

MC38 结肠癌小鼠肿瘤浸润免疫细胞的动态变化

张波扬¹, 陈焕鹏², 余文兰¹, 刘忠华¹, 黄朝峰²

(1. 华南农业大学实验动物中心, 广州 510642; 2. 中山大学人类病毒研究所, 广州 510080)

[摘要] 目的 观察荷瘤小鼠肿瘤浸润免疫细胞在肿瘤发展过程中的动态变化。方法 将小鼠结肠癌 MC38 细胞移植到 24 只 C57BL/6J 小鼠皮下, 荷瘤后每周一次记录小鼠体质量及肿瘤大小的变化, 每周一次采用流式细胞术检测肿瘤浸润免疫细胞水平, 包括 CD45⁺ 细胞、CD3⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、CD4⁺ T 细胞、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞、树突状细胞、巨噬细胞、M1 型巨噬细胞、M2 型巨噬细胞、髓源抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC)、单核样髓源抑制细胞 (monocytic-MDSC, M-MDSC)、粒样髓源抑制细胞 (granulocytic-MDSC, G-MDSC), 共检测 4 周。结果 随着小鼠结肠癌肿瘤的增长, CD45⁺ 细胞水平总体表现出下降趋势, CD8⁺ T 细胞水平稳步下降至不可逆的水平, 而 CD4⁺ T 细胞比例在荷瘤早期迅速增长, 单位体积中浸润细胞数增长了近 8 倍, 肿瘤浸润的 T 细胞几乎为 CD4⁺ 表型。以 NK 细胞为代表的非特异性免疫应答水平持续下降, 而树突状细胞在肿瘤内持续累积, 并通过激活精氨酸酶 1 (Arginase-1, ARG1) 和诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthetase, iNOS), 进一步加深免疫抑制作用。巨噬细胞浸润水平整体无显著变化, 但 I 型巨噬细胞浸润细胞数的下滑速度显著高于 II 型。单位体积肿瘤内 MDSC 数未出现下降趋势, 在肿瘤内持续累积; 其中 G-MDSC 浸润水平呈稳降趋势, M-MDSC 浸润水平持续上升, 且占比远高于 G-MDSC。结论 小鼠移植 MC38 结肠癌细胞后, 肿瘤组织内免疫细胞浸润水平整体下降, 抗肿瘤免疫逐渐占据主导地位, 从而促进结肠癌的发展。肿瘤内产生了 Th1/Th2 漂移现象, 特异性和非特异性免疫应答水平均显著降低, 浸润的单核细胞和粒细胞主要是 Ly6C⁺ 表型。肿瘤相关树突状细胞和巨噬细胞发挥了重要的免疫抑制作用, CD4⁺ T 细胞和 M-MDSC 可能是发挥抗肿瘤免疫效应的关键点。

[关键词] 结肠癌; 肿瘤浸润免疫细胞; 免疫微环境; 小鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)05-0409-09

Dynamic Changes of Tumor-infiltrating Immune Cells in Mice with MC38 Colon Cancer

ZHANG Boyang¹, CHEN Huanpeng², YU Wenlan¹, LIU Zhonghua¹, HUANG Chaofeng²

(1. Laboratory Animal Center of South-China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Human Virology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Correspondence to: LIU Zhonghua, E-mail: 1003280841@qq.com; HUANG Chaofeng, E-mail: hzhaof@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To observe the dynamic changes of tumor-infiltrating immune cells in tumor-bearing mice during tumor development. **Methods** Mouse colon cancer MC38 cells were transplanted subcutaneously into 24 C57BL/6J mice, and the changes in body mass and tumor size of mice were recorded once a week after tumor-bearing. The levels of tumor-infiltrating immune cells, including CD45⁺ T cells, CD3⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, natural killer (NK) cells, dendritic cells, macrophages, M1-type macrophages, M2-type macrophages, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), mononuclear-like MDSCs (M-MDSCs), and granulocytic MDSCs (G-MDSCs) were detected by flow cytometry once a week for 4

[作者简介] 张波扬(1995—), 男, 硕士, 研究方向: 肿瘤模型。E-mail: 784772625@qq.com

[通信作者] 刘忠华(1970—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 1003280841@qq.com

黄朝峰(1975—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 免疫学。E-mail: hzhaof@mail.sysu.edu.cn

weeks. **Results** As the colon cancer tumor of the mouse grows, total CD45⁺ T cellular level decreased, and CD8⁺ T cellular level steadily decreased to an irreversible level, but CD4⁺ T cells proportion rapidly increased at the early stage of the tumor-bearing, quantity of infiltrating cells in the unit volume increased by 8 times, and T cells of tumor-infiltration almost were CD4⁺ phenotype. The nonspecific immune response level represented by NK cells continued to decline, but the dendritic cells continued to accumulate in the tumor. The immunosuppressive action was further enhanced through the activation of arginase-1 (ARG1) and inducible nitric oxide synthetase (iNOS). Macrophage infiltration levels showed no significant change, but the gliding speed for the quantity of infiltrating type- I macrophages was obviously higher than that of type- II macrophages. The proportion of MDSCs per unit volume showed no decreasing trend, and the cells continued to accumulate in the tumor. G-MDSC infiltration level showed a steady decrease, while M-MDSC infiltration level showed an increasing trend, the proportion of M-MDSCs were higher than that of G-MDSCs. **Conclusion** After transplanting MC38 colon cancer cells in mice, the level of immune cell infiltration in the tumor tissue declined, tumor immunology gradually became dominant, thus promoting the development of colon cancer. The Th1/Th2 drift occurred in the tumor. Specific and nonspecific immune response levels were significantly decreased on an average, and the infiltrating monocytes and granulocytes were mainly Ly6C⁺. Tumor-associated dendritic cells and macrophages play an important immunosuppressive role. CD4⁺T cells and M-MDSCs might be the key for promoting tumor immunity.

