文章编号:1000-5404(2006)05-0419-03

论著

晚期胃肠道肿瘤癌性腹水对树突状细胞的抑制效应研究

雷 晓,余佩武,赵永亮,石 彦,饶 芸,曾冬竹,吴 森,周立新 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 对癌性腹水体外抑制树突状细胞(dendritic cells,DC)免疫功能的效应进行观察,着重探讨癌性腹水免疫抑制效应与腹水中IL-10含量的关系。**方法** 分离10例晚期胃肠道恶性肿瘤患者癌性腹水上清,检测IL-10含量;癌性腹水采用抗IL-10中和或直接加入DC体外培养的系统,观察癌性腹水对DC表面分子表达、细胞凋亡及T淋巴细胞刺激功能的影响。**结果** 癌性腹水较对照IL-10含量显著增高,体外对DC有显著抑制作用,能降低DC表面分子表达、抑制DC对T淋巴细胞刺激增殖效应,并显著促进DC凋亡。中和IL-10处理显著减低癌性腹水对DC的抑制效应,但对DC凋亡率无明显影响。**结论** 晚期胃肠道恶性肿瘤患者癌性腹水对树突状细胞免疫功能有显著抑制作用,IL-10含量增高可能是其抑制效应的重要机制。

关键词:树突状细胞;白细胞介素10;胃肠道肿瘤;癌性腹水
中图法分类号:R329.24;R730.2;R735 **文献标识码**:A

In vitro immunosuppressive effects of malignant ascites from advanced gastrointestinal cancer patients on immune function of dendritic cells

LEI Xiao, YU Pei-wu, ZHAO Yong-liang, SHI Yan, RAO Yun, ZENG Dong-zhu, WU Miao, ZHOU Li-xin (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the immunosuppressive effects of ascites from advanced gastricintestinal cancer patients on dendritic cell (DC) immune function and its relationship with interleukin 10. Methods Ascites samples from 10 advanced gastrointestinal cancer patients and 5 patients with benign diseases were taken during or after operation and IL-10 level was detected with ELISA. The malignant ascites was added into *in vitro* DC culture. The alteration of CD1a, CD80, CD83, HLA-DR and Annexin V expression on DC were detected by flow cytometry. The function of DC to stimulate T lymphocytes proliferation was detected by ^{3}H-TdR incorporation method. Results IL-10 was found significantly higher in malignant ascites than that in benign ascites. Malignant ascites showed distinguished suppressive effect on DC surface molecule expressions and the ability to enhance T lymphcytes proliferation. Ascits treatment also promoted DC apoptosis. IL-10 neutralization significantly reduced these suppressive effects but not the apoptosis rate. Conclusion Malignant ascites significantly suppresses DC immune function, in which the upregulation of IL-10 level might be one of the important mechanism.

Key words: dendritic cells; interleukin 10; gastrointestinal cancer; malignant ascites

癌性腹水是胃肠道恶性肿瘤晚期常见的伴随症状,对机体有广泛的影响[1],但目前研究癌性腹水对机体免疫系统影响尤其是对树突状细胞(dendritic cells,DC)作用较少。为探讨晚期胃肠道恶性肿瘤产生的癌性腹水对人外周血DC免疫功能的影响,指导以DC为基础的肿瘤生物治疗,我们将癌性腹水上清加入体外DC培养系统,检测免疫分子表达、T淋巴细胞刺激增殖效应及DC凋亡改变,并检测癌性腹水内抑制性细胞因子IL-10含量,分析其与DC免疫功能抑制机制的关系。

1 材料与方法

1.1 腹水取材与处理

癌性腹水标本来源于本科室2004年1月至2005年2月住院晚期胃肠道恶性肿瘤患者,取腹水前2周内未使用细胞毒性药物,无高热病情及肝功能异常。术中确诊腹腔内广泛种植转

作者简介:雷 晓(1970-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤外科治疗方面的研究。电话:(023)66692865,E-mail:lei_xiaoxiao@mail.yahoo.com.cn
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com
收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-13

