

霍山石斛多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠 肿瘤生长的抑制作用

张金萍¹, 葛基春¹, 李强明¹, 王成², 查学强¹, 罗建平^{1*}

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601)

(2. 安徽省霍山县天下泽雨生物科技发展有限公司, 安徽六安 237200)

摘要: 该研究探讨了霍山石斛多糖 (cDHP) 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用。用 Lewis 肺癌细胞建立肺癌荷瘤小鼠模型, 观测 cDHP 对小鼠生长情况、肿瘤体积、抑瘤率和脾淋巴细胞增殖能力的影响, 并测定肿瘤细胞凋亡比例、脾脏免疫细胞 (T 细胞、Treg 细胞、B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞) 比例及血清细胞因子 (CEA、IL-1 β 、IL-10、IL-2、TNF- α 、VEGF 和 TGF- β) 含量的变化。cDHP 高 369.00 mg/(kg·d)、中 184.50 mg/(kg·d)、低 92.25 mg/(kg·d) 剂量组的抑瘤率分别为 64.52%、50.47%、37.68%。cDHP 的抗肿瘤作用表现在其能够提高荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡比例、改善荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力、调节荷瘤小鼠脾脏免疫细胞比例和血清细胞因子的平衡。cDHP 可通过不同方式影响肿瘤生长, 结果为霍山石斛的开发利用提供了实验依据。

关键词: 霍山石斛; 多糖; 抗肿瘤作用; 荷瘤小鼠

文章编号: 1673-9078(2023)07-7-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0785

The Inhibitory Effects of *Dendrobium huoshanense* Polysaccharides on Tumor Growth in Lewis Lung Carcinoma-bearing Mice

ZHANG Jinping¹, GE Jichun¹, LI Qiangming¹, WANG Cheng², ZHA Xueqiang¹, LUO Jianping^{1*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

(2. Anhui Huoshan Tianxiazeyu Biotechnology Development Co. Ltd., Lu'an 237200, China)

Abstract: To investigate the inhibitory effects of cultivated *Dendrobium huoshanense* polysaccharides (cDHP) on tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-bearing mice, a mouse model of lung cancer was established using LLC cells. The effects of cDHP on various parameters including mouse growth, tumor mass, tumor growth inhibition ratio (treatment/control, T/C), and the proliferative capacity of spleen lymphocytes were assessed. Additionally, changes in the percentage of tumor cell apoptosis, composition of spleen immune cells (T cells, Treg cells, B cells, dendritic cells, and macrophages), and levels of serum cytokines (CEA, IL-1 β , IL-10, IL-2, TNF- α , VEGF, and TGF- β) were monitored. The high-dose (369.00 mg/(kg·d)), medium-dose (184 mg/(kg·d)), and low-dose (92.25 mg/(kg·d)) cDHP groups exhibited T/C ratios of 64.52%, 50.47%, and 37.68%, respectively. In lung tumor-bearing mice, cDHP demonstrated antitumor effects through an increase in the percentage of tumor cell apoptosis, enhanced proliferative capacity of spleen lymphocytes, regulation of spleen immune cell composition, and modulation of serum cytokine levels. These findings indicate that cDHP influences tumor growth through multiple mechanisms. The findings of this study provide experimental evidence supporting the potential development of antitumor drugs based on cDHP.

Key words: *Dendrobium huoshanense*; polysaccharide; antitumor effect; tumor-bearing mice

引文格式:

张金萍, 葛基春, 李强明, 等. 霍山石斛多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(7): 7-15.

ZHANG Jinping, GE Jichun, LI Qiangming, et al. The inhibitory effects of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides on tumor growth in Lewis lung carcinoma-bearing mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 7-15.

收稿日期: 2022-06-21

基金项目: 安徽省科技重大专项 (15czz04087)

作者简介: 张金萍 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 中草药与功能食品, E-mail: m18389797727@163.com

通讯作者: 罗建平 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中草药与功能食品, E-mail: jianpingluo@hfut.edu.cn

恶性肿瘤作为危害人类健康和生命的主要杀手,是全球主要公共卫生问题之一,具有高发病率、高死亡率的特点^[1]。根据国际癌症研究机构最新的调查结果,癌症已是全球所有国家导致死亡的首要原因,2018年全球有近1 000万人死于癌症,其中肺癌的死亡率最高,约占癌症死亡总人数的18%^[2]。目前,传统的癌症治疗方案具有治疗时间长、毒副作用大、治愈率低、费用高等缺点,而中草药在抑制肿瘤生长方面具有多靶点、多途径、低毒性、作用久等诸多优势,对癌症患者可起到缓解病情发展、提高生命质量等作用,因而逐渐成为肿瘤研究领域的一个新方向^[3]。霍山石斛(*Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J. Cheng)是兰科石斛属的名贵中药材,其药用历史超过2 000年,具有“除痹下气,补五脏虚劳羸瘦,强阴,久服,厚肠胃”的功效^[4]。现代药理学研究表明,霍山石斛含有多糖、联苕类、黄酮类、生物碱等多种成分,具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗白内障等多种药理活性^[5-10]。多糖作为霍山石斛中主要的活性成分,其抗肿瘤活性受到了国内外学者的广泛关注。目前霍山石斛抗肿瘤作用研究多集中于原药材及提取物的动物和细胞活性评价方面,评价指标多为肿瘤生长抑制率和细胞毒性作用相关指标^[11],但由于原药材及其提取物成分复杂,相关抗肿瘤活性成分及其作用机制尚不清楚。本研究中,以霍山石斛含量丰富的特征性多糖(以 β -1,4-糖苷键连接的部分乙酰化的葡甘露聚糖)为原料,建立了Lewis肺癌荷瘤小鼠模型,并从肿瘤生长情况、肿瘤细胞凋亡、脾淋巴细胞增殖能力、脾脏免疫细胞比例和血清细胞因子含量多方面探讨霍山石斛多糖的抗肿瘤作用,以期为深入研究霍山石斛抗肿瘤物质基础及作用机制奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

霍山石斛茎,采自安徽省霍山县太平畈乡,由合肥工业大学罗建平教授鉴定,干燥后,称重粉碎,过筛,保存待用。DMEM高糖培养基、RPMI-1640培养基、胰酶、双抗(100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素)、DMSO购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自美国Clark bioscience公司;5-氟尿嘧啶购自上海伊卡生物技术有限公司;ELISA检测试剂盒(肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β)、白细胞介素-2(Interleukin 2, IL-2)、白细胞介素-10(Interleukin 10, IL-10)、癌胚抗原(Carcinoembryonic Antigen, CEA)、血管内皮

