

## • 药效学评价 •

蝎毒多肽提取物对 5-Fu 干预 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠免疫功能的影响

王朝霞, 王兆朋, 贾青, 张月英, 韩琛, 张钰, 王恒孝\*

山东省医学科学院基础医学研究所 病理室, 山东省罕见病重点实验室, 山东 济南 250062

**摘要:** 目的 探讨蝎毒多肽提取物(PESV)对5-Fu干预H<sub>22</sub>荷瘤小鼠免疫功能的影响。方法 Balb/c小鼠随机分为对照组、模型组、化疗组及PESV高、低剂量组,模型组接种H<sub>22</sub>肝癌,化疗组ip 20 mg/kg 5-Fu, PESV组化疗同时ig 40、10 mg/kg PESV,连续干预28 d后处死,计算瘤质量、抑瘤率、脾脏指数和胸腺指数。采用鸡红细胞吞噬实验检测H<sub>22</sub>荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能;流式细胞术检测小鼠脾细胞中T细胞亚群、NK细胞和NKT细胞的变化;采用ELISA法检测小鼠外周血中IFN- $\gamma$ 和IL-4的分泌水平。**结果** 与化疗组比较,PESV高剂量组瘤质量明显减轻( $P < 0.05$ );低、高剂量组的脾脏指数、高剂量组胸腺指数、腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数、高剂量组CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T值及高、低剂量组NK/NKT细胞均显著升高( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。与化疗组比较,PESV高、低剂量组小鼠血清中IFN- $\gamma$ 水平明显增高,IL-4水平显著降低( $P < 0.05$ 、0.01)。**结论** PESV可逆转5-Fu干预H<sub>22</sub>荷瘤小鼠导致的免疫抑制作用。

**关键词:** 蝎毒多肽提取物; 5-Fu; H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠; 免疫功能

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)01-0046-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.01.007

## Effects of polypeptide extract from scorpion venom on immune function of H<sub>22</sub> hepatocarcinoma-bearing mice intervened by 5-Fu

WANG Zhao-xia, WANG Zhao-peng, JIA Qing, HAN Chen, ZHANG Yu, ZHANG Yue-ying, WANG Hong-xiao  
Department of Pathology, Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Institute of Basic Medicine,  
Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

**Abstract: Objective** To study effects of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on immunological function of H<sub>22</sub> hepatocarcinoma-bearing mice intervened by 5-Fu. **Methods** After being inoculated with hepatocarcinoma (H<sub>22</sub>), Balb/c mice were divided into control group, tumor-bearing group, chemotherapy group, high- and low-dose 5-Fu in combination with PESV groups. All of the mice were put to death after consecutive intervention for 28 d, then to calculate tumor weight, tumor inhibition rate, spleen index, and thymus index. Phagocytizing chicken red blood cell test was used to detect abdominal macrophage phagocytosis in H<sub>22</sub> hepatocarcinoma-bearing mice. T cell subsets, changes of NK and NKT cells in spleen cells were detected using flow cytometry. The secretion levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 in peripheral blood were detected by ELISA. **Results** Compared with the chemotherapy group, tumor weights of the 5-Fu in combination with PESV groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and spleen index and thymus index in this group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). At the same time, phagocytic ratio and index of macrophage cell in abdominal cavity in this group were significantly higher than those in the chemotherapy group ( $P < 0.05$ ). Values of CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T cells in the high-dose 5-Fu in combination with PESV group were significantly higher than that in the chemotherapy group ( $P < 0.01$ ). Levels of NK/NKT cells in the high- and low-dose 5-Fu in combination with PESV groups were significantly higher than those of model group ( $P < 0.01$  and 0.05, respectively). Compared with the chemotherapy group, content of serum IFN- $\gamma$  was significantly higher, while content of serum IL-4 decreased significantly in the high- and low-dose 5-Fu in combination with PESV groups ( $P < 0.01$  and 0.05, respectively). **Conclusion** PESV could reverse immunosuppression of H<sub>22</sub> hepatocarcinoma-bearing mice caused by 5-Fu

收稿日期: 2015-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(81303077, 81403150); 山东省中医药科技发展计划项目(2015-323)

作者简介: 王朝霞(1979—), 女, 助理研究员, 主要从事中西医结合抗肿瘤研究。

Tel: 13658644359 (0531)82919939 Fax: (0531)82919930 E-mail: wzxia66@126.com

\*通信作者 王恒孝, 男, 硕士生导师, 从事中西医结合抗肿瘤, 肿瘤免疫等实验研究。Tel: (0531)82919939 E-mail: 2662463723@qq.com

intervention.