移后取腹水;或术中证实腹腔内广泛种植转移,术后出现腹水增长,床旁行无菌腹腔穿刺术获取腹水。共获 10 例,其中胃癌 7 例,大肠癌 3 例,男性 6 例,女性 4 例,年龄(46 ± 16.3)岁。获取标本经 4℃ 10 000 r/min 离心 30 min,取上清以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装并液氮冻存备用。使用前 37 ℃水浴复温,RT 1 500 r/min 离心 10 min。对照腹水样本源于其他疾病住院患者,共 5 例,为男性急性粘连性肠梗阻,于术中剖腹后采取,同上方法处理。以 ELISA 试剂盒(晶美生物)检测腹水样本中 IL-10 含量。

1.2 DC 分离与体外培养

DC 经外周血单个核细胞培养,方法简述如下:健康成人志愿者外周静脉血 40 ml,肝素抗凝,按 1∶2 体积比缓慢加于 Ficoll 淋巴细胞分离液(天津生物)表面,20 ℃下 2 500 r/min 离心 30 min 后收集白膜层,PBS 离心洗涤 5 min × 2 次,RPMI 1640 培养基重悬,加入 24 孔板,37 ℃、5% CO_2 贴壁培养 6 h 后吸弃悬浮细胞,加入含 rhGM-CSF 及 rhIL-4(均购于 Pepro Tech)RPMI1640 培养基,终浓度分别为 500 U/ml 及 1 000 U/ml。培养分 3 组,第 1 组为空白 DC 组,隔日轻振培养板后换液,于 7 d 吹打收集悬浮 DC 备用。第 2 组为 DC + 癌性腹水组,DC 培养 3 d 换液时加入癌性腹水上清,每孔加入 200 μl,同上培养。第 3 组为 DC + 抗 IL-10 中和癌性腹水组,腹水先以抗人 IL-10(BD Pharmingen)单抗预处理,抗体浓度以腹水 IL-10 含量为准,按每 10 pg/ml IL-10 加入 3 ng/ml 抗体,37 ℃孵育 60 min,室温 1 500 r/min 离心 10 min,取上清加入培养孔,同上培养。

1.3 DC 表面分子与凋亡检测

DC 稀释至 1×10^6 个/ml,加入流式检测管,离心弃上清,分别加入抗 CD1a-PE、抗 CD83-FITC、抗 CD80-PE 及抗 HLA-DR-PE 及同型对照抗体(均购于 Immnotech),混匀后 RT 避光孵育 15 min,1 ml PBS 稀释后上机。流式细胞仪(Beckman Coulter Epics XL)以荧光微球调校,对照抗体标记细胞调节非特异性表达率 <2% 后检测 DC 各表面分子表达,每样本检测 > 5 000 个细胞。以 Annexin-V Flous Staining Kit(Roche)双标记流式细胞术按文献操作检测 DC 细胞凋亡比例[2]。

1.4 混合淋巴细胞反应

T 淋巴细胞采于健康成人外周血 20 ml,经 Ficoll 离心、收集白膜、尼龙毛柱孵育后过滤获得,苔盘蓝检查细胞活力 > 97%,调细胞浓度为 5×10^6/ml,加入园底 96 孔板,每孔 100 μl。DC 经丝裂霉素(20 μg/ml,Sigma)孵育 20 min 后洗涤 5 min × 3 次,调细胞浓度至 5×10^4/ml,按 T∶DC = 100∶1、200∶1、500∶1、和 1 000∶1 比例加入 96 孔板,每梯度设 3 复孔,以空白淋巴细胞为对照。培养 48 h,结束前 6 h 加入 ^{3}H-TdR。收集细胞后以液相闪烁计数仪(Beckman LS6500)检测 cpm。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计程序进行 t 检验。

2 结果

2.1 腹水 IL-10 含量

ELISA 法检查显示,良性腹水中 IL-10 含量为(49.7 ± 8.7)pg/ml,癌性腹水内 IL-10 含量为(93.5 ± 27.3)pg/ml,较良性腹水含量显著增高($t = 3.182$,$P < 0.05$)。

2.2 癌性腹水对 DC 表面分子表达及凋亡影响

流式细胞术检测显示 DC + 癌性腹水组的表面分子 CD1a、CD80、CD83 及 HLA-DR 表达有显著降低,DC 上 Annexin V 表达显著增加。DC + 抗 IL-10 处理癌性腹水组上述表面分子表达有显著增高(表 1),但 Annexin V 表达无明显降低。

表 1 癌性腹水对 DC CD1a、CD80、CD83、HLA-DR 及 Annexin V 表达影响[($\bar{x} \pm s$)%]

