

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.01.015

肺瘤平膏及其拆方含药血清对体外负载肿瘤抗原树突状细胞与 T 细胞形成免疫突触的影响

王亚杰¹, 朱晓阳², 韩东², 敖卓², 贺用和³, 祁鑫³, 裴迎霞³, 熊露^{3*}, 张波¹

(1. 中国人民解放军第三〇六医院, 北京市朝阳区安翔北里 9 号, 100101; 2. 中国科学院国家纳米中心; 3. 中国中医科学院广安门医院)

摘要 目的 探讨肺瘤平膏抗肿瘤的免疫调节机制。方法 肺瘤平膏拆方分为解毒方、益气方、益气解毒方, 分别制备含药血清。应用扫描电镜及激光共聚焦显微镜观察成熟树突状细胞与 T 细胞体外相互作用动态过程。树突状细胞培养设为空白组, 将负载肿瘤抗原树突状细胞分为负载组、解毒组、益气组、益气解毒组、全方组和地米低、中、高剂量组, 每组设定 $10^6/10^6$ 、 $10^6/10^5$ 、 $10^5/10^6$ 、 $10^5/10^5$ (树突状细胞/T 细胞) 4 个浓度配比。细胞培养第 2 天, 解毒组、益气组、益气解毒组、全方组吸取相应中药血清 1 ml 加入细胞中, 地米低、中、高剂量组分别加入浓度为 37.5、75.0、150.0 mg/ml 地塞米松磷酸钠注射液 1 ml, 空白组、负载组加入不完全 RPMI-1640 培养液 1 ml。于培养第 8 天, 比较各组在混合培养 3、6 h 时 T 细胞数和免疫突触数。结果 体外负载肿瘤抗原树突状细胞与 T 细胞体外混合培养 30 min 时观察到免疫突触形成。3 h 时 T 细胞发生了明显增殖, 6 h 后随着免疫突触的减少, 细胞分布逐渐趋于均匀。全方组在 3、6 h 时 T 细胞数和免疫突触数均明显高于其余各组 ($P < 0.05$)。各给药组在 $10^6/10^6$ 配比下免疫突触数均明显高于其他配比 ($P < 0.01$)。各组细胞在不同配比下培养 6 h 与本组 3 h 时免疫突触数比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 肺瘤平膏具有一定调节免疫突触形成及促进负载肿瘤抗原树突状细胞刺激 T 细胞增殖作用, 且全方效果优于其拆方。

关键词 肿瘤; 肺瘤平膏; 树突状细胞; 负载肿瘤抗原; 免疫突触; T 细胞

肿瘤侵袭微生态系统中微血管网络、淋巴系统, 免疫效应细胞与肿瘤细胞间形成了相对独立、动态的微环境^[1-2]。在机体免疫选择压力下, 肿瘤细胞依靠自身高突变特性逃避免疫监视, 逐步建立起免疫抑制微环境, 以抵抗或抵制抗肿瘤免疫反应, 形成独特的肿瘤免疫微环境^[3]。浸润于肿瘤微环境中的免疫效应细胞如 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞等以及免疫相关的细胞因子网络是肿瘤免疫微环境的重要组成部分^[4-5]。成熟的树突状细胞通过与 T 细胞形成免疫突触, 刺激初始型 T 细胞的活化和增殖, 启动机体早期特异性抗肿瘤免疫应答, 是机体早期抗肿瘤免疫的关键^[6]。前期研究^[7]表明, 中药复方肺瘤平膏及其拆方可能是通过提高荷瘤小鼠树突状细胞含量及表达, 增强机体的抗肿瘤免疫功能, 进而发挥抑瘤作用。本

研究观察肺瘤平膏及其拆方对体外负载肿瘤抗原树突状细胞形成免疫突触、刺激 T 细胞增殖的影响, 初步探讨其调节肿瘤免疫作用及可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级日本大耳白兔 15 只, 雄性, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 由中国中医科学院动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2000-006。

1.2 细胞及药物

健康人外周血: 由北京市红十字会中心血站提供。肺瘤平膏: 由白花蛇舌草、草河车、败酱草、黄芪、西洋参、三七等组成, 为中国中医科学院广安门医院院内制剂 (批号: 20100522), 用 0.9% 氯化钠溶液制备成终浓度为 1.71 g/ml 后备用。肺瘤平膏拆方分为解毒方、益气方、益气解毒方, 由中国中医科学院广安门医院制剂室制成浸膏, 解毒方由白花蛇舌草、草河车、败酱草组成, 每克浸膏

