

# 脾多肽注射液增强胃癌大鼠脾脏免疫杀伤细胞活性的机制

张志斌<sup>1,2</sup>, 秦思达<sup>1</sup>, 张佳<sup>1</sup>, 杜宁<sup>1</sup>, 张靖<sup>1</sup>, 任宏<sup>1\*</sup>(1.西安交通大学第一附属医院胸外科, 西安 710061; 2.榆林市第一医院胸外科, 陕西 榆林 719000)

**摘要:** 目的 探讨脾多肽注射液增加胃癌大鼠脾脏免疫杀伤细胞活性的机制。方法 取 75 只大鼠, 其中 60 只用 *N*-甲基-*N*-硝基-亚硝基胍(MNNG)诱导建立大鼠胃癌模型, 采用随机数表法将其分为模型组和低、中、高剂量组; 剩余 15 只健康大鼠给予正常饮用水为对照组。第 36 周起, 低、中、高剂量组分别尾静脉注射 0.06, 0.18, 0.54 mL·kg<sup>-1</sup>脾多肽注射液, 对照组和模型组尾静脉注射生理盐水, 每日 1 次, 持续 35 d。处死大鼠后观察胃组织病理学变化; 对比各组脾脏指数、脾脏 NK 细胞杀伤活性; 对比各组胃组织及脾脏中 NK 细胞占比及其表面活化受体(NKG2D)的表达、胃组织中 NKG2D 配体组织相容性复合体 I 类相关基因 A(MICA)mRNA 及蛋白相对表达量。结果 模型组胃黏膜固有层有大量炎性细胞浸润, 癌化细胞多, 黏膜腺体排列严重紊乱; 低、中、高剂量组胃黏膜固有层炎性细胞减少, 黏膜腺体排列紊乱, 癌细胞数量减少, 其中中剂量组减少最为显著; 脾脏指数、脾脏 NK 细胞杀伤活性、脾脏及胃组织中 NK 细胞占比及 NKG2D 表达、MICA mRNA 和蛋白相对表达量组间比较, 对照组最高, 中剂量组其次, 低、高剂量组稍低, 模型组最低, 并且除低、高剂量组之间比较差异无统计学意义外, 其他每 2 组间比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 脾多肽注射液可增强胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性, 其中 0.18 mL·kg<sup>-1</sup>的脾多肽注射液增强效果最佳, 可能与促进 NK 细胞增生、上调 NK 细胞活化性受体 NKG2D 及其配体 MICA mRNA 和蛋白表达有关。

**关键词:** 脾多肽注射液; 胃癌; 脾脏; 免疫杀伤细胞活性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)06-0675-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.06.007

引用本文: 张志斌, 秦思达, 张佳, 等. 脾多肽注射液增强胃癌大鼠脾脏免疫杀伤细胞活性的机制[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(6): 675-680.

## Mechanism of Spleen Polypeptide Injection Enhances Activity of Spleen Immune Killer Cells in Gastric Cancer Rats

ZHANG Zhibin<sup>1,2</sup>, QIN Sida<sup>1</sup>, ZHANG Jia<sup>1</sup>, DU Ning<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, REN Hong<sup>1\*</sup>(1.Department of Thoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2.Department of Thoracic Surgery, the First Hospital of Yulin City, Yulin 719000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the mechanism of spleen polypeptide injection enhances the activity of spleen immune killer cells in gastric cancer rats. **METHODS** Seventy-five rats were selected and 60 of them were induced with *N*-methyl-*N*-nitro-nitrosoguanidine(MNNG) to establish rats gastric cancer models, which was divided into model group, low, medium and high dose groups by random number table method. The remaining 15 healthy rats were given normal drinking water as control group. From 36th week, the low, medium and high dose groups were injected intravenously 0.06, 0.18, 0.54 mL·kg<sup>-1</sup> spleen polypeptide injection, and the control and model groups were intravenously injected with normal saline once daily for 35 d. After the rats were sacrificed, the histopathological changes of stomach tissues were observed. The spleen indexes and the killing activities of NK cells in the spleen of the 5 groups were compared. The expressions of NK cell proportion and its surface activating receptor(NKG2D) in the stomach tissues and spleens, the relative expressions of NKG2D ligand histocompatibility complex class I related gene A(MICA) mRNA and protein in stomach tissues of the 5 groups were compared. **RESULTS** The gastric mucosal lamina propria of the model group was infiltrated by a large number of inflammatory cells, and the cancerous cells of the epithelial cells were obvious and the mucosal glands were seriously disordered. In the low, medium and high dose groups, the number of inflammatory cells in the gastric mucosal lamina propria and the cancer cells were reduced, among which the middle dose group had the most significant reduction. The spleen indexes, the killing activities of NK cells in the spleen, NK cell ratio and NKG2D expressions in spleen and stomach tissue, the relative expressions of MICA mRNA and protein in gastric cancer tissue were compared between each 2 groups, and the results showed that the control group were the highest, the medium dose group the second, the low and high dose groups slightly lower, and the model group were the lowest. There were significant differences between each 2 groups( $P<0.05$ ), without differences between the low and high dose groups. **CONCLUSION** Spleen polypeptide injection can enhance the killing activity of NK cells in the spleen of gastric cancer rats. The 0.18 mL·kg<sup>-1</sup>

