DOI:10.16016/j.1000-5404.201505130

TNFR2 基因敲除小鼠 H22 移植瘤生长特点和 Treg 数量与功能检测

姜 锐[1],杨 鹏[2],江亚萍[3] (430022 武汉,武汉市第一医院检验科[1];550007 贵阳,贵州省骨科医院检验科[2];430030 武汉,华中科技大学同济医学院免疫学研究所[3])

[摘要] **目的** 观察 tmTNF-α/TNFR2 信号轴对荷瘤鼠肿瘤生长影响及其机制。**方法** 采用 Western blot 检查 H22 荷瘤鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞 TNFR1 及 TNFR2 的表达。TNFR2 敲除 BALB/c 小鼠和野生型鼠各 10 只,在 TNFR2 敲除的 BALB/c 小鼠皮下接种 H22 肝癌细胞株,观察肿瘤直径及肿瘤微环境中 Treg 的募集数量,同时以野生型小鼠做对照。用 tmTNF-α 刺激 Treg 细胞,ELISA 检测上清 IL-10 和 TGF-β 的含量。**结果** 荷瘤鼠微环境中 Treg 细胞 TNFR2 表达明显高于野生型小鼠脾脏 Treg 细胞($P<0.05$),而 TNFR1 表达未见明显变化;TNFR2 基因敲除鼠肿瘤直径明显低于野生型小鼠($P<0.05$),且肿瘤微环境中 Treg 细胞数量也明显少于野生型小鼠($P<0.05$)。在体外 tmTNF-α 可以促进 Treg 细胞产生 IL-10 和 TGF-β($P<0.05$)。**结论** TNFR2 基因敲除小鼠肿瘤生长减缓,肿瘤局部微环境中 Treg 细胞减少,同时 tmTNF-α 能够刺激 Treg 细胞释放抑炎因子 IL-10 和 TGF-β,增强其免疫抑制功能。

[关键词] 跨膜型 TNF-α;调节性 T 细胞;肝癌;白细胞介素 10;转化生长因子 β

[中图法分类号] R392.2; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

Tumor growth characteristics in H22 hepatocarcinoma cells transplanted tumor and number and function of Treg in TNFR2 knockout mice

Jiang Rui[1], Yang Peng[2], Jiang Yaping[3] ([1]Department of Clinical Laboratory, Wuhan First Hospital, Wuhan, Hubei Province, 430022; [2]Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial Orthopaedic Hospital, Guiyang, Guizhou Province, 550007; [3]Institute of Immunology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei Province, 430030, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of the transmembrane TNF-α/tumor necrosis factor receptor 2 (tmTNF-α/TNFR2) signaling axis on the growth of transplantation tumor in mouse xenograft model and investigate the underlying mechanism. **Methods** Western blotting was used to determine the expression of TNFR1 and TNFR2 in the Treg cells from control mice and H22 tumor-bearing mice. TNFR2 knock-out mice and wild-type mice (10 animals in each group) were subcutaneously inoculated with H22 hepatocarcinoma cells, then the tumor growth as well as the accumulation of Treg in the suspension of tumor cells were observed. IL-10 and TGF-β production in Treg cells in response to the exogenous tmTNF-α were detected by ELISA. **Results** The TNFR2 expression was significantly higher in the Treg cells from the tumor microenvironment in the tumor-bearing mice than in the spleen Treg cells from wild-type mice ($P<0.05$), but no significant change was seen in the TNFR1 expression. Tumor size was obviously smaller in the TNFR2$^{-/-}$ tumor-bearing mice than the wild-type tumor-bearing mice ($P<0.05$), and the percentage of Treg in the tumor microenvironment was remarkably less in the former group of mice than the latter ($P<0.05$). Exogenous tmTNF-α promoted the secretion of IL-10 and TGF-β in Treg cells ($P<0.05$). **Conclusion** The transplanted tumor gowns slowly in TNFR2 knockout mice, with reduced Treg cells in the tumor

[基金项目] 贵州省教育厅自然科学基金(黔教科 2008086)

[通信作者] 杨 鹏,E-mail yangpeng1976@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151124.0853.009.html(2015-11-24)

microenvironments. tmTNF-α stimulates the release of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-β in the Treg cells to enhance the immune response.

