

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.12.007

阿片类药物对肝癌小鼠细胞免疫功能及 IL-2 和 TNF- α 的影响

张 援*,阮 林

Effects of Cellular Immunity,IL-2 and TNF- α from Opioid Drugs on Hepatic Cancer Mice

Zhang Yuan*,Ruan Lin

Department of Anesthesiology,Cancer Hospital,Guangxi Medical University,Nanning 530021,China(* : Present:Department of Anesthesiology,Fujian Provincial Cancer Hospital,Fuzhou 350014,China)

Abstract: Objective To study the effects of cellular immunity,IL-2 and TNF- α caused by Opioid drugs on hepatic cancer mice. **Methods** The models of H22 hepatic cancer mice were established by the cell inoculation method;and the animals were randomly divided into 5 groups. 10 rats in each group were picked up randomly to detect of lymphocyte subsets CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ counts. The number of IL-2 and TNF- α were detected by Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA). **Results** Compared with the group Saline,the numbers of CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ and the ratios of CD4⁺/CD8⁺ showed no significant different in group Pethidine($P>0.05$),but decreased significantly in group Morphine,group Fentanyl and group Sufentanil($P<0.05$). Compared with group Saline,the numbers of IL-2 increased significantly in group Pethidine($P<0.05$);and the numbers of TNF- α showed no significant difference($P>0.05$);but the numbers of IL-2 and TNF- α decreased significantly in group Morphine,group Fentanyl and group Sufentanil($P<0.05$). **Conclusion** Morphine,Fentanyl and Sufentanil can suppress the immune function,significantly decrease IL-2 and TNF- α of hepatic cancer in mice. Pethidine suppress the immune function unobviously,and the numbers of TNF- α has no significant difference,but significantly increase the numbers of IL-2.

Key words: Opioid drugs; Hepatic cancer; Cellular immune function; IL-2; TNF- α

摘 要:目的 探讨不同的阿片类药物对肝癌小鼠细胞免疫功能及 IL-2 和 TNF- α 的影响。**方法** 采用细胞接种的方法建立 H22 肝癌小鼠动物模型,随机分成 5 组,每组 10 只,流式细胞仪技术检测肝癌小鼠 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 数值,双抗体夹心法(ELISA)检测小鼠血清 IL-2 和 TNF- α 数值。**结果** 与 0.9%氯化钠溶液组相比哌替啶组中肝癌小鼠 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 没有明显变化($P>0.05$),吗啡组、芬太尼组和舒芬太尼组均明显降低($P<0.05$);与 0.9%氯化钠溶液组比较哌替啶组小鼠血清 IL-2 含量明显升高($P<0.05$),血清 TNF- α 含量无明显差别($P>0.05$),与 0.9%氯化钠溶液组比较吗啡组、芬太尼组、舒芬太尼组血清 IL-2 和 TNF- α 均明显降低($P<0.05$)。**结论** 吗啡、芬太尼、舒芬太尼对肝癌小鼠 T 淋巴细胞亚群和 IL-2、TNF- α 明显抑制。哌替啶对肝癌小鼠 T 淋巴细胞亚群抑制不明显,能提高血中 IL-2 含量,对 TNF- α 水平无明显抑制。

关键词: 阿片类药; 肝癌; 细胞免疫功能; IL-2; TNF- α

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)12-1433-04

0 引言

阿片类药物有强效的镇痛作用,可治疗各种类型疼痛,但研究表明^[1-2]阿片类药物可以导致免疫抑制。恶性肿瘤患者机体免疫功能低下,因此在肿瘤患者的治疗中,理想的阿片类药物应具备既可充分镇痛,又能较少的抑制免疫功能,减少肿瘤术后复发。为此本研究以小鼠肝癌为肿瘤模型,采用腹腔阿片类药物注射方式进行实验,观察阿片类药物对肝癌小鼠细胞免疫功能、IL-2 和 TNF- α 抑制的影响,对人肝癌疼痛的治疗研究提供依据。

