

循环应用低剂量环磷酰胺联合白细胞介素-2 对乳腺癌荷瘤小鼠调节性 T 细胞及生存期影响

刘红光¹, 余键涛², 康颖³, 刘登辉¹, 文波¹, 赵茂勋¹, 王雄宇¹

(1. 南华大学附属第一医院肿瘤防治中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 邵阳市中心医院外五科;
3. 南华大学医学院外科学教研室)

摘要: **目的** 了解循环应用小剂量环磷酰胺 (CTX) 联合白细胞介素-2 (IL-2) 对 4T1Balb/c 乳腺癌荷瘤小鼠调节性 T 细胞 (Treg) 及其生存期影响。 **方法** 通过皮下接种 4T1 乳腺癌细胞建立乳腺癌 Balb/c 荷瘤小鼠模型; 荷瘤小鼠随机分为 IL-2 组、CTX 组、IL-2 + CTX 组及对照组, 在种瘤第 10 天开始对荷瘤小鼠分别经腹腔按方案给药, 部分小鼠在末次给药后 4 天处死, 流式细胞术检测小鼠脾脏中 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 调节性 T 细胞数量; 余小鼠观察生存期。 **结果** IL-2 组、CTX 组、IL-2 + CTX 组及对照组调节性 T 细胞比例分别为 26.00% ± 0.98%、11.30% ± 0.85%、20.15% ± 1.11%、17.50% ± 1.13%, 组别之间差异均有显著性 ($P < 0.05$)。IL-2 + CTX 组小鼠最长存活 57 天, 对照组小鼠最长存活 46 天, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。 **结论** IL-2 联合循环应用 CTX 将调节性 T 细胞持续维持在较低水平, 从而延长小鼠生存期。

关键词: 环磷酰胺; 白细胞介素-2; 调节性 T 细胞

中图分类号: R730.51 文献标识码: A

Influence of Cyclical Administration with Low-dose Cyclophosphamide and Interleukin-2 on Regulatory T Cells of Murine Breast Cancer Model and Its Life Span

LIU Hongguang, SHE Jiantao, KANG Ying, et al

(Department of Tumorology Prevention and Cure Center, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China)

Abstract: **Objective** To observe the influence of cyclical administration with Cyclophosphamide (CTX) and Interleukin-2 (IL-2) on regulatory T cells (Treg) of murine breast cancer model and its life span. **Methods** Murine breast cancer model was established by inoculating s. c. mice with 4T1 breast cancer tumor cell line. Tumor-bearing BALB/c mice were randomly divided into four groups: IL-2 group and CTX group and IL-2 + CTX group and control group. Mice in groups were injected intraperitoneally on schedule at the tenth day after tumor was established. Part of mice were sacrificed on day 4 after the last administration. We examined Regulatory T cells ratio of spleen cells by flow cytometry. Others were observed for survival. **Results** The CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ ration in spleens of IL-2 group, CTX group, IL-2 + CTX group and control group were 26.00% ± 0.98%, 11.30% ± 0.85%, 20.15% ± 1.11%, 17.50% ± 1.13% respectively. Significant differences were observed between each group ($P < 0.05$). The longest life span in IL-2 + CTX group and control group were 57 days and 46 days respectively, significant differences were observed between these groups. **Conclusions** Cyclical administration of low dose CTX keep Treg ratio which were expanded by IL-2 in a low level lead to a longer life span.

Key words: cyclophosphamide; interleukin-2; regulatory T cell

现 IL-2 在增强患者机体免疫的同时增加了调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)的比例^[1]。目前研究认为调节性 T 细胞抑制机体抗肿瘤免疫^[2],促进肿瘤发展,并与患者预后密切相关^[3],这也许是 IL-2 抗肿瘤效果不明显的原因。近年来,有关实验证明,低剂量环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)能选择性清除 Treg 并且增强机体免疫,其效应与时间相关^[4-5]。本文前期研究显示,单次小剂量 CTX 可以有效调节 Treg 比例,并且减少肿瘤重量,促进抗肿瘤免疫。但由于小剂量 CTX 去除 Treg 的时间依赖性,Treg 的比例在用药后 10 天便恢复,单次小剂量 CTX 难以达到长期的治疗效果。本研究通过观察循环应用小剂量 CTX 对荷瘤小鼠 Treg 的影响及用药后小鼠生存期,从免疫角度探讨其联合用药的作用,旨在为增强乳腺癌的治疗效果提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只,雌性,18~20 g,6~8 周龄,购自北京华阜康生物技术有限公司(许可证编号:SCXK(京)2009-0007),SPF 级乳腺癌 4T1 荷瘤小鼠 2 只(传代用)购自北京力科爱达生物技术咨询服务中心。

