论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0930-04

肝癌细胞对树突状细胞线粒体功能的抑制作用

曾 柱[1,2],龙金华[3] (550004 贵阳,贵阳医学院基础医学院生物技术教研室[1];100083 北京,北京大学基础医学院生物物理系血液流变学研究中心[2];550004 贵阳,贵州省肿瘤医院头颈肿瘤科[3])

[摘要] **目的** 探索肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells, HCCs)分泌的可溶性细胞因子营造的微环境对树突状细胞(dendritic cells,DCs)线粒体功能状态的影响,以进一步理解肿瘤的免疫逃逸机制。**方法** 用免疫磁珠从人外周血分离 $CD14^+$ 单核细胞,加入粒-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage CSF, rhGM-CSF)、白介素4(IL-4)将单核细胞诱导分化为未成熟 DCs(immature DCs,imDCs),利用肿瘤坏死因子 α(recombinant human tumor necrosis factor -α, rhTNF-α)将 imDCs 诱导为成熟 DCs(mature DCs, mDCs),分别将 imDCs 和 mDCs 与肝癌细胞在 Transwell 中共培养 48 h,正常培养和撤生长因子培养的 DCs 作为对照,利用免疫荧光和 MTT 比色法研究 HCCs 对 DCs 的线粒体膜电位、酶活力和胞内钙离子浓度的影响。**结果** 与 HCCs 共培养后,流式细胞仪的检测结果显示:imDCs 和 mDCs 的线粒体膜电位分别从(659.991 ± 17.052)和(473.741 ± 11.676)下降到(482.681 ± 7.935)和(407.189 ± 5.051)($P < 0.05$),imDCs 和 mDCs 胞内钙离子浓度分别从(427.983 ± 3.358)和(232.587 ± 3.815)增加到(517.308 ± 0.249)和(413.062 ± 2.981)($P < 0.05$, $P < 0.01$),MTT 比色法的检测结果显示 imDCs 和 mDCs 的酶活力分别从(0.764 ± 0.089)和(0.708 ± 0.019)下降到(0.291 ± 0.019)和(0.218 ± 0.019)($P < 0.01$)。**结论** HCCs 可能通过抑制 DCs 的线粒体功能来损伤其免疫功能。

[关键词] 树突状细胞;肝癌细胞;线粒体功能

[中图法分类号] R392.12;R730.23;R735.7 **[文献标志码]** A

Hepatocellular carcinoma cells suppress mitochondrial function of dendritic cells *in vitro*

Zeng Zhu[1,2], Long Jinhua[3] ([1]Department of Biotechnology, School of Basic Medical Science, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [2]Hemorheological Research Center, Department of Biophysics, School of Basic Medical Science, Beijing University, Beijing, 100083; [3]Department of Head and Neck Tumor, Tumor Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou Province, 550004, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of microenvironment created by dissoluble cytokines derived from hepatocellular carcinoma cells (HCCs) on the functional status of mitochondria in dendritic cells (DCs) in order to investigate the mechanisms of tumor immune escape. **Methods** $CD14^+$ monocytes, which were isolated with immune magnetic beads from fresh peripheral blood of healthy human, were then cultured in RPMI1640/10% FBS supplemented with 100 ng/ml rhGM-CSF and 100 ng/ml rhIL-4 for 7 d to develop into immature DCs (imDCs). Maturation was induced by addition of 20 ng/ml rhTNF-α to imDCs for another 3 d of culture. Acquired imDCs and mDCs were respectively co-cultured with human HCCs for 48 h in Transwell chamber. These treated cells were investigated for mitochondrial membrane potential, enzyme activity and intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_{in}$) in the cytoplasma by immune fluorescence and MTT assay. Those untreated cells served as control. **Results** After co-cultured with HCCs, flow cytometry showed that the mitochondrial membrane potentials of imDCs and mDCs were respectively decreased from (659.991 ± 17.052) and (473.741 ± 11.676) to (482.681 ± 7.935) and (407.189 ± 5.051) ($P < 0.05$), $[Ca^{2+}]_{in}$ of imDCs and mDCs were respectively increased from (427.983 ± 3.358) and (232.587 ± 3.815) to (517.308 ± 0.249) and (413.062 ± 2.981) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). MTT assay showed that the enzyme activities of mitochondrions of imDCs and mDCs were respectively decreased from (0.764 ± 0.089) and (0.708 ± 0.019) to (0.291 ± 0.019) and (0.218 ± 0.019) ($P < 0.01$). **Conclusion** HCCs might suppress immune function of DCs by inhibiting functional status of mitochondrion.

