

黄芪注射液与白细胞介素 2 增强树突细胞 抗肿瘤转移作用的比较研究

董竞成 董晓辉

摘要 目的 观察比较黄芪注射液与白细胞介素(IL)-2 增强树突细胞(DCs)的抗肿瘤转移作用。方法 制备 C57BL/6 小鼠骨髓来源的 DCs,用 Lewis 肺癌特异性多肽 Mut1 预激 DCs,并联合黄芪注射液或 IL-2 治疗转移性肺癌小鼠,通过流式细胞仪分析其脾细胞内 T 淋巴细胞亚群比例的变化,用 Elisa 法检测荷瘤小鼠血清 IL-2、IL-4 含量。结果 肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 与黄芪注射液或 IL-2 联合治疗后,肺癌结节减少,小鼠脾脏中 T 淋巴细胞亚群(CD_4^+ 和 CD_8^+)升高,血清 IL-2/IL-4 比值也明显升高。在观察期间,经 DCs 联用 IL-2 和 DCs 联用黄芪注射液免疫小鼠成瘤率均低于单用 DCs 组。结论 黄芪注射液和 IL-2 均能增强 DCs 的抗肿瘤转移作用,有效地促进荷瘤宿主的免疫应答,具有显著的体内抑制肺癌转移的效果。对正常动物免疫保护作用更加明显。

关键词 黄芪注射液;白细胞介素-2;树突细胞;肺癌;抗肿瘤转移

Comparative Study on Effect of Astragalus Injection and Interleukin-2 in Enhancing Anti-tumor Metastasis Action of Dendrite Cells DONG Jing-cheng, DONG Xiao-hui *Integrated Traditional and Western Medical Institute of Pulmonary and Atopic Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Objective To compare the effect of Astragalus injection (AGI) and interleukin-2 (IL-2) in enhancing anti-tumor metastasis action of dendrite cells (DCs) based vaccine. **Methods** C57BL/6 mice's myelogenic DCs were prepared and pre-sensitized by Mut1, a MHC class I-restricted tumor antigen polypeptide of Lewis lung cancer. Then the DCs were used to treat mice with metastatic lung cancer in combination with AGI or IL-2. Change of proportion of T-lymphocyte cell subsets in splenic cell was analyzed by flow cytometry, and the serum contents of IL-2 and IL-4 of the tumor bearing mice were detected by ELISA. **Results** After being treated with tumor antigen polypeptide sensitized DCs plus AGI or IL-2, the tubercle of lung cancer decreased, proportion of subsets CD_4^+ T and CD_8^+ T in mice's splenic cell increased, and serum IL-2/IL-4 ratio also increased obviously. During the observed period, the tumor developing rate in the immune mice treated with DCs combined treatment, either with IL-2 or with AGI, was lower than that in mice treated with DCs alone. **Conclusion** Both AGI and IL-2 can enhance the anti-tumor metastasis action of DCs, effectively promote the immune response of tumor bearing host, therefore have obviously inhibitory effect on lung cancer metastasis *in vivo*. Their immune protective function in normal animals is even more evident.

Key words Astragalus injection; interleukin-2; dendrite cells; lung cancer; anti-tumor metastasis

树突细胞(dendritic cells, DCs)是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞,运用肿瘤抗原多肽致敏的 DCs 治疗肿瘤是 DCs 研究领域的热门课题^[1,2]。有文献报道^[3,4]应用 Lewis 肺癌特异性多肽 Mut1 致敏的 DCs 治疗转移性 Lewis 肺癌取得了显著疗效,其机理在于有效诱导了荷瘤小鼠产生了肿瘤抗原特异性细胞毒性

