

实验

引用:张海桐,郭子硕,杨凯丽,王晓静,陈宛灵,李加玲,阮明月,王一帆,杜守颖,李鹏跃. 黄芪多糖促进T细胞介导的抗肿瘤免疫功能研究[J].中医导报,2025,31(4):8-13,20.

# 黄芪多糖促进T细胞介导的抗肿瘤免疫功能研究\*

张海桐,郭子硕,杨凯丽,王晓静,陈宛灵,李加玲,阮明月,王一帆,杜守颖,李鹏跃  
(北京中医药大学中药学院,北京 102488)

**[摘要]** 目的:探究黄芪多糖(APS)对T细胞介导的抗肿瘤免疫增强作用。方法:通过慢病毒试剂转染,用绿色荧光蛋白(GFP)转染Lewis肺癌细胞(LLC),使LLC细胞带上绿色荧光,构建LLC-GFP荧光细胞株。取C57BL/6荷瘤小鼠的脾脏,在体外培养状态稳定的原代T细胞。采用活细胞分析系统绿色荧光模式,以LLC-GFP细胞的平均荧光强度为指标,考察APS对T细胞杀伤能力的增强作用。分别采用IncuCyte®活细胞分析系统和流式细胞术分析APS对原代T细胞增殖和表型转化的影响。结果:细胞杀伤实验结果显示,与空白组比较,对照组及给药组荧光强度随时间延长而逐渐降低,APS组(40  $\mu\text{g/mL}$ )平均荧光强度最低,表明APS可提高T细胞对肺癌细胞的杀伤能力;细胞增殖实验表明,APS质量浓度为10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ 时可促进原代T细胞的增殖;细胞表型实验显示,40  $\mu\text{g/mL}$ 的APS组原代T细胞CD8<sup>+</sup>细胞的比例为40.5%,高于对照组(37.6%),说明APS具有免疫调节的作用。结论:APS可以通过增加T细胞杀伤肺癌细胞的功能,增强机体的抗肿瘤免疫能力,实现抗肿瘤的作用。

**[关键词]** 肺癌;黄芪多糖;T细胞;免疫增强;抗肿瘤

**[中图分类号]** R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)04-08-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.002

## The Study of Astragalus Polysaccharides Promoting T Cell-Mediated Anti-Tumor Immune Function

ZHANG Haitong, GUO Zishuo, YANG Kaili, WANG Xiaojing, CHEN Wanling, LI Jialing, RUAN Mingyue, WANG Yifan, DU Shouying, LI Pengyue

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the anti-tumor immune-enhancing effect of Astragalus polysaccharide (APS) on T cell-mediated immunity. Methods: The LLC-GFP fluorescent cell line was constructed by transfecting Lewis lung cancer cells (LLC) with green fluorescent protein (GFP) through lentiviral reagent transfection to bring green fluorescence to LLC cells. The spleen of C57BL/6 hormonal mice was taken, and the primary T cells in stable state were cultured *in vitro*. The green fluorescence mode of the live cell analysis system was used to investigate the enhancement of T cell killing ability by Astragalus polysaccharide, with the average fluorescence intensity of LLC-GFP cells as an index. The effects of Astragali polysaccharides on the proliferation and phenotypic transformation of primary T cells were analyzed by IncuCyteR Live Cell Analysis System and flow cytometry, respectively. Results: The results of cell killing experiments showed that compared with the blank group, the fluorescence intensity of the control group and the administered group decreased gradually with the increase of time, and that APS group (40  $\mu\text{g/mL}$ ) showed the lowest average fluorescence intensity, which indicated that APS could enhance the killing ability of T cells against lung cancer cells. The proliferation assay showed that APS could promote the proliferation of primary T cells with the concentration at 10, 20 and 40  $\mu\text{g/mL}$ . The cell phenotype assay showed that the proportion of CD8<sup>+</sup> cells in primary T cells was 40.5% in the APS group (40  $\mu\text{g/mL}$ ), which was higher than that in the control group (37.6%). It indicated that APS played a role in immunomodulation. Conclusion: Astragalus polysaccharide can enhance the anti-tumor

\*基金项目:国家自然科学基金项目(82274111)

通信作者:李鹏跃,男,教授,研究方向为中药新技术与新剂型研究

immunity of the body and achieve anti-tumor effects by increasing the ability of T cells to kill lung cancer cells.

[Keywords] lung cancer; Astragalus polysaccharide; T cells; immune enhancement; anti-tumor

肺癌是男性癌症死亡的主要原因,也是女性癌症死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。肺癌传统治疗方式有手术切除、化疗、放疗等。这些方式几乎都存在非特异性靶向、低生物利用度和耐药性等问题<sup>[2]</sup>。随着生物技术的提高,一系列先进的肺癌治疗策略已应用于临床。其中肺癌免疫治疗是较为有效的方式之一,主要包括免疫检查点抑制剂、癌症疫苗和细胞免疫疗法<sup>[3]</sup>。免疫治疗可以动态调节免疫系统,对肿瘤细胞实现多靶点攻击,具有特异性强、靶向性强、副作用小和无耐药性等特点<sup>[4]</sup>,在临床抗肿瘤中具有广阔的应用前景。

多糖作为一种天然高分子多聚物,是草本植物药效成分之一,能增强CD8<sup>+</sup>T细胞功能,降低调节性T细胞抑制,减轻免疫抑制,促进T细胞增殖<sup>[5-7]</sup>。黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)具有免疫调节作用,可以激活免疫器官和免疫细胞,释放免疫活性物质。体内研究显示,黄芪多糖可以通过促进T淋巴细胞增殖和产生多种细胞因子打破磷酰胺对小鼠的免疫抑制<sup>[8-9]</sup>。

