

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0179-04

环磷酰胺单次注射对小鼠淋巴细胞及其亚群的早期作用

刘继彦^{1,2}, 李永强¹, 彭瑞清¹, 丁 娅¹, 李鸿立¹, 程 霞¹, 张念华¹, 张晓实¹, 曾益新¹(1. 华南肿瘤学国家重点实验室 中山大学肿瘤防治中心, 广州 510060; 2. 四川大学华西医院 肿瘤生物治疗科, 成都 610041)

[摘 要] **目的:** 探讨环磷酰胺(CTX)的免疫增强作用机理。**方法:** 对单次腹腔注射 50 mg/kg CTX 后小鼠外周血和脾脏中淋巴细胞数量的变化进行了连续的观察,并用流式细胞术分析了注射 CTX 后第 5 天外周血淋巴细胞亚群的变化。**结果:** 使用 CTX 后第 1~5 天外周血和脾脏中淋巴细胞数量出现了迅速的下降,同时,外周血淋巴细胞亚群中出现非 T 淋巴细胞比例的下降和 T 淋巴细胞比例的升高,且 CD8⁺ 比 CD4⁺ T 淋巴细胞比例升高明显。**结论:** 淋巴细胞数量和亚群的变化可能同 CTX 的免疫增强作用有关。

[关键词] 环磷酰胺; 免疫增强作用; 淋巴细胞; 亚群

[中图分类号] R730.51 [文献标识码] A

Changes of Lymphocyte and Its Subsets After a Single Injection of Cyclophosphamide to Balb/c Mouse

LIU Ji-yan^{1,2}, LI Yong-qiang¹, PENG Rui-qing¹, Ding Ya¹, Li Hong-li¹, CHENG Xia¹, ZHANG Nian-hua¹, ZHANG Xiao-shi¹, ZENG Yi-xin¹(1. State Key Laboratory of Oncology in South China and the Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510060, China; 2. Department of Cancer Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, China)

[**Abstract**] **Objective:** To explore the possible mechanism that single administration of low dose cyclophosphamide (CTX) has the ability to potentiate immunity in antitumor immunotherapy. **Methods:** Lymphocytes in peripheral blood and spleen were numerated after 50 mg/kg CTX was administrated intraperitoneally to Balb/c mice, and lymphocyte subsets were analyzed by flow cytometry on day 5 of the administration. **Results:** On day 1 to 5 after CTX administration, lymphocytes decreased promptly both in peripheral blood and in spleen, accompanying with the decrease in ratio of non-T lymphocyte subsets and the increase in ratio of T lymphocyte subsets in peripheral blood, and the increase in ratio of CD8⁺ T lymphocytes was more marked than that in ratio of CD4⁺ T lymphocytes. **Conclusions:** These changes might be associated with the immune potentiation effect of CTX, and our observation afforded some information in further investigating the mechanism of immune potentiation effect of CTX.

[**Key words**] cyclophosphamide; immune potentiation effect; lymphocyte; subset

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)是一种常用的细胞毒化疗药物,同时也是一种免疫抑制剂,用于自身免疫性疾病等的治疗。CTX 还能作为免疫增强剂使用,它能加速非肥胖性小鼠自身免疫性糖尿病的发生^[1],还能增强抗肿瘤免疫治疗疗效^[2,7]。因此,这些现象提示在合适的条件下 CTX 能起到免疫增强剂的作用,但其内在的机理目前尚未研究清楚。

淋巴细胞是机体内最主要的免疫效应细胞,其数

量和亚群的变化对机体免疫状态有一定的提示作用。为了探讨 CTX 免疫增强作用的机理,我们用 Balb/c 小鼠为动物模型观察了 CTX 单次注射后体内淋巴细胞

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(04300289); 中国博士后科学基金项目(2004035180)

[作者简介] 刘继彦(1972-), 男, 四川人, 医学博士, 主治医师, 主要从事肿瘤的免疫基因治疗方面的研究

[通讯作者] 曾益新, Email: yxzeng@gzsums.edu.cn

的变化,并对其可能的机理进行了讨论。

1 材料与方法

1.1 动物

6~8周、16~20g Balb/c 小鼠(雌雄各半,清洁级)由中山大学实验动物中心提供。

1.2 试剂

大鼠抗小鼠 CD4(PE 标记)、CD8(Cychrome 标记)、CD3(FITC 标记)单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司;红细胞裂解液按如下配制: NH₄Cl 8.99 g/L, KHCO₃ 1 g/L, EDTA 0.037 g/L; CTX 购自 Sigma Aldrich 公司。