[Key words] Colon cancer; Tumor-infiltrating immune cells; Tumor immune microenvironment; Mice

异质性是恶性肿瘤的重要特征。目前, 研究者多从肿瘤本身探索肿瘤的发生发展机制, 如肿瘤干细胞理论、肿瘤遗传学等, 因此肿瘤曾一致被认为是细胞内突变的体细胞遗传病^[1]。近年来, 肿瘤微环境免疫特征已经被列入肿瘤十大特征之一^[2]。探索肿瘤微环境与肿瘤发生的关系既能预测临床预后, 亦可评价放化疗效果^[3-4]。随着单细胞测序和质谱流式细胞术等新技术的应用, 多种新型免疫细胞亚群得到鉴定, 肿瘤浸润免疫细胞成为了研究的热点之一。

肿瘤微环境主要是由免疫细胞、间充质细胞、内皮细胞和细胞外基质等构成复杂的细胞和分子调控网络, 通过代谢重编程和低氧调控等方式促进肿瘤的发生和发展^[5]。肿瘤微环境中的免疫细胞主要分为淋巴系来源和骨髓来源, 淋巴系来源的主要有CD8⁺ T细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs)、CD4⁺ T细胞 (regulatory T cells, Ths)、自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞和树突状细胞 (dendritic cells, DC), 主要发挥抗肿瘤作用。髓系来源的主要是肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 和髓源抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC), 主要发挥免疫抑制作用。肿瘤与其微环境之间的相互作用非常复杂, 免疫浸润成分在每个肿

瘤阶段都发生了变化, 特定的细胞对患者的生存影响深远。其中, T细胞一直是研究者关注的一个热点。多项研究表明, 大多数T细胞密度随肿瘤进展而降低, T细胞的低密度浸润与不良预后相关^[6-7], 这也是患者生存最重要的预测标准^[8-10]。过继T细胞治疗的新方法为患者带来了新的希望, 但是肿瘤浸润免疫细胞是高度不均匀的。除了淋巴系来源细胞, 大部分髓系成分同样具有代表性, 然而分析Th1和CD8以外的免疫细胞如何影响临床效果时常常得出矛盾的结果^[6]。

目前, 肿瘤与宿主免疫系统之间的关系尚不明确。通过绘制动态免疫图谱的方式, 为患者定制免疫特征图谱, 可以识别动态生物标志物, 区分假性治疗进展, 明确具有潜在反应的患者, 为个性化精准治疗提供动态监测方案^[11]。本文采用流式细胞术对荷瘤小鼠不同时间节点的肿瘤浸润免疫细胞进行分析, 动态观察结肠癌发展的细胞学变化, 绘制免疫微环境的时空变化景观, 以期寻找预后生物标志物和开发新的治疗方法提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雌性C57BL/6J小鼠24只, 体质量为19~21 g, 42~56日龄, 来源于广东省医学实验

动物中心 [SCXK (粤) 2018-0002], 实验动物质量合格证号为44007200068714。动物饲养于华南农业大学实验动物中心屏障环境 [SYXK (粤) 2019-0136]。本研究涉及的动物实验方案符合3R原则, 经华南农业大学动物福利与伦理委员会批准 (批号2019D086)。

1.2 仪器设备和试剂

流式细胞仪 (型号: BD-LSRF fortessa) 购自美国BD公司, 小鼠结肠癌MC38细胞株来源于美国典型培养物保藏中心。RPMI 1640 (C11875500BT) 购自美国Gibco公司。大鼠抗小鼠 pefic blue-CD45 (48-0451-82)、pecy7-CD3 (25-0031-82)、percp5.5-CD4 (45-0042-82)、APC-CD8 (17-0081-83)、PE-NK1.1 (12-5941-82)、pecy7-CD11b (25-0112-82)、APC-Ly6G (17-9668-80)、PE-F4/80 (12-4801-82) 和pecy7-CD206 (25-2061-82) 单克隆抗体均购自美国eBioscience公司, FITC-Ly6C (553104) 单克隆抗体购自美国BD公司, percp5.5-CD11c (65-0114-U100) 和APC-MHC II (20-5321-U100) 单克隆抗体购自美国Tonbo Biosciences公司。PBS和D-PBS为实验室配制, 胶原酶2 (V900892)、胶原酶4 (V900893)、DNA脱氧核糖核苷酸酶1 (D4513) 和透明质酸酶 (H3884) 购自美国Sigma公司。

1.3 实验动物处理

调整小鼠结肠癌MC38细胞密度为 5×10^5 个/mL, 均于C57BL/6J小鼠右侧腹股沟处行一次性皮下注射 (0.1 mL/只)。24只小鼠均可观察到肿瘤生长, 在肉眼可观测肿瘤大小 (大约荷瘤1周) 后, 每周观察一次并使用游标卡尺记录皮下肿瘤的长宽数值, 肿瘤体积=长 $\times$ 宽 $^2/2$ 。每周记录一次小鼠体质量。每周随机选取6只小鼠, 采用流式细胞术检测小鼠肿瘤内免疫细胞浸润水平。

