

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.11.005

· 基础研究 ·

白术多糖通过激活免疫细胞抑制小鼠结肠癌 HT-29 细胞原位移植瘤的生长

冯子芳, 唐仕华, 郭莉佳, 何玲, 杨瑞宾(兴义市人民医院 检验科, 贵州 兴义 562400)

[摘要] **目的:** 探究白术多糖(polysaccharide of atractylodes macrocephala, PAM)对小鼠结肠癌细胞移植瘤生长的抑制作用及其机制。**方法:** 将荧光酶标记的 1×10^7 个结肠癌细胞(HT-29)注射到小鼠结肠浆膜层, 建立结肠癌细胞原位移植瘤模型小鼠。待瘤体体积达到约 230 mm^3 时, 小鼠采用连续 10 d 灌胃给药 30 mg/kg PAM (PAM组)或生理盐水(对照组); 通过肿瘤活体成像技术检测 PAM 对小鼠体内结肠癌细胞生长的影响, 通过流式细胞术检测 PAM 对瘤体组织中粒细胞、树突状细胞以及巨噬细胞的 MHCII 以及 IL-12 的表达、淋巴细胞的激活以及 CD4^+ 和 CD8^+ 细胞分泌 IFN- γ 功能的影响。**结果:** PAM 可显著抑制结肠癌原位移植瘤模型小鼠体内结肠癌细胞生长($P < 0.01$)。PAM 可通过增加 MHCII 和 IL-12 在树突状细胞和巨噬细胞中的表达水平(均 $P < 0.01$), PAM 可显著增加瘤体组织中 CD8^+ 细胞、NK 细胞、 $\text{CD44}^+/\text{NK}$ 细胞和 $\text{CD44}^+/\text{CD4}^+$ 细胞比例以及提升单位组织体积中 CD8^+ 细胞和 NK 细胞细胞数量(均 $P < 0.01$), PAM 可显著增加 CD4^+ 及 CD8^+ 细胞分泌 IFN- γ 的能力(均 $P < 0.01$)。**结论:** PAM 可通过激活结肠癌模型小鼠原位移植瘤组织中免疫细胞来抑制肿瘤生长。

[关键词] 白术多糖; 结肠癌; HT-29 细胞; 肿瘤微环境; 免疫细胞

[中图分类号] R735.3; R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)11-1209-05

Polysaccharide of atractylodes macrocephala inhibits the growth of mice *in-situ* colon cancer HT-29 cell xenograft *via* activating immune cells

FENG Zifang, TANG Shihua, GUO Lijia, HE Ling, YANG Ruibin (Department of Laboratory Medicine, Xingyi People's Hospital, Xingyi 562400, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of polysaccharide of atractylodes macrocephala (PAM) on the growth of colon cancer cells in mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor. **Methods:** 1×10^7 colon cancer HT-29 cells labeled with luciferase were injected into colon serosa of the mice to establish the *in-situ* colon cancer transplantation tumor model. When the tumor volume reached 230 mm^3 , the mice were given 30 mg/kg PAM (PAM group) or equal volume of normal saline (Control group) by gavage for 10 consecutive days. The effect of PAM on the growth of colon cancer cells in mice was tested by *in vivo* tumor imaging technology. The expressions of MHCII and IL-12 in granulocytes, dendritic cells and macrophages, the activation of lymphocytes, and IFN- γ expression in CD4^+ and CD8^+ cells of tumor tissues were detected by Flow cytometry. **Results:** PAM significantly inhibited the growth of colon cancer cells in mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor ($P < 0.01$). PAM activated immune cells through increasing the expression levels of MHCII and IL-12 in dendritic cells and macrophages (both $P < 0.01$). PAM significantly increased the frequency of CD8^+ cells, NK cells, $\text{CD44}^+/\text{NK}$ cells and $\text{CD44}^+/\text{CD4}^+$ cells in tumor tissues and the number of CD8^+ cells and NK cells per unit volume (all $P < 0.01$). PAM significantly increased the IFN- γ secretion of CD4^+ and CD8^+ cells (both $P < 0.01$), too. **Conclusion:** PAM inhibits the growth of colon cancer by activating immune cells in tumor tissues of mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor.