[Key words] dendritic cells; hepatocellular carcinoma cells; mitochondrial function

Supported by the Foundation of Governor of Guizhou Province(2009-79), and the Natural Science Foundation of Guizhou Province(2008-2274). Corresponding author: Zeng Zhu, Tel: 86-851-6909969, E-mail: zengzhu100@sina.com

[基金项目] 贵州省省长基金(黔省专字2009-79);贵州省自然科学基金(黔省合J字2008-2274)

[通信作者] 曾 柱,电话:(0851)6909969,E-mail: zengzhu100@sina.com

树突状细胞(dendritic cells,DCs)是一种特化的抗原呈递细胞,具有强大的抗原摄取和处理能力,能够向幼稚的T细胞呈递肿瘤相关抗原,从而诱导对肿瘤细胞具有特异性的免疫应答[1,2]。将DCs负载肿瘤抗原(肿瘤疫苗)并过继回输荷瘤宿主的体内,这些DCs能够诱导对肿瘤具有特异性的免疫应答[1]。但是从目前的临床试验结果来看,该疗法的治疗效率还不尽人意,还有许多问题需要解决[1,3-6],这就需要进一步研究肿瘤来源因素对DCs功能的影响。现已知道,恶性肿瘤宿主体内的DCs功能发生了紊乱,肿瘤可以通过多种方式逃脱免疫系统的监视[7,8],但是其潜在的机制还知之甚少,并且不同的肿瘤对DCs功能的影响机制还不尽相同[9-11]。不同的研究小组现已证实,肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells, HCCs)并不影响DCs(包括imDCs和mDCs)的表型[12-14]。本课题小组以前的研究发现,不同分化阶段的DCs表现出不同的生物物理特性[15]和粘附能力[16],肿瘤来源的因素可以通过影响DCs的细胞骨架F-actin结构、细胞能量状态和基因转录状态以及生物物理特性来损伤其运动能力,进而抑制其正常免疫功能的发挥[17,18]。

基于此,为了探索肿瘤来源因素对DCs的线粒体功能是否存在影响,本研究利用免疫荧光和MTT等方法观察DCs与HCCs共培养48 h后,DCs的线粒体膜电位和酶活力以及胞内钙离子浓度的变化,对进一步深入了解肿瘤的免疫逃逸机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage CSF, rhGM-CSF),重组人白介素4(recombinant human interleukins 4, rhIL-4)和重组人肿瘤坏死因子α(recombinant human tumor necrosis factor-α, rhTNF-α)购自美国R&D公司;淋巴细胞分离液(Ficoll,1.077 g/ml)购自上海试剂二厂;完全培养基包括:RPMI1640购自美国Gibco公司,胎牛血清(FCS)购自美国HyClone公司,2 mmol/L谷氨酸酰胺,0.01 mmol/L丙酮酸钠,0.05 mmol/L巯基乙醇,20 mmol/L Hepes,100 U/ml青霉素,100 μg/ml链霉素;FITC标记的抗人CD14单克隆抗体购自美国Sigma公司;人$CD14^+$单核细胞阴性选择免疫磁珠试剂盒(monocyte isolation cocktail kit)购自德国Mitenyi公司;Fluo-3/AM酯购自美国Molecular Probe公司;罗丹明123和四唑蓝购自美国Sigma公司。

