

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.08.002

肝癌小鼠外周血及脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化及其意义*

徐自慧¹ 王雅蕾¹ 万亮琴¹ 何芳¹ 陈紫微¹ 王雪¹宋晨晨¹ 谭琰² 王旭¹ 董瑞娟¹ 葛东宇¹ 华茜^{1Δ}

(1 北京中医药大学中医学院 北京 100029; 2 北京中医药大学生命科学院 北京 100029)

摘要 目的:观察小鼠原位肝癌模型外周血以及脾脏 T 淋巴细胞亚群与正常小鼠之间的差异变化,探讨其差异变化的意义。**方法:**在正常 KM 小鼠肝脏种植 H22 细胞,建立小鼠原位模型。采用流式细胞术,以健康正常小鼠为对照,检测肝癌小鼠外周血以及脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化。**结果:**与健康正常小鼠相比,肝癌小鼠外周血 CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比例有显著性降低,CD8⁺T 淋巴细胞显著性升高;脾脏 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞有显著性降低。**结论:**小鼠原位肝癌模型外周血以及脾脏 T 淋巴细胞亚群发生异常,免疫系统紊乱,可以反映小鼠肝癌的发生、发展。

关键词:小鼠原位肝癌模型; T 淋巴细胞亚群; 流式细胞术

中图分类号:R33;R735.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)08-1406-04

The Changes of T Cell Subsets in Peripheral Blood and Spleen and Its Significance in Hepatoma Mice*

XU Zi-hui¹, WANG Ya-lei¹, WAN Liang-qin¹, HE Fang¹, CHEN Zi-wei¹, WANG Xue¹,SONG Chen-chen¹, TAN Yan², WANG Xu¹, DONG Rui-juan¹, GE Dong-yu¹, HUA Qian^{1Δ}

(1 School of Chinese Medicine, 2 School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To observe the difference of T cell subsets in peripheral blood and spleen between normal mice and orthotopic liver cancer model, and to explore the significance of the difference. **Methods:** H22 cells were implanted in the liver of KM mice to establish hepatoma mice and flow cytometry was used to test the changes of T cell subsets in peripheral blood and spleen in hepatoma mice and normal mice as control. **Results:** Compared with normal mice, the proportion of CD4⁺ T cells and CD4⁺/CD8⁺ in peripheral blood of hepatoma mice was significantly decreased, well, the proportion of CD8⁺ T cells significantly increased. The proportion of CD3⁺, CD4⁺ T cells in spleen was significantly reduced. **Conclusions:** After H22 cells were implanted in the liver of mice, the T cell subsets in peripheral blood and spleen were abnormal, and the immune system was disordered. It can reflect the occurrence and development of liver cancer in mice.

Key words: Orthotopic liver cancer model; T cell subsets; Flow cytometry

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)08-1406-04

前言

肝癌的发生、发展与细胞免疫功能状态关系密切^[1],机体的免疫状态特别是由 T 淋巴细胞介导的细胞免疫起重要的作用^[2],T 淋巴细胞亚群构成人体内主要的细胞免疫系统,在杀伤肿瘤细胞,控制肿瘤细胞生长起到极其重要的作用^[3]。当 T 淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时,将导致机体免疫功能紊乱,并且可作为肝癌发生、发展以及转移的指标^[4],监测机体 T 淋巴细胞亚群变化,可为治疗、预后肝癌提供一定的参考^[5]。近年来临床上已有大量报道肝癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群相对健康人群发生异常的资料数据,李晓云^[6]等收集 181 例肝癌患者患者作为试验组,与健康人群相比,试验组外周血 T 细胞

亚群表现为 CD3⁺T 淋巴细胞、CD4⁺T 淋巴细胞比例下降,CD8⁺T 淋巴细胞比上升,CD4⁺/CD8⁺ 比值下降或倒置,说明存在着 T 淋巴细胞功能紊乱^[7],对判断肝癌患者的免疫功能、病情及预后具有重要的临床意义。李丽坤^[8]检测原发性肝癌患者外周血 T 淋巴细胞的变化也得到了相似的结果与结论。故为确定外周血、脾脏 T 淋巴细胞亚群在肝癌发生发展中的变化与作用,本文拟以健康正常小鼠为对照,利用流式细胞术检测小鼠原位肝癌模型的外周血以及脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化,探讨在肝癌模型小鼠外周血以及脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化意义,并根据其结果以期为后期治疗提供参考依据。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81473546);藏医药区域协同创新中心项目(2017XTCX012);

