

·论 著·

[文章编号]1000-8861(2012)05-0389-05

人参皂甙 Rg3 抗小鼠 Lewis 肺癌的机制研究

柯仕忠 刘 瑶[△] 金浩杰 黄晶晶 黄 璐 黄 英 王逸难 高丰光*

[摘要] 目的 以小鼠 Lewis 肺癌为肿瘤模型探讨人参皂甙 Rg3 抗肿瘤机制。方法 以肺癌细胞系 LLC 荷瘤 C57/BL 小鼠建立小鼠肺癌模型,随机分为人参皂甙 Rg3 组、阳性药顺铂组和模型组,分别给予人参皂甙 Rg3、顺铂和生理盐水,同时设立空白对照组。以肿瘤质量、抑瘤率观察人参皂甙 Rg3 的抗肿瘤效果;以流式细胞术测定脾脏 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞数量及比值;以 Elispot 技术检测机体肿瘤抗原特异性 CTL 的诱生情况;以肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数判定人参皂甙 Rg3 的毒副作用。结果 人参皂甙 Rg3 组抑瘤率高于顺铂组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。生理盐水组小鼠脾脏 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞百分率比正常小鼠低,而人参皂甙 Rg3 组和顺铂组高于生理盐水组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。人参皂甙 Rg3 组肿瘤特异性 IFN- γ 斑点数明显增多,与生理盐水组相比具有统计学差异($P<0.05$)。顺铂组脾脏无肿瘤特异性 IFN- γ 斑点出现。和模型组相比较,人参皂甙 Rg3 组小鼠肝脏、脾脏、胸腺指数无明显差异,而顺铂组的肝脏、脾脏、胸腺指数低于人参皂甙 Rg3 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 LLC 细胞荷瘤小鼠具有明显的免疫抑制现象,人参皂甙 Rg3 可显著增加脾脏 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞阳性率并促进肿瘤特异性 CTL 细胞诱生,人参皂甙 Rg3 无肝脏、胸腺、脾脏毒性。

[关键词] 人参皂甙 Rg3 肺癌 免疫治疗 机制

[中图分类号] R392.5

[文献标识码] A

The anti-tumor mechanism of Ginsenoside Rg3 in murine Lewis lung carcinoma model

KE Shizhong, LIU Yao, JIN Haojie, HUANG Jingjing, HUANG Lu, HUANG Ying, WANG Yinnan, GAO Fengguang

Department of Immunology, Basic Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] To investigate antitumor mechanisms and toxicity of ginsenoside Rg3, C57BL/6 mice implanted with Lewis lung cancer cells were further administrated with ginsenoside Rg3, cisplatin, and physiological saline water respectively. Then the antitumor effect, mechanisms and toxicity were determined by tumor inhibition rate, flow cytometry, Elispot and organ index respectively. The results showed that tumor inhibition rates of cisplatin and ginsenoside Rg3 groups were 20.77% and 47.88%, respectively. Tumor implantation could decrease CD4⁺T and CD8⁺T percentages of splenocytes from (20.60±1.196)% and (13.36±0.926)% to (11.79±0.3256)% and (6.278±0.263)%, respectively. Both ginsenoside Rg3 and cisplatin administrations could reverse the decrease of CD4⁺T and CD8⁺T cells induced by tumor implantation. Contrast to physiological saline water, ginsenoside Rg3 could obviously increase IFN- γ spots number from 4.000±0.3162 to 11.40±3.487, while cisplatin administration could not achieve any IFN- γ spots. Importantly, cisplatin administration induced obvious toxicities and result in decreased indexes of liver, spleen and thymus, while the ginsenoside Rg3 treatment did not. All the results suggested that ginsenoside Rg3, which had no obviously liver, spleen and thymus toxicity effects, could obviously inhibit LLC tumor formation by enhancing both CD4⁺T and CD8⁺T cell percentages and promoting tumor specific CTL priming.

