

[文章编号] 1000-1182(2015)02-0141-04

## 抗感染对伴炎症兔颊VX2鳞状细胞癌组织中树突状细胞表面分子HLA-DR和CD86表达的影响

张林 张霓霓 黄桂林 胡小华 易杰 姚礼  
遵义医学院附属口腔医院口腔颌面外科, 遵义 563003

**[摘要]** 目的 探讨抗感染对伴炎症兔颊VX2鳞状细胞癌(鳞癌)组织中树突状细胞(DCs)表面分子HLA-DR和CD86表达的影响。方法 通过接种VX2瘤粒、形成机械创伤、饮用高糖黏性牛奶的方式,建立兔颊VX2鳞状细胞癌模型。实验分为4组。A组(12只):颊癌伴炎症模型兔,连续3 d普鲁卡因青霉素肌注和替硝唑片灌胃。B组(12只):颊癌伴炎症模型兔,连续3 d生理盐水肌注和阿司匹林灌胃。C组(12只):颊癌伴炎症模型兔,伴有局部炎症的兔颊癌,连续3 d生理盐水肌注和灌胃。D组(10只):单纯颊癌模型兔,连续3 d生理盐水灌胃和肌注。实验结束后处死所有兔,收集肿瘤标本,流式细胞仪检测肿瘤组织中DCs表面分子HLA-DR和CD86的表达。结果 HLA-DR单独表达率、HLA-DR和CD86同时表达率均为A组>D组>B组>C组,CD86单独表达率为A组>D组>B组及C组( $P<0.05$ )。结论 抗感染治疗能明显提高伴炎症的兔颊癌组织中DCs表面分子HLA-DR和CD86的表达。

**[关键词]** VX2鳞状细胞癌; 炎症; 抗生素; 树突状细胞

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2015.02.007

**Effects of anti-infection treatment on expressions of HLA-DR and CD86 in dendritic cells in rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma tissue with inflammation** Zhang Lin, Zhang Nini, Huang Guilin, Hu Xiaohua, Yi Jie, Yao Li. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital Affiliated to Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of anti-infection treatment on the expressions of antigen-presenting-related membrane-surface molecules HLA-DR and CD86 in dendritic cells (DCs) in rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma tissue complicated with local inflammation. **Methods** Rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma with local inflammation models that were established by inflammation was induced by inoculation VX2 tumor, mechanical trauma, and drinking of milk with high sugar viscosity. The animals were divided into four groups. Group A ( $n=12$ ): rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma with local inflammation, procaine penicillin was intramuscularly given, and tinidazole tablets were given by gavage for three consecutive days. Group B ( $n=12$ ): rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma with local inflammation, normal saline was intramuscularly given, and aspirin were given by gavage for three consecutive days. Group C ( $n=12$ ): rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma with local inflammation, normal saline was given intramuscularly and by gavage for three consecutive days. Group D ( $n=10$ ): rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma, normal saline was given intramuscularly and by gavage for three consecutive days. All the rabbits were sacrificed for collection of tumor specimens, and the expression levels of membrane-surface HLA-DR and CD86 in DCs of tumor specimens were detected viaflow cytometry. **Results** The positive expression rate of HLA-DR and the double positive expression rate of HLA-DR and CD86 were group A> group D> group B> group C. The positive expression rate of CD86 were group A> group D> group B and group C ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Anti-infection treatment significantly increased the expressions of HLA-DR and CD86 in DCs of rabbit buccal VX2 squamous cell carcinoma tissue complicated with local inflammation.

**[收稿日期]** 2014-07-15; **[修回日期]** 2015-01-26

**[基金项目]** 遵义市科技局科研基金资助项目[遵市科合社字(2013)32号]

**[作者简介]** 张林,住院医师,硕士, E-mail: zlcold@vip.qq.com

**[通信作者]** 黄桂林,主任医师,博士, E-mail: chaojiehuanghl@163.com

**[Key words]** VX2 squamous cell carcinoma; inflammation; antibiotic; dendritic cell

口腔癌患者常常伴有或轻或重的局部炎症,这些炎症的存在是否会影响鳞状细胞癌(以下简称鳞

癌)组织中免疫细胞的免疫状态是学者们感兴趣的问题。本研究通过诱导兔颊癌局部炎症,观察炎症状态以及经抗感染治疗后癌症组织中树突状细胞(dendritic cells, DCs)表面的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II类分子HLA-DR与共刺激分子CD86的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

