

· 论 著 ·

多烯紫杉醇联合微波热疗对鼻咽癌小鼠免疫功能的影响

魏丽霞¹, 何本夫², 张罗生¹

1. 中国人民解放军第四五八医院肿瘤科, 广东 广州 510600;

2. 中国人民解放军第四二一医院肿瘤科, 广东 广州 510318

摘要: 目的 分析多烯紫杉醇联合微波热疗对鼻咽癌小鼠免疫功能的影响, 为鼻咽癌的临床治疗提供指导帮助。

方法 将 60 只 SPF 级的雌性 Balb/c 小鼠, 采用随机数字表法分为健康对照组、多烯紫杉醇对照组、多烯紫杉醇组、热疗对照组、热疗组及多烯紫杉醇联合热疗组, 每组 10 只。除健康对照组外, 其余 50 只小鼠进行鼻咽癌建模, 建模完成后多烯紫杉醇对照组腹腔注射等量生理盐水, 多烯紫杉醇组按 20 mg/kg 剂量腹腔注射, 热疗对照组微波 37℃ 持续 30 min 治疗 (2 次), 热疗组微波 43℃ 持续 30 min 治疗 (2 次), 多烯紫杉醇联合热疗组在给药 1 h 后 43℃ 微波持续 30 min 治疗 (2 次)。健康对照组不予处理。观察小鼠的状况; 测量其体质量; 治疗 10 d 后用流式细胞仪检测各组小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群中的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4/CD8 比值, 并进行对比。**结果** 健康对照组小鼠活动、饮食、排泄、毛色正常, 体形无明显变化; 鼻咽癌小鼠建模成瘤率约 92.00% (46/50), 鼻咽癌小鼠与健康对照组小鼠比较, 行动迟缓, 饮食下降, 皮毛蓬松无光泽。观察小鼠平均体质量发现, 多烯紫杉醇联合热疗组下降明显, 与其他鼻咽癌组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 提示瘤体减小。鼻咽癌小鼠的 CD3⁺、CD4⁺ 以及 CD4/CD8 比值与健康对照组小鼠比较均明显下降 (P 均 < 0.05), 而 CD8⁺ 明显上升 ($P < 0.05$); 多烯紫杉醇联合热疗组小鼠的 T 淋巴细胞亚群与多烯紫杉醇组比较, 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05), 表明小鼠的免疫抑制作用仍然存在; 而与热疗组小鼠对比, CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4/CD8 比值均下降 (P 均 < 0.05), CD8⁺ 上升 ($P < 0.05$), 表明热疗不会加剧免疫抑制的作用。**结论** 多烯紫杉醇联合热疗并不会改善鼻咽癌小鼠免疫功能, 临床治疗仍需使用免疫调节剂, 以提高机体免疫功能, 从而提高抗肿瘤能力, 延长存活时间。

关键词: 多烯紫杉醇; 微波热疗; 鼻咽癌; 免疫功能

中图分类号: R-33 R 739.6 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)02-0162-04

Impact of docetaxel combined with microwave hyperthermia on immune functions in mice with nasopharyngeal carcinoma

WEI Li-xia*, HE Ben-fu, ZHANG Luo-sheng

* Department of Oncology, 458th Hospital of China People's Liberation Army, Guangzhou, Guangdong 510600, China

Corresponding author: HE Ben-fu, Email: hewei1370@sina.com

Abstract: Objective To study the impact of docetaxel combined with microwave hyperthermia on immune functions in mice with nasopharyngeal carcinoma in order to provide a guidance for clinical treatment. **Methods** With the random number table method, 60 female Balb/c mice of the SPF level were divided into six groups ($n = 10$ each): healthy control group, docetaxel control group, docetaxel group, hyperthermia control group, hyperthermia group and docetaxel combined with hyperthermia group. Except healthy control group, nasopharyngeal carcinoma models were established in the remaining 50 mice. After modeling, 20 mg/kg docetaxel or equivalent normal saline were respectively given by intraperitoneal injection in docetaxel group and docetaxel control group; the methods of microwave heating to 37℃ for 30 min (twice) or microwave heating to 43℃ for 30 min (twice) were respectively used in hyperthermia control group and hyperthermia group; the method of microwave heating to 43℃ for 30 min (twice) at one hour after docetaxel using was employed in docetaxel combined with hyperthermia group. No treatment was given in healthy control group. The general state of mice was observed, and the body mass of mice was measured. Ten days after treatment, flow cytometer was used to detect the levels of CD3⁺, CD4⁺,