**Key words:** scorpion venom; 5-fluorouracil (5-Fu); H<sub>22</sub> hepatoma-bearing mice; immune function

蝎毒多肽提取物 (Polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 是本实验室从东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的蝎毒中分离提取的由 50~60 个氨基酸组成的多肽提取物, 耐热、pH 稳定, 具有多种生物活性。东亚钳蝎 (俗称马氏钳蝎), 药用历史悠久, 其药性味咸、辛、平、有小毒, 具有平肝熄风、攻毒散结、通络止痛等功效。前期研究证实, PESV 有显著的抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>, 对机体 T 细胞等免疫细胞功能具有促进作用<sup>[1, 4-5]</sup>。中医药配合肿瘤化疗, 可增效减毒, 并改善患者低下的免疫功能<sup>[6]</sup>。本研究通过建立肝癌 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠模型, 研究 PESV 对 5-Fu 干预 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠免疫功能的影响, 并探讨其免疫调节作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物和细胞

Balb/c 小鼠 100 只, 雄性, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 实验动物生产许可证号 SCXK (鲁) 20130009, 购自山东大学实验动物中心。H<sub>22</sub> 肝癌腹水瘤株, 由山东省医学科学院药物研究所赠予。

### 1.2 药物与试剂

蝎毒冻干粉 (粗提物, 由山东省医学科学院药物研究所谢砚英研究员鉴定), 购自邹平县蝎蚁生物科技有限公司, 外观呈黄色粉末状, 易溶于水。PESV 由本实验室提取<sup>[7]</sup>, 经 HPLC 分析, 为相对分子质量 6 000~7 000 的多肽混合物粉末, 质量分数 89.1%, 使用前用生理盐水溶解稀释到所需浓度。化疗药物: 注射用 5-Fu, 批号 FA131103, 购自上海旭东海普药业有限公司。

RPMI 1640 培养液, 北京赛默飞世尔生物化学制品有限公司; FITC 标记小鼠 CD 4、Dx 5 抗体、PE 标记小鼠 CD 8 抗体、Pc 5 标记小鼠 CD 3 抗体, 均购自美国 BD 公司; 血清细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-4 ELISA 试剂盒, 美国 Ebioscience 公司。

### 1.3 仪器

leicaDM4000B 显微镜, 德国徕卡仪器有限公司; BD FACS Aria III 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司; Multiskan Ascent 酶标仪, 美国 Thermo 公司。

## 2 方法

### 2.1 H<sub>22</sub> 细胞的复苏与传代

将液氮冻存的小鼠 H<sub>22</sub> 腹水瘤株于 37 °C 水浴

锅中快速解冻, 加入 10 mL RPMI 1640 培养液, 振荡混匀, 2 000 r/min, 离心 5 min, 离心 2 次, 除去冻存液, 10 mL RPMI 1640 培养液重悬, 在无菌环境下传代。第三代用于实验。

### 2.2 荷瘤小鼠模型的制备

无菌抽取传代第 7 天的 H<sub>22</sub> 腹水肿瘤细胞, 加入灭菌生理盐水调整密度为  $4 \times 10^6$ /mL, 于小鼠的右腋下 sc 0.2 mL (第 0 天), 接种 80 只小鼠。

### 2.3 动物分组及给药

第 6 天将成瘤小鼠按成瘤体积随机分为模型组、化疗组及 5-Fu 联合 PESV 高、低剂量 (40、10 mg/kg) 组, 每组 20 只。另取 20 只正常小鼠作为对照组。化疗组: 于第 8、15、22 天 ip 20 mg/kg 5-Fu; 模型组: 于同一时间 ip 等体积的生理盐水; PESV 高、低剂量组: 与化疗组同法 ip 5-Fu, 于第 5、6、7、12、13、14、19、20、21、26、27、28 天 ig PESV; 第 29 天结束实验。每天观察小鼠肿瘤生长情况。于末次给药 24 h 内眼球取血, 37 °C 培养箱放 1 h, 然后 4 °C 冰箱静置 5 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 储存于 -80 °C, 用于 ELISA 检测。