作者简介: 张志斌, 男, 博士, 副主任医师  
13909237351 E-mail: zzbvan@163.com

Tel: 18829321617

E-mail: gbfu36051272@163.com

\*通信作者: 任宏, 男, 博士

Tel:

spleen polypeptide injection has the best enhancement effect, which may be related to the promotion of NK cell proliferation, up-regulation of NK cell activation receptor NKG2D and the mRNA and protein expressions of its ligand MICA.

**KEYWORDS:** spleen polypeptide injection; gastric cancer; spleen; immune killer cell activity

胃癌是起源于胃黏膜上皮细胞的一种恶性消化道肿瘤,我国胃癌发病率居全球第 5 位,死亡率居全球第 6 位<sup>[1]</sup>,且随着人们生活节奏逐渐加快、饮食结构的改变,胃癌的发病率和死亡率逐年上升。研究证实,肿瘤的发生和发展与机体免疫调控机制关系密切,免疫疗法是除常规手术切除、放化疗外的重要抗肿瘤手段之一<sup>[2]</sup>。自然杀伤性(natural killer, NK)细胞是细胞免疫的主要群体之一,活化的 NK 细胞可识别和杀伤组织相容性复合体 I (MHC I)缺陷或低表达的靶细胞,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。脾多肽注射液是常用的免疫调节药物<sup>[4]</sup>,具有增强免疫力、抗肿瘤、抗病毒等作用,在胃癌、细胞免疫缺陷病等多种疾病的辅助治疗中已有应用,但关于其调控机制的研究仍然较少。鉴于此,本研究通过观察脾多肽注射液对胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的影响,探讨其免疫学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 75 只 SPF 级 SD 大鼠,♂,3 月龄,体质量 150~180 g,来自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0001;该批小鼠的合格证号:0162035。

**1.1.2 药物、主要试剂和仪器** 脾多肽注射液(吉林风生制药有限公司,规格:每支 2 mL;批号:160113002);小鼠白血病细胞株 YAC-1(中科院细胞库供应),甲基-N-硝基-亚硝基胍(MNNG,Fluka 公司);RPMI1640 细胞培养液(Gibco 公司);乳酸脱氢酶释放(LDH)检测试剂盒(Solarbio,批号:160115A);淋巴细胞分离液(Ficoll, Solarbio);异硫氰酸荧光素(FITC)-CD3<sup>+</sup>(eBioscience);NKG2D-藻红蛋白、NK1.1-PE-Cy7、NKG2D-PE(R&D 公司);逆转录试剂盒(Promega,批号:1602189160),兔抗大鼠 MICA 单抗、人抗兔 MICA 单抗(Abcam 公司)。

DSX100 光学显微镜(奥林巴斯工业有限公司);SM2010R 徕卡切片机、Qwin3 图像分析软件(徕卡显微系统贸易公司);Veriti 酶标仪、9700 实时荧光定量 PCR 仪均来自 ABI 公司;CytoFLEX