本研究采用慢病毒转染的方式构建T细胞与Lewis肺癌细胞(Lewis lung cancer cells, LLC)-绿色荧光蛋白GFP(green fluorescent protein, GFP)细胞共培养模型,通过IncuCyte®活细胞成像实时检测系统和流式细胞术,研究APS对T细胞增殖、表型及杀伤的影响。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞系 SPF级6~8周龄C57BL/6雄性小鼠,体质量为(20.00±1.50)g,购于斯贝福生物公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物质量合格证号:110324231101538916。实验过程中所有小鼠均饲养于北京中医药大学SPF级动物房,恒温(24±1)℃,相对湿度55%~65%,自由饮食、饮水,昼夜节律12 h/12 h循环。本实验已通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审查(BCUM-2023100901-4005)。

Lewis肺癌(LLC)细胞系(北纳生物有限公司,批号:BNCC100069)。

1.2 药物与试剂 RPMI Medium 1640培养基(批号:2561359)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号:8123608)均购于美国Grand Island Biological Company公司;0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA,批号:25200056)、胎牛血清(批号:10099141C)及青霉素-链霉素(双抗,含100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素,批号:15140122)均购自美国英杰生命技术有限公司;嘌呤霉素(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0351);二甲基亚砜(上海源叶公司,批号:A03GS156736,分析纯,纯度99%);聚凝胺(美国Sigma-Aldrich公司,批号:107689);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(北京拜尔迪生物技术有限公司,质量分数98%,批号:2018092101);IL-2(苏州近岸蛋白质科技有限公司,批号:CK24);AO/PI荧光染料(上海睿钰生物科技有限公司,批号:re010212);小鼠淋巴细胞分离液(北京康瑞纳生物科技有限公司,批号:FL1086);注射用黄芪多糖

(天津赛诺制药有限公司,批号:190102);7-AAD(美国BioLegend公司,批号:228563);IncuCyte® Nuclight Green Lentivirus慢病毒转染试剂(美国Essen BioScience公司,批号:4624);Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD3ε 抗体(批号:563565)、Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD28 抗体(批号:102115)、PE-CD3流式抗体(批号:553075)及APC-CD8流式抗体(批号:17577382)均购自美国BioLegend公司;FITC-CD4流式抗体(美国赛默飞世尔科技公司,批号:11004181)。

1.3 主要仪器 C170型二氧化碳培养箱(德国Binder公司);CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);Captair Bio 321 Smart型超净工作台(法国Erlab公司);Eppendorf手动移液器(德国艾本德股份公司);BSA224S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];MoFlo XDP型流式细胞分选仪(美国Beckman Coulter公司);IQ 7000型Milli-Q实验室纯水机[默克化工技术(上海)有限公司];全自动细胞计数仪(美国Counter star公司);FACSCanto II 流式细胞仪(美国Becton, Dickinson公司);SIM-F140AY65-PC型制冰机(日本SANYO公司);IncuCyte®活细胞成像实时检测系统(美国Essen BioScience公司);Epoch型全波长酶标仪(美国BioTek公司)。

## 1.4 LLC-GFP细胞株构建

1.4.1 嘌呤霉素完全致死浓度和聚凝胺安全浓度范围考察 (1)嘌呤霉素完全致死浓度考察:将LLC细胞分为空白组、对照组和给药组(5 μg/mL嘌呤霉素组、10 μg/mL嘌呤霉素组、20 μg/mL嘌呤霉素组、40 μg/mL嘌呤霉素组)。空白组只加入1640基础培养基,不接种细胞,对照组加入等体积1640基础培养基,给药组加入等体积含药1640基础培养基。

(2)聚凝胺安全浓度范考察:将LLC细胞分为对照组和给药组(1 μg/mL聚凝胺组、2 μg/mL聚凝胺组、4 μg/mL聚凝胺组、8 μg/mL聚凝胺组、16 μg/mL聚凝胺组)。对照组加入等体积1640基础培养基,给药组加入等体积含药1640基础培养基。

培养LLC细胞到达一定密度后,用0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的LLC细胞,以培养基轻轻吹打得单细胞悬液,在96孔板中接种LLC细胞,每孔加入100 μL,边缘孔填充PBS,接种密度为5×10<sup>4</sup>个/mL。将96孔板置于细胞培养箱中孵育过夜,至细胞贴壁生长。吸弃原培养基,给药组加入等体积含药1640基础培养基,空白组只加入1640基础培养基不接种细胞,对照组加入等体积1640基础培养基,继续培养24 h后,吸出孔中溶液,加入10 μL MTT工作液,避光孵育4 h后,弃去药液,加入150 μL二甲基亚砜溶液,振荡使紫色结晶物充分溶解,酶标仪490 nm处测定吸光度值并记录实验结果。

1.4.2 慢病毒转染LLC细胞及筛选 培养LLC细胞,到达一定密度后,用0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的LLC细胞,以培养基轻轻吹打得单细胞悬液,在96孔板中接种LLC细胞,每孔加入100 μL,边缘孔填充PBS,接种密度为5×10<sup>4</sup>个/mL。将96孔

板置于细胞培养箱中孵育过夜,至细胞贴壁生长。弃去原培养基,加入含8  $\mu\text{g/mL}$ 聚凝胺和IncuCyte® Nuclight Green Lentivirus的1640基础培养基,病毒滴度设置为6。放置于IncuCyte®活细胞成像实时检测系统,选择Green荧光模式观察48 h。弃去原培养基,加入不含青霉素/链霉素的1640完全培养基,置于细胞培养箱中培养。细胞培养至一定数量后,更换培养基为含10  $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的完全培养基,培养箱中孵育24 h,弃去原培养液,PBS清洗2次,加入新鲜的1640完全培养基继续培养。

