

三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠免疫功能及肿瘤组织凋亡相关蛋白的影响

林钰久¹,柴树人²,龙坤兰¹,陈 骏¹,石冀敏¹,徐静静^{1*}

¹电子科技大学医院,成都 610054; ²浙江省宁波市中医院,宁波 315000

摘要:探索三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠免疫功能及肿瘤组织凋亡相关蛋白的影响。将 60 只小鼠随机分为对照组、模型组、三叶青黄酮高、中、低剂量组(100, 50, 25 mg/mL)各 10 只。连续干预 14 天后,检测各组胸腺指数、脾脏指数、移植瘤组织凋亡及凋亡相关蛋白表达,检测外周血调节性 T 细胞(Treg)比例。结果显示,与模型组比,三叶青黄酮高中剂量组胸腺指数、脾脏指数和移植瘤组织凋亡率升高($P < 0.05$),凋亡相关蛋白表达升高($P < 0.05$),外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞所占比例降低($P < 0.05$)。综上,三叶青黄酮可降低荷 Lewis 肺癌小鼠 Treg 细胞比例,提高免疫功能,诱导移植瘤组织凋亡。

关键词:三叶青黄酮;肺癌;免疫功能;凋亡

中图分类号:R331

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)1-0008-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.1.002

Effects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg flavone on immune function and apoptosis-related proteins in tumor tissues of Lewis lung cancer mice

LIN Yu-jiu¹, CHAI Shu-ren², LONG Kun-lan¹, CHEN Jun¹, SHI Ji-min¹, XU Jing-jing^{1*}

¹University of Electronic Science and Technology Hospital, Chengdu 610054, China;

²Ningbo Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315000, China

Abstract: To explore effects of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg flavone (THDEGF) on immune function and apoptosis-related proteins in tumor tissues of Lewis lung cancer mice. Sixty mice were randomly divided into control group, model group, high-dose, medial-dose and low-dose THDEGF group (100, 50 and 25 mg/mL), 10 cases in each group. They were continuously intervened for 14 days. After intervention, thymus index and spleen index in each group were detected. The apoptosis of transplanted tumor tissue was observed by HE staining and TUNEL staining. The expression of apoptosis-related protein was detected by Western blot. The ratio of regulatory T cells (Treg) in peripheral blood were detected by flow cytometer. The result showed that compared with model group, thymus index, spleen index and apoptosis rate of transplanted tumor tissues were significantly increased in high-dose THDEGF group and medial-dose THDEGF group ($P < 0.05$), while expression of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) was decreased ($P < 0.05$), expression of Bcl2-associated X protein (Bax) and cleaved cysteine aspartate 3 (cleaved Caspase-3) were increased ($P < 0.05$), proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells was significantly decreased ($P < 0.05$). With the increased dose of THDEGF, its effects were significantly enhanced ($P < 0.05$). In conclusion, THDEGF can reduce the proportion of Treg cells in Lewis lung cancer mice, improve the cellular immune function, and induce the apoptosis of transplanted tumor tissues.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg flavone; lung cancer; immune function; apoptosis

肺癌是一种常见的恶性肿瘤,据 2018 年全球数据统计,男性肺癌的发病率和死亡率均位于恶性肿

瘤首位,女性肺癌的发病率位于第 3 位,死亡率仅次于乳腺癌^[1]。目前,肺癌的治疗主要采用等化疗来控制病情发展,延长生存期^[2]。顺铂是临床常用的一种化疗药物,但研究显示,随着顺铂的长期使用以及剂量的增加,会出现不同程度的恶心、呕吐、脱发、免疫抑制等毒副作用^[3]。研究肺癌的发病机制,寻

收稿日期:2020-05-19 接受日期:2020-11-13

基金项目:国家中医药管理局中医药标准化(SATCM-2015-BZ
(200))

*通信作者 Tel:86-013608008995; E-mail:xujj@uestc.edu.cn

找有效的治疗药物,提高患者的生活质量,成为了当前的研究热点。三叶青黄酮是从传统中药三叶青中提取的一种黄酮类化合物,具有抗炎、抗氧化等作用,对于心肌缺血、高血压、心绞痛等具有良好的治疗效果^[4]。近年来研究显示^[5],三叶青黄酮具有抗肿瘤活性,不仅可以促进机体的免疫功能,还可以通过调节细胞内相关细胞因子的分泌,发挥抗肿瘤作用。但三叶青黄酮调节肺癌患者免疫功能以及诱导肿瘤组织凋亡的机制尚未明确。因此,本研究探索了三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠免疫功能及其肿瘤组织凋亡的影响,旨在为临床研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司);Lewis 肺癌细胞株(中国科学院(上海)细胞库);顺铂(齐鲁制药有限公司,国药准字 H20023461);三叶青黄酮(浙江省中药新药研发重点实验室);转化生长因子(transforming growth factor, TGF-β)、白介素-2(interleukin, IL-2)和 IL-10 检测试剂盒(上海歌凡生物科技有限公司);TUNEL 检测试剂盒(上海蝶威达实业有限公司);B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、BCL2 相关 X 蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cleaved Caspase-3)(美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔 IgG(丹麦 DAKO 公司)。

