

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.005

运动对肝原位移植瘤切除术后小鼠脾淋巴细胞分泌因子的影响

陈泉, 赵彤, 万嫣, 苏矜子, 黄晓蒂, 李柏

(海军军医大学中医系, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察运动对肝原位移植瘤切除术后小鼠免疫功能的影响。方法: 对小鼠进行肝原位移植瘤切除术, 并在手术前后不同时期进行有氧运动干预, 观察小鼠术后脾淋巴细胞因子分泌水平。结果: 正常小鼠组IL-6和TNF- γ 明显低于术后对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与术后对照组相比, 后期运动组除IL-4, IL-6和INF- γ 外, 其余各项均有显著差异, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与术后对照组相比, 全程运动组除IL-4和INF- γ 外, 其余各项均有显著差异, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 肝原位移植瘤切除术可对小鼠造成应激损伤, 影响其脾淋巴细胞分泌因子水平。运动有助于术后小鼠免疫功能恢复, 全程运动效果更佳。

[关键词] 有氧运动; 肝原位移植瘤切除术; 免疫功能; 脾淋巴细胞分泌因子; 小鼠

Effect of exercise on spleen lymphocyte secretory factor after orthotopic liver transplantation tumor resection in mice

CHEN Quan, ZHAO Tong, WAN Yan, SU Lingzi, HUANG Xiaodi, LI Bai

(Department of Traditional Chinese Medicine, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract **Objective:** To observe the effect of aerobic exercise on immune function of mice after orthotopic liver transplantation tumor resection. **Methods:** Mice were treated with orthotopic liver transplantation tumor resection and aerobic exercise at different stages before and/or after operation to observe the level of spleen lymphocyte secretory factor after operation. **Results:** The levels of IL-6 and TNF- γ of the normal mice group were significantly lower than those in the postoperative control group ($P < 0.01$). In the postoperative exercise group, there were significant differences in the other items except IL-4, IL-6 and INF- γ compared with the postoperative control group ($P < 0.05$). Except IL-4 and INF- γ , the other items of the total exercise group were significant difference compared with the postoperative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Orthotopic liver transplantation tumor resection caused stress injury in mice and affected the level of splenic lymphocyte secretion

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-26

通信作者 (Corresponding author): 李柏, Email: libai9@126.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81503632); 上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划 (2014-2016年) (ZY3-CCCX-3-7002)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81503632) and Shanghai Three-Year Plan of Action to Further Accelerate the Development of Traditional Chinese Medicine (2014-2016) (ZY3-CCCX-3-7002), China.

factor. Exercise is helpful to the recovery of immune function of mice after operation especially and the effect of whole course exercise is better.

Keywords aerobic exercise; orthotopic liver transplantation tumor resection; immune function; spleen lymphocyte secretory factor; mice

肝癌是病死率最高的恶性肿瘤之一。近年来其发生率和病死率均呈上升趋势^[1]。目前,通过手术切除治疗,肝癌患者的预后和生存期的延长均有所改善^[2]。但术后高复发率仍是影响肝癌患者手术预后差的主要原因,严重影响患者的远期疗效和生活质量^[3]。研究^[4]发现:肝癌术后患者普遍存在细胞免疫功能低下,考虑其可能是影响肝癌术后复发的重要因素。适当运动有助于身体健康,现代也有研究^[5]证实定期适量运动可减轻炎症反应,减少疾病发生。本研究以此为依据,拟在肝原位移植瘤切除术前不同时期对小鼠施以运动干预,运动结束后取组织,检测小鼠脾淋巴细胞分泌因子水平,观察运动对小鼠免疫功能的影响,以期改善患者免疫功能,降低复发转移,提高其生存率。

1 材料与方法

1.1 材料

C57 6~8周龄雄性小鼠40只,体重约24 g/只,于无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级恒温、恒湿环境中分笼饲养,每笼饲养5只。小鼠随机分为5组:正常小鼠组、术后对照组、前期运动组、后期运动组、全程运动组,每组8只。