[**Key words**] transmembrane TNF-α; regulatory T cells; tumor; TNF-α; IL-10; TGF-β

Supported by the Natural Science Foundation of Guizhou Provincial Department of Education (2008086). Corresponding author: Yang Peng, E-mail: ruijiang0127@163.com

肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor, TNF-α)以两种生物学形式存在,即相对分子质量为 17×10^3 的分泌型 TNF-α(secreted TNF-α,sTNF-α)和 26×10^3 的跨膜型 TNF-α(transmebrane TNF-α, tmTNF-α)[1]。tmTNF-α 生物学功能不同于 sTNF-α,sTNF-α 主要和 TNF 受体 1(TNF receptor 1, TNFR1)结合发挥生物学作用,跨膜型 TNF-α 既可以结合 TNFR1 也可以结合 TNFR2 发挥生物学效应,但主要以结合 TNFR2 为主[2-3]。目前更多的研究注重 sTNF-α 在肿瘤发生中的作用,而 tmTNF-α 的作用关注较少[4],文献[5]报道肿瘤微环境中 Treg 募集增多,但 tmTNF-α 对 Treg 免疫功能的影响尚少见报道。本研究观察 tmTNF-α/TNFR2 信号轴对 H22 荷瘤鼠肿瘤生长影响及 tmTNF-α 对 Treg 免疫抑制功能的影响,旨在为 tmTNF-α 在肝癌发生中的作用提供实验依据,从而为肿瘤的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 主要仪器 CO_2 细胞培养箱(德国 Heraeus),流式细胞分析仪(BD LSR Ⅱ),酶联免疫分析仪(上海科学仪器厂),凝胶图像分析系统(BD 公司)。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640(Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物工程公司),TGF-β、IL-10 试剂盒(Biolegend),FITC-CD4 以及 PE-CD25 荧光抗体(BD 公司),肝癌 H22 细胞株(ATCC)。

1.1.3 实验动物 6~8 周龄野生型和 TNFR2 基因敲除的雄性 BALB/c 小鼠各 10 只(由华中科技大学同济医学院李卓娅教授惠赠),体质量约 20 g。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肝癌 H22 细胞悬浮于 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,同时加入双抗生素(青霉素和链霉素各 100 U/mL),置于 37 ℃、5 % CO_2 的培养箱中培养。常规换液和传代,待 H22 细胞状态最佳时,用 1640 培养基调整细胞密度 1×10^6/100 μL,在 BALB/c 小鼠右侧腋皮下接种 H22 细胞株(每只 1×10^6/100 μL)。

1.2.2 肿瘤直径测量 小鼠接种 H22 细胞株后每隔 3 d 测量肿瘤直径,肿瘤体积的计算公式为:$V=a\times b^2$,其中 a 为肿瘤组织的长径(cm),b 为肿瘤组织的短径(cm)。

1.2.3 肿瘤组织细胞悬液的制备 颈椎脱臼法处死小鼠,取出小鼠的肿瘤组织,称量约 0.2 mg,剪碎,加入 1~2 mL 胶原酶Ⅱ、Ⅳ(0.163 U/mL),透明质酸酶和 DNase Ⅰ(2 μg/mL),置于 37 ℃水浴箱消化 2~3 h,用 400 目的尼龙膜过滤,1 500 r/min 离心 10 min 后弃去上清,用 RPMI1640 培养基悬浮,计数。

1.2.4 脾细胞单个核细胞悬液制备 颈椎脱臼法处死小鼠,95% 酒精浸泡 5 min 消毒,打开腹腔,取出完整的脾脏,将其浸泡于加有 RPMI1640 培养基的 EP 管中。用无菌载玻片在培养皿中碾磨脾脏组织,待研磨好后,用 200 目的尼龙膜过滤,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清。视细胞密度加入 2~3 mL 红细胞裂解液,用吸管轻轻地吹打,直至混匀,静置 2 min 后加入含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 5 mL,混匀终止反应,然后用 200 目尼龙膜过滤,1 500 r/min 离心 10 min 后弃去上清。用 1 mL 含有 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基将脾细胞悬浮,然后加入 9 mL 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基混匀,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,并调细胞密度。

