

· 口腔肿瘤学研究 ·

7,12-二甲基苯并[a]蒽诱发叙利亚地鼠颊鳞状细胞癌模型中 Th1/Th2、Th17/Treg 平衡变化研究

田原野 李洪远 李君萍 唐瞻贵*

(中南大学湘雅口腔医院口腔颌面外科 湖南长沙 410008)

[摘要] 目的:采用叙利亚金黄地鼠在致癌剂 7,12-二甲基苯并[a]蒽(7,12-dimethylbenz[a]anthracene, DMBA)的作用下,建立癌前病损以及口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)模型,检测空白对照组、阴性对照组、癌前病损组、OSCC 组的地鼠脾脏中 Th1、Th2、Th17、调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)、Th1/Th2 和 Th17/Treg。分析上述细胞及比值在组间的动态变化,探究平衡变化与口腔黏膜癌变的密切关系。**方法:**1)建模:利用 1 mL 0.5%DMBA 涂搽叙利亚金黄地鼠颊囊黏膜,1 周 3 次,诱导癌前病损和 OSCC 模型。2)取空白对照组($n=10$)、阴性对照组($n=5$)、癌前病损组($n=10$)、OSCC 组($n=18$)脾脏,制备单细胞悬液后利用流式细胞仪检测。**结果:**1)与空白对照组比较,口腔癌组 Th1 减少、Th2 增加、Th17 降低、Treg 增加、Th1/Th2 降低、Th17/Treg 降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。2)与空白对照组比较,癌前病损组 Th1 减少、Th17 减少、Treg 增加、Th1/Th2 降低、Th17/Treg 降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 Th2 增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。3)与癌前病损组比较,口腔癌组 Th17/Treg 升高,差异有统计学意义($P<0.05$);而 Th1 增加、Th2 增加、Th17 增加、Treg 增加、Th1/Th2 降低,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论:**Th1/Th2 平衡向 Th2 漂移可能参与了正常黏膜癌变的发生发展;Th17/Treg 平衡向 Treg 漂移可能主要参与正常黏膜癌变的发生。

[关键词] Th1 Th2 Th17 调节性 T 细胞 口腔癌及口腔癌前病损

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)12-1284-05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.12.006

Study on Dynamic Equilibrium of Th1/Th2 and Th17/Treg in Oral Buccal Squamous Cell Carcinoma Model of Syrian Hamster Induced by DMBA. TIAN Yuan-ye, LI Hong-yuan, LI Jun-ping, TANG Zhan-gui*. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Xiangya Stomatological Hospital, Central South University, Changsha 410008, China.

[Abstract] **Objective:** To find out the changes of Th1, Th2, Th17, Treg, Th1/Th2, and Th17/Treg in golden hamsters induced precancerous lesions and oral squamous cell carcinoma(OSCC) by the action of carcinogenic agent 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). To explore the relationship with oral cancer by analyzing the above cells and the ratio of dynamic changes between different groups. **Methods:** 1) Modeling: using 1 mL 0.5% DMBA to smear the Syrian golden hamster cheek pouch mucosa three times a week to induce precancerous lesions and OSCC models. 2) Take blank control group ($n=10$), negative control group ($n=5$), precancerous lesion group ($n=10$), OSCC group ($n=18$) spleen and grind into single cell suspension and use flow cytometry test. **Results:** 1) Compared with the control group, there was statistical significance ($P<0.05$) concerning the number of Th1 cells decreased, the number of Th2 cells increased, the number of Th2 cells decreased, the number of Th17 cells decreased, the number of Treg cells increased, the ratio of Th1/Th2 ratio decreased and the ratio of Th17/Treg ratio was decreased in the oral cancer group ($P<0.05$). 2) Compared with the control group, there was statistical significance ($P<0.05$) concerning the number of Th1 cells decreased, the number of Th17 cells decreased, the number of Treg cells increased, the ratio of Th1/Th2 ratio decreased, and the ratio of Th17/Treg ratio decreased in precancerous lesions. However, the increase in the number of Th2 cells was not statistically significant ($P>0.05$). 3) Compared with precancerous lesions, there was statistical significance ($P<0.05$) concerning the ratio of Th17/Treg ratio increased in the oral cancer group; while the number of Th1 cells increased, the number of Th2 cells increas-

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81671003)

作者简介 田原野(1992~),男,湖南长沙人,住院医师,硕士,主要从事口腔颌面外科与基础研究工作。

* **通讯作者** 唐瞻贵, E-mail: tangzhangui@aliyun.com

ed, the number of Th17 cells increased, and the number of Treg cells increased and the decrease of Th1/Th2 ratio were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** 1) The shift of Th1/Th2 balance to Th2 maybe involve in the occurrence and development of normal mucosal carcinogenesis. 2) The shift of Th17/Treg balance to Treg maybe involve in the occurrence of normal mucosal canceration.

