

Walker256 胫骨癌痛模型大鼠的脾脏 T 淋巴细胞功能评价

杜俊英, 梁 宜, 陈宜恬, 吴赛飞, 王 虎, 房军帆, 方剑乔

(浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室, 杭州 310053)

【摘要】 目的 胫骨内注射 Walker256 肿瘤细胞制备骨癌痛大鼠模型, 观察其脾脏 T 淋巴细胞的功能变化。**方法** 健康雌性 SD 大鼠 41 只分两批实验进行。第一批实验动物 16 只, 完全随机分为 PBS 组和模型组, 模型组以胫骨内注射 Walker256 肿瘤细胞建立骨癌痛模型, PBS 组仅注射相同剂量的无菌 PBS。动态观察两组大鼠造模前、造模后 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 十个时间点的机械缩腿阈、热辐射刺激潜伏期和自发性疼痛。第二批实验动物 25 只, 完全随机分为空白对照组、PBS 组和模型组, 观察各组造模后 20 d 脾脏 T 淋巴细胞增殖功能, T 淋巴细胞及其亚群含量。**结果** 第一批实验大鼠: 造模前各组大鼠患侧足趾机械缩腿阈、热辐射刺激潜伏期和自发性疼痛差异无显著; 造模后, 模型组患侧足趾缩腿阈和自发性疼痛于模后 4 d 开始明显低于 PBS 组, 并在整个实验过程中均低于 PBS 组, 而其热辐射刺激潜伏期仅造模后 8 d、10 d 和 12 d 与 PBS 组比较有差异, 其他时间点虽低于 PBS 组, 但差异无显著性。第二批实验大鼠: PBS 组大鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力, T 淋巴细胞 (CD3) 及其亚群 (CD4、CD8) 含量与空白对照组比较均差异无显著性; 模型组大鼠的上述各项指标均少于空白对照组和 PBS 组, 且其 T 淋巴细胞增殖能力显著弱于空白对照组和 PBS 组, CD3 含量明显少于空白对照组。**结论** 骨癌痛大鼠模型可出现明显的机械痛觉异常和自发性疼痛, 其热痛觉异常仅发生在骨癌痛的中期; 骨癌痛模型大鼠脾脏 T 淋巴细胞含量及其亚群均有不同程度的减弱。

【关键词】 Walker256 肿瘤细胞; 胫骨; T 淋巴细胞功能; 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 12-0008-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 012. 002

Functional evaluation of spleen T lymphocytes in the rat model of Walker-256 bone cancer pain

DU Jun-ying, LIANG Yi, CHEN Yi-tian, WU Sai-fei, WANG Hu, FANG Jun-fan, FANG Jian-qiao

(Department of Neurobiology and Acupuncture Research, the Third Clinical Medical College,
Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Objective To observe the functional changes of T lymphocytes in the spleen of rats with bone cancer pain. **Methods** forty-one healthy female Sprague-Dawley rats were used in this study, and were divided into blank control, PBS and Walker-256 tumor groups. Bone cancer pain model was established by inoculation of Walker 256 cancer cells into the tibial cavity. The paw withdrawal threshold (PWT), paw withdrawal thermal latency (PWL), and spontaneous pain

【基金项目】 国家自然科学基金 (编号: 81102643), 浙江省自然科学基金 (编号: LY14H270050), 中国博士后基金面上项目 (编号: 2014M550334)。

【作者简介】 杜俊英 (1984 -), 女, 研究方向: 针刺镇痛与免疫调节。E-mail: dujunying0706@163.com; 梁宜 (1980 -), 女, 研究方向: 针刺镇痛与免疫调节。E-mail: liangyiwww@126.com。