基金项目: 北京市自然科学基金 (7122156)

* 通讯作者: jackxianglu@163.com, 18618337289

含生药 2.32 g; 益气方由黄芪、西洋参等组成, 每克浸膏含生药 3.62 g; 益气解毒方由白花蛇舌草、草河车、败酱草、黄芪、西洋参组成, 每克浸膏含生药 2.77 g, 分别配置成浓度为 2.32 g/ml、3.62 g/ml、2.77 g/ml 溶液备用。地塞米松磷酸钠注射液: 5 mg/支, 浙江仙琚制药有限公司, 批号: H33020826。

1.3 主要试剂及仪器

淋巴细胞分离液 Percoll 分离液 (货号: LTS1077) 由 TBD 公司提供; 胎牛血清 (批号: F2442) 由 Sigma 公司提供; CD80 (FITC) F-Mab (批号: 560926)、CD86 (PE) F-Mab (批号: 557344) 购自 Biolegend 公司; 重组肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α , 批号: 560923)、重组人白细胞介素 4 (rhIL-4, 批号: 560701)、重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 由 BD 公司提供; Hoechst-33342 (批号: B2261) 由 Eugene oregon USA 公司提供; Brad-ford 蛋白质定量试剂盒 (批号: CW0013) 购自康为世纪生物科技有限公司; 钙黄绿素储备液 (批号: BNN2149) 为 Sigma 公司提供。

流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: FACSCalibur); 激光共聚焦显微镜 (Nikon 公司, 型号: TE2000U); 低真空扫描电子显微镜 (FEI 公司, 型号: Quanta FEG ESEM); 磁珠分选仪 (德国美天旌生物技术有限公司, 型号: 130096535)。

1.4 树突状细胞与 T 细胞、免疫突触的扫描电镜观察

1.4.1 树突状细胞的培养 健康人外周血浓缩白细胞分离得到的白细胞层, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h。采用贴壁法, 去除巨噬细胞, 加入含有细胞因子 (rhTNF- α 浓度 500 U/ml、rhIL-4 浓度 100 U/ml、rhGM-CSF 浓度 150 ng/ml) 的 RPMI-1640 培养液, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日半量换液。在倒置显微镜下连续每日观察细胞的生长状态及形态变化。待成熟后, 1% 台盼蓝染色, 光镜下细胞计数后, 将细胞数调整到 1×10^6 /ml、 1×10^5 /ml、 1×10^4 /ml 备用。

1.4.2 外周血中单个核细胞 (PBMC) 的分离 将上法分离获得的白细胞层采用贴壁法去除巨噬细胞, 加入 RPMI-1640 培养液, 将细胞数调整到 1×10^6 /ml, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日半量换液。在倒置显微镜下连续每日观察细胞的生长状态及形态变化。

1.4.3 负载肿瘤抗原树突状细胞制备 取对数生长期 Lewis 肺癌细胞株 (中国中医科学院由广安门医院肿瘤实验室提供) 1×10^{10} 个/ml, 反复冻融后, 取上清液按 Brad-ford 蛋白质定量法制作标准曲线, 按试剂盒说明书测定抗原浓度。肿瘤全抗原负载树突状细胞培养与鉴定: 密度梯度法分离得到 PBMC, 制成悬液, 调整贴壁细胞浓度为 2×10^6 个/ml。加入 rhGM-CSF 800 U/ml、rhIL-4 1000 U/ml、rhTNF α 100 μ g/L, 第 3、6 天分别加入肿瘤抗原 10 mg/L 或不加入, 第 9 天收集成熟树突状细胞, 流式细胞仪检测 PE、FITC 标记的 CD86、CD80 表达。用不完全 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^6 /ml, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 7~10 天, 备用。

1.4.4 外周血 T 细胞的分离与纯化 T 淋巴细胞磁珠分选纯化, 不完全 RPMI-1640 培养液培养第 3 天的外周血细胞, 离心制备细胞悬液, 弃上清; 加入 40 μ l 缓冲液重悬细胞颗粒。按磁珠分选步骤收集流出的富集 T 细胞, 离心弃上清, 加入 5 ml 不完全 RPMI-1640 培养液, 得到纯化后的 T 淋巴细胞, 置于 37℃、5% 培养箱中继续培养, 备用。将获得纯化 T 细胞采用 1% 台盼蓝染色, 光镜下细胞计数, RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^6 /ml 和 1×10^5 /ml, 体外培养 3 天备用。

