

应用流式细胞术检测胃癌移植瘤小鼠脾脏中 MDSC 及 T 淋巴细胞亚群的变化

李 南,曾凡业,全梦婷,节阳华,轩艳红,张洪亮

(新疆医科大学第四附属医院肿瘤二科,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 观察胃癌荷瘤小鼠脾脏中髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性 T 细胞(Treg)和传统 T 淋巴细胞群的变化。方法 随机将 30 只 C57BL/6J 小鼠分成荷瘤组和正常组,荷瘤组小鼠模型右侧背部皮下注射小鼠前胃癌细胞,正常组注射等量生理盐水,待肿瘤形成后,采用多色流式分析检测两组小鼠脾脏中 MDSC、Treg 以及 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数量和相应比例,膜联蛋白-V (Annexin-V)染色检测 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞凋亡变化,5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)染色检测 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞增殖变化。结果 荷瘤组小鼠脾脏中 MDSC 和 Treg 占总脾脏细胞中的数量和比例高于正常组,CD4⁺和 CD8⁺T 细胞数量和比例低于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。荷瘤组小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞增殖低于正常组,CD8⁺T 细胞凋亡高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MDSC 和 Treg 细胞可积聚在胃癌荷瘤小鼠脾脏中,且其能抑制 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞增殖和促进 CD8⁺T 细胞凋亡。

关键词:骨髓源性抑制细胞;T 淋巴细胞亚群;胃癌;CD4⁺T 细胞;CD8⁺T 细胞

中图分类号:R392

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.16.021

文章编号:1006-1959(2021)16-0077-04

Application of Flow Cytometry to Detect the Changes of MDSC and T Lymphocyte Subsets in the Spleen of Mice with Gastric Cancer Transplantation

LI Nan,ZENG Fan-ye,TONG Meng-ting,JIE Yang-hua,XUAN Yan-hong,ZHANG Hong-liang

(Second Department of Oncology,the Fourth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,Urumqi 830000,Xinjiang,China)

Abstract: Objective To observe the changes of myeloid-derived suppressor cells (MDSC), regulatory T cells (Treg) and traditional T lymphocyte populations in the spleen of mice bearing gastric tumors. **Methods** A total of 30 C57BL/6J mice were randomly divided into tumor-bearing group and normal group. The right back of the tumor-bearing group was injected with mouse forestomach carcinoma cell, and the normal group was injected with the same amount of normal saline. After the tumor formed, polychromatic flow was used. Formula analysis was used to detect the number and corresponding proportions of MDSC, Treg, CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleens of the two groups of mice. Annexin-V (Annexin-V) staining was used to detect the changes of CD4⁺ and CD8⁺ T cell apoptosis, 5-bromodeoxy Uracil (BrdU) staining was used to detect the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Results** The number and proportion of MDSC and Treg in the total spleen cells in the spleen of the tumor-bearing mice were higher than that of the normal group, and the number and proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells were lower than the normal group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen of mice in the tumor-bearing group was lower than that in the normal group, and the apoptosis of CD8⁺ T cells was higher than that in the normal group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** MDSC and Treg cells can accumulate in the spleen of gastric tumor-bearing mice, and they can inhibit the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and promote the apoptosis of CD8⁺ T cells.

Key words: Bone marrow-derived suppressor cells; T lymphocyte subsets; Gastric cancer; CD4⁺T cells; CD8⁺T cells

胃癌(gastric cancer)是消化道最常见的恶性肿瘤,其死亡率约占所有癌症死亡率的 20%~30%,一般患者的 5 年生存率小于 20%,且大多预后较差^[1]。目前胃癌的致病机制尚不明确,认为肿瘤细胞可能通过促进免疫细胞凋亡或抑制其功能从而获得免疫逃逸。传统治疗方案如手术、放疗及化疗未能明显改善患者的预后生存,但随着对胃癌生物分子学机制的不断深入研究,肿瘤免疫治疗可能为胃癌治疗方案提供新的思路。髓性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)是一种异质性细胞,主要来源于骨髓祖细胞和未成熟髓细胞。研究发现^[2,3],大量