60 只 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠,6~8 周龄,体重均为 20 ± 2 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2015-0001,饲养于本院动物中心实验室,保持室温恒定为 25 °C,自由摄食与饮水。

1.2 Lewis 肺癌细胞悬液的制备

采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将冻存 Lewis 肺癌细胞复苏,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养至对数期,制成细胞悬液(1×10^7 个/mL),取 0.2 mL 细胞悬液接种于小鼠右侧腋窝皮下,接种 10 天后,脱颈处死小鼠,无菌剥取瘤组织,匀浆,过滤,制成细胞悬液。

1.3 动物造模及给药

小鼠预饲养 1 周后,随机选取其中 50 只小鼠进行造模,采用右侧腋窝皮下注射 0.2 mL Lewis 肺癌细胞悬液(1×10^7 个/mL)复制荷 Lewis 肺癌小鼠模

型^[6],若造模后 1 周,肉眼可见瘤组织,则为造模成功,将造模小鼠随机分为模型组、三叶青黄酮高、中、低剂量组和顺铂组各 10 只,另设 10 只小鼠为对照组,于右侧腋窝皮下注射 0.2 mL 生理盐水。接种肿瘤细胞 24 h 后,三叶青黄酮高、中、低剂量组灌胃 0.2 mL 三叶青黄酮(剂量依次为 100、50、25 mg/mL),1 次/天,顺铂组腹腔注射 0.5 mL 顺铂(剂量为 0.2 mg/mL),2 次/天,模型组和对照组灌胃等体积生理盐水,各组均连续干预 14 天。末次给药后,处死小鼠,收集血液,无菌分离肿瘤组织、脾脏和胸腺。

1.4 观察各组小鼠的移植瘤体积和重量

剥离小鼠移植瘤组织,测移植瘤长径、短径,计算其肿瘤体积 = (长径 × 短径²) / 2,同时称取移植瘤重量,计算抑瘤率 = (1 - 实验组肿瘤组织重量 / 对照组肿瘤组织重量) × 100%。

1.5 HE 和 TUNEL 染色检测肿瘤组织病理变化

取小鼠移植瘤组织,进行常规切片制作,一份用于 HE 染色,在光镜下观察组织的病理变化,每张切片随机取 5 个视野拍照;另一份用于 TUNEL 染色,观察移植瘤组织细胞的凋亡情况,严格按照试剂盒说明操作。

1.6 Western blot 检测移植瘤组织凋亡相关蛋白的表达

取小鼠移植瘤组织,匀浆,使用细胞裂解液严格按照蛋白裂解步骤提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量、依次 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转膜至 PVDF 膜、室温密封 2 h,洗膜并加一抗(Bcl-2、Bax 和 cleaved Caspase-3,稀释比例均为 1:1 000)4 °C 孵育过夜,洗膜加 HRP 标记的二抗(稀释比例为 1:5 000)室温孵育 2 h。再用电化学发光显示,凝胶成像系统分析条带强弱,选用 β-actin 作为内参。

1.7 检测各组小鼠的胸腺指数和脾脏指数

取小鼠胸腺和脾脏组织,用 Hanks 液冲洗干净后滤纸印干,称取胸腺和脾脏的质量,计算小鼠胸腺指数和脾脏指数。

1.8 ELISA 检测外周血 IL-2、IL-6 和 IL-10 水平

分离腹主动脉血液,抗凝离心(3 000 rpm,5 min),弃上清,采用 ELISA 法检测血浆 IL-2、IL-6 和 IL-10 水平。

1.9 流式细胞仪分析外周血调节性 T 细胞(Regulatory T cells, Treg)比例

分离腹主动脉血液,采用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,PBS 重悬后,加入 FITC 抗

CD25mAb 和 APC 抗 CD4mAb 各 20 μL , 避光孵育 20 min, 加入配比好的破膜剂, 加入 PE 抗 Foxp3mAb, 避光孵育 20 min, 上机流式细胞仪检测, 分析 Treg 细胞比例。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行分析, 满足正态分布的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较组间差异性, SNK-q 法比较两组间差异; 且差异均以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

