

牛膝多糖与锌对小鼠树突状细胞增殖分化和抗原提呈能力的影响

孙丽莎,冯 婷,路 静,黄幼田,杨洪艳,董子明,赵明耀*

(郑州大学基础医学院 病理生理学教研室,河南 郑州 450052)

摘要:目的 研究牛膝多糖与锌单用及合用在异源性抗原负载的条件下对小鼠树突状细胞(DC)增殖分化和抗原提呈能力的影响,并通过体内实验证实其对荷瘤小鼠的免疫效应,探讨其发生机制。方法 无菌处死正常小鼠获取其骨髓细胞,粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和白细胞介素-4(IL-4)体外诱导骨髓细胞生成DC,同时培养液中加入不同质量浓度的牛膝多糖(200、300、400 $\mu\text{g/mL}$)、锌(0.02 $\mu\text{g/mL}$)。通过显微镜、流式细胞检测技术观察牛膝多糖、锌单用与合用在异源性抗原负载的条件下对DC的影响,并通过体内实验观察对H₂₂荷瘤小鼠脾指数、胸腺指数及肿瘤质量的影响。结果 牛膝多糖和锌单用在异源性抗原负载的情况下能够促进小鼠骨髓源性DC的分化、成熟及表面标记CD86、CD11a的表达,增强DC诱导的细胞毒性T淋巴细胞反应,能够使荷瘤小鼠免疫器官脾脏和胸腺的质量增加,明显抑制肿瘤的生长,并存在明显量效关系;中剂量为阳性效应,高剂量为阴性效应;但牛膝多糖和锌合用并不协同增强效应。结论 牛膝多糖和锌在异源性抗原负载的条件下能够通过刺激DC的分化成熟,提高其抗原提呈能力,进而起到提高机体细胞免疫的作用。

关键词:牛膝多糖; 锌; 树突状细胞; 抗原负载; 肿瘤

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1319-04

树突状细胞(dendritic cell, DC)作为功能强大的抗原提呈细胞,在肿瘤免疫治疗中发挥重要作用,但是由于部分肿瘤组织产生释放的体液因子抑制DC的增殖分化和功能,并使荷瘤宿主体内存在的DC出现功能缺陷而无法有效地提呈肿瘤抗原,进而无法激活T细胞去识别和杀伤肿瘤细胞。如何提高荷瘤状态机体的DC功能是目前抗肿瘤研究面对的问题。免疫调节作用是多糖类物质最基本的作用^[1]。牛膝多糖^[2](*Achyranthes bidentata* polysaccharides)是从牛膝根中分离的一种小分子水溶性多糖化合物,由D- β -葡萄糖和D- α -甘露糖组成。牛膝多糖能够诱导单核细胞表达TNE- α 和IL-6^[3]。多糖能激活细胞上的TLRs受体,通过MAPKs信号转导通路,激活NF- κ B转录因子,导致一些细胞因子基因的转录^[4]。锌离子是一种非氧化还原态离子,能够调节配体-受体及相互间的反应,加强细胞间信号转导通路的对话,在免疫系统的形成、稳定调节和维持机体正常免疫功能方面有着十分重要的作用^[5]。本实验通过研究牛膝多糖与锌单用或合用在异源性抗原负载的条件下对小鼠DC抗原提呈的影响,并通过体内实验证实其对荷瘤小鼠的免疫效应,探讨其发生机制。

1 材料

1.1 仪器和试剂: BCM-100型超净工作台(苏净

集团安泰公司生产),流式细胞仪为美国BD(Beeton Dickinson)公司产品,重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)购自杭州隆基生物技术有限公司,重组小鼠白细胞介素-2(rmIL-2)、重组小鼠白细胞介素-4(rmIL-4)购自美国Pepro-tech公司,流式单克隆抗体PE鼠抗CD11a和FITC鼠抗CD86购自EBIOSCIENCE公司,荧光染料羧基荧光素二醋酸盐琥珀亚胺脂(CFSE)购自Alexis公司,牛膝多糖(质量分数50%)购自山东泰安医药有限公司,葡萄糖酸锌购自海南制药有限公司(批号20080325)。

1.2 实验动物: 清洁级昆明小鼠,6~8周龄,体重20~24 g,雄性,购自河南省实验动物中心。

1.3 肿瘤细胞株: 小鼠肝H₂₂细胞株由本实验室保存,常规传代培养;人食管癌Ec9706细胞株由本实验室常规传代培养。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 髓源性DC的体外诱导培养: 小鼠处死后,无菌提取小鼠骨髓细胞^[6],用37℃预温的Tris-NH₄Cl红细胞裂解液去除红细胞,再用GKN缓冲液离心洗涤3次,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(含rmGM-CSF 10 ng/mL, rmIL-4 5 ng/mL)调细胞浓度至 $5 \times 10^6/\text{mL}$,以1 mL/孔接