1.4.5 扫描电镜观察 1) 磁珠分选后鉴定 T 淋巴细胞, 取 1×10^6 细胞流式检测 CD3⁺ 的表达量进行比较。于培养的第 7 天低真空扫描电镜下鉴定 T 淋巴细胞的形态并成像。2) 成熟树突状细胞电镜成像: 将培养 10 天后获得的树突状细胞滴于多聚赖氨酸包被的玻片上, 37℃ 温育 4 h 后用 2.5% 戊二醛固定 1 h, 并用 1M 的 PBS 冲洗 3 次后, 1% 锇酸固定 90 min, 依次以 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇脱水 3 min, 扫描电镜观察并摄片。3) 免疫突触电镜成像: 混合培养 3~6 h 的 T 细胞与负载肿瘤抗原树突状细胞按上述方法固定, 扫描电镜观察并摄片。

1.5 肿瘤平膏及其拆方含药血清对体外免疫突触形成、T 细胞增殖的影响

1.5.1 含药血清的制备 大耳白兔分为空白对照组、益气方组、解毒方组、益气解毒方组、全方组, 每组 3 只。各给药组灌胃给予相应中药 10 ml/只, 空白对照组灌胃给予等量蒸馏水, 每日 2 次, 连续 4 天。末次灌胃后 2 h 从耳缘静脉采血 8~10 ml, 温室下放置 3 h, 常温 3000 r/min 离心

20 min, 吸取上清, 再于 56℃ 恒温水域箱中灭活 40 min, 于超净台 0.22 μm 过滤除菌, 分装, 置于 -20℃ 保存, 用时放置到室温, 备用。

1.5.2 体外激光共聚焦显微镜动态观察 树突状细胞培养设为空白组, 将负载肿瘤抗原树突状细胞分为负载组、解毒组、益气组、益气解毒组、全方组和地米低、中、高剂量组。用不完全 RPMI-1640 培养液调整树突状细胞及 T 细胞浓度为 1×10^6 /ml、 1×10^5 /ml, 每组设定 4 个浓度配比, 即 $10^6/10^6$ 、 $10^6/10^5$ 、 $10^5/10^6$ 、 $10^5/10^5$, 各组细胞各取 1 ml, 于激光共聚焦培养皿细胞培养第 2 天, 解毒组、益气组、益气解毒组、全方组吸取相应中药血清 1 ml 加入细胞中, 地米低、中、高剂量组分别加入浓度为 37.5、75.0、150.0 mg/ml 地塞米松磷酸钠注射液 1 ml, 空白组、负载组加入不完全 RPMI-1640 培养液 1 ml, 隔日半量换液。于培养第 8 天, 1% 台盼蓝染色, 细胞计数后, 1500r/min 离心 10 min, 弃去上清。将钙黄绿素荧光探针以 1 ml DMSO 溶解, 浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 加 $10 \mu\text{l}$ 钙黄绿素储备液到 5 ml 的 PBS 中配制成染色溶液, 钙黄绿素的终浓度为 $2 \mu\text{mol}/\text{L}$, 加入各组细胞中, 室温孵育 15 min。采用 (490 ± 10) nm 波长激发, 进行双细胞同时相动态观察, 每隔 15 min 成像观察, 连续观察 10 h。将 Hoechst-33342 荧光探针以 PBS 稀释终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 加入 T 细胞中, 37℃, 标记 30 min。Hoechst-33342 标记的 T 淋巴细胞采用 730 nm 波长双光子激发, 进行双细胞同时相动态观察, 每隔 15 min 成像观察, 连续观察 24 h 以上。采用 Image pro plus 6.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 分析, 免疫突触: 以单个树突状细胞与 T 细胞结合计为 1 个免疫突触; 选取结合数量 ≥ 3 个 T 细胞的树突状细胞计数, 少于 3 个突触者予以剔除。最后共选取 5 个层面的每 5 个视野, 以平均树突状细胞结合的 T 细胞数 (个/ mm^2) 来计算免疫突触数。T 细胞增殖数: 选取 5 个层面的每 5 个视野, 计算平均细胞数 (个/ mm^2)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 One-Way ANOVA 进行显著性检验。

2 结果

2.1 树突状细胞与 T 细胞形成免疫突触的扫描电镜成像观察

电镜成像显示, 树突状细胞表面突起细而长的

类似神经突起样的伪足, 表面呈极为复杂凹凸形貌, 符合成熟树突状细胞的形貌, 每一树突状细胞周围与不同数量 T 细胞结合, 或部分胞浆融合或以树突状“触脚”紧密相连, 形成免疫突触, 表现为类“团簇样”黏聚。树突状细胞与 T 细胞充分接触混合培养 30 min 即有免疫突触形成, 3 h 后 T 细胞向树突状细胞“团簇团”聚焦, 细胞充分接触, 形成免疫突触。

