

• 基础研究 •

IL-1 诱导肝癌小鼠炎症及免疫反应的实验研究

厦门大学附属福州第二医院消化内科 (福州 350007) 程变巧 林园香 黄志腾 霍苗苗

【摘要】 目的 通过建立肝癌小鼠模型, 观察 IL-1 刺激肝癌小鼠后对肝癌炎症及免疫微环境的影响。方法 饲养 20 只 NPG 级小鼠, 予 SMMC-7721 肝癌细胞在肝包膜下直接接种, 待瘤体长出后, 随机分为 IL-1 干预组和对照组, ELISA 方法观察 IL-10 和 IL-8 干预前后的表达, 流式细胞术观察 CD4⁺ 和 CD25⁺ 的表达情况。结果 小鼠有 17 只成瘤, 成瘤率为 85%。把 17 只成瘤小鼠分为对照组 7 只, 干预组 10 只; 干预组予 IL-1 腹腔连续注射 3 d 后发现有 6 只瘤鼠死亡, 4 只精神萎靡, 5 d 后小鼠全部死亡; 对照组小鼠无死亡情况。IL-8 在干预后的表达较干预前明显上调 ($P < 0.05$), IL-10 在干预后的表达较干预前升高, 但两组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CD4⁺CD25⁺ 占 CD4⁺ 的比值在干预后的表达均较干预前有上调 ($P < 0.05$)。结论 肝癌小鼠内存在炎症和免疫反应, IL-1 可以诱导肝癌小鼠的炎症和免疫反应强化。

【关键词】 肝癌微环境; 炎症; 免疫; 肝癌模型

【中图分类号】 R735.7; R392 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2020)06-0126-03

Experimental study on inflammation and immune response induced by IL-1 in liver cancer mice CHENG Bianqiao, LIN Yuanxiang, HUANG Zhiteng, HUO Miaomiao. Department of Gastroenterology, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of liver cancer to observe the effects on the inflammation and immune microenvironment of liver cancer in mice stimulated by IL-1. **Methods** A total of twenty NPG mice were bred and inoculated directly under the liver capsule with smmc-7721 hepatocarcinoma cell line. After tumor growth, they were randomly divided into the IL-1 intervention group and the non-intervention group. The expressions of IL-10 and IL-8 before and after intervention were observed by ELISA, and the expressions of CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ were observed by flow cytometry. **Results** Tumorigenesis rate was 85% in 20 NPG mice. The 17 tumor-forming nude mice were divided into control group (7) and intervention group (10). After 3 days of continuous intraperitoneal injection of IL-1, 6 mice in the intervention group died and 4 mice were found to be listless. All the mice died on the fifth day. The control group had no death. Expression of IL-8, IL-10 and CD4⁺CD25⁺ were detected in the control group. IL-8 after the intervention of expression significantly raised ($P < 0.05$), compared with before. IL-10 after the intervention in the expression of a higher before and after the intervention, but no obvious difference compared the two groups ($P > 0.05$). The expression of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺ after intervention have been raised ($P < 0.05$), compared with before. Expression of IL-8, IL-10 and CD4⁺CD25⁺ were detected in the control group. **Conclusion** There are inflammatory and immune responses in liver cancer mice, and IL-1 can induce inflammation and immune enhancement in liver cancer mice.

【Key words】 hepatocarcinoma microenvironment; inflammation; immunity; hepatocarcinoma model

肝细胞肝癌 (HCC) 是重要的世界性健康问题, 目前研究者普遍认为, 肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存的环境, 可以逃避机体的免疫监视, 并不断发生增殖、侵袭和转移等一系列生物学行为^[1-2]。其中巨噬细胞在肿瘤微环境中起着重要作用, 参与肿瘤的免疫调控和持续性炎症反应^[3]。白介素 1 (IL-1) 是体内作用最强的炎症介质之一, 由多种细胞因子分泌, 机体在正常状态下含量很低^[4]。因此本课题拟通过小鼠皮下直接接种实验建立肝癌模型, 通过 IL-1 刺激成瘤肝癌小鼠体内炎症反应, 初步明确肝癌微环境中的炎症和免疫情况, 预期为肝癌的治疗提供一个新的综合治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料: NPG 小鼠 20 只, 雄性, 体质量 20~25 g, 5~6 周龄, 由北京维通达生物技术有限公司提供 [动物生产许

