中国肿瘤生物治疗杂志 Chin J Cancer Biother 2002 Sep; 9(3): 172~174

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0172-03

三氧化二砷对 H22 肝癌荷瘤小鼠免疫功能及瘤体的影响

唐印华[1], 刘铁夫[1], 庄丽维[1], 田永刚[2], 梁 桃[1], 马占军[1](1. 哈尔滨医科大学第一临床医学院消化内科, 哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨市血液肿瘤研究所 肿瘤外科)

[摘 要] **目的:** 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对 H22 肝癌荷瘤小鼠免疫功能的影响及实体瘤生长情况。**方法:** 利用流式细胞仪及改进的 MTT 还原法分别对正常小鼠、荷瘤小鼠对照组、荷瘤小鼠 As_2O_3 治疗组进行 T 细胞亚群及 NK 细胞活性(NKCA)的测定,并比较各组瘤重,计算瘤重抑制率。**结果:** 肝癌小鼠荷瘤对照组与正常组比较,$CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ 及 NKCA 均明显减少($P<0.01$);低剂量及高剂量 As_2O_3 治疗组与荷瘤对照组比较,$CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$ 及 NKCA 均明显升高($P<0.05$),$CD8^+$ 无明显变化;而高剂量 As_2O_3 治疗组与低剂量 As_2O_3 治疗组比较,$CD4^+$, NKCA 明显升高($P<0.05$),$CD3^+$, $CD4^+/CD8^+$ 无明显变化。治疗组瘤重抑制率分别为 39.12%, 45.74%, 病理观察可见间质内大量炎症细胞浸润。**结论:** AS_2O_3 能抑制实体肿瘤的生长,提高肝癌小鼠的免疫功能,这是一值得继续研究的临床课题。

[关键词] 荷瘤小鼠; 三氧化二砷; 肝癌; T 细胞亚群; NK 细胞活性

[中图分类号] R979.1 [文献标识码] A

The Immune Effects and Solid Tumor Growth of Arsenic Trioxide on Experimental H22 Hepatoma-Bearing Mice

TANG Yin-hua, LIU Tie-fu, ZHUANG Li-wei, TIAN Yong-gang, LIANG Tao, MA Zhan-jun (Department of Digestive, First Affiliated Hospital, Haerbin Medical University, Haerbin, 150001, China)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the immune effects and the solid tumor growth of arsenic trioxide on experimental H22 Hepatoma-bearing mice. **Methods**: T lymphocyte subsets and NKcells activity were assessed by flow cytometry and improved MTT assay. Calculate the tumor inhibitory rates. **Results**: The percentage of $CD3^+$ cells and $CD4^+$ cells, the ratio of $CD4^+$ cells to $CD8^+$ cells, the activity of NK cells in the tumor control group were markedly lower ($P<0.01$) than those in the healthy control group. However, they were significantly higher in the tumor treatment than in the tumor control group. There was a higher percentage of $CD4^+$ and NKCA in arsenic trioxide treatment group at high dosage than that at low dosage ($P<0.05$). The tumor inhibitory rates were 39.12% and 45.74% separately. A lot of inflammatory cells could be seen under optic microscopy. **Conclusion**: Arsenic trioxide can obviously increase the immune function of H22 Hepatoma-bearing mice and inhibit the growth of tumor body.

[**Key words**] tumor bearing mice; arsenic trioxide; liver cancer; T lymphocyte subsets; NK cells activity

* 三氧化二砷是中药砒霜的主要有效成分,长期以来被认为是一种致癌剂,能抑制细胞 DNA 和 RNA 的合成,干扰细胞代谢,致染色体畸变[1]。近年来研究证明,As_2O_3 对急性早幼粒细胞性白血病(APL)具有显著疗效[2],而且能抑制多种体外培养的人实体瘤细胞的生长及裸鼠移植瘤的成瘤性[3-4]。国内外许多学者相继进行了诸多的临床与基础方面的研究,但是有关 As_2O_3 对人实体瘤细胞诱导作用的研究多注重探讨其细胞凋亡生物学效应及分子机制[5]。目前有人推测,As_2O_3 有可能提高肿瘤机体的免疫功能。我们通过研究 As_2O_3 对 H22 肝癌荷瘤小鼠外周血的 T 细胞亚群及 NK 细胞活性的影响及对瘤体大小的影响来探讨 As_2O_3 对机体内实体肿瘤的作用。

