

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号:

UDC _____

厦门大学

_____博士_____学位论文

活化的肝星状细胞诱导骨髓来源抑制
性细胞扩增和迁移的机制研究

**Mechanisms of activity hepatic stellate cells induced
myeloid-derived suppressor cells accumulation and
migration**

指导教师姓名: 王效民 教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月

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

英文缩略语表.....	1
中文摘要.....	3
Abstract.....	6
第一章 前言.....	9
1.1. 肝星状细胞.....	10
1.1.1. 肝星状细胞简介.....	10
1.1.2. 肝星状细胞免疫学功能.....	11
1.1.3. 肝星状细胞与肝癌.....	20
1.2. 髓系源性抑制细胞.....	22
1.2.1. MDSCs 的来源及生物学特征.....	23
1.2.2. MD SCs 的扩增和活化.....	24
1.2.3. MDSCs 与肿瘤转移.....	27
1.3. 本文研究目的、内容和意义.....	32
第二章 原位肝癌小鼠髓系来源抑制性细胞及其亚群的分选.....	34
2.1 引言.....	34
2.2 实验材料.....	35
2.2.1 主要仪器设备.....	35
2.2.2 实验材料、试剂.....	36
2.2.3 常用试剂配制.....	36
2.3 实验方法.....	37
2.3.1 实验动物.....	37
2.3.2 细胞培养.....	37
2.3.3 小鼠原位肝癌模型.....	37
2.3.4 小鼠骨髓细胞分离.....	38
2.3.5 小鼠脾脏细胞的分离.....	38

2.3.6	小鼠脾脏 MDSCs 分选	39
2.3.7	小鼠脾脏 MDSCs 亚群分选	39
2.3.8	流式细胞仪分析细胞纯度	42
2.3.9	细胞活力检测	42
2.3.10	吉姆萨染色	42
2.3.11	统计学处理	42
2.4	结果	43
2.4.1	MDSCs 的分选	43
2.4.2	MACS 和 FACS 分选 PMN-MDSCs 和 Mo-MDSCs	46
2.5	讨论	50

第三章 活化的肝星状细胞通过 PGE2/EP4 通路促进髓系来源抑制性细胞扩增

54

3.1	引言	54
3.2	实验材料仪器设备	55
3.2.1	主要仪器设备	55
3.2.2	主要试剂材料	56
3.3	实验方法	57
3.3.1	动物实验	57
3.3.2	细胞培养	57
3.3.3	细胞药物处理	58
3.3.4	HSCs 上清 (CM) 收集	58
3.3.5	CM 诱导 MDSCs 生成	58
3.3.6	EP 抑制剂抑制 MSDCs 生成	58
3.3.7	小鼠原位肝癌模型	58
3.3.8	小鼠骨髓细胞分离	59
3.3.9	小鼠脾脏细胞的分离	59
3.3.10	小鼠脾脏 MDSCs 亚群分选	59
3.3.11	肿瘤细胞分离	59
3.3.12	流式分析	60

3.3.13. 细胞 RNA 提取.....	60
3.3.14. cDNA 合成.....	60
3.3.15. Real-time PCR.....	61
3.3.16. CCK8 细胞增殖实验.....	62
3.3.17. ELISA 试剂盒检测 PGE2.....	62
3.3.18. 统计学分析.....	63
3.4 结果.....	63
3.4.1 肝星状细胞诱导骨髓细胞向 MDSCs 分化.....	63
3.4.2 肝星状细胞通过 COX2-PGE2 信号通路诱导骨髓细胞向 MDSCs 分化.....	67
3.4.3 肝星状细胞通过 PGE2/EP4 信号通路诱导骨髓细胞向 MDSCs 分化.....	69
3.4.4 抑制 HSCs 来源的 PGE2 抑制肿瘤的生长和 MDSCs 的浸润.....	71
3.4.5 HSCs 诱导 MDSCs 及其亚群扩增的机制模式图.....	74
3.5 讨论.....	75
第四章... 活化的肝星状细胞促进髓系来源抑制性细胞迁移及其机制初探.....	78
4.1 引言.....	78
4.2 实验材料.....	78
4.2.1 主要仪器设备.....	78
4.2.2 主要试剂材料.....	79
4.3 实验方法.....	80
4.3.1 动物实验.....	80
4.3.2 细胞培养.....	81
4.3.3 迁移实验.....	81
4.3.4 基因 PCR 芯片.....	82
4.3.5 蛋白芯片.....	82
4.3.6 MDSCs 及其亚群分选.....	83
4.3.7 小鼠肝癌原位模型.....	83
4.3.8 小鼠脾脏细胞分离.....	83
4.3.9 基因表达分析.....	84