T 细胞(CTL)。由于许多肺癌宿主体内的 DCs 数量和功能都明显受抑,不能有效地递呈肿瘤抗原。因此,设法活化 DCs 的抗原递呈功能,保证 DCs 递呈功能的高效性,对肿瘤的免疫治疗有重要意义。大量的研究已经开展,如联用白介素(IL)-2^[4]、IL-7、干细胞因子(Flt3L)、环磷酰胺等或通过基因技术将一些细胞因子的基因转染到 DCs,以此来提高 DC 疫苗的治疗作用,并取得了一定的成效。本研究尝试对黄芪注射液(Astragalus, AG)和 IL-2 对 DC 疫苗的增强作用作一比较。

基金项目:上海市百人计划基金资助(No. 065)

作者单位:复旦大学附属华山医院中西医结合肺和特发性疾病研究室(上海 200040)

通讯作者:董竞成, Tel: 021-62494664; E-mail: jcdong2004@126.

万方数据

材料与方法

1 主要试剂 小鼠 Lewis 肺癌细胞株的 Mut1 抗原 8 肽 (FEQNTAQP), 由西安美联公司合成纯化, 纯度 >95%。重组小鼠 GM-CSF 和重组小鼠 IL-4 购自美国 Peprotech 公司; 注射用人重组 IL-2: 10 万 IU/支, 批号 20030508-6, 长春长生基因药业股份有限公司产品。小鼠细胞因子 IL-2、IL-4 ELISA 试剂盒购自奥地利 Bender MedSystems 公司产品。荧光标记的抗 CD86 抗体、抗 MHC-I 类分子 (H-2K^b) 抗体、抗 MHC-II 类分子 (I-A^b) 抗体试剂盒购自美国 CALTAG 公司; 荧光标记的抗 CD₃⁺、抗 CD₄⁺ 和抗 CD₈⁺ 抗体试剂盒购自美国 CALTAG 公司。黄芪注射液: 每 10ml 含生药黄芪 20g, 杭州正大青春宝药业有限公司生产, 批号 0306012。

2 动物和细胞株 健康 C57BL/6 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 购自中国科学院上海实验动物中心。Lewis 肺癌细胞株: 中国科学院上海细胞所提供。

3 小鼠骨髓来源 DCs 的培养和肿瘤抗原多肽的 Mut1 致敏 获取 C57BL/6 小鼠股骨骨髓细胞 (1×10^6 /ml), 用含 10% FCS、重组小鼠 GM-CSF 25ng/ml 和重组小鼠 IL-4 1 ng/ml 的 RPMI 1640 液培养基在 24 孔板中培养, 培养至第 3 天, 吸弃悬浮细胞, 补足新鲜培养基, 培养至第 7 天, 收集悬浮细胞, 置于另一培养板 (1×10^6 /ml) 继续培养 2~3 天, 收集悬浮细胞即为 DCs。将培养至第 7 天的 DCs 与 GM-CSF、IL-4 与多肽抗原 Mut1 (1 mg/ml) 于 37℃ 共同孵育 24h, 收集细胞, 此细胞即为 DC-Mut1, 并离心洗涤 3 次, 用生理盐水调整至 1×10^6 细胞/ml。

4 自发性肺癌模型的建立 小鼠足垫注射 Lewis 肺癌细胞 5×10^5 /只 ($50 \mu\text{l}$)。当 Lewis 肺癌细胞接种后第 13 天, 荷瘤小鼠足垫部肿瘤直径长至 8~10mm 时, 在 0.67% 戊巴比妥钠 67mg/kg 麻醉下, 以 2% 的碘酒消毒患肢, 于膝关节处进行截肢术。至截肢 20 天后称取小鼠肺重量, 观察、计数肺部表面转移结节数, 以确定转移模型成功与否。

5 Mut1 致敏的 DCs 治疗转移性肺癌 将自发性肺癌小鼠分为 4 组, 每组 15 只。(1)模型组: 截肢后第 2~15 天肩部皮下注射 PBS 100 μl 。(2)DC-Mut1 组: 截肢后第 2 天肩部皮下注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl , 第 8、15 天时再分别注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl 。(3)DC-Mut1 + AG 组: 截肢后第 2~15 天每天腹腔注射 AG 50g/kg, 在截肢后第 2、8、15 天分别肩部皮下注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl 。(4)DC-Mut1 +