[**Key words**] Th1 Th2 Th17 Treg OSCC and Oral precancerous lesion

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是威胁全球人类健康的一种高度恶性疾病。全球每年新增 OSCC 病患 300 000 例以上,占世界肿瘤的 2.1%^[1]。OSCC 一般由正常口腔黏膜发展成口腔癌前病损最后癌变。在维持口腔黏膜上皮细胞稳态时,其微环境发挥着至关重要的作用。失调的微环境能促进正常口腔黏膜发生口腔癌前病损,这种失调的微环境也会使口腔癌前病损更容易转化为 OSCC^[2]。已有研究表明,在 OSCC 患者中,出现 Th1/Th2 和 Th17/Treg 比值下降,使肿瘤免疫处于抑制状态^[3]。但关于口腔癌前病损以及从正常口腔黏膜发展到口腔癌前病损再发展成为 OSCC 的连续过程中,Th1/Th2 和 Th17/Treg 的平衡动态变化鲜见相关报道。因此本研究利用流式细胞术,研究从正常黏膜到癌前病损和癌前病损到口腔癌与 Th1/Th2、Th17/Treg 的变化及其关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 43 只健康雄性无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级叙利亚金黄地鼠,6~8 周龄,体重 80~100 g,由中南大学动物学部提供[生产许可证号:SCXK(京)2016-0011]。在整个动物实验建模过程中,所有鼠均饲养于中南大学动物学部屏障环境独立通气笼内,本实验获得中南大学湘雅口腔医学院伦理委员会批准,整个过程严格按照中南大学实验动物部制定的动物实验操作流程进行。

1.2 试剂和仪器 致癌剂 7,12-二甲基苯并[a]蒽(7,12-dimethylbenz[a]anthracene, DMBA)购自美国 Sigma 公司;Percp-CY5.5 anti-mouse IFN- γ 、Alexa fluor 647 anti-mouse IL-17a、Alexa fluor 647 anti-mouse CD4、PE anti-mouse CD25、PE anti-mouse IL-4、Alexa fluor 647 anti-mouse Foxp3 抗体均购自美国 Biologend 公司;细胞膜破膜剂、细胞核膜破膜剂、白介素刺激剂均购自美国 BD 公司;丙酮购自广东化学试剂厂;RPMI 1640 购自上海浩然生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 癌及癌前病损模型构建 将 43 只叙利亚金

黄地鼠随机分为癌前病损组($n = 10$)、口腔癌组($n = 18$)、阴性对照组($n = 5$)、空白对照组($n = 10$)。癌前病损组及口腔癌组:用油画笔蘸取 1 mL 0.5% DMBA 丙酮液,定点涂于地鼠左侧颊囊部位 5 s。阴性对照组:用油画笔蘸取 1 mL 丙酮液,定点涂于地鼠左侧颊囊部位 5 s。空白对照组:不进行处理。

1.3.2 模型鉴定 肉眼观察颊囊变化(图 1);病理切片观察,每隔 4 周左右,在戊巴比妥麻醉后取颊囊黏膜组织活检,行 HE 染色。2 位资深病理医师在光学显微镜下观察,按口腔组织病理划分标准,将病理切片划分为正常黏膜、上皮不典型性增生、原位癌以及浸润性鳞状细胞癌(图 2)。

