

本文引用: 蒋星, 刘平安, 谢梦洲, 贺佐梅, 曹文, 何娜祯, 贝雪怡, 梁嘉宇. 参山颗粒对 CT26.WT 荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1576-1583.

参山颗粒对 CT26.WT 荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用

蒋星^{1,2,3}, 刘平安^{4*}, 谢梦洲^{1,2,3}, 贺佐梅⁴, 曹文¹, 何娜祯^{1,2,3}, 贝雪怡^{1,2,3}, 梁嘉宇^{1,2,3}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心, 湖南长沙 410208;

3. 湖南中医药大学中医心肺病证辨证与药膳食疗重点实验室, 湖南长沙 410208; 4. 湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410006

[摘要] **目的** 探讨参山颗粒对 CT26.WT 结肠癌荷瘤小鼠的免疫调节及抗肿瘤作用, 为其功能定位、临床运用与市场推广提供理论依据及实验支撑。**方法** 采用腋下注射 CT26.WT 细胞制备结肠癌小鼠模型, 分为空白对照组 (Control 组)、模型组 (Model 组)、参山颗粒组 (SSG 组)、5 氟尿嘧啶阳性药组 (5-FU 组), 每组 6 只, 连续给药 14 d。计算肿瘤体积、肿瘤抑制率。血清中细胞因子 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 的表达水平、脾脏中 T 淋巴细胞亚群的占比、肿瘤组的病理变化及肿瘤中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达情况, 分别用 ELISA 检测法、流式细胞术、HE 染色、RT-PCR 法和免疫组化测定。**结果** 与 Model 组对比, 5-FU 组和 SSG 组肿瘤体积显著减小、肿瘤质量显著降低、抑瘤率显著增加 ($P < 0.01$), 5-FU 组、血清中细胞因子 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 水平、脾细胞悬液中 CD4⁺T/CD8⁺T 的比值及肿瘤组织中 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Bax 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); SSG 组血清中细胞因子 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 水平, 脾细胞悬液中 CD4⁺T/CD8⁺T 的比值及肿瘤组织中 Bax 和 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 参山颗粒可能通过增强荷瘤小鼠免疫抗肿瘤, 激活 Bcl-2/Bax/Caspase-3 细胞凋亡通路从而抑制 CT26.WT 结肠癌荷瘤小鼠肿瘤生长。

[关键词] 参山颗粒; 结肠癌; 免疫调节; Bcl-2/Bax/Caspase-3 凋亡通路

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.09.005

Immunomodulatory and anti-tumor effects of Shenshan Granules on CT26.WT tumor-bearing mice

JIANG Xing^{1,2,3}, LIU Ping'an^{4*}, XIE Mengzhou^{1,2,3}, HE Zuomei⁴, CAO Wen¹, HE Nazhen^{1,2,3},
BEI Xueyi^{1,2,3}, LIANG Jiayu^{1,2,3}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Engineering Technology Research Center for Medicine & Food Homology of Functional Food, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Key Laboratory of TCM Heart and Lung Syndrome Differentiation, Medicated Diet & Dietotherapy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To explore the immunomodulatory and anti-tumor effects of Shenshan Granules on CT26.WT colon tumor-bearing mice, providing theoretical basis and experimental support for its function orientation, clinical application, and market promotion. **Methods** The mouse model of colon cancer was prepared by subaxillary injection of CT26.WT cells. Then the mice were

[收稿日期] 2023-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82205227); 湖南省自然科学基金青年基金项目 (2021JJ40310); 湖南省教育厅研究生创项目 (项目编号: CX20210707); 湖南省重点研发计划项目 (2022SK2018)。

[第一作者] 蒋星, 女, 硕士研究生, 研究方向: 常见疾病的施膳研究。

[通信作者] * 刘平安, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: 723679086@qq.com。

divided into blank control group (control group), model group, Shenshan Granules group (SSG group), and 5-fluorouracil positive drug group (5-FU group), with 6 mice in each group. The mice were administered drug continuously for 14 days. The tumor volume and tumor inhibition rate were calculated. The expression levels of IL-2, TNF- α , and IFN- γ in the serum cytokines, the proportion of T lymphocyte subsets in the spleen, the pathological changes in the tumor group, and the mRNA and protein expressions of Bcl-2, Bax, caspase-3 in tumors were determined by ELISA, flow cytometry, HE staining, RT-PCR, and immunohistochemistry, respectively. **Results** Compared with the model group, the 5-FU and SSG groups had significantly smaller tumor volumes, lower tumor mass, and higher tumor inhibition rates ($P<0.01$). In the 5-FU group, IL-2, TNF- α , and IFN- γ levels in serum cytokines, the ratio of CD4⁺/CD8⁺T in splenocyte suspensions, and the mRNA and protein expressions of Bcl-2 in tumor tissue significantly decreased ($P<0.01$). In the SSG group, IL-2, TNF- α , and IFN- γ levels in serum cytokines, the ratio of CD4⁺/CD8⁺T in splenocyte suspensions, and the mRNA and protein expressions of Bax and caspase-3 in tumor tissue significantly increased ($P<0.01$), but the mRNA and protein expressions of Bcl-2 significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Shenshan Granules may inhibit tumor growth in CT26.WT colon tumor-bearing mice by enhancing the anti-tumor immunity and activating the Bcl-2/Bax/Caspase-3 apoptosis pathway.