1.2 肝癌细胞株的培养

肝癌细胞株Bel7402由北京大学基础医学院细胞生物学系张页教授提供。PBS清洗过的Bel7402细胞(2×10^6/ml)在RPMI1640+10%胎牛血清中培养,培养条件是37 ℃,5% CO_2和95%湿度。细胞每隔3天用10%的胰岛素/EDTA消化后传代。收集处于对数生长期的细胞用于与DCs共培养。

1.3 单核细胞和树突状细胞的获得

DCs按Steinman等[1]描述的方法由健康人新鲜外周血单个核细胞诱导而得,做适当改进。具体步骤简述如下:从人外周血单个核细胞分离的贴壁单核细胞用含鸡尾酒抗体的抗CD3、CD7、CD19、CD45RA、CD56和抗IgE抗体的免疫磁珠(miltenyi biotec)阳性选择去除T细胞、NK细胞、B细胞、中性粒细胞和树突状细胞等非单核细胞,获得高纯度(95%以上)的$CD14^+$单核细胞。收集5×10^6 $CD14^+$单核细胞加入含100 ng/ml rh-GM-CSF和100 ng/ml rhIL-4的完全培养液中培养至第7天,收集悬浮细胞即为未成熟DCs(imDCs)。未成熟DCs中加入20 ng/ml rhTNF-α培养3 d即为成熟的DCs(mDCs)。DCs表型用FITC或PE标记的鼠抗人抗体CD1a、CD11c、CD40、CD80、CD83、CD86和HLA-DR分析其表达量。细胞存活率用台盼蓝染色检测。

1.4 DCs与HCCs的共培养

2×10^7 imDCs或mDCs与2×10^6 HCCs在Transwell(0.6 μm孔径,Corning公司)中培养48 h。DCs置于Transwell的上室,HCCs置于下室。这些细胞命名为DCs+HCCs(包括imDCs+HCCs和mDCs+HCCs)。作为对照,培养于含RPMI1640+10% FBS、rhGM-CSF(50 ng/ml)和rhIL-4(100 ng/ml)的完全培养基中的DCs命名为DCs(包括imDCs和mDCs);培养于含10%胎牛血清、不含rhGM-CSF和rhIL-4的RPMI1640培养基中的DCs命名为DCs+nonGF(包括imDCs+nonGF和mDCs+nonGF)。细胞存活率用台盼蓝染色检测。

1.5 细胞线粒体膜电位检测

常规制备细胞悬液1×10^6,于室温用PBS漂洗2次;加入罗丹明123,终浓度为5 μg/ml,37 ℃孵育30 min;PBS漂洗3次,去除未结合的染料;500 μl PBS重悬细胞,过300目细胞筛,流式细胞仪分析。

1.6 MTT法检测细胞线粒体酶活力

常规制备细胞悬液,PBS漂洗2次,弃上清;1 ml PBS重悬细胞,加入5 mg/ml MTT,避光,37 ℃孵育4 h;1 000 r/min离心5 min,弃上清,PBS漂洗1次,每个样品EP管中分别加入0.5 ml酸性异丙醇,吹打均匀,离心;取0.3 ml上清液入96孔板,每个样品3个复孔;Bio-Rad酶标仪测定570 nm处的光密度值$D(570)$,表示线粒体的酶活力。

1.7 胞内钙离子($[Ca^{2+}]_{in}$)的检测

收集2×10^6细胞,PBS漂洗2次,弃上清;100 μl PBS重悬细胞,加入Ca^{2+}荧光指示剂Fluo-3/AM酯(终浓度为10 μmol/L),37 ℃孵育40 min,期间轻微振荡数次。未加指示剂的样品为阴性对照。PBS漂洗细胞至少3次,弃上清;300 μl PBS重悬细胞,过300目细胞筛,在流式细胞仪上,每个样品收集10^5细胞,用CellQuest程序测定。样品和阴性对照的平均荧光强度差值即为细胞内Ca^{2+}浓度。每种细胞重复测量3次。