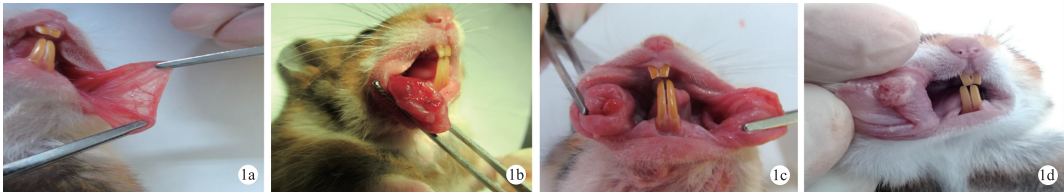
1.3.3 制备淋巴细胞悬液 开腹后分离脾脏后立即用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)润湿冲洗,置于培养皿利用 40 μm 过滤网碾磨,制备单细胞悬液,分别标记 Th、Tr 管;Th 管按试剂说明书先加入白介素刺激剂在 RPMI 1640 中刺激 4 h,破细胞膜 30 min,依次加入 CD4、IFN- γ 、IL-4、IL-17a 抗体孵育 30 min,梯度离心后留 100 μL 上机检测;Tr 管按试剂说明书先依次加入 CD4、CD25 抗体,破细胞核膜 50 min,再加入 Foxp3 抗体孵育 30 min,梯度离心后留 100 μL 上机检测。

1.3.4 流式细胞仪检测初始数据以 FlowJo_V10 软件分析处理

1.4 统计学分析 所得到的数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较使用配对 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;统计图表由 GraphPad Prism 6 软件绘制。

2 结果

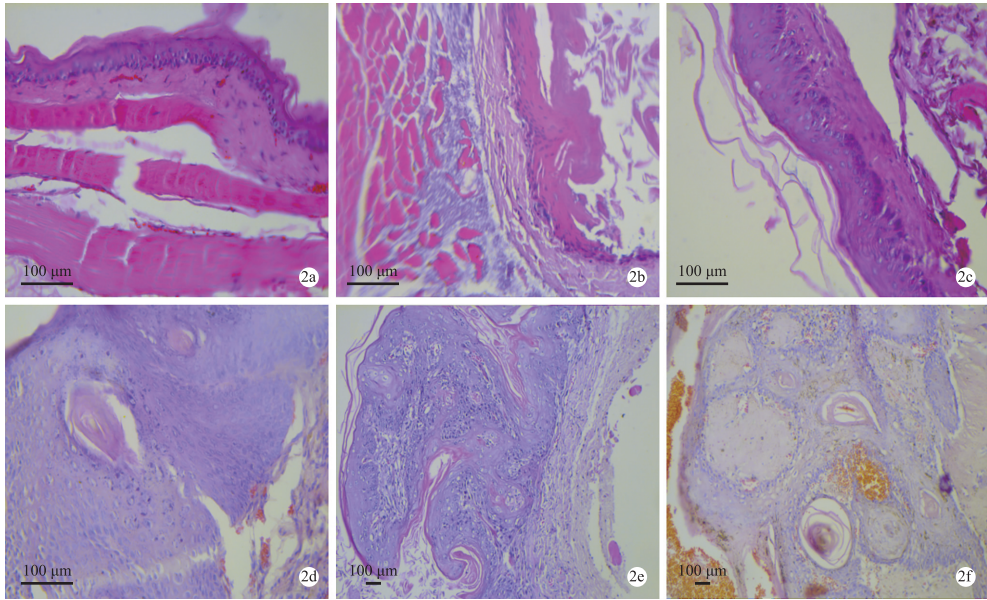
如表 1、2 所示,病损进展过程中 Th1 和 Th17 逐渐减少,其中口腔癌组与空白对照组、癌前病损组与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),Th17 的减少在口腔癌组与癌前病损组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$);Th2 和 Treg 逐渐增多,在口腔癌组与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),Treg 的增多在癌前病损组与空白对照组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$);



1a:正常黏膜;1b:轻中度不典型增生黏膜;1c:中重度不典型增生黏膜;1d:口腔癌

图 1 叙利亚金黄地鼠不同阶段颊囊黏膜体视图

Fig. 1 Buccal mucosa of Syrian golden hamster at different stages.



2a:正常黏膜(×100);2b:丙酮刺激后黏膜(×100);2c:轻中度不典型增生(×100);2d:中重度不典型增生(×100);2e:原位癌(×40);2f:浸润性口腔癌(×40)

图 2 叙利亚金黄地鼠不同阶段颊囊黏膜组织学检测(苏木精-伊红染色)

Fig. 2 HE staining of cheek pouch mucosa at different stages of Syrian golden hamster.