生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、转化生长因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β)购自上海源叶生物科技有限公司;全血及组织稀释液、胶原酶、动物脾脏淋巴细胞分离液试剂盒、苯酚购自北京索莱宝科技有限公司;刀豆蛋白A(Concanavalin A, ConA)、MTT购自Biosharp生物科技有限公司;FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒、anti-mouse CD4 antibody、anti-mouse I-A/I-E(MHC II) antibody、anti-mouse CD8 antibody、anti-mouse CD11c antibody、anti-mouse CD45 antibody、anti-mouse Foxp3 antibody、anti-mouse CD25 antibody、anti-mouse CD3 antibody、anti-mouse F4/80 antibody、anti-mouse CD45RA(B220) antibody、anti-mouse CD16/32(Mouse Fc block) antibody购自美国BD公司。其余试剂均为分析纯并购买于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

MoFlo XDP 流式细胞分选系统,美国 Beckman Coulter 有限公司; Multiskan FC 酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司; DGF30/7-I 电热鼓风干燥箱,南京实验仪器厂; CT15RT 高速冷冻离心机,上海天美科学仪器有限公司; MDF-U73V 超低温冰箱、MLS-3750 高压灭菌锅、MCO-17AIC 恒温 CO₂ 培养箱,日本三洋电机株式会社; SW-CJ-1FD 超净工作台,苏州净化设备有限公司; Hei-VAP Advantage 旋转蒸发器,德国 Heidolph 公司; AL104 分析天平,美国梅特勒托利多公司; XD-101 普通倒置显微镜,南京江南永新光学有限公司; LGJ-18S 原位真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司。

1.3 细胞株

小鼠 Lewis 肺癌细胞购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。细胞经传代培养,冻存于细胞存储液氮罐中保藏备用。

1.4 动物

C57BL/6J 雄性小鼠用于肺癌造模。适年小鼠 6 周龄,体质量(18 \pm 2) g 购自于江苏常州卡文斯实验动物有限公司(合格证编号: NO.201718625; 许可证号: SCXK(苏)2016-0010),并饲养于 SPF 级动物房(温度 20 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C,相对湿度 50%~60%,每天维持 12 h 光照)内,自由摄食和饮水。

1.5 实验方法

1.5.1 霍山石斛多糖的提取

参照 Liu 等^[12]的方法,取霍山石斛茎干粉,经 95% (V/V) 乙醇脱脂,按料液比 1:40 加入蒸馏水,100 °C 提取 3 次,每次 1 h,提取液经纱布过滤、离心得上清液;上清液经真空旋转蒸发仪适度浓缩、终浓度为 80% (V/V) 乙醇过夜沉淀后,离心得醇沉淀物;醇沉淀物加适量蒸馏水复溶,加入 α -淀粉酶 (46 U/mL),60 °C 水解 1 h 后,再经终浓度为 80% (V/V) 乙醇沉淀、蒸馏水复溶、冷冻干燥,得霍山石斛多糖 (Cultivated *Dendrobium huoshanense* Polysaccharide, cDHP)。制得 cDHP 的平均得率为 18.45%,经苯酚硫酸法测得 cDHP 中总糖的含量为 93.17%,考马斯亮蓝法检测 cDHP 中可溶性蛋白的含量为 1.51%。

1.5.2 cDHP 抗肿瘤作用的评价

1.5.2.1 Lewis 肺癌荷瘤小鼠模型的建立

小鼠适应性喂养一周,期间自由摄食和饮水,随机挑选 12 只小鼠作为正常组小鼠 (Normal),剩余小鼠每只于腋下接种 Lewis 肺癌细胞 0.2 mL (每只 2×10^6 个),并压迫注射点防止外漏,在 SPF 级条件下饲养。

1.5.2.2 实验分组及给药干预

接种肺癌细胞后,每日观察小鼠成瘤情况,测量肿瘤长径和短径,计算肿瘤体积。待肿瘤长出后将体积约 $(100 \pm 20) \text{ mm}^3$ 的荷瘤小鼠随机分成 5 组 ($n=12$),包括模型组 (Model)、阳性药物 5-氟尿嘧啶组 (Positive) 以及霍山石斛多糖高剂量组 (cDHP-H)、中剂量组 (cDHP-M) 和低剂量组 (cDHP-L)。根据霍山石斛多糖的平均得率 (18.45%),按《中华人民共和国药典》^[13] 石斛成人最低推荐用量 6.00 g/(60 kg·d) 的 20 倍、10 倍及 5 倍,计算霍山石斛多糖高、中、低剂量组的摄入剂量分别为 369.00、184.50、92.25 mg/(kg·d)。正常组和模型组灌胃等量含 0.5% (m/V) 羧甲基纤维素钠的生理盐水,阳性组灌胃 5-氟尿嘧啶 20 mg/(kg·d)。所有提取物和 5-氟尿嘧啶均用含 0.5% (m/V) 羧甲基纤维素钠的生理盐水悬浮和溶解,每天按 0.2 mL/只小鼠灌胃给药,连续 30 d。肿瘤体积计算公式^[14]见式 (1):

$$V = \frac{1}{2} AB^2 \quad (1)$$

式中:

V ——肿瘤体积, mm^3 ;

A ——肿瘤长径, mm;

B ——肿瘤短径, mm。

1.5.2.3 肿瘤生长情况检测

实验期间,观察各组实验小鼠的活动情况、精神状态、毛发变化和饮食饮水情况。实验结束后, CO_2 窒息处死小鼠,记录小鼠体质量,同时剥离肿瘤,测

量肿瘤体积,计算抑瘤率。抑瘤率计算公式见式 (2):

$$R = \frac{1 - M}{M_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R ——抑瘤率, %;

M ——给药组平均瘤质量, g;

