基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001301

干扰素 α2b 通过降低 MDSC 抑制小鼠肾癌生长的研究

殷永健[1]，陈仕友[1]，罗春丽[2]，张　尧[1]，吴小候[1]
（1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆　400016；2. 重庆医科大学检验医学院，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究干扰素 α2b 抑制小鼠肾癌生长及其潜在的作用机制。**方法**：建立肾癌移植瘤模型，干扰素干预后将肾癌移植瘤模型分为对照组和干扰素 α2b 组，监测各组小鼠移植瘤体积与重量，切取移植瘤作 HE 染色，免疫组织化学检测移植瘤蛋白 BCL-2 表达；超滤加蔗糖重水密度梯度离心法提取外泌体，透射电镜鉴定外泌体 形态及数量的变化；流式细胞术检测小鼠骨髓中髓源性抑制细胞（myeloid-derived suppressor cells，MDSCs）比例，小鼠脾脏 CD4/CD8T 淋巴细胞比例。建立 BALB/c 小鼠实验模型，将其分为生理盐水组、外泌体组和 Renca 细胞组，建模后第 10、20、30 天应用流式细胞仪检测各组小鼠骨髓 MDSCs 比例。**结果**：成功建立肾癌移植瘤模型与 BALB/c 小鼠实验模型，在肾癌移植瘤模型实验中，与对照组比较，干扰素 α2b 组重量与体积明显被抑制（$P<0.01$）。HE 染色结果显示：肿瘤组织中细胞大小不均，形态不一，排列紊乱；细胞核增大，核质比例失常，核深染，异常核分裂。免疫组织化学检测显示：对照组为、干扰素 α2b 组两组间 Bcl-2 蛋白阳性表达率无统计学差异（$P>0.05$）。成功分离并纯化外泌体，对照组、干扰素组 2 组外泌体形态并无统计学差异（$P>0.05$）；与对照组比较，干扰素 α2b 能明显减少 Renca 细胞分泌的外泌体数量（$P<0.01$）。与对照组比较，干扰素 α2b 组 MDSCs 比例明显降低（$P<0.05$），与对照组相比，干扰素组荷瘤小鼠 CD4/CD8T 淋巴细胞比例（$P<0.05$）明显升高。在 BALB/c 小鼠实验模型实验中，在第 10 天、20 天和 30 天，与生理盐水组相比，外泌体组与 Renca 细胞组的 MDSCs 比例明显增高（$P<0.01$），而外泌体组与 Renca 细胞组比较无统计学差异（$P>0.05$）。外泌体组与 Renca 细胞组内，第 20 天和 30 天比第 10 天要明显增加 MDSCs 比例（$P<0.05$），第 20 天和 30 天之间 MDSCs 比例无明显变化（$P>0.05$）。而生理盐水组 MDSCs 比例在第 10、20 和 30 天之间比较无统计学差异（$P>0.05$）。**结论**：干扰素 α2b 通过抑制 Renca 细胞分泌外泌体，而 Renca 细胞来源外泌体在体内参与了小鼠 MDSCs 的活化、增殖，致使 MDSCs 的活化、增殖受限，从而抑制小鼠肾癌生长。

【关键词】干扰素 α2b；外泌体；髓源性抑制细胞；肾癌；抑制生长
【中图分类号】R392　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-12-11

Research of interferon α2b inhibiting the growth of renal carcinoma by reducing MDSCs in mice

Yin Yongjian[1], *Chen Shiyou*[1], *Luo Chunli*[2], *Zhang Yao*[1], *Wu Xiaohou*[1]
(*1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;*
2. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: to investigate the effect of interferon α2b on the growth of renal carcinoma in mice, and to explore the potential mechanism. ***Methods***: Renal carcinoma xenograft model was established. After intervention of interferon, transplanted renal carcinoma model was divided into control group and interferon α2b group. The volume and weight of transplanted tumor in mice was monitored, and tumor was removed was for HE staining. BCL-2 expression was detected in transplanted tumor by immunohistochemical method. Exosomes from renca cells were separated and purified by ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation. The morphology and quantitative of exosomes was identified by transmission electron microscope. The proportion of MDSCs in bone marrow and spleen CD4/CD8T lymphocytes of mice was determined by flow cytometry. BALB/c mouse model was established and was divided into normal saline group, exosomes group and renca cell group. On 10, 20, 30 days after modeling, the MDSCs ratio of bone marrow in each group was detected by flow cytometry. ***Results***: The tumor model of renal carcinoma and experimental model of BALB/c mice were successfully established. Compared with those of control model, the volume and weight of the transplanted tumor treated with interferon α2b were significantly inhibited ($P<0.01$). HE

作者介绍：殷永健，Email：405591031@qq.com，研究方向：泌尿系肿瘤。
通信作者：吴小候，Email：wuxiaohou80@hotmail.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81272572）；重庆市卫生局科研资助项目（编号：2012242）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170609.1106.012.html（2017-06-09）

staining showed that the tumor cells varied in size and morphology, arranged in disorder and had increased nucleus, nucleo cytoplasmic ratio arrhythmia, hyperchromatic nuclei, and abnormal nuclear fission. Immunohistochemistry showed that there was no significant difference in the expression of Bcl-2 protein between the two groups ($P>0.05$). The exosome was separated and purified. There was no significant difference between the two groups in exosomes ($P>0.05$). And the interferon α2b could significantly reduce the amount of exosomes secreted by Renca cells compared with that of control group ($P=0.000$). Compared with that of control group, the proportion of MDSCs in interferon α2b group was significantly decreased ($P=0.00$), and the proportion of CD4/CD8T lymphocytes in tumor bearing mice was significantly increased ($P=0.000$). In the BALB/c mice model experiment, on 10 days, 20 days and 30 days, MDSCs of exosomes group and Renca group were significantly higher than those of normal saline group ($P<0.01$). There was no significant difference in MDSCs between exosomes group and Renca cells group on 10 days, 20 days and 30 days ($P>0.05$). In each exosomes group and Renca cell group, the proportion of MDSCs on 20 days and 30 days was significantly increased than that on 10 days, with statistical significances ($P<0.05$), and there was no significant change in the proportion of MDSCs between 20 days and 30 days ($P>0.05$). There was no significant difference in the proportion of MDSCs in saline group on 10, 20, and 30 days ($P>0.05$). ***Conclusion***: Interferon α2b inhibits the secretion of exosome from renca cells, and exosomes from renca cell are involved in the activation and proliferation of mouse MDSCs in vivo, resulting in the restriction of activation and proliferation of MDSCs, which can inhibit the growth of renal carcinoma.