收稿日期:2012-02-07;修回日期:2012-08-10
作者单位:530021 南宁,广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科(*:现工作单位:350014 福州,福建省肿瘤医院麻醉科)
作者简介:张援(1983-),男,硕士,住院医师,主要从事肿瘤麻醉与镇痛方面的研究

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及饲养环境 健康雄性清洁昆明小鼠 50 只,体重 20~25 g,由广西医科大学动物实验中心提供。动物饲养房,温度:(22+1)℃,湿度:59%~61%,每天光照与黑暗时间各为 12 h,小鼠自由进水。鼠源肝癌细胞株 H22 腹水癌小鼠,由中国科学院上海药物研究所引进,广西壮族自治区肿瘤医院传代保种。
1.1.2 主要试剂和仪器 吗啡针剂,批号:2110701;哌替啶针剂,批号:20090405;芬太尼针剂,批号:2110701;舒芬太尼针剂,批号:101201;IL-2、TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肝癌模型的建立 从 H22 腹水癌小鼠抽取癌性腹水约 1ml,细胞计数,调整细胞浓度至每毫升

1×10⁷个细胞备用。将小鼠腹腔麻醉后,仰卧位,消毒,剪开皮肤和腹膜,显露肝左叶。用微量注射器抽取 50 μl 细胞悬液,针尖刺入小鼠肝脏注入细胞悬液,少量粘合剂涂抹于针孔处止血,缝合关腹^[3]。

1.2.2 实验动物分组及药物注射 接种次日,将 50 只雄性小鼠随机分为 5 组,即 0.9%氯化钠溶液组、吗啡 10 mg/kg 组、哌替啶 40 mg/kg 组、芬太尼 0.2 mg/kg 组、舒芬太尼 0.02 mg/kg 组,每组 10 只(实验所用药物的配制参考临床常用剂量及浓度,同时要使动物出现临床麻醉体征采用人与动物的体表面积计算法来换算)。造模成功后第 7 天开始采用腹腔注射给药,所给液体均配为 0.5 ml,每天 1 次,连续 3 天。

1.2.3 取材 最后一次腹腔注射给药 24 h 后,取小鼠眼眶血 2 ml。

1.2.4 指标检测 (1)全血 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 检测。每只肝癌小鼠摘眼球取血 1 ml,并加肝素抗凝。取 100 μl 抗凝血分别加入 CD3⁺ 抗体、CD4⁺ 抗体、CD8⁺ 抗体避光静置 15 min,之后加红细胞裂解液 1 ml 离心。弃上清液加 PBS 液,送广西壮族自治区人民医院流式细胞仪测定 T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的值。(2)血清 IL-2 和 TNF-α 检测。各组小鼠取血 1ml,不加抗凝剂,置于一次性离心管内,以

3000 r/min 离心 5 min,取血清置于 -20℃ 保存。采用 ELISA 法定定,操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件处理结果数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较用单因素方差分析,均数的两两比较采用 S-N-K 法,检验以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模过程一般情况观察

各组在建模手术后第二天平均体重降低,术后第三天恢复至术前水平,其后持续稳定上升。注药后吗啡组、芬太尼组和舒芬太尼组小鼠行为活动表现为兴奋状态,跳跃、竖尾、环绕饲养笼跑动,持续时间约 1 小时,而哌替啶组表现不明显。

