

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.01.007

慢性复合应激对食管肿瘤大鼠模型细胞免疫及肿瘤标志物的影响

王继云, 张俊权, 张建伟, 王建军, 刘本刚, 李万刚

Effects of Chronic Composite Stress on Cell Immunity and Tumor Marker in Esophageal Neoplasia Model Rats

Wang Jiyun, Zhang Junquan, Zhang Jianwei, Wang Jianjun, Liu Bengang, Li Wangang

Department of Thoracic Surgery, China Natural Gas and Petroleum Corporation Central Hospital, Langfang 065000, China

Abstract: Objective To study the effect of multiple stresses on the changes of cellular immunity and tumor marker in oesophageal neoplasia of rats by animal modeling. **Methods** Wistar rats were chosen for experiment and pathological examination fully confirmed the occurrence of oesophageal cancer in the examined rats. After success of modeling, 40 rats with oesophageal neoplasia were randomly divided into two groups, with twenty in each group. One group were treated with chronic composite stress. The other group was used as control, and normally feed. Before the start of experiment, T-lymphocyte subsets, i. e. CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ and tumor marker, i. e. CEA, CA19-9, CA724, CYFRA21-1 and SCC in each rat were measured. Four weeks stress was supplied for treated rats. Then above parameters were measured again in the control and treated rats. The data were analyzed between control and treated groups. Therefore, we could conclude the effects of stress on cellular immunity function and tumor markers. **Results** Values of CD3⁺, CD4⁺, CD4⁺/CD8⁺ of 40 rats with oesophageal neoplasia before experiment were respectively $(65.37 \pm 4.51) \mu\text{g/L}$, $(30.68 \pm 5.40) \mu\text{g/L}$ and $(1.37 \pm 0.22) \mu\text{g/L}$, while they were $(82.67 \pm 5.55) \mu\text{g/L}$, $(17.81 \pm 1.53) \mu\text{g/L}$ and $(0.84 \pm 0.12) \mu\text{g/L}$ of the treated group after the stress. There were statistic significance before stress and after stress ($P < 0.05$). In contrast values of the control were $(67.14 \pm 1.49) \mu\text{g/L}$, $(35.70 \pm 5.72) \mu\text{g/L}$ and $(1.31 \pm 0.15) \mu\text{g/L}$ after experiment, without statistic significance ($P > 0.05$). There were statistic significance between the control and treatment ($P < 0.01$). Contents of tumor marker CEA and SCC before experiment were $(4.85 \pm 0.93) \mu\text{g/L}$ and $(1.82 \pm 0.61) \mu\text{g/L}$, and after experiment for treated group were $(6.82 \pm 1.06) \mu\text{g/L}$ and $(3.12 \pm 1.21) \mu\text{g/L}$ with statistic significances compared with the control and before experiment, respectively ($P < 0.05$). Other three parameters for tumor marker were statistic significance neither the control/treatment, nor before/after experiment ($P > 0.05$). **Conclusion** Chronic stress affects the body cell immunity function resulting from immunity decline and impacts the development of tumor.

Key words: Stress; Esophageal neoplasia; Rat; Cell immunity; Tumor marker

摘要: 目的 研究慢性复合应激对食管肿瘤大鼠的细胞免疫和肿瘤标志物的影响。**方法** 选用 Wistar 大鼠, 制作食管肿瘤大鼠模型, 造模成功后, 将 40 只食管肿瘤大鼠随机分为两组, 每组 20 例, 一组行 4 周慢性复合应激, 一组正常饲养。观察实验组与对照组应激前后及组间各指标变化, 分析慢性复合应激对大鼠细胞免疫功能及肿瘤标志物的影响。**结果** 40 只患食管肿瘤的 Wistar 大鼠实验前的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 值分别为 $(65.37 \pm 4.51) \mu\text{g/L}$ 、 $(30.68 \pm 5.40) \mu\text{g/L}$ 、 $(1.37 \pm 0.22) \mu\text{g/L}$, 实验组应激后值分别为 $(82.67 \pm 5.55) \mu\text{g/L}$ 、 $(17.81 \pm 1.53) \mu\text{g/L}$ 、 $(0.84 \pm 0.12) \mu\text{g/L}$, 与应激前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组 $(67.14 \pm 1.49) \mu\text{g/L}$ 、 $(35.70 \pm 5.72) \mu\text{g/L}$ 、 $(1.31 \pm 0.15) \mu\text{g/L}$, 与实验前接近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。肿瘤标志物实验前 CEA 的含量为 $(4.85 \pm 0.93) \mu\text{g/L}$, SCC 的含量为 $(1.82 \pm 0.61) \mu\text{g/L}$, 实验组应激后 CEA 和 SCC 分别为 $(6.82 \pm 1.06) \mu\text{g/L}$ 和 $(3.12 \pm 1.21) \mu\text{g/L}$, 与实验前比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与对照组比较差异亦有统计学意义。其余指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 慢性复合应激导致肿瘤大鼠细胞免疫力下降, 对肿

