

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.06.007

痰热清注射液缓解 Lewis 肺癌模型小鼠化疗后的免疫抑制

马鸣¹, 杨兴肖², 张金艳¹, 刘丽华³, 刘永春¹, 赵连梅³, 单保恩³(1. 河北医科大学第四医院 检验科, 河北 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院 感染管理科, 河北 石家庄 050011; 3. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**研究痰热清注射液对 Lewis 肺癌化疗模型小鼠免疫抑制作用的影响,以探讨其对荷肺癌小鼠的免疫调节作用。**方法:**构建 C57 BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型,40 只模型小鼠随机分为模型对照组、痰热清组、化疗组、痰热清联合化疗组及正常对照组,每组 8 只。治疗后摘小鼠眼球取血,取脾脏、外周血和胸腺,并分离腹腔巨噬细胞(M ϕ),检测各组小鼠胸腺指数及外周血淋巴细胞数量,MTT 法检测各组小鼠脾 T、B 淋巴细胞增殖水平,流式细胞术检测胸腺细胞的凋亡率和外周血内 CD3⁺、CD3⁻NK1.1⁺ 细胞及 CD3⁺NK1.1⁺ 细胞比例,RT-PCR 检测胸腺组织 *Bcl-2* 和 *Fas* mRNA 表达水平,乳酸脱氢酶(LDH)释放法和 ELISA 法检测 M ϕ 的杀伤活性及其分泌 IL-12 能力,免疫透射比浊法检测小鼠外周血清中 IgG 及补体 C3 的含量。**结果:**痰热清联合化疗组小鼠的胸腺指数、外周血淋巴细胞计数及 T、B 细胞增殖活性均明显高于单独化疗组($P < 0.01$),同时胸腺细胞的凋亡水平明显低于单独化疗组($P < 0.01$)。痰热清联合化疗组小鼠外周血 CD3⁺T 细胞、CD3⁻NK1.1⁺ 细胞及 CD3⁺NK1.1⁺ 细胞比例均明显高于化疗组($P < 0.01$)。与化疗组相比,痰热清联合化疗组小鼠胸腺组织 *Bcl-2* mRNA 水平明显增高,而 *Fas* mRNA 水平明显减低(均 $P < 0.01$)。痰热清组小鼠 M ϕ 杀伤活性及分泌 IL-12 水平均明显高于化疗组(均 $P < 0.01$),同时外周血 IgG 及补体 C3 含量明显高于化疗组(均 $P < 0.01$)。**结论:**痰热清注射液对肺癌化疗小鼠的免疫系统有明显保护作用,其对抗肿瘤免疫力有明显的促进作用。

[关键词] 肺癌;痰热清注射液;化疗;免疫调节;生物调节剂

[中图分类号] R734.2; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)06-0640-07

Effect of Tanreqing on chemotherapy-associated immune suppression in mice with experimentally induced Lewis lung carcinoma

Ma Ming¹, Yang Xingxiao², Zhang Jinyan¹, Liu Lihua³, Liu Yongchun¹, Zhao Lianmei³, Shan Baoen³(1. Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 2. Department of Infection Administration, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of an injectable Chinese herbal medicine Tanreqing on chemotherapy-induced immunosuppression in a mouse model of lung carcinoma. **Methods:** A total of 40 C57 BL/6 mice were randomized to five groups: 1) normal control, 2) experimentally induced lung carcinoma, 3) Tanreqing treatment, 4) chemotherapy, and 5) chemotherapy combined with Tanreqing treatment. The designated treatments commenced 10 days after lung carcinoma induction and lasted for 5 days. At the end of the treatments, animals were sacrificed after periphery blood sampling, spleen and thymus were collected, and macrophages were isolated from peritoneal fluid. Thymus index and lymphocytes in peripheral blood were quantified. Apoptosis rate of thymus cells and proportion of CD3⁺, CD3⁻NK1.1⁺ and CD3⁺NK1.1⁺ cells in peripheral blood lymphocytes were determined by flow cytometry. The viability of T and B lymphocytes were assessed by MTT assay. *Bcl-2* and *Fas* mRNA levels in thymus were measured by RT-PCR. The cytotoxicity of peritoneal macrophages and their secretion of IL-12 were determined with LDH and ELISA kits. Serum levels of IgG and

[基金项目] 河北省中医药管理局基金资助项目(No. 2013018)。Project supported by the Foundation of Traditional Chinese Medicine Administration of Hebei Province (No. 2013018)