【Key words】interferon α2b; exosomes; myeloid-derived suppressor cells; renal carcinoma; inhibiting growth

外泌体最早由 Johnstone 等 1987 年在研究网织红细胞成熟的过程中发现的[1]。肿瘤细胞源性外泌体是肿瘤细胞内的多泡体（multivesicular bodies，MVBs）与细胞膜融合而以胞吐方式，向细胞外释放的一种直径位于 30~100 nm 之间杯状双分子层小囊泡，是一种类似于亚细胞结构的外核体[2]。髓源性抑制细胞（myeloid-derived suppressor cells，MDSCs）是一群异质性细胞，来源于骨髓祖细胞（myeloid progenitor cells，MPCs）和未成熟髓细胞（Immature myeloid cells，IMCs），是树突状细胞、巨噬细胞和（或）粒细胞的前体，其异常扩增、活化可抑制多种免疫细胞功能。MDSCs 表达特征性分化抗原。在小鼠，MDSCs 表达髓系分化抗原 GR1+CD11b+[2]。干扰素 α 是一类具有高活性、多功能的免疫调节剂，研究发现干扰素 α 可通过调节 CD4 和 CD8 T 淋巴细胞 SOCS1 功能增强抗黑色素瘤效果[3]。在荷瘤小鼠中，重组干扰素 α 也能有效降低 MDSCs 的抑制作用[4]。最近有学者在对乳腺癌源性外泌体的研究中也观察到，将乳腺癌源性外泌体注入小鼠体内后，其外周血及肿瘤组织中 MDSCs 的数量明显增多[5]。

为探明干扰素 α2b 抑制肾癌细胞生长是否与外泌体分泌相关，本课题组前期已对肾癌源性外泌体进行了大量的基础研究工作[6-7]。在本研究中，以小鼠 Renca 细胞分泌的外泌体为实验对象，研究干扰素 α2b、外泌体、MDSCs 三者之间关系，并对其间存在的潜在机制进行初步探究。

1 材料与方法

1.1 主要细胞、动物及试剂

1.1.1 实验样本 小鼠肾癌 Renca 细胞株细胞为上海细胞库购买，6 周龄 BALB/c 雄性小鼠为重庆医科大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 Matrigel 为美国 BD 公司产品，分析纯蔗糖为国药集团化学试剂公司产品，重水（D2O）为青岛腾龙微波科技公司产品，红细胞裂解液为上海碧云天生物技术研究所产品，小鼠脾脏淋巴细胞分离液体为美国 BD 公司产品，FITC GR-1 抗体/PE Anti-Mouse CD11b 抗体为天津三箭生物技术有限公司产品，CD4、CD8 流式抗体为美国 ebioscience 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 建立小鼠肾癌 Renca 细胞株移植瘤模型与 BALB/c 小鼠实验模型 准备 18 只 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠，在 IVC 动物房饲养，室温 20~22 ℃，自由进食饲料 3 d。同时准备接种的肾癌 Renca 细胞。建立小鼠肾癌移植瘤模型：每只小鼠皮下注射 100 μL Renca 细胞悬液和 100 μL matrigel 基质胶溶液的混悬液。接种细胞之后，每周监测各组小鼠体质量、肿瘤体积 2 次，用游标卡尺测量肿瘤尺寸，当移植瘤长到约 40~50 mm^3 时药物处理实验小鼠。药物处理：称取小鼠体质量，将 18 只 BALB/c 小鼠随机分为 2 组（每组 9 只）：对照组、干

扰素 α2b 组。对照组予每只小鼠腹腔注射无菌 PBS 100 μL；无菌 PBS100 μL 灌胃；干扰素组予腹腔注射干扰素 α2b 200 IU；无菌 PBS100 μL 灌胃；干扰素用无菌 PBS 溶解后现配现用，连续 2 周，每周监测各组小鼠体质量、肿瘤体积 2 次。建立 BALB/c 小鼠实验模型：准备 54 只 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠，在 SPF 动物房封闭饲养，室温 20 ℃~22 ℃，自由进食饲料 3 d，同时准备接种的肾癌 Renca 细胞及外泌体。建立小鼠实验模型：将 54 只 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组：生理盐水组、外泌体组和 Renca 细胞组，每组 18 只。生理盐水组每只小鼠皮下注射 200 μL 无菌 PBS 液；外泌体组每只小鼠尾静脉内注射 100 μg Renca 细胞来源外泌体溶液；Renca 细胞组每只小鼠皮下注射约 100 μL Renca 细胞悬液和 100 μL matrigel 基质胶溶液的混悬液。隔天观察各组小鼠状态，每周测量 2 次小鼠体质量和移植瘤大小，用游标卡尺测量肿瘤尺寸。分别在建模后第 10、20、30 天用上述方法分别处理各组小鼠。

1.2.2 小鼠移植瘤体积和重量检测 (1)2 周时切取移植瘤，游标卡尺测得肿瘤尺寸，按照公式计算肿瘤体积；(2)2周时切取移植瘤并称取重量，固定 12 h 作 HE 染色。

