

胡桃楸树皮抗肿瘤有效成分对 H₂₂ 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响

古乐¹, 曹秀格², 李岩¹

1. 北京理工大学生命学院, 北京 100081

2. 北京环球兴学科技发展有限公司, 北京 100091

摘要 为测定胡桃楸树皮提取物(HT)抗肿瘤有效成分对 H₂₂ 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响, 将昆明小鼠随机分为 HT 高剂量组、HT 低剂量组、阳性药环磷酰胺组、模型组和正常组, 采用接种法复制 H₂₂ 肿瘤移植模型。利用荧光标记抗体-流式细胞术检测 HT 对建立的 H₂₂ 荷瘤小鼠模型外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 细胞亚群比值变化; ELISA 法检测 CD4⁺ 细胞所分泌细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的含量, 以测定 Th1/Th2 细胞亚群比例。结果显示, 与阳性药注射用环磷酰胺(CTX)相比, HT 高、低剂量组能显著降低机体 CD8⁺ 亚群比例 ($P < 0.01$), HT 低剂量组可明显提高 CD4⁺/CD8⁺ 比值 ($P < 0.05$)。HT 高、低剂量组的 IL-4 含量显著低于阳性药 CTX 组 ($P < 0.001$), 明显低于模型组 ($P < 0.05$)。HT 高剂量组的 IFN- γ /IL-4 水平明显高于阳性药 CTX 组 ($P < 0.05$)。研究表明, 胡桃楸树皮提取物具有明显的抑瘤作用, 能保护胸腺和脾脏, 能减轻荷瘤机体的 T 细胞免疫功能的损伤。

关键词 胡桃楸; H₂₂ 荷瘤小鼠; T 细胞亚群

胡桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim.), 落叶乔木, 胡桃科胡桃属植物, 俗名胡桃楸、山核桃, 主要分布于中国东北地区^[1]。《开宝本草》最早记载核桃楸有补肾固精、敛肺定喘、抑菌镇咳及抗癌之功效^[2]。其树皮具有清热、解毒、止痢、明目等功效^[3]。近年来国内外对胡桃楸化学成分的研究发现, 胡桃楸树皮中含有胡桃醌、萜醌、黄酮苷、鞣花酸及没食子酸等其中醌类成分具有较强的抗肿瘤、抗氧化、镇痛、抗炎和抗菌等作用^[4,5]。目前, 已有研究证明, 胡桃楸树皮提取物对 S180 肉瘤和 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤率分别为 61.76%~69.85% 和 65.92%~73.18%^[6]。Xu 等^[7,8]从核桃楸树皮中提取得到的单体化合物胡桃醌对 HL-60 细胞具有很强的抗增殖效果和诱导细胞凋亡作用。

机体的免疫状态与肿瘤的发生、发展密切相关, T 淋巴细胞是一类重要的抗肿瘤免疫活性细胞。胡桃楸树皮提取物可以抑制 H₂₂ 瘤增殖并具有明显的抑瘤作用, 还可以通过升高机体 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞亚群的比例, 提高 IFN- γ /IL-4 的比例减少荷瘤机体的 T 细胞免疫损伤, 促进机体免疫功能的提高。胡桃楸树皮提取物提高胸腺、脾脏系数、减轻机体的 T 细胞损伤、抑瘤作用等药理作用研究, 为其进一步的新药开发及肿瘤的临床免疫治疗提供了一定参考。

但国内外有关核桃楸树皮提取物对 T 细胞亚群的免疫调

节作用的报道很少, 因此, 本文以小鼠为动物模型, 通过胡桃楸提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响, 对其抗肿瘤初步机制进行探讨, 为胡桃楸进一步抗癌研究与开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物与瘤株

健康昆明小鼠, 雄性, 体重 (20 $\pm$ 2) g, SPF 级, 购自军事医学科学院, 许可证号: SCXK-(军)-2012-0004。肿瘤细胞株: H₂₂ 肿瘤细胞株, 由北京大学医学部提供。

