· 实验研究 ·

L－精氨酸促进乳腺癌荷瘤小鼠 T 细胞应答*

张艳君[1]，曹彧[1]，冯永辉[2]

摘　要：目的　探讨 L-精氨酸（L-Arg）对乳腺癌的治疗效果及相关机制。**方法**　制备 4T1 小鼠乳腺癌荷瘤模型，实验组小鼠于成瘤后连续给予灌胃 L-Arg（1.5 g/kg）20 d。动态监测肿瘤组织大小和生存率，处理结束时处死小鼠，制备脾细胞悬液，经流式细胞术检测 T 细胞亚群和巨噬细胞比例，ELISA 检测脾细胞培养上清 IFN-γ 和 TNF-α 水平，Griess 反应测定上清中 NO 含量。**结果**　与对照组相比，L-Arg 处理可以抑制肿瘤的生长，延长小鼠生存期；同时，L-Arg 处理组中脾细胞中 $CD4^+$ T（26.53 ± 4.25）%、$CD8^+$ T 细胞（15.65 ± 0.78）% 和巨噬细胞（7.62 ± 0.86）% 比例明显高于 PBS 组［分别为（19.53 ± 2.50）%、（8.78 ± 1.15）% 和（2.02 ± 0.12）%］，脾细胞培养上清中 IFN-γ（36.56 ± 10.50）pg/mL、TNF-α（22.05 ± 4.93）pg/mL 和 NO（30.28 ± 6.00）μm 的分泌水平也明显高于 PBS 组［（分别为（15.47 ± 4.96）pg/mL、（14.69 ± 0.81）pg/mL 和（6.57 ± 2.21）μM］。**结论**　L-Arg 可通过促进乳腺癌荷瘤小鼠的 T 细胞应答，发挥抗肿瘤效应。

关键词：L-精氨酸（L-Arg）；乳腺癌；T 细胞应答
中图分类号：R 392.1　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580（2014）04-0446-03　DOI：10.11847/zgggws2014-30-04-19

L-arginine promotes T cell mediated immune response in mice with breast cancer

ZHANG Yan-jun*, CAO Yu, FENG Yong-hui (* *Physical Examination Center, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning Province* 110001, China)

Abstract: Objective　To explore the role of L-arginine (L-Arg) in the treatment of breast cancer. **Methods**　The experimental rodent model of breast cancer was prepared by injecting 4T1 cell line into the right side body of the mouse. The mice in L-Arg group were orally treated with L-Arg (1.5 g/kg) for successive 20 days when the tumor could be detected with palpation. Tumor size and survival rate were dynamically monitored. The mice were sacrificed and the spleen cell suspension was prepared when the treatment ended. Fluorescence activated cell sorter (FACS) was used to detect the T subsets and macrophage. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Griess reaction were used to detect interferon-gama (IFN-γ), interferon-alpha (TNF-α), and nittric oxide (NO), respectively. **Results**　Compared with the control, treatment with L-Arg could inhibit tumor growth, prolong survival time of the mice. Meanwhile, L-Arg treatment significantly increased the percentages of $CD4^+$ T (26.53 ± 4.25%), $CD8^+$ T cells (15.65 ± 0.78%) and macrophages (7.62 ± 0.86%) compared with the control group (19.53 ± 2.50%, 8.78 ± 1.15%, and 2.02 ± 0.12%, respectively) of the spleen cells. The contents of IFN-γ (36.56 ± 10.50 pg/ml), TNF-α (22.05 ± 4.93 pg/ml) and NO (30.28 ± 6.00 μM) levels in L-Arg group were also significantly higher than those of the control group (15.47 ± 4.96 pg/ml, 14.69 ± 0.81 pg/ml, and 6.57 ± 2.21 μM, respectively, in the spleen cell culture supernatant. **Conclusion**　L-Arg enhances T cell mediated immune response against tumor in the mice with experimental breast cancer.