1.2 方法

1.2.1 运动方式

运动方式采用持续有氧运动干预,运动强度为12 m/min, 30 min/d,每周运动5 d,休息2 d。根据摄氧量和最大摄氧量(VO_{2max})的百分比来衡量运动强度,对强度的控制可通过调节跑台的速度和坡度来实现。根据Bedford等^[6]的研究结果,小于4周的小鼠,雄性: $VO_{2max}=0.19 \times \text{体重} + 91.16$,雌性: $VO_{2max}=0.20 \times \text{体重} + 95.58$;大于4周的小鼠: $VO_{2max}=0.35 \times \text{体重}$ 。

1.2.2 运动干预方案

前期运动组和全程运动组小鼠预先有氧运动4周。运动结束后,除正常组小鼠外,其余各组小鼠进行肝原位种植瘤切除术(于第二军医大学实验动物中心进行)。术后小鼠注意保温,休息7 d。之后后期运动组、全程运动组小鼠继续进行2周有氧

运动干预,其余各组自由活动。运动结束后24 h,处死各组小鼠,并留取小鼠脾脏。

1.3 小鼠肝原位移植瘤切除术

小鼠肝原位移植瘤切除术的详细步骤见文献[7]。

1.3.1 小鼠腹水瘤培养

将冻存的肝癌H22细胞复苏。调整细胞悬液中细胞浓度为 $1 \sim 3 \times 10^6$ 个/mL,于小鼠左下腹正中线旁0.5~1 cm处腹腔注射(0.25 mL/只)。7~10 d可观察到第1代小鼠腹部膨隆,即可传代培养。消毒小鼠腹部后,用1 mL注射器抽取腹水,用生理盐水将腹水稀释3~5倍后注入第2代小鼠腹腔内,7~8 d后可再次传代。3代以后腹水细胞可用于皮下瘤种植。

1.3.2 小鼠皮下瘤种植

取小鼠腹水细胞(H22细胞),用生理盐水调整其浓度为 1×10^6 个/mL后,在小鼠右前肢皮下远端进针,皮下注射0.2 mL。待肿瘤长至1 cm左右(7~10 d),可进行小鼠肝脏原位移植瘤种植。

1.3.3 小鼠原位移植瘤种植

将小鼠皮下瘤取出,彻底清除瘤体周围组织后切成约2 mm立方体备用(须在2 h内用完)。用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg小鼠体重)小鼠,腹部备皮后消毒,采用肝内隧道植入法^[4]将肿瘤植入肝内。缝合术后,术后处涂抹金霉素眼膏,预防感染。

1.3.4 小鼠原位瘤切除

原位移植瘤种植10 d后,沿原切口进腹,切除荷瘤的肝左外叶,止血,关腹,伤口处涂金霉素眼膏,预防感染。术后注意保温,补液,预防小鼠死亡。

1.4 脾淋巴细胞因子检测

脾淋巴细胞因子检测详细步骤见文献[8]。

1.4.1 小鼠脾淋巴细胞悬液制备

颈椎脱臼处死小鼠,75%乙醇消毒后,超净台中取出小鼠脾,除去周围无关组织,并用RPMI1640冲洗2次。后将小鼠脾研磨成脾细胞悬液并静置5 min。取2 mL悬液以1 500 r/min离心5 min后去上清,缓慢滴入淋巴细胞裂解液(1×3 mL,反应1 min后加1 mL PBS终止反应,混匀。

再以1 500 r/min离心5 min, 去上清后加入4 mL RPMI1640洗涤1次。再次以1 500 r/min离心10 min。弃上清, 加入PBS缓冲液。

1.4.2 ELISA 检测小鼠脾淋巴细胞细胞因子分泌水平

室温下, 首先用300 μ L洗液洗板2次, 期间静置浸泡10~15 s。弃掉洗液后, 微孔板必须用吸水纸吸干。洗板完成后, 立即在每孔加入50 μ L检测缓冲液, 再加入50 μ L标准品、样品和对照品。加样过程中, 应保证连续, 并在15 min内完成。用封板膜封好微孔板, 后以100 r/min振荡, 室温(18~22 $^{\circ}$ C)下孵育2 h。弃掉液体, 每孔加入300 μ L洗液洗板, 洗涤6次。洗板后应使用吸水纸彻底移除残留液体。每孔加入100 μ L检测抗体后使用新的封板膜封板, 100 r/min振荡, 室温孵育2 h。再弃掉微孔板液体, 每孔加入300 μ L洗液, 洗板6次。之后每孔加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 再用新的封板膜封板, 100 r/min振荡, 室温孵育45 min。弃掉液体, 每孔加入300 μ L洗液洗板6次。每孔加入100 μ L显色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB), 避光, 室温孵育10~30 min后加入100 μ L终止液, 颜色由蓝色变

