

cecal epithelial cells [J]. *Parasitol Res*, 2017, 116 (1): 225-235.

[10] 刘丽君, 彭建新, 洪华珠, 等. 线粒体在细胞凋亡中的变化与作用[J]. 中国细胞生物学杂志, 2005, 27 (2): 117-120.

[11] 张丙信. Apaf-1、Caspase-9、Bax, Bcl-2 和 p53 在基底细胞样乳腺癌中的表达及临床意义[D]. 承德: 承德医学院, 2015.

[12] Luo J M, Yu L, Xie G C, *et al.* Study on the mitochondrial apoptosis pathways of small cell lung cancer H446 cells induced by trichinella spiralis muscle larvae ESPs [J]. *Parasitology*, 2017, 144(6): 793-800.

[13] Venkatachalam P, Nadumane V K. Modulation of Bax and Bcl-2 genes by secondary metabolites produced by penicillium rubens JGIPR9 causes the apoptosis of cancer cell lines [J]. *Mycology*, 2019, 12(2): 69-81.

益气养阴解毒方及黄芪甲苷体外对 CTLA-4 介导的肺癌免疫逃逸的影响

姜 怡^{1,2}, 蔡雨晴^{1,2}, 张 朋¹, 沈丽萍¹, 刘苓霜^{1*}, 刘嘉湘¹

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 上海中医药大学研究生院, 上海 200120)

摘要: **目的** 探讨益气养阴解毒方及黄芪甲苷在体外肿瘤细胞和淋巴细胞共培养体系中下调膜型细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (mCTLA-4) 和可溶性 CTLA-4 (sCTLA-4)、提高 CD8⁺T 淋巴细胞水平、抑制小鼠 Lewis 肺癌细胞生长的作用, 及其与抗 CTLA-4 单抗联用的协同增效作用。**方法** 小鼠脾脏淋巴细胞与 Lewis 肺癌细胞体外接触式共培养 24 h, 益气养阴解毒方、黄芪甲苷及抗 CTLA-4 单抗的给药浓度分别为 500、50、5 μg/mL, 分为空白对照组、黄芪甲苷组 (单体组)、益气养阴解毒方组 (复方组)、抗 CTLA-4 单抗组 (单抗组)、黄芪甲苷+抗 CTLA-4 单抗组 (单体+单抗组)、益气养阴解毒方+抗 CTLA-4 单抗组 (复方+单抗组)。流式细胞术检测淋巴细胞表面 mCTLA-4 及 CD8⁺T 细胞的表达, ELISA 法检测 sCTLA-4 的水平, CCK-8 法检测 Lewis 肺癌细胞的增殖情况。**结果** 与空白对照组比较, 单体组、复方组、单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组均可下调 mCTLA-4 及 sCTLA-4 的表达 ($P<0.01$), 提高 CD8⁺T 细胞水平 ($P<0.05$), 降低 Lewis 肺癌细胞的存活率 ($P<0.01$), 与抗 CTLA-4 单抗联合给药作用更优 ($P<0.05$)。**结论** 益气养阴解毒方及黄芪甲苷通过下调 mCTLA-4 及 sCTLA-4 表达提高抗肺癌免疫应答、逆转 CTLA-4 介导的肺癌免疫逃逸, 与抗 CTLA-4 单抗联合给药具有协同增效的作用。

关键词: 益气养阴解毒方; 黄芪甲苷; 共培养体系; 肺癌; 细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4; 免疫逃逸

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)08-2173-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.037

在我国, 肺癌发病率和死亡率均居恶性肿瘤首位^[1], 严重危害人类健康。忽视机体免疫系统在肺癌发生发展中的重要作用是阻碍临床疗效提高的重要原因之一。细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 是介导肿瘤免疫逃逸的重要抑制性分子, 主要表达在活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞表面, 组成性地表达于调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 表面, 与 CD28 竞争性地结合抗原提呈细胞表面的 B7 分子发挥免疫抑制作用, 且 CTLA-4 与 B7 分子的亲和力高于 CD28^[2-3]。

可溶性 CTLA-4 (soluble CTLA-4, sCTLA-4) 存在于外周循环中, 与淋巴细胞表面的膜型 CTLA-4 (membrane-bound CTLA-4, mCTLA-4) 具有相同的生物学效应。

