论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1568-04

IL-6 通过 SOCS3 诱导小鼠髓源性 DCs 分化成熟障碍的分子机制研究

赵永亮,余佩武,刘 伟,饶 芸 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军普通外科中心,微创胃肠外科中心)

[摘要] **目的** 观察 IL-6 诱导小鼠髓源性 DCs 分化成熟障碍过程中 SOCS3 的表达变化并探讨其分子机制。**方法** 分离小鼠骨髓细胞,采用黏附法结合 GM-CSF 和 IL-4 刺激法在体外培养髓源性 DCs(BMDCs)。用 LPS 诱导 iDCs 成熟,采用 Real-Time RT-PCR 和 Western blot 方法,观察 IL-6 处理前后 LPS 诱导的 BMDCs 中 SOCS3 表达的变化,并用甲基化特异性 PCR 观察 SOCS3 启动子 CpG 岛的甲基化状态。**结果** Real-Time RT-PCR 和 Western blot 结果显示,LPS 能显著诱导 BMDCs SOCS3 mRNA 和蛋白的表达上调;而经过 IL-6 处理后,LPS 诱导 BMDCs SOCS3 mRNA 和蛋白表达上调的能力被显著抑制($P<0.05$)。甲基化特异性 PCR 与单独用 LPS 处理的 BMDCs 相比,经 IL-6 处理后的 BMDCs SOCS3 启动子区 CpG 岛被甲基化。**结论** IL-6 通过诱导 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化来抑制 SOCS3 表达,进而阻遏 iDCs 分化成熟,促进胃癌等肿瘤细胞侵袭转移。

[关键词] 髓源性树突状细胞;分化成熟障碍;IL-6;SOCS3;CpG 岛甲基化
[中图法分类号] R322.81; R392.11; R394.2 [文献标志码] A

IL-6 induces disturbance on differentiation and maturation of mouse bone marrow derived dendritic cells through SOCS3

Zhao Yongliang, Yu Peiwu, Liu Wei, Rao Yun (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the change of SOCS3 expression and underlying molecular mechanism during the disturbance of differentiation and maturation of mouse bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) induced by IL-6. **Methods** To obtain immature BMDCs, mouse bone marrow cells were isolated and cultured in complete culture medium containing GM-CSF and IL-4 following the removement of the nonadherent cells. The maturation of BMDCs was induced by LPS. The expression of SOCS3 molecules on LPS-treated BMDCs with or without IL-6 treatment was analyzed by real-time RT-PCR and Western blotting. The methylation level of CpG island of SOCS3 gene's promoter in BMDCs was evaluated after LPS treatment in the presence or absence of IL-6 by methylation specific PCR (MS-PCR). **Results** The expression of SOCS3 at mRNA and protein levels in BMDCs were upregulated obviously after LPS stimulation, compared to cells treated by culture media only, and that at mRNA and protein levels in BMDCs treated by LPS plus IL-6 were much lower ($P<0.05$), compared with the cells incubated with LPS alone. LPS plus IL-6 treatment resulted in much higher methylation level in the potential CpG island predicted in SOCS3 gene's promoter region. **Conclusion** IL-6 exerts a negative effect on the differentiation and maturation of BMDCs induced by LPS, through inducing CpG island methylation in SOCS3 promoter and thus suppressing its expression.

