

黄芪甲苷通过诱导 M1 型巨噬细胞极化 发挥抗肿瘤作用的机制

王莉新, 吴文斌, 胥孜杭, 焦肖宁, 苏琳, 朱杨壮壮, 陈晓, 邹纯朴, 朱诗国*
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 探讨黄芪甲苷对巨噬细胞极化的影响及其可能的抗肿瘤免疫机制。方法: 通过噻唑兰 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 比色法检测不同浓度黄芪甲苷作用不同时间, 对巨噬细胞的细胞毒作用, 以选取合适的黄芪甲苷作用浓度; 将巨噬细胞与肿瘤细胞以 1:1 进行共孵育, 并用 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪甲苷作用 24 h, 通过虫荧光素酶 (luciferase, Luc) 杀伤实验检测巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤效率; 以 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪甲苷作用巨噬细胞 24 h, 通过流式细胞术检测巨噬细胞 CD16/32, CD206 表达, 通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS), 精氨酸-1 (Arginine-1, Arg-1) 及细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12), 白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10), 转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) mRNA 表达, 通过蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测巨噬细胞信号传导及转录激活因子 1 (Signal transducers and activators of transcription 1, STAT1), 磷酸化信号传导及转录激活因子 1 (phosphorylation signal transducers and activators of transcription 1, p-STAT1) 表达。结果: 当黄芪甲苷质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对巨噬细胞无细胞毒作用。与空白组比较, Luc 杀伤实验结果显示黄芪甲苷可以显著促进巨噬细胞介导的肿瘤杀伤; Real-time PCR 结果显示黄芪甲苷可以诱导巨噬细胞表面 M1 型巨噬细胞标志 CD16/32 表达增高, 促进 M1 型巨噬细胞特异性指标 iNOS mRNA 表达, 同时诱导 M1 型巨噬细胞相关细胞因子 IL-1 β , TNF- α , IL-12 mRNA 表达增高; Western blot 结果显示黄芪甲苷可以促进巨噬细胞 STAT1 发生磷酸化。结论: 黄芪甲苷可以通过促进巨噬细胞内 STAT1 发生磷酸化, 进而诱导巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞发生极化, 并启动巨噬细胞相关的抗肿瘤免疫应答。

[关键词] 黄芪甲苷; 巨噬细胞; 肺癌; 免疫调节

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R392.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)14-0019-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190822

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190102.1123.016.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 14:07

Anti-tumor Effect of Astragaloside by Inducing M1 Macrophage Polarization

WANG Li-xin, WU Wen-bin, XU Zi-hang, JIAO Xiao-ning, SU Lin, ZHU Yang-zhuang-zhuang,
CHEN Xiao, ZOU Chun-pu, ZHU Shi-guo*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of astragaloside on the macrophage polarization and the possible anti-tumor immunity mechanism of astragaloside. **Method:** The cytotoxic effect of different concentrations of astragaloside at different time points on macrophage was measured by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), in order to choose the suitable concentration of astragaloside, macrophages were co-cultured with tumor cells at the ratio 1:1, and the effect of astragaloside on macrophage-mediated lysis of tumor cells was performed by

[收稿日期] 20181008(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803933, 81473237); 上海市卫生和计划生育委员会科研课题项目(20154Y0167); 上海中医药大学杏林青年学者人才项目

[第一作者] 王莉新, 博士, 助理研究员, 从事中西医结合抗肿瘤研究, E-mail: wlx831208@126.com

[通信作者] *朱诗国, 博士, 研究员, 从事中西医结合抗肿瘤研究, E-mail: jusco105@163.com

biophotonic cytotoxicity assay after the mixed cells were effected with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ astragaloside for 24 h. Macrophages were dealt with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ astragaloside for 24h, the expressions of CD16/32 and CD206 in macrophages were performed by flow cytometry, the mRNA expressions of macrophage inducible nitric oxide synthase (iNOS), Arginine-1 (Arg-1), interleukin- 1β (IL- 1β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-12 (IL-12), interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TGF- β) were measured by Real-time PCR, the protein expressions of macrophage signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) and phosphorylation signal transducers and activators of transcription 1 (p-STAT1) were determined by Western blot. **Result:** Astragaloside had no effect on the viability of macrophages with $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Compared with control group, astragaloside obviously enhanced the macrophage-mediated lysis of tumor cells according to the biophotonic cytotoxicity assay, induced the M1 macrophage marker CD16/32 expression according to flow cytometry, increased the mRNA expressions of iNOS, IL- 1β , TNF- α and IL-12 according to the Real-time PCR, and promoted the phosphorylation of STAT1 in macrophages on the basis of Western blot. **Conclusion:** Astragaloside could induce M1 macrophage polarization by increasing the phosphorylation of STAT1, and initiate macrophage-related anti-tumor immunity response.

