

# 三叶青黄酮干预荷肺癌小鼠MDSCs生成及相关因子表达的研究

李天平, 贺灵芝, 轩贵平, 梁忠厚, 刘德勇

湖南环境生物职业技术学院医药技术学院, 湖南 衡阳

收稿日期: 2023年9月19日; 录用日期: 2023年10月13日; 发布日期: 2023年10月20日

## 摘要

目的: 研究三叶青黄酮对荷肿瘤小鼠MDSCs、PGE2和COX-2的影响, 以及它们在调控肿瘤免疫和逆转肿瘤免疫逃逸中的作用。方法: 40只C57BL/6小鼠随机分为实验组、环磷酰胺组和三叶青黄酮高、中、低剂量组; 每组8只小鼠(以下简称高, 中, 低)。结果: 其它各组的肿瘤体积、肿瘤重量均明显低于模型组( $P < 0.05$ ), 外周血中COX-2和PGE2的水平以及脾脏中MDSCs的比例均明显低于模型组( $P < 0.05$ )。小剂量组第8, 12, 14天的肿瘤体积明显大于环磷酰胺组( $P < 0.05$ ), 且外周血中COX-2和PGE2的浓度明显高于小剂量组( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。中剂量组在第8天时, 肿瘤变大, PGE2在外周血中的含量明显高于对照组( $P < 0.05$ ); 高剂量组第14天的瘤体明显缩小( $P < 0.05$ ), 与对照组比较差异有统计学意义。中低剂量组的肿瘤抑制率低于对照组( $P < 0.05$ ), 而MDSCs的比例高于对照组( $P < 0.05$ ); 结论: 三叶青黄酮对肿瘤细胞有一定的抑制作用, 这种抑制作用可能是通过抑制肿瘤细胞的增殖和凋亡而实现的。

## 关键词

三叶青黄酮, 荷肺癌小鼠MDSCs, 因子表达

## Effect of *Trifolium flavone* on MDSCs Formation and Expression of Related Factors in Mice with Lung Cancer

Tianping Li, Lingzhi He, Guiping Xuan, Zhonghou Liang, Deyong Liu

Medical Technology College, Hunan Polytechnic of Environment and Biology, Hengyang Hunan

Received: Sep. 19<sup>th</sup>, 2023; accepted: Oct. 13<sup>th</sup>, 2023; published: Oct. 20<sup>th</sup>, 2023

文章引用: 李天平, 贺灵芝, 轩贵平, 梁忠厚, 刘德勇. 三叶青黄酮干预荷肺癌小鼠 MDSCs 生成及相关因子表达的研究[J]. 临床医学进展, 2023, 13(10): 16633-16638. DOI: 10.12677/acm.2023.13102328

## Abstract

**Objective:** To study the effects of *Trifolium flavone* on MDSCs, PGE2 and COX-2 in tumor-bearing mice, and their role in regulating tumor immunity and reversing tumor immune escape. **Methods:** 40 C57BL/6 mice were randomly divided into experimental group, cyclophosphamide group and trifoliolate flavonoid high-dose, medium-dose and low-dose groups. There were 8 mice in each group (hereinafter referred to as high, medium and low). **Results:** The tumor volume and tumor weight in other groups were significantly lower than those in model group ( $P < 0.05$ ), the levels of COX-2 and PGE2 in peripheral blood and the proportion of MDSCs in spleen were significantly lower than those in model group ( $P < 0.05$ ). The tumor volume in the low-dose group was significantly higher than that in the cyclophosphamide group at day 8, 12 and 14 ( $P < 0.05$ ), and the concentrations of COX-2 and PGE2 in peripheral blood were significantly higher than those in the low-dose group ( $P < 0.05$ ), with statistical significance. On the 8th day, the tumor was enlarged and the PGE2 content in peripheral blood of the medium dose group was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The tumor volume of the high-dose group was significantly reduced on the 14th day ( $P < 0.05$ ), and the difference was statistically significant compared with the control group. The tumor inhibition rate of medium-low dose group was lower than that of control group ( $P < 0.05$ ), and the proportion of MDSCs was higher than that of control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** *Trifolium flavone* has a certain inhibitory effect on tumor cells, which may be achieved by inhibiting the proliferation and apoptosis of tumor cells.