* 收稿日期: 2009-11-27

作者简介: 孙丽莎(1984—),女,河南焦作人,硕士,主要从事肿瘤的病因发病学、免疫及生物治疗研究。

Tel: 13674968895 E-mail: 3928077@163.com

* 通讯作者 赵明耀 Tel: (0371) 66112278 E-mail: zmy66@zhu.edu.cn

种于 24 孔培养板。置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内。48 h 后弃去悬浮细胞, 半量换液, 以后隔日全量换液。于培养第 3 天向培养液中加入不同质量浓度的牛膝多糖 (200、300、400 μg/mL)、锌 (0.02 μg/mL), 合用 (牛膝多糖 300 μg/mL、锌 0.02 μg/mL), 设生理盐水对照组。每日镜下观察细胞形态变化及生长状况, 并通过形态变化观察其成熟情况。

2.1.2 异源性抗原负载冲击 DC: 按上述 2.1.1 方法培养髓源性 DC, 于第 5 天负载人食管癌 Ec9706 制备的冻融抗原。每日镜下观察细胞形态变化及生长状况, 并通过形态变化观察其成熟情况。

2.1.3 DC 表面 CD86 和 CD11a 的检测: 于培养第 8 天收集按上述方法获得的悬浮 DC, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 加入 FITC 标记的 CD86 和 PE 标记的 CD11a 小鼠抗小鼠单克隆抗体 20 μL, 混匀放置 4 ℃ 冰箱孵育 30 min, 再用 PBS 洗 2 次, 加 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 30 min, 通过流式细胞仪检测 DC 表面标记 CD86 和 CD11a 的表达。

2.1.4 DC 诱导的 T 淋巴细胞杀伤活性的检测: 处死小鼠后无菌取其脾脏, 研磨成单细胞, 用 37 ℃ 预温的 Tris-NH₄Cl 红细胞裂解液去除红细胞, 再用 GKN 缓冲液离心洗涤 3 次, 用 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 (含 rml-2 5 ng/mL) 调细胞浓度至 5×10^7 /mL, 培养 6 h 后收集未贴壁的 T 细胞。于培养第 8 天收集按上述方法获得的悬浮 DC, 与小鼠脾 T 淋巴细胞以 1:50 的比例混合培养 3 d, 收集小鼠脾 T 细胞。收集传代培养的 Ec9706 食管癌细胞, 用 CFSE 进行染色, 用上述获得的 T 淋巴细胞为效应细胞, 人食管癌 Ec9706 细胞为靶细胞, 效靶比为 20:1, 混合培养 6 h, 用流式细胞术检测 T 淋巴细胞杀伤活性。

2.2 体内实验

2.2.1 小鼠皮下荷瘤和牛膝多糖、锌干预: 取接种第 8 天生长良好的肝 H₂₂ 细胞, 用灭菌生理盐水按 1:3 比例稀释成瘤细胞悬液, 于每只小鼠前右腋下接种 0.2 mL (含 2×10^6 个瘤细胞), 荷瘤 24 h 后, 各组分别在左下腹 ip 不同质量浓度牛膝多糖 (5、10、20 mg/kg), 锌 0.2 mg/kg, 合用 (牛膝多糖 10 mg/kg, 锌 0.2 mg/kg), 设生理盐水对照组, 每日给药 1 次, 连续 7 d, 末次给药 24 h 后小鼠称体质量后脱颈处死。

2.2.2 脾指数及胸腺指数的测定: 处死荷瘤小鼠后, 无菌取小鼠脾脏及胸腺称质量, 计算脾指数及胸腺指数 (脾指数=脾质量/体质量, 胸腺指数=胸腺

质量/体质量)。

2.2.3 抑瘤率的测定: 处死荷瘤小鼠后解剖小鼠, 完整剥离肿瘤组织称质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率= (对照组瘤体质量-实验组瘤体质量)/对照组瘤体质量×100%

2.3 统计学处理: 采用统计学软件包 SPSS 13.0, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各实验组之间的比较采用单因素方差 (ANOVA) 分析。

