

# 白花蛇舌草总黄酮对骨肉瘤小鼠免疫相关因子的调节作用

浦飞飞<sup>1,2</sup> 陈凤霞<sup>3</sup> 邵增务<sup>1△</sup> 刘建湘<sup>1</sup> 张志才<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究白花蛇舌草总黄酮(FOD)对骨肉瘤胫骨原位移植瘤小鼠模型免疫相关因子的调节作用。方法:选用 40 只 SPF 级 4~6 周龄 18~20 g 的 BALB/c 小鼠,雌雄各半。构建骨肉瘤胫骨原位移植瘤小鼠模型,随机分为空白对照组和 FOD 组,每组各 20 只。按照分组干预 2 周时间,观察小鼠的一般状况,处死小鼠后检测胸腺指数和脾脏指数,采用流式细胞仪检测淋巴细胞亚群,ELISA 法检测小鼠血清免疫相关因子水平。结果:与空白对照组相比,FOD 组小鼠胸腺指数和脾脏指数显著增加,T 淋巴细胞亚群( $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ )比例显著升高,免疫相关因子 IL-2, TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  显著升高,IL-4 和 IL-6 显著降低,各组数据差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:FOD 能够调节骨肉瘤胫骨原位移植瘤小鼠模型免疫相关因子表达,可为骨肉瘤的综合治疗提供新的治疗手段。

**[关键词]** 白花蛇舌草;总黄酮;骨肉瘤;免疫相关因子

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)02-0001-04

## Effect of Total Flavones of Oldenlandia Diffusa on Immune-Related Factors in Mouse Model of Osteosarcoma

PU Feifei<sup>1,2</sup> CHEN Fengxia<sup>3</sup> SHAO Zengwu<sup>1△</sup> LIU Jianxiang<sup>1</sup> ZHANG Zhicai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

<sup>2</sup> Department of Orthopedics, Wuhan Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

<sup>3</sup> Department of Radiation Oncology and Medical Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China.

**Abstract Objective:** To study the effect of total flavone of oldenlandia diffusa (FOD) on immune-related factors in mouse model of osteosarcoma tibial orthotopic transplantation tumor. **Methods:** 40 BALB/c mice with SPF grades of 4 to 6 weeks and weighing 18 to 20 g were selected, half male and half female. Mouse models of osteosarcoma tibial orthotopic xenograft tumor were established and randomly divided into blank control group and FOD group, with 20 mice in each group. The general conditions of the mice were observed after 2 weeks of intervention according to the grouping conditions. Thymic index and spleen index were detected after the mice were killed, lymphocyte subsets were detected by flow cytometry, and serum immune-related factors of the mice were detected by ELISA. **Results:** Compared with the blank control group, the thymus and spleen index of mice in FOD group were significantly increased, the T lymphocyte subsets ( $CD_4^+$ ,  $CD_8^+$ ,  $CD_4^+/CD_8^+$ ) rate significantly increased, the serum immune-related factors IL-2, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were significantly increased,

while IL-4 and IL-6 were significantly decreased, and the data of each group were statistically different ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** FOD can regulate the expression of immune-related factors in the mouse model of osteosarcoma tibial orthotopic xenograft tumor, this study provide a new treatment method for osteosarcoma.

**Keywords:** oldenlandia diffusa; total flavones; osteosarcoma; immune-related factors

基金项目:国家自然科学基金项目(81904231)

中国博士后科学基金项目(2020M672369)

湖北省博士后创新实践岗位项目(34)

武汉市医学科研项目(WZ18Q05)

<sup>1</sup> 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科(武汉, 430022)

