

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0210-04

黄芪对 S180 肿瘤培养上清免疫抑制作用的影响

杨丽娟¹, 王润田¹, 刘京生², 佟慧¹, 邓郁青¹, 李全海¹(1. 河北医科大学基础所免疫室, 石家庄 050017; 2. 河北省医科院, 石家庄 050021)

[摘要] 目的: 研究黄芪对 S180 肿瘤培养上清免疫抑制作用的影响。方法: 用有或无中药作用的肿瘤培养上清, 以 MTT 法检测其对小鼠脾细胞转化、IL-2 产生、NK 杀伤活性及 CTLL-2 细胞 IL-2 反应性的影响, 以流式细胞仪检测其对小鼠脾细胞表面 IL-2R α 表达的影响。结果: 单纯肿瘤上清可强烈抑制所测 5 项指标。在单纯肿瘤上清中加入中药可明显上调上述 5 项指标。先用含中药培养培养肿瘤细胞, 而后洗去或不洗去中药再培养肿瘤细胞所得的上清, 也可明显上调所测 5 项指标。结论: 黄芪可以直接对抗肿瘤上清的免疫抑制作用; 下调 S180 肿瘤细胞合成和/或分泌免疫抑制物质。

[关键词] 黄芪; 肿瘤; 免疫抑制; 小鼠

[中国分类号] R730.5; R979.1 [文献标示码] A

Influence of AMB on Immunosuppression of S180 Supernatant

YANG Li-juan¹, WANG Run-tian¹, LIU Jing-sheng², TONG Hui¹, DENG Yu-qing¹, LI Quan-hai¹(1. Department of Immunology, Institute of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang 050021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of AMB(Astragalus Mongholicus Bge) on the immunosuppression of tumor cell line S180 supernatant. **Methods:** The effects of the supernatant of S180 cultured with or without AMB on the transformation, IL-2 production and NK activity of murine splenocytes and the reactivity of CTLL-2 to IL-2 were measured by MTT, and the effect on the IL-2R α expression of murine splenocyte was detected by flow cytometry. **Results:** The supernatant of S180 alone could strongly inhibit the five tests. Adding AMB to the superanant of S180, the results of the five tests were up-regulated substantially. The superanants of S180 which were cultured first in AMB for 24 h or 48 h, then washing off AMB or not, and recultured for 24 h remarkably up-regulated the five tests. **Conclusions:** AMB could reverse the immunosuppressions of the supernatant of S180, down-regulate the synthesis and/or secretion of immunosuppressive subsance by tumor cells.

[Key words] AMB; tumor; immunosuppression; mice

* 肿瘤细胞分泌免疫抑制物质是构成肿瘤免疫逃逸的重要因素, 寻找能抑制肿瘤细胞免疫抑制物质产生和/或对抗这些免疫抑制物质免疫抑制作用的有效药物, 具有重要意义。

有报道某些抗癌中药, 如淫羊藿甙, 可逆转肿瘤细胞分泌的免疫抑制物 TGF- β_2 对 LAK 和 CD3AK 细胞杀伤活性的抑制作用^[1,2]。

黄芪是临床常用抗癌中药, 其是否也影响肿瘤细胞分泌免疫抑制物质, 尚未见报道。本文用黄芪注射液在体外较为系统地研究了对 S180 肿瘤细胞培养上清抑制细胞免疫功能的影响作用。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 KM 小鼠, 雌雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 二级动物, 河北省实验动物中心提供, 合格证号: 04-056 号。

1.2 肿瘤细胞株

小鼠肥大细胞瘤株 S180、小鼠胸腺瘤株 YAC-1、IL-2 依赖株 CTLL-2, 均由本实验室保存。

1.3 主要试剂

黄芪注射液, 成都地奥九泓制药厂出品, 每支 10 ml, 20 g, 预实验确定其实验用终浓度为 76.8 g/L。其它试剂: RPMI-1640 为 GIBCO 公司产品, 加 10% 小牛血清即为完全培养液(complete medium, CM); 小牛血清

[作者简介] 杨丽娟(1975-), 女, 河北邢台人, 研究生, 主要从事肿瘤免疫基础研究。

[通信作者] 王润田, E-mail: wangrt@hebmu.edu.cn。

由河北医科大学科技总公司提供;噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]购自华美公司;刀豆蛋白 A (Con A) 为 Sigma 公司产品;分析纯二甲亚砜 (DMSO) 为金山化工厂产品。