1.1.2 药物与试剂

胡桃楸生药材, 购于黑龙江省牡丹江农管局 857 农场; 胡桃楸抗肿瘤有效成分提取物 (含总酚 2.9985 mg/g 生药, 实验室制得); 注射用环磷酰胺 (CTX), 江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号: 05022421; 小鼠抗人 CD3-PEcy5 抗体、小鼠抗人 CD4-FITC 抗体和小鼠抗人 CD3-PE 抗体均购自北京联科生物制品有限公司; 小鼠血清 IL-4 ELISA 试剂盒和小鼠血清 IFN- γ ELISA 试剂盒均由北京吉普腾试剂公司生产; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 购自广州松柏化工有限公司; 水相为实验室自制三蒸水, 乙醇等为分析纯, 所有试剂使用之前均用

收稿日期: 2015-11-03; 修回日期: 2016-02-22

作者简介: 古乐, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药理, 电子信箱: 416949074@qq.com; 李岩 (通信作者), 教授, 研究方向为肿瘤药理, 电子信箱: leeyan@bit.edu.cn

引用格式: 古乐, 曹秀格, 李岩. 胡桃楸树皮抗肿瘤有效成分对 H₂₂ 荷瘤小鼠 T 细胞亚群的影响[J]. 2016, 34(11): 37-41; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.11.006

0.45 μm 滤膜过滤。

1.1.3 主要仪器

AR2140 电子天平(北京科瑞科学器材有限责任公司); WH-3 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂); CO₂ 培养箱(美国 Baxter 型号: WJ-301T); SONY 流式细胞仪(日本索尼公司); 刀、剪等手术器械及量筒; 烧杯; 滴管; 吸管微量加样器; 生物洁净工作台; 肝素抗凝管。

1.2 实验方法

1.2.1 胡桃楸提取物灌胃液制备

称取 5.0 g 黑色胡桃楸粉末, 加入 10 倍量的 95% 乙醇, 摇匀, 80℃ 回流加热 1 h, 回流 2 次, 滤液旋转蒸干。用 0.5% CMC-Na 混悬至所需浓度, 4℃ 冰箱保存备用, 用前超声。

1.2.2 H₂₂ 肿瘤移植模型的建立

将接种 7 天的 H₂₂ 瘤源小鼠颈椎脱臼处死, 固定, 消毒腹部皮肤, 在无菌条件下抽取乳白色腹水, 用无菌生理盐水稀释, 制成 5×10⁶ 个·mL⁻¹ 接种用细胞液, 接种于昆明小鼠右腋窝皮下, 每鼠接种 0.2 mL (含瘤细胞数 2×10⁶ 个), 共 24 只。

1.2.3 动物的分组及给药

将 30 只雄性昆明小鼠, 以体重为指标按随机分为 5 组, 每组 6 只, 分别设为 HT 提取物高剂量组(给药剂量 4 g/kg, 灌胃给药)、HT 提取物低剂量组(给药剂量 2 g/kg, 灌胃给药)、阳性药环磷酰胺组(给药剂量 50 mg/kg, 腹腔注射给药)、模型组和正常对照组(等体积 0.5% CMC-Na, 灌胃给药)。1 次/d, 连续给药 10 d。隔天称取小鼠体重。停药后取材检测。

1.2.4 样品采集

停药后第 1 天称体重后将各组实验动物进行摘眼球取血, 同时摘除胸腺、脾脏和瘤组织, 称重, 数据用于表征脏器系数和抑瘤率。公式如下:

脏器系数=脏器(胸腺、脾脏)重量(mg)/体重(g);

抑瘤率(%)=(模型组瘤重-实验组瘤重)/模型组瘤重×100%。

1.2.5 流式细胞术检测外周血淋巴 CD4⁺/CD8⁺T 细胞亚群的水平

取 100 μL 小鼠抗凝血, 加入试剂 CD3-PEcy5/CD4-FITC/CD3-PE 单克隆抗体混合液作细胞表面分子染色, 混匀后室温避光 20 min, 加入 2 mL 溶血素, 1500 r/min 离心 3 min 弃去上清液, 留取沉淀, 用 1% 多聚甲醛-PBS 固定后, 在流式细胞仪上检测。