[**Key words**] astragaloside; macrophage; lung cancer; immunity regulation

恶性肿瘤的发病率逐年提高,目前已经成为全球致死率较高的疾病之一。在所有的肿瘤病例中,肺癌已成为发病率最高的肿瘤,同时也成为癌症死因之首^[1]。据 2014 年《世界癌症报告》报道,在全世界范围内,肺癌的患病率和致死率都位居第一,而且在中国也是致死率最高的肿瘤^[2]。尽管科学家们一直在探索以各种方式来攻克肺癌,但临床上肺癌的治愈率仍未显示出明显地提高,尤其是肿瘤患者的 5 年生存率一直都无明显改善。近几年来,随着免疫学的发展,免疫治疗的优势已经逐步显现出来。

肿瘤微环境,是指在肿瘤生长过程中,由肿瘤细胞、基质细胞(包括免疫细胞、成纤维细胞、炎性细胞、胶质细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞等)和细胞外基质等共同构成的局部稳态环境,是肿瘤发生、发展、侵袭、转移的必要物质基础^[3]。肿瘤微环境中的基质细胞同一性更好,因此可能对既有的肿瘤治疗策略更加敏感。而且,近 10 年研究也发现,肿瘤组织内及肿瘤周围的宿主免疫细胞对肿瘤发生、发展具有重要作用,是影响肿瘤治疗疗效的一个关键因素^[4]。因此,靶向肿瘤微环境,重建肿瘤微环境中免疫细胞的免疫监视作用,可能成为有效治疗肺癌的策略之一。肿瘤微环境中免疫细胞主要包括巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、调节性 T 细胞、效应 T 细胞及自然杀伤细胞等^[5]。巨噬细胞作为一类固有免疫细胞,近年来成为肿瘤微环境中越来越重要的研究对象。有研究发现,通过“再教育”肿瘤微环境中巨噬细胞,诱导其向 M1 型巨噬细胞极

化可以延长荷瘤小鼠生存时间^[6]。然而目前中药对肿瘤微环境中巨噬细胞的调节作用罕见报道。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪的根,具有补气固表、托毒排脓、利尿生肌的功效。许多扶正或补益方剂均以黄芪为君药,如玉屏风散、黄芪汤、补中益气汤等,功在益气固表。本课题组在前期研究过程中,发现扶正固表名方玉屏风散可以通过调节肿瘤微环境进而抑制肿瘤发生发展^[7]。因此,作为君药的黄芪必然在调节肿瘤微环境方面也发挥重要作用。且黄芪多糖作为一种天然的免疫促进剂,也可通过与放、化疗联用,共同发挥抗肿瘤作用^[8]。黄芪甲苷一向有“超级黄芪多糖”之称,是黄芪多糖的主要有效成分,自然也具有不可忽视的免疫调节作用。但在肿瘤微环境中,黄芪甲苷是否可以通过调节巨噬细胞,进而促进机体的抗肿瘤免疫作用,目前尚未见文献报道。因此,本文主要通过一系列实验观察黄芪甲苷对巨噬细胞的调节作用,并探讨其可能的机制。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞株购买自中国科学院上海生命科学研究院,小鼠 Lewis 肺癌细胞 LLC-Luciferin 细胞株(带有虫荧光素酶)由本实验构建并保存,所有细胞均用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液培养。

1.2 药物与试剂 黄芪甲苷(上海同田生物技术股份有限公司,批号 83207-58-3); 噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128); 虫荧光素酶(D-Luciferin)底物(美国 MCE 公司,批号 2591-17-5); trizol(美国 Thermo Fisher 公司,批号 15596018);

