广东药学院

硕士研究生学位论文

|  |  |
| --- | --- |
| 题目： | **LFA-1 的缺失对肿瘤肺转移的作**  **用研究** |

姓 名： 叶 宇 翔

学 号： 2111243019

院 系： 基础学院 专 业： 病理学与病理生理学导师姓名： 王丽京（教授）

二○一五 年 四 月

**分类号： 密级:**

**UDC:**

LFA-1 的缺失对肿瘤肺转移的作用研究

LFA-1 deficiency affected the tumor metastasis of lung

姓 名： 叶 宇 翔

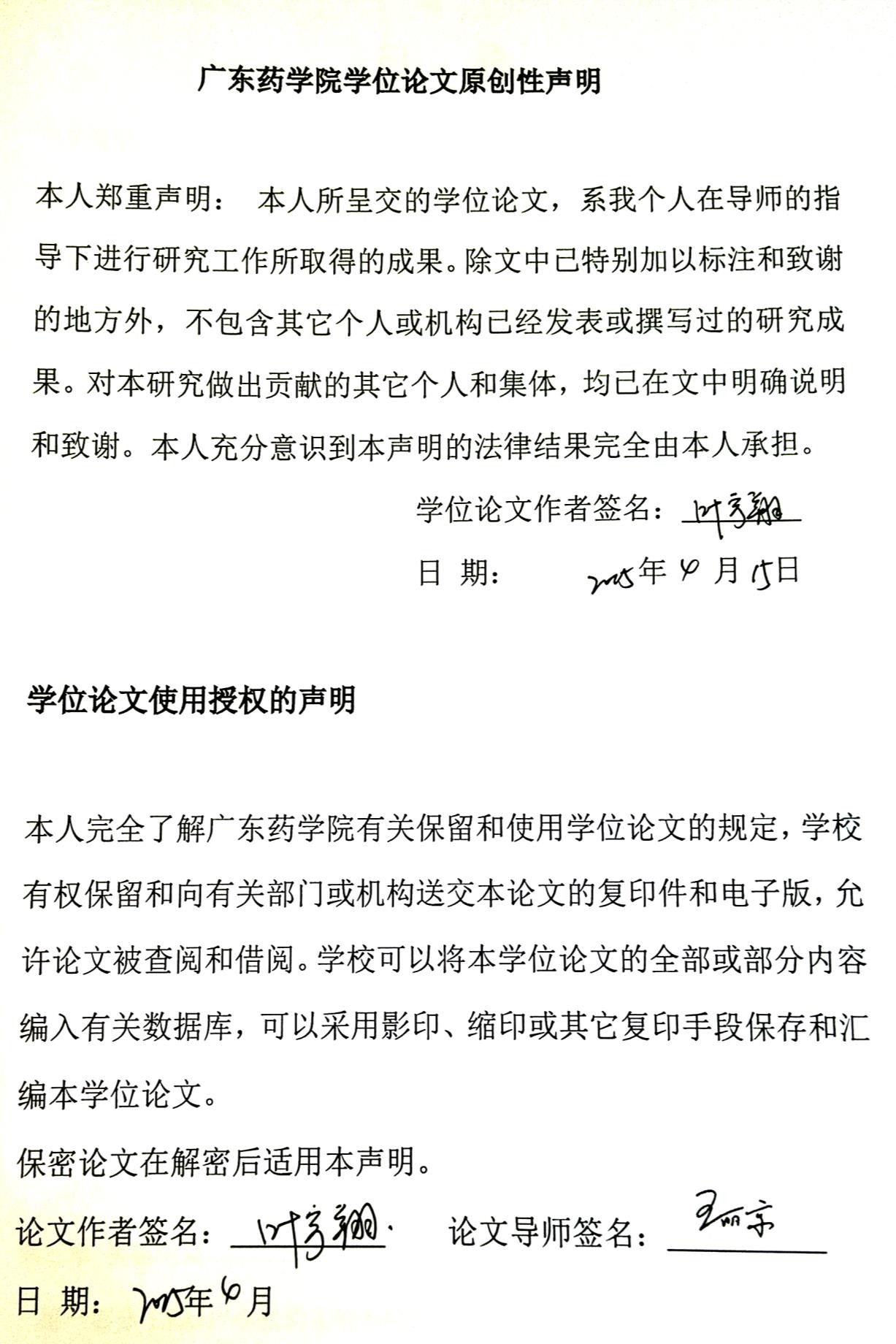
学 号： 2111243019

院 系： 基础学院 专 业： 病理学与病理生理学研究方向： 肿瘤分子病理学导师姓名： 王丽京（教授） 论文提交日期： 2015-03-20

论文答辩日期： 2015-04-30

学位授予单位： 广东药学院

二○一五 年 四 月



**中文摘要**

肿瘤的侵袭和转移的过程一直困扰着科学家们，肿瘤通过血道进入肺部，形成肺部的肿瘤转移过程，一直是研究的热点。LFA-1是表达在白细胞上的整合素家族的一员，它对于白细胞粘附血管内皮和抗原递呈细胞起着关键性的作用。研究发现白细胞上的LFA-1和肿瘤靶细胞的ICAM-1的结合，细胞毒淋巴细胞将可以粘附在肿瘤靶细胞上进行杀伤，监视肿瘤的发生发展。但是未有报道，肿瘤细胞在转移至肺部的过程中LFA-1的缺失了会造成怎样的结果。为了研究LFA-1基因的缺失会怎样影响肿瘤的发生发展，利用敲除LFA-1 基因小鼠作为实验组，用

C57背景鼠作为对照组。

探究在生理条件下实验组和对照组小鼠的血常规，其中实验组的淋巴细胞的数目上调了3倍，中性粒细胞有上调的趋势。镜下探究它们肺部组织结构，实验组的肺间隔减小且CD45RO蛋白标记的白细胞表达显著性的上调。提示我们，白细胞数目的改变和肺部组织结构的改变可能够影响肿瘤的生长和转移。

为此，采用B16F10小鼠黑色素瘤细胞系，构建经典的小鼠尾静脉注射肿瘤细胞，20天后得到肿瘤在肺部转移的荷瘤疾病模型。结果显示，实验组小鼠的肺部肿瘤结节数目增多，同时其生存率也显著性下降。观察荷瘤后肿瘤转移的病理进程，第5和第10天的两组小鼠的肺部肿瘤的数目和大小，在大体观察和镜下观察的结果都没有出现显著性的差异；第15天时，实验组小鼠的肺部在大体下观察肺部肿瘤结节数目显著性的增多，且肿瘤体积增大；镜下观察，肿瘤细胞恶性程度高，出现了侵袭的现象。检测肺部组织的免疫组化Ki67增殖蛋白的结果，实验组的肿瘤细胞在每个进程点上增殖比率都显著性的上调。在荷瘤进程的第15 天时，实验组肿瘤中 CD31 血管标记物和 CD68 巨噬细胞标记蛋白都显著性的高表达；同时观察肿瘤中侵润相关的MMP2蛋白和MMP9蛋白的免疫组化染色都显著性的上调。结合实验结果和LFA-1在白细胞上的表达提示我们，可能实验组小鼠是改变了肿瘤免疫应答和肺部组织的肿瘤微环境造成的肿瘤转移的进程加快。

因此，探究在荷瘤的第15天时小鼠的血液、脾脏和肺部肿瘤中免疫细胞的

结果：实验组小鼠的脾脏中F4/80+的细胞比率显著性的上调；肿瘤组织中CD8+T细胞的比率有显著性的下降趋势；同时肿瘤部位里分泌蛋白 IL-17A 和 IFN-γ 的表达有显著性的上调；提示实验组小鼠的免疫的监视和杀伤的下降使得肿瘤进程在实验组中加快。研究肺部肿瘤微环境时，IL-2、IL-10、IL-12、IL-1β和TGF-β等炎症因子mRNA的表达都显著性的上调；其中，IL-1β 上调 30 多倍最为显著，提示我们可能是主要影响因子。检测得到实验组的血清中IL-1β显著性的上调了

2倍；能够促进肿瘤克隆形成和贴壁能力的增强。检测得到IL-1β 蛋白能促进小鼠黑色素瘤细胞的侵袭和迁移，加入了 anti-IL-1β 蛋白后，逆转了这一结果。依据文献，IL-1β通过上调了肿瘤细胞的p-p38和p-cjun的上调也得到了证实。

本文以研究缺失LFA-1基因小鼠和肿瘤细胞尾静脉注射肺部转移模型为研究体系。阐明了生理条件下，缺失LFA-1基因后的小鼠会造成肺部白细胞的数目增多；荷瘤小鼠的脾脏的IL-17A同INF-γ的上调；肿瘤部位的CD8+T细胞下调；缺失LFA-1基因会造成小鼠肺部微环境中IL-1β的高表达，且上调肿瘤细胞的p-p38和p-cjun的表达，促进了肿瘤的增殖、侵袭和转移。

关键词： LFA-1 敲除； 黑色素瘤； 肿瘤肺转移； IL-1β

Abstract

The process of tumor invasion and metastasis has been plagued by scientists, the tumor through the blood into the lungs, lung metastasis formation process, has been the focus of research. LFA-1 is a member of integrin family expression in leukocytes in the leukocyte adhesion, vascular endothelial cells and antigen presenting cells play a key role. The study found that the combination of white cells of LFA-1 and ICAM-1 in the tumor cells, cytotoxic lymphocytes can kill tumor cells adhesion in the occurrence and development of tumor, monitoring. But no report, LFA-1 tumor cells in the process of metastasis to the lungs in the missing will cause what kind of results. In order to study the deletion of LFA-1 gene will affect the occurrence and development of tumor, LFA-1 gene knockout mice were used as experimental group, with the background of C57 rats as control group.

Research in the experimental group and the control group of mice under physiological conditions the blood routine test, in which the number of the experimental group increased by 3 times of lymphocytes, neutrophils increased trend. Research on their lung tissue under the microscope, the pulmonary septal expression in the experimental group decreased and CD45RO protein labeled white blood cells increased significantly. We suggest that the change in the number of white blood cells, and lung tissue structure changes can affect the growth and metastasis of tumor.

Therefore, using the B16F10 mouse melanoma cell line, build the tail vein injection of tumor cells after 20 days of classic, get the tumor in the lung metastasis of tumor disease model. The results showed that, the number of lung metastases were the experimental groups were increased, and the survival rate was also significantly decreased. To observe the pathological process of tumor metastasis of tumor bearing, the number and size of two groups were fifth and tenth days of lung tumor, the gross observation and microscopic observation results showed no significant differences; the fifteenth day, the mice of the experimental group increased the number of lung

Pulmonary tumor nodules were observed in the general conditions, and tumor volume increased; under the microscope, the malignant degree of tumor cell invasion, appeared the phenomenon. Immunohistochemical detection of Ki67 protein in lung tissue of the proliferation of the experimental group, the proliferation of tumor cells in each process point ratios are significantly up-regulated. On the fifteenth day of tumor process, the experimental group CD31 in tumor markers of angiogenesis and CD68 protein were significantly high expression of macrophage markers of immune; group while observing the tumor invasion related MMP2 and MMP9 protein were significantly up-regulated. According to the experimental results and the expression of LFA-1 in white blood cells suggests that we may, in the experimental group is the change of the tumor immune response and lung tissue of the tumor microenvironment by speeding up the process of tumor metastasis.

Therefore, to explore the immune cells in mice blood, spleen and lung cancer results in fifteenth days of tumor bearing F4/80+ mice of the experimental group: in the spleen cell ratio was significantly increased; the ratio of CD8+T cells in tumor tissue decreased significantly; at the same time, in the tumor expression of secreted protein IL-17A and IFN- y significant increase showed that the experimental group mice; immune surveillance and destruction has accelerated the process of tumor decreased in the experimental group. Research of lung tumor micro environment, the expression of IL-2, IL-10, IL-12, IL-1, TGF- beta and beta inflammatory factors such as mRNA are significantly up-regulated; among them, IL-1 beta increased more than 30 times the most significant, suggesting that we may be the main influence factor. Detection of serum in experimental group IL-1 beta was raised 2 times; enhancement can promote tumor colony formation and adherent ability. Detection of IL-1 beta protein can promote the migration and invasion of melanoma cells, joined the anti-IL-1 beta protein, reverse the results. According to the literature, IL-1 beta by up regulating the expression of tumor cell p-p38 and the up regulation of p-cjun has been confirmed.

In order to study the deletion of the LFA-1 gene in mice and tumor cells by tail

Vein injection of lung metastasis model of system. To clarify the physiological

Conditions, LFA-1 gene deletion in mice can cause lung after the number of white blood cells increased; the spleen of tumor bearing mice IL-17A and INF- gamma increases; the tumor CD8+T cells down regulated expression of LFA-1 gene deletion; will cause the lungs of mice in the micro environment of IL-1 beta, and up regulation of tumor cell p-p38 and the expression of p-cjun, and promote tumor cell proliferation, invasion and metastasis.

Keywords: tumor lung metastasis; LFA-1 knockout; Melanoma; IL-1β

# 第一章 前 言

有医学历史记载以来，人类遭受了暴力、死亡事故和一系列可怕的传染病。

1900年，全球死亡的主要原因是肺炎、流感和肺结核。一个世纪之后，取代死亡的爪牙是心脏病和癌症。其中癌症的特点是不受控制的细胞的增长。2012年，全世界15%的死亡是由于癌症，这是一个可怕的数值。而且这个死亡人数在未来几乎会上升，癌症和肿瘤是现代医学攻克的难题和要点[1]。癌症是恶性肿瘤，原位肿瘤在临床上的治疗，多采用化学治疗[2-4]，放射治疗[5-7]和手术治疗[8-10]，来控制肿瘤的发生发展，治疗病患。但是癌症并不是只会在原位发生，会通过侵袭和转移到身体内其他器官，发生肿瘤的接种和发展，形成新的癌巢[11, 12]。难以对抗的癌症中的转移，是需要我们多加细心研究的。现在很多因素都被发现能够促进肿瘤的发生和转移。[13-18]对于这种不利于病患的因素是需要我们提高警惕的，所以将肿瘤转移放在本论文中好好的探究。

黑色素瘤是一种恶性肿瘤，为起源于黑素细胞的恶性肿瘤，多发生于皮肤，其发病占皮肤恶性肿瘤的第三位。但是不同地区的黑色素瘤的发病率差异也很不同，发病率高的地区，如澳大利亚和美国等，其中是以白种人为主要患病[19]。目前对于黑色素瘤的病因和机制尚不完全清楚，提出了很多假说，大多观点认为的发生黑色素瘤与以下因素有关系：遗传变异、慢性炎症刺激、病毒感染、致癌物质刺激、紫外线照射、免疫失调等。目前对于这种恶性的黑色素瘤转移的研究并不够明确，所以研究黑色素瘤的转移的机制十分重要，需要研究肿瘤的在转移过程中的发生发展过程，寻找基因和分子的治疗靶点，为新药的开发提供支持。

对于肿瘤的发生发展和其侵袭和转移，机体会有免疫机制来监视的，但是肿瘤能够分泌一些细胞因子，如TGF-β，能够帮助肿瘤逃脱免疫监控，失去机体对肿瘤发生发展的抑制，导致肿瘤的恶性程度的机率变高[20-22]。免疫应答研究中，TGF-β可为胸腺T细胞发育的关键调节作用，以及耐受对自身抗原和T细胞的分化和外周T细胞稳态的关键因素[22]。肿瘤的发生是由某些原癌基因激活，并且多发激活，它是高度依赖于宿主的免疫细胞。特别是，CD4（+）辅助性T细胞，由MYC或BCR-ABL的灭活所致机制“癌基因撤出。”因此，免疫介导的多种方式的发病机制，来预防和治疗癌症，包括肿瘤发生，侵袭和转移，以及免疫系统的监

测的机制，提高对癌症免疫机制的理解，有助于癌基因的失活来介导的肿瘤控制和消减[23]。

[我们将机体对肿瘤](http://baike.baidu.com/view/10179.htm)非特异性免疫，和特异性免疫的总和称为肿瘤免疫。一般来说，[肿瘤](http://baike.baidu.com/view/10179.htm)被认为是机体正常的细胞恶变后得到产物。它的特点是，不断地增殖并可以在体内发生转移。因此，肿瘤细胞和免疫学结合来研究，这样研究的特点是，出现某些同类正常的细胞中不能被发现的新的一些[抗原](http://baike.baidu.com/view/20489.htm)标志或者是Marker。现在已发现的[肿瘤抗原](http://baike.baidu.com/view/1011983.htm)，包括[肿瘤特异性的抗原](http://baike.baidu.com/view/3848424.htm)和[肿瘤相关的抗原](http://baike.baidu.com/view/1306420.htm)。[肿瘤特异性的抗原](http://baike.baidu.com/view/3848424.htm)是肿瘤细胞所独特的；[肿瘤相关的抗原](http://baike.baidu.com/view/1306420.htm)是指[胚胎](http://baike.baidu.com/view/32848.htm)性的[抗原](http://baike.baidu.com/view/20489.htm)，为胚胎组织与肿瘤组织所共有的抗原，这些[抗原](http://baike.baidu.com/view/20489.htm)在[胚胎](http://baike.baidu.com/view/32848.htm)时期产生，但随着出生后渐趋地消失，可是在细胞恶变的过程中又被重新地合成，因而肿瘤相关抗原及[胚胎抗原](http://baike.baidu.com/view/2153161.htm)实际上是一种类似“返祖[抗原](http://baike.baidu.com/view/20489.htm)”。由于存在的[肿瘤抗原](http://baike.baidu.com/view/1011983.htm)，一定能够被机体免疫系统给识别，从而激发了特异性的免疫反应，包括，细胞免疫和体液免疫。在细胞免疫这方面来讨论，激活的T[淋巴细胞](http://baike.baidu.com/view/158618.htm)，NK细胞（[自然杀伤细胞](http://baike.baidu.com/view/38836.htm)）和巨噬细胞对[肿瘤细胞](http://baike.baidu.com/view/2921695.htm)均具监视和一定的杀伤作用。[肿瘤](http://baike.baidu.com/view/10179.htm)的体液免疫方面，主要是产生的抗肿瘤抗体对[肿瘤细胞](http://baike.baidu.com/view/2921695.htm)产生破坏效应。一般机体在正常的情况下，机体是需要依赖完整的免疫机制，来有效地监视和杀伤癌变的细胞，因此绝大多数的个体不会出现[肿瘤](http://baike.baidu.com/view/10179.htm)。若某些癌变的细胞在某些特定的条件下，逃避免疫的监视和杀伤，而持续地增殖到一定的程度时，[肿瘤](http://baike.baidu.com/view/10179.htm)的发生就不可被避免了。所以应用[肿瘤抗原](http://baike.baidu.com/view/1011983.htm)的发现，有助于肿瘤的免疫学诊断，某些诊断已成为[癌症早期诊断](http://baike.baidu.com/view/8799198.htm)的标志。[24-29]

在研究肿瘤免疫学的过程中，有科学家提出了，“免疫编辑理论”，认为免疫系统和肿瘤的相互作用经历了三个阶段：1）免疫监视阶段，免疫系统对早期肿瘤进行有效的攻击；2）免疫相持阶段，表现为免疫系统对肿瘤的杀伤和肿瘤生长处于的动态平衡；3）免疫逃逸阶段，表现为肿瘤借助不同的机制（包括抑制宿主免疫功能）逃逸机体免疫系统的攻击。这一理论揭示了，在肿瘤发生，发展的不同阶段，肿瘤与机体免疫系统存在复杂，各异的相互联系。[30-32]这一理论和现实生活中的“毛泽东思想”及其相似，在抗日战争时期我们人民利用，毛主席提出的《论持久战》，和侵华日军，保持着互相的监视，到相互的相持阶段，再到战胜他们，迫使他们逃逸。

机体抗肿瘤的免疫效应：分为：固有，免疫效应和特异性免疫效应。

抗肿瘤固有免疫效应分为：1）NK细胞介导的抗肿瘤效应，NK细胞无需抗原致敏即可直接杀伤敏感的肿瘤细胞，且不受MHC限制。NK细胞在抗新生肿瘤、已形成肿瘤及转移瘤中均发挥重要的作用，在机体抗肿瘤的第一道防线。2）巨噬细胞介导的抗肿瘤效应，巨噬细胞作为一类重要的固有免疫细胞可能在肿瘤早期阶段发挥重要的抗肿瘤效应。3）γδT细胞介导的抗肿瘤效应。4）NKT细胞介导的抗肿瘤效应，肿瘤细胞或者APC将肿瘤的抗原递呈给NKT细胞，活化的

NKT细胞通过某途径杀伤肿瘤细胞。5）中性粒细胞介导的抗肿瘤效应，肿瘤组织周围可见大量的中性粒细胞聚集和浸润。释放某些特定细胞因子来杀伤肿瘤细胞。

抗肿瘤特异性免疫效应分为：1）T细胞介导的抗肿瘤效应，CD4+T细胞介导的抗肿瘤效应；CD8+T细胞介导的抗肿瘤效应，CD8+T细胞可被激活为CTL杀伤性毒细胞。2）B细胞介导的抗肿瘤效应，在APC参与和CD4+Th细胞辅助下，B细胞对肿瘤分泌的可溶性抗原或肿瘤细胞膜抗原产生应答，并分泌抗肿瘤抗体。

机体中肿瘤的免疫逃逸，肿瘤可诱导机体产生免疫耐受，从而抵抗抗肿瘤的免疫效应，并导致肿瘤免疫逃逸。首先，肿瘤相关的抑制分子，1）抑制性细胞因子，肿瘤细胞和肿瘤基质细胞可分泌具有免疫抑制作用的细胞因子。2）抑制性膜分子，肿瘤细胞表面可表达某些抑制性表面分子。3）其它的小分子抑制物。其次，肿瘤相关的抑制性细胞：1）调节性T细胞（Treg），肿瘤灶侵袭大量的Treg，从而显示强的免疫抑制作用。2）髓性前提抑制细胞（MDSC）MDSC受到趋化因子的诱导而聚集于肿瘤组织，可明显抑制T细胞的活化和功能。3）肿瘤相关的巨噬细胞（TAM），激活的巨噬细胞可发挥杀伤肿瘤的效应，但是侵袭于肿瘤灶的巨噬细胞经肿瘤细胞的“教育”后，丧失其杀肿瘤作用，反而产生促进肿瘤的效应。再次，抑制抗肿瘤效应细胞：1）抑制NK细胞杀伤活性，肿瘤细胞通过各种途径来抑制NK细胞的杀伤。2）抑制T细胞激活和功能，随着肿瘤的发展，T细胞分化、激活和功能被抑制。最后，肿瘤细胞可以直接逃逸免疫的监视：1）肿瘤细胞缺乏激发免疫应答所必需的成分。2）肿瘤细胞的逃逸。3）肿瘤抗原诱导免疫耐受。4）肿瘤细胞诱导免疫细胞凋亡或自身抵抗凋亡。5）肿瘤细胞直接抑制或者利用机体免疫缺陷产生抑制作用。[33-39]

募集和应用的T淋巴细胞进入淋巴结，感染或炎症与限定的特异性位点，是一种非常重要的有效的免疫应答的启动和维护。这种复杂和精确调节的T细胞的运输的过程是由一组粘附受体，它们能够形成错综复杂的高度集成的阵列的一种分子网络，以及一个能控制在组织的时间和空间内的途径一系列信号。相关的越来越多的分子信号单个独立的过程在相互协调下有助于T细胞的活化，迁移和效应等功能。这一过程中，细胞的表面受体的整合素家族起着关键作用。特别是，淋巴细胞功能相关抗原-1（LFA-1，也被称为αLβ2整合素），它和T细胞的粘附，极化，外渗和迁移信号转导过程十分重要。[40-43]

Lymphocyte function-associated antigen 1（淋巴细胞功能相关抗原1），也被称为LFA-1，是被发现在所有的T细胞，B细胞，巨噬细胞中性粒细胞上表达的，参与白细胞的招募，可到达感染部位。它结合于抗原呈递细胞上的ICAM-1作为粘附分子。LFA-1是第一和抗原呈递细胞（APC）结合的T细胞分子，最初结合比较弱。从激活T细胞受体和细胞因子受体的信号的构象变化，延长它们接触，从而使T细胞产生增殖。LFA-1 / ICAM-1的相互作用已经被证明是T细胞和T细胞的之间的重要的相互作用，是导致进一步的T细胞分化，激活的信号途径。[44-50]

主要的跨膜蛋白LFA-1，通常表示在T细胞表面非活性的构象和不能有效地粘附于内皮的形态。LFA-1的无活性形式对于T细胞是特别重要的，允许白细胞自由流通，通过血液与血管壁的相互作用是最小的。LFA-1可以进行快速转换从非活动状态，到其固有的亲和力为配体增加增量，细胞信号事件的增多也受其亲和力的影响，横向流动或聚集在细胞表面。活化的LFA-1识别和结合ICAM-1. ICAM-1与它的配体LFA-1受体，激活的粘合剂的相互作用：T细胞向炎症组织或次级淋巴器官通过一系列的滚动，捕获，牢固粘附和迁移从而引发免疫反应，并使得白细胞渗出。T细胞的迁移，特别受LFA-1/ICAM-1互动作用影响，它通过产生胞内信号，导致细胞骨架重塑，达到细胞运动的必要条件，从而有利于T细胞的运动过程。[51-53]