MDSC 积聚在荷瘤小鼠脾脏、血液及肿瘤组织或存在肿瘤患者的外周血及肿瘤组织中。正常的免疫应答反应是机体抵抗肿瘤细胞形成和发展的重要保护因素,其中 CD8⁺T 细胞介导的细胞免疫反应尤为突出。在肿瘤微环境中,活化的 MDSC 可通过直接或间接作用发挥免疫抑制作用,产生免疫逃逸反应,从而使肿瘤逃避机体的自身免疫监视体系,促进肿瘤发展^[4]。本研究建立小鼠胃癌皮下移植瘤模型,利用流式细胞术检测荷瘤小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞以及 MDSC 和调节性 T 细胞(Treg)的数量及相关比例变化,并分析其相关 T 淋巴细胞的增值和凋亡反应,探讨 MDSC 在胃癌免疫逃逸中可能的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠 30 只,购自中国医学科学院医学实验动物研究所[许可

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(编号:2016D01C134)

作者简介:李南(1990.10-),女,新疆乌鲁木齐人,硕士,住院医师,主要从事消化道肿瘤免疫相关研究

通讯作者:张洪亮(1965.5-),男,新疆乌鲁木齐人,硕士,主任医师,主要从事肺、乳腺、大肠、胃、肝等癌症的中西医综合治疗工作

证号:scxk(京)2019-0011],在新疆医科大学大学实验动物中心饲养。本实验设计经动物实验伦理审核。

1.1.2 细胞株 小鼠前胃癌细胞株(mouse forestomach carcinoma cell, MFC)购自于中科院上海生命科学院。

1.1.3 仪器及试剂 红细胞裂解液, Fc 受体阻断剂(2.4G2), 相关流式抗体 (BV421 标记大鼠抗小鼠 CD25; BV605 标记大鼠抗小鼠 CD8a; Alexa Fluor™ 647 标记大鼠抗小鼠 FcγR3 APC-cy7 标记大鼠抗小鼠 CD11b。FITC 标记大鼠抗小鼠 CD4; PE 标记大鼠抗小鼠 Gr-1; PE-cy7 标记大鼠抗小鼠 CD3), 活力染料 FVS510, 荧光补偿微球及膜联蛋白-V (Annexin-V) 凋亡染色试剂盒、5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 细胞增殖检测试剂盒均购自美国 BD bioscience 公司。流式细胞仪为 CytoFLEX 和流式数据分析软件为 Kaluza 2.0 均购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 造模消化 收集对数生长期的 MFC 细胞, PBS 洗涤 2 次后, 用 PBS 制成细胞悬液, 台盼蓝染色活细胞比例大于 95%, 并进行细胞计数, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。采用随机数字表法将 30 只小鼠分成正常组和荷瘤组, 每组 15 只。对小鼠右侧背部皮肤进行常规酒精消毒后, 荷瘤组小鼠注射取 0.2 ml 的 MFC 细胞悬液, 正常组小鼠注射等量的生理盐水。

1.2.2 免疫细胞表面抗原染色 肿瘤形成约 2 周后采用颈椎脱臼法处死小鼠, 分离脾脏并将其制成单细胞悬液, 加入 Fc 受体阻断剂 2.4G2, 4°C 下封闭 10 min, 然后加入活力染料 FVS510 (1:1000 稀释), 室温下孵育 15 min。用细胞缓冲液洗涤 2 遍后加入滴定的细胞表面抗体混合液, 总反应体系为 $50 \mu\text{l}$, 4°C 下避光孵育 10 min, 细胞缓冲液清洗两遍后上机检测。采用 FMO 作为阴性对照, 细胞

凋亡检测按照说明书操作。

1.2.3 细胞内染色 制备脾脏单细胞悬液, 在进行细胞表面抗原染色后, 染色缓冲液洗涤 2 次后, 加入 $100 \mu\text{l}$ 细胞固定/打孔液, 混匀后 4°C 下避光放置 20 min。2 次细胞固定/打孔缓冲液洗涤后, 用 $100 \mu\text{l}$ 细胞固定/打孔缓冲液重悬后, 加入滴定的 Foxp3 抗体, 4°C 下避光孵育 30 min。细胞固定/打孔缓冲液洗涤 2 次后上机检测。

1.2.4 细胞增殖检测 小鼠 24 h 腹腔内注射 BrdU 溶液, 1 mg/只, 连续注射 3 d。在处死小鼠制成脾脏单细胞悬液后, 先进行细胞表面染色, 细胞经固定, 破膜后加入 DNase ($1 \times 10^7/\text{ml}$), 37°C 下避光孵育 60 min, 加入荧光素标记的 BrdU 单克隆抗体染色, 采用流式细胞仪进行检测分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。将 $\alpha=0.05$ 设为检验水准。

