

· 基础研究 ·

三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠髓源性抑制细胞的作用

胡 桃¹ 冯正权² 钟良瑞² 梁 波²

摘要 目的 研究三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠髓源性抑制细胞(MDSCs)的作用,探讨三叶青黄酮抗肿瘤机制。**方法** 40 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为 5 组,三叶青黄酮高(100 mg/mL)、中(50 mg/mL)、低剂量组(25 mg/mL)、造模组及正常组,每组 8 只。除正常组外各组小鼠建立肺癌模型,24 h 后各组灌胃给药。14 天后处死小鼠,剥取瘤组织,计算抑瘤率;流式细胞仪检测小鼠脾脏中 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺)、CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的表达;酶联免疫吸附法测定小鼠外周血中一氧化氮合成酶(iNOS)和精氨酸酶 1(Arg-1)表达。**结果** 三叶青黄酮高、中、低剂量组抑瘤率分别为:44.3%、29.2%、15.4%。与正常组比较,造模组 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺)及 Arg-1、iNOS 含量及 CD8⁺T 比例增高($P < 0.01$)、CD4⁺T 比例、CD4⁺T/CD8⁺T 比值降低($P < 0.01$)。与造模组比较,三叶青黄酮各组 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺)含量、CD8⁺T 细胞比例、Arg-1、iNOS 含量降低,CD4⁺T 细胞比例、CD4⁺T/CD8⁺T 比值升高($P < 0.01$)。与三叶青黄酮高剂量组比较,三叶青黄酮中剂量及低剂量组 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺)含量、CD8⁺T 细胞比例、Arg-1 含量升高,CD4⁺T 细胞比例、CD4⁺T/CD8⁺T 比值降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时三叶青黄酮低剂量组 iNOS 含量增高($P < 0.01$)。**结论** 三叶青黄酮可通过改善荷瘤小鼠肿瘤免疫抑制状态发挥抗肿瘤作用,其机制可能与三叶青黄酮可下调 MDSCs 及其相关炎症因子的表达有关。

关键词 三叶青黄酮;髓系来源抑制细胞;免疫抑制

Effect of Flavonoids from *Tetrastigma Hemsleyanum* Diels et Gilg on Myeloid Derived Suppressive cells in Mice Bearing Lewis Lung Cancer HU Tao¹, FENG Zheng-quan², ZHONG Liang-rui², and LIANG Bo² 1 Department of Mental Health Center, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou (310012); 2 Department of Oncology, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou (310012)

ABSTRACT Objective To study the effects of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg on myeloid derived suppressive cells (MDSCs) in mice bearing Lewis lung cancer, and to discuss antitumor activity. **Methods** Totally 40 C57BL/6 female mice were divided into 5 groups randomly, including high-(100 mg/mL), medium-(50 mg/mL) and low-dose (25 mg/mL) groups, model group and normal group, 8 in each group. The mice were established with lung cancer, except the mice in the normal group. Gavage was conducted 24 h later according to the groups. 14 days later, mice were sacrificed to pick off tumor inhibition tissue and calculate tumor rate. Flow cytometry was used to detect the expression of MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺), CD4⁺T and CD8⁺T cells in mice spleen. Enzyme linked immunosorbent assay was used to determine expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and Arginase-1 (Arg-1) in peripheral blood of mice. **Results** The tumor inhibition rate of high-, medium- and low-dose group was 44.3%, 29.2% and 15.4% respectively. Compared with the normal group, the content of MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺), Arg-1 and iNOS and the proportion of CD8⁺T increased in the model group ($P < 0.01$), while the proportion of CD4⁺T and CD4⁺T/CD8⁺T declined ($P < 0.01$). Compared with the model group, the content of MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺), the proportion of CD8⁺T cells and the content of Arg-1 and iNOS declined in the high-,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81541084); 浙江省自然科学基金资助项目(No. LQ15H290006); 浙江省立同德医院院级项目(No. 2D1503)