1.3 标本的采集和准备

CTX 溶解在生理盐水中,采用腹腔注射(50 mg/kg)给药途径,CTX 注射后 1,3,5,7,9,14,21,28 d 分别采集小鼠静脉血和脾脏。采用眼球摘除法采集小鼠球后静脉血,肝素钠抗凝(20 U/ml);取小鼠脾脏,称重,用注射器头在 200 目尼龙网上轻轻挤压研磨脾脏,PBS 冲洗过滤,得脾单细胞悬液。

1.4 白细胞计数和分类

采用美国 BECKMAN 公司 Coulter Ac. T 全自动血细胞分析仪;或人工计数分类法,简述如下:取抗凝血或脾单细胞悬液,用白细胞稀释液稀释 20 倍,混匀,取 10 μl 加入计数板,静置 1~2 min 后计数白细胞总

数;抗凝血制作血涂片,迅速风干,用 1 份体积的瘤 A 染液染色 30 s 后,加入 2 份体积的瘤 B 液覆盖染色 90 s,流水冲洗,在油镜下计数 100 个白细胞内淋巴细胞所占数目。

1.5 淋巴细胞亚群的检测

将 50 μl 外周血加入流式管,加入不同荧光标记的抗 CD4、抗 CD8 和抗 CD3 抗体,4℃ 避光孵育 30 min,加入红细胞裂解液,避光作用 10 min,PBS 洗 2 次,用含 1% 多聚甲醛的 PBS 固定后,流式细胞仪(BD 公司, BECTON DICKINSON FACSCalibar)检测。

2 结果

2.1 CTX 对外周血淋巴细胞数量和脾脏指标的影响

Balb/c 小鼠经 CTX(50 mg/kg)单次注射后,第 1 天即可见外周血淋巴细胞出现迅速的下降,第 3~5 天降至低点,第 9 天左右有部分的恢复,第 14 天出现再次的下降,第 21 天以后恢复至正常。同时,可见外周血白细胞出现随淋巴细胞数量波动的变化。同外周血淋巴细胞变化一致,免疫器官脾脏的重量和脾脏中淋巴细胞的数量也在使用 CTX 后第 1 天开始出现下降,第 3~5 天左右降至低点;同外周血淋巴细胞变化有所不同的是,在第 14 天左右没有出现脾淋巴细胞数量和脾重量的明显降低(表 1)。

表 1 CTX 注射后小鼠外周血白细胞和脾脏指标的变化

Tab. 1 The changes in WBC of PB and index of spleens after injection of CTX

	Normal	Days after CTX							
		1	3	5	7	9	14	21	28
Lymphocytes in PB (10 ⁹ /L)	6.64 ± 0.91	3.84 ± 0.46 [△]	2.58 ± 0.43 [△]	2.33 ± 0.27 [△]	4.80 ± 0.92 [△]	5.68 ± 0.69	4.09 ± 0.75 [△]	7.01 ± 0.88	6.54 ± 0.77
WBC in PB (10 ⁹ /L)	9.08 ± 1.62	5.83 ± 0.96 [△]	4.08 ± 0.62 [△]	3.90 ± 0.76 [△]	6.85 ± 0.95	8.18 ± 1.25	5.03 ± 0.93 [△]	9.72 ± 1.46	9.23 ± 1.93
Number of spleen cells (10 ⁸)	1.62 ± 0.23	0.90 ± 0.14 [△]	0.75 ± 0.13 [△]	0.85 ± 0.08 [△]	1.29 ± 0.23	1.79 ± 0.24	1.66 ± 0.27	1.67 ± 0.35	1.95 ± 0.32
Weight of spleen (mg)	110.8 ± 5.06	66.2 ± 5.85 [△]	56.5 ± 6.14 [△]	59.0 ± 3.65 [△]	102.0 ± 10.10	114.0 ± 6.38	109.3 ± 10.34	121.5 ± 5.92	119.3 ± 4.86

△ Compared with normal, P < 0.05, n = 4

2.2 CTX 对外周血淋巴细胞亚群的影响

CTX 注射后第 5 天,我们用流式细胞仪分析了外周血淋巴细胞亚群的变化情况,如表 2 所示。CTX 使用后第 5 天可见外周血淋巴细胞中 CD3⁺ T 淋巴细胞

的比例有明显的上升,其中 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞均有不同程度的上升,而 CD8⁺ T 淋巴细胞的上升更为明显。