1.4 肿瘤组织单细胞悬液的制备

采用脱颈椎法处死小鼠后, 剥离肿瘤组织, 冰浴10 min, 用1 $\times$ PBS洗2次, 剪碎肿瘤, 加入胶原酶2 (1 mg/mL)、胶原酶4 (1 mg/mL)、透明质酸酶 (100 U/mL) 和DNA脱氧核糖核苷酸酶1 (100 U/mL), 消化30 min。70 μ m筛网过滤肿瘤组织, 1 $\times$ PBS洗1次, 终止消化。1 $\times$ PBS洗

1次, 吸取10 μ L细胞悬液用1 $\times$ PBS稀释10倍, 用于细胞计数。

1.5 流式细胞术检测肿瘤内免疫细胞浸润水平

将单细胞悬液调整至细胞密度为 1×10^7 个/mL, 每管吸取100 μ L细胞悬液准备流式染色。检测分3组, 先用抗小鼠CD45抗体4 $^{\circ}$ C避光孵育10 min, 然后组1加入抗小鼠CD3、CD4、CD8、NK1.1抗体和相应的同型对照抗体, 组2加入抗小鼠CD11b、Ly6C、Ly6G抗体和相应的同型对照抗体, 组3直接加入抗小鼠CD11c、F4/80、CD206、MHC II抗体和相应的同型对照抗体。4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min后, 1 $\times$ PBS洗1次, 用于流式细胞仪检测。各免疫细胞分子标志定义如下: CD3 $^{+}$ T细胞 (CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$), CD4 $^{+}$ T细胞 (CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$), CD8 $^{+}$ T细胞 (CD45 $^{+}$ CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$), NK细胞 (CD45 $^{+}$ CD3 $^{-}$ NK1.1 $^{+}$), DC (CD45 $^{+}$ CD11c $^{+}$), 总的巨噬细胞 (macrophage, 后用M ϕ 表示) (CD45 $^{+}$ F4/80 $^{+}$), I型M ϕ (CD45 $^{+}$ F4/80 $^{+}$ MHC II $^{+}$), II型M ϕ (CD45 $^{+}$ F4/80 $^{+}$ CD206 $^{+}$), MDSC (CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$), 单核MDSC (M-MDSC) (CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ Ly6C $^{+}$), 粒细胞MDSC (G-MDSC) (CD45 $^{+}$ CD11b $^{+}$ Ly6G $^{+}$)。流式数据使用Flowjo-V10软件分析处理, 单位体积浸润细胞数=各亚群细胞数/肿瘤体积。

1.6 统计学分析

实验数据使用GraphPad Prism 8.0.1软件进行分析。将荷瘤2~4周时的数据分别与荷瘤1周时的数据进行比较, 所有计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间比较采用方差分析, 两组之间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷瘤小鼠肿瘤体积变化及肿瘤免疫细胞浸润变化

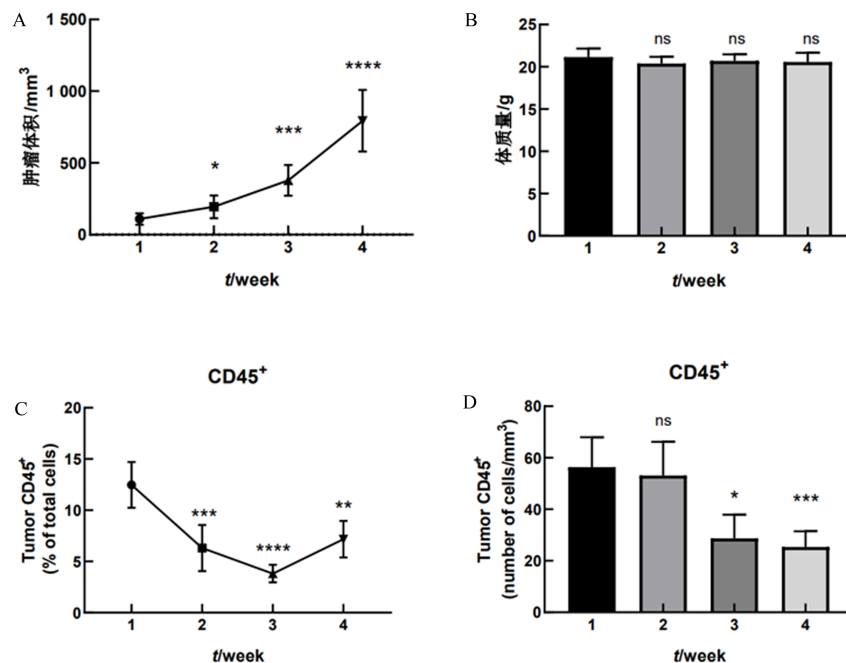
相比荷瘤1周, 荷瘤2周和3周时的小鼠肿瘤体积均明显增大 ($P < 0.05$), 荷瘤4周时显著增大 ($P < 0.0001$), 提示肿瘤体积迅速增长, 增长速率不断加快 (图1A)。记录荷瘤4周的6只小鼠体质量, 结果显示在荷瘤1~4周时未见显著变化 (图1B)。

从荷瘤1周时开始, 每周随机选择6只小鼠

剖检取材并进行流式检测。结果显示, $CD45^+$ 细胞比例在荷瘤 2 周时较 1 周时明显降低 ($P < 0.001$), 荷瘤 3 周时显著降低 ($P < 0.0001$), 荷瘤 4 周时虽明显降低 ($P < 0.01$), 但略有回升趋势 (图 1C)。