流式细胞仪(BeckMan Coulter);电泳仪(Bio-rad)。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型构建及分组** 取 60 只 SD 大鼠,饮用水中加入 MNNG,使 MNNG 浓度为 100 μg·mL<sup>-1</sup>(酒精助溶,用前配制并避光放置),持续给予 36 周后换用正常饮用水,建立大鼠胃癌模型,采用随机数表法将其分为模型组和低、中、高剂量组;另取 15 只健康大鼠为对照组,给予正常饮用水。低、中、高剂量组分别尾静脉注射脾多肽注射液 0.06, 0.18, 0.54 mL·kg<sup>-1</sup>(根据大鼠与人等效剂量换算系数计算<sup>[5]</sup>,低、中、高剂量组分别为临床等效剂量的 1/3, 1, 3 倍),对照组和模型组尾静脉注射等体积生理盐水,每天注射 1 次,持续给药 35 d。

**1.2.2 脾指数及胃组织病理学观察** 末次给药 6 h 后处死大鼠,剥离完整脾脏,称重,计算脾脏指数(脾脏质量/体质量)。取胃组织放入 4%中性甲醛固定(确保胃内外充满甲醛固定液),组织修剪后,酒精梯度脱水(50%→70%→80%→95%→100%→100%),然后用石蜡包埋,制作石蜡切片。经二甲苯脱蜡后,酒精梯度水化(100%→95%→85%→70%→50%),采用常规苏木精-伊红染色法(HE)进行染色,并用中性树脂胶封片,显微镜下观察胃组织病理学改变。

**1.2.3 脾脏 NK 细胞杀伤活性检测** 采用 LDH 释放法检测。无菌取大鼠脾脏,剪碎后匀浆制成脾单细胞悬液即为效应细胞,选择 YAC-1 细胞为靶细胞,按效应细胞-靶细胞 10:1 的比例加至 96 孔板中,每孔设置 5 个复孔,设置自然释放孔、全部释放孔。用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A)值, NK 细胞活性(%)=(A<sub>试验孔</sub>-A<sub>自然释放孔</sub>)/(A<sub>全部释放孔</sub>-A<sub>自然释放孔</sub>)×100%。

**1.2.4 流式细胞术检测胃组织、脾脏中 NK 细胞占比及其表面活性受体(NKG2D)的表达** 末次给药后处死大鼠,取胃组织和脾脏组织,分别剪碎后放置于 200 目滤网研磨,收集于 50 mL 离心管中,静置后 800 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,弃去上清用 Percoll 溶液进行分离、加入细胞裂解液重悬, PBS 终止反应,收集得到单核淋巴细胞,加入

CD3-FITC、NKG2D-PE、NK1.1-PE-Cy7 荧光抗体各 15  $\mu\text{L}$ ，避光孵育 30 min 后用 PBS 洗涤(选用鼠 IgG1-PE 为阴性对照抗体)，采用流式细胞术检测胃组织、脾脏中 NK 细胞及 NKG2D 的表达。

**1.2.5 胃组织中 NKG2D 表面配体 MICA mRNA 的相对表达量检测** 取 75 mg 大鼠胃组织，采用 Trizol 一步提取胃组织中总 mRNA。用逆转录试剂盒获得 cDNA，经鉴定后用作聚合酶链反应(PCR)反应模板，然后进行 RT-PCR，设定 30  $\mu\text{L}$  的反应体系：10 $\times$ buffer 3  $\mu\text{L}$ ；1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  1.7  $\mu\text{L}$ ；0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 1.0  $\mu\text{L}$ ；1 U Taq 酶 0.3  $\mu\text{L}$ ；上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ ；cDNA 3  $\mu\text{L}$ ；ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ ，反应条件：95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min；95  $^{\circ}\text{C}$  变性 60 s，59  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s，72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s，重复 35 个循环。以  $\beta$ -actin 作为内参对照物。采用凝胶成像系统 MICA mRNA 相对表达量， $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  为其相对表达强度。MICA：上游引物：5'-ATCGATCGATCGTACG TGCGCAGCA-3'；下游引物：5'-TGCTACGTCATC GCGATCGTACTAC- 3'； $\beta$ -actin：上游引物：5'-GTCGTACGTACGTACGTCGATGCTA-3'；下游引物：5'-ATCGTCGATGCATCGGCGTACTGAT-3'。