3 结果

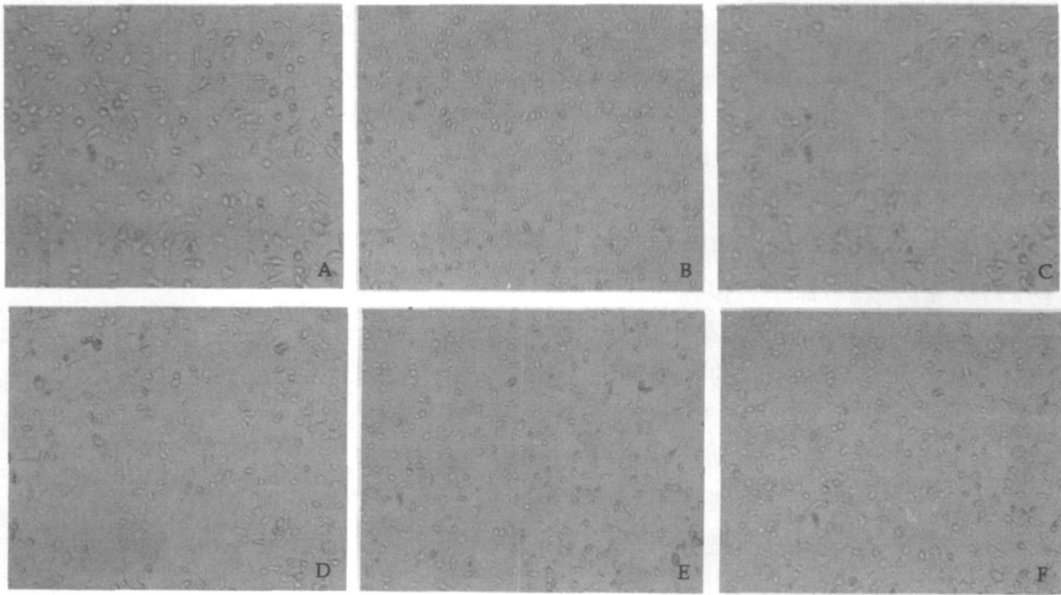
3.1 牛膝多糖、锌对小鼠 DC 形态的影响: 小鼠骨髓来源细胞在含有不同质量浓度牛膝多糖、锌的培养基中生长, 24 h 后见大量细胞贴壁, 48 h 后可见大量均匀散落的细胞集落, 培养至第 5 天, 牛膝多糖中剂量组、锌组、合用组可见大部分细胞有突起伸出, 并有大量的突起交织在一起, 为典型的 DC 形态。牛膝多糖低剂量组、生理盐水对照组仅有少量突起伸出, 牛膝多糖高剂量组细胞数量减少且突起不明显。用冻融抗原冲击后培养至第 8 天, 牛膝多糖中剂量组、锌组、合用组 DC 突起减少, 由贴壁、半悬浮状态变为悬浮状态, 细胞变大变圆, 均匀散布于培养基中, 牛膝多糖低剂量组和生理盐水对照组悬浮的细胞多于牛膝多糖高剂量组, 少于另外 3 组。结果见图 1。

3.2 牛膝多糖、锌对 DC 表面 CD86 和 CD11a 表达的影响: 见表 1。DC 表面 CD86 的表达, 锌单独作用组明显高于其他组 ($P < 0.05$), 牛膝多糖高剂量组明显低于其他组 ($P < 0.05$); CD11a 的表达, 牛膝多糖中剂量组明显高于其他组 ($P < 0.05$), 高剂量组明显低于其他组 ($P < 0.05$)。

3.3 牛膝多糖、锌处理后 DC 诱导的 T 淋巴细胞对 Ec9706 食管癌细胞的杀伤活性: 见表 2。各组的 T 淋巴细胞活性比较显示, 牛膝多糖中剂量组、锌单独及联合用药组明显高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$), 牛膝多糖中剂量组明显高于其他组 ($P < 0.05$), 牛膝多糖高剂量组明显低于其他组 ($P < 0.05$)。

3.4 牛膝多糖、锌对荷瘤小鼠胸腺指数和脾指数的影响: 见表 3。牛膝多糖中剂量组、锌单独作用组及联合应用组的胸腺指数及脾指数都明显高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$)。

3.5 牛膝多糖、锌对荷瘤小鼠的抑瘤作用: 见表 3。牛膝多糖中剂量组的抑瘤率明显高于其他组 ($P < 0.05$), 牛膝多糖高剂量组的抑瘤率明显低于其他组 ($P < 0.05$)。



A-牛膝多糖 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ B-牛膝多糖 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G-牛膝多糖 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
D-对照 E-锌 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ F-A. bidentata polysaccharides 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 锌 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