【通讯作者】 方剑乔 (1961 -), 男, 研究方向: 针刺镇痛与免疫调节。E-mail: fangjianqiao7532@163.com。

(SP) were all measured before modelling (as base) and at 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, and 20 days after modelling. The function of T lymphocyte proliferation, and the content of T lymphocytes and their subgroups in the spleen were detected by cell counting kit-8 method and flow cytometry, respectively, on day 20 after modelling. **Results** Before modelling, there were no differences of PWT, PWL, and SP between the PBS and model groups. After modelling, the PWT and SP of model group were significantly decreased on day 4, and were always lower than that of PBS group during the experiment. Statistical analysis revealed that Walker-256 cancer cell inoculation in the tibia induced a significant decrease in PWL on day 8, 10 and 12 after modelling. Compared with the control group, T lymphocyte proliferation, content of T lymphocyte (CD3) and subgroups (CD4 and CD8) in the PBS group were not significantly decreased. However, T lymphocyte proliferation and the content of CD3 lymphocytes in the model group were significantly lower than those in the blank control group and/or PBS group. **Conclusions** The bone cancer pain rat model may appear obvious mechanical allodynia and spontaneous pain. Its thermal pain hyperalgesia only occurred in the intermediate stage of bone cancer pain. The content of T lymphocytes and its subgroups, and the function of T lymphocyte proliferation are weakened to some extent in the bone cancer pain rat model.

【Key words】 Walker-256 cancer cell; Tibia, T lymphocyte immune function; Rats

机体的免疫功能与肿瘤的发生发展有密切关系,已有研究认为人体免疫功能低下或被抑制时,肿瘤发病率增高,而在肿瘤进行性生长中,肿瘤患者的免疫功能受抑制,两者互为因果,双方各因素的消长对肿瘤的发展起着重要的作用^[1]。Walker-256 胫骨癌痛模型是一种国内外比较公认的研究癌症镇痛药物的实验模型^[2]。有关此模型的免疫功能变化目前未见有报道,本文观察 Walker-256 胫骨癌痛大鼠模型,观察其 T 淋巴细胞增殖功能、T 淋巴细胞及其亚群占脾脏淋巴细胞的含量变化,致力于明确 Walker-256 肿瘤细胞是否适合免疫调节药物抗肿瘤作用的研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

选用清洁级雌性健康 SD 大鼠 41 只(实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016),体重(160 ± 20)g,购自中国科学院上海实验动物中心,由浙江中医药大学实验动物中心饲养。饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料(由实验动物中心提供),及自由饮水,12 h 循环灯光,恒定湿度,室温 23℃ ± 2℃。实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2013-0184。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.2 仪器与试剂

RPMI 1640(11875-119,美国 Gibco);特级胎牛血清(30044184,美国 Gibco);Walker-256 肿瘤细胞(3111C0001CCC000316,北京北纳创联生物技术研究院);青霉素-链霉素溶液(100X)(C0222,碧云天生物技术研究所);青霉素(国药准字 H36020261,

江西东风药业股份有限公司);CCK-8 试剂盒(C0038,碧云天生物技术研究所);流式细胞术所用试剂均采购自美国 eBioscience 公司;盐酸吗啡注射液(C81004-2,东北制药集团公司沈阳第一制药厂),其余试剂均为市售分析纯级。动态足底测量仪(意大利 UgoBasile)、足底热辐射仪(意大利 UgoBasile)、全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)、BD FACS Canto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)、洗板机(美国 Bio-Rad 公司)、韩氏穴位暨神经刺激仪(北京华卫产业开发公司)。

1.3 骨癌痛模型制备

胫骨癌痛大鼠模型制备参造 Medhurst 等^[3]的实验方法,大鼠 10% 水合氯醛(0.35 mL/100g)腹腔麻醉,仰卧位,左后肢备皮、皮肤消毒,胫骨上段切 1 cm 口,暴露胫骨头,9 号针头于胫骨结节下外 5 mm 处与胫骨呈 30° ~ 45° 角朝尾侧进针钻洞,微量注射器抽取 Walker-256 肿瘤细胞悬液 10 μL(1 × 10⁷ cells/mL)注入胫骨髓腔,保持 2 min 拔出针头,无菌骨蜡快速封闭针孔,无菌生理盐水冲洗,皮肤缝合,肌内注射 20 万单位青霉素防感染。

1.4 分组与处理

本次实验分两批进行,第一批实验大鼠(共 16 只)完全随机分为 PBS 组和模型组,用于观察实验动物造模前(基础)、造模后 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 十个时间点的机械缩腿阈、热辐射刺激潜伏期和自发性疼痛的变化情况。第二批实验大鼠(共 25 只)完全随机分为空白对照组、PBS 组和模型组,用于观察造模后 20 d 大鼠脾脏细胞 T 淋巴细胞增殖功能、T 淋巴细胞及其亚群占脾脏淋巴细胞的含量。

1.5 指标检测

1.5.1 行为学观察:我们动态观察了各组大鼠造模前(基础)、造模后 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 十个时间点机械缩腿阈、热辐射刺激潜伏期和自发性疼痛。