[**Keywords**] Shenshan Granules; colon cancer; immunomodulation; Bcl-2/Bax/caspase-3 apoptosis pathway

结肠癌(colon cancer, CC)是指的是由于结肠黏膜发生癌变所导致的消化道恶性肿瘤。其与直肠癌统称为结直肠癌(colorectal cancer, CRC)。全球癌症的最新数据 GLOBOCAN 2020(185个国家)^[1]显示: CRC 在全球最常被诊断的癌症中排名第三,发病率 10.0%;CRC 在全球癌症死亡原因中排名第二,死亡率为 9.4%。目前,根据我国国家癌症中心发布的数据^[2]表明,CRC 在中国恶性肿瘤发病率中排名第三,死亡率排名第五,且发病率和死亡率均保持上升趋势^[3]。有研究表明药食同源中药具有调节免疫抗肿瘤的作用^[4-5],能够减少放化疗带来的毒副作用,但市场上相关的药膳成品较少。药膳成品集口感和便捷性于一体,能提高患者依从性和生存质量。

参山颗粒(SC11344011501360,GB7101)是由湖南省药食同源工程中心研发的一款防治肿瘤的药膳产品。参山颗粒是以健脾益肾为组方原则,经典方四君子汤加菌类化裁而来。由人参、茯苓、山药、枸杞子和灰树花等组成。前期研究表明参山颗粒对人癌 HT-29 细胞迁移具有抑制作用^[6]。本研究通过进一步观察参山颗粒是否通过免疫调节抑制结肠癌 CT26.WT 荷瘤小鼠肿瘤的生长,并探讨其可能的通路,以期参山颗粒的临床应用和推广提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 6~8 周龄雄性 BALB/c 小鼠,体质量 18~22 g,动物合格证编号 ZS-202111300011。

1.2 细胞株

鼠源结肠癌 CT26.WT 细胞株(武汉普诺赛科技有限公司);货号:CL-0071。

1.3 药物与试剂

参山颗粒(正当年医药科技有限公司,批号:20210719);5 氟尿嘧啶(大连美仑生物技术有限公司,批号:M0409A);CT26.WT 细胞专用培养基(武汉普诺赛科技有限公司);APC-CD3、PE-CD4、FITC-CD8 流式抗体(美国 Biolegend 公司);IL-2、IFN- γ 和 TNF- α ELISA 试剂盒(上海抚生实业有限公司);总 RNA 提取试剂盒、PCR Kit 逆转录试剂盒、(上海普洛麦格生物有限公司);Bcl-2、Bax、Caspase-3 引物(赛索菲);Bcl-2、Bax、Caspase-3 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.4 主要仪器

CO₂ 培养箱、离心机(赛默飞世尔科技公司);酶标仪(伯乐生命医学产品有限公司);流式细胞仪(美国 BD 公司);倒置显微镜(德国莱卡公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与动物造模

CT26.WT 细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下常规培养,动物造模采用处于对数生长的细胞。将细胞浓度用 PBS 调整为 1.5×10⁷ 个/mL 的单细胞悬液。于小鼠右前肢皮下接种 200 μ L 细胞悬液,若 1 周左右肿瘤体积约为 100 mm³,则模型建立成功^[7];空白组小鼠于右前肢皮下注射 200 μ L 生理盐水。

2.2 动物分组与给药

随机将小鼠分为空白对照组[Control 组, 10.78 mL/(kg·d)蒸馏水, 灌胃]、模型[Model 组, 10.78 mL/(kg·d), 蒸馏水, 灌胃]、氟尿嘧啶阳性组[5-FU 组, 25 μg/mL, 生理盐水配制, 0.1 mL/只, 每 2 天注射 1 次]^[6]和参山颗粒组[SSG 组, 10.78 g/(kg·d), 灌胃], 每组 6 只, 连续给药 14 d。

2.3 各组小鼠肿瘤生长曲线和抑瘤率^[7]

从肿瘤模型成功日起, 测量小鼠肿瘤的长径(a)和短径(b), 2 次/d。通过公式(1)计算肿瘤体积, 并绘制肿瘤生长曲线。末次干预结束后, 摘眼球采血后, 颈椎脱臼处死小鼠, 将肿瘤取出称重并计算抑瘤率, 见公式(2)。

$$\text{肿瘤体积} = \frac{a \times b^2}{2} \quad (1)$$

$$\text{抑瘤率}(\%) =$$

$$\frac{\text{Model 组平均瘤重} - (5\text{-FU 组/SSG 组)平均瘤重}}{\text{Model 组平均瘤重}} \times 100\% \quad (2)$$