瘤进展有一定影响。

关键词: 应激; 食管肿瘤; 大鼠; 细胞免疫; 肿瘤标志物

中图分类号: R735.1 文献标识码: A

文章编号: 1000-8578(2012)01-0028-04

收稿日期: 2011-05-12; 修回日期: 2011-08-25

作者单位: 065000 河北廊坊, 中国石油天然气集团公司中心医院胸外科

作者简介: 王继云 (1976-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事微创胸外科学的研究

0 引言

现代医学认为应激是机体对各种刺激产生的一些非特异性反应,机体通过交感-肾上腺素髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺素皮质系统分泌的应激激素来调节并对不同应激做出反应,强烈和长期的应激刺激可对机体产生不利影响,大约有 2/3 的疾病或机体异常是由直接或间接的应激刺激所致^[1]。国内外研究已证实,应激能够影响动物和人体的免疫功能^[2],随着传统的生物医学模式向生物-心理-社会医学模式转变,人们越来越重视应激对免疫及肿瘤发生、发展、预后的影响。

1 材料与方法

1.1 食管肿瘤大鼠模型的建立

1.1.1 选用 Wistar 大鼠,体重(110 ± 10) g,2 月龄,雌雄各半,由北京维通利华实验动物技术公司提供。在北京大学医学部动物实验室 SPF 环境下饲养。温度(20 ± 2)℃;(50 ± 10)%相对湿度;12 小时光照/12 小时黑暗。每周记录大鼠体重、食物消耗。

1.1.2 选取健康 Wistar 大鼠 60 只,每周 1 次背部皮下注射 N-亚硝基甲脒(N-nitroso methyl benzyl amine NMBA,纯度 98%),购自美国 Invitrogen 公司,用 20% DMSO 溶解 NMBA,用量:每周 0.5mg/kg。从第 15 周开始每周处死 2 只大鼠,解剖观察食管黏膜改变,逐只记录肿瘤大小、数量、形态。标本以 10% 福尔马林固定,常规病理制片。20 周时,所解剖 2 只大鼠食管均出现肿物,食管处均有瘤体形成,同时病理学检查均证实为食管癌(鳞状细胞癌),见图 1。与文献报道食管肿瘤大鼠造模时间一致。

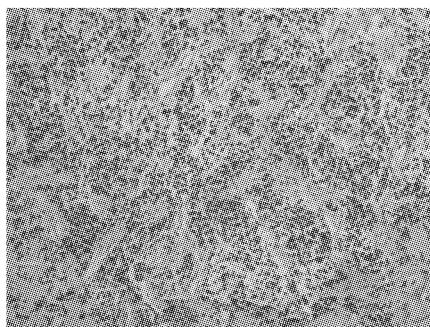


图 1 大鼠鳞状细胞癌(20 周)(HE 染色 $\times 100$)

Figure 1 Esophageal squamous cell carcinoma of rat (20 weeks)(HE $\times 100$)