LFA-1的动态生化信号并通过双向信号传输：分子的信息，不仅从细胞外刺激诱导的细胞内信息流的变化（外部信号）；而且从细胞内的刺激也能引起细胞外的变化（内部信号）。由内而外的信号，如通过细胞因子和趋化因子来刺激，

受到刺激抗原的TCR激活细胞表面受体，可以启动细胞内信号转导通路的影响对LFA-1活化的胞质域。这种激活增加细胞外配体的亲和性和粘附性利于其聚集在细胞表面。外信号激活后，发送一系列生化分子在细胞膜的胞外结构域的胞质信号。这些信号是通过多个不同的整合传播下游的激活激酶蛋白信号分子通路的修饰，调节分子的胞质域的LFA-1的排序，和蛋白质转运到特定的亚群，伴随细胞骨架的。[54-56]

实验室利用LFA-1基因敲除小鼠（LFA-1-/-）是利用基因打靶技术将无功能的外源基因片段转入细胞与基因组中同源序列LFA-1进行同源重组，把具有功能的同源序列置换出来，造成小鼠全身LFA-1功能的完全缺失，本研究所用LFA-1基因敲除小鼠的背景为C57背景。利用此小鼠构建肿瘤模型可以直接从表型观察LFA-1功能缺失后对肿瘤生长影响，并研究其分子作用机制。

目前的研究表明，没有人回答LFA-1在肿瘤肺部转移的作用如何，及分子机制这个问题。**因此，我们猜想 LFA-1 是否在肿瘤肺部转移病理进程中起着作用呢？**

通过本文的研究和实验的证明，LFA-1缺失的小鼠会影响肿瘤的在肺部转移，能够促进肿瘤在肺部转移的数目，大小，抑制了小鼠的生存率。本项目预期通过尾静脉注射B16F10肿瘤细胞的小鼠肿瘤模型的研究，确定LFA-1的缺失在肿瘤肺转移的过程中的作用，并阐述在LFA-1的缺失调控淋巴细胞和中性粒细胞等增多，进而诱导巨噬细胞和中性粒细胞分泌IL-1β等细胞因子，来影响肺部的局部微环境，从而促进肿瘤在肺部转移后的生长。研究LFA-1缺失对肿瘤肺转移中的影响为探讨肿瘤在肿瘤免疫和肿瘤微环境的影响和肿瘤的转移发生发展机制和临床治疗提供新的理论依据。

# 第二章 材料与方法

**材料**

**实验动物**

LFA-1小鼠（LFA-1 knockout mice）：8只，10周龄，雄性，纯合敲除为

（LFA-1-/-），购自广东省实验动物中心。

C57BL/6J(对照小鼠)：8只，10周龄，雄性，即（LFA-1+/+）购自广东省实验动物中心。

**实验试剂及仪器**

鲍氏（Boun's）固定液

组分：40％甲醛溶液：过滤的饱和苦味酸：冰醋酸= 25: 75: 5

配制总量210ml

配制方法将150ml饱和苦味酸加到50ml甲醛溶液中混匀，然后加入

## 10 ml冰醋酸，混匀后转移到相应的容量瓶中。

### 10 X PBS溶液

组分：2g KCl，2.4gKH2PO4, 14.4gNa2HPO4，80gNaCl配置体积：1L

配制方法： 分别称取所需的固体试剂，置于2L的烧杯中，加入约900ml的双蒸水，搅拌溶解，调节其PH值至7.4，定容至1L，转移到相应的容量瓶中，使用时，需取100ml10XPBS溶液，加入900ml双蒸水稀释，定容到1L，再进行使用。

4%( g/ml)多聚甲醛溶液（4%PFA溶液）组分：多聚甲醛40g

配置体积：1L

配置方法： 称取多聚甲醛40g，置于2L的烧杯中，缓缓地加入约800ml的1XPBS溶液，由于不易溶解，再分多次加入氢氧化钠少量助溶，转子搅拌使其充分地溶解，调节PH值，至7.2~7.4，最后定容至1L，转移到相应的容量瓶中。

柠檬酸缓冲液

组分：柠檬酸0.2g，柠檬酸三钠1.5g

配置体积：500ml

配置方法： 分别称取所需的固体试剂，置于1L的烧杯中，加入约400ml的双蒸水，使用转子搅拌溶解，调节其PH值至6.0，定容至500ml，转移到相应的容量瓶中。

3%的双氧水甲醇溶液

组分：30%的双氧水溶液，100%甲醇溶液配置体积：500ml

配置方法： 用量筒量取30%双氧水溶液50ml，置于容量瓶中，用100%甲醇溶液定容至500ml，转移到相应的容量瓶中。

DAB显色剂

组分1X过氧化物缓冲液（1XStable Peroxide Buffer, SPB），Metal enhance DAB Concentrate(10X)

配制总量按每个组织40ul体积配制。

配制方法 将DAB/Metal Concentrate与1XSPB以1: 9的比例混合，配置成1X DAB显色试剂，现用现配，在使用时需要提前30min配制。

**试剂名称厂家**

NaCl、KCl、柠檬酸、柠檬酸三钠广州化学试剂厂乙醇、甲醛、异丙酮、甲醇广州化学试剂厂

Na2HPO4汕头西陇化工厂

EDTA 天津百世化工有限公司

K2HPO4天津福晨化学试剂有限公司

TRIzol Invitrogen cat: 15596-018 Tris-base、甘氨酸上海生工生物琼脂糖GENE COMPANY LTD

细胞培养基Life Tech PCR mix FERMENTAS

APES 中杉金桥

**仪器名称厂家**

低温高速离心机ThermoFisher

激光共聚焦显微镜Con-focal德国Leica徕卡仪器公司

（冷冻）离心机德国Eppendorf仪器公司

Motic解剖显微镜奥林巴斯（Olympus）仪器公司

CO2培养箱Thermo Fisher仪器公司

小鼠独立通气笼IVC江苏苏杭科技器材有限公司凝胶成像系统上海通用GE公司

Exl-800酶标仪Thermo Fisher仪器公司流式细胞仪BD公司

全自动的生物组织包埋机PR公司

石蜡切片机德国Leica徕卡仪器公司冰冻切片机德国Leica徕卡仪器公司

流式细胞仪德国Miltenyi美天旎仪器公司

方法

LFA-1-/-小鼠的基因型鉴定

实验目的：实验室中购回的基因敲除LFA-1小鼠并不是纯合的，需要对其进行基因型的鉴定，选取鉴定出的纯合子再配种扩群，为将要的实验提供足够的LFA-1缺失小鼠样本。

实验原理：第一，要通过生物化学方法，将取得的小鼠尾部组织进行蛋白质裂解、消化，暴露出DNA核酸分子。第二，通过物理化学的萃取原理，用有机溶剂来提取小数的DNA分子。第三，将所得的DNA分子，通过聚合酶链反应，将目的基因(LFA-1)片段扩增，得到亿万倍的目的基因分子。最终，通过将DNA扩增液加入葡聚糖凝胶电泳的方法，在恒定电压的情况下，一定时间后，不同分子量大小的DNA分子将分开。如果，含有扩增含量亿万倍的目的基因片段，才可以在凝胶成像系统下，特定的位子出现明显的条带。

小鼠的饲养环境以及其它相关联的要求如下**：**

1. 在本实验过程中，使用的LFA-1敲除小鼠及对照的C57BL/6小鼠均饲养于

SPF级环境中，要求达到SPF级标准。

2. 由于SPF级对环境的要求，其饲养的环境温度应控制在22-28℃之间，相对湿度也控制在40％－60％范围之内，且环境内噪音不得高于60dB，控制昼夜的温差在2℃，昼和夜的交替时间为12小时。饲养环境内需要每天紫外照射两小时，使得饲养室内与外界形成正压差，缓冲的更衣间，每天早晚紫外灯应照射各一次，每次两小时。

在SPF环境中，小鼠饲养在IVC的独立通风系统中笼位中，且每个笼位密闭和独立通风，每单独的笼饲养小鼠笼位不得超过6只。接受病原生物检查需合格。其它的相关指标，均要求符合SPF动物饲养级别。

3. 小鼠饲养用的饲料，是经过60Coγ射线灭菌的，全价营养颗粒压缩饲料，葵花籽和饮用水，都需装入纯净水装瓶后，在高压灭菌后配用，每周定时换水三次。饲养的垫料，需使用经高压灭菌后的混合木屑。小鼠的笼位采用M5型小鼠

饲养笼（苏杭实验动物设备厂购置），高压灭菌。笼位和饲养垫料每周至少更换两次。

4. 需要时常观察小鼠，饮食情况、活动状态及身体情况。用以下标准判断小鼠是否健康：身上是否有无伤痕，尾是否有无不弯曲，眼睛是否有神，反应是否敏捷；食欲是否旺盛；体毛是否光滑，肌肉是否丰满，活动是否有力；粪便是否呈现黑色的，麦粒状。

5. 进饲养室需经SPF级别要求沐浴穿无菌衣，戴一次性手套及口罩后才能进入。

6. 配制的75%乙醇，2％新洁尔灭溶液，每周交替在动物房使用且每日消毒地板及门窗。

**LFA-1过表达小鼠的繁殖及扩群**

1. 选取LFA-1才纯合的雄性成年（8周）小鼠和纯合的雌性成年（8周）小鼠以1: 3的放置在新的干净的笼位内进行杂交，放入适当的瓜子，约三周后，它们将产生F1代，且F1代可以保持LFA-1基因的敲除，做好相应的标记。

2. 为了研究LFA-1缺失的小鼠，同时以背景鼠C57BL/6J小鼠，作为其对照，扩群方法理LFA-1缺失的小鼠一样，做好相应的标记，饲养环境相同。

实验步骤：

在新生小鼠，哺乳期满21天后，将亲代与子代分开，子代雌雄同时分笼，做好标记后，进行子代的DNA鉴定。

鉴定步骤如下：

### （1） 子代小鼠的剪尾取样：

①抓取小鼠，将小鼠的腹部面对着操作者，抓牢。再用消毒后的剪刀，剪下小鼠的尾尖部约1cm组织，放于标记序号的1.5mlEP管中。盖好盖子，用棉球按压小鼠的损伤部位约15秒，止血。

②在获得组织的同时就可以对小鼠进行编号，在动物房外操作鉴定，以便于区分和辨认，按下面方法进行编号：

小鼠左右前肢各有五个手指，但是只有四只手指比较明显。腹部对着

操作者时，将左边的手指代表个位数，从外向内，分别减掉，标记为数值：1、2、

3、4，如果将第1指和的第2指加起来减掉，将表示数值：5；如果将第1指和第3指加起来减掉，将表示数值：6；依此类推，第1和第4减掉表示7，第2和第3指减掉表示8，第2和第4减掉表示9。例如，该小鼠的编号为7，就剪去左边的第1指和第4指；右前肢代表十位数，从外向内分别表示1、2、3、4，而5、6、7、8、9的表示方法同左前肢标记，例如编号为60，需要标记，剪去右前肢的外侧第1指和第3指，且左前肢四个手指均不用减掉，表示标记为数值：60。通过这样的方法，对小鼠进行编号，可方便用于批量小鼠组织的取材，进而鉴定。

### （2） 子代小鼠的组织中，DNA的提取方法如下：

a）取出带有编号的装有小鼠的组织的EP管。

b）用1ml的移液枪，往每只编号的EP管和非编号的EP管（阴性对照）中加入蛋白裂解液1ml，再用20ul的移液枪加入蛋白酶K 20ul，用振荡器震荡混匀，盖好EP管，放置在恒温的水浴锅中，稳定EP管，保持水浴在55℃过夜（14~16h）。

c）第二天，取出EP管，用离心机离心，转数和时间为：12000rpm，10min。换一批新的相同标记的EP管，取上清液，再次同样方式离心。

d）取上清液600ul，往EP管中加入600ul的饱和酚氯仿液，再次通过同样方式离心，去上清，且需要被重复重复3次。

e）取上清100ul，往EP管中加入400ul的无水乙醇，轻震，若看到有白色絮状的沉淀析出，可能就是全DNA分子。

f）用转数和时间为：7500rpm，4min，离心，弃上清可以得到得固体贴底部壁的白色物质。

g）放置在室温中，自然晾干45min，加入150ul三蒸水，剧烈地震荡溶解，如果不及时对DNA进行扩增实验，需要放置在4℃中保存。

### （3） 利用PCR反应扩增目的DNA片段，即可以得到目的基因LFA-1缺失。

a）LFA-1基因敲除引物序列如下：

Primer1: 5'> CAC GGG TAG CCA ACG CTA TGT C<3' Primer2: 3'> GCC CTG AAT GAA CTG CAG GAC G<5 Primer2: 3'> AGA AGC CAC CAT TTC CCT CT<5 Primer2: 3'> AGC TGG AGT CCC AGT AGC AA<5

以上的引物，由上海生工生物技术有限公司，广州分公司代理合成。

b）反应体系50ul，如下：

名称 体积（ ul ）

PCR Master Mix 25

Primer1 2

Primer2 2

Primer3 2

Primer4 2

Sample (DNA 模版) 2

ddH2O 15

c）PCR反应条件：

step 1. 95℃3min预变性

step 2. 94℃30s变性step 3. 65℃1min退火step 4. 72℃1min 延伸

step 5. 72℃2min充分延伸

step 6. 4℃10min 冷却扩增产物从step 2到step 4重复35个循环。

（3）琼脂糖凝胶电泳：

收集标记好的，PCR反应产物7ul，加样在配置好的1.2%琼脂糖凝胶孔中，利用TAE电泳缓冲液进行电泳设定条件：165V，25min。再将凝胶放置在凝胶成像系统里，电脑成像系统里观察PCR的电泳结果，LFA-1基因敲除的扩增产物片段长度为432bp。

实验结果：



**H&E染色（苏木素&伊红染色）**

实验目的：通过这项实验，就可以观察LFA-1-/-小鼠组LFA-1缺失的小鼠和LFA-1+/+小鼠组C57BL/6J小鼠肺部组织中肿瘤转移形成过程中的数目和形态结构的差别，从而探讨LFA-1缺失在血道肿瘤细胞的转移形成过程中的作用。

实验原理：H&E染色，即为苏木素和伊红染色。介绍苏木素，它是一种嗜碱性的染料，细胞内的细胞核是以核酸为主要成份呈碱性，所以在苏木素染色后细胞核能够被染成紫蓝色；再介绍伊红，它是一种嗜酸性的染料，细胞内的细胞质呈酸性，所以细胞质能够被染成粉红色。

利用的鲍氏（Boun's）固定液具有硬化组织，可以使组织保持原有的形态，且能够保证组织细胞离体后不会自溶、破裂，缺损等现象出现，为保持组织形态结构的提供重要的支持。利用全自动脱水机，按照文献，脱去取样的组织中的水分，可有利于组织细胞的长期保存。

有机溶剂二甲苯和石蜡能互溶，所以组织细胞在二甲苯中的充分浸没，会有利于高低温石蜡，进入组织及其间隙之中，保持组织形态结构。在同时充分的石蜡浸没得组织，可以为后来的切片，提供了有力的形态保证。

刀片的厚度，和切片厚度的选择，会直接影响最终显微镜下，组织细胞形态结构的观察。

利用载玻片涂APES，是为了防止石蜡切片在后续的实验中脱落组织，造成实验结果的不准确，而且烘片可以防止石蜡切片的脱落。

实验步骤：

1. 准备好实验材料，用乙醚麻醉小鼠，眼眶取血后，将小鼠脱颈椎处死，固定在取材板上，用酒精擦拭小鼠的胸部和腹部。剪刀打开小鼠的胸腔，用眼科手术镊，取出小鼠的肺部，放置在1XPBS中清洗数下，将小鼠的肺部血块洗掉。

2. 置于新配好的鲍氏固定液中，将固定液和组织放置在标记好的EP管中，室温放置，做好标记固定过两夜。（固定时间约36h~48h）

3. 固定时间到了之后，按照标记，取出肺部组织。装入相应的包埋盒中，摆好在脱水缸中，通过自动脱水机对肺部组织进行脱水，依次经过梯度乙醇溶液和二甲苯溶液以及最后的低温高温熔点蜡，顺序如下：1）70％

乙醇－80％乙醇－90％乙醇各25min；2）100％乙醇一号缸浸泡50min；3）100％乙醇二号缸浸泡50min；4）二甲苯一号缸浸泡1h；5）二甲苯二号缸浸泡1h；6）低熔点蜡缸中浸泡1h；7）高熔点蜡缸中浸泡1h

4. 利用包埋机对肺部组织包埋，将小鼠的肺部凸起面朝下进行包埋，确保后续切片的顺利。

5. 对包埋好的石蜡，进行切片。用涂好APES的玻片，做好标记，放置在65℃中烘烤2h，放凉后的切片，依次经过：1）二甲苯A 30min；2）二甲苯B 30min；3）无水乙醇A 30min；4）无水乙醇B 30min；5）95％乙醇20min；6）90％乙醇20min；7）80％乙醇20min；8）70％乙醇20min；8）双蒸水5min

6. 先染苏木素：对玻片的组织上滴加苏木素，计时3min，再用自来水冲洗

2min。

7. 滴加1%的盐酸乙醇酸化15s，再用自来水冲洗45s。

8. 滴加氨水溶液反蓝45s，再用自来水冲洗2min。

9. 滴加伊红溶液，10s，再用自来水冲洗1min。

10. 拿出玻片，用力甩去玻片上大部分的残留水，再次依次经过：1）80%乙醇5min；2）90%乙醇5min；3）无水乙醇5min；4）二甲苯10min；5）二甲苯2 15min。

11. 置于通风橱中约晾干，最后用干净的盖玻片和中性树胶对其封片。

**免疫组织化学染色（IHC）**

实验目的：检测玻片上的组织中，相关的蛋白的表达含量和表达定位。

实验原理：利用免疫学原理中抗原和抗体间专一性的结合反应，一抗可以和目的蛋白进行蛋白抗体结合，二抗可以和一抗发生结合，在二抗体上结合可呈色的化学物质，通过DAB染色检测系统，来观察组织细胞中，是否有目标抗原的蛋白的存在，这个检测方式不只可以用来观察抗原所表现的位置也可检测抗原的表现量。但凡是能够让抗体结合的物质，包括蛋白或者其他，它们就是具有抗原性的物质包括，例如蛋白质、病原体、多糖、核酸等都可以被检测。

实验步骤：

1. 将组织的石蜡切片准备好，脱蜡并水化，依次经过：1）二甲苯A 30min；2)二甲苯B 30min；3)无水乙醇A 30min；4)无水乙醇B 30min；5) 95％乙醇20min；6) 90％乙醇20min；7) 80％乙醇20min；8) 70％乙醇20min

2. 双蒸水浸泡5min

3. 将切片放置在转速稳定低速的恒定摇床上，用1xPBS洗5min，共3次。

4. 将切片放置于盛有1x柠檬酸盐缓冲溶液中，用锡箔纸密容器开口处，放置在高压锅中煮沸，在看到高压锅煮沸后，计时3~5min，切断热源，使高压锅冷却至室温。

5. 将切片取出，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

6. 将切片放置至3%的双氧水甲醇溶液中，37℃恒温孵育烘箱30min。（3%

的双氧水甲醇溶液需密封至少提前放置在37℃恒温孵育烘箱中预热1h。）

7. 将切片取出，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

8. 用干净的滤纸将组织周围的水吸走，但是组织上要保持一定湿润不能干片，再用石蜡笔在组织周边画圈，最后往组织上加入10%的BSA溶液，放置在湿盒中，根据组织的的特定条件，37℃恒温孵育45~60min。

9. 轻轻地甩掉组织上的BSA封闭液，加入我们实验前设定的待检测的一抗抗体（本课题中用到的一些抗体: MMP-9 antibody、MMP-2 antibody、Ki67 antibody），放置在湿盒中，4℃冰箱孵育过夜（16h），湿盒要保持平和稳。

10. 第二天取出湿盒，将它放置于室温中，起到复温，约30min左右。

11. 取出切片，轻轻地甩掉组织上的一抗；或者取出玻片，用移液枪快速吸取一抗回收，能够4℃保存的抗体。快速将玻片，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

12. 用干净的滤纸将组织周围的水吸走，但是组织上要保持一定湿润不能干片，向组织圈内加入对应一抗的相应的二抗，放置在湿盒中，37℃恒温孵育烘箱中1h，湿盒要保持平和稳。

13. 快速将玻片，甩掉二抗，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗

5min，共3次。

### 14. 用干净的滤纸将组织周围的水吸走，但是组织上要保持一定湿润不能干片，向组织圈内滴加入1XDAB溶液显色剂，现配现用。在白色的背景下

（滤纸），计时1min，一般组织上会显出棕黄色，再用自来水冲洗10min。

15. 再向组织圈内滴加苏木素，计时1min后，自来水冲洗1min。

16. 自然晾干，放置在二甲苯A和二甲苯B各5min透明。

17. 置于通风橱中约晾干，最后用干净的盖玻片和中性树胶对其封片。

**细胞迁移实验检测**

实验目的：研究B16小鼠黑色素瘤细胞迁移能力在细胞因子作用下的差异实验原理：本实验是在Transwell模型的基础上进行，选用带有小室的24孔板，

上下孔膜直径为8um，目的是让细胞可以变形迁移穿过。它的周边是无菌塑料制成，小室的底部有一层通透性的聚碳酸酯膜。在Transwell模型中，将小室放置于特定大小的24孔板中，就形成了上，下室的模型结构结构，中间由聚碳酸酯膜分隔开来。

如果在下室加入培养液和相应的目的细胞因子，上室加入等量的同批同种细胞的悬浮液。由于细胞因子可以通过聚碳酸酯膜，将细胞加入上室后，培养一定的时间，细胞可以先贴壁再通过变形穿过膜，形成细胞的迁移。将这个聚碳酸酯膜取出后，用酒精固定，结合使用结晶紫染色，细胞将呈现蓝紫色。擦除聚碳酸酯膜对着小室面的细胞，并拍照，对下室面的迁移过来的细胞进行统计，可以评价细胞在细胞因子的作用下的迁移能力。

实验步骤：

1. 细胞培养：B16F10细胞用配制好的，含10%胎牛血清（FBS）及1%的双抗（青霉素和链霉素），的DMEM高糖培养基进行细胞培养，置于恒温箱，37℃，

5%CO2中培养。待细胞处于指数分裂时期时，取出。用5%的胰酶消化时间约5min。细胞的冻存按9: 1（FBS, DMSO）的比例混匀冻存。冻存时，按梯度先冻存与

-20℃，10h后-80℃，48h后转存于液氮罐中。

目 录

[Abstract](#_Toc686594053) 4

[第一章 前 言](#_Toc686594054) 4

[第二章 材料与方法](#_Toc686594055) 5

[10 ml冰醋酸，混匀后转移到相应的容量瓶中。](#_Toc686594056) 5

[12 孔板每孔加0.5ml Trizol。](#_Toc686594057) 10

**[第一部分 LFA-1-/-](#_Toc686594058)**[小鼠的生物学特性的研究](#_Toc686594058)**[LFA-1-/-](#_Toc686594058)**[小鼠肺部组织病理学的研究](#_Toc686594058) 13

[第四章 讨 论](#_Toc686594059) 23

[参考文献](#_Toc686594060) 25

**细胞侵袭实验检测**

实验目的：研究B16小鼠黑色素瘤细胞侵袭能力在细胞因子作用下的差异 实验原理：本实验是在Transwell模型的基础上进行，选用带有小室的24孔板，

上下孔膜直径为8um，目的是让细胞可以变形迁移穿过。它的周边是无菌塑料制成，小室的底部有一层通透性的聚碳酸酯膜。在Transwell模型中，将小室放置于特定大小的24孔板中，就形成了上，下室的模型结构结构，中间由聚碳酸酯膜分隔开来，上室加入特定的1%基质胶，待凝固后，下室加入培养液和相应的细胞因子IL-1β。将B16F10细胞加入到上室中，培养一定的时间，肿瘤细胞会贴壁在小室膜上，并能够分泌有关的金属基质蛋白酶等来降解基质胶，形成向下室的侵袭能力，加入不同的细胞因子将观察对B16F10侵袭能力的研究。

