

· 临床研究 ·

枸杞多糖对人外周血巨噬细胞活性的影响

许忠新¹, 单铁英¹, 苏安英¹, 杨书良²

(河北工程大学医学院:1. 人体解剖学与组织胚胎学系;2. 病理学系, 邯郸 056002)

摘要:目的 研究枸杞多糖(LBP)对正常人外周血巨噬细胞功能的影响。方法 无菌分离人外周血单核细胞,加入植物血凝素(PHA)和不同质量浓度的 LBP,用 MTT 法检测巨噬细胞对肝癌细胞株 Bel-7402 生长的影响,ELISA 法检测 LBP 作用后巨噬细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 用 LBP 处理后的巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤功能增强,80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LBP 刺激后巨噬细胞吞噬作用明显增强($P < 0.01$)。80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LBP 组肿瘤细胞与巨噬细胞培养上清液中 TNF- α 水平明显增高($P < 0.01$),证实该作用可能与 LBP 促进巨噬细胞分泌 TNF- α 增多有关。结论 LBP 能增强人外周血巨噬细胞免疫功能,发挥抗肿瘤作用。

关键词:枸杞多糖;外周血;巨噬细胞;功能

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.044

中图分类号:R730.51;R730.23

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2177-02

Study of lycium bararum polysaccharides on function of human peripheral blood macrophages

XU Zhong-xin¹, SHAN Tie-ying¹, SU An-ying¹, et al.

(1. Department of Human Anatomy and Histo-Embryology;2. Department of Human Pathology, College of Medical Sciences, Hebei Engineering University, Handan, Hebei 056002, China)

Abstract: Objective To study effect of lycium bararum polysaccharides(LBP)on function of human peripheral blood macrophages. Methods Macrophages from human peripheral blood were isolated and cocultured with phytohemagglutinin(PHA) and different concentration of LBP. The effect of LBP on the phagocytosis of macrophage to the growth of human hepatocarcinoma cells Bel-7402 were measured by MTT method. TNF- α secretion in supernatant of macrophage culture after LBP treatment were determined with ELISA assay. Results LBP could strengthen the macrophage to inhibit the proliferation of hepatocarcinoma cells. The proliferation of hepatocarcinoma cells was inhibited significantly by 80,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LBP respectively($P < 0.01$). The secretion of TNF- α in supernatant of tumour cell and macrophages culture after LBP treatment was enhanced by 80,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LBP significantly($P < 0.01$), which may be related with TNF- α production. Conclusion LBP could regulate the immune response of macrophage from human peripheral blood, which may be related with killing carcinoma cells.

Key words: lycium bararum polysaccharides; human peripheral blood; macrophage; function

枸杞多糖(lycium bararum polysaccharides, LBP)是传统中药材枸杞的主要成分之一,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖等 6 种单糖组成。有研究证明,多糖成分(如云苓多糖、灵芝多糖等)可通过激活机体免疫系统来达到抗肿瘤目的^[1-5]。对于 LBP 抑制肿瘤的免疫调节作用及免疫机制尚不清楚。本文主要以 LBP 为材料研究其对入外周血巨噬细胞免疫调节作用,为进一步开发免疫增强剂的抗肿瘤药物提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康人外周血采自 20~30 岁健康志愿者。人肝癌细胞株 Bel-7402 由作者提供。LBP 由本校实验中心从宁夏优质枸杞子中分离提取。人重组白介素-2(rIL-2)购自美国 Peprotech 公司。RPMI-1640 为 Gibco 公司产品。MTT 试剂均为 Sigma 公司产品。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。淋巴细胞分离液为上海生化试剂二厂产品。胎牛血清(FBS)为杭州四季青公司产品。

1.2 分离人外周血单核细胞(PBMC) 无菌采取健康人外周血约 5 mL,予肝素抗凝,加入等体积磷酸盐缓冲液(PBS)混匀,用淋巴细胞分离液经密度梯度离心法分离外周血 PBMC^[6],取白细胞层用 PBS 洗涤 2 次,加入含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基,置于饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养 2 h,贴壁细胞作为巨噬细胞。

1.3 分析巨噬细胞吞噬作用和测定细胞因子分泌 将培养的巨噬细胞用 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 2.5×10^6 个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 80 μL ,实验孔分别加入 20 μL 对照剂(培养基及 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rIL-2)和不同浓度(50、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)LBP,培养 24 h 后分别加入 Bel-7402 细胞悬液(1×10^5 个/mL)100 μL ,使效、靶比为 20:1。每孔液体终体积为 200 μL ,不足者用培养基补齐,每组均设 4 个复孔。置于饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后进行如下处理:(1)取各组培养上清液 100 μL ,用 ELISA 测定 TNF- α 水平;(2)各孔加 MTT(5 mg/mL)20 μL ,培养过夜,离心弃去培养上清液,每孔加入 DMSO 150 μL ,混匀后以测定波长为 492 nm、参比波长为 620 nm 检测各孔 A 值,并计算对肿瘤细胞的抑制率。抑制率=[1-(肿瘤细胞与巨噬细胞混合孔 A 值-巨噬细胞孔 A 值)/肿瘤细胞孔 A 值] $\times 100\%$ 。

1.4 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析和 LSD,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结 果

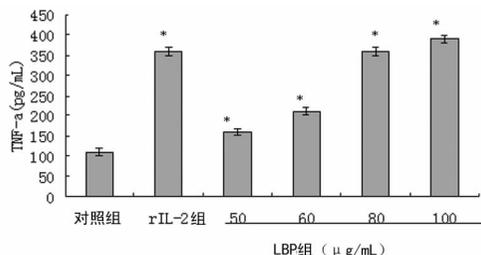
2.1 LBP 对人外周血巨噬细胞吞噬作用的影响 经不同浓度 LBP 作用 72 h 后巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用明显增强($P < 0.01$),80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LBP 刺激后巨噬细胞的吞噬作用明显大于 rIL-2 组($P < 0.01$),见表 1。