Key words: L-arginine; breast cancer; T cell mediated immune response

近年来，乳腺癌已成为严重威胁中国妇女健康的疾病之一，乳腺癌发病率位居大城市女性肿瘤的第一位，而且发病呈年轻化趋势发展[1]。早发现、早诊断、早治疗会显著提高患者生存机会和生存质量[2]。L-精氨酸（L-arginine，L-Arg）作为成人的一种条件必需氨基酸，在某些生理或病理条件下，必须通过食物补充以满足机体的需要[3]。L-Arg 可被精氨酸酶 1 或诱导型一氧化氮合酶分别代谢为尿素和 L-鸟氨酸或一氧化氮（nitric oxide，NO）和 L-瓜氨酸[4]。据报道，人类乳腺癌细胞系可表达精氨酸酶，乳腺癌的发生与精氨酸的耗竭及机体的免疫抑制状态有关[5]，因此，本研究于 2012 年 8 月通过乳腺癌 4T1 荷瘤小鼠模型，采用流式细胞术、ELISA 和 Griess 反应检测 T 细胞及巨噬细胞的数量及功能，探讨 L-Arg 对乳腺癌的治疗效果及相关免疫机制，为开发预防或辅助治疗乳腺癌的新药提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料　6～8 周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自中科院上海实验动物中心。实验动物合格证号：2007000542390。

1.2　主要试剂　4T1 小鼠乳腺癌细胞株（中国科学院

* **基金项目：**辽宁省科学技术基金（2009412001-7）
作者单位：1. 中国医科大学附属第一医院体检中心，辽宁 沈阳 110001；2. 中国医科大学免疫学教研室
作者简介：张艳君（1970－），女，天津人，主管护师，本科，研究方向：抗肿瘤免疫。
数字出版日期：2014－3－12 9：22
数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140312.0922.012.html

上海细胞库)。L-Arg(美国 Sigma 公司);抗-CD3e-FITC(145-2C11)、抗-CD4-PE(H129.19)、抗-CD8α-PerCP(53 -6.7)(美国 BD Biosciences 公司);抗-F4/80-PerCP cy5.5(BM8)(美国 Ebiosciences 公司);TNF-α 和 IFN-γ ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.3　方法

1.3.1　实验分组及小鼠荷瘤模型制备　小鼠随机分为实验组(L-Arg 组)和对照组(PBS 组),每组 10 只。4T1 小鼠乳腺癌细胞(1×10^5)皮下注射至小鼠右侧,制备小鼠荷瘤模型。从可以触摸到肿瘤开始,实验组小鼠连续 20 d 给予灌胃 L-Arg(1.5 g/kg),对照组给予等量的 PBS。动态监测肿瘤生长:用卡尺测量肿瘤的长度(L)和宽度(W),根据下述式计算肿瘤体积:肿瘤体积(mm^3) = $1/2 \times L \times W^2$。

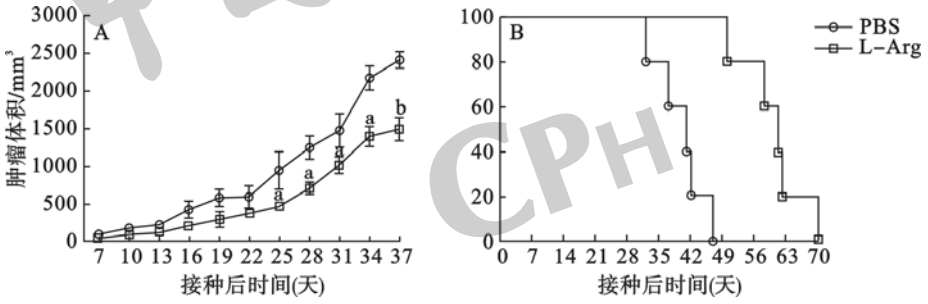
1.3.2　流式细胞术(FACS)检测　常规制备单细胞悬液,调整细胞浓度至 1×10^7/mL。取 0.1 mL 细胞悬液用于 FACS 检测。参照文献[6]进行抗体染色剂 FACS 检测。

1.3.3　ELISA 检测和 Griess 反应　参照文献[6]进行脾细胞培养并收集上清,根据相应 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)说明书检测 IFN-γ 和 TNF-α 的水平。同时采用 Griess 反应测定上清液中 NO 水平。

1.4　统计分析　数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。采用 Kaplan-Meyer 方法比较 2 组小鼠的生存期,通过 Student's t 检验比较两组之间差异。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　L-Arg 处理对 4T1 荷瘤小鼠生存期和肿瘤生长的影响　与 PBS 组相比,L-Arg 处理组小鼠肿瘤的生长明显受到抑制(图 1A)。同时,PBS 组小鼠接种 4T1 细胞后 32 ~47 d 全部死亡,而经 L-Arg 灌胃处理后,小鼠的生存期明显延长,在接种 4T1 细胞 51 d 后才开始死亡(图 1B)。