[Key words] polysaccharide of atractylodes macrocephala (PAM); colon cancer; HT-29 cell; tumor microenvironment; immune cell

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(11): 1209-1213. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.11.005]

结肠癌是常见的、病发于结肠部位的恶性肿瘤, 近几十年来, 我国结肠癌的发病率和病死率呈上升趋势^[1]。健康的免疫系统对于控制肿瘤发生至关重要, 而与癌症相关的免疫逃逸有助于肿瘤的进展^[2], 目前研究^[3]已经确定了多种与肿瘤免疫逃逸有关的分子和细胞机制。结肠肿瘤微环境中的各种免疫细胞, 如淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞等, 在结肠

[基金项目] 贵州省自然科学基金资助项目([2017]1193)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guizhou Province (No.[2017]1193)

[作者简介] 冯子芳(1987-), 女, 硕士, 主管检验师, 主要从事肿瘤与免疫相关的研究, E-mail: zhangxinllmm@aliyun.com

[通信作者] 杨瑞宾(YANG Ruibin, corresponding author), 本科, 主任检验师, 主要从事肿瘤与免疫相关的研究, E-mail: 363365552@qq.com

癌的发病过程中起着重要作用^[4]。白术多糖 (polysaccharide of atractylodes macrocephala, PAM) 是中药白术中的主要活性成分, 临床上常用作机体免疫调节剂^[5]。研究^[6-7]认为, PAM 可在器官及细胞层面上提高机体免疫力, 并具有抗肿瘤的作用。然而 PAM 对结肠癌微环境中免疫细胞的影响报道较少。本研究通过构建结肠癌原位移植瘤模型小鼠并观察 PAM 对瘤体组织中免疫细胞激活以及 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞分泌 IFN- γ 能力的影响, 以期评估 PAM 对结肠癌微环境中免疫细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PAM 购自陕西慈缘生物技术有限公司。D-Luciferin 和 ionomycin 购买自美国 Sigma 公司。流式细胞实验中相关缓冲液与 MHCII、IL-12、CD44、CD4、CD8、TCR、NK1.1、IFN- γ 抗体均购自美国 BD 公司。Fc 抗体购买自美国 Abcam 公司。Golgi Plug 购自美国 eBioscience 公司。

1.2 实验动物

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自贵州医科大学实验动物中心公共服务平台 [实验动物合格证号: SCXK(黔)2018-0001]。实验动物均饲养在 SPF 级动物房中并允许自由进食进水。小鼠在饲养环境下适应 1 周后开展后续实验。动物房室温 (23 \pm 1) $^{\circ}$ C, 湿度 50%, 12 h 明暗循环。所有动物实验按照动物福利标准进行, 本实验通过我院动物伦理委员会审查。

1.3 小鼠结肠癌原位移植瘤模型建立及给药

将小鼠随机分为对照组和 PAM 组 (各 8 只)。小鼠以 1% 戊巴比妥麻醉后, 仰卧固定, 解剖小鼠, 暴露结肠, 将 0.1 ml 荧光酶标记的 1×10^7 个结肠癌细胞 (HT-29) 缓慢注射到小鼠结肠浆膜层, 然后关腹, 消毒创口。10 d 后, 数码卡尺系统测量显示瘤体体积约 230 mm³ 时, PAM 组小鼠每天给予 PAM (30 mg/kg) 灌胃, 连续灌胃 10 d; 对照组给予相同体积生理盐水。

1.4 肿瘤组织生长情况统计

小鼠在第 10、14、19 和 21 d 经腹腔注射 1 mg D-Luciferin (100 μ l 原液用 PBS 稀释), 通过数码卡尺系统测量瘤组织体积; 在第 21 天, 通过 IVIS 200 Bioluminescence imager 系统对瘤组织进行活体成像观察, 分析肿瘤细胞荧光值。