PrimeScript™ RT Master Mix, SYBR Premix Ex Taq(日本 Takara 公司, 批号分别为 RR036A, RR420A); APC anti-mouse CD16/32, APC anti-mouse CD206, true-nuclear™ transcription factor buffer set(美国 Biolegend 公司, 批号分别为 101325, 141707, 424401); 信号传导及转录激活因子 1(STAT1), 磷酸化信号传导及转录激活因子 1(p-STAT1), β-肌动蛋白(β-actin)一抗, 免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 14994, 9167, 4970, 7074); 聚合酶链式反应(PCR)引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 Synergy H1 型多功能微孔板检测仪(美国 Bio-Tek 公司); QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪, ND-ONE-W 型 NanoDrop 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); C6 分析型流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司); PowerPac™ Basic 型蛋白电泳仪、转膜仪, ChemiDoc XRS + 型蛋白免疫印迹化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测细胞增殖 常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 调整细胞密度为 5×10^4 个/mL。铺 96 孔板, 于每孔内加入 RAW264.7 细胞混悬液 100 μL, 待细胞贴壁后, 加入黄芪甲苷继续培养 24, 48 h。黄芪甲苷终质量浓度为 100, 10, 1, 0.1, 0 mg·L⁻¹。培养 24, 48 h, 分别于各孔细胞内加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μL, 37 °C 作用 4 h, 弃上清, 于各孔内分别加入 DMSO 溶解甲臞颗粒 150 μL。并于多功能微孔板检测仪上读取各孔细胞在 490 nm 波长处的吸光度 A, 以检测不同浓度黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞的细胞毒作用。细胞存活率 = $(A_{\text{用药组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.2 Luciferin 杀伤实验检测细胞功能 常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7 及小鼠 Lewis 肺癌细胞 LLC-Luciferin, 分别将细胞密度调整为 2×10^5 个/mL。RAW264.7 及 LLC-Luciferin 按照 1:1 铺 96 孔板, 令终体积为每孔 100 μL。同时, 设立最大生物发光空白组及最小生物发光空白组。加入黄芪甲苷 100 μL, 使其终质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将 96 孔板内的细胞混悬液充分混匀后, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h, 每孔内加入终质量浓度为 $14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ D-Luciferin 底物 2 μL, 反应 10 min, 于多功能微孔板检测仪上检测各孔细胞的生物发光值(590/35 nm)。计算肿瘤细胞杀伤率, 杀伤率 =

$[1 - (\text{用药组} - \text{最小生物发光空白组}) / (\text{最大生物发光空白组} - \text{最小生物发光空白组})] \times 100\%$ 。

2.3 流式细胞术检测细胞极化 常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。铺 24 孔板, 待细胞贴壁后, 加入黄芪甲苷, 使其终质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h。收集细胞, 分别进行细胞表面抗原 CD16/32 及细胞内抗原 CD206(按照 true-nuclear™ transcription factor buffer set 说明书进行破膜固定)的流式染色。按照说明书, 向细胞内加入相应剂量流式抗体(CD16/32, 1:100, CD206, 1:50), 充分混匀后, 于 4 °C 冰箱内避光孵育 30 min。以 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃上清。用含 1% FBS 的 PBS 300 μL 重悬细胞, 充分混匀, 避光, 置于冰上, 于流式细胞仪上进行检测。结果使用 FlowJo 软件进行分析。

2.4 Real-time PCR 检测相关 mRNA 表达 常规培养小鼠巨噬细胞 RAW264.7, 调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL。铺 6 孔板, 待细胞贴壁后, 加入黄芪甲苷, 使其终质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱内培养 24 h。收集细胞, 以 trizol 充分裂解细胞, 常规方法抽提细胞总 RNA。每个样品分别取 RNA 1 μg 进行逆转录反应。收集逆转录产物, 进行 PCR 反应, PCR 反应条件: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。用 Thermo Fisher Scientific QuantStudio 3 PCR 仪自带软件读取各样品 C_t 值, 结果用 2^{-ΔΔC_t} 来表示。引物序列见表 1。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 STAT1 蛋白表达 细胞加药及培养同 2.4 项。收集细胞, 常规方法提取细胞总蛋白并用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 常规方法进行转膜。使用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 2 h 后, 加入一抗(1:1 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 室温下孵育二抗(1:2 500) 1 h。TBST 洗膜 3 次后, ECL 显影曝光。使用 ChemiDoc XRS + 化学发光成像系统采集图像。