	CD1a	CD80	CD83	HLA-DR	Annexin V
DC + 癌性腹水组	12.9 ± 3.0	35.2 ± 5.4	34.4 ± 5.7	43.5 ± 6.7	14.6 ± 5.6
DC + 抗 IL-10 中和癌性腹水组	21.9 ± 8.1	64.4 ± 10.0	70.9 ± 9.1	78.1 ± 7.4	10.9 ± 2.4
t	−2.318	−5.731	−7.603	−7.786	1.337
P	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

2.3 癌性腹水对 DC 淋巴细胞刺激增值作用影响

DC + 癌性腹水组、DC + 抗 IL-10 中和癌性腹水组分别用于刺激 T 淋巴细胞增值实验检测,结果显示 DC + 抗 IL-10 中和癌性腹水组的刺激增值效应在 T∶DC = 200∶1 和 100∶1 时较 DC + 癌性腹水组有显著增加($t = -3.108$,$P < 0.05$;$t = -4.517$,$P < 0.01$)(图 1)。

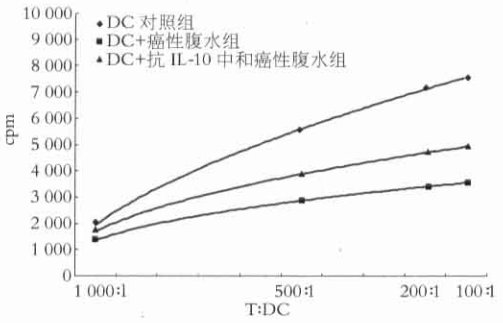


图 1 IL-10 中和处理对腹水抑制 DC 淋巴细胞刺激增值效应的影响

3 讨论

促进胃肠道肿瘤癌性腹水形成的原因复杂,可能包括肿瘤晚期出现的广泛腹腔内种植性转移造成腹膜上皮结构破坏、局部淋巴管道阻塞、新生血管诱导生成等,以及肿瘤晚期恶病质造成内分泌紊乱、电解质紊乱及低蛋白血症等多种因素影响腹膜吸收与分泌平衡机制,造成腹水成为晚期癌症的表现之一。目前研究表明,癌性腹水对患者生存有明显影响[1],需要积极治疗以改善患者预后。因而癌性腹水对患者免疫影响的研究正逐渐受到临床重视。

癌性腹水影响机体免疫系统可能与影响 Th1/Th2 平衡有关。研究表明,机体免疫调节处于 Th1/Th2 的动态平衡中[3],两种状态各有其独特的免疫反应特点

及细胞因子表达情况。抗肿瘤的免疫激发以 Th1 反应为主，其代表性细胞因子表达有 IFN-γ 和 IL-12 等。抑制性免疫以 Th2 反应，以 IL-10、IL-4 和 PGE_2 等抑制性细胞因子表达为代表，后者对 DC 的免疫功能有显著抑制作用。体外实验研究提示，IL-4 和 IL-10 可抑制 DC 上 B7-1/B7-2 表达比例，阻断 DC 介导的细胞毒性 T 细胞反应[4]。在肿瘤环境下，抑制性细胞因子对 DC 也有显著抑制作用。有研究表明，动物模型肿瘤诱导生成的 IL-10 可显著抑制其脾脏 DC 刺激 Th1 细胞反应的能力[5]。对恶性肿瘤患者，抑制性细胞因子含量对患者免疫也有明显影响。研究表明，晚期胃肠道肿瘤患者血浆 IL-10 含量增高，并可作为独立的预后指标，对患者总体生存有显著预后意义[6]。而且胃癌患者腹腔灌洗液中 Th2 免疫反应的代表性细胞因子 IL-10 的含量与胃癌临床分期显著相关，分期越晚 IL-10 含量越高。反之 Th1 反应的代表性细胞因子 IFN-γ 含量则与患者生存率呈现正相关[7]。因此，抑制性细胞因子尤其以 IL-10 表达增高，可能显著影响患者 DC 的免疫诱导功能，导致患者免疫平衡向 Th2 偏移，不利于机体抗瘤免疫的激发，进而显著影响恶性肿瘤患者远期生存率。本研究表明，晚期胃癌患者癌性腹水中 IL-10 含量较良性疾病腹水显著增高，说明 IL-10 在晚期胃肠道恶性肿瘤患者的免疫中可能存在重要作用。将癌性腹水加入体外 DC 培养体系后，DC 上相关免疫分子表达改变明显，MHC 分子、协刺激分子 CD80、成熟标志 CD83 分子等的表达下调，表明癌性腹水能显著抑制 DC 成熟。癌性腹水处理也能显著抑制 DC 对 T 淋巴细胞刺激能力，表明癌性腹水能抑制 DC 功能。癌性腹水经抗 IL-10 中和处理后，以上对 DC 的抑制作用有显著减弱，该结果说明，癌性腹水中 IL-10 是 DC 表面分子表达及功能受抑制重要机制。我们研究发现，DC 上 Annexin V 表达率，亦即 DC 的凋亡率在 IL-10 中和处理后无明显改善，说明癌性腹水成分复杂，影响 DC 的因素可能是多方面、多层次的，癌性腹水中可能存在其他因素导致 DC 凋亡，需要进一步的研究探讨。