**1.2.6 胃组织中 MICA 蛋白相对表达量检测** 取 75 mg 胃组织，液氮中研磨后加入细胞裂解液，置于沸水浴 10 min，离心后取上清液进行蛋白定量。取 45  $\mu\text{g}$  样品加入等体积上样 Buffer，沸水浴 5 min，12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 取上清液，进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离，电转 40 min，加入 5% 脱脂奶粉室温摇床 2 h，加入一抗(1:1 000)，4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜，加入二抗(1:5 000)，常温孵育 1.5 h，暗室中曝光，并应用凝胶成像系统扫描分析，以 MICA 与内参  $\beta$ -actin 灰度值比值表示蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件对数据分析处理，计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示，并用  $t$  检验；多样本比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况

本实验共选取 75 只大鼠，建模 36 周期间，60 只大鼠共死亡 12 只，存活大鼠随机分为模型组和低、中、高剂量组各 12 只；脾多肽注射液或生理盐水干预 35 d 期间，模型组和低、中、高剂量组各死亡 4，2，1，0 只，对照组 15 只大鼠均存

活，共有 56(56/75)只大鼠完成实验研究。

### 2.2 胃组织病理学观察

对照组胃黏膜细胞层次明显、排列整齐；模型组胃黏膜固有层可见大量炎性细胞浸润，癌化细胞多，黏膜腺体排列严重紊乱；低、中、高剂量组胃黏膜固有层炎性细胞减少，黏膜腺体排列紊乱，癌细胞数量减少，其中中剂量组减少最为显著，提示脾多肽注射液可减轻胃癌大鼠胃组织病理变化。结果见图 1。

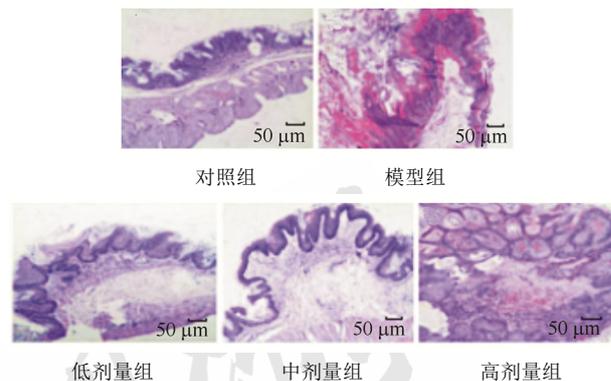


图 1 胃黏膜病理切片 HE 染色图(200 $\times$ )

Fig. 1 HE staining of gastric mucosal pathological sections (200 $\times$ )

### 2.3 脾脏指数、脾脏 NK 细胞杀伤活性对比

脾脏指数、脾脏 NK 细胞杀伤活性组间比较，对照组最高，中剂量组其次，低、高剂量组稍低，模型组最低，除低、高剂量组比较差异无统计学意义外，其他每组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )，提示脾多肽注射液可增强胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性。结果见表 1。

表 1 脾脏指数、脾脏 NK 细胞杀伤活性对比( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Spleen index, spleen NK cell killing activity comparison( $\bar{x} \pm s$ )

组别	$n$	脾脏指数	脾脏 NK 细胞杀伤活性/%
对照组	15	0.36 $\pm$ 0.04	35.44 $\pm$ 3.49
模型组	8	0.24 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	14.02 $\pm$ 1.64 <sup>1)</sup>
低剂量组	10	0.26 $\pm$ 0.03 <sup>1)2)</sup>	25.46 $\pm$ 2.47 <sup>1)2)</sup>
中剂量组	11	0.30 $\pm$ 0.04 <sup>1)2)3)</sup>	31.51 $\pm$ 3.33 <sup>1)2)3)</sup>
高剂量组	12	0.27 $\pm$ 0.03 <sup>1)2)4)</sup>	26.19 $\pm$ 2.70 <sup>1)2)4)</sup>

注：与对照组比，<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ；与模型组比，<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ；与低剂量组比，<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ；与中剂量组比，<sup>4)</sup> $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the low dose group, <sup>3)</sup> $P < 0.05$ ; compared with the middle dose group, <sup>4)</sup> $P < 0.05$ .

