【基础研究】

益神颗粒联合 5- 氟尿嘧啶抑制肿瘤生长的作用机制研究

雷 博[1,2]，张艳艳[1,2]，潘绵立[1,2]，沈龙海[1,2]，王松坡[3*]

（1. 中国医药工业研究总院创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 200437；2. 上海市生物物质成药性评价专业技术服务中心，上海 200437；3. 上海交通大学附属第一人民医院中医科，上海 200080）

摘要：目的 通过益神颗粒联合 5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠肿瘤生长抑制试验，探讨益神颗粒的免疫调节作用机制。**方法** 将 40 只 BALB/c 小鼠建立 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠模型，随机分为模型组、5-FU 组（20 mg/kg）、益神颗粒组（2.5 g/kg）和 5-FU（20 mg/kg）＋益神颗粒（2.5 g/kg）联合用药组，每组 10 只。给药 12 d 后，检测抑瘤率、胸腺和脾脏指数、脾淋巴细胞增殖能力、自然杀伤（natural killer，NK）细胞杀伤活性及腹腔巨噬细胞吞噬功能，采用多因子流式检测技术检测干扰素 -γ（interferon-γ，IFN-γ）、肿瘤坏死因子 -α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）和白介素 -2（interleukin-2，IL-2）水平，流式细胞仪检测脾脏淋巴细胞亚群。**结果** 给药 12 d 后，与模型组比较，5-FU 组、益神颗粒组和联合用药组抑瘤率分别为 52.6%、32.0% 和 65.3%；与模型组比较，益神颗粒组小鼠脾淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性、腹腔巨噬细胞吞噬功能均增强（$P < 0.01$），IL-2 水平增加（$P < 0.01$），$CD4^+/CD8^+$ 细胞比值增大（$P < 0.05$）；与 5-FU 组比较，联合用药组胸腺指数和脾脏指数增大（$P < 0.01$），脾淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性、巨噬细胞吞噬功能增强（$P < 0.05$），TNF-α 和 IL-2 水平增加（$P < 0.05$），$CD4^+/CD8^+$ 细胞比值增大（$P < 0.05$）。**结论** 益神颗粒具有显著的增强免疫功能作用，与化疗药 5-FU 联合使用比单独用 5-FU 具有更强的抑制肿瘤作用，其机制主要与改善、增强因使用化疗药导致的免疫功能降低相关。

关键词：益神颗粒；5-氟尿嘧啶；结肠癌；Colon26细胞；免疫调节

中图分类号：R273 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-9188（2022）04-0386-08

DOI：10.13683/j.wph.2022.04.006

The mechanism of inhibitory effect of Yishen granule combined with 5-fluorouracil on tumor growth

LEI Bo[1,2], ZHANG Yanyan[1,2], PAN Mianli[1,2], SHEN Longhai[1,2], WANG Songpo[3*]

(*1. State Key Laborary of New Drug and Pharmaceutical Process, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China; 2. Shanghai Professional Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China*)

Abstract: ***Objective*** To investigate the immunomodulatory mechanism of Yishen granule combined with 5-fluorouracil (5-FU) on tumor growth inhibition in Colon26 colon tumor bearing mice. ***Methods*** Total 40 BALB/c mice were used to establish Colon26 colon tumor bearing mouse model, and then the mice were randomly divided into model group, 5-FU group (20 mg/kg), Yishen granule group (2.5 g/kg) and 5-FU＋Yishen granule combination group (20 mg/kg＋2.5 g/kg), with 10 mice in each group. After 12 days of administration, the tumor inhibition rate, thymus and spleen index, splenic lymphocyte proliferation, natural killer (NK) cell killing activity and peritoneal macrophage phagocytic

收稿日期：2021-05-10

作者简介：雷博，硕士研究生，研究方向：免疫药理学。

通信作者：王松坡，主任医师，博士，研究方向：中医学和中药学。

基金项目：上海市科技发展基金（17401901200、19401970100）；上海市进一步加快中药事业发展三年行动计划，“海派中医”张氏内科流派诊疗中心［ZY（2018-2020）-CCCX-1002］

