

文章编号: 1674-8115(2010)09-1176-03

· 短篇论著 ·

# 小鼠肺部肿瘤集聚髓源性抑制细胞实验研究

钟 华, 韩宝惠

(上海交通大学附属胸科医院肺内科, 上海 200030)

**摘 要:** **目的** 观察髓源性抑制细胞(MDSCs)在荷瘤小鼠肺部组织的表达情况。**方法** 取 12 只 C57BL/6 小鼠随机分为实验组和对照组, 每组 6 只。实验组: 将体外培养的 3LL 细胞( $0.3 \times 10^6$  个)注射入小鼠尾静脉, 成瘤后 3 周取小鼠肺组织, 酶消化肺组织, 制备肺组织单细胞悬液, 采用流式细胞术检测 MDSCs(GR1-FITC、CD11b-PE 双染阳性)的表达量。对照组: 在小鼠尾静脉注射 PBS, 其余步骤同实验组。**结果** 实验组小鼠肺部组织高表达免疫抑制细胞 MDSCs( $GR^+CD11b^+$  双阳性), 表达量为  $(19.92 \pm 6.08)\%$ ; 对照组 MDSCs 表达量为  $(7.06 \pm 2.67)\%$ , 两组比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。**结论** 肺癌小鼠的肺组织高表达免疫抑制细胞 MDSCs。

**关键词:** 髓源性抑制细胞; 肺癌; 小鼠; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8115.2010.09.038

中图分类号: R730.51

文献标志码: B

## Study of myeloid-derived suppressor cell accumulation in lung of tumor-bearing mice

ZHONG Hua, HAN Bao-hui

(Department of Pulmonary Medicine, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the expression of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in lung tissues of tumor-bearing mice. **Methods** Twelve C57BL/6 mice were randomly divided into experiment group and control group, with 6 mice in each group. 3LL cells ( $0.3 \times 10^6$ ) cultured *in vitro* were injected into tail vein of mice in experiment group, and mouse lung tissues were obtained three weeks after tumor formation. Lung single cell suspension was made with mixture of enzyme, and the expression of MDSCs (GR1-FITC and CD11b-PE double positive staining) was detected by flow cytometry. PBS was injected into tail vein of mice in control group, and the following treatment was the same as that in experiment group. **Results** MDSCs were highly expressed ( $19.92\% \pm 6.08\%$ ) in lung tissues of mice in experiment group ( $GR^+CD11b^+$  double positive staining), that in control group was  $7.06\% \pm 2.67\%$ , and there were significant differences between two groups ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** MDSCs are highly expressed in lung tissues of mice with lung cancer.

**Key words:** myeloid-derived suppressor cells; lung cancer; mouse; flow cytometry

在肺部肿瘤的多学科治疗中,免疫治疗的疗效始终没有得到确定。目前研究<sup>[1-2]</sup>发现,髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)在肿瘤组织内的过多集聚可能是肿瘤对于免疫治疗效果不佳的主要原因。MDSCs 除了可以促进肿瘤的发生和生长外,还具有促进肿瘤逃脱免疫监视、阻碍免疫效应细胞的功能。MDSCs 主要分布在血液、脾脏、淋巴结及骨髓等部位,通过复杂的分子途径,抑制机体的抗肿瘤免疫作用。MDSCs 在小鼠表达为  $GR1^+CD11b^+$  细胞,但目前尚未有证据证实小鼠的肺癌

组织中集聚 MDSCs。因此,本研究应用流式细胞术检测荷瘤小鼠肺部组织的 MDSCs 含量,为今后抗肺部肿瘤免疫治疗中针对 MDSCs 的靶向治疗提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 12 只,体重 20 g 左右,SPF 级,雄性。动物生产许可证号为 SCXK(沪)2007-0001;使用许可证号为 SYXK(沪)

基金项目:上海市自然科学基金(10ZR1428200)(Natural Science Foundation of Shanghai, 10ZR1428200)。