M_0 ——模型组平均瘤质量, g。

1.5.2.4 小鼠脾脏淋巴细胞增殖功能检测

取各组小鼠脾脏,置于全血及组织稀释液中,剪碎、研磨、过 70 μm 筛,制得小鼠脾脏单细胞悬液。小心吸取单细胞悬液后加于等量的淋巴细胞分离液液面上,室温 2 900 r/min 离心 25 min 后,小心取出第二层环状乳白色淋巴细胞至另一洁净的离心管中,加细胞洗涤液洗涤白膜层细胞,1 620 r/min 离心 10 min。重复操作后弃上清,用 RPMI-1640 培养基重悬细胞、计数,制得脾脏淋巴细胞 (每毫升 1×10^6 个细胞)。将小鼠脾脏淋巴细胞悬液按照每孔 200 μL 的量依次加入到 96 孔板中,每组 6 个孔,前 3 个孔加 ConA (5 $\mu\text{g/mL}$),另外 3 个孔不加 ConA 作为参照,按 MTT 法测定脾淋巴细胞增殖活力 (实验组平均 OD 值与对照组平均 OD 值的比值)。

1.5.2.5 肿瘤细胞凋亡情况的检测

取肿瘤组织并剪碎,加入 I 型胶原酶消化液,37 °C 摇床消化 50 min。消化后的细胞悬液用 70 μm 细胞筛网过滤,1 620 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤后重悬,计数并调整至每毫升 1×10^6 个细胞悬液。将单细胞悬液分装入无菌 EP 管中,加入 1% 的 FcBlock (CD16⁺/CD32⁺) 抗体封闭液封闭 15 min 后^[15],用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、流式细胞仪检测荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡情况。

1.5.2.6 脾脏免疫细胞变化的分析

按照 1.5.2.4 的方法制得小鼠脾脏单细胞悬液,加入红细胞裂解液,离心,弃上清,用 RPMI-1640 培养基重悬细胞 (每毫升 1×10^8 个) 后进行免疫细胞的流式分析。其中 T 细胞以 CD3⁺、CD4⁺ 和 CD8⁺ 抗体标记, B 细胞以 CD45⁺ 和 CD45RA⁺ 抗体标记, Treg 细胞以 CD4⁺、CD25⁺ 和 Foxp3⁺ 抗体标记,巨噬细胞及树突状细胞以 CD11c⁺、MHC II⁺ 和 F4/80⁺ 抗体标记。各管中加入相应抗体孵育 30 min,用 300 μL 含 5% (V/V) FBS 的无内毒素 PBS 缓冲液重悬,无菌细胞过滤器过滤后上机分析。所有操作过程尽量避光处理,实验结果使用 Summit V 5.2.1 软件 (美国 Beckman Coulter 有限公司) 进行分析。

1.5.2.7 小鼠血清中相关因子的检测

小鼠心脏取血,离心管收集血样,于 4 °C 冰箱中

保存过夜后 4 °C、5 617 r/min 离心 10 min, 收集血清, 利用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 CEA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-10、VEGF 及 TGF- β 的含量, 具体方法参见试剂盒说明书。

1.5.3 数据分析

所有实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 以用 $\bar{X} \pm SD$ 的形式表示, 采用 Origin 8.6 软件制图, 用 One-way ANOVA 检验各组的差异显著性。

2 结果与讨论

2.1 cDHP 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

影响

小鼠接种肺癌细胞后, 可见其右前肢腋下瘤块逐渐长大, 随给药时间的增加, 除正常组外, 其余小鼠均出现不同程度的行动减缓、毛发蓬松无光泽、饮食饮水相对减少的现象。如图 1a 所示, 给药 30 d 后, 模型组小鼠肿瘤最大, cDHP 组小鼠肿瘤均有不同程度的减小, Positive 组和 cDHP-H 组肿瘤最小。与模型组相比, cDHP 组小鼠状况明显改善, 肿瘤体积均有显著减小 (cDHP-H、cDHP-M: $P < 0.01$, cDHP-L: $P < 0.05$) 且呈现剂量依赖性, cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组小鼠肿瘤体积分别减小了 44.33%、38.63%和 27.86% (图 1b)。与模型组相比, cDHP 组小鼠肿瘤质量均有显著减小 (cDHP-H、cDHP-M: $P < 0.01$, cDHP-L: $P < 0.05$) 且呈现剂量依赖性, cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组小鼠肿瘤质量分别减小了 64.91%、50.88%和 37.72% (图 1c)。cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组小鼠抑瘤率分别达到 64.52%、50.47%和 37.68% (图 1d)。

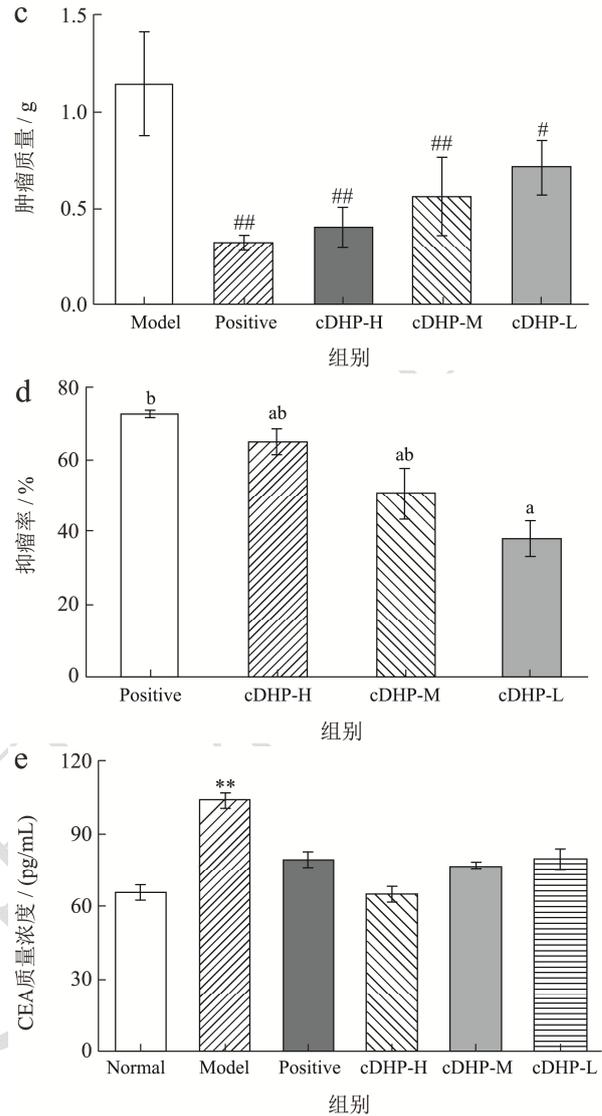
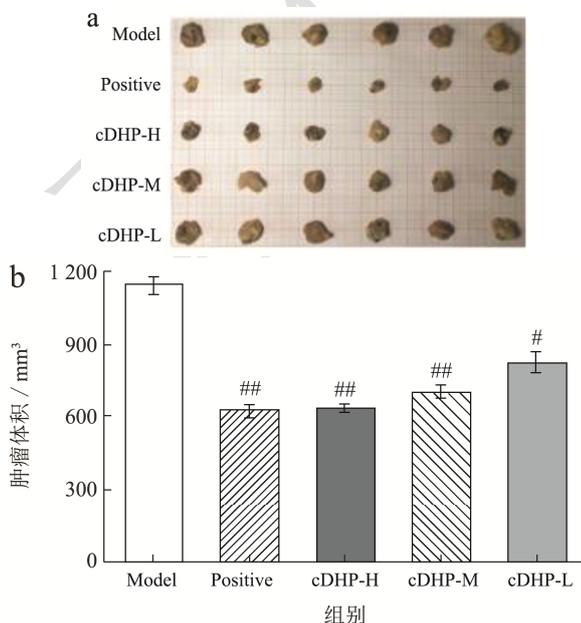