为排除肿瘤大小差异对实验结果的影响, 计算单位体积内浸润细胞数 (各亚群细胞数/ mm^3) 以比较单位体积肿瘤内的细胞学变化。结果

显示, 单位体积肿瘤内 $CD45^+$ 细胞浸润数在荷瘤 2 周时无明显变化 ($P > 0.05$), 荷瘤 3 周时降低 ($P < 0.05$), 荷瘤 4 周时显著降低 ($P < 0.001$) (图 1D)。CD45 是白细胞共同抗原的标志, 在淋巴细胞的发育、功能调节及信号传递中具有重要意义, 被广泛用作浸润免疫细胞的整体标志物。检测发现, 荷瘤 1~4 周时 $CD45^+$ 细胞水平整体呈现骤降趋势, 但在荷瘤 3 周后趋于稳定 (图 1D)。



注: A 显示肿瘤体积变化; B 显示荷瘤 4 周小鼠的体质量变化; C 显示肿瘤浸润 $CD45^+$ 细胞比例变化; D 显示单位体积肿瘤内 $CD45^+$ 细胞浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第 1 周比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns 表示差异无统计学意义, $n=6$ 。

图 1 肿瘤生长曲线与免疫细胞浸润变化

Figure 1 Variations in tumor growth curves and immune cell infiltration

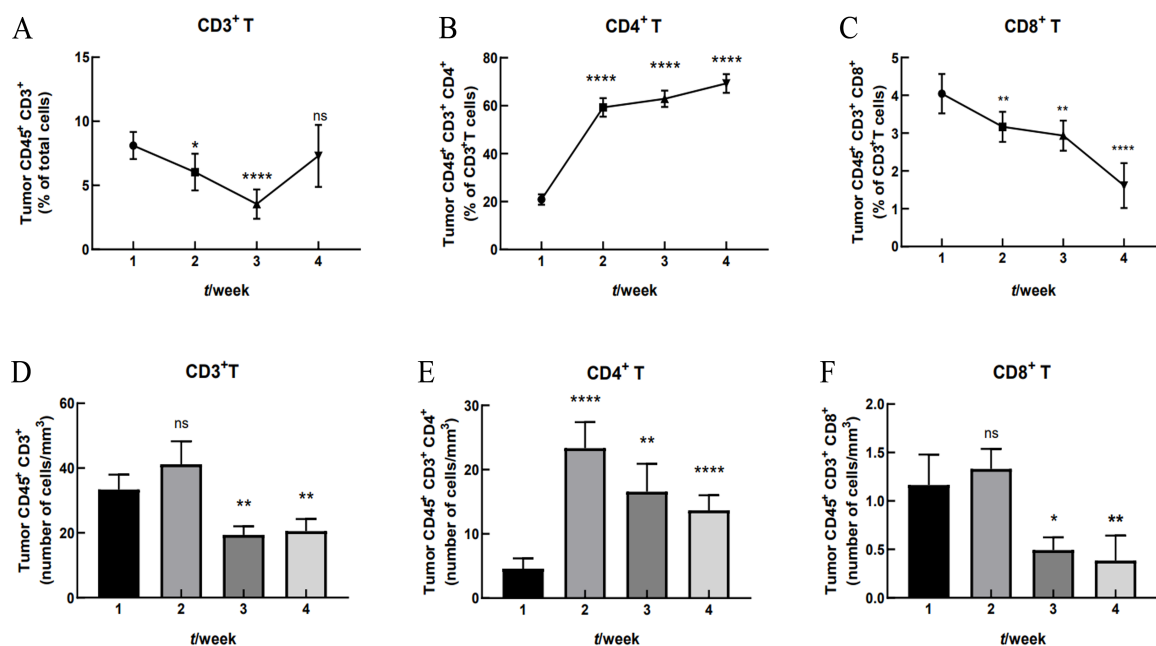
2.2 荷瘤小鼠肿瘤 T 细胞浸润变化

流式细胞术检测结果显示, 相比荷瘤 1 周时, 总 $CD3^+$ T 细胞比例在荷瘤 2 周下降 ($P < 0.05$), 荷瘤 3 周时显著降低 ($P < 0.0001$), 荷瘤 4 周时有明显回升 ($P > 0.05$) (图 2A); $CD4^+$ T 细胞比例在荷瘤 2~4 周时均显著上升 ($P < 0.0001$, 图 2B); $CD8^+$ T 细胞比例在荷瘤 2 周及 3 周时显著下降 ($P < 0.01$), 荷瘤 4 周时下降极显著 ($P < 0.0001$) (图 2C)。相比荷瘤 1 周时, 单位体积肿瘤内总 $CD3^+$ 细胞浸润数在荷瘤 2 周时

保持平稳 ($P > 0.05$), 荷瘤 3 周和 4 周时均显著降低 ($P < 0.01$) (图 2D); 单位体积肿瘤内 $CD4^+$ 细胞浸润数在荷瘤 2~4 周时均显著上升 ($P < 0.01$, 图 2E); 单位体积肿瘤内 $CD8^+$ 细胞浸润数在荷瘤 2 周时无明显变化 ($P > 0.05$), 荷瘤 3 周及 4 周时均降低 ($P < 0.05$) (图 2F)。

2.3 荷瘤小鼠肿瘤 NK 细胞与 DC 浸润变化

流式细胞术检测结果显示, 相比荷瘤 1 周时, NK 细胞比例在荷瘤 2 周及 3 周时无显著变化 ($P > 0.05$), 荷瘤 4 周时下降 ($P < 0.05$), 在荷瘤



