

# 半枝莲多糖对荷瘤小鼠 T 细胞免疫功能的影响

杨姗姗<sup>1</sup>, 张秀娟<sup>2</sup>

(1. 淮安信息职业技术学院, 江苏 淮安 223003;

2. 哈尔滨商业大学 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

**摘要:** 为研究半枝莲多糖对小鼠免疫功能的影响, 探讨其可能的抗肿瘤作用机制, 分别以 50、100、200 mg/kg 的剂量对荷瘤小鼠进行肌肉注射, 采用酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶 (ANAE) 染色法检测 T 淋巴细胞含量, 利用流式细胞术检测 T 淋巴细胞亚群变化及表面蛋白 CD28 的表达, 分别用 IL-2、IFN- $\gamma$  定量酶联免疫检测试剂盒测定 IL-2、IFN- $\gamma$  含量。结果显示, 与对照组相比, 半枝莲多糖各剂量组外周血 T 淋巴细胞总数均升高, 中、高剂量组 T 淋巴细胞含量分别显著升高 21.75%、26.44%; 外周血 T 淋巴细胞亚群中的 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞均提高, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值增加, 中、高剂量组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量分别显著提高 6.53、4.92 个百分点; 各剂量组 CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量均提高, 中、高剂量组分别极显著提高 8.24、7.32 个百分点, CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T 淋巴细胞含量均低于空白对照组; 各剂量组外周血血清中 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的含量均提高, 中剂量组分别提高 100.30%、376.95%。可见, 半枝莲多糖能够提高 T 细胞含量, 提高 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值, 促进外周血血清中 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的分泌, 从而提高机体的免疫功能使其趋于稳态, 发挥抗肿瘤作用。

**关键词:** 半枝莲多糖; 荷瘤小鼠; T 细胞; 免疫

中图分类号: S859.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)06-0145-04

## Effect of *Scutellaria barbata* Polyaccharides on T Lymphocytes Immune Function of Mice

YANG Shan-shan<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-juan<sup>2</sup>

(1. Huai'an College of Information Technology, Huai'an 223003, China; 2. Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

**Abstract:** To investigate the regulatory effects of *Scutellaria barbata* polysaccharides (SPS) on the immune function and anti-tumor mechanism in mice. SPS with the concentration 50, 100, 200 mg/mL was injected into the muscle of mice. T lymphocyte percentage was tested with ANAE and the change of T lymphocytes subsets and the expression of surface protein CD28 were tested with flow cytometry. IL-2 and IFN- $\gamma$  concentration were tested with ELISA kit. Compared with control group, the total number of peripheral blood T lymphocytes in SPS treatment group increased, and the middle and high group significant increased 21.75% and 26.44%, respectively. The number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> of lymphocyte subsets in SPS treatment group of T lymphocytes subsets also increased, and the middle and high group significant increased 6.53 and 4.92 percentage points, respectively. The number of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> T lymph cells in SPS treatment group increased, and the middle and high

收稿日期: 2013-11-02

基金项目: 江苏省教育厅高校科技成果孵化及高新技术产业推广项目 (2010-24); 淮安信息职业技术学院科研基金项目 (hxyq2013014)

作者简介: 杨姗姗 (1981-), 女, 黑龙江密山人, 助理研究员, 硕士, 主要从事抗肿瘤药理研究。

E-mail: yangshanshan810707@163.com

group significant increased 8.24 and 7.32 percentage points, while the number of  $CD8^{+}CD28^{-}$  T lymphocytes decreased. IL-2 and IFN- $\gamma$  concentration increased in SPS treatment group, and the middle group increased 100.30% and 376.95%, respectively. SPS improved the mice immunologic and anti-tumor function by promoting the proliferation of mice T lymphocytes, raised the ratio of  $CD4^{+}/CD8^{+}$  of lymphocyte subsets, promoting the secretion of IL-2 and IFN- $\gamma$ .