2.2 阿片类药物对肝癌小鼠 T 淋巴细胞亚群影响

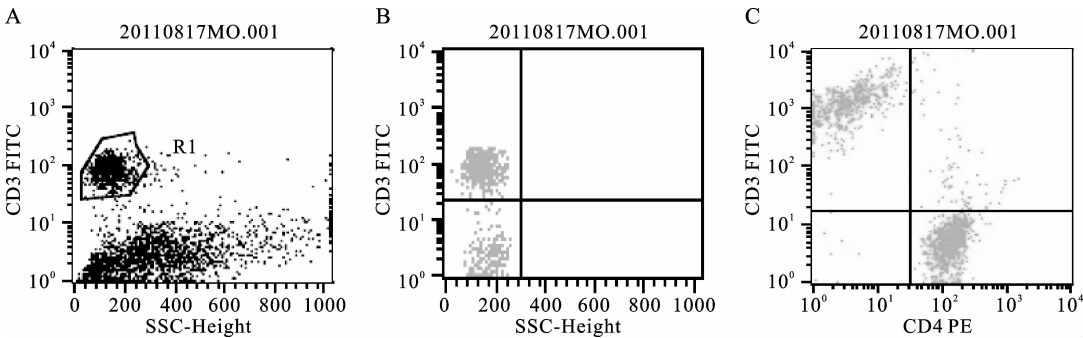
与 0.9%氯化钠溶液组相比,哌替啶组 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 没有明显变化 ($P>0.05$)。而吗啡组、芬太尼组和舒芬太尼组均明显降低 ($P<0.05$)。吗啡组、芬太尼组和舒芬太尼组和哌替啶组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。吗啡组、芬太尼组和舒芬太尼组三组之间比较差异没有统计学意义 ($P>0.05$),见表 1、图 1。

表 1 各组小鼠 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 数值比较

Table 1 Comparison of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in each group

Groups	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ (%)
Saline	41.39 ± 2.87	28.74 ± 2.42	16.29 ± 2.32	1.78 ± 0.29
Pethidine	39.35 ± 3.31	28.81 ± 3.94	15.28 ± 1.71	1.91 ± 0.35
Morphine	31.39 ± 2.67*#	20.05 ± 2.85*#	11.42 ± 2.01*#	1.81 ± 0.43
Fentanyl	30.16 ± 2.43*#	19.36 ± 3.48*#	11.31 ± 2.03*#	1.78 ± 0.54
Sufentanil	28.25 ± 2.89*#	17.89 ± 2.05*#	12.17 ± 1.96*#	1.52 ± 0.36*#

Note; compared with group Saline, * : $P<0.05$, showing significant difference; compared with group Pethidine, # : $P<0.05$, showing significant difference



A; R1 is scattering isolated CD3⁺ in side scatter(SSC); B; upper left quadrant is the number of CD3⁺ automatically analyzed by SimulSET software; C; setting gate according to CD3⁺, separate out CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺, the lower right quadrant is the number of CD3⁺ CD4⁺, Upper left quadrant is the number of CD3⁺ CD8⁺. The number of CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ are automatically analyzed by SimulSET software

图 1 流式细胞仪检测肝癌小鼠 T 淋巴细胞亚群

Figure 1 T lymphocyte subsets of hepatic cancer mice with flow cytometry

2.3 阿片药物液对肝癌小鼠 IL-2 和 TNF-α 的影响

与 0.9%氯化钠溶液组比较,哌替啶组 IL-2 含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组与 0.9%氯化钠溶液组比较,IL-2 含量均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组与哌替啶组比较,IL-2 含量差异均有统计学意义($P<0.05$),吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组三组之间 IL-2 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

与 0.9%氯化钠溶液组比较,哌替啶组 TNF-α 含量无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$),而吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组 TNF-α 含量明显降低,和 0.9%氯化钠溶液组比较差异有统计学意义($P<0.05$),吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组与哌替啶组比较,TNF-α 含量差异有统计学意义($P<0.05$),吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组三组之间 TNF-α 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 2 各组小鼠 IL-2 数值比较

Table 2 Comparison of IL-2 in each group

Groups	IL-2(pg/ml)
Saline	102.26 ± 29.45 [#]
Pethidine	262.92 ± 66.09 [*]
Morphine	60.31 ± 22.48 ^{*#}
Fentanyl	40.84 ± 12.95 ^{*#}
Sufentanil	64.39 ± 22.95 ^{*#}

Note:compared with group Saline,^{*}: $P<0.05$,showing significant difference;compared with group Pethidine,[#]: $P<0.05$,showing significant difference

表 3 各组小鼠 TNF-α 数值比较

Table 3 Comparison of TNF-α in each group

Groups	TNF-α(pg/ml)
Saline	22.77 ± 3.59
Pethidine	22.01 ± 3.99
Morphine	12.90 ± 2.21 ^{*#}
Fentanyl	11.07 ± 3.24 ^{*#}
Sufentanil	12.63 ± 3.26 ^{*#}

