·临床论著·

大剂量黄芪对急性白血病患儿外周血树突状细胞的诱导和抗原呈递功能的影响

董　静[1,2]　顾华丽[2]　马承泰[2]　张芙蓉[2]　陈志红[2]　张源潮[1]

摘要　目的　观察大剂量黄芪对急性白血病患儿外周血单核细胞体外诱导扩增为树突状细胞(DC)及对 DC 抗原呈递功能的影响。**方法**　44 例急性白血病完全缓解期患儿分为黄芪组与对照组,黄芪组 20 例,对照组 24 例。黄芪组于常规化疗同时应用大剂量黄芪(90g/d)1 个月,对照组仅常规化疗。提取两组外周血单个核细胞(MNC),贴壁获得单核细胞,加入白细胞介素-4(IL-4)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF-α)等细胞因子培养 7～8 天,利用流式细胞仪进行 DC 的表型鉴定,用混合淋巴细胞反应鉴定 DC 的抗原呈递能力。**结果**　黄芪组与对照组从外周血单核细胞诱导生成的 DC 形态学差异无显著性;黄芪组 DC 的细胞数量平均为 $4.4\times10^6/2.5\times10^6$ MNC,对照组 DC 的数量平均为 $2.6\times10^6/2.5\times10^6$ MNC,两组比较差异有显著性($P<0.001$);黄芪组 DC 可较强地刺激同种异体淋巴细胞增殖,与对照组比较差异有显著性($P<0.001$)。**结论**　大剂量黄芪可提高急性白血病患者外周血单核细胞诱导生成 DC 的数量并增强 DC 的抗原呈递功能。

关键词　黄芪;树突状细胞;急性白血病;抗原呈递细胞

Effects of Large Dose of Astragalus membranaceus on the Dendritic Cell Induction of Peripheral Mononuclear Cell and Antigen Presenting Ability of Dendritic Cells in Children with Acute Leukemia DONG Jing, GU Hua-li, MA Cheng-tai, et al *Department of Rheumatology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan (250021)*

Abstract　Objective　To explore the effects of large dose of Astragalus membranaceus (Astragalus) on the dentritic cell (DC) induction *in vitro* and augumentation by peripheral mononuclear cell (MNC) and on antigen presenting ability of DC in children with acute leukemia. **Methods**　Forty-four children with acute leukemia in complete remission stage were divided into two groups. Twenty patients in the Astragalus(90g daily) group were treated with large dose of Astragalus(90g daily) based on conventional chemotherapy for one month, while 24 patients in the control group received chemotherapy alone. MNC were extracted from peripheral blood by wall-sticking method and cultured with such cell factors as interleukin-4, gramulocyte macrophage colony stimulating factor, tumor necrosis factor-α for 7－8 days. Phenotype of DC was assayed by flow cytometry and antigen presenting ability of them was assayed by mixed lymphocyte reaction. **Results**　There was no morphological difference in MNC induced DC between the two groups. The average number of DC in Astragalus group and control group was $4.4\times10^6/2.5\times10^6$ MNC and $2.6\times10^6/2.5\times10^6$ MNC, respectively, showing significant difference($P<0.001$). DC in Astragalus group could stimulate the proliferation of allogeneic lymphocytes strongly, showing significant difference when compared with that in the control group ($P<0.001$). **Conclusion** Large dose ofAstragalus could increase the DC induction of MNC and enhance the antigen presenting ability of DC in acute leukemia patients.

Key words　Astragalus membranaceus; dendritic cell; acute leukemia; antigen presenting cell

白血病在中医中属虚劳、血症等范畴,黄芪具有调中益气、升陷固脱、利水消肿等多种作用,许多研究证明[1-3],黄芪是一种双向免疫调节剂,其抗肿瘤作用已经得到公认,而黄芪的免疫调节作用也在很多疾病包

作者单位:1. 山东大学山东省立医院风湿免疫科(济南 250021);2. 青岛大学医学院附属医院

通讯作者:董　静, Tel:0532－82922526, E-mail: dongjing218@tom.com

万方数据

括白血病中得到应用[4,5]。树突状细胞(dendritic cells, DC)是体内已知的功能最强的抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APC),它既能促进 T 辅助细胞和细胞毒性 T 细胞(CTL)生成,也能促进 B 细胞生成抗体,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用。我们曾于 2001 年成功应用白细胞介素-4(IL-4)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)从急性白血病外周血单核细胞诱导生成 DC[6],本研究以此为基础,研究了大剂量黄芪对急性白血病患儿外周血单核细胞诱导生成的 DC 数量及抗原呈递能力的影响,从而探讨黄芪的抗肿瘤作用机制。

