

芪连扶正胶囊干预肺癌干细胞白细胞介素-10、转化生长因子-β₁ 表达对免疫重塑的影响

李慧杰 齐元富 李秀荣 张盈盈

(山东中医药大学附属医院, 济南, 250014)

摘要 目的:观察芪连扶正胶囊干预肺癌干细胞免疫相关因子白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子-β₁(TGF-β₁)表达对其免疫重塑的影响。方法:选取体外常规培养肺癌 A549 细胞,免疫磁珠法分选干细胞,制备芪连扶正胶囊含药血清,按实验分组干预,免疫酶联吸附试验法检测各组 IL-10、TGF-β₁ 的表达,RT-PCR 法检测各组 IL-10 mRNA、TGF-β₁ mRNA 的表达。结果:对照组、芪连扶正胶囊组、顺铂组、芪连扶正胶囊 + 顺铂组的 IL-10 表达依次为(119.03 ± 6.99)%,(108.91 ± 8.07)%,(96.71 ± 5.78)%,(56.41 ± 7.95)%;TGF-β₁ 表达依次为(174.79 ± 7.95)%,(160.51 ± 8.03)%,(141.28 ± 6.97)%,(97.34 ± 7.63)%;IL-10mRNA 表达依次为(1.06 ± 0.19)%,(0.85 ± 0.18)%,(0.67 ± 0.16)%,(0.47 ± 0.12)%;TGF-β₁mRNA 表达(1.27 ± 0.26)%,(1.01 ± 0.20)%,(0.77 ± 0.14)%,(0.50 ± 0.10)%。结论:芪连扶正胶囊可降低肺癌干细胞 IL-10、TGF-β₁ 表达,改善细胞免疫抑制状态,调节免疫重塑,进而抑制肺癌转移。

关键词 芪连扶正胶囊;肺癌;干细胞;肿瘤转移;免疫重塑;免疫逃逸;白细胞介素-10;转化生长因子-β₁

Effects of Qilian Fuzheng Capsule on the Immune Remodeling by Interfering with the Expression of IL-10 and TGF-Beta 1 in Lung Cancer Stem Cells

Li Huijie, Qi Yuanfu, Li Xiurong, Zhang Yingying

(The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Qilian Fuzheng Capsule on the immune remodeling by interfering with the expression of IL-10 and TGF-β₁ in lung cancer stem cells. **Methods:** We cultured the lung cancer A549 cells in vitro, sorted the stem cells by immunomagnetic beads, and prepared the serum containing of Qilian Fuzheng Capsule. According to the experimental group intervention, the expression of IL-10 and TGF-β₁ in each group was detected by Elisa, and the expressions of IL-10mRNA, TGF-β₁ mRNA in each group were detected by RT-PCR. **Results:** In the control group, Qilian Fuzheng Capsule group, cisplatin group, Qilian Fuzheng capsule + cisplatin group, IL-10 expression levels were (119.03 ± 6.99)%,(108.91 ± 8.07)%,(96.71 ± 5.78)%,(56.41 ± 7.95)%; TGF-β₁ expression levels were (174.79 ± 7.95)%,(160.51 ± 8.03)%,(141.28 ± 6.97)%,(97.34 ± 7.63)%; IL-10mRNA expression levels were (1.06 ± 0.19)%,(0.85 ± 0.18)%,(0.67 ± 0.16)%,(0.47 ± 0.12)%; TGF-β₁ mRNA expression levels were (1.27 ± 0.26)%,(1.01 ± 0.20)%,(0.77 ± 0.14)%,(0.50 ± 0.10)%. **Conclusion:** Qilian Fuzheng Capsule can reduce the expression of IL-10 and TGF-β₁ in lung cancer stem cells, improve the cellular immune suppression status, regulate immune remodeling and inhibit lung cancer metastasis.