[Key words] Ginsenoside Rg3 Lung carcinoma Immune therapy Mechanism

随着空气污染的不断加重和烟草的滥用,肺癌已成为我国首位恶性肿瘤死亡原因,占全部恶性肿瘤死亡的 22.7%,是预后最差的恶性肿瘤之一^[1]。化疗是治疗肺癌的重要方法,在杀灭肿瘤细胞的同时,也因造成骨髓抑制、重要脏器损害、抑制免疫功能等而影响化疗

的继续进行。肿瘤免疫治疗通过激发或调动免疫系统,增强抗肿瘤免疫力而杀伤肿瘤细胞,具有化疗无以比拟的优势。已有文献报道,人参活性成分人参皂甙 Rg3 通过抑制肿瘤血管内皮细胞增殖及新生血管形成^[2-3]、促进细胞凋亡^[4-5]、抑制肿瘤侵袭和转移^[6-8]而发挥抗肿瘤效应。张会来等^[9]虽发现人参皂甙 Rg3 可用于干细胞移植后免疫功能重建,具有逆转肿瘤诱发的多药耐药效应,但并不清楚人参皂甙 Rg3 对杀伤肿瘤的重要效应细胞 CTL 的功能影响,限制其在临床的广泛应用。

基金项目 海峡中医药平台(厦门)项目(3502Z20100006) 厦门市自然科学基金(3502Z20104002)

作者单位 361005 厦门大学医学院基础医学部免疫学教研室

*通信作者 高丰光 Tel 0592-2186335 E-mail gffengguang@xmu.edu.cn

[△]共同第一作者

本实验以Lewis肺癌细胞系 LLC 荷瘤小鼠以建立小鼠肺癌模型,以化疗药顺铂为对照,观察人参皂甙 Rg3 的抗癌效果、增强 CD4⁺、CD8⁺T 细胞情况及对抗原特异性 CTL 诱生情况影响,并以肝脏指数、脾脏指数、胸腺指数评估人参皂甙 Rg3 的毒副作用,为临床广泛应用人参皂甙 Rg3 治疗肿瘤提供理论基础和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞系 肺癌 LLC(Lewis Lung Carcinoma)细胞系来源于 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌(ATCC CRL-1642),购自中国科学院上海细胞生物所细胞库。LLC 细胞以 DMEM 培养基培养 (Dulbecco's modified Eagle's medium 4 mmol/L L-glutamine,1.5 g/L sodium bicarbonate 4.5 g/L glucose,10% FBS) 在 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 动物 雌性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体质量 (20±2) g 购于中国科学院上海分院斯莱克动物中心,由厦门大学医学院 SPF 级实验动物中心饲养。本研究得到厦门大学医学院伦理委员会批准。

1.3 实验材料 人参皂甙 Rg3: 购自吉林亚泰制药股份有限公司 (国药准字 Z20030044),每粒含人参皂甙 Rg3 10 mg。顺铂 Cis-Diammineplatinum: 购自 Sigma 公司(货号 P4394)。小鼠 IFN- γ 酶联免疫斑点检测试剂盒(Enzyme-linked Immunospot Assay,Elispot)、红细胞裂解液裂解自 U-CyTech Biosciences 公司(Utrecht, Netherlands)。异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) 标记的抗鼠 CD4 抗体,购自 eBioscience 公司 (California USA)。藻红蛋白 (Phycoerythrin PE) 标记的抗鼠 CD8 抗体,购自 eBioscience 公司(San Diego USA)。

1.4 建立小鼠 Lewis 肺癌模型及给药 以胰酶(0.25 g 胰酶 0.9 g NaCl 0.02 g EDTA,调节 pH 8,过滤)消化法收集 DMEM 培养基培养的 LLC 细胞,调整细胞数为 2×10⁷/ml。以 2×10⁶ 细胞经皮下荷瘤 C57BL/6 小鼠。无菌取小鼠 Lewis 肺癌组织,剪碎、研磨、过滤后,制成瘤细胞悬液,调整细胞数为 1×10⁷/ml 以 2×10⁶ 细胞经皮下荷瘤 48 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠,同时设立空白对照组,即未荷瘤小鼠。荷瘤次日,人参皂甙 Rg3 组按 0.16 mg/20 g 灌胃给药剂量、顺铂组按 0.1 mg/20 g 腹腔给药、空白组与模型组以等量生理盐水灌胃,每天 1 次,连续 14 d。末次给药 24 h 后,处死小鼠,取瘤称质量;以流式细胞术检测脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞;以 Elispot 检测肿瘤抗原特异性 CTL。