were detected. The levels of interferon-γ(IFN-γ), tumor necrosis factor-α(TNF-α) and interleukin-2(IL-2) were measured by multifactor flow cytometry. Splenic lymphocyte subsets were detected by flow cytometry. ***Results*** After 12 days of administration, compared with the model group, the tumor inhibition rates of 5-FU group, Yishen granule group and combination group were 52.6%, 32.0% and 65.3%, respectively. Compared with the model group, the spleen lymphocyte proliferation, NK cell killing activity and peritoneal macrophage phagocytosis in Yishen granule group were enhanced($P<0.01$), the level of IL-2 was increased($P<0.01$), the ratio of $CD4^+/CD8^+$ cells was increased($P<0.05$). Compared with 5-FU group, the thymus index and spleen index in combination group were increased($P<0.01$). The splenic lymphocyte proliferation, NK cell killing activity and macrophage phagocytosis were enhanced in combination group($P<0.05$), the levels of TNF-α and IL-2 increased($P<0.05$), the ratio of $CD4^+/CD8^+$ cells increased($P<0.05$). ***Conclusion*** Yishen granule has a significant effect on enhancing immune function, and the combination with chenmotherapy drug 5-FU has a stronger tumor inhibition effect than chenmotherapy drug 5-FU alone, and its mechanism is mainly related to improving and enhancing the immune function reduction caused by the use of chenmotherapy drugs.

Key words: Yishen granule; 5-fluorouracil; colon cancer; Colon26 cell; immune regulation

结肠癌是我国较为常见的消化系统恶性肿瘤之一，其患病率居全球各类癌症第 3 位，仅次于肺癌和胃癌，且每年依然在以一定的速度持续增长。同时，有超过 50% 的结肠癌患者发生术后转移或预后复发[1]。化疗药物在癌症的治疗中占主要地位，但大多数化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时也杀灭了机体正常细胞，从而对机体造成严重的不良反应[2]。因此，研发能够治疗癌症且不良反应较少的药物或辅助治疗药物迫在眉睫。

益神颗粒是国医大师张镜人教授结合自身多年的临床治疗经验，以“扶正固本”为指导原则研制的经验方。该复方由灵芝、黄精、黄芪、当归和何首乌等 5 味中药材组成，具有益气养神、滋养肝肾及填补精髓等功效。5- 氟尿嘧啶 (5-fluorouracil，5-FU) 是临床上治疗恶性肿瘤的基础化疗药物，能较好地抑制肿瘤生长，但不良反应大，影响患者预后[3-4]。

研究表明，化疗药联合中药治疗，在缓解临床症状的同时也能提高化疗药物的疗效及减少化疗带来的不良反应[5-6]。在此基础上，本研究通过建立 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠皮下移植瘤模型，采用益神颗粒联合 5-FU 对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性及机制进行初步研究，为将其开发为一种抗肿瘤药物或辅助治疗药物提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞

6 周龄 BALB/c 小鼠，无特定病原体动物 (SPF 级)，雄性，体质量 (20±2)g，共计 50 只，购自浙江维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK(浙)2019-0001。动物使用单位：上海医药工业研究院药理评价研究中心，实验动物使用许可证号：SYXK(沪)2019-0027。动物饲养环境：温度 24 ～ 27 ℃，湿度 50% ～ 70%，12 h 交替照明，自由饮水、进食。Colon26 结肠癌瘤块，由上海医药工业研究院药理室传代保存。

1.2 药物

5-FU(Adamas，批号：P1378516)。

益神颗粒，由上海市第一人民医院中医科提供处方，主要由灵芝、制首乌、制黄精、炙黄芪、炒当归 5 味中药材组成。在药材中依次加入 8 倍量和 6 倍量的水煎煮 2 次，第 1 次加水后浸泡 2 h，煮沸后保持微沸 2 h，第 2 次煮沸后保持微沸 1.5 h，过滤，滤液浓缩至相对密度 1.01 ～ 1.06，静置 8 ～ 16 h，离心 (1 000 r/min)15 ～ 20 min，取离心液浓缩至相对密度 1.22 ～ 1.30(50 ～ 80 ℃)，放冷，所得浸膏粉每克含生药量 5.63 g。

1.3 试剂

CCK8 试剂盒 (批号：FZ193503)、胰蛋白酶 (批

号：HP203411）及红细胞裂解液（批号：HJ202408）均购自武汉谷歌生物科技公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（美国 Gibco 公司，批号：205946RP）；1640 培养液（BI，批号：0021119）；刀豆蛋白 A（美国 Simga 公司，批号 P1659069）；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号：A020-2-2）；荧光微球原液（invitrogen，批号：1966992）；CD3（批号：B303301）、CD4（批号：B295393）、CD8 抗体（批号：B311090）和多因子检测试剂盒 Mouse Th Cytokine Panel（批号：B317160）均购自美国 Biolegend 公司。

1.4 仪器

ALC-210.3 电子天平（德国赛多利斯公司）；SW-CJ-2FD 超净工作台（苏州净化设备有限公司）；371 二氧化碳培养箱（美国 Thermo 公司）；TDZ5-WS 离心机（湖南湘仪实验仪器公司）；Varioskan Flash 酶标仪（美国 Thermo 公司）；CytoFLEX 流式细胞仪（美国 Beckman Coulter 公司）。