为黄色。若颜色呈绿色或者颜色明显不均匀, 轻叩板框, 充分混匀。30 min内, 用酶标仪在450 nm波长测定光密度(OD)值。

1.5 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。Levene's检验以检验方差齐性; 数据采用单因素方差分析; 多个样本均数的多重比较采用LSD-*t*检验和Dunnnett-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

正常小鼠组IL-6和TNF- γ 水平明显低于术后对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$)。IL-10在前期运动组小鼠中分泌水平明显高于术后对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与术后对照组相比, 后期运动组除IL-4, IL-6和INF- γ 外, 其余各项差异均有统计学意义($P<0.05$)。与术后对照组相比, 全程运动组除IL-4和INF- γ 外, 其余各项差异均有统计学意义($P<0.05$; 图1~4, 表1)。

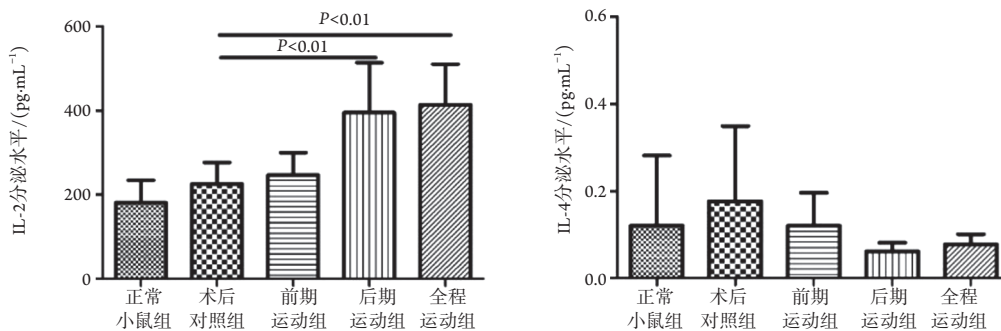


图1 不同运动干预节点对小鼠IL-2, IL-4分泌水平的影响

Figure 1 Effect of exercise at different time on the secretion levels of IL-2 and IL-4

