

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0200-05

· 论 著 ·

白细胞介素 24 对人树突状细胞活化和成熟的诱导作用

卢琳, 陈国友, 蒋应明, 张意, 万涛, 安华章, 曹雪涛(第二军医大学免疫学研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究白细胞介素 24(interleukin-24, IL-24) 对人外周血单核细胞来源树突状细胞(dendritic cell, DC) 表型及抗原提呈功能的影响。**方法:** 利用 Western blot 检测 DC 培养上清中 IL-24 的分泌水平; 利用半定量 RT-PCR 方法分析不同条件下 DC 表达 IL-24 受体及趋化因子受体的情况; 通过流式细胞术分析检测 IL-24 共培养后 DC 细胞表面 CD80、CD86、MHC II 类分子的表达水平; 采用体外混合淋巴细胞实验分析经 IL-24 共培养对 DC 抗原提呈功能的影响。**结果:** 体外培养过程中, 用 LPS 刺激 DC 可诱导其分泌 IL-24; 同时, LPS 还能上调 DC 表达 IL-24 受体亚单位 IL-22R1。IL-24 作用于 DC 可上调 DC 细胞表面 CD80、CD86 及 MHC II 类分子的表达, 并增强 DC 对 T 细胞的抗原提呈功能。**结论:** IL-24 这一新型的细胞因子在体外实验中能促进 DC 的表型成熟, 增强 DC 的抗原提呈功能。

[关键词] 白细胞介素 24; 树突状细胞; 细胞因子; 趋化因子

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A

Interleukin-24 induced activation and maturation of human dendritic cells

LU Lin, CHEN Guo-you, JIANG Ying-ming, ZHANG Yi, WAN Tao, AN Huang-zhang, CAO Xue-tao (Institute of Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of human IL-24 on phenotype and antigen presenting function of human monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. **Methods:** Western blot was used to determine the level of IL-24 in the DC culture supernatant. Semi-quantitative RT-PCR was used to analyze the expression of IL-24 receptor and chemokine receptors in DCs at different developmental stages. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was used to assess the expression of MHC class II molecule, CD80 and CD86 on DCs surface in the presence of IL-24. Allogenic mixed lymphocyte reaction was employed to analyze the effect of IL-24 on the antigen presenting function of DCs. **Results:** We found that LPS induced DCs to secrete endogenous IL-24. Meanwhile, LPS also up-regulated the expression of IL-22R1, an IL-24 receptor subunit, on DCs. Supplement of IL-24 to DCs culture medium significantly augmented the expression of MHC II, CD80, and CD86 on DCs surface, and promoted the antigen presenting function of DCs to T cells. **Conclusion:** IL-24 can promote the activation and maturation of DCs, increasing the antigen presenting function of DCs.

[Key words] interleukin-24; dendritic cell; cytokine; chemokine

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 200-204]

白细胞介素 24(interleukin-24, IL-24), 又称为黑素瘤分化相关抗原 7, 是一种属于 IL-10 家族的新型细胞因子。IL-24 具有较明显的抗肿瘤作用, 能选择性地抑制肿瘤生长, 诱导多种肿瘤细胞凋亡, 并引起黑素瘤细胞末端分化^[1-2]。最近的一些研究结果表明, IL-24 可诱导人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)表达 IL-1、IL-12、GM-CSF。提示 IL-24 可能作为新的免疫调节因子, 参与机体抗肿瘤免疫反应的诱导和维持。树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知的体内功能最强的专职性抗原提呈细胞。作为机体免疫应答反应启动、调控和维持过程的中心环节,

DC 的不同活化和成熟状态、DC 活化后分泌的细胞因子和趋化因子的种类和水平都能影响其功能的发挥^[3]。最新研究结果^[4]表明, 淋巴结生发中心的滤泡状树突状细胞可分泌表达一定量的 IL-24, 提示 IL-24 有可能通过直接作用或者通过诱生二级细胞因子, 激活机体的抗原提呈细胞, 使其提呈肿瘤抗原, 从而诱导

[基金项目] 国家重大基础研究发展规划(“973”计划)课题 (2003CB515503)