1.2.3 组织切片制作 固定：处理对照组、干扰素 α2b 组后，将移植瘤组取出组织后投入 10%中性福尔马林溶液中，固定 12 h。脱水：85%酒精脱水处理 2 h；95%酒精Ⅰ脱水处理 1.5 h；95%酒精Ⅱ脱水处理 2 h；100%酒精Ⅰ脱水处理 1.5 h；100%酒精Ⅱ脱水处理 1 h。透明：将组织置于二甲苯中，透明时间为 30 min。浸蜡：将组织自二甲苯移入石蜡内，放入 60 ℃孵箱内，时间约 3 h。包埋：把溶解的石蜡倒进浸蜡组织埋于中央的纸盒内，直至冷却成坚硬的蜡块。切片：①将包埋好的蜡块进行修块处理。②将蜡块标本切成 3 μm 的薄片，漂在温水皿中展开。③把展开的组织切片移上载玻片，放在 40 ℃孵箱 24 h，烘干，留作 HE 染色和免疫组织化学分析。

1.2.4 HE 染色 组织切片常规二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水，自来水冲洗 5 min，蒸馏水漂洗，苏木精染色 12~13 min，自来水洗 3 次，饱和碳酸锂 10~20 s，重复 2 次，自来水洗 2 次，观察，自来水冲洗 2~3 min，蒸馏水漂洗，95%酒精 I10 s，95%酒精Ⅱ10 s，0.5%伊红染色 30 s，95%酒精Ⅰ2~3 s 4 次，100%酒精Ⅰ2~3 s 3 次，二甲苯Ⅰ5 min 3 次，中性树脂胶封片，倒置显微镜下观察照相。

1.2.5 免疫组织化学检测移植瘤蛋白 BCL-2 表达 组织切片制作：选用准备的 5 μm 的薄片组织切片。免疫组织化学实验：切片常规二甲苯脱蜡，梯度酒精脱水，加入 3%H_2O_2 室温孵育 10 min，PBS 冲洗 3 次，切片浸入 0.01 mmol/L 枸橼酸盐缓冲液（pH6.0）中，微波炉加热，沸腾后断电冷却，重复 3 次，间隔 10 min，冷却至室温，后用 PBS 冲洗 3 次，加血清封闭液，37 ℃下孵育 10min，倾余下液体，各取 50 μL Bcl-2、Bax 一抗加于切片上，完全覆盖组织（原液用抗体稀释液按 1:50 稀释），置于 4 ℃冰箱过夜，第 2 天用 PBS 冲洗 3 次，加入二抗，在 37 ℃孵育 15 min，用 PBS 冲洗 3 次，加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素，于 37 ℃孵育 15 min，用 PBS 冲洗 3 次，滴加 DAB 混合液，镜下观察并且根据颜色控制反应时间，最后蒸馏水洗涤以终止反应，苏木素复染，依次脱水、风干、二甲苯透明，最后用中性树胶封片，在光镜下观察。阳性结果判断标准：Bcl-2 蛋白以肾癌细胞胞浆出现黄色或棕黄色着色为阳性标准，每张切片观察 5 个高倍视野，每个视野计数 100 个肿瘤细胞，计数阳性率。

1.2.6 外泌体提取与鉴定 100 mL 培养 renca 细胞的上清液，1 000 r/min 离心 10 min，3 500 r/min 离心 10 min，获取上清，除去细胞和细胞碎片，10 000 g 低温离心 30 min 获取上清液，加入 100 kD MWCO Centriplus 离心超滤管中，1 000 g 离心 30 min，获取超滤液约 20 mL，将超滤液分别移至容积为 10 mL、底部有 2 mL 3%蔗糖重水垫的离心管中，100 000 g 低温超速离心 1 h，收集离心管底部的缓冲垫，用 PBS 稀释，置于 100 kD MWCO 高回收率高流速切向流超滤离心管中 1 000 g 再次离心 30 min，得到约 2 mL 外泌体，0.22 μm 滤膜过滤除菌，-80 ℃保存备用。分别取 20 μL 对照组、干扰素 α2b 组外泌体悬液滴加于载样铜网上，1 min 后用滤纸吸干，再用 pH 6.8 的 2%磷钨酸溶液 20 μL 负染 1min，滤纸吸干负染液，用白炽灯烘烤约 10 min，最后在透射电镜下观察照相。

1.2.7 外泌体计数 铜网直径为 2.5 mm，每个照相视野面积为 700 nm × 1 000 nm，计算每个视野内外泌体数目，随机取 10 个视野，计算每个视野内 外泌体的平均值，据此推算每毫升细胞上清液中的 外泌体数目，重复 3 次实验后取平均值，进一步作统计学分析。

1.2.8 流式细胞术检测荷瘤小鼠骨髓 MDSCs 比例 逆向解剖法游离股骨/胫骨快捷制备小鼠骨髓细胞[8]，用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞，调整细胞浓度至 1×10^7 个/mL 从每只小鼠细胞悬液中吸取 100 μL 分别加入 4 只 1 mL 无菌 EP 管中，分别标记。其中 1 只管中不加任何抗体，1 只管中加 1 μL GR-1 流式抗体，1 只管中加 1.3 μL CD11b 流式抗体，1 只管中同时加入 1 μL GR-1 抗体和 1.3 μL CD11b 抗体，避光孵育 30 min。在 4 只 EP 管中分别加入 RPMI1640 稀释液 2 000 r/min 离心 2 min 吸弃上清液，加入300 μL RPMI1640 液（含 10%胎牛血清）的重悬，轻轻吹散，将免疫荧光标记的成瘤小鼠组、干扰素 α2b 组小鼠骨髓细胞送流式上机检测各组 MDSCs 比例。