**Key words:** *Scutellaria barbata* polyaccharide; tumor bearing mice; T lymphocytes; immune

半枝莲别名狭叶韩信草、并头草、牙刷草等,为唇形科黄芩属植物,以干燥全草入药,其名最早见于明末医学家陈实功所著“外科正宗”。陆平成等<sup>[1]</sup>以半枝莲多糖为研究对象,观察其对小鼠免疫机能的影响发现,半枝莲多糖在体外可促进刀豆素 A (CoA) 诱导的小鼠脾细胞转化,皮下注射给药 1 周可提高小鼠外周血淋巴细胞中酯酶阳性细胞的百分率,增强二硝基氯苯诱导的迟发型变态反应。孟延发等<sup>[2]</sup>研究发现,半枝莲多糖在体外对 S180 肉瘤细胞以及肝腹水细胞均有一定的抑制作用。目前,关于半枝莲多糖对机体免疫功能的研究较少。为此,探讨了半枝莲多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响,并建立了 S180 荷瘤小鼠肉瘤模型,期为半枝莲多糖的开发和应用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试动物及瘤株 体质量( $20 \pm 2.0$ )g 的雄性昆明小鼠、肉瘤 S180 细胞均购于哈尔滨医科大学附属肿瘤医院肿瘤研究所。

1.1.2 药品与试剂 半枝莲多糖(纯度 30%)购自徐州弘康科技有限公司,黄芪多糖(APS)由哈尔滨商业大学博士后工作站提供,生理盐水购自哈尔滨三联药业有限公司, Anti-mCD4-PE-cy5、Anti-mCD8-PE-cy5、Anti-mCD28-PE 均购自 Bioscience 公司,小鼠白介素-2、IFN- $\gamma$  定量酶联免疫检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

1.1.3 仪器 电子天平购自德国 BSS 公司, HH-2 数显恒温水浴锅购自江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司, XSP-5 型显微镜购自上海光学仪器厂, LD4-2A 型台式低速离心机购自北京医用离心机厂,微量移液器购自 Gilson SAS 公司,倒置显微镜购自日本三洋公司, CLOUTER EPICS-XL 流式细胞仪购自美国 Backman-Coulter 公司,酶标仪购自瑞士 SUNRISE 公司。

### 1.2 建立 S180 荷瘤小鼠肉瘤模型

无菌条件下抽取接种肉瘤 S180 细胞 7 d 的小鼠腹水(活癌细胞数  $>95\%$ ),用无菌生理盐水(体积比 1:4)稀释,制成瘤细胞悬液,按 0.2 mL/只的剂

量接种于小鼠右腋部皮下。

### 1.3 试验设计

50 只小鼠,随机分成 5 组,每组 10 只,雌雄各半。小鼠于接种 24 h 后开始腹腔注射给药,空白对照组注射生理盐水,阳性对照组注射 100 mg/kg 的黄芪多糖;低、中、高剂量组分别注射 50、100、200 mg/kg 的半枝莲多糖,每天给药 1 次,连续给药 7 d,停药次日处死动物。

### 1.4 测定项目

1.4.1 T 淋巴细胞含量测试 停药 24 h 后尾静脉取血,推片。采用  $\alpha$ -醋酸萘酯酶(ANAE)染色法,油镜下计数 400 个淋巴细胞,计算 T 淋巴细胞含量<sup>[3-4]</sup>。

1.4.2 T 淋巴细胞亚群及 CD28 的表达测定 停药 24 h 后,眼眶静脉取血。采用淋巴细胞 3 色荧光染色分析方法,按照仪器及检测试剂说明进行。每份血标本取 2 支试管,各 100  $\mu$ L,加入肝素抗凝,再分别加入 Anti-mCD4-PE-cy5、Anti-mCD8-PE-cy5、Anti-mCD28-PE,然后室温避光孵育 15~20 min,每管加入红细胞裂解液 2 mL,振荡混匀,避光 10 min,离心(1 400 r/min)5 min,弃上清, PBS 洗涤 2~3 次,2 h 内上流式细胞仪检测。