### 2.4 脾细胞的制备

处死小鼠后无菌取脾脏, 用剪刀剔除结缔组织和脂肪并剪碎脾脏, 用注射器针芯轻轻挤压脾组织过 200 目不锈钢网研磨, 制成细胞悬液, 再过 400 目不锈钢网以便形成单个细胞悬液, 离心后低速处理去除红细胞, 再次离心洗涤, 重悬细胞制成脾细胞悬液, 用于流式细胞术检测。

### 2.5 指标检测

**2.5.1 体质量及肿瘤增长** 于化疗前和停药 24 h 后以分析天平各测体质量 1 次。末次给药 24 h 各组小鼠眼球采血后, 以颈椎脱臼法处死, 从腋部皮下完整剥离肿瘤组织, 称瘤质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = (模型组平均瘤质量 - 化疗组或给药组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量

**2.5.2 免疫器官指数的测定** 小鼠处死后快速剥离脾脏和胸腺并称质量, 计算脾脏和胸腺指数。

脏器指数 = 脏器质量 / 终体质量

**2.5.3 腹腔巨噬细胞的吞噬功能** 鸡红细胞悬液的制备 取鸡血置于有机玻璃的锥形瓶中, 朝一个方向充分摇动, 以脱纤维, 用生理盐水洗涤 3 次, 2 000

r/min 离心 10 min, 弃上清, 用生理盐水配成 2% 的鸡红细胞悬液。

吞噬功能的测定 末次给药 24 h 后, 小鼠 ip 2% 鸡红细胞悬液 1 mL, 1 h 后颈椎脱臼处死小鼠, 立即用酒精棉球消毒, 向腹腔注入 2.5 mL 生理盐水, 轻柔腹部 1 min, 剪开腹部皮肤, 用 1 mL 加样器吸出少量腹腔液滴于载玻片上, 置 37 °C 孵育 30 min, 以生理盐水漂洗, 晾干。以丙酮-甲醇 1:1 溶液固定 5 min, 加 Giemsa-Wright's 染色液染色 5 min, 蒸馏水漂洗, 自然晾干。油镜下观察巨噬细胞, 连续选取 10 个视野, 并按以下公式计算吞噬率和吞噬指数。

$$\text{吞噬率} = \frac{\text{吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数}}{\text{巨噬细胞总数}}$$

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬的鸡红细胞数}}{\text{巨噬细胞总数}}$$

**2.5.4 流式细胞术对 T 细胞亚群、NK 细胞和 NKT 细胞的检测** 将制备的脾细胞悬液加入适量的大鼠血清, 4 °C 封闭 30 min 后, 加入抗 CD4-FITC、抗 CD8-PE、抗 Dx5-FITC、抗 CD3-Pc5, 4 °C 避光 30 min; 用 PBS 洗两遍, 重悬细胞, 流式细胞仪检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞比例、CD3<sup>-</sup>Dx5<sup>+</sup>细胞

(NK)、CD3<sup>+</sup>Dx5<sup>+</sup>细胞 (NKT) 的变化。

**2.5.5 ELISA 检测血清中细胞因子 IFN-γ 和 IL-4 的水平** 按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤进行, 待显色终止后即刻用酶标仪检测 450 nm 的吸光度(A) 值。利用酶标软件 cvxpt32 绘制标准曲线, 计算样本中 IFN-γ 和 IL-4 的水平。

**2.6 统计学方法**

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理, 两组间均数比较用 *t* 检验, 多组间均数比较采用单因素方差 LSD 法分析。

**3 结果**

**3.1 对荷瘤小鼠肿瘤生长和免疫器官指数的影响**

与化疗组比较, PESV 高剂量组瘤质量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 化疗组小鼠抑瘤率为 54.30%, 而联合高、低剂量的 PESV 后, 抑瘤率分别增至 66.39%、60.01%。化疗组脾脏指数和胸腺指数较模型组均显著下降 ( $P < 0.01$ ), PESV 低、高剂量组的脾脏指数、高剂量组胸腺指数均显著高于化疗组 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果见表 1。

表 1 PESV 对 H<sub>22</sub> 实体瘤的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Inhibitory effect of PESV on H<sub>22</sub> solid tumor ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