**1.4.3 流式分选阳性LLC-GFP细胞** 培养LLC细胞,到达一定密度后,用0.25%胰蛋白酶消化对数生长期的LLC细胞,以培养基轻轻吹打得单细胞悬液,170 $\times g$ 离心3 min,弃去上清液,加入PBS重悬细胞,并将单细胞悬液过滤至流式分选管中,于流式细胞分选仪分选阳性目的细胞至含1640完全培养基的96孔板中,放置于IncuCyte®活细胞成像实时检测系统,选择Green荧光模式观察。

### 1.5 原代T细胞提取及培养方法建立

**1.5.1 C57BL/6荷瘤小鼠模型构建** 培养箱中培养LLC细胞,待细胞长满培养皿时,PBS清洗两遍,0.25%胰蛋白酶消化3 min,1640完全培养基重悬,170 $\times g$ 离心3 min,弃上清,1640完全培养基重悬细胞沉淀,最终配制成 $5\times 10^7$ 个/mL的细胞悬液,采用皮下注射的方法,每只C57BL/6小鼠皮下注射100  $\mu\text{L}$ 悬液。

**1.5.2 CD3 $\epsilon$ 抗体包被24孔板** 在取原代细胞的前一天,提前包被24孔板。配制含5  $\mu\text{g/mL}$  CD3 $\epsilon$ 抗体的PBS溶液,24孔板每孔加入500  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。

C57BL/6小鼠肿瘤体积长至200  $\text{mm}^3$ 时,脱颈椎处死,75%乙醇浸泡2 min,解剖小鼠,取出脾脏,用含10%胎牛血清(FBS)的PBS清洗,剪碎,将剪碎后的脾脏组织置于40  $\mu\text{m}$ 筛网上,边研磨边用1 mL含10% FBS的PBS冲洗,200 $\times g$ 离心5 min将细胞沉淀下来,6 mL 1640完全培养基重悬后,采用滴管缓慢滴加至含6 mL小鼠淋巴细胞分离液的离心管中,可见到明显的分层,离心30 min(离心条件为升1降0,800 $\times g$ ,20  $^{\circ}\text{C}$ ),吸出中间白膜层,5倍以上PBS稀释后,600 $\times g$ 离心10 min,弃上清,采用含10% FBS的PBS清洗3次,1 mL 1640完全培养基重悬,采用AO/PI荧光染料1:1染色,细胞计数仪记录数量和存活率。

**1.5.3 原代T细胞培养** 取提前包被CD3 $\epsilon$ 抗体的24孔板,弃去包被液,预冷的PBS清洗各孔3次,备用。1640完全培养基充分分散,配制成 $1\times 10^6$ 个/mL的原代T细胞悬液,加入2  $\mu\text{g/mL}$ 的CD28激活抗体及100 U/mL的IL-2,充分吹打均匀后,24孔板每孔加入500  $\mu\text{L}$ 细胞悬液,置于二氧化碳培养箱中培养。

**半量换液培养法培养T细胞:**原代T细胞培养至第3天时,采用半换液的方法换液或传代并记录细胞存活率变化情况,取24孔板培养的细胞,200 $\times g$ 离心5 min,取其中一半上清液1 000 $\times g$ 离心5 min,另外一半上清液弃去,加入新鲜的完全培养基重悬,并加入1 000 $\times g$ 离心后培养液的上清液,充分混匀后加入100 U/mL的IL-2,置于二氧化碳培养箱中继续培养。

### 1.6 APS对原代T细胞介导的免疫功能的影响

**1.6.1 APS对T细胞杀伤作用的影响** (1)T细胞杀伤性研究:将原代T细胞分为空白组(不加T细胞)、对照组、给药组[APS组(5  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(10  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(20  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组

(40  $\mu\text{g/mL}$ )。空白组不加入T细胞悬液,对照组加入T细胞悬液但不给药,给药组加入T细胞悬液并给予相应浓度黄芪多糖。

(2)LLC-GFP细胞荧光强度变化研究:将原代T细胞分为对照组、给药组[APS组(5  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(10  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(20  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(40  $\mu\text{g/mL}$ )。对照组不加入黄芪多糖,给药组加入相应浓度黄芪多糖。

**培养转染的LLC-GFP细胞。**提前配制 $5\times 10^4$ 个/mL的LLC-GFP细胞悬液,96孔板中间部分每孔接种100  $\mu\text{L}$ ,周围采用PBS填充,培养箱中孵育24 h贴壁。提取并培养原代T细胞,待细胞状态稳定后,取T细胞悬液,200 $\times g$ 离心5 min后弃去上清液,加入新鲜的1640完全培养基重悬,取10  $\mu\text{L}$ 细胞悬液,采用AO/PI荧光染料染色后加入细胞计数板中,细胞计数器记录活细胞数量。

采用含不同浓度黄芪多糖的1640完全培养基配置成 $1\times 10^6$ 个/mL的细胞悬液,24孔板每孔500  $\mu\text{L}$ ,培养箱中孵育24 h,200 $\times g$ 离心5 min,弃上清,PBS清洗2次,1640完全培养基重悬。取接种LLC-GFP细胞的96孔板,移液枪吸出培养液,PBS清洗2次,每孔加入100  $\mu\text{L}$ 配置的T细胞悬液,置于IncuCyte®活细胞成像分析系统中,选择绿色荧光模式,观察LLC-GFP细胞荧光强度变化,采用每孔细胞的荧光强度表征T细胞对LLC-GFP细胞的杀伤性强弱。时间设置为24 h。