可证号: SCXK (京) 2014-0001; 质量合格证号: 70604356]。将实验动物分为两组, 对照组和实验组各 10 只。实验动物由福建中医药大学实验动物中心 (SPF 级) 饲养, 恒湿 (46%~51%)、恒温 (26~28 ℃)、SPF 级环境, 小鼠饲养于超净饲养箱中, 予紫外线灭菌处理过的水和饲料喂养, 实验前适应性喂养 1 周。IL-1 抗体 (批号 P00050)、IL-10 (批号 RK00023)、IL-8 (批号 RK00011)、CD4⁺ (批号 517738) 和 CD25⁺ (批号 550628) 均购自武汉爱博泰克生物科技公司。

1.2 方法:

1.2.1 细胞培养: SMMC-7721 肝癌细胞由福州市传染病医院中心实验室惠赠。细胞在含 10% 胎牛血清及 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 庆大霉素的 DMEM 高糖培养基, 置于

37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 小鼠造模：将对数生长期的肝癌细胞消化、离心，把所得的约 1×10^7 /mL 个细胞溶于 PBS 溶液中。将 NPG 小鼠使用 10% 水合氯醛麻醉后，在左侧腹腔做一长约 1 cm 的横断面切口，轻轻按压小鼠胸骨及腰部，挤压出肝左叶，充分暴露肝脏，注射于小鼠肝脏内，用 1 mL 规格的胰岛素注射针吸取 50 μ L 细胞悬液，进针深度约 1.0 cm。后用 4-0 丝线缝合伤口，活力碘消毒伤口，并静推青霉素 3 d 抗感染，术后 4 h 后予 5% 葡萄糖注射液补液 12 h，后正常饲养。造模后 1 周左右可见到皮下开始出现肿块硬结，10~14 d 皮下成瘤。成瘤后开始给药：对照组不予处理；干预组将 IL-1 组予小鼠 0.5 μ g/(kg·d)，每日 1 次，连续腹腔注射给药 3 d。采集小鼠治疗前后的外周血进行后续试验。

1.2.3 ELISA 检测：采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 IL-8、IL-10 的表达情况。取外周血 2 000 rpm 离心 10 min，取上清液待检。具体步骤如下：1) 加样：每个血清样本均设置 3 个孔，并在每孔加标准液各 100 μ L，充分混匀后 37℃ 放置 40 min。2) 洗板：用洗涤液洗 4~6 次，滤纸上印干；3) 加蒸馏水 25 μ L，分别加 IL-8、IL-10 一抗各 25 μ L，两者充分混匀后于 37℃ 放置 20 min；4) 洗板；5) 每孔加酶标抗体 100 μ L 于 37℃ 放置 10 min；6) 洗板；7) 每孔加底物 100 μ L 于 37℃ 暗处 15 min；8) 加 100 μ L 终止液混匀；9) 30 min 内在酶标仪 450 nm 处测吸光值 (A 值)。

1.2.4 流式细胞术：取小鼠外周血 100 μ L，加入 FITC 抗人 CD4、PE 抗人 CD25 各 10 μ L，轻轻涡旋，避光孵育 15 min；2) 向管中加入 450 μ L 溶血素，避光孵育 15 min，轻轻涡旋；3) 上流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达变化比例。

1.3 统计学分析：采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料以均数±标准差表示，符合正态分布资料采用配对资料 *t* 检验，非正态分布资料采用秩和检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肝癌模型的建立及成瘤情况：将对数生长期的 SM-7721 细胞制备成单细胞悬液，通过肝脏直接接种注射后观察发现，随着时间的推移，各组小鼠均有不同程度的皮毛失去光泽，萎靡不振，反应迟缓，喜静，平均在第 8 天左右瘤体开始出现，在第 15 天有 85% (17/20) 的小鼠成瘤，无死亡情况。

2.2 IL-1 干预后对瘤鼠存活的影响：把造模成功的小鼠随机分为对照组 7 只和 IL-1 干预组 10 只。在干预后第 2 天，小鼠毛发稀疏，精神萎靡，饮食下降，伴有发热，腹泻等表现。在第 3 天干预组开始出现小鼠死亡现象，在第 5 天全部小鼠死亡；而对照组无死亡现象。

2.3 IL-1 干预肝癌小鼠后炎症反应情况比较：IL-1 处理后第 3 天取小鼠外周血，采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 IL-8、IL-10 的表达情况。结果发现，在用 IL-1 干预后炎症刺激因子 IL-8 表达量较对照组明显上升，而抑炎因子 IL-10 表达上升不明显，这说明 IL-1 干预后可明显促进肝癌的炎症反应。见表 1。