3 讨论

CTX 是一种最常用的细胞毒化疗药物,广泛用于多种癌症的化疗,包括淋巴瘤,多发性骨髓瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌等。同时,它还用于自身免疫性疾病的治疗以及抗宿主-移植免疫排斥反应等,因此,通常认为 CTX 是一种免疫抑制剂。从二十世纪七十年代起,有人注意到 CTX 除了对肿瘤细胞有直接细胞毒作用之外,还可能通过干预免疫系统产生抗肿瘤作用,特别是在抗肿瘤过继性或主动性免疫治疗过程中,单次给予 CTX 常能增强抗肿瘤免疫治疗疗效^[2,7],即 CTX 还可以作为一种免疫增强剂来使用。CTX 的这种调节免疫功能的作用逐渐引起了一些研究者的兴趣。较其他免疫增强剂而言,CTX 是一种经济,方便且被临床广泛使用的药物,因此深入研究它的免疫增强机制有利于将它更有效的应用到抗肿瘤免疫生物治疗中去。较早的研究认为 CTX 可能去除了机体内的某些免疫抑制细胞而起到了免疫增强的作用^[4]。后来有学者发现“旁观者效应”(bystander effects,通过产生 T 细胞生长因子,如 I 类干扰素,以维持输入的免疫 T 淋巴细胞的增殖、存活和活性)可能参与了 CTX 的免疫增强作用^[6];还有研究发现 CTX 能减少免疫抑制因子(如 IL-10, TGF- β 等)的分泌^[7],增加 I 类 T 辅助细胞(Th1)因子的分泌(如 IFN- γ , IL-2 等)^[8];CTX 能同免疫细胞一起增加一氧化氮在肿瘤局部的产生,从而抑制肿瘤的生长^[3],但至今 CTX 增强抗肿瘤免疫治疗疗效的机制尚未得到最终的阐明。

表 2 CTX 注射后第 5 天小鼠外周血淋巴细胞亚群的变化
Tab. 2 The changes in lymphocyte subsets of peripheral blood on day 5 after injection of CTX

	Normal	Day 5 after CTX
CD3 ⁺ T lymphocytes (%)	63.61 \pm 3.89	77.49 \pm 1.62 ^Δ
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T lymphocytes (%)	45.76 \pm 2.85	54.25 \pm 0.56 ^Δ
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (%)	16.34 \pm 1.38	22.93 \pm 1.68 ^Δ

Δ Compared with normal $P < 0.01$; $n = 4$

本实验选择 Balb/c 小鼠作为动物模型来观察 CTX 注射后对体内淋巴细胞数量和亚群的影响。Balb/c 小鼠是一种常用的近交系小鼠,其外周血淋巴

细胞约占白细胞总数的 60% ~ 80%,这一特点有利于我们观察 CTX 对淋巴细胞的影响。CTX 的使用方法是参照文献报道在动物实验中普遍采用的腹腔内注射的方法^[2,3,5-8],其作用可能是通过小鼠腹膜吸收后转运至肝脏经代谢后发挥作用的。

我们的研究发现,50 mg/kg CTX 单次注射后,Balb/c 小鼠外周血和脾脏中淋巴细胞的数量均出现了迅速的下降,第 3 ~ 5 天降至了低点,第 9 天左右开始出现回升;在外周血中淋巴细胞还于第 14 天左右再次出现下降,21 d 后恢复至正常。通常认为,CTX 对骨髓造血系统有抑制作用,这种作用常常在使用 CTX 后第 10 ~ 14 天造成外周血白细胞的明显降低,这同我们观察到的注射 CTX 后 14 d 左右外周血白细胞出现的低点一致。而我们另外观察到 CTX 使用后小鼠外周血和脾脏淋巴细胞数量在短期内(1 ~ 5 d)也出现了 1 次迅速的下降,这种现象似乎不能用造血系统抑制来解释。造成这种现象的原因我们推测可能是 CTX 对部分敏感的淋巴细胞的直接细胞毒作用所致。因此,我们注射 CTX 外周血淋巴细胞亚群变化亚群变化进行观察。在 CTX 注射后第 5 天分析的淋巴细胞亚群显示,T 淋巴细胞占比例有所上升,结合淋巴细胞总数降低的结果,这似乎说明 CTX 对非 T 淋巴细胞具有更明显的细胞毒作用,造成 T 淋巴细胞比例的增加;在 T 淋巴细胞亚群中,CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例均有不同程度的上升,而 CD8⁺ T 淋巴细胞比例的上升更为明显。也即是说,CD4⁺ T 淋巴细胞亚群较 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群可能对 CTX 更为敏感。