1.5 流式细胞术 小鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞测定参照

相关文献报道方法以流式细胞术进行^[10]。无菌取各组小鼠脾脏,制成单细胞悬液后,以红细胞裂解液裂解红细胞后细胞计数,按每孔 2×10⁵ 个细胞加入到 96 孔板中,离心 1 200 r/min 5 min 弃上清,用 PBS 重悬细胞,加入带有荧光标记的 CD4 和 CD8 抗体 0.25 μ g/10⁵ 细胞,混匀,冰上孵育 30 min,经 PBS 洗涤 1 次后,用 PBS 重悬细胞,用流式细胞仪检测。

1.6 IFN- γ ELISPOT 检测 脾脏细胞中分泌 IFN- γ 的 CTL 细胞数检测参考文献报道和试剂盒说明书方法进行^[10]。取各实验组小鼠脾脏,研碎后取细胞悬液,离心 1 500 r/min 5 min。加红细胞裂解液裂解 3~5 min,离心 1 500 r/min 5 min 弃上清,显微镜下计数细胞,按 1×10⁵ 细胞/孔加入封闭后的 Millipore 培养板(板底披覆 PVDF 膜,结合特异性抗体),37 °C 加 LLC 肿瘤细胞裂解液刺激培养 16~20 h,再加入无菌双蒸水 4 °C 10 min 以裂解细胞,经 PBST(0.5% tween20 in PBS)充分洗涤 10 次后,加入检测缓冲液稀释的检测抗体,37 °C 孵育 1 h,经 PBST 充分洗涤 5 次,再加入检测缓冲液稀释的酶标抗体并 37 °C 孵育 1 h 后,以 PBST 充分洗涤 5 次后加入底物 AEC 室温静置显色 15~45 min,待斑点生长到合适的大小后,以蒸馏水洗涤 6 次以终止显色过程。抗原特异性 CTL 受抗原刺激后释放 IFN- γ 所产生的特异性 IFN- γ 斑点,待膜干燥后,经 Bioscience Bioreader 3000 酶联免疫斑点读数仪计数。

1.7 肿瘤生长抑制率及脏器指数的计算方法 各组小鼠连续给药 14 d 后,模型组小鼠取出肿瘤,计算平均瘤质量,将模型组小鼠的平均瘤质量减去各给药组小鼠的瘤质量再除以模型组小鼠的平均瘤质量,即为给药各组小鼠的肿瘤生长抑制率,公式如下: 肿瘤生长抑制率(%)=[模型组瘤质量(g)-给药组瘤质量(g)]÷模型组瘤质量(g)×100%。各组小鼠连续给药 14 d 后,取出各组小鼠的肝脏、脾脏、胸腺称质量,将各脏器的质量除以对应小鼠的体质量,即为脏器指数,公式如下: 脏器指数(mg/10 g)=脏器质量(mg)/体质量(10 g)。

1.8 统计分析 本文数据用均数±标准差表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验分析,显著性检验标准为 P<0.05。