中央高校基本科研业务费专项基金资助(2018-JYBZZ-XJSJ011)

作者简介:徐自慧(1994-),硕士研究生,研究方向:中医药防治肿瘤机制研究,E-mail: xuzihui-1994@sohu.com

Δ 通讯作者:华茜,博士,教授,研究方向:中医药防治肿瘤、脑血管疾病机制研究,E-mail: hqianz@aliyun.com

(收稿日期:2018-08-08 接受日期:2018-08-31)

1.1 材料

5-6 周龄 KM 小鼠购于斯贝福(北京)生物技术有限公司。实验小鼠合格证号:SCXK(京)2016-0002。饲养环境:SPF 级。H22 细胞瘤株购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,FACS Lysing Solution 溶血素红细胞裂解液,CD3⁺-APC,CD4⁺-FITC,CD8⁺-PE 荧光标记单克隆抗体均购自 BD 公司。流式细胞仪仪器购自 BD,型号:CantoTM II。

1.2 方法

1.2.1 肝癌原位模型小鼠建立 参考相关文献^[9,10]建立小鼠肝癌原位模型,H22 细胞瘤株系 H22 细胞于 KM 小鼠腹腔内保存,并于腹腔中传代,每次传代 7 天,取第三代 H22 细胞进行原位移植模型建立,取 KM 小鼠 25 只,无菌条件下,以 10% 水合氯醛按 0.03 mL/10 g 剂量腹腔麻醉小鼠,小鼠仰卧四肢固定于鼠板,上腹部正中剑突下做切口,左肝膈面实质缓慢注入 50 μ L H22 细胞,1 号针线缝合,术毕,注意保温。

1.2.2 流式细胞术检测肝癌小鼠外周血及脾脏 T 淋巴细胞亚群 肝癌模型小鼠成模后,人道主义取小鼠全血抗凝处理、取脾脏组织过 70 μ m 筛网,得脾脏单细胞悬液,分别取 200 μ L EDTA 抗凝新鲜全血、脾脏细胞悬液按照 1:10 比例加入 1 $\times$ 红细胞裂解液,摇匀后全血、脾脏细胞悬液分别裂解 15 min 和 3 min,200 $\times$ g 离心 5 min 后重悬,按 1:100 稀释比例将标记抗体加入 200 μ L EDTA 抗凝新鲜全血、脾脏细胞混合均匀,避光染色 15 min 后,用 PBS 洗去非特异结合,然后进行流式细胞分析,并对比分析其检测结果。

1.3 统计学分析

所有研究资料均采用 SPSS 22.0 统计软件处理,若数据符合正态分布且方差齐则两组间比较采用两样本均数 *t* 检验;若数据不符合正态分布或方差不齐则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌原位移植模型建立

10 天可触到腹部有硬质肿块,14 天后模型建成。图 1A 为正常小鼠肝脏,图 1B 为肝癌模型小鼠肝脏图片,可见明显肿瘤。图 2A 为正常小鼠肝脏 HE 染色,图 2B 为肝癌模型小鼠肝脏染色。显微镜下见肝癌模型组肿瘤细胞排列紊乱,细胞密度大,核染色深且细胞核固缩(箭头所示)。

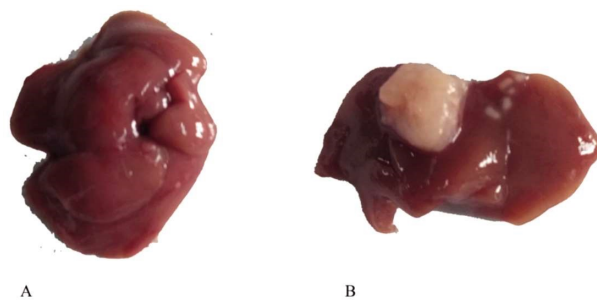


图 1 正常小鼠肝脏与肝癌模型小鼠肝脏

Fig.1 Normal mouse liver and liver cancer model mouse liver

2.2 肝癌原位移植模型脾脏、外周血 T 淋巴细胞亚群分析

经流式细胞术上机检测后,与健康正常小鼠相比,小鼠原位肝癌移植瘤模型外周血 CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比例有显著性降低 ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$),CD8⁺T 淋巴细胞显著性升高 ($**p < 0.01$)见图 3;脾脏 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞有显著性降低 ($*p < 0.05$)见图 4。流式图见图 5,A、C 图分别为正常小鼠外周血、脾脏 T 淋巴细胞亚群流式分析图,B、D 图分别为肝癌模型小鼠外周血、脾脏 T 淋巴细胞亚群流式分析图,其中 Q1 门表示 CD8⁺T 淋巴细胞,Q4 门表示 CD4⁺T 淋巴细胞。