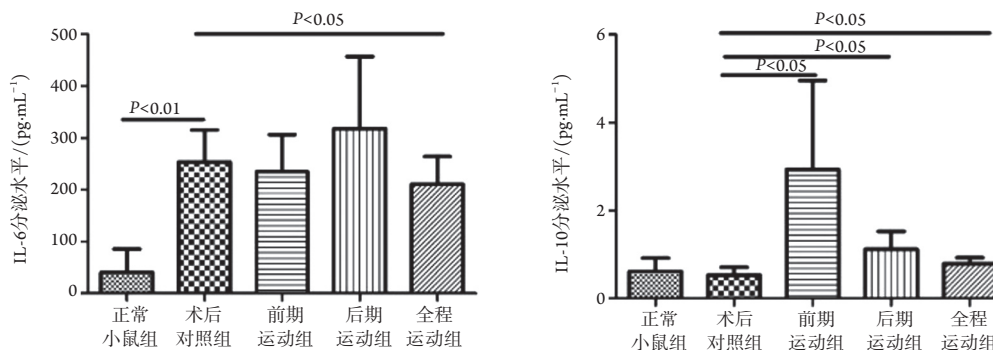
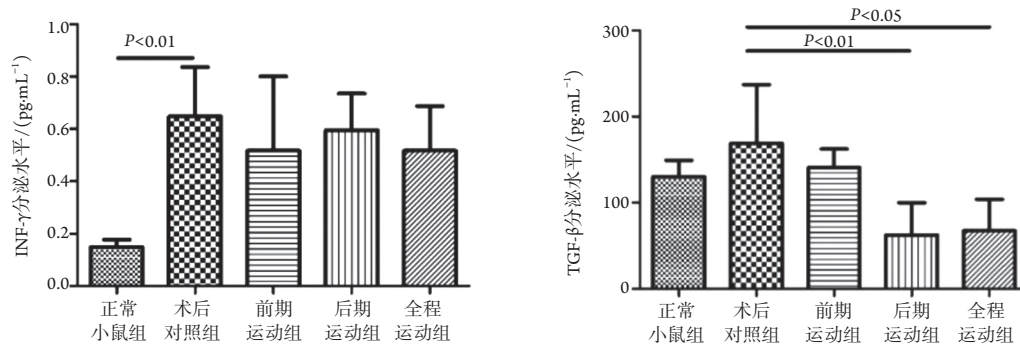
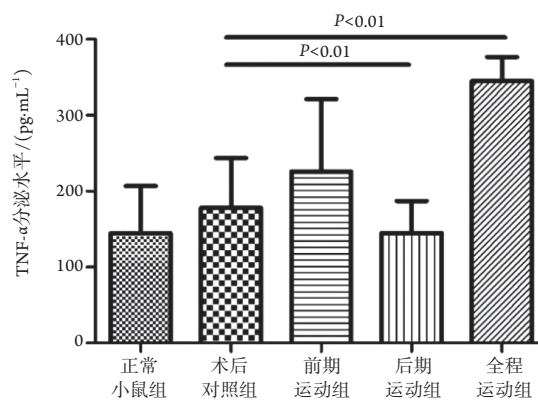


图2 不同运动干预节点对小鼠IL-6, IL-10分泌水平的影响

Figure 2 Effect of exercise at different time on the secretion levels of IL-6 and IL-10

图3 不同运动干预节点对小鼠INF- γ , TGF- β 分泌水平的影响Figure 3 Effect of exercise at different time on the secretion levels of INF- γ and TGF- β 图4 不同运动干预节点对小鼠TNF- α 分泌水平的影响Figure 4 Effect of exercise at different time on the secretion level of TNF- α 表1 不同运动干预节点小鼠脾淋巴细胞因子的分泌水平($n=8$)Table 1 Secretion levels of spleen lymphocyte factor at different time of exercise ($n=8$)

组别	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)
正常小鼠组	180.8 ± 53.32	0.1200 ± 1.1614	40.5 ± 45.03	0.6134 ± 0.3019
术后对照组	225.0 ± 51.24	0.1765 ± 0.1727	253.4 ± 61.78	0.5260 ± 0.1819
前期运动组	246.1 ± 53.71	0.1203 ± 0.07551	234.9 ± 71.41	2.932 ± 2.024
后期运动组	394.7 ± 119.1	0.06125 ± 0.02003	318.3 ± 138.6	1.116 ± 0.4051
全程运动组	413.8 ± 96.40	0.07725 ± 0.02354	210.7 ± 53.23	0.7875 ± 0.1386

组别	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	TGF- β /(pg·mL ⁻¹)
正常小鼠组	0.1486 ± 0.02833	144.6 ± 62.13	130.1 ± 19.05
术后对照组	0.6480 ± 0.1882	178.3 ± 65.57	168.9 ± 68.22
前期运动组	0.5170 ± 0.2845	225.8 ± 95.23	140.7 ± 21.73
后期运动组	0.5958 ± 0.1398	145.3 ± 41.95	62.61 ± 37.25
全程运动组	0.5168 ± 0.1699	345.2 ± 31.47	67.34 ± 36.50

3 讨论

肝癌起病隐匿, 早期多无典型的症状和体征, 患者确诊时, 肿瘤多已属晚期。但随诊疗技术的进步、外科手术水平的提高及人们健康意识的提升, 越来越多的肝癌患者能早期诊断, 病符合手术指标, 从而使肝癌切除术的成功率大幅度增加^[9]。但据统计, 肝癌术后5年的复发率仍高达60%^[10]。肿瘤患者手术后存在免疫抑制期, 而这可能会为仍存留于身体内部的肿瘤细胞留下可乘之机。研究^[11]表明: 中小强度运动能引起免疫细胞数目增多, 使患者机体免疫功能增强。

