

· 论 著 ·

荷瘤大鼠氩氦冷冻治疗前后免疫功能的变化

刘建刚¹, 葛成林², 谭莹², 张凤庆², 李淑芳², 张积仁^{1△}

(1. 南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广州 510282; 2. 山东省潍坊市肿瘤医院介入治疗中心 261041)

摘要:目的 通过检测荷瘤 SD 大鼠经冷冻消融治疗前后 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值及其外周血 sIL-2R 含量的变化情况, 研究荷瘤大鼠治疗前后机体免疫功能的变化。**方法** 建立 SD 大鼠 W-256 肿瘤细胞皮下移植瘤模型, 将 40 只试验大鼠分为 4 组: 正常对照组、荷瘤对照组、冷冻治疗组、手术治疗组, 每组 10 只。应用流式细胞仪检测其治疗前、治疗后 1、3、5 周的 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值变化, 应用免疫试剂盒检测外周血 sIL-2R 含量变化。**结果** 荷瘤大鼠治疗前(CD3⁺、CD4⁺)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均低于正常对照组, 而 CD8⁺ T 细胞数及外周血 sIL-2R 的表达水平均高于正常对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。经冷冻消融治疗后冷冻治疗组大鼠的(CD3⁺、CD4⁺)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均有明显回升, 在术后各个时间点均与同时期荷瘤对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。而 CD8⁺ T 细胞和外周血 sIL-2R 含量则明显下降, 在术后各个时间点均与同时期荷瘤对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。冷冻治疗组在治疗后第 1、3 周(CD3⁺、CD4⁺)、CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值均高于同期手术治疗组, 而 CD8⁺ T 细胞数及外周血 sIL-2R 的表达水平均低于同期手术治疗组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 荷瘤大鼠免疫功能低下, 经冷冻消融治疗后可在短期内显著提高大鼠免疫功能, 具有免疫激活作用, 使机体的免疫功能得到一定程度的改善。

关键词: 氩氦冷冻消融; 种植性乳腺癌; 免疫功能

中图分类号: R737.9; R73-36

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)07-0784-03

Alteration of immune function of rats with implanted breast cancer after Ar-He cryoblation

LIU Jian-gang¹, GE Cheng-lin², TAN Ying², et al.

(1. Cancer Prevention and Treatment Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China;

2. Interventional Therapy Center, Weifang Cancer Hospital, Weifang, Shando 261041, China)

Abstract: Objective To study the change of immune function in rats with imPlanted breast cancer after Ar-He cryoblation. **Methods** A total of 40 SD rats were randomized into 4 groups: cryoblation, surgical resection, tumor-bearing control group, and normal control group. The contents of T cell Phenotype in blood were detected with flow cytometry(FCM) and the contents of sIL-2R were measured by ELISA before and after cryoblation. **Results** Before cryoblation, CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T cell, CD4⁺/CD8⁺ and sIL-2R in the group of tumor-bearing control rats were significantly different than those in the normal control group. After cryoblation, CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ in the cryoblation rats model increased significantly ($P < 0.05$) compared with the group of tumor-bearing control, and it showed significantly different ($P < 0.05$) and CD8⁺ T cell, expression of sIL-2R decreased. It also showed significantly different compared with the group of surgical resection after 1, 3 weeks ($P < 0.05$). **Conclusion** Cryoblation can efficiently stimulate splenocyte activation and Proliferation in tumor-bearing mice, and enhance splenocyte cytotoxicity to tumor cells. cryoblation may activate and improve cell-mediate immune function to some extent.

Key words: Ar-He cryoblation; implanted breast cancer; immune function

氩氦靶向肿瘤治疗技术(简称氩氦刀)由于具有操作安全、禁忌证少、出血少、组织反应轻、不良反应少等优点, 目前在肿瘤的治疗中得到越来越广泛的应用, 是继射频、微波、激光、超声波聚焦、 γ -射线、中子射线之后又一新的肿瘤局部消融治疗手段^[1]。本研究通过动物实验观察常规手术治疗和氩氦冷冻消融治疗对于荷瘤大鼠免疫功能的动态变化, 同时考察手术治疗和射频治疗对于荷瘤大鼠免疫变化的差异性, 为临床治疗积累实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞系 SD 大鼠 50 只, 雄性, 2~3 个月龄, 体质量(200±10)g, 华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.2 实验器材 氩氦靶向冷冻治疗系统——氩氦刀(美国 endocare 公司)。