<sup>2</sup> 华中科技大学同济医学院附属武汉中西医结合医院骨科

<sup>3</sup> 武汉大学中南医院肿瘤放疗科

△通信作者 E-mail: shaozengwupro@163.com

骨肉瘤是青少年最常见的恶性骨肿瘤,免疫治疗是继手术和放化疗之后的有效治疗手段<sup>[1]</sup>。免疫调节学说较为全面地阐述了骨肉瘤的发病机制,免疫调节学说与中医正邪相争学说存在高度统一,中医学认为骨肉瘤的发生是正(宿主)与邪(肿瘤)相互斗争的过程,微环境紊乱将导致阴阳失衡。中医将骨肉瘤归属“骨瘤”范畴,病机为“正虚邪实,邪盛正衰”,应“扶正祛邪,攻补兼施”<sup>[2]</sup>。既往研究表明中医药可提高骨肉瘤的放化疗时机体免疫功能,增加放疗敏感性,逆转化疗多药耐药,抑制肿瘤远处转移<sup>[3]</sup>。中医认为热毒蕴结是肿瘤的重要发病因素,《内经·素问》提出“热者寒之”的观点,白花蛇舌草等清热解毒药在中药防治肿瘤中起重要作用<sup>[3-4]</sup>。笔者在既往的研究中发现白花蛇舌草水提取物联合顺铂对骨肉瘤细胞有协同抗肿瘤作用,可抑制细胞增殖,阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。但是白花蛇舌草抗肿瘤成分和机制尚不明确,文献表明黄酮类成分能抑制肿瘤并增强免疫功能<sup>[4]</sup>。笔者通过分离提取白花蛇舌草总黄酮(Total Flavones of Oldenlandia Diffusa, FOD),进一步研究 FOD 的抗肿瘤作用及免疫调节机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及细胞株

选用 40 只 SPF 级 4~6 周龄 18~20 g 的 BALB/c 小鼠,雌雄各半。构建骨肉瘤胫骨原位移植瘤小鼠模型,随机分为空白对照组和 FOD 组,每组各 20 只。SPF 级别 4~6 周龄 BALB/c 小鼠 40 只,性别雌雄各半,体质量 18~20 g,中位数 19 g,华中科技大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(鄂)2016-0009,实验动物使用许可证号 SYXK(鄂)2016-0057。人成骨肉瘤 MG63 细胞株(美国 ATCC 公司,批号为 CRL-1427)。本研究动物实验经华中科技大学同济医学院实验动物伦理委员会批准(伦审字 S2019009 号),符合华中科技大学动物研究规范。

### 1.2 实验药物及试剂

总黄酮含量 56% 的 FOD(合肥紫金医药科技有限公司,批号为 20090306),鼠 IL-2(美国 R&D 公司,批号为 402-ML),IL-4(美国 R&D 公司,批号为 204-IL),IL-6(美国 R&D 公司,批号为 0377-ML),TNF- $\alpha$ (美国 R&D 公司,批号为 201010),IFN- $\gamma$ (美国 R&D 公司,批号为 201302),小鼠 T 淋巴细胞亚群检测试剂盒含 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 单克隆抗体(上海江莱生物科技有限公司,批号为 JL20201)。

### 1.3 实验仪器

流式细胞仪(德国西门子公司,型号为 Partec Pas),多功能全自动酶标洗板机(北京普天新桥技术有限公司,型号为 PTW-1000),离心机(上海楚柏实验室

设备有限公司,型号为 CN-2060)。

## 1.4 方法

**1.4.1 实验细胞培养** MG63 骨肉瘤细胞培养在 DMEM 培养液(10% 小牛血清、100 IU/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素),细胞培养在 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下的 CO<sub>2</sub> 培养箱,每隔 2 d 换液并传代 1 次。

**1.4.2 造模方法** 收集处于对数生长期的 MG63 细胞,对细胞进行计数,当活细胞超过 90% 时可进行造模。根据参考文献所述组织块移植法构建小鼠胫骨原位骨肉瘤模型<sup>[6]</sup>。

**1.4.3 分组方法** 造模成功后,将 40 只小鼠随机分为空白对照组和 FOD 组,每组各 20 只。

**1.4.4 干预方法** 根据文献报道选用对实体瘤有明显抑制作用的 FOD 药物浓度(5 mg/kg),对 FOD 组小鼠按照 0.1 mL/10 g 药物浓度进行肌内注射给药,对照组小鼠予以生理盐水肌内注射给药,1 次/d,连续给药 15 d<sup>[7]</sup>。

