



黄芪多糖对 Lewis 肺癌小鼠细胞因子及顺铂所致免疫功能低下的影响

明海霞^{1,2}, 陈彦文³, 胡永浩¹, 董晓丽², 顾静², 李杨²

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070;

2. 甘肃中医学院生理教研室, 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000;

3. 甘肃中医学院解剖教研室, 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

【摘要】 目的 观察黄芪多糖(APS)对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长、细胞因子及顺铂(DDP)所致免疫功能低下的影响。方法 90 只小鼠, 设空白对照组 10 只, 余 80 只依次造模为荷瘤小鼠, 并随机分为 8 组: 模型组(等体积生理盐水), 顺铂阳性对照组(6 mg/kg DDP), APS 低(50 mg/kg)、中(100 mg/kg)、高剂量(200 mg/kg)组, 联合用药低、中、高剂量组(DDP 剂量减半, APS 各剂量同上), 于造模次日起各组分别腹腔注射等体积的药物 0.3 mL。DDP 每周一次, 其余药物每天 1 次, 连续 20d。于第 21 天取血清采用 ELISA 法测定细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 的水平, 并观察各组抑瘤率及免疫器官指数。结果 DDP、APS 低、中、高剂量及联合用药低、中、高剂量组对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤的抑瘤率分别为 49.30%、17.21%、39.68%、42.98%、51.02%、57.21%、65.11% (与模型组比较 $P < 0.05$ 或 0.01; 联合用药组与 DDP 组比较 $P < 0.05$)。与空白对照组比较, APS 中、高剂量组和联合用药组脾脏指数显著升高; 与模型组比较, APS 高剂量和联合高剂量脾脏指数差异有显著性 ($P < 0.05$); 与 DDP 组比较, APS 各剂量和联合用药组小鼠胸腺指数和脾脏指数均升高。结论 APS 能提高 Lewis 肺癌小鼠血清中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 的水平; 增强 DDP 所致免疫功能低下小鼠的免疫功能, 对免疫器官有一定的保护作用; 能抑制小鼠 Lewis 肺癌细胞的生长, 在与 DDP 减量联合使用时可使 DDP 抑瘤作用增强, 且其机制可能与增强机体的免疫功能有关, 说明 APS 对 DDP 有一定的增效减毒作用。此项研究在实体瘤的治疗中有潜在的应用前景。

【关键词】 黄芪多糖; Lewis 肺癌; 增效减毒; DDP; 细胞因子

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0044-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.010

Effects of *Astragalus polysaccharide* (APS) on cytokine and immune function impairment induced by cisplatin in mice bearing Lewis lung cancer

MING Hai-xia^{1,2}, CHEN Yan-wen³, HU Yong-hao¹, DONG Xiao-li², GU Jing², Li Yang²

(1. College of Animal Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Department of Physiology, 3. Department of Anatomy, Gansu Provincial Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology and Toxicology, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

【Abstract】 Objective To observe the effects of *Astragalus polysaccharide* (APS) on tumor growth, cytokine and immune function impairment induced by cisplatin (DDP) in mice bearing Lewis lung cancer. **Methods** A total of 90 mice were used in this study: 10 for blank control group, and 80 mice with transplanted Lewis lung cancer were randomly divided into 8 groups: model control group (physiological saline), positive control group treated with DDP (6 mg/kg), low dose APS (50 mg/kg), moderate dose APS (100 mg/kg) and high dose APS (200 mg/kg) groups and three combinations