**1.6.2 APS对原代T细胞增殖的影响** 将提取的原代T细胞分为对照组、给药组[APS组(5  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(10  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(20  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(40  $\mu\text{g/mL}$ )。对照组加入等体积1640基础培养基,给药组加入相应浓度的黄芪多糖。

提取并培养原代T细胞,待原代T细胞状态稳定后,200 $\times g$ 离心5 min,收集原代T细胞并配制成 $5\times 10^4$ 个/mL的细胞悬液,96孔板每孔接种100  $\mu\text{L}$ ,并向每孔中加入不同浓度的黄芪多糖。最后将96孔板放置于IncuCyte®活细胞成像分析系统中孵育24 h。采用IncuCyte®活细胞成像分析系统考察黄芪多糖对荷瘤小鼠原代T细胞增殖的影响。

**1.6.3 APS对原代T细胞中CD8 $^{+}$ T细胞比例的影响** 将原代T细胞分为对照组、给药组[APS组(5  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(10  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(20  $\mu\text{g/mL}$ )、APS组(40  $\mu\text{g/mL}$ )。对照组加入等体积1640基础培养基,给药组加入含相应浓度黄芪多糖的1640培养基。

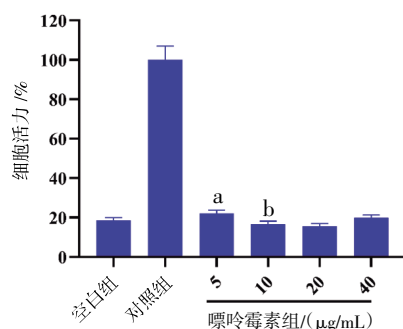
提取并培养荷瘤小鼠的脾脏原代T细胞,待细胞状态稳定后,200 $\times g$ 离心5 min收集原代T细胞并配制成 $1\times 10^6$ 个/mL的细胞悬液,24孔板每孔接种1 mL,采用含不同浓度APS的1640完全培养基孵育24 h,24 h后200 $\times g$ 离心5 min,弃上清,100  $\mu\text{L}$  PBS重悬,7-AAD活性染料、PE-CD3、APC-CD8、FITC-CD4抗体染色,冰浴40 min,200 $\times g$ 离心10 min,弃上清,并用PBS清洗3次,500  $\mu\text{L}$  PBS重悬,过滤后通过流式检测T细胞表型(CD8 $^{+}$ T细胞的比例)。

**1.7 统计学方法** 采用IBM SPSS V27.0统计软件进行统计分析,计量资料服从正态分布且方差齐,以“均数 $\pm$ 标准差”( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组之间比较采用独立样本 $t$ 检验。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较用LSD法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 LLC-GFP荧光细胞株构建

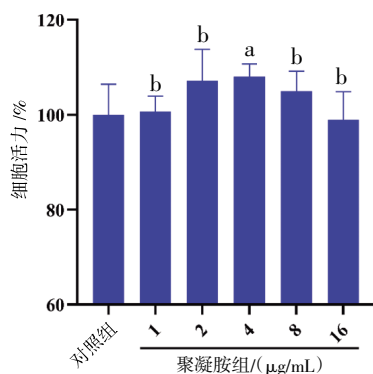
2.1.1 嘌呤霉素完全致死浓度考察结果 不同质量浓度嘌呤霉素(40  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ )作用24 h,对LLC细胞活力的影响存在一定差异。嘌呤霉素质量浓度为5、10、20  $\mu\text{g/mL}$ 时,随着浓度的增加,对细胞活力的损伤也不断增加。5  $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素组细胞活力高于空白组( $P<0.01$ )。10  $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素组细胞活力与空白组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。因此,本实验选择10  $\mu\text{g/mL}$ 为嘌呤霉素对LLC细胞的完全致死浓度。(见图1)



注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P>0.05$ 。

图1 不同浓度嘌呤霉素作用24 h对LLC细胞活力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

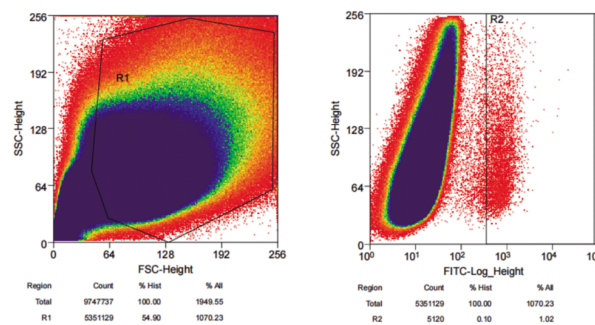
2.1.2 聚凝胺安全浓度范围考察结果 聚凝胺质量浓度为1、2、4  $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞活性随着给药浓度的增加而升高,8  $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活力虽有所下降,但仍高于对照组。聚凝胺浓度在16  $\mu\text{g/mL}$ 时对LLC细胞无明显毒性作用。本研究最终选择聚凝胺浓度为16  $\mu\text{g/mL}$ 进行转染。(见图2)