1.3 试验方法 取 2 只大鼠作为种鼠, 建立腹水模型。待腹

水生成后乙醚麻醉待接种大鼠, 取右后腿外侧新洁尔灭消毒, 皮下注射腹水, 每个注射点用 0.4 mL, 含肿瘤细胞数约 4×10^7 个。共接种 38 只大鼠。隔天测量肿瘤大小, 得出肿瘤体积平均值。同时将 10 只大鼠皮下接种生理盐水作为对照组。第 3 周后, 挑选出 30 只合适的大鼠(肿瘤过大或过小均不入选), 肿瘤体积平均为 3.5 cm³。将其随机分成 3 组, 每组各 10 只荷瘤鼠。连同正常对照组, 一共 4 组, 分别为正常对照组、荷瘤对照组、冷冻治疗组、手术治疗组。用 10% 水合氯醛腹腔麻醉(0.25 mL/100 g)后分别予以处理。冷冻治疗组: 将荷瘤大鼠肿瘤处被毛剪除, 置于金属托盘内, 将肿瘤处乙醇消毒, 直视下将消融针插入肿瘤组织内, 冷冻时间 3~5 min, 复温时间 30 s (插页 I 图 1, 2)。手术治疗组: 将肿瘤处剪去被毛, 乙醇消毒, 切开表皮, 小心暴露肿瘤组织, 仔细分离, 切除, 防止损伤血管。将肿瘤尽量全部剥离后, 创口清洁缝合。荷瘤对照组: 将氩氦刀置入肿瘤 3 min, 而不予冷冻治疗。正常对照组: 只切开皮

△ 通讯作者。

肤,然后清洁缝合。各组 SD 大鼠均在治疗前 1 d,治疗后第 1、3、5 周眼眶采血 1.5 mL,流式细胞术检测行 T 细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)、双抗体夹心法测血清 sIL-2R 的含量。

1.4 统计学方法 所有数据均采用 SPSS12.0 统计软件进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验过程中大鼠生存状态 大鼠接种初期活跃如常,体形无改变。荷瘤对照组大鼠 5 周后明显消瘦,毛色暗淡,肿瘤平均直径达到 5.75 cm³,3 只大鼠肿瘤出现破溃(3/10,30%),行动渐迟缓,摄食量减少。第 6 周死亡 2 只。第 8 周死亡 5 只。手术治疗组大鼠术后伤口恢复快,活跃如前,术后第 4 周 2 例原位肿瘤复发,第 5 周 3 例原位肿瘤复发,复发肿瘤形态不规则,直径最大 1.25 cm。体表未发现远处转移。第 8 周 1 例死亡。冷冻治疗组术后大鼠恢复如常,冷冻后第 3 周消融灶平均直径缩小为 1.13 cm。第 5 周 2 例原位肿瘤复发,复发部位均为原位消融灶以下,考虑为由于肿瘤形态不规则导致消融不全,有肿瘤组织残留所致。最大直径达到 0.82 cm。第 8 周死亡 1 例。

2.2 T 细胞分类检验及血清 sIL-2R 含量的测定 (1)荷瘤对照组大鼠的 CD3⁺、CD4⁺ 细胞的百分率以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值

与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随时间延长而逐步呈降低趋势。手术治疗组 CD3⁺、CD4⁺ 细胞的百分率以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值随时间延长而呈上升趋势,与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且术后与荷瘤对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。冷冻治疗组 CD3⁺、CD4⁺ 细胞的百分率以及 CD4⁺/CD8⁺ 比值同样随时间延长而呈上升趋势,且比手术治疗组上升更明显($P<0.05$),见表 1,2,4。(2)荷瘤对照组大鼠的 CD8⁺ 细胞的百分率在各个时间点与正常对照组相比较均有统计学意义($P<0.05$),且其值随时间延长而逐步呈增加趋势。手术治疗组和冷冻治疗组 CD8⁺ 细胞的百分率随时间延长而呈降低趋势,术后第 3、5 周与荷瘤对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。(3)荷瘤对照组大鼠的外周血液中 sIL-2R 含量在各个时间点与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且随时间延长而逐步呈增加趋势。手术治疗组外周血液中 sIL-2R 含量随时间延长而呈降低趋势,术后第 3、5 周与荷瘤对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),且在各个时间点与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。冷冻治疗组外周血液中 sIL-2R 含量同样随时间延长而呈下降趋势,且比手术治疗组下降更明显,术后第 3、5 周与手术治疗组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