1.2.9 流式细胞术检测荷瘤小鼠脾脏 CD4/CD8T 淋巴细胞比例 在超净工作台中断颈处死各组实验小鼠同前将小鼠放入 75%乙醇内浸泡 5 min 取出小鼠，用 1 mL 注射器针头将其固定于无菌纱布垫的泡沫板上，在室温无菌条件下分离脾脏，尽量除去残留的筋膜脂肪组织在 200 目过滤网中碾

磨，用无血清培养基冲洗过滤网使细胞脱落至平皿中，用移液枪反复冲洗，制成成单细胞悬液后收集于离心管中，300 g 离心 5 min 弃上清，加入小鼠淋巴细胞分离液 2 mL，2 000 r/min 离心 30 min，让离心机缓缓地停下来。吸出中间层的灰白细胞，移入另一只试管内，加 1640 培养液，2 000 r/min 离心 10 min。倒掉上清液，加 5 mL 无血清 1640 培养基，吸管轻轻吹打。分别加入 PE Anti-mouse CD8 和 FITC Anti-mouse CD4 流式抗体，4 ℃避光孵育 30 min。再加入 1 mL FACS 缓冲液重悬细胞，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，取 200 μL FACS 缓冲液重悬细胞，转移至 FCM 上样管中送流式上机检测。

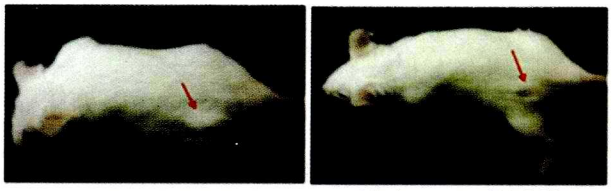
1.3　统计学方法

使用软件 sigmaplot 10 或 GraphPad Prism 5.0 进行图表制作，运用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，使用独立样本 t 检验进行两组独立样本的数据比较；重复测量资料，整体分析采用重复测量方差分析，组间采用 LSD-t 检验进行两两比较，组内使用配对 t 检验。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　建立小鼠 Renca 细胞移植瘤模型及移植瘤 HE 染色

接种肾癌 Renca 细胞 2 周后成功构建小鼠移植瘤模型（见图1）。干扰素干预荷瘤小鼠 2 周后，切取移植瘤组织石蜡包埋切片作 HE 染色结果显示：肿瘤组织中细胞大小不均，形态不一，排列紊乱；细胞核增大，核质比例失常，核深染，异常核分裂，说明成功建立小鼠肾癌移植瘤模型（见图 2）。

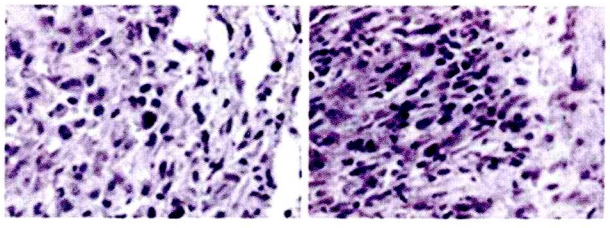


A. 对照组移植瘤模型　　B. 干扰素 α2b 组移植瘤模型

注：红色箭头为接种 Renca 细胞位置

图 1　Balb/c 小鼠肾癌细胞 Renca 移植瘤模型及组织

Fig.1　Balb/c mouse renal cell carcinoma Renca transplanted tumor model and its tissue



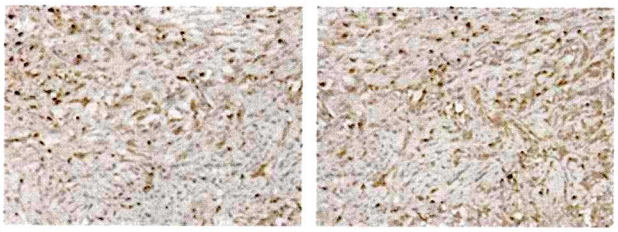
A. 对照组　　B. 干扰素 α2b 组

图 2　Balb/c 小鼠肾癌细胞 Renca 移植瘤 HE 染色光镜(200×)

Fig.2　HE staining of xenografts tissues in each group observed by microscopy(200×)

2.2　干扰素对小鼠移植瘤蛋白 Bcl-2 表达无明显影响

在小鼠肾癌 Renca 细胞移植瘤中，蛋白 Bcl-2 阳性表达呈棕黄色或黄色着色，阳性表达产物位于肾癌细胞的胞浆中。免疫组织化学分析各组小鼠移植瘤，结果显示：取 5 个高倍视野，平均每个视野的 Bcl-2 阳性肾癌细胞数量百分比，对照组为(67.9 ± 4.2)%、干扰素 α2b 组(68.7 ± 3.3)%（见图 3），2 组间 Bcl-2 蛋白阳性表达率无统计学差异（t=0.476，P=0.641）。



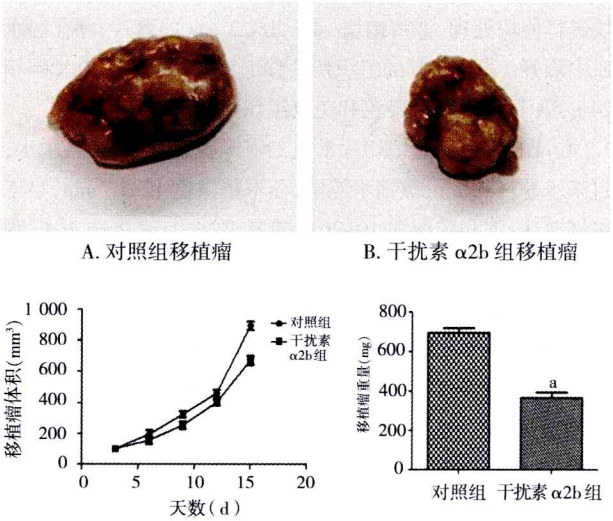
A. 对照组　　B. 干扰素 α2b 组

图 3　干扰素对小鼠移植瘤蛋白 Bcl-2 表达的影响(200×)

