

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.04

· 基础研究 ·

肿瘤细胞对不同分化阶段树突状细胞脂含量和蛋白质二级结构的影响

曾柱¹, 龙金华²(1. 贵阳医学院 生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省肿瘤医院 胸部肿瘤科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 利用傅里叶变换红外光谱(Fourier transformed infrared spectrum, FT-IR)技术探讨肿瘤细胞共培养对不同分化阶段树突状细胞(dendritic cells, DCs)的脂含量和蛋白质二级结构的影响, 为深入理解肿瘤的免疫逃逸机制寻找线索。方法: 免疫磁珠法分离人 CD14⁺ 单核细胞, 以经典方法将其诱导为未成熟 DCs(imDCs)和成熟 DCs(mDCs), 分别将 imDCs 和 mDCs 与肝癌细胞株 BEL7402、红白血病细胞株 K562 以及人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)共培养 48 h, 正常培养的 DCs 作为对照。采用 FT-IR 技术研究不同肿瘤细胞对不同分化阶段 DCs 的脂含量和蛋白质二级结构的影响。结果: 与正常培养的 DCs 相比, 与肿瘤细胞 BEL7402 和 K562 共培养后 imDCs 和 mDCs 的膜磷脂成分减少($2.718 \pm 0.296, 3.124 \pm 0.361$ vs $4.855 \pm 0.324, P < 0.05$; $2.964 \pm 0.136, 3.522 \pm 0.173$ vs $4.217 \pm 0.206, P < 0.05$), 而总的脂含量增加($3.768 \pm 0.185, 3.591 \pm 0.197$ vs $2.487 \pm 0.212, P < 0.05$; $4.288 \pm 0.156, 4.155 \pm 0.167$ vs $3.233 \pm 0.206, P < 0.05$); 蛋白质 α -螺旋含量减少($1.863 \pm 0.192, 1.754 \pm 0.169$ vs $2.364 \pm 0.188, P < 0.05$; $1.124 \pm 0.133, 1.016 \pm 0.107$ vs $1.392 \pm 0.113, P < 0.05$), β -折叠($3.397 \pm 0.225, 3.433 \pm 0.236$ vs $2.486 \pm 0.198, P < 0.05$; $2.646 \pm 0.209, 2.591 \pm 0.216$ vs $1.558 \pm 0.159, P < 0.05$)和转角含量($4.366 \pm 0.284, 4.322 \pm 0.266$ vs $3.127 \pm 0.272, P < 0.05$; $2.675 \pm 0.221, 2.627 \pm 0.235$ vs $1.773 \pm 0.181, P < 0.05$)增加; 并且 mDCs 比 imDCs 更容易受到肿瘤来源因素的影响。结论: 与肿瘤细胞共培养能够导致 mDCs 和 imDCs 的脂含量和蛋白质二级结构发生改变, 可能是肿瘤导致 DCs 功能损伤的结构基础。

[关键词] 树突状细胞; 肝癌细胞; 红白血病细胞; 傅里叶变换红外光谱; 脂含量; 蛋白质二级结构

[中图分类号] R735.7; R733.73; R392.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0258-06

Effects of tumor cells on lipid contents and protein secondary structures of dendritic cells at different differentiation stages