2 结果

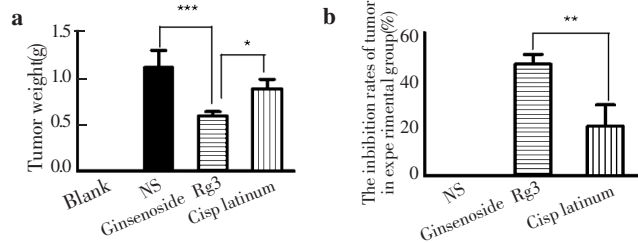
2.1 人参皂甙 Rg3 具有抗小鼠 Lewis 肺癌作用 以 LLC 细胞荷瘤小鼠次日给予生理盐水、人参皂甙 Rg3 或顺铂处理,各组肿瘤质量分别为 1.118 g、0.593 g 和 0.885 g(表 1)。人参皂甙 Rg3 和顺铂具有明显的抗肿瘤效应(图 1a),其肿瘤抑制率分别为 20.77%、47.88%(图 1b),人参皂甙 Rg3 组与顺铂相比较,具有明显的统计学差异(P<0.05)。

表 1 各组小鼠的瘤质量

Tab 1 Tumor weight of each group (g)

Blank	NS	Ginsenoside Rg3	Cisplatinum
0.00	1.118±0.1796	0.593±0.0462 ^b	0.885±0.1008 ^a

a) $P < 0.05$, Ginsenoside Rg3 compared with Cisplatinum ; b) $P < 0.001$, NS compared with Ginsenoside Rg3.



a) Tumor weight of every group ; b) tumor inhibition rates of ginsenoside Rg3 and cisplatinium. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

图 1 人参皂甙 Rg3 对小鼠 Lewis 肺癌具抑制作用

Fig 1 Antitumor effects of ginsenoside Rg3 in murine LLC tumor model

2.2 人参皂甙 Rg3 显著拮抗 LLC 荷瘤所致的 T 淋巴细胞减少

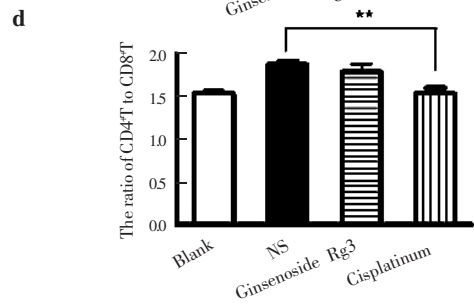
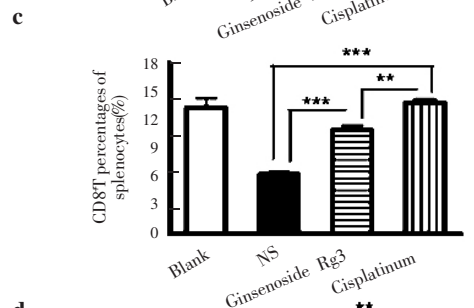
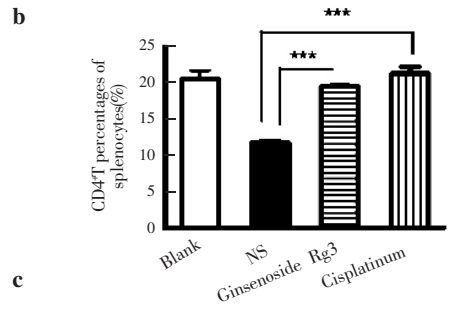
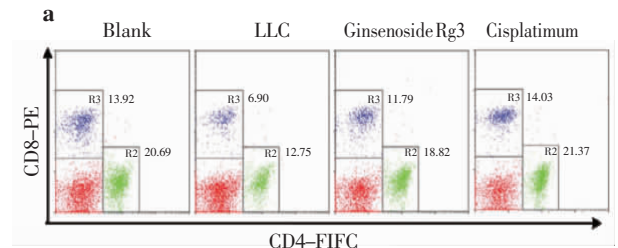
以 LLC 细胞荷瘤小鼠并予人参皂甙 Rg3、顺铂或生理盐水处理，流式细胞术检测脾脏脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞阳性率以观察人参皂甙 Rg3 是否可改善 LLC 荷瘤所致的脾脏 T 淋巴细胞减少，结果发现：正常小鼠脾细胞中 CD4⁺、CD8⁺T 细胞阳性率分别为 20.6%和 13.36%，当 LLC 荷瘤小鼠后 CD4⁺、CD8⁺T 细胞阳性率分别为 11.79%和 6.278%(表 2) 提示 LLC 荷瘤明显降低 T 细胞比例($P < 0.05$)；人参皂甙 Rg3 和顺铂处理可明显增加荷瘤小鼠脾脏 CD4⁺、CD8⁺T 细胞阳性率 差异具有统计学意义($P < 0.05$)，提示人参皂甙 Rg3 和顺铂的抗肿瘤效应通过逆转荷瘤小鼠所致的 T 淋巴细胞减少而实现(图 2b、2c)。与空白组相比较 单纯荷瘤小鼠脾脏 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值明显高于空白组，提示小鼠荷瘤所致的淋巴细胞减少以 CD8⁺T 细胞减少最为明显；人参皂甙 Rg3 而不是顺铂可明显提高小鼠脾细胞 CD4⁺/CD8⁺T 细胞比值 提示人参皂甙 Rg3 而非顺铂可更有效改善荷瘤所致的 CD4⁺ T 淋巴细胞减少(图 2d)。