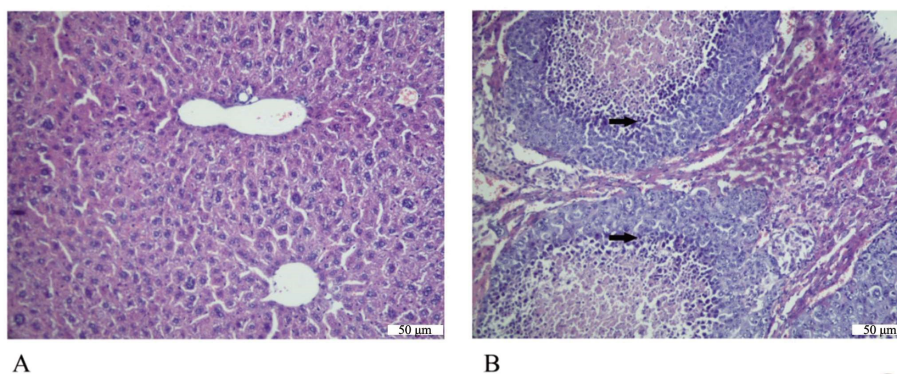


图 2 正常小鼠肝脏 HE 染色与肝癌模型小鼠肝脏 HE 染色(200 $\times$)

Fig.2 The HE staining of normal mouse liver and liver cancer model mouse(200 $\times$)

3 讨论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,也是病死率最高的恶性肿瘤之一。我国每年约有 38.3 万人死于肝癌,占全球肝癌死亡病例数的 51%,严峻的形势给我国的社会和医疗带来了沉重的负担^[1]。有文献表明肝癌的发生发展与机体免疫状态密切相关^[2],肝癌与免疫的关系复杂,肝癌的发生往往伴随机体的免

疫功能低下和紊乱,尤其是 T 淋巴细胞亚群在数量上和功能上的改变,因此检测机体 T 细胞亚群变化对研究肝癌的发生发展有重要作用^[3]。

抗肿瘤免疫以细胞免疫为主,其中 T 淋巴细胞在抗肿瘤的细胞免疫中起中心调控作用^[4]。在 T 淋巴细胞亚群中,CD3⁺T 淋巴细胞表示成熟的 T 淋巴细胞,是细胞免疫中发挥活性的细胞。CD3⁺T 淋巴细胞又可以按 CD 表型分为 CD4⁺T 淋巴细胞和

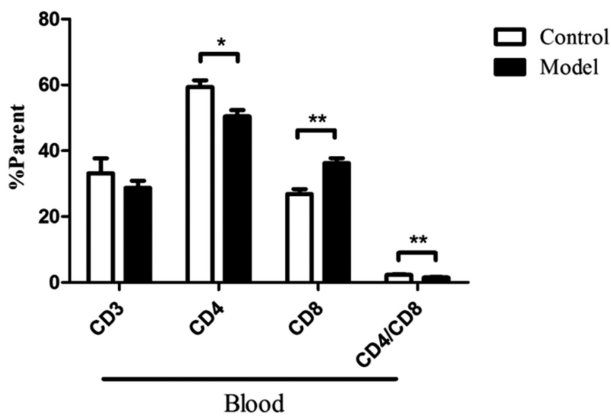


图3 肝癌模型小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群统计图

Fig. 3 Statistical analysis of T lymphocyte subsets in peripheral blood in liver cancer model mice

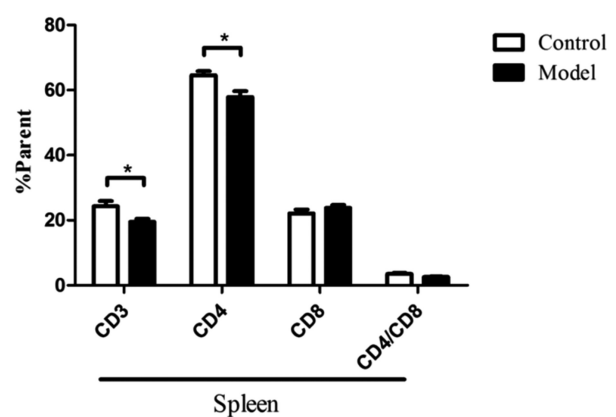


图4 肝癌模型小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群统计图

Fig. 4 Statistical analysis of T lymphocyte subsets in spleen in liver cancer model mice

