基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1773-06

# 肝癌细胞微环境对不同分化阶段树突状细胞功能状态的影响

曾 柱[1],龙金华[2],陈 琳[3]

(1.贵州省贵阳医学院生物技术教研室,贵阳 550004;2.贵州省肿瘤医院头颈肿瘤科,贵阳 550004;3.贵州省贵阳医学院物理教研室,贵阳 550004)

【摘 要】目的:肿瘤的发生发展伴随有其对免疫系统各效应单元的显著抑制,树突状细胞(Dendritic cells,DCs)是目前所知功能最为强大的抗原呈递细胞(Antigen presenting cells,APC)并在天然和适应性免疫应答的启动方面发挥着至关重要的作用。本文探讨肝癌细胞(Hepatocellular carcinoma cells,HCC)分泌的可溶性细胞因子营造的微环境对树突状细胞的功能状态的影响,以探索傅立叶变换红外光谱(Fourier transformed infrared spectrum,FT-IR)技术在基于 DCs 的抗肿瘤细胞免疫治疗中的临床应用。方法:用免疫磁珠(Miltenyi biotec)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(Recombinant human interleukins 4,rhIL-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(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)将 imDCs 诱导为成熟 DCs(Mature DCs,mDCs),分别将 imDCs 和 mDCs 与 HCC 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,采用 FT-IR 技术和分子生物学技术研究 HCC 对 DCs 功能状态的影响。结果:与正常培养和撤生长因子培养的 DCs 相比,与 HCC 共培养 DCs 的基因转录活性和能量状态受到了显著的抑制,免疫印迹的结果进一步证实 DCs 的转录因子 NF-κB 的确受到了由 HCC 分泌的细胞因子的抑制。结论:HCC 能够抑制 DCs 的基因转录活性和能量状态,FT-IR 的变化与转录因子 NF-κB 的表达具有高度的相关性,这为 FT-IR 技术应用于检测 DCs 的功能状态奠定了基础,对基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗具有重要意义。

【关键词】树突状细胞;傅立叶变换红外光谱;基因转录活性;能量状态

作者介绍:曾 柱(1969-),男,副教授,博士,研究方向:树突状细胞生物学。

基金项目:教育部科学技术重点项目(编号:210196);贵州省省长基金(编号:黔省专字 2009-79);贵州省自然科学基金(编号:黔省合 J 字 2008-2274);贵州省贵阳市科学技术项目(编号:2010 筑科农合同字第 1-社-12)。

[8] Kuro-o M. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism[J].Curr Opin Nephrol Hypertens,2006,15(4):437-441.

[9] Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho[J].Sci Aging Knowledge Environ,2006,2006(8):pe11.

[10] Riancho J A,Valero C,Hernández J L,et al.Association of the F352V variant of the Klotho gene with bone mineral density[J].Biogerontology,2007,8(2):121-127.

[11] 马厚勋,牛永红,李章勇,等.等位基因特异性引物 PCR 技术其应用研究[J].生物技术,2005,15(1):15-18.

[12] 马厚勋,谢正祥,牛永红,等.中国汉族人群 NOS3 基因启动子 T-786C、A-922G 与第 7 外显子 G894T 多态性等位基因及其组合分布[J].中国老年学杂志,2004,24(12):1137-1140.

[13] 马厚勋,谢正祥,牛永红,等.汉族人群 NOS3 A-922G、NOS3 T-786C 与 NOS3 G894T SNP 的等位基因及其组合分布与高血压的相关性[J].遗传,2006,28(1):3-10.

[14] 华明娟,马厚勋,牛永红,等.KLOTHO 的 3 个 SNP 位点分布与几种疾病相关性的研究[J].中国现代医学杂志,2008,18(9):1174-1178.

[15] 何进卫,黄琪仁,章振林,等.雌激素受体 α 和维生素 D 受体基因多态性与上海市妇女峰值骨量的关系[J].中华内分泌代谢杂志,2004,20(2):140-142.

