

文章编号: 0258-7025(2004)03-0377-04

激光联用环磷酰胺对荷瘤鼠外周血 IgG 影响的实验研究

黄保续¹, 王洪斌^{1*}, 刘焕奇¹, 曲志娜², 刘西锋¹, 程绍辉¹, 高利¹

(¹ 东北农业大学动物医学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; ² 农业部动物检疫所, 山东 青岛 266032)

摘要 以小鼠 S180 腹水瘤为动物实验模型, 对氦氛激光照射与化疗药物环磷酰胺(CYT)联合应用对 S180 荷瘤鼠外周血 IgG 含量影响作了系统性研究。应用 11.00, 14.67 和 22.00 J/cm² 三种剂量氦氛激光照射荷瘤鼠内眼角, 同时联合应用化疗药物环磷酰胺, 动态监测 S180 荷瘤鼠外周血 IgG 含量的变化。结果表明, CYT 联合应用氦氛激光照射组 IgG 含量均高于单纯应用 CYT 组。

关键词 免疫病理学; 氦氛激光照射; 环磷酰胺(CYT); 外周血 IgG 含量; 小鼠 S180 腹水瘤

中图分类号 R 318.51 文献标识码 A

Study on the Effects of He-Ne Laser Irradiation Combined with Cyclophosphamide on Peripheral Blood Serum IgG in Mice Inoculated with S180 Ascites Sarcoma

HUANG Bao-xu¹, WANG Hong-bin¹, LIU Huan-qi¹,
QU Zhi-na², LIU Xi-feng¹, CHENG Shao-hui¹, GAO Li¹

(¹ College of Veterinary Medicine, North Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)
(² Animal Quarantine of Agricultural Ministry, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract Systematic experiments on the effects of He-Ne laser irradiation combined with the traditional antitumor medicine of cyclophosphamide on peripheral blood serum IgG were conducted by using the experimental model of mouse S180 ascites sarcoma. Three groups of tumor bearing mice were irradiated upon the inner corners with the dosages of 11.00, 14.67 and 22.00 J/cm² He-Ne laser irradiation respectively, and injected with CYT intraperitoneally to observe the changes of peripheral blood serum IgG in tumor bearing mice. The values of peripheral blood serum IgG in tumor bearing mice in the mice with CYT+ He-Ne laser irradiation treatment were higher than that with CYT treatment only. The kinetic detection of peripheral blood serum IgG indicated that CYT showed the immunosuppressive effects on the tumor bearing mice, and the immunosuppressive effects were alleviated in some degree by He-Ne laser irradiation.

Key words immunity nosology; He-Ne laser irradiation; cyclophosphamide (CYT); serum IgG concentration; mouse S180 ascites sarcoma

适当剂量 He-Ne 激光能够提高荷瘤机体的免疫机能, 抑制小鼠 S180 腹水瘤的发生发展^[1~3]。如果将 He-Ne 激光与化疗药物联合应用, 一方面可利

用化疗药物杀伤肿瘤细胞, 抑制肿瘤生长, 另一方面又能利用 He-Ne 激光改善荷瘤机体的免疫抑制状态, 从而达到改善荷瘤机体生存质量, 提高荷瘤机体

收稿日期: 2002-07-22; 收到修改稿日期: 2002-12-17

基金项目: 国家自然科学基金(项目批准号: 30170712)资助项目。

作者简介: 黄保续(1970—), 男, 山东嘉祥人, 博士, 副研究员, 现工作单位为农业部动物检疫所, 主要从事激光生物学和动物流行病学研究。E-mail: huanghx@epizoo.org

* 通信联系人

存活时间。本实验以不同剂量的 He-Ne 激光照射联合应用化学治疗药物环磷酰胺(CYT)对 S180 荷瘤小鼠进行处置,动态检测不同处置情况下荷瘤鼠外周 IgG 含量的变化,来验证这一效应,为肿瘤的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组和实验方法