图 1 cDHP 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

Fig.1 Effects of cDHP on tumor growth of LLC-bearing mice

注: a 为肿瘤直观图; b 为肿瘤体积大小; c 为肿瘤质量; d 为抑瘤率; E 为 CEA 含量。与 Normal 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 不同小写字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

CEA 是一种广谱的肿瘤标志物, 可作为肿瘤诊断评价的特异性指标, 其水平的高低可反映病变程度^[16]。如图 1e 所示, 与正常组相比, 模型组小鼠血清的 CEA 含量升高了 57.85% ($P < 0.01$); 与模型组相比, cDHP 组 CEA 含量均有所减少且呈现剂量依赖性, cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组小鼠 CEA 含量分别下降了 37.22%、25.58%和 23.16%。上述结果表明, 霍山石斛多糖在抑制肿瘤生长的同时也可抑制肿瘤细胞的恶化。

2.2 cDHP 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

影响

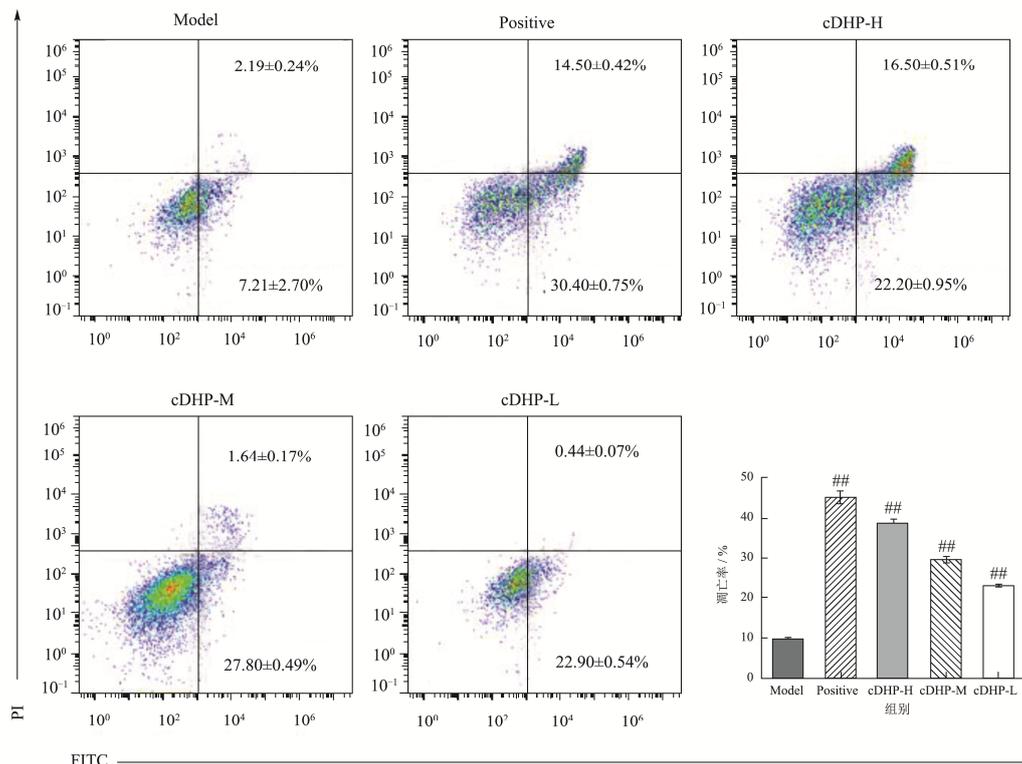


图2 cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡的影响

Fig.2 Effects of cDHP on tumor cell apoptosis of LLC-bearing mice

注:与Model组比较, # $P < 0.01$ 。

细胞凋亡与肿瘤的生长增殖密切相关^[17]。如图2所示,与模型组相比,cDHP组肿瘤细胞凋亡率均显著升高($P < 0.01$)且呈现剂量依赖性,cDHP-H、cDHP-M和cDHP-L组小鼠肿瘤细胞凋亡率分别升高了301.03%、206.19%和138.14%,表明cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠肿瘤细胞增殖具有显著的抑制作用,加速了肿瘤组织中肿瘤细胞的凋亡,结果与房雪等^[18]的报道一致。尽管阳性组小鼠肿瘤细胞凋亡率最高,但因5-氟尿嘧啶在杀死肿瘤细胞的同时也对小鼠正常细胞造成了损伤,导致荷瘤小鼠健康状况较差,生命活力被抑制。

2.3 cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响

脾脏是人体最大的淋巴器官,脾淋巴细胞的增殖能力反映了机体免疫应答的效应^[19]。由图3可见,与正常组相比,模型组小鼠脾淋巴细胞增殖能力下降了52.07%($P < 0.01$);与模型组相比,cDHP-H、cDHP-M和cDHP-L组的脾淋巴细胞增殖能力分别升高了113.79%、79.31%和39.66%,呈剂量依赖性,以cDHP-H组小鼠脾淋巴细胞增殖能力显著升高($P < 0.01$),且显著高于阳性组小鼠脾淋巴细胞增殖能力。上述结果