4.3.10 统计分析.....	84
4.4 结果.....	84
4.4.1 HSC-CM 能够明显诱导脾脏中 MDSCs 的迁移	84
4.4.2 HSC-CM 对 MDSCs 亚群迁移的影响	85
4.4.3 HSC-CM 中趋化因子表达情况.....	86
4.4.4 MDSCs 亚群趋化因子受体表达情况	88
4.4.5 HSC-CM 可能通过 CXCR4/SDF-1 轴促进 MDSCs 迁移.....	95
4.5 讨论.....	96
全文总结	100
参考文献	101

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Content

Abbreviations and acronyms	1
Abstract in Chinese.....	3
Abstract in English	6
Chapter 1 Introduction	9
1.1. Hepatic stellate cells	10
1.1.1. Hepatic stellate cells brief introduction.....	10
1.1.2. Hepatic stellate cells immunological function.....	11
1.1.3. Hepatic stellate cells and liver cancer.....	20
1.2. Myeloid derived suppressor cells.....	22
1.2.1. Origin and characteristics of MDSCs	23
1.2.2. Expansion and activity of MD SCs	24
1.2.3. Role of MDSCs in tumor metastasis.....	27
1.3. Purpose and Significance of this thesis.....	32
Chapter 2 The Sorted of MDSCs and the subset of MDSCs from orthotopic hepatoma in mice.....	34
2.1 Introduction	34
2.2 Materials	35
2.2.1 The main instrument and equipment.....	35
2.2.2 The experimental materials reagent.....	36
2.2.3 Preparation of commonly used reagent.....	36
2.3 Methods.....	37
2.3.1 Experimental animals	37
2.3.2 Cell culture.....	37
2.3.3 The orthotopic hepatoma in mice.....	37
2.3.4 Isolation of mice bone marrow	38
2.3.5 Isolation of mice splenocytes	38

2.3.6	Sorted of MDSCs from tumor-bearing mice splenocytes	39
2.3.7	Sorted of subsets of MDSCs from tumor-bearing mice splenocytes	39
2.3.8	Cell purity analys by flow cytometry.....	42
2.3.9	Cell viability detection.....	42
2.3.10	Giemsa staining	42
2.3.11	Statistical analysis	42
2.4	Results	43
2.4.1	The sorted of MDSCs.....	43
2.4.2	PMN-MDSCs and Mo-MDSCs sorted by MACS and FACS	46
2.5	Discussion and conclusion	50
Chapter 3 Activity Hepatic stellate cells induced MDSCs expansion through PGE2/EP4 signaling		54
3.1	Introduction	54
3.2	Materials	55
3.2.1.	The main instrument and equipment.....	55
3.2.2.	The experimental materials reagent.....	56
3.3	Methods.....	57
3.3.1.	Experimental animals	57
3.3.2.	Cell culture.....	57
3.3.3.	Drug treatement	58
3.3.4.	Collection of HSCs conditional medium.....	58
3.3.5.	HSC-CM induced MDSCs expansion.....	58
3.3.6.	Inhibitor of EP inhibit MDSCs accumulated.....	58
3.3.7.	The orthotopic hepatoma in mice.....	58
3.3.8.	Isolation of mice bone marrow	59
3.3.9.	Isolation of mice splenocytes	59
3.3.10.	Sorted of subsets of MDSCs from tumor-bearing mice splenocytes	59
3.3.11.	Isolation of tumor cells.....	59
3.3.12.	Flow cytometry analysis	60

3.3.13. Cell RNA extraction	60
3.3.14. The synthesis of cDNA.....	60
3.3.15. Real-time PCR.....	61
3.3.16. CCK8 cell proliferation assay.....	62
3.3.17. ELISA kit for detection of PGE2.....	62
3.3.18. Statistical analysis.....	63
3.4 Results	63
3.4.1 Hepatic stellate cell induced bone marrow cells differentiation to MDSCs .	63
3.4.2 Activity Hepatic stellate cells induced bone marrow cells differentiation to MDSCs through COX2-PGE2 signaling.....	67
3.4.3 Activity Hepatic stellate cells induced bone marrow cells differentiation to MDSCs through PGE2/EP4 signaling	69
3.4.4 Inhibited PGE2 derived of HSCs inhibits tumor growth and invasion of MDSCs	71
3.4.5 Schematic for the signal pathway of MDSCs induction by HSCs.....	74
3.5 Discussion and conclusion	75
Chapter 4 The mechanism of activay hepatic stellate cells promote myeloid derived suppressor cells accumulaton and migration	78
4.1 Introduction	78
4.2 Materials	78
4.2.1 The main instrument and equipment.....	78
4.2.2 The experimental materials reagent.....	79
4.3 Methods.....	80
4.3.1 Experimental animals	80
4.3.2 Cell culture.....	81
4.3.3 Migration Experiment.....	81
4.3.4 PCR gene chip	82
4.3.5 Protein chip.....	82
4.3.6 The sorted of MDSCs and the subsets of MDSCs.....	83