[**Key words**] bone marrow derived dendritic cells; disturbance of differentiation and maturation; IL-6; suppressor of cytokine signaling 3; methylation level of CpG island

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5046). Corresponding author: Yu Peiwu, Tel: 86-23-68754161, E-mail: yupeiwu01@vip.sina.com

树突状细胞(dendritic cells,DCs)作为机体内功能最强大的专职抗原提呈细胞(antigen-presenting cells,APCs),在诱导和维持机体特异性抗肿瘤免疫应答中发挥核心作用。肿瘤组织中 DCs 分化成熟障碍是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一,已有研究表明肿瘤组织 IL-6 的异常表达与 DCs 分化成熟障碍有关[1],但 IL-6 诱导 DCs 分化成熟障碍的分子机制尚不清楚。我们前期研究中通过体外细胞培养实验,直接观察到 IL-6

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5046)
[通信作者] 余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@vip.sina.com

抑制 LPS 诱导的 DCs 分化成熟现象[2]，并初步证实 JAK2/STAT3 信号途径过度活化参与了 IL-6 抑制 DCs 分化成熟的过程[3]。已知在 DCs 正常分化过程中，伴有 SOCS3 等的表达显著上调，进而直接抑制 JAK2/STAT3 信号途径活化[4]。那么在 IL-6 诱导 DCs 分化成熟障碍过程中，是否会通过抑制 SOCS3 的表达来直接导致 JAK2/STAT3 信号途径过度活化？为进一步探讨 IL-6 诱导 DCs 分化成熟障碍的分子机制，本研究拟利用小鼠原代髓源性 DCs（BMDCs）成熟障碍模型，进一步明确 DCs 分化成熟障碍与 SOCS3 表达之间的关系，并从启动子 CpG 岛甲基化等表观遗传角度研究 SOCS3 表达异常的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 BALB/c 近交系小鼠 10 只，雌性，6～8 周龄，体质量（20±2）g，均购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂

小鼠淋巴细胞分离液为天津 TBD 公司产品。rmGM-CSF、rmIL-4 和 rmIL-6 购自 R&D 公司。LPS（*Escherichia coli* 026∶B6）购自 Sigma 公司。兔抗小鼠 SOCS3 多抗和兔抗小鼠 β-actin 多抗为 ABCAM 公司产品。RT 试剂盒、SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix 及 r*Taq* 酶均购自 TOYOBO 公司。细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自生工公司；EZ DNA Methylation-Gold Kit 为天漠公司产品。所用引物均为质谱级，在生工公司合成。

1.3 小鼠髓源性 DCs 诱导培养与处理

参考 Inaba 等[5]的方法并稍作改进。BALB/c 小鼠断颈处死，无菌条件下取出股骨和胫骨，用 RPMI1640 培养基反复冲洗骨髓腔，冲洗得到的细胞混悬液经 100 目筛网过滤，用 ACK 裂解缓冲液（0.15 mol/L NH_4Cl，1.0 mmol/L $KHCO_3$，0.1 mmol/L EDTA）去除红细胞，每只可得到（4～6）×10^7 骨髓细胞。用完全 RPMI1640 培养基（含 10% FBS、10 ng/ml rmGM-CSF、10 ng/ml rmIL-4、青链双抗）悬浮骨髓细胞，置于一次性无菌培养瓶中，37 ℃二氧化碳孵箱中孵育。2 d 后更换培养基，小心吸弃非黏附细胞。以后隔天半量换液，同时补加 rmIL-4 和 rmGM-CSF，培养 6 d 可以观察到松散成团的 iDCs，用相差倒置显微镜观察培养期间的 BMDCs 形态。将收获的 iDCs 用完全 RPMI1640 培养基调整细胞浓度至 1×10^6/ml，分为 A、B 2 组，B 组同时加入 LPS（0.5 μg/ml）和 rmIL-6（50 ng/ml），而 A 组仅加入 LPS（0.5 μg/ml）作为对照，每组 $n=3$。继续培养 0、12、24 h 及 48 h 后，进行后续检测。