注:a $P < 0.005$;b $P < 0.001$。

图 1　L-Arg 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤大小和生存期的影响

2.2　L-Arg 处理对 4T1 荷瘤小鼠 T 细胞和巨噬细胞应答的影响　L-Arg 处理后,荷瘤小鼠脾脏的 $CD3^+CD4^+$ T 细胞和 $CD3^+CD8^+$ T 细胞的比例明显高于 PBS 对照组小鼠。同时,ELISA 结果也显示,L-Arg 处理组小鼠脾细胞培养上清中的IFN-γ 和 TNF-α 分泌水平也明显高于 PBS 对照组。

表 1　L-Arg 对 4T1 荷瘤小鼠 T 细胞和巨噬细胞及培养上清中炎症因子的影响

组别	$CD4^+$ T 细胞(%)	$CD8^+$ T 细胞(%)	IFN-γ(pg/ml)	TNF-α(pg/ml)	巨噬细胞(%)	NO_2^-(μm)
PBS	19.53 ±2.50	8.78 ±1.15	15.47 ±4.96	14.69 ±0.81	2.02 ±0.12	6.57 ±2.21
L-Arg	26.53 ±4.25[a]	15.65 ±0.78[a]	36.56 ±10.50[b]	22.05 ±4.93[b]	7.62 ±0.86 [b]	30.28 ±6.00[a]

注:a 与 PBS 组比较,$P < 0.05$;b 与 PBS 组比较,$P < 0.01$。

3　讨　论

尽管联合治疗手段不断创新,但乳腺癌的发病率仍在不断增加[7]。据报道,人类乳腺癌细胞系可表达精氨酸酶 I[5],通过消耗机体的 L-Arg,导致 T 细胞功能下降。而 L-Arg 作为一种条件必需氨基酸,当消耗大于产生能力时,必须通过食物补充以满足机体的需要。肿瘤的发生与机体的免疫功能低下密切相关。T 细胞免疫在抗肿瘤的过程中发挥不可替代的作用,$CD4^+$Th1 细胞和 $CD8^+$CTL 细胞是具有特异性抗肿瘤的关键效应细胞。与正常人相比,肿瘤患者往往表现为 T 细胞功能低下。L-Arg 的消耗能够诱导 T 细胞的低应答状态,降低 T 细胞的增殖和 CD3ζ 链的表达[8-9]。

$CD4^+$Th1 细胞通过分泌 IFN-γ 促进巨噬细胞的活化。一方面,活化的巨噬细胞可提呈肿瘤抗原给 T 细胞,进一步促进 T 细胞活化,杀伤肿瘤细胞[10]。另一方面,巨噬细胞作为效应细胞还可释放出高浓度的 NO 发挥肿瘤杀伤作用[11]。研究表明,高水平 NO 可以增强凋亡相关基因和抗致癌基因的表达水平[12]。膳食补充精氨酸可通过增加分泌 NO 而增强 NK 细胞活性,从而抑制结肠癌的发展[13]。本实验结果显示,给予 L-Arg 后,巨噬细胞的比例以

及 NO 的分泌水平均明显升高。此外,NO 的产生也可能是 L-Arg 经 iNOS 代谢的结果。因此,本研究进一步证实膳食补充 L-Arg 可作为乳腺癌的有效辅助治疗手段,其通过上调宿主的 T 细胞免疫应答,促进 NO 的产生,发挥抗肿瘤效应。

参考文献

[1] 郑艳敏,沈月平,刘银梅,等. 中国女性乳腺癌危险因素 Meta 分析[J]. 中国公共卫生,2012,28(12):1645 - 1648.

[2] 刘丽媛,贾存显,余之刚,等. 女性人群乳腺癌相关知识及影响因素分析[J]. 中国公共卫生,2009,25(10):1275 - 1276.

[3] Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, et al. Sepsis: an arginine deficiency state[J]. Crit Care Med, 2004, 32(10): 2135 - 2145.

[4] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5: 641 - 654.

[5] Singh R, Pervin S, Karimi A, et al. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-l-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells[J]. Cancer Res, 2000, 60: 3305 - 3312.

[6] Feng Y, Zhu X, Wang Q, et al. Allicin enhances host pro-inflammatory immune responses and protects against acute murine malaria infection[J]. Malar J, 2012, 11: 268.

