

环磷酰胺联合卡介苗对 Lewis 肺癌小鼠 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞及效应细胞功能的影响

李欣¹, 崔永生^{1,2}, 刘白楠¹, 李一¹

Function of CD4⁺ CD25⁺ Treg and Effector Cells of Mice with Lewis Lung Cancer Were Influenced by CTX and BCG Therapeutic Alliance

LI Xin¹, CUI Yong-sheng^{1,2}, LIU Bai-nan¹, LI Yi¹

1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Thoracic Surgery, First Hospital, Jilin University

Corresponding Author: LI Yi, E-mail: yilili19@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To study the function of CD4⁺ CD25⁺ Treg and effector cells of mice with Lewis lung cancer were influenced by CTX and BCG therapeutic alliance, investigate the relationship of CD4⁺ CD25⁺ Treg and the tumor, and provide experiment evidence for the tumor immunotherapy. **Methods** The models were established by injected CTX (25 mg/kg) and after 7 days injected subcutaneously to the right axilla of C57BL/6 mice with subculturing Lewis lung cancer cells and BCG (12.5 mg/kg). The dynamic changes of tumor volume were observed. The changes of number of CD4⁺ CD25⁺ Treg and the expression of Foxp3 in spleen were detected by flow cytometer and semi-quantitative RT-PCR. The changes of T lymphocyte proliferation and killing function spleen were detected. **Results** The tumor volumes grew more slowly in CTX and BCG therapeutic alliance group than in the tumor group. The number of CD4⁺ CD25⁺ Treg in spleen of mice was lower in therapeutic alliance group than in the tumor group ($P < 0.05$). The expression of Foxp3 mRNA in spleen lymphocyte was significantly lower in therapeutic alliance group than in the tumor group ($P < 0.05$). The changes of T lymphocyte proliferation in spleen were significantly higher in therapeutic alliance group than in the tumor group ($P < 0.05$). The changes of T lymphocyte killing function in spleen was not significantly lower in therapeutic alliance group than in the tumor group ($P > 0.05$). **Conclusion** After CTX and BCG therapeutic alliance, the number of CD4⁺ CD25⁺ Treg and the expression of Foxp3 mRNA in spleen of mice with Lewis lung cancer decreased, and enhanced the immune response to tumor, this may delay the growth of the tumor.

Key words: CTX; Treg; Foxp3; Tumor immunity

摘要:目的 探讨环磷酰胺(CTX)联合卡介苗(BCG)治疗对 Lewis 肺癌小鼠 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞和效应细胞功能的影响及 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞与肿瘤的相关性。方法 将传代培养的 Lewis 肺癌细胞接种于 C57BL/6 小鼠右腋下,建立 Lewis 肺癌模型。采用 CTX 联合 BCG 治疗,观察各组动物的肿瘤体积、脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量和 Foxp3 mRNA 表达水平、脾脏 T 淋巴细胞增殖和杀伤功能。结果 CTX 联合 BCG 治疗组肿瘤生长较肿瘤组缓慢;联合治疗组小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量明显低于肿瘤组 ($P < 0.05$);联合治疗组小鼠脾脏 Foxp3 mRNA 表达水平明显低于肿瘤组 ($P < 0.05$);联合治疗组小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖功能明显高于肿瘤组 ($P < 0.05$);联合治疗组小鼠脾脏 CTLs 细胞的杀伤活性略高于肿瘤组 ($P > 0.05$)。结论 CTX 联合 BCG 治疗可明显降低 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量和 Foxp3 mRNA 表达水平,并增强机体抗肿瘤免疫应答,使肿瘤生长延缓。

关键词: CTX; Treg; Foxp3; 肿瘤免疫

中图分类号: R730.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)10-0694-03

0 引言

CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞(regulatory T cell,

Treg)是一具有免疫调节(或免疫抑制)作用的细胞群,占 CD4⁺ T 细胞 5%~15%^[1]。近年来发现具有免疫调节功能的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞在保持自身耐受和免疫稳定的同时,也可能以某种机制抑制着免疫系统对肿瘤细胞的免疫应答,从而影响着肿瘤的发生和发展^[2]。