IL-2 组: 截肢后第 2~15 天分别每天 2 次腹腔注射 IL-2 (10 000 IU/次), 在截肢后第 2、8、15 天分别肩部皮下注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl 。在截肢后第 20 天时, 各组杀死小鼠 5 只, 观察小鼠的肺重量和肺表面结节数, 并观察各组剩余 10 只小鼠的生存期和存活情况。

6 诱导小鼠抗肿瘤免疫保护实验 取 24 只雌性 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠, 随机分为 4 组, 每组 6 只。(1)模型组: 截肢后第 2~30 天肩部皮下注射 PBS 100 μl 。(2)DC-Mut1 组: 截肢后第 2 天肩部皮下注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl , 以后每隔 7 天再分别注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl , 共 6 次。(3)DC-Mut1 + AG 组: 截肢后第 2~30 天每天腹腔注射 AG 50g/kg, 在截肢后第 2 天起每隔 7 天分别肩部皮下注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl , 共 6 次。(4)DC-Mut1 + IL-2 组: 截肢后第 2~30 天分别每天 2 次腹腔注射 IL-2 (10 000 IU/次) 另在截肢后第 2 天肩部皮下注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl , 以后每隔 7 天再分别注射 DC-Mut1 5×10^5 /100 μl , 共 6 次。第 31 天时小鼠足垫部注射 Lewis 肺癌细胞 5×10^5 /只 ($50 \mu\text{l}$), 观察 3 周瘤体的生长情况。

7 荷瘤小鼠脾细胞表型的分析 上述荷瘤小鼠截肢后, 于免疫治疗的第 10 天取各组小鼠脾脏, 制备单细胞悬液, 去除红细胞后, 用大鼠抗小鼠直接荧光标记的抗 CD₃⁺、CD₄⁺ 和 CD₈⁺ 单克隆抗体标记 30min 后经 FACS 分析各组小鼠脾细胞内 T 淋巴细胞亚群 (CD₃⁺、CD₄⁺ 和 CD₈⁺) 情况。

8 血清 IL-2 和 IL-4 含量的测定 采用 ELISA 方法, 以标准品的浓度为横坐标, 以相应的吸光度值为纵坐标, 先做标准曲线。然后样本吸光值由标准曲线查得相应浓度值 (pg)。

9 统计学方法 采用单因素方差分析和 *q* 检验。

结 果

1 各组小鼠肺重量和肺转移结节数结果 见表 1。模型组小鼠肺重量和肺结节增加, 与正常组比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 3 个治疗组肺重量显著下降, 肺结节减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 DC-Mut1 组比较, DC-Mut1 + AG 组和 DC-Mut1 + IL-2 组的肺重量和肺结节下降更明显 ($P < 0.05$)。这些结果表明, DC 疫苗对肺癌有一定的治疗效果。AG 和 IL-2 对 DC 疫苗治疗肺癌的增强作用同样明显。

表 1 各组小鼠肺重量和肺转移结节数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺重量(mg)	肺转移结节(个)
正常	5	181±22	0
模型	5	1050±32*	49.3±4.1*
DC-Mut1	5	435±43△	8.1±1.4△
DC-Mut1+IL-2	5	279±53△△▲	3.0±0.6△△▲
DC-Mut1+AG	5	284±33△△▲	4.2±0.5△△▲

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与 DC-Mut1 组比较,▲ $P<0.05$

2 治疗后各组小鼠生存时间及存活情况 见图 1。模型组小鼠 35 天时已经全部死亡。与模型组比较,3 个治疗组小鼠的生存期及生存数明显升高($P<0.05$)。与 DC-Mut1 比较,DC-Mut1+IL-2 组和 DC-Mut1+AG 组小鼠的生存期及生存数明显升高($P<0.01$)。与 DC-Mut1+IL-2 组比较,DC-Mut1+AG 组小鼠生存期更长,生存数更高($P<0.05$),到第 52 天时还有 80% 的小鼠存活。