1.2 主要试剂及仪器

注射用 CTX 购自江苏恒瑞医药股份有限公司;注射用重组人白介素-2 购自江苏金丝利药业有限公司;小鼠调节性 T 细胞流式检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司;小鼠 INF- γ 试剂盒购自美国 RD 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;酶标仪(PW-812)购自深圳汇松仪器设备有限公司;洗板机(MB-530)购自深圳汇松仪器设备有限公司;恒温箱(DHG-9202-O)购自上海光都仪器设备有限公司。

1.3 乳腺癌荷瘤小鼠模型的制备

乳腺癌 4T1 荷瘤小鼠在肿瘤后 2 周人道处死,酒精消毒后无菌条件下剥除肿瘤,肿瘤切成碎块后放入玻璃匀浆器中加入适量磷酸盐缓冲液(PBS)匀浆。匀浆后组织用尼龙滤网过滤后调整细胞浓度至 1×10^7 /mL,制成肿瘤细胞悬液,取细胞悬液 0.1 mL 注射在 BALB/c 小鼠右侧腋窝。大约在肿瘤 1 周后,在右侧腋窝可扪及小结节,至此,乳腺癌模型建立成功。

1.4 动物分组及给药

将荷瘤小鼠随机分为 4 组,每组 10 只。对照组:肿瘤后第 10 天开始连续给予 PBS 至第 21 天,第 10、16、21 天给予生理盐水;IL-2 治疗组:肿瘤后第 10 天开始连续给予 IL-2 至第 21 天,第 10、16、21 天给予生理盐水;CTX 治疗组:第 10 天开始连续给予 PBS 至第 21 天,肿瘤后第 10、16、21 天开始给予 CTX;IL-2 + CTX 治疗组:肿瘤后第 10 天开始连续给予 IL-2 至第 21 天,第 10、16、21 天给予 CTX。以上均为腹腔注射,一天一次,CTX 剂量为 25 mg/kg,IL-2 为 40 000 U,均用生理盐水配制。

1.5 小鼠脾脏 CD4⁺CD25⁺Treg 比例检测

每组随机取 4 只小鼠于停药后第 4 天人道处死后取脾脏,脾脏组织研磨后经尼龙细胞滤网过滤,取滤过液用 ACK 裂解液裂解红细胞,制备脾淋巴细胞悬液。将细胞悬液用预冷 PBS 在显微镜下调至 1×10^7 cells/mL,取 100 μ L 细胞悬液加入 EP 管后加入 0.125 μ g CD4-FITC、0.06 μ g CD25-PE 抗体和 Fc block,黑暗环境中 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,冷 PBS 洗涤后加入固定剂,黑暗中 4 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,再次洗涤后冷 PBS 重悬,上流式细胞仪检测,CellQuest 软件分析。以 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 比值反映 Treg 的含量。

1.6 生存期的观察

剩余小鼠以死亡为观察终点,观察其存活期。

1.7 统计学分析

数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,实验数据用均数 \pm 标准差表示,各组均数间比较均采用方差分析,小鼠生存期采用 Kaplan-Meier 法分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组用药方案后 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 的比例

检测结果显示,IL-2 组及 IL-2 + CTX 组 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 比值明显高于对照组($P < 0.05$);CTX 组其比值明显低于对照组($P < 0.05$);IL-2 + CTX 组其比值明显低于 IL-2 组($P < 0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 各组小鼠脾脏细胞 CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ 比值($n=4$)

组别	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /CD4 ⁺ 比例
IL-2 组	26.00 \pm 0.98 ^a
CTX 组	11.30 \pm 0.85 ^{abc}
IL-2 + CTX 组	20.15 \pm 1.11 ^{ab}
对照组	17.50 \pm 1.13

