

人参皂苷 Rg3 对鼻咽癌放疗患者细胞免疫功能的影响

何 斌^{1,2} 钱立庭¹ 江 浩²

摘要 目的 探讨人参皂苷 Rg3 对鼻咽癌放疗患者细胞免疫功能的影响。方法 选取鼻咽癌放疗患者共 50 例为研究对象,按随机数字表法分为对照组、Rg3 组,每组 25 例。放疗结束后,分离各组患者外周血淋巴细胞。采用 MTT 法检测淋巴细胞增殖,流式细胞仪检测淋巴细胞亚群,间接 ELISA 法检测 IgG、IgM 抗体水平及 Th1/Th2 细胞因子表达。结果 人参皂苷 Rg3 可促进鼻咽癌放疗患者淋巴细胞增殖,上调 CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、IgG、IgM、IL-2,下调 CD8⁺、IL-6,并呈现剂量依赖性。结论 人参皂苷 Rg3 可显著增强鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞免疫功能,提示人参皂苷 Rg3 可作为潜在免疫增强剂,拮抗鼻咽癌放疗所致的免疫抑制。

关键词 人参皂苷 Rg3; 鼻咽癌; 放疗; 淋巴细胞

中图分类号 R 739.63; R 730.3; R 730.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)09-1293-04

鼻咽癌发病率在中国南方有较高的发病率。放疗是目前治疗鼻咽癌的主要方法,对杀灭肿瘤细胞,控制局部复发及远处转移均有重要意义^[1]。但因特异性较差,在杀伤肿瘤细胞的同时也对正常细胞和组织造成不同程度损伤,导致机体免疫功能异常或低下,多表现为淋巴细胞亚群格局改变及其细胞因子表达水平异常等^[2]。放疗所致的免疫功能异常不利于抗肿瘤免疫应答的诱导,且易诱发继发性疾病,延误放疗方案的实施进度,甚至影响抗肿瘤疗效及患者预后^[3]。因此,监控放化疗期间患者机体免疫功能变化,并采取相应的干预措施,对改善患者免疫功能及抗肿瘤疗效均具有积极意义。人参皂苷单体 Rg3 有显著的抗肿瘤及免疫调节作用,是目前已知的活性最强的人参皂苷单体之一^[4]。该研究采用人参皂苷单体 Rg3 体外刺激鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞,并观察其对淋巴细胞的免疫调节作用及机制,旨在为寻找鼻咽癌放疗患者辅助用药提供可靠理论依据及新思路。

2015-05-18 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH190)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院肿瘤放疗科,合肥 230001

²蚌埠医学院第一附属医院肿瘤放疗科,蚌埠 233004

作者简介:何 斌,男,主治医师;

钱立庭,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail: money2004@sina.com

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 5 月~2014 年 5 月蚌埠医学院第一附属医院收治的鼻咽癌并接受放疗患者共 50 例为研究对象。纳入标准:① KPS 评分 ≥ 80 分;② 心、肝、肾功能正常;③ 于我院接受放疗治疗者。排除标准:① 已经出现远处转移者;② 中途退出试验的患者;③ 合并全身免疫性疾病。

1.2 分组方法 按随机原则将入组患者分为对照组、Rg3 组,每组 25 例,各组一般资料比较差异无统计学意义,具有可比性。见表 1。

表 1 各组患者一般资料比较

项目	对照组 (n=25)	Rg3 组 (n=25)	t/u 值	P 值
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	49.8 ± 9.3	49.2 ± 8.6	0.145	0.907
性别[n(%)]			0.288	0.773
男	15(60.0)	16(64.0)		
女	10(40.0)	9(36.0)		
病理类型[n(%)]			0.862	0.389
鳞癌	23(92.0)	21(84.0)		
未分化癌	2(8.0)	4(16.0)		
临床分期[n(%)]			0.468	0.639
I 期	2(8.0)	2(8.0)		
II 期	7(28.0)	5(20.0)		
III 期	8(32.0)	9(36.0)		
IV 期	8(32.0)	9(36.0)		