**1.4.5 标本制作方法** 小鼠末次给药 12 h 后,采用颈椎脱臼法处死小鼠并称重,先行眼球采血,再解剖获取胸腺和脾脏。小鼠眼球采血后静置 2 h,按照 4 000 r/min 离心收集血清和细胞沉淀,分别检测淋巴细胞亚群和免疫相关因子。用滤纸吸取器官和组织表面残血及多余的水分,称取湿重并分别计算胸腺指数和脾脏指数。

## 1.5 实验指标测定

按照公式计算胸腺指数和脾脏指数,胸腺指数 = [(胸腺质量(mg)/小鼠体质量(g))  $\times$  10],脾脏指数 = [脾脏质量(mg)/(小鼠体质量(g))  $\times$  10]。对小鼠外周血按照密度梯度离心法分离提取淋巴细胞分离液,将有核细胞持续染色标记 30 min,吸出上清液并清洗 2 次,检测 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 含量。按照 ELISA 试剂盒说明,分别检测小鼠血清免疫相关因子 IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  含量。

## 1.6 统计学方法

采用 SPSS 统计软件(美国 IBM 公司,型号为 v26.0.0.5)对所得数据进行统计处理,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  形式表示,组间比较采用配对  $t$  检验,率的比较采用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胸腺指数和脾脏指数检测

FOD 实验组与空白对照组相比, FOD 组小鼠胸腺指数和脾脏指数显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 淋巴细胞亚群检测

FOD 实验组与空白对照组相比, FOD 组小鼠

表 1 两组小鼠胸腺指数和脾脏指数( $\bar{x}\pm s$ )

组别	胸腺指数	脾脏指数
空白对照组	1.35±0.08	2.12±0.11
FOD 实验组	1.92±0.12	3.48±0.09
<i>t</i>	17.67	52.79
<i>P</i>	<0.001	<0.001

表 2 两组小鼠淋巴细胞亚群比例( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> /CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>
空白对照组	21.12±1.24	8.45±1.15	2.38±0.12
FOD 实验组	38.46±2.15	16.64±1.22	2.66±0.34
<i>t</i>	31.24	11.85	3.47
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 两组小鼠免疫相关因子含量( $\bar{x}\pm s, \text{ng/L}$ )

组别	IL-2	IL-4	IL-6	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
空白对照组	235.28±9.69	280.16±14.23	286.21±13.62	20.62±1.89	20.24±2.31
FOD 实验组	272.37±11.36	228.21±11.05	219.16±10.24	29.15±1.07	29.39±2.27
<i>t</i>	11.11	12.90	17.60	17.56	12.63
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

3 讨论

中医文献将骨肉瘤归属“骨疽”和“骨瘤”范畴,中医学认为骨肉瘤的病机为“正虚邪实,邪盛正衰”,基本治则应“扶正祛邪,攻补兼施”<sup>[2,8]</sup>。中医学认为骨肉瘤的发生发展是正(宿主)与邪(肿瘤)相互斗争的过程,微环境紊乱将导致阴阳失衡<sup>[2]</sup>。机体激活细胞免疫、体液免疫等免疫效应,导致局部微环境免疫聚集,控制肿瘤细胞扩散,中医理论认为这是机体正气抵御邪气。但机体免疫系统全力抵抗肿瘤时出现短暂紊乱现象使部分免疫细胞分化变异,导致淋巴细胞分化障碍,出现免疫无能、免疫耐受、免疫抑制等,类似中医理论的正邪相争后正气消耗而无力抗邪。T 细胞免疫反应在维持机体稳态中起重要作用,T 细胞亚群失衡将导致免疫功能紊乱,过多表达的细胞因子促使肿瘤微环境紊乱,进而出现 T 细胞亚群漂移现象,导致免疫失衡,这体现了中医正邪相争导致阴阳失衡和邪盛正衰的观点<sup>[9-10]</sup>。