[作者简介] 卢琳(1977-), 女, 江苏高邮人, 硕士, 主要从事肿瘤免疫学及蛋白质工程方面的研究

[通讯作者] 陈国友, E-mail: guoyouchen@immunol.org

机体的抗肿瘤免疫应答。

本研究观察了 IL-24 及其受体在不同活化阶段的人树突状细胞的表达情况,并在 DC 体外培养体系中进一步研究重组人 IL-24 对人树突状细胞表型成熟及抗原提呈功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

重组人 IL-24 购自美国 R&D 公司,内毒素含量低于 1.0 EU/ μg 。RPMI 1640 培养基、胎牛血清、总 RNA 抽提试剂 Trizol(Gibco),淋巴细胞分离液(histopaque, 1.077 g/ml)和 LPS (Sigma),人重组 GM-CSF(先灵宝雅),人重组 IL-4 (Promega),人 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-12p40、IFN- γ 和 IL-10 定量 ELISA 检测试剂盒(R&D 公司),FITC 标记的 CD80 单克隆抗体、PE 标记的抗 CD86 和 Percp 标记的 HLA-DR 单克隆抗体为 PharMin-gen 公司产品。

1.2 人外周血单核细胞来源 DC 的培养

人外周血单核细胞来源 DC 的培养按文献[5]的方法进行。利用 Western blot 方法检测不同条件下 DC 培养上清中 IL-24 的表达水平。

1.3 以 β -actin 为内参照的半定量 RT-PCR

采用 RT-PCR 方法,分析不同条件下 DC 表面 IL-24 受体及趋化因子受体表达情况。按 Trizol 试剂说明提取细胞总 RNA,然后每个样本取 5 μg 总 RNA,在 20 μl 体积中反转录,完毕后稀释至 100 μl ,每次取 2 μl 作为 PCR 的模板。同时设立 β -actin 作为内参照。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 23 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。Human multiple tissue northern (MTNTM) blots 作为 IL-24 受体的阳性对照。RT-PCR 引物序列见表 1。

1.4 流式细胞术和混合淋巴细胞反应实验检测 DC 功能的改变

取培养至第 5 天的人 DC,分别用不同浓度的 IL-24 或 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 刺激,同时设立 PBS 空白对照组。分别收集刺激 12、24、36、48 h 后的 DC,用预冷 PBS 洗 2 遍,根据检测目标分子的不同,分别加入 FITC 标记的抗人 CD80、PE 标记的抗人 CD86 和 Percp 标记的抗人 HLA-DR 单克隆抗体,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 标记 30 min,然后用冷 PBS 洗 2 遍,去除未结合的荧光素抗体。用流式细胞仪(FACS calibur, BD 公司)检测细胞表型,结果的处理用 Cell Quest 软件分析或叠加。

混合淋巴细胞反应实验按文献[6]的方法进行。体外培养至 5 d 的 DC 用 30 Gy ⁶⁰Co 照射去增殖作为刺

激细胞,按一定的比例(1: 10,1: 20,1: 40)与经磁性细胞分离柱分离获得的 CD3⁺T 细胞混合培养 3 d,于培养结束前 12 h 加入³H-TdR。收集细胞,用液闪计数器检测细胞内掺入的 cpm 值。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

Primer	Sequence
IL-20R1sense	5'-TCAAAACAGAACGTGGTCCCACTG-3'
IL-20R1antisense	5'-TCCGAGATATTGAGGGTGATAAAG-3'
IL-20R2 sense	5'-GCTGGTGCTCACTCACTGAAGGT-3'
IL-20R2 antisense	5'-TCTGTCTGGCTGAAGGCGCTGTA-3'
IL-22R1 sense	5'-CCCCAGACACGGTCTACAGCAT-3'
IL-22R1 antisense	5'-GGGTCAGGCCGAAGAAGTCTATAT-3'
CXCR4 sense	5'-GGGCAATGGATTGGTCATCTGCTC-3'
CXCR4 antisense	5'-GTGGTCTTGAGGGCCTTGCGCTTCT-3'
CCR5 sense	5'-CTGAGAAGCATGACGGACAAGTACAGGCT-3'
CCR5 antisense	5'-CAGATGAATGTCCACCTCGCTTTCTTTGG-3'
CCR7 sense	5'-GATTACATCGGAGACAACACC-3'
CCR7 antisense	5'-TAGTCCAGGCAGAAGAGTCG-3'
β -actin sense	5'-GCATCCTCACCTGAAGTAC-3'
β -actin antisense	5'-TTCTCCTTAATGTCACGCAC-3'