作者简介:钟 华(1972—),女,博士,副主任医师;电子邮箱:eddiehong8@hotmail.com。

通讯作者:韩宝惠,电子邮箱:xkyyhan@yahoo.cn。

2008-0043。

**1.1.2 细胞和试剂** Lewis 肺癌细胞(3LL)由中国科学院上海细胞生物研究所提供。RPMI-1640 培养液;孔径为 75  $\mu\text{m}$  细胞过滤网(Fisher, 美国);FACS 缓冲液;流式抗体:GR1-FITC、CD11b-PE 与同型对照抗体(BD, 美国)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 3LL 细胞置于 RPMI-1640 完全培养基中,并放入 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中;5 d 后消化贴壁的肿瘤细胞。

**1.2.2 分组** 12 只小鼠随机分为实验组和对照组,每组 6 只。实验组:将  $0.3 \times 10^6$  个 3LL 肿瘤细胞悬浮于 500  $\mu\text{L}$  PBS 液中,注入小鼠尾静脉;对照组:直接在小鼠尾静脉中注射 500  $\mu\text{L}$  PBS。

**1.2.3 制备肺组织单细胞悬液** 将 DNA 酶、胶原酶、透明质酸酶混合,取 4.5 mL 上述混合酶。两组小鼠接种后 3 周,分别处死,取出肺组织,用眼科手术剪剪碎,置于混合酶中,37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 20 min 取出;研磨,应用细胞过滤网过滤获得小鼠的肺组织单细胞悬液。

**1.2.4 流式细胞术检测 MDSCs 的表达<sup>[2]</sup>** 上述细胞悬液用 FACS 缓冲液洗涤,洗涤后加入 4 mL 缓冲

液,每一流式小管分别置入 1 mL。每组共 4 管,分别加入同型对照、GR1-FITC、CD11b-PE 以及 GR1-FITC + CD11b-PE;室温下孵育 30 min,洗涤后固定,上流式细胞仪分析。二维点阵图应用 WinMDI2.8 软件分析;双阳性细胞比例扣除同型对照比例后为 MDSCs 所占百分比。

## 1.3 统计学处理

采用 SigmaPlot 11.0 统计软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结 果

取实验组小鼠的肺组织,可见暗红色的散在肿瘤结节,光镜下证实成瘤。流式细胞术检测显示,对照组小鼠肺组织中 MDSCs (GR<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 双阳性)表达量为  $(7.06 \pm 2.67)\%$ ,实验组小鼠肺组织中 MDSCs 表达量为  $(19.92 \pm 6.08)\%$ ,两组小鼠肺组织 MDSCs 表达量比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明在实验组小鼠的肺组织单细胞悬液中 MDSCs 明显集聚。由图 1 可见,对照小鼠的肺组织 MDSCs 表达量为 10.27%;荷瘤小鼠的肺组织 MDSCs 表达量为 28.6%。

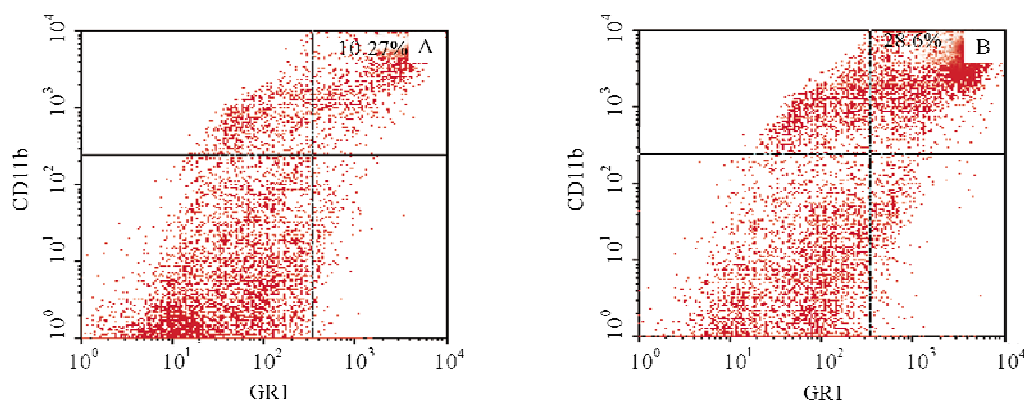


图 1 流式细胞仪检测荷瘤小鼠和对照小鼠肺组织 MDSCs 的表达

Fig1 Expression of MDSCs in lung tissues of tumor-bearing and control mice detected by flow cytometry