实验动物: VX2荷瘤兔1只购于中山大学实验动物中心细胞库。新西兰大白兔46只, 兔龄2~3月, 雌雄不限, 体重1.5~2.0 kg, 由遵义医学院医学与生物学研究中心提供, 许可证号: SYXK(黔)2011-003。

药物: 注射用普鲁卡因青霉素购自上海公谊兽药厂[批号: 兽药字(2006)090052629], 替硝唑片购自重庆科瑞制药集团有限公司(批号: 国药准字H20056192), 阿司匹林片购自辰欣药业股份有限公司(批号: 国药准字H37023270)。

主要试剂: 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记HLA-DR抗体、FITC标记IgG2a抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记CD86抗体、PE标记IgG1抗体均为美国BD公司产品。

### 1.2 兔颊VX2鳞癌炎症模型的建立及分组

兔颊VX2鳞癌模型的建立方法参考文献[1]。从荷瘤兔腿部取出VX2瘤体, 制备VX2瘤粒, 在新西兰大白兔颊部接种VX2瘤粒, 第14天形成肿块, 在癌肿处用手术刀切取肿瘤表面黏膜, 形成一大小约1.0 cm×1.0 cm的创伤。用质量比为50:30:20(纯牛奶:水:白砂糖)的高糖黏性牛奶代替普通饮水饲养。3 d后(实验第17天)见颊部肿瘤处溃疡形成, 表面糜烂, 伴有渗血、红肿明显。成功诱导肿瘤及周围组织的炎症。

实验分组: A组(肿瘤+炎症+抗生素组), 12只颊癌伴炎症模型兔, 普鲁卡因青霉素22 000 U·kg<sup>-1</sup>

肌注, 替硝唑片150 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃, 连续3 d, 每天1次。B组(肿瘤+炎症+阿司匹林组), 12只颊癌伴炎症模型兔, 连续3 d阿司匹林片10 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃, 1 mL生理盐水肌注, 每天1次。C组(肿瘤+炎症组), 12只颊癌伴炎症模型兔, 连续3 d给予生理盐水20 mL灌胃, 1 mL生理盐水肌注, 每天1次。D组(单纯肿瘤组), 10只, 单纯颊癌模型兔, 连续3 d生理盐水20 mL灌胃, 1 mL生理盐水肌注, 每天1次。

### 1.3 瘤体组织学观察

实验第20天处死所有兔, 切取兔的部分肿瘤组织, 甲醛固定液固定, 石蜡包埋后切片, 苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色, 镜下观察。

### 1.4 流式细胞仪检测DCs表面分子HLA-DR和CD86的表达

将各组标本制作成标准浓度( $1 \times 10^6$ 个·mL<sup>-1</sup>)的细胞悬液后, 每个标本设2个加样管(实验管和同型对照管), 避光条件下实验管加入100  $\mu$ L细胞悬液、10  $\mu$ L FITC标记HLA-DR抗体和10  $\mu$ L PE标记CD86抗体, 同型对照(isotype control, ISO)管为100  $\mu$ L细胞悬液、10  $\mu$ L FITC标记IgG2a抗体和10  $\mu$ L PE标记IgG1抗体, 暗室内避光孵育20 min。孵育完成后, 1 500 r·min<sup>-1</sup>离心10 min, 弃上清后再用2 mL PBS缓冲液清洗离心2次。弃上清, 再加0.5 mL PBS缓冲液混匀, 最后加1%多聚甲醛固定液固定, 4  $^{\circ}$ C冰箱避光保存, 用流式细胞仪检测HLA-DR、CD86的表达。