[16] 李海林,龚晓辉,黄永坤,等.维生素 D 受体基因 Apa Ⅰ多态性与维生素 D 缺乏性佝偻病易感性研究[J].中华医学遗传学杂志,2005,22(1):105-107.

[17] 叶 伟,彭 焰,黄东生,等.TGF-β1 基因 -509 C>T 单核苷酸多态性与椎间盘疾病的关系[J].中国矫形外科杂志,2006,14(7):531-534.

[18] Kuro-o M,Matsumura Y,Aizawa H,et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling aging[J].Nature,1997,390(6655):45-51.

[19] Matsumura Y,Aizawa H,Shiraki-Iida T,et al. Identification of the human Klotho gene and its two transcrips encoding membrane and secreted Klotho protein[J].Biochem Biophys Res Commun,1998,242(3):626-630.

[20] Arking D E,Krebsova A,Macek M Sr,et al. Association of human aging with a functional variant of klotho[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(2):856-861.

[21] Kawano K,Ogata N,Chiano M,et al. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women[J].J Bone Miner Res,2002,17(10):1744-1751.

[22] Ogata N,Matsumura Y,Shiraki M,et al.Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women[J].Bone,2002,31(1):37-42.

[23] Mullin B H,Wilson S G,Islam F M,et al.Klotho gene polymorphisms are associated with osteocalcin levels but not bone density of aged postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int,2005,77(3):145-151.

[24] Yamada Y,Ando F,Niino N,et al.Association of polymorphisms of the androgen receptor and klotho genes with bone mineral density in Japanese women[J].J Mol Med,2005,83(1):50-57.

(责任编辑:关蕴良)

【中国图书分类法分类号】Q6-3 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-02

# The effect of hepatocellular carcinoma cell microenvironment on the functional status of dendritic cells at different differentiation stages

*ZENG Zhu, et al*

(*Department of Biotechnology, Guiyang Medical College*)

【Abatract】*Objective*: The generation and progression of tumor is accompanied by a marked suppression of the effect units of immune system. DCs are the most powerful antigen presenting cells as now known and play significant roles in the initiation of innate and acquired immune response. This research aims to study the influence of microenvironment created by soluble cytokines derived from hepatocellular carcinoma cells (HCC) on the functional status of DCs, and to explore the clinical application of Fourier-Transformed Infrared (FT-IR) technology to the DCs-based cellular immune therapy against tumor. *Methods*: The monocytes were cultured in RPMI1640/10% FBS supplemented with 100 ng/ml rhGM-CSF and 100 ng/ml rhIL-4 for 7 days to develop into immature DCs (imDCs). Maturation was induced by addition of 20 ng/ml rhTNF-α to imDCs for another 3 days of culture. Acquired imDCs and mDCs were respectively co-cultured with human HCC for 48 hours in Transwell. The functional status of treated cells was investigated by FT-IR scanning and western blotting with untreated cells as control. *Results*: Compared with untreated DCs, the DCs co-cultured with HCC appeared to be suppressed in gene transcription activity and energy status. The results of western blotting further demonstrated the NF-κB transcription factors of DCs treated with HCC were inhibited by tumor-derived factors. *Conclusion*: HCC can inhibit the gene transcription activity and energy status. The ratio of absorption intensity of FT-IR at given wave numbers is markedly correlative with the expression of NF-κB. Clinically, these results may lay the foundation for the application of FT-IR to the analyses of DCs functional status in cellular immune therapy against cancer.