将这个聚碳酸酯膜取出后，用酒精固定，结合使用结晶紫染色，细胞将呈现

蓝紫色。擦除聚碳酸酯膜对着小室面的细胞，并拍照，对下室面的侵袭过来的细胞进行统计，可以评价细胞在细胞因子的作用下的侵袭能力。

实验步骤：

1. 细胞培养：B16F10细胞用配制好的，含10%胎牛血清（FBS）及1%的双抗（青霉素和链霉素），的DMEM高糖培养基进行细胞培养，置于恒温箱，37℃，

5%CO2中培养。待细胞处于指数分裂时期时，取出。用5%的胰酶消化时间约5min。细胞的冻存按9: 1（FBS, DMSO）的比例混匀冻存。冻存时，按梯度先冻存与

-20℃，10h后-80℃，48h后转存于液氮罐中。

2. 准备好无菌的Transwell chamber及其它需要的相关培养器材（其中小室需要加入相应的无血清DMEM进行水化）。准备足够量培养好的细胞，准备好相应的细胞因子IL-1β，配置好研究浓度，向小室中加入200ul的基质胶溶，37℃使胶凝固。

3. 将细胞消化后计数，分别在每个小室加入含5x105个细胞的悬浮液。在下室中加入800ul培养基，分组，分别加入IL-1β细胞因子和相应的空白对照，使得下室的浓度达到2ug/ml。

4. 放置在恒温培养箱中培养，24h后，取出相应的小室，用90%的乙醇进行固定20min。

5. 放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

6. 分别往目的的小室中，加入1%的结晶紫溶液染色15min，吸取1%结晶紫溶液。

7. 放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

8. 使用刀片，小心地割小室的膜，将对着下室的面朝上，放置在玻片上，做好标记，在滴加中性树胶封片。

9. 利用“弓”字型选取视野，进行拍照，对事业内染上色的细胞进行分组统计。

**血液和组织内白细胞流式检测**

实验原理：研究白细胞在血液和组织中的数量和比率，探究在有无肿瘤的条

件下，白细胞比率的变化。

实验原理：[将待测的细胞](http://baike.baidu.com/view/3687.htm)染色后制成单细胞的悬液。用一定的压力将待测样品压入流动室，不含细胞的磷酸缓冲液在高压下从鞘液管喷出，鞘液管入口方向与待测的样品流成一定角度，鞘液就能够包绕样品高速流动，组成一个圆形流束，待测细胞在鞘液包被下单行排列，依次的通过检测区域。[流式细胞仪](http://baike.baidu.com/view/87884.htm)通常以激光作为其发光源。经聚焦整形后的光束，垂直照射在样品流之上，被荧光染色[细胞](http://baike.baidu.com/view/3687.htm)在激光束的照射下，会产生散射光和激发自身荧光。这两种信号，被前向光电二极管和90°方向的光电倍增管所接收。光散射信号在前向角度进行地检测，这种信号强度基本上反映了[细胞](http://baike.baidu.com/view/3687.htm)的体积大小；荧光信号接受方向与激光束的垂直，经过一系列的[双色](http://baike.baidu.com/view/7746720.htm)性反射镜和带通滤光片的分离，形成的多个不同[波长](http://baike.baidu.com/view/45341.htm)荧光信号。这些荧光信号强度代表了所测的[细胞](http://baike.baidu.com/view/3687.htm)膜表面[抗原](http://baike.baidu.com/view/20489.htm)强度或其核内物质浓度，经光电倍增管地接收后可转换为电信号，再通过，模/数转换器，将连续的电信号转换成为，可被计算机识别的数字的信号。计算机把所测量的各种信号进行计算处理。

应用上述的原理就可以检测细胞膜上细胞蛋白，CD4，CD4，CD8，CD19，

F4/80, CD45等；细胞内的蛋白，IFN-γ，IL-17A等和细胞核内蛋白转录因子，Foxp3

等。检测出来的结果被进一步分析，来确定各个白细胞的比率。实验步骤：

1. 收集新鲜的血液和新鲜的组织；

2. 血液的样本取50ul，加入相应的细胞膜上的抗体（anti-CD3+，anti-CD4+，

anti-CD8+, anti-CD19+ ；anti-F4/80+等）避光孵育30min；

3. 加入红细胞裂解液10min；

4. 用含0.5%BSA的PBS清洗，离心，去除上清，条件为350g，5min，3次；

5. 避光冰浴送检至，流式细胞仪检测。

6. 遇到脾脏等实体组织，碾磨成悬浮液，再用70um的筛网再过滤，得到单细胞悬液；标记抗体，加红细胞裂解液，清洗，上样检测。

7. 遇到肿瘤等难以碾磨完全的实体组织部分：需要加入透明脂酸酶：胶原酶=1: 1, 1.5mg/ml；并加入1%体积DNA酶；37℃水浴消化45min；

8. 取出消化好的组织，碾磨成悬浮液，再用70um的筛网过滤，得到单细胞

悬液；标记抗体，加红细胞裂解液，清洗，上样检测。

9. 遇到胞内蛋白的检测（anti-IL-17A, anti-IFN-γ等），将上述制成的单细胞悬液，加入别加PMA和离子霉素刺激，莫能霉素和BFA终止反应，37℃孵育4h，再标记细胞膜抗体，固定细胞膜抗体，再破膜，标记细胞内抗体，清洗，上样检测。

10. 遇到细胞核内的蛋白的检测（anti-Foxp3等），将上述制成的单细胞悬液，加入别加PMA和离子霉素刺激，莫能霉素和BFA终止反应，37℃孵育4h，再标记细胞膜抗体，固定细胞膜抗体，再破膜，标记细胞内抗体，再固定胞内抗体，再破核膜，标记核内抗体，清洗，上样检测。

**组织总RNA抽提**

实验目的：提取LFA-1-/-小鼠组和LFA-1+/+小鼠的肺部RNA，来观察相应的

mRNA水平的变化。

实验原理：TRIZOL试剂中的主要成分为异硫氰酸胍和苯酚，其中的异硫氰酸胍可裂解细胞，促使核蛋白体的解离，使RNA与蛋白质分离，并将RNA释放到溶液中。当加入氯仿时，它可抽提酸性的苯酚，而酸性苯酚可促使RNA进入水相，离心后可形成水相层和有机层，这样RNA与仍留在有机相中的蛋白质和

DNA分离开。水相层（无色）主要为RNA，有机层（黄色）主要为DNA和蛋白质。

实验步骤：

细胞裂解或组织匀浆。

a. 贴壁细胞

吸尽培养液，每10平方厘米细胞加入1ml Trizol。一般六孔板每孔加1ml Trizol，

## 12 孔板每孔加0.5ml Trizol。晃动3-5下，再用枪吹打2-3下，确保全部裂解，然后吸至离心管中。

b. 悬浮细胞

离心收集细胞，吸尽液体，每五百万至一千万动植物或酵母细胞，或一千万细菌，加入1ml Trizol。用枪吹打或适当振荡，确保全部裂解。某些酵母和细菌如裂解

不充分，可用匀浆器匀浆，确保全部裂解。

c. 组织

先将组织剪切成小块，放入普通玻璃匀浆器内。每50mg-80mg组织加入1ml Trizol，匀浆。对于RNA完整性要求比较高的情况，推荐先液氮冷冻组织块，然后在低温下用研钵研碎组织，随后再加入Trizol进行总RNA抽提。

1. 对于某些蛋白，多糖或脂含量很高的细胞或组织，Trizol裂解后可能会有不溶物或油脂状漂浮物。需12, 000g 4℃离心10min，然后吸取澄清的Trizol裂解产物至一新的离心管中。

2. 室温放置5min，使样品充分裂解。

3. 每毫升Trizol加入0.2ml氯仿，振荡混匀或猛烈晃动15s，室温放置2-3min。

4. 12,000g 4℃离心15min，然后吸取含总RNA的上层无色水相至一新的离心管中，每毫升Trizol约可吸取0.5-0.55ml。

5. 按每毫升最初的Trizol加入0.5ml异丙醇，颠倒数次混匀，室温沉淀10min。如果希望提取microRNA等小RNA，推荐-70℃沉淀过夜。

6. 12,000g 4℃离心10min，在管底可见RNA沉淀，弃上清。

7. 每毫升最初的Trizol加入1ml 75%乙醇（DEPC水配制），振荡或颠倒混匀，

8. 7,500g 4℃离心5min，弃上清。再用离心机甩一下（> 5,000rpm, 离心1s），小心吸尽液体。

9. 待RNA略干后，加入20μl DEPC水溶解，-70℃冻存。注意：切勿让RNA过分干燥，否则将极难溶解，且测出的A260/280值会低于1.6。

10. 分装，每支10ul，-80℃保存。

**RT-PCR检测**

实验目的：将提取的总RNA进行反转录。

实验原理：RT-PCR是将RNA的反转录（RT）和cDNA的聚合酶链式扩增

（PCR）相结合的技术。首先经反转录酶的作用从RNA合成cDNA，再以cDNA为模板，扩增合成目的片段。RT-PCR技术灵敏而且用途广泛，可用于检测细胞中基因表达水平，细胞中RNA病毒的含量和直接克隆特定基因的cDNA序列。

作为模板的RNA可以是总RNA、mRNA或体外转录的RNA产物。无论使用何种

RNA，关键是确保RNA中无RNA酶和基因组DNA的污染。实验步骤：

按照，Invitrogen公司的试剂盒，要求操作

**Real-Time PCR检测**

实验目的：探究两组小鼠的肺部目的mRNA的变化

实验原理：利用荧光信号的变化实时检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，通过Ct值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析

实验步骤：

1. 采用Superarray公司的Master Mix预混体系和引物。

2. 定量PCR在10μl体系中完成：5µl RT²SYBR Green Master Mix，2µl ddH2O, 1.0µl 模板cDNA, 1.0µl 10µM的PCR 引物。

3. 反应程序为：预变性95ºC, 10 min;循环中变性95ºC, 30 sec; 退火55℃, 30

sec延伸72℃，30秒，反应40个循环，融解曲线分析。

**ELISA检测**

实验目的：检测血清中和组织细胞中IL-1β的含量。

实验原理：ELISA的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，受检标本（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开。再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

实验步骤： 1．从已经复温至室温的试剂盒密封袋中取出试验所需的板条，将未用的板条和干燥剂放回原来的铝箔袋内，压实自封条，密封口袋放至4℃保存。 2．设定的空白孔和加标准品和标本稀释液，其余相应的孔内加不同浓度标准品(100ul/孔)或标本，用原装的封板胶纸，封住这些反应孔，37℃孵箱内，孵育

90min。

3．提前在孵育好的20分钟，准备好生物素化抗体工作液

4．洗板5次，用力甩去孔内的残液。

5．在空白组的孔内加生物素化抗体稀释液，其余的孔内加入生物素化的抗体工作液(100ul/孔)。再用新的封板胶纸，封住反应孔，37℃孵箱内孵育60min。6．提前在孵育好的20分钟，准备好酶结合物工作液。避光室温放置。

7．洗板5次，用力甩去孔内的残液。

8．在空白组的孔内加酶结合物稀释液，其余的孔内加入酶结合物工作液（100ul/

孔）。用新封板胶纸封住反应孔，放置在37℃孵箱内，避光孵育30min。

9．打开酶标仪的电源，预热仪器，波段设置好，将要的检测程序。

10．洗板5次，用力甩去孔内的残液。

11．每个孔内加入显色底物(TMB) 100ul/孔，放置在37℃孵箱内，避光孵育15min。

12．每个孔内加入终止液100ul/孔，混匀后，即刻测量OD450值(3min内)。在仪器保存读数结果。

**免疫印迹法检测**

实验目的：检测侵袭相关的蛋白含量的变化。

实验原理：通过电泳区分不同的组分，并转移至固相支持物，通过特异性试剂（抗体）作为探针，对靶物质进行检测，蛋白质的Western印迹技术结合了凝胶电泳的高分辨率和固相免疫测定的特异敏感等多种特点，可检测到低至1～5ng（最低可到10－100pg）中等大小的靶蛋白。

实验步骤：

1）蛋白质样品提取

将B16F10细胞等量种于6孔板中，分别加入相应的IL-1β，溶剂和anti-IL-1β；复孔3个；孵育24h后，去除上清，加入等量三去污裂解液收集细胞蛋白。

2）蛋白质浓度测定

按照，ThermoFisher，公司的BCA试剂盒产品的说明书，制作标准曲线，检测不同样品蛋白质的浓度，加入5x的Loading Buffer和三去污裂解液，将蛋白质浓度统一为4μg/μl，再装入ep管中，让入加热振荡器中，100℃煮沸10分钟，离心7500rpm，1min，存放于-80℃冰箱备用。

3)应用SDS-PAGE(SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳)

依据目标蛋白的分子量，配制浓度为10%分离胶和4%的浓缩胶，配好后保存在4℃冰箱；点样时，去除梳子，暴露点样槽，依次点样，做好记录；用恒压

70V作用在浓缩胶上，当样品的前沿至浓缩胶和分离胶的交界时改为恒压120V；直到目标蛋白所对应的蛋白质Marker的条带的位置到2/3时，就可以停止电泳。估计实验中电泳总时间在2小时以内。

4)转膜

电泳结束后，取出凝胶制作出：按顺序，海绵-三层滤纸-凝胶-PVDF膜-三层滤纸-海绵的夹层式的转膜工作的模型；需要注意赶出，各夹层之间的气泡，并保证整个结构被转膜夹夹紧。将整个装置放置在4℃冰库中，转膜电压条件为恒压100V，1.5h。

5)封闭

转膜结束后，取出PVDF膜，放置在匀速低缓转动的摇床上，用1xTBST清洗10min，3次，用5%的脱脂牛奶室温孵育1h。

6）孵育抗体

封闭结束后，放置在匀速低缓转动的摇床上，用1xTBST清洗10min，3次，一抗MMP2(CST), MMP9（CST），β-actin（碧云天）用1%BSA的PBS溶液，按照公司的抗体说明书，中的比例进行稀释，一抗孵育需要在4℃冰室过夜

（16h）。放置在匀速低缓转动的摇床上，用1xTBST清洗10min，3次，孵育对应二抗（辣根过氧化物酶标记，稀释比例1: 10000）室温1h，放置在匀速低缓转

动的摇床上，用1xTBST清洗10min，3次。

7)显色

实验的显色方法是，ECL化学发光，将在暗室中，将ECL的A液和B液混合；加入到清洗好的PVDF膜3分钟（时间可调整）后，在夹板的X的光片上进行曝光（曝光时间可调整），依次得到相应的显影结果。

**免疫荧光染色检测**

实验目的：检测组织细胞中目的蛋白的定位和表达的含量实验原理：依据抗原与抗体结合的原理：

首先，将已知的抗原或者抗体标记上荧光素（例如将波长为555nm的荧光素利用生物技术标记在抗体上）。

其次，将这荧光抗体（或者是抗原）作为探针，检查细胞或者组织内的相应的抗原（或者抗体）。

最后，在组织细胞中形成的抗原和抗体复合物上，将会含有标记的荧光素，这种荧光素在受到激发光的激发后，电子由低能态进入了高能态，而这种高能态的电子是不够稳定的，最后能量会以辐射光，量子的形式释放能量后，再回到最初的低能态，这时发出特定的波长辐射，这类波长辐射被检测器捕捉记录，在呈现给我们视野，用电脑软件记录这些波长辐射，就是反应荧光的表达。

利用荧光显微镜可以检测，荧光所在的细胞或组织的位置，从而判定此类抗原或抗体的某些性质和表达的定位，确定荧光的表达量以及利用定量软件技术来测定含量。

为了保持测定蛋白的活性和表达的真实性，我们利用OCT，一种冰切包埋剂，它是一种在常温下会呈液态，而在低温（-20℃）下会呈现出固态。我们正是利用了这种特性，可以把目的组织固定在冰切机器配套的托头上，以便于我们冰冻切片，保持了测定蛋白的活性和真实性。利用APES涂过的玻片，做好标记，再将冰切后，所有的切片，经过丙酮固定10min，目的是使得组织收缩，防止组织脱落。

实验步骤：

1. 处死小鼠，打开胸腔，取新鲜的小鼠肺部组织，做好标记，用1xPBS清洗表面的血渍，再置于新鲜的4%的多聚甲醛中，固定过夜（14h~16h）。

2. 将固定好的的肺部组织，通过10%蔗糖，1h；20%蔗糖，1h；30%蔗糖，1h；梯度的蔗糖溶液进行脱水。

3. 将肺部凹圆面，放置在托盘的正面，加上OCT，可以覆盖整个组织的量，快速将托盘放置在相应的位置里。约20，min，这样在-20℃下，就可以进行冰冻切片了。经冰冻切片后玻片，需要置于丙酮中，在常温的环境浸泡约10min后，取出，保存于-20℃作为备用。

4. 从-20℃中，取制备好的肺部组织的冰冻切片，放置在室温中复温约

### 10 min。

5. 回收丙酮，再用蒸馏水浸泡切片约5min。

6. 倒掉蒸馏水，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

7. 将玻片放置于盛有1x柠檬酸盐缓冲溶液中，用锡箔纸密容器开口处，放置在高压锅中煮沸，在看到高压锅煮沸后，计时3~5min，切断热源，使高压锅冷却至室温。

8. 取出玻片，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

9. 轻轻地甩掉组织上的BSA封闭液，加入我们实验前设定的待检测的一抗抗体（本课题中用到的一些抗体：CD68 antibody、CD31 antibody），放置在湿盒中，4℃冰箱孵育过夜（16h），湿盒要保持平和稳。

10. 第二天取出湿盒，将它放置于室温中，起到复温，约30min左右。

11. 取出玻片，轻轻地甩掉组织上的一抗；或者取出玻片，用移液枪快速吸取一抗回收，能够4℃保存的抗体。

12. 取出玻片，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

13. 避光操作：将切片组织周围的水擦干，向组织加入相应的荧光二抗，置于湿盒中，37℃恒温孵育1h。（此步骤开始）

14. 取出玻片，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

15. 将玻片尽量甩干，滴加DAPI溶液，置于湿盒中，室温孵育15min。

16. 取出玻片，放置在转速稳定低速的恒定摇床上用1xPBS洗5min，共3次。

17. 将玻片尽量甩干，放置在阴暗处晾干。

18. 滴加1x的mounting Medium 50ul的荧光封片剂，封片，避光放置在4℃保存。

**细胞克隆实验检测**

#### 1. 取对数生长期的各组细胞，分别用0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞，并把细胞悬浮在10%FBS的DMEM培养液中备用。

#### 2. 将细胞悬液作梯度倍数稀释，每组细胞分别以每皿200个细胞的接种含10mL

37℃预温培养液的皿中其中，分为三组分别加入溶解剂，IL-1β（20ng/ml），IL-1β（20ng/ml）+anti- IL-1β（20ng/ml），并轻轻转动，使细胞分散均匀。置37℃和5%的CO2的细胞培养箱中培养1week。

#### 3. 经常观察，当培养皿中出现肉眼可见的克隆时，终止培养。弃去上清液，用

PBS小心浸洗2次。加4%多聚甲醛固定细胞5mL固定15分钟。然后去固定液，加适量GIMSA应用染色液染10～30min，然后用流水缓慢洗去染色液，空气干燥。

#### 4. 将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片，用肉眼直接计数克隆，或在显微镜（低倍镜）计数大于10个细胞的克隆数目。

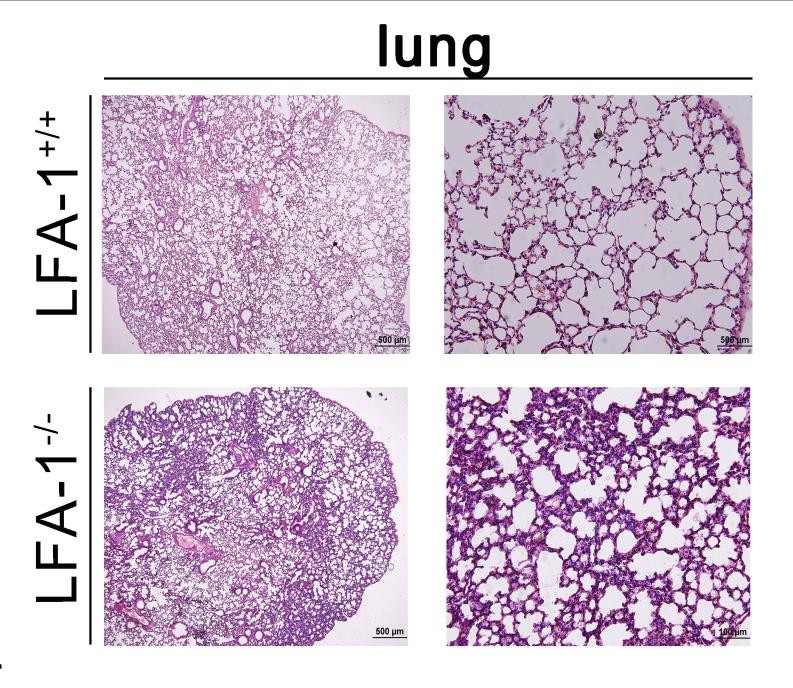
第三章实验结果**第一部分LFA-1-/-小鼠的生物学特性的研究**

# **第一部分 LFA-1-/-**小鼠的生物学特性的研究**LFA-1-/-**小鼠肺部组织病理学的研究

LFA-1-/-小鼠是否会影响其自身的肺部组织形态的发育改变。我们将10w小鼠分为LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组，将两组小鼠取血牺牲，再直接破胸腔取肺部组织，观察大体上两种小鼠肺部之间并没有明显的差异（数据未显示）；将两组小鼠的肺部组织进行相应的固定，脱水，包埋，切片。得到的组织玻片，进行H&E染色，等到染色后组织玻片，封片。将封好的玻片依然按照取材小鼠的分组，标记为两组：LFA-1-/-小鼠组和LFA-1+/+小鼠组，在显微镜下进行组织形态分析，如图1显示。

图1中LFA-1+/+小鼠的肺部从低倍镜下观察，是正常完整的肺部组织形态。肺支气管部分结构正常；肺泡中无渗出物，肺泡间隔正常。从高倍镜下观察，肺组织支气管粘膜上皮完整，肺泡细胞连接紧密，肺组织中未见白细胞的浸润。

图1中LFA-1-/-小鼠的肺部从低倍镜下观察，是出现病理性的改变的肺部组织形态，肺支气管部分结构正常；肺泡中无渗出物，肺泡间隔增宽。从高倍镜下观察，肺组织支气管粘膜上皮完整，肺泡细胞连接紧密肺泡间被挤压出现了闭合，成纤维细胞出现增生，血管有微扩张，肺组织中发见白细胞的浸润显著。在LFA-1-/-小鼠肺部组织结构在生理条件下出现了纤维样的填充肺泡的改变，白细胞的大量浸润，提升我们LFA-1-/-小鼠的肺部出现了纤维样病变，是可能的间质性肺炎的症状。



**图1** **. 未荷瘤的小鼠肺部的H&E染色**

Figure 1. HE stain of the lung

LFA-1+/+小鼠的和LFA-1-/-小鼠在生理条件下肺部组织形态的观察。LFA-1+/+小鼠，n=6；，LFA-1-/-小鼠，n=6. LFA-1-/-小鼠组肺泡间隔增宽，白细胞浸润增多。

**LFA-1-/-小鼠肺部组织中白细胞观察**

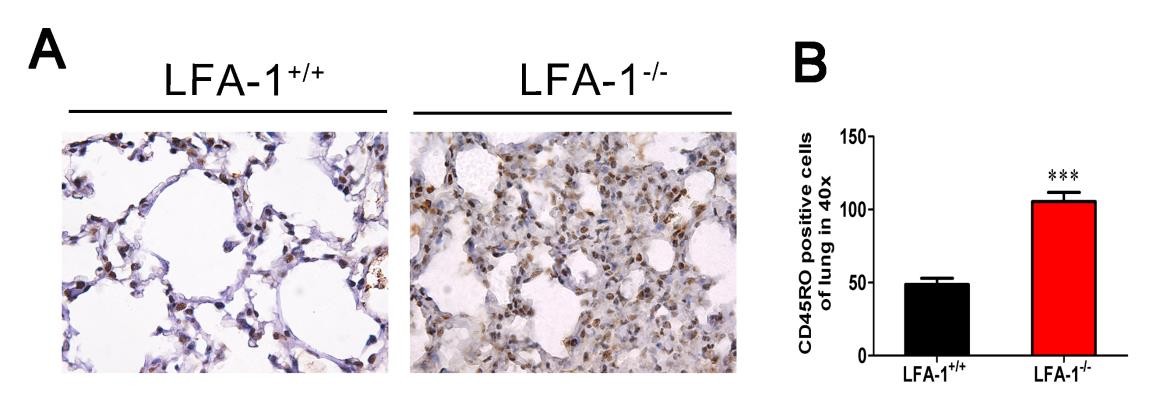
缺失LFA-1基因会影响小鼠肺部组织形态的发育，出现了病理性的组织形态的改变。上述实验结果表明，10w的LFA-1-/-小鼠的肺部明显出现了肺泡间隔增宽以及白细胞数目的增多。由于，LFA-1蛋白是表达在白细胞上的重要粘附分子，研究的重点放在肺部组织中的白细胞上，尤其在组织切片中发现白细胞增多，在肺泡内渗出，同时利用了白细胞的标记物CD45RO蛋白的抗体作为检测白细胞数目，来观察两组小鼠肺部组织中的白细胞是否增多。

