

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520081153471

UDC _

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

活化的肝星状细胞在肝癌微环境中的调节作用

Modulatory activity of activated hepatic stellate cells in microenvironment of hepatocellular carcinoma

张磊

指导教师姓名: 王效民 教授

专业名称: 外 科 学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩日期: 2011 年 5 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2011 年 5 月

活化的肝星状细胞在肝癌微环境中的调节作用

张磊

指导老师

王效民

教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

背景和目的 肝细胞性肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的五大恶性肿瘤之一, 每年约有 500, 000 新发病例; 尤其是在亚洲, 因为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的感染率高, 一些国家 HCC 发病率非常高, 而西方一些国家由于丙型肝炎患者增多, HCC 发病率也逐年升高。我国是 HCC 的高发国家, 发病率居世界首位, 死亡率位于恶性肿瘤死亡率的第二位。由于综合治疗疗效不理想, 毒副作用大, 多数病人诊断后的存活时间通常不超过一年。近年来免疫治疗逐渐受到重视, 成为晚期肝癌治疗的重要手段。免疫治疗的目的是打破机体或肿瘤局部的免疫耐受或免疫抑制, 提高机体本身的免疫功能, 这使得 HCC 的免疫防治研究日趋重要。本实验的研究目的是研究活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)在小鼠肝细胞癌发生发展中的调节作用及肿瘤微环境的免疫功能变化。

实验方法 本实验中, 我们分离培养原代小鼠肝星状细胞。通过建立原位移植瘤模型, 分为 H22 单纯注射组与 H22+HSCs 联合注射组。10 d 后对荷瘤小鼠行瘤组织解剖测量移植瘤大小, 并通过免疫组化观察两组肿瘤中肿瘤细胞增殖, 血管淋巴管生成, T 细胞亚群浸润变化情况和 B7H1 及肿瘤相关巨噬细胞的变化, 以及通过流式细胞术分析脾脏中 T 细胞亚群变化。Tunel 检测肿瘤组织 T 细胞凋亡。

结果 体内实验, HSCs+H22组小鼠原位移植瘤的形成时间与生长速度明显快于单纯接种H22组, 并且免疫组化检测肿瘤组织显示HSCs+H22组肿瘤细胞增殖血管生成, 淋巴管生成都有明显增加, 浸润的T细胞及其亚型较单纯H22组有不同程度降低。同时HSCs+H22组脾脏细胞显示T细胞及其亚型也同样出现不同程度降低。TUNEL试剂盒检测显示HSCs+H22组肿瘤组织中T细胞的凋亡数量增加, 并通过免疫组化分析出HSCs+H22组肿瘤组织中B7H1表达增加以及肿瘤相关巨噬细胞增多。

结论 HSCs通过其因子调节及免疫抑制作用在肿瘤微环境中发挥促进肿瘤的发生发展功能, 这一发现可能为肝癌的治疗以及预后提供新的思路。

关键词: 肝癌, 肝星状细胞, 免疫调节, 微环境

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Background and aims Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common worldwide malignancy. However, Comprehensive treatment is followed by poor prognosis. The purpose of immunotherapy is to break local tumor immune tolerance or immune suppression, improve the body's immune function, which makes the immunoprophylaxis of HCC. Accumulating reports suggested that hepatic stellate cells (HSCs) exhibited the ability in immunosuppression and immunoregulation, and should be responsible for the occurrence and development of hepatocellular carcinoma(HCC).

Methods In this study, HSCs were isolated from Balb/c mice. To establish a stable primary hepatocellular carcinoma (HCC) model mice , and establish a basis for depth laboratory research in hepatocellular cancer. We immunohistochemically examined for their influences on H22 proliferation, angiogenesis,Lymphangiogenesis, T cells, expression of B7H1, tumor-associated macrophage cells (TAM cells) in tumor microenvironment . Furthermore, we examined T lymphocyte subsets in splenocyte were detected by FCM.

Results We demonstrated Co-transplantation of HSCs promoted HCC growth and progression by enhancing tumor angiogenesis, Lymphangiogenesis and tumor cell proliferation . HSCs inhibited the lymphocyte infiltration in tumors and the spleens of mice bearing tumors, induced apoptosis of T cells, and enhanced the expression of B7H1 and TAM cells.

Conclusion Our results demonstrated that HSCs promote HCC progression because of its immune regulatory activity partially. Our data supply new information to support an integral role for HSCs in promoting HCC progression and HSCs may serve as a therapeutic target for HCC.

Keywords Hepatic stellate cells, Hepatocellular carcinoma, Immunoregulation, Microenvironment

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

前 言.....	1
第一部分 小鼠原位肝癌模型的建立.....	8
材料与方法.....	8
实验结果.....	10
讨 论.....	12
小 结.....	13
第二部分 肝星状细胞对肝癌细胞增殖及血管淋巴管生成的影响....	14
材料与方法.....	14
实验结果.....	18
讨 论.....	22
小 结.....	24
第三部分 肝星状细胞在肝癌微环境中的免疫抑制特性.....	25
材料与方法.....	25
实验结果.....	错误！未定义书签。
讨 论.....	31
小 结.....	33
总 结.....	34
参考文献.....	35
综述.....	40
致 谢.....	51