## Keywords

*Trifolium flavone*, MDSCs in Mice with Lung Cancer, Factor Expression

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

肿瘤免疫抑制是肿瘤发生、发展、转移及复发的重要原因,已成为当前肿瘤治疗领域亟待解决的难题[1]。髓源性抑制细胞(MDSCs)是近年来发现的一种新型免疫抑制细胞,可激活 PGE2、COX-2 和 IL-6,增加 Treg,抑制 NK 细胞和 T 细胞的免疫功能,并诱导 M2 型巨噬细胞产生[2] [3] [4]。三叶青具有显著的抗肿瘤活性,其中黄酮类化合物是三叶青抗肿瘤的重要物质基础[5] [6],张祺箐、孙倩倩等[7] [8]早在 2017 就已经证实三叶青黄酮对肺癌小鼠体内 PGE2、COX-2 等免疫相关因子具有一定的调节作用,但其具体机制一直未阐明。本项目拟在前期工作基础上,利用荷 Lewis 肺癌模型,观察三叶总黄酮对荷肺癌小鼠脾脏内 MDSCs 比例的影响,验证三叶青黄酮对肺癌小鼠 COX-2, PGE2 等细胞因子的影响与 MDSCs 的关系,探索三叶总黄酮在体内的抗肿瘤效应及分子机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验动物

浙江中医药大学动物试验中心(SCXY(沪)2003-0016)提供的 SPF 级 5 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 40 只。饲养于浙江中医药大学实验动物中心,试验用的动物执照:SYXK(苏)2015-0001,动物伦理学批准编号:IACUC-20190729-13。在恒温  $25 \pm 2$  度,恒湿  $60\% \pm 5\%$ , SPF 环境下自由摄食基础饲料 1 周。

## 2.2. 实验细胞

中国科学院上海细胞所购得的小鼠原代肺癌细胞系，浙江中医药大学动物试验中心冷冻保存。

## 2.3. 实验药物、试剂及仪器

三叶青是从浙江省中医院购买的，浙江中医药大学药学系对其进行了初步的临床试验。三叶青总黄酮粉按照相应的方法进行萃取，三叶青总黄酮粉按照既定的方法溶解在蒸馏水中，按照需要配置 100 mg/ml、50 mg/ml 和 25 mg/ml 的高剂量、中剂量和低剂量。环磷酰胺胶囊是从齐鲁制药有限公司购买的，规格为 0.5g，5 支/盒，产品质量满足试验要求。达文生物科技公司生产的 COX-2 和 PGE2 ELISA 检测工具。Ly-6G (Gr-1)，CD11b 单抗(美国 eBioscience, Inc.)上海精宏试验器材公司生产的 DK-8D 电加热恒温水箱。鼓风干燥器 GXZ-9140MBE (上海博迅工业有限公司)美国 BIO-Rad 酶联免疫检测装置(BIO-Rad) FACSCanto II 型流式细胞术(美国 BD 公司)。

## 2.4. 动物分组及模型制备

以 40 只小鼠为研究对象，随机分为高、中两组；每组 8 只小鼠(以下简称高，中，低)。本项目拟采用浙江中医药大学动物试验中心的 Lewis 细胞进行体外回输，在保证细胞数量和质量的前提下，将细胞浓度调节到  $1 \times 10^7$  个/mL，然后将 0.2 mL 的细胞悬浮液注入小鼠右腋下，建立荷带 Lewis 肺癌小鼠模型。

## 2.5. 给药方法

模型制备时间达 24 小时后，取高、中、低剂量组的三叶青黄酮 0.2 mL，以 100 mg/mL，50 mg/mL，25 mg/mL，每日给药。环磷酰胺组，以 100 mg/ml/ml 的浓度，每日口服 0.2 ml。模型组以 0.9%生理盐水灌胃，给小鼠喂服 14 天[9]。