1.5.1.1 机械缩腿阈:测量前,将实验大鼠置于塑料盒内,待大鼠安静后(停止梳理毛发和探索性活动),将类似 Von Frey 丝的金属丝($\phi 0.5\text{mm}$)置于大鼠患侧足中央,避开足垫,启动“START”按钮,金属丝即自动上抬,刺激力量以 2.5 g/sec 的速率递增(Ramp = 20 sec),直至大鼠缩腿,仪器自动记录当时的刺激力量。连续测量 4 次,取其平均值,每次间隔 3 min。50 g 为最大刺激力量,以免大鼠足爪受损。

1.5.1.2 热辐射刺激潜伏期:操作方法与测量机械缩腿阈相似。测量前,将大鼠置于透明塑料盒中。待大鼠安静后(停止梳理毛发和探索性活动),将聚焦的红外热源置于大鼠患侧足中央,避开足垫,启动“START”按钮对足底进行热刺激,仪器自动记录大鼠缩足反应时的潜伏期。连续测量 3 次,每次间隔 5 min。20 s 是热辐射刺激时间最上限,30 s 为最大热辐射强度。

1.5.1.3 自发性疼痛评价:根据大鼠自由活动后肢使用以及跛行程度,分别给予 0-3 级评分。0 分:正常行走;1 分:后肢跛行,但不是很显著,使用正常;2 分:介于 1 和 2 分之间;3 分:后肢行走时不着地。

1.5.2 生化指标:

1.5.2.1 脾脏淋巴细胞提取:造模后 20 d,各组实验大鼠 10% 水合氯醛腹腔麻醉($0.35\text{ mL}/100\text{g}$),75% 酒精擦拭腹部皮肤,取出脾脏,称重后置于抗生素生理盐水(青霉素 G 10000 U/mL 、链霉素 $10000\text{ }\mu\text{g/mL}$)中浸泡 20 min,将脾脏置于 200 目不锈钢网筛上,剪碎脾脏后进行研磨,期间加 PBS(灭菌)湿润。获得的细胞悬液加入 3~5 倍细胞体积的红细胞裂解液(碧云天),轻轻吹打混匀,裂解 1~2 min, 1000 r/min 离心 5 min,去上清液。获得的细胞悬液加 5 倍体积 RPMI 1640(10% 胎牛血清、 100 U/mL 青霉素、 100 U/mL 链霉素),轻轻混合, 1000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,重复两次。清洗后的细胞加 RPMI 1640(10% 胎牛血清、 100 U/mL 青霉素、 100 U/mL 链霉素)完全培养基重悬,调整浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液待用。

1.5.2.2 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 法检测大鼠脾脏 T 淋巴细胞的增值能力:取 96 孔细胞培养板,四周加 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS(灭菌)以防液体挥发,各孔加入 $180\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液(大约 2×10^5 个),并予以 $20\text{ }\mu\text{L}$ ConA 刺激(终浓度 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$)作为反应孔,以相同体积不加 ConA 刺激的细胞悬液为空白孔,以 $200\text{ }\mu\text{L}$ 细胞培养液为 control,分别做 3 个复孔,细胞培养箱内培养 72 h。各孔加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(WST-8)溶液,在细胞培养箱内孵育 1 h,用全波长酶标仪在 450 nm 、 650 nm 波长下检测其 A 值。细胞活性% = 反应孔 A 值/空白孔 A 值 * 100。

1.5.2.3 流式细胞术检测大鼠脾脏 CD3^+ 、 CD4^+ 、 CD8^+ 的含量:收集、洗涤细胞调整细胞悬液浓度为 $1 \sim 5 \times 10^6\text{ cell/mL}$,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞加入标记的一抗($1\text{ }\mu\text{L}$ CD3 FITC, $1.25\text{ }\mu\text{L}$ CD4 APC, $0.625\text{ }\mu\text{L}$ CD8 PE), 4°C 孵育 30 min(避光)。加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 1% 多聚甲醛, 4°C 孵育 15 min(避光)。1 mL 冰冷 PBS 重悬细胞, 1200 r/min 离心 5 min,弃上清液,重复 3 次。加 $500\text{ }\mu\text{L}$ 冰冷 PBS 重悬细胞,进行流式检测。control 管:细胞 + 同等剂量 PBS,不加一抗,其余步骤相同。同型对照管:细胞 + 荧光标记的同型 IgG,其余步骤相同。单阳对照管:细胞 + 一种荧光标记的抗体,其余步骤相同。BD FACS Canto II 流式细胞仪检测和分析。