1.3 放疗方法 体位固定并 CT 模拟定位扫描,勾画原发病灶大体肿瘤靶区及临床靶区,依据随机摆位误差确定计划靶区并勾画危及器官。采用调强适形放射治疗,总照射量为 68 Gy,2.27 Gy/次,1 次/d,5 次/周。

1.4 淋巴细胞分离纯化 所有入组患者放疗疗程全部结束后,抽取清晨空腹肘静脉血 5 ml,肝素抗凝,加入等体积 PBS 溶液,混匀,缓慢沿管壁加入等体积淋巴细胞分离液,800 r/min 离心 15 min。吸取淋巴细胞层液体, RPMI1640 洗涤 3 次。加入含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养液重悬浮细胞,37 °C 培养箱培养 12 h,去除贴壁细胞。

1.5 淋巴细胞增殖试验 收集上述淋巴细胞, PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,800 r/min 离心 10 min,弃上清液,含 10% FBS 的 RPMI1640 重悬浮脾淋巴细胞,

调整细胞密度至 2×10^6 个/ml, 铺板 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 2 h, 分别加入不同刺激物: 刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) ($5 \mu\text{g/ml}$)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) ($5 \mu\text{g/ml}$)。按分组不同, Rg3 组分别加入终浓度为 1、10、100 mg/L 的人参皂苷单体 Rg3, 对照组加入等体积 PBS, 每个样本 3 个平行重复。 37°C $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 72 h。MTT 法检测淋巴细胞增殖。

1.6 淋巴细胞亚群测定 收集分离纯化后的淋巴细胞, 调整细胞密度至 5×10^6 个/ml, 铺板, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 24 h。按分组不同, Rg3 组分别加入终浓度为 1、10、100 mg/L 的人参皂苷单体 Rg3, 对照组加入等体积 PBS, 每个样本 3 个平行重复。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 72 h, 收集细胞悬液, 采用流式细胞仪检测 CD4^+ 、 CD8^+ 百分比, 并计算 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 比值。

1.7 淋巴细胞抗体及细胞因子测定 收集分离纯化后的淋巴细胞, 调整细胞浓度至 2×10^6 个/ml, 铺板 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 24 h。按分组不同, Rg3 组分别加入终浓度为 1、10、100 mg/L 的人参皂苷单体 Rg3, 对照组加入等体积 PBS, 每个样本 3 个平行重复。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养 72 h, 收集上清液, 采用间接 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)检测 IgG、IgM 抗体水平及白细胞介素-2(interleukin-2,

IL-2)、IL-6 水平。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较用 t 检验, 计数资料用 % 表示, 组间比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞增殖的影响 不同剂量(1、10、100 mg/L) 人参皂苷单体 Rg3 处理鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞 72 h 后, 可显著促进 ConA 及 LPS 诱导的淋巴细胞增殖, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 呈显著剂量依赖性。见表 2。

2.2 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞亚群的影响 不同剂量(1、10、100 mg/L) 人参皂苷单体 Rg3 处理鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞 72 h 后, 可显著上调 CD4^+ 及 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, 下调 CD8^+ , 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 呈显著剂量依赖性。见表 3、图 1。

2.3 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞抗体表达水平的影响 不同剂量(1、10、100 mg/L) 人参皂苷单体 Rg3 处理鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞 72 h 后, 可显著上调淋巴细胞 IgG、IgM 抗体表达水平, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 呈显著剂量依赖性。见表 4。

表 2 人参皂苷单体 Rg3 对不同丝裂原诱导的鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=25)	Rg3 组 (n=25)			F 值	P 值
		1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L		
ConA (5 mg/L)	0.12 ± 0.11	5.23 ± 1.14*	17.12 ± 2.54*	56.31 ± 3.14*	178.023	0.000
LPS (5 mg/L)	0.10 ± 0.03	2.24 ± 0.44*	2.98 ± 0.34*	4.35 ± 0.74*	30.878	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$