1.5 方法

1.5.1 造模

取 10 只小鼠在右腋部皮下接种直径约为 2 mm 的 Colon26 结肠癌瘤块（存于液氮中复苏瘤块），生长 7 d 后，测量接种小鼠皮下结节直径大于 10 mm，处死小鼠，经酒精消毒后剥离肿瘤组织，置无菌磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）中。用剪刀除去肿瘤组织坏死部分，将肿瘤组织剪碎后与生理盐水混匀，用玻璃匀浆器制成细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^7 个 /ml。每只小鼠右腋部皮下接种细胞悬液 0.2 ml，建立 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠模型。

1.5.2 分组与给药

将模型小鼠随机分为模型组、5-FU 组、益神颗粒组及 5-FU ＋益神颗粒联合用药组，每组 10 只。建模后次日开始给药，给药前记录小鼠体质量。根据笔者前期预试验发现益神颗粒（浸膏）在 2.5 g/kg 剂量时具有一定的抑瘤效果，所以本研究选用该剂量。模型组灌胃生理盐水 0.4 ml，一日 1 次；5-FU 组按 20 mg/kg 腹腔注射 5-FU 溶液 0.2 ml，两日 1 次；益神颗粒组按 2.5 g/kg 灌胃益神颗粒溶液 0.4 ml，一日 1 次；联合用药组按 20 mg/kg 腹腔注射 5-FU 溶液 0.2 ml，两日 1 次，同时按 2.5 g/kg 灌胃益神颗粒溶液 0.4 ml，一日 1 次，给药周期 12 d。

1.5.3 观察指标

1.5.3.1 抑瘤率及脏器指数测定

末次给药 24 h 后，4 组小鼠均摘除小鼠眼球取血，无菌条件下分离瘤组织、脾脏及胸腺并称重，计算抑瘤率和脏器指数。抑瘤率＝（模型组瘤重－给药组瘤重）/ 模型组瘤重 ×100%，脏器指数＝脏器质量（mg）/ 体质量（g）。合并用药效果根据金氏公式计算 Q 值：$Q = E_{1+2}/(E_1 + E_2 - E_1\times E_2)$，其中 E_{1+2} 为联合用药抑瘤率，E_1 和 E_2 分别为 5-FU 和益神颗粒抑瘤率。若 $0.85 < Q < 1.15$，说明二药合用有相加作用，若 $Q > 1.15$，说明二药合用有协同作用。

1.5.3.2 脾淋巴细胞增殖能力检测

无菌条件下取出 4 组小鼠脾脏，用剪刀剪碎，过 200 目尼龙布，收集脾细胞悬液，离心（1 000 r/min）10 min 后弃上清液，细胞沉淀中加 2 ml 红细胞裂解液，轻轻吹打均匀，室温静置 5 min，离心（1 000 r/min）10 min，弃上清液，用含 10% FBS 的 1640 培养液重悬细胞于培养皿中，置 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱培养 2 h，收集悬浮细胞即为脾淋巴细胞，调整细胞浓度为 5×10^6 个 /ml。取 500 μl 脾淋巴细胞悬液，加入 1 mg/ml 的刀豆蛋白 A 溶液 2.5 μl，混合后加至 96 孔板，每孔 100 μl，每个样品设 3 个复孔，置 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 72 h。培养结束后，每孔加入 CCK8 试剂 10 μl，2 h 后用酶标仪于 450 nm 波长下测量吸光度（optical density，OD）。

1.5.3.3 自然杀伤（natural killer，NK）细胞杀伤活性检测

按上述方法制备 2×10^7 个 /ml 的脾淋巴细胞悬液，并以含 0.5% 牛血清白蛋白（albumin from bovine

serum，BSA）的 1640 培养液重悬作为效应细胞，另取 4×10^5 个 /ml 的 YAC-1 细胞以含 0.5% BSA 的 1640 培养液重悬作为靶细胞。向 96 孔板分别加入 100 μl 的效应细胞和靶细胞（效应细胞：靶细胞＝50 ： 1），对照孔加靶细胞 100 μl 和含 0.5% BSA 的 1640 培养液 100 μl，最大释放孔加靶细胞 100 μl 和 20% NP-40 裂解液 100 μl，置 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 4 h，然后低温离心取上清液。按照 LDH 测定试剂盒说明书测定细胞上清液的 LDH 活性。NK 细胞杀伤活性＝（$OD_{试验孔}-OD_{对照孔}$）/（$OD_{最大释放孔}-OD_{对照孔}$）×100%