注：A显示肿瘤浸润CD3⁺ T细胞比例变化；B显示肿瘤浸润CD4⁺ T细胞比例变化；C显示肿瘤浸润CD8⁺ T细胞比例变化；D显示单位体积肿瘤内CD3⁺ T细胞浸润数量变化；E显示单位体积肿瘤内CD4⁺ T细胞浸润数量变化；F显示单位体积肿瘤内CD8⁺ T细胞浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n = 6$ 。

图2 荷瘤小鼠肿瘤浸润T细胞变化

Figure 2 Variations in the proportion of infiltrating T cells in the tumor

后总体呈现下降趋势（图3A）；DC比例在荷瘤2周及3周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时显著上升（ $P < 0.01$ ，图3B）。相比荷瘤1周时，单位体积肿瘤内NK细胞浸润数在荷瘤2周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤3周及4周时显著下降（ $P < 0.0001$ ，图3C）；单位体积肿瘤内DC浸润数在荷瘤后2周及3周时无明显变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时下降（ $P < 0.05$ ，图3D）。

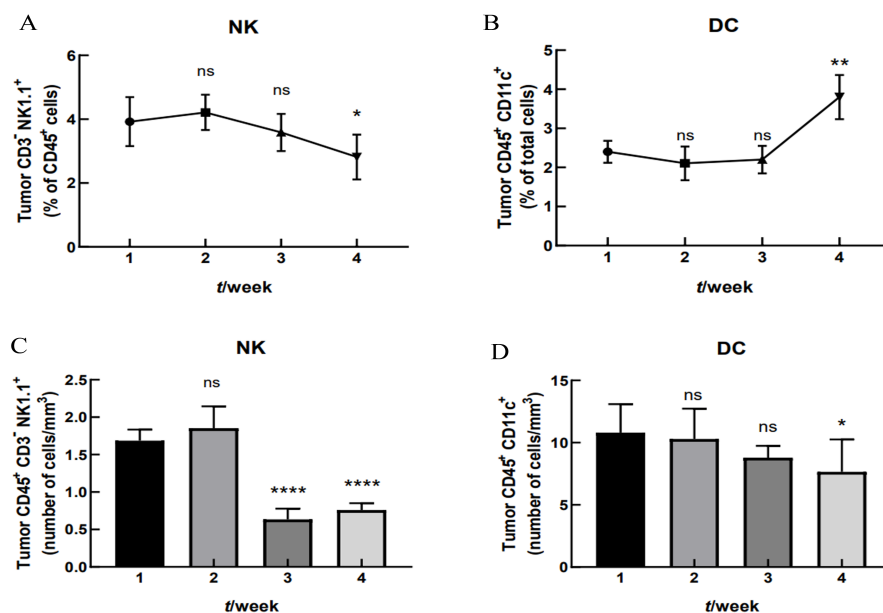
2.4 荷瘤小鼠肿瘤相关巨噬细胞浸润变化

流式细胞术检测结果显示，相比荷瘤1周时，总的巨噬细胞（用M ϕ 表示）比例在荷瘤1周~4周后无显著变化（ $P > 0.05$ ，图4A）；I型M ϕ 比例在荷瘤1周到4周无显著变化（ $P > 0.05$ ，图4B）；II型M ϕ 比例在荷瘤2周及3周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），但荷瘤4周时下降（ $P < 0.05$ ）（图4C）。相比荷瘤1周时，单位体积肿瘤内总M ϕ 浸润数在荷瘤2周时显著降低（ $P < 0.05$ ），荷瘤3周及4周时降低极显著（ $P < 0.0001$ ）（图

4D）；单位体积肿瘤内I型M ϕ 浸润数在荷瘤2周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤3周及4周时下降（ $P < 0.05$ ）（图4E）；单位体积肿瘤内II型M ϕ 浸润数在荷瘤2周及3周时无显著变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时下降（ $P < 0.05$ ）（图4F）。