1.6 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。机械缩腿阈、热辐射刺激潜伏期和自发性疼痛的实验数据采用重复测量方差分析,并用多因素方差分析进行组间两两比较;其他实验数据采用单因素方差分析,方差齐性时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验,均以 $P < 0.05$ 为差异显著的标准。

2 结果

2.1 骨癌痛大鼠机械缩腿阈变化情况

我们采用足底动态测量仪检测各组大鼠患侧足跖造模前(基础)、造模后 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 的机械缩腿阈。从表 1 中可以看到,造模前,PBS 组和模型组大鼠基础机械缩腿阈比较差异无显著($P > 0.05$)。造模后 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 各时间点,模型组大鼠机械缩腿阈明显小于 PBS 组大鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠机械缩腿阈变化情况 ($g, \bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 1 The paw withdrawal threshold of rats in each group at different time-points ($g, \bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	造模前 Before modelling	造模后 After modelling								
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
PBS 组 PBS group	18.72 ± 1.22	14.91 ± 0.91	15.46 ± 1.04	14.83 ± 1.43	16.13 ± 0.43	16.72 ± 1.11	16.13 ± 0.72	18.01 ± 2.61	17.31 ± 1.24	18.52 ± 1.24
模型组 Model group	18.23 ± 1.23	9.78 ± 0.54 ^{##}	9.91 ± 0.41 ^{##}	10.53 ± 0.95 [#]	11.96 ± 0.78 ^{##}	12.64 ± 1.45 [#]	10.52 ± 1.15 ^{##}	10.69 ± 1.81 [#]	9.58 ± 0.58 ^{##}	9.36 ± 1.12 ^{##}

注:与 PBS 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Note. Compared with the PBS group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 2 各组大鼠热辐射刺激潜伏期变化情况 ($s, \bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 2 The paw withdrawal thermal latency of rats in each group at different time-points ($s, \bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	造模前 Before modelling	造模后 After modelling								
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
PBS 组 PBS group	10.32 ± 0.66	11.66 ± 0.69	11.28 ± 1.65	11.53 ± 0.91	9.23 ± 0.51	10.26 ± 1.12	8.92 ± 0.79	9.50 ± 0.80	9.33 ± 0.45	9.18 ± 0.33
模型组 Model group	10.19 ± 0.74	11.41 ± 0.81	9.43 ± 1.23	8.88 ± 0.63 [#]	7.17 ± 0.65 [#]	6.97 ± 0.42 [#]	8.39 ± 0.31	9.04 ± 0.47	9.81 ± 0.34	8.30 ± 0.74

表 3 各组大鼠自发性疼痛变化情况 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 3 The spontaneous pain of rats in each group at different time-points ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	造模前 Before modelling	造模后 After modelling								
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	16 d	18 d	20 d
PBS 组 PBS group	0.00 ± 0.00	0.92 ± 0.08	1.00 ± 0.12	0.75 ± 0.18	0.33 ± 0.14	0.17 ± 0.11	0.08 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组 Model group	0.00 ± 0.00	1.25 ± 0.13 [#]	1.67 ± 0.14 ^{##}	1.67 ± 0.14 ^{##}	1.83 ± 0.11 ^{##}	1.83 ± 0.11 ^{##}	1.75 ± 0.13 ^{##}	1.67 ± 0.23 ^{##}	1.42 ± 0.19 ^{##}	1.42 ± 0.19 ^{##}

表 4 各组大鼠脾脏 T 淋巴细胞及其亚群含量变化情况 ($\%, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The content of T lymphocyte (CD3) and subgroup (CD4 and CD8) in spleen in the rats ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	动物数 n	CD3	CD4	CD8
空白对照组 Control group	8	26.59 ± 1.58	15.29 ± 0.62	11.65 ± 0.61
PBS 组 PBS group	9	25.32 ± 2.36	15.56 ± 1.53	10.40 ± 0.62
模型组 Model group	8	22.03 ± 1.73	13.42 ± 1.04	9.24 ± 0.81 [*]

