基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.006

舌鳞癌细胞微环境对小鼠髓源性树突状细胞生长分化的影响

童 熹,李 勇,李 显,王启明,季 平,王 涛
(重庆医科大学口腔医学院口腔颌面外科,重庆 400015)

【摘 要】目的:探讨舌鳞癌微环境对小鼠髓源性树突状细胞生长分化的影响。方法:小鼠骨髓前体细胞,在含重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和重组小鼠白介素-4 培养体系中体外培养。实验组在上述培养液中再加入 Tca8113 培养上清液模拟肿瘤微环境(Tumor microenvironment,TME);对照组不加 Tca8113 培养上清液;镜下观察 DCs 形态,台酚蓝染色法计活细胞数,流式细胞术检测 DCs 表型(CD86、CD11c、MHC-Ⅱ)表达。结果进行 *LSD-t* 统计学分析。结果:①Tca8113 微环境下可诱导出具有典型形态及表型树突状细胞;②低剂量 Tca8113 培养上清液微环境刺激增强刺激 DCs 分化成熟,中等剂量 Tca8113 培养上清液微环境不影响成熟 DC(Mature DC,mDCs)分化,但能促进骨髓前体细胞分化为未成熟 DC(Immature DC,imDC);高剂量 Tca8113 培养上清液微环境抑制 DCs 分化成熟。结论:Tca8113 微环境下可成功诱导骨髓前体细胞分化为树突状细胞;舌鳞癌微环境对树突状细胞分化影响的多样性与环境中免疫因子浓度密切相关。

【关键词】肿瘤微环境;树突状细胞;免疫逃逸;免疫抑制因子
【中国图书分类法分类号】R739.86 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-04

Effects of microenvironment of tongue squamous cell carcinoma on the growth and differentiation of bone marrow-derived dendritic cell

TONG Xi, LI Yong, LI Xian, WANG Qi-ming, JI Ping, WANG Tao
(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of microenvironment of tongue squamous cell carcinoma on the growth and differentiation of bone marrow-derived dendritic cell. *Methods*: Marrow precursor cells were cultured in RPMI1640 medium containing rmGM-CSF and rmIL-4 +either cs-Tca8113 or not. Control groups were cultured without any cs-Tca8113. The morphology of DCs were observed under optical microscope; the number of survive cells was calculated by trypan blue; the phenotypes of cells were analyzed by flow cytometry. All results were analyzed statistically by *LSD-t*. *Results*: The cells cultured in tumor microenvironment appeared typical morphotype and phenotype. Microenvironment of low dose cs-Tca8113 stimulated DCs to mature. Microenvironment of medium dose cs-Tca8113 promoted bone marrow precursor to differentiate into imDC. Microenvironment of high dose cs-Tca8113 inhibited DCs to differentiate and mature. *Conclusion*: Bone marrow precursor cells can be successfully induced into DCs with typical characteristics in the microenvironment of Tca8113. The multiple effects of Tca8113 microenvironment on the growth and differentiation of DCs are closely related to the concentration of cs-Tca8113.

【Key words】tumor microenvironment; dendritic cell; immune escape; immune suppressor

肿瘤微环境(Tumor microenvironment,TME)指肿瘤在发生发展过程中所处的内环境,其中主要包括肿瘤细胞分泌的各种的可溶性细胞因子[1,2]。从肿瘤的形成到肿瘤生长后期过程中,肿瘤组织内 TME 处于一个动态变化的过程。TME 是导致肿瘤细胞获得免疫耐受的关键[3,4]。目前认为头颈部肿瘤细胞皆异常分泌且与免疫抑制相关的细胞因子包括转换生长因子 β1(Transforming growth factor-β1,TGF-β1)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)、环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)、白介素-10(Interleukin-10,IL-10)等。已被证实单一免疫抑制因子(TGF-β1、VEGF、IL-10)在体外细胞试验中均影响 DCs 分化、成熟,进而导致免疫耐受[5,6];但与临床对照研究结果相比有差异,同时头颈部 TME 内多免疫抑制因子的联合作用对 DCs 分化影响的研究却鲜有见诸报道。本实验利用不同剂量的舌鳞癌细胞培养上清液模拟舌鳞癌发生发展不同时期 TME 对小鼠髓源性树突状细

