临床等效剂量组可显著降低化疗小鼠的肿瘤重量和肿瘤系数($P < 0.01$)见表 1。

表 1 参芪扶正注射液对化疗小鼠肿瘤重量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	<i>n</i>	肿瘤重量 (g)	肿瘤系数 (%)
荷瘤对照组	—	12	0.87 ± 0.24 ²⁾	5.08 ± 1.32 ²⁾
模型组	—	15	0.51 ± 0.16	3.21 ± 0.86
参芪组	8	10	0.39 ± 0.11 ¹⁾	2.55 ± 0.68
	4	10	0.36 ± 0.18 ²⁾	2.19 ± 1.02 ²⁾
	2	10	0.42 ± 0.09	2.91 ± 0.61

注:与模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 对化疗小鼠细胞因子的影响 结果显示参芪扶正注射液组的临床等效剂量组可显著提高化疗小鼠的 TNF- α 及 IL-2 的浓度 ($P < 0.01 \sim 0.05$), 而 IFN-

γ 和 IL-4 虽分别较对照组提高了 $0.59 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和降低了 $0.63 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 但差异皆无统计学意义, 见表 2。

表 2 参芪扶正注射液对化疗小鼠细胞因子的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	<i>n</i>	IFN- γ ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TNF- α ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-2 ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-4 ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-5 ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
模型组	—	12	32.58 ± 8.74	44.52 ± 25.01	12.30 ± 7.61	2.50 ± 0.89	0 ± 0
参芪组	8	10	26.49 ± 6.44	85.31 ± 74.48	20.54 ± 12.73	1.76 ± 1.08	0 ± 0
	4	10	33.17 ± 12.58	$130.67 \pm 99.48^{2)}$	$21.70 \pm 11.49^{1)}$	1.87 ± 1.08	0 ± 0
	2	9	30.32 ± 7.03	50.50 ± 32.93	12.43 ± 10.42	2.24 ± 1.05	0 ± 0

4 讨论

早在 1986 年, Mosmann 等已发现小鼠 CD4 阳性细胞群是一个不均一的亚群, 可分为 Th1 和 Th2 两个功能不同的独立亚群。Th1 细胞主要分泌 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 等, TNF- α 可作为效应分子直接诱导肿瘤细胞的凋亡, IFN- γ 可活化巨噬细胞, 增强其杀伤已被吞噬的病原体的能力, IL-2 可增强 NK 细胞的杀伤能力; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 等, 其主要功能为刺激 B 细胞增殖并产生抗体, 与体液免疫相关。由于 Th1/Th2 亚群及其相互之间的平衡在免疫应答的调节中起着关键的作用, 因此目前认为 Th1/Th2 平衡的失调与多种疾病(包括恶性肿瘤)的发生、发展和预后有着密切的关系。

流式微球技术(CBA)是近年新发展的检测技术, 它具有不同荧光强度的 5 个微球群, 分别包被了针对 IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α , IFN- γ 的特异性捕获抗体, 捕获微球和 PE 标记的检测抗体混合后, 可与待测样本孵育形成“三明治”复合物, 通过流式细胞仪可分析结果, 它较传统的 ELISA 技术有较大优势: CBA 所需样本体积仅为 ELISA 分析所必需样本量的 1/6; 稳定性更好; 能避免由于酶联放大技术使信号失真导致的假象等。本实验通过构建化疗干预下荷 S₁₈₀ 小鼠模型, 采用 CBA 技术检测, 揭示参芪扶正注射液对化疗干预下荷瘤小鼠 Th1/Th2 平衡状态的影响。

参芪扶正注射液以传统的扶正补气中药党参、

黄芪为原料制成。《本经正义》云:“党参力能补脾养肾, 润肺生津, 健运中气”。黄芪也为补气要药, 既可以内补脏腑之气, 又可益卫固表托毒。本实验结果显示, 临床等效剂量($4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的参芪扶正注射液可显著提高荷瘤小鼠血清中 Th1 细胞的标志细胞因子 TNF- α 和 IL-2 的含量 ($P < 0.01$), 同时作为 Th2 细胞的标志物 IL-4 下降了 $0.63 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 提示参芪扶正注射液可诱导 Th1 细胞较 Th2 细胞的优势, 也即细胞免疫较体液免疫占优势, 这符合目前的一般认识, 即在抗肿瘤过程中细胞免疫发挥重要作用。

同时研究发现化疗干预下荷瘤小鼠加用参芪扶正注射液后肿瘤重量及肿瘤系数显著减少 ($P < 0.01$), 也符合了药物可有效改善荷瘤动物的免疫状态, 从而发挥抑制肿瘤的假设。

总之, 参芪扶正注射液可诱导化疗小鼠的 Th1/Th2 平衡向 Th1 细胞占优势的方向转化, 增强其细胞免疫功能, 从而发挥抑制肿瘤的作用。

[参考文献]

- [1] 陶德胜, 曹 晖, 李乃卿. 数字化中药探索[M]. 香港: 世界医药出版社, 2007: 174.
- [2] 丁治国, 李乃卿, 陶德胜, 等. 参芪扶正注射液对小鼠肝转移癌组织基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 15(2): 135-138.
- [3] 丁治国, 史晓光, 李兰芳, 等. 参芪扶正注射液对荷 S₁₈₀ 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(10): 37-38.