2.2 骨癌痛大鼠热辐射刺激潜伏期变化情况

我们还采用热辐射法检测了各组大鼠患侧足跖造模前(基础),造模后 4、6、8、10、12、14、16、18、20 d 的热辐射刺激潜伏期,结果如表 2 所示。造模前,PBS 组和模型组大鼠的基础热辐射刺激潜伏期比较差异无显著意义 ($P > 0.05$)。造模后 4 d 和 6 d,模型组大鼠热辐射刺激潜伏期有一定的下降,但与 PBS 组大鼠比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。至造模后 8 d 和 10 d,模型组大鼠热辐射刺激潜伏期明显小于 PBS 组大鼠 ($P < 0.05$)。到造模后 12 d 至整个实验结束(造模后 20 d),模型组大鼠热辐射刺激潜伏期和 PBS 组比较均差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 骨癌痛大鼠自发性疼痛变化情况

另外,我们还观察了造模前(基础)、造模后 4、6、8、10、12、14、16、18 d 和 20 d 十个时间点,各组大鼠患侧足跖自发性疼痛的变化。如表 3 所示,造模

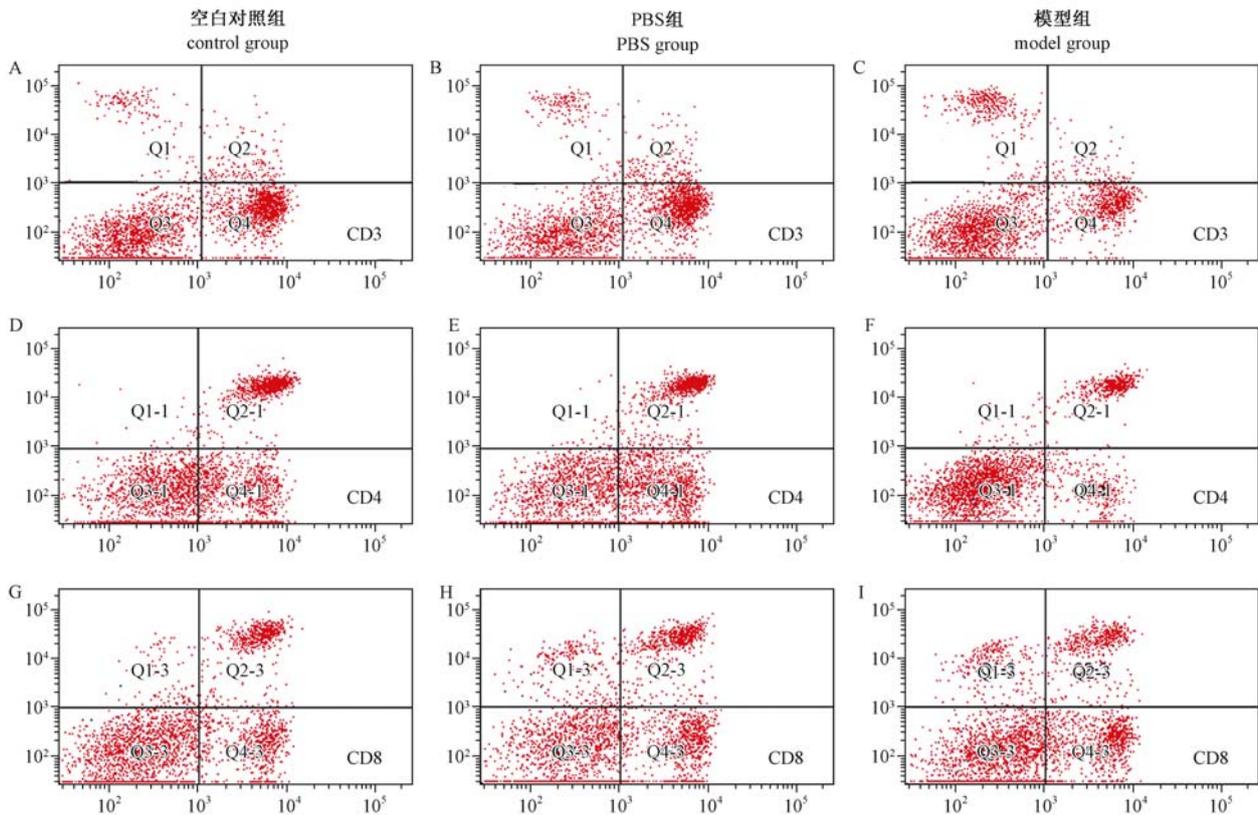
前,PBS 组和模型组大鼠患侧足跖无自发性疼痛。造模后 4 d 至 14 d,PBS 组和模型组大鼠患侧足跖出现自发性疼痛,模型组大鼠的自发性疼痛明显高于 PBS 组 ($P < 0.01$)。造模后 16 d,PBS 组大鼠患侧足跖已恢复正常,无自发性疼痛行为;模型组大鼠患侧足跖仍具有自发性疼痛,明显高于 PBS 组大鼠 ($P < 0.01$)。

