

不良心理应激对人卵巢癌裸鼠血清 sIL-2R、VEGF 和 CA125 的影响

张艳玉^{1,2}, 高国兰³, 高 军¹, 王 芬¹

Expression of sIL-2R, VEGF and CA125 in Nude Mice Bearing Human Ovarian Carcinoma Induced by Adverse Psychological Stress

ZHANG Yan-yu^{1,2}, GAO Guo-lan³, GAO Jun¹, WANG Fen¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Grade 2008 of Department Medicine, Graduate School of Nanchang University; 3. Department of Gynecology, Aviation General Hospital

Corresponding Author: GAO Guo-lan, Email: guolan_gao@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate expression of Soluble Interleutin-2 Receptor (sIL-2R), vascular endothelial growth factor (VEGF) and CA125 in nude mice bearing human ovarian carcinoma induced by adverse psychological stress. **Methods** All nude mice were randomly divided into 4 groups (each $n = 6$): normal control group (I), simple stress group (II), tumor group (III), and tumor plus stress group (IV). Adverse psychological stress model and human ovarian carcinoma xenografts model were established in correlated groups. The growth of tumors was observed in nude mice. The weight of subcutaneous tumor was measured, the concentrations of sIL-2R, VEGF and CA125 in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with tumor group, human ovarian carcinoma xenografts grew faster in tumor plus stress group, the tumor growth rate was 66.33% ($P < 0.05$). The level of sIL-2R, VEGF in simple stress group was significantly higher than those in normal control group ($P < 0.05$). Expression of CA125 level in simple stress group was not significant difference with that in normal control group ($P > 0.05$). Tumor group and normal control group, tumor plus stress group and normal control group were significantly different compared with correlated group ($P < 0.05$), the concentrations of sIL-2R, VEGF and CA125 in serum were significantly higher than that in correlated control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Adverse psychological stress can suppress the immune function of tumor-bearing nude mice, and result in rapid growth of tumors.

Key words: Adverse psychological stress; Ovarian tumor; sIL-2R; VEGF; CA125 antigen

摘要:目的 探讨不良心理应激对人卵巢上皮性癌荷瘤裸鼠血清可溶性白介素 2 受体 (sIL-2R)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和 CA125 影响。**方法** 将 24 只裸鼠随机分为 4 组: 正常生长组 (I)、单纯应激组 (II)、单纯荷瘤组 (III)、荷瘤 + 应激组 (IV), 每组 6 只, 建立相应的人卵巢上皮性癌荷瘤裸鼠模型和不良心理应激模型。观察皮下瘤生长情况、裸鼠体重的变化, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测各组裸鼠血清中 sIL-2R、CA125、VEGF 的含量。**结果** IV 组裸鼠皮下瘤比 III 组生长较快, 肿瘤增长率达 66.33%。II 组裸鼠血清中 sIL-2R、VEGF 水平与 I 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), sIL-2R、VEGF 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); II 组裸鼠血清中 CA125 水平与 I 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。III 组与 I 组, IV 组与 I 组相比 sIL-2R、VEGF、CA125 水平均差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 不良心理应激可抑制荷瘤裸鼠的免疫功能, 导致肿瘤快速增长。

关键词: 不良心理应激; 卵巢肿瘤; 可溶性白介素 2 受体; 血管内皮生长因子; CA125 抗原

中图分类号: R711.75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)04-0365-04

收稿日期: 2010-03-29; 修回日期: 2010-10-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860301)

作者单位: 1. 330006 南昌, 南昌大学第一附属医院妇产科; 2. 南昌大学研究生院医学部 2008 级; 3. 航空总医院妇科

通信作者: 高国兰, E-mail: guolan_gao@yahoo.com.cn

作者简介: 张艳玉 (1984-), 女, 硕士, 住院医师, 主要从事妇科肿瘤方面的研究

0 引言

卵巢上皮性癌 (卵巢癌) 是女性生殖系统中病死率最高的恶性肿瘤^[1]。随着医学模式向心理-社会-生物医学模式的转变, 人们逐渐把肿瘤视为一种身心疾病, 从而开始重视心理社会因素对其的影响^[2],