1.8 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SAS 8.2统计软件作方差分析,组间两两比较用t检验。

2 结果

2.1 DCs 线粒体膜电位

流式细胞仪检测细胞内罗丹明 123 的荧光强度，结果如表 1 所示，与对应的正常培养的 DCs 相比较，imDCs + HCCs 和 mDCs + HCCs 的线粒体膜电位显著下降（$P < 0.05$）。

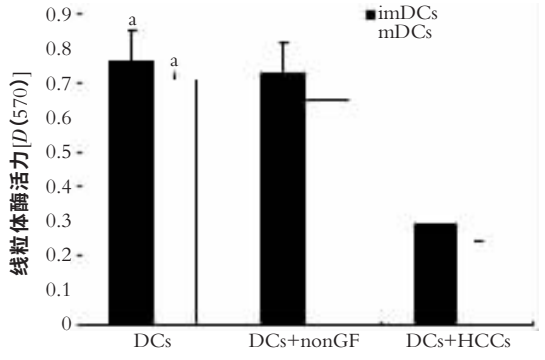
表 1 不同培养条件下 imDCs 和 mDCs 线粒体膜电位的比较（$\bar{x} \pm s$）

细胞类别	DCs	DCs + nonGF	DCs + HCCs
imDCs	659.991 ± 17.052[a]	513.488 ± 12.349	482.681 ± 7.935
mDCs	473.741 ± 11.676[b]	574.626 ± 13.369	407.189 ± 5.051

a：$P < 0.05$，与 imDCs + HCCs 比较；b：$P < 0.05$，与 mDCs + HCCs 比较

2.2 DCs 线粒体酶活力

MTT 法检测了不同培养条件下 DCs 的线粒体酶活力，如图 1 所示，DCs + HCCs（包括 imDCs + HCCs 和 mDCs + HCCs）的 $D(570)$ 值显著低于 DCs（$P < 0.01$），说明其线粒体酶活力受到了显著的抑制。

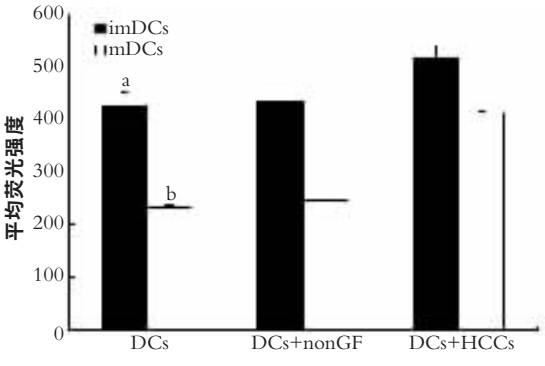


a：$P < 0.01$，与 DCs + HCCs 比较

图 1 不同培养条件下 DCs 线粒体酶活力的比较

2.3 DCs 的 $[Ca^{2+}]_{in}$

用流式细胞仪测得的平均荧光强度如图 2 所示，肿瘤微环境下的 DCs（包括 imDCs 和 mDCs）胞内 Ca^{2+} 浓度显著增加（$P < 0.01$，$P < 0.05$）。