1.5.3.4 腹腔巨噬细胞吞噬能力检测

4 组小鼠处死后，小鼠腹腔经预冷 PBS 灌洗，收集灌洗液，离心（1 000 r/min）10 min 收集细胞。用含 5% FBS 的 Hank's 试剂调节细胞浓度至 5×10^5 个 /ml，接种于 6 孔板，每孔 1 ml。取荧光微球原液 50 μl 与 2% BSA 溶液 2.5 ml，于 37 ℃避光孵育 30 min，超声处理 5 min。每孔加处理过的荧光微球 200 μl，置 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养 2 h。用细胞刮刮下巨噬细胞，过滤、计数及浓缩，用流式细胞仪测定。评价指标为吞噬百分数。吞噬百分数＝吞噬荧光微球巨噬细胞数 / 巨噬细胞总数 ×100%

1.5.3.5 IFN-γ、TNF-α 和 IL-2 水平检测

眼球摘除法取 4 组小鼠血液，每只 300 μl，离心分离血清。按照试剂盒说明书中的操作指南，采用多指标可溶性蛋白流式定量分析技术检测小鼠血清中 IFN-γ、TNF-α 和 IL-2 水平。

1.5.3.6 脾脏淋巴细胞亚群检测

制备 1×10^7 个 /ml 的脾淋巴细胞悬液，每个待测样品 100 μl，另准备 4 份对照样品，分别为空白对照（不加任何抗体）、CD3 对照（只加 CD3 抗体）、CD4 对照（只加 CD4 抗体）、CD8 对照（只加 CD8 抗体）；向待测样品中分别加入适量 CD3、CD4、CD8 抗体，混匀后冰上避光孵育 20 min，用流式细胞仪检测。

1.5.3.7 统计方法

运用 SPSS11.0 软件分析，所有数据均采用（均数 ± 标准差）记录，使用单因素方差分析，两组间差异比较采用 Bonferroni-*t* 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠体质量及抑瘤率的影响

给药前，各组小鼠体质量无明显差异。给药 12 d 后，与模型组比较，5-FU 组与联合用药组小鼠体质量均降低，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与 5-FU 组比较，益神颗粒组和联合用药组小鼠体质量均升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组比较，药物具有明显的抑瘤作用，5-FU 组、益神颗粒组和联合用药组抑瘤率分别为 52.6%、32.0% 和 65.3%，联合用药组优于其他组；Q 值计算为 0.96。详见表 1。

表 1 各组小鼠体质量、瘤重及抑瘤率比较

（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 1 Comparison of body weight, tumor weight and tumor inhibition rate of mice in each group

（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

分组	体质量/g		瘤重/g	抑瘤率/%	Q值
	给药前	给药12 d后			
模型组	20.81±0.82	22.80±1.19	1.59±0.20	–	0.96
5-FU组	20.84±0.82	17.89±0.58*	0.75±0.08*	52.6	
益神颗粒组	20.87±0.81	23.77±0.61$^{\#}$	1.08±0.10*$^{\#}$	32.0	
联合用药组	20.93±0.79	19.48±0.72*$^{\#}$	0.55±0.08*$^{\#}$	65.3	

注：与模型组比较，*P<0.01；与5-FU组比较，$^{\#}P$<0.01

Note: *vs* model group, *P<0.01; *vs* 5-FU group, $^{\#}P$<0.01

2.2 对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠脏器指数的影响

与模型组比较，5-FU 组和联合用药组的胸腺指数和脾脏指数均减小，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与 5-FU 组比较，益神颗粒组和联合用药组的胸腺指数和脾脏指数均增大，差异有统计学意义（$P<0.01$）。详见表 2。

表 2 各组小鼠胸腺指数、脾脏指数比较
($\bar{x}\pm s$，$n=10$，单位：mg/g)

Table 2 Comparison of thymus index and spleen index in each group ($\bar{x}\pm s$，$n=10$，unit：mg/g)