## 2.6. 各指标检测方法

一般情况。在肿瘤疫苗接种之后，对试验动物进行常规监测，主要包括：试验动物的活动性、摄食、饮水状况，还有体重的增减情况，眼睛、被毛等异常情况。

ELISA 检测小鼠血清中 COX-2、PGE2 含量[10] [11]。在灌胃 14 天后，从小鼠的眼球中取出血液，放入 1.5 mL Ep 试管，在室温下放置 30~60 分钟后，用  $3000 \times g$  离心 10 分钟，再用移液枪将血清提取出来，放入清洁的 EP 试管中，在  $-20^\circ\text{C}$  下保存。按照标准的要求进行稀释。空白对照中仅加入显色剂 A，B 和终止液，不加入任何试样。将 50 微升的标准物质和 50 微升的链霉素 - 辣根过氧化物酶(HRP)分别放入标准物质孔中。将 40 微升的试样装入待测试样孔，接着分别装入 10 微升的抗 COX-2 抗体、50 微升的链酶亲和素-HRP。用保鲜膜轻摇混合， $37^\circ\text{C}$  保温 60 分钟。仔细拆下封口板的薄膜，把里面的液体扔掉，然后抖落水份，在每个孔洞里注上水份；放置 30 秒，扔掉。重复五次。用手拍打干燥。首先将 50 微升的显色剂 A 注入到每个孔洞中，然后再将 50 微升的显色剂 B 注入到每个孔中，轻摇混合均匀后，在  $37^\circ\text{C}$  的遮光条件下显色 10 分钟。加入 50 微升的终止溶液，在每个孔洞中(这时由蓝色从红色转变为黄色)结束反应。用无孔调零后，依次测定每个孔的吸收系数(OD)，并在 45 nm 处测定。检测必须在加入终止剂后 10 分钟之内完成。用 COX-2 法测定 PGE2。以标准品的浓度和相应的 OD 值为基础，计算出标准曲线的直线回归方程，再以样品的 OD 值为基础，在回归方程上计算出相应的样品浓度。

取眼内血液后，将颈动脉脱位，将肿瘤完全切除，称量肿瘤重量，计算肿瘤抑制率。抑制肿瘤的比率 =  $(1 - \text{实验组肿瘤的平均重量} / \text{模型组肿瘤的平均重量}) \times 100\%$ 。

脾脏组织标本制备与检测。切断颈项，取脾脏，用玻璃片剂将脾脏粉碎，滤过筛子，获得细胞悬液。红血球溶解液避光溶解 20 分钟后，用 PBS 冲洗 2 次。PBS 重悬细胞至  $1 \times 10^6$  个/100 $\mu\text{L}$ ，将 100  $\mu\text{L}$  放入

流式管中, 取 1 mL PBS 液洗涤细胞 2 次, 取 100  $\mu$ L PBS 液重悬细胞, 按照细胞表面抗原染色法标记表面抗原, 在每管加入 0.5  $\mu$ L Anti-MouseLy-6 G (Gr-1) FITC, 0.5  $\mu$ L Anti-MouseCD11b PE, 4 $^{\circ}$ C 避光培养 30 min, 然后上机进行检测。1.7 统计方法应用 SPSS Statistics19.0 对试验数据进行处理, 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  为单位, 进行单因子变异数分析, 在方差齐性的情况下, 使用 LSD、SNK 等方法进行多组间的配对比较, 使用 Dunnett'sT3 方法进行比较。以  $P < 0.05$  为有显著性差异。

### 3. 结果

#### 3.1. 各组小鼠瘤组织体积变化比较

所有组随着时间的增加肿瘤的体积都在不断的增大, 而在同一时间内其他组与模型组相比, 肿瘤体积则明显缩小( $P < 0.05$ )。小剂量组第 8、12、14 天的肿瘤体积比环磷酰胺组大, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。中剂量组第 8 天, 瘤体增大, 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。高剂量组第 14 天的瘤体明显缩小( $P < 0.05$ ), 与对照组比较差异有统计学意义(见表 1)。

**Table 1.** Tumor volume in different groups of mice

**表 1.** 不同组别小鼠肿瘤的体积

组别	肿瘤体积( $\text{cm}^3$ )		
	8 天	12 天	14 天
模型组	1.03 $\pm$ 0.21	1.69 $\pm$ 0.25	2.12 $\pm$ 0.28
环磷酰胺组	0.56 $\pm$ 0.16	0.74 $\pm$ 0.09	0.81 $\pm$ 0.13
三叶青黄酮低剂量组	0.97 $\pm$ 0.13	1.12 $\pm$ 0.27	1.76 $\pm$ 0.24
三叶青黄酮中剂量组	0.81 $\pm$ 0.16	1.0 $\pm$ 0.12	1.33 $\pm$ 0.2
三叶青黄酮高剂量组	0.75 $\pm$ 0.09	0.87 $\pm$ 0.18	0.98 $\pm$ 0.23
F	20.026	24.384	21.145
P	<0.05	<0.05	<0.05