与对照组比较,a, $P < 0.05$;与 IL-2 组比较,b, $P < 0.05$;与 IL-2 + CTX 组比较,c, $P < 0.05$

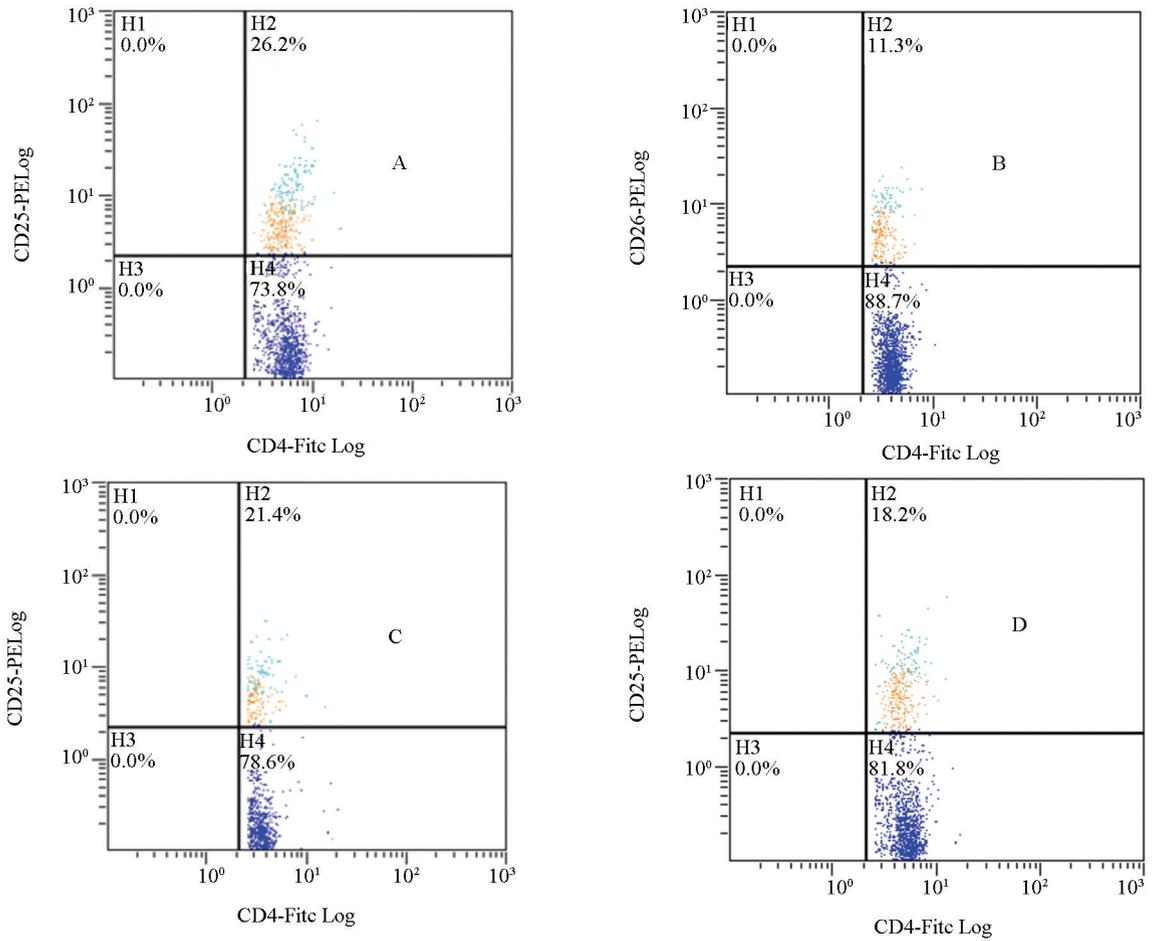


图 1 流式细胞检测调节性 T 细胞的结果 A: IL-2 组; B: CTX 组; C: IL-2 + CTX 组; D: 对照组

2.2 各组不同用药方案后小鼠生存期的比较

IL-2 组小鼠最长存活 50 天; CTX 组小鼠最长存活 48 天; IL-2 + CTX 组最长存活 57 天; 对照组最长存活 46 天。IL-2 组与对照组生存期间差异无显著性 ($P > 0.05$); IL-2 + CTX 组生存时间长于对照组 ($P > 0.05$)。IL-2 + CTX 组中位生存期长于 IL-2 组及 CTX 组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 2)。

3 讨 论

Treg 大约占正常人外周血中 $CD4^+$ T 细胞的 5% ~ 10% [6], 其主要功能是分泌包括白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 等在内的免疫抑制因子 [7-8], 从而维持机体免疫耐受。实验证明在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤患者外周血中 Treg 比例明显增高 [9]。由于 Treg 能通过多种机制抑制免疫 [10], 目前认为 Treg 的上调可以抑制机体对肿瘤的免疫应答, 从而导致肿瘤免疫耐受, 促进肿瘤免疫逃避 [11]。因此, 通过各种手段调控 Treg, 可能是肿瘤免疫治疗的一种途径。

CTX 作为抗肿瘤药物, 已广泛应用于临床, 其具有直接细胞毒作用, 大剂量应用时能抑制免疫。目前认为小剂量 CTX 在选择性的杀伤 Treg 的同时不影响效应 T 细胞的功能, 其选择性杀伤 Treg 的机