实验过程是将两组小鼠生理条件下的肺部组织在玻片做anti-CD45RO免疫组化。通过图2A我们可以观察得到，右边的LFA-1-/-小鼠的肺组织中黄褐色免疫组化染色结果数目显著性高于左边LFA-1+/+小鼠的肺组织的数目，这些黄褐色的被标记的细胞正是

CD45RO标记的细胞，表明LFA-1-/-小鼠的肺泡组织中在生理条件下就会有大量的白细胞渗出，并且聚集在肺泡的周围。

如图2B，采用“弓”字形的统计方式，将免疫组化的结果进行统计，在放大400 倍

下，LFA-1+/+小鼠肺组织的白细胞数目约在50个左右，而LFA-1-/-小鼠的肺组织白细胞数目是约在110个左右，结果统计显著性地高于LFA-1+/+小鼠组。



整个图2显示的结果，说明LFA-1-/-小鼠的肺部组织中白细胞的数目显著性高于LFA-1+/+小鼠的肺部组织的白细胞的数目。（这两个视野和前面的HE染色不对应）

**图2** **. 未荷瘤的小鼠肺部的CD45RO染色及统计**

Figure 2. CD45RO IHC of the lung and statics

A. LFA-1+/+小鼠的和LFA-1-/-小鼠在生理条件下的肺部组织的CD45RO免疫组化在400倍镜下的结果。LFA-1+/+小鼠，n=6；LFA-1-/-小鼠，n=6. B. LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠的抗体CD45RO免疫组化的结果统计，anti-mouse，P<0.001. LFA-1-/-小鼠白细胞在肺部生理条件下，白细胞浸润数目增多。

LFA-1-/-小鼠血液中白细胞计数

上述实验的结果提示我们，LFA-1-/-小鼠组在10w时生理条件下较LFA-1+/+小鼠组而言，支气管结构正常但是，肺泡间隔增宽，出现了纤维样的填充肺泡的改变，且白细胞就会显著性的渗出到肺泡周边，数目就会显著性地增加。

血液常规白细胞检测，是常用的实验方法来观察小鼠体循环中，白细胞的数目的改变。将两组小鼠在生理条件下，取血进行血常规检测统计分析，得到的结果统计如图3。

图3中，将两组小鼠在淋巴细胞，中性粒细胞，血小板，嗜酸性细胞，单核细胞检测的结果和总的白细胞检测的结果，在每一种白细胞的数目做逐一的对比分析。

淋巴细胞检测结果在LFA-1-/-小鼠组中显著性提高，达到平均的浓度为6.3x109/L，而LFA-1+/+小鼠组的浓度为2.7x109/L，LFA-1-/-小鼠组是LFA-1+/+小鼠组的2倍多，说明

在生理条件下，LFA-1-/-小鼠淋巴细胞数目明显大于LFA-1+/+小鼠组；中性粒细胞在LFA-1-/-小鼠组中有所提高，达到平均浓度为1.5x109/L，而LFA-1+/+小鼠组的浓度为0.7x109/L，LFA-1-/-小鼠组是LFA-1+/+小鼠组的2倍多，说明在生理条件下，LFA-1-/-小鼠中性粒细胞数目大于LFA-1+/+小鼠组；血小板在LFA-1-/-小鼠组和LFA-1+/+小鼠组的数目差不多，都在浓度为620x109/L左右，没有显著性的差异；单核细胞在LFA-1-/-小鼠组和LFA-1+/+小鼠组的数目差不多，都在浓度2.5x109/L为左右，没有显著性差异；嗜酸性粒细胞在LFA-1-/-小鼠组中有所提高，达到平均0.2x109/L浓度，而LFA-1+/+小鼠组在0.08x109/L浓度，LFA-1-/-小鼠组是LFA-1+/+小鼠组的2倍多，说明在生理条件下，LFA-1-/-小鼠中性粒细胞数目大于LFA-1+/+小鼠组；白细胞的总数在LFA-1-/-小鼠组中显著性提高，达到平均的浓度为8.7x109/L，而LFA-1+/+小鼠组为3.2x109/L，LFA-1-/-小鼠组是对照的2.5倍多，说明在生理条件下，LFA-1-/-小鼠组的白细胞总数显著性大于LFA-1+/+小鼠组。

血常规检查白细胞体循环中的的统计结果显示：在生理条件下，两组小鼠有显著性差异的有淋巴细胞和白细胞总数，由于淋巴细胞所占比例较高，所以白细胞总数的提升是由于淋巴细胞的显著性差异造成的。白细胞的增高和之前的肺组织中肺泡间隔渗出的大量白细胞之间似乎是有相似的联系接近显著性差异的有中性粒细胞和嗜酸性细胞，其中两组相比较，P值为0.0668，所以我们推测，中性粒细胞如果在增大样本量后可能将会是有显著性差异的。嗜酸性细胞有上调的趋势，但是由于统计的结果下差异较大，没有显著性的。统计的结果中，没有差异的有单核细胞数目和血小板数目，在统计学中没有显著性差异，也没有明显上升或下调的趋势。总之，缺在失LFA-1基因就可以造成生理条件下，在体循环和局部的肺组织中，大量白细胞的增多和渗出聚集，造成了体内出现了炎症的反应。



图3 LFA-1-/-小鼠血常规结果Figure 3. Routine blood test and statics

LFA-1+/+小鼠和LFA-1-/-小鼠的血常规检测白细胞数目的结果，，上图从上到下，从左到右的顺序检查的指标分别为：淋巴细胞、血小板、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性细胞和白细胞总数。LFA-1+/+小鼠，n=6；LFA-1-/-小鼠，n=6，P<0.05. LFA-1-/-小鼠白细胞、淋巴细胞数目增多。

**LFA-1-/-小鼠的血液学和免疫器官组织学研究**

两组小鼠体循环的白细胞数目常规检测的结果提示：可能在生理条件下，LFA-1-/-小鼠的免疫系统的器官结构发生了改变，导致体循环中白细胞的数目的增加，从而在肺泡间隔中渗出增加了炎性反应。

因此，将探究LFA-1-/-小鼠和LFA-1+/+小鼠的免疫器官的组织形态上的差异，

生理条件下的血液和骨髓分别制作成血液和骨髓涂片，利用Gimsa的染色方法对涂片进行染色。将胸腺和淋巴结取出，固定，脱水，包埋，切片。再通过HE染色，得到结果。如图 4

血液涂片染色结果显示，在生理条件下，在无论是在低倍镜下还是在高倍镜下，LFA-1-/-小鼠组的血液涂片上观察记录了很多淋巴细胞样的细胞，且这类细胞数目是LFA-1+/+小鼠组的2倍左右，这一观察记录的结果符合之前的血液中白细胞数目血液常规检测的淋巴细胞数目的检查结果。

骨髓涂片染色结果显示，在生理条件下，在无论是在低倍镜下还是在高倍镜下，LFA-1-/-小鼠组的血液涂片上观察记录了很多淋巴细胞样的祖细胞，且这类细胞数目是LFA-1+/+小鼠组的2倍左右。这一结果提示我们由于在骨髓内淋巴细胞的祖细胞的数目增多，导致血液体循环中分化的淋巴细胞数目增多。

两组小鼠的生理条件下，胸腺组织形态上都保持红髓和白髓的完整，红髓和白髓之间没有发现病理性改变和白髓塌陷，胸腺组织是淋巴细胞归巢和成熟的重要发育器官，可能不是由于胸腺的组织改变造成淋巴细胞的数目地异常增多。



**图4** **. 未荷瘤的小鼠免疫器官的检测**

Figure 4. Detection of immune organs

LFA-1+/+小鼠和LFA-1-/-小鼠的免疫系统器官的图片染色检测，从左到右分别表示，外周血涂片Gimsa染色，骨髓涂片Gimsa染色，胸腺HE染色。LFA-1+/+小鼠，n=6；LFA-1-/-小鼠，n=6。血液中，LFA-1-/-小鼠淋巴细胞数目增多；骨髓中，LFA-1-/-小鼠淋巴细胞祖细胞增多。

**LFA-1-/-小鼠血液中T淋巴细胞的研究**

由于在LFA-1+/+小鼠和LFA-1-/-小鼠的白细胞血液常规数目检测和两组小鼠血液涂片检测的结果证实，在生理条件下，LFA-1-/-小鼠的淋巴细胞异常的增多。在生理的条件下，LFA-1-/-小鼠组的血液中淋巴细胞数目显著性地上调，并且血液涂片的结果也佐证了血常规的结果。

T细胞是淋巴细胞中最为重要的细胞免疫反应的淋巴细胞，利用流式细胞术来观察两组小鼠T淋巴细胞的亚型的数目。方法是将LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的血液经流式细胞术上样前处理，标记T细胞亚型的目的抗体

（anti-CD3+—PE, anti-CD4+—FITC, anti-CD8+—APC）；去除红细胞；清洗；送检至流式细胞仪中检测，结果统计按照细胞数目比率百分比统计结果如图5，其中，LFA-1+/+小鼠组的统计百分比结果用黑色柱状图来表示，而LFA-1-/-小鼠组则用红色柱状图来表示。

流式统计结果分析，LFA-1+/+小鼠血液中CD3阳性的T淋巴细胞占淋巴细胞的约占淋巴细胞群的40%，而LFA-1-/-小鼠血液中CD3阳性的T淋巴细胞占淋巴细胞群的约38%，两组之间没有显著性的差异性；再进一步观察T细胞的亚型LFA-1+/+小鼠血液中CD4阳性的T淋巴细胞占淋巴细胞的约占淋巴细胞群的18%，LFA-1-/-小鼠血液中CD4阳性的T淋巴细胞占淋巴细胞的约占淋巴细胞群的19%，两组之间也没有显著性的差异性；LFA-1+/+小鼠血液中CD8阳性的T淋巴细胞占淋巴细胞的约占淋巴细胞群的19%，LFA-1-/-小鼠血液中CD8阳性的

T淋巴细胞占淋巴细胞的约占淋巴细胞群的18%，两组之间也没有显著性的差异性。

CD3是T淋巴细胞的总标记物，表示的是T淋巴细胞的数目；CD4是T淋巴细胞亚型具有激活和活化T和B淋巴细胞的功能；CD8是是T淋巴细胞另一个亚型，是效应T细胞，可以直接作用于抗原和细胞。虽然，这三个统计结果是阴性结果，但是却提示我们，淋巴细胞数目增多前提下，T细胞好它的亚型细胞比例并没有下降，提示我们淋巴细胞中T细胞的数目在LFA-1-/-小鼠中血液有所增加。体循环中，T细胞的增加，使得机体处于炎性激活的状态。



**图5** **. 未荷瘤的小鼠血液中T淋巴细胞数目比率统计**

Figure 5. Detection of T cells and Statics

LFA-1+/+小鼠和LFA-1-/-小鼠的血液中检测T细胞所占淋巴细胞的相对比率的统计，纵坐标表示所占淋巴细胞的比率，横坐标分别表示：CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞和

CD3+T淋巴细胞；黑色结果表示LFA-1+/+小鼠组，红色结果表示LFA-1-/-小鼠组。LFA-1+/+小鼠，n=6；LFA-1-/-小鼠，n=6. LFA-1-/-小鼠血液中，CD3、CD4和CD8T细胞数目增多。

**第二部分LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的研究**

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的建立**

在生理条件下，10w的LFA-1-/-小鼠能够发生体循环T细胞增多的比率，肺泡间隔增宽，白细胞的渗出，导致类似纤维样的病理性改变，所以我们提出和探究科学问题：这种炎性的机体和炎性的肺组织的改变是否能够促进肿瘤转移的过程，尤其是肺部组织中？

为了研究这个提出的科学问题，需要建立LFA-1-/-小鼠和LFA-1+/+小鼠在肿瘤肺转移的疾病模型不同的差异和机制，探究是否白细胞在肿瘤的转移过程汇总能够起到关键性作用。因此，我们利用经典的小鼠尾静脉注射肿瘤细胞，饲养

20天时，将小鼠牺牲，取出其肺部来检测肺部肿瘤转移的模型。探究两组小鼠模型的差异包括：检测肺部中肿瘤转移的数目，大小等，如图6。



图6表示，在生理条件下，10w的LFA-1+/+小鼠和LFA-1-/-小鼠接受尾静脉注射B16F10小鼠黑色素瘤细胞系，肿瘤细胞的状态处于指数生长时期，计数并用生理盐水稀释细胞，终浓度为1.0x105个/0.2 ml，操作过程中需要注意细胞的均匀程度，再注射到每只小鼠的尾静脉中（注射后，小鼠处于“荷瘤”状态）。荷瘤后的第20天时，牺牲小鼠，取出两组小鼠的肺部来观察肿瘤的结节的数目和大小。

图6 .尾静脉肺转移的模型表型示意图

Fig6. The model of tumor lung metastasis injected from vein

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的结果**

在给LFA-1-/-小鼠和LFA-1+/+小鼠尾静脉，注射B16F10黑色素瘤细胞后的第

20天时。牺牲两组所有的小鼠，通过直接取材的方式，将小鼠的肺部组织小心取出，用1xPBS小心地清洗上面的血块。再根据组别，归类摆放在白纸上，拍肺转移模型的肺部大体图，如图7A。

图7A可以观察得到，LFA-1-/-小鼠组中小鼠的的肺部黑色结节数目明显多于LFA-1+/+小鼠组的肺部黑色结节数目，其中有部分结节颜色为乳白色。再做观察，可以清晰的发现，LFA-1+/+小鼠组的肺部依然能够看到淡粉红色的正常组织的区域，黑色的结节是以点缀的方式，随机分布在小鼠肺部的不同的肺叶上，而大部分LFA-1-/-小鼠组的肺部组织，此器官的正常的组织区域的样貌难以辨认，各片肺叶实质的大部分都被黑色肿瘤结节所充实，结节的分布方式也难以判别。通过观察也发现肿瘤的大小，也是LFA-1-/-小鼠组的肿瘤大于LFA-1+/+小鼠。

为了验证模型的有效性，我们同样观察了尾静脉注射生理盐水组的两组小鼠的肺部，都呈现粉红色的肺部组织，并发现黑色或者白色的结节（这里没有展示展示）。

图7B为两组小鼠的肺部黑色肿瘤结节的数目统计。分析这个统计的结果，肿瘤在肺部转移的数目，两组小鼠之间有显著性的差异。LFA-1+/+小鼠肺部的结节数目最少的达4个，最多也就达到7个，而LFA-1-/-小鼠的肺部结节数目至少

的都达到24个，最多能达到55个。



以上的实验结果和图7A说明，尾静脉注射肿瘤细胞肺部转移的模型建立成功，且LFA-1-/-小鼠在尾静脉注射肿瘤肺部转移数目明显增多，此类两组之间的差异的表型十分确切。

**图7** **.** 肺转移肺部展示及数目统计

Figure 7. Lung metastasis and Statics

LFA-1+/+小鼠的肺部和LFA-1-/-小鼠肺转移肺部展示及结节数目统计，A，两组小鼠在接受尾静脉注射B16F10黑色素瘤细胞20天后，取材的部分展示；B，A的结果统计，LFA-1+/+小鼠组n=14，LFA-1-/-小鼠组n=15，P<0.05. LFA-1-/-小鼠肺转移肿瘤结节数目增多，肿瘤体积增大。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的生存率研究**

依据文献我们在20天牺牲小鼠，但是尾静脉注射的肿瘤细胞造成的肺转移是否会对LFA-1-/-小鼠的生存率有影响，通过重复模型的实验探究小鼠在荷瘤情况下的生存率。设定LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组各25只，在小鼠出现死亡后计数统计，制作生存曲线，如图8。

图8中展示的实线表示LFA-1+/+小鼠组，而虚线则表示LFA-1-/-小鼠组。实线趋势在随着天数的增加一开始保持平稳，到了30天的时曲线开始下降，到达

60%，说明小鼠出现了死亡且死了10只，其它小鼠死亡，是呈稳定的曲线下降趋势，到42天时曲线到达横坐标轴上，说明小鼠LFA-1+/+小鼠全部死亡；实线趋势在随着天数的增加一开始保持平稳，到了27天的时曲线开始下降，说明小

鼠出现了死亡且死了15只，其它小鼠的死亡，是呈急速的下降曲线趋势，到33天时曲线到达横坐标轴上，说明LFA-1-/-小鼠全部死亡。两组小鼠的中位生存率时间为7天，LFA-1-/-小鼠组的中位生存时间较LFA-1+/+小鼠组显著性减少。

同时从行为学上观察两组小鼠的生存质量，两组小鼠在被观察生存率的期间LFA-1+/+小鼠组几乎行为敏捷，受到外部刺激时能及时做出强烈地应答；而LFA-1-/-小鼠组大部分小鼠的行为呆缓，受到外部刺激时不能及时应答，被动行为显著。（结果没有展示）。

荷瘤后两组小鼠的生存率检测实验的结果检测，显示LFA-1-/-小鼠在同样的时间内，小鼠生存质量较差且死亡率显著性提高。



**图8** **.肺转移模型的生存率**

Figure 8. Survival rate in the model

LFA-1+/+小鼠的和LFA-1-/-小鼠在尾静脉注射肿瘤肺转移的模型下的生存曲线图，黑色的实线表示LFA-1+/+小鼠组，黑色的虚线表示LFA-1-/-小鼠组。LFA-1+/+小鼠组，n=25；LFA-1-/-小鼠组，n=25. LFA-1-/-小鼠荷瘤后生存中位时间减少7天。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型肿瘤进展的研究**

LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的建立成功，为进一步探究肿瘤的发生发展机制打下基础，从注射肿瘤细胞到第20天取出肺部组织这个阶段肿瘤的变化，肿瘤的进程需要我们用实验来探究。

肿瘤肺转移的模型建立是在尾静脉注射肿瘤细胞后20天时，肺部组织肿瘤的结节数目和肿瘤的大小发生了显著性的变化。造成这一结果的原因可能是三种情况：第一种，由于接种数目相同，肿瘤细胞进入机体后，LFA-1-/-小鼠组的肺部肿瘤接种上的数目就多，随着时间的推移肿瘤体积增大；第二种，肿瘤细胞进入机体后，LFA-1-/-小鼠组的肿瘤接种上肺部的数目没有显著性的差异，但是随着时间变化，肿瘤的增殖旺盛，侵袭和迁移增强，导致观察到第20天的肿瘤大小和数目的差异；第三种，就是前二者皆有，肿瘤细胞进入机体后，接种在LFA-1-/-小鼠的肺部肿瘤细胞数目就多，且肿瘤细胞的增殖旺盛。

因此，探究LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型肿瘤进展就十分重要。设计研究实验方案：将荷瘤后的小鼠，在肿瘤进展到20天前的模型进行分段探究，记

为尾静脉注射后肿瘤进展时间：第5天，第10天和第15天，分别来观察肿瘤在肺组织上的进展，包括结节数目和肿瘤大小等，如图9。

图9是将LFA-1-/-小鼠组和LFA-1+/+小鼠组的肺部放置在同一大体图中，分为了三个时间段，从左至右分别为，第5天、第10天和第15天。在同一时间段内分为，上、下两部分：上部分，LFA-1+/+小鼠的肺部的大体图；下部分，LFA-1-/-小鼠的肺部的大体图，两组小鼠在同一时间点对照来做观察比较。

从图9A观察，两组小鼠荷瘤后，第5天时，两组小鼠的肺部肿瘤结节数目并没有太多差别，依据图9D统计结果，LFA-1+/+小鼠的肺部平均结节数目在0.5个，而LFA-1-/-小鼠组平均的结节数目在1.0个，但是统计学上并没有显著性差异。

从图9B观察，两组小鼠荷瘤后，前10天时，两组小鼠的肺部肿瘤结节数目依然并没有太多的差别，依据图9E统计结果，LFA-1+/+小鼠的肺部的平均结节数目在2.7个，而LFA-1-/-小鼠组平均的结节数目在3.2个，但是统计学上并没有显著性差异。

从图9C观察，两组小鼠荷瘤后，第15天时，两组小鼠的肺部肿瘤结节数目大体上就有了显著性地差异。两组小鼠的肺部肿瘤能够在大体上观察区别数目的差异，且肿瘤结节呈现黑色，少部分出现了白色的结节样。LFA-1-/-小鼠组接种的肿瘤和正常肺部组织开始没有明显的界限区分了，体积也增长的很大，最大的结节能够达到半径为0.1cm；而LFA-1+/+小鼠组的肺部肿瘤，还是能够和周围正常组织进行区分开来。

通过对两组小鼠的对比大体图来观察，从数目上比较，LFA-1+/+小鼠的肺部肿瘤数目较少，依据图9F统计结果，平均结节数目在3.8个，LFA-1-/-小鼠组的结果在7.5个，统计学上有显著性差异；从形态上观察，LFA-1-/-小鼠的肿瘤体积较大，黑色的结节和白色的结节分布不均匀，肿瘤的实体区域和周围的正常肺部的区域难以肉眼区分，而LFA-1+/+小鼠的肺部肿瘤结节，体积较小，而且肿瘤实体区域和肺部正常组织区分很明显，如图9C中箭头所指。

在荷瘤后的第10天时两组小鼠肺部肿瘤结节数目和大小没有显著性变化；

而在荷瘤后的第15天时，肿瘤数目和大小发生了显著性地差异性变化；说明在

荷瘤后，第10到第15天内小鼠的肺部转移的肿瘤的进展发生了显著性变化。



探究的实验结果解释了前面提到的假设：可能是接种肿瘤后在，两组肺部的肿瘤数目近似，且在第10天到第15天时，肿瘤的进展突然加剧，使得LFA-1-/-小鼠肺部转移的肿瘤发生了显著性的增加。

**图9** **. 随时间变化的肺部肿瘤结节数目和统计**

Figure 9. The number of tumor nodes time incrementing and Statistics

尾静脉注射B16F10肿瘤细胞后，随肿瘤进程时间的变化，两组小鼠的肺部肿瘤结节数目和它的统计结果；A，荷瘤后的第5天时两组小鼠肺部的肿瘤结节数目大体图；B，

荷瘤后的第10天时两组小鼠肺部的肿瘤结节数目大体图；C，荷瘤后的第15天时两组

小鼠肺部的肿瘤结节数目大体图；D，荷瘤后的第5天时两组小鼠肺部的肿瘤结节数目

统计；E，荷瘤后的第10天时两组小鼠肺部的肿瘤结节数目统计；F，荷瘤后的第15

天时两组小鼠肺部的肿瘤结节数目统计；LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6，

P<0.05。荷瘤后第15天，LFA-1-/-小鼠肿瘤数目增多，肿瘤体积增大。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的细胞增殖的研究**

同时探究随着肿瘤的进展，观察各个时间点的两组小鼠的肺部组织形态和肿瘤细胞增殖的变化。将上述小鼠的肺部组织固定，脱水，包埋，切片后，进行

HE染色和免疫组化anti-Ki67蛋白的检测，如图10。

为了便于观察，我们将低倍镜下放大和高倍镜下放大叠加在一个图中，小区域放大的表示高倍是在低倍下的局部地放大。

图10A表示的是在肿瘤进展后的第5天时，两组小鼠肺部的组织HE染色结果，上部分表示的是LFA-1+/+小鼠组，下部分表示的是LFA-1-/-小鼠组。两组小鼠的肿瘤结节数目在低倍镜下，没有显著性差异改变；放大高倍镜后，高倍镜下也没有显著性的差异。

图10B表示的是在肿瘤进展后的第10天后，两组小鼠肺部的组织HE染色结果，上部分表示的是LFA-1+/+小鼠组，下部分表示的是LFA-1-/-小鼠组。两组小鼠的肿瘤结节数目在低倍镜镜下，依然没有显著性差异改变；放大高倍镜后，高倍镜下也没有显著性的差异。

前两个时间点的HE染色的实验结果提示说：两组小鼠荷瘤后第5天到第10

天内的肺部转移的肿瘤数目和大小并没有发生显著性改变。

图10C表示的是在肿瘤进展后的第15天，两组小鼠肺部的组织HE染色结果，上部分表示的是LFA-1+/+小鼠组，下部分表示的是LFA-1-/-小鼠组。两组小鼠的肿瘤结节数目在镜下，有了显著性的差异。LFA-1+/+小鼠组的肿瘤结节数目在低倍镜下平均约是5个，半径虽然较之前有所增长，但是和LFA-1-/-小鼠组相比明显较小；肿瘤结节周围的正常肺组织结构清晰可见，癌巢与癌旁分界清晰，大多呈现圆形的结节病灶；LFA-1-/-小鼠组的肺部转移的肿瘤结节数目在低倍镜下是平均约是8个，较之前两个时间点，很显著的增加了肿瘤结节的数目和肿瘤体积的大小；肿瘤结节周围的正常肺组织结构不能被清洗的分辨开来，为癌巢与癌旁分界不清晰，同时镜下发现了两个肿瘤癌巢共边的情况。