表 3 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞亚群的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=25)	Rg3 组 (n=25)			F 值	P 值
		1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L		
CD4^+ (%)	28.23 ± 2.12	34.37 ± 1.80*	40.15 ± 1.24*	46.34 ± 2.11*	11.023	0.000
CD8^+ (%)	38.56 ± 2.31	33.12 ± 1.97*	30.02 ± 1.35*	21.78 ± 1.45*	14.878	0.000
$\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$	0.82 ± 0.12	1.12 ± 0.07*	1.62 ± 0.15*	2.08 ± 0.35*	15.982	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$

表 4 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞抗体表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=25)	Rg3 组 (n=25)			F 值	P 值
		1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L		
IgG (mg/ml)	0.98 ± 0.24	1.45 ± 0.19*	1.68 ± 0.14*	1.86 ± 0.22*	34.788	0.000
IgM (mg/ml)	0.57 ± 0.11	2.21 ± 0.27*	3.87 ± 0.28*	5.78 ± 0.56*	30.957	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$

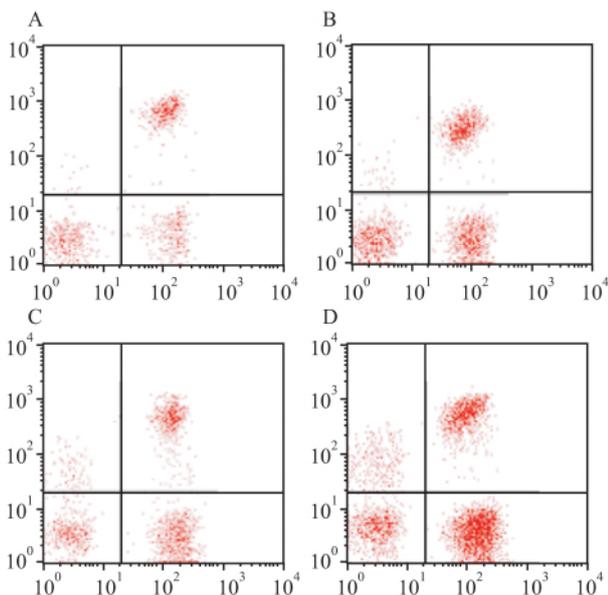


图1 不同浓度人参皂苷单体 Rg3 对外周血淋巴细胞亚群的影响
A: 对照组; B: Rg3(1 mg/L) 组; C: Rg3(10 mg/L) 组; D: Rg3(100 mg/L) 组

2.4 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞 IL-2、IL-6 表达水平的影响 不同剂量(1、10、100 mg/L) 人参皂苷单体 Rg3 处理鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞 72 h 后,可显著上调 IL-2 表达,下调 IL-6 表达,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$) 呈显著剂量依赖性。见表 5。

3 讨论

免疫细胞参与免疫应答,机体中各种免疫细胞担任着重要的角色^[5]。免疫细胞可以分为多种,主要包括淋巴细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、单核/巨噬细胞、粒细胞、肥大细胞和淋巴因子激活杀伤细胞等。淋巴细胞减少是指机体外周淋巴细胞绝对总数的减少,多见于恶性肿瘤患者药物化疗或放射线治疗后^[6]。之后,机体为维持免疫内环境稳定,启动内源性淋巴细胞的自稳性增殖,最终使淋巴细胞数量恢复至正常生理水平范围,淋巴细胞数量从减少到复常的过程被定义为淋巴细胞减少状态。研究^[7]显示,放化疗所致的淋巴细胞减少状态可造成

机体免疫功能异常,不利于抗肿瘤免疫应答的诱导。

人参皂苷 Rg3 分子式为 $C_{42}H_{72}O_{13}$, 相对分子量为 784, 是已知人参皂苷中抗肿瘤作用最为显著的单体。我国自行研制的首个应用于临床的抗肿瘤一类中药—“参一胶囊”中的主要活性成分即为 Rg3。此外, Rg3 亦具有抗疲劳、免疫增强、舒张血管等生物学活性^[8-9]。但人参皂苷单体 Rg3 对放疗所致的免疫抑制的调节作用对比研究鲜见报道。