分组	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	平均瘤质量/g	抑瘤率/%	脾脏指数/%	胸腺指数/%
对照	—	—	—	9.37 ± 3.69	3.28 ± 1.34
模型	—	3.49 ± 0.27	—	7.52 ± 2.19 <sup>△</sup>	2.63 ± 1.41 <sup>△</sup>
化疗	20	1.67 ± 0.53 <sup>###</sup>	54.30	5.73 ± 2.48 <sup>##</sup>	1.72 ± 0.70 <sup>##</sup>
PESV	40	1.21 ± 0.25 <sup>***</sup>	66.39	8.67 ± 5.03 <sup>***</sup>	2.71 ± 1.15 <sup>**</sup>
	10	1.54 ± 0.46 <sup>##</sup>	60.01	6.45 ± 2.66 <sup>*</sup>	1.96 ± 0.62

与对照组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与化疗组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$   
<sup>△</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs chemotherapy group

**3.2 对荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能的影响**

与模型组比较, 化疗组小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率和吞噬指数均显著降低 ( $P < 0.01$ )。PESV 高、低剂量组均可显著提高吞噬率和吞噬指数, 与化疗组比较差异显著 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结果见表 2。

**3.3 对 T 细胞亚群、NK 细胞和 NKT 细胞的作用**

与模型组比较, 化疗组小鼠脾细胞中 CD4<sup>+</sup>T/CD8<sup>+</sup>T 值降低 ( $P < 0.05$ )。与化疗组比较, PESV 低剂量组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值略有升高, 差异不显著; PESV 高剂量组 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值明显升高, 差异显著 ( $P < 0.01$ )。结果见图 1。NK 细胞和 NKT 细胞百分比在模型组、化疗组明显低于对照组 ( $P < 0.05$ 、0.01); PESV 高、低剂量组均显著高于化疗组 ( $P < 0.01$ 、0.05)。结果见图 2。

表 2 PESV 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 2 Effect of PESV on phagocytic function of macrophage in H<sub>22</sub> hepatoma-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

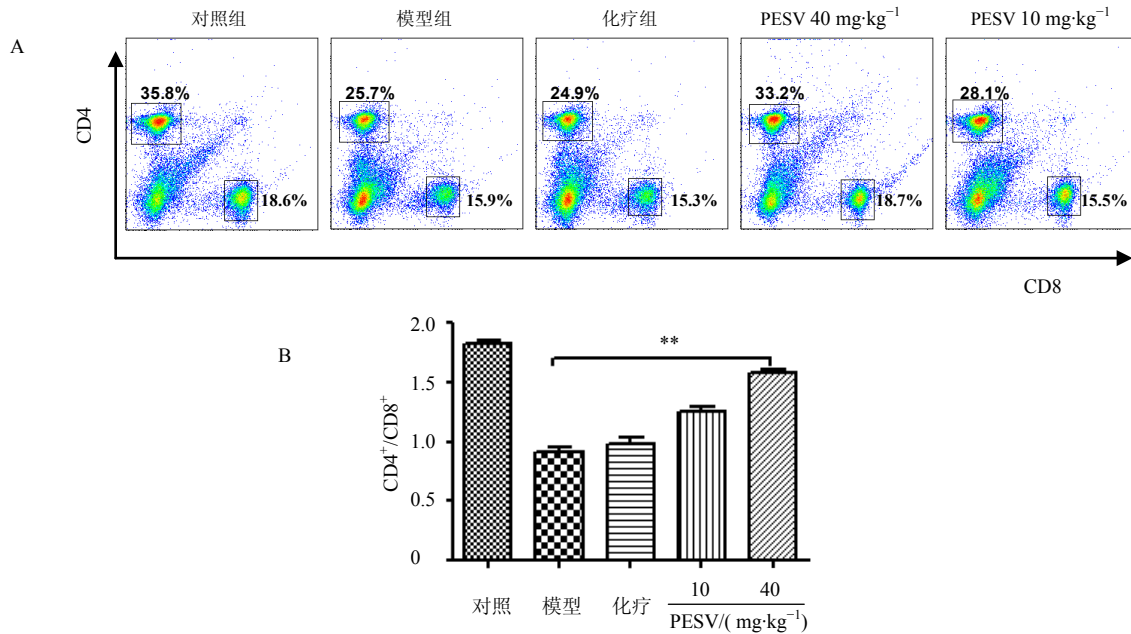
分组	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	吞噬率/%	吞噬指数
对照	—	47.3 ± 4.5	0.82 ± 0.07
模型	—	42.5 ± 5.7 <sup>△</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>△</sup>
化疗	20	26.9 ± 3.4 <sup>##</sup>	0.36 ± 0.08 <sup>##</sup>
PESV	40	41.8 ± 5.1 <sup>**</sup>	0.75 ± 0.19 <sup>***</sup>
	10	30.7 ± 4.2 <sup>*</sup>	0.50 ± 0.14 <sup>*</sup>