作者介绍:童 熹(1984-),男,硕士,研究方向:肿瘤的免疫治疗。
通信作者:李 勇,男,主任医师,Email:cq-liyong@126.com。
基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2004BB5117);重庆市卫生局科研基金资助项目(编号:07-2-178);重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ090326)

胞生长分化影响，并探讨其发生的可能机制，为临床舌鳞癌免疫治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及设备

重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（rmGM-CSF）、重组小鼠白细胞介素 4（rmIL-4）、胰蛋白酶购于 Sigma 公司；抗小鼠 PE-Cy5 CD11c，抗小鼠 PE-CD86、抗小鼠 FITC-MHC及同型对照试剂购于 eBioscienc 公司；PBS、RPMI1640 购于 Hyclone 公司；优质胎牛血清购于 Gibico 公司；PBS 缓冲液购于 Invitrogen 公司。舌鳞癌 Tca8113 细胞株购于四川大学口腔疾病研究国家重点实验室；流式细胞仪（BECTON DICKINSON FACSCalibur）。

1.2 实验器材

眼科剪，眼科镊，培养皿，巴氏管，离心管，玻璃培养瓶，200目细胞筛等。

1.3 实验动物

6~8 周 C57BL/6 雌性小鼠，50 只，（28 ± 3）g，购于重庆医科大学实验动物中心。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准[7]。

1.4 实验方法

1.4.1 Tca8113 培养上清液（Culture supernatural of Tca8113 cells，cs-Tca8113）制备 收集对数生长期 Tca8113 细胞株置于含 10%胎牛血清 RPMI1640 培养基中配成 1×10^6 个/ml 细胞悬液，4 ml/瓶分装于 50 ml 培养瓶，置 37℃，5%CO_2，饱和湿度条件下培养，待培养瓶中细胞铺满瓶底 80%，改用无血清培养基培养 48 h 后收集培养上清液，离心、分子筛过滤后于-80℃恒温保存备用。

1.4.2 骨髓细胞制备 C57BL/6 小鼠脱颈法处死，无菌条件下取出股骨，75%酒精浸泡消毒 60 s，RPMI1640 培养液反复冲洗骨髓腔，直至股骨发白。得到骨髓细胞，加入 37 ℃预温的红细胞裂解液（氯化铵裂解液），静置 2 min，离心 1 000 r/min，2 min，弃上清，加入 PBS 液混匀，再离心 1 000 r/min，3 min，2 次，收集沉淀的骨髓细胞备用。

1.4.3 树突状细胞培养 参考Lutz等[8]方法并加以改进。将收集到的小鼠骨髓细胞以含 10 μg/ml rmGM-CSF+10 μg/ml rmIL-4 的 10%胎牛血清 RPMI1640 配成 2×10^9 个/L 骨髓细胞悬液，6 ml/瓶接种于 50 ml 培养瓶，将其分为 1 个对照组和 8 个实验组。实验组：第 1 组加入 0.1 ml cs-Tca8113，第 2 组加入 0.2 ml cs-Tca8113，第 3 组加入 0.4 ml cs-Tca8113，第 4 组加入 0.8 ml cs-Tca8113，第 5 组加入 1.4 ml cs-Tca8113，第 6 组加入2.0 ml cs-Tca8113，第 7 组加入2.2 ml cs-Tca8113，第 8 组加入 2.8 ml cs-Tca8113；对照组：不加任何干预因素。所有细胞置 37℃、5%CO_2、饱和湿度条件下培养 48 h 后换液，仅保留贴壁细胞，重新加入培养液 6 ml，同时实验各组加入与之前同样剂量 cs-Tca8113；之后隔日半量换液，实验各组同样补入之前半量 cs-Tca8113；培养至第 6 天收集悬浮细胞计数后流式细胞术检测细胞表型。根据不同剂量范围内 cs-Tca8113 对 DCs 生长分化影响差异，我们将其分为低剂量组（1、2 组），中剂量组（3、4、5、6 组），高剂量组（7、8 组）。