作者单位: 1. 浙江省立同德医院精神卫生中心(杭州 310012); 2. 浙江省立同德医院肿瘤科(杭州 310012)

通讯作者: 冯正权, Tel: 13858182057, E-mail: fzhq213@aliyun.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180516. 081

medium- and low-dose groups, while the proportion of $CD4^+T$ cells and the ratio of $CD4^+T/CD8^+T$ increased ($P < 0.01$). Compared with high-dose group, the content of MDSCs ($GR-1^+CD11b^+$), the proportion of $CD8^+T$ cells and the content of Arg-1 increased in the medium- and low-dose groups, while the proportion of $CD4^+T$ cells and the ratio of $CD4^+T/CD8^+T$ declined ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the meantime, the content of iNOS increased in the low-dose group ($P < 0.01$). Conclusion The flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg could exert its anti-tumor effect by improving tumor immunology inhibitory state of tumor-bearing mice, the mechanism is likely to be associated with the fact that Flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg can lower the expression of MDSCs and the relative inflammatory factors.

KEYWORDS flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; myeloid derived suppressive cells; immunosuppression

髓源性抑制细胞 (myeloid derived suppressive cells, MDSCs) 是一类髓系来源发育不成熟的免疫抑制细胞群体, 可通过多途径诱导免疫负向调控, 其中 MDSCs 介导的 T 细胞免疫耐受是其主要作用途径之一, 其机制与其表面高表达精氨酸酶 1 (Arginase-1, Arg-1) 和一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 有关^[1,2]。三叶青黄酮是三叶青的药用部位根茎提取而来, 在体外实验中具有直接诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤生长的作用^[3-6], 在体内试验中通过抑制炎症因子的表达发挥抗肿瘤作用^[7]。本实验通过建立荷 Lewis 肺癌小鼠, 流式细胞仪检测其脾脏中 MDSCs、 $CD4^+T$ 和 $CD8^+T$ 细胞的表达, 酶联免疫吸附法测定小鼠外周血中 iNOS 和 Arg-1 表达, 研究三叶青黄酮能否抑制肿瘤免疫逃逸从而达到抗肿瘤生长的作用及其相关机制。

材料与方法

1 动物 40 只 5 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠, 体重 (18 ± 2) g, 由浙江中医药大学实验动物中心代为饲养, 饲养于温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 55% ± 5% 的清洁级动物实验房中。许可证号: SCXY (沪) 2003-0016, 上海西普乐-必凯实验动物有限公司。

2 实验药品 三叶青购买于浙江省中医院, 产地浙江 (批号: 171209), 经浙江中医药大学药学院鉴定为葡萄科崖爬藤属植物三叶青的块根, 符合实验要求。

3 细胞株 小鼠 Lewis 肺癌 (小鼠前肺癌细胞 Lewis lung carcinoma, LLC) 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。冻存于浙江中医药大学动物实验中心。

4 试剂与仪器 小鼠 Ly-6G (Gr-1) 抗体 (批号: E00737-1633), 小鼠 CD11b 抗体 (批号: E01072-1632), 小鼠 CD3e 抗体 (批号: E00058-1632), 小鼠 CD8a 抗体 (批号: E06083-1632), 小鼠 CD4 抗体 (批号: E01008-1638) 购置美国 eBioscience 公司;

小鼠 Arg-1 ELISA 试剂盒 (批号: E20150321L), 小鼠 iNOS ELISA 试剂盒 (批号: E20154029L), RPMI1640 液 (批号: 0804021205) 购置达文生物技术有限公司; FACSCanto II 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; DK-8D 型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; 酶联免疫检测仪, 美国 Bio-Rad 公司。

5 实验灌胃用药制备 根据傅婷婷^[8] 三叶青总黄酮提取和纯化工艺研究提取、纯化三叶青黄酮, 测其浓度为 87.6%。参照张祺菁^[9] 实验将三叶青黄酮粉末溶于蒸馏水, 按所需配置成高、中、低剂量, 溶度分别为: 100、50、25 mg/mL。