1.4 qRT-PCR 检测诱导培养与处理前后小鼠髓源性 DCs SOCS3 的表达

收集经 0、12、24、48 h 不同处理时间的 1×10^6 BMDCs，用 Trizol 提取总 RNA，进行 SOCS3 表达的 qRT-PCR 定量检测，用 Oligo（dT）18 为 RT 引物，将 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。分别以 5′-AGACTTCACGGCTGCCAACATC-3′ 和 5′-GGAAACTTGCTGTGGGTGACCA-3′为上下游引物，进行 PCR 反应，SOCS3 扩增片段长度为 225 bp；以 β-actin 为内参照，分别以 5′-TGAACCCTAAGGCCAACCGTGA-3′ 和 5′-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3′为上下游引物，进行 PCR 反应，β-actin 扩增片段长度为 311 bp。PCR 反应体系（20 μl）：cDNA 1 μl，上下游引物各 1 μl（10 μmol/L）。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃ 30 s，68 ℃ 30 s，进行 40 次循环，随后进行融解曲线分析，最后通过△△CT 法进行 SOCS3 表达的相对定量。

1.5 DCs 中 SOCS3 的 Western blot 检测

收集经 0、24、48 h 不同处理时间的 5×10^6 BMDCs，加入裂解缓冲液 200 μl 冰浴静置 1 h，然后 4 ℃、14 000 r/min 离心 25 min，上清液采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度（mg/ml），-80 ℃ 冻存。每个样品取 50 μg 总蛋白，SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜，30 V 低温条件下半干转印 2 h，10% 脱脂奶粉封闭后分别加入兔抗 SOCS3 多抗（ab723，25×10^3）、兔抗 β-actin 多抗（ab25894，42×10^3），所有抗体均 1∶5 000 稀释，4 ℃过夜。PBST 漂洗 4 次后，加入 HRP 偶联的山羊抗兔 IgG（1∶5 000 稀释），4 ℃孵育过夜。PBST 漂洗 4 次后，用 ECL（增强化学发光）试剂盒显色。

1.6 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化检测

1.6.1 小鼠 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛的预测 以小鼠 SOCS3 基因的转录起点（transcription start site，TSS）的 G 为 +1，向前提取 2 kb 向后提取 861 bp 至 Intron 2 结束共 2 861 bp，输入到 MethPrimer[6]（http://www.urogene.org/methprimer/index1.html）进行分析，发现在 -92 nt 至 +69 nt 之间可能存在 1 个 CpG 岛。

1.6.2 基因组 DNA 提取与转化 用细胞基因组 DNA 提取试剂盒提取 LPS/+IL-6 处理 24 h DCs 的基因组 DNA，测定浓度。随后按试剂盒说明书进行亚硫氢酸修饰：取 0.5 μg 基因组 DNA，用 ddH_2O 补足体积至 20 μl，再加 130 μl 转化试剂，94 ℃ 10 min，64 ℃ 150 min，随后过 DNA 纯化柱进行纯化。

1.6.3 甲基化特异性 PCR（MSP）检测 特异性检测 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛（转录起点前 -92 nt 至 +69 nt）甲基化所用的引物为使用在线工具 MethPrimer（http://www.urogene.org/methprimer/index1.html）设计，具体序列为：检测甲基化（M）的引物，正向（MF）5′-TGGGAAATAGTAAAATTCGGTTC-3′，反向（MR）5′-ATCTAAACCTCCCAACCTACGTA-3′，预期产物长度 162 bp；非甲基化引物，正向（UF）5′-TGGGAAATAGTAAAATTTGGTTTGT-3′，反向（MR）5′-CATCTAAACCTCCCAACCTACATA-3′，预期产物长度 163 bp。反应体系为 50 μl，内含修饰后的模板 DNA 2 μl，r*Taq* 酶采用 TaKaRa 公司的 HotStart 热启动酶。反应条件为：95 ℃ 30 s，53 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，计 40 个循环。反应结束后采用 2% 的琼脂糖电泳分析结果。