表 1 四组流式细胞结果分析

Table 1 Average percentage ratio of four different test items

组别	检测项目						$\bar{x} \pm s$
	Th1	Th2	Th17	Treg	Th1/Th2	Th17/Treg	
口腔癌组	1.204±0.346 *	1.680±0.393 *	0.137±0.022 *	0.366±0.106 *	0.188±0.054 *	1.579±0.362 *	
癌前病损组	0.596±0.027 *	0.636±0.040	0.093±0.014 *	0.230±0.038 *	0.979±0.117 *	0.326±0.086 *	
阴性对照组	2.362±0.847	1.296±0.405 *	0.188±0.016	0.254±0.088 *	1.921±0.131 *	1.250±0.371 *	
空白对照组	5.341±1.200	0.437±0.086	0.236±0.036	0.048±0.002	9.395±1.653	4.518±0.855	

注: * $P < 0.05$

表 2 4组不同检测项目的两两之间相关分析

Table 2 Correlation analysis between two groups of four different testing items

组别	Th1		Th2		Th17		Treg		Th1/Th2		Th17/Treg	
	T 值	P 值	T 值	P 值	T 值	P 值	T 值	P 值	T 值	P 值	T 值	P 值
口腔癌/癌前病损	-1.264	0.218	-1.746	0.093	-1.491	0.150	-0.830	0.414	1.682	0.105	-2.546	0.018
口腔癌/阴性对照	1.487	0.152	-0.489	0.630	-1.308	0.208	-0.532	0.599	8.889	0.000	-0.777	0.446
口腔癌/空白对照	4.077	0.000	-2.468	0.022	-0.995	0.037	-2.082	0.047	7.278	0.000	3.620	0.001
癌前病损/阴性对照	2.887	0.013	2.089	0.060	4.002	0.001	-0.782	0.283	4.585	0.000	3.166	0.008
癌前病损/空白对照	3.739	0.002	-2.015	0.062	3.650	0.002	-5.062	0.000	5.368	0.000	4.617	0.000

Th1/Th2 比值比降低,口腔癌组与空白对照组、癌前病损组与空白对照组差异均有统计学意义($P <$

0.05);Th17/Treg 比值比在口腔癌组与空白对照组、癌前病损组与空白对照组降低($P < 0.05$),而在

口腔癌组与癌前病损组升高。

3 讨论

免疫微环境在维持口腔黏膜上皮细胞的稳态中发挥着至关重要的作用^[4]。黏膜的癌变过程包含着微环境中基因异质性不断增加,原癌基因或者抑癌基因的突变累积^[5]。同时随着癌基因信号通路的激活,其微环境也会随之发生改变^[6,7]。失调的微环境能促进正常口腔黏膜发展为口腔癌前病损,此外口腔癌前病损患者也更容易发展为 OSCC。大量肿瘤免疫学研究已经证实:机体的免疫系统能识别肿瘤,并能通过免疫监视机制阻止肿瘤的生长。抗原提呈细胞在识别体内异种抗原后,刺激初始 T 细胞进而分化成熟为效应 T 细胞。其中 Th1/Th2、Th17/Treg 在肿瘤的发生发展中发挥了一定的免疫作用^[8]。

Th1 和 Th2 功能受到抑制将引起抗肿瘤作用的破坏,从而导致肿瘤的进展。研究表明, Th1/Th2 比值越低,平衡向 Th2 方向漂移时,肿瘤偏大、浸润转移能力强以及预后差。而 Th1 比例较高的肿瘤中,患者有更长久的生存时间而且肿瘤复发的概率也大大降低^[3,9]。本研究发现,随着上皮恶性程度的逐渐加重, Th1 细胞减少主要存在于从正常黏膜到癌前病损的过程中,在从癌前病损到口腔癌的过程中这种减少并不明显。Th1 型免疫可能在癌前病损的早期对于肿瘤细胞具有高度的免疫杀伤作用,而随着肿瘤异质性的不断累积, Th1 型免疫反应受到抑制,肿瘤逃避免疫监视系统,促进癌变进展。从正常黏膜最后发展成为口腔癌时 Th2 型免疫明显提升, Th2 细胞的增多主要发生在从癌前病损到口腔癌的过程中,在从正常黏膜到癌前病损的过程中这种增多无统计学意义。Th2 型免疫可能在肿瘤发展的后期发挥免疫作用,介导体液免疫的应答。Th1/Th2 随着疾病的进展不断增加, Th1/Th2 比值不断降低, Th1/Th2 的免疫平衡被打破,平衡向 Th2 方向漂移,机体免疫功能受到抑制,肿瘤逃避免疫监视, Th2 介导肿瘤的免疫耐受。