ZENG Zhu¹, LONG Jin-hua²(1. Department of Biotechnology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Thoracic Oncology, Tumor Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of tumor cells on lipid contents and protein secondary structures in dendritic cells (DCs) of different differentiation stages by Fourier transformed infrared spectrum (FT-IR), and to provide a clue for understanding the mechanism of tumor immune escape. **Methods:** CD14⁺ monocytes were isolated by immunomagnetic beads, and the immature DCs (imDCs) and mature DCs (mDCs) were induced by classic method. The imDCs and mDCs were co-cultured with human hepatoma BEL7402 cells, erythroleukemia K562 cells or human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) for 48 h, untreated DCs served as control. The effects of tumor cells on lipid contents and protein secondary structures of DCs at different differentiation stages were investigated by FT-IR. **Results:** Compared with untreated DCs, the concentration of membrane phospholipid in DCs co-cultured with BEL7402 and K562 tumor cells was significantly decreased ($2.718 \pm 0.296, 3.124 \pm 0.361$ vs $4.855 \pm 0.324, P < 0.05$; $2.964 \pm 0.136, 3.522 \pm 0.173$ vs $4.217 \pm 0.206, P < 0.05$), the total lipid was increased ($3.768 \pm 0.185, 3.591 \pm 0.197$ vs $2.487 \pm 0.212, P < 0.05$; $4.288 \pm 0.156, 4.155 \pm 0.167$ vs $3.233 \pm 0.206, P < 0.05$); protein α -helix content decreased ($1.863 \pm 0.192, 1.754 \pm 0.169$ vs $2.364 \pm 0.188, P < 0.05$; $1.124 \pm 0.133, 1.016 \pm 0.107$ vs $1.392 \pm 0.113, P < 0.05$), β -sheet ($3.397 \pm 0.225, 3.433 \pm 0.236$ vs $2.486 \pm 0.198, P < 0.05$; $2.646 \pm 0.209, 2.591 \pm 0.216$ vs $1.558 \pm 0.159, P < 0.05$) and turn content ($4.366 \pm 0.284, 4.322 \pm 0.266$ vs $3.127 \pm 0.272, P < 0.05$; $2.675 \pm 0.221, 2.627 \pm 0.235$ vs $1.773 \pm 0.181, P < 0.05$) increased; and mDCs were more easily affected by tumor source factors.

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目(No. 210196); 贵州省省长基金(No. 2009-79); 贵州省自然科学基金(No. 2008-2274); 贵州省贵阳市科学技术项目(No. 2010-1-12)。Project supported by the Key Program of Science and Technology from Chinese Ministry of Education (No. 210196), the Governor Foundation of Guizhou Province (No. 2009-79), the Natural Science Foundation of Guizhou Province (No. J-2008-2274), and the Science and Technology Program of Guiyang Guizhou Province (No. 2010-1-12)

[作者简介] 曾柱(1969-), 男, 贵州省三都水族自治县人, 博士, 副教授, 主要从事树突状细胞生物学的研究。E-mail: zengzhu100@sina.com

[通信作者] 曾柱(ZENG Zhu, corresponding author), E-mail: zengzhu100@sina.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.006.html>

3.233 ± 0.206, $P < 0.05$), the protein α -helix was decreased (1.863 ± 0.192, 1.754 ± 0.169 vs 2.364 ± 0.188, $P < 0.05$; 1.124 ± 0.133, 1.016 ± 0.107 vs 1.392 ± 0.113, $P < 0.05$), and the protein-sheet and β -turn were increased (3.397 ± 0.225, 3.433 ± 0.236 vs 2.486 ± 0.198, $P < 0.05$; 2.646 ± 0.209, 2.591 ± 0.216 vs 1.558 ± 0.159, $P < 0.05$). Moreover, compared with imDCs, mDCs were more susceptible to tumor-derived factors (4.366 ± 0.284, 4.322 ± 0.266 vs 3.127 ± 0.272, $P < 0.05$; 2.675 ± 0.221, 2.627 ± 0.235 vs 1.773 ± 0.181, $P < 0.05$). **Conclusion:** Tumor cells can elicit the changes of lipid contents and protein secondary structures of imDCs and mDCs, which might be the structure basis for functional impairment caused by tumors.

[**Key words**] dendritic cell; hepatoma cell; erythroleukemia cell; Fourier transformed infrared spectrum; lipid content; protein secondary structure

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 258-263]

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是一种特化的抗原提呈细胞,具有强大的抗原摄取和处理能力,诱导对肿瘤细胞特异性的免疫应答^[1-2]。DCs与T细胞间的相互作用信息为临床治疗提供了依据^[3-5]。将DCs负载肿瘤抗原(肿瘤疫苗)并通过继回输荷瘤宿主的体内,能够诱导对肿瘤特异性的免疫应答^[1]。但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],需要进一步研究肿瘤来源因素对DCs功能的影响。有研究^[8]发现,肿瘤浸润部位有DCs存在,且DCs的数量与肿瘤浸润程度密切相关。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,且不同的肿瘤对DCs功能的影响机制还不尽相同^[9, 11-13]。本课题组前期研究^[14-18]发现,肿瘤来源因素可以通过损伤DCs的生物物理特性来影响其免疫学功能。细胞的结构和功能之间存在相互依赖的关系,细胞的生物学功能改变往往伴随着生物大分子二级结构和含量的变化。本研究利用傅里叶变换红外光谱(Fourier-transformed infrared spectrum, FT-IR)技术研究了肝癌细胞和红白血病细胞对不同分化阶段DCs的蛋白质二级结构和脂含量的影响,为进一步深入理解肿瘤的免疫逃逸机制寻找新的线索。

