文章编号:1000-5404(2010)12-1305-03

论著

肝癌细胞对树突状细胞白介素-12表达的影响

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** 研究肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells,HCCs)微环境对树突状细胞(dendritic cells, DCs)的白介素-12(interleukin-12, IL-12)表达的影响,以进一步理解肿瘤的免疫逃逸机制。**方法** 免疫磁珠法从人外周血分离$CD14^+$单核细胞,加入rhGM-CSF和rhIL-4将单核细胞诱导分化为imDCs,利用rhTNF-α将imDCs诱导为mDCs,imDCs和mDCs与HCCs在Transwell中共培养48 h,ELISA法分别检测不同培养条件下上清液中IL-10、IL-12、转化生长因子β_1(trasnformed growth factor-β_1,TGF-β_1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)的表达量。**结果** 与HCCs共培养后,imDCs和mDCs的IL-12的表达量分别从(115.076±8.129)pg/ml和(258.346±3.609)pg/ml下调至(17.599±1.757)pg/ml和(6.787±1.123)pg/ml($P<0.05$, $P<0.01$),而且培养上清中的TGF-β_1浓度分别从(133.172±3.053)pg/ml和(174.446±3.972)pg/ml上调至(633.025±9.527)pg/ml和(486.806±10.515)pg/ml($P<0.05$,$P<0.01$),VEGF的浓度分别从0 pg/ml上调至(830.892±7.564)pg/ml和(858.169±5.419)pg/ml($P<0.01$)。**结论** HCCs可抑制DCs的IL-12的表达,这可能是HCCs损伤DCs免疫调节功能的方式之一。

[关键词] 树突细胞;癌,肝细胞;白细胞介素12;转化生长因子β1;血管内皮生长因子
[中图法分类号] R392.11; R730.23; R735.7 **[文献标志码]** A

Hepatocellular carcinoma cell line Bel7402 suppresses IL-12 secretion of dendritic cells

Zeng Zhu[1,2], Long Jinhua[3] ([1]Department of Biotechnology, School of Basic Medical Sciences, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [2]Hemorheological Research Center, Faculty of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Peking University, Beijing, 100083; [3]Department of Head and Neck Tumor, Tumor Hospital of Guizhou, 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 expression of IL-12 of dendritic cells (DCs) at different differentiating stage. **Methods** The $CD14^+$ monocytes, isolated with immune magnetic beads from fresh peripheral blood of healthy human, were cultured in RPMI 1640/10% 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 days' culture. Acquired imDCs and mDCs were respectively co-cultured with human HCC Bel7402 cells for 48 h in Transwell chamber. The concentrations of IL-10, IL-12, TGF-β_1 and VEGF in culture supernatant were investigated by ELISA, imDCs and mDCs cultured alone served as control. **Results** After co-cultured with Bel7402 cells, IL-12 were decreased from (115.076±8.129) pg/ml to (17.599±1.757) pg/ml in imDCs, and from (258.346±3.609) pg/ml to (6.787±1.123) pg/ml in mDCs ($P<0.05$, $P<0.01$). However, TGF-β_1 concentrations in culture supernatant were increased from (133.172±3.053) pg/ml to (633.025±9.527) pg/ml in imDCs, and from (174.446±3.972) pg/ml to (486.806±10.515) pg/ml in mDCs ($P<0.05$, $P<0.01$). VEGF concentrations was from 0 pg/ml to (830.892±7.564) pg/ml and (858.169±5.419) pg/ml in imDCs and mDCs respectively ($P<0.01$). **Conclusion** HCCs inhibits secretion of IL-12 from DCs, which may be one of the ways which HCCs impair the immune regulatory function of DCs.

[Key words] dendritic cells; carcinoma, hepatocellular; interleukin-12; transforming growth factor beta1; vascular endothelial growth factors

Supported by the Special 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

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。将DCs负载肿瘤抗原(肿

[基金项目] 贵州省省长专项基金(2009-79)和贵州省自然科学基金(2008-2274)
[通信作者] 曾 柱,电话:(0851)6909969,E-mail: zengzhu100@sina.com

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。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[1,2],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,恶性肿瘤通过损伤 DCs 的功能等多种方式来逃脱免疫系统的监视,但是其潜在的机制还知之甚少[3]。本课题小组前期研究发现,不同分化阶段的 DCs 表现出不同的微观流变学特性[4]和黏附能力[5],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、线粒体功能[6]以及微观流变学特性来损伤其运动能力,进而抑制其正常免疫功能的发挥[7,8]。IL-12 是 DCs 发挥免疫调节功能的重要细胞因子,它在机体抗肿瘤的过程中发挥着重要的作用[9]。本研究探讨肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells, HCCs)微环境对 DCs 的白介素-12(interleukin-12, IL-12)表达的影响,以进一步理解肿瘤的免疫逃逸机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage CSF, rhGM-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 -α, rhTNF-α)购自 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 或 PE 标记的抗人 CD1a、CD11c、CD14、CD40、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司;M199 培养基购自美国 Gibco 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。