而且是心理肿瘤学研究热点。本研究采用束缚应激模型模拟不良心理社会应激因素,将束缚应激施加到荷瘤裸鼠上,检测不良心理应激对人卵巢癌裸鼠血清中可溶性白介素 2(Soluble Interleutin-2Receptor, sIL-2R)、CA125、血管内皮生长因子(VEGF)水平,以此探讨社会心理因素对卵巢癌发生发展的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 细胞系 人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞由中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所提供。

1.1.2 实验动物 雌性裸鼠(ALB/C-nu)购自湖北省实验动物研究中心,许可证号:SCXK(鄂)2008-0005,SPF 级,4~6 周龄,体重 16~20g 左右,饲养于超净生物层流架内(室内恒温 25℃ ± 2℃,恒湿 50%左右,定期进行紫外线照射,饮用水、饲料、垫料,均高压消毒,饲养笼定期更换并用 84 消毒液浸泡消毒)。

1.1.3 主要试剂 新生胎牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司。RPMI1640 培养液购自美国 Hyclone Corporation 公司。sIL-2R 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自上海森熊科技实业有限公司。VEGF 的酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。CA125 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自武汉优尔生科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%的胎牛血清(56℃,灭活 30 min),RPMI1640 培养液中置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中传代培养,3~4 天传代 1 次。

1.2.2 人卵巢癌皮下瘤模型的建立 取对数生长期的 SKOV3 细胞用 0.05%胰酶消化后配成 3 × 10⁷/ml。锥虫蓝试剂测定卵巢癌细胞活性 >95%。常规消毒后于裸鼠右侧背部皮下接种每只 0.2ml。正常组则皮下注射 0.9%氯化钠溶液每只 0.2ml。

1.2.3 不良心理应激模型的建立 将裸鼠束缚于

50ml 离心管(已打孔洞,通风良好),裸鼠在其中仅为活动受限,躯体及尾部均未受压迫,8h 后将裸鼠放出,恢复自由,并供应食物和水。束缚时间为每天早上 10 点~下午 6 点,5 天/周,共 2 周。

1.2.4 实验分组及处理 将 24 只裸鼠随机分为 4 组,每组 6 只。正常对照组(I):正常饲养;单纯荷瘤组(II):建立卵巢癌皮下瘤模型,正常饲养;单纯应激组(III):制作不良心理应激型,裸鼠予以束缚处理,束缚后正常饲养;荷瘤 + 应激组(IV):卵巢癌皮下瘤模型和不良心理应激模型。单纯应激组与荷瘤 + 应激组应激开始时间:待荷瘤鼠皮下瘤约 8mm 时同时予以应激。

1.2.5 标本采集 各组裸鼠在应激周期结束后第 2 天,采用摘除眼球方法,收集裸鼠血液,离心后取血清,-20℃ 保存。处死裸鼠,取出皮下瘤,剥离后,用 PPS 洗液清洗血渍,用滤纸拭干,电子天平称瘤重。肿瘤生长率 = (荷瘤加应激组瘤重 - 单纯荷瘤组瘤重) / 单纯荷瘤组瘤重 × 100%。

1.2.6 裸鼠外周血中 sIL-2R、VEGF、CA125 含量的测定 依据酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒操作说明书测定 sIL-2R、VEGF、CA125 的含量。

1.3 统计学方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成瘤情况

细胞接种后 1~3 天可见界限清晰质软的“假瘤样”皮下结节。3~5 天裸鼠背部右侧开始出现肿块,接种成功率 100%,实验中无裸鼠死亡。

2.2 两组裸鼠皮下瘤瘤重的比较

结果见表 1。

2.3 各组裸鼠血清 sIL-2R、VEGF、CA125 含量

各组裸鼠血清中均可检测到 sIL-2R、VEGF、CA125 水平,见表 2。利用两因素方差分析应激与瘤态可使三者水平增加,说明不良心理应激可使荷瘤鼠免疫功能受到抑制,促进肿瘤的生长。