1.5 流式细胞术检测 PAM 处理对移植瘤组织中相关细胞的激活作用

第 21 天, 上述 (1.4) 检测完毕后, 通过过量乙醚麻醉处死小鼠, 取瘤组织。胰蛋白酶消化组织并通过 100 μ m 和 40 μ m 滤膜过滤, 洗除红细胞, 并通过

Ficoll 梯度离心去除死细胞后, 制成单细胞悬液。(1) 免疫细胞激活的检测: 细胞在添加 Fc 抗体的 FACS 缓冲液中孵育 10 min, 加入 100 μ l 荧光标记的抗体 (IL-12 或 MHCII) 在 4 $^{\circ}$ C 黑暗下孵育 30 min, 再孵育二抗 30 min; (2) 淋巴细胞激活的检测: 细胞分别在 4 $^{\circ}$ C 黑暗下孵育 CD8/TCR、NK1.1/TCR、NK1.1/CD44 抗体 30 min, 再孵育二抗 30 min; (3) CD4⁺ 细胞功能检测: 细胞分别在 4 $^{\circ}$ C 黑暗下孵育 CD4/CD44 抗体 30 min, 再孵育二抗 30 min。所有样品在 LSRII 流式细胞仪中分析, 通过 FlowJo 软件统计流式细胞数据。

1.6 流式细胞术检测 PAM 处理对移植瘤组织中 T 细胞分泌 IFN- γ 的影响

肿瘤细胞悬液中加入淋巴细胞分离液 Ficoll, 400 \times g 室温离心 20 min 分离淋巴细胞。将淋巴细胞置于添加了终质量浓度 10 ng/ml PMA、100 ng/ml ionomycin 和 Golgi Plug 的缓冲液中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h。置于添加了荧光标记的 IFN- γ 抗体通透缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 孵育 25 min, 将细胞重悬于 350 μ l FACS 缓冲液中。样品在 LSRII 流式细胞仪中进行分析, 通过 FlowJo 软件统计流式细胞数据。

1.7 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组不同时间测量的瘤体体积的比较采用重复测量的方差分析, 其他两组间数据比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAM 对模型小鼠结肠癌原位移植瘤中癌细胞生长的影响

荧光酶标记的 1×10^7 个结肠癌细胞 (HT-29) 接种后体积约为 50 mm³, 接种后 10 d 约为 230 mm³, 所有小鼠均造模成功。第 10 天开始进行 PAM 处理, 并在 10~21 d 采用数码卡尺检测瘤体积。结果 (图 1A) 显示, PAM 组移植瘤体积明显低于对照组 ($P < 0.01$)。在第 21 天采用 IVIS 200 Bioluminescence imager 检测肿瘤细胞荧光值, 结果 (图 1B) 显示, PAM 组结肠癌原位移植瘤细胞荧光值明显低于对照组 ($P < 0.01$)。

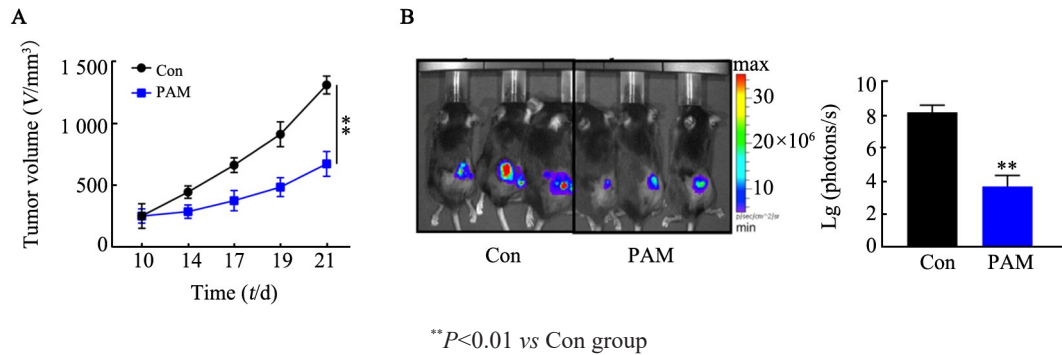
2.2 PAM 对模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中免疫细胞激活的影响