[作者简介] 马鸣(1983-),男,博士生,主管技师,主要从事肿瘤分子诊断学研究,E-mail: maming19830419@163.com

[通信作者] 单保恩(Shan Baoen, corresponding author), E-mail: shanbaoen@163.com

C3 were measured by immune turbidimetry. **Results:** As compared with the chemotherapy group, the chemotherapy and Tanreqing combination group had significantly higher thymus index, lymphocyte count and T and B lymphocyte viabilities in the spleen ($P < 0.01$), significantly higher percentages of CD3⁺, CD3⁻NK1.1⁺ and CD3⁺NK1.1⁺ cells in peripheral-blood lymphocytes ($P < 0.01$), and significantly higher *Bcl-2* mRNA abundance ($P < 0.01$) but significantly lower *Fas* mRNA abundance ($P < 0.01$). Peritoneal macrophages isolated from animals in the combination treatment group produced significantly higher levels of IL-2 and displayed significantly higher cytotoxicity than those isolated from animals in the chemotherapy group ($P < 0.01$). Moreover, serum levels of IgG and C3 were significantly higher in the combination group than in the chemotherapy group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The injectable Chinese herbal medicine Tanreqing appears to have an immune protective and anti-tumor immunity-enhancing activities in lung carcinoma patients undergoing chemotherapy.

[**Key words**] lung carcinoma; Tanreqing-injection; immunoregulation; biological modulator

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(6): 640-646]

近年来,我国肺癌发病率持续上升,已成为恶性肿瘤中第一位死因。对于肺癌患者,化疗仍然是常规治疗方法之一,然而化疗对患者免疫功能影响较大,容易造成免疫抑制,并导致感染等并发症而直接威胁患者生命。近年来,“生物调节剂”的概念得到越来越广泛的认同,中药作为生物调节剂,以其良好的疗效和低廉的价格受到越来越广泛的重视。痰热清注射液是一种具有清热解毒、驱邪扶正作用的国家中药二类新药制剂,目前临床上主要用于各种感染性疾病的治疗。其用于肺癌化疗后并发感染患者,不仅能够明显改善患者的临床感染症状,还能够明显提升患者淋巴细胞免疫活性^[1-2]。因此,本研究通过构建 Lewis 肺癌移植瘤化疗模型,并在化疗过程中给荷瘤小鼠使用痰热清注射液,观察小鼠化疗后的免疫功能,以初步探讨该药作为生物调节剂对小鼠肺癌化疗后机体免疫抑制作用的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞株、试剂及药物

5~6周龄 C57BL/6 小鼠(体重 17~20 g)购自河北医科大学实验动物中心(动物合格证号 911148)。Lewis 小鼠肺癌细胞株及 H22 小鼠肝癌细胞株由河北医科大学第四医院科研中心提供。痰热清注射液(批号:1107114)购自上海凯宝药业有限公司。顺铂注射液(批号:8090151PB)购自齐鲁制药有限公司。小鼠 CD3-FITC、NK1.1-PE 分别购自 Ebioscience 及 Caltag 公司,免疫浊度法血清免疫球蛋白 IgG 和补体 C3 检测试剂盒均购自上海太阳生物技术有限公司,MTT 购自 Sigma 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,乳酸脱氢酶(LDH)释放法杀伤活性检测试剂盒购自南京建成生物技术有限公司,PCR 反转录及扩增

试剂盒购自 Promage 公司,小鼠 IL-12 ELISA 检测试剂盒购自美国 ADL 公司。

1.2 小鼠模型的建立及实验分组

Lewis 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养传代后,取对数生长期细胞,调节密度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$,给每只小鼠右侧肩胛部注射 0.2 ml 细胞悬液,观察肿瘤生长情况。在第 8 天左右各小鼠均可触及肿块,在第 10 天开始给予治疗。随机将小鼠分为 5 组(每组 8 只):正常对照组(构建荷瘤模型时只注射 0.2 ml 生理盐水,不做任何治疗处理)、模型对照组、痰热清组、化疗组和痰热清联合化疗组。除正常对照组构建荷瘤模型时只注射 0.2 ml 生理盐水,不做任何治疗处理,其余 4 组治疗时均采用瘤旁注射,痰热清注射液注射剂量为 5 ml/kg,溶于 0.2 ml 生理盐水;顺铂注射剂量参考文献[3],6.15 mg/kg,溶于 0.2 ml 生理盐水;生理盐水注射量也为 0.2 ml。具体的治疗方案见表 1。第 15 天,摘眼球取血后,脱颈椎处死小鼠,取脾脏和胸腺用于后续实验。