淋巴细胞增殖实验是常用的实验方法,可用于评估刺激物对于细胞免疫的诱导能力。而不同的丝裂原刺激淋巴细胞类型亦不相同^[10]。Con A 刺激 T 淋巴细胞增殖, LPS 则刺激 B 淋巴细胞增殖。韦晓洁^[11]采用人参皂苷 Rg3 体外刺激 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞,结果显示 Rg3 均可有效促进 ConA、LPS 和卵清白蛋白诱导的淋巴细胞增殖。本研究结果显示,人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞均有活化作用。

按表型不同, T 淋巴细胞可分为 CD_3^+ 、 CD_4^+ 和 CD_8^+ 等亚群, CD_3^+ 代表总 T 淋巴细胞,其数量直接反应机体参与免疫应答的免疫活性细胞活性和数量; CD_8^+ 为 T 杀伤细胞,直接参与病毒清除过程; CD_4^+ 为 T 辅助细胞,可促进 B 淋巴细胞分泌抗体,对 CD_8^+ 的增殖、活化具有重要调节作用, T 淋巴细胞亚群比例的改变可导致机体正常免疫功能状态的改变,并影响机体病毒清除过程。 CD_4^+ / CD_8^+ 比值上调可提示机体免疫功能升高, CD_4^+ / CD_8^+ 比值下调则提示机体出现免疫抑制^[12]。本研究结果显示,放疗可导致鼻咽癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群变化;而人参皂苷单体 Rg3 可通过调节 T 淋巴细胞亚群比例,改善 T 淋巴细胞功能,提高细胞免疫应答,从而拮抗放疗所致的机体免疫抑制。

B 淋巴细胞是机体内唯一能产生抗体的细胞,在受到抗原刺激后 B 淋巴细胞可分化为浆细胞,进而分泌不同活性的抗体,即免疫球蛋白,如 IgG、IgM、IgE、IgA 等,抗体与其相应抗原结合可介导机体内多种生理学效应,诱发抗原-抗体反应^[13]。本研究结果提示人参皂苷单体 Rg3 可活化抗原特异

表5 人参皂苷单体 Rg3 对鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞 IL-2、IL-6 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组 (n=25)	Rg3 组 (n=25)			F 值	P 值
		1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L		
IL-2(pg/ml)	2.98 ± 0.25	5.11 ± 0.37*	6.24 ± 0.34*	7.46 ± 0.57*	20.608	0.000
IL-6(pg/ml)	9.23 ± 1.17	6.88 ± 0.57*	6.07 ± 0.78*	5.17 ± 0.76*	23.924	0.000

与对照组比较: * $P < 0.05$

性淋巴细胞(如 B 淋巴细胞),促进体内抗体生成,诱导抗原-抗体反应,从而增强机体内免疫活性。

现阶段研究^[14]显示,放疗可下调 Th1 细胞因子表达,同时上调 Th2 细胞因子表达,导致 Th1/Th2 免疫平衡出现 Th2 漂移,这对于鼻咽癌患者预后是极为不利的。本研究结果显示,提示人参皂苷单体 Rg3 可通过调节鼻咽癌放疗患者外周血 Th1/Th2 细胞因子分泌水平,纠正放疗所致的 Th2 免疫漂移现象,提高 Th1 细胞介导的细胞免疫,从而提高机体免疫能力。

综上所述,人参皂苷 Rg3 可显著增强鼻咽癌放疗患者外周血淋巴细胞免疫功能,提示人参皂苷 Rg3 可作为潜在免疫增强剂,拮抗鼻咽癌放疗所致的免疫抑制。

参考文献

[1] Valouev A, Weng Z, Sweeney R T, et al. Discovery of recurrent structural variants in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Genome Res*, 2014, 24(2): 300-9.