2.4 骨癌痛大鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖能力变化情况

模型组大鼠脾脏 T 淋巴细胞的增殖能力 (104.03 ± 7.47) 明显低于空白对照组 (124.87 ± 10.74) 和 PBS 组 (125.57 ± 7.07) 大鼠 ($P < 0.05$)。

2.5 骨癌痛大鼠脾脏 T 淋巴细胞及其亚群含量变化情况

如表 4,图 1 所示,模型组大鼠脾脏 T 淋巴细胞 (CD3)、及其亚群 (CD4 和 CD8) 的含量均少于空白对照组和 PBS 组大鼠,但仅 CD8 的含量明显少于空



注:图 A-I 分别是空白对照组 CD3 含量、PBS 组 CD3 含量、模型组 CD3 含量、空白对照组 CD4 含量、PBS 组 CD4 含量、模型组 CD4 含量、空白对照组 CD8 含量、PBS 组 CD8 含量、模型组 CD8 含量

图 1 各组大鼠脾脏 T 淋巴细胞及其亚群含量变化流式细胞图

Note. Fig. A-I represent the content of CD3 lymphocytes in the control, PBS, and model groups, the content of CD4 lymphocytes in the control, PBS, and model groups, the content of CD8 lymphocytes in the control, PBS and model groups, respectively.

Fig. 1 Flow cytometry scatter plot of the content of T lymphocytes (CD3) and subgroup (CD4 and CD8) in the rat spleen

白对照组大鼠($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验所采用的胫骨内注射 Walker-256 肿瘤细胞建立的胫骨癌痛模型是国内外的用于研究骨癌痛机制的常见模型之一^[4,5]。Mao-Ying 等^[4]比较两种浓度(4×10^5 和 4×10^3)的 Walker-256 肿瘤细胞胫骨内注射制备的骨癌痛中观察到,不同浓度的 Walker-256 肿瘤细胞胫骨内注射均能导致模型大鼠双侧足跖机械痛觉异常和自发性疼痛的产生,但未观察到明显的热痛觉异常;同时 4×10^5 组比 4×10^3 组先出现机械痛觉异常,于造模后 4 d 即观察到双侧机械痛阈明显下降。我们的结果与 Mao-Yin 相似,造模后 4 d,模型组大鼠患侧机械痛阈明显下降、出现显著的自发疼痛现象;并且在整个实验的各个时间点,模型组大鼠的机械痛阈和自发性疼痛评分均显著低于空白对照组和 PBS 组。有关热痛觉异常方面,我们的结果与 Mao-Yin 不一致,我们观察

到,模型组在造模后 8、10、12 d 这三个时间点时,其热辐射刺激潜伏期明显低于空白对照组和 PBS 组;其他各个时间点的热辐射刺激潜伏期与空白对照组和 PBS 组比较无显著差异。另有学者^[5]采用胫骨内注射 4×10^4 个 Walker-256 肿瘤细胞观察期热痛阈变化情况中发现,骨癌痛模型的热痛阈于造模后 12 d 显著下降,并且在于造模后 15 d、18 d 和 21 d 时模型组的热痛阈均显著小于 PBS 组。

T 淋巴细胞简称 T 细胞,来源于骨髓中的淋巴样前祖细胞,在胸腺中发育成熟。成熟的 T 细胞只能表达 CD4 或 CD8 分子,即 $CD4^+$ T 细胞或 $CD8^+$ T 细胞。CD4 和 CD8 分子的主要功能是辅助 TCR 识别抗原和参与 T 细胞活化信号的转导。CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的功能彼此不同。CD4⁺ T 细胞细胞识别由 13~17 个残基组成的外源性抗原肽,受自身 MHC II 类分子的限制。活化后,分化的效应细胞主要为 Th 细胞,但也有少数 CD4⁺ 效应 T 细胞具有细胞毒作用和免疫抑制作用。而 CD8⁺ T 细胞识别