表 1 治疗方案

Tab. 1 Therapeutic schedule

Group	d 10 to 14	d 10, 12 and 14
Normal control	-	-
Model control	Normal saline	-
Tanreqing	Tanreqing	Normal saline
Chemotherapy	Normal saline	Cisplatin
Chemotherapy + Tanreqing	Tanreqing	Cisplatin

1.3 小鼠外周血淋巴细胞计数、脾淋巴细胞增殖活性、胸腺指数(thymus index, TI)检测

上述小鼠摘眼球取外周血后,常规计数外周血

淋巴细胞。同时, 无菌条件下, 取胸腺称质量, 计算 (TI), $TI = \text{胸腺质量}(\text{mg}) / \text{体质量}(\text{g})$ 。脾脏在无菌条件下, 用眼科剪剪成小块后, 通过 200 目铁砂网制成淋巴细胞单细胞悬液, PBS 洗两遍, 以 5×10^6 /孔的密度接种于 96 孔板中, 以 ConA (5 mg/ml) 或 LPS (20 mg/ml) 作为刺激源, 刺激 48h 后, MTT 法并用酶标仪检测小鼠脾 T、B 淋巴细胞增殖水平 [以 492 nm 波长下的光密度 (D) 值表示]。

1.4 RT-PCR 检测小鼠胸腺细胞凋亡程度及 *Bcl-2* 和 *Fas* mRNA 的表达水平

胸腺称质量后, 于无菌条件下用网搓法将胸腺组织制成单细胞悬液, 加入碘化丙啶 (PI), 避光孵育 30 min, 流式细胞术检测胸腺细胞的凋亡程度。按 TRIzol 产品说明书提取胸腺细胞总 RNA, 作为两步法 RT-PCR 的模板。cDNA 序列设计 PCR 扩增引物序列参考文献 [4]。基因表达差异分析: RT-PCR 扩增产物相对表达量的强弱用目的基因的灰度值与相应反应条件下 β -actin 灰度值的比值来表示。扩增基因 *Bcl-2* 基因 (388 bp) 的上游引物为 5'-CGACTTCGCCGAGAT GTCCAGCCAG-3', 下游引物为 5'-ACTTGTG GCCCAGATAGGCACCCAG-3'。*Fas* 基因 (418 bp) 的上游引物为 5'-GCTGCAGACAT-GCTGTGGATC-3', 下游引物为 5'-TCACAGCCAG-GAGAATC CAG-3'。 β -actin 基因 (138 bp) 的上游引物为 5'-AGAGGGAAATCGTG CGTGAC-3', 下游引物为 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'。

1.5 流式术检测小鼠外周血淋巴细胞亚群比例

按照 1.2 方法取各组小鼠外周血后, 50 μl 全血加入 20 μl 抗小鼠 CD3-FITC 及 NK1.1-PE, 室温避光孵育 30 min, 加入破膜剂, 裂解红细胞后, 流式细胞术检测外周血 CD3⁺、CD3⁻ NK1.1⁺ 细胞及 CD3⁺ NK1.1⁺ 细胞比例。

1.6 LDH 释放法、ELISA 检测小鼠腹腔巨噬细胞 ($M\phi$) 的吞噬杀伤活性及 $M\phi$ 分泌 IL-12 的能力

小鼠腹腔 $M\phi$ 的分离方法参考文献 [5], 脱颈椎处死小鼠后, 无菌条件下, 用眼科剪剖开各组小鼠下腹部, PBS 反复冲洗腹腔, 将冲洗液离心, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬沉淀的细胞, 置饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h, 弃去悬浮细胞, 贴壁细胞即为 $M\phi$ 。刮下细胞并调整细胞密度至 2×10^6 /ml 作为效应细胞, 取对数生长期的小鼠肝癌细胞 H22 (密度 1×10^5 /ml) 作为靶细胞。每孔加入 100 μl 效应细胞 (E), 加入 100 μl 靶细胞 (T), E:T 比

