

# 射频消融治疗大鼠移植性肝肿瘤对脾脏树突状细胞的影响

戴维德 范智慧 陈敏华 河福金 李洪民

**【摘要】目的** 探讨射频消融(RFA)治疗大鼠肝肿瘤对其脾脏组织内树突状细胞(DC)表型的影响及其意义。**方法** 选取40只正常Sprague Dawley大鼠,10只作为正常对照组,其余30只制作Walker-256肝肿瘤模型后,随机分为RFA后7d组、RFA后14d组和荷瘤对照组,每组10只。RFA后7d组、RFA后14d组分别于RFA处理后7d及14d处死,荷瘤对照组与正常对照组不做RFA处理即处死。取其脾脏组织,采用Ficoll密度梯度离心法分离出单个核细胞,应用流式细胞术检测单个核细胞OX62、OX6及CD86表达水平。**结果** 正常大鼠与荷瘤大鼠的脾脏单个核细胞中分别有(10.36±3.21)%、(11.69±4.39)%表达OX62,二者比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。正常大鼠与荷瘤大鼠的脾脏单个核细胞中分别有(76.33±7.86)%、(60.58±6.26)%表达OX6;而分别有(63.06±8.77)%、(40.87±8.66)%表达CD86,二者比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。RFA后7d OX62阳性表达率为(10.24±2.49)%,RFA后14d为(15.10±2.37)%,RFA后14d组与荷瘤对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。RFA后7d OX6阳性表达率为(77.45±4.53)%,RFA后14d为(75.47±5.22)%,2组与荷瘤对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。RFA后7d CD86阳性表达率为(46.86±9.42)%,RFA后14d为(45.53±9.13)%,2组与荷瘤对照组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 荷瘤鼠脾脏组织中未成熟DC比例高,抗原提呈能力弱,RFA促使荷瘤大鼠外周血中DC前体细胞迁移到脾脏组织中的数量增多,并进一步分化成熟,对提高机体在免疫应答中的抗原提呈能力起到促进作用。

**【关键词】** 射频消融; 大鼠; 肝肿瘤; 脾脏; 树突状细胞

**The influence of radiofrequency ablation of liver tumors on spleen dendritic cells** 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 the influence of radio-frequency ablation (RFA) of liver tumors on the phenotype of spleen dendritic cells in rats. **Methods** Ten healthy Sprague Dawley rats constituted the normal control group. Thirty experimental Walker-256 liver tumor model rats were prepared by implanting tumor particles, and these were then randomly divided equally into three groups: a 7 days after RFA group, a 14 d after RFA group and a tumor control group. The spleen tissue of all groups was sampled before the experiment, and the spleens of the 7 d and 14 d after RFA groups were sampled again 7 d and 14 d after RFA respectively. The mononuclear cells in the spleen tissue were separated through Ficoll density gradient centrifugation. The expression level of OX62, OX6 and CD86 in the mononuclear spleen cells was analyzed with flow cytometry. **Results** In the spleens of the normal control rats (10.36±3.21)% of mononuclear cells expressed OX-62. In the tumor control group the proportion was (11.69±4.39)%, and the difference between the two groups was not significant. In the spleens of the normal rats (76.33±7.86)% of mononuclear cells expressed OX-6, while in the tumor control group the ratio was (60.58±6.26)%, a significant difference. In the spleens of the normal rats (63.06±8.77)% of mononuclear cells expressed CD-86, while in the tumor control rats the ratio was (40.87±8.66)%, a difference which was not significant. In spleens of rats with tumors 7 d and 14 d after RFA the proportion of OX-62 was (10.24±2.49)% and (15.10±2.37)% respectively. The difference between the tumor control group and the 14 d after RFA group was significant. The proportion of OX-6 in the 7 d and 14 d groups was (77.45±

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.02.007

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

4.53)% and (75.47 ± 5.22)% respectively, and both levels were significantly different from the tumor control group. The proportion of CD86 was (46.86 ± 9.42)% and (45.53 ± 9.13)% in the 7 d and 14 d RFA groups respectively, and neither was significantly different from the tumor control group. **Conclusions** Immature dendritic cells were more common in the spleens of rats with tumors than in the normal controls. Their antigen-presenting capacity was weaker. RFA can increase the number of precursor dendritic cells migrating from peripheral blood to the spleen, and those cells may further differentiate or mature, which may improve antigen-presenting capacity to a certain extent.