### 2.4 胃组织及脾脏中 NK 细胞占比的对比

胃组织及脾脏中 NK 细胞占比组间比较，对照组最高，中剂量组其次，低、高剂量组稍低，模

型组最低, 除低、高剂量组比较差异无统计学意义外, 其他各组间比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 提示脾多肽注射液可以增加 NK 细胞在胃组织和脾脏中的占比。结果见图 2~3。

### 2.5 胃组织及脾脏中 NKG2D 的表达对比

胃组织及脾脏中 NKG2D 的表达组间比较, 对照组最高, 中剂量组其次, 低、高剂量组稍低, 模型组最低, 除低、高剂量组比较差异无统计学意义外, 其他各组间比较差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 提示脾多肽注射液可上调胃组织及脾脏中 NK 细胞活化性受体 NKG2D 的占比。结果见图 4~5。

### 2.6 胃组织中 MICA mRNA 和蛋白相对表达量对比

胃组织中 MICA mRNA 和蛋白相对表达量组间比较, 对照组最高, 中剂量组其次, 低、高剂量组稍低, 模型组最低, 除低、高剂量组比较差异无统计学意义外, 其他各组间比较差异均有统

计学意义 ( $P<0.05$ ), 提示脾多肽注射液可上调 NKG2D 配体 MICA mRNA 和蛋白的表达。结果见表 2、图 6。

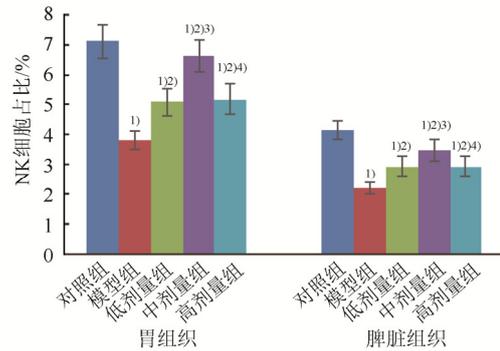


图 2 胃组织及脾脏中 NK 细胞占比对比

与对照组比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与低剂量组比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; 与中剂量组比, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 2 Comparison of NK cell ratio in gastric tissue and spleen Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with the low dose group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; compared with the middle dose group, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

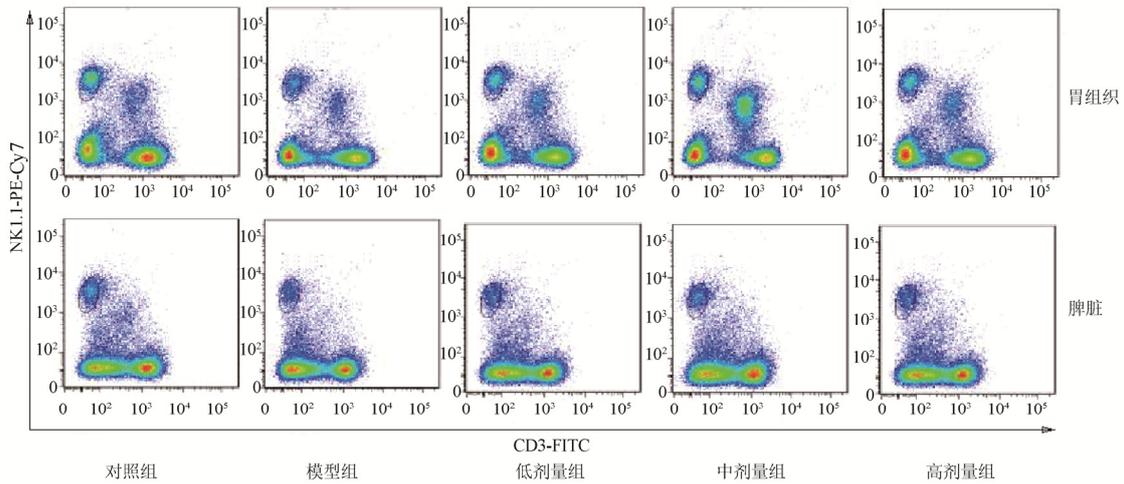


图 3 流式细胞仪检测胃组织及脾脏中 NK 细胞占比

Fig. 3 Flow cytometry to detect the proportion of NK cells in gastric tissue and spleen