国医大师刘嘉湘教授创立的“扶正治癌”学术思想指导肺癌治疗取得了显著的临床疗效, 其作用机制与免疫调节密切相关^[4]。益气养阴解毒方是“扶正法”治疗肺癌的代表方, 全方益气养阴以扶正固表, 清热解毒标本兼顾。作者课题组前期研究发现, 益气养阴解毒方及其类方可以提高肺癌患者生活质量、稳定瘤灶和延长生存期, 作用机

收稿日期: 2020-08-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703987); 上海市卫生和计划生育委员会面上项目 (201840158); 上海市科学技术委员会科研项目 (19401971200); 刘嘉湘国医大师传承工作室建设项目 (DSGZS-2017002); 上海申康医院发展中心科研项目 (SHDC12018124)

作者简介: 姜 怡 (1982—), 女, 博士生, 副主任医师, 从事中医药防治肺癌的临床及基础研究。Tel: (021) 64385700-8103, E-mail: jjyz@shutcm.edu.cn

* 通信作者: 刘苓霜 (1965—), 女, 硕士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治肺癌的临床及基础研究。Tel: (021) 64385700-8102, E-mail: liuls107@163.com

制与改善外周细胞免疫功能、下调 sCTLA-4 表达相关^[5-7]。黄芪是益气养阴解毒方的君药，补益肺脾之气。黄芪甲苷是黄芪最主要的单体活性成分^[8]，具有抗肺癌的活性，其机制可能与抑制吲哚胺-2, 3-双加氧酶（Indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO）表达，进而下调 Treg 细胞水平，增强细胞毒性 T 淋巴细胞的活性有关^[9]。益气养阴解毒方及黄芪甲苷体现了中医“扶正法”提高自身抗癌能力的治疗理念。基于此，本研究并非观察中医药对肿瘤细胞的直接抑制作用，而是应用淋巴细胞与肿瘤细胞共培养体系，探讨益气养阴解毒方及黄芪甲苷通过下调 mCTLA-4 及 sCTLA-4 表达，逆转 CTLA-4 介导的肺癌免疫逃逸，进而抑制肿瘤的生长，并探索中医药联合 CTLA-4 阻断剂的应用价值。

1 材料

1.1 动物和细胞 C57BL/6 小鼠，6~8 周龄，雄性，体质量约 20 g，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（沪）2018-0006。小鼠 Lewis 肺癌细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.2 药物与试剂 益气养阴解毒方由生黄芪 30 g、北沙参 30 g、天冬 15 g、麦冬 15 g、女贞子 12 g、山茱萸 9 g、绞股蓝 15 g、仙灵脾 15 g、葫芦巴 12 g、石上柏 30 g、石见穿 30 g、重楼 15 g 组成，生药由上海中医药大学附属龙华医院中药房提供。益气养阴解毒方按传统方法制成水煎剂，旋转蒸发仪浓缩后制成冻干粉，冻干粉由上海中医药大学附属龙华医院科技中心实验室制备，使用真空干燥（60℃）。益气养阴解毒方冻干粉采用 PBS 溶解，制备成质量浓度为 50 mg/mL 的贮备液，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装，4℃保存备用。黄芪甲苷（北京索莱宝科技有限公司，SA8640）粉末，纯度≥98%（HPLC），用 DMSO 制备成质量浓度为 20 mg/mL 的母液，-20℃保存备用。抗小鼠 CTLA-4 单抗 [clone 9H10]（美国 BioXCell 公司，660518J1），质量浓度为 7.32 mg/mL，以 PBS 作为溶剂，4℃避光保存备用。小鼠脾脏淋巴细胞分离液试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，P8860）。APC 标记的抗小鼠 CD152（CTLA-4）单克隆抗体（美国 Biolegend 公司，106310）。FITC 标记的抗小鼠 CD8a 抗体（美国 Biolegend 公司，100705）。小鼠 CTLA-4 ELISA 试剂盒（英国 Abcam 公司，ab255720）。细胞计数试剂盒-8（CCK-8）（上海碧云天生物技术有限公司，C0037）。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱（美国赛默飞世尔科技公司，51020241）；倒置荧光显微镜（日本奥林巴斯公司，OLYMPAS IX71）；台式低速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司，L500）；多功能酶标仪（美国 MD 公司，SpectraMax M2e）；流式细胞仪（美国贝克曼库尔特公司，FACS Calibur）。