说明,Lewis肺癌荷瘤小鼠随肿瘤的增长其免疫能力处于抑制状态,而cDHP给药组对ConA诱导的淋巴细胞增殖具有明显的促进作用。

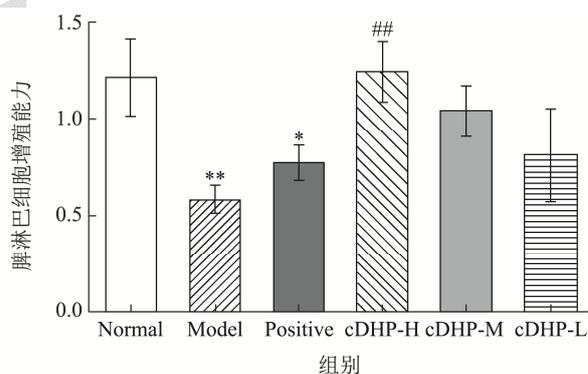


图3 cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effects of cDHP on splenic lymphocyte proliferation of LLC-bearing mice

注:与Normal组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与Model组比较,# $P < 0.01$ 。

2.4 cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠脾脏免疫细胞的影响

脾脏的淋巴细胞约占全身循环淋巴细胞总量的25%,不仅有抑制肿瘤细胞增殖的细胞,也有促肿瘤

细胞增殖的细胞,因此脾脏淋巴细胞的免疫调节作用是肿瘤免疫的一个重要环节,在肿瘤免疫应答中发挥双重作用^[20]。在T细胞亚群中,CD4⁺细胞是细胞免疫系统的指挥中枢、具有抗肿瘤的作用,CD8⁺细胞为细胞毒性T淋巴细胞、可通过分泌炎性细胞因子和细胞溶解分子(如穿孔素和颗粒酶)杀死肿瘤细胞。正常情况下CD4⁺细胞与CD8⁺细胞处于平衡状态,维持机体的免疫稳态,当CD4⁺与CD8⁺比值降低时,则表明机体免疫功能处于抑制状态^[21]。图4a显示,正常组CD4⁺与CD8⁺比值为1.87,模型组CD4⁺与CD8⁺比值为0.82,说明Lewis肺癌荷瘤小鼠处于免疫抑制状态;而cDHP-H、cDHP-M和cDHP-L组CD4⁺与CD8⁺比

值分别为3.45、3.16、2.29,说明cDHP可增强机体免疫功能,产生抗肿瘤活性。

Treg(调节性T细胞)是一类具有显著免疫抑制作用的、以表达Foxp3⁺、CD25⁺、CD4⁺为细胞表型特征的抑制性T细胞(Ts),它能够抑制其它细胞的免疫应答,在肿瘤的生长中发挥着重要作用^[22]。图4b显示,与正常组相比,模型组中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例升高了132.73%($P<0.01$);与模型组相比,cDHP-H、cDHP-M和cDHP-L组中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例分别降低了57.65%、50.54%和40.80%,说明cDHP可降低Lewis肺癌荷瘤小鼠脾脏中的Treg细胞比例,减弱其免疫抑制作用。