**【Key words】** Radiofrequency ablation; Liver tumors; Spleen; Dendritic cells

射频消融(radio-frequency ablation, RFA)作为一种肝肿瘤局部热凝固治疗方法,其安全性、有效性较高,副作用及并发症较少,可以重复进行,在国内外临床实践中已取得了较好的治疗效果<sup>[1]</sup>。研究证实,RFA造成肿瘤原位灭活的同时能激发机体免疫反应,引起自身抗肿瘤作用<sup>[2]</sup>。树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前所知的机体内功能最强的专职性抗原提呈细胞,是机体免疫反应的始动者,在免疫应答的诱导中具有独特的地位<sup>[3]</sup>。对DC的分布、功能状态等方面的研究有助于深入了解RFA对机体整体及局部免疫状态的影响。脾脏作为机体最大和最重要的外周免疫器官,是DC迁徙的目的地之一及进一步发育成熟的场所。RFA对脾脏DC的影响国内外鲜见相关报道。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 40 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; 美国 Beckman Coulter 公司产流式细胞仪; 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记抗大鼠 OX62、多甲藻叶绿素蛋白 (peridinin chlorophyll protein, PerCP) 标记抗大鼠 OX6 以及藻红蛋白 (Phycoerythrin, PE) 标记抗大鼠 CD86 购于美国 BD 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、肿瘤模型制作及动物分组

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 后长成直径约为 0.8 cm 的瘤块。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 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 mm<sup>3</sup> 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: 取 10 只正常大鼠作为正常对照组。将造模成功的 30 只大鼠随机均分为 RFA 后 7 d 组、RFA 后 14 d 组和荷瘤对照组, 每组 10 只。RFA 后 7 d 组、RFA 后 14 d 组进行射频治疗 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)。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, 给予肌注青霉素 G 钠注射液, 20 000 U/kg 体重。

### 四、取材方法

RFA 后第 7 天及第 14 天处死该 2 组大鼠, 切除脾脏组织待测, 正常对照组与荷瘤对照组不做 RFA 处理即处死取材, 方法同上。

### 五、大鼠脾脏组织单个核细胞 OX62、OX6 以及 CD86 表达水平的检测

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离脾脏组织中单个核细胞: 处死大鼠, 取出脾脏组织, 称取 5 g, 用眼科剪将其剪碎, 铜网过滤 (200 目) 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 rpm, 15 min 离心, 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), 调节细胞浓度为  $1 \times 10^7$ /ml, 每管 100 μl, 加入 OX62、OX6 以及 CD86 抗体至终浓度为 3 μg/ml, 常温下避光 15 min, 1000 rpm, 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。

### 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

荷瘤大鼠 RFA 前、后脾脏 DC OX62、OX6 及 CD86 的表达和分析:正常对照组大鼠与荷瘤对照组大鼠的脾脏单个核细胞中 OX62 阳性表达率比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而 2 组 OX6 及 CD86 的阳性表达率比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),荷瘤对照组均低于正常对照组。RFA 后 14 d 组 OX62 阳性表达率明显升高,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 OX6 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 阳性表达率虽有升高,但与荷瘤对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1 及图 1~3。

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

组 别	只数	OX62	OX6	CD86
正常对照组	10	10.36 ± 3.21	76.33 ± 7.86	63.06 ± 8.77
荷瘤对照组	10	11.69 ± 4.39	60.58 ± 6.26 <sup>a</sup>	40.87 ± 8.66 <sup>b</sup>
RFA 后 7 d 组	10	10.24 ± 2.49	77.45 ± 4.53 <sup>d</sup>	46.86 ± 9.42
RFA 后 14 d 组	10	15.10 ± 2.37 <sup>c</sup>	75.47 ± 5.22 <sup>d</sup>	45.53 ± 9.13

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与荷瘤对照组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.05$