【Key words】Dendritic cells; Fourier transformed infrared spectrum; Gene transcription activity; Energy status

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]。从功能上来看,DCs 可分为未成熟 DCs(Immature DCs,imDCs)和成熟 DCs(Mature DCs,mDCs)。在机体内,imDCs 位于外周组织,其主要功能是摄取和处理抗原。获得抗原后 imDCs 逐渐分化为 mDCs,并通过血管或淋巴管向二级淋巴组织迁移。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。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[1,3,6,7],这就需要进一步研究肿瘤来源因素对 DCs 功能的影响。有研究发现肿瘤浸润部位有 DCs 存在,而且 DCs 的数量与肿瘤浸润程度密切相关[8]。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[9,10],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[9,11-13]。不同的研究小组现已证实,肝癌细胞(Hepatocellular carcinoma cells,HCC)并不影响 DCs(包括 imDCs 和 mDCs)的表型(如 CD11c、CD40、CD80、CD83 和 CD86 等)[14-16],说明 HCC 可以通过其他的途径来影响 DCs的免疫功能。有学者认为,HCC 可能通过抑制转录因子 NF-κB 来损伤 DCs 的生物学功能[17-19]。NF-κB 是天然和适应性免疫应答的关键活化因子,涉及肝脏中的肥大细胞和 DCs 等免疫细胞的功能,被许多信号转导通路所共享,其在这些细胞中的活化可导致细胞因子和趋化因子的表达[19,20]。RelB 是 NF-κB 转录因子家族的一个重要成员,在 DCs 成熟过程中发挥着重要的作用[21]。一旦 DCs 活化,RelB 就会被转运至细胞核并在转录水平和蛋白水平上调自身的表达[22,23]。

另外,在基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗的临床应用中,由于其制备过程对于临床医生来说比较繁琐,细胞的功能状态难以判断,而且负载抗原的方式、过继回输 DCs 的时间间隔、注射途径等均会影响其临床治疗效果[1,3],这就需要对这些操作过程进行优化。目前判断细胞功能状态方法主要是利用分子生物学的检测技术,还未见简便、实用、可靠而又无创的检测技术报道,这对基于 DCs 的抗肿瘤细胞免疫治疗的临床应用来说尤为重要。在我们以前的工作基础上[24-26],本研究利用傅立叶变换红外光谱(Fourier transformed infrared spectrum,FT-IR)技术和分子生物学技术研究了 HCC 对 DCs 功能状态的影响,结果发现 HCC 能够抑制 DCs 的基因转录活性和能量状态,分子生物学的研究结果显示 DCs 转录因子 NF-κB 的表达的确受到了 HCC 来源因素的影响,从而进一步证明了 HCC 能够通过抑制 DCs 的基因转录状态来损伤其功能,说

明 DCs 的 FT-IR 的变化与 NF-κB 的表达具有高度的相关性，为 FT-IR 技术应用于检测 DCs 的功能状态奠定了基础，这对基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗来说具有重要的临床意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)，重组人白介素 4(Recombinant human interleukins 4，rhIL-4)将和重组人肿瘤坏死因子 α(Tumor necrosis factor-α，TNF-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；NF-κB 抑制剂 Aspirin(ASA)购自美国Sigma 公司。

### 1.2 HCC 株的培养

HCC 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($2\times10^6$ 个/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

DCs 按 Steinman 等描述的方法由健康人新鲜外周血单个核细胞诱导而得，作适当修改。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 $5\times10^6$ 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(RPMI1640 干粉、$NaHCO_3$、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸、青霉素、链霉素、20%胎牛血清)中培养至第 7 d，收集悬浮细胞即为 imDCs。imDCs 中加入 20 ng/ml rhTNF-α 培养 3 d即为 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 HCC 的共培养

$2\times10^7$ 个 imDCs 或 mDCs 与 $2\times10^6$ 个 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。上室中的细胞命名为 imDCs+HCCs or 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 DCs 的处理

为了研究 FT-IR 对细胞基因转录活性的敏感性，将获得的 imDCs 和 mDCs 用 5 mmol/L 的 ASA 处理细胞 48 h，除加入 ASA 外，培养条件与正常 DCs 的一致，这些 DCs 分别命名为 imDCs+ASA 和 mDCs+ASA。细胞存活率用台盼蓝染色检测。