表 1 各组小鼠移植瘤的体积和重量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Volume and weight of transplanted tumors in mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	肿瘤体积 Tumor volume (cm^3)	肿瘤质量 Tumor mass (g)	抑瘤率 Tumor-inhibition rate (%)
模型组 Model group	1.82 ± 0.41	1.58 ± 0.32	-
顺铂组 Cisplatin group	$0.81 \pm 0.17^\#$	$0.61 \pm 0.12^\#$	61.39 ± 9.44
三叶青黄酮低剂量组 L-THDEGF	$1.76 \pm 0.38^\Delta$	$1.51 \pm 0.35^\Delta$	$4.43 \pm 0.62^\Delta$
三叶青黄酮中剂量组 M-THDEGF	$1.32 \pm 0.26^\# \Delta$	$1.07 \pm 0.25^\# \Delta$	$32.28 \pm 5.21^\Delta$
三叶青黄酮高剂量组 H-THDEGF	$1.09 \pm 0.21^\# \Delta$	$0.86 \pm 0.13^\# \Delta$	$45.57 \pm 7.84^\Delta$
F	20.805	27.209	130.761
P	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与模型组相比, $^\# P < 0.05$; 与顺铂组相比, $^\Delta P < 0.05$ 。

Note: Compared with model group, $^\# P < 0.05$; Compared with cisplatin group, $^\Delta P < 0.05$.

2.2 HE 染色观测各组荷瘤小鼠移植瘤组织的病理变化

HE 染色结果显示, 对照组和三叶青黄酮低剂

2 结果

2.1 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠移植瘤体积和重量的影响

与模型组相比, 三叶青黄酮高、中剂量组和顺铂组荷瘤小鼠的肿瘤体积和肿瘤质量明显降低 ($P < 0.05$), 且随着三叶青黄酮剂量升高, 其作用明显增强 ($P < 0.05$); 顺铂组相比, 三叶青黄酮高、中剂量组荷瘤小鼠的肿瘤体积、肿瘤质量和抑瘤率明显升高 ($P < 0.05$) (见表 1)。

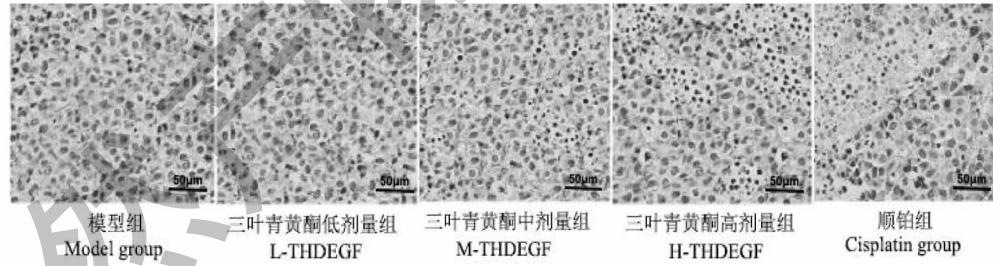


图 1 HE 染色观测各组荷瘤小鼠移植瘤组织的病理变化 ($\times 200$)

Fig. 1 Pathological changes of transplanted tumor tissues of tumor-bearing mice in each group were observed by HE staining ($\times 200$)

2.3 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠移植瘤组织凋亡及相关蛋白的影响

与模型组相比, 顺铂组、三叶青黄酮高、中剂量组移植瘤组织细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), Bcl-2 的表达明显下降 ($P < 0.05$), Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达明显升高 ($P < 0.05$), 且随着三叶青黄酮剂量升高, 其作用明显增强 ($P < 0.05$); 与顺铂组相比, 三叶青黄酮高、中剂量组移植瘤组织细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.05$), Bcl-2 的表达明显升高

($P < 0.05$), Bax 和 cleaved Caspase-3 的表达明显下降 ($P < 0.05$) (见图 2、表 2)。

2.4 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响

与对照组相比, 模型组、三叶青黄酮中、低剂量组荷瘤小鼠的胸腺指数和脾脏指数明显降低 ($P < 0.05$), 与模型组相比, 三叶青黄酮高、中剂量组和顺铂组荷瘤小鼠的胸腺指数和脾脏指数明显升高 ($P < 0.05$), 且随着三叶青黄酮剂量升高, 其作用明