表 1 各组不同时间 CD3⁺ 的变化($\bar{x}\pm s, \%$)

组别(n=10)	术前	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
正常对照组	68.30±2.99	69.68±4.08	70.09±2.58	67.45±2.76
荷瘤对照组	45.93±2.68◆	42.34±3.03◆	37.84±3.17◆	28.31±3.66◆
手术治疗组	46.57±3.73◆	49.66±2.68◆*	53.12±4.11◆*	52.33±3.79◆*
冷冻治疗组	46.74±2.70◆	57.52±4.71◆*#	65.55±3.39*#	57.38±3.69◆*

与正常对照组比较,◆: $P<0.05$;与荷瘤对照组比较,* : $P<0.05$;与手术组比较,# : $P<0.05$ 。

表 2 各组不同时间 CD4⁺ 的变化($\bar{x}\pm s, \%$)

组别(n=10)	术前	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
正常对照组	39.94±1.55	39.65±1.58	40.25±1.43	40.08±1.41
荷瘤对照组	23.00±0.86◆	20.42±0.86◆	17.29±1.20◆	10.67±1.07◆
手术治疗组	22.88±1.24◆	25.41±1.19◆*	30.48±1.17◆*	28.24±0.87◆*
冷冻治疗组	23.04±1.00◆	33.34±1.95◆*#	38.64±0.93*#	29.22±1.23◆*

与正常对照组比较,◆: $P<0.05$;与荷瘤对照组比较,* : $P<0.05$;与手术组比较,# : $P<0.05$ 。

表 3 各组不同时间 CD8⁺ 的变化($\bar{x}\pm s, \%$)

组别(n=10)	术前	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
正常对照组	25.76±2.16	25.37±3.09	25.56±2.40	26.49±2.65
荷瘤对照组	31.03±4.02◆	32.24±4.40◆	32.45±5.49◆	34.81±2.20◆
手术治疗组	30.38±4.83◆	28.46±4.05	27.27±5.05*	26.12±3.00*
冷冻治疗组	30.89±3.99◆	27.63±4.47	25.33±5.64*	26.05±2.04*

与正常对照组比较,◆: $P<0.05$;与荷瘤对照组比较,* : $P<0.05$;与手术组比较,# : $P<0.05$ 。

表 4 各组不同时间 CD4⁺/CD8⁺ 比值的变化($\bar{x}\pm s$)

组别(n=10)	术前	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
正常对照组	1.56±0.14	1.58±0.18	1.59±0.13	1.53±0.17
荷瘤对照组	0.75±0.09◆	0.64±0.09◆	0.55±0.13◆	0.31±0.03◆
手术治疗组	0.78±0.16◆	0.91±0.11◆*	1.19±0.07◆*	1.09±0.12◆*
冷冻治疗组	0.76±0.10◆	1.24±0.24◆*#	1.59±0.32*#	1.13±0.11◆*

与正常对照组比较,◆: $P<0.05$;与荷瘤对照组比较,* : $P<0.05$;与手术组比较,# : $P<0.05$ 。

表 5 各组不同时间 sIL-2R 的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/mL}$)

组别 (n=10)	术前	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
正常对照组	3.71±0.22	3.73±0.31	3.72±0.26	3.79±0.31
荷瘤对照组	6.44±0.75◆	6.70±1.11◆	7.45±0.88◆	8.19±0.53◆
手术治疗组	6.69±1.13◆	6.23±0.71◆	5.44±0.93◆*	5.03±0.73◆*
冷冻治疗组	6.57±0.74◆	5.57±0.63◆*	4.18±1.05*#	5.62±1.02◆*#

与正常对照组比较,◆: $P<0.05$;与荷瘤对照组比较,* : $P<0.05$;与手术组比较,# : $P<0.05$ 。

3 讨 论

随着冷冻技术的不断改善,以氩氦刀为代表的冷冻消融已成为继手术、放疗、化疗之后的又一重要的恶性肿瘤治疗手段。人们在早期就已经认识到冷冻治疗引起的免疫反应对原发灶和转移灶肿瘤的消退均起着重要作用^[2-3]。