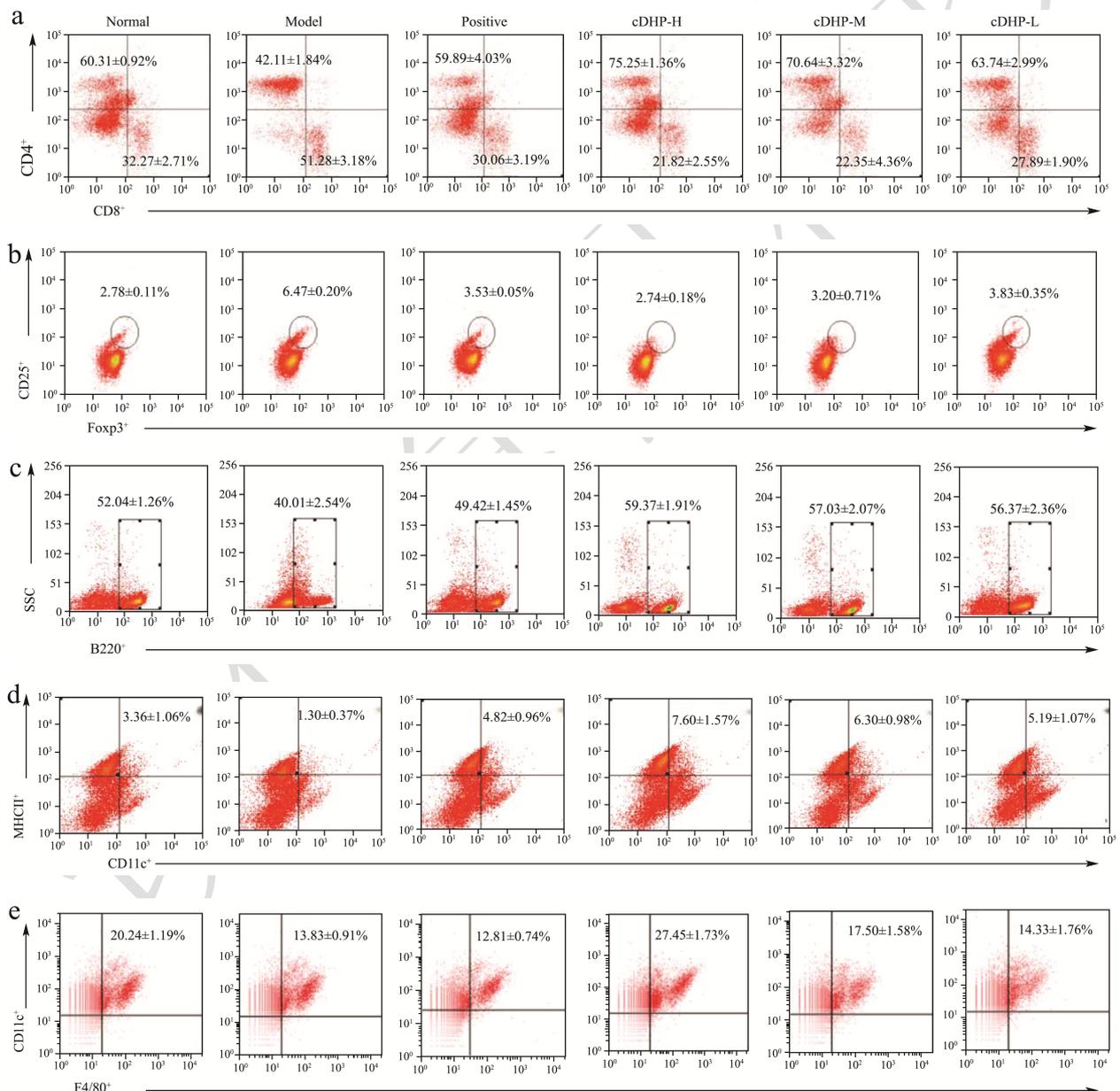


图4 cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠脾脏组织免疫细胞分型的影响

Fig.4 Effects of cDHP on immune cell typing in spleen tissues of LLC-bearing mice

注: a为T细胞, b为Treg细胞, c为B细胞, d为树突状细胞, e为巨噬细胞。

B 细胞能够通过产生抗肿瘤抗体,分泌多种细胞因子以及作为抗原提呈细胞等多种途径正向调控抗肿瘤免疫进程^[23];树突状细胞在免疫应答中是机体适应性免疫应答的起点,是体内唯一能激活静息期 T 细胞的抗原提呈细胞,而巨噬细胞是天然免疫系统特化的、存活时间长、具有吞噬作用的细胞,它和树突状细胞一起在机体的抗肿瘤免疫反应中具有重要作用^[24]。如图 4c 所示,与正常组相比,模型组中 B 细胞比例降低了 23.12%;与模型组相比,cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中 B 细胞比例分别升高了 48.39%、42.54% 和 40.89%。如图 4d 所示,与正常组相比,模型组中树突状细胞比例降低了 61.31%;与模型组相比,cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中树突状细胞比例分别升高了 484.62%、384.62% 和 299.23%。如图 4e 所示,与正常组相比,模型组中巨噬细胞比例降低了 31.67%;与模型组相比,cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中巨噬细胞比例分别升高了 98.48%、26.54% 和 3.62%。以上结果表明,cDHP 以剂量依赖性的方式升高小鼠脾脏 B 细胞、树突状细胞和巨噬细胞的比例,从而增强 cDHP 的抗肿瘤活性。

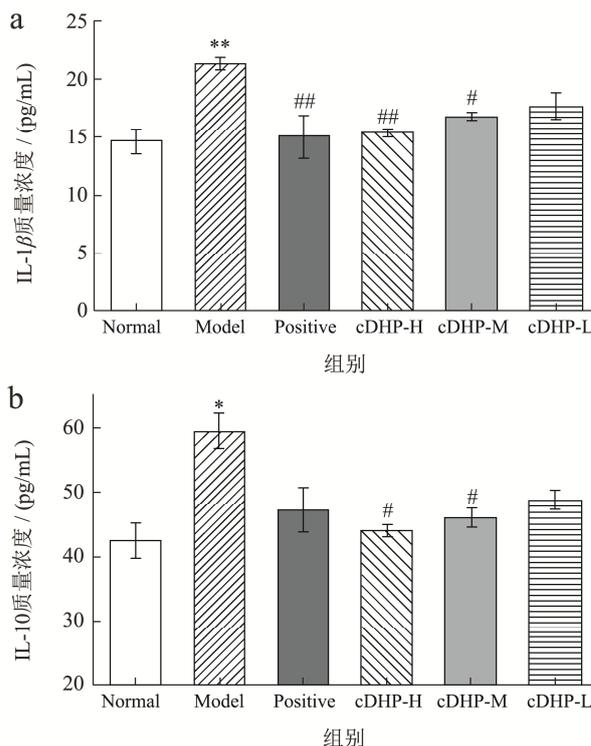
2.5 cDHP 对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠血清细胞因子的影响

细胞因子是一类具有广泛生物学活性的小分子蛋白质,包括白细胞介素、肿瘤坏死因子、生长因子等,它们一般通过结合相应受体来调节细胞的生长、分化和免疫应答^[25]。

IL-1 β 作为重要的免疫调节因子,可通过抑制与机体免疫功能密切相关的辅助性 T 细胞功能,加速肿瘤细胞的浸润与转移^[26]。IL-10 是由 Treg 细胞、Th2 细胞、单核细胞、巨噬细胞等产生的一种多效细胞因子,可通过抑制抗原提呈细胞对抗原的递呈从而抑制机体对肿瘤免疫监视作用,如抑制树突状细胞、Th17 细胞的活性,减少 IL-23、IL-17 的分泌,进而促进肿瘤的发生发展^[27]。由图 5a 可知,与正常组相比,模型组中 IL-1 β 分泌水平增加了 45.93% ($P < 0.01$);与模型组相比,cDHP 给药组小鼠血清中 IL-1 β 分泌水平均显著降低 (cDHP-H、cDHP-M: $P < 0.01$, cDHP-L: $P < 0.05$) 且呈现剂量依赖性,cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中 IL-1 β 分泌水平分别降低了 27.97%、21.58% 和 17.34%。由图 5b 可知,与正常组相比,模型组中 IL-10 分泌水平增加了 40.29% ($P < 0.05$);与模型组相比,cDHP 给药组小鼠血清中 IL-10 分泌水平均有所降低 (cDHP-H、cDHP-M: $P < 0.05$) 且呈现

剂量依赖性,cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中 IL-10 分泌水平分别降低了 25.95%、22.67% 和 17.93%。由上述结果可知,肿瘤细胞的大量增多引起了机体内炎症反应和免疫应答反应,cDHP 以剂量依赖性方式下调给药组中 IL-1 β 和 IL-10 的分泌水平实现抗肿瘤作用。