2.2 树突状细胞与 T 细胞分布动态变化的激光共聚焦显微镜观察

树突状细胞与 T 细胞在混合培养体系中随着相互作用时程的延长, 分布发生了明显的变化。30 min 树突状细胞与 T 细胞相互游走聚集, 有免疫突触的形成。第 2 h 随着免疫突触形成的增多, 两种细胞聚集现象加剧, 树突状细胞与结合在其周围的 T 细胞形成少量“团簇样”聚集。第 3 h 可观察 T 细胞与树突状细胞均发生不均匀的聚集, 二者聚集区域一致。第 3~4 h 相互聚集的现象呈加剧趋势。6 h 后随着免疫突触的减少, 聚集分布逐渐趋于均匀。第 10 h 仍可见到某种程度的聚集现象。

2.3 肺癌平膏及其拆方含药血清对负载肿瘤抗原树突状细胞刺激 T 细胞增殖的影响

表 1 示, 与空白组比较, 全方组、益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中、高剂量组 T 细胞数明显升高, 并且 T 细胞数全方组 > 益气解毒组 > 益气组 > 解毒组 > 地米低剂量组 > 地米中剂量组 > 地米高剂量组, 除 $10^6/10^6$ 、 $10^5/10^5$ 配比下益气解毒组与益气组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 其余各组各配比下与益气组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。全方组各配比下 T 细胞数均高于益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中、高剂量组 ($P < 0.01$)。除地米高剂量组外, 其余各组 $10^6/10^6$ 配比下 T 细胞数均明显高于其他配比 ($P < 0.01$)。

表 2 示, 与空白组比较, 全方组、益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中剂量组 T 细胞数明显升高 ($P < 0.01$); 负载组、地米高剂量组与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。除 $10^6/10^5$ 、 $10^5/10^6$ 、 $10^5/10^5$ 配比下益气解毒组与全方组 T 细胞数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 其余各组与全方组各配比下 T 细胞数比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。全方组、益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中、高剂量组在 $10^6/10^6$ 配比下 T 细胞数高于本组 $10^6/10^5$ 配比,

$10^5/10^6$ 配比高于 $10^5/10^5$ 配比 ($P < 0.01$)。混合培养 6 h, $10^6/10^6$ 和 $10^5/10^6$ 配比时全方组、益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中剂量组, $10^6/10^5$ 配比时益气解毒组、益气组, $10^5/10^5$ 配比时解毒组和地米低、高剂量组 T 细胞数与本组 3 h 时

比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4 肺瘤平膏及其拆方含药血清对负载肿瘤抗原树突状细胞形成免疫突触的影响

表 3 示, 细胞混合培养 3、6 h 后, 全方组、益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中、高剂

表 1 树突状细胞与 T 细胞不同配比混合培养 3 h 后各组 T 细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	树突状细胞/T 细胞			
		$10^6/10^6$	$10^6/10^5$	$10^5/10^6$	$10^5/10^5$
空白组	3	203.1 $\pm$ 21.0	124.5 $\pm$ 14.8	160.8 $\pm$ 19.4	101.0 $\pm$ 15.7
负载组	3	253.1 $\pm$ 24.9	150.3 $\pm$ 20.2	210.6 $\pm$ 30.0	151.0 $\pm$ 19.9
解毒组	3	709.0 $\pm$ 25.8 * Δ ▲	366.0 $\pm$ 38.1 * Δ ▲#	503.9 $\pm$ 20.0 * Δ ▲#	280.4 $\pm$ 40.0 * Δ ▲#
益气组	3	973.0 $\pm$ 28.3 *▲	402.1 $\pm$ 20.0 *▲#	600.7 $\pm$ 17.2 *▲#	395.9 $\pm$ 17.3 *▲#
益气解毒组	3	998.9 $\pm$ 38.0 *▲	460.5 $\pm$ 25.9 * Δ ▲#	910.0 $\pm$ 20.5 * Δ ▲#	400.0 $\pm$ 14.8 *▲#
全方组	3	1439.6 $\pm$ 55.7 * Δ	530.1 $\pm$ 44.3 * Δ #	1204.2 $\pm$ 48.2 * Δ #	455.3 $\pm$ 50.4 * Δ #
地米低剂量组	3	678.3 $\pm$ 39.4 * Δ ▲	346.6 $\pm$ 55.8 * Δ ▲#	433.2 $\pm$ 40.4 * Δ ▲#	245.1 $\pm$ 22.9 * Δ ▲#
地米中剂量组	3	505.2 $\pm$ 44.7 * Δ ▲	300.0 $\pm$ 48.6 * Δ ▲#	400.9 $\pm$ 30.7 * Δ ▲#	211.0 $\pm$ 50.0 * Δ ▲#
地米高剂量组	3	381.6 $\pm$ 25.3 * Δ ▲	200.7 $\pm$ 27.6 * Δ ▲	380.1 $\pm$ 36.4 * Δ ▲	180.5 $\pm$ 26.0 * Δ ▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与益气组比较, $\Delta P < 0.01$; 与全方组比较, ▲ $P < 0.01$; 与本组 $10^6/10^6$ 配比比较, # $P < 0.01$