显增强($P < 0.05$) ;与顺铂组相比,三叶青黄酮高、中剂量组荷瘤小鼠的胸腺指数和脾脏指数无明显差异($P > 0.05$)(见表2)。

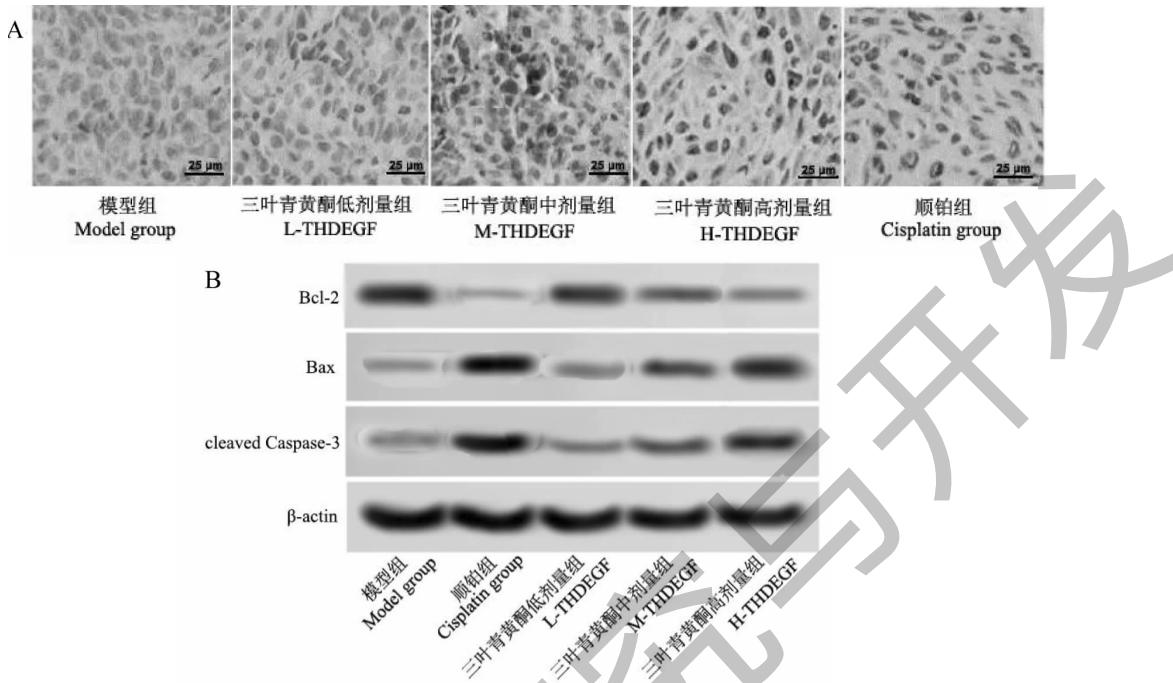


图2 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠移植瘤组织凋亡的影响($\times 400$)

Fig. 2 Effect of flavonoids on apoptosis of transplanted tumor tissues of tumor-bearing mice in each group ($\times 400$)

注:A:TUNEL 检测移植瘤组织细胞凋亡;B:Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达。

Note: A: Apoptosis of transplanted tumor tissue detected by TUNEL; B: Expression of apoptosis-related proteins detected by Western blot.

表2 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠移植瘤组织凋亡及相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of flavonoids on apoptosis and related proteins in transplanted tumor tissues of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	凋亡率 Apoptosis rate (%)	Bcl-2	Bax	Cleaved Caspase-3
模型组 Model group	5.14 ± 1.21	0.64 ± 0.05	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.03
顺铂组 Cisplatin group	$32.94 \pm 5.74^{\#}$	$0.22 \pm 0.03^{\#}$	$0.76 \pm 0.07^{\#}$	$0.69 \pm 0.06^{\#}$
三叶青黄酮低剂量组 L-THDEGF	$8.20 \pm 1.86^{\blacktriangle}$	$0.61 \pm 0.06^{\blacktriangle}$	$0.25 \pm 0.03^{\blacktriangle}$	$0.28 \pm 0.03^{\blacktriangle}$
三叶青黄酮中剂量组 M-THDEGF	$16.74 \pm 3.08^{\# \blacktriangle}$	$0.48 \pm 0.04^{\# \blacktriangle}$	$0.49 \pm 0.04^{\# \blacktriangle}$	$0.45 \pm 0.04^{\# \blacktriangle}$
三叶青黄酮高剂量组 H-THDEGF	$25.76 \pm 4.21^{\# \blacktriangle}$	$0.30 \pm 0.03^{\# \blacktriangle}$	$0.62 \pm 0.05^{\# \blacktriangle}$	$0.58 \pm 0.05^{\# \blacktriangle}$
F	104.893	181.579	274.841	225.492
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与模型组相比, $^{\#}P < 0.05$;与顺铂组相比, $^{\blacktriangle}P < 0.05$ 。

Note: Compared with model group, $^{\#}P < 0.05$; Compared with cisplatin group, $^{\blacktriangle}P < 0.05$.