注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P>0.05$ 。

图2 不同浓度聚凝胺作用24 h对LLC细胞活力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

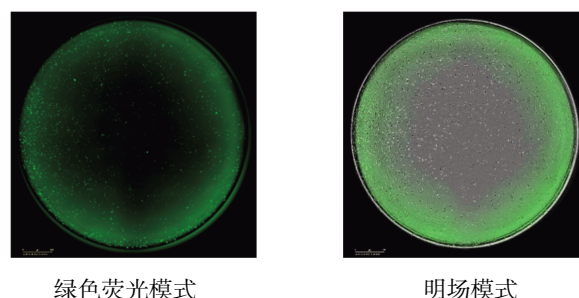
2.1.3 流式分选阳性LLC-GFP细胞结果 去除不能表达GFP蛋白的LLC细胞,将稳定表达GFP蛋白的LLC细胞接种于含有培养基的96孔板中,R1区域排除死细胞及细胞碎片等干扰,R2区域为阳性目的细胞,即能稳定表达GFP蛋白、带绿色荧光的LLC细胞。将96孔板置于IncuCyte®活细胞成像实时检测系统,选择Green荧光模式观察。LLC细胞均带有绿色荧光。(见图3~4)



R1区域筛选去除细胞碎片和死细胞

R2区域筛选出LLC-GFP细胞

图3 流式细胞分选仪分选阳性LLC-GFP细胞结果



绿色荧光模式

明场模式

图4 流式细胞分选仪分选阳性LLC-GFP细胞绿色荧光观察

2.2 原代T细胞提取及培养方法建立 T细胞在不同的时间均出现克隆团(T细胞扩增时出现),且随着时间延长克隆团越来越多,在72 h时克隆团最多(黑色虚线方框标注所示),提示原代T细胞生长及增殖状态良好。(见图5)

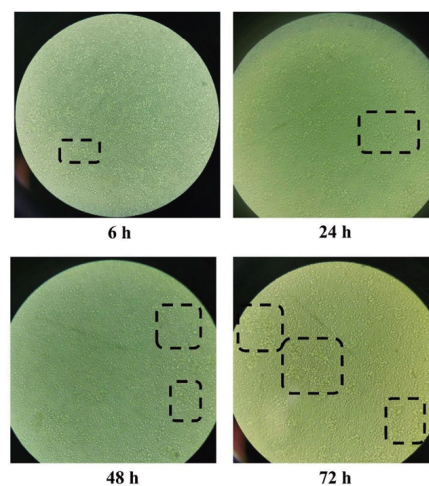


图5 原代T细胞在培养不同时间时的生长状态图 ( $\times 20$ )

原代T细胞在取材的第1天存活率为98%,提示取材方法可取,之后在第2天和第3天存活率急剧下降,原因是提取出来的脾脏淋巴细胞中不仅有T细胞,还有很大比例的其他种类的白细胞(如B细胞、粒细胞等)。其中T细胞由于受到包被抗体刺激而被激活并增殖,而其他淋巴细胞没有被激活,逐渐凋亡并随着低速离心逐渐与T细胞分开。第2天之后T细胞存活率逐渐提高,第5天后逐渐稳定在90%左右。T细胞数目随着时间延长逐渐增加,在第5天,由最初计数的 $2 \times 10^6$ 个活细胞增至 $2 \times 10^7$ 个活细胞,扩增了10倍,提示T细胞存活状态逐渐稳定。(见图6)

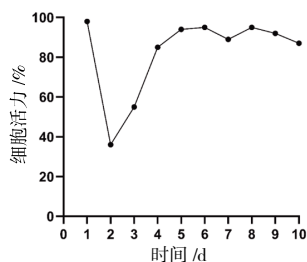


图6 原代T细胞存活率变化

### 2.3 APS对T细胞介导的免疫功能的影响

2.3.1 APS对T细胞杀伤性的影响 空白组细胞随着时间的延长,荧光强度逐渐增加,提示LLC-GFP细胞在没有T细胞的干预下细胞数量逐渐增加。对照组和各给药组每孔平均荧光强度均随着时间延长而逐渐降低。24 h后各给药组每孔平均荧光强度均低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),其中浓度为40  $\mu\text{g/mL}$ 的APS组每孔平均荧光强度最低。结果提示LLC-GFP细胞在T细胞的干预下细胞数量逐渐减少。APS能提高荷瘤小鼠原代T细胞对肺癌细胞的杀伤能力。(见图7~8)

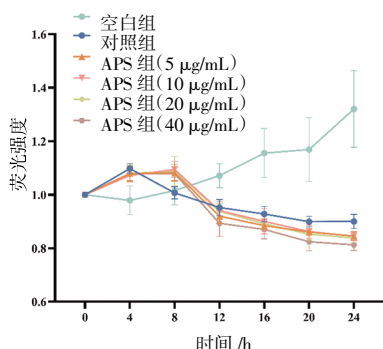
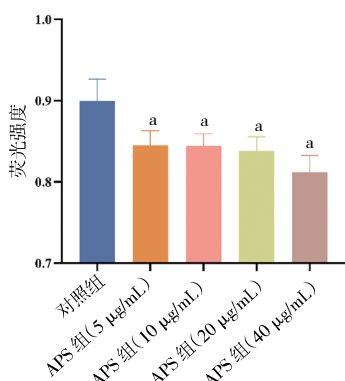


图7 各组荧光强度比较 ( $n=5$ )



注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ 。

图8 24 h后各组 LLC-GFP 细胞荧光强度比较 ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