表 2 各组小鼠 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞百分数

Tab 2 CD4 and CD8 positive T cells percentages of splenocytes of each group (%)

T cell subsets	Blank	NS	Ginsenoside Rg3	Cisplatinum
CD4 ⁺ T ^a	20.60±1.196	11.79±0.3256	19.59±0.2712	21.40±0.8770
CD8 ⁺ T ^b	13.36±0.926	6.278±0.263	10.97±0.4645	13.87±0.1995

a) $P < 0.001$, blank compared with NS ,NS compared with ginsenoside Rg3 , NS compared with cisplatinium; b) $P < 0.001$, NS compared with Ginsenoside Rg3 ,NS compared with Cisplatinium.



a) Histogram presentation of CD4⁺ T and CD8⁺ T detected by FACS b) ginsenoside Rg3-enhanced CD4⁺ T percentages of splenocytes ; c) ginsenoside Rg3-enhanced CD8⁺ T percentages of splenocytes ; d) the ratio of CD4⁺ T to CD8⁺ T in splenocytes. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

图 2 人参皂甙 Rg3 显著逆转 LLC 荷瘤所致的 T 细胞减少
Fig 2 Reverse of LLC implantation-induced lymphocyte decrease by ginsenoside Rg3

2.3 人参皂甙 Rg3 明显增加 LLC 抗原特异性 CTL 诱生

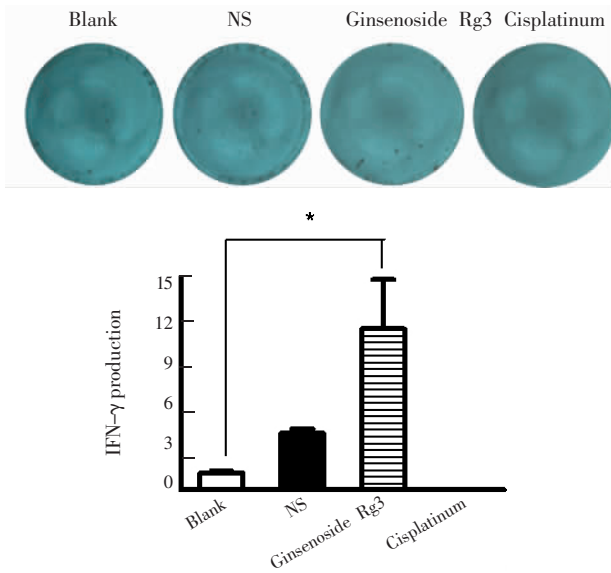
以 LLC 细胞裂解物刺激小鼠脾细胞 Elispot 技术检测脾脏 LLC 抗原特异性 CTL 的诱生情况，结果发现 顺铂处理小鼠无特异性 CTL 斑点出现，生理盐水组和人参皂甙 Rg3 治疗组均出现 LLC 抗原特异性的 CTL 斑点(圆形的斑点，有斑晕，圆点中心较深向四周淡开)(表 3 图 3a)；与空白组和生理盐水组相比较，人参皂甙 Rg3 灌胃可明显提高机体对肿瘤抗原 LLC 细胞的应答能力，差异有统计学意义($P < 0.05$ 图 4b) 提示人参皂甙 Rg3 通过增强机体产生抗原特异性 CTL 诱生能力而发挥抗肿瘤效应。

表3 各组小鼠的CTL产生情况

Tab 3 Production of CTL of each group

Blank	NS	Ginsenoside Rg3	Cisplatinum
1.200±0.2000 ^a	4.000±0.3162	11.40±3.487	0.00

a) $P < 0.05$, compared with Ginsenoside Rg3.