a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 DCs + HCCs 比较

图 2 不同培养条件下 DCs 胞内钙离子浓度的比较

3 讨论

树突状细胞（DCs）起源于骨髓中的造血干细胞，出骨髓后分化为髓系和淋巴系祖细胞，$CD14^+$ 单核细胞来源的髓系 DCs 是目前体外诱导 DCs 的主要方法[1]。DCs 是专业抗原呈递细胞，其主要功能是摄取、加工处理和呈递抗原，可诱导幼稚 T 细胞活化增殖，从而引起机体的免疫应答或耐受。从功能上来说，获得抗原前的 DCs 称为 imDCs，位于外周组织，具有极强的抗原摄取和处理能力，主要是通过吞噬作用（phagocytosis）、巨胞饮作用（macropinocytosis）和受体介导的内吞作用（receptor-mediated endocytosis）等方式摄取抗原；获取抗原后，DCs 在处理抗原的同时，向二级淋巴组织迁移，逐渐减弱其抗原摄取和处理能力，上调 MHC Ⅱ 和趋化因子受体 CCR7 等基因的表达，逐渐出现并增强其共刺激信号（costimulation signal）CD86、CD80 和 CD40 等分子的表达，导致其活化幼稚 T 细胞的能力逐渐增加，成为 mDCs[3]。在淋巴结内，mDCs 与幼稚的 T 细胞发生直接的物理性接触，通过 MHC Ⅰ 或 MHC Ⅱ 分子向其呈递所获抗原，刺激幼稚 T 细胞特异性增殖，从而启动适应性免疫应答或耐受[3-5]，所以，DCs 与 T 细胞间的任何相互作用信息都有可能在临床上开发出新的治疗方法。

肿瘤细胞的低免疫原性与 DCs 的功能低下密切相关。多数学者认为肿瘤组织微环境存在的大量细胞因子单独或协同地抑制了 DCs 的抗原呈递功能，使机体无法诱导抗肿瘤免疫应答[7,9-11]。

线粒体是细胞内具有双层膜结构和独立基因组 DNA 的重要细胞器，它不仅仅是细胞主要的能量来源，而且还涉及到细胞的凋亡、物质代谢、运动、信号转导等重要的功能[19]。线粒体与细胞骨架系统之间存在功能上的偶联[20]，细胞骨架及其某些结合蛋白能够通过控制线粒体外膜对 ADP 的渗透性来调控其呼吸功能[21]。线粒体膜电位和酶活力是衡量细胞线粒体功能的重要指标。在正常细胞的线粒体中，三羧酸循环产生的能量传递给电子，电子经呼吸链传递的同时，将质子从线粒体内膜的基质侧泵到内膜外，形成跨膜电位差，即线粒体的膜电位。在线粒体合成 ATP 的过程中，线粒体内膜两侧的电位差发挥着至关重要的作用，同时线粒体膜电位也是反映线粒体膜完整性的指标之一[19]。线粒体酶活力是反映细胞线粒体功能的另一个重要指标，线粒体酶参与三羧酸循环和氧化磷酸化过程，其活性变化决定有氧代谢的盛衰，其损伤性反应与线粒体内膜损伤程度和 ATP 的合成量呈正相关[21]。研究结果显示，与 HCCs 共培养 48 h 后，无论是 imDCs 还是 mDCs，细胞的线粒体膜电位和酶活力均显著下降（$P < 0.05$，$P < 0.01$），说明 DCs 的线粒体膜结构受到了损伤，影响了氧化磷酸化和 ATP 的合

成过程,导致细胞能量状态低下。Kuznetsov 等[22]的研究发现,细胞线粒体的结构与其迁移能力密切相关。本课题组以前的研究发现,DCs 的能量状态和迁移能力的确受到了 HCCs 来源因素的抑制,而且这种抑制并不是通过诱导 DCs 的凋亡来实现[18]。本研究结果进一步证实了 DCs 的线粒体功能受抑可能与其迁移能力和免疫功能受损存在密切联系。众所周知,线粒体损伤是细胞凋亡的重要途径之一[23],但是为什么 HCCs 能够损伤 DCs 的线粒体功能而又不导致其凋亡,这一问题需要进一步的研究。

钙离子作为细胞内重要的第二信使,在多方面影响细胞的生物学行为,线粒体功能与细胞 $[Ca^{2+}]_{in}$ 存在偶联[24]。本研究发现,与对应的正常 DCs 相比,DCs + HCCs 组(包括 imDCs + HCCs 和 mDCs + HCCs)的 $[Ca^{2+}]_{in}$ 显著增加($P<0.01$, $P<0.05$),这可能是 DCs 的线粒体膜电位和酶活力下降的直接结果。$[Ca^{2+}]_{in}$ 的增加会导致细胞骨架不稳定和细胞变形能力下降。本课题小组以前的研究发现:HCCs 可导致 DCs 的细胞骨架 F-actin 紊乱、迁移能力下降、抗原摄取和共刺激能力受损[20]。结合本研究结果可以推测,由 HCCs 引起的 $[Ca^{2+}]_{in}$ 增加可能是处于肿瘤微环境下的 DCs 迁移能力和免疫功能受损的原因之一。