表 2 树突状细胞与 T 细胞不同配比混合培养 6 h 后各组 T 细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	树突状细胞/T 细胞			
		$10^6/10^6$	$10^6/10^5$	$10^5/10^6$	$10^5/10^5$
空白组	3	200.4 $\pm$ 17.6	117.0 $\pm$ 16.2	180.1 $\pm$ 15.0	118.3 $\pm$ 18.0
负载组	3	269.1 $\pm$ 18.5	149.8 $\pm$ 19.1	260.4 $\pm$ 22.0	169.0 $\pm$ 20.2
解毒组	3	656.9 $\pm$ 20.3 * Δ ○	386.4 $\pm$ 28.0 * Δ ▲	663.8 $\pm$ 26.7 * Δ ○○	350.9 $\pm$ 27.7 * Δ ▲○
益气组	3	899.6 $\pm$ 37.2 * Δ ○○	501.8 $\pm$ 19.0 * Δ ▲○○	1002.0 $\pm$ 22.6 * Δ ○○	409.9 $\pm$ 17.6 * Δ #
益气解毒组	3	1200.2 $\pm$ 16.9 * Δ ○○	520.7 $\pm$ 34.4 * Δ ○	1130.2 $\pm$ 34.2 * Δ ○○	420.9 $\pm$ 30.8 * Δ #
全方组	3	1516.6 $\pm$ 35.0 * Δ ○	530.5 $\pm$ 24.9 * Δ ▲	1174.0 $\pm$ 28.0 * Δ ○	443.7 $\pm$ 24.9 * Δ #
地米低剂量组	3	898.0 $\pm$ 29.0 * Δ ○○	400.9 $\pm$ 35.0 * Δ ▲	805.9 $\pm$ 20.4 * Δ ○○	325.9 $\pm$ 19.2 * Δ ▲○
地米中剂量组	3	780.3 $\pm$ 24.0 * Δ ○○	306.1 $\pm$ 28.5 * Δ ▲	740.6 $\pm$ 20.1 * Δ ○○	283.0 $\pm$ 20.9 * Δ ▲#
地米高剂量组	3	380.2 $\pm$ 20.7 Δ	190.4 $\pm$ 21.3 Δ ▲	360.0 $\pm$ 16.9 Δ	150.0 $\pm$ 16.0 Δ ▲○

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与全方组比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 $10^6/10^6$ 配比比较, ▲ $P < 0.01$; 与本组 $10^5/10^6$ 配比比较, # $P < 0.01$; 与表 1 同组 3 h 时比较, ○ $P < 0.05$, ○○ $P < 0.01$