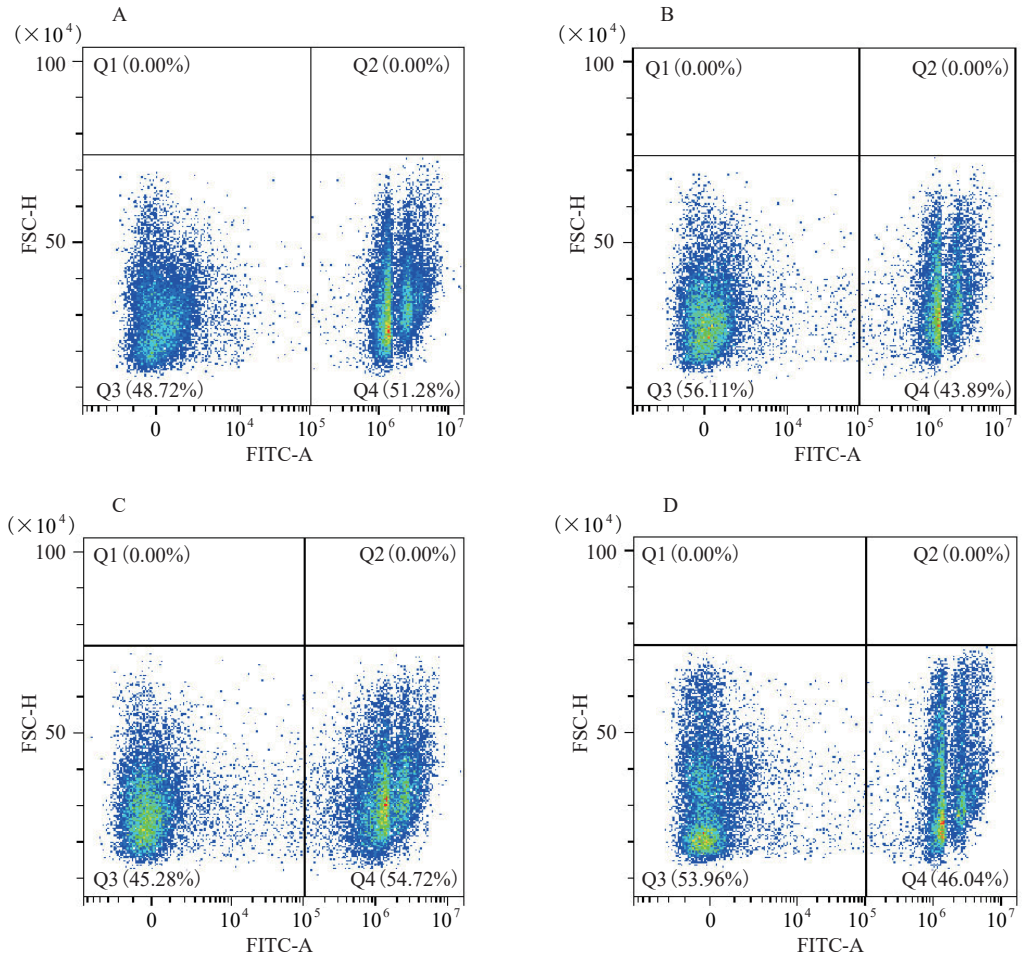
分组	胸腺指数	脾脏指数
模型组	1.23±0.20	7.77±0.33
5-FU组	0.71±0.10*	3.34±0.32*
益神颗粒组	1.40±0.14#	8.25±0.61#
联合用药组	0.96±0.12*#	4.54±0.39*#

注：与模型组比较，*$P<0.01$；与 5-FU 组比较，#$P<0.01$

Note: *vs* model group, *$P<0.01$; *vs* 5-FU group, #$P<0.01$

2.3 对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠免疫功能的影响

与模型组比较，5-FU 组和联合用药组的淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性和巨噬细胞吞噬功能均减弱，益神颗粒组均增强，差异有统计学意义（$P<0.01$）；与 5-FU 组比较，益神颗粒组和联合用药组的淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性和巨噬细胞吞噬功能均增强，差异有统计学意义（$P<0.05$）。详见表 3、图 1。



A：模型组，B：5-FU 组，C：益神颗粒组，D：联合用药组

A: model group, B: 5-FU group, C: Yishen granule group, D: combination group

图 1 各组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬荧光微球功能比较 ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

Figure 1 Comparison of phagocytosis of fluorescent microspheres by peritoneal macrophages in different groups of mice ($\bar{x}\pm s$，$n=10$)

表 3 各组小鼠淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性、巨噬细胞吞噬功能的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 3 Comparison of lymphocyte proliferation, NK cell killing activity and macrophage phagocytosis in each group of mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

分组	淋巴细胞增殖能力	NK细胞杀伤活性/%	巨噬细胞吞噬功能/%
模型组	0.95±0.07	43.96±2.61	51.10±2.19
5-FU组	0.53±0.05*	17.50±2.41*	43.68±0.49**
益神颗粒组	1.08±0.13*##	51.67±3.62*##	53.64±0.73**##
联合用药组	0.64±0.03*#	26.20±5.01*##	46.89±1.60*##

注：与模型组比较，*$P<0.01$；与 5-FU 组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

Note: *vs* model group, *$P<0.01$; *vs* 5-FU group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$