Key Words Qilian Fuzheng Capsule; Lung cancer; Stem cell; Tumor metastasis; Immune remodeling; Immune evasion; IL-10; TGF-β₁

中图分类号:R273;R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.037

肿瘤干细胞是肿瘤组织中存在的小部分具有自我更新能力和分化潜能的细胞,是肿瘤发生、转移和复发的根源^[1]。肿瘤转移过程中存在免疫逃逸现象,而免疫重塑是最终导致逃逸的关键^[2]。免疫重塑的肿瘤细胞能过度产生抑制性细胞因子如白细胞介素-10(IL-10),转化生长因子-β₁(TGF-β₁)等,并诱导产生调节性 T 细胞、抑制性巨噬细胞,在肿瘤局部形成免疫抑制的肿瘤微环境^[3]。中医药在改善机

体免疫功能、提高患者生命质量方面彰显优势,本研究观察芪连扶正胶囊对肺癌干细胞免疫相关因子 IL-10、TGF-β₁ 表达的影响,探讨其对肺癌干细胞免疫重塑的影响,以期抑制肺癌转移及肺癌治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 细胞为山东中医药大学附属

医院中心实验室惠赠的人肺腺癌细胞系 A549 细胞株。动物为 SPF 级体重 ± 200 g、雄性 SD 大鼠, 购买于济南朋悦实验动物繁育有限公司(质量合格证号 SCXK(鲁)20140007), 饲养于山东中医药大学附属医院中心实验室 SPF 动物房。

1.1.2 主要药物 芪连扶正胶囊(山东中医药大学附属医院, 批号 Z01080226), 注射用顺铂(齐鲁制药有限公司, 批号 H20023461)。

1.1.3 试剂与仪器 主要试剂: RPMI-1640 培养基及胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限公司)、免疫酶联吸附试验法(ELISA)检测试剂盒(南京巴德得生物科技有限公司)、CD133 细胞分离试剂盒、PE 标记的 CD133 抗体(美国 Gene Copoeia 公司)、反转录试剂盒(TaKaRa 公司)、RNA 引物(生工生物工程股份有限公司, IL-10 上游 5'-TTACCTGGAGGTGATGC-3'、下游 5'-GGGAAGAAATCGATGACAGC-3'; TGF- β_1 : 上游 5'-GTACCTGAACCCGTGTTGCT-3', 下游 5'-GTATCGCAGGAATTGTTGC-3'; GAPDH 上游 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', 下游 5'-AGGGGC-CATCCACAGTCTTC-3')。

主要仪器: Class II 2085 型超净工作台、Multiskan Go 酶标仪(美国 Thermo Forma 公司)、BB5060UV 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司)、Axiovert 40 型倒置相差显微镜(德国蔡司)、流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)、Trans-Blot Turbo 转膜仪、电泳系统(美国 Bio-rad 公司)、Innotech Fluor Chem Q 成像分析系统(美国 Alpha 公司)、96 孔型 PCR 仪(美国 Therm Fisher 公司)、LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ROCHE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 实验分组: 分为对照组(10% 胎牛血清)、芪连扶正胶囊组(芪连扶正胶囊含药血清)、顺铂组(终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂溶液)、联合组(芪连扶正胶囊含药血清 + 顺铂溶液)。

含药血清制备: 购买体重 ± 200 g 的雄性 SD 大鼠适应性喂养 5 d; 随机分为芪连扶正胶囊组及对照组, 芪连扶正胶囊组大鼠灌胃应用芪连扶正胶囊溶液, 对照组应用等量生理盐水, 灌胃 1 次/d、连续灌 14 d; 末次灌胃前 12 h 禁食, 末次灌胃后 1 h 10% 水合氯醛麻醉大鼠; 经腹主动脉取血, 离心取血清, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

肺癌干细胞分选: 常规培养细胞, 消化离心收集细胞, 调整细胞浓度、清洗、加入、缓冲液重悬细胞, 按照 CD133 细胞分离试剂盒说明逐步进行, 流式细

胞仪检测阳性细胞的百分率, 分选的 CD133⁺ 比例为 80.79%, 可用于后续实验。

1.2.2 干预方法 肺癌干细胞常规培养, 待细胞生长到 80% 左右, 按实验分组进行干预, 48 h 后收集细胞进行相关指标测定。

1.2.3 检测指标与方法 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 IL-10、TGF- β_1 : 常规培养细胞, 按实验分组干预, 继续培养 48 h, 离心收集, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用; 检测时, 配制标准品, 加样, 封板温育 30 min, 洗板, 加酶标试剂, 重复后加显色剂, 震荡混匀, 避光显色 15 min, 加终止液, 酶标仪 450 nm 波长下测定各孔吸光度值(A 值), 计算数据。