2 方法

2.1 细胞培养 取培养基 RPMI 1640，加 10% FBS 和 1% 双抗（100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素），将消化后的 Lewis 肺癌细胞与配置好的培养基在 37℃、5%CO₂ 培养

箱中培养。取对数生长期的 Lewis 肺癌细胞用于后续实验。

2.2 小鼠脾脏淋巴细胞分离 无菌条件下摘取 C57BL/6 小鼠脾脏，撕去脾脏被膜，用眼科剪将脾脏剪成小块。将 200 目尼龙筛网放置于平皿上，加入少量组织稀释液，将脾脏放置于筛网上，使用注射器活塞来研磨脾脏。研磨完全后使用组织稀释液冲洗筛网，收集细胞悬液，再经滤网过滤。加入与脾脏单细胞悬液等量的分离液。吸取单细胞悬液加于分离液液面上。室温，2 500 r/min，离心 25 min。用移液枪吸取第二层环状乳白色淋巴细胞至另一洁净的 15 mL 离心管中，向离心管中加入 10 mL 细胞洗涤液洗涤白膜层细胞，1 000 r/min，离心 10 min。弃上清，5 mL 的细胞清洗液重悬细胞，1 000 r/min，离心 10 min，并重复一遍。弃上清，细胞重悬备用。

2.3 小鼠脾脏淋巴细胞与 Lewis 肺癌细胞共培养体系及分组给药 将对数生长期 Lewis 肺癌细胞和小鼠脾脏淋巴细胞进行细胞接触式共培养，共培养时间为 24 h。分为空白对照组、黄芪甲苷组（单体组）、益气养阴解毒方组（复方组）、抗 CTLA-4 单抗组（单抗组）、黄芪甲苷+抗 CTLA-4 单抗组（单体+单抗组）、益气养阴解毒方+抗 CTLA-4 单抗组（复方+单抗组）。本研究预实验采用 CCK-8 法检测益气养阴解毒方和黄芪甲苷对 Lewis 肺癌细胞存活率的影响以选择合适的给药浓度，结果显示益气养阴解毒方给药浓度 1 000 μg/mL、黄芪甲苷给药浓度 80 μg/mL 以下对 Lewis 肺癌细胞生长无影响，并参考抗 CTLA-4 单抗促进 IL-2 和 INF-γ 分泌、增强免疫功能的体外研究^[10]，本实验益气养阴解毒方、黄芪甲苷及抗 CTLA-4 单抗的给药浓度分别为 500、50、5 μg/mL。

2.4 流式细胞术检测 mCTLA-4 及 CD8⁺T 细胞的表达 将对数生长期的 Lewis 肺癌细胞（1×10⁶/mL）接种于 6 孔板中，每孔 1 mL，每组 3 复孔，待肿瘤细胞贴壁后，加入小鼠脾脏淋巴细胞（1×10⁶/mL），每孔 1 mL，根据组别加入益气养阴解毒方（500 μg/mL）、黄芪甲苷（50 μg/mL）、抗 CTLA-4 单抗（5 μg/mL），共培养 24 h。从共培养体系中吸取悬浮的淋巴细胞，PBS 清洗 2 次后，加入 CD8、CTLA-4 抗体，避光孵育 30 min。PBS 清洗，加入 300 μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪上机检测 CD8⁺T 细胞和 mCTLA-4。

2.5 ELISA 检测 sCTLA-4 共培养体系同“2.4”，取共培养所得上清，严格按照小鼠 CTLA-4 ELISA 试剂盒说明书进行操作。根据试剂盒中提供的标准品浓度绘制标准曲线，计算其质量浓度，单位用 pg/mL 表示。

2.6 CCK-8 检测 Lewis 肺癌细胞的增殖情况 在 96 孔板里，每孔加入 Lewis 肺癌细胞（2 000 个细胞）在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中进行培养，待肿瘤细胞贴壁后，加入小鼠脾脏淋巴细胞（2 000 个细胞），根据组别加入益气养阴解毒方（500 μg/mL）、黄芪甲苷（50 μg/mL）、抗 CTLA-4 单抗（5 μg/mL），每孔终体积为 100 μL，每组 3 个复孔，共培养 24 h，弃去培养上清（包括淋巴细胞），

