

• 研究报告 •

肺癌患者血清对巨噬细胞吞噬活性的抑制作用

胡云才¹, 齐海花², 孙立新², 段昕所², 杨宁², 陆洁²

(1. 河北省沧州荣复军人疗养院, 河北 沧州 061000; 2. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000)

巨噬细胞是重要的免疫细胞,在抗肿瘤免疫中发挥着重要的作用。吞噬活性是巨噬细胞的重要特性,也是巨噬细胞发挥抗肿瘤作用的重要途径。但恶性肿瘤往往通过多种机制抑制机体的抗肿瘤作用,包括对巨噬细胞吞噬功能的抑制。恶性肿瘤可产生和释放多种免疫抑制物质抑制巨噬细胞等多种免疫细胞的功能,构成肿瘤免疫逃逸的重要方面。恶性肿瘤产生的免疫抑制物质可能存在于恶性肿瘤患者的血液中,因而使患者的血清可能具有免疫抑制作用。本研究选用肺癌患者血清测定其对巨噬细胞吞噬功能的影响,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源:肺癌患者血清来源于承德医学院附属医院肿瘤科 15 例未经任何治疗的肺癌志愿者,其中男性 11 例、女性 4 例,平均年龄 60.53 岁;选择同期 15 例健康志愿者为健康对照组。

本研究符合医学伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,所有操作均取得患者或家属的知情同意。

1.2 巨噬细胞的分离和培养:取健康人静脉血,肝素抗凝, Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(PBMC)。用含 10% 胎牛血清(购自中国医学科学院血液学研究所)的 RPMI 1640 培养基(购自美国 Gibco 公司)调整细胞数为 5×10^6 个/ml,置于 6 孔板中培养。37℃、5%CO₂ 孵箱贴壁 3 h 后,用预温的培养基洗去未黏附的细胞,悬浮细胞可以重复黏附,以得到更多的贴壁细胞,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 2 ml 及 1000 kU/L 重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF),隔 2 d 半量换液,培养 7 d 获得贴壁细胞,用于后续实验。

1.3 巨噬细胞吞噬中性红实验:将制备好的巨噬细胞调整浓度为 5×10^6 个/ml,加入 96 孔细胞培养板中,每孔 200 μ l,置于 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养,3~4 h 后弃去培养液,分别加入含 50% 肺癌血清的完全培养液 200 μ l,以含 50% 健康人血清的完全培养液作为对照,每组设 3 个复孔,每孔加入终浓度为 10 mg/L 的脂多糖(LPS,购自美国 Sigma 公司),继续培养 24 h 后,弃去巨噬细胞培养上清液,每孔中加入 0.1% 中性红 100 μ l,置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 3 h,使巨噬细胞吞噬中性红,然后弃去中性红溶液,此时被吞噬的中性红仍存留于巨噬细胞中不能被去除。用预温的 0.9% 生理盐水清洗 96 孔细胞培养板 3 次,弃上清液,以充分去除未被吞噬的中性红,再加入细胞裂解液(等体积无水乙醇和冰乙酸)150 μ l 静置过夜,使被吞噬的中性红释放到裂解液中。

1.4 检测指标及方法:在酶标仪(购自美国 Bio-Rad 公司)540 nm 波长处测定巨噬细胞的吞噬活性[吸光度(A)值]。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示,在肺癌患者血清的作用下,巨噬细胞的吞噬活性受到抑制。巨噬细胞吞噬中性红实验中,肺癌血清组巨噬细胞的吞噬活性明显低于健康对照组($P < 0.01$)。

表 1 两组巨噬细胞吞噬活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	巨噬细胞吞噬活性(A 值)
肺癌血清组	15	1.2016 ± 0.4059^a
健康对照组	15	3.2694 ± 0.3275

注:与健康对照组比较, $^aP < 0.01$

3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康,其中肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,在全球范围内的发病率和病死率均处于上升趋势,已成为人类因癌症死亡的最主要原因之一。据世界卫生组织(WHO)统计,每年全球有超过 120 万例新发肺癌病例,约 110 万例死亡,平均每 30 s 就有 1 人死于肺癌^[1]。我国肺癌发病率和病死率亦处于上升趋势,已成为城市恶性肿瘤中的第一位死因^[2]。