1.4.4 DCs 形态学观察、细胞量计数、DCs 表型 CD11c、CD86、MHC-Ⅱ检测 分别于培养第 3、5 天显微镜下观察各组细胞形态变化；于培养第 6 天收集各组悬浮细胞，台酚蓝染色活细胞数目 DC 数目，而后调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，分别加入 PE-Cy5 CD11c、PE-CD86、FITC-MHC-Ⅱ抗体及其同型对照，流式细胞仪三色荧光标记检测细胞表型。CD11c 表型百分比×活细胞数目即 DCs 数目。

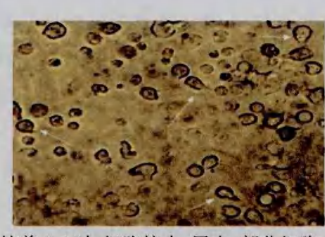
1.5 统计学处理

实验数据进行正态分布和方差齐性检验，符合方差分析条件，使用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析。多组数据间两两比较采用完全随机设计的单因素方差分析 *LSD-t* 检验方法。检验水准 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 则认为差异有统计学意义。

2 结 果

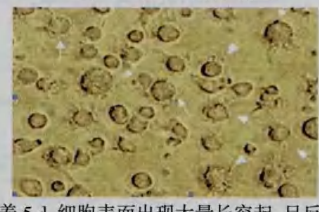
2.1 光学显微镜下的细胞形态

实验组与对照组细胞生长无明显差异，均表现出树突状细胞生长过程中的典型形态。培养第 3 天，大部分细胞贴壁生长，细胞呈圆形或卵圆形，少部分细胞有少许毛刺样突起（图 1）；培养第 5 天，视野内可见大量形态典型树突状细胞（图 2）。



培养 3 d 时，细胞核小，居中，部分细胞表面出现短突起 光学显微镜（×400）

图 1 树突状细胞前体



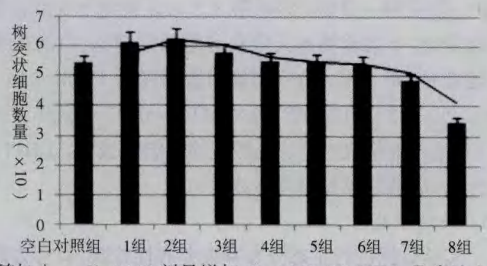
培养 5 d，细胞表面出现大量长突起，呈反射状排列 光学显微镜（×400）

图 2 树突状细胞

2.2 不同剂量 cs-Tca8113 干预下获得的树突状细胞数量

TME下获得的 DCs 数量随 cs-Tca8113 剂量增加有逐步减少趋势（图 3）。低剂量 cs-Tca8113 干预下获得的DC（1、2 组）数量大于对照组、中剂量组（其中的 4、5、6 组）和高剂量组（7、8 组），且差异有统计学意义 $P<0.05$；中等剂量组（第 3、4、5、6 组）生成 DC 数量与对照组接近，差异无统计学意义 $P>0.05$；高剂量组生成 DCs 显著低于其他 3 组，$P<0.05$（表1）。以对照组为基准，可以观察到随着 cs-Tca8113 增加，培养的

树突状细胞数目呈现先升后降的过程，且其对树突状细胞数目影响是由量变到质变的过程而非一蹴而就。表明不同阶段 TME 对小鼠髓源性树突状细胞的影响各不相同。



随加入 cs-Tca8113 剂量增加，Tca8113-DC MHC-Ⅱ表达上调，CD86+MHC-Ⅱ表达逐渐下调

图 3　不同剂量 cs-Tca8113 下生成小鼠树突状细胞数量

2.2　树突状细胞表免疫型检测分析

在模拟舌鳞癌微环境下，骨髓前体细胞成功诱导分化为具有典型免疫表型 DCs，见图 4；随 cs-Tca8113 剂量逐步增大，MHC-Ⅱ+CD86 表达有逐步减弱趋势，MHC-Ⅱ表达逐渐增强趋势（图 5）。MHC-Ⅱ+CD86 表达：对照组与第 1、2、3、4、7、8 组差异有统计学意义，$P<0.05$；低剂量组（1、2 组）与对照组、中剂量组、高剂量组对比差异有 MHC-Ⅱ：对照组与高剂量组、5 组、6、组差异有显统计学意义，$P<0.05$；高剂量组（7、8 组）与低剂量组、高剂量组、对照组相比有显著性差异 $P<0.05$；著性 $P<0.05$；低剂量组、3 组、4 组之间无明显差异 $P>0.05$（表 1）。以对照组为参照，可观察到随着模拟舌鳞癌细胞微环境的进展，MHC-Ⅱ表达呈现先上调而后下调的趋势，MCH-Ⅱ+CD86 的表达则正相反，且其间也是由量变至质变的过程，并无明显分界点。