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 HCCs 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 d 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和鉴定

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,做适当修改。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 个 $CD14^+$ 单核细胞加入含 100 ng/ml rhGM-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 DC (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。扫描电镜分析细胞形态。细胞存活率用胎盘蓝染色检测。

1.4 mDCs 与 HCCs 共培养及其上清收集

2×10^7 个 imDCs 或 mDCs 与 2×10^6 个 HCCs 在 Transwell (0.6 μm 孔径, Corning 公司)中培养 48 h,培养液总体积为 10 ml。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。收集每种培养条件培养上清 5 ml,离心后,-80 ℃冻存,备用。

1.5 细胞因子的检测

ELISA 试剂盒(美国 Biosource 公司)检测不同培养条件下上清液中 IL-12、IL-10、TGF-β_1 和 VEGF 的含量。酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)读取光密度值[$D(450)$]。

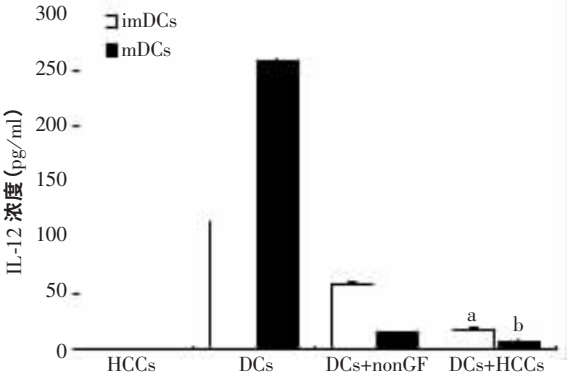
1.6 统计学分析

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

2 结果

2.1 不同培养条件下上清液中 IL-12 的表达

各种培养条件下细胞培养上清中的 IL-12 表达量如图 1 所示,DCs + HCCs 组的 IL-12 分泌明显低于 DCs 组($P < 0.05$, $P < 0.01$),而在 HCCs 上清中并未检测到 IL-12。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对应的 DCs 比较

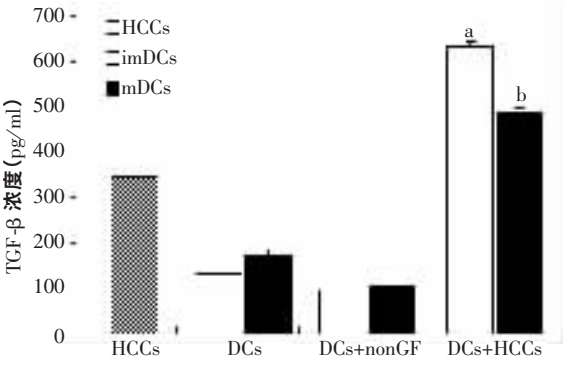
图 1 不同培养条件下细胞培养上清中 IL-12 的表达

2.2 不同培养条件下上清液中 TGF-β_1 的表达

在不同的培养条件下,培养细胞上清中均有 TGF-β_1 存在,如图 2 所示,对于 HCCs、DCs 和 DCs + nonGF 组来说,TGF-β_1 的含量在 100 ~ 350 pg/ml 的水平,但是当 HCCs 与 DCs 共培养时,上清中的 TGF-β_1 含量达到 500 ~ 600 pg/ml 的水平,远高于这 2 种细胞单独培养时分泌水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 不同培养条件下上清液中 VEGF 的表达

DCs 和 DCs + nonGF 组的上清中没有检测到 VEGF,而 HCCs 的分泌水平在 350 pg/ml 左右,但是当 DCs 与 HCCs 共培养后,上清中 VEGF 的含量高达 800 pg/ml($P < 0.01$)。在各种培养条件下的上清中均没有检测到 IL-10 的表达。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对应的 DCs 比较