2 结果

2.1 胃癌 MFC 荷瘤小鼠肿瘤形成情况 胃癌移植瘤接种小鼠后, 第 6 天可在体外触及约黄豆大小肿块, 约第 17 天后肿块显著增大, 其与正常组小鼠相比, 荷瘤组小鼠开始出现不同程度的消瘦、竖毛、蜷缩、精神萎靡、懒动、活动量减少, 成瘤率为 100.00%。

2.2 荷瘤小鼠脾脏中 MDSC 和 Treg 细胞变化 在流式数据分析中, 应用 4 个基本的二维散点图以消除上样分析样本的碎片、死细胞, 粘连体和不稳定的细胞流见图 1。与正常组相比, 荷瘤组 MDSC 占脾细胞的比例和数量升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 荷瘤组 $\text{CD}3^+\text{CD}4^+\text{CD}25^+\text{Foxp}3^+$ Treg 细胞比例及数量较正常组升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2、表 1。

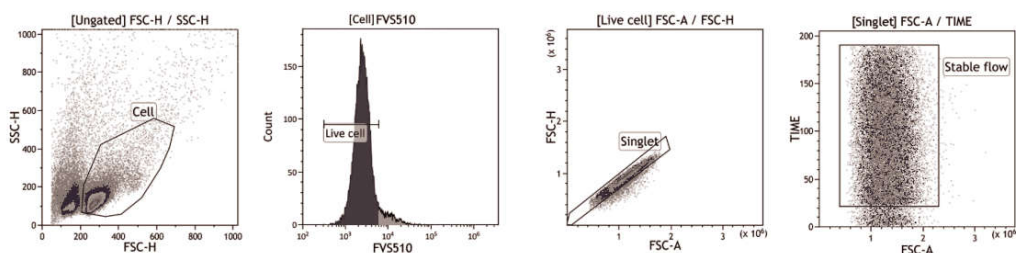


图1 粘连体和不稳定的细胞流

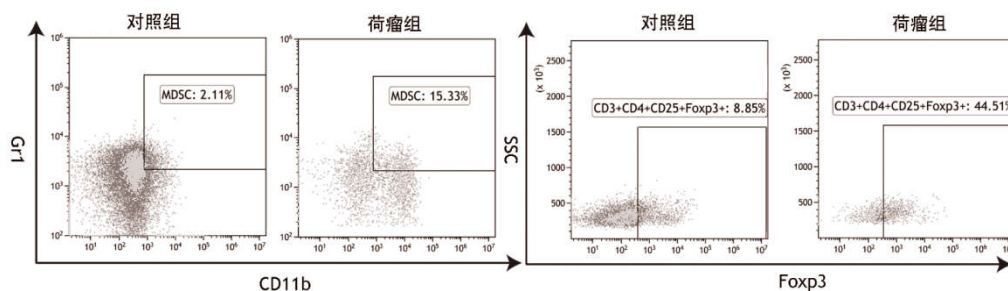


图2 小鼠脾脏中 MDSC 和 Treg 细胞

表 1 两组小鼠脾脏中 MDSC 和 Treg 细胞比例及数量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDSC 比例(%)	MDSC 数量($\times 10^7$)	Treg 比例(%)	Treg 数量($\times 10^7$)
正常组	15	3.24 \pm 1.39	0.42 \pm 0.01	10.18 \pm 2.76	0.12 \pm 0.03
荷瘤组	15	26.56 \pm 3.91	1.94 \pm 0.58	37.93 \pm 4.01	0.29 \pm 0.05
t		5.862	2.365	3.824	2.122
P		0.000	0.023	0.001	0.004

2.3 荷瘤小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞变化 荷瘤组小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞所占脾细胞比例和数量低于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3、表 2。

2.4 荷瘤小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞凋亡率与增

值率变化 荷瘤组 CD4⁺T 细胞凋亡率高于正常组,但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 荷瘤组小鼠脾脏 CD8⁺T 细胞凋亡比例高于正常组,且 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞增值率低于正常组,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 4、表 3。