表 1 不良应激对荷瘤小鼠肿瘤重量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of bondage stress on the weight of murine tumor($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Before planting (g)	After planting (g)	Tumor weight(g)	Tumor growth rate(%)
Tumor	6	18.083 ± 1.158	24.167 ± 1.538	0.950 ± 0.308	
Tumor plus stress	6	18.583 ± 1.281	22.167 ± 1.402	1.583 ± 0.598	66.333

Note: stress can significantly increase the weight of the tumor, the difference was statistically significant ($P < 0.01$)

表 2 不良心理应激对荷瘤小鼠血清 sIL-2R, VEGF, CA125 的影响
Table 2 Effects of bondage stress on serous sIL-2R, VEGF and CA125

Groups	n	sIL-2R(pg/ml)	VEGF(pg/ml)	CA125(u/ml)
Normal control	6	30. 515 ± 7. 604 [●]	37. 630 ± 8. 258 [●]	8. 041 ± 1. 512 [●]
Simple stress	6	41. 646 ± 15. 135 [△]	50. 404 ± 8. 758 ^{△●}	8. 163 ± 1. 927 ^{△●●}
Tumor	6	43. 878 ± 12. 055 [▲]	64. 829 ± 12. 940 ^{▲●}	22. 008 ± 10. 930 ^{▲●●}
Tumor plus stress	6	59. 906 ± 12. 647 [★]	86. 073 ± 15. 171 ^{★●}	47. 696 ± 19. 780 ^{★●●}

Note: sIL-2R: [△] vs. [●], $P < 0. 05$; [▲] vs. [●], $P < 0. 05$; [★] vs. [▲], $P < 0. 05$; VEGF: ^{△●} vs. [●], $P < 0. 05$; ^{▲●} vs. [●], $P < 0. 01$; ^{★●} vs. ^{▲●}, $P < 0. 05$; CA125: ^{△●●} vs. [●], $P < 0. 05$; ^{★●●} vs. ^{▲●●}, $P < 0. 05$

3 讨论

肿瘤的发生发展与众多因素有关,其中社会心理因素为其重要因素之一,长期恶性精神刺激和不良生活环境促进肿瘤发生发展已经成为定论^[3]。由于人心理因素的多样性,难以统一控制,采用应激动物模型来研究心理因素对肿瘤的影响,有利于统一标准,重复性好,可控制性强,观察周期短,有望获得理想的结果。本实验模型在应激过程中不挤压动物,仅仅是限制其活动,在很大程度上动物承受的是心理应激^[4-5]。心理应激作用最重要的途径是下丘脑-垂体-肾上腺皮质(HPA)轴,HPA 轴的激活可使糖皮质激素分泌增多,在糖皮质激素的作用下,自然杀伤(NK)细胞的活性下降,对肿瘤细胞的杀伤能力和免疫监视能力下降,可能导致肿瘤的发生^[6],从而影响癌症的发生和转归^[7-8]。心理神经免疫学研究显示社会心理因素主要通过影响免疫系统来促进肿瘤的发生发展^[9]。社会心理应激因素及情绪变化能引起神经内分泌及免疫系统的功能改变长期的慢性应激对免疫的影响主要是抑制,进而影响肿瘤的发生发展和转归这一事实已被大量的临床研究证实^[10-11]。本实验清楚地展示了不良心理应激、免疫功能和卵巢癌三者之间的关系。

3.1 不良心理应激对 sIL-2R 的影响

sIL-2R 是一种重要的免疫抑制因子,是机体免疫激活的 T 淋巴细胞释放的一条多肽链,淋巴细胞激活后,其膜表面表达的白细胞介素-2 受体可从细胞膜脱落,释放入血循环中,称为可溶性白细胞介素-2 受体^[12],与白细胞介素-2 介导的免疫及疾病的发生发展密切相关,反映了机体免疫活性状态。研究发现,肿瘤患者血清 sIL-2R 水平增高,T 细胞 CD3⁺、CD4⁺ 表达水平下降,CD8⁺ 表达升高,NK 细胞活性降低,说明肿瘤使整体免疫功能也存在抑制状态。Berghella 等^[13]认为肿瘤本身可产生 sIL-2R,还有学者发现^[14],sIL-2R 除小部分是从正常淋巴细胞脱落外,大部分是从恶性肿瘤表面脱落而入血液中的,因此 sIL-2R 在卵巢癌患者血清中高表