IL-2 又称 T 细胞生长因子,能促进 T 细胞生长、增殖及分化,调节 NK 细胞并保持它的自然杀伤力,诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的增殖和产生,从而有效破坏和杀伤肿瘤细胞^[28]。TNF- α 是免疫调节网络调控中重要部分,可由单核巨噬细胞、T 细胞及肥大细胞产生释放,是目前已知的肿瘤微环境中生物活性最强的促炎细胞因子^[29]。它可以诱导 B 细胞活化因子的产生,促进 B 淋巴细胞的增生和分化,产生肿瘤特异性抗体,增强抗体介导的体液免疫反应,从而提高机体的抗肿瘤免疫能力^[30]。由图 5c 可知,与正常组相比,模型组中 IL-2 分泌水平降低了 40.34% ($P < 0.01$);与模型组相比,cDHP 给药组小鼠血清中 IL-2 分泌水平均显著升高 (cDHP-H、cDHP-M: $P < 0.01$, cDHP-L: $P < 0.05$) 且呈现剂量依赖性,cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中 IL-2 分泌水平分别升高了 51.65%、38.25% 和 30.34%。由图 5d 可知,与正常组相比,模型组中 TNF- α 分泌水平升高了 3.56%;与模型组相比,cDHP-H 组血清中 TNF- α 分泌水平显著升高 ($P < 0.05$),cDHP-H、cDHP-M 和 cDHP-L 组中 TNF- α 分泌水平分别升高了 12.87%、4.40% 和 7.11%。结果表明,cDHP 可以剂量依赖性方式上调 IL-2 和 TNF- α 的分泌水平,增强抗肿瘤作用。



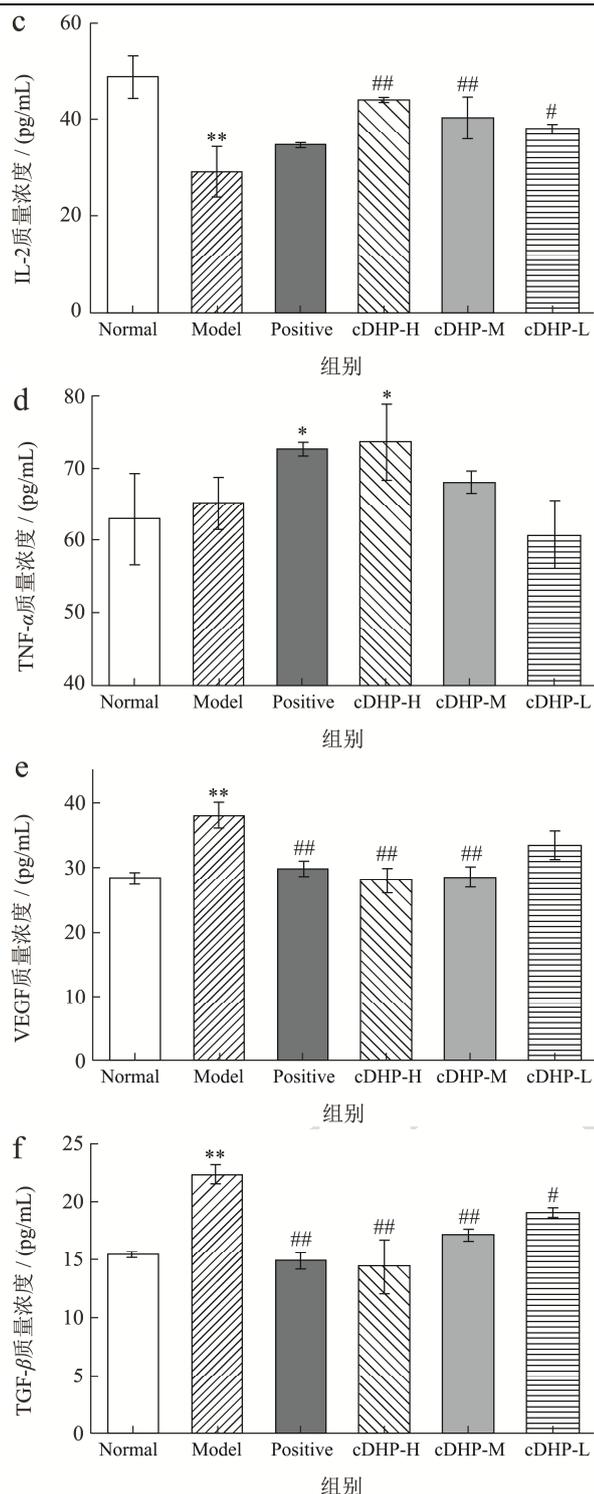


图5 cDHP对Lewis肺癌荷瘤小鼠血清细胞因子的影响

Fig.5 Effects of cDHP on serum cytokines of LLC-bearing mice

注: a为IL-1β, b为IL-10, c为IL-2, d为TNF-α, e为VEGF, f为TGF-β。与Normal组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与Model组比较, #P<0.05, ###P<0.01。

VEGF是一种由肿瘤细胞生成的特异性因子,对肿瘤新生血管形成具有促进作用^[31]。TGF-β,即转化生长因子-β,在肿瘤微环境中能够促进肿瘤生长、血管生成、转移和免疫逃逸,较高的TGF-β水平可以阻

断未成熟的T细胞向Th1细胞分化,促进其向Treg亚群的转化,并抑制树突状细胞的抗原递呈功能,从而导致肿瘤细胞的免疫逃逸^[32]。由图5e可知,与正常组相比,模型组中VEGF分泌水平增加了34.06%(P<0.01),与模型组相比,cDHP给药组小鼠血清中VEGF分泌水平均显著降低(cDHP-H、cDHP-M: P<0.01, cDHP-L: P<0.05)且呈现剂量依赖性,cDHP-H、cDHP-M和cDHP-L组中VEGF分泌水平分别降低了26.28%、25.06%和12.12%。由图5f可知,与正常组相比,模型组中TGF-β分泌水平增加了44.71%(P<0.01),与模型组相比,cDHP给药组小鼠血清中TGF-β分泌水平均显著降低(cDHP-H、cDHP-M: P<0.01, cDHP-L: P<0.05)且呈现剂量依赖性,cDHP-H、cDHP-M和cDHP-L组中TGF-β分泌水平分别降低了35.67%、23.38%和14.84%。结果表明,cDHP以剂量依赖性方式下调血清中VEGF和TGF-β水平,表明cDHP可通过减少VEGF和TGF-β的分泌水平来抑制肿瘤新生血管形成和免疫逃逸。

3 结论

利用Lewis肺癌荷瘤小鼠模型,从肿瘤生长情况、肿瘤细胞凋亡、脾淋巴细胞增殖能力、脾脏免疫细胞组成比例和血清细胞因子含量多方面探讨了cDHP的抗肿瘤作用。实验结果表明,cDHP [184.50~369.00 mg/(kg·d)]可通过提高荷瘤小鼠肿瘤细胞凋亡比例以减少肿瘤细胞的数量来抑制肿瘤生长,并可通过调节机体免疫细胞和细胞因子的平衡状态缓解机体的免疫抑制,从而起到抑制荷瘤小鼠肿瘤生长的作用。鉴于不同品种和生态环境会影响霍山石斛化学成分的合成与积累,今后进一步的研究需对不同产地和品种的霍山石斛在动物模型和给药剂量一致的条件下进行抗肿瘤作用比较,以期对霍山石斛的开发利用提供坚实的基础数据。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.