中医对肿瘤病因的认识主要涉及热、毒、瘀、虚,治疗多采用清热解毒、活血化瘀和扶正固本的方法,因而清热解毒、活血化瘀和扶正固本药是最受关注的抗肿瘤中药<sup>[11-12]</sup>。中医理论认为热毒蕴结是肿瘤的重要发病因素,《素问·至真要大论》提出“热者寒之”,因此,白花蛇舌草等清热解毒药在中药防治肿瘤中起重要作用<sup>[13]</sup>。药理研究表明,白花蛇舌草具有抗肿瘤、抗氧化、增强免疫等作用,其抗肿瘤作用受到广泛关注,实验证实白花蛇舌草可抑制肿瘤增殖、侵袭和转移,诱导凋亡,调节免疫<sup>[4]</sup>。白花蛇舌草清热解毒的功效可祛除热毒,避免留滞体内耗气伤津,使正气渐复,阴阳自

CD<sub>4</sub><sup>+</sup>,CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 和 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 显著增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

2.3 免疫相关因子检测

FOD 实验组与空白对照组相比,FOD 组小鼠 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  显著升高,IL-4 和 IL-6 显著降低,各组数据差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

和,此即“邪去正自安”,与现代药理学体现的抗肿瘤并增强免疫功能具有统一性。

笔者在前期研究中发现白花蛇舌草水提取物联合顺铂对骨肉瘤细胞有协同抗肿瘤作用,可抑制细胞增殖,阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。然而,白花蛇舌草的抗肿瘤活性成分和作用机制尚不明确。药理学研究发现白花蛇舌草活性成分主要有黄酮类、多糖类、萜醌类、萜类和有机酸类等,其中黄酮类成分能抑制肿瘤生长并增强机体免疫功能。王秋兰等<sup>[13]</sup>通过研究 FOD 对胃癌细胞 BGC-823 株 CLIC4 蛋白表达的影响,探讨 FOD 对肿瘤间质形成和肿瘤浸润转移的影响。结果发现 CLIC4 与胃癌间质形成相关,促进肿瘤的进展;FOD 可抑制 CLIC4 的表达,减少恶性肿瘤间质的形成,抑制肿瘤浸润和转移。张彦兵等<sup>[14]</sup>研究了 FOD 对肝癌 MHCC97-H 细胞增殖和凋亡的影响,结果表明 FOD 能显著抑制肝癌细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,呈时间依赖性和剂量依赖性。

胸腺是机体 T 淋巴细胞分化的重要组织器官,在机体对肿瘤发生免疫反应的过程中发挥重要作用,当肿瘤生长到一定程度,胸腺组织将发生萎缩;脾脏是免疫反应的启动部位,在机体的体液免疫和细胞免疫中起重要作用<sup>[15]</sup>。本研究通过构建骨肉瘤股骨原位移植瘤小鼠模型并采用 FOD 干预,结果发现 FOD 组小鼠胸腺指数和脾脏指数显著增加,说明 FOD 能够保护免疫器官并提高机体免疫功能。机体对肿瘤的免疫反应可分为细胞免疫和体液免疫两类,其中以 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> Th 细胞和 CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞为主的 T 淋巴细胞亚群发挥了重要的抗肿瘤免疫作用。细胞因子可通过免疫

细胞调节免疫功能,对维持机体免疫稳态起重要作用<sup>[16]</sup>。Th1 细胞介导的细胞免疫主要分泌 IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  等;Th2 细胞介导的体液免疫反应能促进 B 淋巴细胞成熟分化,主要分泌 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 和 IL-13 等<sup>[17]</sup>。Th1/Th2 细胞所维持的稳态可使机体具备正常的免疫功能,当 Th1 细胞及其分泌的细胞因子处于优势状态时,说明机体对肿瘤的免疫较强;反之,当 Th1 细胞及其分泌的细胞因子处于优势状态时,则说明机体对肿瘤的免疫功能受到抑制<sup>[18]</sup>。本研究表明 T 淋巴细胞亚群(CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)比例显著升高,免疫相关因子 IL-2, TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  显著升高,IL-4 和 IL-6 显著降低,这些结果表明 FOD 对骨肉瘤小鼠的免疫功能具有诱导和增强作用。辛欢欢等<sup>[15]</sup>研究发现 FOD 能促进小鼠脾淋巴细胞增殖,增强 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞活化的能力并促进 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  分泌。王秋兰等<sup>[19]</sup>通过检测 IL-2 和 IL-6 的含量来研究 FOD 的抗肿瘤机制,结果发现 FOD 对机体细胞免疫有调节作用,其机制可能是通过调节 T 淋巴细胞功能对抗化疗药物引起的骨髓抑制。