1.4.3 IL-2 和 IFN- $\gamma$  含量测定 停药 24 h 后,眼球采血,室温凝固 30 min,1 000 r/min 离心 15 min,收集血清。按照试剂盒说明进行操作,将标准品稀释,以标准品的质量浓度为横坐标, OD 值为纵坐标,绘制标准曲线,并根据标准曲线计算各样品的 IL-2 和 IFN- $\gamma$  含量。

### 1.5 数据处理

采用 SPSS 16.0 处理数据,数据采用平均值  $\pm$  标准差表示,差异显著性检验采用单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞含量的影响

由表 1 可知,与空白对照组比较,半枝莲多糖各剂量组的 T 淋巴细胞百分率均提高,中、高剂量组分别升高 21.75%、26.44% ( $P < 0.01$ );与黄芪多糖组比较,半枝莲多糖低剂量组 T 淋巴细胞百分率下

降( $P>0.05$ ),中、高剂量组均升高( $P<0.05$ )。

表 1 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠外周血 T 淋巴细胞含量的影响

分组	T 细胞百分率/%
空白	48.00±2.75
黄芪多糖组	54.31±2.23
半枝莲多糖低剂量组	51.31±1.64a
半枝莲多糖中剂量组	58.44±1.71Ab
半枝莲多糖高剂量组	60.69±1.66Ab

注:a 表示与空白对照比较差异显著( $P<0.05$ ),A 表示与空白对照比较差异极显著( $P<0.01$ );b 表示与阳性对照比较差异显著( $P<0.05$ ),B 表示与阳性对照比较差异极显著( $P<0.01$ ),下同。

表 2 半枝莲多糖对 S180 小鼠外周血 T 淋巴细胞分化的影响

组别	CD4 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> T 细胞	CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> T 细胞
空白	28.16±1.85	23.83±2.26	15.39±0.78	23.50±0.85
黄芪多糖组	34.80±1.72	24.61±2.04	21.47±2.86	14.06±2.87
半枝莲多糖低剂量组	30.83±1.03	23.79±1.99	17.49±1.41a	19.43±1.39aB
半枝莲多糖中剂量组	34.69±1.33a	26.02±1.92	23.63±1.91Ab	15.52±1.29Ab
半枝莲多糖高剂量组	33.08±2.42a	24.51±0.92	22.71±1.13A	15.08±1.01A

2.3 半枝莲多糖对 S180 小鼠外周血清 IL-2 和 IFN-γ 含量的影响

由表 3 可以看出,与空白对照组比较,半枝莲多糖各剂量组的 IL-2 和 IFN-γ 含量均有提高,中剂量组 IL-2、IFN-γ 分别提高 100.30%、376.95% ( $P<0.01$ );与黄芪多糖组比较,半枝莲多糖中剂量组 IL-2 含量显著升高,IFN-γ 含量极显著升高。

表 3 S180 小鼠外周血清中 IL-2 和 IFN-γ 含量( $n=10$ )

组别	IL-2	IFN-γ
空白	11.715 0±2.618 5	2.820 0±1.091 4
黄芪多糖组	15.132 5±4.551 6	5.855 0±1.789 1
半枝莲多糖低剂量组	12.200 0±3.160 5	3.472 5±1.416 6
半枝莲多糖中剂量组	23.465 0±0.681 4Ab	13.450 0±1.118 0AB
半枝莲多糖高剂量组	17.435 0±3.807 4a	5.857 5±2.592 9a

3 讨论

T 淋巴细胞依据细胞表面表达 CD 分子的不同分为 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞两大亚群,作为介导细胞免疫的重要细胞,其活化、增殖、分化过程中涉及到多种分子和细胞因子的参与<sup>[5-7]</sup>。本试验结果显示,半枝莲多糖各剂量组的 T 淋巴细胞百分率均提高,其中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量均提高;CD8<sup>+</sup> T