* $P < 0.05$.

图3 人参皂甙 Rg3 显著提高抗原特异性 CTL 诱导

Fig 3 Ginsenoside Rg3-induced tumor specific CTL in LLC implantation model

2.4 人参皂甙 Rg3 对小鼠无明显毒副作用 以 LLC 细胞荷瘤小鼠次日给予生理盐水、人参皂甙 Rg3 或顺铂处理 实验结束 取小鼠肝脏、脾脏、胸腺称重并计算各脏器指数(表 4) 人参皂甙 Rg3 组和生理盐水组小鼠的肝脏、脾脏、胸腺指数无明显差异,说明人参皂甙 Rg3 对实验组小鼠无明显的毒性作用,而顺铂组的肝脏、脾脏、胸腺指数低于人参皂甙 Rg3 组 差异具有统计学意义($P < 0.05$) 说明化疗药顺铂对肝脏、脾脏、胸腺有一定的毒性(图 4)。

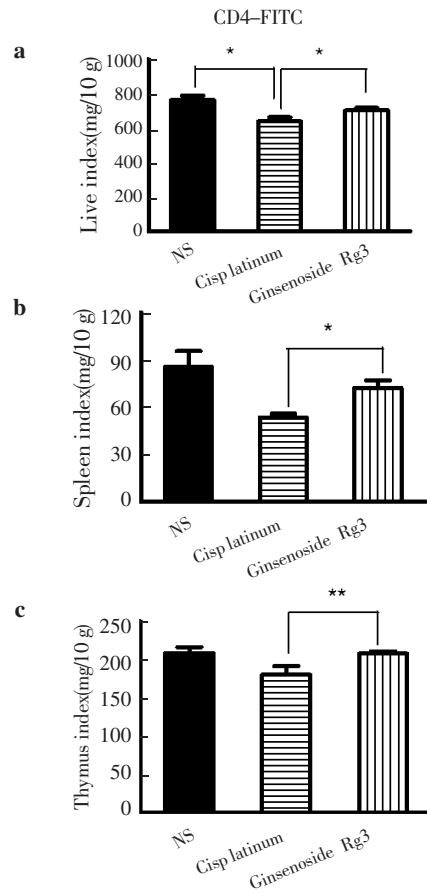
表 4 各组小鼠脏器数

Organ index	NS	Ginsenoside Rg3	Cisplatinum
Liver index	765.7±24.80	703.7±15.19	640.4±24.42
Spleen index	93.84±15.06	72.35±4.587	53.37±2.366
Thymus index	208.1±8.067	207.7±2.898	180.0±11.39

3 讨论

肺癌为发展中国家恶性肿瘤死亡率的第 1 位肿瘤 尽管常规治疗方法如手术治疗、化疗、放疗取得了较大改进 但肺癌 5 年生存率仍较低^[1] 且化疗对复发

患者的有效率不足 25%^[12] 化疗和放疗在杀死癌细胞的同时也对机体正常细胞产生损害,且化疗和放疗也易导致肿瘤细胞耐药性的产生而降低化疗和放疗效果。肿瘤免疫治疗是通过调节癌患病入自身机体免疫功能而发挥抗肿瘤效应,从而控制和杀伤肿瘤细胞 具有放疗和化疗无法比拟的优越性,也成为继手术、化疗和放疗之后的有效治疗方法。



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. a) liver index; b) spleen index; c) thymus index.