例为 20:1, 培养 48 h, 培养结束后, 每孔取培养上清液 10 μl 加入酶标板中, 测定孔和测定空白孔各取 5 μl , 用酶标仪测定波长 450 nm 处光密度 (D) 值。按下列公式计算细胞的杀伤活性: 细胞杀伤活性 (%) = (测定孔的 D 值 - 测定空白孔的 D 值) / (标准品孔的 D 值 - 标准空白孔的 D 值) $\times 100\%$ 。另取 100 μl 效应细胞和靶细胞共培养孔培养上清, ELISA 法检测上清液中 IL-12 的含量, 具体操作步骤按照说明书进行, 根据标准曲线计算 IL-12 的含量。

1.7 免疫透射比浊法检测小鼠外周血中 IgG 及补体 C3 水平的影响

小鼠取血后, 离心分离血清, 首先通过标准品制作标准曲线, 在波长为 340 nm 处采用免疫透射比浊法检测小鼠外周血血清中 IgG 及补体 C3 的水平, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.8 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计学软件, 计量资料样本间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 痰热清注射液对小鼠 TI、外周血淋巴细胞计数及脾淋巴细胞增殖活性的影响

如表 2 所示, 与正常对照组相比, 模型组小鼠脾淋巴细胞增殖活性明显减低 ($P < 0.01$), TI 明显增高 ($P < 0.01$), 而痰热清组小鼠的脾 T 淋巴细胞被 ConA 刺激后的增殖活性显著高于模型对照组 ($P < 0.05$), 而脾 B 淋巴细胞被 LPS 刺激增殖活性无明显改变 ($P > 0.05$); 化疗组小鼠 TI、外周血淋巴细胞数及脾淋巴细胞增殖活性均明显低于模型组与正常对照组 ($P < 0.01$); 痰热清联合化疗组较单纯化疗组与模型对照组均有明显改善 ($P < 0.01$)。

2.2 痰热清注射液对模型小鼠胸腺细胞凋亡程度及 *Bcl-2* 和 *Fas* mRNA 表达水平的影响

模型对照组、痰热清组小鼠胸腺细胞凋亡率及 *Bcl-2* 和 *Fas* mRNA 表达率与正常对照组相比均无明显差异 ($P > 0.05$), 化疗组胸腺细胞凋亡率及 *Fas* mRNA 表达率均明显高于对照组、*Bcl-2* mRNA 表达率明显低于对照组 ($P < 0.01$), 而痰热清联合化疗组胸腺细胞凋亡率及 *Fas* mRNA 表达率均明显低于化疗组, *Bcl-2* mRNA 表达率明显高于化疗组 ($P < 0.01$) (图 1, 图 2, 图 3)。

表 2 痰热清注射液对小鼠 TI、外周血淋巴细胞计数及脾淋巴细胞增殖水平的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effects of Tanreqing-injection on TI,lymphocytes count and proliferation of spleen lymphocyte of model mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	TI	Lymphocytes count($\times 10^9/L$)	T cell(D_{492})	B cell(D_{492})
Normal control	2.46 \pm 0.26	2.92 \pm 0.32	0.64 \pm 0.05	0.58 \pm 0.06
Model control	2.93 \pm 0.18 **	3.01 \pm 0.41	0.52 \pm 0.04*	0.43 \pm 0.02*
Tanreqing	2.98 \pm 0.13 **	3.12 \pm 0.52	0.63 \pm 0.05 Δ	0.49 \pm 0.04
Chemotherapy	1.02 \pm 0.14 ** $\Delta\Delta$	0.99 \pm 0.18 ** $\Delta\Delta$	0.33 \pm 0.02 ** $\Delta\Delta$	0.21 \pm 0.04 ** $\Delta\Delta$
Chemotherapy + Tanreqing	2.85 \pm 0.23 ** $\Delta\Delta\blacktriangle$	2.70 \pm 0.46 * $\Delta\Delta\blacktriangle$	0.61 \pm 0.03 $\Delta\Delta\blacktriangle$	0.54 \pm 0.03 $\Delta\Delta\blacktriangle$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model control group; $\blacktriangle P < 0.01$ vs chemotherapy