1.2 慢性复合应激流程

(1)饮水冲突:设计在标准大鼠饲养笼,将电脑时控仪和实验组的饲养笼接成电流环路,电压 36 伏,电流 1 毫安,随机设定电脑时控仪程序,当大鼠

饮水时因电路连接会受到电击,不饮水则电路不通,每周 1 次,通电间隔时间随机设定,总时间不超过 20 h/d。(2)限制:将大鼠限制在一狭小的容器中(自制一塑料瓶,直径 9 厘米,长 22 厘米,一端敞小口,一端为活动式大口),在此容器中大鼠可以翻滚身体,但不能前后左右活动,每周 2 次,每次 2 h。(3)噪音和闪烁照明刺激仪(北京纽森特瑞科技有限公司)连接电脑时控仪,可分别随机设定噪音和闪烁照明的刺激时间,噪音强度为 90 分贝,每周 2 次,每次 4 h,间隔时间随机设定;闪烁照明灯距离鼠笼上方 10 cm,闪烁频率为 3 次/秒,每周 2 次,一次 6 h,一次 4 h,间隔时间随机设定。(4)拥挤:将 10 只大鼠放置于标准鼠笼中,每周 2 次,每次 12 h。(5)潮湿环境:将 300 毫升水混合到垫料中,每周 1 次,每次 16 h。(6)实验流程:将 40 只食管癌大鼠随机分成 2 组,实验开始时两组分别行 T 淋巴细胞亚群检验及测定 5 种肿瘤标志物。一组接受复合刺激,一组正常饲养,应激 4 周后分别将两组大鼠再次行上述实验。

1.3 T 细胞亚群检测

全部数据由流式细胞仪(美国 Bechman Coulter 公司,型号为 EPICSXL)及 SYSTEM II SOFTWARE V3.0 软件获取和分析。

1.4 肿瘤标志物测定

1.4.1 仪器和试剂 全自动电化学发光免疫分析仪为瑞士 Roche 公司的 Elecsys 2010,Abbott IMX 酶免疫分析仪(美国)。CEA、CA19-9、CA724 和 CY-FRA21-1 试剂盒和质控物由瑞士 Roche 公司提供,SCC 试剂盒和质控物由美国 Abbott 公司提供。

1.4.2 方法 CEA、CA19-9、CA724 和 CY-FRA21-1 测定均应用电化学发光免疫分析法(Electro Chemiluminescence Immunoassay,ECLIA),SCC 测定应用微粒子酶联免疫测定法(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay,ELISA)严格按试剂盒说明书操作,用配套试剂测定质控品,数值在标定值允许范围内。

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验开始前实验组与对照组 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 5 项肿瘤标志物 CEA、CA19-9、CA724、CYFRA21-1 和 SCC 统计分析差异无统计学意义($P > 0.05$)。按照大鼠与人对应应激时间的比率,将实验组动物慢性复合应激 4 周,

4 周后同时行外周血 T 淋巴细胞亚群和 5 项肿瘤标志物的检测,其结果为实验组应激前后 CD3+、CD4+、CD4+/CD8+ 差异有统计学意义($P<0.05$)。对照组 T 淋巴细胞亚群 3 项指标均差异无统计学意义($P>0.05$)。而实验组与对照组实验后 CD3+、CD4+、CD4+/CD8+ 各项指标均差异有统计学意义($P<0.01$),见表 1。本实验五项肿瘤标志物 CEA、CA19-9、CA724、CYFRA21-1 和 SCC 中,实验组和对照组实验开始之前差异无统计学意义($P>0.05$)。实验组应激前后 CEA 和 SCC 两项指标差异有统计学意义($P<0.05$),其余三项应激前后差异无统计学意义($P>0.05$)。实验前后对照组五项指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。应激后实验组与对照组 CEA 和 SCC 差异有统计学意义,其余三项差异无统计学意义,见表 2。

表 1 T 淋巴细胞亚群实验组
及对照组应激前后变化($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 1 Changes of peripheral blood T-lymphocyte subsets
of experimental group and
control group before and after stress($\bar{x}\pm s, n=20$)

Groups	CD3+	CD4+	CD4+/CD8+
Experimental group before stress	65.37 $\pm$ 4.51	30.68 $\pm$ 5.40	1.37 $\pm$ 0.22
Experimental group after stress	32.67 $\pm$ 5.55	17.81 $\pm$ 1.53	0.84 $\pm$ 0.12
Control group before experiment	65.56 $\pm$ 5.51	31.68 $\pm$ 5.46	1.35 $\pm$ 0.20
Control group after experiment	67.14 $\pm$ 1.49	35.70 $\pm$ 5.72	1.31 $\pm$ 0.15