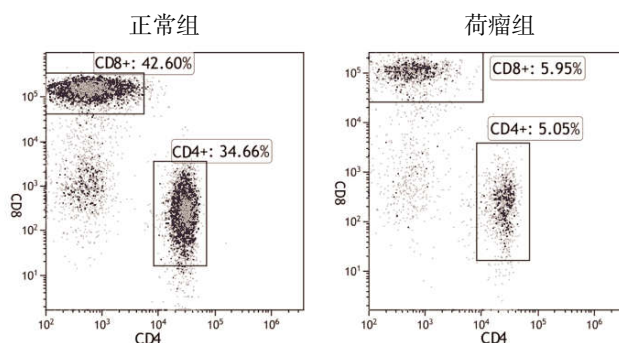


图 3 小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞

表 2 两组小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞比例及数量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T 细胞比例(%)	CD4 ⁺ T 细胞数量($\times 10^7$)	CD8 ⁺ T 细胞比例(%)	CD8 ⁺ T 细胞数量($\times 10^7$)
正常组	15	50.12 \pm 2.98	2.87 \pm 0.35	25.17 \pm 0.74	0.95 \pm 0.13
荷瘤组	15	7.54 \pm 1.64	0.96 \pm 0.81	5.14 \pm 0.63	0.46 \pm 0.05
t		8.457	3.525	4.963	2.114
P		0.000	0.001	0.000	0.044

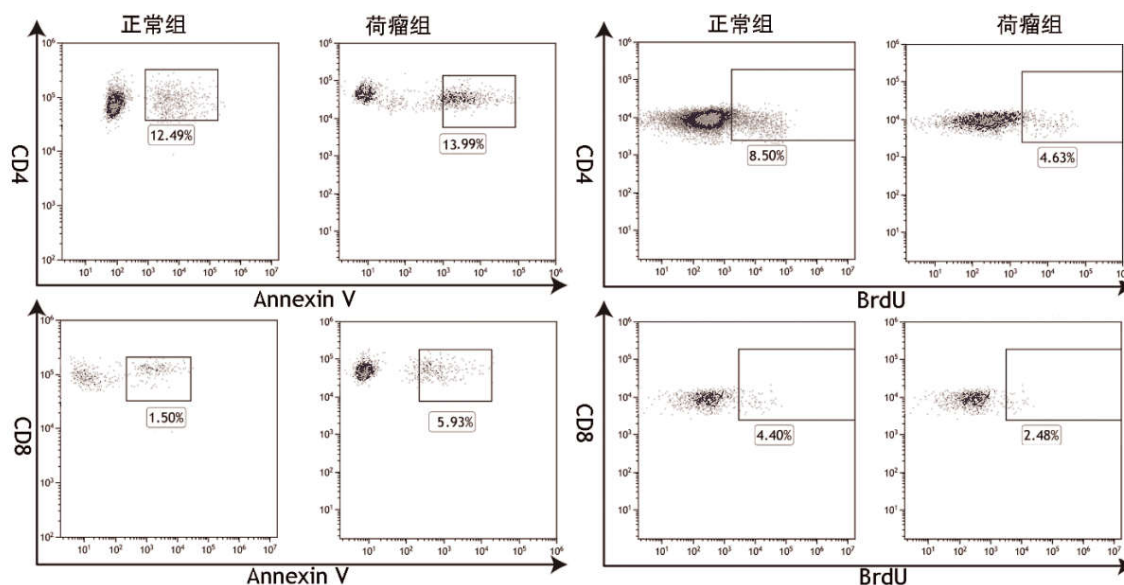


图 4 小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞凋亡率与增值率

表3 两组小鼠脾脏中 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞凋亡率与增值率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	CD4 ⁺ 凋亡率	CD8 ⁺ 凋亡率	CD4 ⁺ 增值率	CD8 ⁺ 增值率
正常组	15	11.94±3.96	3.74±1.07	9.32±1.65	5.94±0.43
荷瘤组	15	13.94±1.45	5.53±0.84	2.96±0.47	1.33±1.59
t		2.543	2.087	4.352	6.113
P		0.017	0.046	0.000	0.000

3 讨论

肿瘤的发生与发展常伴随着机体自身的免疫功能异常变化,且主要体现在各种功能性免疫细胞数量或功能的改变。体内多种免疫细胞可杀伤或清除肿瘤细胞,但传统 T 细胞仍发挥着至关重要作用,其中 CD8⁺效应性 T 细胞可释放穿孔素或颗粒酶,分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及表达膜型 FasL 等机制直接杀伤肿瘤细胞,而 CD4⁺效应性 T 细胞可释放 Th1 型细胞因子,促进 CD8 的细胞毒性杀伤机制^[5]。然而,在机体抗肿瘤免疫应答过程中,肿瘤细胞却能逃避机体免疫系统的攻击或抑制传统 T 细胞免疫应答,从而导致肿瘤细胞在体内进行性生长。MDSC 和 Treg 细胞可发挥免疫抑制作用,其中人 MDSC 定义为 CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{low}-, 小鼠 MDSC 定义为 Gr1⁺CD11b⁺^[6], 而 Treg 是一群细胞表面高表达 CD25,胞内高表达 Foxp3 转录因子的 CD4⁺T 细胞亚群。肿瘤部位的 MDSC 可分泌白介素-10(IL-10)和转化生长因子- β (TGF- β) 等抑制免疫应答,而 Treg 细胞可通过细胞直接接触和分泌 IL-35 和 TGF- β 等细胞因子抑制 T 效应细胞增殖^[7,8]。