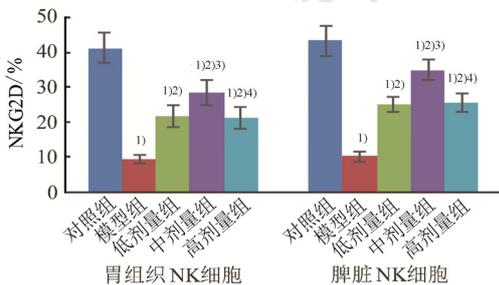


图 4 胃组织及脾脏中 NKG2D 的表达对比

与对照组比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与低剂量组比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; 与中剂量组比, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

Fig. 4 Comparison of NKG2D expression in gastric tissue and spleen

Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with the low dose group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; compared with the middle dose group, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

表 2 胃组织中 MICA mRNA 和蛋白相对表达量对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 Comparison of relative expression of MICA mRNA and protein in gastric tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MICA mRNA	MICA 蛋白
对照组	15	0.78±0.08	0.83±0.10
模型组	8	0.30±0.03 <sup>1)</sup>	0.11±0.02 <sup>1)</sup>
低剂量组	10	0.43±0.05 <sup>1)2)</sup>	0.32±0.04 <sup>1)2)</sup>
中剂量组	11	0.54±0.07 <sup>1)2)3)</sup>	0.57±0.07 <sup>1)2)3)</sup>
高剂量组	12	0.44±0.05 <sup>1)2)4)</sup>	0.33±0.05 <sup>1)2)4)</sup>

注: 与对照组比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与模型组比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与低剂量组比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; 与中剂量组比, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with the control group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with the model group, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with the low dose group, <sup>3)</sup> $P<0.05$ ; compared with the middle dose group, <sup>4)</sup> $P<0.05$ 。