2.4 对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠血清中 IFN-γ、TNF-α 和 IL-2 水平的影响

与模型组比较，5-FU 组和联合用药组的 IFN-γ 水平降低；与 5-FU 组比较，益神颗粒组的 IFN-γ 水平升高，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组比较，5-FU 组 TNF-α 水平降低；与 5-FU 组比较，益神颗粒组和联合用药组的 TNF-α 水平均升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与模型组比较，5-FU 组的 IL-2 水平降低，益神颗粒组升高；与 5-FU 组比较，益神颗粒组和联合用药组的 IL-2 水平升高，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。详见表 4。

表 4 各组小鼠血清 IFN-γ、TNF-α 和、IL-2 水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，单位：pg/ml）

Table 4 Comparison of serum IFN-γ, TNF-α and IL-2 levels in each group of mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，unit：pg/ml）

分组	IFN-γ	TNF-α	IL-2
模型组	13.22±3.24	19.78±3.19	15.04±3.71
5-FU组	2.47±0.99*	9.62±2.74*	8.31±1.96*
益神颗粒组	14.64±3.59##	23.36±5.81##	22.34±4.30*##
联合用药组	3.02±1.49*	15.71±4.51#	13.32±4.22#

注：与模型组比较，*$P<0.01$；与5-FU组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$

Note: *vs* model group, *$P<0.01$; *vs* 5-FU group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$

2.5 对 Colon26 结肠癌荷瘤小鼠脾淋巴细胞亚群影响

与模型组比较，5-FU 组和联合用药组的 $CD4^+/CD8^+$ 比值减小，益神颗粒组则增大，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。与 5-FU 组比较，益神颗粒组和联合用药组的 $CD4^+/CD8^+$ 比值均增大，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。详见表 5、图 2。

表 5 各组小鼠脾淋巴细胞亚群 $CD4^+/CD8^+$ 比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Table 5 Comparison of spleen lymphocyte subsets $CD4^+/CD8^+$ in different groups of mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

分组	比值
模型组	2.57±0.05
5-FU组	1.84±0.03*
益神颗粒组	3.01±0.05*#
联合用药组	1.96±0.03*#

注：与模型组比较，*$P<0.05$；与 5-FU 组比较，#$P<0.05$

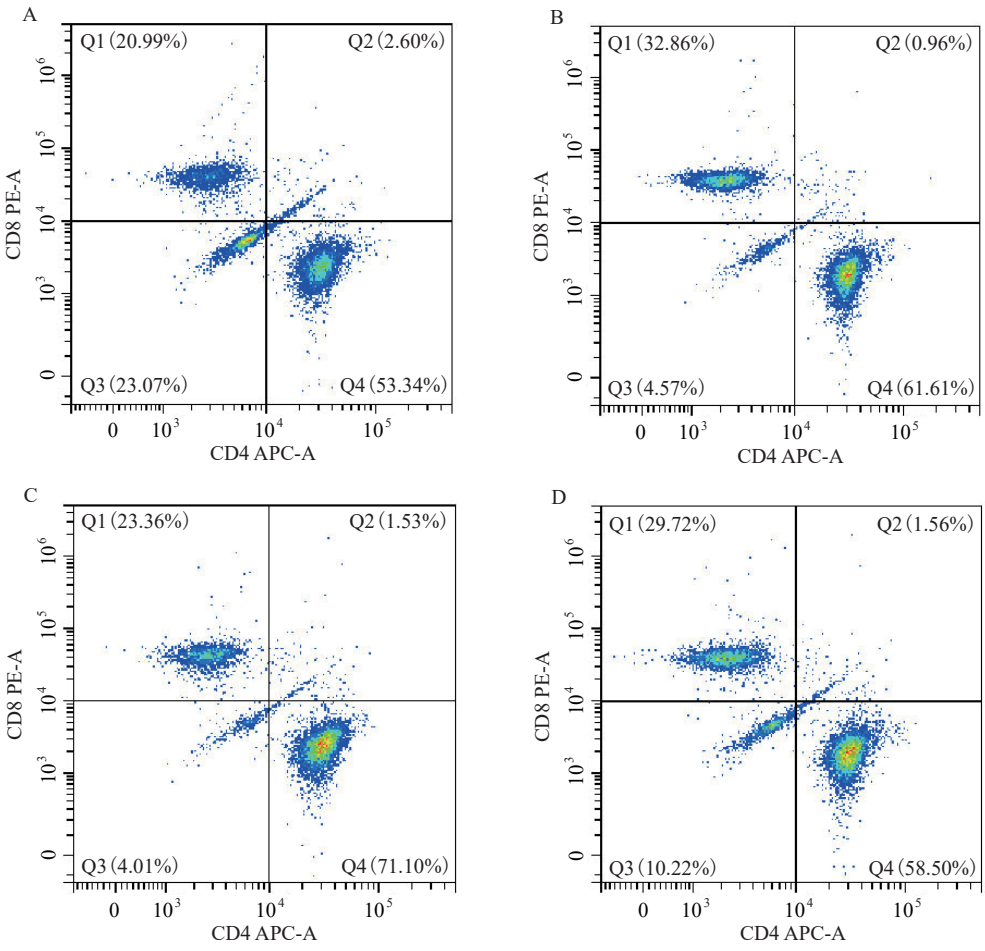
Note: *vs* model group, *$P<0.05$; *vs* 5-FU group, #$P<0.05$