恶性肿瘤的发生发展是一个十分复杂的过程,与多种因素密切相关,其中免疫因素发挥重要作用。免疫功能是机体的重要功能,与多种生理功能及疾病密切相关,而改善机体的免疫功能,有助于多种疾病的治疗和康复。参麦注射液能够改善重症肺炎患者的免疫功能^[3];大黄联合山莨菪碱能够改善严重脓毒症患者的免疫功能^[4];补阳还五汤能通过减少脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞、B 淋巴细胞凋亡,从而改善脓毒症时的免疫抑制^[5]。

辅助性 T 细胞 17(Th17)和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg)在脓毒症发生发展的免疫机制中起重要作用,而血必净注射液能有效降低脓毒症患者 Th17 和 CD4⁺CD25⁺ Treg 的异常表达,有效降低脓毒症患者病死率^[6];衡炎方具有双向调节脓毒症免疫紊乱,减轻脓毒症患者全身炎症反应,改善患者免疫抑制的作用^[7];香菇多糖联合化疗治疗后肺癌患者 T 淋巴细胞亚群 CD4/CD8 比值有一定程度升高,说明了香菇多糖具有增强患者免疫功能的作用^[8];灵芝多糖对肺癌患者血清淋巴细胞活化的抑制具有拮抗作用^[9]。

机体的免疫系统对恶性肿瘤具有免疫监视功能,通过天然免疫和适应性免疫的密切协作,阻止肿瘤的发生发展,发现并清除肿瘤细胞^[10]。但恶性肿瘤可通过多种机制逃避机

体免疫系统的识别和攻击,肿瘤细胞直接或间接诱导的免疫抑制是肿瘤免疫逃逸的重要机制。而巨噬细胞是肿瘤微环境中含量最多的免疫细胞,其在肿瘤的影响下发生表型和功能的变化,对肿瘤的进展具有重要作用^[11]。因此,有必要研究恶性肿瘤特别是肺癌对巨噬细胞功能的影响。

巨噬细胞作为机体免疫系统的重要组成部分,在固有免疫和适应性免疫反应中具有重要的作用,而且是两种免疫反应联系的“桥梁细胞”,在生物体内发挥多种免疫功能,包括吞噬作用,加工处理并呈递抗原,参与免疫应答,分泌多种细胞因子等,激活的巨噬细胞还具有杀灭多种病原微生物及肿瘤细胞的作用^[12-13]。有研究表明,B16F10 黑素瘤细胞培养上清液可抑制 LPS 刺激小鼠腹腔巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和一氧化氮(NO)^[14]。巨噬细胞的吞噬活性是巨噬细胞的重要功能特性,也是巨噬细胞发挥抗肿瘤作用的重要途径。因此,巨噬细胞的吞噬活性可在某些方面反映巨噬细胞的抗肿瘤活性。而恶性肿瘤如肺癌患者的血清中可能存在恶性肿瘤产生和释放的免疫抑制物质,不仅对淋巴细胞具有免疫抑制作用^[15],还可能抑制巨噬细胞的吞噬活性。

本研究中通过对 15 例肺癌患者的实验结果显示,在肺癌患者血清作用下的巨噬细胞的吞噬活性受到抑制,表明肺癌患者血清具有抑制巨噬细胞吞噬活性的作用。研究肺癌等恶性肿瘤抑制巨噬细胞吞噬活性的机制,寻求解除这种抑制的途径和方法,将有助于恶性肿瘤的控制和治疗。

参考文献

- [1] 林小萍,王庆生,刘新民. 肺癌发病趋势及分析. 天津医科大学学报,2000,6(2): 129-132.
- [2] 刘小芹,钱梦华,邹弘,等. 非吸烟女性肺癌危险因素病例对照研究. 中国初级卫生保健,2010,24(9): 64-65.
- [3] 陈宁,程彤,申丽旻,等. 参麦注射液对重症肺炎患者免疫功能

的影响. 中国中西医结合急救杂志,2010,17(5): 302-304.