图 2　不同培养条件下细胞培养上清中 TGF-β_1 的表达

3　讨论

DCs 是目前所知功能最为强大的抗原呈递细胞,其分泌的细胞因子在机体免疫调控中发挥着关键的作用。在肿瘤病灶内形成的细胞因子微环境能够调控免疫应答结果(耐受或应答)[3]。IL-12 具有强大的抗肿瘤作用,也是衡量 DCs 免疫调节功能的重要指标[9]。本研究表明,DCs + HCCs 组的 IL-12 表达量明显下降($P<0.05$,$P<0.01$),说明 HCCs 来源因素明显抑制 DCs 表达 IL-12。也就是说,处于肝癌微环境下的 DCs 的免疫调节能力显著受抑,在荷瘤宿主体内,这势必会影响 IFN-γ 和 IL-18 的表达,这也许是目前 DCs 抗肿瘤免疫治疗效果不佳的重要原因之一。

为了进一步研究抑制性细胞因子对 DCs 的 IL-12 表达量的影响。本研究选择性地检测了上清中 TGF-β_1、IL-10 和 VEGF 的表达量。肿瘤细胞表达的 TGF-β_1 对 DCs 具有复杂的影响,是肿瘤逃脱免疫监视的一个关键性因素[3]。在不同的培养条件下上清中均有 TGF-β_1 存在(图 2),对于 HCCs、DCs 和 DCs + nonGF 组来说,TGF-β_1 的含量在 100 ~ 350 pg/ml 的水平,但是当把 HCCs 和 DCs 共培养时,上清中的 TGF-β_1 含量达到 500 ~ 600 pg/ml 的水平,远高于这两种细胞单独培养时表达水平($P<0.05$,$P<0.01$),说明 HCCs 与 DCs 相互作用后,可能存在某种机制上调了上清中 TGF-β_1 的表达量,这可能是 DCs 的 IL-12 表达下降及免疫功能受损伤的关键因素之一。

近年来的研究发现 VEGF 能够抑制 DCs 的免疫学功能,而且荷瘤宿主血清 VEGF 的表达水平与肿瘤进展呈正相关[10]。DCs 和 DCs + nonGF 组不分泌 VEGF,HCCs 的分泌水平在 350 pg/ml 左右,但是当 DCs 与 HCCs 共培养时,上清中 VEGF 的含量高达 800 pg/ml 的水平($P<0.01$),也就是说,DCs 和 HCCs 相互作用的导致了肝癌细胞 VEGF 的分泌水平显著增加,DCs 本身不表达 VEGF,但是来源于 DCs 某种因素上调了 HCCs 细胞 VEGF 的表达水平。

不同的研究小组分别报道了 TGF-β_1 诱导肝癌细胞上调 VEGF 的表达,也就是说,TGF-β_1 可能是 VEGF 的上游调控信号[11],但是这一信号转导通路的下游信号还不得而知[12]。结合本研究的发现,可以推测在 DCs 与 HCCs 的共培养系统中可能存在一种协同作用调控机制,HCCs 与 DCs 相互作用导致 HCCs 上调 TGF-β_1 的表达,而后 TGF-β_1 又上调 HCCs 分泌 VEGF,VEGF 反过来增加 TGF-β_1 的表达,这一协同作用使 DCs 的转录因子 NF-κB 和 STAT3 表达下降,导致 IL-12 的表达下调,IL-12 表达的减少更进一步导致效应性 T 细胞的 IFN-γ 表达下调,从而使 DCs 免疫调节功能受到严重损伤,这可能是目前基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗不理想的重要原因之一,但该机制还需进一步研究。

本研究结果表明:与 HCCs 共培养后,DCs 的 IL-12 的表达显著下降,而且 TGF-β_1 和 VEGF 间可能存在某种协同机制来抑制 DCs 的 IL-12 表达,这可能是肿瘤逃脱机体免疫监视的方式之一,这对进一步理解肿瘤的免疫逃逸机制具有重要意义。

参考文献:

[1] Steinman R M, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine [J]. Nature, 2007, 449(7161): 419 - 426.
[2] Nestle F O, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(2): 163 - 169.
[3] Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(10): 715 - 727.
[4] 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.
[5] 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, 32(4): 261 - 268.
[6] 曾柱, 龙金华. 肝癌细胞对树突状细胞线粒体功能的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(9): 930 - 933.
[7] 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.
[8] 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.
[9] 余佩武, 赵永亮, 王月禾, 等. 转染 rhscIL-12 对人树突状细胞功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5): 384 - 386.
[10] Mimura K, Kono K, Takahashi A, *et al*. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2[J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(6): 761 - 770.
[11] Smyth M J, Dunn G P, Schreiber R D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity[J]. Adv Immunol, 2006, 90: 1 - 50.
[12] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 263 - 274.

(**收稿**:2009-12-23;**修回**:2010-02-27)
(编辑　王小宴)