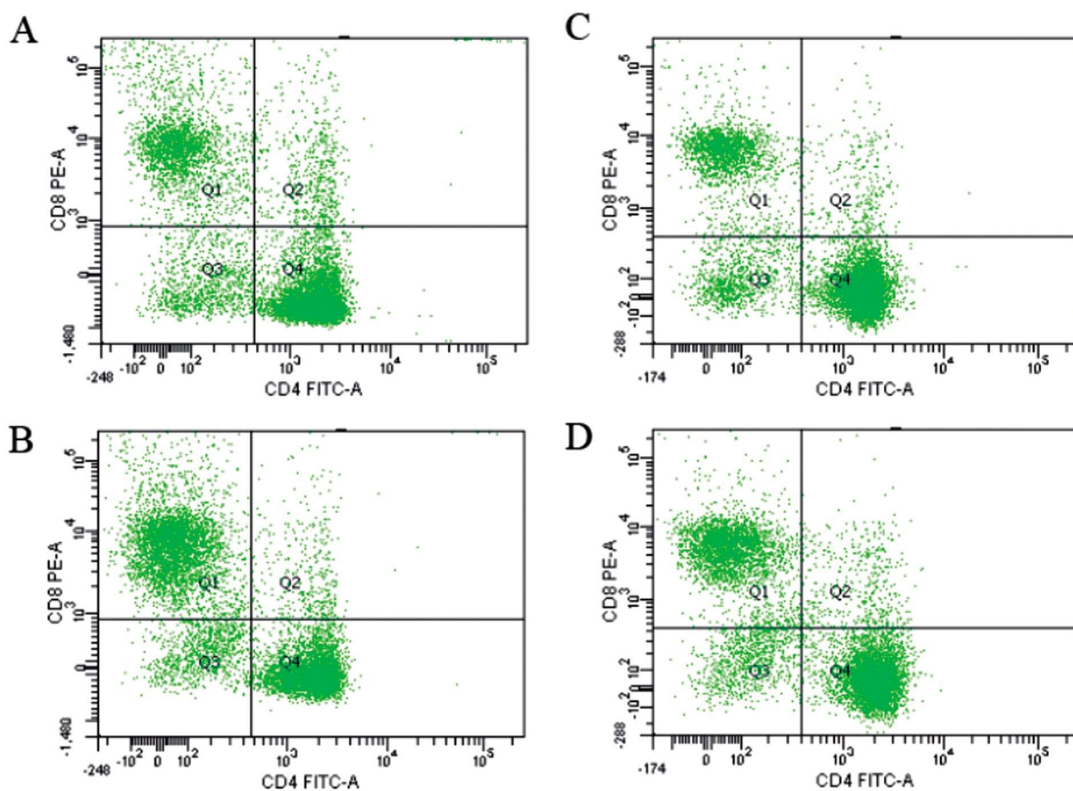


图5 正常小鼠、肝癌模型小鼠外周血、脾脏 T 淋巴细胞亚群流式分析

Fig.5 Flow cytometry analysis of T cell subsets in peripheral blood and spleen in normal mice and liver cancer model mice

CD8⁺T 淋巴细胞。CD4⁺T 淋巴细胞通过分泌细胞因子等起调节免疫系统中其它免疫细胞(B 细胞以及其它 T 淋巴细胞)的作用,具有辅助抗体的生成以及活化巨噬细胞活化的效应,所以又被称为“辅助性 T 淋巴细胞”;CD8⁺T 淋巴细胞也可以分泌一部分 CD4⁺T 淋巴细胞分泌的细胞因子,主要发挥细胞毒性和免疫抑制作用,通常被称为“细胞毒性 T 淋巴细胞”^[15,16],又可进一步以 CD8⁺T 淋巴细胞表面 CD28⁺ 的表达与否分为将其分类为杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)和抑制性 T 淋巴细胞 Ts,其中抑制性 T 细胞发挥抑制 T、B 淋巴细胞活性以及介导细胞毒活性的效应,抑制性 T 淋巴细胞可以抑制抗体的产生,以及同种异体抗体所诱导的细胞增殖反应。抑制性 T 细胞长期升高将导致杀伤性 T 细胞消耗,并引起免疫系统对肿瘤细胞产生无免疫应