A: 对照小鼠; B: 荷瘤小鼠

## 3 讨 论

MDSCs 早在 20 世纪 80 年代就已被学者发现,是一类具有免疫抑制功能的细胞群;2007 年 Gabrilovich 等<sup>[3]</sup>建议统一命名为 MDSCs。MDSCs 具有异质性、未成熟性和可塑性,包括各分化阶段的巨噬细胞、粒细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC);

其表面标志较为复杂,取决于机体中不同细胞因子的影响和该群细胞的获得途径;在小鼠表达为 GR1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> 细胞,在人表达为 CD33<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> 细胞<sup>[4-5]</sup>。

MDSCs 除了出现在肿瘤疾病中以外,还可以在感染性疾病中集聚。但是在感染性疾病中,MDSCs 呈一过性增高,当外源性因素去除后可以恢复正常;

而在肿瘤性疾病中 MDSCs 持续性增高<sup>[6]</sup>。MDSCs 对于肿瘤免疫的影响,表现在以下几个方面:①作为 DC 的前提细胞,不能分化为成熟的 DC,这种未成熟的 DC(iDC)通过细胞接触和产生 NO 来抑制 T 细胞的功能;②MDSCs 具有向免疫细胞抑制作用的 2 型 M $\phi$ (M2)方向分化的趋势;③导致肿瘤特异性 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量下降;④在荷瘤小鼠体内诱导 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fox3<sup>+</sup>Treg 细胞产生,引起免疫无能和抑制;⑤抑制 NK 细胞的活性。MDSCs 抑制肿瘤免疫的途径可分为氨基酸依赖性和非依赖性两类<sup>[6-8]</sup>。

综上所述,MDSCs 被认为在肿瘤的免疫抑制中起关键性作用。本研究中,我们应用尾静脉注射 3LL 细胞建立了鼠源性的肺部肿瘤,3 周后应用酶消化法获得小鼠肺组织单细胞悬液,利用流式双染法检测到小鼠肺组织中集聚的高浓度 MDSCs,证实了 MDSCs 在肺部肿瘤发生、发展中起着关键作用,如果能寻找到针对 MDSCs 的有效治疗方法,或许能找到抑制肺部肿瘤的途径。目前,有许多研究正集中寻找去除这些细胞的方法,减小或者逆转 MDSCs 的免疫抑制功能。这些探索性的方法包括:利用抗 GR1 抗体清除 GR1<sup>+</sup>细胞,但 GR1<sup>+</sup>还表达于中性粒细胞,如果同时去除,有增加感染的可能;利用全反式维甲酸诱导 MDSCs 的成熟;应用精氨酸特异性阻断剂减低 MDSCs 的免疫抑制活性<sup>[9-10]</sup>。今后的研究应侧重于 MDSCs 发生和发展的时间与空间变化,找到与肿瘤进程密切相关的细胞亚型,充分考虑到 MDSCs 抑制机制的个体差异性、空间差异性和时间差异性。

#### 参考文献:

- [1] Serafini P, De Santo C, Marigo I, et al. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(2): 64-72.
- [2] Frey AB. Myeloid suppressor cells regulate the adaptive immune response to cancer[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(10): 2587-2590.
- [3] Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1): 425.
- [4] Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice[J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5791-5802.
- [5] Watanabe S, Deguchi K, Zheng R, et al. Tumor-induced CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes[J]. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3291-3300.
- [6] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer[J]. *Immunol*, 2009, 182(8): 4499-4506.
- [7] Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer[J]. *J Immunol*, 2001, 166(1): 678-689.
- [8] Sinha P, Clements VK, Bunt SK, et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response[J]. *J Immunol*, 2007, 179(2): 977-983.
- [9] Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, et al. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor bearing animals and enhances antitumor immune activity[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(18): 6713-6721.
- [10] Serafini P, Borrello I, Bronte V, et al. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression[J]. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(1): 53-65.

收稿日期: 2010-01-25

本文编辑: 张哲康