本研究中所使用的模型中的肝癌株, 其形态特征和病理表现与人肝细胞癌相似。因此本研究使用本肝癌株造肝原位移植瘤模型以较好模拟人类肝癌的发展。已有研究^[12]表明: 肝原位移植瘤切除术会对术后小鼠造成应激损伤, 产生免疫抑制。那么运动是否对肝原位移植瘤切除术后小鼠的免疫功能恢复产生积极作用? 本研究从脾淋巴细胞分泌因子角度入手, 通过肝原位移植瘤模型^[13], 对其施以手术切除, 并予运动干预, 以观察脾淋巴细胞分泌因子水平的变化。

免疫细胞因子是指主要由免疫细胞合成、分泌的具有生物活性的低分子质量蛋白质或多肽的统称。Th细胞可分为Th1细胞和Th2细胞2个亚群, 辅助T细胞参与细胞免疫的IL-2, IFN- γ , TNF- α 等细胞因子主要由Th1细胞亚群分泌, 介导体液免疫的细胞因子如IL-4, IL-6, IL-10等细胞因子由Th2细胞亚群分泌^[14]。

本研究结果显示, 正常小鼠组IL-6和TNF- γ 明显低于术后对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); IL-2, IL-4, TGF- β , TNF- α 均较术后对照组低, 说明手术对肝原位移植瘤切除术后小鼠产生影响, 并破坏Th细胞2个亚群所分泌的细胞因子的平衡, 产生免疫紊乱, 这一结果与本研究之前研究结果相符^[8]。人体中IL-2可使胸腺细胞和T细胞进入S期, 促进细胞增殖^[15]。IL-6则是一种公认的、比较敏感的评价组织损伤的标志物^[16]。IL-10可上调体液免疫, 促进B淋巴细胞的增殖、成熟及抗体的分泌^[17]。TNF- α 具有广泛的生物学活性, 在机体免疫调节、抗感染等方面发挥重要作用^[18]。TGF- β 的生物学功能研究主要集中在炎症、组织修复和胚胎发育等方面, 其能抑制免疫活性细胞增殖和淋巴细胞分化, 抑制细胞因子产生^[19]。全程运动组IL-2, IL-10, TNF- α 均高于对照组, IL-6, TGF- β 均低于对照组, 差异有统计学意义。本研

究中, 全程运动组IL-2, IL-10, TNF- α 均高于对照组, IL-6, TGF- β 均低于对照组, 差异有统计学意义, 表明全程运动组小鼠免疫功能较术后对照组改善, 组织损伤恢复好于术后对照组小鼠。根据脾淋巴细胞分泌因子水平测定结果, 前期运动组和后期运动组小鼠, 其术后免疫功能较术后对照组小鼠也有相应改善, 其中后期运动组IL-2, IL-10高于对照组, IL-7, TGF- β , TNF- α 低于对照组, 差异有统计学意义。前期运动组IL-10高于对照组, 差异有统计学意义。

综上所述, 肝原位移植瘤切除术对小鼠造成应激损伤, 影响脾淋巴细胞分泌因子水平, 引起免疫抑制。而运动有助于小鼠术后免疫功能恢复, 全程运动效果更佳。但运动促进小鼠免疫功能恢复的相关机制有待后续研究进一步明确。