#### 3.2. 各组小鼠瘤重及抑瘤率比较

14 天后, 其它各组肿瘤重量均低于模型组( $P < 0.05$ ); 小剂量组的肿瘤重量明显高于环磷酰胺组( $P < 0.05$ )。中低剂量组和低剂量组的肿瘤抑制率均低于低剂量组( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

**Table 2.** Tumor weight and tumor inhibition rate of mice in different groups

**表 2.** 不同组别小鼠肿瘤的重量、抑瘤率

组别	肿瘤质量(g)	抑瘤率(%)
模型组	1.83 $\pm$ 0.34	-
环磷酰胺组	0.61 $\pm$ 0.08	61.79 $\pm$ 6.42
三叶青黄酮低剂量组	1.49 $\pm$ 0.28	16.98 $\pm$ 1.57
三叶青黄酮中剂量组	1.0 $\pm$ 0.23	31.65 $\pm$ 3.81
三叶青黄酮高剂量组	0.85 $\pm$ 0.15	53.77 $\pm$ 5.39
F	25.302	124.268
P	<0.05	<0.05

### 3.3. 各组小鼠体内 MDSCs 比例以及 COX-2、PGE2 含量比较

与模型组比较, 各组 MDSCs 比例下降( $P < 0.05$ )。与环磷酰胺组比较, 低、中剂量组 MDSCs 比例较高( $P < 0.05$ )。各组小鼠的外周血中 COX-2 和 PGE2 的水平均低于模型组( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。与环磷酰胺组相比, 低剂量组外周血液中 COX-2 和 PGE2 的水平显著升高( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义(见表 3)。中剂量组外周血液中 PGE 2 水平显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

**Table 3.** Proportion of MDSCs and related protein levels in different groups of mice  
**表 3.** 不同组别小鼠体内 MDSCs 比例及相关蛋白水平

组别	MDSCs 比例(%)	COX-2 (ng/mL)	PGE2 (pg/mL)
模型组	38.71 ± 1.03	2.59 ± 0.02	132.24 ± 0.64
环磷酰胺组	21.25 ± 5.47	1.33 ± 0.03	109.69 ± 0.38
三叶青黄酮低剂量组	31.47 ± 4.19	1.62 ± 0.04	124.26 ± 0.46
三叶青黄酮中剂量组	28.68 ± 3.72	1.49 ± 0.02	116.51 ± 0.38
三叶青黄酮高剂量组	20.37 ± 2.95	1.31 ± 0.03	105.63 ± 0.62
F	112.372	160.426	278.342
P	<0.05	<0.05	<0.05

## 4. 讨论

早在 1979 年, Lord 等正式提出了“肿瘤微环境(Tumor micro-environment, TME)”并得到了大家广泛认可, TME 指肿瘤在发生、发展过程中所处的细胞微环境, 它由肿瘤细胞本身、间质细胞以及少量浸润细胞和细胞生长所需的微血管、微淋巴管、组织液、众多细胞因子等共同构成[12]。肿瘤微环境中炎症因子、肿瘤细胞产生的细胞因子、肿瘤间质细胞分泌 Toll 样受体、补体等通过不同信号通路众多途径发挥负向免疫作用。我们前期实验发现, 该模型组小鼠脾内 MDSCs 显著上调, 外周血液中 COX-2 和 PGE2 显著上调, 于是猜想 MDSCs 在肿瘤形成过程中可能扮演非常作用的角色, 并且这种角色很可能与肿瘤免疫有关。本课题拟在前期研究基础上, 以三叶青黄酮与环磷酰胺联合应用, 观察其对小鼠肿瘤生长、小鼠肿瘤体积、小鼠脾内 MDSCs 比例、外周血液内 COX-2、PGE2 等的影响, 并进一步验证其作用机制, 为临床应用提供依据。结果表明, 三叶青黄酮成分在高浓度下对 MDSCs 和 PGE2、COX-2 的抑制效果与环磷酰胺类似, 但在高浓度下对 MDSCs 和 PGE2、COX-2 的抑制效果略好, 这一现象可能与三叶青素类成分通过多个途径发挥抗肿瘤效应相关, 值得深入探讨。