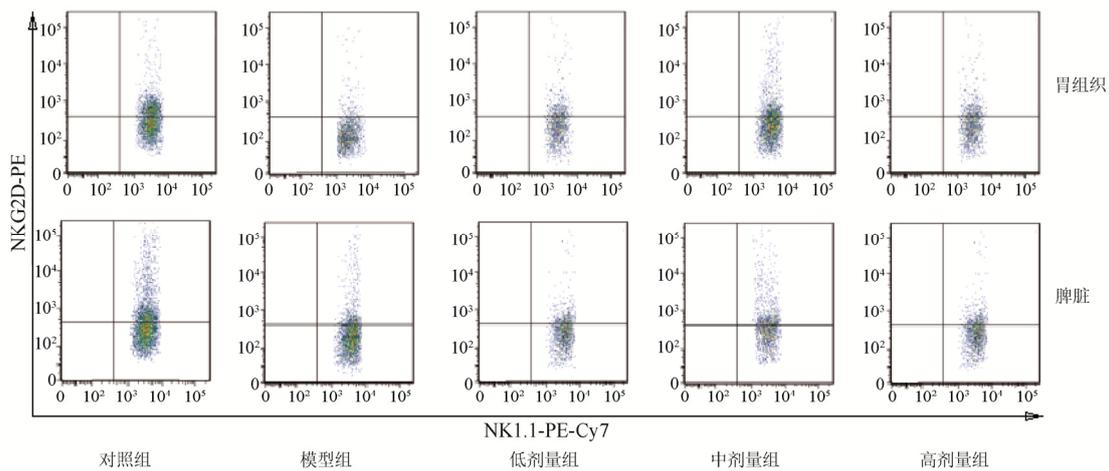


图5 流式细胞仪检测胃组织和脾脏中 NKG2D 表达

Fig. 5 Flow cytometry for detection of NKG2D expression in gastric and spleen

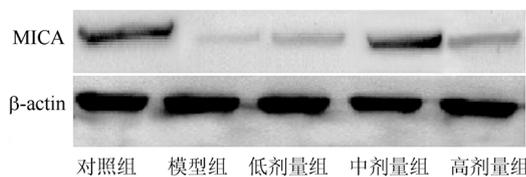


图6 蛋白免疫印迹法检测胃组织中 MICA 蛋白表达

Fig. 6 Western blotting detection of MICA protein expression in gastric tissue

### 3 讨论

胃癌的诱发原因较多, 包括饮食、幽门螺杆菌、长期过量饮酒、遗传等因素<sup>[6]</sup>。胃癌的发病机制复杂, 目前仍未完全阐明, 有研究认为胃癌的发生与胃癌细胞的免疫逃逸有关, 生理状态下, 机体免疫细胞可及时清除癌化细胞, 而当机体免疫力下降时, 癌化细胞不能及时激活免疫应答机制, 肿瘤细胞存活<sup>[7]</sup>。NK 细胞在无预先刺激情况下即可活化, 活化后可激活机体多种信号通路, 进而在抗肿瘤免疫应答过程中发挥重要免疫监视作用, 对胃癌患者的治疗和预后均有重要影响<sup>[8]</sup>。

本研究发现, 高、中、低剂量组胃黏膜下层炎性细胞减少, 癌细胞数量减少, 其中中剂量组减少最为显著; 脾脏指数、脾脏 NK 细胞杀伤活性组间比较, 对照组最高, 中剂量组其次, 低、高剂量组稍低, 模型组最低, 除低、高剂量组之间无统计学差异外, 其他各组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示脾多肽注射液可增强胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性, 其中  $0.18 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  的脾多肽注射液增强效果最佳。脾脏是机体重要外周免疫器官, 而随着肿瘤的进展, 脾脏中免疫杀伤

细胞活性逐渐减弱<sup>[9]</sup>。动物实验证实<sup>[10]</sup>, 荷瘤小鼠脾脏前期受非小细胞肺癌细胞抗原刺激可产生可溶性抑制因子, 且随着肿瘤的进展, 抑制因子数量增多。本实验中, 经 MNNG 诱导的胃癌大鼠脾脏中 NK 细胞被明显抑制, 说明大鼠脾脏内已存在某种抑制因子, 进而降低脾脏内 NK 细胞对炎症因子刺激的反应能力。脾多肽是由小牛脾脏提取物纯化的一类多肽, 相对分子质量  $< 6000$ , 经静脉注射后随血液循环进入脾脏, 通过与细胞膜受体结合, 提高 NK 细胞活性, 进而提高细胞非特异性免疫反应。本研究中中剂量组作用效果最好, 推测可能是该剂量为临床等效剂量一致的原因, 另外, 高剂量的脾多肽注射液可能对大鼠有一定的毒性, 进而可能降低其临床效果。由此, 脾多肽注射液对胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性具有明显促进作用。

胃组织及脾脏中 NK 细胞占比及 NKG2D 的表达、MICA mRNA 和蛋白相对表达量组间比较, 对照组最高, 中剂量组其次, 低、高剂量组稍低, 模型组最低( $P < 0.05$ ), 提示脾多肽注射液增强胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性的调控机制可能与 NK 细胞占比增加、NK 细胞活化性受体 NKG2D 及其配体 MICA mRNA 和蛋白表达上调有关。Wu 等<sup>[11]</sup>从健康小牛脾脏中提取多肽混合物, 作用于肺癌小鼠, 证实脾多肽提取物可缓解癌细胞免疫抑制效应, 通过免疫调节途径治疗肺癌, 提示与肺癌小鼠 NK 细胞增殖有关, 与本研究中应用脾多肽注射液明显提高胃癌大鼠脾脏及胃组织中 NK 细胞占比结果相似。NKG2D 可表达于 NK 细胞表面,

也可表达于其他免疫效应细胞表面,属于激活受体蛋白<sup>[12]</sup>。机体正常细胞表面 MHC I 类分子可正常表达, NK 细胞通过识别 MHC I 类分子后,其杀伤功能抑制,病理状态下,部分细胞表面 MHC I 表达抑制, NKG2D 与靶细胞表面相应配体 MICA 结合,从而激活 NK 细胞杀伤活性<sup>[13]</sup>。研究表明<sup>[14-15]</sup>, MICA 可在胃癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤细胞表面低表达,肿瘤细胞表面 MICA 配体与 NKG2D 结合的有效性较低,有利于肿瘤细胞免疫逃逸。本研究用不同浓度的脾多肽注射液进行干预后,胃癌组织中 MICA mRNA 表达升高, MICA 释放相应增多,与 NKG2D 结合后增强 NK 细胞的免疫杀伤作用,激活免疫应答反应<sup>[16]</sup>。由此,脾多肽注射液可能不仅通过增加 NK 细胞占比,而且上调胃癌组织中 MICA mRNA 表达、与 NKG2D 结合后增强 NK 细胞的免疫杀伤作用而发挥免疫杀伤作用。