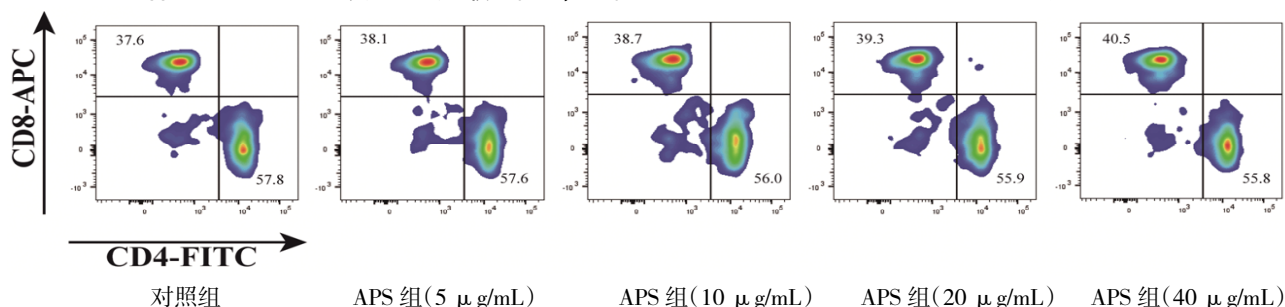


图11 各组小鼠脾脏 CD8<sup>+</sup>T 细胞比例

2.3.2 APS对T细胞增殖的影响 经过含5  $\mu\text{g/mL}$ 黄芪多糖的1640完全培养基孵育后,24 h内原代T细胞的增殖效果与对照组没有显著性差异。推测其原因是黄芪多糖的浓度太低,对原代T细胞的激活效果有限。而经过含APS(质量浓度分别为10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ )1640完全培养基孵育后,原代T细胞的增殖效果明显( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。由此推测,黄芪多糖能够提高原代T细胞的增殖能力,进而增强T细胞介导的抗肿瘤免疫反应。(见图9~10)

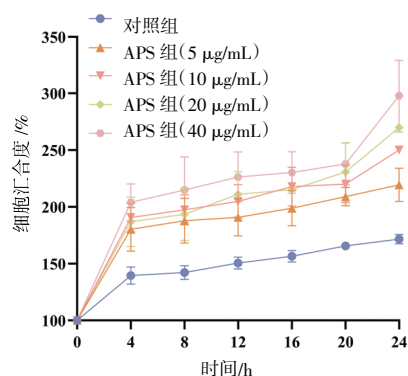
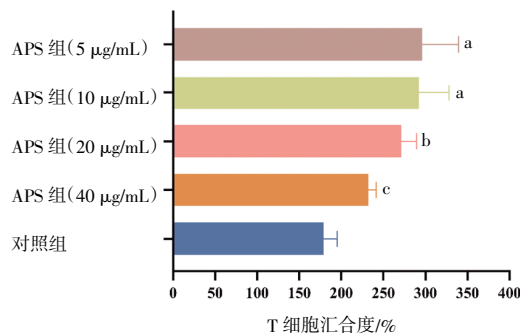


图9 24 h 时各组原代T细胞汇合度比较 ( $n=3$ )



注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P>0.05$ 。

图10 各组原代T细胞汇合度比较 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

2.3.3 APS对T细胞表型的影响 CD8<sup>+</sup>T细胞又被称为细胞毒性T淋巴细胞,是抗肿瘤过程中主要杀伤肿瘤细胞的一类细胞。对照组原代T细胞的CD8<sup>+</sup>细胞的比例为37.6%,而在APS孵育后CD8<sup>+</sup>T细胞比例均提高,且随着浓度的增加比例逐渐提高。40  $\mu\text{g/mL}$  APS孵育后,原代T细胞的CD8<sup>+</sup>T细胞的比例最高(40.5%)。表明APS孵育原代T细胞后,可以提高原代T细胞中CD8<sup>+</sup>T细胞的比例,发挥免疫调节的作用。(见图11)

### 3 讨论

肺癌的病机为脾胃中气虚损,肝肺升降不利,痰瘀蕴毒<sup>[10]</sup>。化疗等常规治疗方法配合补益药物,可提高机体免疫能力,



从而增强抗肿瘤作用<sup>[11]</sup>。黄芪是临床上常用的补气中药<sup>[12]</sup>,能大补肺气,益肾水之上源<sup>[13]</sup>。黄芪多糖是其主要的活性成分。

肿瘤微环境由多种细胞相互作用构成。由2种及以上的细胞构成的共培养模型,有助于探索细胞之间的互作关系,模拟肿瘤微环境<sup>[14]</sup>。谢钰珍等<sup>[15]</sup>通过将GFP转入结肠癌细胞(HT29),构建了稳定表达PD-L1-GFP报告基因的HT29结肠癌细胞株。李沐涵等<sup>[16]</sup>研究表明,乳腺癌细胞与淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cells,LECs)共培养后,血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1,TSP-1)对肿瘤微环境下的LECs增殖、迁移和侵袭能力有抑制作用。赵慧咏等<sup>[17]</sup>研究发现巨噬细胞-肝癌细胞共培养能增加肿瘤相关巨噬细胞趋化因子(C-X-C motif chemokine Ligand 1,CXCL1)表达,促进肝癌细胞系Huh7进展。本实验首先用慢病毒转染,通过10  $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选转染成功的细胞,并采用16  $\mu\text{g/mL}$ 聚凝胺提高转染成功率,构建稳定荧光细胞系,然后将此细胞与原代T细胞进行共培养,建立了更为直观的体外肺癌微环境。