荷瘤后，肿瘤的进程的各个时间点的HE染色的结果，符合上述的大体图的观察。结果证实：第在荷瘤后的第10天到第15天时，肿瘤的进展加剧，使得LFA-1-/-小鼠肺部转移的肿瘤数目发生了显著性的增加，体积显著性增大，肿瘤的恶性程度也增加了。

图10D~图10F分别表示的是在肿瘤进展后的第5天、第10天和第15天的两组小鼠肺部的组织免疫组化anti-Ki67蛋白的结果，上部分表示的是LFA-1+/+小鼠组，下部分表示的是LFA-1-/-小鼠组染色结果。

观察荷瘤后第5天的结果，LFA-1-/-小鼠的肿瘤区域部分就有显著性的黄褐色阳性细胞，而LFA-1+/+小鼠的增殖比率没有那么显著，只有很少部分的黄褐色阳性细胞。依据图10G的统计结果，LFA-1+/+小鼠组的平均增殖比率为：9.6%；LFA-1-/-小鼠组的增殖比率为：17.4%，且LFA-1-/-小鼠肺部肿瘤细胞的增殖比率较LFA-1+/+小鼠组有所上调且有显著性的差异。

观察荷瘤后第10天的结果，LFA-1-/-小鼠的肿瘤区域部分就有显著性的黄褐色阳性细胞，而LFA-1+/+小鼠的黄褐色阳性细胞也有所增加，比率依然不够多。依据图10H的统计结果，LFA-1+/+小鼠组的平均增殖比率为，37.6%；LFA-1-/-小鼠组的增殖比率为，64.4%，且LFA-1-/-小鼠肺部肿瘤细胞的增殖比率较LFA-1+/+小鼠组有所上调且有显著性的差异。

观察荷瘤后第15天的结果，LFA-1+/+小鼠的黄褐色阳性细胞增加显著；LFA-1-/-小鼠的肿瘤区域部分就有显著性的黄褐色阳性细胞，而且较LFA-1+/+小鼠组比率较高。依据图10I的统计结果，LFA-1+/+小鼠组的平均增殖比率为，65.6%；LFA-1-/-小鼠组的增殖比率为，80.4%，且且LFA-1-/-小鼠肺部肿瘤细胞的增殖比率较LFA-1+/+小鼠组有所上调且有显著性的差异。

上述的免疫组化检测Ki67蛋白的结果表明，荷瘤后两组小鼠的肿瘤细胞增殖在第5天时就出现了显著性的差异，且LFA-1-/-小鼠组的转移的肿瘤细胞的增殖上调。虽然HE染色的结果显示没有数目和体积大小的变化，两组小鼠的转移的肿瘤细胞却在增殖能力上发现生了显著性的差异提示我们肿瘤的增殖和生长需要时间的积累；同时是需要机体内肺部组织提供更好的肿瘤生长的微环境。



**图10** **. 肿瘤进程时H&E染色免疫组化Ki67结果和统计**

Figure 10. H&E staining and IHC Ki67 time incrementing and Statistics

荷瘤后随时间变化的两组小鼠的H&E染色和免疫组化anti-Ki67结果和统计；A，荷瘤后第5天时，两组小鼠肺部的H&E染色；B，荷瘤后第10天时，两组小鼠肺部的H&E染色；C，荷瘤后第15天时，两组小鼠肺部的H&E染色；D，荷瘤后第5天时，两组小鼠肺部的肿瘤anti-Ki67结果；E，荷瘤后第10天时，两组小鼠肺部的肿瘤anti-Ki67结果；F，荷瘤后第15天时，两组小鼠肺部的肿瘤anti-Ki67结果；G，D的结果统计；

H，E的结果统计；I，F的统计；H&E放大倍数40倍和200倍，Ki67免疫组化放大倍数200倍。LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6，\*P<0.05，\*\* P<0.05, \*\*\*P<0.05。荷瘤后肿瘤进程中，LFA-1-/-小鼠肺部转移肿瘤在各个时间点上，增比率增加。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的MMP2和MMP9的研究**

两组小鼠荷瘤后，在观察肺部转移的肿瘤进程时，两组小鼠的肿瘤细胞增殖能力的差异提示我们，是否肿瘤的侵袭能力也有显著性差异。为此我们探究两组小鼠的肺部肿瘤细胞侵袭能力，如图11。

文献指出，基质金属蛋白酶2（MMP2）和基质金属蛋白酶9（MMP9）能降解细胞外基质(ECM)中的各种蛋白成分，破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障，在肿瘤侵袭转移中起关键性作用，肿瘤组织的侵袭和迁移离不开他们的分泌。很多实体肿瘤中MMP2和MMP9的表达水平明显升高，且与这个肿瘤的的进展和转移有密切关系；肿瘤组织中MMP2和MMP9的两者表达水平呈显著正相关；检测肿瘤组织中MMP2和MMP9的表达表达较高，肿瘤转移的几率越大，机体的预后将更差。

为了便于观察，我们将低倍镜下放大和高倍镜下放大叠加在一个图中，小区域放大的表示高倍对低倍下放大的局部放大。

图11A~图11C分别表示的是在荷瘤后肿瘤的进程过程中第5天、第10天和第15天时，两组小鼠肺部肿瘤组织免疫组化MMP2的结果，上部分表示的是LFA-1+/+小鼠组，下部分表示的是LFA-1-/-小鼠组。

第5天时，结果显示，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的黄褐色阳性蛋白表达量不够明显，都没有显著性表达的区域。

第10天时，结果显示，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的黄褐色阳性蛋白表达量不够明显，都没有显著性表达的区域。

第15天时，结果显示，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的黄褐色阳性细胞都有显著性的升高；且LFA-1-/-小鼠组的肿瘤实质部分大部分都是黄褐色的阳性蛋白表达的部分，说明肿瘤细胞在大量表达MMP2表达，且比LFA-1+/+小鼠组显著性的增加。说明荷瘤后在肿瘤进程的第15天时，两组小鼠的MMP2表达量有提高，且LFA-1-/-小鼠组的MMP2表达较LFA-1+/+小鼠组在肿瘤组织的周围有

显著性的提高，表明LFA-1-/-小鼠组肿瘤细胞的侵袭能力更强。

图11D~图11F分别表示的是在荷瘤后肿瘤的进程过程中第5天、第10天和第15天时，两组小鼠肺部肿瘤组织免疫组化MMP9的结果，上部分表示的是LFA-1+/+小鼠组，下部分表示的是LFA-1-/-小鼠组。

第5天时，结果显示，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的黄褐色阳性蛋白表达量不够明显，都没有显著性表达的区域。

第10天时，结果显示，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的黄褐色阳性蛋白表达量不够明显，都没有显著性表达的区域。

第15天时，结果显示，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的黄褐色阳性细胞都有显著性的升高；且LFA-1-/-小鼠组的肿瘤实质部分大部分都是黄褐色的阳性蛋白表达的部分，说明肿瘤细胞在大量表达MMP9表达，且比LFA-1+/+小鼠组显著性的增加。说明荷瘤后在肿瘤进程的第15天时，两组小鼠的MMP9表达量有提高，且LFA-1-/-小鼠组的MMP9表达较LFA-1+/+小鼠组在肿瘤组织的周围有显著性的提高，表明LFA-1-/-小鼠组肿瘤细胞的侵袭能力更强。

探究两组小鼠的肺部肿瘤细胞侵袭能力，得到的MMP2和MMP9的免疫组化的结果表明：在荷瘤后，肿瘤细胞在肿瘤的进程中，第5天和第10天时，并没有分泌较多的的MMP2和MMP9蛋白，可能是由于这个阶段肿瘤细胞是有增殖的表达，而没有太多侵袭的需要；而是到了肿瘤体积足够大的第15天时，肿瘤细胞分泌了大量的MMP2和MMP9蛋白，加快了肿瘤发展的进程，帮助肿瘤自身地侵袭。

荷瘤后，LFA-1-/-小鼠组的肺部肿瘤中在第15天时较LFA-1+/+小鼠组表达

MMP2和MMP9蛋白量显著性增多，提示我们，LFA-1-/-小鼠的肺部微环境能够促进肿瘤细胞的侵袭。



**图11** **. 肿瘤进程时肺部免疫组化MMP2和MMP9的结果**

Figure 11. IHC MMP2 and MMP9 tumor incrementing

荷瘤后随肺部肿瘤进程的两组小鼠的肿瘤细胞免疫组化MMP2和MMP9的结果；A，荷瘤后第5天时，两组小鼠肺部的肿瘤细胞免疫组化MMP2的结果；B，荷瘤后第10天时，两组小鼠肺部的肿瘤细胞免疫组化MMP2的结果；C，荷瘤后第15天时，两组小鼠肺部的肿瘤细胞免疫组化MMP2的结果；D，荷瘤后第5天时，两组小鼠肺部的肿瘤细胞免疫组化MMP9的结果；E，荷瘤后第10天时，两组小鼠肺部的肿瘤细胞免疫组化MMP9的结果；F，荷瘤后第15天时，两组小鼠肺部的肿瘤细胞免疫组化MMP9的结果；免疫组化放大倍数分别为40倍和200倍。LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠MMP2和MMP9表达增加。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的血管微密度的研究**

荷瘤后的第15天作为肺部转移的肿瘤发展的重要的进展时间点，将此时的两组小鼠的肺部肿瘤组织切片进行了血管微密度探究。

首先，观察左边区域的上图表示的是LFA-1+/+小鼠组的肺部肿瘤在15天时检测的CD31的表达情况，绿色的荧光表示的是CD31，蓝色则表示的DAPI；下图则表示的LFA-1-/-小鼠组表达。上图中蓝色DAPI比较密集地部位是中间一块，但是下图则是靠近中间偏左下的一部分，这些蓝色密集地区域表示肿瘤细胞的核，同样表示肿瘤细胞的位置。绿色的CD31，在LFA-1+/+小鼠组中的肿瘤区域呈现星星点点的表达，不够密集；但是LFA-1-/-小鼠组的绿色的表达很密集，荧光表达数目显著性的比LFA-1+/+小鼠组的增多。结果提示：标记血管的CD31蛋白在两组小鼠的肺部肿瘤中都呈现出表达，且LFA-1-/-小鼠组的表达量较LFA-1+/+小鼠组上调，进一步表示微血管密度（MVD）在LFA-1-/-小鼠组的肿瘤癌巢中显著性的高表达，为肿瘤的增殖和侵袭提供了丰富的血液和营养。



**图12** **. 荷瘤后第15天时肺部肿瘤中免疫荧光CD31的表达**

Figure 12. IF CD31 of the tumor at the 15 day

荷瘤后第15天时小鼠的免疫荧光CD31表达结果；蓝色表示DAPI；绿色表示CD31. A，LFA-1+/+小鼠肺部肿瘤中CD31的表达量；B，LFA-1-/-小鼠肺部肿瘤中CD31的表达量；LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠肺部转移肿瘤中，微血管密度增加。

**第三部分LFA-1-/-小鼠荷瘤后免疫微环境的改变**

LFA-1 是白细胞上的一类黏附分子，影响了白细胞的对抗原递呈细胞的黏附，白细胞作为免疫过程中的重要的因素。同样，肿瘤作为一类带有抗原的细胞，免疫系统的监视和免疫细胞的杀伤。研究机体对肿瘤的免疫监视和机体的免疫缺失都会对肿瘤的发生发展的进程产生影响。提出科学问题：LFA-1-/-小鼠荷瘤后，是怎么样影响了白细胞对肿瘤的作用，根据血液常规检测的结果提示研究的主要是白细胞中淋巴细胞。巨噬细胞在肿瘤的免疫研究过程中总是扮演者重要的因子作用，所以肿瘤中巨噬细胞的作用也是探究的重点。

因此，设计实验，来探究LFA-1-/-小鼠荷瘤后免疫微环境的改变：T细胞亚型的标记物分别是CD4和CD8蛋白，CD3表示的是总T细胞都表达的蛋白；B细胞的标记物是CD19，活化的巨噬细胞的标记物主要是F4/80，。通过流式细胞术将荷瘤后，两组小鼠的血液、脾脏和肺部转移的肿瘤部位的白细胞标记上这些抗体，来探究免疫系统微环境的改变。

**LFA-1-/-小鼠荷瘤后血液中T细胞、B细胞和巨噬细胞的变化**

在两组小鼠荷瘤后的第15天时，我们将小鼠牺牲分别取两组小鼠的抗凝全血做流式细胞术的处理，经标记抗体（anti-CD3+—PE，anti-CD4+—FITC，anti-CD8+—APC，anti-CD19+—APC-Cy7；anti-F4/80+—PE-Cy7；

anti-CD45+—Vivoblue）；去除红细胞；清洗；制成可被检测的单细胞悬液；送检至流式细胞仪中检测，结果统计按照细胞数目的比率百分比及统计的结果如图13。结果的展示是通过设门，在CD45的前提下，且在设门CD3的前提下检测

CD4和CD8是。

图13A表示的是纵坐标为CD3+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD3+细胞略有增加，

但是没有显著性的比率上调，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为

5.22%，LFA-1-/-小鼠组为2.70%，比率上是有所下降的，说明在小鼠荷瘤后的第

15天时，血液中CD3+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图13B表示的是纵坐标为CD4+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD4+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为3.82%，LFA-1-/-小鼠组为0.782%，比率上是下降的，但是结合图13F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，血液中CD4+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图13C表示的是纵坐标为CD8+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD8+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组1.5%，LFA-1-/-小鼠组0.248%，比率上是下降的，但是结合图13F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，血液中CD8+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图13D表示的是纵坐标为CD19+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD19+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为5.49%，LFA-1-/-小鼠组为1.45%，比率上是下降的，但是结合图9F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差2异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，血液中CD19+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图13E表示的是纵坐标为F4/80+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的F4/80+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为3.00%，LFA-1-/-小鼠组为0.548%，比率上是下降的，但是结合图13F的结果来看有下降趋势但是没有显

著性差异，说明小鼠在荷瘤后的第15天时，血液中F4/80+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图13F是图A，B，C，D，E的流式细胞术的统计结果图，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组各有6个样本量，符合流式细胞术检测的数目，其中LFA-1+/+小鼠组的统计百分比结果用黑色表示，而LFA-1-/-小鼠组则用红色柱状图。反映了两组小鼠虽然在免疫细胞上有明显的下降趋势但是在统计结果内却没有显著性的差异变化。尤其是CD4+，CD8+，F4/80+的细胞下降趋势明显，表明在小鼠在荷瘤后的第15天时，LFA-1-/-小鼠组的血液中较LFA-1+/+小鼠组的CD4+和

CD8+T细胞都有所下降，B细胞和活化的巨噬细胞也同样的下降较为明显。



**图13** **.荷瘤后小鼠血液中免疫细胞数目比率及统计**

Figure 13. Detection immune cells of blood with tumor injected and Statics

荷瘤后两组小鼠的血液中检测免疫细胞所占相对比率的统计。A，CD3+T淋巴细胞；B，

CD4+T淋巴细胞；C，CD8+T淋巴细胞；D，CD8+T淋巴细胞；E，CD8+T淋巴细胞；F，统计结果；免疫细胞变化趋势不明显，统计的结果在两组小鼠血液中都没有明显的差异。LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6，P<0.05。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠

B细胞、T细胞和巨噬细胞在血液中有下降趋势。

**LFA-1-/-小鼠荷瘤后脾脏中T细胞、B细胞和巨噬细胞的变化**

脾脏作为最大最为重要的淋巴器官，其不与淋巴管道可以直接相连的，没有淋巴窦，但是有大量的血窦。其结构和各类淋巴细胞分布的特征大家都十分熟悉了。主要的功能是：1）是免疫细胞的居住和产生应答的重要场所，脾的功能和它对抗原刺激的应答的过程是血源性抗原产生的应答的主要场所；2）全身血液的重要滤器官，在脾脏中红髓中巨噬细胞负责清除血液中的外来的抗原及发生突变和衰老的自身细胞等；3）脾脏能够贮存和调节血量。

所以在给在两组小鼠荷瘤后的第15时，我们牺牲小鼠后立即取材，将脾脏从腹部取出，分为LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组。做流式细胞术的处理过程中类似上述的方法，但是由于是实体器官组织需要将功能细胞和其中的结缔组织区分开来，应用无菌的75um的虑孔，将功能细胞和结缔组织分开，且操作过程需要注意脾脏的碾磨充分，其它操作为标记抗体（anti-CD3+—PE，

anti-CD4+—FITC, anti-CD8+—APC, anti-CD19+—APC-Cy7 ;

anti-F4/80+—PE-Cy7；anti-CD45+—Vivoblue）；去除红细胞；清洗；制成可被检测的单细胞悬液；送检至流式细胞仪中检测，结果统计按照细胞数目的比率百分比及统计的结果如图14。

图14A表示的是纵坐标为CD3+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域没有显著性的差异改变，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为1.18%，LFA-1-/-小鼠组为1.71%，比率上是有所上升的，但结果却是说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中CD3+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图14B表示的是纵坐标为CD4+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD4+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为0.678%，LFA-1-/-小鼠组为1.66%，比率上是有所上升的，但是结合图14F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，但结果却是说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中CD4+细胞没

有显著性改变在两组小鼠中。

图14C表示的是纵坐标为CD8+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD8+细胞上调幅度不大，选中区域的阳性细胞没有明显改变，再看数值统计左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为0.437%，LFA-1-/-小鼠组为0.578%，比率上是上升微乎其微的，结果说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中CD8+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图14D表示的是纵坐标为CD19+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD19+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为1.59%，LFA-1-/-小鼠组为1.77%，比率上是下降的，但是结合图14F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中CD19+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图14E表示的是纵坐标为F4/80+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的F4/80+细胞有显著性上升，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为11.3%，LFA-1-/-小鼠组为

16.0%，比率上是上升的，再结合图14F的结果来看有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中F4/80+细胞有显著性改变在两组小鼠中。F4/80+细胞主要标记的是小鼠活化的巨噬细胞，一旦巨噬细胞被激活就能表达F4/80，被检测到。上述结果中提到，在脾脏中红髓中巨噬细胞负责清除血液中的外来的抗原及发生突变和衰老的自身细胞等，作为我们初步对巨噬细胞在脾脏中显著性上升的解释：肿瘤细胞进入体循环中，随着时间变化被免疫的白细胞识别，暴露出抗原。同时免疫器官脾脏发挥作用，目的是来清除血液中的肿瘤细胞和其它抗原。但是由于基因的改变，LFA-1-/-小鼠的脾脏在肿瘤进入血液后和其它抗原的作用下，使得巨噬细胞的激活增多显著性大于LFA-1+/+小鼠组。这些流式统计的结果提示我们巨噬细胞的作用可能是清除抗原和激活炎症。

图14F是图A，B，C，D，E的流式细胞术的统计结果图，其中LFA-1+/+小鼠组的统计百分比结果用黑色表示，而LFA-1-/-小鼠组则用红色柱状图。反映了两组各小鼠虽然在这些白细胞上有明显的下降趋势但是在统计结果内却没有显著性的差异变化。尤其是CD4+的T细胞上升趋势明显，且是小鼠各组间个体之间差异较为显著；F4/80+的细胞差异性显著。流式统计的结果表明在两组小鼠在荷瘤后的第15天时，LFA-1-/-小鼠组较LFA-1+/+小鼠组的脾脏中的CD4+ T细胞有所上调，活化的巨噬细胞也同样的上调显著。



**图14** **.荷瘤后第15天时小鼠脾脏中免疫细胞数目比率及统计**

Figure 14. Detection immune cells of spleen with tumor injected and Statics at 15days

两组小鼠荷瘤后第15天时脾脏中检测免疫细胞所占相对比率的统计。A，CD3+T淋巴细胞；B，CD4+T淋巴细胞；C，CD8+T淋巴细胞；D，CD8+T淋巴细胞；E，CD8+T淋巴细胞；F，A、B、C、D、E的流式图的统计结果；LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6，P<0.05。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠B细胞、T细胞和巨噬细胞在脾脏中有上升趋势，其中F4/80巨噬细胞上调显著。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的T细胞、B细胞和巨噬细胞的变化**

荷瘤后，肺部转移的肿瘤的大小和其发生发展与肺部中的免疫细胞的数量和活性密切相关。既然LFA-1-/-小鼠组在血液中没有显著性的差异，但是相对

LFA-1+/+小鼠组在脾脏中的巨噬细胞有明显的提升。之前的实验结果也提示我们，LFA-1-/-小鼠的肺部的白细胞数目就显著性升高较LFA-1+/+小鼠组。那么是否是在荷瘤后，出现肺部转移的过程中白细胞也会影响肿瘤的发生发展呢？

为了探究小鼠荷瘤后，肿瘤发生肺部转移过程中的白细胞的变化，我们通过观察小鼠的肺部的组织中肿瘤内的主要的免疫细胞的数量变化。在同一批小鼠的处理过程中，我们取LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠各新鲜组织的肺部，加入相应的流式中的消化酶，将肺部的结缔组织消化，使得组织中的其它细胞可以被制作成单细胞悬液，经过流式细胞仪检测出来。

简述标记过程：在小鼠荷瘤后的15天时，我们牺牲小鼠后立即取材，将整个肺部从胸腔中取出，分为LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组，用1xPBS清洗表面的血液，经过消化酶37℃水浴消化45min，再应用无菌的75um的虑孔，将功能细胞和结缔组织分开，混匀悬浮液，吸取等量的再做抗体的标记

（anti-CD3+—PE, anti-CD4+—FITC, anti-CD8+—APC, anti-CD19+—APC-Cy7; anti-F4/80+—PE-Cy7）；清洗；制成可被检测的单细胞悬液；送检至流式细胞仪中检测，结果统计按照细胞数目的比率百分比及统计的结果如图15。

图15A表示的是纵坐标为CD3+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域有上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为13.8%，LFA-1-/-小鼠组为8.32%，比率上是有所下降的，但是结合图15F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，结果说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肿瘤中CD3+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图15B表示的是纵坐标为CD4+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD4+细胞有显著性上升，但左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为9.19%，LFA-1-/-小鼠组为5.98%，比率上是有所下降的，但是结合图15F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，结果说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肿瘤中CD4+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图15C表示的是纵坐标为CD8+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD8+细胞上调幅度不大，选中区域的阳性细胞没有明显改变，再看数值统计左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组3.57%，LFA-1-/-小鼠组2.64%，比率上是下降的，但是结合图15F的结果来看有下降趋势但是没有显著性差异，可能这种差异是由于个体差异较大造成的结果。

图15D表示的是纵坐标为CD19+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的CD19+细胞有略微的上调，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为4.20%，LFA-1-/-小鼠组为5.89%，比率上是上调的，但是结合图15F的结果来看有上趋势但是没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肿瘤CD19+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图15E表示的是纵坐标为F4/80+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。对照着LFA-1+/+小鼠组的流式分析结果图来看，LFA-1-/-小鼠组的F4/80+细胞有显著性下降，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为13.0%，LFA-1-/-小鼠组为

6.45%，比率上是下降的，再结合图15F的结果来看没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肿瘤中F4/80+细胞没有显著性改变在两组小鼠中。但是和之前的脾脏结果没有联系，甚至是下降的趋势，所以根据实验结果分析，这些被标记的白细胞的比率在接种肿瘤后没有对肿瘤转移的肺部的发展起着决定性的作用。

图15F是图A，B，C，D，E的流式细胞术的统计结果图，其中LFA-1+/+小鼠组的统计百分比结果用黑色表示，而LFA-1-/-小鼠组则用红色柱状图。反映了两组小鼠虽然在免疫细胞上有明显的上升和下降趋势但是在统计结果内却没有显著性的差异变化。观察CD8+的T细胞的数据结果，CD8+的T细胞是对肿瘤直接杀伤的一类T细胞，LFA-1-/-小鼠组虽然在表达上有所下降，但是数据的统计的结果却是没有显著性的差异的，统计图的结果观察，LFA-1-/-小鼠组的组内差

异变化不大，但是LFA-1+/+小鼠组的组内差明显，导致统计的结果没有显著性差异，下降的幅度也不是很明显。这样就可以解释可能由于LFA-1-/-小鼠组CD8+T细胞对肿瘤的监视和杀伤不如LFA-1+/+小鼠的强度大。F4/80+细胞的变化也较为显著，但是没有统计学差异，组内直接的差异比较大，所以也没有显著性差异，巨噬细胞在肿瘤中可以扮演多种角色，但是下降的趋势提示我们，巨噬细胞的减少对于肿瘤的发展可能对肿瘤转移肺部的发生发展有影响。



**图15** **.荷瘤后第15天时小鼠肿瘤中免疫细胞数目比率及统计**

Figure 15. Detection immune cells of tumor with tumor injected and Statics at 15 days