2.4 小鼠免疫器官指数计算^[9]

从处死的小鼠中, 完整的取出小鼠的脾脏和胸腺, 并称取其质量, 通过公式(3)计算小鼠脾脏指数和胸腺指数。

$$\text{小鼠脏器指数} = \frac{\text{脏器质量}(\text{mg})}{\text{小鼠质量}(\text{g})} \quad (3)$$

2.5 ELISA 法检测小鼠血清中细胞因子 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 的含量^[10]

摘眼球采血, 静置 2 h 后, 3 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 10 min, 取出血清。所有操作均按 ELISA 试剂盒说明书进行, 将酶标仪设定为 450 nm 波长, 测定各孔 OD 值。通过 ELISA 软件计算出标准曲线, 再通过标准曲线得出血清中 IL-2、IFN- γ 和 TNF- α 含量。

2.6 流式细胞术检测小鼠脾脏中淋巴细胞亚群 CD3、CD4 和 CD8 占比^[11-12]

常规方法制备脾脏淋巴细胞悬液^[13]。用 PBS 将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL, 设置空白管(不加抗体)、单染管(只加一种抗体)和样品管(加 CD3、CD4 和 CD8 流式抗体)。避光孵育 30 min, 每管加入 2 mL PBS 进行清洗, 2 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min, 弃上清液; 再加入 PBS 溶液 0.5 mL 重悬, 待上机检测。

2.7 RT-PCR 法测定 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 基因在肿瘤中表达情况

称取肿瘤组织 100 mg/只, 按逆转录试剂盒操作, 提取总 RNA。将 mRNA 逆转录为 cDNA, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存, 备用。采用 SYBR 法在荧光定量 PCR 仪上检测 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 蛋白的表达, 以 GAPDH 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。引物由赛索菲公司提供, 序列见表 1, 公式见公式(4)、公式(5)。

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\text{内参基因}) \quad (4)$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct}(\text{模型组均值}) \quad (5)$$

2.8 HE 染色观察小鼠肿瘤组织病理变化

将肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水、包埋, 切片(4 μm)制作石蜡切片。

表 1 引物序列表

基因名称	序列(5' to 3')	长度/bp
mouse Bax	F: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3' R: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3'	18
mouse Bcl-2	F: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3' R: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3'	18
mouse Caspase-3	F: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3' R: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3'	18
mouse GAPDH	F: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3' R: 5'-CGAATTGGAGATGAACTG-3'	18

2.9 免疫组化法检测肿瘤组织中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达

用常规方法对肿瘤组织进行包埋和染色。细胞核染为淡黄至棕黄色为阳性细胞, 光学显微镜下观察免疫组化结果, 采用 Image J 图像分析软件测定阳性细胞的面积。

2.10 统计学处理

数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 采用 SPSS 22.0 软件分析, 两组间比较采用 t 检验, 多组内比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 多重比较采用 Dunnett 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参山颗粒对肿瘤生长的影响

随着时间的推移, 5-FU 组和 SSG 组抑制了肿瘤的生长, 且给药第 14 天时, 如图 1A 所示, 与 Model 组相比, 5-FU 组和 SSG 组显著减小肿瘤体积($P <$

0.01);与5-FU组相比,SSG组肿瘤体积显著大于5-FU组($P<0.01$)。治疗14d后,称取肿瘤质量并计算抑瘤率,SSG组和5-FU组对肿瘤生长有明显的抑制作用,SSG组抑瘤率为 $44.01\% \pm 0.20\%$ ($P<0.01$),5-FU组为 $55.58\% \pm 0.18\%$ ($P<0.01$);此外,SSG组和5-FU组治疗后的抗肿瘤活性也可以从肿瘤的外观中清楚地识别出来。详见图1和表2。

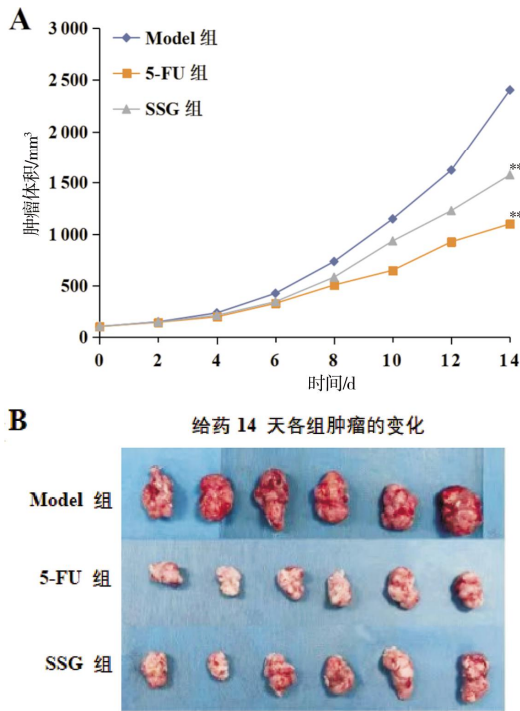


图1 参山颗粒对肿瘤生长的影响

表2 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	瘤重/g	抑瘤率/%
Model 组	9.76±0.14	-
5-FU 组	4.33±0.16**	55.58±0.18**
SSG 组	5.46±0.17***	44.01±0.20***