1 材料与方法

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(rhIL-4)和重组人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)购自R&D公司。淋巴细胞分离液ficoll(1.077g/ml)购自上海试剂二厂。RPMI 1640购自美国Gibco公司,胎牛血清(FCS)购自美国HyClone公司,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。傅立叶变换红外光谱仪(NEXUS-470FTIR)购自德国Nicolet公司。

1.2 肿瘤细胞株的培养

人肝癌细胞株BEL7402和红白血病细胞株K562分别由北京大学基础医学院细胞生物学系张页教授和中国医学科学院章静波教授提供。肿瘤细胞(2×10^6 /ml)在含10%胎牛血清的RPMI 1640中培养,培养条件是37℃、5%CO₂和95%湿度。细胞每隔3d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 人脐静脉内皮细胞的分离、鉴定和培养

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由新生儿脐带分离而得,并培养于含20%胎牛血清的M199培养基中。通过观察细胞的八角形和检测胞质中Ⅷ因子相关抗原进行鉴定。具体步骤简述如下:细胞换液后直接在倒置显微镜下观察细胞的形态及生长特征,并作相差摄影,同时进行常规H-E染色观察并摄片。鉴定采用DAB免疫组织化学法,在6孔培养板中放置载玻片,玻片上植入2ml含有 1×10^6 细胞的悬液,待细胞贴壁后,取出载玻片,放入-20℃的冷丙酮中固定30min,用PBS冲洗3次,每次2min;滴加3% H₂O₂室温孵育10min, PBS冲洗3次,每次2min,以消除内源性过氧化物酶的活性。滴加兔抗人Ⅷ因子相关抗原多抗工作液,放入湿盒内4℃过夜,同时另一盖玻片不加一抗作阴性对照。次日,用PBS冲洗3次,每次2min,滴加辣根酶标记的羊抗兔IgG,37℃孵育30min, PBS冲洗3次,每次2min;用DAB底物混合工作液显色;显微镜下观察,待出现特异性染色后,终止显色。进行复染、脱水、透明、封片,相差显微镜下观察摄影。

1.4 DCs与肿瘤细胞和HUVECs的共培养

DCs前体细胞的分离以及DCs的培养诱导和鉴

定参照本课题组以前的方法^[14-18]。免疫磁珠法分离人 CD14⁺ 单核细胞, 加入 GM-CSF、IL-4 诱导分化为未成熟 DCs(immature DCs, imDCs), 利用 TNF- α 将 imDCs 诱导为成熟 DCs(mature DCs, mDCs)。2 \times 10⁷ 个 imDCs 或 mDCs 分别与 2 \times 10⁶ 个 BEL7402、K562 以及 HUVECs 在 Transwell(0.6 μ m 孔径, Corning 公司)中培养 48 h。DCs(包括 imDCs 和 mDCs)置于 Transwell 的上室, BEL7402、K562 以及 HUVECs 分别置于下室。细胞分组为: DCs + BEL7402(包括 imDCs + BEL7402 和 mDCs + BEL7402)、DCs + K562(包括 imDCs + K562 和 mDCs + K562)和 DCs + HUVECs(imDCs + HUVECs 和 mDCs + HUVEC)。培养于含 RPMI 1640 + 10% FBS、rhGM-CSF(50 ng/ml)和 rhIL-4(100 ng/ml)的完全培养基中的 DCs 作为对照, 分组为 DCs(包括 imDCs 和 mDCs)。细胞存活率用锥虫蓝染色检测。