1.5 IL-24 诱导 DC 分泌细胞因子和趋化因子的检测

取培养第 5 天的人 DC,用 DC 培养基调整细胞密度至 5 $\times 10^5$ 个/ml,分别用不同浓度的 IL-24 或 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 刺激 48 h。设立空白对照组。刺激结束后,收获细胞培养上清,用定量 ELISA 试剂盒检测上清中细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-12p70 和 TNF- α)和趋化因子(IP-10 和 MIP-1 α)的分泌水平。ELISA 检测操作参照 R&D 公司的试剂盒说明书进行。根据线性回归方程绘制标准曲线,计算出各样品中分泌的细胞因子浓度,用 pg/ml 表示。

1.6 统计学处理

应用 SPSS11.5 软件进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 人外周血单核细胞来源的 DC 可诱导表达 IL-24

IL-24 在人体细胞的生理表达具有高度的组织特异性,主要是活化的 CD3⁺T 淋巴细胞和单核细胞能够表达 IL-24。为了观察不同培养条件下,DC 是否表达内源性的 IL-24,将培养 5d 的 DC 不经任何刺激或用 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用 24 h,取上清进行蛋白质印迹检测。

结果表明经 LPS 激活的 DC 能显著高表达 IL-24,而未经刺激的 DC 则检测不到有 IL-24 的表达(图 1)。

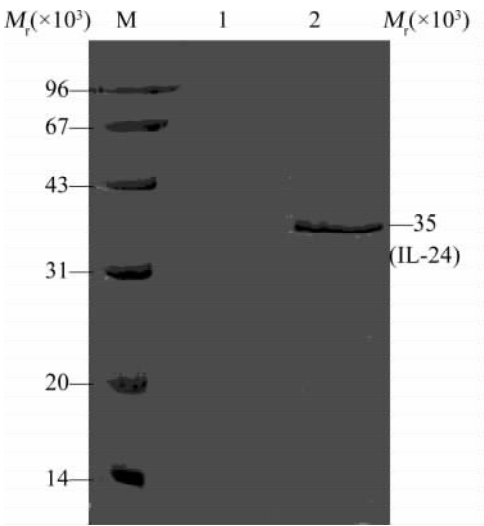


图 1 Western blot 检测 DC 分泌 IL-24

Fig. 1 Western blot detection of IL-24 secretion by DC

M: Protein marker; 1: Immature DC;
2: Mature DC induced by LPS

2.2 不同条件下 DC 细胞表面 IL-24 受体亚单位的表达水平

IL-24 受体是 2 个异二聚体,分别是 IL-22R1/IL-20R2 和 IL-20R1/IL-20R2。RT-PCR 结果表明,与未经处理的 DC(即未成熟 DC)相比,人外周血单核细胞来源的 DC 经 LPS 和人重组 IL-24 蛋白刺激后,IL-24 受体的 IL-22R1 单体 mRNA 表达水平均有明显上调,而 IL-20R2 mRNA 的表达在各实验组中没有显著变化;IL-20R1 mRNA 则在实验组及阴性对照组细胞表面均未见表达(图 2)。因此,IL-24 在 DC 内发挥生理功效可能是通过 IL-22R1/IL-20R2 异二聚体介导的,这一受体在未成熟 DC 表面是低表达的,而在经 LPS 诱导成熟的 DC 表面和 IL-24 刺激后 DC 表面的表达是增加的。

2.3 IL-24 诱导 DC 表型和功能成熟

DC 的抗原提呈功能和对 T 细胞的共刺激作用是通过 DC 表面的 MHC 分子及多种共刺激分子所介导的。将培养的 DC 用不同浓度的 IL-24 处理后进行 FACS 分析,发现 IL-24 诱导 DC 表面 CD80、CD86 及 HLA-DR 分子表达明显上调,表明 IL-24 可诱导 DC 表型成熟(图 3)。此外,成熟 DC 可诱导特异性 T 细胞活化和增殖,而未成熟的 DC 则不能引发 T 细胞应答。在混合淋巴细胞反应中,IL-24 和 LPS 处理的 DC 可促使 T 细胞增殖,这表明 IL-24 能促进 DC 功能成熟(图 4)。