### 1.6 FT-IR 检测

分别收集 $2\times10^6$ 个作不同处理的 DCs。重水(含 0.9% NaCl)漂洗 2 次，去上清液，用微量移液器将细胞移至 $CaF_2$ 窗片的中间，每次 5 μl，37℃静置至大部分水分蒸发，加盖另一 $CaF_2$ 窗片，上机(NEXUS-470FTIR，德国 Nicolet 公司)检测，以重水为空白对照谱，扫描范围 900~4 000 $cm^{-1}$，分辨率8 $cm^{-1}$，扫描叠加 256 次。用 OMNIC6.0 软件处理数据，将实验样品与空白对照的差减谱进行傅立叶变换自去卷积，带宽：51.4，灵敏度增强因子：2.5，自动校正基线后，确定每个吸收峰的高度，即得到该波数位置的吸收度。

### 1.7 蛋白质免疫印迹分析

蛋白质免疫印迹反应用于分析 DCs 中 RelB 和 actin 的表达。简述如下，收集 $2\times10^6$ 个细胞，常规裂解液裂解细胞；BCA 试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)测定裂解液中的蛋白浓度。蛋白等量上样(10 μg)，SDS-PAGE(4%浓缩胶/8%分离胶)电泳，电转至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride，PVDF)膜(Millipore，美国)，鼠抗人 RelB(C19，Santa Cruz，美国)和 β-actin(Sigma，美国)抗体与膜孵育。化学发光法显示目标蛋白。Image J 分析所获图像。计算每一 RelB 的表达量与上样对照(β-actin)的比值。

### 1.8 统计学处理

实验数据以表示，所有数据用 SPSS11.5 统计软件的 ANOVVA 作方差分析，组间作 SNK 两两比较，$P<0.05$ 时，认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 不同分化阶段的 DCs 的鉴定

不同分化阶段 DCs 的 CD1a、CD11c、CD40、CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 的表达和形态学鉴定请参阅本课题的发表的其他论文[27]。

### 2.2 各种培养条件下 DCs 的 FT-IR 吸收强度比

图 1 为所得到的 mDCs 与 HCC 共培养条件下细胞的 FT-IR 示意图。不同波数对应的峰高表示细胞内不同结构成分的红外吸收强度，不同峰位对应不同的微观结构[28-31]，如在 916~1 300 $cm^{-1}$ 内的吸收峰来自 DNA 和 RNA 不同二级结构成分的振动，1 650~1 540 $cm^{-1}$ 内代表蛋白质的酰胺Ⅰ带和酰胺Ⅱ带，此范围内的吸收峰来自蛋白质肽链中酰胺 C=O 伸展振动和酰胺 N-H 弯曲振动，1 452 $cm^{-1}$ 和 1 467 $cm^{-1}$ 峰来自膜

脂的酰基链中甲基和甲叉基的弯曲振动，2 800~3 000 $cm^{-1}$ 范围内的峰来自膜磷脂中 C-H 伸展振动。

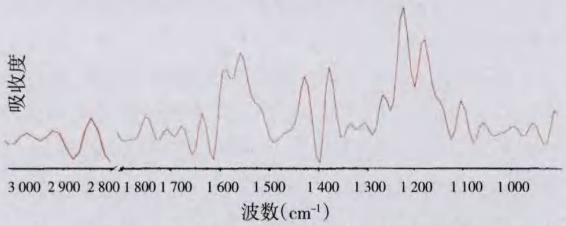
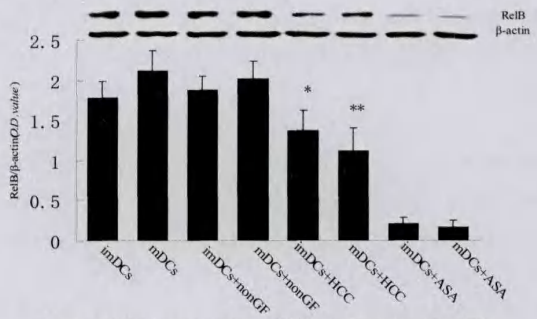