Fig.3　Effect of IFNα2b on the protein expression of Bcl-2 in each group xenografts by immunohistochemistry analysis(200×)

2.3　干扰素 α2b 降低小鼠移植瘤体积和重量，抑制其生长

对小鼠肾癌移植瘤的药物干预发现：与对照组重量(696.31 ± 21.87)相比，干扰素 α2b 组移植瘤重量(366.60 ± 29.65)被显著抑制（t=26.845，P=0.000）。与对照组体积相比，干扰素 α2b 组移植瘤的体积同样被明显抑制（d3：t_D=0.034，P=0.857；d6：t_D=10.899，P=0.005；d9：t_D=40.380，P=0.000；d12：t_D=44.537，P=0.000；d15：t_D=305.970，P=0.000），见图 4，表 1。



A. 对照组移植瘤　　B. 干扰素 α2b 组移植瘤

C. 移植瘤体积线条图　　D. 移植瘤重量柱状图

a，与对照组比较，P<0.01

图 4　小鼠成瘤后干扰素α2b 对小鼠移植瘤体积和重量生长的影响

Fig.4　Effects of IFNα2b on the volume and weight of tumour xenografts

表 1 干扰素组与对照组在各时间点的体积

Tab.1 Statistical analysis of volume change

天数（d）	对照组	干扰素 α2b 组
3	101.91 ± 23.32	103.71 ± 17.95
6	195.19 ± 27.31	161.79 ± 13.24
9	325.99 ± 27.63	254.69 ± 19.23
12	461.52 ± 18.69	401.72 ± 19.33
15	891.22 ± 30.63	671.35 ± 22.00

注：$F_{天数}$=2661.385，$P_{天数}$=0.000；$F_{组别}$=221.437，$P_{天数}$=0.000；$F_{天数\times组别}$=66.992，$P_{天数\times组别}$=0.000

2.4 干扰素 α2b 减少 Renca 细胞分泌外泌体

透射电镜检测显示：对照组、干扰素 α2b 组 Renca 细胞分泌的外泌体为大小不等、呈类圆盘形的扁平形状半球体，其直径约为 30~100 nm。与对照组（46.0 ± 3.4）nm 相比，干扰素 α2b 组（45.2 ± 4.4）nm 外泌体直径并无统计学差异（t=0.412，P=0.685）；与对照组（4.74 ± 0.10）×10⁷ 比较，干扰素 α2b（3.70 ± 0.07）×10⁷ 能明显减少 Renca 细胞分泌外泌体数量（t=27.191，P=0.000），见图 5 和 6。

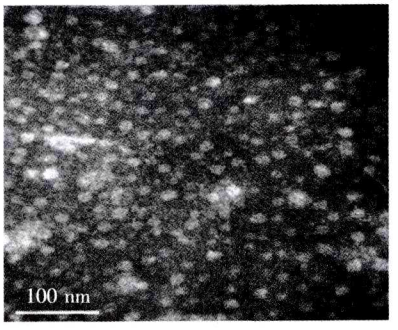
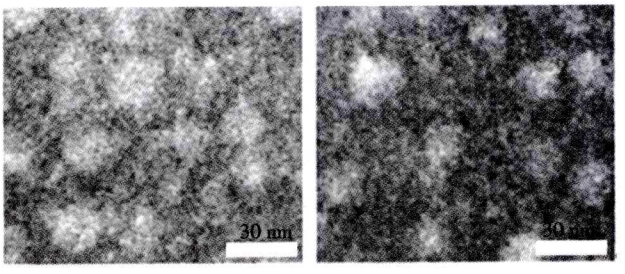


图 5 透射电镜下肾癌 Renca 细胞来源外泌体形态图（100 000×）

Fig.5 Morphology of Renca cell-derived exosomes visualized by transmission electron microscopy（100 000×）



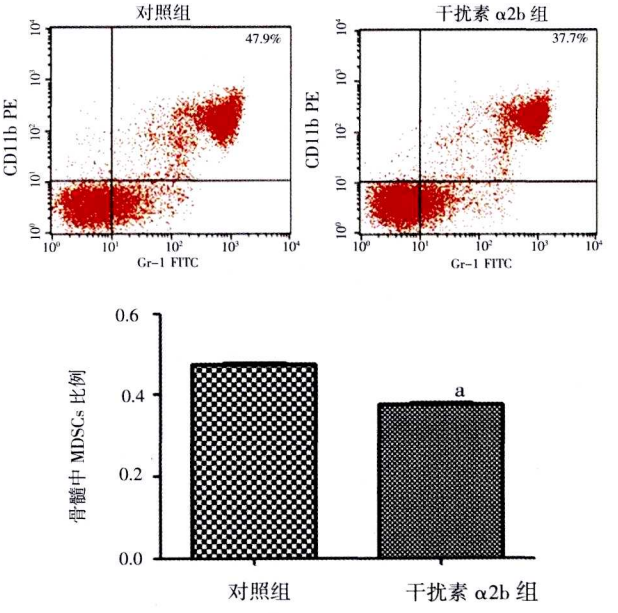
A. 对照组 B. 干扰素 α2b 组

图 6 干扰素 α2b 对 Renca 分细胞泌外泌体形态及数量的影响

Fig.6 Morphology and quantity changes of Renca cell-derived exosomes treated with IFN α2b