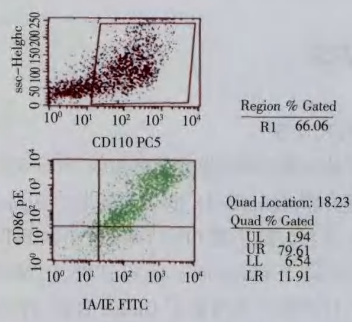


图 4　1.4 ml cs-Tca8113 DCs 免疫表型

3　讨　论

DCs是迄今为止发现的功能最强的抗原提呈细胞（Antigen presenting cell，APC），是机体获得性免疫的关键[9,10]。DCs 在分化过程中分为未成熟DC（Immature DC，imDC）和成熟DC（Mature DC，mDC）[11,12]。不同成熟阶段 DCs 免疫表型及功能不同：imDC 低表达 MHC-Ⅱ同时不表达或者低表达 CD40、CD86 等共刺激分子，能抑制T 细胞增殖，与初始型 T 细胞作用后促使其向 Th2 细胞分化，诱导产生 CD4+、CD25+的调节性 T 细胞，诱导自身反应性 T 细胞凋亡，从而产生免疫耐受[13]；而 mDC 则高表达 CD86+MHC-Ⅱ，具有强抗原呈递能力，诱导 T 细胞增殖 TME 的免疫抑制作用机制之一就是分泌多种异常量免疫抑制因子。免疫抑制因子主要通过 3 条途径抑制

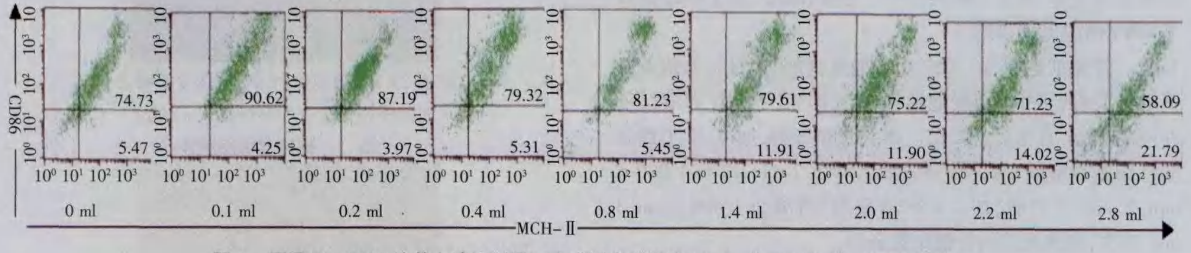


图 5　不同 Tca8113 培养上清液剂量下生成树突状细胞 MHC-Ⅱ、MHC-Ⅱ+CD86 表达

表 1　不同 cs-Tca8113 剂量下生成小鼠树突状细胞数量及其 MHC-Ⅱ、CD86+MHC-Ⅱ表达（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	对照组	1 组	2组	3组	4组	5组	6 组	7 组	8组
DCs数目（×10⁶ 个）	5.44 ± 0.26	6.19 ± 0.19	6.31 ± 0.12	5.82 ± 0.08	5.52 ± 0.12	5.50 ± 0.28	5.43 ± 0.13	4.89 ± 0.13	3.45 ± 0.26
MHC-Ⅱ	72.3 ± 2.36	88.31 ± 2.03	84.87 ± 2.22	79.41 ± 0.87	79.69 ± 1.39	74.55 ± 6.51	70.27 ± 4.36	66.61 ± 4.11	57.97 ± 2.30
MHC-Ⅱ +CD86	5.22 ± 0.25	4.00 ± 0.24	4.28 ± 0.24	5.66 ± 0.48	5.66 ± 0.71	10.49 ± 1.34	12.93 ± 1.12	14.03 ± 0.54	19.85 ± 1.71

