

清热解毒中药黄芩诱导小鼠肝癌H22细胞HSP70免疫原性的实验研究

成晓燕, 张 轶, 卢洪梅 (广东医科大学第二临床医学院中医学教研室, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 观察清热解毒中药黄芩诱导HSP70免疫原性对小鼠肝癌H22细胞的免疫效应。**方法** 将被中药黄芩处理过的肝癌H22细胞免疫小鼠分成黄芩未封闭组、黄芩封闭组和空白对照组, 观察各组荷实体瘤小鼠瘤体质量、肿瘤组织形态学改变及外周血T淋巴细胞亚群的变化情况。**结果** 黄芩未封闭组瘤体质量有所减轻, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$); 黄芩未封闭组肿瘤组织坏死明显; 黄芩未封闭组外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞均明显升高, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 清热解毒中药黄芩可诱导小鼠肝癌H22细胞高表达HSP70, 在一定程度上能提高小鼠对同种移植瘤的主动免疫作用。

关键词: 清热解毒; 黄芩; 小鼠; 肝癌H22; HSP70; 诱导

中图分类号: R 735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610(2018)06-0629-03

Experimental study on the immunogenicity of HSP70 induced by scutellariae baicalensis on mice liver cancer H22 cells

CHENG Xiao-yan, ZHANG Yi, LU Hong-mei (Department of Traditional Chinese Medicine, the Second Clinical Medical College, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To observe the immunogenicity of HSP70 induced by Scutellariae baicalensis on mice liver cancer H22 cells. **Methods** The mice immunized with H22 cells of liver cancer were treated with Scutellariae baicalensis. The mice were divided into three groups: Unblocked Group, Blocked Group and Control Group. The changes of tumor mass, tumor histological morphology and peripheral blood T lymphocyte subsets in mice with solid tumor in each group. **Results** The average tumor mass of the Unclosed Group was reduced, and there was a statistical difference compared with that of the Control Group ($P<0.01$); the necrosis of tumor tissue in the Unblocked Group was obvious; the CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in the Unblocked Group was significantly increased, and there was a statistical difference compared with those of the Control Group ($P<0.01$). **Conclusion** Scutellariae baicalensis can induce the high expression of HSP70 in mice liver cancer H22 cells and enhance the active immunity of mice against allograft tumor to some extent.

Key words: clearing heat and removing toxicity; scutellariae baicalensis; mice; liver cancer H22; HSP70; induction

黄芩属于清热解毒中药, 近年研究表明黄芩具有广泛的抗肿瘤活性, 对多种肿瘤细胞具有抑制和杀伤作用^[1-4]。本课题组前期研究发现清热解毒中药可诱导肝癌H22细胞高表达热休克蛋白70(HSP70)^[5], 本研究用清热解毒中药黄芩处理后的高表达HSP70的肝癌H22细胞免疫同种移植瘤小鼠, 以进一步探讨黄芩的抗肿瘤作用是否为通过诱导肝癌H22细胞HSP70的免疫原性而实现, 结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

基金项目: 湛江市科技计划项目(No.2012C3106019)

收稿日期: 2018-10-19; 修订日期: 2018-12-03

作者简介: 成晓燕(1975-), 女, 硕士, 讲师。

1.1.1 实验动物、细胞株和药物 SPF级昆明种小鼠, 45只, 雌性, 周龄6~8周, 体质量18~22 g, 购于广东医科大学实验动物中心; 腹水型肝癌H22细胞株由中山大学中山医学院提供; 黄芩购买于本院的药剂科, 经过本院中药学教研室鉴定为正品。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640培养基(粉剂)由HyClone提供; 新生小牛血清由杭州四季清提供; 鼠抗小鼠HSP70单克隆抗体, 由Elabscience提供; 流式细胞仪荧光体CD3 Cy5-PE、CD4 FITC、CD8 PE购自深圳欣博盛科技有限公司; 溶血素由广州生物健仑科技有限公司提供。

1.1.3 实验仪器 低速冷冻离心机(上海安亭)、ALTRAEPICS流式细胞仪(Beckman Coulter USA)、电子天平(北京赛多利斯)。

1.2 方法

1.2.1 荷腹水瘤小鼠模型的制备和给药处理 将肝癌H22细胞株用RPMI-1640血清细胞培养液进行培养,按常规法把细胞制成细胞悬液,离心去上清,然后用RPMI-1640基础培养基将细胞浓度调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于5只小鼠腹腔中,每只1 mL。小鼠接种1周后形成明显的腹水,抽取荷腹水瘤小鼠腹水并用生理盐水1:3比例进行稀释,将稀释后的腹水细胞经腹腔接种于10只受试小鼠,每只0.2 mL,接种当天对每只荷腹水瘤小鼠用黄芩浓缩液0.03 mL/g灌胃,每天1次,12 d后抽取腹水。