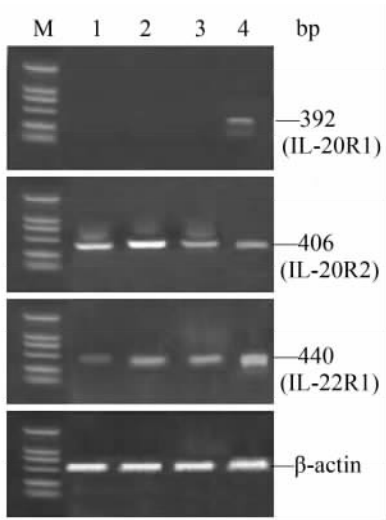


图 2 IL-24 受体在 DC 中的表达

Fig. 2 Expression of IL-24 receptor components on DCs

M: DL2000 DNA marker; 1: Immature DC;
2: Mature DC induced by LPS; 3: DC treated with 1 μ g/ml IL-24; 4: Positive control

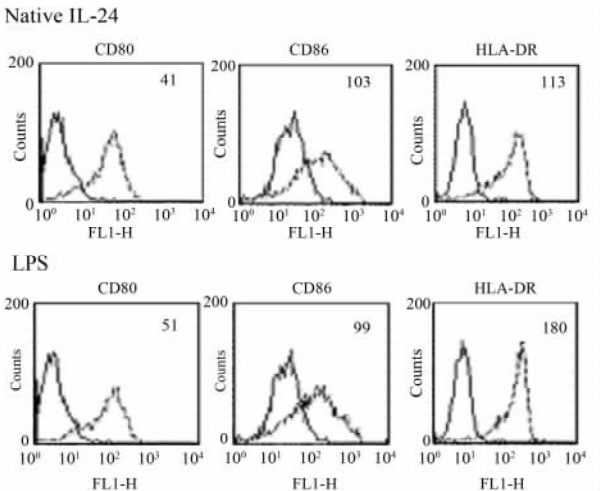


图 3 IL-24 诱导 DC 表型成熟

Fig. 3 Phenotypical maturation of DC induced by IL-24

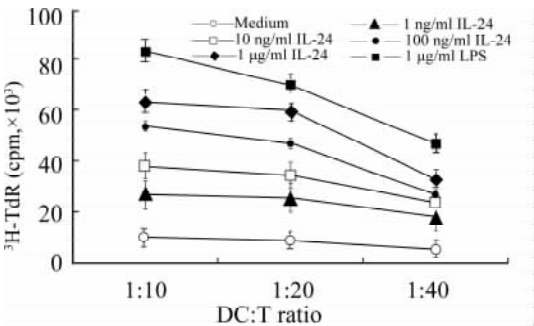


图 4 IL-24 对 DC 刺激同种混合淋巴细胞反应的增强效应

Fig. 4 Enhanced allogeneic T cell proliferation induced by DC pretreated with IL-24 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

2.4 IL-24 诱导 DC 分泌细胞因子

用不同剂量的 IL-24 分别刺激培养至第 5 天的 DC, 结果表明, IL-24 可诱导 DC 分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-12 等细胞因子, 其中 TNF- α 和 IL-12 分泌表达的水平较高, 并且存在着剂量依赖效应(IL-24 作用浓度 1、10、100、1 000 ng/ml 时, DC 分泌 IL-12 分别为 71、152、1 023、1 920 pg/ml)。由于 IL-12 是诱导 Th1 型免疫应答的重要细胞因子, 提示 IL-24 可能诱导 DC 产生 Th1 型免疫应答。

2.5 IL-24 诱导 DC 趋化因子及其受体的表达

用不同浓度 IL-24 处理 DC 后, 趋化因子 IP-10 及 MIP-1 α 的分泌量显著增加, 并具有明显剂量依赖效应(图 5)。趋化因子受体的表达与成熟 DC 向二级淋巴器官归巢和活化初始型 T 细胞有关。研究已证实未成熟 DC 高表达 CCR1 和 CCR5, 而成熟的 DC 表面 CCR7 和 CXCR4 表达上调。用 IL-24 或 LPS 处理 DC 后 CCR7 和 CXCR4 表达增加而 CCR5 表达下降(图 6)。

