

寒热环境刺激对 DEN 诱发性肝癌大鼠 Th1 和 Th2 细胞因子的影响*

王丽娜, 陈永福, 岳小强[△]

(第二军医大学长海医院中医系, 上海 200433)

[摘要] 目的: 研究寒热环境刺激对二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 诱发性肝癌大鼠模型血清 Th1、Th2 细胞因子的影响。方法: 通过灌胃 DEN (按体质量 10mg/kg 给予 0.2% DEN 灌胃, 每日 1 次, 5 次/周, 连续 14 周) 建立诱发大鼠肝癌模型, 同时给予特定的寒热环境刺激, 每天连续 3h, 5 次/周, 至 20 周末处死所有大鼠, HE 染色观察大鼠肝脏组织学变化; 计算大鼠的脾体比、成瘤率、死亡率; ELISA 检测大鼠血清 IL-2、IFN- γ 、IL-10、IL-4 的含量。结果: 与模型组比较, 热环境组成瘤率、死亡率、脾体比相对较高, IL-2、IFN- γ 浓度降低, IL-10、IL-4 浓度升高; 而寒环境组则与之相反, 且寒热两组间差异显著 ($P < 0.05$)。结论: 长期的寒热环境刺激可对 DEN 诱发性肝癌大鼠模型的肿瘤生成和预后呈现不同影响, 而引起 Th1 和 Th2 细胞因子的改变可能是其主要的作用机制之一。

[关键词] 寒热环境刺激; DEN 诱发性肝癌; 细胞因子; 大鼠

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2011)03-0033-03

肿瘤的发生与遗传、免疫、精神、环境等多种因素有关, 其中环境因素在肿瘤的发生发展中起着重要的作用。原发性肝癌是严重危害健康和生命的恶性肿瘤之一, 其发病呈现明显的地域性, 高发地区具有高热、潮湿等特性。本实验模拟寒热环境刺激, 观察其对 DEN 诱发性大鼠肝癌发生发展的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar 雄性大鼠, 清洁级, 中科院上海实验动物中心提供, 饲养于第二军医大学实验动物中心清洁级动物房。

1.2 主要试剂

二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN), 购自东京化成工业株式会社; 0.9% 氯化钠溶液。大鼠白介素-2 (interleukin-2, IL-2) ELISA 试剂盒, 大鼠白介素-4 (interleukin-4, IL-4) 试剂盒, 大鼠白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 试剂盒, 大鼠干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) ELISA 试剂盒, 由上海西唐生物科技有限公司进口分装。

1.3 主要仪器

海尔电冰柜, 型号: BC/BD-167SC, 购自海尔公司; 电热恒温鼓风干燥机, 型号: DHG-9140A, 购自上海恒一科技有限公司。

1.4 动物分组及模型制备

Wistar 大鼠 42 只, 随机分组为 4 组: 肝癌模型 (12 只)、热环境组 (12 只)、寒环境组 (12 只) 和空白对照组 (6 只)。模型、热环境、寒环境组均按体质量 10mg/kg 给予 0.2% DEN 灌胃, 每日 1 次, 5 次/周, 至 14 周末停药, 停药后自然生长 6 周, 20 周后处死动物。模型组在 $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 环境下颗粒饲料喂养, 自由饮水, 人工照明, 光照为 12L: 12D, 相对湿度为 50% ~ 80%; 热环境组置于 $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 恒温鼓风干燥机中给予热刺激 3h, 1 次/日; 寒环境组置于 $(0 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 冰箱中给予寒刺激 3h, 1 次/日, 其余条件同前饲养。空白对照组于 $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 环境下, 其余条件同前饲养, 并给予等量生理盐水灌胃, 每日 1 次, 5 次/周, 至 14 周末停止, 停药后, 热环境、寒环境组继续给予寒热刺激, 20 周末处死所有动物。

1.5 肝组织病理学观察

* 基金项目: 第二军医大学 2008 年青年启动基金 (NO: 07NQ18)

收稿日期: 2010-07-11 修回日期: 2011-04-02

作者简介: 王丽娜 (1980 ~), 女, 山东人, 讲师, 主要从事中医药防治肿瘤的研究。[△]通信作者: 岳小强, Tel: 021-81871565 E-mail: yuexiaoqiang@smmu.edu.cn

HE 染色镜检, 按 1987 年全国实验肿瘤病理专题座谈会纪要所制定的标准进行病理诊断^[1], 肝细胞性肝癌采用 Edmonson 方法进行分级诊断。

1.6 血清 IL-2、IL-4、IL-10 及 IFN- γ 检测
ELISA 方法检测。

1.7 统计学处理
采用 SPSS10.0 软件统计系统进行统计处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差别采用单因素方差分析, 组与组之间比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况及成瘤率和死亡率的观察