答。在机体处于正常情况时,CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞处于动态平衡,并处于互相反馈调节的状态,所以当 CD4⁺T 淋巴细胞与 CD8⁺T 淋巴细胞的比例发生变化时就代表了机体免疫功能发生了显著的改变^[17]。CD4⁺T/CD8⁺T 比例的下降反映了 T 淋巴细胞功能紊乱,机体的细胞免疫功能处于抑制状态,辨别及杀伤突变细胞的能力发生减弱,机体免疫功能发生障碍,这种情况下有利于肿瘤细胞快速生长,甚至会发生肿瘤细胞的转移^[18]。

本研究中肝癌模型小鼠外周血 CD4⁺T 淋巴细胞、CD4⁺/CD8⁺ 比例有显著性降低,CD8⁺T 淋巴细胞显著性升高。CD4⁺T 淋巴细胞降低提示肿瘤细胞生长迅速,诱导了负性的免疫微环境,从而产生了逃避免疫效应;CD8⁺T 淋巴细胞显著性

升高可能是由于抑制性 T 淋巴细胞 Ts 增多, 导致免疫细胞的免疫活性被抑制, 机体免疫功能产生变化; CD4⁺/CD8⁺ 比例下降, 提示肝癌小鼠的 CD8⁺T 淋巴细胞损坏程度比 CD8⁺T 淋巴细胞严重, 这种变化反映了肝癌小鼠机体正向的免疫反应处于下降状态, 表示机体免疫细胞(T 淋巴细胞)的负向调节作用大于正向调节作用; 结果中 CD3⁺T 淋巴细胞未显示出显著性的降低(有下降的趋势), 这与样本量有一定关系, 也与未采用绝对计数存在一定的关联, 但总体的结果反映了肝癌小鼠的机体存在免疫抑制的状态。肝癌小鼠脾脏 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞有显著性降低, 显示出了一定脾脏免疫细胞受到损伤, 肝癌的发生抑制了免疫细胞的活性, 但实验结果并不能全面动态提示机体免疫系统的变化, 之后的实验研究将进一步动态分析肝癌模型小鼠外周血 T 淋巴细胞亚群, 以及脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化, 以期得到 T 淋巴细胞亚群与肝癌进展的更确切的关系。

中医药是中华民族的瑰宝, 在中国有很悠久的历史。中药在抗肿瘤方面具有一定的疗效, 能够缓解肿瘤患者的症状, 改善其生活质量。目前的研究表明^[19,20]中药可通过增强免疫应答, 而起到杀灭肿瘤细胞的作用。中药的成分多种多样, 并且每种成分的效果也不同, 目前发现的多糖类^[21]、多酚类^[22,23]、黄酮类^[24]等均具有抗肿瘤免疫活性作用。在以往的研究中, 也表明中药能通过调节机体免疫细胞的活性而起到抗肿瘤的作用, 方学辉等^[25]研究熊果酸抗小鼠 H22 肝癌移植瘤及对免疫功能的影响, 实验结果表明熊果酸能增强机体的免疫功能明显抑制 H22 荷瘤小鼠的肿瘤生长。有实验研究表明人参皂苷^[26]Rg1 能够提高肝癌患者的免疫力, 增加化疗药物效应。但其中确切的中药发挥抗肿瘤免疫活性的机制还不是很明显, 有待进一步研究, 所以建立肝癌小鼠并检测具有抗肝癌作用中药对机体免疫细胞尤其是 T 细胞亚群的作用可为探究中药抗肝癌机制提供一个新思路。

综上所述, 建立小鼠肝癌模型, 利用流式细胞术研究肝癌模型小鼠外周血、脾脏 T 淋巴细胞亚群的变化, 可为药物尤其是中药治疗肝癌以及肝癌预后提供一定的参考并为筛选与免疫机制相关的抗肿瘤药物提供相关依据, 可用于探索中药对 T 淋巴细胞免疫干预的作用机制研究, 并可以为肿瘤治疗提供新的思路与方法。

参考文献(References)

[1] Qin Shan-yu, Ma Shi-jia, Huang Xiao-li, et al. Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(2): 135-141