2.5 荷瘤小鼠肿瘤髓源性抑制细胞浸润变化

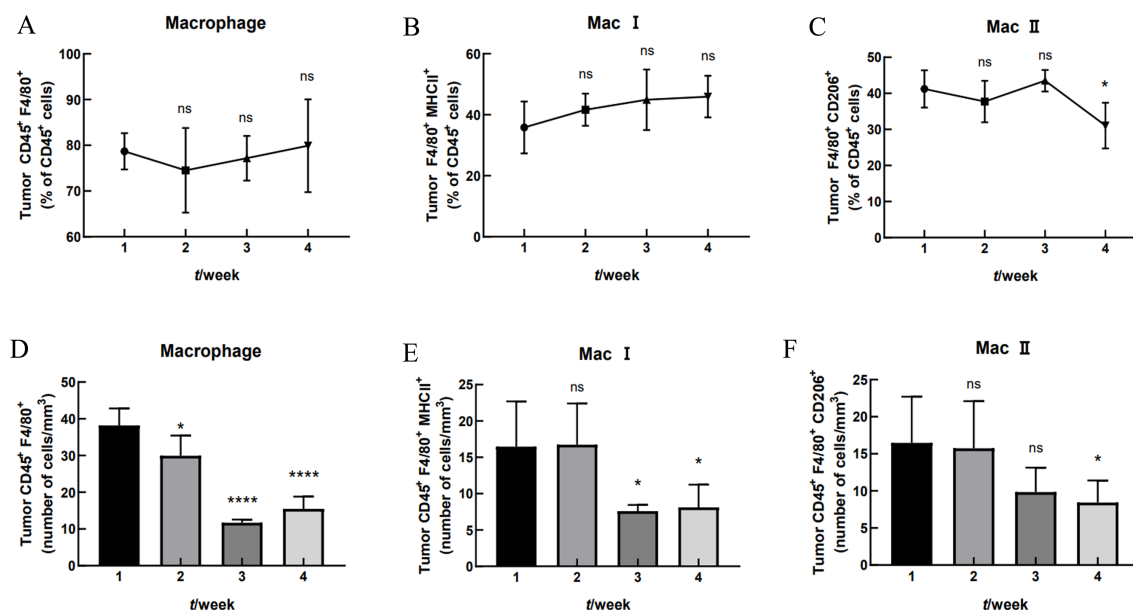
流式细胞术检测结果显示，相比荷瘤1周时，CD11b⁺细胞比例在荷瘤后总体未呈现明显变化（ $P > 0.05$ ，图5A）；M-MDSC比例在荷瘤2周和3周时无明显变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时明显上升（ $P < 0.05$ ），整体呈增长趋势（图5B）；G-MDSC比例在荷瘤后2周及4周均明显下降（ $P < 0.05$ ），整体呈下降趋势（图5C）。相比荷瘤1周时，单位体积肿瘤内CD11b⁺及M-MDSC细胞浸润数在荷瘤1周到4周时无显著变化（ $P > 0.05$ ，图5D和5E）；单位体积肿瘤内G-MDSC浸润数在荷瘤2周及3周时无明显变化（ $P > 0.05$ ），荷瘤4周时明显下降（ $P < 0.05$ ），总体呈下降趋势（图5F）。



注：A显示肿瘤浸润NK细胞比例变化；B显示肿瘤浸润DC比例变化；C显示单位体积肿瘤内NK细胞浸润数量变化；D显示单位体积肿瘤内DC细胞浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n=6$ 。

图3 荷瘤小鼠肿瘤浸润自然杀伤(NK)细胞和树突状细胞(DC)变化

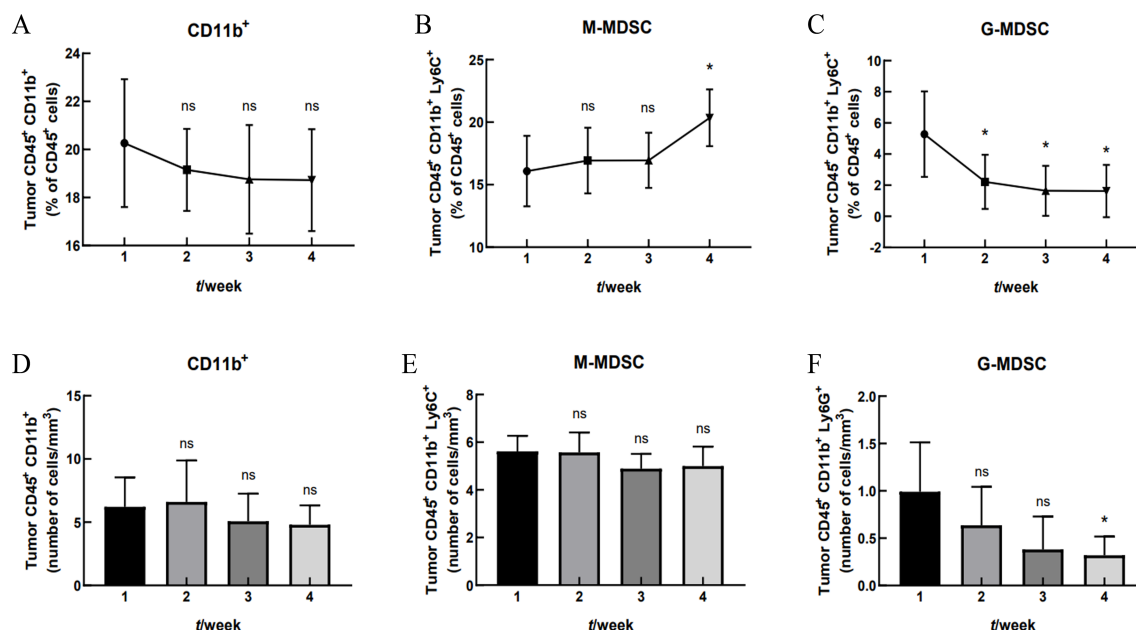
Figure 3 Variations of the infiltrating natural killer (NK) cells and dendritic cells (DCs) in the tumor



注：A显示肿瘤浸润总Mφ比例变化；B显示肿瘤浸润I型Mφ比例变化；C显示肿瘤浸润II型Mφ比例变化；D显示单位体积肿瘤内总Mφ浸润数量变化；E显示单位体积肿瘤内I型Mφ浸润数量变化；F显示单位体积肿瘤内II型Mφ浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n=6$ 。

图4 荷瘤小鼠肿瘤中浸润的巨噬细胞(Mφ)变化比较

Figure 4 Comparison of variations in the proportion of infiltrating macrophages (Mφ) in the tumor



注：A显示肿瘤浸润CD11b⁺细胞比例变化；B显示肿瘤浸润M-MDSC比例变化；C显示肿瘤浸润G-MDSC比例变化；D显示单位体积肿瘤内CD11b⁺浸润数量变化；E显示单位体积肿瘤内M-MDSC浸润数量变化；F显示单位体积肿瘤内G-MDSC浸润数量变化。各时间节点与荷瘤第1周比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ，ns表示差异无统计学意义， $n=6$ 。