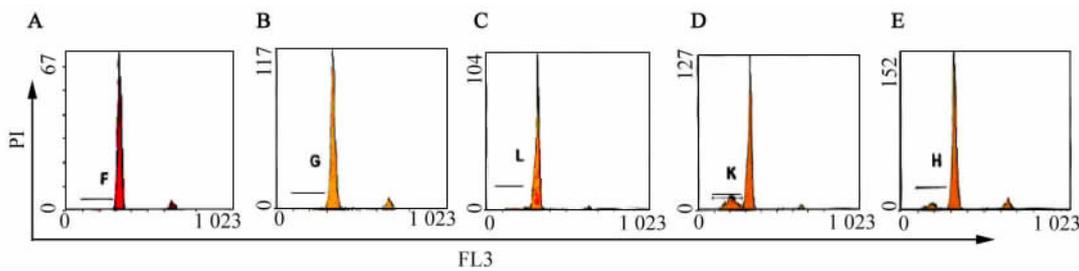


图 1 流式细胞术检测痰热清注射液对肺癌化疗小鼠胸腺细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effects of Tanreqing-injection on apoptosis of thymocytes in mice with lung carcinoma treated by chemotherapy as detected by flow cytometry

A:Normal control group;B:Model control group;C:Tanreqing group ;D:Chemotherapy group;E:Chemotherapy + Tanreqing group

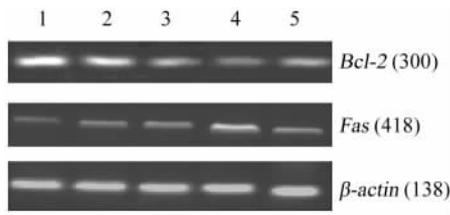


图 2 痰热清注射液对肺癌化疗小鼠胸腺组织表达 Bcl-2 和 Fas mRNA 水平的影响

Fig. 2 Effects of Tanreqing-injection on Bcl-2 and Fas mRNA expressions in thymus tissue s of mice with lung carcinoma treated by chemotherapy

1:Normal control group;2:Model control group;
3:Tanreqing group ;4:Chemotherapy group;
5:Chemotherapy + Tanreqing group

2.3 痰热清注射液对模型小鼠外周血淋巴细胞亚群比例的影响

流式细胞术检测结果(表 4)显示,模型对照组小鼠外周血内 CD3⁺T 细胞、CD3⁻NK1.1⁺细胞及 CD3⁺NK1.1⁺比例均明显减低($P < 0.05$);化疗组小鼠上述三类细胞比例均进一步下降($P < 0.01$);

痰热清组 CD3⁺T 细胞、CD3⁻NK1.1⁺细胞较模型对照组明显提高($P < 0.05$),而 CD3⁺NK1.1⁺比例无明显改变($P > 0.05$);痰热清联合化疗组上述三类细胞比例均较化疗组明显增高($P < 0.01$)。

2.4 痰热清注射液对模型小鼠腹腔 Mφ 杀伤活性及其分泌 IL-12 能力的影响

LDH 释放实验和 ELISA 检测结果(表 5)显示,与正常对照组相比,化疗组和模型组小鼠 Mφ 杀伤率及 IL-12 分泌水平均明显降低($P < 0.05$);痰热清组杀伤率较模型对照组无明显改变($P > 0.05$),但 IL-12 分泌水平增加($P < 0.05$);痰热清联合化疗组的 Mφ 杀伤率及 IL-12 分泌水平均明显高于化疗组($P < 0.01$)。

2.5 痰热清注射液对小鼠外周血血清中 IgG 及补体 C3 水平的影响

免疫透射比浊法检测结果(表 6)显示,与正常对照组相比,痰热清组和模型组小鼠外周血血清中 IgG 及补体 C3 的水平均无明显差异($P > 0.05$),化疗组血清中 IgG 及补体 C3 的水平较正常对照组明显降低($P > 0.01$),但痰热清联合化疗组血清中 IgG 及补体 C3 的水平均明显高于化疗组($P < 0.01$)。

表 3 痰热清注射液对模型小鼠胸腺细胞凋亡率、胸腺组织 *Bcl-2* 和 *Fas* mRNA 表达的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of Tanreqing-injection on apoptosis ratio of thymocytes, *Bcl-2* and *Fas* mRNA expressions in thymus tissues of model mice($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Ratio of apoptosis(%)	<i>Bcl-2</i> mRNA	<i>Fas</i> mRNA
Normal control	1.83 ± 0.26	0.76 ± 0.16	0.19 ± 0.04
Model control	1.66 ± 0.43	0.70 ± 0.18	0.24 ± 0.06
Tanreqing	1.90 ± 0.37	0.68 ± 0.24	0.21 ± 0.07
Chemotherapy	18.76 ± 3.21 ^{**△△}	0.29 ± 0.06 ^{**△△}	0.71 ± 0.20 ^{**△△}
Chemotherapy + Tanreqing	7.53 ± 1.47 ^{**△△▲▲}	0.59 ± 0.11 ^{*△△▲▲}	0.40 ± 0.17 ^{*△△▲▲}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model control; $\blacktriangle P < 0.01$ vs chemotherapy