注:与Model组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与5-FU组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.2 参山颗粒对荷瘤小鼠免疫器官的影响

SSG组的脾脏指数和胸腺指数远高于Model组和5-FU组,分别为 7.48 ± 0.40 和 19.89 ± 0.75 。表示SSG组能显著改善荷瘤小鼠脾脏、胸腺指数($P<0.01$)。详见表3。

表3 参山颗粒对荷瘤小鼠脾脏和胸腺指数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	脾脏指数	胸腺指数
Model 组	5.41±0.21	13.13±0.47
5-FU 组	3.76±0.23**	9.36±0.46**
SSG 组	7.48±0.40***	19.89±0.75***

注:与Model组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与5-FU组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.3 参山颗粒对荷瘤小鼠血清中细胞因子水平的影响

SSG组IL-2、TNF- α 和IFN- γ 的表达显著高于Model组和5-FU组($P<0.01$)。Control组IL-2、TNF- α 和IFN- γ 表达显著高于Model组($P<0.01$)。详见图2。

3.4 参山颗粒对荷瘤小鼠脾脏T淋巴细胞亚群的影响

与Control组比较,Model组CD4⁺T细胞的百分比少12.06%($P<0.05$)、CD8⁺T细胞的百分比多30.84%($P<0.01$)、CD4⁺T/CD8⁺T比值少32.83%($P<0.01$);与Model组相比,5-FU组CD4⁺T细胞的百分比少6.58%($P<0.05$)、CD8⁺T细胞的百分比多13.37%($P<0.05$)、CD4⁺T/CD8⁺T比值少11.03%($P<0.01$),SSG组CD4⁺T细胞的百分比多5.06%($P<0.01$)、CD8⁺T细胞的百分比少20.89%($P<0.01$)、CD4⁺T/CD8⁺T比值多24.38%($P<0.01$)。详见图3。

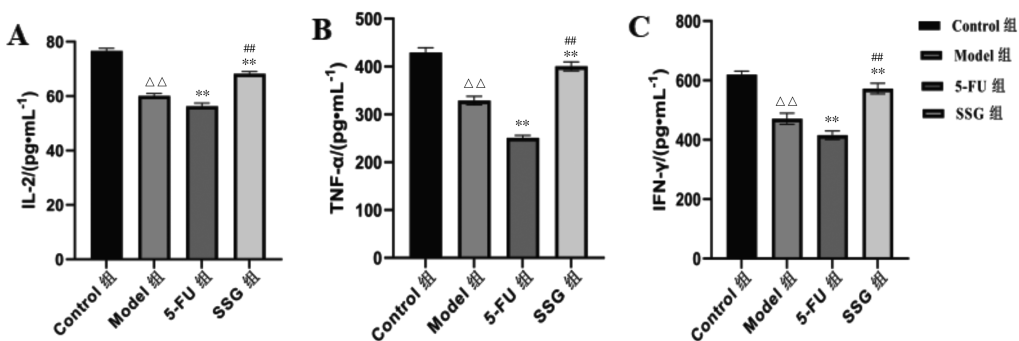


图2 参山颗粒对荷瘤小鼠血清中IL-2、TNF- α 和IFN- γ 的影响

注:与Control组比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与Model组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与5-FU组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