两组小鼠荷瘤后第15天时肿瘤中检测免疫细胞所占相对比率的统计。A，CD3+T淋巴细胞；B，CD4+T淋巴细胞；C，CD8+T淋巴细胞；D，CD8+T淋巴细胞；E，CD8+T淋巴细胞；F，A、B、C、D、E的流式图的统计结果；LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6，P<0.05。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠CD8+T细胞在肿瘤中有下降趋势。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的T细胞相关免疫细胞变化**

在探究T细胞和巨噬细胞的过程中，我们发现了，CD4+和CD8+的T细胞的和F4/80+细胞的改变较为显著。和CD4+, CD8+细胞相关的细胞有调节性T细胞

（Treg），CD4+T细胞的亚型Th17细胞。

Treg细胞是调节性T细胞(Regulatory cell, 简称Treg)，是一类控制体内，自身免疫反应性的T细胞亚群。调节性T细胞与自身免疫性疾病的发生关系密切，其异常表达可导致自身免疫性疾病。它能够在转录因子Foxp3的启动下，由

CD4+; CD25+T细胞转变成Treg细胞，能够抑制其它T细胞的增殖和活性，从而影响它们在组织中含量。由于CD4+和CD8+的T细胞在脾脏和肺部肿瘤组织中，改变都有很大的趋势，探究Treg的改变，对于活性CD4+和CD8+T细胞的改变是一种佐证。

Th17细胞是由TH0细胞在IL-6和IL-23的刺激下分化而成的辅助性T细胞，主要分泌IL-17、IL-22等促炎症因子，ROR-γ是其重要的转录因子。TH17细胞在自身免疫中起重要的作用。Th17细胞的主要效应因子是IL-17. IL-17是一种主要由活化的T细胞产生的致炎细胞因子，可以促进T细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子如IL-6、IL-8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和化学增活素及细胞黏附分子1(cellular adhesion molecule 1, CAM-1)，从而导致炎症的产生。IL-17是T细胞诱导的炎症反应的早期启动因子，可以通过促进释放前炎性细胞因子来放大炎症反应。Th17细胞能够分泌产生IL-17A、IL-17F、IL-6以及a肿瘤坏死因子(tumor necrosis factora, TNF-a)

等，这些细胞因子可以集体动员、募集及活化中性粒细胞。Th17细胞产生的IL-17能有效地介导中性粒细胞动员的兴奋过程，从而有效地介导了组织的炎症反应。炎症的发生发展对于肿瘤的发生发展起着重要的作用：像是炎症信号通路

NF-kb，激活后在很多实验中被证实能够促进肿瘤的发生发展。探究Th17细胞的方式就是研究IL-17的含量是否改变，有助于我们对实验中小鼠的炎症反应的判别。

在两组小鼠荷瘤后的第15天，我们牺牲小鼠后立即取材，将整个肺部从胸

腔中取出，用1xPBS清洗血液，经过消化酶37℃水浴消化45min；和将脾脏从腹部取出来；分为LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组。对消化好的肿瘤肺部组织和脾脏组织碾磨，再应用无菌的75um的虑孔，将功能细胞和结缔组织分开，混匀悬浮液，吸取等量的加入刺激剂和阻滞剂，再做抗体的标记，经标记抗体

(anti-CD3+—PE, anti-CD4+—FITC, anti-CD8+—APC, anti-CD25+—APC-Cy7 ;

anti-Foxp3+—PE-Cy7; anti-IL-17A+—Vivogreen; anti-IFN-γ+—Vivoblue；

anti-CD45+—APC-Cy5.5）；加入固定破膜剂；清洗；制成可被检测的单细胞悬液；送检至流式细胞仪中检测，结果统计按照细胞数目的比率百分比及统计的结果如图16。

图16A表示的是纵坐标为Foxp3+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，是在选中CD4+；CD25+条件下，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。流式结果观察，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域都没有显著性的细胞，阳性细胞含量都较少，右边的选中的区域下，比左边LFA-1+/+小鼠组的区域荧光强度含量有上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为0.245%，LFA-1-/-小鼠组为0.604%，比率上是有所上升的，但是结合图16D的结果来看，是没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肺组织中Treg细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图16B表示的是纵坐标为IFN-γ+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，是在选中CD45+条件下，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。流式结果观察，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域都有显著性的细胞，阳性细胞含量都很多，右边的选中的区域下，比左边LFA-1+/+小鼠组的区域荧光强度含量有显著性的上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为4.74%，LFA-1-/-小鼠组为10.3%，数值上比率上是有显著性上升的，结合图16D的结果来看，且统计学有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肺组织中分泌IFN-γ的白细胞细胞有显著性改变在两组小鼠中。

图16C表示的是纵坐标为IL-17+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，是在选中CD4+条件下，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表

示LFA-1-/-小鼠组。流式结果观察，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域都有显著性的细胞，阳性细胞含量都很多，右边的选中的区域下，比左边LFA-1+/+小鼠组的区域荧光强度含量有显著性的上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为4.25%，LFA-1-/-小鼠组为5.32%，数值上比率上是有上升的趋势，结合图16D的结果来看，且统计学有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，肺组织中Th17细胞细胞有显著性改变在两组小鼠中。

图16E表示的是纵坐标为Foxp3+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，是在选中CD4+；CD25+条件下，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。流式结果观察，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域都没有显著性的细胞，阳性细胞含量都较少，右边的选中的区域下，比左边LFA-1+/+小鼠组的区域荧光强度含量有上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为0.151%，LFA-1-/-小鼠组为0.209%，比率上是有所上升的，但是结合图16H的结果来看，是没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中Treg细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图16F表示的是纵坐标为IFN-γ+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，是在选中CD45+条件下，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。流式结果观察，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域都有显著性的细胞，阳性细胞含量都很多，右边的选中的区域下，比左边LFA-1+/+小鼠组的区域荧光强度含量有上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为9.74%，LFA-1-/-小鼠组为11.1%，数值上比率上是有上升的趋势的，但是结合图16H的结果来看，统计学却没有显著性差异，说明在小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中分泌IFN-γ的白细胞细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

图16G表示的是纵坐标为IL-17+的细胞数目，横坐标表示侧向角细胞的颗粒大小SSC，是在选中CD4+条件下，左边的图表示LFA-1+/+小鼠组，右边的图表示LFA-1-/-小鼠组。流式结果观察，LFA-1-/-小鼠组的阳性的细胞数目区域和LFA-1+/+小鼠组的阳性数目区域都有显著性的细胞，阳性细胞含量都很多，右边

的选中的区域下，比左边LFA-1+/+小鼠组的区域荧光强度含量有显著性的上升的趋势，左右两图的比率结果分别为，LFA-1+/+小鼠组为6.01%，LFA-1-/-小鼠组为

7.02%，数值上比率上是有上升的趋势，但是结合图16H的结果来看，统计学却没有显著性差异，说明在两组小鼠荷瘤后的第15天时，脾脏中Th17细胞细胞没有显著性改变在两组小鼠中。

流式的实验的结果提示：在荷瘤后的第15天时，两组小鼠的脾脏和肿瘤中

Foxp3+的Treg细胞没有显著性的改变；LFA-1-/-小鼠组分泌IL-17A和IFN-γ 的

Th17和巨噬细胞等较LFA-1+/+小鼠组在肺部转移的肿瘤都有显著性上调，IL-17A和IFN-γ在脾脏中有上调的趋势但是没有显著性的差异可能是小鼠组内差异比较明显。解释提出的科学问题，改变了肿瘤环境中的炎症细胞数目来影响肿瘤的发生发展，促进了肿瘤在肺部的转移和生长。



**图16** **.荷瘤后的第15天小鼠肿瘤和脾脏中特定免疫细胞数目比率及统计**

Figure 16. Detection cells of tumor and spleen with tumor injected and Statics

荷瘤后的第15天小鼠肿瘤和脾脏中特定免疫细胞数目比率及统计。A，Foxp3+Treg细胞；

B，分泌IFN-γ的细胞；C，Th17细胞；D，统计脾脏中的数目比率结果；E，Foxp3+Treg细胞；F，分泌IFN-γ的细胞；G，Th17细胞；H，统计肺部转移的肿瘤中的数目比率结果；LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6，P<0.05。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠肿瘤中，IL-17A和IFN-γ表达显著性上调。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的肿瘤中巨噬细胞研究**

巨噬细胞作为研究肿瘤免疫的重点，在流式结果中没有显著性的改变，那么通过其他技术方式来探究肿瘤中的巨噬细胞就很有必要性，应用免疫荧光的研究技术，来探究两组小鼠荷瘤后的第15天时肺部肿瘤进程中，巨噬细胞的变化。

如图16

将两组小鼠的肺部肿瘤切片染上巨噬细胞的抗体anti-CD68，经染DPAI后封片后拍照。图16左边为LFA-1+/+小鼠组，可见的绿色的荧光表示的是CD68表达，它是膜蛋白会包裹在核的外；DAPI是蓝色的，能够和绿色的膜呈现出一个细胞的形态。由于石蜡的切片中，背景较深，表达较为亮的则是有效表达，暗处的绿色则是背景；蓝色则表示的细胞核。右图则表示的LFA-1-/-小鼠组的CD68同DAPI的表达。



LFA-1+/+小鼠组中蓝色的区域比较密集地部位是中间偏右下角，但是LFA-1-/-小鼠组中则是整个部分，这里密集的区域表示肿瘤的癌巢。CD68作为巨噬细胞膜上表达的一种蛋白，常用它与其它白细胞和肿瘤细胞区分开来；在LFA-1+/+小鼠组中的肿瘤的区域有包绕着的巨噬细胞只有6个，同时LFA-1-/-小鼠组的数量表达很密集，达到了23个，两组小鼠的CD68标记的巨噬细胞数目有显著性的差异。这一实验结果解释：荷瘤后的第15天时，巨噬细胞在LFA-1-/-小鼠组较LFA-1+/+小鼠组的肺部肿瘤中浸润的更多。就有可能释放更多的炎症细胞因子，为肿瘤的发展和侵袭提供了有利的微环境。

**图17** **. 荷瘤后第15天时肺部肿瘤中免疫荧光CD68的表达**

Figure 17. IF CD68 of the tumor at the 15 day

荷瘤后第15天时小鼠的免疫荧光CD68表达结果；蓝色表示DAPI；绿色表示CD68. A，LFA-1+/+小鼠肺部肿瘤中CD68的表达量；B，LFA-1-/-小鼠肺部肿瘤中CD68的表达量；LFA-1+/+小鼠组，n=6；LFA-1-/-小鼠组，n=6。荷瘤后第15天时，LFA-1-/-小鼠CD68标记的巨噬细胞数目增加。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的炎症相关细胞因子的变化**

肿瘤中巨噬细胞可能是作用在荷瘤后，两组小鼠肺部转移的肿瘤内部重要的一类白细胞，结合文献的提示：巨噬细胞能够促进局部炎症的发展，炎症的发生发展对于肿瘤的侵袭和转移，肿瘤的进程有着密切的关系。

炎症的定义具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的防御反应为炎症。虽然单细胞动物和其它无血管的多细胞动物对损伤因子也可发生反应，例如吞噬反应或其它清除有害因子的反应，但这些都不能称为炎症。只有当进化到具有血管的机体，才具有以血管反应为主要特征，同时又保留上述吞噬和清除等反应的复杂而又完善的炎症过程。因此，从进化角度看，血管反应是炎症过程的中心环节。在炎症过程中，一方面损伤因子直接和间接造成组织和细胞的破坏，另一方面通过炎症充血和渗出反应，以稀释、杀伤和包围损伤因子。同时通过实质和间质细胞的再生使受损伤的组织得以修复和愈合。因此可以说炎症是损伤的抗损伤的统一过程。

我们提出科学问题：是不是在荷瘤前，两组小鼠的肺部中白细胞分泌的炎症因子在中是否有差异，这种差异性的细胞因子是不是能够由巨噬细胞分泌？能够促进肿瘤的发生发展？

因此，检测LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的炎症相关因子（TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-2, IL-12, IL-10, IL-1β和TGF-β），这些细胞因子在大量文献中报到和炎症的发生促进，抑制有关系，而且是和T细胞、巨噬细胞相关的炎症因子。

将LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠，10w时在生理条件下牺牲，打开胸腔，将小鼠的肺部取下来。依据文献中的方法和提取总RNA的Trizol试剂盒的要求，选取小鼠肺部左上叶肺部组织，大约在35mg。

应用Trizol试剂盒的试剂和操作步骤，提取两组小鼠的肺组织总RNA。再应用反转录试剂盒，吸取等量的总RNA，2μl，将它们进行发转录，变成相对稳

定地cDNA。得到的这些稳定的cDNA后，在应用Real-Time PCR仪器，检测上述炎症因子，来检测这些炎症因子在两组小鼠的肺部中的mRNA水平的变化，通过软件分析结果，通过Real-Time PCR检测方式检测和相应的统计方式进行统计，左边黑色的图柱示LFA-1+/+小鼠组，右边的图柱示LFA-1-/-小鼠组，如图18。图18A表示的是细胞因子TNF-α的mRNA水平在肺部组织中表达；

LFA-1-/-小鼠组较LFA-1+/+小鼠组的TNF-α的mRNA水平是有上升的趋势的，但是统计学结果却没有显著性差异。

图18B表示的是细胞因子IFN-γ的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的IFN-γ的mRNA水平是有上升的趋势的，但是统计学结果却没有显著性差异。

图18C表示的是细胞因子IL-17的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的IL-17的mRNA水平是有上升的趋势的，但是统计学结果却没有显著性差异。

图18D表示的是细胞因子IL-2的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的IL-2的mRNA水平的结果是有显著性统计学差异。IL-2，一般来说是促进淋巴细胞增殖的，这一类细胞因子的上调，和之前的血液中淋巴细胞在LFA-1-/-小鼠组中升高的结果是相符合的。

图18E表示的是细胞因子IL-12的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的IL-12的mRNA水平的结果是有显著性统计学差异。IL-12，一般来说是能诱导T细胞和NK细胞产生多种细胞因子，促进细胞毒性淋巴细胞增殖和功能的活化。

图18F表示的是细胞因子IL-10的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的IL-10的mRNA水平的结果是有显著性统计学差异。IL-10，一般来说是IL-10可以通过多种途径参与免疫抑制：抑制CD4+T细胞合成和产生IL-2、IL-5、TNF-α和IFN-γ；抑制细胞毒性T细胞、自然杀伤（NK）细胞释放IFN-γ；抑制巨噬细胞向Th1细胞提呈抗原；减少巨噬细胞表面的主要组织相容性复合体MHCⅡ类分子、ICAM-1和B7分子的表达等。

图18G表示的是细胞因子IL-1β的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的IL-1β的mRNA水平的结果是有显著性统计学差

异。IL-1β，是一种促炎性细胞因子，主要通过刺激炎症和自身免疫病相关基因的表达，诱导环氧化酶2、磷脂酶A2、一氧化氮合酶、IFN-γ、黏附分子等效应蛋白的表达，在免疫调节及炎症进程中扮演着重要的角色。它和TNF-α的联合作用是促进炎症的发生发展，激活各类白细胞的活性。

图18H表示的是细胞因子TGF-β的mRNA水平在肺部组织中表达；LFA-1-/-小鼠组相对于LFA-1+/+小鼠组的TGF-β的mRNA水平的结果是有显著性统计学差异。TGF-β，是是一种多功能的细胞因子，它以细胞或背景依赖的方式发挥着肿瘤抑制或肿瘤促进的作用；肿瘤上皮细胞中的TGF-β信号通过诱导Snail1/2、

ZEB1/2和HMGA2等转录因子的表达，促进了上皮间充质转化，这些转录因子抑制了上皮细胞粘附蛋白的表达，并诱导了间充质蛋白的表达。这些改变促使细胞极性和细胞间接触的丧失，使细胞获得一种迁移、浸润的表型，从而实现了癌细胞的播散。

通过统计图18的结果分析：IL-1β上调倍数最多，平均达到30多倍，而其它的炎症细胞因子的表达水平多上调，但是倍数没有IL-1β倍数高。

解释了上述提出的科学问题：可能是由于IL-1β的上调促进了肺部组织中的微环境，为肿瘤的发生发展提供了基础。IL-1β它是一类促进炎症发生的因子，释放过程多是有巨噬细胞，中性粒细胞释放，其它的白细胞在炎症的过程中也会释放，但是在机体中主要释放IL-1β的促炎作用的细胞还是巨噬细胞和中性粒细胞。符合我们的探究目的，确定巨噬细胞和中性粒细胞是我们探究的主要细胞的类型。提示我们炎症因子，IL-1β将是我嫩研究的重点。

IL-1β是释放的外分泌因子，在组织内主要是被巨噬细胞合成和释放后，进入组织和血清当中，需要检测血清中是否有因子促进肿瘤的侵袭和转移。



**图18** **.荷瘤前小鼠肺组织中炎症因子Real-Time PCR统计**

Figure 18. Real-Time PCR statistics of some inflammation factors in lung tissues

荷瘤前两组小鼠的的肺部组织中炎症因子的相对统计。A，TNF-α相对结果统计；B，IFN-γ相对结果统计；C，IL-17相对结果统计；D，IL-2相对结果统计；E，IL-12相对结果统计；F，IL-10相对结果统计；G，IL-1β相对结果统计；H，TGF-β相对结果统计。LFA-1+/+小鼠组，n=12；LFA-1-/-小鼠组，n=12，P<0.05。细胞因子IL-1β，在LFA-1-/-小鼠中表达平均上调30倍。

**LFA-1-/-小鼠肿瘤细胞肺转移模型的血清中IL-1β含量的检测**

由于巨噬细胞分泌的炎症因子IL-1β是外分泌蛋白，被合成和释放到组织局部和血液中，造成局部和机体中的IL-1β上调。结合上述上述的实验的结果，肺部组织中IL-1β的已近上调。血清当中IL-1β是否上调。

为了探究小鼠血清中是否是IL-1β的改变，我们将LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组的血清取出，利用ELISA检测技术检测两组小鼠荷瘤前的血清中IL-1β的结果同时检测LPS刺激下的两组小鼠1.5h后取出小鼠的血清，用ELISA检测结果，如图19。

图19 A是10w荷瘤前两组小鼠没有处理直接取出的血清，来测量IL-1β 的

统计含量，黑色表示的是LFA-1+/+小鼠组，结果为2.6 pg/ml；红色的表示的是LFA-1-/-小鼠组，结果为8.7 pg/ml. LFA-1-/-小鼠组的统计结果显著性比LFA-1+/+小鼠组升高。说明在荷瘤前生理条件下，LFA-1-/-小鼠体循环中IL-1β就相对较高，刺激机体炎症的发生，白细胞对组织的浸润。

图19B是10w荷瘤前两组小鼠经过LPS刺激后取出的血清，来测量IL-1β的统计含量，黑色表示的是LFA-1+/+小鼠组，结果为78.3 pg/ml；红色的表示的是LFA-1-/-小鼠组，n=12，结果为175.5 pg/ml. LFA-1-/-小鼠组的统计结果显著性比LFA-1+/+小鼠组升高。提示我们，在LPS刺激机体的条件下，免疫系统激活后，LFA-1-/-小鼠相对IL-1β分泌到血液中较高，继续促进炎症的发展。

实验的结果告诉我们，在LPS和非LPS刺激下，IL-1β在LFA-1-/-小鼠组较LFA-1+/+小鼠组的血清中都显著性升高，促进机体炎症的发生和发展，就能够解释为什么荷瘤前生理条件下，淋巴细胞增多，肺组织中白细胞浸润增多。

提出科学问题：结合肿瘤肺转移模型的研究，IL-1β是不是能够促进肿瘤细胞的侵袭和迁移呢？



**图19** **.血清IL-1β的ELISA结果的统计**

Figure 19. Statistics of IL-1βELISA of the serum

荷瘤前生理条件下的两组小鼠血清ELISA检测IL-1β含量和LPS处理的两组小鼠血清

ELISA检测IL-1β含量；A，非处理的两组小鼠血清ELISA检测IL-1β含量的统计结果；

B, LPS处理的两组小鼠血清ELISA检测IL-1β含量的统计结果；LFA-1+/+小鼠血清组，

n=12；LFA-1-/-小鼠组血清，n=12，P<0.05. IL-1β在LFA-1-/-小鼠血液中含量上调。

**LFA-1-/-小鼠的血清能够促进肿瘤细胞增殖能力的研究**

血清中的炎症细胞因子IL-1β在LFA-1-/-小鼠组中显著性升高，是否血清能够促进肿瘤细胞的增殖？

利用细胞克隆技术，设计第一个实验，将指数生长时期的B16F10小鼠黑色素瘤细胞等量均匀的培养在六孔板中，2000个/孔。先培养细胞贴壁后，换掉培养基，新的培养基为三组，DMEM组（非处理对照组），2个复孔；DMEM+5%LFA-1+/+mice Serum(LFA-1+/+小鼠组)，2个复孔；

DMEM+5%LFA-1-/-mice Serum(LFA-1-/-小鼠组)，2个复孔。再经过培养，固定，染色完成肿瘤细胞的克隆实验。得到结果图20A。

图20A中分别为的三组对应着培养基的成分，细胞被染成了蓝紫色。最左边的非处理对照组已经没有任何蓝紫色的着色了；中间的LFA-1+/+小鼠组的孔内有分散均匀的蓝紫色着色区域；最右边的LFA-1-/-小鼠组的孔内也有分散均匀的蓝紫色着色区域，且较LFA-1+/+小鼠组的着色区域数目多。图20B是A的统计图，灰色表示非处理对照组，黑色为LFA-1+/+小鼠组和红色表示LFA-1-/-小鼠组。灰色没有任何的着色区域，统计结果为0；黑色的统计结果为192个；红色的统计的结果为246个。LFA-1-/-小鼠组统计结果与LFA-1+/+小鼠组相比，有显著性升高，且有显著性差异。非处理对照组中没有细胞的存活，证实肿瘤细胞没有血清中的细胞因子就不能存活，而LFA-1-/-小鼠组与LFA-1+/+小鼠组的对比结果说明，LFA-1-/-小鼠能够比LFA-1+/+小鼠的血清促进B16F10小鼠黑色素瘤细胞克隆的形成。

利用肿瘤细胞贴壁的原理，设计第二个实验，实验分组如上，三组，DMEM组（非处理对照组），2个复孔；DMEM+5%LFA-1+/+mice Serum(LFA-1+/+小鼠组)，2个复孔；DMEM+5%LFA-1-/-mice Serum(LFA-1+/+小鼠组)，2个复孔。处理是将B16F10肿瘤细胞标记绿色荧光，在各组接种到六孔板前，就用分组的培养基稀释，再继续培养6h后，用激光激发细胞的底部荧光，对底部的绿色荧光肿瘤细胞进行拍照和计数，如图19C显示。

图20C中分为的三组对应着培养基的成分，底部贴壁的肿瘤细胞呈现绿色。最左边的非处理对照组贴壁的绿色荧光较少；中间的LFA-1+/+小鼠组的绿色荧光较较多；最右边的LFA-1-/-小鼠组的绿色荧光肿瘤细胞最多。图20D是C的统计

图，灰色表示非处理LFA-1对照组，黑色为LFA-1+/+小鼠组和红色表示LFA-1-/-

小鼠组。灰色平均统计结果为3.6；黑色的统计结果为4.8；红色的统计的结果为

5.8，且和LFA-1+/+小鼠组有统计学显著性的差异。非处理对照组中有细胞贴壁说明实验中肿瘤细胞是能够在DMEM+10%FBS血清条件下进行贴壁生长；LFA-1-/-小鼠组较LFA-1+/+小鼠组统计贴壁数目显著性的升高的差异，说明LFA-1-/-小鼠的血清中有某种因子能够促进肿瘤细胞的贴壁生长。

上述两个实验结果提示：表明LFA-1-/-小鼠的血清能够促进B16F10肿瘤的克隆和贴壁生长。之前的实验提示我们可能是IL-1β的升高，那么我们就检测IL-1β是否能够促进肿瘤的侵袭和迁移？



**图20** **.肿瘤克隆和贴壁实验和统计**

Figure 20. colon experiment and stick wall experiment and statistics

肿瘤细胞培养基的成分加入两组小鼠的血清培养肿瘤，对于肿瘤的克隆和贴壁生长结果的影响；A，克隆实验，蓝紫色着色区域为克隆形成的菌落；B，克隆实验的统计结果；

C，贴壁生长实验，绿色荧光表示底部贴壁的肿瘤细胞数目；D，贴壁生长实验的统计结果；非处理对照组，DMEM；LFA-1+/+小鼠组，DMEM+5%LFA-1+/+小鼠血清，n=3；LFA-1-/-小鼠组，DMEM+5%LFA-1-/-小鼠血清，n=3，P<0.05. LFA-1-/-小鼠血清促进肿瘤的克隆形成和贴壁过程。