表 4 痰热清注射液对模型小鼠淋巴细胞亚群的影响($n=8, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab. 4 Effects of Tanreqing-injection on lymphocyte subsets of model mice ($n=8, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	CD3 ⁺ T cells	CD3 ⁻ NK1.1 ⁺ cells	CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ cells
Normal control	62.63 ± 7.69	8.71 ± 1.83	5.30 ± 0.95
Model control	52.33 ± 8.89 [*]	7.21 ± 1.48 [*]	4.69 ± 1.05 [*]
Tanreqing	59.11 ± 6.52 Δ	8.85 ± 1.38 Δ	4.90 ± 1.12
Chemotherapy	39.85 ± 5.99 ^{**△△}	3.15 ± 0.90 ^{**△△}	1.82 ± 0.45 ^{**△△}
Chemotherapy + Tanreqing	51.29 ± 6.51 ^{*△△▲▲}	7.17 ± 1.53 ^{*△△▲▲}	5.07 ± 0.90 ^{△△▲▲}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model control; $\blacktriangle P < 0.01$ vs chemotherapy

表 5 痰热清注射液对小鼠腹腔 M ϕ 的杀伤活性及其分泌 IL-12 的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of Tanreqing-injection on cytotoxic and secretion of IL-12 for macrophage of model mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	Killing rate(%)	IL-12($\rho_B / \text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
Normal control	36.19 ± 4.12	326.23 ± 55.36
Model control	27.63 ± 3.22 [*]	265.11 ± 46.51 ^{**}
Tanreqing	29.16 ± 3.89 [*]	299.18 ± 41.26 ^{*△}
Chemotherapy	16.55 ± 3.17 ^{**△△}	112.31 ± 31.28 ^{**△△}
Chemotherapy + Tanreqing	32.33 ± 5.13 ^{△△▲▲}	289.17 ± 23.39 ^{*△△▲▲}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model control; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs chemotherapy

表 6 痰热清注射液对小鼠外周血清中 IgG 及补体 C3 水平的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Effects of Tanreqing-injection on level of IgG and C3 in peripheral blood serum of model mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	IgG($\rho_B / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	C3($\rho_B / \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Normal control	2.33 ± 0.32	0.38 ± 0.07
Model control	2.43 ± 0.29	0.36 ± 0.03
Tanreqing	2.38 ± 0.37	0.40 ± 0.05
Chemotherapy	1.83 ± 0.27 ^{**△△}	0.16 ± 0.02 ^{**△△}
Chemotherapy + Tanreqing	2.08 ± 0.13 ^{*△△▲▲}	0.33 ± 0.02 ^{▲▲}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal control; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model control; $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs chemotherapy

3 讨论

近年来,很多中药制剂作为生物调节剂,已成功应用于恶性肿瘤的综合治疗,并且以其低毒、廉价、高效等优势,受到越来越多医务工作者的青睐。痰热清注射液是由黄芩、金银花、熊胆粉等精制成而成的国家中药二类新药,具有清热燥湿、泻火解毒、化痰解痉、驱邪扶正等功效^[1-2]。本实验通过构建小鼠肺癌化疗模型,系统研究了该药对肺癌化疗机体的免疫调节作用。

外周血淋巴细胞数量减少、免疫活性降低是化疗后的常见并发症。本研究中,单纯化疗组小鼠外周血淋巴细胞数量明显减少,经非特异性丝裂原 ConA 或 LPS 刺激后,T 细胞和 B 细胞增殖能力明显低于正常和模型对照组,同时胸腺指数明显降低,胸腺细胞凋亡增加。淋巴细胞是介导机体特异性免疫应答的主力,而胸腺是 T 细胞发育、分化的主要场所,是机体能否行使正常抗肿瘤免疫功能的关键因素^[5-6]。痰热清注射液联合化疗组小鼠上述指标均较化疗组明显改善,提示该药对化疗小鼠的胸腺具有明显的保护作用,可促进淋巴细胞分化、发育及免疫活性,从而改善化疗后免疫抑制状态。进一步研究发现,痰热清注射液联合化疗组小鼠胸腺细胞表达抗凋亡基因 *Bcl-2* mRNA 的水平明显高于化疗组,而表达促凋亡基因 *Fas* mRNA 的水平明显减低,这两类基因的相对表达水平在调控胸腺细胞的凋亡水平中具有重要意义^[7-8],提示该药对胸腺细胞的保护作用可能与调节上述两种凋亡相关基因表达有关。