[基金项目] 甘肃省科技厅计划项目(NO. 1212RJZA093)。

[作者简介] 明海霞(1975-), 女, 副教授, 甘肃农业大学 2012 级博士生。E-mail: 18909429885@163.com

[通讯作者] 胡永浩, 男, 教授, 博士生导师。主要从事畜禽传染病学及病原分子生物学方面的研究。E-mail: yhh0817@126.com

of APS + DDP groups (the same three APS levels with half dose of DDP, respectively). 0.3 mL of the drugs was intraperitoneally injected to the mice, respectively, on the second day after modeling. DDP was injected once a week and other drugs were injected once per day for consecutive 20 days. On the 21st day, blood samples were collected and serum levels of cytokine IL-2, IL-6, IL-12 and TNF- α were determined by ELISA, and the tumor inhibition rate and immune organ indexes were assessed. **Results** The tumor inhibition rates of the positive control, low, moderate and high dose APS groups and three combinations of APS + DDP groups of mice bearing Lewis lung carcinoma were 49.30%, 17.21%, 39.68%, 17.21%, 51.02%, 57.21% and 65.11%, respectively. Compared with the model group, $P < 0.05$ or $P < 0.01$, and compared the three combination groups with the DDP group, $P < 0.05$. Compared with the blank control group, the spleen index was significantly increased in the moderate and high dose APS groups and the three combinations of APS + DDP groups. There was a significant difference between the spleen indexes of the model control group, and the spleen indexes of high dose APS and the combination with high dose APS groups were significantly higher than that of the model control group ($P < 0.05$). Compared with the DDP group, APS in various doses and combinations increased the thymus index and spleen index. **Conclusions** APS can improve the levels of cytokine IL-2, IL-6, IL-12 and TNF- α in mice bearing Lewis lung cancer, enhance the immune function impairment induced by DDP, has certain protective effect on the immune organs, and inhibit the growth of Lewis lung cancer in mice. When APS is used in combination with a half-dose of DDP, APS enhanced the inhibition of tumor growth. This mechanism may be related to the enhanced body immune function. Our results indicate that APS enhances the therapeutic effect of DDP and reduces its toxicity, therefore, may have potential application value in future treatment of solid tumors.

【Key words】 *Astragalus polysaccharides*; Lewis lung cancer; Synergistic effect; Cisplatin; cytokines; Mice

根据 IARC(国际癌症研究机构)发布的最新在线数据库“全球癌症 2012”(GLOBOCAN 2012)统计数据显示,2012 年,全球癌症新发病例上升到 1410 万人,另外有 820 万人死于癌症,其中发病率和死亡率均居首位的是肺癌^[1]。目前化疗仍是肺癌综合治疗的主要手段,但副作用大,因此寻找一种对肿瘤细胞有高效的杀伤或抑制作用,而对正常细胞无毒性或有保护作用的化疗药物显得尤为重要。现代研究表明,黄芪多糖(*Astragalus polysaccharide*, APS)可增强肿瘤抑制,减少毒副反应,并可增进机体细胞免疫功能,改善肿瘤患者的生活质量^[2]。为进一步探讨 APS 辅助抗肿瘤机制,揭示其与荷瘤小鼠免疫功能之间的关系,本辅助化疗可增强肿瘤抑制,减少毒副反应,并可增进机体细胞免疫功能,实验观察不同浓度 APS 对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长、细胞因子及 DDP 所致免疫功能的影响,为揭示 APS 的抑瘤和增效减毒机理提供依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞株及动物

小鼠 Lewis 肺癌细胞株(LLC)中国科学院上海生命科学研究院细胞库提供。

SPF 级 C57BL/6 小鼠,雄性,共 90 只,6~8 周龄,体重约(20 \pm 2)g,由兰州大学医学院实验动物中心提供【SCXK(甘)2013-0002】;实验设施使用证

【SYXK(甘)2011-0001-0001110】。

1.2 主要药品

黄芪多糖(APS):陕西昂盛生物医药科技有限公司,产品批号:UHQDT130518;使用时将黄芪多糖干粉剂用生理盐水溶解,灭菌,4℃冰箱保存备用。顺铂注射液(DDP)2 mL:每支 10 mg,云南个旧生物药业有限公司,批号:120201。

1.3 主要试剂

HyClone High Glucose DMEM、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS):均购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司(批号:NYE0885、NVJ0313、NYE0884);小鼠 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α ELISA 试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司(批号:2012920)。

1.4 主要仪器

新苗牌超净工作台:上海新苗医疗器械制造有限公司;Heal Force HF151-CO₂ 细胞培养箱:香港力康发展有限公司;美国 Bio-Rad iMark 酶标仪,购自上海众生生命科学发展有限公司;CT14RD 型高速冷冻离心机,购自天美科技有限公司;AR224CN 电子天平,购自奥豪斯仪器(上海)有限公司 ZHWY-110X30;AE31EF-INY 荧光倒置相差显微镜:Motican Pro。

以上仪器由甘肃中医学院基础医学实验教学中心和中药药理与毒理学重点实验室提供。

2 方法

2.1 细胞培养

将小鼠 Lewis 肺癌细胞培养于含 10% 新鲜胎牛血清的 DMEM 培养基(含青、链霉素各 100 IU/mL)中,37℃、体积分数为 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中连续培养。至对数生长期(80% 铺满全层)时,用质量分数为 0.25% 胰酶常规消化,将细胞调整为 1×10^7 个/mL 的悬液。