BALB/c 小鼠共 90 只,选取条件见文献[4]。随机取出 15 只,为正常对照组(I 组),其余 75 只小鼠腹腔接种瘤细胞悬液 0.2 mL 后,随机分成 II, III, IV, V, VI 5 个组,每组 15 只,第 II 组为肿瘤对照组,每日腹腔注射生理盐水 0.2 mL,第 III, IV, V, VI 组于肿瘤接种后次日分别作激光照射和/或环磷酰胺处理(激光照射方法参见文献[4]),连续 6 天。在接种肿瘤后第 4, 8 和 12 天各剖杀 5 只,作免疫学指标的测定。各组具体处理过程见图 1。图中,○为正常小鼠;●为每组接种 S180 瘤细胞 1×10^6 个/鼠;◆为 III, IV, V, VI 组次日腹腔注射环磷酰胺 20 mg/kg · BW,连续 6 天;▲为对 IV, V, VI 组同步照射激光,其剂量分别为 11.00, 14.67 和 22.00 J/cm²,连续 6 天。

1.2 样品的采集、处理和血清 IgG 含量的测定

1.2.1 血清的分离和保存

用手术镊剔除小鼠眼球,无菌采集眼血,收集于洁净刻度试管内,分离血清,置于微量离心管内, -20℃ 冻存,待测 IgG 含量。

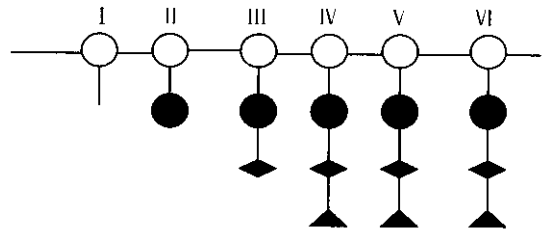


图 1 各组小鼠实验处理流程图

I: 正常对照组; II: 肿瘤对照组;

III: 化疗(CYT)对照组; IV: CYT+11.00 J/cm² 组; V: CYT+14.67 J/cm² 组; VI: CYT+22.00 J/cm² 组

Fig. 1 Process for He-Ne laser irradiation and CYT injection

I: normal control group; II: tumor control group;

III: CYT control group; IV: CYT+11.00 J/cm² group; V: CYT+14.67 J/cm² group; VI: CYT+22.00 J/cm² group

1.2.2 外周血清 IgG 含量的检测

采用超微量免疫比浊法。取聚乙烯反应板,于每孔中加入最适工作浓度的羊抗鼠 IgG 血清(-20℃ 冰箱冻存,使用前用抗体稀释液按 6 倍量稀释至最适工作浓度,并以 3000 r/min 离心 20 min,取上清。抗血清稀释液:其配方为聚乙二醇 40.0 g, NaF 10.0 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 101.5 g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 101.5 g, NaN 31.0 g, 双蒸水溶解后补足水量至 1000 mL,过滤除菌后 4℃ 保存),每孔 150 μL,而后加入待测血清 1 μL,稀释液 1 μL,每份标本均设复孔,每块板上均用相应标准参考品制备标准曲线(见表 1)。

表 1 标准曲线建立方法

Table 1 Establishment of the standard curve for IgG concentration detection

Items	Standard sample/(g/L)	Added in standard samples into every pores /μL(g/L)*					Best dilution of antiserum
		1	2	3	4	5	
IgG	11.8	0.2(2.36)	0.5(5.90)	1.0(11.8)	1.5(17.7)	2.0(23.6)	1:12

* Total amount in every pores were 152 μL. The deficiency were filled with dilution fluid.