淋巴细胞是介导机体抗肿瘤及抗感染适应性免疫应答的主要效应细胞,该作用主要由 T 细胞及 NK 细胞等完成^[9-11],而 NKT 细胞是一群既具有 T 细胞又具有 NK 细胞特性的细胞亚群,目前其抗肿瘤作用已较明确^[12-13]。正常情况下,外周血中 T 细胞、NK 细胞及 NKT 细胞的比例均保持在一定范围内,肿瘤本身即可造成上述三类细胞比例降低,同时在化疗后初期,化疗药物的毒性作用可造成其进一步降低^[9,14]。本研究发现,与正常对照组相比,模型组小鼠外周血淋巴细胞中 CD3⁺ 细胞、CD3⁻ NK1.1⁺ 细胞及 CD3⁺ NK1.1⁻ 细胞比例均明显降低,而痰热清组小鼠外周血中 CD3⁺ 细胞及 CD3⁻ NK1.1⁺ 细胞比例均明显增加,化疗组小鼠的上述三类细胞则出现显著降低,但痰热清联合化疗组小鼠外周血上述三类细胞比例明显增高,提示化疗联合痰热清注射液可能具有纠正肿瘤造成的淋巴细胞亚群紊乱和增强机体抗肿瘤免疫活性的功能。

M ϕ 是重要的抗原提呈细胞,其免疫活性是连接特异性与非特异性免疫应答的关键因素之一^[5,15]。IL-12 是机体重要的免疫调节因子,其不仅可促进 M ϕ 等抗原提呈细胞的免疫活性及对肿瘤抗原的摄取、加工和提呈,还可促进细胞毒性 T 细胞对肿瘤细胞的识别、杀伤,因此在机体抗肿瘤免疫中发挥重要作用^[5,16]。本研究发现,模型对照组与单独化疗组小鼠 M ϕ 的杀伤活性及表达 IL-12 能力明显下降,而痰热清联合化疗组小鼠 M ϕ 免疫活性明显增强,提示痰热清注射液能够通过促进 M ϕ 分泌 IL-12 而促进 M ϕ 的免疫活性,并增强机体抗肿瘤免疫力。

此外,本实验还研究了各组小鼠血清中 IgG 及补体 C3 的水平,结果发现,痰热清注射液联合化疗组小鼠血清 IgG 及补体 C3 水平减低的状况较化疗组有明显的改善。IgG 是血清中含量最高的免疫球蛋白,而补体 C3 是具有酶活性的球蛋白,它们在机体非特异性抗肿瘤体液免疫应答中发挥重要作用,同时两者又是代表机体体液免疫水平的重要指标^[17]。因此推测,该药不仅可显著促进机体细胞免疫应答,还能够增强非特异性抗肿瘤体液免疫应答能力。

总之,本研究通过构建小鼠肺癌化疗模型,探索了痰热清注射液对肺癌小鼠化疗后免疫抑制状态的调节作用,并对其可能机制进行了初步探讨,发现痰热清注射液可从细胞和体液免疫两个方面改善机体化疗后免疫抑制的状态,增强机体抗肿瘤免疫力,提示该药在临床上可能具有更广阔的应用空间,为该药在肺癌综合治疗中的应用提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 燕忠生,魏千程,李俊,等. 痰热清注射液防治放射性肺炎的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(12): 1270-1275.
- [2] 马鸣,刘丽华,杨兴肖,等. 痰热清注射液对肺鳞状细胞癌患者放疗后淋巴细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 291-294.
- [3] 魏素菊,尤江莲,韩文峰,等. rmh-TNF 协同顺铂抗 Lewis 肺癌血管生成的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(3): 264-268.
- [4] 刘丽华,刘登湘,马鸣,等. 五味子提取物对辐射所致小鼠淋巴细胞减少的预防效果及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(3): 313-317.
- [5] 赵连梅,纪昕,单保恩,等. 淫羊藿苷对化疗后小鼠骨髓和细胞免疫抑制作用的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(10): 976-979.
- [6] 张剑,吴敏,张自森,等. 养正消积胶囊对原发性肝癌肝动脉