[2] 李永强,刘志辉,胡晓桦,等. CD4⁺/CD25⁺与 CD28⁺/TCR⁺ T 淋巴细胞亚群与进展期鼻咽癌患者预后的关系[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2013, 18(12): 1108-11.

[3] Péron J, Cropet C, Tredan O, et al. CD4 lymphopenia to identify end-of-life metastatic cancer patients[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(5): 1080-9.

[4] 储继红,许美娟,吴婷,等. 人参皂苷 Rg3 药理学及药代动力学研究进展[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(2): 180-2.

[5] Church S E, Jensen S M, Antony P A, et al. Tumor-specific

CD4⁺ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8⁺ T cells[J]. *Eur J Immunol* 2014 44(1): 69-79.

[6] Cézé N, Thibault G, Goujon G, et al. Pre-treatment lymphopenia as a prognostic biomarker in colorectal cancer patients receiving chemotherapy[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 68(5): 1305-13.

[7] Yasuda K, Nirei T, Sunami E, et al. Density of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer[J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6: 49.

[8] 华琼, 华海清. 人参皂苷 Rg3 抗肝癌作用机制的研究进展[J]. *中医学报*, 2012, 27(3): 266-8.

[9] 贺兼斌, 廖慧中, 易高众, 等. 人参皂苷 Rg3 对小鼠肺腺癌移植瘤生长抑素受体表达的调控及意义[J]. *肿瘤*, 2012, 32(8): 572-7.

[10] 耿卫朴, 徐曼, 罗祎, 等. 灵芝多糖和当归多糖促进人外周血 T 淋巴细胞增殖和分泌 IFN- γ [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(5): 655-8.

[11] 韦晓洁. 人参皂甙 Rg3 不同构型免疫佐剂作用和抗氧化作用及其机理的研究[D]. 广西大学, 2012.

[12] Nigam P K, Patra P K, Khodiar P K, et al. A study of blood CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cell levels and CD4⁺: CD8⁺ ratio in vitiligo patients[J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2011, 77(1): 111.

[13] Li H X, Han S Y, Ma X, et al. The saponin of red ginseng protects the cardiac myocytes against ischemic injury *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(6): 477-83.

[14] Jones S W, Roberts R A, Robbins G R, et al. Nanoparticle clearance is governed by Th1/Th2 immunity and strain background [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3061-73.

The effect of Rg3 ginsenosides on cellular immune function of nasopharyngeal carcinoma patients with radiotherapy

He Bin^{1,2}, Qian Liting¹, Jiang Hao²

(¹Dept of Medical Oncology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

²Dept of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College Bengbu 233000)

Abstract Objective To evaluate the effect of ginsenoside-Rg3 on cellular immune function of nasopharyngeal carcinoma patients with radiotherapy. **Methods** 50 nasopharyngeal carcinoma patients with radiotherapy were randomly divided into Rg3 group (n = 25) and control group (n = 25). After the radiotherapy, the peripheral blood lymphocyte of each group were collected. MTT method was used to detect lymphocyte proliferation. Lymphocyte subgroup was detected by Flow Cytometry/financial capacity model. IgG, IgM and Th1/Th2 cytokines was detected by ELISA. **Results** Ginsenoside Rg3 could promote the proliferation of lymphocytes in patients with nasopharyngeal carcinoma radiotherapy, upregulation of CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺, IgG, IgM, IL-2, downregulation of CD8⁺, IL-6, and showed dose dependent. **Conclusion** Rg3 ginsenosides can significantly enhance the peripheral blood lymphocyte immune function of nasopharyngeal carcinoma patients with radiotherapy. Rg3 ginsenosides may be a potential immune immunosuppression caused by nasopharyngeal carcinoma radiotherapy enhancer antagonism.

Key words Rg3 ginsenosides; nasopharyngeal carcinoma; radiotherapy; lymphocyte