**图 1 与 HCC 共培养条件下 mDCs 的 FT-IR(去卷积)示意图**

将样品与重水空白对照差减谱进行傅立叶变换去卷积后，软件校正基线后，确定每个峰的高度，即为样品在该峰位的吸收度。计算特征波数相对应的峰高度(吸收度)之比，根据 Jagannathan Ramesh 等人的研究结果[32]，峰吸收度比 $A_{1020}/A_{1545}$ 对应 DNA/酰氨Ⅱ带，$A_{1121}/A_{1545}$ 对应 RNA/酰氨Ⅱ带，$A_{1030}/A_{1080}$ 对应葡萄糖/磷酸盐，$A_{1030}/A_{2924}$ 对应葡萄糖/磷脂，它们分别表示细胞中核酸和蛋白质的相对含量，转录状态，代谢更新状态和消耗自由葡萄糖以进行磷脂重新合成的状态。所有光谱均经过傅立叶自去卷积处理且没有波数漂移。不同培养条件下的 DCs 吸收强度比如表 1 所示。

### 2.3 不同培养条件下 DCs 的 NF-κB 的表达

RelB 是 NF-κB 转录因子家族的一个重要成员，在 DCs 成熟过程中发挥着重要的作用。本研究采用 RelB 的表达来指示 NF-κB 的表达。蛋白质免疫印迹反应的结果(图 2)显示，与 HCC 共培养后，DCs(包括 imDCs 和 mDCs)的 RelB 的表达受到了显著的抑制($P<0.05$ 和 $P<0.01$)，而且 NF-κB 的特异性抑制剂 ASA 能够显著地抑制 RelB 的表达，从而进一步证实了 FT-IR 的研究结果。




imDCs+HCC 和 mDCs+HCC 分别与 imDCs 和 mDCs 相比较：*$P<0.05$ 和 **$P<0.01$

**图 2 不同培养条件下 DCs 的 Rel B 与 β-actin 的表达比率的变化**

**表 1 不同培养条件下细胞的红外吸收强度比 ($\bar{x} \pm s$)**

| 细胞型 | | $A_{1020}/A_{1545}$ DNA/amide Ⅱ | $A_{1121}/A_{1545}$ RNA/amide Ⅱ | $A_{1030}/A_{2924}$ glucose/phospholipids | $A_{1030}/A_{1080}$ glucose/phosphate |
|---|---|---|---|---|---|
| DCs | imDCs | 3.782 ± 0.016 | 2.953 ± 0.060 | 1.274 ± 0.046 | 0.753 ± 0.033 |
| | mDCs | 0.531 ± 0.032 | 1.219 ± 0.039 | 0.169 ± 0.022 | 0.957 ± 0.058 |
| DCs+nonGF | imDCs+nonGF | 3.655 ± 0.027 | 1.822 ± 0.086 | 1.383 ± 0.031 | 0.764 ± 0.028 |
| | mDCs+nonGF | 0.583 ± 0.026 | 0.877 ± 0.051 | 0.423 ± 0.015 | 0.604 ± 0.022 |
| DCs+HCC | imDCs+HCC | 3.721 ± 0.027 | 0.603 ± 0.004* | 0.382 ± 0.010* | 0.302 ± 0.017* |
| | mDCs+HCC | 0.577 ± 0.027 | 0.361 ± 0.004* | 0.125 ± 0.007* | 0.408 ± 0.023* |
| DCs+ASA | imDCs+ASA | 3.718 ± 0.018 | 0.296 ± 0.021** | 0.351 ± 0.012** | 0.281 ± 0.024** |
| | mDCs+ASA | 0.488 ± 0.024 | 0.125 ± 0.009** | 0.107 ± 0.009** | 0.386 ± 0.031** |

注：imDCs 和 mDCs 分别与 imDC+HCC 和 mDC+HCC 相比较：*$P<0.05$；imDCs 和 mDCs 分别与 imDCs+ASA 和 mDCs+ASA 相比较：**$P<0.05$