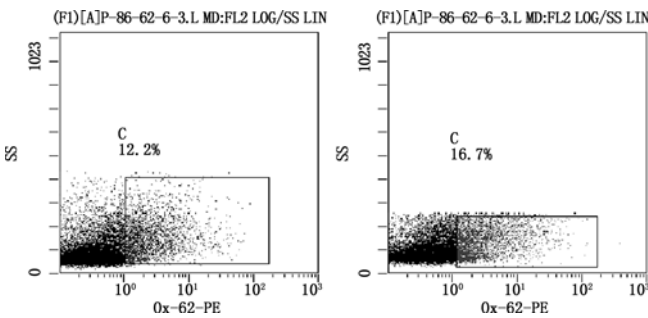


图 1 FCM 检测 RFA 前、后大鼠脾脏 PBMC 中 OX62 的表达

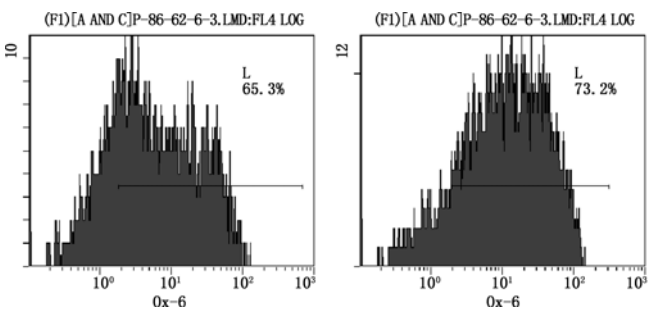


图 2 FCM 检测 RFA 前、后大鼠脾脏 PBMC 中 OX6 的表达

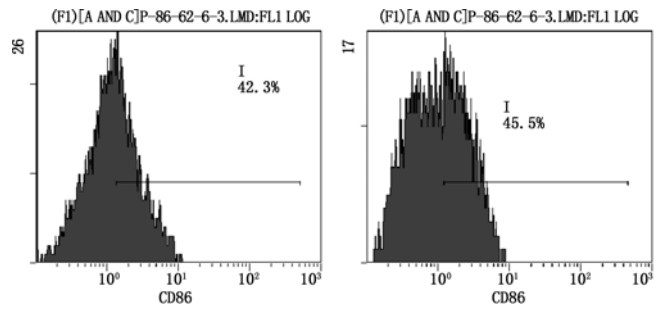


图 3 FCM 检测 RFA 前、后大鼠脾脏 PBMC 中 CD86 的表达

## 讨 论

肝肿瘤是一种严重危害人类健康的疾病,目前每年约有 120 万的新发病例<sup>[4]</sup>,其治疗包括外科切除和非手术介入治疗。RFA 治疗肝癌是近年来得到不断推广的局部热凝固治疗方法,其灭活率高、并发症低,取得了与手术接近的治疗效果。有学者总结治疗 256 例 374 个肝癌病灶,肿瘤坏死率可达 95.2%<sup>[1]</sup>。已有研究证实,RFA 治疗后外周血自然杀伤细胞数目增加、肿瘤边缘 HSP 表达增强,CD8<sup>+</sup> T 细胞数量增多等<sup>[5-7]</sup>。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。在机体免疫反应中抗原提呈细胞对抗原的识别与提呈是首要的环节,能否进行有效的抗原提呈直接关系到免疫激活的效果或免疫耐受的诱导。抗原提呈细胞主要指 DC、巨噬细胞、B 细胞等。其中 DC 是目前所知的机体内功能最强的专职性抗原提呈细胞,是机体免疫反应的始动者,在免疫应答的诱导中具有独特的地位<sup>[8]</sup>。RFA 前、后 DC 的分布、分化成熟等方面变化的研究深入理解 RFA 对机体整体及局部免疫状态的积极影响具有重要意义。

脾脏是机体最大和最重要的外周免疫器官,占全身淋巴组织总重的 1/4,拥有全身 T 细胞的 25% 和 B 细胞的 10%~15%,是机体免疫应答发生的场所,DC 转移到这里后逐渐发育成熟,以主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类和 II 类分子的形式提呈抗原,与 T 细胞相互作用,激活初始性 T 细胞及次级 T 细胞反应。脾脏组织中 DC 的数量及功能状态对机体抗肿瘤免疫功能的意义重大。但脾脏对肿瘤的关系具有时相性和双向性。随着肿瘤的进展,脾脏不仅没有积极地发挥抗肿瘤功能,反而转变为负性的免疫抑制作用。有研究报道,肝肿瘤患者脾静脉血内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 细胞下降,而 CD8<sup>+</sup> T 细胞升高显著,CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 出现倒置,抑制性 T 细胞 (CD8<sup>+</sup> T 细胞) 在脾脏内所占比例增加,脾脏处于免疫抑制状态<sup>[9-11]</sup>。已知由肿瘤细胞及多种组织细胞产生的某些细胞因子 (cytokines, CK) 可抑制 DC 的功能,白细胞介

素-10(interleukin-10, IL-10)、血清转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)等是影响 DC 分化成熟的重要负性因素。我们的前期研究结果显示, RFA 使得荷瘤鼠外周血中 IL-10 及 TGF- $\beta$ 1 表达水平下降, 理论上推测这在一定程度上有助于脾脏免疫功能的恢复和提高, 也有助于对 DC 功能抑制的解除。