流式细胞术检测结果 (图 2A 和 B) 显示, PAM 组移植瘤组织的粒细胞中 MHCII 和 IL-12 的表达没有显著差异 ($P > 0.05$), 而树突状细胞以及巨噬细胞中 MHCII 和 IL-12 的表达水平显著高于对照组 (均 $P < 0.01$)。

2.3 PAM 对模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中淋巴细胞激活的影响

流式细胞术检测结果显示, 与对照组比较, PAM

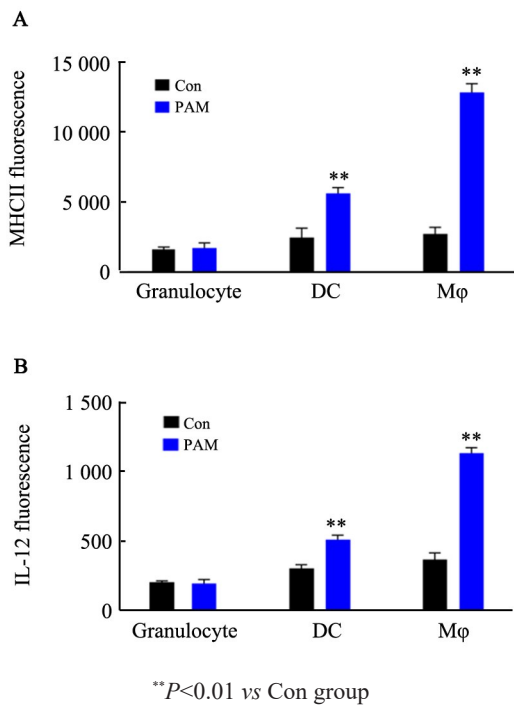
组移植瘤组织中CD8⁺细胞(图3A)和NK细胞(图3B)比例均明显升高(均 $P < 0.01$),且CD44⁺表达的NK细胞(图3C)比例也明显升高($P < 0.01$)。



A: The volume change of colon cancer in mice; B: Luminescent images and data analysis of colon cancer in mice at 21th day

图1 PAM对结肠癌模型小鼠原位移植瘤生长的影响

Fig.1 Effect of PAM on the growth of xenograft in mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor



A: MHCII expression in granulocyte, dendritic cells and macrophage; B: IL-12 expression in granulocyte, dendritic cell and macrophage

图2 PAM对模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中免疫细胞激活的影响

Fig. 2 Effect of PAM on the activation of immune cells in xenograft tissues of mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor

2.4 PAM对移植瘤体组织中CD4⁺细胞功能的影响

流式细胞术分析瘤组织单位体积中CD4⁺细胞数目,检测结果(图4A)显示,与对照组相比,PAM组移植瘤组织单位体积中CD8⁺细胞和NK细胞数明显增加($P < 0.01$),进一步验证了图3的实验结果;而CD4⁺