## 基金项目

本文系 2018 年湖南省衡阳市科技局指导性项目《三叶青黄酮对肺癌小鼠抗肿瘤作用的研究》, (课题编号: S2018F9031018293)阶段性研究成果之一; 2020 年, 湖南省教育厅科学研究一般项目: 《基于 PAA/GO/M-NP 电化学传感器检测黄酮类药物的研究》(项目编号: 20C0688)的研究成果; 2023 湖南省教育规划“十四五”规划课题《高职药类专业“产学研用创”五位一体科教融汇人才培养模式的研究》(项目编号: ND233231)的研究成果; 2021 年, 湖南省自然科学基金项目《基于金属硫化物  $M_xS_y$  负载贵金属纳米粒构建电化学传感器检测残留抗生素的研究》(项目编号: 221JJ50088)的研究成果; 2020 年湖南环境生物职业技术学院校级青年基金项目《三叶青黄酮对肺癌小鼠抗肿瘤作用的研究》的阶段性研究成果。



## 参考文献

- [1] 夏睿雪, 雷绘敏, 周斌兵, 等. 肿瘤免疫代谢靶向治疗的研究进展[J]. 现代免疫学, 2023, 43(5): 417-422.
- [2] Papadaki, M.A., Aggouraki, D., Vetsika, E.K., Xenidis, N., Kallergi, G., Kotsakis, A. and Georgoulas, V. (2021) Epithelial-to-Mesenchymal Transition Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Their Correlation with MDSCs and Tregs in HER2-Negative Metastatic Breast Cancer Patients. *Anticancer Research*, **41**, 661-670. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14817>
- [3] Karolina, O. (2023) Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Ovarian Cancer-Looking back and Forward. *Cells*, **12**, 1912. <https://doi.org/10.3390/cells12141912>
- [4] 王梦儿, 魏玲玉, 王金胜. 髓源性抑制细胞在肿瘤中空间分布模式及对肿瘤转移机制影响的研究进展[J]. 长治医学院学报, 2023, 37(1): 69-72.
- [5] 陆艳飞. 基于 miRNA 调控的三叶青黄酮肝癌抑制作用分子机制研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江中医药大学, 2023. <https://doi.org/10.27465/d.cnki.gzzyc.2023.000015>
- [6] 王碧旭, 卢静静, 孙棱, 等. 三叶青地上部分提取物对 H22 荷瘤小鼠的抗转移作用[J]. 中成药, 2022, 44(11): 3671-3676.
- [7] 张祺箐, 冯正权. 三叶青黄酮对荷 Lewis 肺癌小鼠脾脏单个核细胞 PGE<sub>2</sub>、COX-2 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(10): 842-845.
- [8] 孙倩倩. 三叶青黄酮通过 COX-2/PGE<sub>2</sub> 通路干预荷 Lewis 肺癌小鼠 M2 型巨噬细胞及相关因子表达的研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江中医药大学, 2017. <https://doi.org/10.27465/d.cnki.gzzyc.2017.000215>
- [9] Elkabets, M., Ribeiro, V.S., Dinarello, C.A., et al. (2010) IL-1 Beta Regulates a Novel Myeloid-Derived Suppressor Cell Subset That Impairs NK Cell Development and Function. *European Journal of Immunology*, **40**, 3347-3357. <https://doi.org/10.1002/eji.201041037>
- [10] Harari, O. and Liao, J.K. (2004) Inhibition of MHC II Gene Transcription by Nitric Oxide and Antioxidants. *Current Pharmaceutical Design*, **10**, 893-898. <https://doi.org/10.2174/1381612043452893>
- [11] Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., et al. (2007) Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Macrophages Subverts Tumor Immunity toward a Type 2 Response. *The Journal of Immunology*, **179**, 977-983. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.977>
- [12] Shimrit, M., Tomer, M., Achinoam, I., et al. (2023) The Tumor Microenvironment Shows a Hierarchy of Cell-Cell Interactions Dominated by Fibroblasts. *Nature Communications*, **14**, Article Number 5810. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41518-w>