达。这与本实验结果相同,单纯荷瘤组与正常生长组相比有显著性升高($P < 0. 05$)。心理应激牵涉到中枢神经系统、内分泌系统和免疫系统构成的复杂网络,其能通过不同的途径造成机体的免疫功能障碍。有实验显示社会心理因素可对免疫系统的功能产生影响^[15]。Marino 等^[16]认为,恶性肿瘤患者血清中 sIL-2R 水平的增高,是由肿瘤诱导的免疫反应所致,不是由肿瘤细胞产生的。而在应激状态下 sIL-2R 的变化则研究比较少,本实验显示单纯应激组比正常生长组也有显著性升高($P < 0. 05$)。本课题 sIL-2R 在应激、瘤态下显著性升高,有明显差异($P < 0. 05$)。说明肿瘤与应激两因素作用下使得机体的免疫状态形成恶性循环,难以控制肿瘤的发展。

3.2 不良心理应激对 VEGF 的影响

VEGF 是目前已知活性最强、专属性最高的促血管生成因子,参与肿瘤血管形成、浸润和转移过程。近期研究认为,在肿瘤的生长过程中,VEGF 信号系统的活化与肿瘤新生血管的形成具有密切联系^[17],促进肿瘤新生血管生成^[18]。实体肿瘤的生长和转移依赖于生成新血管提供营养,包括卵巢癌在内的人类多种肿瘤中 VEGF 均有过度表达。有研究显示,正常卵巢可表达 VEGF 蛋白^[19]。也有研究发现情绪和社会关系可影响某些肿瘤患者血中促血管生成因子的水平^[20-21],从而推测心理社会因素可以促进肿瘤血管的形成。Lutgendorf 等^[21]发现在卵巢癌患者中,无主感、无价值感较大及朋友有较远距离感的患者,血液中 VEGF 水平较高;而能从家庭、朋友和邻居获得较多社会支持的患者 VEGF 水平较低。这与本实验的研究结果一致,本实验中,有不良心理应激的裸鼠血清中 VEGF 水平均较对照组高,差异有统计学意义($P < 0. 05$)。以上研究说明 VEGF 参与卵巢癌的发生发展过程,在应激条件下,肿瘤的发生发展则更加迅速。VEGF 作为最主要的肿瘤血管促进因子,可发挥一定的肿瘤免疫抑制作用,在社会心理因素应激卵巢癌的发生、发展过程中发挥着重要作用。

3.3 不良心理应激对 CA125 的影响

CA125 是一种糖蛋白,它是在细胞内合成,正常情况下 CA125 不能进入血液,细胞发生恶变,就容易进入血液,也就是肿瘤发生时在血清中可检测到其在体内的改变,可由肿瘤细胞产生或诱导产生。CA125 被公认为卵巢癌最有意义的标志物,CA125 浓度变化和卵巢癌能引起患者血清 CA125 表达明显上升,而机体免疫功能明显下降^[22]。本实验结果显示,在应激条件下,荷瘤裸鼠血清中 CA125 水平显著性升高($P < 0.05$),反过来说明不良心理应激对卵巢癌的影响,使机体的免疫功能下降,促进肿瘤的发展。

许多研究表明,卵巢癌细胞可通过分泌多种免疫抑制分子,使机体抗癌免疫应答处于低能状态,从而使肿瘤细胞逃逸免疫监视而发展,同时不良心理应激也可以削弱抗肿瘤免疫反应,形成恶性循环,进而促进卵巢癌的发生发展。SIL-2R、VEGF、CA125 升高或降低能反映卵巢癌恶性程度变化,分析他们的水平高低可以间接反映不良心理应激对卵巢癌的影响,为心理社会因素对卵巢癌的发生发展的机制提供依据,反过来为卵巢癌的心理治疗提供理论基础。

参考文献:

[1] Fehrmann RS, Li XY, van der Zee AG, et al. Profiling studies in ovarian cancer: a review [J]. *Oncologist*, 2007, 12(8): 960-966.