收稿日期:2007-10-15;修回日期:2008-01-21
作者单位:1. 130021 长春,吉林大学基础医学院免疫学教研室;2. 吉林大学一医院胸外科
通信作者:李一, E-mail: yilili19@yahoo.com.cn
作者简介:李欣(1979-),女,博士,主要从事肿瘤免疫耐受的研究

环磷酰胺 (CTX) 除了对肿瘤细胞具有细胞毒作用外, 近来研究显示 CTX 还可以通过影响免疫系统的功能而发挥其抗肿瘤功能^[3-4]; 卡介苗 (BCG) 具有激发免疫系统对肿瘤的免疫应答, 促进机体抵御肿瘤的作用。因此本文采用 CTX 联合 BCG 治疗 Lewis 肺癌小鼠, 观察其 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞变化, 为肿瘤的免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

CTX 为江苏恒瑞医药股份有限公司产品; BCG 为浙江万马药业有限公司产品; PE-anti-CD4⁺ 及 FITC- anti-CD25⁺ 抗体购于基因公司; Trizol 试剂购于 GIBCO 公司; AMV 逆转录酶、RNasin 与 Ex Tag DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品; MTT 购于 Sigma 公司; 酶标检测仪 550 型为 BIORAD 公司产品; 流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 实验动物及分组

吉林大学实验动物中心提供近交系 C57BL/6 小鼠, 32 只, 雄性, 体重 18 ~ 22 g, 4 ~ 6 周龄。按每组 8 只随机分成对照组、肿瘤组、CTX 组和联合治疗组。Lewis 肺癌细胞 1 × 10⁶ 个/只, 接种于小鼠右腋皮下制备 Lewis 肺癌肿瘤组模型; 小鼠腹腔注射 CTX (25 mg/kg) 7 天后, 接种 Lewis 肺癌细胞 1 × 10⁶ 个/只于小鼠右腋皮下, 制备 CTX 单独治疗组模型; 小鼠腹腔注射 CTX (25 mg/kg) 7 天后, 腹腔注射 BCG (12.5 mg/kg), 同时接种 Lewis 肺癌细胞 1 × 10⁶ 个/只于小鼠右腋皮下制备联合治疗组模型; 对照组为小鼠右腋皮下注射等量生理盐水。

1.3 观测指标及方法

1.3.1 肿瘤体积变化 自第 7 天起, 每 3 天用游标卡尺测量每只小鼠腋下肿瘤长径 (L) 和短径 (W), 用 Steel 公式计算肿瘤体积: $V = LW^2/2$ 。

1.3.2 脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞含量的测定 将小鼠颈椎脱臼处死, 制备脾细胞悬液, Tris-NH₄Cl 溶胀红细胞, 取 1 × 10⁶ 个细胞 (100 μl 体积), 加入 PE-anti-CD4⁺ 和 FITC- anti-CD25⁺ 抗体, 用流式细胞仪检测脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量。

1.3.3 脾脏 Foxp3 mRNA 表达测定 用 Trizol 试剂提取脾脏组织中的总 RNA, 并进行逆转录反应。小鼠 Foxp3 引物序列上游为 5-CAGCTGCCTA-CAGTGCCCTAG-3', 下游为 5-CATTTGCCAG-CAGTGGGTAG-3', 扩增片段大小为 382 bp, 反应条件为 94 变性 30 s, 58 复性 30 s, 72 延伸 30 s, 进行 36 个循环后进一步延伸 72 10 min。选取 β -actin 为内参照, 取 5 μl PCR 产物用 1.5% 的普通琼