加样完毕,于微量振荡器上混匀 1 min, 37℃ 温箱放置 30 min,取出反应板再混匀 1 min,用酶联免疫检测仪测定 490 nm 吸光度,以不加样的抗血清调零,根据标准曲线换算出相应的 IgG 含量。本法要求反应系统中保持抗体过量,故抗血清最适工作浓度的选择十分重要,最适工作浓度的要求是最小检验量可产生较高的吸光度值,线性范围要求较宽。

用文献[4]的 1.3 节数据处理方法进行数据处理。 万方数据

2 结果与分析

实验结果表明,CYT 注射后第 4 天,除 CYT+22.00 J/cm² 氦氛激光照射组外,其他三个 CYT 及 CYT/氦氛激光照射联合应用组 IgG 含量均出现显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05$)。此后,随 CYT 的停用而有所回升,但至第 8 天后又呈现迅速下降趋势,12 天时出现了显著下降 ($P < 0.01, P < 0.05$)。整个实验过程中,CYT/氦氛激光照射联合应用组 IgG 含量均高于 CYT 单纯应用组。具体结果见表 2,其

变化趋势见图 2。

表 2 CYT/氦氛激光照射组联合应用对荷瘤鼠外周血 IgG 含量的影响

Table 2 Effects of CYT/He-Ne laser combinations on serum IgG concentration in tumor bearing mice ($g \cdot L^{-1}$, $n=5$)

Group	Treatments	Days post tumor inoculation		
		4	8	12
I	Normal control	15.07±1.72 ^{ABb}	14.76±2.21 ^{Bb}	13.36±1.95 ^{Aa}
II	Tumor control	15.95±3.66 ^{Ab}	39.86±11.44 ^{Aa}	6.43±0.82 ^{Cd}
III	CYT control	5.89±1.34 ^{Dd}	12.99±6.07 ^{Bc}	8.67±0.51 ^{BCbc}
IV	CYT+11.00 J/cm ² He-Ne laser	7.76±1.81 ^{CDcd}	12.51±1.12 ^{Bc}	9.41±1.61 ^{BCbc}
V	CYT+14.67 J/cm ² He-Ne laser	10.66±1.75 ^{BCc}	16.80±2.67 ^{Bbc}	8.48±1.65 ^{BCcd}
VI	CYT+22.00 J/cm ² He-Ne laser	19.72±3.81 ^{Aa}	22.65±5.64 ^{Bbc}	10.73±2.12 ^{ABb}

注:在数据上角用字母标示法注明差异显著性水平,其中大写字母完全不同者表示处理间有极显著性差异($P < 0.01$),大写字母有相同者而小写字母完全不同者为处理间有显著性差异($P < 0.05$),小写字母相同者表示两处理间无显著性差异($P > 0.05$)。

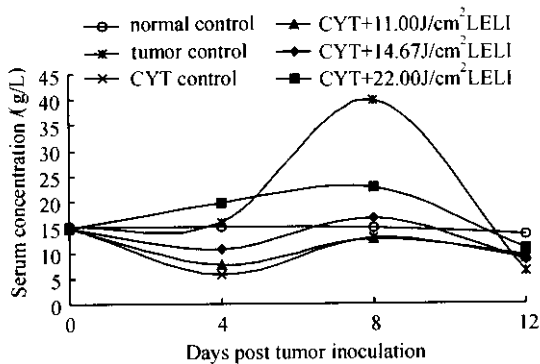


图 2 CYT 与氦氛激光照射联合应用对荷瘤鼠外周血 IgG 含量的动态影响

Fig.2 Kinetic changes of serum IgG concentration in S180 ascites sarcoma bearing mice after He-Ne laser irradiation combined with cyclophosphamide

3 分析与讨论

3.1 动态影响

前期实验表明,14.67 J/cm² 氦氛激光(氦氛激光单纯应用最佳抑瘤剂量组)抑瘤效果与 CYT+22.00 J/cm² 氦氛激光联合应用(CYT/氦氛激光联合应用最佳抑瘤剂量组)的抑瘤效果进行比较,可以发现,单纯氦氛激光照射组的抑瘤效果在第 8 天时明显不如 CYT/氦氛激光联合应用组,这是由于 CYT 杀瘤效应作用的结果。至 12 天时,由于 CYT 的停用,各组死瘤率虽无太大变化,但就腹水量、腹水瘤密度及总瘤数三个指标而言,CYT/氦氛激光联合应用组抑瘤效果仍明显优于单纯氦氛激光照射组。将 CYT,氦氛激光照射组及 CYT/氦氛激光联合应用组三种处理的抑瘤指标作比较,可更为明显地看出这种变化趋势。尽管 CYT 对荷瘤鼠腹水瘤的发生发展也有着明显的影