4.3.7	The orthotopic hepatoma in mice.....	83
4.3.8	Isolation of mice splenocytes	83
4.3.9	Analysis of gene expression	84
4.3.10	Statistical analysis	84
4.4	Results	84
4.4.1	HSC-CM induce migration of MDSCs from splenocytes	84
4.4.2	HSC-CM induce migration of subsets of MDSCs from splenocytes	85
4.4.3	The expression of chemokine in HSC-CM.....	86
4.4.4	The expression of chemokine receptor in the subsets of MDSCs	88
4.4.5	HSC-CM may promote MDSCs migration through the CXCR4/SDF-1 axis..	95
4.5	Discussion and conclusion	96
Conclusion		100
Reference		101

英文缩略语表

英文缩写	英文全称	中文名称
HCC	hepatocellular carcinoma	原发性肝癌
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
HSCs	Hepatic stellate cells	肝星状细胞
PDL-1	programmed death ligand 1	程序性死亡配体-1 分子
TCR	T cell receptor	T 细胞受体
ICAM-1	intracellular adhesion molecule -1	细胞间黏附分子-1
IGSF	immunoglobulin superfamily	免疫球蛋白超家族
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand	肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体
TGF- β	transforming growth factor β	转化生长因子 β
TNF- α	tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
NK	natural killer cell	自然杀伤细胞
NKT	natural killer T cell	自然杀伤性 T 细胞
IFN- γ	interferon- γ	干扰素 γ
Treg	Regulatory T cell	调节性 T 细胞
MDSCs	myeloid-derived suppressor cell	髓系来源抑制性细胞
Arg-1	argina-1	精氨酸-1
iNOS	inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合酶
C3	complement component 3	补体成分 3
TLRs	Toll-like receptors	Toll 样受体
ROS	reactive oxygen species	活性氧
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor	粒/巨噬细胞集落刺激因子

缩略语表

M-CSF	macrophagecolony-stimulating factor	巨噬细胞集落刺激因子
SCF	stem-cell factor	干细胞因子
TAMs	tumour-associated macrophages	肿瘤相关巨噬细胞
COX2	cyclooxygenase	环氧酶 2
MIF	macrophage migration inhibitory factor	巨噬细胞迁移抑制因子
SAA3	serum amyloid A3	血清淀粉样蛋白 A3
bFGF	basic fibroblast growth factor	碱性成纤维细胞生长因子

中文摘要

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第五大常见的恶性肿瘤，在肿瘤致死的病因中排名第三位。在全球，每年有超过 50 万人死于肝癌，且一半以上在中国。随着科学研究的发展，科研人员发现肝癌的发生发展不仅仅是病毒感染、环境因素、基因突变这些因素，肿瘤微环境对肿瘤的发生、发展、复发转移有着重要作用。肝脏是一个具有“免疫特赦”的脏器，肝癌微环境中的非实质细胞及其细胞因子是肝癌的免疫逃逸，复发转移的重要因素。

肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSCs) 是肝癌微环境中重要的非实质细胞。活化的星状细胞具有免疫调节能力，能够诱导免疫抑制细胞的产生，促进肝癌的发生、发展、复发转移。髓系来源抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSCs) 是具有免疫负调控作用的免疫抑制细胞，是近年来研究的热点。我们前期研究发现活化的星状细胞能促进肝癌的发生发展，促进肝癌中 MDSCs 的蓄积。然而在活化的 HSCs 诱导 MDSCs 在肝癌微环境中蓄积的机制并不清楚。本文能过以下三个部分研究进行探讨和阐述。

第一部分 髓系来源抑制性细胞及其亚群的分选

本章首先通过流式分选方法对比不同的流式抗体分选荷瘤小鼠骨髓中的 MDSCs 的可行性。我们单标 APC-CD11b 或 PE-Gr-1 或双标 APC-CD11b, PE-Gr-1, 对比其分选后的细胞纯度和细胞活力，发现三各方法分选得到的细胞 90% 以上为 CD11b⁺Gr-1⁺ 的细胞，即 MDSCs，且其细胞活力都达 95% 以上。然而用 CD11b 单色标记分选 MDSCs 既可以满足实验对细胞纯度和活力的要求，又重复性高，减少荧光素染料对后续实验的干扰，同时也节省资源。

为了进一步研究 MDSCs 亚群，我们还建立不同的方法分选荷瘤小鼠脾脏中 PMN-MDSCs 和 Mo-MDSCs。应用流式和磁珠分选的方法都能得到高纯度和高活力的 PMN-MDSCs 和 Mo-MDSCs。而 PMN-MDSCs 在脾脏中比例较高，流式分选会更节省资源。而 Mo-MDSCs 在脾脏中比例很少，则选用磁珠分选的方法可以更省时间。本部分研究提供了 MDSCs 及亚群的分选方法，为后续 HSCs 对 MDSCs 作用的机制研究奠定了基础。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.