1.5 FT-IR 检测细胞中脂含量和蛋白质二级结构

分别收集 2 \times 10⁶ 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 CaF₂ 窗片的中间, 每次 5 μ l, 37 $^{\circ}$ C 静置至大部分水分蒸发, 加盖另一 CaF₂ 窗片, 上机检测。以重水为空白对照谱, 扫描范围为 900 ~ 4 000 cm⁻¹, 分辨率为 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里叶变换自去卷积。带宽为 51.4, 灵敏度增强因子为 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。

红外光谱显示细胞中特定成分(如蛋白质、脂类和核酸等)的红外吸收信号, 如图 1 所示。各波数范围内对应的物质如表 1 所示, 如 916 ~ 1 300 cm⁻¹ 的吸收度来自 DNA 和 RNA 中不同结构基团的振动信号; 1 452 cm⁻¹ 和 1 467 cm⁻¹ 带的吸收度来自脂类酰基链中的甲基和亚甲基的振动信号; 1 540 ~ 1 650 cm⁻¹ 范围的两条主带来自蛋白质中的肽基团酰胺 I 带和酰胺 II 带, 它们分别对应于 C = O 基团的伸展振动和 N-H 基团的弯曲振动信号; 2 800 ~

3 000 cm⁻¹ 的条带来自膜脂分子中的 C-H 基团伸展振动。

表 1 细胞红外光谱中的波数及其代表的含义

Tab.1 Wave numbers in infrared spectrum of cells and their significance

Wave number (cm ⁻¹)	Significance
Amide acid I band	1 690 Turn and bend
	1 676 Antiparallel β -folding
	1 659 α -helix
	1 645 Random coil
	1 634 Parallel β -folding
Amide acid II band	1 545 α -helix
	1 532 Uncertain
	1 452, 1 467 Lipid
	2 800 ~ 2 950 Membrane phospholipid

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据用 SPSS11.5 统计软件作 Anova 方差分析, 组间作 SNK 两两比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同培养条件下 DCs 脂含量的变化

如表 1 所示, 1 647 cm⁻¹ 和 2 924 cm⁻¹ 的吸收度分别对应细胞中脂类酰基链中的甲基和亚甲基以及膜脂分子中的 C-H 基团伸展振动信号。所有的光谱都经过傅里叶自去卷积, 光谱中没有波数漂移。如图 2 所示, 与 HUVECs 共培养后的 imDCs 和 mDCs, 在 1 647 cm⁻¹ 和 2 924 cm⁻¹ 的吸收度与正常对照相比不具统计意义的差异($P > 0.05$); 而与肿瘤细胞共培养后, imDCs 和 mDCs 在 1 647 cm⁻¹ 的吸收度显著增加($P < 0.05$), 在 2 924 cm⁻¹ 的吸收度显著下降($P < 0.05$)。说明, 肿瘤细胞共培养导致了 imDCs 和 mDCs 总脂含量的增加(3.768 \pm 0.185, 3.591 \pm 0.197 vs 2.487 \pm 0.212, $P < 0.05$; 4.288 \pm 0.156, 4.155 \pm 0.167 vs 3.233 \pm 0.206, $P < 0.05$)和膜磷脂含量的下降(2.718 \pm 0.296, 3.124 \pm 0.361 vs 4.855 \pm 0.324, $P < 0.05$; 2.964 \pm 0.136, 3.522 \pm 0.173 vs 4.217 \pm 0.206, $P < 0.05$), 而且, mDCs 的脂含量比 imDCs 的脂含量更容易受到肿瘤来源因素的影响。

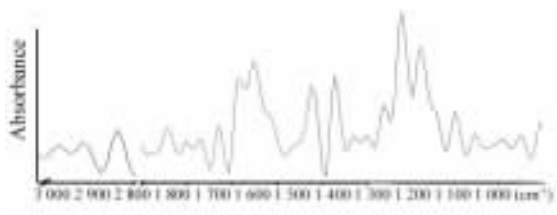


图 1 细胞中脂含量和蛋白质二级结构的红外光谱示意图
Fig.1 Schematic diagram of infrared spectrum of lipid contents and protein secondary structures in cells