6 荷瘤小鼠造模及分组 用完全随机的方法, 将 40 只小鼠分成 5 组, 每组各 8 只小鼠, 分别为用药组三叶青黄酮高、中、低剂量组, 造模组及正常组。除正常组外, 其余各组小鼠进行造模。取对数生长期的小鼠 Lewis 肺癌细胞, 以血细胞计数板进行计数后, 用生理盐水进行稀释, 调整细胞浓度为每毫升 1×10^7 个, 用 75% 酒精消毒小鼠右侧腋窝皮肤, 用 1 mL 注射器吸取 0.2 mL (约 2×10^6 个细胞) 细胞悬液接种于小鼠右侧腋窝皮下^[10]。造模后 24 h, 三叶青黄酮高、中、低剂量三组, 分别予以所需三叶青黄酮溶液制剂 0.2 mL, 每日 1 次, 造模组 0.9% 生理盐水 0.2 mL, 每日 1 次, 连续 14 天, 正常组予以正常饮食。

7 观测指标及方法

7.1 一般情况观察 每日观察小鼠精神状态, 反应程度, 皮毛色泽, 饮食饮水状况, 记录死亡小鼠的数量, 测量记录小鼠体重, 观察肿瘤组织生长状况, 成瘤后, 隔天用游标卡尺测量肿瘤体积 ($V = 1/2 \text{ 长径} \times \text{短径}^2$)。

7.2 肿瘤组织标本处理 灌胃 14 天后颈椎脱臼处死小鼠, 完整剥离瘤组织, 称取瘤重, 计算抑瘤率。抑瘤率 (%) = $(1 - \text{治疗组平均瘤重} / \text{荷瘤生理盐水组平均瘤重}) \times 100\%$ 。

7.3 脾组织标本处理

7.3.1 脾细胞悬液标本制备 将小鼠浸泡在

75%的酒精中 2~3 min,解剖腹部,无菌取出脾组织,将分离获得的脾脏放入 RPMI1640 培养液的培养皿中,减去多余结缔组织及脂肪,用 1 mL 注射器戳入脾脏中反复吹打,分离淋巴细胞,直至脾脏变白,收集细胞液,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,加入红细胞裂解液 2 mL,混匀,4 ℃ 条件下静置 15 min 加入 RPMI1640 液终止裂解,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,收集脾细胞沉淀,加入 RPMI1640 液调整细胞数。

7.3.2 流式细胞仪检测脾组织 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺)、CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例 调整细胞数约为 1×10⁶ 个,取 100 μL 置于流式管中。取 1 mL PBS 液洗涤细胞 2 次。取 100 μL PBS 液重悬细胞,按照细胞表面抗原染色方法标记表面抗原,每管加入 0.5 μL Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) FITC,0.5 μL Anti-Mouse CD11b PE,4 ℃ 避光孵育 30 min,上机检测脾单个核细胞中 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺) 比例。相同方法检测 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例,计算 CD4⁺T/CD8⁺T 比值。

7.4 iNOS、Arg-1 检测 灌胃 14 天后摘除小鼠眼球采血,置于 1.5 mL Ep 管中,室温静置 30~60 min,3 000 r/min 离心 10 min,用移液枪将分离血清置干净的 EP 管,-20 ℃ 低温冰箱保存。采用 ELISA 检测小鼠外周血清中 iNOS、Arg-1 的含量,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