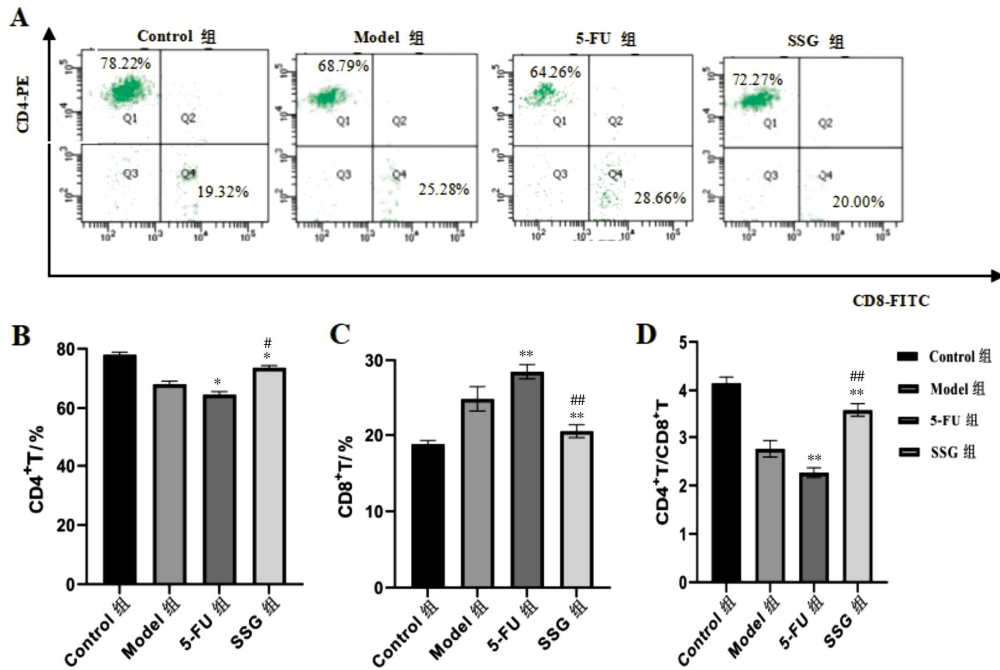


图3 参山颗粒对荷瘤小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的影响
注:与 Model 组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 5-FU 组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.5 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响

与 Model 组相比,5-FU 组和 SSG 组的 Bcl-2 显著降低($P<0.01$),Bax 和 Caspase-3 显著提高($P<0.01$),与 5-FU 组相比,SSG 组的 Bcl-2 显提高($P<0.05$),Bax 和 Caspase-3 显著降低($P<0.01$)。详见表 4。

表 4 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
Model 组	1.01±0.14	1.11±0.20	1.05±0.34
5-FU 组	0.57±0.10**	3.61±0.32**	5.81±0.71**
SSG 组	0.74±0.36**#	2.44±0.52**##	3.20±0.39**##

注:与 Model 组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 5-FU 组比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.6 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化的影响

HE 染色显示,Model 组小鼠肿瘤组织细胞排列紧密,病理性核分裂象增多,形状不规则,染色质明

显增多,细胞核深染;与 Model 组相比,SSG 组和 5-FU 组,可见肿瘤面积缩小,呈现不同程度的坏死,且肿瘤细胞分布不均,并伴有炎性细胞浸润。详见图 4。

3.7 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

与 Model 组相比,5-FU 组和 SSG 组的 Bcl-2 阳性细胞明显减少,Bax 和 Caspase-3 阳性细胞明显增加($P<0.01$);与 5-FU 组相比,SSG 组 Bcl-2 阳性细胞明显增加,Bax 和 Caspase-3 阳性细胞明显减少($P<0.01$)。详见图 5。

4 讨论

参山颗粒方中以灰树花健脾益气、扶正固本,人参大补元气、补脾养胃为君;山药益气养阴、补脾肺肾,香菇健脾胃、补肝肾、益智安神为臣药;茯苓利水渗湿,健脾安神,枸杞子、桑椹补益肝肾,滋阴生津为

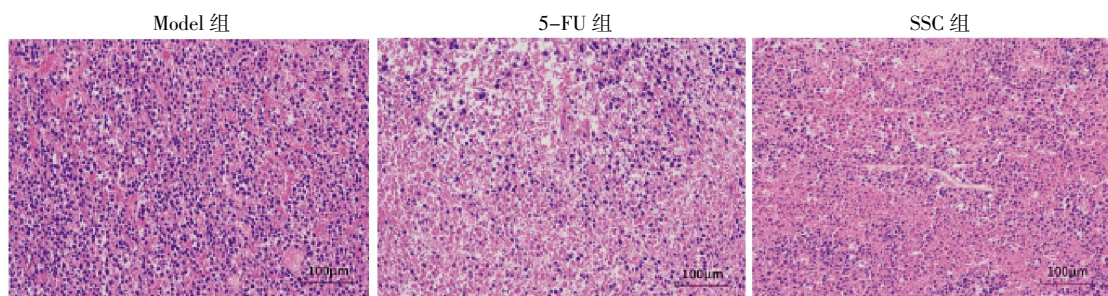


图 4 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤组织病理变化的影响($\times 200$,比例尺=100 μm)