2.2 肿瘤细胞共培养条件下 DCs 蛋白质的各种二级结构含量的变化

如图 3 所示,不同细胞共培养条件下,DCs 的 FT-IR 谱分别在 $1\ 659\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 634\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 690\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 645\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收度显示出明显的变化,所有的光谱都经过傅里叶自去卷积,光谱中没有波数漂移。如表 1 所示,这些波数分别对应细胞中蛋白质的 α -螺旋、平行的 β -折叠、转角和无规卷曲。与正常培养的 DCs 相比,DCs + K562 和 DCs + BEL7402 在 $1\ 659\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收度显著下降 ($P < 0.05$),而在 $1\ 634\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 690\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收度显著增加 ($P < 0.05$),DCs 和 DCs + HUVECs 之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。

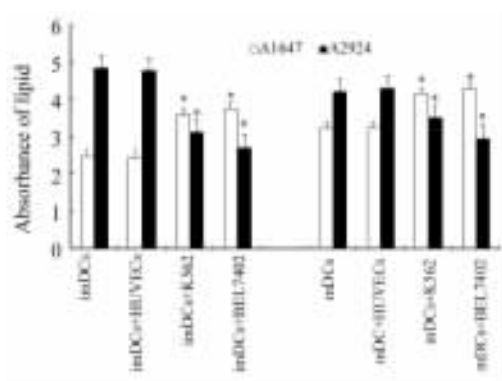


图 2 不同培养条件下的 DCs 在波数 $1\ 467\ \text{cm}^{-1}$ 和 $2\ 924\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收度

Fig. 2 Absorbances of DCs under different culturing conditions at $1\ 467\ \text{cm}^{-1}$ and $2\ 924\ \text{cm}^{-1}$ wave numbers

* $P < 0.05$ vs imDCs or mDCs

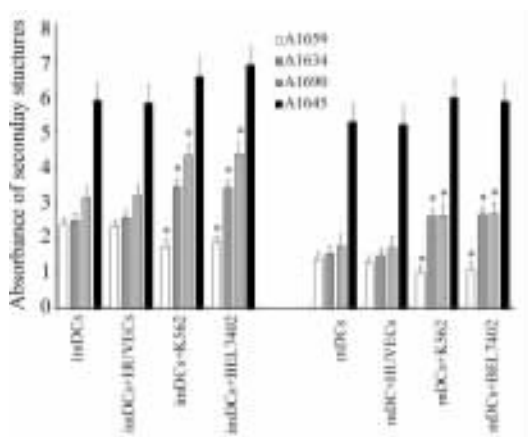


图 3 不同培养条件下 DCs 蛋白质各种二级结构的含量
Fig. 3 Contents of different protein secondary structures of DCs under different culturing conditions

* $P < 0.05$ vs imDCs or mDCs

结果说明,肿瘤细胞共培养导致了 imDCs 和 mDCs 中蛋白质的 α -螺旋含量减少 (1.863 ± 0.192 , 1.754 ± 0.169 vs 2.364 ± 0.188 , $P < 0.05$; 1.124 ± 0.133 , 1.016 ± 0.107 vs 1.392 ± 0.113 , $P < 0.05$),平行的 β -折叠 (3.397 ± 0.225 , 3.433 ± 0.236 vs 2.486 ± 0.198 , $P < 0.05$; 2.646 ± 0.209 , 2.591 ± 0.216 vs 1.558 ± 0.159 , $P < 0.05$) 和转角 (4.366 ± 0.284 , 4.322 ± 0.266 vs 3.127 ± 0.272 , $P < 0.05$; 2.675 ± 0.221 , 2.627 ± 0.235 vs 1.773 ± 0.181 , $P < 0.05$) 含量增加。另外, mDCs 蛋白质二级结构的变化程度大于 imDCs 蛋白质二级结构的变化程度 ($P < 0.05$),说明 mDCs 更容易受到肿瘤来源因素的影响。

3 讨论

基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗能否成功与肿瘤的免疫逃逸密切相关^[1]。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 的抗原提呈功能,使机体无法诱导抗肿瘤免疫应答,导致肿瘤逃脱机体的免疫监视^[9,11-13],其潜在机制还需进一步深入研究^[1,3,6-7]。