Th17 和 Treg 的发育途径相互之间有许多共同之处,两者的联系十分紧密,平衡的打破或者倾斜会造成免疫应答结果的不同^[3]。Th17 细胞主要与促炎反应有关,当 Th17 占主导地位时,机体容易出现自身免疫性疾病和组织破坏, Treg 则主要与免疫抑制有关。如果 Treg 与 Th17 平衡遭到打破,则出现免疫耐受、肿瘤进展、淋巴转移等^[10,11]。本研究发现, Th17 的分化可能在正常黏膜转变成癌前病

损的过程中受到了抑制,从而降低其促炎作用,使体内异常细胞得不到有效清除,肿瘤异质性逐渐增加。Treg 的增加可能主要发生在由正常黏膜转化成癌前病损的过程中, Treg 是具有强大免疫抑制作用的辅助性 T 细胞,由于免疫抑制作用使癌基因不断累积,为肿瘤发展提供有利的免疫微环境。Th17/Treg 随着疾病的进展先降低后升高,但其最终还是低于空白对照组。可能由于涂搽等机械刺激使得空白对照组和阴性对照组出现了差异,而正常黏膜与癌前病损、口腔癌之间比较可以发现 Th17/Treg 向 Treg 方向漂移,该平衡的紊乱促进了癌症的发生;然而在癌前病损、口腔癌之间 Th17/Treg 向 Th17 方向漂移,这种漂移与机体增强炎症反应、对抗肿瘤的免疫应答有关;这种先升高后降低的趋势表明,肿瘤的发生可能与 Treg 的大量增加从而抑制了机体 Th1、Th17 及其他免疫,而在后期机体启动炎症反应机制分化出更多的 Th17 来对抗肿瘤,但某种程度上也可能会促进炎癌转化的机制。

本研究发现在正常黏膜到癌前病损到口腔癌的过程中, Th1/Th2 平衡向 Th2 失衡可能参与了整个癌变发生发展,不断升高的 Treg 降低机体的免疫功能对 Th1/Th2 平衡的失衡可能有一定的作用。而 Th17/Treg 向 Treg 失衡可能主要参与正常黏膜癌变的发生,在癌前病损恶变为口腔癌的过程中,机体的 CD4⁺ 辅助 T 细胞的降低,对肿瘤异质性累积及免疫耐受免疫逃避有促进作用。提高机体 CD4⁺ 辅助 T 细胞、降低 Th2 以及 Treg 可能为将来癌前病损及口腔癌的免疫治疗提供了新思路。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136 (5) : E359—E386
- [2] Ai R, Tao Y, Hao Y, et al. Microenvironmental regulation of the progression of oral potentially malignant disorders towards malignancy [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46) : 816—817
- [3] Gaur P, Singh AK, Shukla NK, et al. Inter-relation of Th1, Th2, Th17 and Treg cytokines in oral cancer patients and their clinical significance [J]. *Hum Immunol*, 2014, 75 (4) : 330—337
- [4] Liu J, Mao JJ, Chen L. Epithelial—mesenchymal interactions as a working concept for oral mucosa regeneration [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2011, 17(1) : 25—31
- [5] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer [J]. *Nature*, 2002, 420(6917) : 860—867
- [6] 杨柳,陈娟,单忠艳,等.口腔鳞状细胞癌患者外周血淋巴细胞免疫分型及临床意义[J]. *口腔医学研究*, 2018, 34(5) :

548-553

[7] Kumar S, Saini RV, Mahindroo N. Recent advances in cancer immunology and immunology-based anticancer therapies [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96 : 1491-1500

[8] Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes [J]. Nature, 1996, 383(6603) : 787-793

[9] 蒋灿华, 叶冬霞, 陈万涛, 等. 舌鳞癌 SD 大鼠血清中 Th1/Th2 漂移与肿瘤进展的关系[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2005, 3

(3) : 238-241

[10] 任仪鹏, 步荣发, 张蕾, 等. 口腔鳞癌患者外周血及肿瘤微环境中 Th17 细胞水平研究[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2017, 15(1) : 5-8

[11] 史悦怡, 任仪鹏, 张蕾, 等. 口腔鳞癌患者外周血及肿瘤微环境中 Treg 水平关系的研究[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2017, 15(2) : 77-81

[收稿日期: 2018-06-11]

(本文编辑 关隽)

《口腔医学研究》杂志审稿流程示意图