Note:compared with group Saline,^{*}: $P<0.05$,showing significant difference;compared with group Pethidine,[#]: $P<0.05$,showing significant difference

3 讨论

免疫系统在控制肿瘤生长中起着重要的作用,其中恶性肿瘤发病机制中一个重要因素是免疫失衡,T 淋巴细胞在肿瘤免疫中起中心调控作用,T 淋巴细胞亚群执行细胞免疫功能及免疫调节功能。它通过功能各异的淋巴细胞亚群来完成免疫监视机能,其中 CD3⁺ 细胞代表淋巴细胞总数,CD4⁺ 细胞为免疫应答中的主要反应细胞,具有增强和扩大其他免疫细胞的功能,CD8⁺ 细胞可对靶细胞产生细胞介导的细胞毒作用,同时对 CD4⁺ 细胞具有调节性免疫抑制作用,CD4⁺/CD8⁺ 的稳定比例维持着细胞免疫反应的平衡,CD4⁺/CD8⁺ 比值明显降低提示疾病严重、恶性肿瘤和预后不良^[4]。IL-2、TNF-α 等细胞因子对机体免疫应答的调节起着重要的作用^[5]。IL-2 亦称 T 细胞生长因子,主要由活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞产生,能激活多种免疫细胞,促进淋巴细胞有丝分裂,是调节机体免疫功能主要淋巴因子之一,可通过调节机体的免疫系统发挥抗肿瘤效应。TNF-α 是由单核巨噬细胞产生的一种潜在的细胞因子,具有广泛生物学活性,能够激活 T 细胞和刺激 B 细胞产生抗体、刺激单核细胞等产生细胞因子、促进白细胞杀死微生物及杀灭肿瘤细胞等功能^[6]。阿片药物可以通过抑制 T、B 淋巴细胞及 NK 细胞的增殖,降低细胞因子,如 IL-2、IL-4、IL-6 的产生^[7]。单核细胞表面具有阿片受体且分泌 IL-6,与这些受体结合引起细胞内腺苷-3',5'-环化一磷酸浓度下降,阿片类药物可能通过此种方式发挥作用^[8]。吗啡可以诱导单核细胞产生凋亡,从而抑制机体的免疫功能,可能导致肿瘤生长及复发。近年来也有人认为吗啡是可以抑制肿瘤生长的^[9],实验研究表明吗啡可以通过激活 p53 信号途径导致 MCF-7(人乳腺癌细胞株)、MDA-MB-231(人乳腺癌细胞株)和 HT-29(人结肠腺癌细胞株)的生长抑制、细胞周期阻滞以及凋亡^[10],同时对 A549(人肺腺癌细胞株)和 HL-60(人幼粒细胞白血病细胞株)具有生长抑制效应^[11]。本实验发现:除哌替啶组外,其余阿片药组的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 数量都比 0.9%氯化钠溶液组明显降低($P<0.05$);与 0.9%氯化钠溶液组相比,哌替啶组 IL-2 含量明显升高($P<0.05$),TNF-α 含量无明显变化($P>0.05$),而吗啡、芬太尼组和舒芬太尼组 IL-2 和 TNF-α 含量均明显降低($P<0.05$),说明哌替啶有

改善肝癌小鼠细胞因子作用,具有一定的调节机体免疫功能的作用,进而抑制肿瘤的生长,原因分析如下:其一,哌替啶的镇痛作用是吗啡的十分之一,且有一定的镇静作用,对机体的 T 淋巴细胞免疫抑制较轻,也可能通过激活 p53 信号途径导致 H22 肝癌株凋亡。其二,有研究表明^[12],镇静剂量的麻醉剂有助于降低生物体体温,从而抑制其新陈代谢速度,这对于阻止肿瘤快速生长可能具有意义,实验中哌替啶组的小鼠表现为安静状态,这对抑制新陈代谢速度、阻止肝癌生长有意义。最后,造模后小鼠有疼痛刺激,阿片类药物能减轻开腹和疼痛应激引起的免疫抑制,同时阿片药物本身具有免疫抑制作用,其中哌替啶对机体的免疫抑制较轻,又能减轻疼痛所引起的免疫抑制,二者综合起来起到一个积极意义的结果^[13]。这三方面可能是哌替啶能抑制肝癌小鼠肿瘤生长的原因,因此,对肝癌癌痛的治疗有参考价值。