[7] Barron JJ, Quimbo R, Nikam PT, et al. Assessing the economic burden of breast cancer in a US managed care population[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2008, 109: 367 - 377.

[8] Rodriguez PC, Zea AH, DeSalvo J, et al. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes[J]. J Immunol, 2003, 171: 1232 - 1239.

[9] Zea AH, Rodriguez PC, Culotta KS, et al. L-arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes[J]. Cell Immunol, 2004, 232: 21 - 31.

[10] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting[J]. Immunity, 2004, 21: 137 - 148.

[11] Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumor progression[J]. Nature Reviews Cancer, 2006, 6: 521 - 534.

[12] Yin XY, Jiang JM, Liu JY, et al. Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice[J]. World Journal of Gastroenterology, 2007, 13: 6249 - 6253.

[13] Yeh CL, Pai MH, Li CC, et al. Effect of arginine on angiogenesis induced by human colon cancer: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2010, 21: 538 - 543.

收稿日期:2013-12-12　　(韩仰欢编辑　张翠校对)

· 实验研究 ·

中药对老年痴呆症小鼠干预作用*

何胜,黄杰林,李佩蕾,王亚威,黄炳臣,张树球,梁伟江,郭海艳

摘　要:目的　建立铝致老年痴呆症(AD)小鼠模型,探讨中药干预效果及机制。**方法**　小鼠给予氯化铝水溶液拌饲料喂养建立 AD 模型,实验设对照组、模型组、抗痴 1、2、3 号组($n=6$)。采用水迷宫试验测定小鼠记忆力变化,处死小鼠取大脑,分别测定乙酰胆碱酯酶(AchE)、丙二醛(MDA)、铝含量、超氧阴离子自由基($O^{\cdot-}_2$)清除率,观察大脑病理改变。**结果**　水迷宫实验结果显示,与对照组比较,模型组小鼠错误率明显升高;与模型组比较,抗痴 1、2 号组小鼠错误率明显下降($P<0.05$);对照组、模型组、抗痴 1、2、3 号组 AchE 活性分别为(0.829 ± 0.095)、(0.399 ± 0.093)、(0.758 ± 0.025)、(0.700 ± 0.086)、(0.418 ± 0.066) U/mg·prot,与对照组比较,模型组小鼠脑组织 AchE 活性下降,与模型组比较,抗痴 1、2 组小鼠脑组织 AchE 活性升高($P<0.01$);与对照组比较,模型组小鼠脑组织 $O^{\cdot-}_2$ 清除率[(16.61 ± 1.49)%]下降,与模型组比较,抗痴 1、2 号组小鼠脑组织 $O^{\cdot-}_2$ 清除率[分别为(20.54 ± 1.93)%、(19.62 ± 1.63)%]明显升高($P<0.05$);模型组小鼠脑组织铝含量明显高于对照组,与模型组比较,抗痴干预各组小鼠脑组织中铝含量明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$);病理观察可见模型组小鼠脑神经细胞减少、神经元变性等损伤现象,抗痴干预组脑组织病理改变较轻。**结论**　铝可致小鼠记忆认知能力障碍,大脑乙酰胆碱酯酶活性下降、抗氧化能力降低,中药可明显改善铝致小鼠神经毒性作用。

关键词:铝;老年痴呆症(AD);乙酰胆碱酯酶(AchE);抗氧化能力

中图分类号:R 995　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2014)04-0448-03　DOI:10.11847/zgggws2014-30-04-20

Therapeutic effect of traditional Chinese medicine on Alzheimer's disease in mice

HE Sheng, HUANG Jie-lin, LI Pei-lei, et al (*Heavy Metals and Fluoride Arsenic Toxicology Laboratory, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise, Guangxi Zhuang Automous Region* 533000, China)

Abstract: Objective　To establish an aluminum-induced Alzheimer's disease model in mice and to explore therapeutic effect of traditional Chinese medicine treatment on the disease. **Methods**　The mice were treated with the feed

* **基金项目**:广西自然科学基金(桂科自 0991282;桂科自 0499013);校创新项目(XJACX201301)

作者单位:右江民族医学院重金属与氟砷毒物研究实验室,广西 百色 533000

作者简介:何胜(1962 -),男,壮族,广西靖西人,讲师,学士,研究方向:环境毒理学及解毒作用。

通讯作者:黄杰林,E-mail:sqzhang224@163.com

数字出版日期:2014 - 3 - 12 9:23

数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140312.0923.013.html