## 3 讨 论

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 细胞的能力也逐渐增加，成为成熟 DCs[33]。

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大量的细胞因子，这些细胞因子单独地或协同地抑制了 DCs 的抗原呈递功能，使机体无法诱导抗肿瘤免疫应答[9,11-13]。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，该疗法的治疗效率与理论上的预测还有一定的距离，许多问题有待解决[1,3,6,7]，这就需要进一步研究肿瘤来源因素对 DCs 功能的影响，而且在基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗的临床应用中，由于操作过程比较繁琐，细胞的功能状态难以判断，开发可靠而实用的判断细胞功能状态的方法以简化临床细

胞免疫治疗的操作过程显得尤为重要。FT-IR 技术在生物大分子研究中的应用主要是通过不同峰位的波数对应的谱线来了解各种功能基团的振动模式，它对细胞的结构、构象和微环境的变化极为敏感，现已成为研究细胞内生化事件的有力武器。所以，在本研究中，我们利用 FT-IR 技术来研究HCC对 DCs 功能状态的影响，探索 FT-IR 与细胞功能状态的相关性，为将 FT-IR 技术应用于临床细胞免疫治疗提供理论依据。

$A_{1020}/A_{1545}$ 表示细胞中 DNA 和蛋白质酰氨Ⅱ带的相对含量，对应于细胞的增殖状态，从我们的研究中可发现(表 1)，4 种不同的培养条件下 DCs 的 $A_{1020}/A_{1545}$ 值无统计意义的差别($P>0.05$)，说明这些细胞处于不增殖状态，这与 DCs 是终末分化和不增殖的细胞是相一致的。

$A_{1121}/A_{1545}$ 表示细胞中 RNA 和酰氨Ⅱ带的相对含量，对应于细胞的基因转录状态。从表 1 可看出，在 HCC 微环境下，imDCs 和 mDCs 的基因转录受到了肿瘤来源因素的明显抑制($P<0.05$)，这与其他文献的报道是相一致的[19,20,34]。DCs 的基因转录状态的改变可能会影响重要分子或蛋白的表达，从而影响其正常的生理功能(迁移和共刺激能力)，导致对肿瘤具有特异性的免疫应答受损，可能是肿瘤逃脱免疫监视的一种方式。转录因子 NF-κB 被许多信号转导通路所共享[20]，是天然和适应性免疫应答的关键活化因子，涉及肝脏中的肥大细胞和 DCs 等免疫细胞的功能，其在这些细胞中的活化可导致细胞因子和趋化因子的表达[19,20]。有研究发现肿瘤细胞高表达的血管内皮生长因子、转化生长因子和白介素 10 等能够通过抑制 NF-κB 的表达来抑制 DCs 表达预炎性细胞因子、趋化因子、粘附分子和共刺激分子[35-39]，由此可以推测在肝癌微环境下，DCs 的 $A_{1121}/A_{1545}$ 值的降低可能归因于 NF-κB 的表达受抑。RelB 是 NF-κB 转录因子家族的一个重要成员，在 DCs 成熟过程中发挥着重要的作用[21]。一旦 DCs 活化，RelB 就会被转运至细胞核并在转录水平和蛋白水平上调自身的表达。所以，本研究采用 RelB 的表达来指示 NF-κB 的表达。分子生物学的研究结果显示，无论是 imDCs 还是 mDCs 的 RelB 的表达均受到了 HCC 的抑制($P<0.05$ 和 $P<0.01$)，从而证实了 FT-IR 的研究结果。为了进一步探索 FT-IR 与细胞基因转录状态的相关性，本研究用 NF-κB 的特异性抑制剂 ASA 作用于 DCs 48 h，FT-IR 和分子生物学的实验结果显示(表 1 和图 2)，imDCs 和 mDCs 的 $A_{1121}/A_{1545}$ 值以及 RelB的表达均显著下降($P<0.05$)，说明 FT-IR 与细胞的基因转录状态具有高度的相关性。当然，本研究只关注了一个转录因子 NF-κB，是否涉及到其他的转录因子还需要进一步的研究。