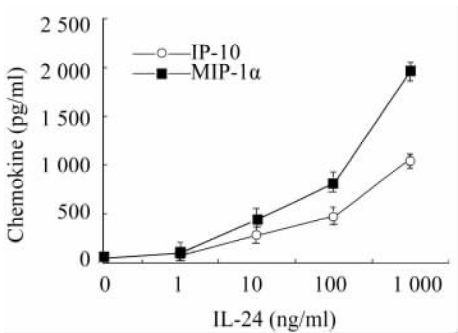


图 5 不同浓度 IL-24 对 DC 分泌趋化因子的诱导效应($n=3$)

Fig. 5 Induction of chemokines by DC stimulated with IL-24 in dose-dependent manner ($n=3$)

3 讨 论

IL-24 是最近发现的一种具有直接抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤分化的多功能细胞因子。迄今为止, 有关 IL-24 的生物学功能研究多侧重于直接的抗肿瘤生物学活性, 但有关其免疫学功能尚无系统的研究报道。IL-24 为 IL-10 细胞因子家族成员之一^[7]。目前很多研究已证实, IL-10 可通过抑制 DC MHC II 类分子、CD80 和 CD86 等辅助刺激分子表达及其他一些促炎细胞因子和趋化因子的产生, 从而抑制 DC 的抗原提呈功能, 间接降低了 T 细胞增殖水平和细胞因子的产生^[8-9]。有研究报道, IL-24 和 IL-10 的免疫学功能可能存在着一定的拮抗性^[10]。因此, IL-24 对 DC 功能活性的研究不仅有助于发现 IL-24 新的免疫学功能, 而且对于进一步阐明 IL-24 抗肿瘤作用机制具有重要意义。

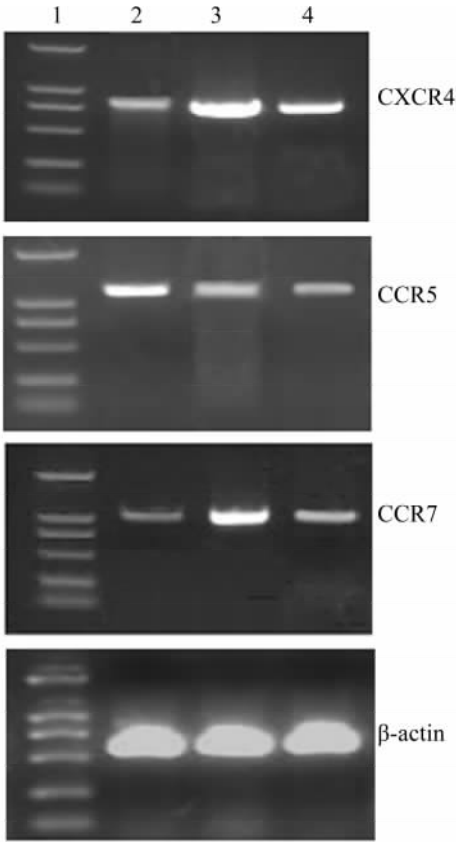


图 6 DC 表达趋化因子受体
Fig. 6 Expression of chemokine receptors on DCs
1: Marker; 2: Medium; 3: LPS; 4: IL-24

研究者目前已成功克隆了 IL-24 受体, 该受体与 IL-10 家族细胞因子的受体一样, 属于 II 型细胞因子的受体家族, 该受体在多种肿瘤细胞及正常组织细胞中广泛表达。Wang 等^[10] 研究表明, IL-24 是通过 IL-22R1/IL-20R2 和 IL-20R1/IL-20R2 等异二聚体受体发挥功效的, 后者也是 IL-20 的受体。但目前有关 DC 表达 IL-24 受体及调控的研究尚未见报道。因此, 本研究采用 RT-PCR 法初步观察了 DC 表面 IL-24 受体单体的表达情况。结果表明, DC 表面不表达 IL-20R1/IL-20R2, IL-24 在 DC 上是通过唯一的受体二聚体 IL-22R1/IL-20R2 发挥作用的。这一结果为 IL-24 直接调控 DC、影响 DC 的成熟、趋化及抗原提呈功能提供了最直接的证据, 而非仅仅通过作用于其它免疫相关因子, 促进 DC 分泌二级细胞因子来间接调控 DC 的功能。同时, 这一发现为进一步研究 IL-24 与 DC 作用的信号转导机制提供了线索。

在此基础上, 本研究进一步观察了 IL-24 在体外培养实验中对 DC 分化成熟、及抗原提呈功能的影响。在体外培养 5 d 的未成熟 DC 培养物中, 加入 1 ng/ml

