

· 基础研究 ·

荷瘤大鼠射频消融治疗前后肝脏巨噬细胞炎性蛋白-1 α 的变化及其意义

戴维德 范智慧 陈敏华 河福金 李洪民

【摘要】目的 研究射频消融(RFA)治疗大鼠肝肿瘤前、后肝脏局部组织内单个核细胞中 OX-62、OX-6 及 CD86 阳性表达率及其相关趋化因子巨噬细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α)的变化,探讨 RFA 对肝脏局部组织内树突状细胞分化迁移的影响。**方法** 取 60 只正常 Sprague Dawley (SD)大鼠制作 Walker-256 肝肿瘤模型后,分为 RFA 后 7 d 组、RFA 后 14 d 组和荷瘤对照组,每组 20 只。RFA 后 7 d 组、RFA 后 14 d 组分别于 RFA 处理后第 7 天及第 14 天处死,对照组不做 RFA 处理即处死。取消融灶周边(对照组取肿瘤周边)0.5 cm 范围内肝组织,采用 Ficoll 密度梯度离心法分离出单个核细胞,应用流式细胞仪检测单个核细胞 OX-62、OX-6 及 CD86 表达水平。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测肿瘤周边或消融灶周边 0.5 cm 范围内肝组织内 MIP-1 α 浓度。**结果** 荷瘤对照组肿瘤周边肝组织内单个核细胞中有(15.29 $\pm$ 4.59)%表达 OX-6,RFA 后 7 d 组和 RFA 后 14 d 组 OX-6 阳性表达率分别为(34.20 $\pm$ 11.62)%、(39.18 $\pm$ 9.14)%,与荷瘤对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。荷瘤对照组肿瘤周边肝组织内单个核细胞中有(18.91 $\pm$ 4.58)%表达 OX-62,RFA 后 7 d 组和 RFA 后 14 d 组 OX-62 阳性表达率分别为(24.49 $\pm$ 4.45)%、(22.77 $\pm$ 3.50)%,RFA 后 7 d 组与荷瘤对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。荷瘤对照组肿瘤周边肝组织内单个核细胞中有(66.29 $\pm$ 17.69)%表达 CD86,RFA 后 7 d 组 CD86 阳性表达率为(55.29 $\pm$ 10.69)%,RFA 后 14 d 组为(55.93 $\pm$ 12.64)%,2 组与荷瘤对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。荷瘤对照组肿瘤周边肝组织内 MIP-1 α 浓度为(232.92 $\pm$ 54.58)pg/ml,RFA 后 7 d 组和 RFA 后 14 d 组分别为(499.38 $\pm$ 15.14)pg/ml、(495.90 $\pm$ 9.94)pg/ml,与荷瘤对照组相比差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RFA 治疗后荷瘤大鼠肝脏 MIP-1 α 表达水平增高,促进树突状细胞的迁移,而肝脏单个核细胞 OX-62、OX-6 及 CD86 阳性表达率的变化也反映出这类细胞分化数量增多,有利于提高机体局部抗原提呈能力及宿主抗肿瘤免疫应答的恢复。

【关键词】 射频消融; 大鼠; 肝肿瘤; 树突状细胞; 巨噬细胞炎性蛋白-1 α ; 迁移

Changes of macrophage inflammatory protein-1 α in the livers of rats with Walker-256 tumors treated with radiofrequency ablation DAI Wei-de*, FAN Zhi-hui, CHEN Min-hua, HE Fu-jin, LI Hong-min. * Department of Ultrasound, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Corresponding author: CHEN Min-hua, Email: minhuachen@vip.sina.com

【Abstract】Objective To study changes in the expression levels of OX-62, OX-6 and CD86 of mononuclear cells and the related chemotatic factor macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in the livers of rats with Walker-256 tumors treated with radiofrequency ablation (RFA) and to elucidate the influence of RFA on differentiation and migration of liver dendritic cells (DCs). **Methods** Walker-256 liver tumors were induced in 60 Sprague-Dawley rats by implanting tumor particles. These rats were randomly divided equally into three groups from which liver tissue around the local area of the tumor was sampled at 7 d and 14 d after RFA. The mononuclear liver cells were separated with Ficoll density gradient centrifugation. The expression levels of OX-62, OX-6 and CD86 in the mononuclear cells were analyzed with flow cytometry. The expression level of MIP-1 α in the liver tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The average expression of OX-6 in the control rats was 15.29 $\pm$ 4.59% and those 7 d and 14 d after RFA were 34.20 $\pm$ 11.62% and 39.18 $\pm$ 9.14% respectively. The difference between the two RFA groups and the control group was statistically significant. The average expression rate of OX-62 in the control rats was 18.91 $\pm$ 4.58% and those 7 d and 14 d after RFA were 24.49 $\pm$ 4.45% and 22.77 $\pm$ 3.50% respectively. The difference between the 7 d group and the control group was significant. The average ex-