为验证此推论, 我们采用 Ficoll 密度梯度离心法分离大鼠脾脏单个核细胞(其中包括 DC 和淋巴细胞)。以大鼠 DC 特异性标志 OX62 标记大鼠 DC, 同时检测 OX6 和 CD86。大鼠 OX62 是 Brenan 和 Rees<sup>[11]</sup> 从大鼠淋巴组织中分离的面纱样 DC 中发现的一种相对特异性抗原, 现已知道它是大鼠 DC 表面整合素的  $\alpha$ E2 亚基, 可能与大鼠 DC 的迁移和定位有关。OX62 抗原除了 DC 阳性外, 皮肤和小肠中 CD3<sup>+</sup> $\gamma/\delta$  T 细胞有少量表达, 但其它组织细胞均为阴性。由于 CD3<sup>+</sup> $\gamma/\delta$  T 细胞数量少, 而且缺乏主要组织相容性复合体 II 抗原, 所以 OX62 可作为检测大鼠 DC 的特异性理想标志<sup>[12-13]</sup>。而 OX6 即大鼠 MHC II (主要组织相容性抗原), 可与抗原肽组成 MHC-抗原肽复合物, 是 DC 抗原提呈的最主要结构功能单位。CD86 作为 B7 分子家族成员, 是 DC 最主要的协同刺激因子。结合这三者可以科学地反映脾脏组织中 DC 的数量和功能状态。

DC 广泛分布于除脑实质以外的血液、肝脏、脾脏、淋巴结及其它非免疫器官组织中。本研究结果显示, 正常对照组与荷瘤对照组的脾脏单个核细胞中 OX62 阳性表达率进行比较, 差异无统计学意义。而 OX6 及 CD86 的阳性表达率, 2 组比较差异均有统计学意义, 荷瘤对照组均低于正常对照组。表明荷瘤对照组脾脏组织中 DC 数量虽与正常对照组差别不大, 但其主要是一些 DC 前体细胞和不成熟 DC, 其表型特点为 OX62 表达阳性, 而 OX6 和 CD86 为弱表达。而 RFA 后 7 d 组及 RFA 后 14 d 组 OX6 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。RFA 后 7 d 组及 RFA 后 14 d 组 CD86 阳性表达率略有升高, 与荷瘤对照组比较差异均无统计学意义。表明 RFA 造成肝肿瘤原位灭活, 使得肿瘤本身对机体免疫系统功能的抑制作用解除, 原本由肿瘤细胞分泌的大量 IL-10、TGF- $\beta$ 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- $\beta$ 1 的低水平表达, 削弱了其对全身免疫功能状态以及外周血中 DC 的抑制作用<sup>[14]</sup>, 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, 后者具有很强的摄取和处理抗原能力, 而这些未成熟 DC 摄取了抗原后会迁移到脾脏, 在此逐渐发育成熟, 因此在脾脏组织中未成熟 DC 与成熟 DC

并存。其中的成熟 DC 选择并激活有相应抗原受体的 T 细胞, 从而激活免疫应答。

综上所述, RFA 促使荷瘤鼠外周血中 DC 前体细胞迁移到脾脏组织中的数量增多, 并进一步分化成熟, 对提高机体在免疫应答中的抗原提呈能力起到促进作用。

## 参 考 文 献

- [1] 陈敏华, 严昆, 杨薇, 等. 343 例肝恶性肿瘤射频消融疗效及并发症. 北京大学学报(医学版), 2005, 37:292-296.
- [2] 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.
- [3] Dauer M, Obermaier B, Herten J, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. J Immunol, 2003, 70:4069-4076.
- [4] O'Beime JP, Harrison PM. The role of the immune system in the control of hepatocellular carcinoma. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004, 16:1257-1260.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Gillams AR. The use of radiofrequency in cancer. Br J Cancer, 2005, 92:1825-1829.
- [8] Moll H. Antigen delivery by dendritic cells. Int J Med Microbiol, 2004, 294:337-344.
- [9] Yang AS, Lattime EC. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. Cancer Res, 2003, 63:2150-2157.
- [10] Garrigan K, Moroni-Rawson P, McMurray C, et al. Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. Blood, 1996, 88:3508-3512.
- [11] Brenan M, Rees DJ. Sequence analysis of rat integrin alpha E1 and alpha E2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph. Eur J Immunol, 2000, 30:1527-1537.
- [12] Furumoto K, Arai S, Yamasaki S, et al. Spleen-derived dendritic cells engineered to enhance interleukin-12 production elicit therapeutic antitumor immune responses. Int J Cancer, 2000, 87:665-672.
- [13] Hubert FX, Voisine C, Louvet C, et al. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> OX62<sup>-</sup> and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. J Immunol, 2004, 172:7485-7494.
- [14] 戴维德, 范智慧, 陈敏华, 等. 荷瘤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.

(修回日期:2009-04-09)

(本文编辑:松 明)