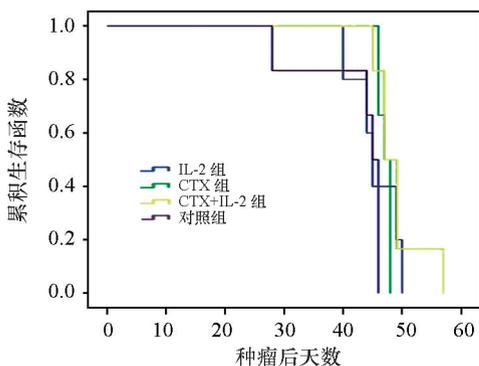


图 2 各组荷瘤小鼠生存曲线

制被认为与 Treg 细胞内低水平的三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 有关^[12]。在单次应用小剂量 CTX 后,小鼠体内 Treg 在第 3~4 天降至最低,在 10 天后恢复正常,这意味着低剂量 CTX 删除 Treg 具有时间依赖性^[5]。因此,为达到长久且持续的抗肿瘤效果,有节律的循环应用 CTX 成为了本研究的选择。本研究发现在循环应用 CTX 后,与对照组相比荷瘤小鼠脾脏 Treg 比例明显减少,这与相关实验结果相一致^[13]。与对照组相比,IL-2 实验组的小鼠调节性 T 细胞比率明显增加,这说明 IL-2 在增强免疫的同时也促进 Treg 增殖从而抑制免疫。同时实验结果显示,与对照组相比,IL-2 组小鼠生存期无明显延长。单独使用 IL-2 在此试验中抗肿瘤效果不明显的原因是因为 IL-2 促进了 Treg 增殖。本研究结果显示,在使用 IL-2 时联合使用循环应用低剂量 CTX 删除 Treg 细胞,小鼠生存期延长,且同对照组相比,差异有显著性,这可能与循环使用小剂量 CTX 持续减少 Treg 比例有关。

目前,国内外在应用低剂量 CTX 对 Treg 进行调控的抗肿瘤研究大多数集中在单次小剂量上,如 Liu^[14] 所进行的研究;仅有少数研究循环应用小剂量环磷酰胺对调节性 T 细胞的影响,如李卫泊^[13,15]。本研究循环使用小剂量 CTX 联合 IL-2 在小鼠乳腺癌模型中进行实验,并取得了一定的成果,有可能为肿瘤的治疗提供新的方案。

参考文献:

[1] d'Hennezel E, Kornete M, Piccirillo CA. IL-2 as a therapeutic target for the restoration of Foxp3⁺ regulatory T cell function in organ-specific autoimmunity: implications in pathophysiology and translation to human disease [J]. *J Transl Med*, 2010, 8:113.

[2] Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression [J]. *Immunity*, 2009, 30(5):636-645.

[3] Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival [J]. *Nat Med*, 2004, 10(9):942-949.

[4] Ikezawa Y, Nakazawa M, Tamura C, et al. Cyclophosphamide decreases the number, percentage and the function of CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells, which suppress induction of contact hypersensitivity [J]. *J Dermatol Sci*, 2005, 39(2):105-112.

[5] Motoyoshi Y, Kminoda K, Saitoh O, et al. Different mechanisms for anti-tumor effects of low- and high-dose cyclophosphamide [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(1):141-146.

[6] 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.

[7] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans [J]. *Immunol Rev*, 2006, 212:28-50.

[8] Han Y, Guo Q, Zhang M, et al. CD69⁺ CD4⁺ CD25⁻ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1 [J]. *J Immunol*, 2009, 182(1):111-120.

[9] Schabowsky RH, Madireddi S, Sharma R, et al. Targeting CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T-cells for the augmentation of cancer immunotherapy [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007, 8(12):1002-1008.

[10] 于益芝,曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1):1-6.

[11] Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, et al. CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model [J]. *J Immunol*, 2007, 178(11):6840-6848.

[12] Zhao J, Cao Y, Lei Z, Selective depletion of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(12):4850-4858.

[13] 李卫泊,尹昱,蔡建辉,等. 循环应用低剂量环磷酰胺对黑色素瘤荷瘤小鼠调节性 T 细胞的影响及抗癌作用 [J], *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(4):403-407.

[14] Liu JY, Wu Y, Zhang XS, et al. Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(10):1597-1604.

[15] 李卫泊,尹昱,张峻岭,等. 低剂量循环应用环磷酰胺联合树突状细胞疫苗对小鼠黑色素瘤的治疗效果 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 24(6):709-713.

(此文编辑:蒋湘莲)