

东阿阿胶对体外培养的癌症放疗病人外周血淋巴细胞的影响

郑筱祥¹, 李小龙¹, 王彦刈¹, 尤金花², 田守生² (1. 浙江大学生物医学工程及仪器科学学院, 浙江 杭州 310027; 2. 山东东阿阿胶股份有限公司, 山东 东阿 252201)

摘要:目的 观察东阿阿胶对体外培养的癌症放疗病人外周血淋巴细胞的影响。方法 SD大鼠东阿阿胶灌胃给药 3d后取血制备含药血清;取放疗病人外周血,经淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞,接种于 96孔培养板,东阿阿胶含药血清按分组剂量加入培养孔中,阳性对照为胸腺肽, 37℃, 5% CO₂培养一定时间后,上流式细胞仪测定增殖率、T淋巴细胞活化抗原的表达、淋巴细胞表型及 Th1/Th2细胞的比例。结果 与对照组相比,不同剂量含东阿阿胶血清均能显著促进丝裂原诱导的淋巴细胞增殖,促进淋巴细胞活化,提高 CD3⁺ (T细胞)、CD3⁺ CD56⁺ CD16⁺ (NK细胞)的比例和 CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺ 比值,增加 Th1,降低 Th2。结论 东阿阿胶能解除或减轻肿瘤和放疗对免疫系统产生的抑制作用,有助于免疫细胞对肿瘤的应答。

关键词: 东阿阿胶;免疫;流式细胞术

中图分类号: R286; R730.55 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)04-0267-04

Effect of donkey-hide gelatin on the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients treated by radio-therapy in vitro

ZHENG Xiao-xiang¹, LI Xiao-long¹, WANG Yan-yi¹, YOU Jin-hua², TIAN Shou-sheng² (1. College of Biomedical Engineering & Instrument Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Shandong Dong-e E-jiao Pharmaceutical Group Co. Ltd, Dong-E County, Shandong 252201, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of donkey-hide gelatin (DHG) on the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients treated by radio-therapy in vitro. **METHODS** SD rats were given DHG orally for three days and then withdrawn the blood to isolate the drug-involved serum (DS). Heparinized peripheral blood was obtained from the cancer patients treated by radio-therapy. The peripheral blood lymphocytes were isolated on lymphocyte separation medium and placed in 96-well culture plate. The DS was placed in each well according to dosage groups (the positive-control group was placed with thymus peptide). The cells in culture plate were cultured at 37℃ in 5% CO₂ air for some time and then used in detecting cellular proliferation, expression of T lymphocyte activation antigen, lymphocyte immunophenotype and the ratio of Th1/Th2 cells. **RESULTS** Compared with the control group, the DS of different doses could improve the lymphocyte proliferation induced by mitogen and lymphocyte activation, increase the proportion of CD3⁺ (T cells) and CD3⁺ CD56⁺ CD16⁺ (NK cells) and the ratio of CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺, raise the ratio of Th1/Th2 cells. **CONCLUSION** DHG can get rid of or relieve the immune system depression induced by tumor and radio-therapy and conduce to immunocyte response to tumor.

KEY WORDS donkey-hide gelatin; immunity; flow cytometry

在肿瘤发生和治疗的过程中,肿瘤细胞本身和放化疗治疗手段都能对机体的免疫系统产生抑制作用,造成免疫功能低下,因此,如何增强肿瘤病人的免疫力,减轻放化疗的不良反应是肿瘤治疗中的关键。本实验通过观察传统补血中药东阿阿胶对体外培养的癌症放疗病人外周血淋巴细胞的影响,探讨了东阿阿胶增强肿瘤免疫的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂:东阿阿胶(山东东阿阿胶股份有限公司,批号:N010624-1);淋巴细胞分离液(上海恒信化学试剂有限公司,批号20010315);刀豆素A(ConA)(Sigma);PBS