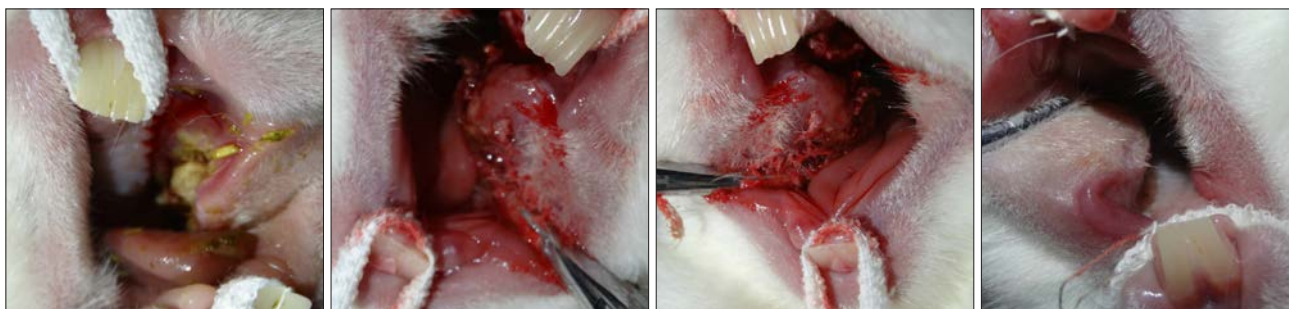
### 1.5 统计分析

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。各组的比较采用方差分析, 组间两两比较用LSD-*t*检验。

## 2 结果

### 2.1 兔颊VX2鳞癌肉眼及组织学观察

实验第20天时, 肉眼观察可见: A组, 颊部肿瘤破溃, 但无明显糜烂渗血; B组和C组颊部肿瘤糜烂, 明显渗血; D组肿瘤无破溃(图1)。



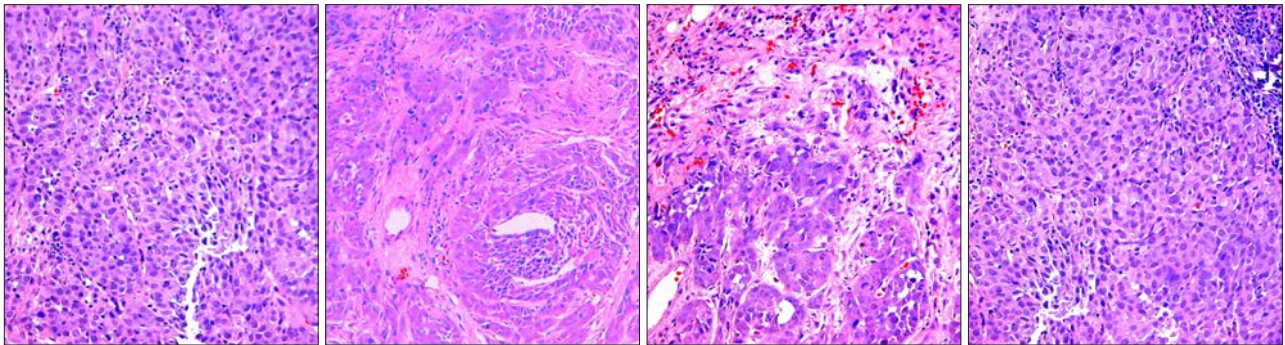
从左到右依次为A、B、C、D组。

图1 实验第20天4组颊部肿瘤肉眼观察

Fig 1 Naked-eye observation of buccal tumor for 4 groups at the twentieth day of experiment

在HE染色显微镜下观察可见：A组，肿瘤组织内轻度炎性细胞浸润，成纤维细胞增生；B组和C组，肿瘤组织内大量炎性细胞浸润，成纤维细胞增

生明显，可见组织内血管扩张；D组，少量炎性细胞（图2）。



从左到右依次为A、B、C、D组。

图2 实验第20天4组VX2鳞癌的组织学观察 HE ×200

Fig 2 VX2 squamous carcinoma tissues of 4 groups at the twentieth days of experiment HE ×200

## 2.2 鳞癌组织DCs表面分子HLA-DR和CD86的表达情况

4组鳞癌组织DCs表面分子HLA-DR和CD86的表达见表1。方差分析表明，4组的HLA-DR单独表达率、CD86单独表达率、HLA-DR和CD86同时表达率之间均有统计学差异（ $F$ 值分别为216.658、49.068、125.040， $P$ 值均小于0.01）。LSD- $t$ 检验进一步两两比较表明，HLA-DR单独表达率、HLA-DR和CD86同时表达率均为A组>D组>B组>C组，CD86单独表达率为A组>D组>B组及C组（ $P<0.05$ ）。

表1 4组HLA-DR和CD86的表达

Tab 1 The expression of HLA-DR and CD86 of 4 groups %

组别	HLA-DR	CD86	HLA-DR+CD86
A	9.77±0.64 <sup>*#☆</sup>	2.53±0.47 <sup>*#☆</sup>	2.20±0.37 <sup>*#☆</sup>
B	4.21±0.52 <sup>◇</sup>	0.54±0.10 <sup>◇</sup>	0.37±0.08 <sup>◇</sup>
C	3.56±0.12 <sup>▲</sup>	0.21±0.04 <sup>▲</sup>	0.07±0.01 <sup>▲</sup>
D	5.02±0.42	1.35±0.57	0.75±0.14