2.6 统计学方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 其中采用单因素方差分析进行多组间比较, 采用双尾 T 检验进行两组间比较。应用 GraphPad Prism5 软件进行统计分析及制图。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞的细胞毒作用 与 24, 48 h 空白组比较, RAW264.7 细胞在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪甲苷作用下存活率无明显改变,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
iNOS	上游 CTGCAGCACTTGATCAGGAACCTG 下游 GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA	311
Arg-1	上游 CAGAAGAATGGAAGAGTCAG 下游 CAGATATGCAGGGAGTCACC	250
IL-1 β	上游 AGTTGACGGACCCAAAAG 下游 TTTGAAGCTGGATGCTCTCAT	80
TNF- α	上游 GCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGG 下游 ATGATCTGAGTGTGAGGGTCTGG	107
IL-12	上游 AGTGACATGTGGAATGGCGT 下游 CAGTTCAATGGGCAGGGTCT	133
IL-10	上游 AAACAACCTCTTGAAAACCTCG 下游 TCCCCAATGGAAACAGCTTAAAC	182
TGF- β	上游 ATCTCGATTTTTACCCTGGTGGT 下游 CTCCCAAGGAAAGGTAGGTGATAGT	122
β -actin	上游 CCACCATGTACCCAGGCATT 下游 AGGGTGTAAAACGCAGCTCA	253

在 1, 10, 100 mg·L⁻¹ 黄芪甲苷作用下存活率显著下降 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 黄芪甲苷对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of astragaloside on RAW264.7 cell viability rate ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	24 h	48 h
空白	-	100.03 \pm 1.14	100.00 \pm 2.49
黄芪甲苷	0.1	93.00 \pm 3.88	97.86 \pm 6.60
	1	89.32 \pm 3.01 ¹⁾	79.71 \pm 3.81 ¹⁾
	10	83.69 \pm 5.70 ¹⁾	66.78 \pm 4.25 ¹⁾
	100	59.55 \pm 5.73 ¹⁾	42.50 \pm 3.93 ¹⁾

注:与同时间空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 黄芪甲苷对巨噬细胞杀伤肿瘤细胞功能的影响 与空白组比较,黄芪甲苷组巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤效率显著增强 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 黄芪甲苷对巨噬细胞杀伤功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of astragaloside on macrophage killing function ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	杀伤效率/%
空白	-	32.98 \pm 3.49
黄芪甲苷	0.1	39.86 \pm 2.62 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 5, 7 同)。

3.3 黄芪甲苷对 M1 型巨噬细胞极化的影响

3.3.1 黄芪甲苷对巨噬细胞极化特异性指标的影响 与空白组比较,黄芪甲苷组 RAW264.7 细胞 M1 型巨噬细胞表面标志 CD16/32 表达增高 ($P < 0.05$); M2 型巨噬细胞标志 CD206 表达无明显变化。见表 4。与空白组比较,黄芪甲苷组 RAW264.7 细胞 iNOS mRNA 表达增强 ($P < 0.01$); Arg-1 mRNA 表达无明显变化。见表 5。

表 4 黄芪甲苷对巨噬细胞极化标志的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of astragaloside on markers of macrophage polarization ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	CD16/32	CD206
空白	-	85.57 \pm 1.19	7.03 \pm 1.12
黄芪甲苷	0.1	89.37 \pm 1.05 ¹⁾	8.07 \pm 0.29

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 5 黄芪甲苷对巨噬细胞 iNOS, Arg-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of astragaloside on macrophage iNOS, Arg-1 mRNA expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	iNOS	Arg-1
空白	-	1.00	1.00
黄芪甲苷	0.1	2.81 \pm 0.38 ¹⁾	1.35 \pm 0.81

3.3.2 黄芪甲苷对巨噬细胞极化相关细胞因子表达的影响 与空白组比较,黄芪甲苷组 IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-10 mRNA 表达增高 ($P < 0.05, P < 0.01$); TGF- β mRNA 表达无明显变化。见表 6。

3.4 黄芪甲苷对巨噬细胞 STAT1 磷酸化的影响 与空白组比较,黄芪甲苷组 STAT1 表达无变化, p-STAT1 表达显著增高 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 7。