1 材料与方法

* [作者简介] 唐印华(1974-), 女, 黑龙江省大庆市人, 医师, 硕士, 主要从事消化系统肿瘤的生物治疗的研究。

1.1 实验动物

健康成年昆明系小鼠,体重 18~22 g,雌雄各半。哈尔滨医科大学第一临床医学院实验动物中心提供。

1.2 瘤细胞株

小鼠 H22 肝癌细胞株,黑龙江省肿瘤医院提供。K562 细胞株,哈尔滨兽医药研究所提供。

1.3 药物及主要试剂

0.1% As_2O_3 溶液(亚砷酸注射液,哈尔滨医科大学第一临床医学院生产);$CD3^+$,$CD4^+$,$CD8^+$ 单克隆抗体,美国 Immunotech 公司产品;BSA,上海华舜生物工程有限公司产品;MTT,Tetrazolium-serve 产品,5 mg/ml。

1.4 实验方法

1.4.1 建立荷瘤鼠模型及分组

无菌操作取 H22 小鼠腹水,台盼蓝染色,光镜下瘤细胞计数,活瘤细胞 >90%,调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml,分别取 0.2 ml 接种于小鼠前肢外侧皮下,制成实体型荷瘤鼠模型。将小鼠 40 只随机分为 A,B,C,D 4 组。A 组为正常组,B 组为荷瘤对照组,C,D 组为荷瘤治疗组,每组各 10 只。B,C,D 组于第 2 天开始给药。B 组:生理盐水 0.2 ml,C 组:As_2O_3 2 mg/kg 约 0.2 ml,D 组:As_2O_3 4 mg/kg 约 0.2 ml,分别腹腔注射,每天 1 次,连续 10 d。于停药后第 2 天取小鼠眼静脉血,每只 2 ml,并取瘤体,称重,计算瘤重抑制率。瘤重抑制率(%)=(1 - 给药组平均瘤重/对照组平均瘤重)×100%。各组瘤标本用 20% 福尔马林固定,石蜡包埋切片,HE 染色光镜观察。

1.4.2 应用流式细胞仪分析 T 细胞亚群

取小鼠抗凝血 100 μl 加入 3 个试管内,再分别加入 $CD3^+$,$CD4^+$,$CD8^+$ 单克隆抗体各 20 μl,混匀,放暗处作用 15~30 min。每个试管内加溶血剂 2 ml,颠倒混合后放暗处 10 min,离心,用 PBS 洗 1 次,加 1% 甲醛 PBS 液 0.6 ml,固定 10~30 min,用流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司,型号 FACS Cabibur)分析。

1.4.3 应用改进的 MTT 还原法[6]测定 NK 细胞活性

效应细胞及靶细胞 K562 分离及制备参阅文献[7]方法。MTT 细胞毒实验:96 孔 U 型底培养板中,实验孔加效、靶细胞各 100 μl;靶细胞对照孔加靶细胞、培养液各 100 μl;效应细胞对照孔加效应细胞、培养液各 100 μl。每孔作 3 个平行复孔。各孔均加入 10 μl MTT,37℃ 5% CO_2 培养箱孵育 4 h,离心弃上清,各孔加 0.04 mol/L 盐酸异丙醇 100 μl 溶解 MTT 还原产物甲瓒,微型震荡器振荡 10 min。酶联检测仪(型号 DYNA TECH. MR7000)570 nm 波长测 OD 值。求 3 个平行孔的平均值,按下述方法计算 NK 细胞活性:

$$NKCA(\%)=\left[1-\frac{\text{实验孔(效+靶)OD 值}-\text{效应细胞对照孔 OD 值}}{\text{靶细胞对照孔 OD 值}}\right]\times100\%$$