本课题组以前工作^[16-18]已经证实,肿瘤来源因素可以通过损伤 DCs 的生物物理特性抑制其免疫学功能,说明 DCs 的结构和功能密切相关。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学事件的有力武器。本研究利用 FT-IR 技术检测肿瘤细胞和非肿瘤细胞对 DCs 结构成分的影响,以进一步从结构生物学的角度来寻找肿瘤免疫逃逸机制的新线索。

脂质既是细胞重要的结构成分也是重要的能量来源,在细胞功能的发挥过程中具有重要的作用。本研究的结果表明,K562 和 BEL7402 肿瘤细胞共培养可诱导 DCs 的总脂含量增加 ($P < 0.05$),而使膜磷脂含量下降 ($P < 0.05$),这可能是肿瘤细胞损伤 DCs 功能的结构基础。过量食源性脂质对 DCs 功能具有负面影响,它可损伤 DCs 的抗原提呈功能,并下调其黏附分子的表达^[19]、皮肤中 DCs 数量的减少^[20]、抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 DCs 成熟,并导致其刺激 T 细胞的能力受到损伤^[21]、下调 IL-12 的表达^[22]等。Herber 等^[23]最近的研究结果证明,肿瘤来源因素可通过上调 DCs 的清道夫受体 A (scavenger receptor A) 的表达来增加脂的摄取,导致三酰甘油在 DCs 胞质内的沉积,进

而损伤其抗原提呈功能。本研究也证实,在肿瘤细胞共培养的条件下 DCs 的总脂含量增加。令人感兴趣的是,本研究结果还发现,肿瘤来源因素可导致 DCs 膜磷脂含量减少,这可能是 DCs 质膜流动下降^[16-18]的直接原因。根据这些研究结果可以推测,肿瘤来源因素可能通过影响脂的摄取和代谢,损伤 DCs 的免疫学功能。

蛋白质的二级结构是指蛋白质多肽链本身的折叠和盘绕的方式,主要有 α -螺旋、 β -折叠和转角等,它们通过骨架上的羰基和酰胺基团之间形成的氢键维持,氢键是稳定二级结构的主要作用力。本研究发现,在与 K562 和 BEL7402 肿瘤细胞共培养的条件下,DCs 中蛋白质的 α -螺旋含量减少($P < 0.05$),而平行的 β -折片和转角含量增加($P < 0.05$),说明细胞中的蛋白质构象发生了变化。 α -螺旋是蛋白质二级结构中最有序、最稳定的构象,其含量减少意味着 DCs 中的蛋白质出现从有序化向无序化变化的趋势。本课题组以前的研究^[16-18]发现,肿瘤可以通过损伤 DCs 的膜生物物理特性来影响其免疫学功能。膜蛋白的二级结构中的 α -螺旋伸入到膜脂双层中,膜的稳定性在很大程度上依赖于 α -螺旋结构的稳定。由此可以推测,DCs 中蛋白质 α -螺旋的含量减少,导致其膜的稳定性下降,进而影响其免疫学功能,具体的机制还需要进一步深入研究。Chan 等^[24]认为,巨噬细胞和 DCs 的功能受到血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β , TGF- β 1)和白介素 10(interleukin-10, IL-10)等肿瘤来源的因素的调控,而且,这些细胞因子表达量的微小波动均会导致 DCs 的功能发生改变。本研究发现,mDCs 的脂含量和蛋白质二级结构比 imDCs 的脂含量和蛋白质二级结构更容易受到肿瘤来源因素的影响($P < 0.05$),说明 mDCs 比 imDCs 对微环境的改变更为敏感,这可能与 DCs 分化过程中结构和功能的重塑有关。以上结果提示,在基于 DCs 的抗肿瘤免疫治疗中应该先对患者机体内的细胞因子环境进行改造,才能提高该疗法的临床治疗效果,但是具体的机制还需更进一步深入研究。