1.4 6 种肿瘤上清的制备

用对数生长期 S180 的肿瘤细胞,以不同介质调成 2×10^5 /ml,置 37°C ,5% CO_2 ,在饱和湿度条件下培养一定时间后,2 000 r/min,30 min,离心收取如下 A ~ F 6 种上清:①CM 中培养 24 h 的 A 上清;②含黄芪 CM 中培养 24 h 的 B 上清;③含黄芪 CM 中培养 24 h 后洗去黄芪,再用新鲜 CM 培养 24 h 的 C 上清;④含黄芪 CM 中培养 48 h 的 D 上清;⑤含黄芪 CM 中培养 48 h 后洗去黄芪,再用新鲜 CM 培养 24 h 的 E 上清;⑥A 上清内加黄芪的 F 上清。均以 -20°C 保存,作为原液用于 CTLL-2 细胞 IL-2 反应性测定,以 CM 作 1:10 稀释用于其它实验和测定。

1.5 A 上清对小鼠脾细胞的毒性实验

常规制备小鼠脾细胞,CM 悬成 $1 \times 10^4 \text{L}^{-1}$ (下同),加入 ELISA 板,50 μl /孔。实验孔加入 A 上清,100 μl /孔;对照孔加入等量的 CM,均设 3 复孔。最后用 CM 补加至每孔总体积为 200 μl 。同上培养 72 h,MTT 法测各孔 OD 值,取 3 复孔均值。

1.6 6 种肿瘤上清对 5 项指标影响的测定

1.6.1 对 Con A 诱导的小鼠脾细胞转化的影响

脾细胞加入 ELISA 板,50 μl /孔。实验组及 Con A 对照组 (Con A control) 各孔加入最适量 Con A (2.5 mg/L),空白对照组 (control) 各孔加入等量 CM。实验组 A ~ F 各孔再分别加入对应的 6 种肿瘤上清,100 μl /孔。均设 3 复孔。最后用 CM 补加至每孔总体积为 200 μl 。同上培养 72 h,MTT 法测各孔 OD 值,取 3 复孔均值。

1.6.2 对 Con A 诱导小鼠脾细胞产生 IL-2 的影响

1.6.2.1 IL-2 的诱生

脾细胞加入 24 孔板,0.5 ml/孔。实验组 A ~ F 每孔分别加入 100 μl 对应的 6 种肿瘤上清以及最适量的 Con A;Con A 对照组 (Con A control) 每孔加入最适量的 Con A;黄芪加 Con A 对照组 (AMB + Con A) 每孔加入黄芪及最适量的 Con A;单纯黄芪对照组 (AMB) 每孔加入黄芪;空白对照组每孔加入 CM。均设 3 复孔。最后用 CM 补加至每孔总体积为 2.0 ml。同上培养 48 h。3 复孔混合,2 000 r/min 离心,30 min,收集小鼠脾细胞,供测小鼠脾细胞表面 IL-2R α 的表达使用;收取上清, -20°C 保存备测 IL-2 活性用。

1.6.2.2 IL-2 活性测定

收集对数生长期 CTLL-2 细胞,洗涤 2 次,CM 悬成

$4 \times 10^2 \text{L}^{-1}$,加入 96 孔板,50 μl /孔。用上述收取保存的各诱生 IL-2 的上清作为原液 (即 1:1 稀释,下同) 以 CM 做倍比稀释至 1:32 共 6 个不同浓度,即 1:1,1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,分别加入 CTLL-2 细胞孔中,100 μl /孔,作为实验孔;取已知人重组 IL-2 (用 CM 稀释为 100 U/ml) 如上也制成 6 个不同稀释度,分别加入 CTLL-2 细胞孔中,100 μl /孔,作为阳性对照孔 (positive control)。均设 3 复孔。最后用 CM 补加至每孔总体积为 200 μl 。培养 26 h,按前述 MTT 法测各孔 OD 值,取 3 复孔均值。

1.6.3 对 Con A 诱导的小鼠脾细胞表面 IL-2R α 表达的影响

取上述诱生 IL-2 后离心收集的小鼠脾细胞,洗涤 2 次,用 4% 甲醛缓冲液 (用 0.01 mol/L, pH7.4 的 PBS 配制) 悬成 $1 \times 10^3 \text{L}^{-1}$ /每个样本, 4°C 保存。用流式细胞仪测定细胞表面 IL-2R α 的表达。

1.6.4 对小鼠脾细胞 NK 活性的影响

脾细胞加入 ELISA 板,50 μl /孔,做为效应细胞 (E)。取处于对数生长期的 YAC-1 细胞做为靶细胞 (T),洗涤 2 次,用 CM 悬成 $2 \times 10^2 \text{L}^{-1}$,加入上述 E 孔中,50 μl /孔,此即 E + T 孔,效靶比为 50:1。另设单独的效应细胞 (E) 和单独的靶细胞 (T) 对照孔。实验组 A ~ F 的 E + T, E 和 T 孔中分别加入对应的 6 种肿瘤上清,100 μl /孔。单纯黄芪对照 (AMB) 的 E + T, E 和 T 孔中分别加入黄芪。空白对照 (control) 的 E + T, E 和 T 孔中加入等量 CM。均设 3 复孔。最后用 CM 补至 200 μl /孔。培养 24 h。MTT 法测各孔 OD 值,以 3 复孔均值按下述公式计算 NK 杀伤率:

$$\text{杀伤率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{ODE} + \text{T} - \text{ODE}}{\text{ODT}}\right) \times 100\%$$