本研究结果说明 FOD 能够调节骨肉瘤胫骨原位移植瘤小鼠模型免疫相关因子表达,为骨肉瘤的综合治疗提供新的治疗手段。

## 参考文献

- [1] LETTIERI C K, APPEL N, LABBAN N, et al. Progress and opportunities for immune therapeutics in osteosarcoma[J]. Immunotherapy, 2016, 8(10): 1233-1244.
- [2] 庞莉,袁刘,葛信国. 肿瘤炎症微环境与中医阴阳平衡的关系[J]. 中医杂志, 2018, 59(21): 1832-1835.
- [3] 丁聚贤,谢兴文,许伟,等. 中医药在骨肉瘤放化疗中的作用研究进展[J]. 中医正骨, 2018, 30(5): 43-46.
- [4] 浦飞飞,陈凤霞,夏平. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分和作用机制的研究进展[J]. 癌症进展, 2019, 17(17): 1985-1988.
- [5] PU F, CHEN F, LIN S, et al. The synergistic anticancer effect of cisplatin combined with oldenlandia diffusa in osteosarcoma MG-63 cell line in vitro[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9(1): 255-263.
- [6] 刘振峰,任晓强,艾力江·阿斯拉,等. 细胞悬液注射法与组织块移植法建立骨肉瘤动物模型比较[J]. 科技导报, 2013, 31(16): 65-68.
- [7] 王宇翎,张艳,李前进,等. 白花蛇舌草总黄酮的抗肿瘤作用[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(11): 1622-1625.
- [8] 司富春,丁帅伟. 骨肉瘤中医证型与方药分析研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(7): 903-907.
- [9] 浦飞飞,陈凤霞,冯晶,等. 湖北地区骨肉瘤患者中医证型与临床病理学的相关性分析[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2019, 27(9): 42-45.
- [10] 袁长深,段戡,赵蔚峰,等. 从中医阴阳浅析骨肉瘤微环境紊乱与免疫失衡的联系[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(23): 4-6.
- [11] 芮冉,焦佩娟,张朝玉,等. 提高机体抗肿瘤免疫中药的现代研究[J]. 吉林中医药, 2018, 38(3): 325-327.
- [12] 张盐,胡作为. 胡作为运用清热药治疗肿瘤经验[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2018, 35(1): 44-49.
- [13] 王秋兰,薛永杰,韩涛. 胃癌中 CLIC4 蛋白表达及白花蛇舌草总黄酮对其表达的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(6): 681-684.
- [14] 张彦兵,王天昶,朱娇,等. 白花蛇舌草总黄酮对肝癌 MHCC97-H 细胞增殖的抑制作用[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(19): 2716-2719.
- [15] 辛欢欢,李春玲,王贵平. 白花蛇舌草黄酮注射液对小鼠脾淋巴细胞的免疫增强作用[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(7): 752-757.
- [16] 杜娜雯,白日兰,崔久崑. 肿瘤免疫逃逸机制及治疗策略[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(4): 454-462.
- [17] 鲍轶,莫娟芬. T 细胞耗竭、失能和衰老状态及其与肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(7): 557-560.
- [18] 王丽华,王亮亮,张競,等. 卵巢癌患者外周血 Th1/Th2 及 Treg/Th17 细胞平衡关系[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(8): 1066-1070.
- [19] 王秋兰,朱建坤,韩涛,等. 白花蛇舌草总黄酮对苯并(a)芘致实体瘤小鼠 IL-2 和 IL-6 的影响[J]. 西部中医药, 2015, 28(5): 14-17.

(收稿日期:2020-08-02)