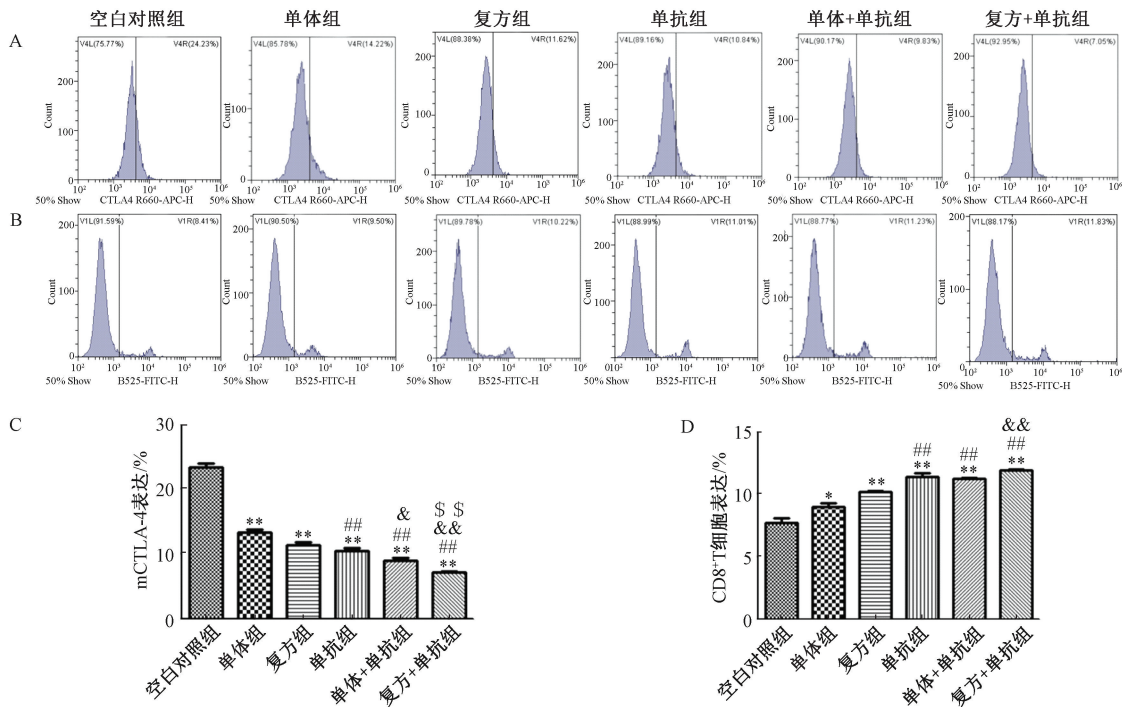
PBS 清洗 1 次后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液和 90 μL 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱内继续孵育 4 h, 在 450 nm 测定吸光度值。计算细胞存活率, 存活率 = $(\text{OD}_{\text{实验组}}/\text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 实验数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。运用 GraphPad Prism 5 软件进行作图。

3 结果

3.1 益气养阴解毒方及黄芪甲苷对 mCTLA-4 及 CD8⁺T 细胞的影响 与空白对照组比较, 单体组、复方组、单抗组、

单体+单抗组和复方+单抗组 mCTLA-4 表达降低 ($P < 0.01$); 与单体组比较, 单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 mCTLA-4 表达降低 ($P < 0.01$); 与复方组比较, 单体+单抗组和复方+单抗组 mCTLA-4 表达降低 ($P < 0.05$); 与单抗组比较, 复方+单抗组 mCTLA-4 表达降低 ($P < 0.01$)。与空白对照组比较, 单体组、复方组、单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 CD8⁺T 细胞表达升高 ($P < 0.05$); 与单体组比较, 单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 CD8⁺T 细胞表达升高 ($P < 0.01$); 与复方组比较, 复方+单抗组 CD8⁺T 细胞比例升高 ($P < 0.01$)。见图 1。

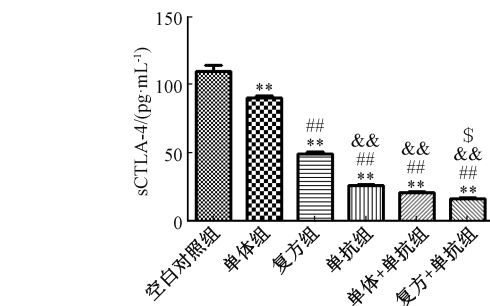


注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与单体组比较, ## $P < 0.01$; 与复方组比较, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$; 与单抗组比较, \$ $P < 0.01$ 。A 为 mCTLA-4 流式图, B 为 CD8⁺T 细胞流式图, C 为 mCTLA-4 统计结果图, D 为 CD8⁺T 细胞统计结果图。