注：\* $P<0.01$ ，A vs. B；# $P<0.01$ ，A vs. C；☆ $P<0.01$ ，A vs. D；<sup>◇</sup> $P<0.05$ ，B vs. C；<sup>▲</sup> $P<0.05$ ，B vs. C；<sup>◇</sup> $P<0.05$ ，B vs. D；<sup>▲</sup> $P<0.01$ ，C vs. D。

## 3 讨论

根据文献<sup>[2]</sup>报道，在接种后第14天颊部瘤体直径可达1.5~2.0 cm，此时肿瘤细胞生长旺盛且坏死组织少，随着时间推移，瘤体越长越大，第21天表面出现破溃，切开瘤体见内部有明显的液化坏死，瘤兔生存时间一般为40 d。因此，本实验在接种后第14天制作局部炎症，第17天开始使用药物连续抗炎3 d，在第20天取出组织标本进行相关实验分析，

避免了肿瘤自身坏死对实验结果造成干扰。

在复杂的肿瘤炎性微环境中，会出现各种不同功能的免疫监视细胞和免疫效应细胞。这些免疫细胞通过其分化与功能作用，使肿瘤所诱导的特殊炎性环境变得更加复杂<sup>[3]</sup>。肿瘤组织内可发现不同表型和功能的DCs。DCs是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞，根据其刺激T细胞增殖能力的不同，可分为未成熟树突状细胞（immature dendritic cells, imDCs）和成熟树突状细胞（mature dendritic cells, mDCs）。正常情况下，绝大多数体内DCs处于非成熟状态，具有极强的抗原摄取、加工和处理能力，其表达MHC II类分子（含HLA-DR）、共刺激分子（含CD86）和黏附分子的水平低，提呈抗原和激发免疫应答的能力弱<sup>[4]</sup>。成熟DCs为T细胞提供第一信号（即抗原-MHC分子复合物这一抗原信号），还为T细胞充分活化提供了第二信号（高表达的CD80、CD86、CD40等共刺激分子），因此DCs是专职性抗原提呈细胞（antigen presenting cell, APC）中唯一能直接激活初始T细胞的APC<sup>[5]</sup>。DCs作为一类特殊的细胞群体在激活和维持抗肿瘤免疫反应中发挥了关键作用，同时DCs的肿瘤抗原提呈功能在肿瘤炎性微环境中丢失或变得低效<sup>[6]</sup>。

在局部炎症与肿瘤相互作用的过程中，多种炎性细胞因子的表达上调，如环氧化酶（cyclooxygenase, COX）-2、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、白细胞介素（interleukin, IL）-1β、IL-6、IL-10、IL-8、IL-1α、转化生长因子（transforming growth factor, TGF）-β等，其均是可影响DCs功能和/或诱导DCs凋亡的免疫负性调节因子<sup>[7-8]</sup>。其中IL-1β和IL-6都是重要的促炎性因子，可通过刺激肿瘤细胞产生IL-10直接抑制DCs对

抗原的趋化反应<sup>[9]</sup>。IL-10直接抑制DCs的细胞膜上MHC分子及共刺激分子的表达,隔绝DCs向T细胞抗原受体呈递肿瘤相关抗原,导致刺激信号不能传入T细胞,使T细胞始终处于无反应状态,最终造成肿瘤免疫逃逸,在大多数肿瘤患者中IL-1 $\beta$ 、IL-6和IL-10的表达均明显增高<sup>[10]</sup>。IL-6可促进肿瘤细胞表达VEGF发挥免疫抑制,并上调VEGF表达<sup>[11]</sup>。VEGF是一种免疫抑制因子,可以通过抑制DCs的分化和成熟,导致肿瘤的免疫逃逸效应<sup>[12]</sup>。口腔鳞癌本身高表达的IL-1 $\beta$ 和IL-6能促进VEGF的释放,而VEGF在肿瘤微环境中对DCs功能的抑制起着非常重要的作用<sup>[13]</sup>。VEGF对CD34<sup>+</sup>造血干细胞向DCs的分化具有强烈的抑制作用,导致免疫系统无法监视到肿瘤细胞。其机制可能是VEGF抑制了NF- $\kappa$ B的表达,从而进一步阻碍了DCs的功能与作用,DCs的发育分化与NF- $\kappa$ B有着十分紧密的联系。VEGF与HPC上的VEGF受体-1结合后阻止了NF- $\kappa$ B与其抑制物I- $\kappa$ B分离,从而影响NF- $\kappa$ B的活性,抑制造血前体干细胞向DCs分化。