细胞数目没有明显差异。进一步研究(图4B)发现,PAM组CD4⁺细胞中CD44⁺/CD4⁺细胞比例较对照组明显增加($P < 0.01$)。

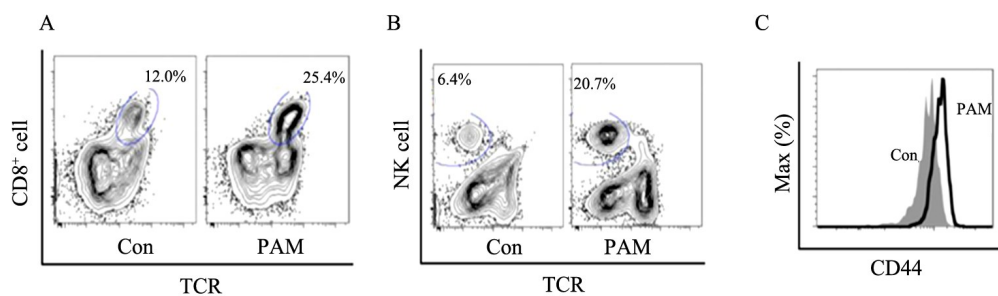
2.5 PAM对T淋巴细胞分泌IFN-γ的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,PAM组模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中可分泌IFN-γ的CD4⁺细胞(图5A)和CD8⁺细胞(图5B)比例明显升高($P < 0.01$)。

3 讨论

癌症是一种与慢性炎症密切相关的疾病,免疫细胞与癌症的发生发展密切相关^[8-9]。肿瘤组织由肿瘤细胞和非肿瘤细胞组成,包括内皮细胞、周细胞、成纤维细胞、间质细胞和免疫细胞等^[10]。这些肿瘤细胞和非肿瘤细胞以及它们所表达的许多不同因子共同形成了肿瘤微环境^[11]。了解肿瘤微环境中关键的免疫细胞的方式,可在一定程度上有助于逆转肿瘤细胞免疫逃逸和控制癌症进展。结肠癌是常见发生于结肠部位的消化道恶性肿瘤,多发于直肠与乙状结肠交界处^[12-13]。已有研究^[6]报道,PAM具有抑制结直肠癌细胞增殖的作用。本研究通过肿瘤活体成像技术同样证明了PAM可抑制结肠癌原位移植瘤模型小鼠体内结肠癌细胞的生长。

本研究进一步对肿瘤微环境中关键的免疫细胞进行了研究。MHCII类分子主要参与外源性抗原提呈,在免疫应答的起始阶段将经过处理的抗原片段提呈给CD4⁺细胞^[14]。在免疫应答中,MHCII类分子主要协调免疫细胞间的相互作用,调控体液免疫和细胞免疫应答^[15]。IL-2是由多种免疫细胞产生并作用于多种细胞的一类细胞因子,其在传递信息、激活

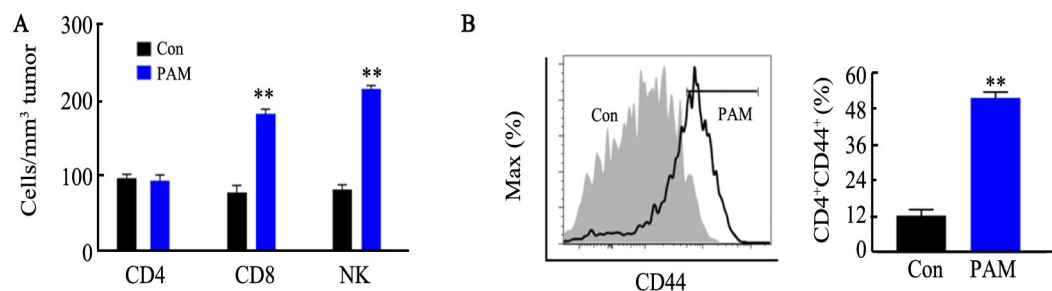


**P<0.01 vs Con group

Flow cytometric screening of CD8⁺ cells (A), NK cells (B) and CD44 expression in NK cells (C)

图3 PAM对模型小鼠原位结肠癌移植瘤组织中淋巴细胞激活的影响

Fig.3 Effect of PAM on the activation of lymphocyte in xenograft tissues of mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor



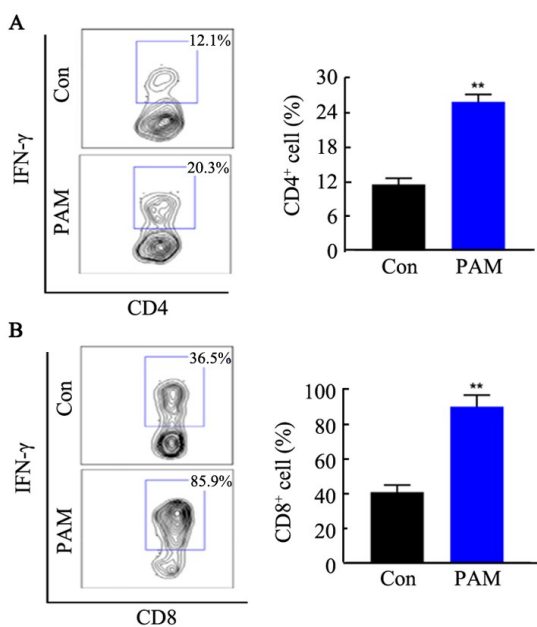
**P<0.01 vs Con group

A: Number of T lymphocyte and NK lymphocyte in colon cancer tissues per unit volume;

B: CD44 staining of cells showed T cell differentiation

图4 PAM对模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中CD4⁺细胞功能的影响

Fig.4 Effect of PAM on the function of CD4⁺ cells in xenograft tissues of mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor



**P<0.01 vs Con group

A: CD4⁺ cells of secretion IFN-γ; B: CD8⁺CD4⁺ cells of secretion IFN-γ

图5 PAM对模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中T淋巴细胞分泌IFN-γ能力的影响

Fig.5 Effects of PAM on the IFN-γ secretion of T lymphocytes in xenograft tissues of mice bearing *in-situ* colon cancer transplantation tumor

与促进T、B细胞活化与增殖中起重要作用^[16-17]。激活的巨噬细胞、NK细胞和CD8⁺细胞可以直接杀伤肿瘤细胞^[18]。本研究通过流式细胞术证明了PAM可显著提高模型小鼠结肠癌原位移植瘤组织中树突状细胞和巨噬细胞的MHCII和IL-12的表达水平,此结果提示,PAM可激活移植瘤组织中树突状细胞和巨噬细胞。随后检测了PAM对模型小鼠结肠癌移植瘤组织中淋巴细胞激活的影响,结果显示,PAM可显著提高移植瘤组织中CD8⁺细胞、NK细胞和CD44⁺/NK细胞比例以及单位体积内的细胞数量,这提示着PAM可激活上述细胞的活性。在免疫细胞中,CD44主要参与T细胞的活化,而活化后的T细胞可杀伤肿瘤细胞^[19]。本研究发现,虽然PAM没有对CD4⁺数量直接产生影响,但PAM显著提高了CD4⁺细胞中CD44⁺/CD4⁺细胞比例,说明其可显著增加CD4⁺细胞活性。另外,本研究还发现,PAM可显著增加可分泌IFN-γ的CD4⁺及CD8⁺细胞比例;而IFN-γ进一步促进NK和T细胞活化并促进抗原提呈和提高巨噬细胞溶酶体活性^[20],进而杀伤肿瘤细胞。