2.2 肺癌移植瘤模型的建立、分组及用药

90 只小鼠,设空白对照组 10 只,余 80 只依次造模^[3]:将复苏的 Lewis 肺癌瘤株,接种于 3 只小鼠右腋窝皮下以保种,每 10d 转种一次,连续 2 次,正式实验时,选取生长良好的 Lewis 肺癌组织,剪碎匀浆,按照肿瘤质量(g)与生理盐水(mL)1:3 匀浆制成细胞悬液,经 0.2% 台盼蓝染色后计数活细胞数 >95%,调整细胞浓度为每毫升 1×10^7 个。接种于 C57BL/6J 小鼠右前肢腋窝皮下,每只约 0.2 mL,全程严格无菌操作。将造模的小鼠随机分为 8 组,每组 10 只:模型组(等体积生理盐水),顺铂阳性对照组(6 mg/kg DDP),APS 低(50 mg/kg)、中(100 mg/kg)、高剂量(200 mg/kg)组,联合用药低、中、高剂量组(DDP 剂量减半,APS 各剂量同上),于造模次日各组分分别腹腔注射等体积的药物 0.3 mL。DDP 每周一次,其余药物每天 1 次,连续 20 d。

2.3 标本检测

于第 21 天安乐处死,眼球摘取采血,放置 4 h 后离心,分离血清,放于 -20℃ 备用。临用前平衡至室温,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作,测定

细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 的水平。

取标本:常规分离组织,称体重、脾重、胸腺、肿瘤组织的重量,并将肿瘤组织一半用 4% 多聚甲醛固定,一半用冷生理盐水冲洗后备用。计算脾指数、胸腺指数及抑瘤率。脾指数(mg/g) = 脾重(mg)/体重(g),胸腺指数(mg/g) = 胸腺重(mg)/体重(g),抑瘤率 = (1 - 实验组平均瘤重/对照组平均瘤重) \times 100%。

2.4 统计学方法

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。采用 Excel 2007、SPSS 13.0 软件统计,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较,组间差异采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

3 结果

3.1 移植瘤模型建立结果

接种后 5 d 左右即可于右腋下扪及小肿块即实体瘤。与阴性对照组相比,早期体重增大,后 DDP 化疗组小鼠体重呈下降趋势,小鼠皮毛糙杂,活动受限,实验结束时解剖均可得肿瘤。

3.2 黄芪多糖对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长的影响

与模型对照组比较,黄芪多糖低、中、高剂量组和顺铂组荷瘤小鼠瘤质量显著减轻,黄芪多糖低、中、高剂量组与顺铂组比较,小鼠瘤质量差异无显著性($P > 0.05$)。而联用黄芪多糖可以显著提高对小鼠 Lewis 肺癌细胞的抑瘤率,与顺铂组比较差异有显著性($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 APS 对 Lewis 肺癌移植瘤生长的影响及对 DDP 增效作用($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

Tab.1 Effects of APS on the growth of Lewis lung cancer cells and its synergy with DDP

组别 Groups	剂量/mg/kg Doses	平均瘤质量/g Average tumor mass	平均抑瘤率/% Average tumor inhibition rate
模型对照 Model control	0	1.52 \pm 0.45	-
DDP Cisplatin	6	0.53 \pm 0.25 **	49.30
APS 低 Low dose APS	50	0.89 \pm 0.27	17.21
APS 中 Moderate dose APS	100	0.73 \pm 0.21 *	39.68
APS 高 High dose APS	200	0.59 \pm 0.08 **	42.98
1/2 DDP + Low dose APS	3 + 50	0.49 \pm 0.16 **	51.02 Δ
1/2 Cisplatin + Low dose APS			
1/2 DDP + Moderate dose APS	3 + 100	0.41 \pm 0.01 ** Δ	57.21 Δ
1/2 Cisplatin + Moderate dose APS			
1/2 DDP + High dose APS	3 + 200	0.30 \pm 0.15 ** Δ	65.11 $\Delta\Delta$
1/2 Cisplatin + High dose APS			

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 DDP 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. model control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, vs. cisplatin group.