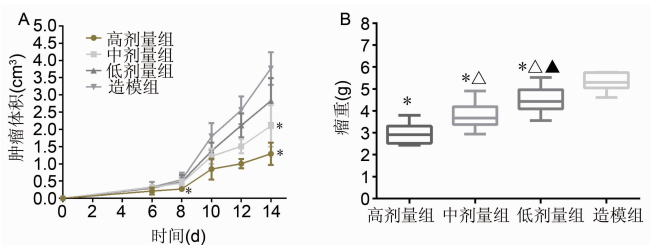
8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件包处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单样本 *K-S* 检验检测频数分布,多组间比较用单因素方差分析,方差齐性时多组间两两比较用最小极差法 (*LSD* 法)和 *SNK* 法,方差不齐时多组间两两比较用 *Dunnett's T3* 法。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况比较 各组小鼠未出现死亡。正常组一般情况良好;其余各组小鼠成瘤前后一般情况变化较明显,成瘤前各组小鼠一般情况较好,反应较灵敏,皮毛光泽,饮食饮水情况较好,各组间无明显差异。成瘤后各组小鼠都出现消瘦,进食减少,反应灵敏度降低,其中以生理盐水组最为明显。

2 各组小鼠肿瘤体积生长变化曲线、瘤重及抑瘤率比较(图 1) 造模 5~7 天后,在其右侧腋窝皮下可肉眼观察并扪及肿瘤小结节,造模组小鼠成瘤率 100%,平均成瘤时间约 7 天。与造模组小鼠瘤体积比较,第 8 天时三叶青黄酮高剂量组明显较减小 (*P* < 0.01),三叶青黄酮中、低剂量组虽也减小,但差异无

统计学意义 (*P* = 0.31, *P* = 0.13)。第 14 天时各组体积均较造模组减小,三叶青黄酮低剂量组与其差异不明显 (*P* = 0.052);其余各组差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。与造模组比较,三叶青黄酮各剂量组瘤重降低 (*P* < 0.01),三叶青黄酮高剂量组瘤重低于中剂量组与低剂量组,且低剂量组也低于中剂量组 (*P* < 0.05, *P* < 0.01)。三叶青黄酮高、中、低剂量组抑瘤率分别为:44.3%、29.2%、15.4%。



注:图 A 为各组小鼠肿瘤体积生长折线图;图 B 为各组小鼠瘤重图;与造模组比较,**P* < 0.01;与三叶青黄酮高剂量组比较,△*P* < 0.01;与三叶青黄酮中剂量组比较,▲*P* < 0.05

图 1 各组小鼠肿瘤体积生长折线图和瘤重图

3 各组小鼠脾组织中 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺) 比例比较(表 1,图 2) 与正常组比较,造

表 1 各组小鼠脾组织中 MDSCs (GR-1 ⁺ CD11b ⁺) 细胞比例比较 (%, $\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	MDSCs (GR-1 ⁺ CD11b ⁺)
正常	8	4.163 ± 0.580
造模	8	20.338 ± 1.452 *
三叶青黄酮高剂量	8	7.825 ± 0.701 △
三叶青黄酮中剂量	8	10.863 ± 1.230 △▲
三叶青黄酮低剂量	8	16.838 ± 1.382 △▲○

注:与正常组比较,**P* < 0.01;与造模组比较,△*P* < 0.01;与三叶青黄酮高剂量组比较,▲*P* < 0.01;与三叶青黄酮中剂量组比较,○*P* < 0.01

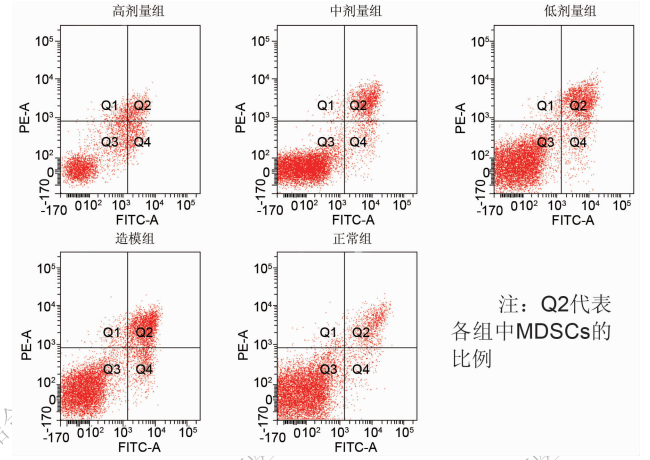


图 2 各组小鼠脾细胞中 MDSCs 的比例 (GR-1⁺CD11b⁺)