CD8⁺ and the ratio of CD4 to CD8 in T lymphocyte subsets of mice spleen, and the results were compared among six groups. **Results** In mice of healthy control group, activity, diet, excretion and fur color were all normal, and no significant body shape change was found. The tumor formation rate of modeled mice was 92.00% (46/50). Compared with healthy control group, slow-acting, poor appetite, fluffy and dull fur appeared in the nasopharyngeal carcinoma mice. The average body mass of mice in docetaxel combined with hyperthermia group significantly decreased compared with other groups (all $P < 0.05$). Compared with healthy control group, the levels of CD3⁺, CD4⁺ and the ratio of CD4 to CD8 significantly decreased, and the level of CD8⁺ significantly increased in nasopharyngeal tumor mice (all $P < 0.05$). There were no significant differences in T lymphocyte subsets between docetaxel combined with hyperthermia group and docetaxel group (all $P > 0.05$), and there were significant differences between docetaxel combined with hyperthermia group and hyperthermia group (all $P < 0.05$). The aforementioned results indicated that the immunosuppressive effect of docetaxel combined with hyperthermia still existed, and the hyperthermia cannot aggravate the immunosuppressive effect. **Conclusions** Docetaxel combined with hyperthermia cannot improve immune function of mice with nasopharyngeal carcinoma, therefore, the immunomodulatory drug in clinical therapy is still needed to improve organism immune function and thus enhance the ability of anti-tumor and prolong survival time.

Key words: Docetaxel; Microwave hyperthermia; Nasopharyngeal carcinoma; Immune function

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 作为一种恶性肿瘤,高发于中国南方和东南亚一带,且发病率逐年增加^[1]。有研究表明,鼻咽癌的发病与遗传因素和免疫功能下降密切相关,其病因为 EB 病毒与促癌物质协同作用,导致鼻咽癌发生发展。由于疾病隐匿,鼻咽癌确诊时多为晚期,给治疗带来了极大困难^[2]。目前,主流的治疗方法为同步放化疗,治疗效果尚可,但给患者的免疫系统造成极大的破坏。微波热疗是一种新的抗肿瘤方法,它不仅对肿瘤细胞具有一定杀伤作用,而且还能够增加肿瘤细胞对放射线的敏感性,促进放疗效果^[3]。随着研究的深入,如何提高治疗效果、降低免疫功能破坏和延长患者生存时间是鼻咽癌相关研究的重点。笔者从 2010 年 9 月至 2012 年 4 月采用多烯紫杉醇联合微波热疗的方法对鼻咽癌小鼠进行干预实验,以观察其免疫功能的变化,现报道总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物采用 Balb/c 小鼠 (SPF 级) 60 只,体重 20~25 g,雌性,鼠龄 4 周,购自南京医科大学实验动物中心,实验动物许可证号: SCXK (宁) 2010-0012。细胞株采用:人低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞株 CNE-2,同样购自南京医科大学附属第一医院生物研究室。

1.2 药品器材 RPMI 1640 培养基为北京中杉生物技术公司提供;胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司;多烯紫杉醇注射液由深圳万乐药业公司提供,分子量为 853.9,规格:20 mg;80-2 型离心机 (上海手术器械厂);BD FACSCalibur 流式细胞仪 (FACS)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 采用随机数表法将小鼠分为健康对照组、多烯紫杉醇对照组、多烯紫杉醇组、热疗对照组、热疗组及多烯紫杉醇联合热疗组,每组 10 只。健康对照组不作任何处理,其余 50 只小鼠进行鼻咽癌建模。

1.3.2 鼻咽癌模型的建立 将所有小鼠放置在 24 h 光照调节动物饲养箱中饲养 3 周,CNE-2 鼻咽癌细胞在 37℃、5% 湿度下 RPMI 培养基培养,每 2 天传代 1 次,收集对数生长期的肿瘤细胞系细胞,通过胰酶消化后,1 500 r/min 离心机离心 5 min,计数后配制成 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ 的单细胞悬液,无菌条件下为 50 只随机选取的小鼠进行皮下接种,10 d 后接种小鼠均出现直径 $> 5 \text{ mm}$ 的皮下结节,鼻咽癌小鼠模型建立^[4]。