- [4] 徐杰,张斌,于娜,等. 大黄联合山莨菪碱对严重脓毒症患者免疫功能的影响. 中国中西医结合急救杂志,2012,19(2): 65-67.
- [5] 张畔,郭聪芳,骆宁,等. 补阳还五汤对脓毒症大鼠脾细胞凋亡的实验研究. 中国危重病急救医学,2011,23(8): 486-489.
- [6] 邵敏,刘宝,王锦权,等. 脓毒症患者辅助性 T 细胞 17 和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达及血必净注射液的干预作用. 中国危重病急救医学,2011,23(7): 430-434.
- [7] 张朝晖,周刚,龚勋,等. 衡炎方对严重脓毒症免疫调控的前瞻性研究. 中国危重病急救医学,2011,23(2): 77-80.
- [8] 朱江,周桂萍. 香菇多糖联合化疗治疗中晚期肺癌疗效观察. 中国中西医结合急救杂志,2011,18(1): 37.
- [9] 胡云才,孙立新,陆洁,等. 灵芝多糖对肺癌患者血清淋巴细胞活化的抑制作用. 中国中西医结合急救杂志,2012,19(5): 300-303.
- [10] Töpfer K, Kempe S, Müller N, et al. Tumor evasion from T cell surveillance. J Biomed Biotechnol,2011,2011: 918471.
- [11] Wang B, Li Q, Qin L, et al. Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II (hi) to MHC class II (low) mediates tumor progression in mice. BMC Immunol,2011,12: 43.
- [12] Obmińska-Mrukowicz B, Szczypka M, Gawęda B. Modulation of murine macrophages and T lymphocytes by lysozyme dimer. Pol J Vet Sci,2002,5(4): 237-241.
- [13] Yun Y, Han S, Park E, et al. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. Arch Pharm Res,2003,26(12): 1087-1095.
- [14] 齐海花,胡云才,兰天飞,等. B16F10 黑素瘤细胞培养上清液对脂多糖刺激小鼠腹腔巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子- α 和一氧化氮的影响. 中国中西医结合急救杂志,2012,19(3): 169-171.
- [15] 胡云才,孙立新,陆洁,等. 肺癌患者血清对淋巴细胞活化的影响. 中国中西医结合急救杂志,2012,19(1): 39-41.

(收稿日期:2012-10-16)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对来稿的一般要求

文稿应具有科学性、创新性、实用性和导向性。要求资料真实、可靠,数据准确,必要时应进行统计学处理;文字精炼,层次清楚;论点明确,论据充分,结论清晰。应特别注意对研究过程和方法陈述的严谨性、逻辑关系的严密性、文字表述的流畅性。

来稿需经第一作者或通信作者所在单位审核,并附单位推荐信。推荐信(附带版权转让协议)可在本刊编辑部索取。推荐信应证明稿件内容和数据资料的真实性,注明对稿件的审评意见以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项,并加盖单位公章。如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。需要特别说明的是,科研论文一般具有职务作品的属性。为了保护知识产权,对于原创性研究论文,本刊要求稿件推荐信须由享有该研究知识产权的单位(即科研立项单位、病例资料所在单位)出具;多中心研究的推荐信可由作为该项研究主持者的第一作者或通信作者的所在单位出具。述评、综述、论坛类稿件不受上述规定限制。

欢迎作者通过 Email 投稿,《中国中西医结合急救杂志》的投稿信箱:cccm@em120.com。对于 Email 投稿,还需再寄纸质版稿件 2 份以及各类基金项目复印件。

《中国中西医结合急救杂志》一般不退还原稿,请作者自留底稿。若作者要求退还文中原始图片,请在投稿时特别声明。为了便于必要时编辑部与作者及时取得联系,请在文稿后注明第一作者或通信作者的联系方式(移动电话及 Email),所有处理稿件的相关问题均通过 Email 完成。

本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体重;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析。