表 1 IL-1 干预肝癌小鼠后炎症反应情况 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	干预前	干预后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
IL-8				
对照组	215.33±76.79	221.14±58.80	0.266	0.799
干预组	264.56±93.16	303.71±91.95	8.088	0.004
IL-10				
对照组	91.27±75.47	89.10±40.57	1.348	0.266
干预组	99.11±95.89	153.85±75.47	1.890	0.059

2.4 IL-1 对肝癌小鼠免疫反应的影响：IL-1 处理后第 3 天取小鼠外周血，用 CD4⁺ 和 CD25⁺ 标记后采用流式细胞术检测两者的表达情况，结果发现 IL-1 干预后的小鼠 CD4⁺CD25⁺ 占 CD4⁺ 的比例均较干预前明显增加，且两组比较，差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。见图 1。

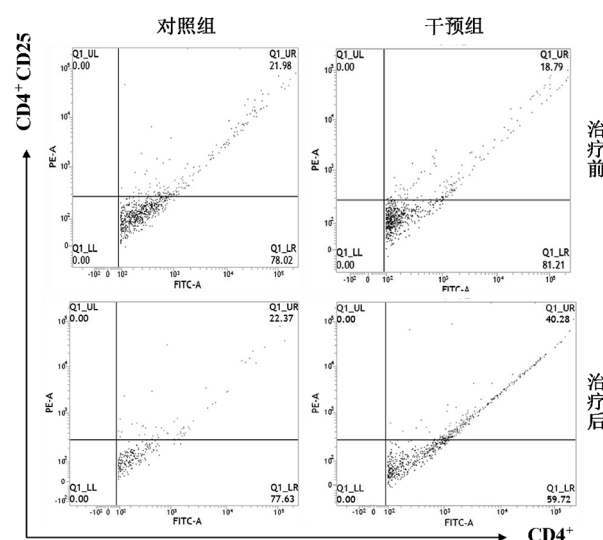


图 1 肝癌小鼠 IL-1 干预前后 CD4⁺ 和 CD25⁺ 表达情况

3 讨论

肿瘤微环境 (TME) 是肿瘤细胞赖以生存和发展的复杂环境，其细胞成分和非细胞成分共同为肿瘤生长起到支撑的作用。巨噬细胞是 TME 中的重要组成成分，又称为肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM)。外周血单核细胞在肿瘤细胞分泌的各种趋化因子和细胞因子的作用下迁移至肿瘤局部，在肿瘤微环境的作用下进一步分化成 TAM。作为肿瘤组织中浸润白细胞的重要组成部分，TAM 的选择激活与肝癌的病程进展关系密切。动物实验证实，白细胞介素作为肿瘤炎症微环境的重要组分，参与了诱导肿瘤血管生成和肿瘤的转移，与肿瘤进展密切相关^[5]。

探讨肝癌的肿瘤微环境的调控是目前研究的热点和重点。目前认为肝脏细胞在经历外界不同刺激后通过促进细胞坏死、凋亡以及分泌多种蛋白形成炎症微环境，从而参与肝癌的发生和发展^[6]。因此本课题拟通过建立肝癌微环境动态观察肝癌内的炎症和免疫反应。相对于常见的造模方式，通过尾静脉注射或皮下接种肿瘤细胞的方法进行的动物造模实验，上述两种耗时间，同时一般接种的小鼠都是免疫缺陷

小鼠,最佳造模时间短暂,用上述两种很容易导致小鼠死亡,影响观察时间。因此本课题优化造模方式,用肝癌细胞系直接肝内注射包埋的方式,耗时短,结果发现在术后 1 周有瘤体长出,最晚术后 10 d 长出肿瘤,成瘤率约为 85%,比上述两种成瘤效果更高,且老鼠死亡率也较低。

随后用 IL-1 炎症刺激因子对小鼠进行干预实验,3 d 后发现干预小鼠开始出现精神萎靡,甚至死亡,待 5 d 后实验组小鼠全部死亡,而对照组无一例死亡。两组瘤体大小变化不大,追寻原因,可能是 IL-1 干预组体内炎症反应强烈,造成机体内炎症免疫紊乱,而小鼠无法对抗体内强烈的炎症免疫反应,致使精神欠佳。IL-8,又称为趋化因子,是巨噬细胞和上皮细胞等分泌的细胞因子,主要由核-巨噬细胞产生,主要参与机体的炎症反应。IL-10 是一种多细胞源、多功能的细胞因子,调节细胞的生长与分化,参与炎症反应和免疫反应,是目前公认的炎症与免疫抑制因子。因此用上述两种因子进行检测发现,IL-8 在干预后的表达明显高于在干预前和对照组的表达。IL-10 在干预后表达也有上升,相对于干预前和对照组,表达上升不明显,可能是 IL-1 处理后刺激机体炎症反应增加。IL-8 作为一种炎症趋化因子,刺激局部炎症反应增强,而 IL-10 作为一种抑炎因子,在刺激后反应落后于刺激因子的表达水平。