1.5 统计学分析

采用计算机 SAS 软件分析数据采用 t 检验。

2 结 果

2.1 As_2O_3 的抑瘤作用(见表 1)

表 1 各组实体瘤瘤体生长的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Comparison of growth of tumor body in different groups ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Average tumor weight	Tumor inhibitory rates
Control	10	3.17 ± 0.75	
Low dose AS_2O_3	10	1.93 ± 0.36	39.12%
High dose As_2O_3	10	1.72 ± 0.42△	45.74%

Compared with control, $P<0.01$

△ Compared with low dose As_2O_3, $P>0.05$

由表 1 可见,As_2O_3 低剂量组及高剂量组平均瘤重低于对照组平均瘤重,有显著性差异($P<0.01$),其抑瘤率分别为 39.12%,45.74%,说明 As_2O_3 能有效抑制肿瘤生长。但高剂量组与低剂量组平均瘤重比较,无明显差异($P>0.05$)。在实验过程中,对照组荷瘤鼠活动减少,步态不稳,毛发稀疏,进食水少,形体消瘦呈恶病质,其中 1 只在用药第 5 天死亡,而治疗组小鼠活动基本正常,饮食状况无明显改变,体重未见明显减轻。

2.2 AS_2O_3 对肝癌小鼠免疫功能的影响(见表 2)

2.3 光镜下组织病理学观察

各组肿瘤组织均有不同程度的出血、坏死,其中治疗组癌细胞变小,核固缩、变性、片状坏死,间质内有大量炎性细胞浸润,以淋巴细胞及巨噬细胞多见。

3 讨 论

目前 As_2O_3 对肝癌细胞的抑制作用方面的研究已有很多报道,但是均局限于人肝癌细胞的体外研究方面,体内实验方面研究甚少。通常验证一种抗肿瘤药物疗效的常用动物模型,是采用将细胞或组织块形成的肿瘤注入免疫缺陷或同基因的小鼠皮下,待肿瘤长到一定程度再给以相应药物处理,本实验就是根据这一原理制成 H22 肝癌荷瘤小鼠模型,来研究砷剂在体内的抗肝癌作用。

表 2　正常组、对照组及治疗组 T 细胞亚群及 NK 细胞活性检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　T lymphocyte subsets and NK cell activity were examined in all groups

Groups	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	NKCA
Normal	70.62 ± 3.18	41.01 ± 2.15	22.35 ± 1.65	1.84 ± 0.05	50.44 ± 2.71
Control	41.84 ± 4.66	22.91 ± 3.49	17.35 ± 2.95	1.33 ± 0.17	9.72 ± 4.13
Low dose As_2O_3	49.04 ± 6.64 △▲	27.70 ± 3.43△▲	15.74 ± 3.66	1.80 ± 0.21△	41.60 ± 3.29△
High dose As_2O_3	51.45 ± 5.97△	31.48 ± 2.79△□	17.45 ± 2.42	1.82 ± 0.17△	47.15 ± 3.97△□

$P < 0.01$, compared with normal groups; $P < 0.01$ and ▲ $P < 0.05$ compared with control groups;
□ $P < 0.05$ high dose As_2O_3 was significantly better than low dose As_2O_3

机体的免疫功能与肿瘤的发生、发展有密切关系。肿瘤细胞的增殖通常伴有免疫应答的减弱[8]。机体内具有抗肿瘤、抗病毒、发挥免疫监督功能的 3 种细胞。第一道防线是自然杀伤细胞(NK 细胞);其次,由巨噬细胞非特异性的吞噬消除突变细胞;第三是 T 淋巴细胞的特异作用。以上 3 道防线细胞相互配合,完成抗肿瘤作用。NK 细胞能直接杀伤肿瘤细胞。NK 细胞及 T 淋巴细胞对靶细胞的杀伤均通过穿孔素(perforin, PF)及 Fas 介导。一般认为 $CD8^+$ T 细胞在杀伤肿瘤细胞中起主要作用,$CD4^+$ T 细胞在肿瘤免疫中起重要的辅助作用[9]。$CD4^+/CD8^+$ 比值可直接反应出机体的细胞免疫功能状态。有实验发现再次抗瘤免疫反应 $CD4^+$ T 杀伤细胞发挥重要作用[10]。最好的疫苗应该能够同时激活 $CD4^+$ T 细胞及 $CD8^+$ T 细胞。