注：（完全随机设计的单因素方差分析 *LSD-t* 检验结果）DCs 数量：对照组与实验组 1、2、7、8 组间相比 $P<0.05$；对照组与实验组 3、4、5、6 组间 $P>0.05$；1 组与 3、4、5、6、7、8 组间相比 $P<0.05$；2 组与 3、4、5、6、7、8 组间相比 $P<0.05$；3 组与 6、7、8 组相比 $P<0.05$；4 组与 7、8 组相比 $P<0.05$；5 组与 7、8 组相比 $P<0.05$；6 组与 7、8 组相比 $P<0.05$；7 组与 8 组相比 $P<0.05$。MHC-Ⅱ+CD86：对照组与实验组 1、2、3、4、7、8 相比 $P<0.05$；实验组 1、2 与实验组、3、4、5、6、7、8 相比 $P<0.05$，实验 3、4 组与 5、7、8 组相比 $P<0.05$。实验 5 组与 7、8 组相比 $P<0.05$，实验 6、7 组与 8 组相比 $P<0.05$。MHC-Ⅱ：对照组与实验组 5、6、7、8 相比 $P<0.05$；实验 1、2 组与实验 3、4、5、6、7、8 组相比 $P<0.05$，实验 2 组与 4、5、6、7、8 组相比 $P<0.05$，实验 3、4 组与 5、6、7、8 组相比 $P<0.05$。实验 5 组与 6、7、8 组相比 $P<0.05$，实验 6 组与 8 组相比 $P<0.05$，实验 7 组与 8 组相比 $P<0.05$

DCs抗原呈递功能：①抑制骨髓前体细胞分化为DCs，减少树突状细胞数目；②诱导前体细胞分化为 imDC，产生免疫耐受；③抑制 imDC 成熟[13]。

Tca8113 微环境中包含有多种免疫抑制因子，其中 TGF-β、VEGF、IL-10 是目前研究较多的几种。IL-10 通过降低 DC 共刺激分子的表达将 imDC 转变为耐受性 DC，同时还可以阻断单核细胞向 DCs 分化，IL-10 刺激；TGF-β 可阻止骨髓前体细胞向成熟树突状细胞分化，同时抑制树突状细胞抗原提呈功能；VEGF 影响 DCs 的分化，中和 VEGF 特异性抗体，消除肿瘤细胞介导的 DCs 的分化的抑制。不同免疫抑制因子对 DCs 影响既有相同也有相异之处，有理由相信他们之间可能共享某些信号通路，也有其特异信号通路。

本实验应用 Tca8113 培养上清液中各种可溶性因子模拟 TME：在高剂量 cs-Tca8113 的 TME 下，树突状细胞的分化出现了抑制，表现在生成 DCs 数目的减少，mDC减少，imDC 增加。本结果与王志勇等[14]临床对照实验相一致：他们发现颌面部鳞癌患者肿瘤组织内的 DCs 浸润程度及功能都有不同程度的缺失。这说明 Tca8113 微环境具有减少 DCs 的浸润、抑制 DCs 成熟和诱导 imDC 免疫耐受的功能，从而限制由其诱导的抗肿瘤细胞免疫反应的作用。同时还证明了高剂量 cs-Tca8113 模拟的 TME 与舌鳞癌肿瘤组织功能相似性。

本研究结果还显示：低浓度和中等浓度 Tca8113 可溶性因子的 TME 对 DCs 分化的影响与高浓度之间有很大的区别：低浓度 Tca8113 可溶性因子 TME 促进 DCs 分化和成熟，表现在 DCs 数目增加和 mDC 比列增加，imDC 比列减少；中等浓度的 Tca8113 可溶性因子微环境不影响骨髓前体细胞分化成熟为 mDCs，但强化诱导骨髓前体细胞向 imDC 方向分化，表现在 imDC 比例增加而生成 DCs 总数量无明显改变，既是在中等剂量范围内，imDC 表型 MHC-Ⅱ表达随 cs-Tca8113 增加而上调，说明 TME 对 DCs 调控渐变的多样性。