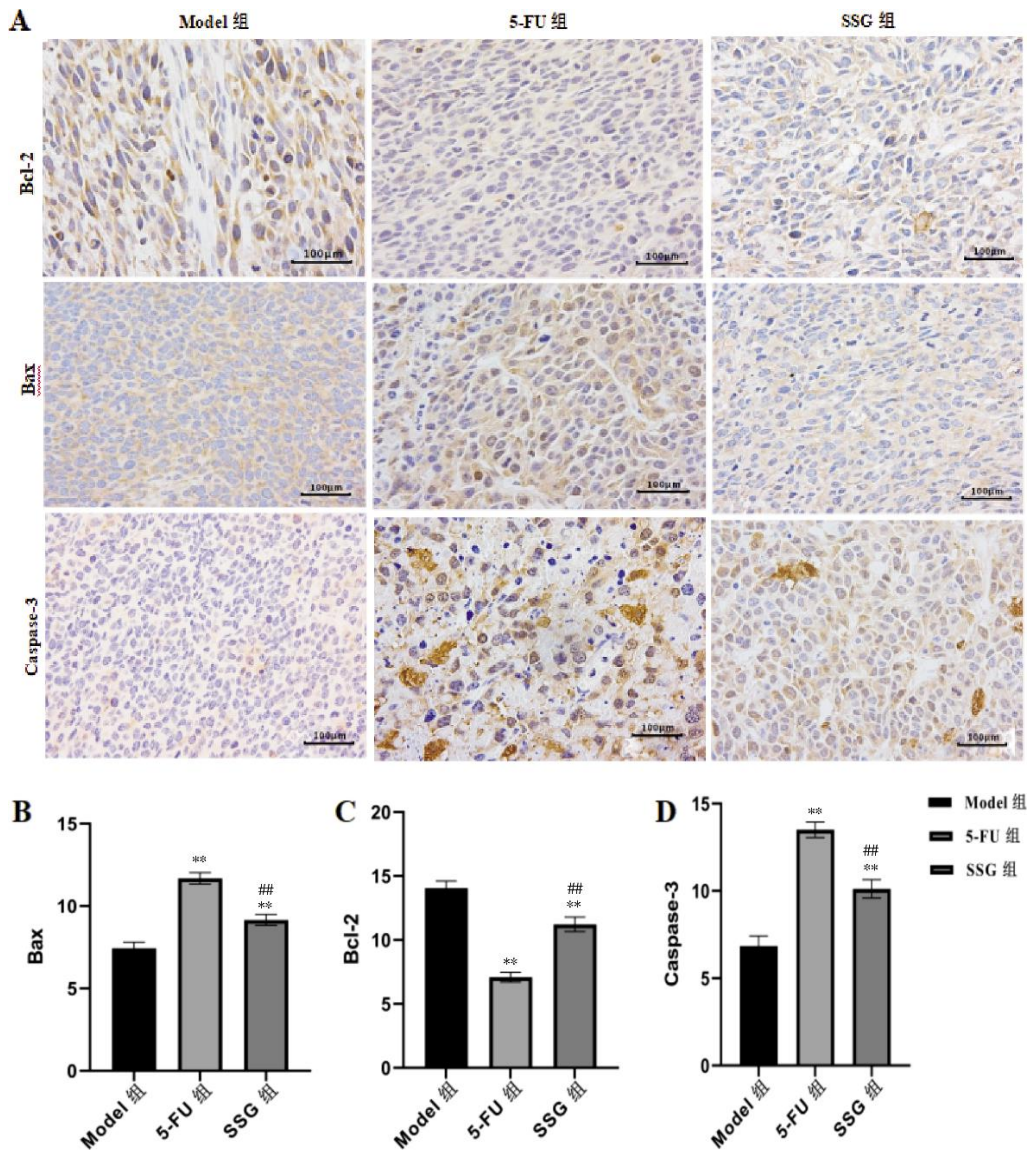


图5 参山颗粒对荷瘤小鼠肿瘤组织中的 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达的影响($\times 400$, 比例尺=100 μm)

注:与 Model 组比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 5-FU 组比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

佐药,三味药共奏健脾利湿、补肾养阴之效;再佐以玫瑰花疏肝解郁、活血行气,全方共奏健脾益肾、调补气血之效。在药理作用方面,灰树花能够抑制肿瘤细胞生长和预防转移^[14]。香菇多糖具有抑制肿瘤生成、免疫调节等多种生物活性^[15]。人参多糖能够明显增强免疫系统的功能且也具有一定的抗肿瘤活性^[16]。现代研究表明,茯苓具有抗肿瘤、免疫调节的作用^[17]。枸杞子中的枸杞多糖(LBP)可通过调节细胞周期调控因子、细胞内凋亡信号通路、凋亡抑制基因,破坏细胞膜表面结构等诱导肿瘤细胞凋亡^[18]。桑椹中的花青素可提高荷 S180 瘤小鼠的脾和胸腺指数,通过调节免疫影响肿瘤的生长与转移,体内外均具有抗 S180 瘤的作用^[19]。山药具有多种药理活性,如降血糖、降血脂、抗肿瘤、免疫调节的功能^[20]。现代研究

表明,玫瑰花水煎液有抑制 Ras/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的过度表达,进而产生抗肿瘤作用^[21]。机体的免疫力与肿瘤的关系比较密切,机体免疫力低下容易引发肿瘤。如果机体中的正气比较充足,邪气就无法导致机体出现疾病,中医所说的正气就是免疫力,免疫功能发挥防御疾病的作用^[22]。