资料和方法

1 临床资料 急性白血病患儿共 44 例,年龄3~10 岁,均为青岛大学医学院附属医院儿内科住院患儿,诊断标准按照国际通用的 MIC 分型标准[7]。用抽签法随机分为黄芪组 20 例及对照组 24 例,其中黄芪组男 12 例,女 8 例,平均(5.6±1.5)岁;急性淋巴细胞白血病 16 例,急性非淋巴细胞白血病 4 例。对照组男 15 例,女 9 例,平均(6.0±1.8)岁;急性淋巴细胞白血病 18 例,急性非淋巴细胞白血病 6 例。两组在病种、年龄、性别等方面差异无显著性,有可比性。取标本时处于完全缓解 12 个月以上,近 1 个月内未使用强化疗方案,外周血白细胞 $>4\times10^9$/L。

2 方法

2.1 治疗方法 黄芪组常规化疗的同时予黄芪 90 g/天,水煎服,共 30 天,疗程结束后 1 周内取外周静脉血。对照组常规化疗,在上述缓解期内取外周血。两组常规化疗方案采用 1993 年国内制定的"小儿急性白血病诊疗建议"[8]。

2.2 单个核细胞(MNC)的制备 外周血用 Ficoll 液分离 MNC,600 g×10 min 离心洗涤两次,200 g ×10 min 离心洗涤 1 次。

2.3 DC 的培养 调整 MNC 终浓度为 2.5×10^6/ml,加至 24 孔培养板的各孔,放置于 37℃ CO_2 培养箱中培育 2h,吸弃悬液,用培养液清洗 1 次,往各孔中加入 IL-4 1 000U/ml(Promega 公司产品)、GM-CSF 100μg/ml(军事医学科学院基础研究所产品)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 100 U /ml(购自北京邦定生物医学公司),培养液终体积为 1 ml。将培养板放于 37℃、5% CO_2 培养箱中。培养第 3 天末半量换液。第 7 天计数悬浮细胞数量。

2.4 形态学观察 相差显微镜下每天动态观察细胞形态,每天观察后吸取细胞,离心,涂片作瑞氏染色。

2.5 DC 免疫表型的测定 采用免疫荧光法、流式细胞仪测定[9,10]。培养第 7~8 天,收集悬浮细胞,各取 100μl 细胞悬液加入流式细胞仪测定管,加入 FITC 标记的抗人 CD1a 单抗(Parmingen 公司产品)、CD80 单抗(Ancell 公司产品)、CD14 单抗(Parmingen 公司产品)、HLA-DR 单抗(Parmingen 公司产品)、HLA-ABC 单抗(Parmingen 公司产品)、IgG 阴性对照单克隆抗体,置于 4℃避光反应 45 min,离心洗涤。用流式细胞仪检测 DC 特异性标志 $CD1a^+$ CD_{80}^+ $HLA\text{-}DR^+$ $HLA\text{-}ABC^+$ CD_{14}^- 的细胞数量,用 CELL QUEST software 分析。

2.6 同种异体混合淋巴细胞反应(MLR) 利用 MLR 检测 DC 的抗原刺激能力,MLR 采用 ^{3}H-TdR 掺入法[11,12]。培养第 8~10 天,在 DC 的孔内加入丝裂霉素终止细胞增殖,接种于 96 孔培养板,每孔终体积 200 μl,每组共 3 个复孔,放于 37℃ CO_2 培养箱内培养 96 h。培养结束前 16 h 分别向各个孔加入 ^{3}H-TdR ,0.5 μCi/孔,继续培养 16 h,收集细胞至各滤膜上,用液闪计数仪(LKB-1209)测 cpm 值,结果取 3 个复孔的平均值。

2.7 统计学方法 两组均数间比较采用 t 检验。

结 果

1 DC 的形态学 黄芪组与对照组的外周血单核细胞经过 7~10 天的培养,由贴壁细胞变为悬浮细胞,形态多为不规则形、类圆形。两组的 DC 生成过程相同,镜下形态无区别。瑞氏染色细胞形态无区别。

2 DC 的免疫表型和数量 两组 $CD1a^+$ CD_{80}^+ $HLA\text{-}DR^+$ $HLA\text{-}ABC^+$ CD_{14}^- 的细胞数比较,黄芪组 DC 的数量平均为 $(4.4\pm0.48)\times10^6/2.5\times10^6$ MNC,对照组平均为 $(2.6\pm0.76)\times10^6/2.5\times10^6$ MNC,两组比较差异有显著性(t 值 $=9.1712$, $P<0.001$)。