1.2.5 肿瘤组织细胞悬液和脾细胞悬液分选 $CD4^+CD25^+$ Treg 用小鼠 $CD4^+$T 淋巴细胞磁珠分离试剂盒、LD 分离柱、MS 分离柱、MidiMAC 分选器,加压洗脱,收集细胞。先阴性选择去除非 $CD4^+$T 淋巴细胞而获得 $CD4^+$T 淋巴细胞;加入 FITC-CD25 单克隆抗体,再加入磁珠标记抗 FITC 后分选细胞,阳性选择获得 $CD4^+CD25^+$ Treg。

1.2.6 流式细胞仪检测 Treg 调整要检测的肿瘤细胞数为 1×10^6/管,加入 FITC-CD4 和 PE-CD25,用流式细胞仪检测。

1.2.7 tmTNF-α 的制备 收集对数生长期的 RAW264.7 细胞,1 000 r/min 离心 5 min,洗涤 3 次,用无血清的 DMEM 细胞培养基重悬,加入 LPS 至终浓度 100 ng/mL,置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱温育 2 h 后,用 4% 多聚甲醛重悬,固定细胞,室温 15 min,用 1×PBS 洗涤 3 次,调整细胞数为 2×10^7/mL(RAW264.7 tmTNF-α 表达为 40% ~50%)。

1.2.8 tmTNF-α 刺激 Treg 细胞 取经磁珠分选获得的荷瘤鼠 Treg 细胞用无血清 DMEM 细胞培养基调整细胞浓度铺于 24 孔板,2×10^6/孔,分别用 sTNF-α

(终浓度300 ng/mL)和tmTNF-α(效靶比10∶1)刺激,同时设Treg不加刺激剂作为对照。培养16 h后,收集上清,提取Treg细胞全蛋白。

1.2.9　ELISA检测上清IL-10和TGF-β　用tmTNF-α刺激Treg细胞,收集上清,根据试剂盒说明用双抗体夹心法检测上清中IL-10和TGF-β的含量

1.2.10　Western blot检测Treg细胞TNFR的表达

收集荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞和野生型小鼠脾脏Treg细胞,提取全蛋白后定量,上样量约80 μg蛋白,进行SDS-PAGE,检测Treg细胞TNFR1和TNFR2的表达。

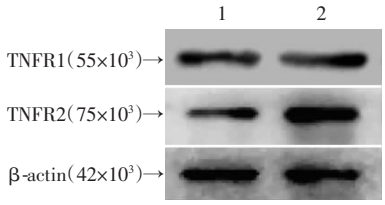
1.3　统计学的分析

采用Graphpad 5统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较用Student's t 检验。

2　结果

2.1　荷瘤小鼠微环境中Treg细胞TNFR2的表达变化

荷瘤小鼠肿瘤微环境中Treg细胞TNFR2的表达水平明显高于野生型小鼠脾脏Treg细胞,而TNFR1表达水平无明显变化(图1)。

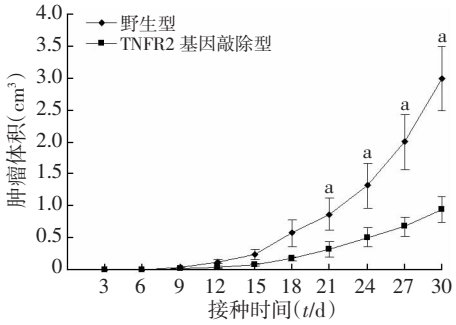


1:野生型鼠;2:荷瘤鼠

图1　Western blot检测荷瘤小鼠Treg细胞TNFR蛋白的表达

2.2　TNFR2基因敲除鼠体内肝癌瘤体体积的变化

在野生型和TNFR2基因敲除的BALB/c小鼠皮下接种等量的H22肝癌细胞株,肝癌瘤体的体积伴随着接种时间的延长而增加,但在接种21 d后,TNFR2基因敲除鼠体内癌瘤体体积均低于野生型小鼠($P<0.05$,图2)。