[2] Misono S, Weiss NS, Fann JR, et al. Incidence of Suicide in Persons With Cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(29): 4731-4738.

[3] Maddock C, Pariente CM. How does stress affect you? An overview of stress, immunity, depression and disease [J]. *Epidemiol Psychiatr Soc*, 2001, 10(3): 153-162.

[4] Manfredi B, Sacerdote P, Gaspani L, et al. IL-6 knock-out mice show modified basal immune functions, but normal immune responses to stress [J]. *Brain Behav Immun*, 1998, 12(3): 201-211.

[5] 高国兰, 邹春芳, 邹学森, 等. 人卵巢上皮癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立及生物学性状的鉴定 [J]. *实用癌症杂志*, 2004, 19(5): 454-457.

[6] Spiegel D, Sephton SE. Psychoneuroimmune and endocrine pathways in cancer; effects stress and support [J]. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 2001, 6(4): 252-265.

[7] Kiecolt-Glaser JK, Robles TF, Hefner KL, et al. Psychooncology and cancer: psychoneuroimmunology and cancer [J]. *Ann*

Oncol, 2002, 13(Suppl 4): 165-169.

[8] Antoni MH. Psychoneuroendocrinology and psychoneuroimmunology of cancer; plausible mechanisms worth pursuing [J]. *Brain Behav Immun*, 2003, 17(Suppl 1): S84-91.

[9] Reiche EM, Morimoto HK, Nunes SM. Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer [J]. *Int Rev Psychiatry*, 2005, 17(6): 515-527.

[10] Callaghan BD. Does the pineal gland have a role in the psychological mechanisms involved in the progression of cancer? [J]. *Med Hypotheses*, 2002, 59(3): 302-311.

[11] 赵玲, 张灿珍, 王羽丰, 等. 女性癌症发病的社会心理因素研究 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2002, 9(3): 233-235.

[12] Rabin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology function, and clinical application [J]. *Ann Intern Med*, 1999, 113(8): 619-627.

[13] Berghella AM, Pellegrini P, Piancatelli D, et al. Progression mechanisms in colon cancer; soluble interleukin-2(IL-2) receptor, IL-2 plus anti-CD3 proliferative response and tumour stage correlations [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1994; 38(3): 160-166.

[14] Pui CH. Serum interleukin-2 receptor: clinical and biological implications [J]. *Leukemia*, 1989, 3(5): 323-327.

[15] Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry [J]. *Psychol Bull*, 2004, 130(4): 601-630.

[16] Marino P, Cugno M, Preatoni A, et al. Increased levels of soluble interleukin-2 receptors in serum of patients with lung cancer [J]. *Br J Cancer*, 1990; 61(3) 434-435.

[17] Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, 73(7): 751-762.

[18] Nishida N, Yano H, Komai K, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 101(6): 1364-1374.

[19] Urlick ME, Giles JR, Johnson PA. VEGF expression and the effect of NSAIDs on ascites cell proliferation in the hen model of ovarian cancer. [J] *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3): 418-424.

[20] Moyad MA, Pienta KJ. Mind-body effect; insulinlike growth factor-1; clinical depression; and breast, prostate, and other cancer risk: an unmeasured and masked mediator of potential significance? [J]. *Urology*, 2002, 59(4 Suppl 1): 4-8.

[21] Lutgendorf SK, Johnsen EL, Cooper B, et al. Vascular endothelial growth factor and social support in patients with ovarian carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 95(4): 808-815.

[22] 刘瑶, 陈红, 黄晓东, 等. 卵巢癌患者 CA125 表达和免疫状态关系研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(5): 290-292.

[编辑校对: 刘红武]