RT-PCR 法检测 IL-10mRNA、TGF- β_1 mRNA: 常规培养细胞, 按实验分组加药, 继续培养 48 h, 逐步提取总 RNA, 测定 RNA 浓度, 标准内进行后续实验; 逐步合成 cDNA, PCR 扩增, 上机检测, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 处理实验数据。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌干细胞 IL-10、TGF- β_1 表达情况 与对照组比较, 各药组均可降低细胞 IL-10 和 TGF- β_1 的表达($P < 0.05$); 与顺铂组比较, 芪连扶正胶囊组及联合组的 IL-10 和 TGF- β_1 表达均与之差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组肺癌干细胞 IL-10、TGF- β_1 表达比较($\bar{x} \pm s, \text{ng}/\text{L}$)

组别	IL-10	TGF- β_1
对照组($n=6$)	119.03 \pm 6.99	174.79 \pm 7.95
顺铂组($n=6$)	96.71 \pm 5.78*	141.28 \pm 6.97*
芪连扶正胶囊组($n=6$)	108.91 \pm 8.07* Δ	160.51 \pm 8.03* Δ
联合组($n=6$)	56.41 \pm 7.95* Δ	97.34 \pm 7.63* Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与顺铂组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 4 组肺癌干细胞 IL-10mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, \text{A}$)

组别	IL-10	TGF- β_1
对照组($n=6$)	1.06 \pm 0.19	1.27 \pm 0.26
顺铂组($n=6$)	0.67 \pm 0.16*	0.77 \pm 0.14*
芪连扶正胶囊组($n=6$)	0.85 \pm 0.18*	1.01 \pm 0.20* Δ
联合组($n=6$)	0.47 \pm 0.12* Δ	0.50 \pm 0.10* Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与顺铂组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 肺癌干细胞 IL-10mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达

与对照组比较, 各用药组均可降低细胞 IL-10mRNA、TGF- β_1 mRNA 表达($P < 0.05$); 与顺铂组比较, 芪连扶正胶囊组 IL-10mRNA 表达差异无统计

学意义($P > 0.05$)、而联合组较之差异有统计学意义($P < 0.05$), TGF- β_1 mRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

肿瘤干细胞是存在于肺癌细胞中的一个亚群, 具有高度自我更新及无限增殖能力, 研究证实其与肿瘤发生、侵袭、转移及复发密切相关^[4], 是肺癌恶性表型的根源和潜在的治疗靶点, 肺癌也不例外^[5]。肿瘤的发生发展涉及到肿瘤细胞与机体免疫系统相互作用的复杂过程, 当机体发生肿瘤时, 肿瘤细胞可使自身不被免疫效应细胞杀伤即免疫逃逸^[6], 加之其分泌免疫抑制因子可改变肿瘤抑制的微环境、介导肿瘤细胞逃避免疫系统攻击, 促进肿瘤发生与生长^[7]。且机体免疫系统具有抗肿瘤的保护功能, 以及对肿瘤的重新塑型功能, 我们将后者称之为“免疫重塑”, 即免疫系统不断杀伤较高免疫原性的肿瘤细胞, 同时忽略低免疫原性的肿瘤细胞, 逐渐出现免疫原性更低、恶性程度更高的肿瘤表型, 并在体内存留下来的过程^[8]。免疫重塑不但可以影响机体免疫系统对肿瘤进行重塑与编辑, 亦可改变机体免疫系统相关成分, 从而更利于肿瘤免疫逃逸的形成, 以及肿瘤的浸润转移。免疫重塑的肿瘤细胞能产生大量抑制性细胞因子, 如 IL-10、TGF- β_1 等, 其通过直接接触及诱导该类因子削弱细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic Lymphocyte, CTL)、自然杀伤细胞的杀伤活性, 进而逃逸机体免疫监视, 促进肿瘤转移^[9-10]。其中, IL-10 是参与肿瘤免疫逃逸的重要免疫抑制因子, 具有双向免疫调节特性, 其介导免疫抑制机制是通过作用于不同免疫细胞亚群多途径发挥免疫抑制, 促进机体抗肿瘤免疫逃逸^[11]。而 TGF- β_1 可直接或间接作用于免疫细胞, 诱导其功能缺失, 帮助肿瘤逃避机体免疫监视功能, 促进肿瘤发展^[12]; 另外, TGF- β_1 可促进肿瘤组织血管生成、加速肿瘤细胞和外基质之间相互作用, 抑制机体免疫, 加速肿瘤生长及浸润转移^[13]。有研究证实 IL-10、TGF- β_1 参与肺癌患者肿瘤微环境构成, 是肺癌患者免疫应答受到抑制的原因之一, 促进了肺癌的发生发展及转移, 并强调两者可作为监控肺癌患者免疫功能的参考指标^[14]。