(pH 7.2);RPMI 640培养基(GIBCO);新生牛血清(杭州四季青生物技术公司);胸腺肽(浙江省医学科学院制药厂,批号:020329);碘化丙啶(PI)(Sigma);荧光标记小鼠抗人单克隆抗体 anti-IL-2-PE, anti-IFN γ -PE, anti-IL-4-FITC, anti-IL-10-FITC及相关同型 IgG对照(CALTAG);FIX & PERM CELL PERMEABILIZATION KIT(CALTAG);豆蔻酰佛波醇乙酯(Phorbol 12-Myristate 13 Acetate, PMA)(Sigma);二甲基亚砜(DMSO)(江苏鸿声化工厂,批号:20021129);离子霉素(Ionomycin, Sigma);莫能霉素(Monensin, Sigma);荧光标记小鼠抗人单克隆抗体 anti-CD3-PerCP, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD3-FITC, anti-CD56-FITC, anti-CD69-Tc, anti-CD16-PE,

anti-CD25-FITC, anti-HLA-DR-FITC 相关同型 IgG 对照 (CALTAG)。

1.1.2 器材: FACS_{ort}流式细胞仪 (美国 BD), Heraeus 离心机 (德国), Heraeus 细胞培养箱 (德国)。

1.2 东阿阿胶含药血清的制备

取 200g 左右的 SD 大鼠 (浙江省医学科学院实验动物中心提供, 合格证: 医动字第 22-2001001 号), 雌雄兼用, 东阿阿胶 (0.5g/mL) 灌胃 [10g/(kg·d)], 对照组灌同体积生理盐水, 连续 3d, 第 3 天灌胃后 2h 颈动脉取血, 4000 r/min 离心 30min, 取血清, 0.22μm 滤膜过滤, -20℃ 保存备用。

1.3 癌症放疗病人外周血淋巴细胞的体外培养及剂量分组

取放疗病人外周血, 经淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞, 用加血清培养基 (RPMI 640 + 10% 新生牛血清) 洗两遍, 2500 r/min 离心 10min, 加血清培养基重悬, 贴壁法去除贴壁细胞, 调整细胞浓度至 2.5×10^6 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100μL。东阿阿胶含药血清分别按大剂量 (60μL/孔)、小剂量 (30μL/孔)、对照 (对照血清 100μL/孔) 加入上述培养孔中, 体积不足部分用对照血清加足到总体积 200μL/孔; 阳性对照为胸腺肽 (终浓度 20μg/mL)。细胞在 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。

1.4 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞增殖的影响

按步骤 2 处理的细胞每孔再加 ConA (终浓度 2μg/mL), 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 72h, 然后取出细胞, 用 PBS 洗两遍, 加入 PI (终浓度 5μg/mL) 染色 5min 后, 按文献^[11]方法上流式细胞仪测定增殖率。

1.5 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞活化的影响

按步骤 2 处理的细胞每孔再加 ConA (终浓度 2μg/mL), 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 72h, 然后取出细胞, 用 PBS 洗两遍, 加抗体 (CD69, CD25 和 HLA-DR), 室温反应 20min, PBS 洗两遍, 500μL PBS 重悬, 上流式细胞仪测定。

1.6 东阿阿胶对放疗病人外周血 T 淋巴细胞和 NK 细胞的影响

分离出的淋巴细胞加含药血清后, 每孔再加 ConA (终浓度 2μg/mL), 于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 72h。然后取出细胞, 用 PBS 洗两遍, 加抗体 (CD3, CD4, CD8, CD56, CD16), 室温反应 20min, PBS 洗两遍, 500μL PBS 重悬, 上流式细胞仪测定。

1.7 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞 Th1/Th2 细胞的影响

按步骤 2 处理的细胞培养 48h 后, 取出细胞, 用加血清培养基洗一遍并重悬, 取 400μL 悬液, 分成两管, A 管中加入 Monensin 工作液; B 管中加入 PMA 工作液 + Ionomycin 工作液 + Monensin 工作液。37℃, 5% CO₂ 孵育 4h, PBS 洗一遍, 加入适量荧光标记 anti-CD3, CD4 抗体, 孵育 20min, 用 FIX&PERM CELL PERMEABILIZATION KIT 破膜固定, 加入适量荧光标记 anti-IL-2, IFNγ, IL-4, IL-10 抗体, 孵育一段时间, PBS 洗涤一次, 去上清, 适量 PBS 重悬细胞沉淀, 按文献^[2]方法上流式细胞仪检测。