综上,PAM可通过激活结肠癌组织中免疫细胞从而抑制结肠癌生长,本研究为结肠癌的治疗提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 张玥, 石菊芳, 黄慧瑶, 等. 中国人群结直肠癌疾病负担分析[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(7): 709-714.
- [2] LEE C C, DING X C, ZHAO T, et al. Transthyretin stimulates tumor growth through regulation of tumor, immune, and endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2019, 202(3): 991-1002. DOI: 10.4049/jimmunol.1800736.
- [3] 马肖静, 周慧婷, 董熠, 等. 肿瘤发生与免疫逃逸相关机制的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(11): 1046-1050.
- [4] ZHANG Y F, JIANG S H, HU L P, et al. Targeting the tumor microenvironment for pancreatic ductal adenocarcinoma therapy[J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 8(2): 18. DOI:10.21037/cco.2019.03.02.
- [5] LI W Y, GUO S X, XU D N, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* koidz (PAMK) relieves immunosuppression in cyclophosphamide-treated geese by maintaining a humoral and cellular immune balance[J/OL]. *Molecules*, 2018, 23(4): E932[2019-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6017956/>. DOI: 10.3390/molecules23040932.
- [6] FENG Y Y, JI H Y, DONG X D, et al. An alcohol-soluble polysaccharide from *Atractylodes macrocephala* Koidz induces apoptosis of Eca-109 cells[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 226: 115136. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115136.
- [7] FENG Z F, YANG R B, WU L S, et al. *Atractylodes macrocephala* polysaccharides regulate the innate immunity of colorectal cancer cells by modulating the TLR4 signaling pathway[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7111-7121[2019-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6733773/>. DOI:10.2147/OTT.S219623.
- [8] GONZALEZ H, HAGERLING C, WERB Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression[J]. *Genes Dev*, 2018, 32(19/20): 1267-1284. DOI:10.1101/gad.314617.118.
- [9] BOTTAI G, RASCHIONI C, SZÉKELY B, et al. AXL-associated tumor inflammation as a poor prognostic signature in chemotherapy-treated triple-negative breast cancer patients[J/OL]. *NPJ Breast Cancer*, 2016, 2: 16033[2019-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5515347/>. DOI:10.1038/npjbcancer.2016.33.
- [10] CHEN D S, MELLMAN I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point[J]. *Nature*, 2017, 541(7637): 321-330. DOI:10.1038/nature21349.
- [11] CHOI Y, KIM J W, NAM K H, et al. Systemic inflammation is associated with the density of immune cells in the tumor microenvironment of gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(4): 602-611. DOI:10.1007/s10120-016-0642-0.
- [12] GOUVAS N, AGALIANOS C, PAPAPARASKEVA K, et al. Surgery along the embryological planes for colon cancer: a systematic review of complete mesocolic excision[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2016, 31(9): 1577-1594. DOI:10.1007/s00384-016-2626-2.
- [13] BONNOT P E, PASSOT G. RAS mutation: site of disease and recurrence pattern in colorectal cancer[J]. *Chin Clin Oncol*, 2019, 8(5): 55. DOI:10.21037/cco.2019.08.11.
- [14] 祝文峰, 袁建辉, 李红梅. 树突状细胞在免疫应答中的作用及其临床意义[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2009, 5(2): 179-182.
- [15] ZHANG L, SOSINOWSKI T, COX A R, et al. Chimeric antigen receptor (CAR) T cells targeting a pathogenic MHC class II: peptide complex modulate the progression of autoimmune diabetes[J/OL]. *J Autoimmun*, 2019, 96: 50-58[2019-06-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6541442/>. DOI: 10.1016/j.jaut.2018.08.004.
- [16] HRMADNIKOVA I, LI S, KOTLABOVA K, et al. Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with hsp 70 derived 14-mer peptide(TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors on peripheral blood T cells, B cells and NKT cells [J]. *Plos One*, 2016, 11(3): e0151535. DOI: 10.1371/journal.pone.0151535.
- [17] BENNETT N R, ZWICK D B, COURTNEY A H, et al. Multivalent antigens for promoting B and T cell activation[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(8): 1817-1824. DOI:10.1021/acscmbio.5b00239.
- [18] CASSETTA L, KITAMURA T. Macrophage targeting: opening new possibilities for cancer immunotherapy[J]. *Immunology*, 2018, 155(3): 285-293. DOI:10.1111/imm.12976.
- [19] KLEMENT J D, PASCHALL A V, REDD P S, et al. An osteopontin/CD44 immune checkpoint controls CD8⁺ T cell activation and tumor immune evasion[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(12): 5549-5560. DOI:10.1172/JCI123360.
- [20] BRAND A, SINGER K, KOEHL G E, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(5): 657-671. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.08.011.

[收稿日期] 2019-06-21

[修回日期] 2019-10-15

[本文编辑] 黄静怡