脂糖凝胶电泳后, 凝胶电泳成像系统观测成像情况。

1.3.4 脾脏 T 淋巴细胞的增殖情况测定 取 96 孔培养板加入 1 × 10⁶ 个脾细胞悬液, 加入 ConA, 终浓度为 5 μg/ml, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 48 h 后每孔加入 5 mg/ml MTT 10 μl, 继续培养 4 h, 每孔加入 DMSO 100 μl, 在酶标仪上于 570 nm 读取吸光度 (OD 值)。

1.3.5 脾脏 T 淋巴细胞杀伤功能测定 取 96 孔培养板每孔加 P815 细胞 5 × 10⁴ 个, 置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱过夜。次日处死对照组、肿瘤组、CTX 单独治疗组和联合治疗组小鼠, 取脾细胞后用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液调整细胞浓度, 使效靶细胞比分别为 20 : 1, 按 100 μl/孔 × 3 孔加入上述含靶细胞的 96 孔培养板。采用定量乳酸脱氢酶 (LDH) 法检测 CTLs。

1.3.6 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件包处理数据。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤体积动态变化和生长曲线

自接种肿瘤细胞第 7 天开始测量肿瘤体积, 每隔 3 天检测一次。肿瘤体积变化随时间的推移呈对数增长, 见图 1。结果显示联合治疗组与 CTX 单独治疗组相比可明显延缓肿瘤的生长。

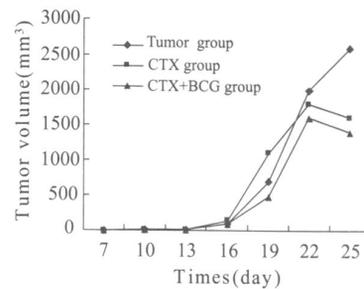


图 1 肿瘤体积变化曲线

Fig 1 The changes of tumor volume

2.2 CTX 联合 BCG 对小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量影响

结果显示肿瘤组脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量明显高于对照组 (*P* < 0.05), 联合治疗组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量比肿瘤组低 (*P* < 0.05); 联合治疗组 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量明显低于肿瘤组, 但略高于 CTX 组, 见图 2。可能为 BCG 活化 CD4⁺ T 细胞, 使 CD25 表达上调, 因此 CD4⁺ CD25⁺ Treg 对肿瘤免疫抑制作用可能降低, 同时又可能增强效应细胞功能。

2.3 CTX 联合 BCG 对小鼠脾脏 Foxp3 mRNA 表达的影响

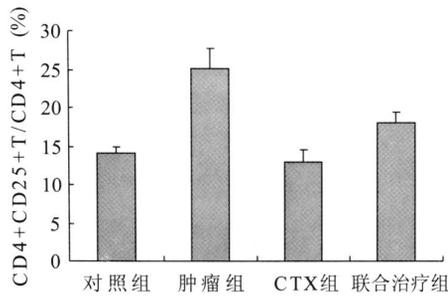


图 2 CTX 与 BCG 联合治疗后小鼠脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞数量变化

Fig 2 The number of CD4⁺ CD25⁺ Treg in spleen after CTX and BCG therapeutic alliance

对照组脾脏 Foxp3 mRNA 表达水平为 (0.525 ± 0.199), 肿瘤组 Foxp3 mRNA 表达水平为 (1.375 ± 1.187), CTX 组 Foxp3 mRNA 表达水平为 (0.947 ± 0.373), 联合治疗组 Foxp3 mRNA 表达水平为 (0.394 ± 0.197)。电泳结果见图 3。显示肿瘤组小鼠脾脏 Foxp3 mRNA 表达明显增高, 联合治疗组表达水平明显低于肿瘤组 ($P < 0.05$), 但 CTX 组表达水平仍高于正常对照组。表明在肿瘤发生时 Foxp3 表达明显增高, 而 CTX 联合 BCG 治疗可降低其表达。

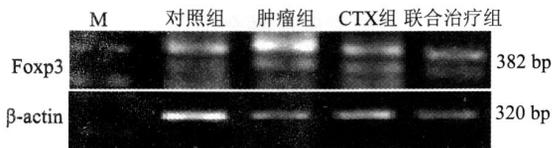


图 3 CTX 与 BCG 联合治疗后 Foxp3 mRNA 表达
Fig 3 The expression of Foxp3 mRNA after CTX and BCG therapeutic alliance