模组脾细胞中 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺) 比例升高 ($P < 0.01$); 与造模组比较, 三叶青黄酮各组 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺) 比例均被抑制 ($P < 0.01$); 三叶青黄酮各组间 MDSCs (GR-1⁺CD11b⁺) 比例高剂量组 $<$ 中剂量组 $<$ 低剂量组, 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

4 各组小鼠脾细胞中 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞比例、CD4⁺T/CD8⁺T 比值比较 (表 2, 图 3) 与正常组比较, 造模组脾细胞中 CD8⁺T 细胞比例增高, CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值降低 ($P < 0.01$)。与造模组比较, 三叶青黄酮各组 CD8⁺T 细胞比例降低, CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值升高 ($P < 0.01$)。与三叶青黄酮高剂量组比较, 三叶青黄酮中、低剂量组 CD8⁺T 细胞比例增高, CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且三叶青黄酮低剂量组较中剂量组 CD8⁺T 细胞比例增高, CD4⁺T 细胞比例及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠脾细胞中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 比例及 CD4⁺T/CD8⁺T 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T (%)	CD8 ⁺ T (%)	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
正常	8	70.1 ± 7.5	23.4 ± 3.0	3.0 ± 0.9
造模	8	48.2 ± 5.3 [*]	40.1 ± 3.6 [*]	1.0 ± 0.1 [*]
三叶青黄酮高剂量	8	61.7 ± 1.9 [△]	30.9 ± 1.9 [△]	2.0 ± 0.1 [△]
三叶青黄酮中剂量	8	57.4 ± 1.4 ^{△△△}	33.8 ± 2.4 ^{△△}	1.67 ± 0.1 ^{△△△}
三叶青黄酮低剂量	8	53.4 ± 1.3 ^{△△△○○}	37.0 ± 2.0 ^{△△△○}	1.4 ± 0.1 ^{△△△○○}

注: 与正常组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与造模组比较, [△] $P < 0.01$; 与三叶青黄酮高剂量组比较, ^{△△} $P < 0.05$, ^{△△△} $P < 0.01$; 与三叶青黄酮中剂量组比较, [○] $P < 0.05$, ^{○○} $P < 0.01$

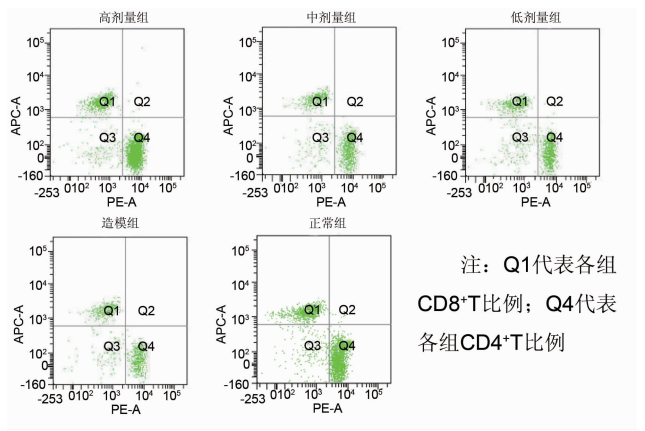


图 3 各组小鼠脾细胞中 CD4⁺T 和 CD8⁺T 比例

5 各组小鼠外周血中 Arg-1、iNOS 含量比较 (图 4) 与正常组比较, 造模组 Arg-1、iNOS 含量增高 ($P < 0.01$)。与造模组比较, 三叶青黄酮组 Arg-1、iNOS 含量均明显减低 ($P < 0.01$)。与三叶青黄酮高剂量组比较, 三叶青黄酮中剂量组及低剂量组, 小鼠外