3 讨论

在肿瘤的发生、发展过程中，免疫功能受到抑制，而免疫功能的增强有助于肿瘤的治疗[7]。5-FU 为传统化疗药物，对结肠癌的抑制效果显著，但由于缺乏靶向性，其在杀伤肿瘤细胞的同时也会杀死机体的正常细胞，免疫抑制作用严重。

胸腺是机体受抗原刺激后发生免疫应答的部位，亦是免疫细胞发育、成熟和分化的场所。脾脏含有大量 NK 细胞、淋巴细胞和吞噬细胞，是机体细胞免疫和体液免疫的中心。胸腺指数和脾脏指数能很好地反映免疫细胞的功能状况和免疫器官的发育水平[8]。淋巴细胞在抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用，而淋巴细胞增殖能力是评价机体抗肿瘤免疫水平的关键指标[9]。NK 细胞是机体抗肿瘤的第一道防线，具有细胞介导的细胞毒作用，不依赖补体或抗体，不需要预先活化即可直接杀伤肿瘤细胞[10]。巨噬细胞胞浆内含有过氧化物酶、碱性磷酸酶、溶酶体等物质，可非特异性吞噬多种抗原，亦是溶解肿瘤细胞的效应细胞[11]。

现代药理学研究表明，灵芝能增强单核巨噬细胞、树突状细胞、NK 细胞和细胞毒性 T 细胞的功能，促进细胞因子如 IFN-γ、IL-2 等生成，促进肿瘤相关抗体产生，拮抗肿瘤细胞的免疫逃逸等[12]。黄芪可



A：模型组，B：5-FU 组，C：益神颗粒组，D：联合用药组

A: model group, B: 5-FU group, C: Yishen granule group, D: combination group

图 2　各组小鼠脾淋巴细胞亚群 $CD4^+/CD8^+$ 比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Figure 2　Comparison of spleen lymphocyte subsets $CD4^+/CD8^+$ in different groups of mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

通过改善机体免疫功能、抑制肿瘤细胞增殖或促凋亡、辅助化疗抗肿瘤和逆转耐药性来发挥抗肿瘤作用[13]。当归多糖除了激活 B 细胞和巨噬细胞的免疫功能外，还通过细胞外基质直接抑制癌细胞的黏附和侵袭[14]。何首乌可通过抑制肿瘤细胞增殖、阻滞细胞周期、诱导凋亡、抗肿瘤细胞转移和抗血管新生来发挥抗肿瘤作用[15]。黄精具有调节免疫功能，但其抗肿瘤及免疫调节作用尚无报道。本研究显示，与模型组比较，益神颗粒能明显增强小鼠脾淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性、腹腔巨噬细胞吞噬功能；与 5-FU 联用时，不仅具有抑制肿瘤生长的相加作用，还能有效改善 5-FU 导致的小鼠胸腺指数和脾脏指数减少，以及改善小鼠的脾淋巴细胞增殖能力、NK 细胞杀伤活性、腹腔巨噬细胞吞噬功能减弱。该结果提示，益神颗粒联合 5-FU 能提高抗肿瘤作用可能与其增强免疫功能作用有关。

T 淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫应答以 $CD4^+$、$CD8^+$ T 细胞亚群为主，其中 $CD8^+$细胞可直接杀伤肿瘤细胞；$CD4^+$细胞具有激活 $CD8^+$细胞和刺激 B 细胞分泌抗体等功能。正常情况下，$CD4^+/CD8^+$ T 细胞在体内维持动态平衡，其比值的降低被认为是免疫力低下的重要标志之一[16]。IFN-γ、TNF-α、IL-2 是由 T 淋巴细胞分泌的、具有免疫调节作用的细胞因子，可反映肿瘤的生长状况，也能体现肿瘤