综上所述,脾多肽注射液可增强胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性,其中 0.18 mL·kg<sup>-1</sup>的脾多肽注射液增强效果最佳,可能与上调 NK 细胞活化性受体 NKG2D 及其配体 MICA mRNA 表达有关。本研究通过讨论脾多肽注射液增强胃癌大鼠脾脏 NK 细胞杀伤活性及其调控机制,为胃癌临床治疗提供理论基础。

## REFERENCES

[1] ZUO T T, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Epidemiology of stomach cancer in China [J]. *Chin J Clin Oncol*(中国肿瘤临床), 2017, 44(1): 52-58.

[2] SPRANGER S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment [J]. *Int Immunol*, 2016, 28(8): 383-391.

[3] WANG X R, CHEN R M, GONG F S, et al. Experimental study of HSP70-TKD induced NK cells migrated toward tumor cells [J]. *Chin J Immunol*(中国免疫学杂志), 2016, 32(8): 1123-1127.

[4] HAN H, WEI Q, QIU G, et al. Effect and clinical efficacy of lienal polypeptide injection on immune function of cervical

cancer patients with neoadjuvant chemotherapy [J]. *J Hebei Med Univ*(河北医科大学学报), 2016, 37(12): 1424-1427.

- [5] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. *南昌大学学报:医学版*, 1997, 39(4): 41.
- [6] LEE Y C, CHIANG T H, CHOU C K, et al. Association between helicobacter pylori eradication and gastric cancer incidence: a systematic review and meta-analysis [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(5): 1113-1124.
- [7] 崔碧琨, 于益芝. 恶性肿瘤的免疫逃逸机制[J]. *实用肿瘤杂志*, 2016, 31(1): 14-18.
- [8] 王莉新, 吴文斌. NK 细胞的免疫监视作用及肿瘤免疫逃逸[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(3): 418-422.
- [9] LI Y C, ZHAO L N, ZHANG X Y, et al. Changes of cell surface markers CD3, CD4, CD44, CD62L on mouse spleen lymphocytes after culture *in vitro* [J]. *Chin J Immunol*, 2016, 32(11): 1607-1609.
- [10] HUANG Z Y, ZHANG X L. Experimental study of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in non-small cell lung cancer cell apoptosis induced [J]. *Chin J Immunol*(中国免疫学杂志), 2015, 23(21): 3055-3057.
- [11] WU Y P, DENG J, OUYANG S H, et al. Immune regulation effect of lienal polypeptides extract in Lewis lung carcinoma-bearing mice treated with cyclophosphamide [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2018, 243(1): 66-77.
- [12] LABANI-MOTLAGH A, ISRAELSSON P, OTTANDER U, et al. Differential expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors by epithelial ovarian cancer-derived exosomes and its influence on NK cell cytotoxicity [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 5455-5466.
- [13] CHEN W, XU H, ZHU X X, et al. DNT cell inhibits the growth of pancreatic carcinoma via NKG2D and MICA pathway *in vivo* [J]. *Nat Med J China*(中华医学杂志), 2017, 97(16): 154-159.
- [14] WANG L, ZHANG X G. Inhibition of targeting MICA gene on the proliferation of gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *Chin J Health Lab Technol*(中国卫生检验杂志), 2016, 26(6): 850-851.
- [15] ZHOU Z F, LI J Y, LIN W S, et al. MICA expression predicts the efficacy of postoperative chemotherapy combined with NK cell infusion in non-small cell lung cancer [J]. *Immunol J*(免疫学杂志), 2017, 33(9): 789-794.
- [16] SAMUELS S, FERNS D M, MEIJER D, et al. High levels of soluble MICA are significantly related to increased disease-free and disease-specific survival in patients with cervical adenocarcinoma [J]. *Tissue Antigens*, 2015, 85(6): 476-483.

收稿日期: 2019-05-07

(本文责编: 蔡珊珊)