A-A. bidentata polysaccharides 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ B-A. bidentata polysaccharides 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ G-A. bidentata polysaccharides 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ D-control E-zinc 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ F-A. bidentata polysaccharides 300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ + zinc 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

图 1 牛膝多糖与锌对小鼠 DC 形态的影响

Fig. 1 Effect of A. bidentata polysaccharides and zinc on morphology of DC from mice

表 1 牛膝多糖和锌对 DC 表面 CD86 和 CD11a 表达的
影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 2 DC 诱导的 T 淋巴细胞对 Ec9706 细胞的
杀伤活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of A. bidentata polysaccharides and zinc on
expression of CD86 and CD11a of DC ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Killing activity of T lymphocyte induced
by DC to Ec9706 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	CD86/ %	CD11a/ %
对照	—	9.71 $\pm$ 0.16	10.42 $\pm$ 0.76
牛膝多糖	200	10.93 $\pm$ 0.84	46.36 $\pm$ 0.78*
	300	16.72 $\pm$ 0.35*	67.03 $\pm$ 0.24* #
	400	3.10 $\pm$ 0.66* #	4.92 $\pm$ 0.54* #
锌	0.02	18.22 $\pm$ 0.39* #	53.61 $\pm$ 0.26*
牛膝多糖+ 锌	300+ 0.02	16.14 $\pm$ 0.48*	52.23 $\pm$ 0.32*

组 别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	杀伤活性/ %
对照	—	34.16 $\pm$ 0.13
牛膝多糖	200	37.28 $\pm$ 0.06
	300	58.89 $\pm$ 0.27* #
	400	25.80 $\pm$ 0.62* #
锌	0.02	46.28 $\pm$ 0.24*
牛膝多糖+ 锌	300+ 0.02	44.79 $\pm$ 0.26*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与其他组比较: # $P < 0.05$

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与其他组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs other groups

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs other groups

表 3 牛膝多糖和锌对荷瘤小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of A. bidentata polysaccharides and zinc on tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组 别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	胸腺指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	脾指数/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	瘤体积/ mm^3	瘤质量/ g	抑瘤率/ %
对照	—	2.58 $\pm$ 0.08	11.28 $\pm$ 0.26	2.782 $\pm$ 0.22	1.83 $\pm$ 0.08	—
牛膝多糖	5	3.07 $\pm$ 0.77	10.93 $\pm$ 0.04	2.321 $\pm$ 0.24	1.37 $\pm$ 0.13*	25.39
	10	3.18 $\pm$ 0.17*	13.09 $\pm$ 0.32*	1.241 $\pm$ 0.28* #	0.97 $\pm$ 0.19* #	47.19#
	20	2.83 $\pm$ 0.24	11.84 $\pm$ 0.08	2.685 $\pm$ 0.76	1.57 $\pm$ 0.34*	14.39#
锌	0.2	3.37 $\pm$ 0.15*	12.82 $\pm$ 0.02*	1.723 $\pm$ 0.08*	1.13 $\pm$ 0.58*	38.21
牛膝多糖+ 锌	10+ 0.2	3.21 $\pm$ 0.05*	13.72 $\pm$ 0.23*	2.242 $\pm$ 0.28	1.18 $\pm$ 0.22*	35.68

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与其他组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs other groups

4 讨论

DC 具有强大的抗原提呈能力和诱导初始 T 细胞活化的能力。在增殖分化和功能完善过程中, DC

有前体期、未成熟期和成熟期 3 个分化阶段。负载冻融肿瘤组织抗原刺激可促使 DC 未成熟期进入成熟期, 利用异源性抗原产生的免疫交叉反应, 可以更

明确地观察抗原提呈能力和 CTL 效应^[7]。

本实验结果表明牛膝多糖和锌首先加强了 DC 的增殖分化,使成熟 DC 数量增多,表现为细胞变大变圆,胞浆增多,高表达 CD86 和 CD11a 等共刺激分子;同时也加强了 DC 的抗原提呈能力,诱导初始 T 细胞活化,启动 T 细胞产生免疫应答的能力加强。牛膝多糖有可能是通过激活 TLRs 受体加强未成熟期 DC 对抗原的摄取,而牛膝多糖诱导单核细胞表达 TNF- α 和 IL-6 又能够使未成熟 DC 分化为成熟 DC。在本实验中,牛膝多糖的作用存在着明显的量效关系,中剂量表现为正性作用,高剂量表现为负性作用。出现这种结果,一方面可能是由于高剂量使细胞外液渗透压升高,细胞膜的稳定性降低,细胞内外电子发生转移,影响了细胞信号转导通路;另一方面是过多激活受体可能会引起负反馈现象。牛膝多糖单用的作用大于同锌合用的作用,说明两者之间存在着抑制作用,可能是锌影响了牛膝多糖的调节功能。