a:$P<0.05$,与TNFR2基因敲除型比较

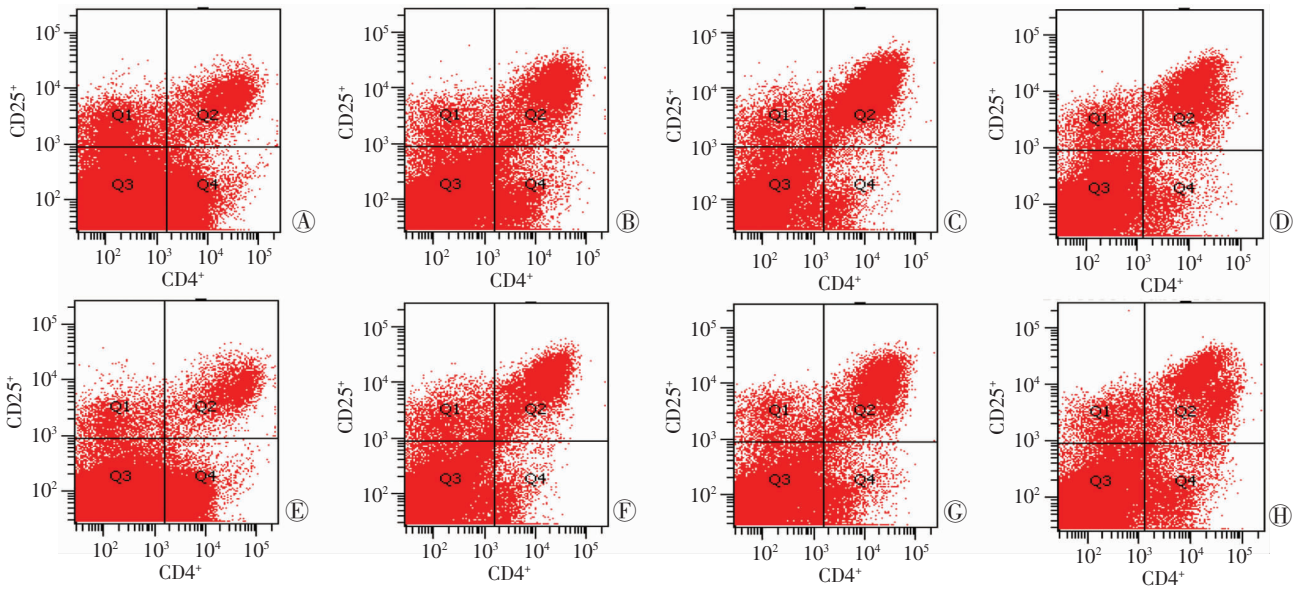
图2　野生型与TNFR2基因敲除鼠皮下肝癌瘤体体积比较

2.3　TNFR2基因敲除鼠皮下肝癌组织微环境中Treg细胞数量的变化

TNFR2基因敲除型的BALB/c小鼠在皮下接种H22肝癌细胞株第4、5周,癌组织微环境Treg细胞的数量明显低于野生型小鼠($P<0.01$,图3、4)。

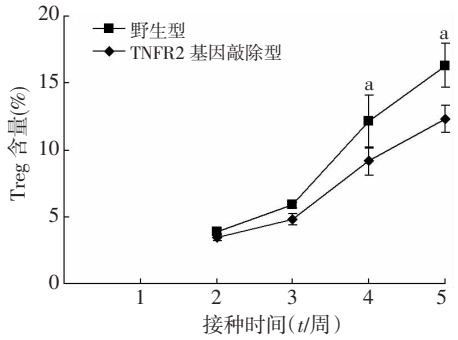
2.4　tmTNF-α对Treg分泌抑制性细胞因子IL-10和TGF-β表达的影响

tmTNF-α可明显促进Treg细胞分泌IL-10和TGF-β($P<0.01$),而sTNF-α仅能刺激Treg分泌TGF-β,对Treg细胞分泌IL-10无影响($P>0.05$,图5)。