图 1 益气养阴解毒方及黄芪甲苷对 mCTLA-4 和 CD8⁺T 细胞表达的影响 ($n=3$)

3.2 益气养阴解毒方及黄芪甲苷对 sCTLA-4 的影响 与空白对照组比较, 单体组、复方组、单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 sCTLA-4 表达降低 ($P < 0.01$); 与单体组比较, 复方组、单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 sCTLA-4 表达降低 ($P < 0.01$); 与复方组比较, 单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 sCTLA-4 表达降低 ($P < 0.01$); 与单抗组比较, 复方+单抗组 sCTLA-4 表达降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.3 益气养阴解毒方及黄芪甲苷对共培养体系中 Lewis 肺癌细胞增殖的影响 与空白对照组比较, 单体组、复方组、单抗组、单体+单抗组和复方+单抗组 Lewis 肺癌细胞存活率降低 ($P < 0.01$); 与单体组比较, 复方组、单体+单抗组和复方+单抗组 Lewis 肺癌细胞存活率降低 ($P < 0.01$); 与复方组比较, 单体+单抗组和复方+单抗组 Lewis 肺癌细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 与单抗组比较, 单体+单抗组和复

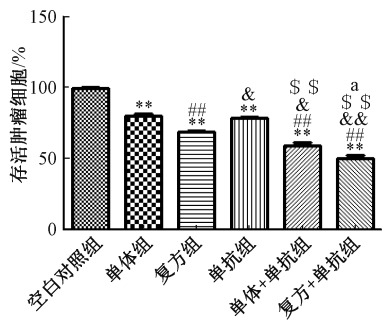


注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与单体组比较, ## $P < 0.01$; 与复方组比较, && $P < 0.01$; 与单抗组比较, \$ $P < 0.05$ 。

图 2 益气养阴解毒方及黄芪甲苷对 sCTLA-4 的影响 ($n=3$)

方+单抗组 Lewis 肺癌细胞存活率降低 ($P < 0.01$); 与单体+单抗组比较, 复方+单抗组 Lewis 肺癌细胞存活率降低 ($P < 0.01$); 与单抗组比较, 单体+单抗组和复

0.05)。见图 3。



注：与空白对照组比较，** $P < 0.01$ ；与单体组比较，## $P < 0.01$ ；与复方组比较，& $P < 0.05$ ，&& $P < 0.01$ ；与单抗组比较，\$ $P < 0.01$ ；与单体+单抗组比较，^a $P < 0.05$ 。

图 3 益气养阴解毒方及黄芪甲苷对 Lewis 肺癌细胞增殖的影响 ($n = 3$)

4 讨论

免疫应答过程中 T 细胞的激活需要双信号作用。第一信号主要来自 T 细胞抗原识别受体与抗原肽-主要组织相容性复合体的特异性结合；第二信号由一系列共刺激分子提供，免疫检查点就是其中负性共刺激分子，主要包括 CTLA-4、程序性死亡分子 1 (programmed death 1, PD-1) 及程序性死亡分子 1 配体 (PD-1 ligand, PD-L1) 等，其作用类似于 T 细胞的“制动系统”，抑制特异性 T 细胞的活化、增殖，限制免疫系统对自身健康细胞进行攻击。然而，恶性肿瘤利用免疫检查点这一特性逃避机体免疫杀伤。CTLA-4 主要在外周淋巴器官中抑制 T 细胞的活化^[11]，在肿瘤微环境中亦可发挥免疫抑制作用^[12]。sCTLA-4 是由于 CTLA-4 选择性剪切使 CTLA-4 基因缺失第三外显子而形成，亦与 B7 分子结合，阻断 CD28/B7 通路，抑制机体免疫功能^[13]。