大量文献资料表明,在肿瘤患者外周血中常出现 T 细胞亚群的紊乱,表现为 $CD3^+$, $CD4^+$ 百分率和 $CD4^+/CD8^+$ 比值下降,这种变化随着肿瘤的进展而加重[11]。本研究结果中已阐明,As_2O_3 主要是通过提高 $CD4^+$ 含量,从而提高机体的细胞免疫功能。治疗组 NKCA 较荷瘤组明显提高,这可能是 As_2O_3 使肝癌细胞分泌的免疫抑制物减少,解决了机体荷瘤状态下免疫功能受到抑制的现象。As_2O_3 这种对机体的免疫方面的影响与傅德良[12]等在胸腺肽 α_1 对围手术期胰腺癌患者血中 T 细胞和 NK 细胞的影响中的结果相似。实验中我们还观察到 As_2O_3 能有效地抑制实体瘤组荷瘤鼠皮下肿瘤的生长,整个实验过程中,治疗组无体重变化等明显毒副作用,且 As_2O_3 可使肿瘤细胞核变性、坏死,间质内大量淋巴细胞及巨噬细胞浸润,说明 As_2O_3 能抑制小鼠肝癌的生长,增强间质内炎症细胞的浸润。

我们的研究结果证明,As_2O_3 能够改善和提高机体的免疫力,抑制实体肿瘤的生长,为其应用于临床提供了一定的理论依据。我们可以利用介入方法将三氧化二砷导入人体,如作为肝动脉插管的治疗药物之一,在其诱导细胞凋亡的基础上,提高机体的免疫功能,抑制肿瘤的生长,为手术创造机会;或腹腔内注药,以减少腹水等。这是一值得继续研究的临床课题。

[参考文献]

[1] Dong JT, Luo XM. Effects of arsenic on DNA damage and repair in human fetal lung fibroblasts[J]. Mutat Res, 1994; 315(1): 11-15.

[2] 张　鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17: 58-60.

[3] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, *et al*. *in vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide(As_2O_3) in the treatment of promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1996, 88(33): 1052-1061.

[4] 邓有平, 林　晨, 张雪艳, 等. 三氧化二砷抗肿瘤作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 174-175.

[5] 伍　刚, 周云峰, 应大明, 等. 三氧化二砷对神经母细胞瘤细胞增殖的影响[J]. 癌症, 1999, 18(3): 263.

[6] 何金生, 李瑞珠, 宋庭益, 等. MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究[J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12: 356-358.

[7] 阮永威, 谭辉, 宫东绕, 等. 自然杀伤细胞活性与血清癌胚抗原关系的研究[J]. 免疫学杂志, 1994, 10(4): 245-247.

[8] Choi SH, Chung EJ, Whang DY, *et al*. Alteration of signal-transducing molecules in tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood T lymphocytes from human colorectal carcinoma patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 1998, 45(6): 299-305

[9] Hung K, Hayashi R, Lafond-walker A, *et al*. The central role of $CD4^+$ T cells in the antitumor immune response[J]. J Exp Med, 1998, 188(12): 2357-2368.

[10] Gause WC, Ekkens M, Nguyen D, *et al*. The development of $CD4^+$ T effector cells during the type 2 immune response[J]. Immunol Res, 1999, 20(1): 55-65.

[12] 邢　雪, 吴在佳, 陈孝平, 等. 肝癌患者免疫功能的临床研究[J]. 中华实验外科杂志, 1996, 13: 333.

[13] 傅德良, 倪泉兴, 虞先浚, 等. 胸腺肽 α_1 对围手术期胰腺癌患者血中 T 细胞和 NK 细胞的影响[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(6): 362-365.

[收稿日期] 2002-04-02　　[修回日期] 2002-07-15