**IL-1β促进肿瘤细胞的侵袭能力的研究**

IL-1β在LFA-1-/-小鼠的血清中显著性升高，而血清能够促进肿瘤的克隆和贴壁过程，那么IL-1β的升高是否能够促进肿瘤的侵袭和迁移？

肿瘤肺转移模型的建立是将肿瘤细胞液是通过尾静脉注射进入小鼠体内，血清中的IL-1β可能就会对肿瘤细胞转移到肺部组织中，起到决定性的作用。我们提出假设：IL-1β的升高可能促进小鼠B16F10黑色素瘤肿瘤细胞的侵袭和迁移。

根据侵袭和实验步骤将B16F10肿瘤细胞接种在Transwell板上，根据设计的时间来处理细胞；上室的培养基都是DMEM+10%FBS，下室的培养基分为三组，空白对照组、IL-1β组和IL-1β+anti-IL-1β组，且培养基中都加入

DMEM+10%FBS。这样侵袭和迁移实验的结果在固定上室的孔膜后，染1%结晶紫20min就能反应结果，如图21。

图20A是侵袭实验的结果展示，实验过程中在Transwell板上室上加一层薄薄的基质胶，在其凝固加入肿瘤细胞，再加入各组相应培养基进行实验。肿瘤细胞的形态被染成蓝紫色。最左边的是空白对照组，细胞个数大概在5个左右；中间是IL-1β组，染上颜色的细胞数量在16个左右；最右边的是IL-1β+anti-IL-1β组，蓝紫色的细胞数目在10个左右。图16B是A的统计值，黑色为空白对照组，红色为IL-1β组，灰色为IL-1β+anti-IL-1β组。红色的IL-1β组的统计结果较

IL-1β+anti-IL-1β组和空白对照组都有显著性升高的差异。

图20C是迁移实验的结果展示，直接将细胞加在Transwell板上室上，加入各组相应培养基进行实验。肿瘤细胞的形态被染成蓝紫色。最左边的是空白对照组，细胞个数大概在10个左右；中间是IL-1β组，染上颜色的细胞数量在22个左右；最右边的是IL-1β+anti-IL-1β组，蓝紫色的细胞数目在13个左右。图20D是A的统计值，黑色为空白对照组，红色为IL-1β组，灰色为IL-1β+anti-IL-1β组。红色的IL-1β组的统计结果较空白对照组和IL-1β+anti-IL-1β组都有显著性升高的差异。

IL-1β刺激B16F10肿瘤细胞的侵袭和迁移实验的结果解释了：IL-1β能够促进肿瘤细胞的侵袭和迁移，有利于肿瘤的进入小鼠的机体器官组织中，并在器官中发生发展的进程。



**图21。** **IL-1β刺激肿瘤的侵袭和迁移实验**

Figure 21. Statistics of IL-1βeffect tumor invasion and migration

IL-1β刺激B16F10小鼠黑色素肿瘤细胞的侵袭和迁移实验；A，Transwell细胞侵袭实验结果；B，侵袭实验的统计结果；C，Transwell细胞迁移实验结果；D，迁移实验的统计结果；空白对照组，n=6；IL-1β组，n=6；IL-1β+anti- IL-1β组，n=6；P<0.05. IL-1

β促进肿瘤的侵袭和迁移。

**IL-1β上调肿瘤细胞p-p38和p-cjun的表达**

结合荷瘤后两组小鼠的肺部转移的肿瘤组织病理性的改变和荷瘤后两组小鼠免疫相关的检测结果同文献提示。侵袭和转移的过程中，肿瘤细胞高表达

MMP2和MMP9蛋白可能是由于上调了肿瘤细胞内的p38和p-cjun，那么应用

WesternBlot（WB）技术检测，观察IL-1β刺激肿瘤细胞24h后，提取肿瘤细胞的蛋白，观察相关p38、p-p38、cjun、p-cjun和β-actin的表达情况，如图22。

图22是WB的各蛋白的表达结果：横向分为五行，分别表示的是：p-p38、p38、p-cjun、cjun和β-actin。纵向分为三列，分别表示的是：空白对照组、IL-1β组和IL-1β+anti-IL-1β组。用细胞因子IL-1β（20ng/ml）刺激肿瘤细胞24h后收集细胞蛋白，完成WB实验后得到的结果。

图22 中，β-actin在三组的表达量都很齐；P38表达量也很齐，但是p-p38

表达情况为：空白对照组的表达量较少，IL-1β组的表达量较多，而

IL-1β+anti-IL-1β组虽然在IL-1β刺激，但是加入了anti-IL-1β中和IL-1β的作用



了蛋白后，p-p38表达情况就得到了逆转，同样表达较少；结果提示，在p38表达相同的前提下，IL-1β刺激肿瘤细胞后，肿瘤细胞能够表达更多的p-p38。同样，cjun表达量也很齐，但是p-cjun表达情况为：空白对照组的表达量较少，IL-1β组的表达量较多，而IL-1β+anti-IL-1β组虽然在IL-1β刺激，但是加入了anti-IL-1β中和IL-1β的作用了蛋白后，p-cjun表达情况就得到了逆转，同样表达较少；结果提示，在p38表达相同的前提下，IL-1β刺激肿瘤细胞后，肿瘤细胞能够表达更多的p-cjun。

**图 22**  **IL-1β刺激肿瘤细胞p-cjun和pp38的表达**

Figure 22. WB of pcjun and pp38 after IL-1βstimulate

肿瘤细胞培养在指数生长期时分为三组，分别加入只有溶剂、IL-1β（20ng/ml）和IL-1β

（20ng/ml）+anti-IL-1β（20ng/ml）刺激肿瘤细胞24h后p38、p-p38、cjun、p-cjun和β-actin的表达量；从左到右分别表示为空白对照组，IL-1β组和IL-1β+anti-IL-1β组；从上到下的检测的蛋白分别为：p-p38、p38、p-cjun、cjun和β-actin. IL-1β促进肿瘤细胞高表达p-p38和p-cjun蛋白。

# 第四章 讨 论

### **1.** **LFA-1-/-**小鼠生理条件下组织同细胞的改变

LFA-1是的一部分整合素家族β链（CD18），α链（αL, CD11a）组成的蛋白，经基因工程技术敲除LFA-1基因，相应的两条蛋白链就不会在细胞上表达，LFA-1-/-小鼠就是基因技术敲除了小鼠的LFA-1基因，这两条蛋白链就不会在小鼠体内的白细胞上表达。

文献中，LFA-1-/-小鼠作为一种免疫研究的工具小鼠，研究的方向多是在免疫疾病相关的研究实验中，如实验性变态反应性脑脊髓炎（EAE）[57]。这些研究中，表明LFA-1-/-小鼠能够在生理和病理条件下发生慢性炎症反应，形成超敏的体质，影响小鼠的疾病模型结果。为研究中，LFA-1影响机体免疫的重要工具小鼠。肿瘤作为当今研究的热点，它和炎症的关系一直被人们所关注，慢性炎症是否能促进肿瘤的的发生发展的进程，和肿瘤的侵袭同转移一直也是研究的热点。

生理条件下，10w的LFA-1-/-小鼠较对照组LFA-1+/+小鼠可以被在镜下被检测出，肺泡间隔增宽，可能是由于上述的慢性炎症造成的结果，致炎因子持续存在并且损伤组织。持续存在的、对抗自身组织的免疫反应即自身免疫性疾病。有着白细胞浸润到组织细胞中，释放FGF家族蛋白等致使结缔组织所组成的支架和间隙，包括肺泡间隔、小叶间隔、支气管及血管的周围组织、淋巴管组织[58, 59]。那么研究肿瘤的肺部转移过程和LFA-1-/-小鼠的关系就及其重要，探究肿瘤的发生发展的进程是否会受到LFA-1基因的影响和改变。

肿瘤的生长和转移同肿瘤细胞所处的环境，有着密切的关系。肿瘤生长微环境中有的白细胞，其在肿瘤转移和生长中发挥着极为重要的作用。大量临床研究资料，述说了白细胞在肿瘤实质中浸润的密度越高，换肿瘤的人群的预后愈差

[60].19世纪就有科学家研究证实了：实体肿瘤组织中，如果有白细胞的浸润，提示白细胞会在肿瘤发生发展的过程中，起着重要的作用。[61, 62]我们通过血常规和细胞图片检测，LFA-1-/-小鼠的血液中的淋巴细胞有显著性的上升；且有中性粒细胞的上升趋势明显。

淋巴细胞对于肿瘤的作用是：B 细胞直接分泌抗体中和肿瘤的抗原，T 细胞、

NK细胞可以直接监视和杀伤肿瘤细胞。但是淋巴细胞的增多不是由肿瘤进入机体后的抗原刺激，而是由于本身缺失了LFA-1基因后，就显著性增加了淋巴细胞的含量。这样对于进入后的肿瘤是否能够起到免疫的效果，需要进一步探究。我们根据实验中的表型推测，进入血液循环的肿瘤细胞被机体识别，正常的小鼠体内的淋巴细胞就可以增殖，杀伤肿瘤细胞和监视肿瘤实体的发展；但是缺失了LFA-1基因的小鼠，虽然能够识别肿瘤的抗原，但是淋巴细胞的增殖比率已经饱和了，起到对B16F10肿瘤细胞能够杀伤识别的增殖的淋巴细胞很少，就导致了表型的产生，但是这个推测还是需要后续大量的实验结果来证明。

小鼠的血液检测中，LFA-1-/-小鼠的中性粒细胞也有明显的上升趋势，提示我们，中性粒细胞在这当中可能也起着重要的作用。中性粒细胞在血液的非特异性细胞免疫系统中起着十分重要的作用，它处于机体抵御微生物病原体，特别是在化脓性细菌入侵的第一线，当炎症发生时，它们被趋化性物质吸引到炎症部位。肿瘤进入小鼠的机体内，立即会被免疫系统识别，释放肿瘤相关的抗原，受到某些趋化因子作用后，中性粒细胞表面的L-选择素数量增加，血管内皮细胞开始表达P-或E-选择素；这两类选择素结合可使细胞贴向血管壁，称为着边作用；这时中性粒细胞迅速表达整合素例如MAC-1和LFA-1等，与内皮细胞的配体结合可使中性粒细胞变扁，紧密粘贴内皮细胞；继而中性粒细胞变形移出血管外，以阿米巴运动的方式向趋化源移动。但是由于缺失了LFA-1的结合内皮细胞的配体减少，使得本身有功能的中性粒细胞不能够作用到肿瘤之中。

在我们的实验中，还检测了骨髓细胞的图片，结果中显示，骨髓细胞中的祖细胞含量也显著性上调，而这些祖细胞是增多可能是外周血淋巴细胞和中性粒细胞的来源，解释了血液中淋巴细胞的含量增多的原因。

### **2.** **LFA-1-/-**小鼠促进肿瘤细胞的肺转移模型的差异

为探究LFA-1对尾静脉注射肿瘤肺转移的模型影响，本课题采用LFA-1敲除的基因工程小鼠，LFA-1-/-小鼠，通过一系列实验探索，结果表明LFA-1基因的缺失能促进尾静脉注射肿瘤肺转移的模型中的肿瘤的的生长。相比LFA-1+/+小鼠，LFA-1+/+小鼠，LFA-1-/-小鼠从尾静脉注射肿瘤细胞后前10天没有显著性的肿瘤的数目增加，也没有肿瘤体积增大；但是到了，注射肿瘤细胞后前15 天

后，肿瘤的数目显著性的增加，肿瘤体积也显著性地增大，病理进程得到了加快，且小鼠的生存时间显著地缩短了，说明LFA-1参与了肿瘤肺部转的生长。此外，我们检测了LFA-1-/-小鼠转移灶的肿瘤细胞的增殖能力，相对于LFA-1+/+小鼠的肺部转移病灶内肿瘤细胞，明显增加，提示了LFA-1的缺失，通过促进肺转移病灶内肿瘤细胞的增殖，从而促进肿瘤的发生和发展。

本课题首次回答了LFA-1对尾静脉注射肿瘤肺转移的作用：LFA-1的缺失促进尾静脉注射肿瘤肺转移的肿瘤的发生发展。[63]

是否LFA-1的缺失影响其他肿瘤的生长？为回答这个问题，我们使用LFA-1+/+小鼠和LFA-1-/-小鼠，建立皮下移植B16F10小鼠黑色素瘤细胞的肿瘤模型，结果显示，LFA-1的缺失对后黑色素瘤体积有明显差异，且LFA-1-/-小鼠接种皮下的肿瘤大小和LFA-1+/+小鼠的接种肿瘤大小相比，显著性的下降了。另一个模型实验，是将LFA-1-/-小鼠和APCmin/+杂交得到，APCmin/+；LFA-1-/-小鼠，作为LFA-1-/-小鼠组和LFA-1+/+小鼠组APCmin/+；LFA-1+/+小鼠的肠道腺瘤做比较，且腺瘤的数目和大小皆收到了抑制，和皮下接种肿瘤模型的表型十分相似。

我们将以上两个模型定义为，原位癌肿瘤的发生发展，LFA-1的缺失对它们的作用；而本次论文中使用的模型，是通过血道转移的肿瘤转移的模型。二者模型对于肿瘤的发生发展结果不同。可能是由于，在原位癌模型中，调节性T细胞（Treg）的数目的改变，导致肿瘤收到了免疫监视更为明显，抑制了肿瘤的发生发展，所以原位癌模型的实验结果和转移模型的实验结果不同。

荷瘤后，第15天时两组小鼠肺部组织中，对肿瘤的检测：微血管密度，肿瘤的内部的CD31，结果是在LFA-1-/-小鼠肺部的肿瘤之中较LFA-1+/+小鼠组高表达。肿瘤的发生发展的进程，离不开血管提供的营养，CD31是血管内皮的标记物，，它的表达量同血管数目成正比，由此可以看出到了注射后的第15 天时，LFA-1-/-小鼠的肺部肿瘤的内部微血管密度（MVD）值较高，合理地解释了肿瘤的大小比LFA-1+/+小鼠组大。

为了继续观察肺部肿瘤的微环境，B16F10肿瘤细胞在被尾静脉注射进入小鼠体内后，分时间段来取材观察肿瘤的数目和大小。发现在小鼠荷瘤10天以内，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠组组的肺部肿瘤数目没有显著性地改变。但是到了小鼠荷瘤后15天时，LFA-1-/-小鼠组的肺部肿瘤数目显著性地上调，肿瘤的大

小也是显著性的增大，镜下观察的结果也是这样的。肿瘤的变化随着时间推移在变化，且在10~15天内有显著性的改变在两组小鼠的肺部中。通过Ki67免疫组化[64]检测的结果，在肿瘤细胞注射后5天时，LFA-1-/-小鼠组肺部转移的肿瘤细

胞增殖的比率显著性高于LFA-1+/+小鼠组的比率。随后的10天和15天的结果都是LFA-1-/-小鼠组的肿瘤细胞增殖比率上调。那么说明是在肺部环境中，进入LFA-1-/-小鼠的体内的肿瘤细胞更容易发生增殖，结合克隆实验，可能就是IL-1β的升高，导致的肿瘤增殖加快。

随着肿瘤在肺部的增殖，它的侵袭和迁移能力是否也增加了。MMP2和MMP9蛋白是降解Ⅳ型胶原最主要的酶，能够帮助肿瘤突破基底膜的束缚，侵袭和转移到别处。很多实验室的文章和其它研究表明，MMP2和MMP9表达越高，说明肿瘤侵袭和转移能力越强[65-67]。荷瘤后的肺部转移的进程中，10天以内的MMP2和MMP9的免疫组化结果，LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠的没有显著性地改变。但是到了15天时，LFA-1-/-小鼠组的小鼠肿瘤部位的MMP2和MMP9免疫组化的结果高表达。而LFA-1+/+小鼠的相应的肿瘤部位MMP2和MMP9表达较少。结合之前的侵袭和转移结果，IL-1β能够促进B16F10肿瘤细胞的侵袭和转移。我们推断出，IL-1β促进肿瘤的增殖，通过上调MMP2和MMP9促进肿瘤的侵袭转移。

### **3.** **LFA-1-/-**小鼠促进肿瘤的肺转移模型的免疫微环境的差异

利用流式细胞术检测LFA-1-/-小鼠组荷瘤后第15天时的CD3+、CD4+和CD8+的T细胞和CD19+的B细胞在血液和脾脏中没有显著性的变化，但在肿瘤部位发现CD8+的T细胞下降趋势，说明影响肿瘤的在肺部的转移的过程中，T细胞和B细胞的作用不是很明显。但是由于缺乏了NK细胞的检测，不能排除所有淋巴细胞在肿瘤的肺转移过程中没有起到显著性的作用。同时检测F4/80+标记的巨噬细胞的比率显著性的在脾脏中比率含量上升了。

荷瘤后的第15天，为了探究是否有其他免疫细胞的比率改变，同时检测了比较经典的Tregs、Th17细胞和巨噬细胞的分泌的蛋白Foxp3、IL-17A和IFN-γ，在肺部肿瘤的结果中显示，IL-17A，和IFN-γ显著性的提高在LFA-1-/-小鼠组中。Th17细胞的主要效应因子是IL-17. IL-17是一种主要由活化的T细胞产生的致

炎细胞因子，可以促进T细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子从而导致炎症的产生。IL-17是T 细胞诱导的炎症反应的早期启动因子，可以通过促进释放前炎性细胞因子来放大炎症反应。Th17细胞能够分泌产生IL-17A，IL-17F，IL-6和TNF-α等，这些因子能够集体动员，募集及活化中性粒细胞。Th17细胞产生的IL-17，能有效地介导中性粒细胞活化过程，从而有效地介导了组织的炎症反应。

IFN-γ主要是由活化的T细胞产生，它的作用是具有抗病毒、抗增殖活性、主要的生物学活性是免疫调节作用：激活巨噬细胞并促进其功能；促进Th0分化为Th1抑制Th2增殖；激活中性粒细胞的功能；激活血管内皮细胞等。这里结合结果来推断，应该是激活了巨噬细胞和中性粒细胞的活性。它们能够刺激释放更多的炎性细胞因子，来刺激肿瘤的生长。

荷瘤后，第15天时两组小鼠肺部组织中，对肿瘤中的巨噬细胞进行了检测的检测：CD68是巨噬细胞的蛋白标记物，它的表达量同巨噬细胞成正比，LFA-1-/-小鼠组中巨噬细胞数量显著性比LFA-1+/+小鼠组高，说明浸润在肿瘤内部的巨噬细胞是比LFA-1-/-小鼠组多的，虽然和之前流式的结果，测得F4/80结果不同，但是是由于标记的蛋白不同，造成的结果的不一致。结果结合文献，提示我们，巨噬细胞在侵袭中，可能被肿瘤细胞给“驯化”，释放更多炎症因子，来促进肿瘤的发展、侵袭和转移。

LFA-1-/-小鼠在荷瘤前后，都表现出免疫系统的改变，尤其是白细胞在肺部和血液中大量的增多，炎性机体的反应也有文献的支持。在建立荷瘤模型后，我们探究为什么肿瘤在肺部转移增多了呢？IL-17A和IFN-γ的改变提示我们，炎症的发生在小鼠荷瘤后显著性在肺部，那么是不是小鼠的肺部微环境就是适合肿瘤的侵袭和生长呢？在前面的探讨中我们发现肺部中缺失了LFA-1基因的小鼠的数目变化显著性的上升。那么是不是这些白细胞释放的促炎因子导致肺部的微环境适合肿瘤的侵袭呢？

因此，我们选择在肿瘤被注射前，筛选了一系列重要的炎症因子，观察肺部的微环境的改变，通过Real-Time PCR的结果告诉我们，这些炎症细胞因子中显著性上调的有：IL-2，IL-12，IL-10，IL-1β和TGF-β。这些都是能够促进炎症发生的重要的炎症因子。

IL-2能刺激T细胞生长，各种刺激物活化的T细胞一般不能在体外培养中长期存活，加入后则使其长期持续得增殖；巨噬细胞受到IL-2的持续作用后，它的抗原递呈能力、细胞毒性、杀菌力均明显地增强，分泌某些细胞因子的能力得到加强。[68-70] IL-2的上调可能是肺部中白细胞增殖增多的一种原因。上调了4倍，和血常规中淋巴细胞上调倍数很是相近。

IL-12可以诱导NK细胞和T细胞产生IFN-γ，促进了Th1的分化，增强了细胞免疫反应，发挥了抗病毒的作用。[71-73] IL-12上调了20倍，提示我们在机体的肺部的局部，收到了感染能够快的激活免疫反应。

IL-10一般来说是IL-10可以通过多种途径参与免疫抑制：抑制CD4+T细胞合成和产生IL-2、IL-5、TNF-α和IFN-γ；抑制细胞毒性T细胞、自然杀伤（NK）细胞释放IFN-γ；抑制巨噬细胞向Th1细胞提呈抗原；减少巨噬细胞表面的主要组织相容性复合体MHCⅡ类分子、ICAM-1和B7分子的表达等。[74-79]

TGF-β是一种多功能的细胞因子，它以细胞或背景依赖的方式发挥着肿瘤抑制或肿瘤促进的作用；肿瘤上皮细胞中的TGF-β信号通过诱导Snail1/2、ZEB1/2和HMGA2等转录因子的表达，促进了上皮间充质转化，这些转录因子抑制了上皮细胞粘附蛋白的表达，并诱导了间充质蛋白的表达。这些改变促使细胞极性和细胞间接触的丧失，使细胞获得一种迁移、浸润的表型，从而实现了癌细胞的播散。它的上调提示我们肿瘤如果在肺部发生，更容易生长和转移。[80-82]

IL-1β，是一种促炎性的细胞因子，主要通过刺激炎症和自身免疫病相关基因的表达，诱导环氧化酶2、磷脂酶A2、一氧化氮合酶、IFN-γ、黏附分子等效应蛋白的表达，在免疫调节及炎症进程中扮演着重要的角色。它和TNF-α的联合作用是促进炎症的发生发展，激活各类白细胞的活性。[83-86]它在小鼠的肺部中上调了30多倍，是所有检测的结果中，上调倍数最大的。那么我们想，这种分泌性的释放的促炎性的细胞因子是否能够为肿瘤的侵袭和转移提供微环境来刺激实验中的肿瘤的生长和发展，后续实验的证明中有体现。就将IL-1β作为我们研究的重点，确定它能够促进B16F10肿瘤细胞的侵袭和迁移。

血清当中是否是IL-1β也升高，通过ELISA检测，发现在生理条件下的小鼠体内的血清中，IL-1β显著性的上调了3倍左右；同时我们也检测了在LPS刺激下，IL-1β的ELISA结果，发现也是上调了2倍多。这个结果就是说明了，无

论在免疫系统激活或生理条件的情况下，LFA-1-/-小鼠的血清中IL-1β显著性升高，那么推测，B16F10肿瘤细胞在被注射进入小鼠体内后，受到IL-1β的影响更容易在肺部发生转移，肺部的微环境提供了丰富的IL-1β。