1.3.3 实验方法 健康对照组不做任何处理;多烯紫杉醇对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水;多烯紫杉醇组与多烯紫杉醇联合热疗组均一次性腹腔注射多烯紫杉醇 20 mg/kg;热疗对照组微波加热 37℃ 持续 30 min,隔日重复热疗 1 次;热疗组与多烯紫杉醇联合热疗组在给药 1 h 后,微波热疗恒温 43℃ 对肿瘤部位进行热导向化疗,持续时间为 30 min,隔日重复热疗 1 次,条件相同,第二次热疗时不再给药^[5]。

1.4 检测方法 免疫指标检测采用脾 T 淋巴细胞亚群检测,在接种 20 d 后,将小鼠颈椎脱位处死后取脾脏,制备成细胞悬液。经培养、取样、冷冻、离心,按照说明避光下分别加入抗 CD3 (PE-Cy7 标记)、抗 CD4 (FITC 标记) 和抗 CD8 (PE 标记) 抗体,振荡混匀,低温下避光静置 30 min,用 Buffer 液洗一遍^[6]。用 BD FACSCalibur 流式细胞仪 (FACS) 检测 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4/CD8 细胞比率。

1.5 观察指标 对研究对象于接种鼻咽癌细胞株 CNE-2 后开始观察小鼠的精神状态、饮食、排泄、毛色、活动等方面指标。每 3 天测量 1 次小鼠体质量,比较治疗前后各组体质量变化情况。用 1.4 的方法对小鼠 T 淋巴细胞亚群进行测定,观察细胞免疫指标:CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 及 CD4/CD8 比值。

1.6 统计学分析 采用 SAS 9.0 统计软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数之间的比较采用方差分析和两两比较的 q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量比较 健康对照组小鼠活动、饮食、排泄、毛色正常,身形无明显变化。50 只建模小鼠第 10 天时有 46 只小鼠腋下出现大小不等的肿瘤结节,成瘤率约 92.00% (46/50),成瘤失败小鼠 4 只(多烯紫杉醇对照组 2 只,多烯紫杉醇组 1 只,热疗对照组 1 只)。鼻咽癌小鼠与健康对照组小鼠比较,行动迟缓,饮食下降,皮毛蓬松无光泽。小鼠平均体质量连续比较发现,治疗前鼻咽癌小鼠各组因肿瘤瘤体而出现体质量均较健康对照组上升 (P 均 < 0.05);治疗后 3、7、10 d 多烯紫杉醇对照组体质量平稳升高 ($P < 0.05$),提示瘤体保持增大;多烯紫杉醇联合热疗组逐次明显递降,与其他鼻咽癌组比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05),提示瘤体减小。见图 1。

2.2 多烯紫杉醇对小鼠的 T 淋巴细胞的影响 鼻咽

癌小鼠各组的 CD3⁺、CD4⁺、及 CD4/CD8 比值与健康对照组小鼠比较均明显下降 (P 均 < 0.05),CD8⁺ 明显上升 (P 均 < 0.05);多烯紫杉醇组与多烯紫杉醇对照组相比,各指标改善更明显 (P 均 < 0.05)。见表 1。

2.3 热疗对小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 热疗组小鼠的 CD3⁺、CD4⁺ 以及 CD4/CD8 比值与健康对照组小鼠比较明显下降,CD8⁺ 明显上升 (P 均 < 0.05);而热疗对照组小鼠与热疗组比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见表 1。

2.4 多烯紫杉醇联合热疗对小鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 多烯紫杉醇联合热疗组小鼠的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 以及 CD4/CD8 比值与多烯紫杉醇组比较,差异无统计学意义 (P 均 > 0.05);而与热疗组小鼠对比,CD3⁺、CD4⁺ 及 CD4/CD8 比值均下降 (P 均 < 0.05),CD8⁺ 上升 ($P < 0.05$)。见表 1。