我们认为,CTX 对淋巴细胞的这种早期作用,可能同 CTX 增强抗肿瘤免疫治疗的机制有关。有研究认为,CTX 的使用时间是决定 CTX 是否具有免疫增强作用的主要因素,在 CTX 使用后 7 d 内给予免疫治疗常可增强免疫治疗的疗效^[2,5]。我们的研究发现,在注射 CTX 后 1 ~ 5 d 内,在淋巴细胞数量减少的同时,淋巴细胞各亚群之间比例失调,表现为非 T 淋巴细胞对 CTX 的敏感性大于 T 淋巴细胞;而在 T 淋巴细胞中,CD4⁺ T 淋巴细胞对 CTX 的敏感性大于 CD8⁺ T 淋巴细胞。这种比例的失调可能造成了机体对免疫干预的敏感性增高,使机体更易对免疫治疗起反应。通常认为,外周淋巴细胞的数量和亚群之间的比例是机体保持免疫稳态的重要因素。在我们的实验中,我们观察到 CTX 作用后由于非 T 淋巴细胞(主要为 B 淋巴细胞)下降更为明显造成 T 淋巴细胞比例相对增高,这可能是 CTX 能增强细胞免疫反应而对体液免疫反应没有增强作用的原因之一;而最近的研究发现,主要起免疫抑制作用的淋巴细胞为 CD4⁺ T 淋巴细胞中高表达

CD25 的亚群(CD4⁺ CD25⁺)^[9];且 CTX 能部分去除 CD4⁺ CD25⁺ 细胞^[5];而 CD8⁺ T 淋巴细胞是细胞免疫的主要效应细胞。因此,我们观察到的 CTX 作用后 CD8⁺ T 淋巴细胞比例的上升高于 CD4⁺ T 淋巴细胞比例的上升这一现象可能意味着效应 T 淋巴细胞的相对增多和抑制性 T 淋巴细胞的相对减少。这些都有助于我们理解 CTX 使用后各淋巴细胞亚群变化造成机体免疫反应性增高的现象。由于 CTX 的使用时机是决定其是否具有增强抗肿瘤免疫治疗疗效的主要决定因素,我们的实验结果也为 CTX 在免疫治疗中的使用时机提供了参考依据。

[参 考 文 献]

[1] Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, *et al.* Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2[J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(3): 469-474.

[2] Mihalyo MA, Doody AD, McAleer JP, *et al.* *In vivo* cyclophosphamide and IL-2 treatment impedes self-antigen-induced effector CD4 cell tolerization: Implications for adoptive immunotherapy [J]. *J Immunol*, 2004, 172(9): 5338-5345.

[3] Pelaez B, Campillo JA, Lopez-Asenjo JA, *et al.* Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing

tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2001, 166(11): 6608-6615.

[4] Berd D, Maguire HC Jr, Mastrangelo MJ. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide[J]. *Cancer Res*, 1986, 46(5): 2572-2577.

[5] Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, *et al.* CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(2): 336-344.

[6] Proietti E, Greco G, Garrone B, *et al.* Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(2): 429-441.

[7] Matar P, Rozados VR, Gonzalez AD, *et al.* Mechanism of antitumorigenic immunopotentiality by low-dose cyclophosphamide[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(8): 1060-1066.

[8] Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, *et al.* Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 50 (11): 588-596.

[9] Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response[J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 531-562.

[收稿日期] 2005 - 01 - 20 [修回日期] 2005 - 05 - 11
 [本文编辑] 韩 丹

第九届全国肿瘤生物治疗学术会议征稿启事

肿瘤的生物治疗是肿瘤治疗研究的热点,为了更广泛深入地交流该领域的研究进展和临床应用经验,讨论存在的问题和展望未来的发展趋势,由中国免疫学会肿瘤免疫与生物治疗分会和中国抗癌协会肿瘤生物治疗专业委员会联合主办的第九届全国肿瘤生物治疗学术会议于2006年6月在山东省青岛市举行。诚邀国内外专家与同行踊跃投稿、参加会议交流。会议期间将邀请著名专家报告肿瘤防治新进展。

一、征文主题:

1. 肿瘤生物治疗的新理论与新策略; 2. 肿瘤免疫与生物治疗和诊断的新技术; 3. 肿瘤免疫机制研究; 4. 细胞治疗; 5. 细胞因子治疗; 6. 抗体治疗; 7. 肿瘤疫苗; 8. 基因治疗; 9. 中药及免疫调节剂的应用等; 10. 与常规治疗相结合而组成的新疗法

二、征文要求

凡未在国内外公开刊物发表过的研究成果,请撰写为 800 ~ 1 000 字的中文摘要,并加盖公章(请附软盘或发 E-mail)。所接受的论文摘要将录入会议论文集。

三、截稿日期

2006 年 3 月 15 日

四、征文请寄: 上海市杨浦区翔殷路 800 号第二军医大学《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部,来稿请在信封左下角注明“会议投稿”。

邮政编码: 200433

联系人: 韩丹

电 话: 021 - 55620605 × 22

传 真: 021 - 65382502

E-mail: hd@biother.org