至 $1\ \mu\text{g/ml}$ 重组人 IL-24, 可明显上调 DC 表面协调刺激分子 CD80、CD86 及主要组织相容性抗原受体 (HLA-DR) 的表达。重组 IL-24 还能诱导 DC 分泌 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 和 IL-12 等促炎细胞因子, 增强了 DC 刺激同种异型 T 细胞增殖的能力, 表明 IL-24 对于 DC 的成熟及抗原提呈具有显著的促进效应。

本研究结果表明, 在体外培养体系中 IL-24 可显著刺激 DC 的分化成熟, 其机制一方面可能与 IL-24 直接作用于 DC 本身的特异性受体, 诱导 DC 表达 CD80、CD86、HLA-DR 等免疫活性分子有关; 另一方面, 也可能由于 IL-24 诱导 DC 产生了 IL- 1β 、IL-6 和 TNF- α 等炎性细胞因子而发挥对 DC 的活化和成熟的协同促进作用。此外, IL-24 还可诱导 DC 产生趋化因子 IP-10 和 MIP- 1α , 并促进 DC 表达趋化因子受体 CCR7 和 CXCR4。IP-10 能够趋化 T 细胞, 并具有促进 Th1 型淋巴细胞在相应引流淋巴结的 T 细胞区聚集驻留的功能^[11-12]; 而 MIP- 1α 主要趋化单核细胞、T 细胞及 DC^[13], 因此能吸引更多的抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 及免疫效应细胞进入炎症区域, 从而扩大和增强了免疫反应。CCR7 和 CXCR4 在 DC 上的高表达将促进成熟 DC 和初始型 T 细胞在相应次级淋巴器官 T 区的共定位, 从而有利于 DC 活化初始型 T 细胞产生 Th1 型免疫应答。由此可见, IL-24 对 DC 的作用具有多重性。

IL-24 作为一种新型多功能细胞因子, 在高浓度时可发挥直接的抑制肿瘤生长、诱导肿瘤细胞分化效应, 而在低浓度时则主要作为免疫调节因子作用于多种免疫活性细胞, 增强机体的抗肿瘤免疫应答。本实验结果证实, IL-24 可显著促进 DC 的成熟、分化, 及增强其抗原提呈功能, 促进 Th1 型免疫应答反应, 但有关其作用机制及信号传导途径等尚待进一步的深入探讨。

【参考文献】

- [1] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, *et al.* Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression [J]. *Oncogene*, 1995, 11(12): 2477-2486.
- [2] Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, *et al.* The protein product

of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [J]. *J Immunol*, 2002, 168 (12): 6041-6046.

- [3] Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, *et al.* Dendritic cells as vectors for therapy [J]. *Cell*, 2001, 106(3): 271-274.
- [4] Ellerhorst JA, Prieto VG, Ekmekcioglu S, *et al.* Loss of MDA-7 expression with progression of melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(4): 1069-1074.
- [5] Cao X, Zhang W, Wan T, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel CXC chemokine macrophage inflammatory protein-2 γ chemoattractant for neutrophils and dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2588-2595.
- [6] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval AI, *et al.* LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response [J]. *J Immunol*, 2000, 164(8): 4105-4110.
- [7] Wolk K, Kunz S, Asadullah K, *et al.* Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members [J]? *J Immunol*, 2002, 168(11): 5397-5402.
- [8] Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, *et al.* Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1997, 159(10): 4772-4780.
- [9] Corinti S, Albanesi C, la Sala A, *et al.* Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions [J]. *J Immunol*, 2001, 166(7): 4312-4318.
- [10] Wang M, Tan Z, Zhang R, *et al.* Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 7341-7347.
- [11] Anthony LS, Wu H, Sweet H, *et al.* Priming of CD8⁺ CTL effector cells in mice by immunization with a stress protein-influenza virus nucleoprotein fusion molecule [J]. *Vaccine*, 1999, 17(4): 373-383.
- [12] Srivastava PK, Menoret A, Basu S, *et al.* Heat shock proteins come of age: Primitive functions acquire new roles in an adaptive world [J]. *Immunity*, 1998, 8(6): 657-665.
- [13] Muller G, Lipp M. Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(2): 217-224.

【收稿日期】 2006-03-10

【修回日期】 2006-05-10

【本文编辑】 王莹

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》