本研究结果显示:1)在局部炎症刺激下,C组(肿瘤+炎症组)肿瘤组织内DCs功能性分子HLA-DR和CD86的表达明显低于D组(单纯肿瘤组);2)使用抗生素抗感染治疗3 d后,A组(肿瘤+炎症+抗生素组)肿瘤组织内DCs功能性分子HLA-DR和CD86表达明显高于B组(肿瘤+炎症+阿司匹林组)、C组(肿瘤+炎症组)和D组(单纯肿瘤组);3)使用阿司匹林抗炎治疗3 d后,B组(肿瘤+炎症+阿司匹林组)肿瘤组织内DCs功能性分子HLA-DR的表达率及HLA-DR、CD86的同时表达率均高于C组(肿瘤+炎症组),CD86表达率无明显差异。

据此可以推测:局部炎症可能抑制了肿瘤微环境中DCs功能性分子的表达,导致成熟DCs数量减少。通过抗生素对局部感染细菌的杀灭,减少了外源性因素对机体刺激引起的炎症反应,使肿瘤组织内DCs功能性分子HLA-DR和CD86的表达明显升高,即成熟DCs数量增加,使用抗生素抗感染治疗可提高DCs功能。阿司匹林为非抗菌药物,不能明显改善由细菌性感染引起的DCs功能性分子的表达,但其长期服用在预防口腔癌变中的作用也有报道。

综上,在细菌感染引起的肿瘤炎症微环境中,大量释放的炎性细胞因子及细胞因子之间的协同作用可能导致细胞因子网络的调节紊乱,进而干扰DCs功能分子表达,阻碍肿瘤抗原呈递,这也可能是肿瘤获得免疫逃逸的机制之一,但感染性炎症抑制肿瘤微环境中DCs成熟及功能的具体机制尚不清楚。

## [参考文献]

- [1] 童树友, 张娟, 朱坤鹏, 等. 兔口腔Vx-2肿瘤模型的建立[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(2):151-153.
- [2] 沈毅, 孙坚, 周晓健, 等. 兔舌不同部位VX-2鳞癌与颈淋巴结转移模型的生物学特性[J]. 上海口腔医学, 2007, 16(5):497-501.
- [3] Lin A, Schildknecht A, Nguyen LT, et al. Dendritic cells integrate signals from the tumor microenvironment to modulate immunity and tumor growth[J]. Immunol Lett, 2010, 127(2):77-84.
- [4] Inaba K, Turley S, Iyoda T, et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli[J]. J Exp Med, 2000, 191(6):927-936.
- [5] 刘秀红, 付萍. 树突状细胞表面标志及功能研究进展[J]. 皮肤病与性病, 2009, 31(3):22-24.
- [6] Palombo F, Focaccetti C, Barnaba V. Therapeutic implications of immunogenic cell death in human cancer[J]. Front Immunol, 2014, 4:503.
- [7] 董张丽, 杨丽娟, 赖东梅. 免疫对肿瘤的负向调控[J]. 现代免疫学, 2011, 31(5):428-431.
- [8] Forget P, Coulie PG, Retsky M, et al. Is there a rationale for an anesthesiologist's role against cancer recurrence[J]. Acta Anaesthesiol Belg, 2013, 64(1):15-24.
- [9] Bonomi M, Patsias A, Posner M, et al. The role of inflammation in head and neck cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 816:107-127.
- [10] Zhang M, Zhou S, Zhang L, et al. Role of cancer-related inflammation in esophageal cancer[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2013, 23(1):27-35.
- [11] Middleton K, Jones J, Lwin Z, et al. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2014, 89(1):129-139.
- [12] Oh H, Takagi H, Otani A, et al. Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(1):383-388.
- [13] Burkly L, Hession C, Ogata L, et al. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells[J]. Nature, 1995, 373(6514):531-536.

(本文编辑 李彩)