2.5 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠外周血细胞因子

的影响

与对照组相比,模型组、顺铂组、三叶青黄酮高、中、低剂量组外周血 IL-2 水平明显下降($P < 0.05$),IL-10 和 TGF- β 水平明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,顺铂组、三叶青黄酮高、中剂量组外周血 IL-2

水平明显升高($P < 0.05$),IL-10 和 TGF- β 水平明显下降($P < 0.05$),且随着三叶青黄酮剂量升高,其作用明显增强($P < 0.05$);与顺铂组相比,三叶青黄酮高、中剂量组外周血 IL-2、IL-10 和 TGF- β 水平无明显变化($P > 0.05$)(见表4)。

表 3 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of flavonoids on thymus index and spleen index of tumor-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾脏指数 Spleen index (mg/g)
对照组 Control group	2.73 ± 0.18	3.75 ± 0.56
模型组 Model group	2.14 ± 0.14 *	2.21 ± 0.34 *
顺铂组 Cisplatin group	2.57 ± 0.17 #	3.15 ± 0.44 *#▲
三叶青黄酮低剂量组 L-THDEGF	2.20 ± 0.12 *▲	2.26 ± 0.30 *▲
三叶青黄酮中剂量组 M-THDEGF	2.52 ± 0.16 *#	2.83 ± 0.31 *#
三叶青黄酮高剂量组 H-THDEGF	2.61 ± 0.17 #	3.34 ± 0.42 *#
F	22.517	22.725
P	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$;与顺铂组相比, ▲ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with cisplatin group, ▲ $P < 0.05$.

表 4 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠外周血细胞因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Influence of flavonoids on cytokines in peripheral blood of tumour-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	IL-2 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TGF-β (pg/mL)
对照组 Control group	122.71 ± 14.68	38.26 ± 5.87	187.43 ± 25.61
模型组 Model group	75.35 ± 10.56 *	67.05 ± 8.52 *	276.85 ± 31.70 *
顺铂组 Cisplatin group	104.72 ± 12.34 *#	51.83 ± 7.04 *#	207.34 ± 30.89 *#
三叶青黄酮低剂量组 L-THDEGF	79.54 ± 10.15 *▲	62.78 ± 8.54 *▲	261.70 ± 36.84 *▲
三叶青黄酮中剂量组 M-THDEGF	88.68 ± 11.27 *#	54.31 ± 7.28 *#	234.66 ± 31.59 *#
三叶青黄酮高剂量组 H-THDEGF	105.54 ± 11.13 *#	49.20 ± 6.14 *#	203.58 ± 32.76 *#
F	24.792	33.924	48.571
P	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$;与顺铂组相比, ▲ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with cisplatin group, ▲ $P < 0.05$.

2.6 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠外周血 Treg 细胞的影响

与对照组相比,模型组、顺铂组、三叶青黄酮高、中、低剂量组外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞所占比例明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,顺铂组、三叶青黄酮高、中剂量组外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞所占比例明显降低($P < 0.05$),且随着三叶青黄酮剂量升高,其作用明显增强($P < 0.05$);与顺铂组相比,三叶青黄酮高剂量组外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞所占比例明显降低($P < 0.05$),三叶青黄酮中剂量组外周血 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 细胞所占比例明显升高($P < 0.05$) (见图 3、表 5)。

3 讨论

Lewis 肺癌细胞是小鼠来源的肺腺癌细胞,常用

于临床试验,研究药物治疗的临床疗效^[7]。顺铂是临床最常用的化疗药物之一,对于肺癌、恶性淋巴瘤、食管癌等多种恶性肿瘤均有一定的临床疗效,但顺铂的毒副作用大大限制了其临床应用。因此,本研究采用 Lewis 肺癌细胞建立荷瘤小鼠模型,以顺铂为阳性对照,来研究药物治疗的临床疗效。三叶青黄酮是从传统中药三叶青中提取的一种黄酮类化合物,研究显示^[8],三叶青黄酮具有良好的抗肿瘤活性,可以提高机体的免疫力,发挥抗肿瘤的作用,但其具体的作用机制尚不清楚。本研究中,高、中剂量的三叶青黄酮可以明显降低移植瘤组织的体积和重量,诱导肿瘤坏死,且随着剂量的增加,其作用逐渐增强,但高剂量三叶青黄酮的抑瘤率仍低于顺铂,提示三叶青黄酮可以呈剂量依赖性的降低移植瘤组织的体积和重量,但其作用效果明显低于顺铂。Cheng