本实验研究结果表明荷瘤大鼠与正常大鼠比较其自身免疫水平处于抑制状态。手术治疗后大鼠免疫功能有一定程度的恢复,但恢复较慢,而且在实验过程中多数指标一直未恢复到正常水平,在各个时间点上的 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞,CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值以及外周血液中 sIL-2R 含量与正常对照组比较有明显差异。而冷冻消融治疗对荷瘤大鼠的免疫功能则有比较强的增强效果。冷冻治疗组在治疗后 T 细胞活性及外周血液中 sIL-2R 到第 3 周左右免疫增强效果达到最高,与正常水平相当。尤其引人注意的是,冷冻治疗后 1、3 周各项指标均显著优于相应的手术治疗组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与手术治疗组比较,冷冻治疗组的最大不同之处在于将冷冻治疗后坏死的肿瘤细胞原位留置于体内。冷冻治疗组术后免疫功能明显增强的原因可能与此有关,冷冻治疗后的肿瘤细胞可能激活机体的淋巴细胞,促进淋巴细胞增殖,起到了“原位固化瘤苗”(灭活后的肿瘤细胞原位留置于体内)的作用。

冷冻治疗后 5 周 T 细胞分类和外周血液中 sIL-2R 含量同手术治疗组差异无统计学意义,其原因可能与两组荷瘤对照大鼠经手术和冷冻治疗后有不同程度肿瘤复发对结果的影响有关(手术治疗组大鼠复发 3 只,冷冻治疗组大鼠复发 2 只)。也有可能是不明原因所致,但冷冻治疗带来的免疫增强作用可能是有一定限度的,如何促进和维持冷冻治疗的免疫调节作用将是一个值得进一步探讨的问题。

氩氦刀治疗具有减轻肿瘤负荷、减少肿瘤产生的免疫抑制因子、术后应激反应轻、机体免疫抑制小、坏死的原位肿瘤抗原

释放后能够刺激机体免疫功能等外科手术治疗所不具备的优点,在合理选择患者、选择合适肿瘤消融面积、精确定位等条件下,如果与 CIK 过继免疫治疗、树突状疫苗等免疫治疗方法联合应用,将会在中、晚期肿瘤的临床治疗方面开辟新的局面,缓解患者痛苦,提高生活质量,减少肿瘤复发^[4-6]。

参考文献:

[1] 张积仁. 氩氦靶向肿瘤治疗技术[M]. Hong Kong: pioneer Bioscience Publishing Co,2003;124.
[2] Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, et al. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity[J]. Br J Cancer, 2006, 95(7):896.
[3] Udagawa M, Kudo-Saito C, Hasegawa G, et al. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryo-ablative tumor pretreatment and Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton stimulation[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24):7465.
[4] 彭秋平,汪森明,张积仁,等. 肝癌氩氦刀冷冻免疫的实验与临床研究[J]. 医学研究生报, 2003, 16(2):145.
[5] 施明,王福生,张冰,等. 自体 CIK 细胞治疗肝癌的安全性和有效性评价[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(4):333.
[6] 陈翔,土洪林,李坚,等. 射频消融联合表阿霉素对兔肝 VXZ 肿瘤微血管密度和细胞增殖的影响[J]. 重庆医学, 2005, 34(12):1841.

(收稿日期:2009-08-03 修回日期:2009-09-28)

(上接第 783 页)

nanoparticles[J]. Science, 1997, 277(8):1078.
[5] 张平,习东,宁琴,等. 纳米金标记法在 HIV 检测中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(13):1552.
[6] Storhoff JJ, Lucas AD, Garimella V, et al. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(7):883.
[7] Velasco D, Tomas M, Cartelle M, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin(oxacillin) resist-

ance in Staphylococcus aureus[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(4):379.
[8] 张莉萍,陈维贤,聂红,等. 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的应用评价[J]. 中华医学检验杂志, 2003, 26(2):126.
[9] 张鹏,张文芳,张媛,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速检测方法的比较[J]. 中华医学检验杂志, 2008, 31(3):325.

(收稿日期:2009-08-22 修回日期:2009-09-28)