芪连扶正胶囊是我院研发的抗肿瘤自制剂, 前期临床研究观察了芪连扶正胶囊对化疗患者免疫功能的影响, 结果显示: 芪连扶正胶囊组提高白细胞及中性粒细胞计数明显, 有效率高达 94.29%, T 淋巴细胞亚群及自然杀伤细胞活性亦较对照组改善明显, 可保护机体免疫功能^[15]; 芪连扶正胶囊联合化

疗治疗晚期非小细胞肺癌可改善患者大部分临床症状, 提高生命质量, 保护机体免疫功能, 降低肿瘤标志物 CEA 与 CA125 水平, 减轻血液和消化道不良反应, 具有增效减毒作用^[16]; 其维持治疗晚期非小细胞肺癌的具有可行性, 可延长患者无疾病进展生存期^[17]。实验研究证实芪连扶正胶囊可增加荷瘤小鼠的免疫器官质量, 改善小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能, 提高荷瘤小鼠的自然杀伤细胞活性; 芪连扶正胶囊可提高细胞表面共刺激分子 B71、B72 的表达, 促进 T 细胞活化, 增强细胞免疫功能^[18]; 芪连扶正胶囊可通过调控 TGF- β_1 抑制肺癌 A549 细胞增殖侵袭及上皮间质转化的发生。前期研究从不同角度证实芪连扶正胶囊具有提高机体免疫力、抗肿瘤侵袭转移作用, 但具体机制有待进一步阐明。本研究观察了芪连扶正胶囊含药血清对肺癌干细胞免疫相关因子 IL-10、TGF- β_1 表达的影响, 结果显示芪连扶正胶囊可降低 IL-10、TGF- β_1 的蛋白及基因表达, 与对照组比较有显著性差异, 降低程度虽不及顺铂, 但与顺铂有协同作用。

综上所述, 肺癌干细胞是肺癌转移的根源, 免疫重塑加速肺癌转移, IL-10、TGF- β_1 是免疫逃逸的重要分子, 在免疫重塑过程中发挥重要作用, 而芪连扶正胶囊可通过降低 IL-10、TGF- β_1 表达改善细胞免疫抑制状态, 进而发挥调节免疫重塑、抑制肺癌转移的作用。基于此, 进一步探寻中医药免疫治疗靶点可为抑制肺癌转移及肺癌综合治疗提供新策略。