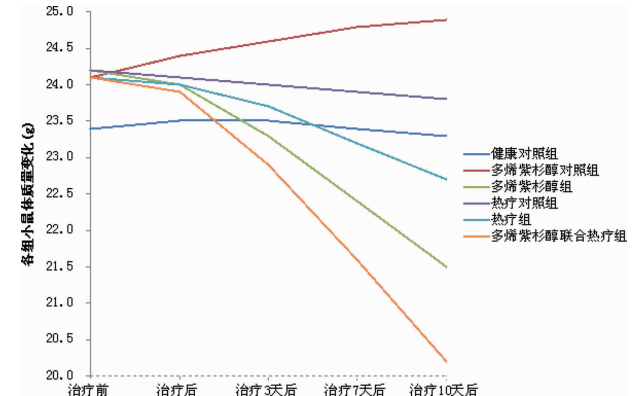


图 1 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 多烯紫杉醇、热疗及两者联合对小鼠的 T 淋巴细胞亚群影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4/CD8
健康对照组	10	48.74 ± 5.15	27.88 ± 4.02	12.32 ± 1.81	2.14 ± 0.44
多烯紫杉醇对照组	8	35.16 ± 3.95 ^a	22.52 ± 3.76 ^a	13.49 ± 1.01 ^a	1.49 ± 0.13 ^a
多烯紫杉醇组	9	29.28 ± 4.06 ^{ab}	16.99 ± 3.34 ^{ab}	20.67 ± 1.27 ^{ab}	0.82 ± 0.15 ^{ab}
热疗对照组	9	36.07 ± 4.34 ^a	21.64 ± 4.94 ^a	12.89 ± 2.15 ^a	1.36 ± 0.06 ^a
热疗组	10	35.84 ± 5.12 ^a	21.67 ± 3.38 ^a	14.01 ± 1.41 ^a	1.28 ± 0.31 ^a
多烯紫杉醇联合热疗组	10	31.04 ± 5.26 ^{ac}	16.73 ± 4.62 ^{ac}	16.13 ± 2.37 ^{ac}	0.89 ± 0.10 ^{ac}
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$;与多烯紫杉醇对照组比较,^b $P < 0.05$;与热疗组比较,^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

鼻咽癌作为一种恶性肿瘤,出现颈淋巴结或远处器官转移极为常见,单纯放射治疗效果并不理想,因此,寻找一种有效、稳定、低毒的治疗措施是临床中亟待解决的问题^[7-8]。随着对肿瘤的研究不断深化,研究者发现多烯紫杉醇对肿瘤细胞具有良好的抑制作用,其机制为抑制微管动力,干扰有丝分裂,使得细胞增殖失败,诱导细胞凋亡。单纯多烯紫杉醇疗效虽然

在临床应用中得到肯定,但是对晚期、复发性肿瘤其治疗效果下降明显^[9-11]。热疗作为除手术、放疗、化疗、免疫疗法外的第五种癌症治疗方法,正在受到重视。相关研究表明,热疗通过延长细胞分化周期诱导肿瘤细胞坏死,与多烯紫杉醇合用,不仅可提高疗效,还可减少用量以减轻药物带来的副作用^[12]。

为进一步了解多烯紫杉醇联合热疗的疗效,及其对免疫功能的影响,本研究通过采用多烯紫杉醇联合热疗对鼻咽癌小鼠模型进行治疗,观察小鼠脾脏 T

淋巴细胞亚群中 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 以及 $CD4/CD8$ 比值情况。T 淋巴细胞亚群是构成机体免疫防御的重要机制^[13]。其中 $CD4^+$ 具有调节免疫反应活性的作用,通过辅助 B 细胞分泌抗体,起到对肿瘤的抑制作用。T 淋巴细胞亚群的失调,将导致免疫功能下降,加速肿瘤生长^[14-15]。本研究结果显示,健康小鼠的活动、饮食、排泄、毛色、体形无明显变化,而鼻咽癌小鼠则行动迟缓,饮食下降,皮毛蓬松无光泽,差异明显。小鼠平均体质量连续比较发现,治疗前,鼻咽癌小鼠各组因肿瘤瘤体而出现体质量均较健康对照组上升;治疗后 3、7、10 d 多烯紫杉醇对照组体质量平稳升高,提示瘤体保持增大;而多烯紫杉醇联合热疗组较其他鼻咽癌组明显递降,提示瘤体减小,多烯紫杉醇联合热疗的疗效可能更加显著。免疫功能研究显示,鼻咽癌小鼠各组的脾脏 T 细胞亚群 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD4/CD8$ 比值与健康对照组小鼠比较均明显下降, $CD8^+$ 明显上升,表明癌症导致小鼠的免疫功能受损;多烯紫杉醇组与只用生理盐水的多烯紫杉醇对照组相比各指标明显下降,表明化疗进一步影响免疫功能。热疗组小鼠的 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD4/CD8$ 比值较健康对照组小鼠明显下降, $CD8^+$ 明显上升;而热疗对照组小鼠与热疗组比较差异无统计学意义,表明热疗并不会对免疫功能造成影响。多烯紫杉醇联合热疗组小鼠的 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 以及 $CD4/CD8$ 比值与多烯紫杉醇组比较,差异无统计学意义,表明联合组多烯紫杉醇化疗对小鼠的免疫抑制作用仍然存在;而与热疗组小鼠对比 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 及 $CD4/CD8$ 比值均明显下降, $CD8^+$ 明显上升,表明单纯热疗不会加剧免疫抑制的作用。