8~10 个残基组成的内源性抗原肽,受自身 MHC I 类分子的限制。活化后,分化的效应细胞为 Tc (CTL) 细胞,具有细胞毒作用,可特异性杀伤靶细胞。尽管仍有争议,但是越来越多的研究表明免疫系统能够识别和消除初期肿瘤,CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞是重要的免疫监视介质^[6]。由于肿瘤细胞较少表达 NHC II 类分子,传统认为 CD8⁺T 细胞被认为是抗肿瘤免疫的主要 T 细胞,而 CD4⁺T 细胞在肿瘤免疫中的主要作用为辅助 CD8⁺T 细胞的活化^[7-9]。但是,也有文献报道,CD4⁺T 细胞可直接对肿瘤产生细胞毒作用^[10,11],且在无 CD8⁺T 细胞参与的情况下,CD4⁺T 细胞也具有抑制肿瘤的作用的能力^[12]。在 CD4⁺T 细胞缺失的情况下,CD8⁺ 细胞的抗肿瘤作用受限制^[13,14]。亦有研究报道, MHC I 类限制性转基因小鼠,CD4⁺T 细胞缺失的情况下,CD8⁺T 细胞仍能保持抗肿瘤作用^[15]。

我们本次的实验中,观察到 Walker-256 肿瘤细胞可以降低外周脾脏 T 淋巴细胞的增殖能力,减少 T 淋巴细胞及其亚群的含量,尤以 CD8⁺T 淋巴细胞含量的减少为甚。CD8⁺T 细胞作为抗肿瘤的主要细胞之一,所以我们认为,Walker-256 致骨癌痛模型可以抗肿瘤免疫药物研究的模型之一。

参考文献:

- [1] 文亚平,高丽华,黎明. 肿瘤与免疫系统的相互作用及肿瘤免疫治疗新策略[J]. 中国肿瘤, 2011, 2:103 - 107.
- [2] 李晓青,孙玉明,黄章翔,等. Walker256 乳腺癌细胞构建大鼠胫骨骨癌痛模型[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15: 41 - 45.
- [3] Medhurst S, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain[J]. Pain, 2002, 96:129 - 140.
- [4] Mao-Ying QL, Zhao J, Dong ZQ, et al. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345:1292 - 1298.
- [5] 严继贵,童晔玲,何国浓,等. 应用 walker-256 细胞建立大鼠骨癌痛模型[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25:1128 - 1130.
- [6] Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state [J]. Nature, 2007, 450:903 - 907.
- [7] Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, et al. CD8⁺T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells [J]. J Immunol, 2005, 174:2591 - 2601.
- [8] Fujii H, Arakawa A, Utsumi D, et al. CD8 (+) tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma[J]. Int J Cancer, 2014, 134: 2393 - 2402.
- [9] Chen Y, Ayaru L, Mathew S, et al. Expansion of anti-mesothelin specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in patients with pancreatic carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9:e88133.
- [10] Noyan F, Lieke T, Taubert R, et al. Naive tumor-specific CD4 (+) T cells were efficiently primed in acute lymphoblastic leukemia[J]. Scand J Immunol, 2014, 80: 161 - 168.
- [11] Snook AE, Magee MS, Schulz S, et al. Selective antigen-specific CD4 (+) T-cell, but not CD8 (+) T- or B-cell, tolerance corrupts cancer immunotherapy [J]. Eur J Immunol, 2014, 44:1956 - 1966.
- [12] Segal BM, Glass DD, Shevach EM. Cutting edge: IL-10-producing CD4⁺ T cells mediate tumor rejection [J]. J Immunol, 2002, 168:1 - 4.
- [13] Haabeth OA, Tveita AA, Fauskanger M, et al. How do CD4 (+) T cells detect and eliminate tumor cells that either lack or express MHC class II molecules? [J]. Front Immunol, 2014, 5:174.
- [14] Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, et al. Human T cell responses against melanoma[J]. Annu Rev Immunol, 2006, 24: 175 - 208.
- [15] Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, et al. Eradication of established tumors by CD8⁺ T cell adoptive immunotherapy[J]. Immunity, 2000, 13:265 - 276.

[修回日期] 2014-10-10