图5 荷瘤小鼠肿瘤中浸润的髓源抑制性细胞(MDSC)变化比较

Figure 5 Comparison of changes in the proportion of infiltrating myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the tumor

3 讨论

大多数肿瘤都有一个分步进展的过程，包括一系列组织学、形态学和遗传学的变化，这些变化随着时间的推移而改变或累积^[12]。肿瘤微环境与肿瘤细胞之间复杂的相互作用贯穿了肿瘤发展全过程。目前，关于癌症免疫的研究主要集中在外周血、脾内或淋巴结，而对肿瘤内部免疫细胞浸润的复杂情形尚知之甚少。本研究检测几种具有代表性的免疫细胞浸润水平在结肠癌发展进程中的瘤内变化景观，旨在为结肠癌免疫学研究提供实验依据。

本实验数据显示，CD8⁺ T细胞水平稳步下降至不可逆的水平，个别样本浸润细胞数极低，而CD4⁺ T细胞比例在荷瘤早期就已迅速增长并持续累积，单位体积中浸润细胞数增长了近8倍。T细胞浸润水平在荷瘤1周及2周时有增长趋势，随后快速下降，这与CD4⁺ T细胞的飞速增长保持一致，肿瘤浸润的T细胞几乎都是CD4⁺表型。

已有研究表明，Th1细胞主要分泌白细胞介素(interleukin)-2、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)等，通过干扰内皮细胞增殖来抑制肿瘤生长。Th2细胞主要分泌IL-4等，诱导TAMs产生M2表型，并通过分泌抗炎细胞因子激活体液免疫，促进肿瘤生长。而调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)通过直接表达抑制性细胞因子，或间接消耗IL-2，抑制CD8⁺ T细胞的激活与增殖^[13]。而肿瘤内的Th2细胞浸润水平往往远高于Th1细胞，即产生了Th1/Th2漂移的现象^[14]。本研究结果支持CD4⁺ T细胞在肿瘤进展中产生Th1/Th2漂移的假设，所产生的免疫抑制状态严重影响了CD8⁺ T细胞和NK细胞的增殖和活化效率，并发现M-MDSC和CD4⁺ T细胞的高水平浸润与CD8⁺ T细胞和NK细胞水平的下降具有一定的相关性。另外，总T细胞比例在显著降低后出现反弹，这可能与NC细胞在荷瘤3周及4周的显著上升有关，这也体现了机体免疫在肿瘤发展整个过程中的顽强抗衡。然而尽管肿瘤体积飞速增

长,单位体积浸润DC细胞数也没有表现出急剧下跌的趋势。曾有报告称,肿瘤相关树突状细胞(tumor-associated dendritic cells, TADC)在抗原提呈、诱导同种异体反应性和分泌IL-2等方面的能力均显著下降,其表面分子以及联合转运蛋白和抗原加工相关转运体的表达也明显降低,相反它们具有促进MDSC累积和促使髓系细胞分化为F4/80⁺TAM的作用^[15]。事实上,大多数实体瘤都能通过产生IL-6、VEGF、CSF-1等细胞因子来抑制DC的分化和成熟,这种未成熟的TADC同样高表达CD11c,并在肿瘤内迅速累积,通过激活精氨酸酶1(arginase1, ARG1)和诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthetase, iNOS),进一步加深免疫抑制作用。

TAMs是占比最大的肿瘤浸润免疫细胞,也是肿瘤进展、转移和抗治疗的关键驱动因素。本研究发现,总M ϕ 的细胞比例始终维持在较高水平。通常认为,M1型巨噬细胞高表达肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、主要组织相容性复合体II(major histocompatibility complex-II, MHC II)分子等,发挥抗肿瘤作用;M2型巨噬细胞高表达ARG1和CD206等,发挥促肿瘤作用;然而肿瘤微环境中的I型巨噬细胞往往可转变为II型^[16]。本研究结果中巨噬细胞浸润数整体下降,但I型M ϕ 细胞数的下滑速度显著快于II型M ϕ ,未发现巨噬细胞的显著II型漂移现象。实际上,TAMs完全不同于普通巨噬细胞,其具有抑制T细胞功能发挥、促进巨噬细胞和单核细胞分化以及促肿瘤血管生成的作用,从而形成了促肿瘤生长的旁分泌循环。

MDSC与免疫逃逸机制密切相关,可通过分泌炎症因子促进肿瘤细胞的存活和肿瘤血管生成,但由于其异质性和非成熟性,目前对该细胞群的定义一直存在争议^[17]。本研究以CD11b⁺细胞标志肿瘤内浸润的MDSC,发现MDSC整体水平始终居高不下。于是本研究进一步分析G-MDSC和M-MDSC的浸润水平,发现G-MDSC浸润水平稳步下降,这可能是肿瘤内的趋化因子CXC缺失引起。值得注意的是,M-MDSC的浸润水平稳定上升,且占比远高于G-MDSC。由于G-MDSC和M-MDSC抑制T细胞生长增殖的途径