$A_{1030}/A_{2924}$ 表示细胞内糖/磷脂的相对含量，对应于细胞内消耗自由葡萄糖以进行磷脂重新合成的情况。$A_{1030}/A_{1080}$ 表示细胞内糖/磷酸的相对含量，对应于细胞的代谢更新状态。在 HCC 的影响下，DCs 的 $A_{1030}/A_{2924}$ 和 $A_{1030}/A_{1080}$ 值均比其它 2 种培养条件下的对应值低($P<0.05$)，这种差异可能来自不同培养条件下 DCs 内可以利用的糖的含量，也就是说细胞可能缺乏能量来完成其其他的功能，如迁移和刺激幼稚 T 细胞增殖等，因为细胞的能量状态控制了其细胞代谢快慢。所以，肝癌微环境中的某些因素(如：转化生长因子 β1、血管内皮生长因子和白介素 10 等)影响了 DCs 中一些关键成分的代谢从而抑制其功能，如一些蛋白质和脂的代谢障碍不可避免地涉及到抗原的摄取、处理和呈递过程以及迁移能力。

总之，本研究结果表明 HCC 能够抑制 DCs 的基因转录活性和能量代谢状态，导致 DCs 的正常生理功能受到损伤，从而无法有效地启动免疫应答，可能是肿瘤细胞免疫逃逸的一个方面。DCs 的 FT-IR 的变化与 NF-κB 的表达具有高度的相关性，为 FT-IR 技术应用于检测 DCs 的功能状态奠定了基础，这对基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗来说具有重要的临床意义。

## 参 考 文 献


[1] Steinman R M, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine[J]. Nature, 2007, 449(9): 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, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity[J]. Nature, 1998, 392(6673): 245-252.

[5] Banchereau J, Palucka A K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer[J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5(4): 296-306.

[6] Soruri A, Zwirner J. Dendritic cells: limited potential in immunotherapy[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37: 241-245.

[7] Nestle F O, Farkas A, Conrad C. Dendritic-cell- based therapeutic vaccination against cancer[J]. Current Opinion in Immunology, 2005, 17(2): 163-169.

[8] Tsujitani S, Kakeji Y, Watanabe A. Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer[J]. Cancer, 1990, 66(9): 2012-2016.

[9] Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion[J]. Nature Reviews Immunology, 2006, 6(10): 715-727.

[10] Gavin P D, Catherine M K, Robert D S. Interferons, immunity and cancer immunoediting[J]. Nature Reviews Immundogy, 2006, 6(11), 836-848.

[11] Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects[J]. Nature Reviews Immunology, 2004, 4(12): 941-951.

[12] Rabinovich G A, Gabrilovich D, Sotomayor E M. Immunosupressive strategies that are mediated by tumor cells[J]. Annu. Rev. Immunol, 2007, 25(2): 267-296.

[13] Zou W. Immunosupressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance[J]. Nature Reviews Cancer, 2005, 5(4): 263-

274.

[14] 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].Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(4): 431-436.

[15] 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.

[16] Lee W C, Chiang Y J, Wang H C, et al. Functional impairment of dendritic cell caused by murine hepatocellular carcinoma[J]. J. Clinical Immunology, 2004, 24(4): 145-153.

[17] Thumann C, Schvoerer E, Abraham J D, et al. Hepatitis C virus structural proteins do not prevent human dendritic cell maturation [J]. Gastroenterol Clin Biol, 2008, 32(1 Pt. 1): 59-68.

[18] Zimmermann M, Flechsig C, La Monica N, et al. Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes[J]. J Hepatol, 2008, 48(1): 51-60.

[19] Karin M, Greten F R. NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression[J].Nature Reviews Immunology, 2005, 5(10): 749-759.