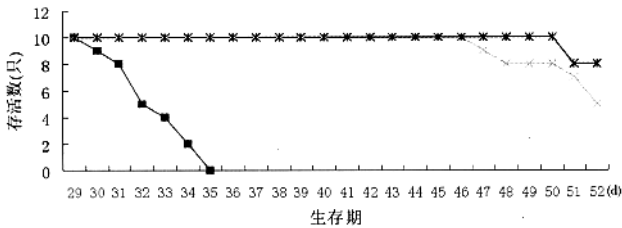


图 1 各组小鼠生存时间及存活情况($n=10$)

注:—■—模型组 —○— DC-Mut1组 —△— DC-Mut1+IL-2组 —◆— DC-Mut1+AG组

3 各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群测定结果 见表 2。与正常组小鼠比较,模型组 CD_3^+ 、 CD_4^+ 和 CD_8^+ 细胞降低($P<0.05$)。与模型组小鼠比较,3 个治疗组 CD_3^+ 、 CD_4^+ 和 CD_8^+ 增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与 DC-Mut1 组比较,DC-Mut1+AG 组与 DC-Mut1+IL-2 组 CD_4^+ 显著增高($P<0.01$)。

表 2 各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群测定结果比较 (% $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+
正常	5	35.8±0.8	22.9±1.0	12.9±1.0
模型	5	21.9±0.7*	11.8±1.9*	10.0±1.3*
DC-Mut1	5	28.4±0.9△	16.3±0.4△	12.1±0.6△
DC-Mut1+IL-2	5	34.4±1.0△	20.5±1.1△△▲	13.5±1.5△
DC-Mut1+AG	5	31.8±1.0△	18.9±1.4△▲	12.7±0.5△

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与 DC-Mut1 组比较,▲ $P<0.01$

4 各组小鼠血清 IL-2 和 IL-4 的测定结果 见表 3。IL-2:与模型组比较,3 个治疗组小鼠均显著升高($P<0.05$);与 DC-Mut1 组比较,DC-Mut1+AG 组和 DC-Mut1+IL-2 组升高更明显($P<0.05$)。IL-4:与模型组比较,DC-Mut1+AG 组和 DC-Mut1+IL-2 组明显下降($P<0.05$)。IL-2/IL-4:与模型组比较,3

个治疗组均显著升高($P<0.05$);与 DC-Mut1 组比较,DC-Mut1+AG 组和 DC-Mut1+IL-2 组升高更明显($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠血清 IL-2 和 IL-4 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-2		IL-4		IL-2/IL-4
		(ng/L)				
模型	5	8.365±0.370		8.276±1.036		1.010±0.047
DC-Mut1	5	10.592±1.795 *		7.085±1.365		1.494±0.085 *
DC-Mut1+IL-2	5	14.187±1.924 *△		6.897±0.737 *		2.056±0.093 *△
DC-Mut1+AG	5	13.463±1.731 *△		6.385±0.393 *		2.108±0.076 *△

注:与模型组比较,* $P<0.05$;与 DC-Mut1 组比较,△ $P<0.05$

5 各组小鼠免疫保护实验结果 在 Lewis 肺癌细胞攻击实验中,模型组小鼠全部成瘤。DC-Mut1 组有 4 只小鼠成瘤。DC-Mut1+AG 组和 DC-Mut1+IL-2 组在观察期内无 1 只小鼠成瘤,与模型组比较差异有显著性($P<0.05$)。

讨 论

在机体抗肿瘤免疫过程中,树突细胞在抗原的识别、加工和处理并递呈给 CD_4^+ 细胞,活化 CTL 的抗肿瘤免疫应答及启动机体特异性抗肿瘤免疫中占有重要地位。通过调节肿瘤抗原的递呈以增强抗肿瘤免疫应答是目前肿瘤免疫治疗的重要策略之一。