是相互独立的,笔者推测浸润的单核细胞和粒细胞主要是Ly6C⁺表型,M-MDSC可能是促瘤免疫和免疫逃逸的主角。

综上所述,笔者推测,癌细胞一旦接种于小鼠,机体迅速做出抗肿瘤和促肿瘤的免疫应答;肿瘤组织内免疫细胞浸润水平整体下降,CD8⁺T细胞和NK细胞水平的下降不断削弱机体抗肿瘤免疫效应。TADC和TAMs在促肿瘤免疫应答中发挥了重要作用,CD4⁺T细胞和M-MDSC可能是促肿瘤效应的关键点,促肿瘤免疫逐渐占据主导地位,从而促进结肠癌的发展。

参考文献:

- [1] ENGBLOM C, PFIRSCHKE C, PITTET M J. The role of myeloid cells in cancer therapies[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(7):447-462. DOI:10.1038/nrc.2016.54.
- [2] HUI L, CHEN Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil[J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(1): 7-13. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.07.039.
- [3] MIYASHITA M, SASANO H, TAMAKI K, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8⁺ and FOXP3⁺ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17:124. DOI:10.1186/s13058-015-0632-x.
- [4] FENG W, LI Y, SHEN L, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with completely resected stage IIIA(N₂) non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 7227-7240. DOI: 10.18632/oncotarget.6979.
- [5] DE PALMA M, BIZIATO D, PETROVA T V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(8): 457-474. DOI: 10.1038/nrc.2017.51.
- [6] BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer[J]. *Immunity*, 2013, 39(4): 782-795. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.10.003.
- [7] PAGÈS F, BERGER A, CAMUS M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(25): 2654-2666. DOI:10.1056/nejmoa051424.
- [8] ATREYA I, NEURATH M F. Immune cells in colorectal cancer: prognostic relevance and therapeutic

- strategies[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2008, 8(4): 561-572. DOI:10.1586/14737140.8.4.561.
- [9] BINDEA G, MLECNIK B, FRIDMAN W H, et al. Natural immunity to cancer in humans[J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(2): 215-222. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.006.
- [10] PAGÈS F, KIRILOVSKY A, MLECNIK B, et al. *In situ* cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(35): 5944-5951. DOI: 10.1200/jco.2008.19.6147.
- [11] LESTERHUIS W J, BOSCO A, MILLWARD M J, et al. Dynamic versus static biomarkers in cancer immune checkpoint blockade: unravelling complexity[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(4): 264-272. DOI:10.1038/nrd.2016.233.
- [12] SHARMA P, WAGNER K, WOLCHOK J D, et al. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(11):805-812. DOI:10.1038/nrc3153.
- [13] LAUEROVA L, DUSEK L, SIMICKOVA M, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response[J]. *Neoplasma*, 2002, 49(3): 159-166.
- [14] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [15] 焦国慧, 杨荣存. 肿瘤相关免疫抑制细胞与免疫逃逸机制研究进展[J]. *癌症进展*, 2008, 6(2):147-151. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1535.2008.02.009.
- [16] DENARDO D G, RUFFELL B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19(6):369-382. DOI:10.1038/s41577-019-0127-6.
- [17] MARVEL D, GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3356-3364. DOI:10.1172/jci80005.
- (收稿日期: 2020-10-09 修回日期: 2021-02-22)

《中华人民共和国生物安全法》: 生物技术研究、开发与应用安全

《中华人民共和国生物安全法》由中华人民共和国第十三届全国人民代表大会常务委员会第二十二次会议于2020年10月17日通过,自2021年4月15日起施行。

第四章 生物技术研究、开发与应用安全

第三十四条 国家加强对生物技术研究、开发与应用活动的安全管理,禁止从事危及公众健康、损害生物资源、破坏生态系统和生物多样性等危害生物安全的生物技术研究、开发与应用活动。从事生物技术研究、开发与应用活动,应当符合伦理原则。

第三十五条 从事生物技术研究、开发与应用活动的单位应当对本单位生物技术研究、开发与应用的安全负责,采取生物安全风险防控措施,制定生物安全培训、跟踪检查、定期报告等工作制度,强化过程管理。

第三十六条 国家对生物技术研究、开发活动实行分类管理。根据对公众健康、工业农业、生态环境等造成危害的风险程度,将生物技术研究、开发活动分为高风险、中风险、低风险三类。生物技术研究、开发活动风险分类标准及名录由国务院科学技术、卫生健康、农业农村等主管部门根据职责分工,会同国务院其他有关部门制定、调整并公布。

第三十七条 从事生物技术研究、开发活动,应当遵守国家生物技术研究开发安全管理规范。从事生物技术研究、开发活动,应当进行风险类别判断,密切关注风险变化,及时采取应对措施。

第三十八条 从事高风险、中风险生物技术研究、开发活动,应当由在我国境内依法成立的法人组织进行,并依法取得批准或者进行备案。从事高风险、中风险生物技术研究、开发活动,应当进行风险评估,制定风险防控计划和生物安全事件应急预案,降低研究、开发活动实施的风险。

第三十九条 国家对涉及生物安全的重要设备和特殊生物因子实行追溯管理。购买或者引进列入管控清单的重要设备和特殊生物因子,应当进行登记,确保可追溯,并报国务院有关部门备案。个人不得购买或者持有列入管控清单的重要设备和特殊生物因子。

第四十条 从事生物医学新技术临床研究,应当通过伦理审查,并在具备相应条件的医疗机构内进行;进行人体临床研究操作的,应当由符合相应条件的卫生专业技术人员执行。

第四十一条 国务院有关部门依法对生物技术应用活动进行跟踪评估,发现存在生物安全风险的,应当及时采取有效补救和管控措施。

(《实验动物与比较医学》编辑部摘录)