3.3 黄芪多糖对 Lewis 肺癌小鼠细胞因子的影响

黄芪多糖可提高 Lewis 肺癌小鼠血清中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 的水平,与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);DDP 阳性对照组血清中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 的水平则降低,与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);联合用药组血清中各细胞因子与 DDP 组比较差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 APS 对 Lewis 肺癌小鼠细胞因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.2 Effects of APS on cytokines in mice bearing Lewis lung cancer

组别 Groups	剂量 Dose mg/kg	IL-2	IL-6	IL-12	TNF- α
空白对照 Blank control	0	37.67 \pm 11.84**	132.86 \pm 18.97**	29.96 \pm 4.59**	85.98 \pm 15.37**
模型对照 Model control	0	13.86 \pm 4.23	29.86 \pm 7.64	13.23 \pm 3.43	24.28 \pm 3.86
DDP Cisplatin	6	4.89 \pm 3.95*	9.68 \pm 5.94**	5.68 \pm 2.97**	12.69 \pm 3.64**
APS 低 Low dose APS	50	14.75 \pm 6.76	40.85 \pm 4.8*	15.42 \pm 3.49	26.91 \pm 3.59
APS 中 Moderate dose APS	100	24.96 \pm 8.01*	51.69 \pm 3.56**	17.83 \pm 5.32*	31.52 \pm 4.13*
APS 高 High dose APS	200	36.76 \pm 4.65**	63.43 \pm 3.31**	20.98 \pm 2.42**	37.49 \pm 3.27**
1/2 DDP + Low dose APS	3 + 50	16.54 \pm 3.76 $\Delta\Delta$	30.41 \pm 4.65 $\Delta\Delta$	9.53 \pm 3.90* Δ	30.52 \pm 4.22* $\Delta\Delta$
1/2 DDP + Moderate dose APS	3 + 100	27.67 \pm 4.03** $\Delta\Delta$	62.34 \pm 6.02** $\Delta\Delta$	18.45 \pm 3.24** $\Delta\Delta$	49.38 \pm 6.49** $\Delta\Delta$
1/2DDP + APS 高	3 + 200	32.98 \pm 5.74** $\Delta\Delta$	95.87 \pm 4.71** $\Delta\Delta$	23.56 \pm 4.61** $\Delta\Delta$	71.63 \pm 8.34** $\Delta\Delta$

注:与模型对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DDP 组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$,** $P < 0.01$, vs. model control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, vs. cisplatin group.

表 3 APS 对 Lewis 肺癌移植瘤小鼠免疫器官指数的影响及对 DDP 减毒作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Effects of APS on the immune organ indexes and reducing the DDP toxicity in mice bearing Lewis lung cancer

组别 Groups	剂量/mg/kg Dose	脾脏指数/mg/g Spleen index	胸腺指数/mg/g Thymus index
空白对照 Blank control	0	3.10 \pm 0.112	2.63 \pm 0.035
模型对照 Model control	0	2.02 \pm 0.033 \blacktriangle	2.05 \pm 0.026 \blacktriangle
DDP Cisplatin	6	2.62 \pm 0.024*	2.44 \pm 0.019*
APS 低 Low dose APS	50	2.13 \pm 0.019	2.10 \pm 0.009
APS 中 Moderate dose APS	100	2.27 \pm 0.021	2.15 \pm 0.031
APS 高 High dose APS	200	2.32 \pm 0.071*	2.35 \pm 0.034*
1/2DDP + Low dose APS	3 + 50	2.65 \pm 0.036*	2.48 \pm 0.011
1/2DDP + Moderate dose APS	3 + 100	2.71 \pm 0.050* Δ	2.51 \pm 0.021* Δ
1/2DDP + High dose APS	3 + 200	2.89 \pm 0.049* Δ	2.56 \pm 0.017* Δ

注:与空白组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与模型对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 DDP 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note: $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, vs. blank control; * $P < 0.05$,** $P < 0.01$, vs. model control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, vs. cisplatin group.