牛膝多糖、锌作为重要的生物反应调节剂对机体 DC 的正性作用以及两者同时合用无叠加效应,可为抗肿瘤的研究提供一个新的视角,对今后研究中药抗肿瘤的免疫机制提供参考价值。

致谢:李沛、赵继敏、郑智敏、江亚楠等病理生理学教研室老师在实验中给予的指导和帮助。

参考文献:

- [1] 冯 优,王凤山,张天民,等. 多糖类药物的研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 34(2): 69-71.
- [2] 林肖惠,刘 鹏,徐为人,等. 牛膝不同炮制品中多糖的测定 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1180-1182.
- [3] 宁 勇,姚彩萍,王宇学. 牛膝多糖对外周单核细胞的激活作用 [J]. 华中科技大学学报:医学版, 2005, 34(4): 413.
- [4] Han S B, Yoon Y D, Ahn H J, *et al.* Role of MAPK signaling pathway in the activation of polysaccharide [J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(9): 1301-1312.
- [5] 耿战辉,程义勇,马秀玲,等. 应激对受体通路的影响及锌的保护机制 [J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 19(2): 36.
- [6] 杨洪艳,张义国,董子明,等. 小鼠骨髓和脾来源的树突状细胞的分离与扩增培养 [J]. 河南医科大学学报, 1999, 34(1): 19-21.
- [7] Hsu F J, Benike C, Fagnoni F, *et al.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells [J]. *Nat Med*, 1996, 2(1): 52-58.

姜黄素防治大鼠高脂性脂肪肝的研究

狄建彬^{1,2}, 顾振纶^{1,2}, 赵笑东³, 钱培刚^{1,2}, 蒋小岗^{1,2}, 郭次仪^{4*}

(1. 苏州大学医学部 药理学系, 江苏 苏州 215007; 2 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007;

3 苏州市中医医院, 江苏 苏州 215003; 4 香港保健协会, 香港)

摘要:目的 研究姜黄素对大鼠实验性高脂性脂肪肝的防治作用。方法 采用高脂乳剂制备大鼠高脂性脂肪肝模型,同时分别采用不同剂量的姜黄素 (40、80、160 mg/kg) 以及力平之 (20 mg/kg) 进行干预。实验 4 周后,计算肝脏系数,检测实验动物血清中总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白-胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇 (LDL-C)、游离脂肪酸 (FFA)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙氨酸转氨酶 (AST)、天冬氨酸转氨酶 (ALT) 的量,肝脏组织中 TC、TG、FFA、MDA、SOD 的变化,同时制备大鼠肝脏组织切片在光镜下观察其病理学变化。结果 姜黄素 (40、80 mg/kg) 给药 4 周后,与模型组相比,肝脏系数非常显著降低 ($P < 0.01$),其血清和肝脏匀浆液的 TC、TG、FFA、MDA、AST、ALT 等水平均有显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),HDL-C、SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。光镜和电镜观察表明,给予姜黄素 (40、80 mg/kg) 4 周后大鼠的肝脂质变性明显减轻 ($P < 0.01$)。结论 姜黄素对大鼠高脂性脂肪肝具有较好的预防和治疗作用,其机制可能是通过调节血脂、降低脂肪 (TG) 在肝脏中的沉积以及清除氧自由基,抑制脂质过氧化产物的产生有关。

关键词:姜黄素; 高脂性脂肪肝; 脂质过氧化; 血脂

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1322-05

脂肪肝是最常见的弥漫性肝病之一,是多种原因引起的肝脏脂肪代谢紊乱的一种代谢性疾病,主要使肝细胞摄取的脂肪增加而氧化减少所致的肝细

胞内蓄积脂肪过多的病理状态。高脂血症为脂肪肝的重要因素,有 21% ~ 90% 的高脂血症患者合并脂肪肝^[1]。高脂性脂肪肝是一种全球性疾病,累及

* 收稿日期: 2009-11-03

基金项目: 香港保健协会心血管疾病研究资助项目 (HK20040906); 苏州市科技局应用基础研究计划 (YJS0939)

作者简介: 狄建彬 (1983—), 男, 江苏常州人, 硕士研究生, 研究方向: 心血管药理学。

Tel: (0512) 65190599 E-mail: dijianbin83@126.com

* 通讯作者 顾振纶 Tel: (0512) 65190599 E-mail: zhenlungu.2003@163.com