随寒热环境干预的进行, 热环境组大鼠逐渐出现烦躁, 活动增加, 不停抓挠铁笼, 腹部上翻, 耳朵、尾巴颜色加深, 多汗; 寒环境组大鼠聚集扎堆, 身体蜷缩, 背毛竖立, 耳朵、尾巴颜色变淡; 空白对照组和模型组无明显变化。在造模 8 周后, 除空白对照组外, 各组大鼠均出现不同程度的消瘦、脱毛、爪/毛少光泽等表现, 体重下降, 热环境组体重下降最明显; 各组均有大鼠死亡, 模型组死亡 2 只, 热环境组死亡 4 只, 寒环境组死亡 2 只, 均为自然死亡, 解剖后见到肝脏紫黑, 严重肿胀, 布满颗粒; 20 周末处死大鼠解剖发现模型和热环境组肝脏重度肿胀, 弥漫性肝硬变, 满布大小不等的灰白色结节和灰褐色颗粒; 寒环境组肝脏肿胀程度稍轻, 质软, 散在分布数个灰白色结节; 空白对照组肝脏外观正常, 表面无结节。结果见表 1。

2.2 寒热环境对 DEN 诱发性肝癌大鼠脾指数的影响

模型、热环境、寒环境和 N 组比较, 脾脏显著增大 ($P < 0.05$); 热环境组增大最为明显、寒环境组增大幅度较小, 并小于模型组, 热环境、寒环境两组差异显著 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠体重与死亡率、成瘤率 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	体重/g	死亡率/%	成瘤率/%
空白对照组	6	431.17 $\pm$ 19.79	0	0
模型组	12	317.60 $\pm$ 46.62 *	16.67	83.3 *
热环境组	12	305.75 $\pm$ 14.55 *	33.33	91.7 *
寒环境组	12	329.90 $\pm$ 35.26 * Δ	16.67	66.7 * Δ

与正常组比较, * $P < 0.05$; 与热环境组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 寒热环境对 DEN 诱发性肝癌大鼠肝脏组织学影响

HE 染色显示, 空白对照组肝组织正常表现, 经 DEN 染毒后, 其余 3 组大多为肝细胞性肝癌伴周围组织肝硬化, 少数为肝硬化, 寒环境组 1 只大鼠仅为肝纤维化。结果见图 1。

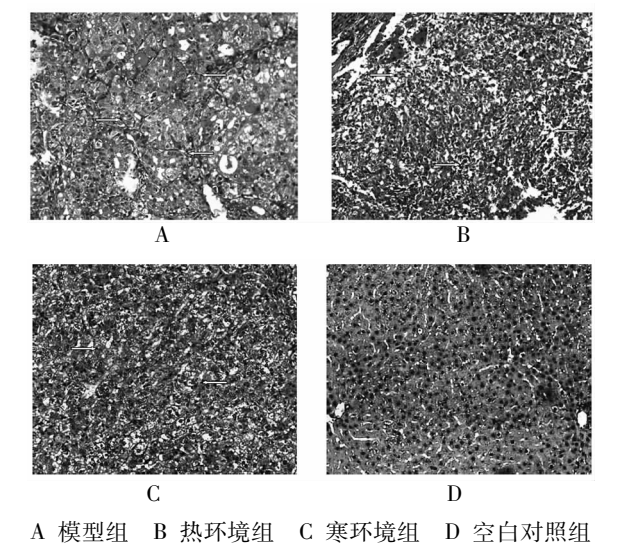


图 1 各组大鼠肝组织 HE 染色 ($\times 200$)

2.4 寒热环境对 DEN 诱发性肝癌大鼠 Th1、Th2 细胞因子的影响

干预 20 周后, ELISA 检测血清细胞因子, 结果显示, 模型、热环境、寒环境和 N 组比较, IL-2、IFN- γ 呈显著下降趋势, 其中热环境组最低, 而在寒环境中的寒环境组相对高; IL-4、IL-10 则显著升高, 数值最高的为热环境组, 而寒环境组则相对较低, 具体数值见表 2。

表 2 各组大鼠的血清 Th1、Th2 细胞因子的浓度 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	IL-2/(pg/mL)	IFN- γ /(pg/mL)	IL-4/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)
空白对照组	28.08 $\pm$ 8.62	21.53 $\pm$ 6.42	6.00 $\pm$ 0.99	49.68 $\pm$ 17.21
模型组	15.17 $\pm$ 4.19	6.32 $\pm$ 2.14 * Δ	10.99 $\pm$ 4.91	72.36 $\pm$ 10.36 * Δ
热环境组	8.59 $\pm$ 4.29 *	3.38 $\pm$ 1.32 *	15.29 $\pm$ 6.96 *	90.38 $\pm$ 16.18 *
寒环境组	15.49 $\pm$ 7.16	8.15 $\pm$ 3.17 * Δ	7.82 $\pm$ 5.51	60.31 $\pm$ 13.86 Δ