1.8 流式细胞仪分析

所有样品以 FACS_{ort} 流式细胞仪进行分析, 激发光为 488nm。前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 以线性信号收集, 所有荧光强度以对数度量收集。测定时, 各荧光通道均以相应同型 (isotype) IgG 对照染色细胞作为阴性对照以调节流式细胞仪参数。

1.9 结果处理

试验数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计检验用方差分析 (F 检验) 及各实验组与对照组比较的 q (Dunnett 法) 检验。

2 结果

2.1 东阿阿胶对癌症放疗病人外周血淋巴细胞增殖的影响

不同剂量含东阿阿胶血清作用放疗病人外周血淋巴细胞 3d 后, 与对照相比, 均能显著促进丝裂原诱导的细胞增殖 ($P < 0.01$)。阳性对照胸腺肽也具有显著的促进作用 ($P < 0.01$), 结果见表 1。

表 1 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞增殖率 (% , $n = 3, \bar{x} \pm s$) 的影响

Tab 1 The effect of donkey-hide gelatin on the proliferation of cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients treated by radio-therapy (% , $n = 3, \bar{x} \pm s$)

组 别	增殖率
对照组	0 ± 4.42
东阿阿胶小剂量组	22.21 ± 1.58 ^{**}
东阿阿胶大剂量组	42.07 ± 2.45 ^{**}
阳性对照组	60.83 ± 6.49 ^{**}

注: ^{**} $P < 0.01$, 与对照组比较

Note: ^{**} $P < 0.01$, compared with the control group

2.2 东阿阿胶对癌症放疗病人外周血淋巴细胞活化的影响

与对照相比, 不同剂量含东阿阿胶血清作用放疗病人外周血淋巴细胞 3d 后, 均能显著增加 CD69⁺ 的表达率 ($P < 0.01$), 东阿阿胶小剂量组可增加 HLA-DR 的表达 ($P < 0.05$), 东阿阿胶大剂量组对 CD25⁺ ($P < 0.05$) 和 HLA-DR ($P < 0.01$) 的表达率有提高作用。阳性对照胸腺肽对 CD25⁺ ($P < 0.05$), CD69⁺ ($P < 0.01$) 和 HLA-DR ($P < 0.01$) 的表达率都具有促进作用。结果见表 2。

表 2 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞活化 (% , $n = 3, \bar{x} \pm s$) 的影响

Tab 2 The effect of donkey-hide gelatin on the activation of cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients treated by radio-therapy (% , $n = 3, \bar{x} \pm s$)

组 别	CD69	CD25	HLA-DR
对照组	13.47 ± 0.44	26.66 ± 1.20	23.94 ± 1.65
东阿阿胶小剂量组	20.94 ± 1.41 [*]	25.82 ± 1.62	27.18 ± 0.85 [*]
东阿阿胶大剂量组	27.11 ± 1.00 ^{**}	29.94 ± 1.74 [*]	30.76 ± 2.02 ^{**}
阳性对照组	20.85 ± 0.64 [*]	28.70 ± 0.66 [*]	28.56 ± 0.98 ^{**}

注: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, 与对照组比较

Note: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, compared with the control group