2.2 半枝莲多糖对 S180 小鼠外周血 T 淋巴细胞分化的影响

由表 2 可知,与空白对照组相比,半枝莲多糖各剂量组 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量均提高,中、高剂量组分别提高 6.53、4.92 个百分点( $P<0.05$ );CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞除低剂量组外,各剂量组均提高( $P>0.05$ );CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T 淋巴细胞各剂量组均显著提高,中、高剂量组分别提高 8.24、7.32 个百分点( $P<0.01$ );各剂量组 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T 淋巴细胞含量均降低,低剂量组降低 4.07 个百分点( $P<0.05$ ),中、高剂量组分别降低 7.98、8.42 个百分点( $P<0.01$ );各剂量组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值均升高。

淋巴细胞除低剂量组外,各剂量组均提高。研究发现,静止的 T 淋巴细胞接受抗原提呈细胞(APC)递呈的双信号后活化,发挥抗肿瘤效应<sup>[8-9]</sup>,CD28 分子与 APC 表面 B7 因子结合构成具有共刺激作用的第 2 信号,介导 T、B 淋巴细胞粘附,防止克隆无反应状态的形成<sup>[10-13]</sup>,CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T 淋巴细胞主要为激活的细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte,CTL),与肿瘤直接接触,通过排粒作用释放穿孔素和颗粒酶等细胞毒性物质,溶解靶细胞<sup>[14]</sup>,同时还可能通过释放一些细胞因子诱导靶细胞凋亡<sup>[15]</sup>;而 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T 淋巴细胞中大部分为抑制性 T 淋巴细胞,对免疫应答具有负向调节作用<sup>[16-18]</sup>,且其长期升高可导致机体 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量下降,最终导致机体免疫系统对新的肿瘤细胞的无杀伤反应性<sup>[19]</sup>。本试验发现,半枝莲多糖各剂量组 CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T 淋巴细胞含量较空白对照均明显提高,CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T 淋巴细胞含量均降低。由此可见,半枝莲多糖可通过提高机体细胞免疫能力,进而抑制肿瘤细胞。

动物机体 CD4<sup>+</sup> T 细胞数量高于 CD8<sup>+</sup> T 细胞,两者的比值保持在比较稳定的平衡状态。李峰等<sup>[20]</sup>认为,正常小白鼠的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的值是 1.6,机体在受到外界各种因素刺激时,外周血 T 淋巴细胞亚群发生变化,从而使机体正常的免疫功能改

变<sup>[21]</sup>。本试验结果显示,半枝莲多糖各剂量组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值均升高,但均低于正常值。这表明给药后机体免疫机能提高,并趋向稳态发展。

细胞因子是免疫细胞间的信号分子,免疫细胞通过分泌的细胞因子对免疫应答发挥促进或抑制作用。研究表明,IL-2、IFN- $\gamma$  由 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞受诱导合成,同时 IL-2、IFN- $\gamma$  可促进 T 淋巴细胞的增殖和分化<sup>[22-23]</sup>,二者是细胞免疫过程中参与的重要细胞因子。本试验发现,半枝莲多糖各剂量组的 IL-2 和 IFN- $\gamma$  含量均有提高。肿瘤的生长使体内的 IL-2、IFN- $\gamma$  生成量有不同程度的降低,从而干预了免疫调节作用;而半枝莲多糖提高了 IL-2、IFN- $\gamma$  的生成量,从而提高免疫功能。

本试验结果还表明,半枝莲多糖促进 T 淋巴细胞的增殖,增强共刺激分子即活化所需信号分子 CD28 的产生以及提高了辅助性 T 细胞分泌细胞因子的能力,提高机体细胞免疫功能,进而起到抗肿瘤作用。