周血中 Arg-1 含量增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且三叶青黄酮低剂量组 iNOS 含量也增高 ($P < 0.01$)。与三叶青黄酮中剂量组比较, 三叶青黄酮低剂量组 Arg-1 含量增高 ($P < 0.05$)。

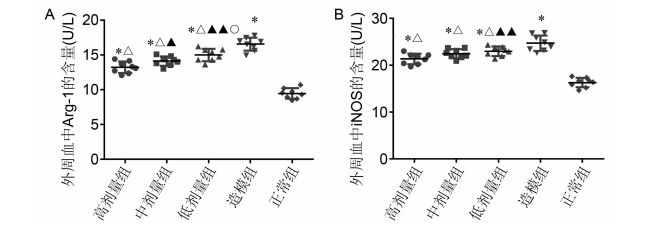


图 4 各组小鼠外周血中 Arg-1、iNOS 含量比较

讨 论

中医学病名中尚未出现肺癌一词, 多按其突出症状, 将其归为其他肺系疾病范畴。中医学认为肺癌病位在肺, 分为正气不足, 邪毒侵犯, 是总体属虚, 局部属实的一种慢性疾病, 主要由于机体正气不足, 气血阴阳失调, 脏腑功能失用, 外淫邪气侵袭, 肺气不足无以抵抗邪气, 肺脏功能得不到发挥, 无以宣发肃降主行水主一身之气, 致气机阻滞, 津液失布, 化而为痰, 痰凝气滞, 脉络瘀阻, 日久而结为肿块^[11]。三叶青是葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤的干燥块根, 可活血化瘀、解毒化痰、清热止痛。现代药理研究发现三叶青有抗炎、抗肿瘤, 调节免疫功能等活性^[12]。研究表明黄酮类是三叶青抗癌主要物质^[13]。实验结果显示三叶青黄酮具有抑制肿瘤细胞生长的作用, 其中三叶青黄酮高剂量组作用最佳, 证实三叶青黄酮具有抗癌作用。

L-精氨酸(L-Arginase, L-Arg)是 Arg-1 和 iNOS 活化所必须的底物, 也是 T 细胞活化所必须的氨基酸, MDSCs 通过高表达 Arg-1 和 iNOS 竞争性消耗 L-Arg, 分别产生代谢产物尿素、L-鸟氨酸和 L-瓜氨酸和一氧化氮 (nitric oxide, NO)^[14,15]。一方面 L-Arg 的缺乏使 T 细胞向胞内传递信号的表面分子 CD3 ζ 的合成下调^[16], 结合 3'-UTR, 稳定 mRNA 的 RNA 结合蛋白 HuR 产生减少^[17], 导致细胞周期素 D3 (cyclin D3) mRNA 容易被降解, 使 T 细胞不能上调 cyclin D3 和细胞周期素依赖蛋白激酶 4, 导致 T 细胞增殖处于 G0-G1 期^[18]。另一方面 L-Arg 降解产物的抑制作用, NO 可干预 JAK/STAT/NF- κ B 信号通路的传导,

下调主要组织相容性复合体 II 的表达水平来抑制 T 细胞活化^[19],肿瘤细胞能通过上调双链 DNA 断裂修复的蛋白激酶 DNA-PKcs,使肿瘤细胞能够避免 NO 的抑制作用^[20]。此外 Arg-1 和 iNOS 活化时,两者结合形成的过亚硝酸盐及产生的其他活性氧族、活性氮族都能通过不同途径发挥免疫抑制作用^[21,22]。