1.2.6 ELISA 法测定 Th1/Th2 细胞亚群分泌的细胞因子 IL-4、IFN-γ

利用小鼠眼球取血样品 1 mL, 待血凝后, 以 3000 r/min 速度离心 20 min, 得血清, 置 -70℃ 冰箱内保存待测。按照试剂盒说明书准备标准品和空白对照。将标本稀释液用蒸馏水作 1:10 倍稀释(体积比), 后用重蒸水 1:20 比例配制洗涤液, 备用。每待测孔各加入标准品或待测样品 100 μL, 将反应板充分混匀后 37℃ 放置 120 min。用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次, 向滤纸上印干。每孔中加入第一抗体工作液 100 μL, 将充分混匀后 37℃ 放置 60 min, 洗板(同前)。每孔中加入酶标抗体工作液 100 μL, 充分混匀后 37℃ 放置 30 min, 洗板(同前)。每孔中加入底物工作液 100 μL, 置 37℃ 避光反应 15 min 后, 每孔加入 100 μL 终止液混匀。30 min 内用酶标仪在波长 450 nm 的条件下测吸光度值(A)。

1.2.7 统计学分析

实验数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS13.0 统计分析软件进行统计分析, 计量资料组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。P<0.05 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HT 对 H₂₂ 荷瘤小鼠体重的影响及抑瘤效果

与 CTX 组相比, HT 高、低剂量组体重有显著升高(P<0.01)。与模型对照组相比, HT 高剂量组和 CTX 组瘤重有显著性降低(P<0.01), HT 低剂量组有明显降低(P<0.05)。见表 1。

表 1 HT 提取物对 H₂₂ 荷瘤小鼠体重的影响及抑瘤效果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Weight and antitumor effect of HT extract on H₂₂ hepatoma-bearing mice($\bar{x} \pm s$)

组别	数量	剂量/(g·kg ⁻¹)	体重/g	瘤重/g	抑瘤率/%
正常组	6	—	31.37±0.70	0	—
模型组	6	—	31.73±0.72	0.81±0.33	—
阳性药	6	0.05	25.45±0.94	0.10±0.06△△	87.78
高剂量	6	4.00	29.47±3.20##	0.37±0.21△△	54.27
低剂量	6	2.00	31.82±2.83##	0.61±0.36△	25.04

注: 与阳性药比较, ##P<0.01; 与模型组比较, △P<0.05, △△P<0.01。

2.2 HT 对 H₂₂ 荷瘤小鼠免疫器官的影响

HT 提取物高、低剂量组的脾脏系数分别为(8.21±4.41)、(7.70±1.73), 与阳性药脾脏系数(3.09±0.83)相比, HT 提取物的脾脏系数显著高于阳性药组(P<0.01); 同时, HT 高、低剂

量组的胸腺系数也显著高于阳性药组(P<0.001)。见表 2。

2.3 HT 对 H₂₂ 荷瘤小鼠 CD4⁺/CD8⁺T 细胞亚群水平的影响

与阳性药 CTX 组相比, HT 高、低剂量组的 CD4⁺、CD8⁺ 细胞都显著低于阳性药组(P<0.01); HT 低剂量组的 CD4⁺/CD8⁺

比值明显高于阳性药组($P<0.05$)。见表3及图1。

表2 HT对H₂₂荷瘤小鼠免疫器官的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of HT on immune organs of H₂₂ hepatoma-bearing mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	数量	脾脏系数%	胸腺系数%
正常组	—	6	5.65±1.73	2.22±0.19
模型组	—	6	5.83±1.11	2.34±0.13
阳性药	0.05	6	3.09±0.83	1.20±0.28
高剂量	4.00	6	8.21±4.41 ^{##}	2.21±0.56 ^{###}
低剂量	2.00	6	7.70±1.73 ^{##}	2.35±0.58 ^{###}

注:与阳性药比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

表3 HT对荷瘤小鼠CD4⁺/CD8⁺T细胞亚群的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of HT on CD4⁺/CD8⁺T cell subsets of H₂₂ hepatoma-bearing mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	CD4 ⁺ /%	CD8 ⁺ /%	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
模型组	36.13±4.92	9.99±2.16	3.70±0.63
阳性药	48.73±3.72	15.08±3.72	3.34±0.91
高剂量	34.03±3.45 ^{##}	10.35±3.45 ^{##}	3.44±0.93
低剂量	36.48±5.23 ^{##}	8.34±2.71 ^{###}	4.88±1.99 [#]