[2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries (vol 68, pg 394, 2018) [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(4): 313-313.

[3] 毕炜. 中药抗肿瘤多靶点效应的研究进展[J]. 江苏中医药,

- 2011,43(3):92-93.
- [4] 颜美秋,陈素红,吕圭源.石斛“厚肠胃”相关功效药理学研究及应用进展[J].中草药,2016,47(21):3918-3924.
- [5] Li Q M, Jiang H, Zha X Q, et al. Anti-inflammatory bibenzyls from the stems of *Dendrobium huoshanense* via bioassay guided isolation [J]. Nat Prod Res, 2020, 34(4): 563-566.
- [6] Xie S Z, Shang Z Z, Li Q M, et al. *Dendrobium huoshanense* polysaccharide regulates intestinal lamina propria immune response by stimulation of intestinal epithelial cells via toll-like receptor 4 [J]. Carbohydr Polym, 2019, 222: 115028.
- [7] Wan J, Gong X, Wang F, et al. Comparative analysis of chemical constituents by HPLC-ESI-MS(n) and antioxidant activities of *Dendrobium huoshanense* and *Dendrobium officinale* [J]. Biomed Chromatogr, 2022, 36(1): e5250.
- [8] Ge J C, Zha X Q, Nie C Y, et al. Polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* stems alleviates lung inflammation in cigarette smoke-induced mice [J]. Carbohydr Polym, 2018, 189: 289-295.
- [9] Yue H, Zeng H, Ding K. A review of isolation methods, structure features and bioactivities of polysaccharides from *Dendrobium* species [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(1): 1-27.
- [10] Ge J C, Zha X Q, Nie C Y, et al. Polysaccharides from *Dendrobium huoshanense* stems alleviates lung inflammation in cigarette smoke-induced mice [J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 189: 289-295.
- [11] 刘冰.霍山石斛(栽培)多糖化学结构系统解析及抗胃癌活性构效关系研究[D].合肥:合肥工业大学,2019.
- [12] Liu B, Shang Z Z, Li Q M, et al. Structural features and anti-gastric cancer activity of polysaccharides from stem, root, leaf and flower of cultivated *Dendrobium huoshanense* [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 143: 651-664.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [14] Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, et al. Anticancer and apoptosisinducing effects of quercetin *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 819-828.
- [15] 郭岩,路静,王本兴,琚媛媛,等.非小细胞肺癌患者的血清癌胚抗原、糖类抗原 125 水平及临床意义[J].癌症进展,2022, 20(14):1461-1463,1467.
- [16] Hao C, Zhang G, Zhang L J P I M B, et al. Serum CEA levels in 49 different types of cancer and noncancer diseases [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2019, 162: 213-227.
- [17] Troiano L, Ferraresi R, Lugli E, et al. Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry [J]. Nat Protoc, 2007, 2(11): 2719-2727.
- [18] 房雪,韩吉春,李德芳,等.霍山石斛多糖通过激活 GSK-3 β 信号通路减轻大鼠心肌缺血-再灌注损伤[J].中药材,2017,40 (4):925-930.
- [19] Fan S, Yu G, Nie W, et al. Antitumor activity and underlying mechanism of *Sargassum fusiforme* polysaccharides in CNE-bearing mice [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112: 516-522.
- [20] Bronte V, Pittet M J. The spleen in local and systemic regulation of immunity [J]. Immunity, 2013, 39(5): 806-818.
- [21] 莫娟梅,甘芷川,张顺荣,等.扶正方对 Lewis 肺癌小鼠免疫功能、PI3K/AKT 信号通路和外周血 IL-2、IL-6、INF- γ 的影响[J].现代生物医学进展,2021,21(23):4422-4426.
- [22] Darrasse-Jeze G, Podsypanina K. How numbers, nature, and immune status of Foxp3⁺ regulatory T-cells shape the early immunological events in tumor development [J]. Front Immunol, 2013, 4: 292.
- [23] Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer F I, et al. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease [J]. Int Immunol, 2000, 12: 597-605.
- [24] 王正昕,张明徽,李楠,等.胃癌组织中树突状细胞浸润及其表面分子表达的临床意义[J].第二军医大学学报,2002,23 (3):264-266.
- [25] 夏成兴,李学东.血清细胞因子对术后患者状态评估中的应用研究进展[J].标记免疫分析与临床,2016,23(8):945-948.
- [26] Chung S, Geerts D, Roseman K, et al. Osteoprotegerin mediates tumor-promoting effects of interleukin-1beta in breast cancer cells [J]. Mol Cancer, 2017, 16: 27.
- [27] Ouyang W, O'garra A J I. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation [J]. Immunity, 2019, 50(4): 871-891.
- [28] 吴琳,叶峥嵘.阳和汤药组配伍对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠的抑瘤效应及 IL-2、IL-4 的影响[J].现代中医药,2019,39(4):125-129.
- [29] 陆文洁.TNF- α 在雷公藤红素抑制荷瘤小鼠肿瘤生长中的作用研究[D].广州:广州医科大学,2018.
- [30] Lee J, Lee J, Um S, et al. Synovial cell death is regulated by TNF- α -induced expression of B-cell activating factor through an ERK-dependent increase in hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Cell Death Dis, 2017, 8: e2727.
- [31] Costache M I, Ioana M, Iordache S, et al. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: A review of the literature [J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(3): 199-208.
- [32] Lee H J. Recent advances in the development of TGF-beta signaling inhibitors for anticancer therapy [J]. J Cancer Prev, 2020, 25(4): 213-222.