中医学认为“正气亏虚”是肺癌发生、发展的根本，邪毒则是肺癌发生的重要条件。早在 20 世纪 70 年代，刘嘉湘教授在全国率先系统地提出“扶正治癌”学术思想和治疗方法，通过提高机体自身抗癌能力达到“人瘤共存”“带瘤生存”的目的，其机制可以从调节机体免疫功能方面深入研究。益气养阴解毒方是“扶正法”治疗肺癌的代表方，由生黄芪、北沙参、天冬、麦冬、女贞子、山茱萸、绞股蓝、仙灵脾、葫芦巴、石上柏、石见穿、重楼组成。生黄芪补益脾肺之气，北沙参滋养肺胃之阴液、润肺止咳，共为君药；天冬、麦冬、女贞子、山茱萸、绞股蓝为臣药，增强益气养阴的功效；仙灵脾、葫芦巴、石上柏、石见穿、重楼为佐药，仙灵脾、葫芦巴具有温肾阳、暖脾阳之功，其与黄芪合用，益气作用更强，其与滋养阴液诸药同用，则刚柔相济，石上柏、石见穿、重楼清热解毒，祛邪以扶正；天冬在本方中又取其入肺经亦作为使药之用。全方具有益气养阴、清热解毒之功效。研究显示，益气养阴解毒方及其类方具有稳定瘤灶、延长生存期的作用，机制与改善机体外周细胞免疫功能相关^[5-6]。黄芪甲苷是黄芪最主要

的单体活性成分，具有调节免疫系统、下调免疫抑制因子 IDO 表达以及增强对抗癌药物敏感性等作用^[8-9,14]。本课题组前期研究显示，晚期非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 患者外周血中 sCTLA-4 高表达^[15]；益气养阴解毒方及其类方的作用机制可能为下调晚期 NSCLC 患者外周血中 sCTLA-4 的表达^[7]。由此，推测调控 CTLA-4 介导的肺癌外周及微环境的免疫耐受可能是益气养阴解毒方的重要作用机制之一，值得进一步深入研究。

基于中医“扶正法”提高自身抗癌能力的治疗理念，本实验并非观察中药复方及单体直接抑制肿瘤细胞增殖的作用，而是运用淋巴细胞与肿瘤细胞共培养的方法，探讨益气养阴解毒方及黄芪甲苷是否通过下调 CTLA-4 表达，进而增强免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用，并观察中医药与免疫检查点抑制剂的协同增效作用。研究发现，黄芪甲苷、益气养阴解毒方、抗 CTLA-4 单抗均能下调共培养体系中 mCTLA-4 和 sCTLA-4 的表达，提高 CD8⁺T 细胞水平，黄芪甲苷或益气养阴解毒方联合抗 CTLA-4 单抗具有协同增效的作用。研究证实，益气养阴解毒方及黄芪甲苷可以通过下调免疫抑制分子 mCTLA-4 和 sCTLA-4，逆转 CTLA-4 介导的肺癌免疫逃逸，从而发挥抗癌作用，体现了中医“扶正治癌”提高自身抗癌能力的作用内涵。研究中，给药组均提高了 CD8⁺T 细胞的表达，可能与 CD8⁺T 细胞中细胞毒杀伤性亚群的增殖有关，课题组后续研究将进一步对 T 细胞表型进行分析，并深入挖掘中医药如何调控 CTLA-4 表达的分子机制，以期完善中医“扶正治癌”的作用机制提供研究基础。

参考文献：

[1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.

[2] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(2): 303-310.

[3] Balzano C, Buonavista N, Rouvier E, et al. CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes[J]. *Int J Cancer Suppl*, 1992, 7(2): 28-32.

[4] 刘苓霜, 张朋, 姜怡, 等. 中医扶正法治疗肺癌的临床疗效及其对机体的免疫调节作用[J]. 自然杂志, 2019, 41(4): 281-286.

[5] 刘嘉湘, 施志明, 李和根, 等. 益肺抗癌饮治疗 271 例非小细胞肺癌临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2001(2): 4-6.

[6] 郭慧茹, 刘嘉湘, 李和根, 等. 益气养阴解毒法对非小细胞肺癌患者生活质量和免疫功能的影响[J]. 吉林中医药, 2013, 33(12): 1217-1220.

[7] 姜怡, 吴立波, 沈丽萍, 等. 中医综合维持治疗方案对晚期非小细胞肺癌患者血清中可溶性细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 的影响及其与预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(10): 757-762.

[8] Li L, Hou X J, Xu R F, *et al.* Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2017, 31(1): 17-36.

[9] Zhang A L, Zheng Y H, Que Z J, *et al.* Astragaloside IV inhibits progression of lung cancer by mediating immune function of tregs and CTLs by interfering with IDO[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(11): 1883-1890.

[10] Selby M J, Engelhardt J J, Johnston R J, *et al.* Preclinical development of ipilimumab and nivolumab combination immunotherapy: mouse tumor models, *in vitro* functional studies, and cynomolgus macaque toxicology [J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0161779.