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.08.004

基金项目:北京市科委重大项目培育专项(Z0005190040431)

作者单位:100730 北京,卫生部北京医院超声科(戴维德,于北京大学临床肿瘤学院超声科攻读博士后);北京大学临床肿瘤学院超声科(范智慧、陈敏华),病理科(河福金、李洪民)

通信作者:陈敏华,Email:minhuachen@vip.sina.com

pression rate of CD86 in the control rats was $66.29 \pm 17.69\%$ and those 7 d and 14 d after RFA were $55.29 \pm 10.69\%$ and $55.93 \pm 12.64\%$ respectively. These differences between both RFA groups and the controls group were not significant. The average expression level of MIP-1 α around the tumors was 232.92 ± 54.58 pg/ml in the controls and 499.38 ± 15.14 pg/ml and 495.90 ± 9.94 pg/ml 7 d and 14 d after RFA respectively. These differences from the controls were both statistically significant. **Conclusion** The expression of MIP-1 α around the tumors was elevated after RFA, which could promote the migration of DCs. The changes in the expression of OX-62, OX-6 and CD86 also could reflect increased DC differentiation, which could improve local antigen-presenting capacity to a certain extent and recovery of host anti-tumor immune response.

【Key words】 Radiofrequency ablation; Rats; Liver tumors; Dendritic cells; Macrophage inflammatory protein-1 α ; Migration

近年来,免疫系统在识别和消除肿瘤中所发挥的重要作用已被人们逐渐认识。射频消融(radiofrequency ablation, RFA)、微波凝固等治疗方法在使肿瘤组织原位灭活的同时,通过改善宿主的免疫功能状态,增强机体的抗肿瘤免疫能力而进一步影响疗效^[1-2]。在抗肿瘤免疫中细胞免疫占有极其重要的地位,作为机体功能最强的专职抗原呈递细胞,树突状细胞(dendritic cell, DC)在体内的迁移是发挥其生物学功能的重要环节,DC在体内迁移主要受趋化因子/趋化因子受体系统介导^[3]。RFA治疗肝肿瘤后肝脏局部与DC迁移相关的趋化因子是否会发生变化从而影响DC的分化、迁移,目前鲜见报道,我们对此进行了初步研究,现报道如下。

材料与方法

一、实验动物和材料

健康、雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 200 g 左右, 购自军事医学科学院动物中心。

美国 Rita 公司产 500 型射频消融治疗系统, 发生器频率为 460 kHz, 最大发射功率为 50 W, 射频电极针为锚形, 其尖端设置 4 个热敏电耦, 最大扩展直径为 3 cm, 消融区温度实时监测并显示; 美国 Beckman Coulter 公司产流式细胞仪; 酶标比色分析仪由华东电子管厂制造, DG3022A 型。异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记抗大鼠 OX-62、多甲藻叶绿素蛋白 (peridinin chlorophyll protein, PerCP) 标记抗大鼠 OX-6 以及藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记抗大鼠 CD86 购于美国 BD 公司; 大鼠巨噬细胞炎症蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购于美国 RB 公司; 大鼠淋巴细胞分离液购自武汉博士德生物有限公司; 10% 水合氯醛由解放军总医院生产。

二、肿瘤模型制作及分组

1. 肿瘤模型制作: 将冻存的 Walker-256 腹水瘤细

胞液取出, 37℃ 条件下复苏后于 SD 大鼠腋窝皮下注射 0.2 ml, 7 d 后长成直径约 0.8 cm 瘤块。切取瘤块周边生长旺盛的鱼肉样组织, 用眼科剪剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块, 浸泡于生理盐水中备用。取健康 SD 大鼠 30 只, 按 3 ml/kg 体重腹腔注射 10% 水合氯醛, 麻醉后将其仰卧位固定于动物操作台上, 腹部脱毛; 于上腹部剑突下做一 1.5 cm 长的纵切口, 挤压牵出肝左叶, 直视下用小尖刀在肝组织浅面做一皮瓣; 纱布压迫止血后, 将上述 1 mm³ 瘤块植入, 压迫片刻; 腹腔注射青霉素, 依次缝合切口。瘤块种植后 10~12 d, 均长成直径为 0.5~0.8 cm 的肿瘤。