1.7 统计学分析

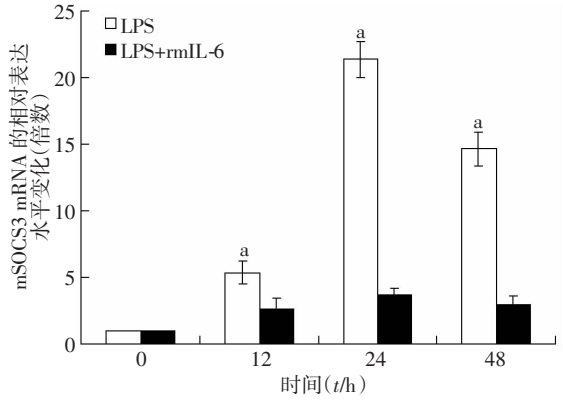
实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 13.0 统计软件进行，原始数据作方差齐性检验后进行方差分析。

2 结果

2.1 IL-6 显著抑制 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 的表达

Real-Time RT-PCR 结果显示，单独经 LPS 处理的 iDCs，其

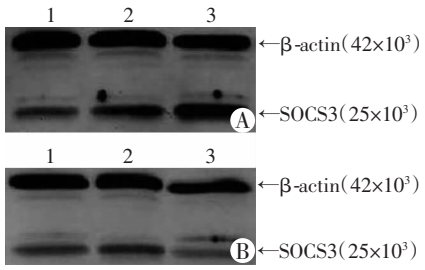
SOCS3 基因 mRNA 在处理后 12 h 即升高，在 24 h 达高峰（约增加 21 倍），在 48 h 略有下降；而 IL-6 可显著抑制此过程中 SOCS3 基因 mRNA 水平的增高（$P<0.05$），提示 IL-6 处理可显著抑制 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 基因的转录（图 1）。



a：$P<0.05$，与 LPS + rmIL-6 比较

图 1　IL-6 处理对 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 mRNA 表达的影响

Western blot 结果显示，单独经 LPS 处理的 iDCs，其 SOCS3 蛋白水平在处理后 48 h 内逐渐升高；而 IL-6 可显著抑制此过程中 SOCS3 蛋白水平的增高，提示 IL-6 处理可显著抑制 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 蛋白的表达（图 2），其变化趋势与 mRNA 一致。Real-time RT-PCR 和 Western blot 结果均提示 IL-6 显著抑制 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 基因的表达，先抑制基因转录，进而影响蛋白表达。



A：LPS；B：LPS + mIL-6；1：0 h；2：24 h；3：48 h

图 2　IL-6 处理对 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 蛋白表达的影响

2.2　SOCS3 的转录受抑制可能与其 CpG 岛的甲基化有关

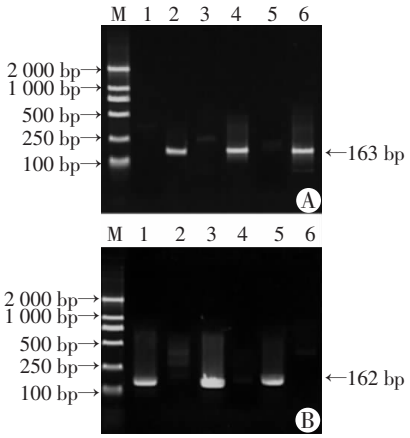
2.2.1　小鼠 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛预测分析　在 −92 ~ + 69 nt 之间可能存在 1 个 CpG 岛，序列如图 3 所示。

```
-92 CTATACAGAG CCTGGGAAAC AGCAAAACTC GGCTCGCCTA CAAGACTCCA GCGCGCCCTC
-32 TGGTGGACTC GGGGGACGAG CATGGGATGA GGGTTTCTTT CCTCTAGCTC CCCCACCGCG
                                   TSS:  +1   Exon1
+29 CCGAGAGTAC CTGGGCGGAC CCACAGTTCG CCACGCAGGT T  +69
```