本实验结果李鹏等[15]研究结果有一定差异：他们发现低浓度 TGF-β1 能抑制 DCs 成熟，明显增加 imDCs 数量，高浓度 TGF-β1 显著抑制 DCs 成熟及不增加其 imDC 数量。提示了 TME 对 DCs 影响多样性。引起该结果的原因可能是因为模拟的 TME 中免疫抑制因子浓度相关：低浓度肿瘤源性免疫抑制因子间相互拮抗导致其免疫抑制能力缺失，同时异常量免疫抑制因子同时具有抗原性，刺激 DCs 成熟；而中等浓度肿瘤源性免疫抑制因子相互拮抗的同时产生了一定免疫抑制能力，抵抗肿瘤源性免疫抑制因子对 DCs 成熟刺激作用，与此同时，诱导更多 imDC 产生，最终导致免疫耐受效应。

cs-Tca8113 增加，模拟舌鳞癌形成到发展各个阶段 TME。诱导生成的树突状细胞从其生长分化上观察，经历了免疫增强——免疫均衡——免疫抑制 3 个不同阶段，与肿瘤免疫编辑（Cancer immunoediting）理论认为的肿瘤与免疫细胞之间相互作用的 3 阶段：消除阶段、相持阶段、逃逸阶段相吻合。在一定程度上说明应用 cs-Tca8113 能较好模拟舌鳞癌微环境。

综上所述，我们研究结果提示不同阶段舌鳞癌微环境对 DCs 生长分化作用呈现多样性，丰富了肿瘤免疫逃逸机制。肿瘤源性免疫抑制因子间相互作用具体机制必将是我们未来研究的重点。

参 考 文 献

[1] Hede K.Environment protection：studies highlight importance of tumor microenvironment[J].J Nat Cancer Inst，2004，96(15)：1120-1121.

[2] Laconi E.The evolving concept of tumor microenvironments[J]. Bioessays，2007，29(8)：738.

[3] Gajewski T F，Meng Y，Blank C，et al.Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment[J].Immunol Rev，2006，213：131-145.

[4] Alessandro P，Maria R Z.Mechanisms of tumor escape：role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells [J].Arch Immunol Ther Exp，2006，54(5)：323-333.

[5] Kiertcher S M，Luo J，Dubinett S M，et al.Tumor promote altered maturation and early apoptosis of monoeyte-derived dendritic cells[J]. Cancer Res，2006，66(18)：1268-1276.

[6] 张新华，钟翠萍，顾云娣，等.转染 TGF-β1 基因对大鼠树突状细胞成熟分化影响[J].中华国际医学杂志，2002，2(2)：95-99.

[7] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China[S].Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.2006-09-30.

[8] Lutz M B，Suri R M，Niimi M，et al.Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft surivival in vivo [J].Eur Immunnol，2000，30(7)：1813-1822.

[9] Lipscomb M F，Master B J.Ddendritic cells：immune regulators in health and disease[J].Physiol Rev，2002，82(1)：97-130.

[10] Casas R，Skarsvik S，Lindstrom A，et al.Lindstrom A Impaired maturation of monocyte-derived dendritic cells from birch allergic individuals in association with birch-specific immune responses[J].Scand J Immunol，2007，66(5)：591-598.

[11] Thomson A W，Robbins P D.Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation[J].Ann Rheum Dis，2008，67 (s3)：90-96.

[12] Stepkowski S M，Phan T，Zhang H，et al.Immature syngeneic dendritic cells potentiate tolerance to pancreatic islet allografts depleted of donor dendritic cells in microgravity culture condition[J].Transplantion，2006，82(12)：1756-1763.

[13] Lutz M B，Schuler G.Immuatura，semi-mature and full mature dendritic cells：which signal induce tolerance or immunity[J]? Trends Immunol，2002，23(9)：445-449.

[14] 王志勇，李声伟，胡勤刚，等.树突状细胞体外诱导淋巴细胞抑制舌癌细胞生长的实验研究[J].实用口腔医学杂志，2004，20(5)：517-521.

[15] 李 鹏，束永前，张学光.TGF-β1 对人单核细胞来源树突状细胞影响[J].临床肿瘤学杂志，2005，10(3)：293-296.

（责任编辑：冉明会）