图 4 脏器指数结果图

Fig 4 The results of organ index

抗血管生成是目前肿瘤治疗研究中最活跃的领域之一 血管生长抑制剂人参皂甙 Rg3 是中药人参中的一种单体成分,体内和体外实验均已证实人参皂甙 Rg3 具有确切的抑制肿瘤血管生成的作用,对多种动物移植性实体瘤具有抑制作用^[4-5,13]。CD8⁺T 细胞 特别是抗原特异性 CD8⁺CTL 是机体抗肿瘤的主要效应性 T 细胞 通过释放穿孔素、颗粒酶和 FasL 介导的凋亡途径而发挥抗肿瘤效应。人参皂甙 Rg3 虽可抑制肿瘤血管生成,但其抗肿瘤效应是否通过调节机体免疫特别是 CTL 诱导尚未见文献报道。

本研究以 Lewis 肺癌为肿瘤模型 通过荷瘤小鼠,着重研究人参皂甙 Rg3 对已形成的肿瘤的治疗作用,

系统研究了人参皂甙 Rg3 的抗肿瘤效应、抗肿瘤的免疫机制及可能存在的潜在毒副作用。LLC 细胞荷瘤可成功在小鼠体内建立小鼠肺癌模型, 人参皂甙 Rg3 和化疗药顺铂均具有明显的抗 LLC 肺癌的作用, 尤以人参皂甙 Rg3 的抗肿瘤效果为佳(表 1 图 1)。LLC 荷瘤实验发现, LLC 肺癌细胞可明显降低脾脏细胞中 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞阳性率, 尤以对 CD8⁺T 细胞抑制作用为甚; 虽然人参皂甙 Rg3 和顺铂的使用均可逆转 LLC 肺癌所致的脾脏 T 淋巴细胞的减少(图 2b 2c), 但人参皂甙 Rg3 可更有效改善荷瘤所致的 CD4⁺T 淋巴细胞减少(图 2d)。以 LLC 细胞裂解物刺激脾细胞 ELISPOT 检测肿瘤抗原特异性 CTL 的诱生情况, 发现人参皂甙 Rg3 可显著提高机体对 LLC 肺癌的 CTL 应答能力(图 3)。药物对机体毒副作用的指标肝脏指数、胸腺指数、脾脏指数的检测则发现, 化疗药顺铂具有一定的机体毒副作用。与化疗药顺铂相比较, 人参皂甙 Rg3 具有较轻的机体毒性。

肿瘤浸润淋巴细胞包括介导抗肿瘤作用的 CD8⁺CTL、固有免疫的 NK 细胞, 也包括介导肿瘤微环境免疫抑制的调节性 T 细胞等组分。本研究虽然对荷瘤小鼠脾脏 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞数量及比值进行测定, 也检测了脾脏中肿瘤抗原特异性 CTL 的诱生情况, 以观察人参皂甙 Rg3 对肿瘤荷瘤所致的免疫抑制作用的逆转效果, 但并未涉及肿瘤浸润淋巴细胞的组分变化及功能, 也未涉及对调节性 T 细胞的影响。鉴于肿瘤荷瘤所致的免疫抑制机理的复杂性, 人参皂甙 Rg3 对肿瘤浸润淋巴细胞中抗肿瘤的效应细胞及介导免疫抑制的调节性 T 细胞数量和功能的影响, 尚有待于我们进一步的深入研究。顺铂虽可明显增加荷瘤小鼠脾脏 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的数量, 但 ELISPOT 检测却无 LLC 抗原特异性的 CTL 斑点的现象提示, 顺铂在杀伤肿瘤细胞逆转肿瘤荷瘤所致的 T 细胞减少的同时, 可能通过抑制 CTL 释放 IFN- γ 而对 CTL 发生功能产生了影响。