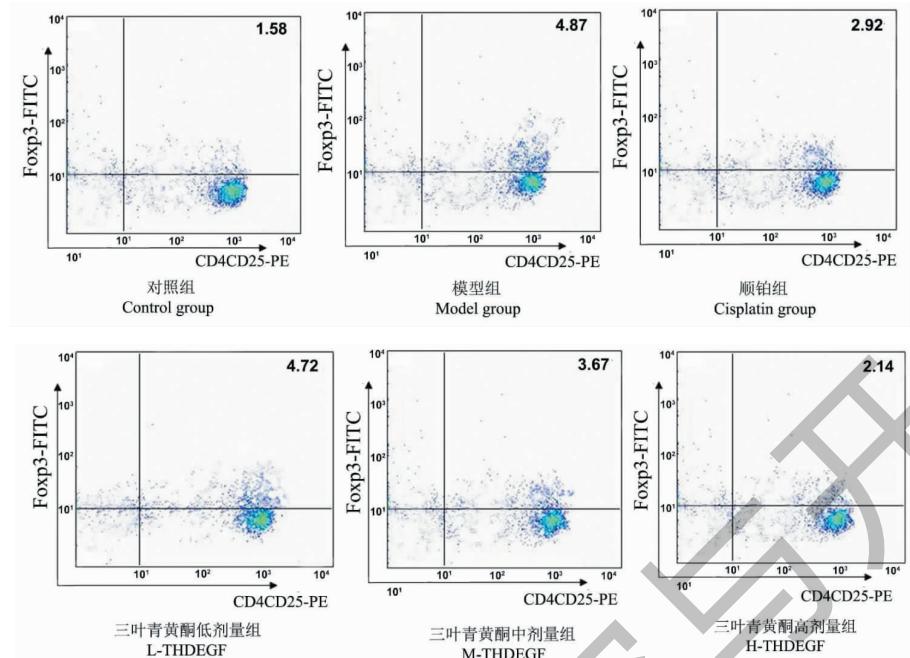


图 3 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠外周血 Treg 细胞的影响

Fig. 3 Effect of flavonoids on Treg cells in peripheral blood of tumour-bearing mice in each group

表 5 三叶青黄酮对各组荷瘤小鼠外周血 Treg 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of flavonoids on Treg cells in peripheral blood of tumour-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	$CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$
对照组 Control group	1.58 ± 0.22
模型组 Model group	$4.87 \pm 0.60 ^*$
顺铂组 Cisplatin group	$2.92 \pm 0.36 ^* \#$
三叶青黄酮低剂量组 L-THDEGF	$4.72 \pm 0.53 ^* \blacktriangle$
三叶青黄酮中剂量组 M-THDEGF	$3.67 \pm 0.51 ^* \# \blacktriangle$
三叶青黄酮高剂量组 H-THDEGF	$2.14 \pm 0.39 ^* \# \blacktriangle$
F	88.359
P	<0.001

注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$;与顺铂组相比, ▲ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with cisplatin group, ▲ $P < 0.05$.

等^[9]的研究显示,三叶青黄酮具有抗炎、抗肿瘤、免疫调节等作用,有望应用于临床抗肿瘤治疗,提高化疗疗效,提示三叶青黄酮有望应用于临床辅助治疗。

本研究中,高、中剂量的三叶青黄酮可以明显上调移植瘤组织 cleaved Caspase-3 的表达,降低 Bcl-2/Bax 的表达,提高移植瘤组织细胞的凋亡率,且随着剂量的增加,其作用逐渐增强,但高剂量三叶青黄酮的促凋亡率仍低于顺铂,提示三叶青黄酮可以呈剂量依赖性的诱导肿瘤细胞凋亡。Bcl-2/Bax 是一组调控线粒体途径介导的凋亡相关蛋白,一旦细胞

接收到外部信号刺激时,胞质中的 Bax 会转位至线粒体细胞膜与 Bcl-2 形成异源二聚体,诱导细胞色素 C 的释放,激活 Caspase 凋亡级联反应,诱导细胞凋亡^[10,11],提示三叶青黄酮可以调节凋亡相关蛋白的表达,诱导移植瘤组织凋亡。本研究中,高、中剂量的三叶青黄酮可以明显升高外周血 IL-2 水平,降低 IL-10 和 TGF-β 水平,随着剂量的增加,其作用逐渐增强,且高剂量的三叶青黄酮与顺铂作用后疗效相当。IL-2 是由辅助性 T 细胞(Th)1 细胞分泌的细胞因子,可以介导细胞免疫反应,IL-10 是由 Th2 细