综上所述,本研究结果表明多烯紫杉醇联合热疗治疗鼻咽癌,对免疫功能的影响并不会得到明显改善,需要使用免疫调节剂以促进免疫功能的提升,从而增加机体的抗瘤能力,延长患者生存时间。

参考文献

- [1] 张光斌,郑安平,赵福军,等. 放化疗联合热疗治疗颈部淋巴结转移鼻咽癌的疗效观察[J]. 肿瘤基础与临床,2012,25(4):304-306.
- [2] 邓敬锋,邵汛帆,史建军,等. 全身热疗联合放化疗治疗Ⅲ、Ⅳa 期鼻咽癌的临床研究[J]. 中国医药科学,2011,1(21):30-31,40.

- [3] Su SF, Han F, Zhao C, et al. Treatment outcomes for different subgroups of nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity-modulated radiation therapy[J]. Chin J Cancer, 2011, 30(8): 565-573.
- [4] 马姗姗,王仁生,肖帅,等. 鼻咽癌热疗疗效的系统评价[J]. 中华肿瘤防治杂志,2011,18(4):288-291.
- [5] 任艳鑫,李晓江,杨洁,等. 鼻咽癌组织中 BCRF-1 基因表达及其与免疫功能的相关性分析[J]. 西安交通大学学报(医学版),2012,33(4):474-477.
- [6] He X, Ou D, Ying H, et al. Experience with combination of cisplatin plus gemcitabine chemotherapy and intensity-modulated radiotherapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2012, 269(3): 1027-1033.
- [7] 薛鸣,郭明坤. 自体 CIK 细胞治疗对鼻咽癌患者肿瘤标志物及免疫功能的影响[J]. 中国肿瘤,2015,24(2):139-141.
- [8] Lin S, Tham IW, Pan J, et al. Combined high-dose radiation therapy and systemic chemotherapy improves survival in patients with newly diagnosed metastatic nasopharyngeal cancer[J]. Am J Clin Oncol, 2012, 35(5): 474-479.
- [9] 韦祝新,李萍,阮林,等. 鼻咽癌患者放射治疗对免疫功能的影响[J]. 中国医药指南,2011,9(21):10,63.
- [10] 方慧云,程伟民,李晓玲,等. 放化疗同步 CIK 治疗对鼻咽癌患者免疫功能的影响[J]. 检验医学与临床,2012,9(15):1914-1916.
- [11] Twu CW, Wang WY, Chen CC, et al. Metronomic adjuvant chemotherapy improves treatment outcome in nasopharyngeal carcinoma patients with postradiation persistently detectable plasma Epstein-Barr virus deoxyribonucleic acid[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2014, 89(1): 21-29.
- [12] Chen Y, Sun Y, Liang SB, et al. Progress report of a randomized trial comparing long-term survival and late toxicity of concurrent chemoradiotherapy with adjuvant chemotherapy versus radiotherapy alone in patients with stage III to IVB nasopharyngeal carcinoma from endemic regions of China[J]. Cancer, 2013, 119(12): 2230-2238.
- [13] 王奋. 同步化疗联合后程强调放疗治疗中晚期鼻咽癌的临床研究[J]. 中国医药导报,2012,9(26):36-37,40.
- [14] Xu T, Zhu G, He X, et al. A phase III randomized study comparing neoadjuvant chemotherapy with concurrent chemotherapy combined with radiotherapy for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: updated long-term survival outcomes [J]. Oral Oncology, 2014, 50(2): 71-76.
- [15] Kong L, Hu C, Niu X, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by concurrent chemoradiation for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: interim results from 2 prospective phase 2 clinical trials [J]. Cancer, 2013, 119(23): 4111-4118.

收稿日期:2015-07-10 修回日期:2015-08-03 编辑:石嘉莹