4 讨论

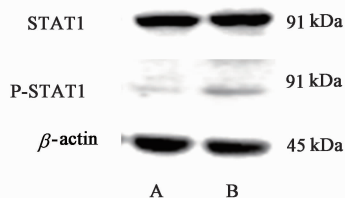
肺癌是一种全身属虚,局部为实,本虚标实的病证,邪毒聚结,极易耗损人体正气,并随着正消邪长,正气耗损更甚。临床上,肺癌常用治疗方法以清热解毒、软坚散结、活血化瘀和以毒攻毒为主,这些祛邪之法长期应用易导致脾胃功能受损,气血生化乏源,正气更虚,邪气更甚,加上癌毒易走窜弥散,常发生远处转移,进而危及生命^[9]。故正虚是形成肺癌的内在根本,也是肺癌发生、发展的关键所在,肿瘤只不过是机体全身性疾病的一个局部表现而已。因此,肿瘤治疗过程中,必须强调扶正固本,顾护人体正气。可通过增强机体的抵抗力,达到控制或减小肿瘤的目的。因此,扶正固本法是肺癌治疗的

表 6 黄芪甲苷对巨噬细胞极化相关细胞因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of astragaloside on macrophage polarization related cytokines mRNA expressions ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 β	TNF- α	IL-12	IL-10	TGF- β
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
黄芪甲苷	0.1	3.65 \pm 1.10 ²⁾	2.54 \pm 0.84 ²⁾	3.98 \pm 1.13 ²⁾	1.42 \pm 0.09 ¹⁾	1.02 \pm 0.38

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 空白组; B. 黄芪甲苷组

图 1 黄芪甲苷对巨噬细胞 STAT1 磷酸化蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of astragaloside on macrophage STAT1 phosphorylation

表 7 黄芪甲苷对巨噬细胞 STAT1, p-STAT1 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of astragaloside on expressions of macrophage STAT1, p-STAT1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	STAT1/ β -actin	p-STAT1/ β -actin
空白	-	0.963 \pm 0.013	0.056 \pm 0.004
黄芪甲苷	0.1	0.997 \pm 0.012	0.204 \pm 0.001 ¹⁾

关键^[10]。也就是所谓中医学“扶正祛邪”的观点,即通过扶助正气,达到“邪祛正自安”的目的。黄芪作为一种补益类中药,不仅具有直接抑瘤作用,还具有增强机体免疫功能的效应^[11]。黄芪甲苷作为黄芪的主要有效成分,其直接抑瘤作用一直是人们关注的焦点^[12]。但是有关黄芪甲苷的免疫调节作用研究较少。本实验旨在阐明黄芪甲苷对巨噬细胞的调节作用,所以首先通过 MTT 比色法筛选出了对巨噬细胞无细胞毒性的黄芪甲苷($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),从而为后续实验提供基础。

巨噬细胞是组成肿瘤微环境的主要成分,介导了炎症发生和肿瘤发生、发展。巨噬细胞一旦进入外周组织后,会依赖于局部组织微环境的变化进一步发生活化及极化,因此巨噬细胞是一群具有高度可塑性和异质性的细胞,在维持组织内环境稳态、参与炎症反应及抗病原体感染等方面发挥重要作用。巨噬细胞在不同微环境因素作用下可极化为两种亚型,即 M1 型和 M2 型^[13]。M1 型巨噬细胞,也称之为经典活化的巨噬细胞,主要参与抗感染及抗肿瘤免疫应答^[14]; M2 型巨噬细胞,也称之为替代活化的

巨噬细胞,主要参与超敏反应及抗寄生虫免疫应答^[15-17]。通常所说肿瘤相关巨噬细胞(TAM)主要是指位于肿瘤微环境内的 M2 型巨噬细胞。肿瘤组织内 TAM 的浸润,有助于肿瘤细胞发生增殖、血管新生、侵袭转移等,且与肿瘤发展进程及耐药性密切相关^[18]。TAM 有可能成为抗肿瘤治疗的新靶标。目前认为,针对 TAM 的抗肿瘤免疫治疗策略大致可以分为三大类,即①抑制 TAM 向肿瘤组织募集;②直接靶向杀伤 TAM;③再教育 TAM,使其逆转为具有抗肿瘤作用的 M1 型巨噬细胞^[19-21]。且近年来已有研究显示,通过“再教育”M2 型巨噬细胞,诱导其向 M1 型巨噬细胞极化的确可以有效延长荷瘤小鼠带瘤生存时间^[6]。本实验发现,在巨噬细胞与肿瘤细胞共培养体系下,黄芪甲苷可以促进巨噬细胞发挥抗肿瘤作用,提示黄芪甲苷有可能可以诱导巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞发生极化。接着,通过检测巨噬细胞极化相关的细胞标志(CD16/32, CD206), iNOS, Arg-1 及细胞因子表达水平,发现黄芪甲苷主要诱导 M1 型巨噬细胞表面标志 CD16/32 表达增加,促进 M1 型巨噬细胞特异性指标 iNOS mRNA 表达增高,同时主要诱导 M1 型巨噬细胞相关细胞因子 IL-1 β , TNF- α , IL-12 mRNA 表达增高,以上实验结果均提示黄芪甲苷可以促使巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞发生极化。