肿瘤浸润淋巴细胞主要存在于炎性浸润的实体肿瘤内部,被认为是宿主抗肿瘤反应的主要效应细胞。研究认为 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞主要抑制肿瘤细胞的免疫反应,引起肿瘤细胞逃避机体的免疫监视,从而促进肿瘤的发生和发展^[7-8]。结合本文,IL-1 干预后 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比值较干预前和对照组均明显升高,而对照组治疗前 CD4⁺CD25⁺ 占 CD4⁺ 的比例无明显差别。结果推测随着肝癌内环境炎症反应的加强,免疫抑制作用也加

强,从而更容易引起肝癌的侵袭和转移。

综上,肝癌体内存在免疫和炎症反应,两者是同时存在的,但两者之间有无协同作用,是否通过调控体内的炎症反应进而促进肝内的免疫反应,促进瘤细胞的免疫逃逸,将进一步通过肝癌炎症和免疫的调控机制的研究来揭示肝癌发生发展的生物学行为。

参考文献

- [1] Yang J D, Nakamura I, Roberts L R. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets [J]. Semin cancer, 2011, 21 (1): 35-43.
- [2] Wang H Y, Chen L. Tumor microenvironment and hepatocellular carcinoma metastasis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28 (1): 43-48.
- [3] Parisi L, Gini E, Baci D, et al. Macrophage polarization in chronic inflammatory diseases: killers or builders [J]. J Immunol Res, 2018, 1 (14): 1-2.
- [4] Kimya Y, Akdis C, Cengiz C, et al. Plasma interleukin-1binterleukin-and interleukin-1 receptor antagonist levels in pre-eclampsia [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1997, 73 (1): 17-21.
- [5] Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, et al. Hepatocyte-stellatecell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory micro-environment that drives progression in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Research, 2012, 72 (10): 2533-2542.
- [6] Eli P. Neighbourhood deaths cause a switch in cancer subtype [J]. Nature, 2018, 562 (7725): 45-46.
- [7] 刘鑫男,李丹,李斌. 免疫微环境介导的肿瘤耐受机制及其靶向治疗 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40 (13): 2281-2290.
- [8] 杜娜雯,白日兰,崔久崑. 肿瘤免疫逃逸机制及治疗策略 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26 (4): 454-462.

• 基础研究 •

有机磷农药、高糖高脂饮食对二乙基亚硝胺诱发的大鼠肝癌模型肝组织损伤的实验研究

福建卫生职业技术学院 (福州 350101) 郭丹 黄慧 倪峰¹ 刘炜 王玉婷 张月芬

【摘要】目的 研究低剂量三唑磷暴露、高糖高脂饮食对二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发的大鼠肝癌模型肝组织病理的影响。**方法** 将正常 6 周龄雄性 SD 大鼠 70 只随机分为 4 组,分别为对照组 (10 只)、DEN 组 (20 只)、农药组 (20 只)、双高组 (20 只)。除对照组外,其余 3 组分别进行间歇腹腔注射 DEN、腹腔注射 DEN+有机磷农药饮水、腹腔注射 DEN+高脂高糖饲料的处理,观察大鼠的饮食、毛色、精神及活动情况,每周测量大鼠体质量,每隔 4 周解剖部分大鼠观察肝脏形态,造模 16 周时解剖大鼠观察肝脏病理学形态。**结果** 对照组大鼠饮食活动正常,毛色自然。实验组随着 DEN 注射次数的增加,均出现不同程度的消瘦、脱毛、毛发枯槁、活动减少等现象。造模后,各实验组大鼠平均体质量均低于对照组。实验第 16 周时,DEN 组、农药组及双高组的肝脏形态皆出现明显的病理改变,各组的病变严重程度为:双高组>农药组>DEN 组。**结论** 农药污染、高糖高脂饮食可促进 DEN 诱导肝脏由肝炎-肝硬化的发展过程;施加低剂量三唑磷、高糖高脂饮食因素诱导的肝癌发展过程在组织形态学上更接近临床真实病例,这为改进 DEN 肝癌大鼠模型提供有力的实验依据。

基金项目:福建省科技计划引导性项目 (2019Y0051)

¹ 通信作者