与对照组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与化疗组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$   
<sup>△</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs chemotherapy group, same as below

**3.4 对荷瘤小鼠外周血 IFN-γ 和 IL-4 水平的影响**

与对照组比较, 模型小鼠血清中 Th1 型细胞因子 IFN-γ 水平明显降低, Th2 型细胞因子 IL-4 水平

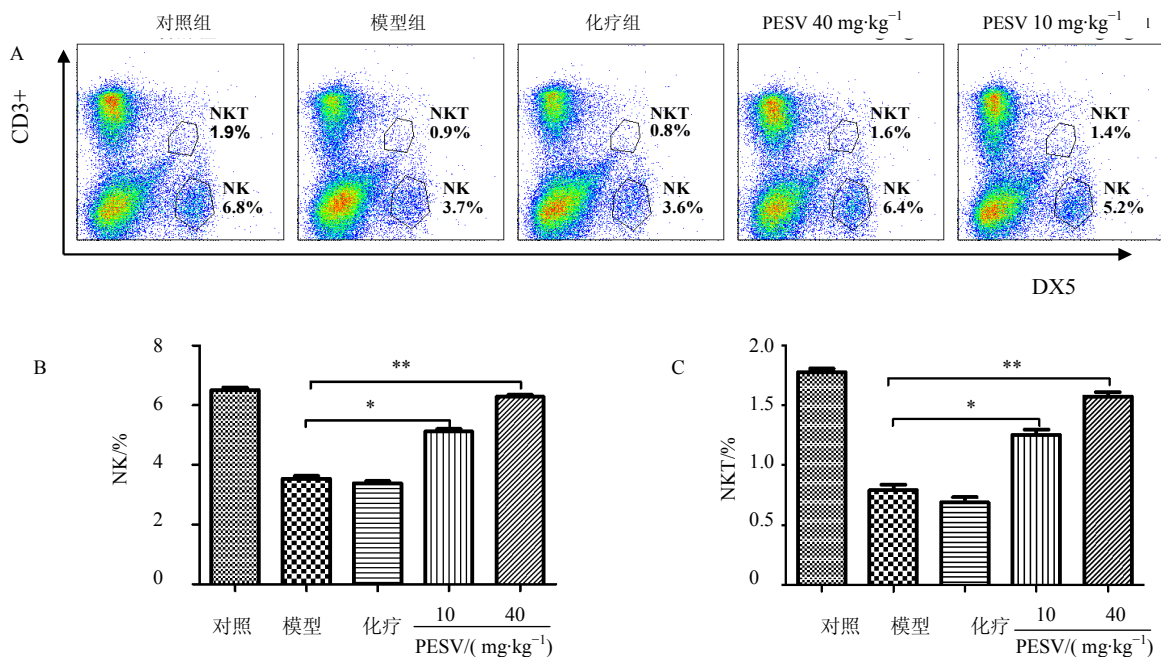
明显增高 ( $P < 0.01$ ); 化疗组与模型组比较, IFN- $\gamma$  水平降低, IL-4 水平明显增高 ( $P < 0.01$ ); 与化疗组比较, PESV 高、低剂量组 IFN- $\gamma$  水平明显增高, IL-4 水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。见表 3。



A-脾脏单个核细胞中 CD4、CD8 流式细胞仪检测结果散点图; B-脾脏单个核细胞中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比较; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$   
A-Scatter detection results of CD4 and CD8 flow cytometry in single nucleus cells of spleen; B. Comparison of CD4<sup>+</sup> T cell and CD8<sup>+</sup> T cell ratio in spleen mononuclear cells; \*\* $P < 0.01$  vs model group

图 1 PESV 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响

Fig. 1 Effect of PESV on T cell subset in H<sub>22</sub> hepatoma-bearing mice



A-脾脏单个核细胞中 NK、NKT 流式细胞仪检测结果散点图; B-脾脏单个核细胞中 NK 细胞百分率的比较; C-脾脏单个核细胞中 NKT 细胞百分率的比较; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