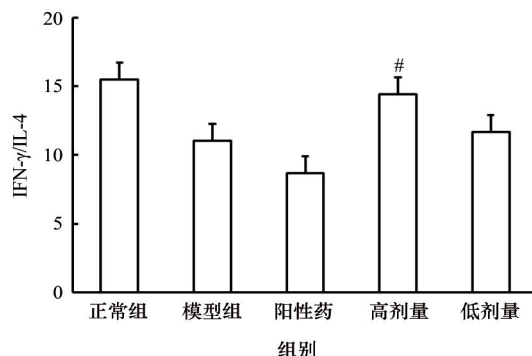
注:与阳性药比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$,#### $P<0.001$ 。

表4 各实验组淋巴细胞分泌的细胞因子的变化($\bar{x}\pm s$) ($n=6$)

Table 4 Level of cytokines secreted by lymphocytes in each experiment group ($\bar{x}\pm s$) ($n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-4 含量/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ 含量/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /IL-4
正常组	—	14.58±1.77	224.25±29.22	15.52±2.37
模型组	—	16.58±2.31	182.67±125.64	11.06±7.90
阳性药	0.05	20.77±3.00	179.66±37.19	8.68±1.57
高剂量	4.00	13.40±2.77 ^{△###}	183.67±38.59	14.43±5.22 [#]
低剂量	2.00	14.52±1.19 ^{###}	167.43±32.27	11.70±3.12

注:与模型组比较,△ $P<0.05$;与阳性药比较,## $P<0.05$,### $P<0.001$ 。



注:与阳性药比较,## $P<0.05$ 。

图2 各实验组血清中IFN- γ /IL-4水平

Fig. 2 Levels of IFN- γ /IL-4 in serum of each experimental groups

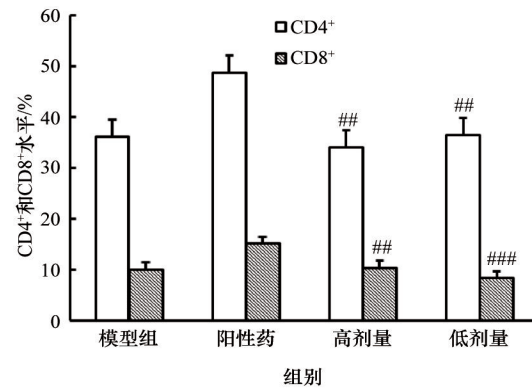


图1 HT对荷瘤小鼠CD4⁺/CD8⁺T细胞亚群的影响

Fig. 1 Effect of HT on CD4⁺/CD8⁺T cell subsets of H₂₂ hepatoma-bearing mice ($\bar{x}\pm s$)

2.4 HT对H₂₂荷瘤小鼠Th1/Th2细胞亚群分泌的细胞因子水平的影响

从表4可以看出,HT高、低剂量组与阳性药CTX组相比IL-4含量显著降低($P<0.001$),其中HT高剂量组的IL-4的含量明显低于模型组($P<0.05$)。与阳性药组相比,HT高剂量组的IFN- γ /IL-4比值明显升高($P<0.05$)(图2)。

3 讨论

近年来,随着对肿瘤免疫机制的不断了解,免疫治疗已经成为继手术、放疗和化疗之后综合治疗肿瘤的又一个重要措施。动物免疫器官是动物机体发生免疫反应的主要场所,动物免疫器官的重量与动物机体的免疫功能密切相关,机体免疫功能决定于免疫器官的状况。本次实验中,HT提取物高、低剂量组的脾脏系数分别为(8.21±4.41)、(7.70±1.73),与阳性药脾脏系数(3.09±0.83)相比,HT提取物的脾脏系数显著高于阳性药组($P<0.01$);同时,HT高、低剂量组的胸腺系数也显著高于阳性药组($P<0.001$)。这表明,HT提取物可以减少对机体免疫器官对损伤。同时,通过各实验组体重数据可以看出,在实验过程中,HT高、低剂量组小鼠的体重显著高于阳性药CTX组,反应出阳性药CTX对机体有减轻体重的副作用。