参考文献

1. 吕桂帅, 陈磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景[J]. 生命科学, 2015, 27(3): 237-248.
LÜ Guishuai, CHEN Lei, WANG Hongyang. Current situation and prospect of liver cancer research in China[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2015, 27(3): 237-248.
2. Ling CQ, Yue XQ, Ling C. Three advantages of using traditional Chinese medicine to prevent and treat tumor[J]. J Integr Med, 2014, 12(4): 331-335.
3. 王学松, 张庆, 于德升, 等. 原发性肝癌术后行肝动脉化疗栓塞治疗肿瘤复发的多因素分析[J]. 中国现代普通外科进展, 2012, 15(9): 746-748.
WANG Xuesong, ZHANG Qing, YU Desheng, et al. Multivariate analysis of hepatic arterial chemoembolization in the treatment of tumor recurrence after primary liver cancer surgery[J]. Chinese Journal of Current Advances in General Surgery, 2012, 15(9): 746-748.
4. 覃英容, 林源, 莫显伟, 等. 原发性肝癌患者术后细胞免疫功能状况与复发的相关性[J]. 中国癌症防治杂志, 2013, 5(3): 235-238.
QIN Yingrong, LIN Yuan, MO Xianwei, et al. Correlation of postoperative cellular immune function and recurrence in primary liver cancer[J]. Journal of Chinese Medical Abstracts-Oncology, 2013, 5(3): 235-238.
5. Ahmadinejad Z, Alijani N, Mansori S, et al. Common sports-related infections: a review on clinical pictures, management and time to return to sports[J]. Asian J Sports Med, 2014, 5(1): 1-9.
6. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, et al. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures[J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979,

- 47(6): 1278-1283.
7. 韩梦飞. 有氧运动联合四君子汤对肝癌小鼠术后免疫功能影响的实验研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2017.
HAN Mengfei. Experimental study on the effect of aerobic exercise combined with Sijunzi decoction on postoperative immune function of hepatoma mice[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2017.
 8. 赵彤. 运动对肝癌切除术后小鼠淋巴细胞增殖及免疫相关通路的影响[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
ZHAO Tong. Influence of hepatectomy on general state and immune function of mice[D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2016.
 9. 郭永章. 原发性肝癌的诊断与治疗研究进展[J]. 昆明医科大学学报, 2011, 32(7): 1-5.
GUO Yongzhang. Progress in diagnosis and treatment of primary hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Kunming Medical University, 2011, 32(7): 1-5.
 10. 范高祥, 王洪林. 原发性肝癌术后复发转移的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(13): 1630-1631.
FAN Gaoxiang, WANG Honglin. Progress in the study of postoperative recurrence and metastasis of primary liver cancer[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2012, 9(13): 1630-1631.
 11. 邓艺华, 吴卫兵, 刘晓丹. 运动对免疫功能的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(1): 48-49.
DENG Yihua, WU Weibing, LIU Xiaodan. Effects of exercise on immune function[J]. Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice, 2004, 10(1): 48-49.
 12. 赵彤, 吕灿, 韩梦飞, 等. 肝原位瘤切除术对小鼠一般状态和免疫功能的影响[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(6): 883-886.
ZHAO Tong, LÜ Can, HAN Mengfei, et al. Influence of hepatectomy on general state and immune function of mice[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2016, 20(6): 883-886.
 13. 韩克起, 顾伟, 胡侠, 等. 小鼠肝癌原位移植模型的建立及生物学特性[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(5): 372-374.
HAN Keqi, GU Wei, HU Xia, et al. Establishment and biological characteristics of orthotopic transplantation model of liver cancer in mice[J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2004, 2(5): 372-374.
 14. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, et al. Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training[J]. Int J Sports Med, 2000, 21(1): 21-24.
 15. Tilley JW, Chen L, Fry DC, et al. Identification of a small molecule inhibitor of the IL-2/IL-2R α receptor interaction which binds to IL-2[J]. J Am Chem Soc, 1997, 119(32): 7589-7590.
 16. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease[J]. Nat Immunol, 2015, 16(5): 448-457.
 17. Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, et al. Pillars article: induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells[J]. J Immunol, 2016, 197(5): 1547-1555.
 18. De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, et al. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth[J]. Oncogene, 2015, 34(27): 3493-3503.
 19. Massagué J. TGF-beta signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 753-791.

本文引用: 陈泉, 赵彤, 万嫣, 苏羚子, 黄晓蒂, 李柏. 运动对肝原位移植瘤切除术后小鼠脾淋巴细胞分泌因子的影响[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(4): 712-717. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.005

Cite this article as: CHEN Quan, ZHAO Tong, WAN Yan, SU Lingzi, HUANG Xiaodi, LI Bai. Effect of exercise on spleen lymphocyte secretory factor after orthotopic liver transplantation tumor resection in mice[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(4): 712-717. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.04.005