[2] 古力米热·布然江, 古丽娜·库尔班. 调节性 T 细胞与妇科恶性肿瘤免疫研究进展[J]. 肿瘤, 2011, 31(03): 277-279

[3] 周建光, 杨梅, 曹海涛, 等. 淋巴细胞亚群的检测在临床的应用[J]. 东南国防医药, 2015, 17(03): 298-300+321

[4] 胡丛岗, 汤国军, 王建军, 等. 原发性肝癌患者肿瘤转移与 T 细胞亚群及其细胞因子的相关性分析 [J]. 重庆医学, 2017, 46(16): 2215-2217

[5] 周启明, 吴沛宏. T 淋巴细胞亚群及 NK 细胞变化与原发性肝癌预后的关系[J]. 介入放射学杂志, 2005(06): 635-637

[6] 李晓云, 于晓辉, 王维, 等. 肝细胞肝癌患者外周血中 T 细胞亚群和 NK 细胞的变化[J]. 肝脏, 2016, 21(05): 381-383

[7] Mc Dunn JE, Tumbull IR, Polpitiva AD, et al. Splenic CD4⁺T cells have a distinct transcriptional response six hours after the onset of sepsis[J]. Journal of the American college of surgeons, 2006, 203(3): 365-375

[8] 李丽坤. 原发性肝癌患 T 细胞亚群和 NK 细胞数目的变化及其临床意义[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(03): 46-47

[9] 赵方, 胡明道, 陈鹏. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及其研究意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2017, 25(18): 2883-2885

[10] 侯杰, 罗兰, 焦成斌, 等. H22 昆明鼠肝癌原位模型的建立[J]. 黑龙江医药科学, 2015, 38(01): 78-79

[11] 吕桂帅, 陈磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景 [J]. 生命科学, 2015, (03): 237-248

[12] Makarova-Rusher OV, Medina-Echeverez J, Duffy AG, et al. The yin and yang of evasion and immune activation in HCC [J]. J Hepatol, 2015, 62(6): 1420-1429

[13] 姚芳, 邢彤, 奥敦托娅, 等. T 细胞亚群及其细胞因子与原发性肝癌及其预后的相关性分析[J]. 肿瘤药学, 2017, 7(04): 479-482

[14] Shalpour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil [J]. The Journal of clinical investigation, 2015, 125(9): 3347-3355

[15] Ivanova EA, Orekhov AN. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview [J]. BioMed research international, 2015, 2015: 327-470

[16] 苏广梅. 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)对肿瘤的识别与治疗[J]. 健康必读(下旬刊), 2011, 9: 37

[17] Tinago W, Coghlan E, Macken A, et al. Clinical, immunological and treatment-related factors associated with normalised CD4⁺/CD8⁺ T-cell ratio: effect of naive and memory T-cell subsets [J]. PloS one, 2014, 9(5): e97011

[18] Yang Zhang-ru, Zhao Ning, Meng Jin, et al. Peripheral lymphocyte subset variation predicts prostate cancer carbon ion radiotherapy outcomes[J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 26422-26435

[19] 王瑛, 彭芳. 中药对肝癌免疫微环境影响的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(07): 1342-1345

[20] Shen Li-juan, Chen Hou-liu, Zhu Qiu-fang, et al. Identification of bioactive ingredients with immuno-enhancement and anti-oxidative effects from Fufang-Ejiao-Syrup by LC-MS n combined with bioassays[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 11(7): 363-371

[21] 程伟, 邢东炜, 张阔光. 中药多糖调节肿瘤免疫应答研究进展[J]. 现代免疫学, 2017, 37(03): 242-246

[22] 伊娟娟. 红松球果多酚类化合物分离鉴定及抗肿瘤作用机制研究 [D]. 哈尔滨工业大学, 2017

[23] Yamada K, Sawa T, Murayama K, et al. Histamine Release-Suppressive Effect of Water Extracts Prepared from Flower and Leaf of Chrysanthemum, Shiranui Himekiku [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 2012, 59(8): 394-400

[24] 吕辉. 桑黄多糖及黄酮抗肿瘤活性比较研究 [J]. 中医学报, 2018, 33(01): 27-29

[25] 方学辉, 吴倩, 韩雪梅, 等. 熊果酸抗小鼠 H22 肝癌移植瘤及对免疫功能的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2013, 19(03): 199-201

[26] 罗飘, 楚世峰, 高岩, 等. 人参皂苷 Rg1 在肝脏疾病中的药理作用研究进展[J]. 药学报, 2018, 53(01): 21-27