2.3 东阿阿胶对癌症放疗病人外周血 T 淋巴细胞和 NK 细胞

胞的影响

与对照组相比,不同剂量含东阿阿胶血清作用放疗病人外周血淋巴细胞 3 d后,均能显著增加 CD3⁺ (T细胞)的比例 ($P < 0.01$),提高 CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺ (Th细胞 /Ts细胞)的比值 ($P < 0.01$),对 CD3⁺ CD56⁺ CD16⁺ (NK细胞)的比例也有显著的提高 ($P < 0.01$)。阳性对照胸腺肽对上述指标也具有显著的促进作用 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 东阿阿胶对癌症放疗病人外周血 T淋巴细胞和 NK细胞的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 The effect of donkey-hide gelatin on T lymphocytes and NK cells of cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients treated by radio-therapy ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	CD3 ⁺ (T细胞), %	CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺ (Th细胞 /T细胞)	CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (NK细胞), %
对照组	31.50 ± 1.80	0.76 ± 0.01	20.74 ± 2.68
东阿阿胶小剂量组	34.56 ± 1.65*	1.07 ± 0.16**	27.74 ± 1.53**
东阿阿胶大剂量组	39.16 ± 1.27**	1.25 ± 0.16**	28.80 ± 2.08**
阳性对照组	45.56 ± 1.10**	1.33 ± 0.15**	32.84 ± 1.36**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group

2.4 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞 Th1 /Th2细胞的影响

放疗病人外周血淋巴细胞经东阿阿胶作用后, Th1 细胞和 Th2细胞的比例向免疫增强的方向变化,东阿阿胶两个剂量组与对照组相比能显著增加 Th1 细胞的比例 ($P < 0.01$),降低 Th2细胞的比例 ($P < 0.01$)。阳性对照胸腺肽对 Th1 细胞比例也具有显著的促进作用 ($P < 0.01$),对 Th2细胞的比例则显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

表 4 东阿阿胶对放疗病人外周血淋巴细胞 Th1 /Th2细胞 (% , $n = 3, \bar{x} \pm s$)的影响

Tab 4 The effect of donkey-hide gelatin on Th1 /Th2 of cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients treated by radio-therapy (% , $n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	Th1	Th2
对照组	5.80 ± 0.24	2.89 ± 0.55
东阿阿胶小剂量组	16.19 ± 1.62**	0.74 ± 0.11**
东阿阿胶大剂量组	10.10 ± 0.65**	0.50 ± 0.15**
阳性对照组	11.13 ± 1.69**	1.45 ± 0.03**

注: ** $P < 0.01$, 与对照组比较

Note: ** $P < 0.01$, compared with the control group

3 讨论

东阿阿胶具有滋阴润燥、补血止血的作用,是传统的补血中药。现代研究发现东阿阿胶具有促进骨髓造血、改善微循环、提高机体免疫力、调节植物神经功能、抗脂质过氧化和延缓衰老等作用^[3-5]。目前对于阿胶的作用机制,大家有着不同的看法,传统机制认为是因其含有人体必须氨基酸和微量元素的缘故^[3],王志海等^[6]认为阿胶的作用机制是依靠其所含有的同其他一切胚胎样组织相似的微环境物质去改善