参考文献

- [1] Gazdic M, Simovic Markovic B, Jovicic N, et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Metastasis of Lung Cancer Cells by Downregulating Systemic Antitumor Immune Response [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 6294717.
- [2] Guo Q, Jin Z, Yuan Y, et al. New mechanisms of tumor-associated macrophages on promoting tumor progression: recent research advances and potential targets for tumor immunotherapy [J]. *J Immunol Res*, 2016, 2016: 9720912. Epub 2016 Nov 16.
- [3] 刘瑞, 张玉人, 李杰. 肿瘤相关巨噬细胞的免疫重塑—中药抗肿瘤治疗的新靶点 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(4): 470-473.
- [4] Albin A, Bruno A, Gallo C, et al. Cancer stem cells and the tumor microenvironment: interplay in tumor heterogeneity [J]. *Connect Tissue Res*, 2015, 56(5): 414-425.
- [5] Aoi T. Biology of lung cancer: genetic mutation, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cells [J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2016, 64(9): 517-523.
- [6] Millrud CR, Bergenfelz C, Leandersson K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(2): 3649-3665.
- [7] 张锦鹏, 李瑞超, 高轩, 等. 肿瘤免疫逃逸机制的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2017, 37(3): 367-372.

- [8] 薛娜,林洪生. 免疫编辑理论与中医药抗肿瘤免疫[J]. 中医杂志,2012,53(21):1801-1804.
- [9] Solinas G, Schiarea S, Liguori M, et al. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor; a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility[J]. J Immunol, 2010, 185(1): 642-652.
- [10] Wei J, Barr J, Kong LY, et al. Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(1): 67-78.
- [11] 王佳丽, 刘丽华. IL-10 对肿瘤免疫双向调节的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(1): 130-133.
- [12] Bellomo C, Caja L, Moustakas A. Transforming growth factor β as regulator of cancer stemness and metastasis[J]. Br J Cancer, 2016, 115(7): 761-769.
- [13] 王涛, 张泽峰, 高峰, 等. 肺癌患者血清 TGF- β_1 水平变化及其与临床特征的关系[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(30): 5911-5913, 5936.
- [14] 梁晶. 肺癌患者外周血 Treg 细胞与 IL-10、TGF- β 检测及其临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(11): 1980-1983.
- [15] 李慧杰, 孟双荣, 李秀荣. 芪连扶正胶囊对化疗患者免疫功能的影响[J]. 河南中医, 2009, 29(6): 561-562.
- [16] 李慧杰. 芪连扶正胶囊联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2010: 6-12.
- [17] 李慧杰, 齐元富, 李秀荣. 芪连扶正胶囊维持治疗晚期非小细胞肺癌优势分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 21-23.
- [18] 李秀荣, 张盈盈, 李慧杰, 等. 芪连扶正胶囊对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及 B7-CD28 共刺激通路的影响[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(4): 344-346.

(2017-10-29 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 1967 页)

- [14] Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants; 20 years on[J]. Trends Pharmacological Sciences, 2009, 30(11): 563-569.
- [15] SM Gibney, EM Fagan, Ann-Marie Waldrona, et al. Inhibition of stress-induced hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase exhibits antidepressant activity in an animal model of depressive behaviour[J]. The International Journal of Neuropsychopharmacology, 2014, 17(6): 917-928.
- [16] Laimer, Troester, Kloss, et al. Expression and prognostic impact of indoleamine 2,3-dioxygenase in oral squamous cell carcinomas[J]. 2011, 47(5): 352-357.
- [17] Reimold M, Batra A, Knobel A, et al. Anxiety is associated with reduced central serotonin transporter availability in unmedicated patients with unipolar major depression; a [^{11}C]DASB PET study[J]. Molecular Psychiatry, 2008, 13(6): 606-613, 557.
- [18] Joensuu M, Tolmunen T, Saarninen PI, et al. Reduced midbrain serotonin transporter availability in drug-naive patients with depression measured by SERT-specific [^{123}I] nor-beta-CIT SPECT imaging[J]. Psychiatry Res, 2007, 154(2): 125-131.
- [19] Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, et al. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation[J]. Clin Chim Acta, 2006, 364(1-2): 82-90.
- [20] 周静洋, 李丽娜, 范盎然, 等. 培元解郁方对 IFN γ 诱导抑郁模型大鼠的抗抑郁作用及 TRY-KYN 代谢途径的调节[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(2): 754-757.

(2017-09-09 收稿 责任编辑: 张文婷)