[11] Topalian S L, Drake C G, Pardoll D M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 450-461.

[12] Spranger S, Koblish H K, Horton B, *et al.* Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8⁺ T cells directly within the tumor microenvironment[J]. *J Immunother Cancer*, 2014, 2(1): 3.

[13] Oaks M K, Hallett K M, Penwell R T, *et al.* A native soluble form of CTLA-4[J]. *Cell Immunol*, 2000, 201(2): 144-153.

[14] 邹 衡, 丁 磊, 黎晶晶, 等. 黄芪甲苷抗肿瘤研究的新进展[J]. *药物生物技术*, 2019, 26(6): 547-551.

[15] 吴立波, 姜 怡, 姜维洁, 等. 外周血 sCTLA-4 作为晚期非小细胞肺癌患者的预后因子[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016, 23(5): 670-674.

丹酚酸 B 抑制波动高糖诱导的糖尿病大鼠心肌细胞凋亡

赵梦秋¹, 任允楠², 陶善珩², 郑书国^{2*}

(1. 安徽卫生健康职业学院药学教研室, 安徽 池州 247009; 2. 皖南医学院药理教研室, 安徽 芜湖 241002)

摘要: **目的** 观察丹酚酸 B 对波动高糖诱导的糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的影响。**方法** 采用高糖高脂饮食合并一次性腹腔注射链脉佐菌素 (STZ) 的方法建立大鼠糖尿病模型, 通过错时给予胰岛素或葡萄糖建立血糖波动模型, 给药组大鼠按照 160 mg/kg 及 80 mg/kg 的剂量给予丹酚酸 B 6 周。实验结束前一天检测大鼠空腹血糖及血糖波动情况。TUNEL 法观察大鼠心肌细胞凋亡情况, ELISA 法检测血清肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 以及心肌组织天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 表达, 免疫印迹法检测心肌组织 Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** 丹酚酸 B 能够降低糖尿病大鼠空腹血糖 ($P<0.05$, $P<0.01$), 减轻波动高糖诱导的糖尿病大鼠心肌细胞凋亡, 降低血清 CK-MB 水平 ($P<0.01$)。丹酚酸 B 上调 Bcl-2 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 抑制 Bax ($P<0.05$, $P<0.01$)、caspase-3 蛋白表达 ($P<0.01$)。**结论** 丹酚酸 B 可能通过调节凋亡相关蛋白表达抑制波动高糖诱导的糖尿病大鼠心肌细胞凋亡。

关键词: 丹酚酸 B; 糖尿病; 血糖波动; 心肌细胞; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)08-2177-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.08.038

糖尿病及其心血管并发症的发病率和致死率近年来持续上升, 是威胁人类健康的一大杀手^[1]。糖尿病心脏病 (Diabetic Cardiomyopathy, DCM) 是糖尿病的一种严重的心血管并发症, 疾病早期就能观察到结构与功能障碍^[2], 心肌细胞凋亡是其主要的病理特征之一。DCM 的发病机制尚未完全阐明, 多种因素如高血糖、胰岛素抵抗、代谢紊乱等可通过氧化应激、内质网应激、钙调节受损、线粒体功能障碍等各种途径促使心肌细胞凋亡^[3], 其中高血糖发挥关键作用。此外, 血糖波动可能是糖尿病患者早期心功能异常的危险因素^[4], 血糖波动可引起比持续高糖更严重的

慢性并发症, 如心肌细胞产生氧化应激损伤, 使心肌细胞凋亡增加^[5]。

作为传统中药丹参中提取出来的一种活性化合物, 丹酚酸 B 的心脏保护作用在多种模型上得到验证^[6-7]。然而丹酚酸 B 是否能够减轻波动高血糖造成的心脏损伤, 延缓 DCM 进程尚不清楚。本实验在糖尿病大鼠模型上通过人工干预造成一日内血糖水平大幅波动, 并观察丹酚酸 B 对心肌细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 动物与饲料 雄性 SD 大鼠, 体质量 220~240 g, 购

收稿日期: 2020-07-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81102626); 安徽高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2019A1283)

作者简介: 赵梦秋 (1990—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为心血管药理学。Tel: 18815730622, E-mail: 648003996@qq.com

* 通信作者: 郑书国 (1967—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师。Tel: 13955300871, E-mail: zhengsg2000@163.com