TSS 为转录起点，以其为 +1，前面碱基序列依次为负，之后依次为正

图 3　预测发现的小鼠 SOCS3 基因启动子区可能 CpG 岛碱基序列组成

2.2.2　MSP 检测 iDCs 分化成熟过程中小鼠 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态　MSP 产物经琼脂糖电泳结果如图 4 所示，经 LPS + IL-6 诱导 iDCs 分化成熟 24 h，提取其基因组 DNA 经亚硫酸盐修饰，3 例样本采用甲基化（M）或非甲基化特异性引物（U）PCR 反应后，经 2% 琼脂糖电泳显示仅非甲基化特异性引物 PCR 出现预期条带，而甲基化特异性引物 PCR 为阴性，提示单纯 LPS 处理诱导 iDCs 分化成熟过程中 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛未发生显著甲基化；而 LPS + IL-6 联合处理后，电泳显示仅甲基化特异性引物 PCR 出现预期条带，而非甲基化特异性引物 PCR 为阴性，提示 IL-6 可能通过诱导 SOCS3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化来抑制其表达，进而阻遏 LPS 诱导的 iDCs 分化成熟。



A：LPS 刺激 24 h；B：LPS + mIL-6 刺激 24 h

M：DNA 标准；1：样品 1 的甲基化引物；2：样品 1 的非甲基化引物；3：样品 2 的甲基化引物；4：样品 2 的非甲基化引物；5：样品 3 的甲基化引物；6：样品 3 的非甲基化引物

图 4　MSP 检测 iDCs SOCS3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态

3　讨论

胃癌发生免疫逃逸的关键机制是 DCs 分化成熟障碍，激活 IL-6-STAT3 信号通路可抑制 DCs 分化成熟，但其下游详细分子机制尚不清楚。最近研究发现在 DCs 正常分化过程中，伴有 SOCS3 等 SOCS 家族蛋白表达的显著上调，提示 DCs 的正常分化可能受到 SOCS 蛋白的调控[7]。而在本研究中，我们在小鼠髓源性 DCs 正常/异常分化模型中观察到：在 LPS 诱导的 iDCs 正常分化过程中，伴有 SOCS3 的 mRNA 与蛋白表达水平显著上调；而在 IL-6 存在的情况下，iDCs 分化成熟障碍，存在 SOCS3 的 mRNA 与蛋白表达明显受抑制。本研究提示 iDCs 分化成熟异常可能与 JAK/STATs 信号通路负调控因子 SOCS3 的表达受抑制有关。

DNA 甲基化是调控基因表达常见的重要机制之一，参与细胞分化与增殖、生物体老化、肿瘤发生转移等多种重要生命活动。研究证实，启动子区 CpG 岛甲基化可抑制基因表达。近年在多种肿瘤的研究中发现 SOCS1 和 SOCS3 基因的启动子区 CpG 岛均存在异常高甲基化，导致 SOCS1、3 蛋白表达沉寂，最终 JAK/

STAT信号途径异常增强,促进细胞增殖与转移[8]。这些结果提示:SOCS1、3的甲基化依赖性转录沉寂是导致JAK/STAT信号转导组成性活化的重要机制,也是肿瘤恶变的机制之一。预测分析发现,在SOCS3基因的启动子区存在一个可能的CpG岛,因此我们假设:在肿瘤免疫抑制因子IL-6诱导的iDCs异常分化中,SOCS3蛋白的表达抑制很可能与SOCS3基因启动子区CpG岛异常甲基化有关。

随后我们通过甲基化特异性PCR(MSP)证实经IL-6处理的异常分化iDCs,其SOCS3基因启动子区CpG岛存在异常甲基化,而正常分化的成熟DCs,其SOCS3基因启动子区CpG岛未发现异常甲基化表现。据此,我们初步推测:肿瘤免疫抑制因子IL-6可能通过诱导SOCS3基因启动子区CpG岛的甲基化来抑制SOCS3表达,进而异常增强JAK/STAT信号途径,阻遏iDCs分化成熟,使肿瘤细胞逃避免疫监视,促进胃癌等肿瘤细胞侵袭转移。

参考文献:

[1] 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.