1.6.5 对 CTLL-2 细胞 IL-2 反应性的影响

如前制备 CTLL-2 细胞,加入 ELISA 板中,50 μl /孔。实验组及阳性对照组 (positive control) 每孔加入用 CM 稀释的 IL-2 (100 U/ml),100 μl /孔。实验组 A ~ F 各孔再加入对应的 6 种肿瘤上清,10 μl /孔。单纯黄芪对照孔 (AMB) 加入黄芪。空白对照组 (control) 每孔加入等量的 CM。均设 3 复孔。最后用 CM 补加至每孔总体积为 200 μl 。同 1.6.2.2 培养并测定结果。

1.7 统计学处理

差异显著性检验采用成组设计两样本均数比较 t 检验及多个样本均数间两两比较的方差分析。

2 结果

2.1 A 上清对小鼠脾细胞的毒性实验

A 上清组(OD 值 0.505 ± 0.030)与对照组(OD 值 0.509 ± 0.029)无明显差异($P > 0.05$),显示 A 上清对小鼠脾细胞无毒性作用。

2.2 6 种肿瘤上清对五项指标的影响(见表 1,2; 图 1, 2, 3)。

化和 IL-2R α 的表达的上调作用仍达不到 Con A 对照组水平,对 CTLL-2 细胞 IL-2 反应性的上调作用也达不到阳性对照组水平($P < 0.01$);②B, C, D, E 各上清对 Con A 诱导的小鼠脾细胞 IL-2 产生的上调作用达到了 Con A 对照组的水平,对小鼠脾细胞 NK 杀伤活性的上调作用达到了对照组水平($P > 0.05$);③F 上清对 Con A 诱导的小鼠脾细胞 IL-2 产生的上调作用未达到 Con A 对照组水平($P < 0.01$);④B, C, D, E 4 组上清对五项指标的影响之间无明显差异($P > 0.05$)。

图 1 不同肿瘤上清对 Con A 诱导小鼠脾细胞转化的影响
Fig.1 The effects of the different supernatants of S180 on the transformation of murine splenocytes induced by Con A

A, B, C, D, E, F stand for the corresponding supernatants of S180 respectively

图 2 不同肿瘤上清对 CTLL-2 细胞 IL-2 反应性的影响

Fig.2 The effects of the different supernatants of S180 on the reactivity of CTLL-2 to IL-2

A, B, C, D, E, F stand for the corresponding supernatants of S180 respectively

2.2.1 A 上清对 5 项指标的影响

A 上清与对照相比,能显著抑制($P < 0.01$)所测 5 项指标即小鼠脾细胞 Con A 诱导的转化、IL-2 产生和 IL-2R α 表达, NK 杀伤活性及 CTLL-2 细胞 IL-2 反应性。

2.2.2 B ~ F 上清对 5 项指标的影响

①B ~ F 各上清与 A 上清相比,可明显上调上述 5 项指标($P < 0.01$),但对 Con A 诱导的小鼠脾细胞转

图 3 不同肿瘤上清对小鼠脾细胞 NK 活性的影响

Fig.3 The effects of the different supernatants of S180 on the NK activity of murine splenocytes

A, B, C, D, E, F stand for the corresponding supernatants of S180 respectively

表 1 不同肿瘤上清对 Con A 诱导的小鼠脾细胞 IL-2 产生的影响

Tab.1 The effects of different supernatants of S180 on the production of IL-2 of murine splenocytes induced by Con A

Groups	n	OD($\bar{x} \pm s$)
Control	10	0.434 \pm 0.020
Positive control	10	1.334 \pm 0.137
Con A control	10	0.925 \pm 0.100
AMB + Con A	10	1.219 \pm 0.165
AMB	10	0.717 \pm 0.062
A	10	0.586 \pm 0.032 Δ
B	10	0.927 \pm 0.039 \blacktriangle
C	10	0.901 \pm 0.021 \blacktriangle
D	10	0.932 \pm 0.023 \blacktriangle
E	10	0.924 \pm 0.063 \blacktriangle
F	10	0.911 \pm 0.150 \blacktriangle

Δ Compaired with Con A control, $P < 0.01$; \blacktriangle Compaired with A, $P < 0.01$; A, B, C, D, E, F stand for the corresponding supernatants of S180 respectively