本实验通过检测各组小鼠脾细胞中 MDSCs 含量、CD8⁺T、CD4⁺T 细胞比例及外周血中 Arg-1、iNOS 的含量明确三叶青黄酮抗肿瘤机制。实验结果显示与正常组比较荷瘤小鼠各组脾脏中 MDSCs 表达增加,T 淋巴细胞比例失调,外周血中 Arg-1 和 iNOS 的表达均增加,证实肿瘤的发生与 MDSCs 高表达密切相关,与 T 细胞免疫耐受有关,与外周血中 Arg-1 和 iNOS 的表达增加有关。运用不同溶度三叶青黄酮干预后小鼠脾脏中 MDSCs 和外周血中 Arg-1 和 iNOS 的表达都有不同程度的下降,T 淋巴细胞比例失调有不同程度的改善,证实三叶青黄酮各组均可通过下调免疫抑制细胞 MDSCs、炎症因子 Arg-1 和 iNOS 的表达,调节机体免疫能力发挥抗肿瘤的作用,其中三叶青黄酮高剂量作用最佳。

通过研究发现三叶青黄酮具有抗肿瘤的作用,其通过下调荷瘤鼠脾细胞中 MDSCs 的表达抑制其相关炎症因子 Arg-1 和 iNOS 的分泌,从而改善 MDSCs 对 T 细胞的免疫耐受,发挥抗肿瘤作用。因此笔者推测三叶青黄酮抗肿瘤作用与其下调 MDSCs 及其相关炎症因子的表达改善荷瘤小鼠肿瘤免疫抑制状态有关。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 641-654.
- [2] Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives [J]. Immunol Rev, 2008, 222: 180-191.
- [3] 冯正权,倪克锋,何煜,等. 三叶青黄酮诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的实验研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(6): 669-672.
- [4] 张立明,樊瑞军,杨凤琴. 三叶青黄酮诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2850-2851.
- [5] 钟良瑞,魏克民. 三叶青黄酮对肺癌 A549 细胞生长抑制与 MAPKs 通路关系的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 101-104.
- [6] 倪克锋,丁志山,黄挺. 三叶青黄酮对 H-22 荷瘤小鼠瘤体的抑制作用及其机理研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(6): 732-734.
- [7] 冯正权,林晓阳,郝皖蓉. 三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌鼠免疫抑制相关细胞因子的干预作用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(3): 275-279.
- [8] 傅婷婷. 三叶青总黄酮的提取和纯化工艺研究 [D]. 杭州:浙江大学, 2010.
- [9] 张祺箐. 三叶青黄酮干预荷肺癌鼠脾脏 Treg 细胞和体外相关细胞因子表达的研究 [D]. 杭州:浙江中医药大学, 2014.
- [10] Feng Z, Hao W, Lin W, et al. Antitumor activity of total flavonoids from *Tetragastria hemsleyana* Diels et Gilg is associated with the inhibition of regulatory T cells in mice [J]. Onco Targets Ther, 2014, 7: 947-956.
- [11] 韩克舜,杨亚琴,李文虎. 肺癌中医辨证分型概述 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(16): 120-122.
- [12] Chen LY, Guo SH. Progress in studies of chemical composition and pharmacological effects of *tetragastria hemsleyana* [J]. Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2012, 36(12): 1368-1370.
- [13] 林婧,纪明妹,黄泽豪,等. 三叶青化学成分及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(8): 658-663.
- [14] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 641-654.
- [15] Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, et al. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine [J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21123-21129.
- [16] LaFace D, Talmadge J. Meeting report: regulatory myeloid cells [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(7): 780-782.
- [17] Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression [J]. Blood, 2007, 109(4): 1568-1573.
- [18] Harari O, Liao JK. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants [J]. Curr Pharm Des, 2004, 10(8): 893-898.
- [19] Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology [J]. Immunobiology, 2007, 212(9): 795-812.
- [20] Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells [J]. Immunol Rev, 2008, 222(1): 162-179.
- [21] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 641-654.
- [22] Dolcetti L, Marigo I, Mantelli B, et al. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation [J]. Cancer Lett, 2008, 267(2): 216-225.

(收稿:2017-02-13 在线:2018-07-12)

责任编辑:汤 静