STAT1 的活化有助于巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞发生极化。STAT1 一旦活化,马上发生磷酸化,可进一步二聚化形成同源二聚体,继而转位进入细胞核内^[22]。进入细胞核内的 p-STAT1 二聚体,会直接与 iNOS, IL-1 β , IL-12 等靶基因启动子区域的顺式作用元件发生结合,进而启动这些靶基因的转录,诱导巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞发生极化^[23]。本实验进一步研究发现,在黄芪甲苷作用下,巨噬细胞内 STAT1 磷酸化水平增加,提示黄芪甲苷有可能通过促进 STAT1 磷酸化,进而促进 M1 型巨噬细胞的极化。

综上所述,黄芪甲苷可以通过促进巨噬细胞内 STAT1 发生磷酸化,进而诱导巨噬细胞向 M1 型

巨噬细胞发生极化,并启动巨噬细胞相关的抗肿瘤免疫应答。这一发现将为临床上黄芪甲苷的抗肿瘤应用提供新的思路,但是其具体作用机制还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.

[3] Albini A, Magnani E, Noonan D M. The tumor microenvironment: biology of a complex cellular and tissue society[J]. Q J Nucl Med Mol Imaging, 2010, 54(3): 244-248.

[4] Schreiber R D, Old L J, Smyth M J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion [J]. Science, 2011, 331(6024): 1565-1570.

[5] Kerkar S P, Restifo N P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment[J]. Cancer Res, 2012, 72(13): 3125-3130.

[6] YUAN R, LI S, GENG H, et al. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis[J]. Int Immunopharmacol, 2017, 49: 30-37.

[7] LUO Y, WU J, ZHU X, et al. NK cell-dependent growth inhibition of Lewis lung cancer by Yu-Ping-Feng, an ancient Chinese herbal formula[J]. Med Inflamm, 2016, doi: 10.1155/2016/3541283.

[8] 陈卓,于卫江. 注射用黄芪多糖对小细胞肺癌放疗的作用及对机体免疫的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 309-313.

[9] 刘苓霜. 刘嘉湘辨治肺癌经验[J]. 中医文献杂志, 2006, 24(2): 38-40.

[10] 刘嘉湘,陈树森,郁仁存,等. 肺癌证治[J]. 中医杂志, 1986,27(3): 4-7.

[11] 桑国优,韦世秀,刘成军. 黄芪抗肿瘤作用机制和临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 3032-3034.

[12] 杨苏钰,唐德才,曹子丰,等. 黄芪甲苷配伍姜黄素

对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤转移的抑瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 155-160.

[13] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization; *in vivo* veritas [J]. J Clin Invest, 2012, 122(3): 787-795.

[14] Mosser D M, Edwards J P. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(12): 958-969.

[15] Lewis C E, Pollard J W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 605-612.

[16] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes[J]. Trends Immunol, 2002, 23(11): 549-555.

[17] Goerdts S, Orfanos C E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells [J]. Immunity, 1999, 10(2): 137-142.

[18] Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophage[J]. J Exp Med, 2015, 212(4): 435-445.

[19] Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, et al. Tumor-associated macrophages as treatment targets in oncology [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(7): 399-416.

[20] Biswas S K, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophage: functional diversity, clinical significance, and open questions [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35(5): 585-600.

[21] Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, et al. Re-educating tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB [J]. J Exp Med, 2008, 205(6): 1261-1268.

[22] KE S, Ziemiecki A, Wilks A F, et al. Polypeptide signaling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins [J]. Nature, 1993, 366(6455): 580-583.

[23] Darnell J E J, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. Science, 1994, 264(5164): 1415-1421.

[责任编辑 张丰丰]