1.2.2 黄芩处理后的腹水肝癌H22细胞制备 采用低速离心法对腹水肝癌H22细胞进行分离和纯化。将3 mL腹水加入离心管中,用PBS液稀释至5 mL,4 ℃ 1 000 r/min离心20 s。弃上清,沉淀加2 mL PBS液制成细胞悬液后加入装有1 mL小牛血清的离心管中,4 ℃ 1 000 r/min离心20 s。去掉上层清液,离心管底部富含肝癌H22细胞,重复操作以获得纯度更高的肝癌H22细胞。

1.2.3 荷实体瘤小鼠模型制备和分组处理 用RPMI-1640基础培养基将体外培养的肝癌H22细胞浓度调为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种在小鼠的右腋皮下,每只0.2 mL,共30只,建立荷实体瘤小鼠模型。待1周小鼠成瘤后,随机将荷实体瘤小鼠分为黄芩未封闭组、黄芩封闭组和空白对照组,每组10只。黄芩未封闭组予瘤旁注射经黄芩处理后的腹水肝癌H22细胞 $1 \times 10^6/\text{mL}$,每只0.2 mL;黄芩封闭组予瘤旁注射经HSP70单克隆抗体封闭的腹水肝癌H22细胞 $1 \times 10^6/\text{mL}$,每只0.2 mL;空白对照组予瘤旁注射0.2 mL的生理盐水。隔日注射1次,连续注射3次。

1.2.4 荷实体瘤小鼠各组瘤体质量 免疫治疗2周后将荷实体瘤小鼠颈椎脱臼处死,完整地剥离肿瘤组织,用电子天平称量瘤体的质量。

1.2.5 荷实体瘤小鼠肿瘤组织形态学观察 每组取5只荷实体瘤小鼠的肿瘤,石蜡浸润包埋,HE染色制备病理切片,光学显微镜下观察肿瘤组织形态学改变,肿瘤组织按坏死程度分为轻微(-)、轻度(+)、中度(++)、重度(+++)等类型。

1.2.6 荷实体瘤小鼠外周血T淋巴细胞亚群的检测 采用直接免疫荧光三标法,流式细胞仪技术检测外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺的表达。每鼠取50 μL抗凝血于试管中,加入CD3-PE/CY5、CD4-FITC、CD8-PE荧光抗体各10 μL(荧光抗体用PBS液稀释成0.0125 g/L),避光孵育30 min,同时设同型对照;加入经蒸馏水以1:9比例稀释的溶血素1 mL,避光10 min,待

血液澄清透明后加入1 mL 4 ℃ PBS液,4 ℃ 2 000 r/min低速离心5 min,丢弃上层清液;加0.5 mL PBS液吹打,悬浮沉淀细胞,再加入1%多聚甲醛溶液固定,上流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS19.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷实体瘤小鼠瘤体质量的比较

黄芩未封闭组瘤体质量低于黄芩封闭组和空白对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),黄芩封闭组的瘤体质量与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表1。

表1 3组荷实体瘤小鼠瘤体质量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	瘤体质量/g
黄芩未封闭组	10	0.64 ± 0.32^{ab}
黄芩封闭组	10	1.05 ± 0.27
空白对照组	10	1.17 ± 0.36

与空白对照组比较:^a $P < 0.01$;与黄芩封闭组比较:^b $P < 0.01$

2.2 荷实体瘤小鼠肿瘤组织形态学的改变

黄芩未封闭组肿瘤组织坏死区域较大,多呈大片凝固状坏死,坏死区边缘可见大量炎性细胞浸润;黄芩封闭组肿瘤组织坏死较少,肿瘤坏死区域多呈灶状,可见大量正常肿瘤细胞和少量炎性细胞浸润;空白对照组肿瘤组织坏死区较小,肿瘤坏死区域呈灶状或条带状,有少量炎性细胞浸润,与黄芩封闭组情况相似。详见表2。

表2 3组荷实体瘤小鼠肿瘤组织坏死情况 (例)

组别	<i>n</i>	-	+	++	+++
黄芩未封闭组	5	0	0	1	4
黄芩封闭组	5	0	2	2	1
空白对照组	5	0	3	1	1

2.3 荷实体瘤小鼠外周血T淋巴细胞亚群表达情况

黄芩未封闭组CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞表达均较空白对照组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);黄芩封闭组CD4⁺、CD8⁺表达与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