表 1 LBP 对人外周血巨噬细胞吞噬作用的影响($n=4$)

组别	A 值($\bar{x}\pm s$)			肿瘤细胞抑制率(%)
	巨噬细胞+肿瘤细胞	巨噬细胞	肿瘤细胞	
对照组	0.826±0.045	0.165±0.014	0.703±0.038	5.97
rIL-2 组	0.521±0.004*	0.201±0.007	0.568±0.009	43.66*
LBP 组($\mu\text{g/mL}$)				
50	0.731±0.014*	0.152±0.016	0.688±0.027	15.84*
60	0.702±0.031*	0.158±0.008	0.685±0.010	20.58*
80	0.540±0.021*	0.184±0.011	0.694±0.007	48.70*
100	0.527±0.012*	0.205±0.005	0.700±0.014	54.00*

* :与对照组比较, $P<0.01$ 。

2.2 LBP 对人外周血巨噬细胞 TNF- α 的影响 经不同浓度 LBP 作用 72 h 后 LBP 组肿瘤细胞与巨噬细胞培养上清液中 TNF- α 水平明显增高($P<0.01$), 80、100 $\mu\text{g/mL}$ LBP 组肿瘤细胞与巨噬细胞培养上清液中 TNF- α 量与对照组比较明显增高($P<0.01$), 但 80、100 $\mu\text{g/mL}$ LBP 组与 rIL-2 组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见图 1。

* :与对照组比较, $P<0.01$ 。图 1 LBP 对人外周血巨噬细胞 TNF- α 的影响($n=6$)。

3 讨论

肿瘤患者在接受放、化疗时射线和药物对机体的免疫系统有抑制作用, 致使机体免疫功能进一步下降, 影响了治疗效果并可导致一些不良反应, 所以解决肿瘤患者免疫功能低下问题成为肿瘤治疗的非常关键的环节。最近国内外学者提出生物反应调节剂(biological response modifier, BRM)的概念, 强调在肿瘤放、化疗及手术治疗同时应用 BRM, 不但能提高患者免疫功能, 还可减轻上述治疗对免疫系统及造血系统的损害, 从而提高治疗效果。在我国, 中药取自天然, 来源广泛, 容易获得, 不良反应小, 因此从中药中提取有效成分作为 BRM 显示出明显优势。LBP 具有很好的免疫促进作用, 为进一步研究其作用机制, 本文研究了 LBP 对外周血巨噬细胞增殖及功能的影响。

TNF- α 能够直接杀死病毒和肿瘤, 最近文献指出, TNF- α 在 CD8⁺ T 细胞的成熟阶段发挥重要的信号作用, TNF- α 缺乏时会导致效应性 CD8⁺ T 细胞产生下降, 影响其转化为记忆性

T 细胞^[7]。可见 TNF- α 除了对肿瘤细胞具有直接毒性和生长抑制作用外, 还可以通过增强 CD8⁺ T 细胞的细胞毒作用抵抗肿瘤生长。

本研究结果显示, 在 50~100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下 LBP 可明显提高巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤功能, 并增强巨噬细胞 TNF- α 的分泌。提示 LBP 除可以直接增强巨噬细胞吞噬功能外, 还可能通过促进巨噬细胞分泌 TNF- α 来间接杀伤肿瘤细胞。

本研究结果证实, LBP 能够增强巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤功能。LBP 可作为 BRM 发挥免疫调节功能而增强抗肿瘤作用, 但其具体的作用机制尚需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 何燕, 吴雄志. 中药多糖的免疫调节作用[J]. 四川中医, 2001, 2(19): 15.
- [2] 古赛, 蒋小黎. 枸杞多糖治疗酒精性脂肪肝大鼠的实验研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(1): 60.
- [3] 方晓松, 周馨. 注射用黄芪多糖治疗原发性肝癌的疗效观察[J]. 重庆医学, 2009, 38(8): 935.
- [4] Gan L, Zhan GSH, Yan GXL, et al. Immunomodulation and antitumor activity by apolysaccharide protein complex from Lycium barbarum[J]. Int Immunopharmacol, 2006, 4(4): 563.
- [5] 王宝金, 赵轩. 子宫腺肌病患者组织中巨噬细胞的检测[J]. 医药论坛, 2009, 30(3): 15.
- [6] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [7] Shi M, Umeshappa KS. Alpha tumor necrosis factor contributes to CD8⁺ T cell survival in the transition phase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360(3): 702.

(收稿日期: 2009-09-07 修回日期: 2010-01-11)

(上接第 2176 页)

AsAb 一旦转阴可采取一些积极的治疗, 如促排卵、IUI 等, 使其在尽量短的时间内妊娠, 否则随着时间的延长, 有可能在精子抗原刺激下再产生 AsAb。

参考文献:

- [1] 王辉. 抗精子抗体与不孕的研究现状[J]. 海南医学, 2006, 17(2): 139.
- [2] 徐明彩, 李彦红. 夫精宫腔内人工授精治疗不孕症 301 例分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(6): 110.

- [3] 刘玉成. 抗精子抗体阳性不育症的临床特点与治疗分析[J]. 中外医疗, 2008, 27(27): 38.
- [4] 陈杰. 抗精子抗体的产生、诊断及治疗进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2007, 1(27): 43.
- [5] 郭柳薇, 李学兰. 不育症患者血清、血浆抗精子抗体与解脲支原体感染的相关研究[J]. 广西医学, 2006, 28(10): 1557.

(收稿日期: 2009-11-10 修回日期: 2010-01-10)