Note: there were statistic significance among these groups with t-test($P<0.05$)

3 讨论

本实验拟采用由饮水冲突、限制、噪音闪烁照明、拥挤、潮湿环境 5 种应激原组成的“复合应激”,以模拟人类当前所面临的复杂生存环境,通

过观察细胞免疫因子和肿瘤标志物水平在应激前后及组间的变化,研究慢性复合应激与肿瘤进展的关系,为临床医学研究提供一定的理论依据。

肿瘤的发生、发展及预后与机体的免疫功能,特别是与 T 淋巴细胞功能有密切的关系^[3],T 淋巴细胞是具有多功能的细胞群体,在免疫应答的调控中发挥着重要的作用。T 淋巴细胞由不同的亚群组成,不同亚群的 T 细胞具有不同的表面分子,即具有不同的白细胞分化簇。因此,可以通过单抗检测 T 细胞表面不同的白细胞分化簇鉴定不同的 T 细胞亚群,不同的亚群有不同的免疫功能。CD3+ 抗原分子通常分布在成熟 T 细胞表面,故 CD3+ T 细胞数量可代表机体总 T 细胞数量,而 CD4+ T 细胞通常代表 T 辅助细胞,CD8+ T 细胞通常代表 T 抑制细胞,CD4+/CD8+ 比值反映了机体细胞免疫功能状态是否稳定,比值降低代表细胞免疫功能降低。近年来大量实验表明应激能使免疫功能发生抑制,这包括:淋巴细胞有丝分裂原反应降低;淋巴细胞细胞毒性降低,干扰素产生减少;吞噬作用降低;辅助性 T 细胞及抑制性 T 细胞细胞百分数及比率降低。经典的实验^[4]提示慢性应激组体内 Th1、Th2 细胞平衡被破坏从而降低机体的细胞免疫功能,本实验再次证明了这一点。刘继文等^[5]报道慢性应激对大鼠免疫功能损伤的研究,结果发现实验组与对照组动物 CD3+、CD4+ 及 CD4+/CD8+,指标均有显著降低($P<0.01$),提示应激使大鼠免疫功能受损,所以慢性应激对正常大鼠和肿瘤大鼠均有免疫破坏作用,最近卢莉等^[6]报道慢性应激对小鼠行为和免疫功能的影响,本实验研究了慢性复合应激引起 T 细胞亚群的变化,能代表 T 细胞免疫功能的 CD3+、CD4+、CD4+/CD8+ 指标在慢性复合应激后显著降低,证实了慢性应激能引起肿瘤大鼠免疫功能的下降,这也说明了慢性应激不仅对正常机体,而且对肿瘤机体的免疫功能亦有破坏。

表 2 五项肿瘤标志物应激前后的变化($\bar{x}\pm s, n=20$)

Table 2 Expressions of five tumor markers of stress group and control group($\bar{x}\pm s, n=20$)

Groups	CEA ($\mu\text{g/L}$)	CA19-9 (u/L)	CA724 (u/L)	CYFRA21-1 ($\mu\text{g/L}$)	SCC ($\mu\text{g/L}$)
Experimental group before stress	4.85 $\pm$ 0.93	18.08 $\pm$ 5.63	4.89 $\pm$ 4.33	4.09 $\pm$ 4.04	1.82 $\pm$ 0.61
Experimental group after stress	6.82 $\pm$ 1.06	19.10 $\pm$ 4.61	5.77 $\pm$ 3.54	4.54 $\pm$ 3.85	3.12 $\pm$ 1.21
Control group before experiment	4.72 $\pm$ 0.83	18.11 $\pm$ 5.23	4.82 $\pm$ 4.03	4.19 $\pm$ 4.01	1.79 $\pm$ 0.59
Control group after experiment	4.04 $\pm$ 0.82	19.50 $\pm$ 7.88	3.89 $\pm$ 4.33	4.11 $\pm$ 3.97	2.01 $\pm$ 0.67