3 两组不同浓度 DC 刺激同种异体 MLR 增殖曲线比较 见图 1。黄芪组 500 个 DC 便可刺激同种异体淋巴细胞增殖,cpm 值平均达 9 230±471,对照组 500 个 DC 亦可刺激同种异体淋巴细胞增殖,cpm 值平均达 6 855±506,两组比较差异有显著性(t 值 $=15.9992$, $P<0.001$)。提示黄芪组 DC 的免疫呈递功能明显高于对照组 DC。

讨 论

在白血病的早期,疾病以"邪盛"为主,此时当以"祛邪"为主要治疗方法,在化疗后或疾病后期,体质虚

万方数据

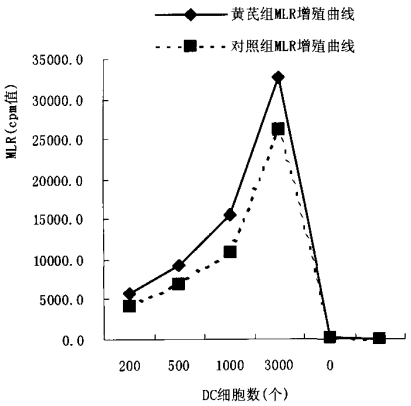

图 1　两组不同浓度的 DC 刺激下同种 MLR 增殖曲线比较

弱,抵抗力低下,则以"扶正"为主要治法,黄芪是一种常用的扶正中药,性甘、微温,入肺、脾经,补中,益元气,温三焦,壮脾胃,有增强机体免疫力,消除肿瘤患者体内残微病变作用。药物化学分析证实黄芪含有三萜皂甙类衍生物、黄酮化合物、多糖、多种氨基酸、微量元素和维生素等多种物质,能增强机体抵抗力,调节免疫功能。实验研究表明,黄芪可明显地抑制小鼠移植性肿瘤的生长,对体外人癌细胞生长有抑制作用,但黄芪并不能直接杀伤肿瘤细胞,目前研究其抗肿瘤作用机制主要有:(1)通过调节免疫系统而发挥作用。(2)黄芪的多糖成分能增加网状内皮系统的吞噬功能,促进抗体的生成。(3)黄芪总甙可调节 T 细胞亚群的比例,促进肿瘤细胞的凋亡。

树突状细胞(DC)是体内功能最强的抗原呈递细胞,DC 高水平表达Ⅰ类和Ⅱ类 HLA 分子、共刺激信号 B7-1、B7-2 及某些黏附分子如 CD11,CD54,CD50,CD58 等,在初次免疫应答中具有重要作用。近年来,对 DC 的研究成为免疫学领域的研究热点,DC 在抗肿瘤免疫中有着重要作用。DC 在白血病的免疫治疗方面的研究进展迅速,DC 负载了白血病抗原或与白血病细胞融合后形成白血病疫苗,具有安全、高效、特异的优点,应用 DC 诱导机体产生出针对自身白血病细胞的特异性细胞免疫是一条很有希望的免疫治疗的途径[13-15]。一些研究证明大剂量黄芪具有免疫治疗作用[16,17],本实验发现黄芪可以明显增加急性白血病的外周血单核细胞诱导生成 DC 的数量,提高 DC 抗原刺激能力,故黄芪能提高抗原呈递细胞的功能,这可能是黄芪发挥抗肿瘤作用的又一重要途径,鉴于 DC 在肿瘤免疫治疗方面的重要地位,黄芪提高 DC 抗原呈递能力将具有重大的临床应用价值。

参 考 文 献

1 许杜娟,吴　强,杨　雁,等.黄芪总苷的抑瘤作用及其作用机制.中国药理学通报 2003;19(7):823—826.
Xu DJ, Wu Q, Yang Y, et al. The anti-tumor function and mechanism of astragalosides. Chin Pharmacol Bull 2003;19(7):823—826.

2 王润田,单保恩,李巧霞,等.黄芪提取物免疫调节活性的体外实验研究.中国中西医结合杂志 2002;22(6):453—456.
Wang RT, Shan BE, Li QX, et al. Extracorporeal experimental study on immuno-modulatory activity of Astragalus membranaceus extract. Chin J Integr Tradit West Med 2002; 22(6):453—456.

3 郑春燕,肖　伟.肺癌患者外周血单个核细胞 TH1/TH2 反应状态及黄芪的调节作用.中国免疫学杂志 2002;18(7):502—504.
Zheng CY, Xiao W. Pattern on Th1/Th2 and regulation of astragalus in lung cancer. Chin J Immunol 2002;18(7):502—504.

4 余向东,严发敏.黄芪注射液配合化疗对急性白血病患者 T 淋巴细胞亚群的影响.时珍国医国药 2003;14(12):755.
Yu XD, Yan FM. The effects of astragalus on T cell subgroup in acute leukemia. Lishizhen Med Materia Medica Res 2003;14(12):755.