表 3 树突状细胞与 T 细胞不同配比混合培养 3、6 h 各组免疫突触数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	样本数	树突状细胞/T 细胞			
			$10^6/10^6$	$10^6/10^5$	$10^5/10^6$	$10^5/10^5$
空白组	3 h	3	30.2 $\pm$ 3.9	21.1 $\pm$ 4.2	24.1 $\pm$ 4.7	20.0 $\pm$ 3.0
	6 h	3	29.1 $\pm$ 2.6	20.0 $\pm$ 3.1	20.2 $\pm$ 3.7	18.2 $\pm$ 2.9
负载组	3 h	3	33.0 $\pm$ 5.6	19.1 $\pm$ 2.0	25.0 $\pm$ 5.7	18.7 $\pm$ 4.2
	6 h	3	30.0 $\pm$ 3.9	17.2 $\pm$ 3.2	23.0 $\pm$ 3.4	13.7 $\pm$ 2.5
解毒组	3 h	3	45.9 $\pm$ 2.0 * Δ	29.9 $\pm$ 1.7 * Δ ▲	34.8 $\pm$ 2.0 * Δ ▲	26.8 $\pm$ 2.0 * Δ ▲
	6 h	3	60.4 $\pm$ 6.8 * Δ	43.1 $\pm$ 7.0 * Δ ▲	54.2 $\pm$ 4.0 * Δ ▲	39.9 $\pm$ 8.2 * Δ ▲
益气组	3 h	3	49.6 $\pm$ 6.1 * Δ	36.6 $\pm$ 4.3 * Δ ▲	40.4 $\pm$ 3.4 * Δ ▲	33.4 $\pm$ 3.2 * Δ ▲
	6 h	3	55.5 $\pm$ 9.2 * Δ	35.9 $\pm$ 4.0 * Δ ▲	49.1 $\pm$ 3.4 * Δ ▲	38.0 $\pm$ 9.1 * Δ ▲
益气解毒组	3 h	3	53.2 $\pm$ 5.2 * Δ	36.9 $\pm$ 3.9 * Δ ▲	44.2 $\pm$ 3.8 * Δ ▲	37.3 $\pm$ 3.2 * Δ ▲
	6 h	3	64.3 $\pm$ 9.3 * Δ	39.8 $\pm$ 5.4 * Δ ▲	52.8 $\pm$ 9.3 * Δ ▲	40.4 $\pm$ 9.8 * Δ ▲
全方组	3 h	3	63.7 $\pm$ 4.9 *	48.0 $\pm$ 3.6 * Δ ▲	53.6 $\pm$ 6.0 * Δ ▲	45.0 $\pm$ 2.3 * Δ ▲
	6 h	3	87.1 $\pm$ 9.8 *	58.4 $\pm$ 9.3 * Δ ▲	79.3 $\pm$ 6.3 * Δ ▲	56.0 $\pm$ 8.7 * Δ ▲
地米低剂量组	3 h	3	43.0 $\pm$ 3.5 * Δ	27.7 $\pm$ 2.2 * Δ ▲	30.0 $\pm$ 2.0 * Δ ▲	26.1 $\pm$ 2.0 * Δ ▲
	6 h	3	51.3 $\pm$ 4.1 * Δ	30.7 $\pm$ 4.2 * Δ ▲	43.2 $\pm$ 2.3 * Δ ▲	30.1 $\pm$ 3.3 * Δ ▲
地米中剂量组	3 h	3	36.0 $\pm$ 3.3 * Δ	25.5 $\pm$ 4.4 * Δ ▲	34.8 $\pm$ 3.6 * Δ ▲	24.8 $\pm$ 3.0 * Δ ▲
	6 h	3	39.0 $\pm$ 10.2 * Δ	26.3 $\pm$ 8.7 * Δ ▲	35.9 $\pm$ 8.0 * Δ ▲	27.0 $\pm$ 9.9 * Δ ▲
地米高剂量组	3 h	3	20.1 $\pm$ 4.0 * Δ	14.1 $\pm$ 4.1 * Δ ▲	13.5 $\pm$ 3.6 * Δ ▲	11.1 $\pm$ 2.3 * Δ ▲
	6 h	3	18.1 $\pm$ 3.0 * Δ	9.0 $\pm$ 2.2 * Δ ▲	12.1 $\pm$ 2.0 * Δ ▲	7.1 $\pm$ 1.9 * Δ ▲

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与全方组同时间比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 $10^6/10^6$ 配比同时间比较, ▲ $P < 0.01$

量组在各配比下免疫突触数与空白组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 而负载组与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。全方组在各配比下免疫突触数明显多于益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中、高剂量组 ($P < 0.01$)。全方组、益气解毒组、益气组、解毒组和地米低、中、高剂量组在 $10^6/10^6$ 配比下免疫突触数均明显高于其他配比 ($P < 0.01$)。各组细胞在不同配比下培养 6 h 与本组 3 h 时免疫突触数变化差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

T 细胞的免疫识别主要通过 T 细胞受体 (TCR) /CD3 复合体识别抗原呈递细胞 (APC) 的 MHC-肽复合物, 并在 T 细胞与抗原呈递细胞间形成复杂的超分子活化簇 (SMAC) 的结构, 其形成过程涉及作用位点的膜与脂筏微域的重分区和聚集、接头蛋白的相互作用、细胞骨架的活化以及黏附分子的作用, 这与神经突触的结构和功能有相似性, 因此称为免疫突触^[1]。APC 与特异性细胞毒性 T 细胞相互作用形成免疫学突触是 T 细胞活化的关键^[2]。免疫突触的形成将强化 T 细胞受体与 MHC-肽的相互作用、促进 T 细胞信号转导相关分子的相互作用, 有利于 T 细胞效应功能的发挥^[3]。Stoll 等^[4]应用双光子激光共聚焦显微镜成功观察了离体淋巴结中树突状细胞刺激 T 细胞增殖的过程, 为我们应用双光子激光共聚焦显微镜动态成像技术, 设计在体外培养体系中动态观察树突状细胞刺激 T 细胞增殖过程, 深入揭示富含多糖类中药调节机体免疫机制的研究提供了可能。