A-Scatter detection results of NK and NKT flow cytometry in single nucleus cells of spleen; B-Comparison of the percentage of NK cells in spleen mononuclear cells; C-Comparison of the percentage of NKT cells in spleen mononuclear cells; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs model group

图 2 PESV 对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠 NK 细胞和 NKT 细胞的影响

Fig. 2 Effect of PESV on NK cell and NKT cell in H<sub>22</sub> hepatoma-bearing mice

表3 PESV对H<sub>22</sub>荷瘤小鼠外周血IFN- $\gamma$ 和IL-4水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 3 Effect of PESV on serum level of IFN- $\gamma$  and IL-4 in H<sub>22</sub> hepatoma-bearing mice ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

分组	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	IFN- $\gamma$ /( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	IL-4/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
对照	—	11.37 $\pm$ 5.94	9.83 $\pm$ 8.05
模型	—	7.53 $\pm$ 6.02 $\Delta\Delta$	15.35 $\pm$ 5.17 $\Delta\Delta$
化疗	20	5.83 $\pm$ 4.65 <sup>#</sup>	17.74 $\pm$ 3.71 <sup>#</sup>
PESV	40	8.32 $\pm$ 4.62 <sup>**</sup>	13.63 $\pm$ 3.81 <sup>**</sup>
	10	6.21 $\pm$ 5.28 <sup>*</sup>	15.98 $\pm$ 4.94 <sup>*</sup>

与对照组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与化疗组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs tumor-bearing group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs chemotherapy group

#### 4 讨论

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 每年新增病例我国约占半数, 已成为肝癌发病最集中的地区之一, 严重威胁人们的生命健康。肝癌起病隐匿, 进展迅速, 大部分患者就诊时已属中晚期, 往往已失去手术治疗的机会。当前治疗原发性肝癌常用药物首推氟尿嘧啶, 其次是阿霉素、顺铂和丝裂霉素, 但这些药物由于产生多药耐药, 毒副作用大, 还常常降低患者免疫功能等缺点而限制临床应用效果<sup>[8]</sup>。

研究表明, 若在肿瘤化疗的同时配合中医中药治疗, 能降低化疗的毒副作用, 增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 提高机体免疫功能。近年来, 研究发现中草药无论在抑制肿瘤细胞还是在肿瘤的病后调理、改善体征、减轻放化疗不良反应等方面均发挥了重要作用<sup>[9]</sup>。临床实践证明一些复方的覆盖面较广, 但是作用较弱; 而一些单味中药定向作用于某些肿瘤, 且抑瘤效果显著<sup>[10]</sup>。

本实验结果显示, 5-Fu 联用低、高剂量的 PESV 后, 荷瘤小鼠的瘤质量显著减小 ( $P < 0.01$ ), 抑瘤率较化疗组明显提高, 表明 PESV 可增强 5-Fu 对荷瘤小鼠的抑瘤作用。5-Fu 化疗后, 荷瘤小鼠的脾脏和胸腺指数均显著下降 ( $P < 0.01$ ), PESV 高、低剂量组小鼠的脾脏和胸腺指数则显著上升, 表明 PESV 可逆转 5-Fu 化疗引起免疫器官的萎缩, 从而减轻免疫器官的损伤, 保护免疫器官。

巨噬细胞在体内扮演清道夫角色, 可以直接吞噬外来抗原, 其吞噬功能可直观反映机体非特异性免疫水平<sup>[11]</sup>。它可以直接与瘤细胞结合发挥杀瘤效应; 也可以分泌某些产物抑制肿瘤生长; 还可以通过 ADCC 作用杀伤肿瘤<sup>[12]</sup>。本研究结果显示, 化疗

组显著降低了巨噬细胞吞噬率和吞噬指数 ( $P < 0.01$ ), 表明 5-Fu 对机体非特异性免疫有抑制作用。PESV 高、低剂量组均可显著提高吞噬率和吞噬指数, 与化疗组比较具有显著性差异 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 说明 PESV 能抑制 5-Fu 对机体非特异性免疫有抑制作用, 促进荷瘤机体非特异性免疫力的提高。