- 化疗栓塞术后患者细胞免疫功能及血管形成的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 189-192.
- [7] Mirzaei MH, Esmailzadeh A. Overexpression of MDA-7/IL-24 as an anticancer cytokine in gene therapy of thyroid carcinoma [J]. J Med Hypoth Ideas, 2014, 8(1): 7-13.
- [8] Chang GC, Yu CT, Tsai CH, et al. An epidermal growth factor inhibitor, gefitinib, induces apoptosis through a p53-dependent up regulation of pro-apoptotic molecules and down regulation of antiapoptotic molecules in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 600(1/3): 37-44.
- [9] Yang N, Li Z, Jiao Z, et al. A trichosanthin-derived peptide suppresses type 1 immune responses by TLR2-dependent activation of CD8⁺ CD28⁻ Tregs [J]. Clin Immunol, 2014, 153(4): 277-287.
- [10] 刘丽华, 刘登湘, 马鸣, 等. 五味子提取物预防辐射所致免疫损伤的实验研究 [J]. 癌变 畸变 突变, 2012, 24(2): 108-110.
- [11] Yarde DN, Lorenzo-Arteaga K, Corley KP, et al. CD28⁻ CD8⁺ T cells are significantly reduced and correlate with disease duration in juveniles with type 1 diabetes [J]. Hum Immunol, 2014, 22(9): 424-428.
- [12] Masaki T, Jay AB. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: A new immunoregulatory axis [J]. Trends in Immunology, 2007, 28(11): 491-496.
- [13] Viale R, Ware R, Maricic I, et al. NKT cell subsets can exert opposing effects in autoimmunity, tumor surveillance and inflammation [J]. Curr Immunol Rev, 2012, 8(4): 287-296.
- [14] Lu AP, Zhang SS, Zha QL, et al. Relationship among gastric mucosa CD4⁺, CD8⁺ cells infiltration, Hp infection and symptoms in patients with chronic gastritis [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(16): 2486-2490.
- [15] Nikolic T, Movita D, Lambers ME, et al. The DNA-binding factor C/EBP β critically controls gene expression in macrophages [J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 58-70.
- [16] 单保恩, 潘晓明, 赵连梅, 等. 淫羊藿苷促进脐血来源树突状细胞的分化与成熟 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(4): 325-330.
- [17] Hoffmann C, Stanke J, Kauffmann AM, et al. Combine T cell vaccine and application of agonistic anti-GITR mAb(DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expression tumors in mice [J]. J Immunother, 2010, 33(2): 136-145.
- [收稿日期] 2014 - 07 - 15 [修回日期] 2014 - 10 - 27
[本文编辑] 黄静怡

· 读者 · 作者 · 编者 ·

抵制不端行为 净化学术风气

学术不端行为是指在科学研究和学术活动中的各种造假、抄袭、剽窃和其他违背科学共同惯例的行为。为抵制学术不端行为,净化学术风气,中国科协在 2007 年 1 月发布了《科技工作者科学道德规范(试行)》,将不端行为概括为以下 7 条。

1. 故意做出错误的陈述,捏造数据或结果,破坏原始数据的完整性,篡改实验记录和图片,在项目申请、成果申报、求职和提职申请中做虚假的陈述,提供虚假获奖证书、论文发表证明、文献引用证明等。

2. 侵犯或损害他人著作权,故意省略参考他人出版物,抄袭他人作品,篡改他人作品内容;未经授权,利用被自己审阅的手稿或资助申请中的信息,将他人未公开的作品或研究计划发表或透露给他人或为己所用;把成果归功于对研究没有贡献的人,将对研究工作做出实质性贡献的人排除在作者名单之外,僭越或无理要求著者或合著者身份。

3. 成果发表时一稿多投。

4. 采用不正当手段干扰和妨碍他人研究活动,包括故意毁坏或扣压他人研究活动中必需的仪器设备、文献资料、以及其他与科研有关的财务;故意拖延对他人项目或成果的审查、评价时间,或提出无法证明的论断;对竞争项目或结果的审查设置障碍。

5. 参与或与他人合谋隐匿学术劣迹,包括参与他人的学术造假,与他人合谋隐藏其不端行为,监察失职,以及对投诉人打击报复。

6. 参与与自己专业无关的评审及审稿工作;在各类项目评审、机构评估、出版物或研究报告审阅、奖项评定时,出于直接或间接或潜在的利益冲突而作出违背客观、准确、公正的评价;绕过评审组织机构与评议对象直接接触,收取评审对象的馈赠。

7. 以学术团体、专家的名义参与商业广告宣传。

(本刊编辑部)