3 讨论

细胞免疫是机体对肿瘤进行免疫监视的功能主体,其中 T 细胞和 NK 细胞是两种关键的免疫活性细胞。已有报道 S180 肿瘤细胞可分泌多种免疫抑制物质^[3-6],在肿瘤局部形成了一个深度免疫抑制的“黑洞”区,不但使身在其中的免疫细胞功能严重抑制,即使功能正常的免疫细胞,甚至活化的免疫细胞一旦进入这个环境,也将变为功能抑制,因此肿瘤可以逃脱免疫系统的排斥而不断生长。

表 2 不同肿瘤上清对 Con A 诱导的小鼠脾细胞表面 IL-2R α 表达的影响

Tab.2 The effects of different supernatants of S180 on the expression of IL-2R α on murine splenocytes induced by Con A

Groups	IL-2R α (%)
Control	9.64
Con A control	26.70
AMB	25.50
AMB + Con A	28.40
A	12.00
B	23.50
C	25.10
D	23.10
E	21.60
F	22.31

A, B, C, D, E, F stand for the corresponding supernatants of S180 respectively

黄芪可提高荷瘤小鼠脾细胞免疫功能,也可直接杀伤肿瘤细胞^[7],但尚无关于其对肿瘤免疫抑制物质影响的报告。为此,我们用市售黄芪注射液,在体外较为系统的研究了其对 S180 肿瘤上清免疫抑制作用的影响。本研究以“黄芪对 Con A 诱导的小鼠脾细胞体外转化的影响”和“黄芪体外对肿瘤细胞的影响”两个预实验结果,选择既对 Con A 诱导的小鼠脾细胞体外转化有明显协同作用又对肿瘤细胞无直接毒性作用的黄芪最高浓度作为实验用浓度,因此本研究的所有结果均无黄芪直接杀伤肿瘤细胞的影响。

本研究发现,单纯 S180 肿瘤细胞培养上清(A 上清)对小鼠脾细胞无毒性作用,而对所测 5 项指标有明显抑制作用,提示这种抑制作用是由 S180 肿瘤细胞分

泌的免疫抑制物质所引起。在单纯 S180 肿瘤细胞培养上清中加入实验用浓度的黄芪(F 上清)可明显上调 5 项指标,提示黄芪能直接对抗 S180 分泌的免疫抑制物质的免疫抑制作用。用含实验用浓度的黄芪的培养液培养 S180 肿瘤细胞 24 h 或 48 h 后,洗去黄芪再培养 24 h 的上清都可明显上调 5 项指标,提示,实验用浓度的黄芪还可下调 S180 肿瘤细胞合成和/或分泌免疫抑制物质,此下调作用在黄芪作用 24 h 时即可显现,且一旦显现即可自行维持至少 24 h。

我们以往的研究发现,黄芪可上调小鼠脾细胞 IL-15 mRNA 表达。因此,本研究发现的黄芪对 S180 肿瘤上清免疫抑制作用的对抗作用,可能是其本身的作用,也可能是通过提高小鼠脾细胞 IL-2 和 IL-15 的表达而间接发挥作用,抑或二者兼有,其确切机制尚待进一步研究。有报道 S180 肿瘤细胞可分泌多种免疫抑制物质,黄芪对 S180 肿瘤上清免疫抑制作用的影响,是通过对抗或下调哪一种或哪几种免疫抑制物质,以及这种对抗和下调作用是在何水平,如基因水平、转录水平还是分泌水平,是在何环节,如受体表达、受体结合还是信号传导等,都还有待于今后进一步研究。黄芪注射液中含有多种成分,是何成分逆转 S180 肿瘤上清免疫抑制作用,也有待今后进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李晓燕, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿甙逆转转化生长因子 β 2 免疫抑制作用的抗肿瘤研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, 7(2): 127-130.
- [2] 李晓燕, 张玲, 王芸, 等. 淫羊藿甙逆转转化生长因子 β 2 对 LAK, CD3AK 细胞的免疫抑制作用[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(5): 266-268.
- [3] 张劲松. 肿瘤免疫抑制与治疗[J]. 国外医学免疫学分册, 2001, 24(1): 50-54.
- [4] Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor in human disease[J]. N Engl J Med, 2000, 342 (18): 1350-1358.
- [5] Teraoka H, Sawada T, Yamashita Y, et al. TGF-beta1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cellular invasion[J]. Int J Oncol, 2001, 19(-4): 709-715.
- [6] Chery JA. Expression of regeneration and tolerance factor on B cell chronic lymphocytic leukemias: A possible mechanism for escaping immune surveillance[J]. Am J Hematol, 1999, 61: 46-61.
- [7] 杨金明, 郭红梅, 陈霞, 等. 黄芪对 S180 荷瘤小鼠的免疫增强及抑瘤作用[J]. 中国实验临床免疫学杂志, 1995, 7(1): 41-43.

[收稿日期] 2002 - 11 - 26

[修回日期] 2003 - 01 - 18