总之,本研究结果表明 HCCs 能够引起 DCs 的线粒体膜电位和酶活力下降以及胞内钙离子的增加,导致 DCs 线粒体的生理功能受到了损伤,从而影响其正常免疫功能的发挥,这可能是肿瘤细胞免疫逃逸的一个方面。

参考文献:

[1] Steinman R M, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine [J]. Nature, 2007, 449(7161): 419 – 426.
[2] Dhodapkar M V, Dhodapkar K M, Palucka A K. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(1): 39 – 50.
[3] Steinman R M. Dendritic cells *in vivo*: a key target for a new vaccine science[J]. Immunity, 2008, 29(3): 319 – 324.
[4] Banchereau J, Palucka A K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 296 – 306.
[5] Soruri A, Zwirner J. Dendritic cells: limited potential in immunotherapy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 241 – 245.
[6] Nestle F O, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(2): 163 – 169.
[7] Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(10): 715 – 727.
[8] Dunn G P, Koebel C M, Schreiber R D. Interferons, immunity and cancer immunoediting[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(11): 836 – 848.
[9] Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(12): 941 – 952.
[10] Rabinovich G A, Gabrilovich D, Sotomayor E M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells[J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 267 – 296.
[11] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 263 – 274.
[12] Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, *et al*. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(4): 431 – 436.
[13] Lee W C, Wang H C, Jeng L B, *et al*. Effective treatment of small murine hepatocellular carcinoma by dendritic cells[J]. Hepatology, 2001, 34(5): 896 – 905.
[14] Lee W C, Chiang Y J, Wang H C, *et al*. Functional impairment of dendritic cells caused by murine hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Immunol, 2004, 24(2): 145 – 154.
[15] Zeng Z, Liu X, Jiang Y, *et al*. Biophysical studies on the differentiation of human $CD14^+$ monocytes into dendritic cells[J]. Cell Biochem Biophys, 2006, 45(1): 19 – 30.
[16] Jiang Y, Zeng Z, Sun D, *et al*. Adhesion of monocyte-derived dendritic cells to human umbilical vein endothelial cells in flow field decreases upon maturation[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2005, 33(4): 261 – 268.
[17] Zeng Z, Xu X, Zhang Y, *et al*. Tumor-derived factors impaired motility and immune functions of dendritic cells through derangement of biophysical characteristics and reorganization of cytoskeleton[J]. Cell Motil Cytoskeleton, 2007, 64(3): 186 – 198.
[18] Zeng Z, Yao W, Xu X, *et al*. Hepatocellular carcinoma cells deteriorate the biophysical properties of dendritic cells[J]. Cell Biochem Biophys, 2009, 55(1): 33 – 43.
[19] Campello S, Lacalle R A, Bettella M, *et al*. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics[J]. J Exp Med, 2006, 203(13): 2879 – 2886.
[20] McBride H M, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse[J]. Curr Biol, 2006, 16(14): R551 – R560.
[21] Kuznetsov A V, Hermann M, Saks V, *et al*. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(10): 1928 – 1939.
[22] Kuznetsov A V, Margreiter R. Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10(4): 1911 – 1929.
[23] Wang C, Youle R J. The role of mitochondria in apoptosis[J]. Annu Rev Genet, 2009, 43:95 – 118.
[24] Kazuno A A, Munakata K, Tanaka M, *et al*. Relationships between mitochondrial DNA subhaplogroups and intracellular calcium dynamics [J]. Mitochondrion, 2008, 8(2): 164 – 169.

(**收稿**:2009-11-16;**修回**:2009-12-14)
(编辑 吴培红)