AG 增强 DCs 的抗原递呈作用机理可能为(1)AG 本身的抗肿瘤作用;如对体液免疫、细胞免疫功能、Th1/Th2 的免疫反应状态和对自然杀伤细胞(NK)的影响。(2)AG 通过影响 DCs 作用(DCs 的抗原递呈有赖于其体内与 T 淋巴细胞的相互作用)。DCs 将抗原递呈给 CD_4^+ 细胞,由 Th1 细胞释放的细胞因子 IL-2 作用于 CTL 或靶细胞,从而产生 CTL 活化的第二信号;同时 DCs 的成熟分化也受 Th1/Th2 反应状态的影响^[5],而 AG 能有效调整荷瘤小鼠 Th1/Th2 免疫反应状态^[6]。有文献报道^[7],应用 AG 后慢性肾衰患者的外周血中的 DCs 计数增加,提示 AG 可活化 T 细胞对 DCs 的作用,还能增强 DCs 将抗原递呈于 T 细胞的能力,进而又增强 T 细胞转化的能力。

IL-2 增强 DCs 的抗原递呈作用机理在于具有促进 CD_4^+ 细胞增殖和促进 CTL 功能的作用。

本结果表明,AG 联用 DC 疫苗可以延长小鼠的生存期,而 IL-2 联用 DC 疫苗可以升高 CD_4^+ 细胞以及抑制肺癌结节和升高外周血 IL-2 的浓度。需要指出的是,与 IL-2 的增强作用相比,虽然疗效相似,但是 AG 以其确切的疗效、毒副反应小、成本低和多环节的抗肿瘤免疫反应,必将在增强 DC 疫苗治疗肺癌疗效方面起重要的作用。

参 考 文 献

- 1 Paczesny S, Ueno H, Fay J. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol* 2003 ;13(6):439—47.
- 2 Ardavin C, Amigorena S, Reis e Sousa C. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity* 2004 ;20(1):17—23.
- 3 章卫平, 何 龙, 曹雪涛. 淋巴细胞趋化因子基因修饰增强肿瘤多肽致敏的树突状细胞的抗肿瘤免疫效果. *中华医学杂志* 1999 ;79(3):170—176.
Zhang WP, He L, Cao XT. Enhanced therapeutic efficacy of tumor RNA-pulsed dendritic cells after genetic modification with lymphocatactin. *Chin Med J* 1999 ;79(3):170—176.
- 4 Shimizu K, Fields RC, Giedlin M, et al. Systemic administration of interleukin 2 enhances the therapeutic efficacy of den-

- dritic cell-based tumor vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ;96(5):2268—2273.
- 5 Buatois V, Baillet M, Becart S, et al. MHC class II-peptide complexes in dendritic cell lipid microdomains initiate the CD4 Th1 phenotype. *J Immunol* 2003 ;171(11):5812—5819.
- 6 肖 伟, 郑春燕, 孙继萍, 等. 肺癌 Th1/Th2 反应状态及黄芪的调节作用. *山东医科大学学报* 2001 ;39(4):309—313.
Xiao W, Zheng CY, Sun JP, et al. Pattern of TH1/TH2 and regulation of Astragalus in lung cancer. *J Shandong Med Univ* 2001 ;39(4):309—313.
- 7 卢娟娟, 刘骏达, 张 锦, 等. 黄芪对慢性肾功能衰竭血树突状细胞的影响. *中国康复* 2001 ;16(16):204—206.
Lu JJ, Liu JD, Zhang J, et al. Effect of Astragalus on blood dendritic cells in the patients with chronic renal failure. *Chin J Rehabil* 2001 ;16(16):204—206.