2. 动物分组: 将造模成功的大鼠 60 只随机均分为 RFA 后 7 d 组、RFA 后 14 d 组和荷瘤对照组, 每组 20 只。每组分为 2 个亚组, 每个亚组 10 只。其中一个亚组用于 DC 表型检测, 另一个亚组用于趋化因子检测。RFA 后 7 d 组、RFA 后 14 d 组进行 RFA 治疗 1 次。各组大鼠饲养条件相同。

三、RFA 治疗方法

荷瘤大鼠经 10% 水合氯醛腹腔麻醉后, 腹部脱毛, 将电极片粘贴于大鼠下腹脱毛区。无菌条件下开腹暴露肝脏, 将大鼠肝脏左叶轻柔牵出并固定, 斜置电极针经正常肝组织插入肿瘤, 展开电极针 (控制其直径在 0.5~0.8 cm, 消融直径约 1 cm)。设定射频仪功率为 50 W, 温度为 60℃, 阻抗控制在 150 Ω 左右, 射频作用时间为 4 min。射频处理完毕后收针, 将功率降至 15 W, 烧灼针道后退针。观察针道无出血即连续缝合关腹, 肌注青霉素 G 钠注射液, 20 000 U/kg。

四、取材方法

RFA 后第 7 天及第 14 天处死该 2 组大鼠, 取其消融灶周边 (荷瘤对照组取肿瘤周边) 0.5 cm 范围内肝组织待测, 荷瘤对照组不做 RFA 处理即处死取材, 方法同上。

五、标本处置及观察项目

1. 大鼠肝脏组织单个核细胞 OX-62、OX-6 及 CD86 表达水平的检测: 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离肝脏组织中单个核细胞。处死大鼠, 取出肝脏组织,

称取 5 g,用眼科剪将其剪碎,铜网(200 目)过滤制成细胞匀浆;将细胞匀浆沿壁缓慢注入预加有 2 ml 淋巴细胞分离液的试管中,沿壁缓慢注入预加有 2 ml 淋巴细胞分离液的试管中,2000 转/min,离心 15 min,小心吸出中间白色云雾状细胞层(即分离到的单个核细胞层),调细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$,每管 100 μl ,加入 OX-62、OX-6 及 CD86 抗体至终浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,常温下避光 15 min,1000 转/min,离心 5 min,弃上清;加入 0.5 ml 生理盐水,流式细胞仪检测细胞表面表型。

2. 大鼠肝脏组织 MIP-1 α 浓度检测:组织剪碎制成组织匀浆过滤至离心管内,离心 1000 转/5 min,取上清;试剂盒平衡至室温(20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$);浓缩洗涤液(50X)以双蒸水稀释成 1X;HRP 用酶联稀释液稀释 60 倍;加入 100 μl 标准品、100 μl 标本于相应反应板孔中,轻轻混匀 30 s,20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,洗板 3 次;每孔加入 100 μl 抗体,20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,洗板 3 次;每孔加 100 μl $1 \times \text{HRP}$,20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min;洗板 3 次;每孔加 TMB 显色液 100 μl ,轻轻混匀 10 s,20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min;每孔加 100 μl 终止液,450 nm 处检测 OD 值(各孔的吸光值),以 OD 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据样品的 OD 值在标准曲线上查出其浓度。

六、统计学分析

实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 版统计软件包进行处理,组间多个样本均数的比较采用单因素方差分析。

结 果

一、荷瘤大鼠 RFA 前、后肝脏树突状细胞 OX-62、OX-6 及 CD86 的表达和分析

RFA 后 7 d 组消融灶周边肝组织内单个核细胞中 OX-62 阳性表达率升高,与荷瘤对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 RFA 后 7 d 组及 RFA 后 14 d 组消融灶周边肝组织内单个核细胞中 OX-6 阳性表达率均升高,2 组与荷瘤对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。RFA 后 7 d 组及 RFA 后 14 d 组 CD86 阳性表达率与荷瘤对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