[2] 赵永亮, 余佩武, 罗华星, 等. IL-6抑制LPS诱导的小鼠髓源性DCs成熟的实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(8): 911-913.

[3] 赵永亮, 余佩武, 雷晓, 等. JAK2/STAT3途径在IL-6抑制LPS诱导的树突状细胞分化成熟中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1063-1065.

[4] Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(6): 454-465.

[5] Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al*. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1693-1702.

[6] Li L C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs[J]. Bioinformatics, 2002, 18(11): 1427-1431.

[7] Larregina A T, Morelli A E, Kolkowski E, *et al*. Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants[J]. Immunology, 1997, 91(2): 303-313.

[8] Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, *et al*. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(3): 100-110.

(**收稿**:2011-02-14;**修回**:2011-04-14)

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2011)15-1571-01

个案与短篇

急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术中胆道损伤的预防

张 莹[1], 范 伟[1], 张大国[2], 张 玉[3] (550002 贵阳,贵州省人民医院:肝胆外科[1],心外科[2],信息科[3])

[**关键词**] 急性胆囊炎;腹腔镜胆囊切除;胆道损伤;预防
[**中图法分类号**] R657.4 [**文献标志码**] B

腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)创伤小、恢复快,已成为胆囊切除术的首选方案。然而,与传统的开腹胆囊切除术相比,腹腔镜胆道损伤的发生率高[1-2],特别在急性炎症时,胆囊三角区组织水肿黏连,解剖欠清晰,更易发生胆道损伤[3]。故如何预防胆道损伤成为关注的主要问题。我们自2005年10月到2011年4月共完成急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术98例,无1例胆道损伤,现将体会报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2005年10月至2011年4月完成的98例急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术,男性58例,女性40例。平均年龄47.8(29~68)岁。患者入院时及入院前均明显的右上腹剧痛,初次发病3例,反复发病95例。查体:体温>37.5 ℃者15例,全组患者有明显右上腹疼痛及压痛体征,Murphy's征(+),行B超检查报告胆囊壁明显增厚,呈双边征26例,胆囊肿大72例。入院后给予抗感染对症治疗,24~72 h内行手术治疗。

1.2 手术方法

全组患者均在气管插管、静吸复合麻醉下接受气腹LC。患者取仰卧位。先于脐下或脐旁做弧形长1 cm切口建立气腹(10~12 mmHg),采用常规三孔法操作79例,四孔法操作19例。腹腔镜下分离粘连胆囊周边粘连,显露胆囊三角区。在急性胆囊炎时,胆囊淋巴结常肿大,此淋巴结位于胆囊颈部[4],可作为解剖胆囊三角的"航标",在肿大的胆囊淋巴结右下方紧贴胆囊淋巴结用电凝钩打开胆囊前三角进行解剖分离。另外,因在肝方叶尖右侧0.5~1 cm处肝管汇合形成肝总管[5],因此,可在肝方叶尖右侧1.5 cm处靠近胆囊用电凝钩打开胆囊前三角,胆囊前三角打开多可显露出胆囊动脉,可先夹闭、切断胆囊动脉,预防解剖三角区时伤及胆囊动脉而致的出血。逐步打开胆囊后三角,用分离钳或电凝钩仔细分离胆囊前后三角之间的软组织,切勿用力过大,以免伤及胆囊动脉导致出血而使术野不清。当胆囊前后三角完全贯通后,紧贴胆囊向胆囊床方向分离,直至完全超过肝右切迹及肝方叶尖右侧1.5 cm以上。沿胆囊管向肝十二指肠韧带方向推拨脂肪组织,显露胆总管及肝总管前壁,距胆总管0.5 cm夹闭胆囊管并切断,将胆囊从胆囊

[**通信作者**] 张大国, E-mail:zhangyingdoc@163.com

(下转1575页)