(收稿 2004-09-24 修回 2004-12-02)

· 病例报告 ·

黄连解毒汤加减治愈附红细胞体病 2 例

魏 岚¹ 刘学辉¹ 姚崇林²

例 1 陈某,男,6 岁,因疲乏、困倦加重 2 个月,于 2002 年 8 月 5 日就诊。经查:巩膜无黄染,结膜及口唇稍苍白,心尖部 1 级缩鸣音,两肺呼吸音清晰,肝肋下 1.5 cm,边厚质软,脾未扪及。舌红少苔,脉细数。实验室检查:Hb 90 g/L, RBC $3.0 \times 10^{12}/L$, 红细胞比容 0.28 L/L,网织红细胞 20%,WBC 及 TPL 均在正常范围;血总胆红素 38 $\mu\text{mol}/L$,直接胆红素 3 $\mu\text{mol}/L$,空腹血糖 3.3 mmol/L,肝功能在正常范围,胸片未见异常;末梢血片吉姆萨染色,油镜观察受感染的红细胞表面有数量不等的附红细胞体附着。临床诊断为附红细胞体病。中医辨证属感染瘟疫之毒并兼气血亏虚,阴虚内热。治宜泻火解毒,补气养血。方用黄连解毒汤加减:黄连 5g 黄柏 8g 大青叶 10g 金银花 10g 连翘 10g 当归 5g 黄芪 10g,每日 1 剂水煎服,4 剂后诸证减轻,复查附红细胞体减少,继服 10 剂,诸证消除,复查附红细胞体阴性。

例 2 王某,男,8 岁,因乏力、多汗、手足心热、消瘦 0.5 年,于 2003 年 4 月 2 日就诊。经查:T 37.2℃,体重 20 kg,巩膜无黄染,结膜略苍白,心尖部轻度缩鸣音,两肺呼吸音清晰,肝肋下 2 cm,边稍厚,脾触及边缘。舌红少苔,脉细数。实验室检查:Hb 100 g/L, RBC $3.5 \times 10^{12}/L$, 红细胞比容 0.33 L/L,网织红细胞 10%,WBC 及 TPL 均在正常范围;血总胆红素 25 $\mu\text{mol}/L$,直接胆红素 2.8 $\mu\text{mol}/L$;尿、粪常规及肝功能均正常,胸片未见异常;末梢血片吉姆萨染色,油镜观察受感染的红细

胞表面有数量不等的附红细胞体附着。临床诊断为附红细胞体病。中医辨证属感染瘟疫之毒兼气血亏虚,阴虚火旺。治宜清热泻火解毒,兼以补虚。方用黄连解毒汤加减:黄连 8g 黄柏 8g 大青叶 10g 金银花 10g 连翘 10g 当归 5g 黄芪 10g 白芍 10g 甘草 5g。每日 1 剂,水煎服,连服 14 剂,诸证消失,复查附红细胞体阴性。

讨 论 附红细胞体病是由附红细胞体感染人或畜而引起的疾病。临床检验附红细胞体采用吉姆萨、瑞氏单染或复染,油镜观察感染红细胞表面有数量不等的附红细胞体附着。虫体在 1 μm 左右,大多为圆形,或卵圆形、三角形、半月形,虫体在红细胞边缘呈虫噬缺口状。治疗用四环素族、喹诺酮类、庆大霉素等疗效较好,但不宜用于儿童。

本病属瘟疫病范畴,由于疫毒入血日久,损耗气血,而表现乏力、头晕、少眠、盗汗等气血亏虚,阴虚火旺之症。治以清热、泻火解毒为主,兼以补气养血以扶助正气,故以黄连解毒汤加减以祛邪扶正,方中黄连、黄柏泻火解毒;大青叶清血中热毒;金银花、连翘清热解暑消痈散结;当归、黄芪补气养血,全方攻补兼施,即不损伤正气,又祛邪外出。现代药理研究证实,黄连、黄柏、大青叶、金银花、连翘均为广谱抗菌,并对某些寄生虫有抑制作用,黄连还能增强白细胞的吞噬能力,黄芪有增强机体免疫功能及较广泛的抗菌谱,当归能促进血红蛋白及红细胞的生成,上药共用,可抗炎、杀虫,增强机体免疫力,促进红细胞及血红蛋白生成,故取得临床疗效。