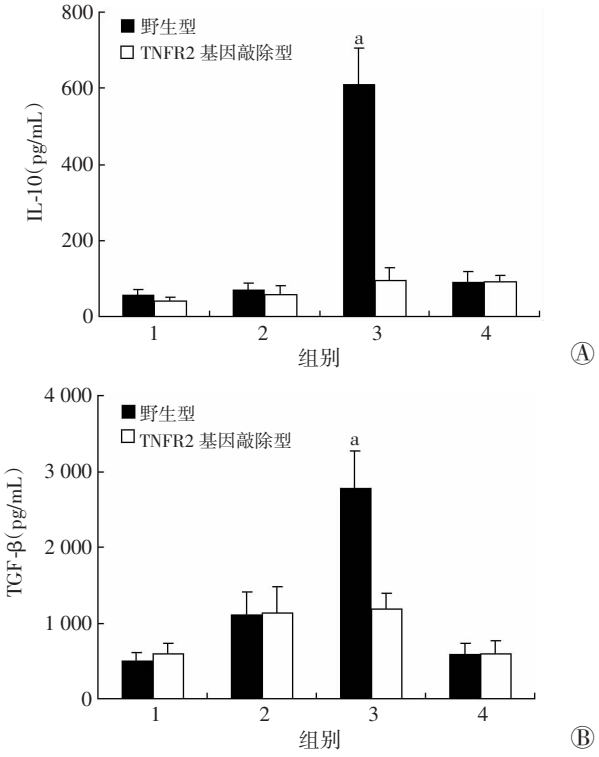
A~D:野生型;E~H:TNFR2基因敲除型;A、E:第2周;B、F:第3周;C、G:第4周;D、H:第5周

图3　流式细胞仪检测野生型鼠与TNFR2基因敲除型鼠第2、3、4、5周肿瘤组织微环境中Treg细胞数量



a:$P<0.05$,与 TNFR2 基因敲除型比较

图 4 野生型与 TNFR2 基因敲除型鼠肿瘤组织中 Treg 的含量变化趋势



1:对照组;2:sTNF-α 组;3:tmTNF-α 组;4:tmTNF-α + 抗体组

a:$P<0.05$,与对照组比较

图 5 ELISA 检测 tmTNF-α 对 Treg 细胞分泌 IL-10(A)和 TGF-β(B)的影响

3 讨论

tmTNF-α 是分泌型 TNF-α 的前体,首先表达在细胞膜上,经 TNF 转化酶水解,释放其胞外段而成为 sTNF-α,两型 TNF-α 均通过 TNFR 结合发挥效应[5-6]。目前认为,sTNF-α 主要和 TNFR1 结合发挥作用,tmTNF-α 既可以结合 TNFR1 也可以结合 TNFR2 发挥生物学效应,但主要以结合 TNFR2 为主,并且 tmTNF-α 生物学效应不同于 sTNF-α[7-8]。文献[9]报道显示肿瘤特异性 T 细胞和肿瘤相关巨噬细胞等可组成性表达 TNF-α,并且在肿瘤发生、肿瘤增殖、肿瘤血管生成及转移等方面发挥重要作用,普遍认为 TNF-α 主要发挥的是肿瘤的杀伤作用。但最近的研究发现,TNF-α 也可促进肿瘤的生长,文献[11-13]表明,用 TNF-α 治疗小鼠胰腺癌原位移植模型,结果却促进了肿瘤的生长和转移,报道发现肿瘤微环境中一定量的 TNF-α 还能够促进动物胸腔、皮肤和肠道肿瘤的生长和扩散,测定前列腺癌患者和正常人血清中 TNF-α 水平,发现转移性前列腺癌患者血清中 TNF-α 的水平明显高于局限性前列腺癌患者。这些研究更加注重 sTNF-α 在肿瘤发生中的作用,对 tmTNF-α 关注较少。本研究在 BALB/c 鼠皮下接种 H22 肝癌细胞建立的荷瘤鼠模型中发现,肿瘤微环境中 Treg 细胞 TNFR2 表达明显高于野生型小鼠脾脏 Treg 细胞,结果提示 tmTNF-α/TNFR2 信号轴介导的生物学效应可能在肿瘤发生中扮演着重要作用。