机体的免疫由 T 淋巴细胞介导, T 淋巴细胞在肿瘤免疫中起调控作用, 成熟的 T 淋巴细胞分为 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>两个亚群, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值是肿瘤患者机体免疫状态的指标之一<sup>[13-14]</sup>, Th1/Th2 细胞亚群水平评价机体免疫状态和免疫能力的一个综合指标, IFN- $\gamma$  和 IL-4 分别是 Th1 和 Th2 细胞分泌最特异的细胞因子, 检测血清中 IFN- $\gamma$  和 IL-4 水平对维持 Th1/Th2 平衡起重要作用<sup>[15]</sup>。本研究结果表明 PESV 联合用药能升高荷瘤小鼠脾细胞中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>值, 增加荷瘤小鼠血清中 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$  水平, 同时降低 Th2 型细胞因子 IL-4 水平, 逆转 Th1/Th2 漂移, 能够拮抗 5-Fu 的免疫毒性, 增强荷瘤机体的免疫力。

NK 和 NKT 细胞作为天然免疫细胞, 无需抗原的预先刺激和活化即可发挥细胞毒效应, 在肿瘤免疫、抗病毒感染及清除非己细胞中发挥重要作用<sup>[16]</sup>, 在本实验中, 与化疗组比较, PESV 联合用药组能增加荷瘤小鼠脾细胞中 NK 细胞和 NKT 细胞百分比, 从而提高机体的免疫力。

综上所述, 蝎毒多肽提取物提高了荷瘤小鼠的特异性和非特异性免疫功能, 逆转化疗引起的免疫功能抑制, 这为蝎毒多肽提取物在肿瘤化疗中的应用提供了实验依据。

#### 参考文献

- [1] Wu L, Yun Z, Tagawa T, et al. Tumor cell repopulation between cycles of chemotherapy is inhibited by regulatory T-cell depletion in a murine mesothelioma model [J]. *Thorac Oncol*, 2011, 6(9): 1578-1586.
- [2] 王兆朋, 张维东, 张捷, 等. 蝎毒多肽提取物对非激素依赖性前列腺癌细胞增殖抑制作用的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(8): 938-942.
- [3] 赵嵌嵌, 张维东, 武利存, 等. 蝎毒多肽提取物联合雷帕霉素抑制 H22 肝癌肿瘤血管生成的作用机制研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1343-1347.
- [4] 徐林, 张维东, 王兆朋, 等. 蝎毒多肽提取物对小鼠 Lew is 肺癌免疫逃逸的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(17): 2324-2327.
- [5] 张月英, 张维东, 武利存, 等. 蝎毒多肽提取物对肿瘤

- 微环境中树突状细胞成熟表型的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48(10): 34-38.
- [6] 易清清, 谭莹, 李 晔, 等. “益元抑瘤汤”对 H22 荷瘤小鼠免疫功能影响的实验研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2014, 2(30): 205-208.
- [7] 张 妍, 张维东, 张月英, 等. 蝎毒多肽提取物对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖及血管内皮生长因子和凝血酶敏感蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 515-519.
- [8] 封 萍, 周应军, 韩家凯, 等. 黄荆子乙酸乙酯提取物对人肝癌裸鼠移植瘤生长的影响 [J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2008, 5(4): 13-15.
- [9] 叶 菁, 陈培丰. 中药及其提取物抑制肿瘤血管生成的研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(4): 530-532.
- [10] 范跃祖, 陈春球, 赵泽明, 等. 去甲斑蝥素对胆囊癌肿瘤血管生成的作用及机制研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86(10): 693-699.
- [11] 栗 敏, 马洪宇, 沈继朵, 等. 复方阿胶浆对 H22 肝癌荷瘤小鼠 5-Fu 化疗的增效减毒作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 216-219.
- [12] Katsiari C G, Liossis S C, Sfrikakis P P. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheu*, 2010, 39(6): 491-503.
- [13] 白海亚, 马秀芬. 新辅助化疗对局部进展期乳腺癌患者 T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞免疫功能的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(9): 843-845.
- [14] 宋 利. 宫颈癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞数量与临床分期的相关性分析 [J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(2): 177-179.
- [15] Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, *et al*. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma [J]. *Surgery*, 2002, 131(1): 236-241.
- [16] 李明琦, 白雪峰, 王锡山. 自然杀伤细胞的基础研究和进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2012, 35(2): 90-94.