Note: there were statistic significance among these groups with t-test($P<0.05$)

肿瘤标志物是指由肿瘤组织产生或肿瘤与宿主相互作用而产生的,可从血液、尿液或其他体液中检测得出,并可以此诊断肿瘤性疾病或监测肿瘤的发展^[7-8]。虽然特异性差,但往往能反映出肿瘤的进展与预后^[9]。文献报道在应激条件下荷瘤裸鼠血清中 CA125 水平显著升高,说明不良心理应激对卵巢癌的影响,使机体免疫力下降,促进肿瘤进展^[10]。本实验将 CEA、CA19-9、CA724、CYFRA21-1 和 SCC 五项标志物联合起来检测,更好的反映标志物水平与肿瘤进展的关系。应激后五项指标中只有 CEA 和 SCC 两项指标变化差异有统计学意义,在一定程度上反应出应激后肿瘤的进展。肿瘤标志物特异性不高,设想如检测更多的标志物,可以更好的支持应激诱发肿瘤进展这一理论。

关于慢性应激对机体免疫机能及肿瘤发生发展的影响,由于心理社会因素复杂,难于控制和定量以及研究方法、研究对象不同等原因,导致研究结果亦不尽一致,本实验支持了慢性复合应激导致机体免疫力下降、促进肿瘤的发生发展。这一过程可能涉及心理-神经-内分泌-免疫学、褪黑素、视黄醛核受体、与肿瘤血管生成有关的细胞因子、DNA 损伤及修复等因素,机制复杂,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. *Nat Med*, 1998, 4(7): 844-847.
- [2] Lawrence DA, Kim D. Central/peripheral nervous system and immune responses [J]. *Toxicol*, 2000, 142(3): 189-201.
- [3] Kuss I, Hathwa YB, Ferris RL, et al. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(11): 3755-3762.
- [4] Magnra S, Nwakeze PC, Demsky SD. Pre- and in-treatment predictors of retention in methadone treatment using survival analysis [J]. *Addiction*, 1998, 93(1): 57-60.
- [5] Liu JW, Yuan F, Lian YL, et al. Experimental study on the mechanism of chronic stress on immune function damage of rat [J]. *J Environ & Occupa Med*, 2007, 24(6): 599-602. [刘继文, 袁芳, 连玉龙, 等. 慢性应激对大鼠免疫功能的损伤机制的研究实验 [J]. *环境与职业医学*, 2007, 24(6): 599-602.]
- [6] Lu L, Li MF. Effect of chronic stress on behaviors and immunological function in mice [J]. *Chin J Clin Psycho*, 2009, 17(3): 369-370. [卢莉, 李敏芳. 慢性应激对小鼠行为和免疫功能的影响 [J]. *中国临床心理学杂志*, 2009, 17(3): 369-370.]
- [7] Macho L, Koska J, Ksinantova L, et al. The response of endocrine system to stress loads during space flight in human subject [J]. *Adv Space Res*, 2003, 31(6): 1605-1610.
- [8] Fan XL, Wang K, Zeng ZL. The value of preoperative combined detection of several serum tumor markers in patients with digestive system neoplasm [J]. *Lingnan Mod Clin Surg*, 2006, 6(4): 273-274. [樊孝廉, 王昆, 曾昭林, 等. 术前联合检测血清肿瘤标志物诊断消化系统肿瘤的临床价值 [J]. *岭南现代临床外科*, 2006, 6(4): 273-274.]
- [9] Marrelli D, Pinto E, De Stefano A, et al. Preoperative positivity of serum tumor markers in a strong predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2001, 78(4): 253-258.
- [10] Zhang YY, Gao GL, Gao J, et al. Expression of sIL-2R, VEGF and CA125 in nude mice bearing human ovarian carcinoma induced by adverse psychological stress [J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2011, 38(4): 365-368. [张艳玉, 高国兰, 高军, 等. 不良心理应激对人卵巢癌裸鼠血清 sIL-2R、VEGF 和 CA125 的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(4): 365-368.]

[编辑校对: 周永红]