4 讨论

中医认为,恶性肿瘤的发生与机体正气亏虚密切相关,正气亏虚,邪气乘虚而入则易患肿瘤。现代医学认为,当免疫系统失去监视功能时,就会导致肿瘤的发生,而肿瘤分泌的一些细胞因子会抑制机体的免疫功能,使肿瘤进一步发展、转移,因此免疫功能紊乱是肿瘤发生发展的关键。外界的致癌因素只是促使肿瘤发生的外部条件,这个观点与中医学的“正虚致瘤”的理论是一致的。据报道化疗药物在抗肿瘤的同时,免疫器官指数明显下降,严重损害免

3.4 黄芪多糖对 Lewis 肺癌移植瘤小鼠 DDP 所致免疫器官指数的影响

与空白对照组比较,黄芪多糖中、高剂量组和联合用药组脾脏指数显著升高;与模型组比较,黄芪多糖高剂量和联合高剂量脾脏指数差异有显著性($P < 0.05$);与 DDP 组比较,黄芪多糖各剂量和联合应用黄芪多糖组小鼠胸腺指数和脾脏指数均升高。见表 3。

疫器官^[4],说明其抗肿瘤疗效好的代价是在损伤整体的基础上实现的。

近年研究证实,许多中药可以通过提高肿瘤宿主的免疫功能等干扰肿瘤的生长、代谢、增殖过程,最终使肿瘤细胞发生死亡或凋亡^[5],同时发挥整体调节作用,从而延长肿瘤患者的生存期。黄芪是传统扶正固本中药,其成分中黄芪多糖类和黄芪皂苷类物质具有增强机体免疫功能的作用,运用黄芪调节人体免疫功能的作用来治疗疾病,体现了中医扶正治疗的原则^[6]。

IL-2 能诱导产生细胞毒 T 淋巴细胞、刺激 T 细

胞增殖分化、诱导干扰素等多种细胞因子的分泌、增强 NK 细胞活性,具有增强机体免疫功能等多方面作用,是一种免疫增强剂。IL-2 含量高低反映了宿主免疫系统清除自身损伤细胞、衰老变性细胞、自体变性方面的能力大小及宿主 T 淋巴细胞活化程度。IL-6 可以介导免疫球蛋白的分泌、加强终末 B 细胞的分化、促进细胞毒 T 细胞和 NK 细胞溶解细胞的能力、提高 T 细胞活化信号。各种细胞因子可以直接调节癌细胞的生长,抑制癌细胞增殖或促使癌细胞分化,也可以通过诱导细胞因子网络的其他成员发挥作用,因为在参与机体免疫反应的过程中,它们并非独立作用,而是存在于相互依存的复杂网络之中。

本实验首次研究 APS 及 APS 联合化疗药物 DDP 对 Lewis 肺癌小鼠血清中 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 及免疫功能的影响,探讨其抗肿瘤的机制和对 DDP 的增效减毒作用。结果显示,APS 能提高 Lewis 肺癌小鼠血清中细胞因子 IL-2、IL-6、IL-12、TNF- α 的水平;增强 DDP 所致免疫功能低下小鼠的免疫功能,对免疫器官有一定的保护作用;能抑制小鼠 Lewis 肺癌细胞的生长,在与 DDP 减半量联合使用时可使 DDP 抑瘤作用增强,且其机制可能与增强机体的免疫功能有关,说明 APS 在抑制肿瘤生长的

同时可能通过提高荷瘤小鼠血清中细胞因子水平而提高免疫功能,增强自身抗肿瘤能力,并对 DDP 有一定的增效减毒作用,与单纯的化疗药物比较,有独特的优势。有关黄芪多糖的抗肿瘤机制及对免疫系统的其它影响,值得进一步深入研究和应用。

参 考 文 献

- [1] Parkin DM, Bray FI, Devesea SS. Cancer burden in the year 2000;The global picture [J]. Eur J Cancer, 2001, 37(Suppl): 64 - 66.
- [2] 刘跃华,黄静,王雍. 注射用黄芩多糖联合化疗治疗中晚期胃癌的疗效[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(3):516 - 518.
- [3] 梁靓靓. 调气消积汤对 Lewis 肺癌小鼠抑瘤作用的实验研究[D]. 辽宁中医药大学, 博士论文. 2010;10
- [4] 孙震晓,孙晋华,程霜,等. 中药地椒提取物的抗肿瘤作用及对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中西医结合学报, 2003, 9(1): 238.
- [5] Ebina T, Ogarm N, Sllimanuki H, et al. Life-prolonging effect of immune cell BAK (BRM-activated killer) therapy for advanced solid cancer patients; prognostic significance of serum acidic protein levels [J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(9):555 - 560.
- [6] 吴宝明,李俊. 黄芪多糖在免疫调节中的作用 [J]. 安徽医药, 2008, 12(7):577 - 579.

[收稿日期] 2014-06-03