本研究应用扫描电镜、流式细胞术检测及激光共聚焦显微镜细胞动态成像技术, 观察成熟树突状细胞与 T 细胞体外相互作用的动态过程。研究显示, 经肿瘤抗原负荷成熟树突状细胞体外亦可与 T 细胞形成免疫突触, 树突状细胞与 T 细胞在混合培养体系中随着相互作用时程的延长分布发生了明显的变化。最初的 30 min 内即可发生相互聚集, 树突状细胞与 T 细胞相互游走聚集, 有免疫突触形成; 第 3~6 h 达到高峰, 6~10 h 随着免疫突触的减少, 聚集分布则逐渐趋于均匀。初步证实免疫突触的形成在树突状细胞刺激 T 细胞增殖中发挥重要作用。

肺瘤平膏以解毒抗癌、益气养阴、活血化瘀为基本治疗大法, 前期研究结果显示, 肺瘤平膏能够

调节树突状细胞抗原递呈功能, 提高机体的抗肿瘤免疫监视功能^[5]。另外, 还发现其对血小板的激活和黏附具有抑制作用, 进而影响恶性肿瘤的转移过程^[6]; 通过减少肿瘤患者的血栓形成, 升高抗凝血酶 III 活性水平, 减少转移的发生, 缓解肿瘤患者高凝状态^[7]。本研究初步表明, 肺瘤平膏全方含药血清可促进免疫突触的形成, 延长其结合时间, 有一定刺激 T 细胞增殖的作用; 并且肺瘤平膏全方在调节免疫突触形成、刺激 T 细胞增殖效应方面, 明显优于其拆方 (益气方、益气解毒方、解毒方)。

参考文献

- [1] RESTIFO NP, KAWAKAMI Y, MARINCOLA F, et al. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I [J]. *Immunother*, 1993, 14(3): 182-190.
- [2] GREAVES M, MALEY CC. Clonal evolution in cancer [J]. *Nature*, 2012, 481(7381): 306-313.
- [3] KHANNA R, COOPER L, KIENZLE N, et al. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt lymphoma cells [J]. *Immunol*, 1997, 159(12): 5782-6785.
- [4] MONTES M, MCLLOY D, HOSMALIN A, et al. Calcium responses elicited in human T cells and dendritic cells by cell-cell interaction and soluble ligands [J]. *Int Immunol*, 1999, 11(4): 561-568.
- [5] REVY P, SOSPEDRA M, BARBOUR B, et al. Functional antigen independent synapses formed between T cells and dendritic cells [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(21): 925-931.
- [6] GRAKOU A, BROMLEY SK, SUMEN C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 221-227.
- [7] 郑红刚, 朴炳奎, 花宝金, 等. 肺瘤平膏及其拆方对 Lewis 肺癌小鼠树突状细胞影响的实验研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(12): 1288-1291.
- [8] STOLL S, DELON J, BROTZ TM, et al. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes [J]. *Science*, 2002, 296(5574): 1873-1876.
- [9] 李树奇, 林洪生, 张宗歧, 等. 肺瘤平对中晚期肺癌患者血液流变学和抗凝血酶 III 影响的临床研究 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 1995, 1(2): 84-88.
- [10] 郑红刚, 朴炳奎, 林洪生, 等. 肺瘤平膏及其拆方对树突状细胞抗原递呈功能影响的分子机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(6): 1133-1136.