用,而HT对小鼠体重影响较小。

而细胞免疫中T淋巴细胞是一类重要的抗肿瘤免疫活性细胞。T淋巴细胞可根据其细胞表面的分化抗原分为CD4⁺T淋巴细胞和CD8⁺T淋巴细胞两大亚群。CD4⁺T淋巴细胞大多为辅助性T淋巴细胞(helper T cell, Th cell),具有协助体液免疫和细胞免疫的功能。CD4⁺细胞杀伤肿瘤细胞的效应主要是通过其释放的细胞因子,激活单核细胞、巨噬细胞及NK细胞,由单核细胞和巨噬细胞杀伤肿瘤细胞介导。CD8⁺T细胞主要是细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, Tc cell)和抑制性T细胞(suppressor T cell, Ts cell)^[9]。有资料表明,癌症患者的CD4⁺亚群比例下降,而CD8⁺亚群相对增高,CD4⁺/CD8⁺比值的降低主要见于免疫缺陷和恶性肿瘤等^[10]。故检测外周血T细胞亚群对了解宿主体内的细胞免疫功能有重要作用。本实验中,阳性药CTX组小鼠的CD8⁺T细胞明显升高,CD4⁺/CD8⁺比值偏离正常水平,提示阳性药CTX在抑瘤的同时也会导致小鼠T淋巴细胞免疫功能异常及免疫调节功能紊乱。HT高、低剂量组小鼠的CD8⁺T细胞值较阳性药组明显降低($P<0.01$),使CD4⁺/CD8⁺比值升高,提示HT在抑瘤的同时,较阳性药CTX对荷瘤小鼠T细胞功能有增强作用,并通过主要抑制CD8⁺T细胞来调整CD4⁺/CD8⁺的比例失调,提示HT还具有一定的免疫调节作用。

CD4⁺T细胞是辅助性T细胞(Th)的共同表型。根据CD4⁺T细胞所分泌细胞因子及生物学功能不同,将其分为Th1、Th2两个功能不同的独立亚群。由于Th1、Th2细胞无表面特异性标记性分子,所以对Th1/Th2平衡的测定是通过检测Th1、Th2细胞分泌的细胞因子IFN- γ 、IL-4来间接反映的。当Th1细胞占优势时,抑制体液免疫应答;当Th2细胞占优势时,抑制细胞免疫应答,而Th1/Th2平衡调节与许多免疫相关疾病的发生发展紧密联系^[11-13]。正常情况下,Th1/Th2细胞处于平衡状态。许多研究表明Th1/Th2漂移于肿瘤、自身免疫性疾病、移植排斥反应等多种疾病有关。许多研究均证实肿瘤发生时免疫反应向Th2漂移,在进展期肿瘤病人外周血中IFN- γ 分泌减少,IL-4分泌增加,导致在肿瘤生长时,Th1/Th2向Th2漂移^[14,15]。所以,Th1/Th2细胞的消长和平衡是免疫调节的核心环节。本实验中,HT高剂量组与阳性药CTX组比,IFN- γ 的含量增加,IL-4的含量显著减少($P<0.001$),表明HT高剂量组在抗肿瘤的同时会改善Th1/Th2亚群比例。

4 结论

考察了HT对H₂₂荷瘤小鼠体重的影响及抑瘤效果,实验结果表明HT高低剂量组的抑瘤率均低于CTX组且HT高剂量抑瘤率大于50%,HT对H₂₂抑瘤作用较好;HT高、低剂量组($P<0.001$)小鼠的体重显著高于阳性药组,即HT对机体抑瘤过程造成体重减轻的副作用较小。HT给药组的脾脏系数、胸腺系数均显著高于阳性药组($P<0.01\sim 0.001$),提示HT抑瘤同时可促进胸腺和脾脏细胞的增值活化,减少免疫器官损伤、促进机体免疫功能提高。