5 赵莲华,李　清,陈咏梅,等.黄芪成分 F3 新制剂对人 CCL-229、K562 癌细胞的抑制作用.实用癌症杂志 2003;18(3):242—244.
Zhao LH, Li Q, Chen YM, et al. The inhibitory effects of two cancer cell lines induced by F3 new preparation from astragalus membranaceus. Pract J Cancer 2003;18(3):242—244.

6 董　静,孙立容,李学荣,等. 树突状细胞应用于急性白血病免疫治疗的初步研究. 肿瘤 2001;21(4):294—296.
Dong J, Sun LR, Li XR, et al. Generation and study of dendritic cells from peripheral blood of acute leukemia patients. Tumor 2001;21(4):294—296.

7 First MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. Cancer Genet Cytogenet 1986;23:189—197.

8 广西北海会议. 小儿急性白血病诊疗建议(修订草案).中华儿科杂志 1993;31(5): 285—287.
Guangxi Beihai Meeting. Direction for the diagnosis and therapy of childhood acute leukemia. Chin J Pediatrics 1993;31(5): 285—287.

9 Liu XM, Sun XM. Significance of apoptosis associated antigen 7A7 expression in acute myelogenous leukemia. J Exp Hematol 1999;7(1):39—41.

万方数据

10 R. Mahanonda, N. Sa-Ard-Iam, O. Charatkulangkun, et al. Monocyte activation by porphyromonas gingivalis LPS in aggressive periodontitis with the use of whole-blood cultures. J Dent Res 2004;83(7): 540—545.

11 童向民,金 洁,薛永权,等.急性髓系白血病细胞诱导分化生成树突状细胞的研究.中华内科杂志 2004;43(1): 45—48.
Tong XM, Jin J, Xue YQ, et al. The study of dendritic cells derived from acute myeloid leukemia cells. Chin J Intern Med 2004;43(1): 45—48.

12 Banat GA, Usluoglu N, Hoeck M, et al. Dendritic cells fused with core binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia blast cells induce activation of cytotoxic lymphocytes. Br J Haematol 2004;126(4): 593—601.

13 Westers TM, Stam AG, Scheper, et al. Rapid generation of antigen-presenting cells from leukemia blasts in acute myeloid leukemia. Cancer Immunol Immunother 2003;52(1):17—27.

14 Galea-Lauri J, Darling D, Mufti G, et al. Eliciting cytotoxic T lymphocytes against acute myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strateges for dendritic cell-based vaccination. Cancer Immunol Immunother 2002;51(6):299—310.

15 Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med 2001;193(2):233—238.

16 郑国庆.张志远教授应用大剂量黄芪经验.辽宁中医杂志 1995;22(10):443—444.
Zheng GQ. Professor Zhang Zhi-yuan's treatment with large doses of astragalus. Liaoning J Tradit Chin Med 1995;22(10):443—444.

17 石 鹏,林为民,傅忠国.大剂量黄芪注射液治疗肾病综合征临床研究.中国新医药 2003;2(12):30—31.
Shi P, Lin WM, Fu ZG. Clinical research of radix astragali injection on nephropathy syndrome. China New Med 2003;2(12):30—31.

(收稿:2005-04-04 修回:2005-07-12)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

名誉总编 季钟朴

总 编 辑 陈可冀

副总编辑 沈自尹 肖培根 陈维养(常务)

顾 问 吴咸中 辛育龄 关幼波 邓铁涛 尚天裕 王永炎 侯 灿

编辑委员 马必生 王一涛 王书臣 王今达 王宁生 王 阶 王学美 王 佩 王宝恩
王硕仁 王雪苔 尹光耀 史大卓 史载祥 刘干中 刘建勋 刘耕陶 刘猷枋
危北海 匡调元 朱 兵 吕爱平 吕维柏 齐清会 孙 燕 李 恩 李乃卿
李大金 李玉光 李连达 李廷谦 李国贤 李国栋 李鸣真 李顺成 李恩宽
杨任民 杨秀伟 时毓民 陈士奎 陈小野 陈冬燕 陈香美 吴伟康 陆付耳
张大钊 张之南 张永祥 张伯礼 张国玺 张亭栋 张荣华 张家庆 张梓荆
林求诚 林志彬 林瑞超 郁仁存 周文泉 周 俊 周霭祥 金益强 赵伟康
唐由之 顾振纶 郭赛珊 徐治鸿 梁晓春 黄晓愚 曹小定 葛秦生 谢宗万
谢竹藩 董福慧 曾晓春 雷 燕 蔡定芳 裴正学 黎磊石 廖家桢 廖福龙
戴瑞鸿

万方数据