免疫系统由免疫器官、免疫细胞及免疫活性物质组成<sup>[18]</sup>。免疫系统在肿瘤的发生、发展、转移及消退等过程均发挥着重要的作用。研究<sup>[19]</sup>表明,免疫系统可通过消除或抑制病毒感染,防止炎症环境建立,特异性识别和清除组织中的肿瘤细胞,预防肿瘤的发生。随着科学研究的发展,免疫系统在抗肿瘤过程中的作用得到充分证明,免疫疗法在肿瘤治疗中的应用也越来越广泛。免疫疗法具有耐受性高、安全性好、免疫记忆可持续及有效性高等特点<sup>[20]</sup>。免疫疗法能重新激活肿瘤-免疫循环<sup>[21]</sup>,使机体抗肿瘤免疫反应重新活跃,实现对肿瘤的控制和清除。T细胞是机体重要的免疫细胞,能发挥细胞免疫及免疫调节等功能<sup>[22]</sup>。机体免疫稳态依赖于T细胞共刺激和共抑制信号的平衡,而癌细胞常常利用这些信号逃避免疫攻击<sup>[23]</sup>。T细胞介导的肿瘤特异性抗原(tumor specific antigen,TSA)和肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA)定向的细胞毒性等,可引起细胞免疫,从而对肿瘤细胞起到杀伤作用<sup>[24]</sup>。多糖对免疫系统具有激活作用。有研究<sup>[25]</sup>显示,APS可以通过调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路和改善免疫功能,发挥对食管癌的抑制作用。CD8<sup>+</sup>T细胞是起杀伤肿瘤作用的主要细胞之一<sup>[26]</sup>。APS能够调控结肠癌肿瘤微环境,增加CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润<sup>[27]</sup>。在肺癌荷瘤小鼠中,APS能通过增加CD4<sup>+</sup>T细胞与CD8<sup>+</sup>T细胞的比例以及白细胞介素-2(interleukin-2,IL-2)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )的表达来改善顺铂引起的免疫抑制<sup>[28]</sup>。本实验结果显示,当APS质量浓度为40  $\mu\text{g/mL}$ 时,T细胞对LLC细胞杀伤作用最强,且APS能促进原代T细胞的增殖。流式分选结果显示,T细胞中CD8<sup>+</sup>T细胞比例显著提高。增加CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润,可起到杀伤肿瘤的作用。

综上所述,APS可通过影响T细胞的增殖、表型和杀伤作用等,进而促进T细胞介导的免疫作用,但是具体的作用机制和发挥作用的因子尚不明确。

## 参考文献

- [1] LEITER A, VELUSWAMY R R, WISNIVESKY J P. The global burden of lung cancer: Current status and future trends[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2023,20(9):624-639.
- [2] LI Y T, YAN B S, HE S M. Advances and challenges in the treatment of lung cancer[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2023,169:115891.
- [3] OLIVEIRA G, WU C J. Dynamics and specificities of T cells in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*,2023,23(5):295-316.
- [4] TAN S Z, LI D P, ZHU X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond[J]. *Biomed Pharmacother*,2020,124:109821.
- [5] 钱一雯,薛珺瑜,钱诗雨,等.补气类中药多糖对动物结肠癌细胞作用的研究进展[J].*中国民族民间医药*,2024,33(1):67-72.
- [6] HUANG J M, LIU D, WANG Y W, et al. Ginseng polysaccharides alter the gut microbiota and kynurenine/tryptophan ratio, potentiating the antitumour effect of antiprogrammed cell death 1/programmed cell death ligand 1 (anti-PD-1/PD-L1) immunotherapy[J]. *Gut*,2022,71(4):734-745.
- [7] CHEN S Y, LIANG L N, WANG Y, et al. Synergistic immunotherapeutic effects of Lyciumbarbarum polysaccharide and interferon- $\alpha$ 2b on the murine Renca renal cell carcinoma cell line in vitro and in vivo[J]. *Mol Med Rep*, 2015,12(5):6727-6737.
- [8] YANG T H, JIA M, MENG J, et al. Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from Angelica sinensis[J]. *Int J Biol Macromol*,2006,39(4-5):179-184.
- [9] OLIVO PIMENTEL V, YAROMINA A, MARCUS D, et al. A novel co-culture assay to assess anti-tumor CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity via luminescence and multicolor flow cytometry[J]. *J Immunol Methods*,2020,487:112899.
- [10] 王怡超,焦丽静,胡佩珮,等.许玲从一气周流分析肺癌的因机证治[J].*中医导报*,2021,27(8):185-187.
- [11] 王玉,张露,汤磊磊,等.中医药调控肺癌辐射治疗作用机制研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2024,30(8):253-261.
- [12] 李艳.扶正祛邪化毒法在肿瘤治疗中的应用[J].*中医临床杂志*,2009,21(6):487-489.
- [13] 王翔,王鹏,杨芳艳,等.张锡纯辨治肺癆学术经验[J].*中医导报*,2024,30(8):120-123.
- [14] 秦燕勤,刘含,李建生.COPD细胞微环境体外模型建立的思路与方法[J].*中国药理学通报*,2024,40(1):6-12.
- [15] 谢钰珍,覃鸿妮,吴凡,等.基于CRISPR/Cas9基因编辑技术构建PD-L1-GFP报告基因HT29细胞株[J].*山东理工大学学报(自然科学版)*,2024,38(2):67-72.
- [16] 李沐涵,赵红博,熊桂红,等.TSP-1对体(下转第20页)