#### 参考文献:

- [1] 陆平成,许益民. 半枝莲多糖对细胞免疫的调节作用[J]. 南京中医学院学报,1989(2):32-33,39.
- [2] 孟延发,李志孝,张立. 半枝莲多糖 SPS4 组分的纯化性质及分析[J]. 生物化学杂志,1993,9(2):224.
- [3] 朱辛为,李志馨,冀肇华. 淋巴细胞标记染色-ANAE 法的改进[J]. 解剖学杂志,2003(3):300-301.
- [4] 耿卫朴,徐曼,罗祎. 灵芝多糖和当归多糖促进人外周血 T 淋巴细胞增殖和分泌 IFN- $\gamma$ [J]. 中国药理学通报,2012,27(5):655-658.
- [5] 吴旋,白东清,杨广,等. 灵芝多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响[J]. 华北农学报,2011,26(3):195-198.
- [6] 张红英,王学兵,崔保安,等. 山药多糖对 PRRSV 灭活疫苗免疫猪抗体和 T 细胞亚群的影响[J]. 华北农学报,2010,25(2):236-238.
- [7] 胡涛,周凌云,卜登攀,等. 脂多糖诱导奶牛细胞因子及其他相关物质变化研究进展[J]. 华北农学报,2010,25(B12):144-148.
- [8] 谢好贵,陈美珍,张玉强. 多糖抗肿瘤构效关系及其机制研究进展[J]. 食品科学,2011,31(11):329-333.
- [9] 闫梅霞,杨元超,侯微. 药用菌多糖的抗肿瘤作用研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10799-10801.
- [10] 周晋华. 流式细胞术分析不同分期的恶性肿瘤外周血 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 临床肿瘤学杂志,2009,14(7):619-621.
- [11] Huang Y J, Shivanee, Qiao L. Tumor resistance to CD8<sup>+</sup> T cell-based therapeutic ccination[J]. Immunolther,2007,55:205-217.
- [12] Filaci M, Fravega D, Fenoglio M, *et al.* Non-antigen specific CD8<sup>+</sup> T suppressor lymphocytes[J]. Clin Exp Med 2004,4:86-92.
- [13] Eck S C, Turka L A. Generation of protective immunity against an immunogenic carcinoma requires CD40/CD40L and B7/CD28 interections but not CD4<sup>+</sup> T cell[J]. Cancer Immunol Immunother,1999,48(6):336.
- [14] 杨帆,丁仁瑞. 肿瘤抗原肽及 CTL 杀伤机理的研究进展[J]. 中国肿瘤,1998(5):220-222.
- [15] 福军亮,王福生. CD4<sup>+</sup> 杀伤性 T 细胞在病毒感和肿瘤性疾病中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学,2012,27(1):102-104.
- [16] Antony P A, Piccirillo C A, Akpinarli A, *et al.* CD8<sup>+</sup> T cell immunity against a tumor/self antigen is augmented by CD4<sup>+</sup> T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells[J]. J Immunol,2005,174(5):2591-2601.
- [17] Yang Y F, Tomura M, Iwasaki M, *et al.* IFN- $\gamma$  acts on T-cell receptor-triggered human peripheral leukocytes to up-regulate CCR5 Expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells[J]. Journal of Clinical Immunology,2001,21(6):402-407.
- [18] Dalod M, Sinet M, Deschenmin J C, *et al.* Altered *ex vivo* blance between CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> cell within HIV-specific CD8<sup>+</sup> T cells of HIV-seropositive patients[J]. Eur J Immunol,1999,29(1):28-44.
- [19] 盖晓东,赵丽微,历春. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 调节性 T 细胞与 CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T 细胞在结直肠癌组织中的分布[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(12):1397-1399.
- [20] 李峰,高兴玉,饶邦复. 黄花碱对小白鼠中枢神经系统中毒机理的研究[J]. 畜牧与饲料科学,2005,26(3):25-27.
- [21] 张建军,韩敏,王宇. 小花棘豆生物碱对小白鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 免疫功能的影响[J]. 畜牧与饲料科学,2013,34(4):3-6.
- [22] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 2 版. 上海:上海医科大学出版社,2000:285-295.
- [23] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2001:17.