2.5 干扰素α2b 降低荷瘤小鼠骨髓中 MDSCs 比例

干扰素 α2b（200 IU/只）单独处理荷瘤小鼠 2 周后，采用逆向解剖法获取荷瘤小鼠股骨/胫骨。提取小鼠股骨/胫骨内骨髓，流式细胞仪检测各组小鼠骨髓内 MDSCs 比例，结果显示：与对照组的百分比（47.65 ± 0.25）%比较，干扰素α2b 组（37.7 ± 0.50）%MDSCs 比例明显降低（t=57.193，P=0.000）。见图7。



a：与对照组比较，P<0.05

图 7 流式细胞仪检测干扰素 α2b 对荷瘤小鼠骨髓 CD11b+GR-1+MDSCs比例的影响

Fig.7 Effect of IFNα2b on the ratios of CD11b+GR-1+MDSCs in tumor-bearing mice by flow cytometry

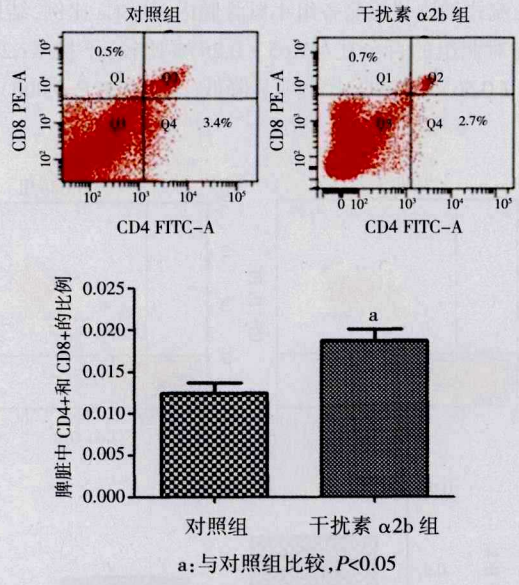
2.6 干扰素α2b 升高荷瘤小鼠脾脏中 CD4/CD8 T 淋巴细胞比例

干扰素 α2b（200 IU/只）单独处理荷瘤小鼠 2 周后，解剖获取各组荷瘤小鼠脾脏，提取小鼠脾脏内细胞，见图 8。流式细胞仪检测荷瘤小鼠脾脏 CD4/CD8 T 淋巴细胞比例结果显示：与对照组的百分比（1.25 ± 0.12）%比较，干扰素 α2b 组（1.87 ± 0.14）%能明显升高荷瘤小鼠 CD4/CD8T 淋巴细胞比例（t=-9.747，P=0.000），见图 9。



图 8 脾脏淋巴细胞形态图（光镜，100×）

Fig.8 Morphology of lymphocyte in the spleens of each group（light microscope，100×）



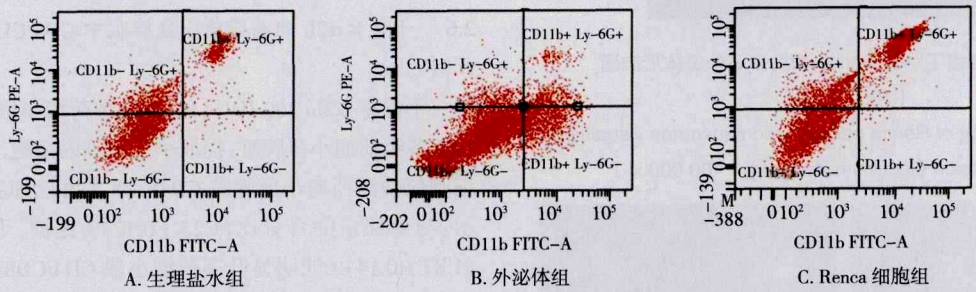
a：与对照组比较，$P<0.05$

图 9　流式细胞仪检测干扰素 α2b 对荷瘤小鼠脾脏中 CD4/CD8 T 淋巴细胞比例的影响

Fig.9　Effect of IFNα2b on the ratios of CD4/CD8 T lymphocyte in the spleens of tumor-bearing mouse by flow cytometry

2.7　Renca 细胞来源外泌体在体内参与了小鼠 MDSCs 的活化、增殖

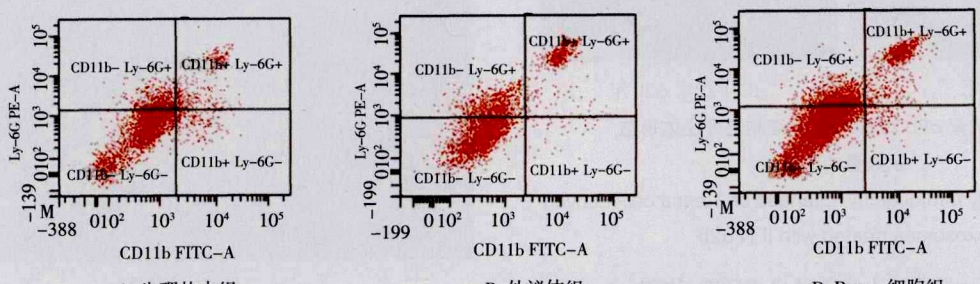
对照组每只小鼠皮下注射 200 μL 无菌 PBS 液，外泌体组每只小鼠尾静脉内注射 100 μg 外泌体溶液，Renca 细胞组每只小鼠皮下注射 100 μL Renca 细胞悬液造模后，在第 7 天，注射 Renca 细胞的小鼠形成小的移植瘤模型。在第 10 天处理 3 组小鼠各 6 只，采用逆向解剖法获取荷瘤小鼠股骨/胫骨。分离骨髓细胞，流式细胞术检测各组小鼠骨髓 MDSCs 比例结果显示：与生理盐水组 MDSCs 百分比比较，外泌体组和 Renca 细胞组的 MDSCs 比例明显增高（外泌体：t_D=-11.810，P=0.000；Renca 细胞：t_D=-13.840，P=0.000），见图 10。第 20天同法检测显示：与生理盐水组 MDSCs 百分比比较，外泌体组和 Renca细胞组的 MDSCs 比例明显增高（外泌体：t_D=-64.020，P=0.000；Renca 细胞 t_D=-64.440，P=0.000），见图 11。第 30天同法检测显示：与生理盐水组 MDSCs 百分比比较，外泌体组和 Renca 细胞组的 MDSCs 比例明显增高（外泌体：t_D=-70.270，P=0.000；Renca 细胞：t_D=-69.010，P=0.000），见图 12。外泌体组与 Renca 细胞组比较，在第 10 天、20 天和30 天均无统计学差异（d10：t_D=2.020，P=0.061；d20：t_D=0.430，P =0.676；d30：t_D=1.260，P=0.227）。外泌体组与 Renca 细胞组内，第 20 天和 30 天比第 10 天要明显增加 MDSCs 比例（外泌体组：d10-20 t=-23.181，P=0.000；d10-30：t=-36.311，P=0.000；Renca 细胞组：d10-20 t=-15.541，P=0.000；d10-30：t=-13.716，P=0.000），有统计学意义，第 20天和 30 天之间 MDSCs 比例无统计学变化（外泌体组：d20-30 t=-2.221，P=0.077；Renca 细胞组：d20-30 t=-0.335，P=0.751），见图 13、表2。而生理盐水组 MDSCs 比例在第 10、20 和 30 天之间比较无统计学差异（d10-20：t=-0.820，P=0.456；d10-30：t=-2.285，P=0.071；d20-30：t=0.420，P=0.692）。