造血微环境,郭成浩等^[7]认为阿胶的药效和其特有的“聚负离子基”结构有关,对于这些关于阿胶作用机制的假说还有待于进一步的验证和研究。机体的免疫系统功能状态对于肿瘤的发生发展有着重要意义,在正常的生理状况下,免疫系统可及时发现并清除机体内发生突变或恶化的细胞,因此对肿瘤的发生起到了监视及清除的作用。当机体免疫系统由于某些原因受到抑制后,肿瘤就容易生长^[8]。在肿瘤的生长过程中,肿瘤细胞能分泌许多可溶性的免疫抑制因子,对宿主的免疫系统产生多方面的抑制作用^[9-11],这被认为是肿瘤逃避免疫监视的可能机制之一。放化疗是肿瘤的重要治疗手段,但其所带来的血液系统和免疫系统的毒性反应常常限制了放化疗周期的顺利完成。因此,在本实验中我们以体外培养的癌症放疗病人外周血淋巴细胞为模型,通过增殖率、T淋巴细胞活化抗原的表达、淋巴细胞表型及 Th1 /Th2细胞的比例等方面的指标,考察了东阿阿胶对免疫系统的作用。淋巴细胞的分裂增殖是免疫系统受到免疫刺激后产生的应答反应。CD69是 T细胞早期活化标志物;CD25是 IL-2R(白细胞介素 2受体)的 α 亚基,组成高亲和力 IL-2R的必要成分,在 T细胞活化中起非常重要的作用;HLA-DR是 MHCII类抗原,在 T细胞活化晚期表达,这些活化抗原表达水平的高低,可以反映 T细胞的免疫功能状态。CD3⁺ (T细胞)按表型不同分为 CD4⁺, CD8⁺两大亚群,正常人 CD4⁺ / CD8⁺比值应在 1.7 ~ 2.0 左右,而在肿瘤等病理状况下 CD4⁺ / CD8⁺比值降低甚至倒置;CD4⁺ T细胞又可根据分泌细胞因子的不同分为 Th1, Th2, Th3, Th0细胞, Th1 主要分泌肿瘤坏死因子 (TNF)、 γ 干扰素 (IFN γ)、白细胞介素 2 (IL-2)等, Th2主要分泌白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 10 (IL-10)等, Th1 / Th2之间的失衡与肿瘤的发生发展有密切的关系,增加细胞毒性 T淋巴细胞 (CTL)抗肿瘤活性需要有 Th1 细胞因子 (IFN γ , IL-2)的信号触发,而 Th2 细胞因子 (IL-4、IL-10)却下调该作用^[12-14]。NK 细胞无论在血循环中或组织中均可参与阻抑肿瘤转移和生长。从实验结果中可以看出,东阿阿胶能显著促进丝裂原诱导的淋巴细胞增殖,促进 CD25⁺, CD69⁺和 HLA-DR等 T细胞活化抗原的表达,提高 CD3⁺ (T细胞), CD3⁺ CD56⁺ CD16⁺ (NK 细胞)的比例和 CD3⁺ CD4⁺ / CD3⁺ CD8⁺比值,增加 Th1 细胞的比例,而对 Th2细胞有抑制作用。因此我们认为东阿阿胶不但可以减轻放化疗的不良反应,还具有增强肿瘤免疫的作用,而且与西药升白药相比较而言价格便宜,不会给患者带来沉重的经济负担,值得在临床运用中推广。对于东阿阿胶免疫增强的作用机理,还值得进一步的探索。

参考文献

[1] Wang YY, Zheng XX. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro[J]. J of Immunol Methods, 2002, 268: 179-188.
[2] 祝怀平,戴海明. 流式细胞术检测单个淋巴细胞内细胞因子表达及其临床应用[J]. 临床输血与检验, 2003, 3; 4(1): 3.
[3] 王京娥,杨福安. 阿胶作用机理的研究[J]. 中医药学报,

- 1991; 1: 43.
- [4] 王永实,范治全. 阿胶复脉汤对大鼠内毒素血症血小板血液凝固性与脂质过氧化变化的影响 [J]. 第二军医大学学报, 1993; 14(1): 55.
- [5] 郑筱祥,杨勇,叶剑峰,等. 东阿阿胶的升白作用及机制研究 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2005, 22(2): 102.
- [6] 王志海,何秀敏. 阿胶补血作用机理初探 [J]. 山东中医杂志, 1992, 11(3): 35.
- [7] 郭成浩,金毅. 阿胶药理作用的结构学说 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(1): 54.
- [8] Ryffel B, Mihatsch MJ. Immunosuppression and cancer: the ciclosporin case [J]. Drug Chem Toxicol, 1992; 15(2): 95.
- [9] Luo JS, Kammerer R. Modulations of the effector function and cytokine production of human lymphocytes by secreted factors derived from colorectal carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 1997, 72(1): 142.
- [10] Buggins AG, Milojkovic D. Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-kappaB, c-Myc, and pRb pathways [J]. J Immunol, 2001, 167(10): 6021.
- [11] 杨业金,陈兆聪. 白血病细胞产生的免疫抑制因子对 IL2 作用的影响 [J]. 癌症, 1994, 13(1): 4.
- [12] Kelso A, Troutt AB. Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4 + and CD8 + T cells and clones activated in vivo and vitro [J]. Immunol Rev, 1991, 123: 85.
- [13] Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4 + T cells [J]. Annu Rev Immunol, 1994, 12: 635.
- [14] Rohrer JW, Coggin JM Jr. CD8 T cell clones inhibit antitumor T cell function by secreting IL-10 [J]. J Immunol, 1995, 155(12): 5719.