胞分泌的细胞因子,主要调节体液免疫反应^[12]。Zhang 等^[13]的研究显示,IL-10 是由 Th2 细胞分泌的细胞因子,在维持机体正常的免疫应答中发挥着重要的作用,当其水平升高可拮抗 Th1 功能,抑制细胞免疫,提示三叶青黄酮可以降低 IL-10 水平,升高 IL-2 水平,提高机体的细胞免疫功能。TGF- β 是由 Treg 细胞分泌的细胞因子,具有免疫抑制作用,可以促进肿瘤的发生发展。Kindlund 等^[14]的研究显示,TGF- β 和 IL-10 是肿瘤细胞免疫逃避的主要调控因子,可以抑制细胞免疫功能,抑制肿瘤细胞凋亡,提示三叶青黄酮可以调节相关因子的表达,提高细胞免疫功能,发挥抗肿瘤效应。

本研究中,高、中剂量的三叶青黄酮可以明显降低 Treg 细胞比例,随着剂量的增加,其作用逐渐增强,且高剂量的三叶青黄酮作用效应强于顺铂。Treg 是 CD4⁺ T 细胞中的一类重要亚群,分为自然 Treg(natural Treg,nTreg) 和诱导 Treg(induced Treg,iTreg),可以通过多种机制抑制免疫效应细胞的功能,是肿瘤免疫逃逸的关键^[15]。nTreg 主要通过直接接触发挥免疫抑制作用,iTreg 主要通过分泌 IL-10 和 TGF- β ,发挥免疫负调控作用^[16]。Foxp3 是 Treg 细胞表面的一种分子标记蛋白,Foxp3⁺ Treg 可以表达 CD4、CD25 及转录因子 Foxp3^[17]。多项研究均表明^[18,19],Foxp3 基因可影响 Treg 细胞发育、分化和功能,Foxp3⁺ Treg 对可以调节免疫系统中的多种免疫细胞,发挥其免疫抑制作用。Miyabe 等^[20]研究发现,肿瘤细胞可以分泌趋化因子与其受体特异性结合,并趋化 Foxp3⁺ Treg 至肿瘤局部,使肿瘤细胞逃脱宿主免疫系统监视,促进肿瘤的恶性发展,提示三叶青黄酮可以降低 Treg 细胞比例,抑制 IL-10 和 TGF- β 的分泌,抑制细胞免疫功能,发挥其抗肿瘤效应,且其免疫调节作用效应强于顺铂,有望应用于临床辅助治疗,提高机体的免疫力,发挥其抗肿瘤效应。

综上所述,高、中剂量的三叶青黄酮可以明显降低外周血 Treg 细胞比例,升高 IL-2 水平,降低 IL-10 和 TGF- β 水平,调节移植瘤组织凋亡相关蛋白的表达,诱导移植瘤组织凋亡,抑制移植瘤的生长,有望应用于临床抗肿瘤治疗。但本研究尚处于基础研究阶段,尚需大量的临床试验来验证其临床疗效。

参考文献

1 Chen WQ,Zuo TT,Zheng RS,et al. Analysis of lung cancer

- incidence and death in China in 2013[J]. Chin J Oncol(中华肿瘤杂志),2017,39:795-800.
- 2 Tang X,Yan Li,Zhu L,et al. Salvinolic acid A reverses cisplatin resistance in lung cancer A549 cells by targeting c-met and attenuating Akt/mTOR pathway[J]. J Pharmacol Sci,2017,135(1):1-7.
 - 3 Wang H,Yang Z,Dai X,et al. Bisdemethoxycurcumin sensitizes cisplatin-resistant lung cancer cells to chemotherapy by inhibition of CA916798 and PI3K/AKT signaling[J]. Apoptosis,2017,22:1157-1168.
 - 4 Wu HY,Wu YT,Chen YY,et al. Effect of radix tetrastigma hemsleyani flavone on apoptosis and MAPK signaling pathway in myeloid leukemia NB-4 cells[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志),2019,35:1451-1456.
 - 5 Wang DD,Gao R,Yan B. Experimental study on the effects of Radix Tetrastigmate on respiratory syncytial virus[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2019,31:1070-1074.
 - 6 Xie X,Xie B,Rao B,et al. Effect of Qingzao Jiufei Tang expression on EGFR,NF- κ B,ICAM-1 and protein phosphorylation of JAK1 and STAT1 of Lewis lung cancer in rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2016,22(24):140-144.
 - 7 Zhang Z,Sun Z,Sun YQ,et al. Effects of bevacizumab combined with cisplatin on immune function and vascular endothelial growth factors in the mice of Lewis lung cancer[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2017,33:2394-2397.
 - 8 Li ZT,Chen JQ. Advances in anti-tumor effect of clover extracts on digestive system[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2016,38:2444-2447.
 - 9 Cheng Q,Fu HZ. Study development on pharmacological effect and clinical research of radix tetrastigme[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报),2016,18:235-238.
 - 10 Li T,Zhang Y,Han D,et al. Involvement of IL-17 in secondary brain injury after a traumatic brain injury in rats[J]. Neuromolecular Med,2017,19:541-554.
 - 11 Jiang W,Chen Y,Li B,et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of cyt-c in rat hippocampus[J]. Mol Biosystems,2017,13:1863-1873.
 - 12 Zhang M,Lu Y,Liu X,et al. Relationship between XspI site polymorphisms of LDL-R gene and serum IL-2 and IL-10 in patients with hypercholesterolemia[J]. J Clin Lab Anal,2016,30:1122-1127.
 - 13 Zhang Q,Fu L,Liang Y,et al. Exosomes originating from

- MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation; exosomes promote the differentiation of Tregs [J]. J Cell Physiol, 2018, 233: 6832-6840.
- 14 Kindlund B, Sjöling Å, Yakkala C, et al. CD4 $^{+}$ regulatory T cells in gastric cancer mucosa are proliferating and express high levels of IL-10 but little TGF- β [J]. Gastric Cancer, 2016, 20(1): 116-125.
- 15 Cruz L, Hashemifar S, Wu C, et al. Excessive expression of MIR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance [J]. J Clin Invest, 2017, 127: 530-542.
- 16 Rathod S, Tripathy A. TGF- β 1 and contact mediated suppression by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ CD127 $^{-}$ T regulatory cells of patients with self-limiting hepatitis E [J]. Hum Immunol, 2016, 77: 1254-1263.
- 17 Fontenot J, Gavin M, Rudensky A. Pillars article: Foxp3 programs the development and function of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T cells [J]. J Immunol, 2017, 198: 986-992.
- 18 Wei Y, Yu K, Wei H, et al. CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ GARP $^{+}$ regulatory T cells display a compromised suppressive function in patients with dilated cardiomyopathy [J]. Immunol, 2017, 151: 291-303.
- 19 Wada M, Tsuchikawa T, Kyogoku N, et al. Clinical implications of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ regulatory T cell frequencies after CHP-MAGE-A4 cancer vaccination [J]. Anticancer Res, 2018, 38: 1435-1444.
- 20 Miyabe C, Miyabe Y, Strle K, et al. An expanded population of pathogenic regulatory T cells in giant cell arteritis is abrogated by IL-6 blockade therapy [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 76: 898-905.

研究发现皂苷合成途径关键酶

三萜类皂苷是重要的医药原料,由一个或多个糖基结合在三萜皂元上,被用于制造可的松、睾丸素、黄体酮和口服避孕药等二十几种甾体激素,也可用于制取洗涤剂、乳化剂、发泡剂、防腐剂等。许多植物都生产皂苷,但其生产路径尚不清楚。

2020年11月16日Nature Communication报道,日本大阪大学等机构的研究团队合作突破性地发现了皂苷合成中糖基化环节的重要细节,并在酵母中成功构建了生产甘草皂苷的工程化生物合成途径,为以皂素为原料的高价值产品的商业化生产铺平了道路。

之前普遍认为是 UDP 依赖性糖基转移酶(UDP-dependent glycosyltransferase, UGT)催化三萜皂元的糖基化,但 UGT 催化甘草皂苷和各种大豆皂苷 C-3 位的保守葡萄糖醛酸部分转移的作用尚未确定。此次,研究者突破性地发现纤维素合酶超家族衍生的糖基转移酶(cellulose synthase superfamily-derived glycosyltransferase, CSyGT)能催化三萜皂元的 3-O-葡萄糖醛酸糖基化。研究者通过三种豆科植物(甘草、大豆和日本莲)的基因共表达分析,揭示了 CSyGTs 在皂苷生物合成中的作用,研究者还在酿酒酵母体内对 CSyGTs 功能进行验证。

研究发现,CSyGT 突变体不积累大豆皂苷,但在内质网中异位表达的 CSyGTs 成功地补充大豆皂苷生物合成。这一发现颠覆了以往的认知,填补了以往知识的空白。研究者还在酵母中成功构建生产了甘草皂苷的途径,开辟了通过大规模培养工程酵母细胞来工业生产有价值的皂苷的新途径。