二、荷瘤大鼠 RFA 前、后肝脏局部 MIP-1 α 浓度检测

荷瘤对照组肝脏局部 MIP-1 α 表达水平为(232.92 ± 54.58)pg/ml。RFA 后 7 d 组为(499.38 ± 15.14)pg/ml, RFA 后 14 d 组为(495.90 ± 9.94)pg/ml,肝脏局部 MIP-1 α 表达水平随时间呈上升趋势, RFA 后 7 d 组及 RFA 后 14 d 组与荷瘤对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 RFA 前、后荷瘤鼠肝脏 DC 表型检测(% , $\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	OX-62	OX-6	CD86
荷瘤对照组	10	18.91 $\pm$ 4.58	15.29 $\pm$ 4.59	66.29 $\pm$ 17.69
RTA 后 7 d 组	10	24.49 $\pm$ 4.45 ^a	34.20 $\pm$ 11.62 ^b	55.29 $\pm$ 10.69
RTA 后 14 d 组	10	22.77 $\pm$ 3.50	39.18 $\pm$ 9.14 ^b	55.93 $\pm$ 12.64

注:与荷瘤对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.05$

讨 论

DC 是机体功能最强的专职抗原呈递细胞,分布于机体防御系统的第一线,具有率先识别、捕获、处理及呈递抗原的功能,DC 具有高度活动性,其在体内的迁移是发挥其生物学功能的重要环节,抗原信息只有通过 DC 处理并从外周组织传递到淋巴器官(淋巴结、脾脏)才能完成有效呈递而激活免疫反应。DC 在体内的迁移主要受趋化因子/趋化因子受体系统介导。趋化因子是一类能调节淋巴细胞的迁移和活化的小分子蛋白,在受到炎症等刺激时,它们由活化的淋巴细胞本身分泌或由基质细胞、内皮及上皮细胞分泌^[4],对中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等免疫效应细胞发生趋化作用。随着对 DC 在抗肿瘤免疫应答中的深入研究,趋化因子对 DC 分化、迁移过程的影响越来越受到关注。DC 能否发挥强大功能与其在体内的迁移密切相关。有研究报道,呼吸道炎症致支气管黏膜急性损伤后,局部组织内一系列趋化因子的表达增高,促使外周血 DC 前体细胞迅速动员聚集在抗原沉积区的黏膜上皮^[5]。

RFA 治疗后外周血 NK 细胞数目增加、肿瘤边缘热休克蛋白(heat shock protein, HSP)表达增强,CD₈⁺ T 细胞数量增多等^[6-8]。免疫效应细胞数量或功能的提高使得宿主免疫功能状态得以改善,有助于巩固和提高局部肿瘤灭活的疗效。本研究显示,RFA 治疗后,消融区周边肝组织内 DC 数量增多。一方面可能是由肿瘤细胞分泌的大量 IL-10、TGF- β 1 等负性因子也由于肿瘤细胞的坏死而减少。外周血 IL-10 及血清 TGF- β 1 的低水平表达,削弱了其全身免疫功能状态以及外周血中 DC 的抑制作用^[9],从而促使骨髓中的 DC 祖细胞分化为循环中的 DC 前体细胞数目增加,较多的 DC 前体细胞分化为未成熟 DC。另一方面,本研究结果显示,RFA 治疗肝肿瘤后,消融区周边肝组织内 MIP-1 α 浓度明显增高。MIP-1 α 属于 CC 族趋化因子,在组织损伤时可由单核巨噬系统细胞释放,主要趋化未成熟 DC 进入局部组织^[10]。RFA 治疗后肝脏局部 MIP-1 α 明显增高,可吸引骨髓和外周血 DC 前体细胞经血循环迁移进入肝组织发育为未成熟 DC,从而导致肝脏局部未成熟 DC 数量增多。与本研究得出的 RFA 治疗后肝脏局部单个核细胞中 OX-62、OX-6 阳性

表达率升高,而 CD86 阳性表达率未见明显升高的结果是相一致的。这些未成熟 DC 具有很强的抗原摄取能力,在肝内可摄取和加工抗原,利于对有害因子的清除及损伤的修复;同时由于 RFA 治疗改变了肝脏局部微环境及肿瘤的免疫原性^[11],这些 DC 还可摄取肿瘤抗原并活化,有利于机体抗肿瘤免疫应答的恢复。