Effect of Medicated Serum of Feiliuping Extractum (肺瘤平膏) and Its Decomposed Recipes on Immune Synapse Formation between Tumor Antigen Loaded Dendritic Cells and T Cells: An in Vitro Study

WANG Yajie¹, ZHU Xiaoyang², HAN Dong², AO Zhuo², HE Yonghe³, QI Xin³, PEI Yingxia³, XIONG Lu³, ZHANG Bo¹

(1. 306th Hospital of People's Liberation Army, Beijing, 100101; 2. National Center for Nanoscience and Technology, Chinese Academy of Sciences; 3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To explore the probable immune regulation mechanism of Feiliuping Extractum (肺瘤平膏) in treating tumor. **Methods** The Feiliuping Extractum was decomposed into Jiedu Recipe (解毒方), Yiqi Recipe (益气方) and Yiqi Jiedu Recipe (益气解毒方), and the medicated serums were prepared. The dynamic interaction between mature dendrite cells and T cells in vitro was observed by scanning electron microscope (SEM) and laser scanning confocal microscope (LSCM). The dendrite cell culture was set as the blank group, while the tumor antigen loaded dendrite cells was divided into the load group, Jiedu group, Yiqi group, Yiqi Jiedu group, the whole recipe group and the low, medium and high dose of dexamethasone (DX) group, and four concentration ratios ($10^6/10^6$, $10^6/10^5$, $10^5/10^6$, $10^5/10^5$, dendrite cell/ T cell) were set in each group. On the 2nd day of cell culture, Jiedu group, Yiqi group, Yiqi Jiedu group and the whole recipe group were given 1ml of corresponding medicated serum to the cell, and the low, medium and high dose of DX groups were given DX sodium phosphate injection with the concentration of 37.5, 75.0 and 150.0 mg/ml, and the blank group and the load group were added 1 ml of incomplete RPMI-1640 culture medium. On the 8th day of culture, the T cell number and the immune synapse number in each group were compared at the 3rd and 6th hour of mixed culture. **Results** At the 30th minute of mixed culture of tumor antigen loaded dendrite cells and T cells, the immune synapse formation was observed. At the 3rd hour, T cells proliferated significantly. After 6 hours, along with the decrease of immune synapses, the cell distribution tended to be even gradually. In the whole recipe group, the T cell number and immune synapse number at the 3rd and 6th hour were larger significantly than the other groups ($P < 0.05$). In each drug administration group, the synapse number at the ratio of $10^6/10^6$ was larger significantly than the other ratios ($P < 0.01$). In each group, the synapse number at the 6th hour had no statistically significant difference from that at the 3rd hour in different ratios ($P > 0.05$). **Conclusion** Feiliuping Extractum could regulate the formation of immune synapse and promote the stimulation of the tumor antigen loaded dendrite cells on the proliferation of T cells. The whole recipe performs better than the decomposed recipes.

Keywords tumor; Feiliuping Extractum; dendrite cell; loading tumor antigen; immune synapse; T cell

(收稿日期: 2016-02-15; 修回日期: 2016-09-31)

编辑: 邓 媛

• 信 息 窗 •

第一部中医药综合性法律正式颁布

2016 年 12 月 25 日, 国家主席习近平发布第五十九号主席令, 《中华人民共和国中医药法》已由第十二届全国人民代表大会常务委员会第二十五次会议通过, 自 2017 年 7 月 1 日起正式施行。这部为传统中医药振兴而制定的国家法律的诞生, 将为继承和弘扬中医药、促进中医药事业健康发展提供有力的法律支撑。

中医药是中华民族的瑰宝, 是我国独特的卫生资源、潜力巨大的经济资源、具有原创优势的科技资源、优秀的文化资源和重要的生态资源。历经数千年不断丰富发展, 中医药以其深邃的哲学思想为中华民族繁衍昌盛做出了卓越贡献, 被誉为打开中华文明宝库的钥匙。国家卫生计生委副主任、国家中医药管理局局长王国强在全国人大常委会办公厅新闻发布会上指出, 中医药法作为第一部全面、系统体现中医药特点的综合性法律, 将党和国家关于发展中医药的方针政策用法律形式固定下来, 将人民群众对中医药的期盼和要求用法律形式体现出来, 对中医药行业发展具有里程碑意义。

这部法律明确了中医药事业的重要地位和发展方针, 提出“中医药事业是我国医药卫生事业的重要组成部分。国家大力发展中医药事业, 实行中西医并重的方针”; “发展中医药事业应当遵循中医药发展规律, 坚持继承和创新相结合, 保持和发挥中医药特色和优势”; “国家鼓励中医西医相互学习, 相互补充, 协调发展, 发挥各自优势, 促进中西医结合”。

当前, 我国正在不断深化医药卫生体制改革, 为推进健康中国建设和全面建成小康社会奠定坚实基础。随着健康观念变化和医学模式转变, 中医药日益显示出独特优势, 在我国卫生与健康工作中发挥着越来越重要的作用。制定中医药法, 对深化医药卫生体制改革、促进健康中国建设具有重要意义, 也有助于提升中医药的国际影响力, 增强中华文化软实力, 适应“走出去”战略需要。