响,但其生命延长率却明显低于氦氛激光照射组及 CYT 氦氛激光联合应用组,而氦氛激光照射组初期的抑瘤效果并不明显,从而导致其生命延长率低于 CYT/氦氛激光联合应用组。相对而言,CYT/氦氛激光联合应用既可收到良好的抑瘤效果,又可明显改善荷瘤体的生存质量,并相应提高荷瘤鼠生命延长率,从而证明 CYT/氦氛激光联合应用对小鼠腹水瘤具有协同性的抑制效应。

实验结果表明,CYT 注射后第 4 天,CYT 与氦氛激光联合应用各组均出现某种程度的 IgG 下降趋势,尤其是单纯 CYT 应用组,IgG 含量下降更为显著($P < 0.01$)。但随着 CYT 的停用,于第 8 天时,IgG 含量便出现了某种程度的回升,这表明 CYT 对 IgG 分泌具有极显著的抑制效应。但至第 12 天时,除 CYT+22.00 J/cm² 氦氛激光联合应用组外,其余各肿瘤接种组均呈现显著的下

降趋势,这表明了荷瘤机体免疫机能的极度下降。此时,尽管不再有 CYT 的抑制,但由于肿瘤免疫抑制因子(TDSF)的抑制作用及诸多效应细胞的老化,B-淋巴细胞分泌 IgG 功能的下降,以及 IgG 与靶细胞的结合,导致可检测 IgG 含量明显下降。

从实验结果还可看出,CYT 与氦氛激光联合应用各组,在检测的各个时期,均比单纯 CYT 应用组同期的 IgG 含量为高,尤其是 CYT+22.00 J/cm² 氦氛激光联合应用组更是如此,直到第 12 天时,其 IgG 含量仍保持相对较高水平,这表明该组小鼠整体免疫机能的受抑制程度较低,也表明氦氛激光照射对 CYT 的 IgG 分泌抑制效应具有改善作用。

3.2 氦氛激光照射可改善由 CYT 及肿瘤本身所致的免疫抑制效应

由于 CYT 的抑瘤机制在于杀灭干细胞,那么

其在杀灭肿瘤组织的同时,必然对骨髓干细胞产生某种程度的抑制效应,从而对机体免疫功能造成某种程度的抑制效应。一方面,肿瘤自身可通过产生或诱导 TDSF 造成荷瘤机体的免疫抑制;另一方面,CYT 又可造成骨髓抑制而导致荷瘤机体的免疫抑制,从而使荷瘤宿主接受化疗药物治疗后免疫功能进一步下降。本实验 CYT 对照组外周血 IgG 含量进行性下降就充分说明了这一点。由于化疗药物的免疫抑制效应,尽管可取得良好的抑瘤效果,却难以取得良好治疗效果。

实验检测表明,氦氖激光照射可在某种程度上改善 CYT 的免疫抑制效应。本实验中,CYT 与氦氖激光照射联合应用组与单纯 CYT 应用组相比,均有显著增强或升高,尤其在 CYT 停止应用后,氦氖激光照射的这一改善效应更为明显。由此可以看出,氦氖激光照射可对 CYT 及肿瘤自身所致的免疫抑制效应起到一定的改善作用,从而一方面可使荷瘤鼠生存质量得到改善,另一方面又可使荷瘤宿主充分调动自身的抗癌机制^[5],与 CYT 的杀瘤作用相互协同,起到更好的抗癌效应^[6]。