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Introduction	1
Part I Primary hepatocellular carcinoma (HCC) model	8
Materials and methods	8
Results	10
Discussion	12
Brief summary of Part I	13
Part II HSC inducing proliferation of the tumor cells	
andangiogenesis, lymphangiogenesis	14
Materials and methods	14
Results	18
Discussion	22
Brief summary of Part II	24
Part III Inhibitory effect of HSCs on immune responses in the HCC	
microenvironment	25
Materials and methods	25
Results	27
Discussion	30
Brief summary of Part III	33
Conclusion	34
References	35
LiterautreReview	40
Acknowledgement	51

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前言

1. 肝细胞性肝癌

肝细胞性肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC) 一直是发病率最高的肿瘤之一, 每年约有 500, 000 新发病例; 尤其是在亚洲的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染率高以及欧美国家的丙型肝炎患者增多, HCC 发病率也逐年升高。我国是 HCC 的高发国家, 发病率居世界首位, 死亡率位于恶性肿瘤死亡率的前三位^[1-2]。HCC 具有很高的血管转移的倾向, 且易转移、易复发。手术虽然是最有效的治疗方法, 但大多病人诊断时就已失去了手术机会。而那些有手术适应症的病人, 因肿瘤细胞侵入门静脉或肝其他部位引起肝癌再发及肝内转移, 其长期存活率比较低。现在, HCC 治疗方法已从单一的手术切除发展到以手术为主, 辅以经皮微波凝固治疗、射频毁损治疗、肝动脉化疗栓塞、放射治疗、局部治疗(如瘤内局部无水乙醇注射等)等多模式的综合治疗, 但是疗效仍不理想, 毒副作用大, 多数病人诊断后的存活时间通常不超过 1 年^[3]。近年来免疫治疗逐渐受到重视, 成为晚期肝癌治疗的重要手段。临床常用的免疫制剂包括各种细胞因子如干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)等; 此外还有过继免疫细胞、各种胸腺肽等, 可以单用或与其它治疗方法联合应用, 研究证明能提高生活质量, 延长生存期。免疫治疗的目的是打破机体或肿瘤局部的免疫耐受或免疫抑制, 提高机体本身的免疫功能, 这使得 HCC 的免疫防治研究显得日趋重要。基于此本课题开展了 HCC 肿瘤微环境中免疫细胞和细胞因子的研究。

2. 原位肝癌模型的建立

为了能够较好的研究肝癌微环境, 肝癌动物模型的建立及选择是十分重要的。理想的实验肝癌模型应具备以下条件: 1.动物模型包括病因、发病机制及生物学行为、发生部位、组织学类型等方面应最好地相同或相近与人类肝癌的生物学行为;2.模型制备具有可重复性, 制备成功率高;3.制备模型的方法简易, 费用低廉, 实验周期短;4.采取的实验方法对人体无或较小危害, 对环境无污染。常用的

肝癌模型制备方法有细胞接种或瘤组织植入、化学药品诱发、以及转基因小鼠。转基因肝癌模型虽然可根据研究目的进行设计,能够从不同环节对发病机制及治疗方法进行探讨,但是转基因鼠制备的成本较高,技术难度大,操作程序复杂。药物诱发肝癌模型虽然能很好地模拟正常人体肿瘤的形成过程,但从其诱导到肿瘤产生的过程较长,难以在一时间获得肿块大小较一致的动物模型供实验用,成瘤率也很难达到满意^[4-6]。移植性肝癌模型是指能够在同系、同种或异种动物体内传代生长的肝癌,其生长特性和组织学类型较稳定,分为异位移植和肝脏原位移植。异位移植是在非肝脏部位的其他部位建立肝癌模型,皮下移植性肝癌是目前国内外用于肿瘤治疗药物筛选及免疫治疗,通路研究的最常见的模型^[7-8]。通过皮下接种瘤细胞方法建立的皮下肿瘤模型中,肿瘤通常呈不规则圆形,瘤体外有包膜,容易与皮肤和肌肉分离,便于观察和测量肿瘤大小。但是这种皮下肿瘤最明显的不足是肿瘤细胞生长的环境与人体内原发肿瘤生长的微环境完全不同,因而形成的肿瘤很少发生远处转移。原位移植不仅能够很好地模拟肝癌微环境,而且成瘤时间短,肿瘤成瘤性稳定,重复率高。为了观察联合 HSC 细胞共移植对肝癌微环境的影响,选用细胞移植的原位模型,最为合适。

3. 肝癌微环境

3.1 肿瘤微环境的提出

肿瘤微环境(tumor microenvironment)最早于1979年由Lord正式提出,当时并没有引起广泛的关注。上世纪九十年代,肿瘤免疫研究发展迅速,各种免疫治疗方法不断出现。其中,细胞过继免疫治疗被认为是最有前景的免疫治疗方法,该方法是将患者免疫细胞进行体外培养,加入肿瘤特异性抗原和细胞因子刺激,筛选具有高度特异性肿瘤杀伤效应的免疫细胞并大量扩增,然后回输到患者体内以杀灭肿瘤。由于此方法克服了人体内肿瘤免疫耐受中肿瘤抗原呈递效率低下和效应性淋巴细胞不足的两个关键问题,一度得到肿瘤免疫研究者极大的重视,遗憾的是,利用此方法,体外研究可以得到了较好的肿瘤杀伤效应,但体内应用效果却远逊于体外,并不能得到显著的免疫杀伤效应。最近研究表明,肿瘤微环境内的免疫耐受是导致这种情况发生的最关键原因。微环境即邻近的组织细胞及其分泌的各种因子的稳定是保持细胞正常增殖、分化、代谢和功能活动的重要

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库