免疫抑制似乎是化疗药物的主要不良反应,但对天然多糖没有干扰。相反,多糖基于其免疫刺激活性抑制体内肿瘤生长^[23-24]。胸腺和脾脏是重要的免疫器官,可以直接反映机体的免疫功能^[25]。因此,测定 BALB/c 小鼠的免疫器官指数,以评估 SSG 对免疫功能的影响。虽然 SSG 组的抗癌活性低于 5-FU 组,但 SSG 组的脾脏和胸腺指数远高于 Model 组和 5-FU 组。说明参山颗粒能显著改善荷瘤小鼠脾脏

指数和胸腺指数($P<0.01$)。

参山颗粒由于是药食同源中药材组成,故多糖是其主要有效成分之一,前期文献研究表明,其里面的抗肿瘤的有効成分主要为多糖。多糖可以促进细胞因子的产生,从而进一步促进抗肿瘤防御^[26-27]。TNF- α 被认为是一种强大的免疫介质,可直接诱导肿瘤细胞凋亡^[28]。IL-2 能够提高免疫力,促进自体肿瘤的杀伤^[29]。IFN- γ 具有很强的抗肿瘤和抗血管生成活性,能够通过调节 c-myc 基因的表达来抑制癌细胞的生长^[30]。本研究显示 SSG 组 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的表达显著高于 Control 组($P<0.01$)和 5-FU 组($P<0.01$)。表明参山颗粒能够提高荷瘤小鼠血清中参与免疫调节的细胞因子水平。由于化疗药会降低免疫水平,所以 SSG 组在参与免疫调节的细胞因子水平上会显著高于 5-FU 组。

T 淋巴细胞在抗肿瘤免疫反应过程中起着重要作用^[31]。CD4⁺T 和 CD8⁺T 为 T 淋巴细胞的两大亚群,有研究表明,CD4⁺T 淋巴细胞所占比例增加会提升免疫能力,CD8⁺T 则相反;CD4⁺/CD8⁺比值增加,可表示为肿瘤细胞免疫功能处于上升^[32]。本研究结果显示,与 Model 组比较,SSG 组小鼠脾细胞悬液中 CD4⁺T 细胞的百分比显著增加,CD8⁺T 细胞的百分比显著减少($P<0.01$),CD4⁺/CD8⁺T 比值显著增加($P<0.01$)。提示参山颗粒可上调 CD4⁺/CD8⁺T 的比值,从而发挥抗肿瘤作用。

Bcl-2 是线粒体途径中调节肿瘤细胞凋亡的重要蛋白质,具有很强的凋亡抑制功能^[33]。Bax 是一种促进凋亡的蛋白,对 Bcl-2 有直接拮抗作用^[34]。Caspase-3 可激活凋亡信号的传递,是促进细胞凋亡的关键蛋白。Bax 和 Bcl-2 结合可形成凋亡二聚体,与 Caspase 蛋白级联反应,诱导细胞凋亡^[35]。本研究结果显示,与 Model 组相比,5-FU 组和 SSG 组的 Bcl-2 阳性细胞明显减少,Bax 和 Caspase-3 阳性细胞明显增加($P<0.01$)。

综上所述,本研究表明参山颗粒具有抑制 CT26.WT 荷瘤小鼠肿瘤生长的作用,该作用可能与改善机体免疫,调节 Bcl-2/Bax/Caspase-3 凋亡信号通路有关。