相关的免疫调节活动水平[17-19]。本研究表明，与模型组比较，益神颗粒能提高小鼠 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值，增加 IL-2 水平；与 5-FU 联用时，能改善 5-FU 导致的 $CD4^+/CD8^+$ T 细胞比值减小，增加 TNF-α 和 IL-2 水平。该结果进一步提示，益神颗粒的抗肿瘤作用与免疫调节作用有关。

4 结论

综上所述，益神颗粒能显著增强免疫功能，联合化疗药 5-FU 使用比单独使用 5-FU 具有更强肿瘤抑制作用，其机制主要与改善、增强因使用化疗药导致的免疫功能降低相关。因此，本研究为益神颗粒作为一种抗肿瘤药物或辅助治疗药物提供了一定的理论依据和数据支持。

参考文献：

[1] Gu MJ, Huang QC, Bao CZ, *et al*. Attributable causes of colorectal cancer in China[J]. Bio Med Central Cancer, 2018, 18(1): 38.

[2] Drake CG, Antonarakis ES. Update: immunological strategies for prostate cancer[J]. Curr Urol Rep, 2010, 11(3): 202-207.

[3] Elnahry AG, Elnahry GA. Response to: optic neuritis induced by 5-fluorouracil chemotherapy: case report and review of the literature[J]. J Oncol Pharm Pract, 2020, 26(3): 775.

[4] Longley DB, Harkin DP. Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 330-338.

[5] Zhang L, Jin Y, Peng J, *et al*. Qingjie Fuzheng granule attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109223.

[6] 王婷, 王巧琳, 段春燕, 等. 益气复生方联合化疗对胃癌荷瘤小鼠肿瘤生长及肿瘤浸润淋巴细胞的影响[J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(7): 60-65.

[7] Salehi-Rad R, Dubinett SM. Understanding the mechanisms of immune-evasion by lung cancer in the context of chronic inflammation in emphysema[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(2): 382-385.

[8] Xi S, Fu B, Loy G, *et al*. The effects of Ciji-Hua'ai-Baosheng on immune function of mice with H_{22} hepatocellular carcinoma receiving chemotherapy[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 898-909.

[9] Shimizu T, Taniguchi K, Asakuma M, *et al*. Lymphocyte-to-monocyte ratio and prognostic nutritional index predict poor prognosis in patients on chemotherapy for unresectable pancreatic cancer[J]. Anticancer Res, 2019, 39(4): 2169-2176.

[10] Oh JH, Kim MJ, Choi SJ, *et al*. Sustained type Ⅰ interferon reinforces NK cell-mediated cancer immunosurveillance during chronic virus infection[J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(4): 584-599.

[11] Kulkarni A, Chandrasekar V, Natarajan SK, *et al*. A designer self-assembled supramolecule amplifies macrophage immune responses against aggressive cancer[J]. Nat Biomed Eng, 2018, 2(8): 589-599.

[12] 林华型. 灵芝多糖抗肿瘤靶向作用机制研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(4): 428-430.

[13] Li S, Sun Y, Huang J, *et al*. Anti-tumor effects and mechanisms of astragalus membranaceus(AM) and its specific immunopotentiation: status and prospect[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 258: 112797.

[14] Zhang Y, Cui Z, Mei H, *et al*. Angelica sinensis polysaccharide nanoparticles as a targeted drug delivery system for enhanced therapy of liver cancer[J]. Carbohydr Polym, 2019, 219: 143-154.

[15] 李洪亮, 刘明, 汪选斌. 何首乌对肿瘤脂代谢的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(9): 1855-1861.

[16] 安青, 何立巍, 吴红雁, 等. 虫草素通过调节$CD4^+$ T淋巴细胞PD-1受体促进肿瘤免疫及机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(5): 495-498.

[17] Dobrzanski MJ, Reome JB, Hollenbaugh JA, *et al*. Tc1 and Tc2 effector cell therapy elicit long-term tumor immunity by contrasting mechanisms that result in complementary endogenous type 1 antitumor responses[J]. J Immunol, 2004, 172(3): 1380-1390.

[18] Cao G, Wang J, Zheng X, *et al*. Tumor therapeutics work as stress inducers to enhance tumor sensitivity to natural killer(NK) cell cytolysis by up-regulating NKp30 ligand B7-H6[J]. J Biol Chem, 2015, 290(50): 29964-29973.

[19] Shrikant P, Mescher MF. Opposing effects of IL-2 in tumor immunotherapy: promoting CD8 T cell growth and inducing apoptosis[J]. J Immunol, 2002, 169(4): 1753-1759.

（编辑：沈佳婕）