A. 生理盐水组　　B. 外泌体组　　C. Renca 细胞组

图 10　建模后第 10 天流式细胞仪检测各组小鼠骨髓 MDSCs 比例变化

Fig.10　Ratio of mice bone marrow in each group on 10th day by flow cytometry



A. 生理盐水组　　B. 外泌体组　　D. Renca 细胞组

图 11　建模后第 20 天流式细胞仪检测各组小鼠骨髓 MDSCs 比例变化

Fig.11　Ratio of mice bone marrow in each group on 20th day by flow cytometry

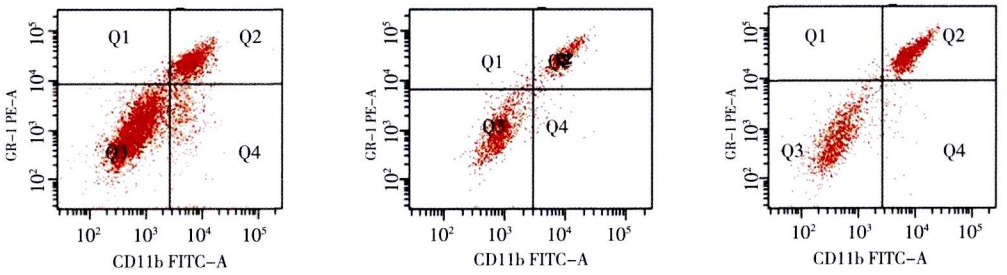


图 12　建模后第 30 天流式细胞仪检测各组小鼠骨髓 MDSCs 比例变化

Fig.12　Ratio of mice bone marrow in each group on 30th day by flow cytometry

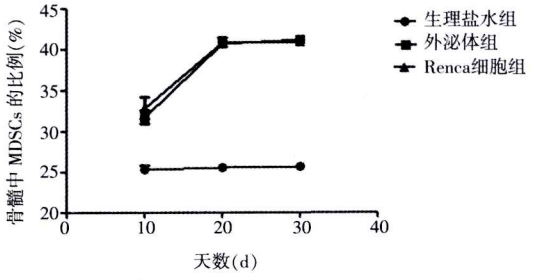


图 13　建模后第 10、20、30 天各组小鼠骨髓 MDSCs 比例变化

Fig.13　Changes of MDSCs ratio in each group after modeling on the 10th, 20th and 30th days

表 2　在 10、20、30 天时各组小鼠骨髓中 MDSCs 比例

Tab.2　The proportion of MDSCs in bone marrow of mice in the days of 10, 20 and 30

天数(d)	生理盐水组	外泌体组	Renca细胞组
10	(25.31 ± 0.49)%	(31.75 ± 0.83)%	(32.85 ± 1.32)%
20	(25.56 ± 0.36)%	(40.75 ± 0.26)%	(40.85 ± 0.56)%
30	(25.67 ± 0.41)%	(41.23 ± 0.30)%	(40.95 ± 0.42)%

注：$F_{天数}$=729.026，$P_{天数}$=0.000；$F_{组别}$=2175.615，$P_{天数}$=0.000；$F_{天数\times组别}$=163.317，$P_{天数\times组别}$=0.000

3　讨　论

肾癌被认为是少数几种具有免疫原性的肿瘤，免疫治疗是转移性肾癌主要的治疗方式。目前研究认为，肿瘤免疫逃逸可能是其疗效欠佳的主要原因。肿瘤免疫编辑假说[9-10]认为，在肿瘤发生发展的进程中，肿瘤细胞通过多种机制改变肿瘤组织周围的微环境而形成免疫“赦免区”，最终逃避机体的免疫识别与攻击。目前研究认为：髓源性抑制细胞对多种免疫细胞具有强大的抑制作用，其在肿瘤微环境的高浓度聚集是形成免疫“赦免区”的原因之一。MDSCs 在肾癌组织微环境中呈高浓度聚集，肾癌组织中浸润性淋巴细胞表现为功能缺陷、失能或凋亡，外周血中精氨酸酶Ⅰ显著增加，IFN-γ 生成明显降低，T 细胞 CD3ζ 链表达明显降低。因此，MDSCs 是参与肾癌的免疫逃逸的主要原因。MDSCs 的数量及分布变化，贯穿于肿瘤发生发展的整个过程，且与肿瘤的大小和恶性程度相关[11]。目前认为外泌体是在许多活细胞晚期内体形成的，分泌到细胞外的一种纳米大小的膜性小囊泡，不同细胞分泌的外泌体其所含的蛋白质不同，其生物学功能也是有差异的[12]。肿瘤细胞源性外泌体具有肿瘤细胞自身的特点，在其表面既含有一套肿瘤共同抗原，又有肿瘤特异性抗原，完全具备抗原提呈条件，在肿瘤免疫活动中具有重要的作用。