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] 孙可欣, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2019, 28(1): 1-11.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局, 中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020 年版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(6): 601-625.
- [4] LONG T T, LIU Z J, SHANG J C, et al. Polygonatum sibiricum polysaccharides play anti-cancer effect through TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 813-821.
- [5] KOGA Y, TSURUMAKI H, AOKI-SAITO H, et al. Roles of cyclic AMP response element binding activation in the ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway in central nervous system, cardiovascular system, osteoclast differentiation and mucin and cytokine production[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1346.
- [6] 赵晶晶, 谢梦洲, 曹建中, 等. 参山固体饮料对人结直肠癌细胞 HT-29 增殖和迁移的影响[J]. *中医学报*, 2019, 34(11): 2398-2402.
- [7] LI W F, HU X Y, WANG S P, et al. Characterization and anti-tumor bioactivity of astragalus polysaccharides by immunomodulation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145: 985-997.
- [8] 木拉提艾则·玉素甫, 阿合力·那斯肉拉, 沈芳, 等. 乳源性复合益生菌对 CT-26 荷瘤小鼠抗肿瘤作用研究[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(2): 11-15, 30.
- [9] 周丽菁, 龙婷婷, 周星, 等. 刺五加多糖对 Lewis 荷瘤小鼠抗肿瘤免疫调节作用及机制的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(6): 849-853, 858.
- [10] 王菊, 梁蕾. 桔梗多糖对 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫功能的影响[J]. *现代免疫学*, 2021, 41(6): 462-467.
- [11] 王娜, 谢磊. 红景天苷调节免疫及抑制宫颈癌 U14 荷瘤小鼠肿瘤生长作用的研究[J]. *中药材*, 2020, 43(7): 1732-1736.
- [12] 张燕丽, 岳秋娟, 张林泉, 等. 水母雪莲乙醇提取物对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠抗肿瘤免疫的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(5): 988-992, 998.
- [13] 胡炆, 张国栋, 虞坚尔, 等. 补肾固表颗粒对免疫低下小鼠血清 IL-2、IFN- γ 及 NK 细胞活性、脾淋巴细胞增殖的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(4): 77-80.
- [14] 王亚敏, 谢梦洲, 张超文, 等. 药食用真菌灰树花防治肿瘤相关应用的研究进展[J]. *农产品加工*, 2019(3): 83-86.
- [15] 艾亮, 王晓东. 香菇多糖联合云芝糖肽对 Lewis 肺癌小鼠免疫调节与抗肿瘤作用的研究[J]. *新中医*, 2019, 51(1): 12-17.
- [16] 王永宏, 艾芷伊, 张俊顺, 等. 人参皂苷抗肿瘤活性与机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(1): 485-491.

- [17] 王颜佳. 茯苓抗肿瘤、免疫调节药理作用研究及应用[J]. 海峡药学, 2014, 26(5): 16-18.
- [18] MIAO Y, XIAO B X, JIANG Z, et al. Growth inhibition and cell-cycle arrest of human gastric cancer cells by Lycium barbarum polysaccharide[J]. Medical Oncology, 2010, 27(3): 785-790.
- [19] 刘莹, 覃骊兰, 蓝毓营. 桑葚化学成分、药理作用及质量标志物研究进展[J]. 重庆医学, 2021, 50(6): 1063-1067.
- [20] 刘改枝, 朱奕林, 许杜娟, 等. 山药活性成分抗老年痴呆症的网络药理学作用机制探讨[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(3): 374-382.
- [21] LIU Y, ZHI D J, WANG X, et al. Kushui Rose (R. Setate x R. Rugosa) decoction exerts antitumor effects in C. elegans by downregulating Ras/MAPK pathway and resisting oxidative stress[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 42(3): 1411-1417.
- [22] 田建辉. 扶正治癌调控肿瘤免疫研究[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(6): 565-569.
- [23] FERREIRA S S, PASSOS C P, MADUREIRA P, et al. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132: 378-396.
- [24] PANG G B, WANG F J, ZHANG L W. Dose matters: Direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 195: 243-256.
- [25] MAO G H, REN Y, LI Q, et al. Anti-tumor and immunomodulatory activity of selenium (Se)-polysaccharide from Se-enriched Grifolafrondosa[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 607-613.
- [26] FAN S R, YU G Q, NIE W J, et al. Antitumor activity and underlying mechanism of Sargassum fusiforme polysaccharides in CNE-bearing mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 516-522.
- [27] PANG G B, ZHANG S L, ZHOU X P, et al. Immunoactive polysaccharide functionalized gold nanocomposites promote dendritic cell stimulation and antitumor effects[J]. Nanomedicine, 2019, 14(10): 1291-1306.
- [28] YUN U J, PARK S E, JO Y S, et al. DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors[J]. Cancer Letters, 2012, 323(2): 155-160.
- [29] SUN X, GAO R L, XIONG Y K, et al. Antitumor and immunomodulatory effects of a water-soluble polysaccharide from Lili Bulbus in mice[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102: 543-549.
- [30] MUMBERG D, MONACH P A, WANDERLING S, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(15): 8633-8638.
- [31] CHRAA D, NAIM A, OLIVE D, et al. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2019, 105(2): 243-255.
- [32] WANG X B, WU D J, CHEN W P, et al. Impact of radiotherapy on immunological parameters, levels of inflammatory factors, and clinical prognosis in patients with esophageal cancer[J]. Journal of Radiation Research, 2019, 60(3): 353-363.
- [33] ADAMS C M, CLARK-GARVEY S, PORCU P, et al. Targeting the Bcl-2 family in B cell lymphoma[J]. Frontiers in Oncology, 2019, 8: 636.
- [34] 杨兴广, 杨继武, 赵鹏举, 等. Bcl-2与Bax基因在结直肠癌合并血吸虫病患者体内表达及临床病理意义[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(2): 148-153, 194.
- [35] 林思, 朱华, 秦慧真, 等. 对叶百部总生物碱对人肝癌SMMC-7721细胞凋亡及Bcl-2, Bax和cleaved Caspase-3蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 73-79.

(本文编辑 苏维)