- [8] 陈怡,李道成.子宫颈癌患者的中医中药治疗[J].中国实用妇科与产科杂志,2024,40(1):45-49.
- [9] 王子承,王海波,王颖,等.“虚劳干血”理论指导下复元活血汤合大黄蛰虫丸对乳腺癌癌因性疲乏的干预效果研究[J/OL].中华中医药学刊,2024:1-8.(2024-05-07).https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20240506.1139.010.html.
- [10] 彭皇青,边庆华,陈荣荣.桂枝茯苓丸联合大黄蛰虫丸治疗卵巢囊肿的临床疗效[J].检验医学与临床,2023,20(3):383-386.
- [11] TIAN Y Y, MA B B, YU S Y, et al. Clinical antitumor application and pharmacological mechanisms of Dahuang Zhechong Pill[J]. Chin Herb Med, 2023, 15(2): 169-180.
- [12] 刘丽,王建成,韩庆霞,等.UPLC-MS/MS测定大黄蛰虫丸中的9种成分[J].食品与药品,2023,25(5):426-431.
- [13] 王剑,孙永东,周兴玮,等.黄芩素经由miR-125b-5p/IRF4轴进而促进喉癌细胞死亡并抑制其侵袭的机制研究[J].中国临床药理学与治疗学,2023,28(11):1209-1218.
- [14] LUO Y H, ZHANG L, WANG M Y, et al. Anti-cancer effects of baicalein on cervical carcinoma cells through down-regulation of the ERK/p38/MAPK pathway[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2021, 35(3): 945-952.
- [15] 谢燕华,康超,猴娇,等.黄芩苷诱导人肝癌HepG-2细胞凋亡及对Bcl-2和Bax蛋白表达的影响[J].陕西中医药大学学报,2023,46(5):78-82.
- [16] 熊梦雨.黄芩苷通过HPVE6/E7调控Wnt3a/ $\beta$ -catenin通路影响宫颈癌HeLa细胞的研究[D].十堰:湖北医药学院,2023.
- [17] 司晓丽,韩玉梅,王家敏,等.芍药苷对结肠癌SW480细胞增殖、侵袭、迁移的影响[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2019,28(2):127-133.
- [18] 张璨,林鹏,杨玉,等.芍药苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J].癌变·畸变·突变,2024,36(2):164-167.
- [19] EL-SEWEDYT, SALAMA A F, MOHAMED A E, et al. Hepatocellular carcinoma cells: Activity of amygdalin and sorafenib in targeting AMPK/mTOR and BCL-2 for anti-angiogenesis and apoptosis cell death[J]. BMC-Complement Med Ther, 2023, 23(1): 329.
- [20] FOLKERTS H, HILGENDORF S, VELLENGA E, et al. The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment[J]. Med Res Rev, 2019, 39(2): 517-560.
- [21] 徐明瑶,谢胜,黎丽群,等.自噬-凋亡平衡调控在结直肠癌中的作用及中药干预研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(23):207-217.
- [22] MARIÑO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE E H, et al. Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(2): 81-94.
- [23] MARQUEZ R T, XU L. Bcl-2: Beclin 1 complex: Multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch[J]. Am J Cancer Res, 2012, 2(2): 214-221.
- [24] ADAMS J M, CORY S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(5): 488-496.
- [25] LUO S, RUBINSZTEIN D C. Apoptosis blocks beclin 1-dependent autophagosome synthesis: An effect rescued by bcl-xL[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 268-277.
- [26] ZHU Y S, ZHAO L X, LIU L, et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis[J]. Protein Cell, 2010, 1(5): 468-477.

(收稿日期:2024-10-14 编辑:罗英姣)

(上接第13页)外肿瘤微环境下的LECs增殖、迁移和侵袭的影响[J].航空航天医学杂志,2024,35(8):972-976.

- [17] 赵慧咏,魏昇,杨茗皓,等.肿瘤相关巨噬细胞及其分泌的CXCL1对肝癌细胞系Huh7生物学行为的影响[J].安徽医科大学学报,2023,58(3):398-404.
- [18] 李荣荣,瞿申红,张少杰,等.miR-155/GATA3/CD4<sup>+</sup>T细胞通路对变应性鼻炎发病机制的调控[J].中国免疫学杂志,2024,40(3):629-635.
- [19] VESELY M D, KERSHAW M H, SCHREIBER R D, et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2011, 29: 235-271.
- [20] LAHIRI A, MAJI A, POTDAR P D, et al. Lung cancer immunotherapy: Progress, pitfalls, and promises[J]. Mol Cancer, 2023, 22(1): 40.
- [21] 向莉,王爱荣,江高峰.肿瘤免疫循环调节研究进展[J].肿瘤药学,2021,11(4):420-425.
- [22] 燕羽婷,李昕蓉,李岩,等.补益药红芪免疫调节作用机制研究进展[J].中草药,2024,55(16):5656-5668.
- [23] 陈静,吴涛,刘雪松.肿瘤免疫:免疫系统与肿瘤细胞的持续战斗[J].科学(上海),2023,75(5):12-16.
- [24] PARDOLL D. Does the immune system see tumors as foreign or self? [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 807-839.
- [25] 陈耀华,豆亚伟,周理乾,等.黄芪多糖基于PI3K/Akt通路对食管癌大鼠抑瘤作用及免疫功能的影响[J].现代生物医学进展,2023,23(16):3032-3036.
- [26] PADINHARAYIL H, ALAPPAT R R, JOY L M, et al. Advances in the lung cancer immunotherapy approaches[J]. Vaccines, 2022, 10(11): 1963.
- [27] 王雅楠,归明彬,屈莲平,等.黄芪多糖抑制结肠癌肿瘤微环境IDO1的表达增加瘤内CD8<sup>+</sup>T细胞浸润[J].中国中药杂志,2023,48(17):4722-4730.
- [28] LI K, LI S, WANG D, et al. Extraction, characterization, antitumor and immunological activities of hemicellulose polysaccharide from astragalus radix herb residue [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3644.

(收稿日期:2024-07-18 编辑:蒋凯彪)