中医认为,热毒蕴结是恶性肿瘤的主要病因病

表3 荷实体瘤小鼠外周血T淋巴细胞亚群的表达

 $(\bar{x} \pm s, \%)$

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
黄芩未封闭组	10	85.87 ± 6.66 ^{ac}	63.29 ± 6.75 ^a	22.39 ± 4.76 ^{ab}
黄芩封闭组	10	70.44 ± 13.1 ^b	55.36 ± 13.97	17.87 ± 3.20
空白对照组	10	61.80 ± 14.74	45.66 ± 11.02	15.62 ± 3.96

与空白对照组比较: ^a*P*<0.01, ^b*P*<0.05; 与黄芩封闭组比较: ^c*P*<0.05

理之一, 采用清热解毒法可起到泻火解毒、清热散结作用。临床实践证明, 清热解毒药或清热解毒法对某些恶性肿瘤有一定疗效。有实验证明清热解毒法在原发性肝癌治疗中疗效确切, 可以降低肿瘤发生风险、预防术后复发、提高生存质量、延长生存期、提高生存率及疗效、改善症状^[6]。黄芩属于清热解毒类药物, 也是一种有效的抗癌药物, 对于肝癌、肠癌和肺癌等癌症治疗有显著疗效。研究发现, 不同产地的黄芩提取物对小鼠H22肝癌移植瘤均有一定的抑制作用^[7]。

HSP70是生物体细胞在受热或其他理化因素应激下合成的一组具有高度保守性的蛋白质, 近年来研究发现HSP70在多种肿瘤组织中有较高表达, 高表达的HSP70具有很强的抗原递呈作用, 可诱导细胞毒性T淋巴细胞(CTL)免疫应答, 有效地杀伤肿瘤细胞^[8-11]。

本课题组前期研究发现, 清热解毒中药可诱导肝癌H22细胞高表达HSP70, 在前期研究基础上, 我们用黄芩处理后的高表达HSP70的肝癌H22细胞去免疫同种移植瘤小鼠, 结果发现荷瘤小鼠肿瘤质量有所减轻(*P*<0.01), 肿瘤坏死区域较大, 外周血CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞明显升高, 与空白对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.01), 但当肝癌H22细胞高表达HSP70被抗体封闭后, 上述所发挥出来的作用则明显减弱。本实验结果说明, 清热解毒中药黄芩可致肝癌H22细胞高表达HSP70, 高表达HSP70肝癌H22细胞在一定程度上可诱导小鼠对同种移植瘤的主动免疫作用, 其机理为清热解毒中药黄芩诱导肝癌H22细胞高表达HSP70, HSP70与肝癌抗原肽结合

成HSP70-肽复合物, 从而诱导肝癌细胞毒性T淋巴细胞(CTL)克隆, 发挥肿瘤特异性杀伤作用。

参考文献:

- [1] 辛颖, 达拉胡, 白玉花. 中蒙药并头黄芩乙醇提取物体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2016, 22(2): 35-36.
- [2] 孙吉凤, 刘诗音, 宋英明. 黄芩素抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 中国当代医药, 2015, 22(14): 24-26.
- [3] 严静怡, 陈宝安. 汉黄芩素的提取及抗肿瘤的作用机制[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2210-2212.
- [4] 马立, 龙汉安. 黄芩抗肿瘤作用的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(2): 200-201.
- [5] 王洪琦, 成晓燕, 胡玲. 清热解毒中药诱导肝癌H22细胞HSP70表达的研究[J]. 中国中医基础杂志, 2006, 12(5): 396-398.
- [6] 张欢欢, 张树辉. 清热解毒法治疗原发性肝癌述评[J]. 中医学报, 2018, 33(7): 1174-1178.
- [7] 耿广琴, 杨志军, 杨秀娟, 等. 甘肃不同产地黄芩提取物的抗肿瘤作用研究[J]. 中国中医药科技, 2016, 23(3): 273-276.
- [8] 肖红燕, 李莉, 潘东峰. HSP70在星形细胞瘤的表达及与肿瘤恶性程度的关系[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(8): 919-921.
- [9] Kumar S, Stokes J, Singh U P, et al. Targeting HSP70: a possible therapy for cancer[J]. Cancer Lett, 2016, 374(1): 156-166.
- [10] 申艳梅, 单保恩, 刘丽华. HSP70多肽复合物的抗肿瘤作用研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2013, 25(4): 262-266, 271.
- [11] 游朝勇. HSP70与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2012, 27(1): 89-91.