MIP-1 α 升高的原因可能与组织的炎症反应以及机体应激改变等因素有关;RFA 治疗产生的高温以及炎症过程中出现的局部血液循环障碍可造成局部代谢和功能发生不同程度的障碍,组织和细胞变性、坏死,细胞溶酶体膜崩解,释放大量的水解酶,如蛋白酶、脂酶和磷酸酯酶等,这又进一步引起周围组织和细胞变性、坏死,局部组织 MIP-1 α 表达增多。

总之,RFA 治疗后肝脏局部与 DC 相关的趋化因子表达增高,有利于促进 DC 的迁移、分化成熟和完成抗原呈递功能,可能对体内残留癌细胞的清除及减少肿瘤复发具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 罗葆明,王军华,潘景升,等. 射频消融治疗肝癌对免疫功能的影响. 中国临床医学影像杂志,2002,13:411-413.
- [2] 王月香,董宝玮,于晓玲,等. 超声引导微波凝固治疗肝癌前后血清转化生长因子 $\beta 1$ 的变化及意义. 肿瘤防治研究,2004,31:287-289.

- [3] Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. J Immunol, 2001, 167:1862-1866.
- [4] Oppenheim JJ. Overview of chemokines. Adv Exp Med Biol, 1993, 351: 183-186.
- [5] Stumbles PA, Strickland DH, Pimm CL, et al. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. J Immunol, 2001, 167:228-234.
- [6] 王艳滨,吴后男,严昆,等. 肝细胞癌射频治疗前后淋巴细胞亚群及 T 细胞功能的变化. 中国介入影像与治疗学,2006,3:35-41.
- [7] Schueller G, Kettenbach J, Sedivy R, et al. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo. Int J Oncol, 2004, 24:609-613.
- [8] Gillams AR. The use of radiofrequency in cancer. Br J Cancer, 2005, 92:1825-1829.
- [9] 戴维德,范智慧,陈敏华,等. 肝癌大鼠射频消融治疗前、后白细胞介素-10 表达水平的变化及其意义. 中华物理医学与康复杂志,2008,30:35-41.
- [10] McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, et al. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. J Exp Med, 1994, 179:1331-1336.
- [11] 王艳滨,陈敏华,严昆,等. 原发性肝癌射频治疗后局部免疫功能的变化及其临床意义. 中国微创外科杂志,2006,6:803-806.

(修回日期:2010-05-14)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

药刀靶点治痛新技术学习班招生通知

为促进疼痛治疗靶点化、微创化进程,进一步提高疼痛性疾病临床疗效,特向各级临床工作者举办药刀靶点治痛新技术学习班,该学习班由药刀疗法发明人、《中国药刀学》一书著者陕俊平教授全程授课,学习方式以理论与实践相结合,现场提供病例操作,白天进行理论知识学习,晚上授课老师与学员进行一对一操作、讲解,主要授课内容包括:①病变粘连点、痛点检查及准确定位,一次性针、刀、药(磁、药栓)、电、气靶点微创同施;②痛点检查探查定位系统在疼痛诊疗中的应用;③药刀靶点微创松解术及调衡术;④药刀靶点注射、药液配制及常用注射术;⑤药刀臭氧靶点治疗术;⑥磁疗药栓具体制作方法及靶点应用;⑦如何提高针刀、注射、磁疗药栓植入、药刀针灸四序列治疗的疗效,预防针刀治疗后的创伤再粘连及注射治疗后复发;⑧针刀、注射治疗的误区剖析。

学员通过学习后,可掌握针刀、注射、磁疗药栓植入及药刀针灸四序列靶点治疗技术,可用于治疗颈腰椎疾患(如腰椎间盘突出症)、骨质增生症、肩关节周围炎、腱鞘炎、跟骨痛、股骨头坏死、骨性关节炎、神经卡压综合征、软组织疼痛、脊柱相关性疾病等,能明显减轻患者疼痛,提高生活质量。本学习班学费共计 1680 元(包含资料费及 1 套药刀刀具费用);报名时间:2010 年 10 月 23 日 ~ 29 日;报名地址及联系人:100029 北京中医药大学药学院 425 室,岳老师;联系电话:010-84064076;陕教授授课手机号为 13892316858,联系时间为 15:00 ~ 22:00,仅限疑难问题解答。

北京高等中医药培训学校