3.3 IgG 及生化测定

Ig 是体内的一种免疫球蛋白,是一种具有抗体活性或化学结构上与抗体相似的球蛋白,普遍存在于血液、组织液及外分泌液中。IgG 就是免疫球蛋白中的一种,它以高浓度遍布全身,是全身性体液免疫反应的主要效应分子,参与机体的体液免疫调节。

IgG 主要在脾脏和淋巴结中的浆细胞中合成,在血清中分解缓慢,半衰期为 16~24 天。IgG 的作用范围广,大多数抗菌、抗毒素和抗病毒的抗体属于 IgG,不少自身抗体,例如系统性红斑狼疮的抗核抗体和抗甲状腺的球蛋白抗体也属于 IgG。IgG 亦是肿瘤免疫的一个重要指标。

血清中 IgG 的含量较高,检测方法主要有单纯扩散和免疫比浊法。近年来,主要采用的是免疫比浊法。本实验采用的超微量免疫比浊法具有快速、操作简便、结果准确的特点,检测量要求的线性范围宽。

4 结 论

1) 对荷瘤鼠外周血 IgG 含量的动态变化监测表明,CYT 与氦氖激光照射联合应用时,一方面因 CYT 可对 S180 腹水瘤产生明显的杀伤和抑制效应,另一方面又因氦氖激光照射的免疫调节效应,适量的氦氖激光照射可导致外周血免疫性抗体 IgG 含量的升高,使得由 CYT 和肿瘤本身所致的免疫抑制状态在某种程度上得以改善,从而使荷瘤机体的生存时间明显延长。

2) 本实验证实了 CYT 与氦氖激光照射联合应用对小鼠 S180 腹水瘤发生发展的肯定性抑制效应,为进一步开展此项研究提供了一个实验依据。

参 考 文 献

- 1 Cheng Shaohui, Huang Baoxu, Wang Hongbin. Effect of low-energy He-Ne laser irradiation on the proliferation reaction of splenic T lymphocyte of S180-bearing mouse [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2000, **9**(2):98~100
程绍辉,黄保续,王洪斌. 低能量氦氖激光照射对荷瘤小鼠 T 淋巴细胞增殖反应的影响[J]. *激光生物学报*, 2000, **9**(2):98~100
- 2 Cheng Shaohui, Wang Hongbin, Huang Baoxu. Effect of low-energy laser irradiation on serum IgG concentration of S180-bearing mice [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 1999, **1**:98~100
程绍辉,王洪斌,黄保续. 低能量 He-Ne 激光照射对小鼠 S180 外周血 IgG 含量的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医杂志*, 1999, **1**:98~100
- 3 Cheng Shaohui, Wang Hongbin, Huang Baoxu. Effect of low-energy He-Ne laser irradiation on serum IgG concentration and splenic weights of S180-bearing mouse [J]. *Laser Journal*, 2000, **21**(3):71~72
程绍辉,王洪斌,黄保续. 低能量氦氖激光照射对荷瘤小鼠 IgG 含量及脾重的影响[J]. *激光杂志*, 2000, **21**(3):71~72
- 4 Huang Baoxu, Wang Hongbin, Liu Huanqi *et al.*. Study on the He-Ne laser irradiation on the activity of humoral immune factors IL-2 in mice [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(2):249~252
黄保续,王洪斌,刘焕奇等. 氦氖激光对鼠体液免疫因子 IL-2 影响的实验研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(2):249~252
- 5 Z. D. Kitsmaniuk, V. B. Demochko, V. I. Popovich. The use of low-energy lasers for preventing and treating postoperative and radiation induced complications in patients with head and neck tumors [J]. *Vopr. Oncol.*, 1992, **38**(8):980
- 6 M. L. Magne, C. O. Rodriguez, S. A. Autry *et al.*. Photodynamic therapy of facial squamous cell carcinoma in cats using a new photosensitizer [J]. *Lasers Surg. Med.*, 1997, **20**:202~209