人参皂甙 Rg3 可明显提高小鼠非特异性免疫功能和特异性(包括细胞免疫和体液免疫)免疫功能的作用, 其作用强度与剂量有一定关系^[14]。CD8⁺CTL 是介导肿瘤杀伤的主要靶细胞, 但 CD4⁺T 细胞对记忆性 CTL 杀伤肿瘤具有重要作用^[10], 只有 CD4⁺/CD8⁺比值正常时, 才能发挥正常的免疫作用^[15]。本研究发现, 人参皂甙 Rg3 不仅可有效增强 CTL 的诱生能力(图 3), 而且可有效逆转肿瘤所致的 CD4⁺T 淋巴细胞减少, 提高 CD4⁺/CD8⁺比值, 提示人参皂甙 Rg3 可能通过增加 CD4⁺T 细胞数量而辅助 CTL 释放 IFN- γ 发挥抗肿瘤效应。但人参皂甙 Rg3 是否可增强树突状细胞等抗原提呈细胞表达共刺激分子而增强 C

TL 应答能力, 是否直接调控 CTL 的功能也有待于进一步的深入研究。鉴于人参皂甙 Rg3 具有比化疗药顺铂更轻的毒副作用和更好的抗肿瘤效应, 人参皂甙 Rg3 在临床肺癌治疗中具有更广阔的应用价值。

【参考文献】

- [1] Belinsky SA, Liechty K C, Gentry FD, et al. Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6):3338-3344.
- [2] 刘静. 中药抗小鼠 Lewis 肺癌实验研究进展[J]. *中国中医药信息杂志*, 2009, 16(1): 112-116.
- [3] 秦志丰, 魏品康, 许玲, 等. 中药消痰散结方联合 NP 方案治疗中晚期非小细胞肺癌 33 例[J]. *中医杂志*, 2007, 48(9): 822-823.
- [4] 李利亚, 唐劲天, 李佩文. 中药抗肿瘤血管生成的实验研究进展[J]. *医学理论与实践*, 2004, 17(2): 152-154.
- [5] 高勇, 王杰军, 许青. 人参皂甙 Rg3 抑制肿瘤新生血管形成的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(1):40-42.
- [6] 杨威, 李博, 乔世兴, 等. GS-Rg3 抗鼠源性膀胱癌 BBT739 黏附、侵袭和肺转移作用的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2005, 25(5): 571-573.
- [7] 刘基巍, 陈俊霞, 于丽华, 等. GS-Rg3 和核糖核酸酶抑制因子转基因对小鼠黑色素瘤的抑制作用研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(12): 722-725.
- [8] 刘基巍, 赵翌, 富力, 等. PCNA、P16、MM P9 在 GS-Rg3 抗肝癌淋巴道转移中的表达及意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2004, 9(3): 225-228.
- [9] 张会来, 王华庆, 姚智, 等. GS-Rg3 促进同系小鼠外周血干细胞移植后免疫恢复研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2005, 25(5): 431-434.
- [10] Gao FG, Khammanivong V, Liu WJ, et al. Antigen-specific CD4⁺ T-cell help is required to activate a memory CD8⁺ T cell to a fully functional tumor killer cell [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6438-6441.
- [11] Karanikas V, Germenis A. Tumor specific CD8⁺ T cells in patients with lung cancer and healthy individuals [J]. *J BUON*, 2009, 14(Suppl 1):S153-S157.
- [12] Bunn PA Jr, Thatcher N. Systemic treatment for advanced (stage IIIb/IV) non-small cell lung cancer: more treatment options; more things to consider conclusion [J]. *Oncologist*, 2008, 13(Suppl 1):37-46.
- [13] 潘子民, 叶大风, 谢兴, 等. 人参皂甙 Rg3 对荷瘤卵巢癌的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(4):227-230.
- [14] 王庭富, 孟正木. 人参皂甙 Rg3 对免疫功能的影响[J]. *中国药科大学学报*, 1999, 30(2): 133-135.
- [15] 张清仲, 符林春, 岑玉文, 等. 广东 HIV/AIDS 患者舌象分析及其与 CD4、CD8、CD4/CD8 计数的相关性研究[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(4):325-328.

(收稿日期 2011-11-23 修回日期 2011-12-28)

(编辑 侯瑞)