[20] Sun B, Karin M.NF-kappa B signaling, liver disease and hepatopr otective agents[J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6228-6244.

[21] Martin E, O'Sullivan B, Low P, et al. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10[J]. Immunity, 2003, 18(1): 155-167.

[22] Pettit A R, Quinn C, Macdonald K P, et al. Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function[J]. J Immunol, 1997, 159(8): 3681-3691.

[23] O'Sullivan B J, Macdonald K P, Pettit A R, et al. RelB nuclear translocation regulates B cell MHC molecule, CD40 expression, and antigen -presenting cell function[J].Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(21): 11421-11426.

[24] Zeng Z, Liu X, Jiang Y, et al. Biophysical studies on the differentia tion of human $CD14^+$ monocytes into dendritic cells[J].Cell Biochemistry and Biophysics, 2006, 45(1): 18-28.

[25] Yuhui J, Zhu Z. Adhesion of monocyte-derived dendritic cells to human umbilical vein endothelial cells in flow field decreases upon maturation[J].Clinical hemorheology and microcirculation, 2005, 33(2): 261-268.

[26] 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 Motility and the Cytoskeleton, 2007, 64(3): 186-198.

[27] 陈 琳, 戴 鹏, 廖兴江, 等.不同分化阶段的树突状细胞的细胞膜生物物理特性变化[J].生物物理学报, 2008, 24(2): 107-116.

[28] Liu K Z, Schultz C P, Mohammad R M, et al. Similarities between the sensitivity to 2-chlorodeoxyadenosine of lymphocytes from CLL patients and bryostatin 1-treated WSU-CLL cells: an infrared spectroscopic study [J]. Cancer letters, 1998, 127(5): 185-193.

[29] Gao T X, Ci Y X, Jian H Y, et al. FTIR investingation of the interaction of tumors cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid[J]. Vibrational spectroscopy, 2000, 24(2): 225-231.

[30] Le Gal J M, Morjani H, Manfait M. Ultrastructural appraisal of the multidrug resistance in K562 and LR73 cell lines from FTIR [J].Cancer Research, 1993, 53(8): 3681-3686.

[31] Le Gal J M, Morjani H, Fardel O et al. Conformational changes in membrane proteins of multidrug-resistant K562 and primary rat hepato cyte cultures as studied by FTIR[J]. Anticancer Research, 1994, 14(4A): 1541-1548.

[32] Ramesh J, Salman A.Application of FTIR microscopy for the characterization of malignancy: H-ras tranfected murine fibroblasts as an example[J]. Biochem Biophys Methods, 2001, 50(1): 33-42.

[33] Steinman R M. Dendritic cells and vaccines[J]. Proc(Bayl Univ Med Cent), 2008, 21(1): 3-8.

[34] Burkly L, Hession C, Ogata L, et al. Expression of RelB is required for development of thymic medulla and dendritic cell[J].Nature, 1995, 373 (6514): 531-536.

[35] Oyama T, Ran S, Ishida T, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kB activation in hemopoietic progenitor cells[J]. J. Immunol, 1996, 160(3): 1224-1232.

[36] Takahashi A, Kono K, Ichihara F, et al.Vascular endothelial grown factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflanmatory cytokines[J].Cancer Immunol Immunother, 2004, 53(6): 543-550.

[37] Kobie J J, Wu R S, Kurt R A, et al. Transforming growth factor β inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines[J]. Cancer Reaearch, 2003, 63(8): 1860-1864.

[38] Weber F, Byrne S N, Brown S L D A, et al. Transforming growth factor-β1 immobilises dendritic cells within skin tumors and facilitate tumour escape from the immune system[J]. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54(9): 898-906.

[39] Peguet Navarro J. Interleukin-10 inhibits the primary allogence T cell responses to human epiderimal Langerhans cells[J]. Eur. J. Immunol, 1994, 24(4): 884-889.

(责任编辑: 冉明会)