MDSC 是免疫抑制网络中主要的细胞群,其是由早期髓源祖细胞、非成熟粒细胞、单核细胞以及不同分化阶段的树突状细胞组成,可存在于肿瘤患者外周血和大量积聚在荷瘤宿主外周淋巴和肿瘤组织中^[9]。本研究采取 MFC 小鼠背部注射制备胃癌小鼠模型,主要观察荷瘤小鼠脾脏中各种淋巴细胞的变化,结果显示荷瘤小鼠脾脏中 MDSC 和 Treg 细胞较正常组升高,而 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞比例和数量却呈下降趋势($P < 0.05$),其原因可能为这两类淋巴细胞的增殖能力明显降低,且 CD8⁺T 细胞的凋亡能力显著升高。此外,MDSC 的大量增殖和激活能诱导一氧化氮合酶、精氨酸酶和活性氧的表达,从而导致精氨酸的加速分解和一氧化氮的大量合成,而精氨酸的缺乏会阻滞 T 细胞的分化和增殖,且一氧化氮的积聚抑制 IL-2 受体下游信号蛋白,从而抑制 T 细胞活化,并激活 Fas-FasL 途径促进 T 细胞凋亡^[9,10]。此外,CD8⁺T 细胞 Fas 表达的增加,也会增强肿瘤组织 MDSC 和 Treg 诱导凋亡的敏感性。

总之,胃荷瘤小鼠脾脏中 MDSC 和 Treg 细胞比例和数量增加,而具有抗肿瘤细胞作用的 CD4⁺和

CD8⁺T 细胞数量降低,增殖受阻和凋亡增加,提示肿瘤形成和发展过程中机体免疫功能的复杂变化,且主要表现为抑制肿瘤作用减弱,促进肿瘤进展因素增强。因此,如何扭转这一免疫功能变化,将会为临床胃癌患者的治疗提供新的方向,但具体免疫细胞在肿瘤微环境中所起的作用仍需进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, et al. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 4012.
- [2] Law A, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer [J]. Cells, 2020, 9(3): 561.
- [3] Yang L, Wang B, Qin J, et al. Blockade of CCR5-mediated myeloid derived suppressor cell accumulation enhances anti-PD1 efficacy in gastric cancer [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(1): 91-97.
- [4] 陈思文, 王翎, 苏楠, 等. 老年荷瘤小鼠髓源性抑制细胞亚群检测及功能研究[J]. 中华老年医学杂志, 2016, 35(6): 651-655.
- [5] Sabine H, Loh J, Cristina R, et al. Synergy between CD8 T Cells and Th1 or Th2 Polarised CD4 T Cells for Adoptive Immunotherapy of Brain Tumours[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63933.
- [6] Diaz-Montero CM, Finke J, Montero AJ. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic, predictive, and prognostic implications[J]. Semin Oncol, 2014, 41(2): 174-184.
- [7] Lindau D, Gielen P, Kroesen M, et al. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells[J]. Immunology, 2013, 138(2): 105-115.
- [8] Onyilagha C, Kuriakose S, Ikeogu N, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Contribute to Susceptibility to Trypanosoma congolense Infection by Suppressing CD4⁺ T Cell Proliferation and IFN- γ Production[J]. J Immunol, 2018, 201(2): 507-515.
- [9] Ornstein MC, Diaz-Montero CM, Rayman P, et al. Myeloid-derived suppressors cells (MDSC) correlate with clinicopathologic factors and pathologic complete response (pCR) in patients with urothelial carcinoma (UC) undergoing cystectomy[J]. Urol Oncol, 2018, 36(9): 405-412.
- [10] Ibáñez-Vea M, Zuazo M, Gato M, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment: Current Knowledge and Future Perspectives[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018, 66(2): 113-123.

收稿日期: 2021-02-28; 修回日期: 2021-03-12

编辑/刘欢