与正常组比较, * $P < 0.05$; 与热环境组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

研究已证实,肿瘤的发生是环境因素和遗传因素共同作用的结果,其中环境因素在肿瘤的发病中起着重要作用,如肝癌的分布具有明显的地域环境特征^[2],就世界范围而言,肝癌高发的国家和地区主要分布在亚洲的东南亚和非洲的东南非,在中国主要集中在东南沿海,高发地区气候均具有温暖、潮湿、多雨的特点^[3]。中医理论认为,外界环境不但可以影响人的生理、导致机体发病,而且对人的疾病过程也会产生各种的影响。祖国医学将外界环境分为“风寒暑湿燥火”六大类,每一类均是导致疾病发生的重要原因,且在致病和疾病演变上各有特点。根据阴阳学说,又可以把它们进一步分为阴阳两大类,其中寒和热是阴阳两类外环境致病因素的典型代表。基于上述认识,我们以环境中的寒热变化(温度)为切入点,观察不同寒热环境刺激对DEN诱发性大鼠肝癌模型肿瘤生物学特征的影响。在预实验的基础上,设定了热环境温度 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 和寒环境温度 $0 \pm 2^\circ\text{C}$ 。实验20周后观察到,寒热环境的两组与模型组比较,尽管趋势明显,但统计差异不显著;但两者比较,热环境下DEN诱发性肝癌大鼠的成瘤率和脾指数明显要比寒环境下的高,初步说明长期的寒、热不同环境刺激可能会对肿瘤的生成和预后产生不同的影响。

免疫系统是机体对抗外来病原体及有效防止肿瘤形成和生长的重要屏障,主要包括细胞免疫和体液免疫,分别由不同的细胞及其分泌物介导。其中T细胞介导的细胞免疫,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用,T淋巴细胞又分为Th1、Th2两个功能亚群^[4],以表达IL-2和IFN- γ 为主的Th1细胞,可以增强杀伤性效应细胞的细胞毒性作用,主要介导抗肿瘤的细胞免疫反应;以表达IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13为主的Th2型细胞,促进机体抗体的产生,介导体液免疫反应,同时也抑制Th1细胞分泌其系列因子。近年来研究表明^[5],大多数肿瘤患者和荷瘤动物体内Th1细胞功能下降,而Th2细胞功能相对升高,具体表现在Th1细胞产生的细胞因子减少,而Th2细胞产生的细胞因子增多。Th1型细胞因子较Th2型细胞因子分泌增多称

为Th2/Th1型偏移,Th2型细胞因子较Th1型细胞因子分泌增多称为Th1/Th2型偏移^[6],Th1/Th2型偏移,提示机体细胞免疫功能下降,免疫监视功能降低,有利于肿瘤的生长;Th2/Th1型偏移,则细胞免疫功能增强,具有有效的抑制肿瘤生长的效应^[7]。本实验观察到,热环境下DEN诱发性的肝癌大鼠IL-2和IFN- γ 分泌均减少,而IL-4、IL-10分泌则增多,发生了Th1/Th2型偏移,与模型组的变化一致;而寒环境组与正常对照组比较,仅IFN- γ 分泌减少,但却明显高于热环境下肝癌大鼠分泌量。这一结果提示,热环境可能通过抑制T细胞分泌Th1型细胞,增加Th2型细胞,从而进一步加重了DEN诱发性的肝癌大鼠免疫抑制状态,而寒环境则似对上述病理过程有一定的改善作用,这可能是寒热环境对DEN诱发性大鼠肝癌模型产生不同影响的机制之一。本文只是从肝癌模型大鼠的免疫因子受寒热刺激影响的角度进行了观察,对于寒热环境刺激对于正常大鼠免疫因子的影响本文未做研究,这可以作为进一步研究的方向之一。

[参考文献]

- [1] 中华病理学杂志编委会. 实验肿瘤专题座谈会纪要[J]. 中华病理学杂志, 1988, 17(2): 84.
- [2] 姜月里. 癌症的预防[J]. 现代中医药, 2006, 4: 4-9.
- [3] 吕书勤, 凌昌全. 浅析肝癌与“湿”[J]. 天津中医药, 2004, 21(2): 134-136.
- [4] Mosmann FR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more [J]. Immunol Today, 1996, 17: 138-146.
- [5] Clerici M, Clerici E, Shearer GM. The tumor enhancement phenomenon: reinterpretation from a Th1/Th2 perspective [J]. J Natl Cancer Inst. 1996 Apr 3; 88(7): 461-2.
- [6] 张圣林, 邱法波, 吴力群. Th1/Th2偏移与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(2): 113-117.
- [7] 程志强, 刘保瑞. Th1/Th2漂移与肿瘤免疫治疗[J]. 江苏医药, 2006, 32(6): 567-568.

(编辑:迟越)

(英文摘要见第43页)