深入研究表明，IL-10/IL-10-R 系统正常情况下是 DC 内源性免疫功能负调节机制之一。未成熟 DC 可分泌 IL-10，以自分泌形式抑制 DC 成熟，同时以旁分泌形式抑制效应 T 细胞分化、促进调节性 T 细胞产生，以达到抑制过度的免疫反应或防止自身免疫发生[8]的作用。而且 DC 分泌 IL-10 具有异质性，根据 DC 功能特点，可以将 DC 划分为为刺激性 DC（DC_1）与抑制性 DC（DC_2），刺激性 DC 以分泌 IL-12 为主，抑制性 DC 则以分泌 IL-10 为主[9]。因而内 DC 不能被认为是单一细胞群，可能是具有不同功能的多分化亚群的集合。DC 最终的分化结果与其环境中的细胞因子有一定关系。研究表明，局部 IFN-γ 能诱导 DC 向 DC_1 分化，进而诱导 Th1 反应；PGE_2 诱导 DC 向 DC_2 分化，促进 Th2 反应产生[10]。因此，IL-10/IL-10-R 系统也可能是 DC 分化控制的一种重要机制。在恶性肿瘤环境下，DC 正常的免疫负调节与分化机制可能被肿瘤诱导生成的 IL-10 等细胞因子利用和强化，造成机体免疫平衡向 Th2 方向偏移，严重影响机体抗肿瘤免疫反应产生，对患者预后造成严重影响。进一步深入分析恶性肿瘤患者免疫细胞因子特点，研究 DC 免疫调节与分化同恶性肿瘤的关系，在临床恶性肿瘤免疫治疗中充分利用细胞因子和抗细胞因子手段，以纠正机体免疫平衡，促进和增强机体抗肿瘤免疫，达到较好的免疫治疗效果，将是今后临床抗肿瘤生物治疗研究的重要方向。

参考文献：

[1] BIELIGK S C, CALVO B F, COIT D G. Peritoneovenous shunting for nongynecologic malignant ascites[J]. Cancer, 2001, 91(7): 1247-1255.

[2] 雷　晓，余佩武. 双标记流式细胞术定量分析 5-FU 诱导胃癌细胞早期凋亡[J]. 第三军医大学学报，2002，24(7)：855-857.

[3] KIDD P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease[J]. Altern Med Rev, 2003, 8(3): 223-246.

[4] KING C, MUELLER-HOENGER R, MALO-CLEARY M, *et al*. Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic $CD8^+$ T-cell responses[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 206-214.

[5] YANG A S, LATTIME C. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2150-2157.

[6] DE-VITA F, ORDITURA M, GALIZIA G, *et al*. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies[J]. Cancer, 1999, 86(10): 1936-1943.

[7] MAJIMA T, ICHIKURA T, SEKI S, *et al*. Interleukin-10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2001, 78(2): 124-130.

[8] CORINTI S, ALBANESI C, LA-SALA A, *et al*. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions[J]. J Immunol, 2001, 166(7): 4312-4318.

[9] CHAKRABORTY A, LI L, CHAKRABORTY N G, *et al*. Stimulatory and inhibitory differentiation of human myeloid dendritic cells[J]. Clin Immunol, 2000, 94(2): 88-98.

[10] VIEIRA P L, DE-JONG E C, WIERENGA E A, *et al*. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction[J]. J Immunol, 2000, 164(9): 4507-4512.

（编辑　陈聪连）