本实验中将干扰素 α2b 干预小鼠肾癌细胞Renca后收集的上清液，应用超滤加蔗糖/重水密度梯度离心法分离、纯化出肾癌细胞 Renca 分泌的外泌体，用透射电镜观察不同干预组外泌体的形态学及数量的变化，结果显示外泌体形态与之前文献描述一致，为大小不等、呈类圆盘形的扁平形状半球体，其直径约为 30~100 nm。干扰素 α2b 在体外可以显著减少小鼠肾癌 Renca 细胞来源的外泌体分泌量，而对外泌体的形态影响并无统计学差异。另外我们将干扰素 α2b 处理实验组 BALB/c 小鼠，逆向解剖游离双侧股骨/胫骨分离小鼠骨髓细胞，运用流式细胞术分别检测各组荷瘤小鼠骨髓中 MDSCs 比例和脾脏中 CD4/CD8T 淋巴细胞比例，结果显示与对照组比较，干扰素 α2b 明显减少荷瘤小鼠骨髓中 MDSCs 比例。同时与对照组比较，干扰素 α2b 组能明显升高荷瘤小鼠 CD4/CD8T 淋巴细胞比例，这与之前的文献报道是一致的。证实了干扰素 α2b 在体内抑制小鼠肾癌移植瘤生长是与低 MDSCs 比例，减少 MDSCs 的免疫抑制作用，升高 $CD4^+/CD8^+$ T 淋巴细胞比例，恢复免疫功能密切相关。本实验中，干扰素 α2b 在体

外能明显抑制小鼠肾癌 Renca 细胞的生长，减少外泌体的分泌；在体内也能抑制荷瘤小鼠移植瘤生长，降低骨髓中 MDSCs 和脾脏 CD4/CD8 T 淋巴细胞比例，那么在肾癌荷瘤小鼠体内，机体抗肿瘤除了依赖促凋亡/抗凋亡这条途径，是否还存在其他的机制参与了肾癌的进展呢？本课题组前期研究发现肾癌 ACHN 细胞来源外泌体可促进自身细胞生长和增殖，那么外泌体与具有免疫抑制作用的 MDSCs 之间是否存在某种联系呢？在本研究中采用生理盐水、Renca 细胞来源外泌体和 Renca 细胞分别在 BALB/c 小鼠皮下或尾静脉内注射建立实验小鼠模型，分别在建模后在第 10、20 和 30 天分离各组小鼠骨髓细胞，运用流式细胞术检测各组小鼠骨髓 MDSCs 比例的变化，验证肾癌细胞来源外泌体携带有肾癌细胞的相关抗原，在体内可以活化 MDSCs，促进其增殖，以期为后续机制研究打下基础。

综上所述，干扰素 α2b 在体外能显著抑制小鼠肾癌 Renca 细胞的生长，减少外泌体的分泌，降低骨髓中 MDSCs 和脾脏 CD4/CD8 T 淋巴细胞比例，从而提高机体免疫能力，介导抗肿瘤免疫，抑制肿瘤生长。干扰素、外泌体、MDSCs 在肿瘤免疫方面仍有许多值得研究的地方。深入对其机制的认识，对于认识肿瘤免疫具有重要作用，若能在这些机制方面寻找到新的突破点，必将为肿瘤治疗找到更为广阔的前景。

参 考 文 献

[1] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exesomes) [J]. Bid Chem, 1987, 262(19): 9412-9420.

[2] Karam JA, Rini BI, Varella L, et al. Metastasectomy after targeted therapy in patients with advanced renal cell carcinoma[J]. J Urol, 2011, 185(2): 439-444.

[3] Zoglmeier C, Bauer H, Norenberg D, et al. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(7): 1765-1775.

[4] Motylewska E, Lawnicka H, Kowalewicz-Kulbat M, et al. Interferon alpha and rapamycin inhibit the growth of pheochromocytoma PC12 line in vitro[J]. Endok- rynologia Polska, 2013, 64(5): 368-374.

[5] Xiang XY, Poliakov A, Liu C, et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. Int[J]. Cancer, 2009, 124, 2621-2633.

[6] Zhang Y, Luo CL, Wu XH, et al. exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2010, 36(1): 133-140.

[7] Zhang Y, Wu XH, Luo CL, et al. Interleukin-12-anchored exosomes increase cytotoxicity of T lymphocytes by reversing the JAK/STAT pathway impaired by tumor-derived exosomes[J]. Int J Mol Med, 2010, 25(5): 695-700.

[8] 付必莽，苏莹珍，何小文，等. 逆向解剖法游离股骨/胫骨快捷制备小鼠骨髓细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011(14)：2601-2604.

[9] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 991-998.

[10] Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity[J]. Adv Immunol, 2006, 90: 1-50.

[11] Mirza N, Fishman M, Fricke I, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients[J]. Cancer Res, 2006, 66: 9299-9307.

[12] Liu X, Lu J, He ML, et al. Antitumor effects of interferon-alpha on cell growth and metastasis in human nasopharyngeal carcinoma[J]. Current cancer drug targets, 2012, 12(5): 561-570.

（责任编辑：方 济）

读者·编者·作者

更 正

2017年第 42 卷第 3 期发表的《糖尿病足骨髓炎的治疗进展》和《复方黄柏液局部应用对糖尿病足溃疡愈合的临床研究》两篇文章，因作者本人失误，导致基金项目著录有误，现更正如下：

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81670766）；天津医科大学科学基金资助项目（编号：2015KYZM03）。

特此更正。

重庆医科大学学报编辑部