为了验证 tmTNF-α/TNFR2 信号轴在肿瘤发生中的作用,我们在 TNFR2 基因敲除 BALB/c 鼠皮下接种 H22 肝癌细胞,同时以在野生 BALB/c 鼠皮下接种 H22 肝癌细胞为对照,结果显示 TNFR2 基因敲除荷瘤鼠肿块体积明显低于野生型小鼠,尤其在接种 30 d 肿块体积缩小更为显著。这些结果进一步提示 tmTNF-α/TNFR2 信号与肿瘤发生密切相关。目前认为,肿瘤衍生的细胞因子能够诱导多种抑制性细胞,抵抗机体抗肿瘤的天然免疫和适应性免疫,文献[15-16]结果显示,$CD4^+CD25^+$T 细胞(Treg)与肿瘤免疫功能密切相关,Treg 细胞可以通过不同的机制抑制一系列免疫反应,包括抑制 NK 细胞的增殖、细胞因子分泌和细胞毒作用,以及对单核/巨噬细胞、树突状细胞、B 细胞等免疫活性细胞起抑制或杀伤作用,最终促使肿瘤细胞免疫耐受和逃逸[17-18]。本实验结果显示,TNFR2 基因敲除荷瘤鼠肿瘤微环境中 Treg 细胞数量明显低于野生型小鼠,提示 tmTNF-α/TNFR2 信号轴与肿瘤微环境中 Treg 含量有关,但是阻断 tmTNF-α/TNFR2 信号轴后为何会导致肿瘤微环境中 Treg 减少,从本实验尚得不出结论。为进一步研究可能的机制,本研究还可从阻断 tmTNF-α/TNFR2 信号轴后是因为 Treg 细胞募集减少了,还是因为导致 Treg 细胞凋亡增多等方面来探讨 Treg 细胞减少的原因。

TNF-α 促进肿瘤生长的机制虽不是很清楚,但也有一些相关发现。如在卵巢癌细胞中,TNF-α 上调炎性细胞因子及趋化因子网络、作用于卵巢癌微环境、影响肿瘤血管发展及癌细胞迁移等,从而促进肿瘤的发展及恶化[19]。目前认为,Treg 细胞可以通过释放抑炎因子 IL-10 和 TGF-β 发挥作用[20]。为了验证 tmTNF-α 是否可以直接诱导 Treg 细胞释放抑炎因子发挥免疫

抑制作用,在体外我们用 tmTNF-α 直接刺激 Treg 细胞,同时设 sTNF-α 刺激组作为对照,结果显示,tmTNF-α 可以显著诱导 Treg 细胞释放抑炎因子 IL-10 和 TGF-β,与 sTNF-α 作用相比,sTNF-α 仅仅诱导释放 TGF-β,且作用强度远低于 tmTNF-α,但对 Treg 细胞分泌 IL-10 无影响。本实验结果说明 tmTNF-α 可以促进 Treg 释放 IL-10 和 TGF-β,从而发挥免疫抑制作用。本实验对象仅在 TNFR2 基因敲除的小鼠上,为了更好地说明 tmTNF-α/TNFR2 在肿瘤中的作用,可进一步在 TNFR1 基因敲除和 TNFR1R2 双基因敲除的小鼠上验证。

综上所述,tmTNF-α/TNFR2 信号在 H22 荷瘤鼠肿瘤发生中扮演着重要作用,阻断 tmTNF-α/TNFR2 信号后肿瘤局部微环境中的 Treg 细胞减少,tmTNF-α/TNFR2 信号能够导致 Treg 细胞抑炎因子 IL-10 和 TGF-β 释放增多,增强 Treg 细胞免疫抑制作用。本研究结果提示,用 TNF-α 拮抗剂治疗肿瘤时,最好选择性地封闭膜分子,而不要干扰可溶性分子。本研究为 tmTNF-α 在肿瘤发生中的作用提供了实验依据,同时为选择 TNF 拮抗剂治疗肿瘤提供了新的视野。

参考文献:

[1] Zhou W, Yang P, Liu L, *et al*. Transmembrane tumor necrosis factor-alpha sensitizes adipocytes to insulin[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 406: 78 - 86. DOI:10.1016/j.mce.2015.02.023

[2] Yan X, Jiang Z, Bi L, *et al*. Salvianolic acid A attenuates TNF-alpha- and D-GalN-induced ER stress-mediated and mitochondrial-dependent apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 ratio and calcium release in hepatocyte LO2 cells[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2015, 388(8): 817 - 830. DOI:10.1007/s00210 - 015 - 1116 - 3

[3] Meusch U, Klingner M, Baerwald C, *et al*. Deficient spontaneous in vitro apoptosis and increased tmTNF reverse signaling-induced apoptosis of monocytes predict suboptimal therapeutic response of rheumatoid arthritis to TNF inhibition[J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(6): R219. DOI:10.1186/ar4416

[4] Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy[J]. Curr Opin Immunol, 2014, 27: 1 - 7.

[5] Cao R, Ji H, Yang Y, *et al*. Collaborative effects between the TNFalpha-TNFR1-macrophage axis and the VEGF-C-VEGFR3 signaling in lymphangiogenesis and metastasis[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(3): e989777. DOI:10.4161/2162402X.2014.989777

[6] Doss G P, Agoramoorthy G, Chakraborty C. TNF/TNFR: drug target for autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory diseases[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19: 1028 - 1040.

[7] Muller S, Rihs S, Schneider J M, *et al*. Soluble TNF-alpha but not transmembrane TNF-alpha sensitizes T cells for enhanced activation-induced cell death[J]. Eur J Immunol, 2009, 39(11): 3171 - 3180. DOI:10.1002/eji.200939554

[8] Meroni P L, Valentini G, Ayala F, *et al*. New strategies to address the pharmacodynamics and pharmacokinects of tumor necrosis factor (TNF) inhibitors: a systematic analysis[J]. Autoimmun Rev, 2015, 14(9): 812 - 829. DOI:10.1016/j.autrev.2015.05.001

[9] Shin S Y, Lee J M, Lim Y, *et al*. Transcriptional regulation of the growth-regulated oncogene alpha gene by early growth response protein-1 in response to tumor necrosis factor alpha stimulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1829(10): 1066 - 1074.

[10] Stathopoulos G T, Kollintza A, Moschos C, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion[J]. Cancer Res, 2007, 67(20): 9825 - 9834. DOI:10.1158/0008 - 5472.CAN - 07 - 1064

[11] Zins K, Abraham D, Sioud M, *et al*. Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1038 - 1045. DOI:10.1158/0008 - 5472.CAN - 06 - 2295

[12] Scott K A, Moore R J, Arnott C H, *et al*. An anti-tumor necrosis factor-alpha antibody inhibits the development of experimental skin tumors[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(5): 445 - 451.

[13] Huang Y, Ma C, Zhang Q, *et al*. $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome[J]. Oncotarget, 2015, 6(19): 17462 - 17478.

[14] Guzman-Flores J M, Portales-Perez D P. Mechanisms of suppression of regulatory T-cells (Treg)[J]. Gac Med Mex, 2013, 149(6): 630 - 638.

[15] Hardardottir I, Olafsdottir E S, Freysdottir J. Dendritic cells matured in the presence of the lycopodium alkaloid annotine direct T cell responses toward a Th2/Treg phenotype[J]. Phytomedicine, 2015, 22(2): 277 - 282.

[16] Vinay D S, Ryan E P, Pawelec G, *et al*. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies[J]. Semin Cancer Biol, 2015, [Epub ahead of print]. DOI:10.1016/j.semcancer.2015.03.004

[17] Kulbe H, Thompson R, Wilson J L, *et al*. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(2): 585 - 592.

[18] Roychoudhuri R, Eil R L, Restifo N P. The interplay of effector and regulatory T cells in cancer[J]. Curr Opin Immunol, 2015, 33: 101 - 111. DOI:10.1016/j.coi.2015.02.003

(**收稿**:2015-05-24;**修回**:2015-07-24)

(编辑 吴培红)