组 SI 为 (1.184 ± 0.261), CTX 单独治疗组 SI 为 (1.412 ± 0.119), 联合治疗组 SI 为 (1.747 ± 0.108)。联合治疗组小鼠 T 淋巴细胞功能明显高于肿瘤组 ($P < 0.05$), 略高于 CTX 单独治疗组。结果显示 CTX 与 BCG 联合治疗可提高脾脏 T 淋巴细胞功能, 从而有可能提高机体抗肿瘤免疫。

2.5 CTX 联合 BCG 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞杀伤功能的影响

对照组脾脏 T 淋巴细胞杀伤率为 0.338 ± 0.093, 肿瘤组杀伤率为 0.218 ± 0.051, CTX 单独治疗组杀伤率为 0.289 ± 0.055, 联合治疗组杀伤率为 0.285 ± 0.049。结果显示 CTX 与 BCG 联合治疗组小鼠脾脏 T 淋巴细胞杀伤活性比肿瘤组略高, 但变化不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

自 1995 年 Sakaguchi 等人首先提出 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞之后, 引起了免疫学界越来越

多的关注, 先后对其进行了广泛的研究^[1,5]。CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞是自然产生并成熟于胸腺的独特细胞群。对其在体内的生物学效应的研究发现, 具有免疫调节功能的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞在保持自身耐受和免疫稳定的同时, 也参与对肿瘤免疫应答的抑制^[6]。因此, CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞不但在肿瘤逃逸、促进肿瘤的生长中发挥作用, 也可能是肿瘤疫苗和免疫增强剂难以奏效的原因。

环磷酰胺广泛应用于多种癌症的治疗^[7-8]; 同时它可用于自身免疫等疾病的治疗。低剂量 CTX 可能通过足够清除 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞并恢复其体内效应 T 细胞的抗肿瘤活性, 从而增强抗肿瘤免疫^[9-10]。我们研究发现联合治疗较单纯 CTX 治疗更能显著提高外周淋巴细胞的增殖功能, 提示联合治疗在刺激效应细胞活化的同时, 可降低 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞对肿瘤效应细胞的抑制作用, 使机体免疫系统有效地对肿瘤细胞进行杀伤。

新的肿瘤治疗策略是在刺激肿瘤免疫应答的同时抑制或清除 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞, 使肿瘤免疫治疗更加有效和善。

参考文献:

- [1] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases[J]. J Immunol, 1995, 155(3): 1151-1164.
- [2] Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy[J]. J Clin Invest, 2007, 117(5): 1167-1174.
- [3] 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.
- [4] Taieb J, Chaput N, Scharz N, et al. Chemotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines[J]. J Immunol, 2006, 176(5): 2722-2729.
- [5] Raimondi G, Turner MS, Thomson AW, et al. Naturally occurring regulatory T cells: recent insights in health and disease [J]. Crit Rev Immunol, 2007, 27(1): 61-95.
- [6] 李欣, 崔永生, 王炎, 等. CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞在 Lewis 肺癌移植鼠中的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(4): 454-457.
- [7] Matar P, Gonzalez AD, Gonzalez AD, et al. Mechanism of antimetastatic immunopotentiality by low-dose cyclophosphamide[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(8): 1060-1066.
- [8] Di Paolo NC, Tuve S, Ni S, et al. Effect of Adenovirus-Mediated Heat Shock Protein Expression and Oncolysis in Combination with Low-Dose Cyclophosphamide Treatment on Antitumor Immune Responses[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 960-969.
- [9] Ghiringheli 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.
- [10] Christine Lutsiak ME, Roshanak T, Smani, et al. Inhibition of CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide [J]. Blood, 2005, 105(7): 2862-2868.

[编辑: 贺文; 校对: 杨卉]