本实验通过流式细胞术测定了HT对H₂₂荷瘤小鼠CD4⁺/CD8⁺T细胞亚群的影响,结果表明阳性药组(CTX)小鼠的CD8⁺T细胞明显升高、CD4⁺/CD8⁺比值偏离正常水平,HT给药组小鼠的CD8⁺T细胞值较阳性药组明显降低($P<0.01$)、CD4⁺/CD8⁺比值升高,与阳性药CTX相比,HT对荷瘤小鼠T细胞功能有增强作用并通过抑制CD8⁺细胞调整CD4⁺/CD8⁺的比例,减弱机体荷瘤状态下的免疫功能抑制状态。与阳性药组比,HT高剂量组的IFN- γ 含量增加,IL-4的显著量减少($P<0.001$),IFN- γ /IL-4值显著上升($P<0.05$),表明HT可影响机体的自身免疫系统,使Th1/Th2类细胞趋向平衡。

参考文献(References)

- [1] 詹苗, 张咏莉. 山核桃树及树皮的化学成分及药理作用研究进展[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(1): 87-89.
Zhan Miao, Zhang Yongli. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological effects of the tree and bark of walnut[J]. Journal of Tropical Medicine, 2008, 8(1): 87-89.
- [2] 沈广志, 邹桂华, 梁婷, 等. 核桃楸的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015(17): 219-224.
Shen Guangzhi, Zhou Guihua, Liang Ting, et al. Research progress on chemical constituents of Juglans mandshurica Maxim.[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015(17): 219-224.
- [3] 赵守训, 黄泰康, 丁志尊, 等. 中药辞海. 第3卷[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 2007.
Zhao Shouxun, Huang Taikang, Ding Zhizun, et al. Chinese Dictionary. Third volumes[M]. Beijing: China Medical Science Press, 1996: 2007.
- [4] 汪向升, 张咏莉. 核桃楸的化学成分分析及其抗肿瘤活性概述[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(1): 122-125.
Wang Xiangsheng, Zhang Yongli. The analysis of chemical constituents and antitumor activity of Juglans mandshurica Maxim.[J]. Journal of Tropical Medicine, 2013, 13(1): 122-125.
- [5] 谷志惠. 核桃楸外果皮有效成分的提取及生物活性研究[D]. 东北林业大学, 2015.
Zan Zhihui. Study on Extraction and bioactivity of effective components of walnut epicarp[D]. Northeast Forestry University, 2015.
- [6] 邹品文, 赵春景, 尹小燕. 核桃楸树皮提取物的抗肿瘤作用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(4): 308-310.
Zhou Pinwen, Zhao Chunjing, Yin Xiaoyan. The anti-tumor effect of the extracts of Juglans mandshurica Maxim.[J]. China Journal of Hospital Pharmacy, 2010, 30(4): 308-310.
- [7] Xu H L, Yu X F, Qu S C, et al. Juglone, from Juglans mandshurica Maxim., inhibits growth and induces apoptosis in human leukemia cell HL-60 through a reactive oxygen species dependent mechanism[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(3-4): 590-596.
- [8] Xu H L, Yu X F, Qu S C, et al. Anti-proliferative effect of juglone from Juglans mandshurica maxim. on human leukemia cell hl-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway[J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 645(1-3): 14-22.
- [9] 刘廷, 鞠玉琳, 李杨, 等. 中药复方连黄对小鼠T淋巴细胞亚群CD4⁺、CD8⁺的影响[J]. 四川动物, 2009, 28(1): 115-116.
Liu Ting, Ju Yulin, Li Yang, et al. Effect of Chinese Traditional Medicine Lianhuang to CD4⁺、CD8⁺ on Mouse for the T Lymphocyte Subsets [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2009, 28(1): 115-116.
- [10] 顾佳颖, 胡春梅, 石光. CD4⁺、CD8⁺细胞水平变化与恶性肿瘤疗效的