参考文献:

[1] Tsai YC, Won SJ, Lin MT. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury[J]. Pain, 2000, 88 (2): 155-60.

[2] Bar-Yosef S, Melamed R, Page GG, et al. Attenuation of the tumor-promoting effect of surgery by spinal blockade in rats [J]. Anesthesiology, 2001, 94(6): 1066-73.

[3] Zhang Y, Xu HW, Zhang TP, et al. Establishment and improvement of primary hepatocarcinoma ICR mouse model by injection method [J]. Xi Bao Sheng Wu Xue Za Zhi, 2007, 29 (3): 434-8. [张煜, 徐涵文, 张太平, 等. 注射法制作 ICR 小鼠肝癌模型及其改进[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(3): 434-8.]

[4] Lu WF. Medical immunology [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2002: 94-6. [陆慰峰. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 94-6.]

[5] Gao P, Zhou AM. Malignancies in patients with red blood cell immunity and cytokines, and the relationship between free rad-

icals [J]. Di Si Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2005, 26(10): 908-11. [高萍, 邹爱民. 恶性肿瘤患者红细胞免疫和细胞因子与自由基关系的研究[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(10): 908-11.]

[6] Xia H, Li J, Yu CH, et al. Effect of TNF- α on the apoptosis of A549 cells[J]. Zhongguo Lin Chuang Yao Li Xue Yu Zhi Liao Xue, 2005, 10(12): 66-8. [夏晖, 李捷, 于长海, 等. TNF- α 对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(12): 66-8.]

[7] Li W, Tang HZ, Jiang YB, et al. Influence of Different Doses of Fentanyl on T- lymphocyte Subpopulations and Natural Killer Cells of Patients with Esophageal Tumor during Preoperation and Postoperation[J]. Ai Zheng, 2003, 22(6): 634-6. [李伟, 汤惠珍, 蒋艳波, 等. 不同剂量芬太尼对食管癌根治术患者术前术后 T 淋巴细胞亚群、NK 细胞的影响[J]. 癌症, 2003, 22(6): 634-6.]

[8] Sacerdote P. Opioid-induced immunosuppression[J]. Curr Opin Support Palliat Care, 2008, 2(1): 14-8.

[9] Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 441(3): 185-91.

[10] Cheng WF, Chen LK, Chen CA, et al. Chimeric DNA vaccine reverses morphine - induced immunos uppression and tumorigenesis[J]. Mol Ther, 2006, 13(1): 203-10.

[11] Hatsukari I, Hitosugi N, Ohno R, et al. Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro [J]. Anticancer Res, 2007, 27(2): 857-64.

[12] Zhang H, Yang Y, Liu J, et al. Suppressing effect of anesthetic on growth of emt6 breast cancer in mice [J]. Ke Ji Dao Bao, 2008, 26(4): 66-71. [张辉, 杨阳, 刘静, 等. 注射麻醉剂抑制小鼠 EMT6 乳腺肿瘤的生长[J]. 科技导报, 2008, 26(4): 66-71.]

[13] Xing CY, Wu MY, Fan HP. Effects of different anesthetic and analgesic protocols on cellular immune function and stress hormone level in patients undergoing lobectomy for esophagus cancer[J]. Nanfang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010, 30(2): 284. [邢翠燕, 吴明毅, 范海鹏. 不同麻醉和镇痛方法对食管癌手术患者细胞免疫功能及应激激素水平的影响[J]. 南方医科大学报, 2010, 30(2): 284.]

[编辑: 刘红武; 校对: 杨 卉]