研究IL-1β促进肿瘤的侵袭和迁移实验，我们使用了Transwell小室，利用

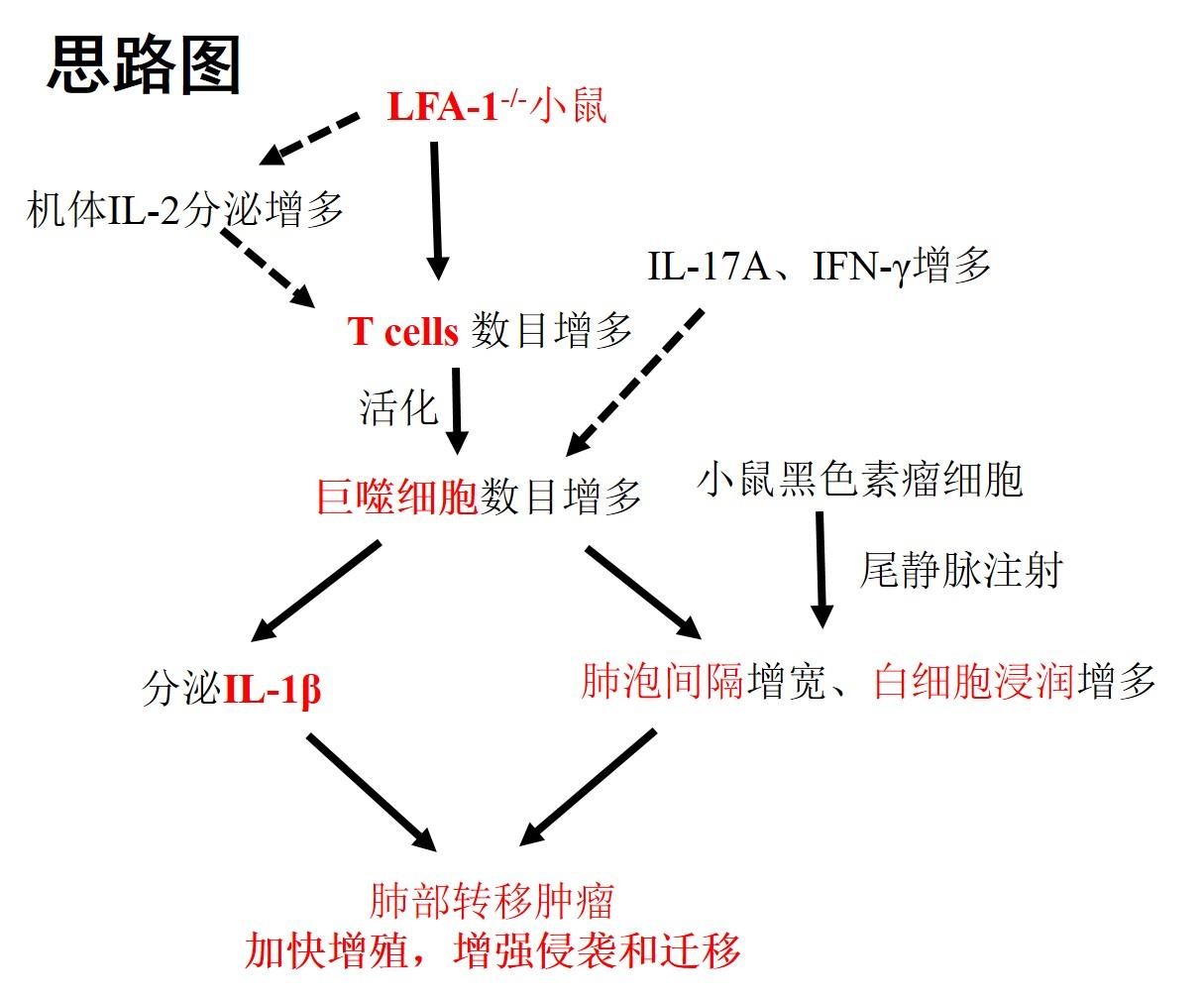
上下小室的环境中加入的细胞因子不同，判断IL-1β是否能够促进B16F10肿瘤细胞的侵袭和转移，并且我们加入了一组消除IL-1β的抗体，发现这一组的结果就和空白对照组的结果相似了，说明IL-1β确实能够促进B16F10肿瘤细胞的侵袭和转移。

同时我们检测了LFA-1+/+小鼠组和LFA-1-/-小鼠的血清对于B16F10肿瘤细胞的克隆能力和贴壁能力的比较，发现LFA-1-/-小鼠的血清在加入B16F10肿瘤细胞培养后，无论是克隆能力和贴壁能力显著性上调了。

文献中提示我们IL-1β能够促进人肺癌的MMP2和MMP9的表达通过上调p-p38和p-cjun蛋白，我们做了相同的实验结果，发现确实能够上调B16F10肿瘤细胞p-p38和pcjun，上调了批p-p38和p-cjun，所以我们推断，IL-1β能够促进肿瘤的MMP2和MMP9的高表达是通过上调p-cjun蛋白[87]。

综上，本文通过探索初步得出LFA-1基因的缺失能够促进LFA-1-/-小鼠黑色素瘤在肺部的转移和生长，并从肿瘤微环境角度阐明LFA-1影响了免疫细胞，其其作用机制涉及，1、LFA-1缺失促进白细胞的增殖；2、巨噬细胞和Th17显著增殖；3、LFA-1缺失促进肺部组织中IL-1β和其它炎性因子的升高；4、微环境中IL-1β表达上调促进肿瘤的增殖和侵袭和转移。其具体的作用机理，还是需要进一步的实验研究。

本文的研究探索，确定了LFA-1对肿瘤肺转移的作用，并探索其可能的一些作用机制，为探讨了肿瘤血道转移和发生发展机制，临床治疗提供新的理论依据和新的思路。



参考文献

[1] Brody H. Cancer[J]. Nature, 2014, 509(7502): S49.

[2] Darmon M, Thiery G, Ciroldi M, et al. Intensive care in patients with newly diagnosed malignancies and a need for cancer chemotherapy[J]. Crit Care Med, 2005, 33(11): 2488-2493.

[3] Hirsch J. An anniversary for cancer chemotherapy[J]. JAMA, 2006, 296(12): 1518-1520.

[4] Unitt C, Montazeri K, Tolaney S, et al. Cardiology patient page. Breast cancer chemotherapy and your heart[J]. Circulation, 2014, 129(25): e680-e682.

[5] Garcez K, Lim C C, Whitehurst P, et al. Carotid dosimetry for T1 glottic cancer radiotherapy[J]. Br J Radiol, 2014, 87(1038): 20130754.

[6] Taylor C, Darby S C. Ischemic heart disease and breast cancer radiotherapy: the way forward[J]. JAMA Intern Med, 2014, 174(1): 160-161.

[7] Bristow R G, Berlin A, Dal Pra A. An arranged marriage for precision medicine: hypoxia and genomic assays in localized prostate cancer radiotherapy[J]. Br J Radiol, 2014, 87(1035): 20130753.

[8] Arrington A K, Voci A, Reparaz L, et al. Factors and outcomes associated with surgical treatment options of contralateral breast cancer[J]. Am J Surg, 2014, 208(4): 524-530.

[9] Swegal W, Koyfman S, Scharpf J, et al. Endoscopic and open surgical approaches to locally advanced sinonasal melanoma: comparing the therapeutic benefits[J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2014, 140(9): 840-845.

[10] Kummel S, Holtschmidt J, Loibl S. Surgical treatment of primary breast cancer in the neoadjuvant setting[J]. Br J Surg, 2014, 101(8): 912-924.

[11] Yang Y F, Jan Y H, Liu Y P, et al. Squalene synthase induces tumor necrosis factor receptor 1 enrichment in lipid rafts to promote lung cancer metastasis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(6): 675-687.

[12] Wu J B, Shao C, Li X, et al. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(7): 2891-2908.

[13] Wu J B, Shao C, Li X, et al. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(7): 2891-2908.

[14] Zhang B, Copur-Dahi N, Kalmaz D, et al. Gastrointestinal manifestations of breast cancer metastasis[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(9): 2344-2346.

[15] Zhang H Z, Xia X Y, Zhu F, et al. Correlation of deregulated like-acetylglucosaminyl transferase and aberrant alpha-dystroglycan expression with human tongue cancer metastasis[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2014, 72(6): 1106-1118.

[16] Devun F, Biau J, Huerre M, et al. Colorectal cancer metastasis: the DNA repair inhibitor Dbait increases sensitivity to hyperthermia and improves efficacy of radiofrequency ablation[J]. Radiology, 2014, 270(3): 736-746.

[17] Xue J, Lin X, Chiu W T, et al. Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF-beta-dependent cancer metastasis[J]. J Clin Invest, 2014, 124(2): 564-579.

[18] Lee-Chang C, Bodogai M, Martin-Montalvo A, et al. Inhibition of breast cancer metastasis by resveratrol-mediated inactivation of tumor-evoked regulatory B cells[J]. J Immunol, 2013, 191(8): 4141-4151.

[19] Geller A C, Annas G D. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer[J]. Semin Oncol Nurs, 2003, 19(1): 2-11.

[20] Mamuya F A, Duncan M K. aV integrins and TGF-beta-induced EMT: a circle of regulation[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(3): 445-455.

[21] Taylor A W. Review of the activation of TGF-beta in immunity[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(1): 29-33.

[22] Li M O, Flavell R A. TGF-beta: a master of all T cell trades[J]. Cell, 2008, 134(3): 392-404.

[23] Casey S C, Li Y, Fan A C, et al. Oncogene withdrawal engages the immune system to induce sustained cancer regression[J]. J Immunother Cancer, 2014, 2: 24.

[24] Trivedi S, Jie H B, Ferris R L. Tumor antigen-specific monoclonal antibodies and induction of T-cell immunity[J]. Semin Oncol, 2014, 41(5): 678-684.

[25] Toraya-Brown S, Fiering S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer[J]. Int J Hyperthermia, 2014, 30(8): 531-539.

[26] Robertson F C, Berzofsky J A, Terabe M. NKT cell networks in the regulation of tumor immunity[J]. Front Immunol, 2014, 5: 543.

[27] Gutierrez T, Simmen T. Endoplasmic reticulum chaperones and oxidoreductases: critical regulators of tumor cell survival and immunorecognition[J]. Front Oncol,

2014,4:291.

[28] Chen L, Fabian K L, Taylor J L, et al. Therapeutic use of dendritic cells to promote the extranodal priming of anti-tumor immunity[J]. Front Immunol, 2013, 4: 388.

[29] Baghdadi M, Jinushi M. The impact of the TIM gene family on tumor immunity and immunosuppression[J]. Cell Mol Immunol, 2014, 11(1): 41-48.

[30] Baron F, Storb R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: a review[J]. Springer Semin Immunopathol, 2004, 26(1-2): 71-94.

[31] Burkert J, Wright N A, Alison M R. Stem cells and cancer: an intimate relationship[J]. J Pathol, 2006, 209(3): 287-297.

[32] Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H. The B7 family revisited[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 515-548.

[33] Hall V J, Stojkovic P, Stojkovic M. Using therapeutic cloning to fight human disease: a conundrum or reality[J]. StemCells, 2006, 24(7): 1628-1637.

[34] Orabona C, Grohmann U, Belladonna M L, et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86[J]. Nat Immunol, 2004, 5(11): 1134-1142.

[35] Bregni M, Bernardi M, Ciceri F, et al. Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of advanced solid tumors[J]. Springer Semin Immunopathol, 2004, 26(1-2): 95-108.

[36] Owens D M, Watt F M. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 444-451.

[37] Soltysova A, Altanerova V, Altaner C. Cancer stem cells[J]. Neoplasma, 2005, 52(6): 435-440.

[38] Stuge T B, Holmes S P, Saharan S, et al. Diversity and recognition efficiency of T cell responses to cancer[J]. PLoS Med, 2004, 1(2): e28.

[39] Zeng Y, Graner M W, Katsanis E. Chaperone-rich cell lysates, immune activation and tumor vaccination[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(3): 329-338.

[40] Lin E Y, Guckian K M, Silvian L, et al. Structure-activity relationship of ortho- and meta-phenol based LFA-1 ICAM inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2008, 18(19): 5245-5248.

[41] ZimmermanT, BlancoFJ. InhibitorstargetingtheLFA-1/ICAM-1

Cell-adhesion interaction: design and mechanism of action[J]. Curr Pharm Des, 2008,14(22):2128-2139.

[42] Zappasodi R, Di Nicola M, Carlo-Stella C, et al. The effect of artificial antigen-presenting cells with preclustered anti-CD28/-CD3/-LFA-1 monoclonal antibodies on the induction of ex vivo expansion of functional human antitumor T cells[J]. Haematologica, 2008, 93(10): 1523-1534.

[43] Dold S, Laschke M W, Lavasani S, et al. Cholestatic liver damage is mediated by lymphocyte function antigen-1-dependent recruitment of leukocytes[J]. Surgery, 2008, 144(3): 385-393.

[44] Wang Y, Shibuya K, Yamashita Y, et al. LFA-1 decreases the antigen dose for T cell activation in vivo[J]. Int Immunol, 2008, 20(9): 1119-1127.

[45] Sheridan H, Hook I, Nestor C, et al. Inhibition of LFA-1 mediated T-cell motility by naphthoquinones[J]. Planta Med, 2008, 74(11): 1383-1387.

[46] Duan H X, Lu G X, Cheng L M. [LFA-1 and VLA-4 involved in vasoendothelial adhesion and transendothelial migration of human high proliferative potential endothelial progenitor cells] [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2008, 16(3): 671-675.

[47] Decreasing the expression of LFA-1 and ICAM-1 as the major mechanism for the protective effect of glutamine on ischemia-reperfusion injury[J]. Acta Orthop, 2008, 79(2): 308.

[48] Namazi H. Decreasing the expression of LFA-1 and ICAM-1 as the major mechanism for the protective effect of hyperbaric oxygen on ischemia-reperfusion injury[J]. Microsurgery, 2008, 28(4): 300.

[49] Puigdomenech I, Massanella M, Izquierdo-Useros N, et al. HIV transfer between CD4 T cells does not require LFA-1 binding to ICAM-1 and is governed by the interaction of HIV envelope glycoprotein with CD4[J]. Retrovirology, 2008, 5: 32.

[50] Li M, Gao C J. [An update on beta2 integrin LFA-1 and ligand ICAM-1 signaling] [J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2008, 16(1): 213-216.

[51] Choi E Y, Orlova V V, Fagerholm S C, et al. Regulation of LFA-1-dependent inflammatory cell recruitment by Cbl-b and 14-3-3 proteins[J]. Blood, 2008, 111(7): 3607-3614.

[52] Singh K, Colmegna I, He X, et al. Synoviocyte stimulation by the LFA-1-intercellular adhesion molecule-2-Ezrin-Akt pathway in rheumatoid

Arthritis[J]. J Immunol, 2008,180(3):1971-1978.

[53] Ardern-Jones M R, Black A P, Ogg G S. Anti-lymphocyte function associated antigen-1 inhibits T-helper 2 function of human allergen-specific CD4+ T cells[J]. Br J Dermatol, 2008, 158(3): 456-462.

[54] Asaduzzaman M, Zhang S, Lavasani S, et al. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis[J]. Shock, 2008, 30(3): 254-259.

[55] van Kooyk Y, Figdor C G. Signalling and adhesive properties of the integrin leucocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)[J]. Biochem Soc Trans, 1997, 25(2): 515-520.

[56] Sumimoto S, Mayumi M. [Role of LFA-1/ICAM-1-dependent cell adhesion in CD40-mediated inhibition of anti-IgM antibody-induced B-cell death] [J]. Nihon Rinsho, 1996, 54(7): 1779-1783.

[57] Gultner S, Kuhlmann T, Hesse A, et al. Reduced Treg frequency in LFA-1-deficient mice allows enhanced T effector differentiation and pathology in EAE[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(12): 3403-3412.

[58] Yadava K, Marsland B J. Lymphoid follicles in chronic lung diseases[J]. Thorax, 2013, 68(6): 597-598.

[59] Boyton R J, Reynolds C J, Quigley K J, et al. Immune mechanisms and the impact of the disrupted lung microbiome in chronic bacterial lung infection and bronchiectasis[J]. Clin Exp Immunol, 2013, 171(2): 117-123.

[60] Coussens L M, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different![J]. J Exp Med, 2001, 193(6): F23-F26.

[61] Dunn G P, Bruce A T, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 991-998.

[62] Khong H T, Restifo N P. Natural selection of tumor variants in the generation of" tumor escape" phenotypes[J]. Nat Immunol, 2002, 3(11): 999-1005.

[63] Coupland L A, Chong B H, Parish C R. Platelets and P-selectin control tumor cell metastasis in an organ-specific manner and independently of NK cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(18): 4662-4671.

[64] Laurinavicius A, Plancoulaine B, Laurinaviciene A, et al. A methodology to ensure and improve accuracy of Ki67 labelling index estimation by automated digital image analysis in breast cancer tissue[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(2): R35.

[65] Araujo A A, Lopes D S G, Souza T O, et al. Olmesartan decreases IL-1beta and TNF-alpha levels; downregulates MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL; and upregulates OPG in experimental periodontitis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013, 386(10): 875-884.

[66] Zhang C, Li C, Zhu M, et al. Meta-analysis of MMP2, MMP3, and MMP9 promoter polymorphisms and head and neck cancer risk[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62023.

[67] Zhang L, Zhang H, Song G X, et al. [The expression of MMP-2 and MMP-9 in adenoid cystic carcinoma of lacrimal gland] [J]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 2013, 49(1): 58-63.

[68] Kaur M, Bahia M S, Silakari O. Inhibitors of interleukin-2 inducible T-cell kinase as potential therapeutic candidates for the treatment of various inflammatory disease conditions[J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 47(3): 574-588.

[69] Hartemann A, Bourron O. Interleukin-2 and type 1 diabetes: new therapeutic perspectives[J]. Diabetes Metab, 2012, 38(5): 387-391.

[70] Byers B A, Temple-Oberle C F, Hurdle V, et al. Treatment of in-transit melanoma with intra-lesional interleukin-2: a systematic review[J]. J Surg Oncol, 2014, 110(6): 770-775.

[71] Wang Y, Fan K T, Li J M, et al. The regulation and activity of interleukin-12[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2012, 4: 888-899.

[72] Benson J M, Peritt D, Scallon B J, et al. Discovery and mechanism of ustekinumab: a human monoclonal antibody targeting interleukin-12 and interleukin-23 for treatment of immune-mediated disorders[J]. MAbs, 2011, 3(6): 535-545.

[73] Judson M A, Marchell R M, Mascelli M, et al. Molecular profiling and gene expression analysis in cutaneous sarcoidosis: the role of interleukin-12, interleukin-23, and the T-helper 17 pathway[J]. J Am Acad Dermatol, 2012, 66(6): 901-910, 910-911.

[74] Veenbergen S, Samsom J N. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets[J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(3): 269-276.

[75] Hofmann S R, Rosen-Wolff A, Tsokos G C, et al. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury[J]. Clin Immunol, 2012, 143(2): 116-127.

[76] Bouabe H. Cytokine reporter mice: the special case of IL-10[J]. Scand J Immunol, 2012, 75(6): 553-567.

[77] Iyer S S, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease[J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32(1): 23-63.

[78] Howell W M, Rose-Zerilli M J. Interleukin-10 polymorphisms, cancer susceptibility and prognosis[J]. Fam Cancer, 2006, 5(2): 143-149.

[79] Murray P J. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response[J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6(4): 379-386.

[80] Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease[J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29 Suppl 1: i37-i45.

[81] Lan H Y, Chung A C. TGF-beta/Smad signaling in kidney disease[J]. Semin Nephrol, 2012, 32(3): 236-243.

[82] Kage H, Borok Z. EMT and interstitial lung disease: a mysterious relationship[J]. Curr Opin Pulm Med, 2012, 18(5): 517-523.

[83] Mortaz E, Adcock I M, Shafei H, et al. Role of P2X7 Receptors in Release of IL-1beta: A Possible Mediator of Pulmonary Inflammation[J]. Tanaffos, 2012, 11(2): 6-11.

[84] Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29318.

[85] Crampton S J, Collins L M, Toulouse A, et al. Exposure of foetal neural progenitor cells to IL-1beta impairs their proliferation and alters their differentiation - a role for maternal inflammation[J]. JNeurochem, 2012, 120(6): 964-973.

[86] Lee Y A, Choi H M, Lee S H, et al. Hypoxia differentially affects IL-1beta-stimulated MMP-1 and MMP-13 expression of fibroblast-like synoviocytes in an HIF-1alpha-dependent manner[J]. Rheumatology (Oxford), 2012, 51(3): 443-450.

[87] Huang Q, Lan F, Wang X, et al. IL-1beta-induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of p-cjun/c-fos, MMP2 and MMP9[J]. Mol Cancer, 2014, 13: 18.

**缩略语表**

**缩略语英文全称中文全称**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| bp | Base pair | 碱基对 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲液 |
| BSA | Bovine Serum Albumin | 牛血清白蛋白 |
| HRP | Horseradish Peroxides | 辣根过氧化物酶 |
| DAB | 3,3-diaminobenzidine | 二氨基联苯胺 |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| EDTA | Ethylenediamine Tetracetic Acid | 乙二胺四乙酸二钠 |
| FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |
| HE | Hematoxylin Eosin | 苏木素-伊红 |
| IHC | Immunohistochemistry | 免疫组织化学 |
| IF | Immunofluorescence | 免疫荧光 |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole 2hci | 4',6二脒基-2-苯吲哚  盐酸 |
| MVD | Microvessel Density | 微血管密度 |

致**谢**

本课题研究是在导师王丽京教授的悉心指导和帮助下完成。

三年前，王丽京教授把我领入广东药学院，进入血管生物学研究所学习。在攻读硕士研究生期间，王教授细致入微的教导将我从一个懵懂的本科毕业生领入神圣的生命科学殿堂，并教会我许多做人道理。王教授拥有渊博的科学知识、活跃的学术思想、严谨求实的治学态度，特别是对科学对生活的热爱与执着使我受益匪浅。在学习工作上，王教授是我的良师；在生活中，王教授更给予了我热诚的关怀，让我时时处处都能感受到如父母般的温暖，在无数次困难彷徨的时候，王教授都给了我耐心的指导和帮助，教导我无数做人做事的道理，让我终生受用。在此，谨对为我的成长倾注了全部心血的王教授表示深深的敬意和最诚挚的感谢！

本论文从选题、实验设计到实验开展都凝聚着王丽京教授的心血。王丽京教授实事求是的工作作风以及热情活跃的科研思维，让我深深体会到一个科学家崇高的科研境界，生活中也得到耿教授无数的关心和照顾。在此，谨对耿教授致以最诚挚的敬意！

课题的开展，得到带组老师李江超老师的悉心帮助指导，谢谢他的帮助。感谢血管生物学研究所的张希敏老师、亓翠玲老师、兰天老师、章倩倩老师、何晓东老师、袁俏冰老师、顾取良老师、郑凌云老师、杨永霞老师、陈卉老师等各位老师在实验工作中的指导和帮助。感谢杨雪松老师、魏来老师、郑利民老师、邹艳丽师姐、吴翀师兄等老师和师兄师姐对实验思路的指导。感谢叶志金师兄在给我极大的支持和科研指导，是他的带教使我步入科研殿堂，特别感谢郭四美师姐和周秦师兄对我实验技术的教导和帮助，特别感谢叶志金师兄和刘翼龙师兄对我实验课题基础的铺垫，特别感谢师弟周泽启，师妹张潇涵承接后续的课题工作，并在实验中给予我极大的支持和帮助。

在三年的学习过程中和课题进行期间，得到郭四美师姐、周秦师兄、温定文师兄、方海燕师姐、陈胜霞师姐、刘翼龙师兄、丁一师兄，韩露师姐、雷岩师姐、勾红菊师姐、廖梦颖师姐、叶杰师兄、吴腾师兄、郭文涛师兄，胡曦文、吴湛彬、

刘红英、邢丽英、杨扬、刘影、吴平香、李小妹同学，周泽启、周大磊、陈佳园、李斌、段有发、李昌正、黎冰林师弟，还有师妹胡银霞、黎帅、曾翠玲、张静丽、李香莉、纪晓倩、李嘉玲、欧意桃、郐一贺，同寝室的李鑫禹、万强、田先地、黄志文、陈宏升、赵亚波、蔡春生的关心和帮助，在此一并致以深深的谢意！

部分实验在中ft大学眼科中心魏来教授课题组完成，感谢魏来教授和邹艳丽师姐的帮助和指导！

我要感谢父母，正是他们多年来物质上的支持和精神上的鼓励，我才能顺利完成学业。谢谢父母无私的、默默的、始终如一的支持和鼓励！

感谢所有关心我、爱我的人们！你们的关爱是我继续前进的动力！

**硕士期间发表论文**

**中文杂志**

[1]改良CAM移植瘤模型的制备及其对肿瘤血管新生抑制药物的筛选效果

[J]．中国肿瘤生物治疗杂志，2014(02)：187-191．**第一作者**

**[2]** Tg(CD4-EGFP); LFA-1~(-/-)基因工程小鼠模型的构建[J]．广东药学院学报，2013(05)：543-546．**第五作者**

**[3]** Slit2蛋白过表达的阿尔茨海默症杂合子小鼠的构建与鉴定[J]．中国比较医学杂志，2013(10)：17-20．**第三作者**

**[4]** PSGL-1基因敲除小鼠血中MIP-1γ和TNF-α的表达[J]．中国比较医学杂志，2014(02)：70-73．**第五作者**

**[5]** FGF4在肺癌细胞体内和体外中表达差异的研究[J]．基因组学与应用生物学，2014(03)：501-504．**第六作者**

**外文期刊**

**[6]** Li J C, Han L, Wen Y X, et al. Increased permeability of the blood-brain barrier and Alzheimer's disease-like alterations in slit-2 transgenic mice [J]. J Alzheimers Dis, 2015,43(2):535-548**.第十三作者**

**[7]** Glipizide, an antidiabetic drug, suppresses tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis [J]. Oncotarget, 2014,5(20):9966-9979.**第五作者**

**[8]** High salt intake negatively impacts ovarian follicle development [J]. Ann Anat, 2015,200:79-87.**第五作者**

[8] Robo1/2 regulate follicle atresia through manipulating granulosa cell apoptosis in mice [J]. Scientific Reports, 2015,已接收。**第一作者**

**另外有三篇外文文章在投，均为共一二作**

**攻读硕士研究生期间参加的学术会议情况**

1. 2013年11月，参加中华医学会第十九次学术会议暨第三届中国病理年会。

2. 2014年12月，参加广东省病理医师协会。

3. 2013年07月，参加中华医学会组织胚胎学大会。

4. 2013年08月，参加广东省动物研究大会。