- 关系[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(22): 6454-6455.
- Gu Jiaying, Hu Chunmei, Shi Guang. The relationship between the level of CD4⁺ and CD8⁺ cells and the curative effect of malignant tumors [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(22): 6454-6455.
- [11] 王红丽, 张晓明, 刘效栓, 等. 射干扶正口服液对H₂₂肝癌荷瘤小鼠的抑瘤作用及T细胞功能的影响[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2012, 38(3): 42-44.
- Wang Hongli, Zhang Xiaoming, Liu Xiaoshuan, et al. Anticancer and T cellular immune effects of Shiganfuzheng oral liquid on experimental H₂₂ hepatoma-bearing mice[J]. Journal of Lanzhou University: Medical Sciences, 2012, 38(3): 42-44.
- [12] 杜敏, 陈炯, 李文波, 等. 胰腺癌患者手术前后CD4⁺CD8⁺T细胞比例与IL-4, IFN- γ 含量的关系[J]. 肝胆胰外科杂志, 2008, 20(3): 156-159.
- Du Min, Chen Jiong, Li Wenbo, et al. The relationship between CD4⁺CD8⁺T cells ratio of patients with pancreatic carcinoma before and after operation and IL-4, IFN- γ levels[J]. Journal of Hepatopancreatobiliary Surgery, 2008, 20(3): 156-159.
- [13] 于晓红, 李书丹, 阚洪敏, 等. 红树莓原液对免疫抑制小鼠脏器指数及血清IFN- γ 、IL-4水平对影响[J]. 天津中医药, 2015, 32(3): 173-175.
- Yu Xiaohong, Li Shudan, Kan Hongmin, et al. Influence of red raspberry on IFN- γ , IL-4 levels and immunosuppressed mice organs index [J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 32(3): 173-175.
- [14] 袁颖, 郭忻. 鼻炎喷剂对变应性鼻炎大鼠细胞因子IL-4、IFN- γ 的影响[J]. 江苏中医药, 2008, 40(6): 78-79.
- Yuan Ying, Guo Xin. Effect of Rhinitis Spray on IL-4, IFN- γ levels in allergic rhinitis cytokines rats[J]. Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine, 2008, 40(6): 78-79.
- [15] 周韵娇, 李鹏, 张丽红, 等. 慢性肾小球肾炎患者外周血Th1/Th2及CD28⁺细胞的变化及其临床意义[J]. 检验医学, 2015, 30(2): 141-143.
- Zhou Yunjiao, Li Peng, Zhang Lihong, et al. The variation and its clinical significance of Th1/Th2 and CD28⁺ cells from peripheral blood in patients with chronic glomerulonephritis[J]. Laboratory Medicine, 2015, 30(2): 141-143.

Antitumor effect of *Juglans mandshurica* Maxim. bark extracts in H₂₂ hepatoma mice

GU Le¹, CAO Xiuge², LI Yan¹

1. Beijing Institute of Technology, The School of Life Science, Beijing 100081, China
2. Beijing Universal Education Technology Development Co. Ltd., Beijing 100091, China

Abstract To evaluate the effect of *Juglans mandshurica* Maxim. bark extracts (HT) against the transplant hepatic cancer in mice, young mice are randomly divided into the HT high dose group, the HT low dose group, the positive drug CTX group, the model group and the normal group. The H₂₂ Hepatoma mice model is duplicated by transplant. The fluorescently labeled antibodies flow cytometry method is used to examining the effects of antitumor active ingredients of *Juglans mandshurica* Maxim. bark extracts (HT) on the levels of CD4⁺/CD8⁺ in the peripheral blood of H₂₂ tumor-bearing mice model. Elisa is used to determine the content of IL-4 and IFN- γ cytokines secreted by the T helper lymphocytes (CD4⁺) and the levels of Th1/Th2 cytokines ratio. Compared to the positive drug CTX control group, the level of CD4⁺/CD8⁺ ($P < 0.05$) is improved in the HT high dose group and the HT low dose group. The content of IL-4 in the HT high, low-dose groups is significantly lower than that in the positive drug CTX ($P < 0.001$), and lower than that in the model group ($P < 0.05$). The level of IFN- γ /IL-4 in the HT high-dose group is higher than that in the positive drug CTX group ($P < 0.05$). It is concluded that the *Juglans mandshurica* Maxim. bark extracts (HT) have a significant effect of anti-tumor, and can protect the thymus and spleen, and also can reduce the damage of T cells in the tumor-bearing immune function.

Keywords *Juglans mandshurica* Maxim. bark extracts (HT); H₂₂ hepatoma mice; T cell subset

(编辑 田恬)