总之,本研究发现 K562 和 BEL7402 肿瘤细胞可诱导 DCs 的蛋白质 α 螺旋结构和膜磷脂成分减少,而脂含量增加,说明肿瘤来源因素能够导致 DCs 的蛋白质结构和脂含量发生改变,可能是肿瘤导致 DCs 功能损伤的结构基础。研究结果对进一步从结构生物学的角度来理解肿瘤的免疫逃逸机制具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Steinman RM, Jacques B. Taking dendritic cells into medicine [J]. *Nature*, 2007, 449(9): 419-426.
- [2] Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: Balancing immunity and tolerance [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(1): 39-50.
- [3] Steinman RM. Dendritic cells *in vivo*: A key target for a new vaccine science [J]. *Immunity*, 2008, 29(3): 319-324.
- [4] Jacques B, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [J]. *Nature*, 1998, 392(2): 245-252.
- [5] Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(2): 296-306.
- [6] Palucka K, Ueno H, Fay J, et al. Dendritic cells and immunity against cancer [J]. *J Intern Med*, 2011, 269(1): 64-73.
- [7] Janikashvili N, Larmonier N, Katsanis E et al. Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2010, 2(1): 57-68.
- [8] Tsujitani S, Kakeji Y, Watanabe A, et al. 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]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(10): 715-727.
- [10] Gavin PD, Catherine MK, Robert DS. Interferons, immunity and cancer immunoediting [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(11): 836-848.
- [11] Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 941-951.
- [12] Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25(3): 267-296.
- [13] Zou W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 263-274.
- [14] Zeng Z, Liu X, Jiang Y, et al. Biophysical studies on the differentiation of human CD14⁺ monocytes into dendritic cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2006, 45(1): 19-30.
- [15] Jiang Y, Zeng Z, Sun D, et al. Adhesion of monocyte-derived dendritic cells to human umbilical vein endothelial cells in flow field decreases upon maturation [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2005, 32(4): 261-268.
- [16] 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 Motil Cytoskeleton*, 2007, 64(3): 186-198.
- [17] Zeng Z, Yao W, Xu X, et al. Hepatocellular carcinoma cells deteriorate the biophysical properties of dendritic cells [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2009, 55(1): 33-43.
- [18] Xu X, Zeng Z, Yao W, et al. Biomechanical alterations of dendritic cells by co-culturing with K562 CML cells and their potential role in immune escape [J]. *J Biomech*, 2010, 43(12): 2339-

- 2347.
- [19] Sanderson P, Macpherson GG, Jenkins CH, et al. Dietary fish oil diminishes the antigen presentation activity of rat dendritic cells [J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 62(6): 771-777.
- [20] Mélot M, Pudney PD, Williamson AM, et al. Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum corneum by *in vivo* confocal Raman spectroscopy [J]. *J Control Release*, 2009, 138(1): 32-39.
- [21] Zeyda M, Saemann MD, Stuhlmeier KM, et al. Polyunsaturated fatty acids block dendritic cell activation and function independent of NF- κ B activation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 14293-14301.
- [22] Aliberti J, Hieny S, Reis ESC, et al. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: A mechanism for regulation of microbial immunity [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(1): 76-82.
- [23] Herber DL, Cao W, Nefedova Y, et al. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer [J]. *Nat Med*, 2010, 16(8): 880-886.
- [24] Chan T, Wiltout RH, Weiss JM. Immunotherapeutic modulation of the suppressive liver and tumor microenvironments [J]. *Int Immunopharmacol*, (2011 - 01 - 15) [Epub ahead of print].
- [收稿日期] 2011 - 03 - 10 [修回日期] 2011 - 04 - 25
[本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

Pias1 对 Foxp3 的表观遗传学调控

鉴于 Treg 细胞在免疫负向调控方面的重要作用, Treg 细胞的特征标志分子——Foxp3 的转录调控一直受到广泛的关注。目前对诱导 Foxp3 的转录信号研究比较透彻, 例如 CD3、CD28 介导的信号可以激活 AP-1 和 NFAT, 结合于 Foxp3 的启动子序列激活转录; 而 IL-2R 介导的信号可以激活 STAT5 并结合于 Foxp3 的 CNS2 序列, 稳定 Foxp3 表达; TGF- β R 介导的信号可以激活 SMAD2 和 SMAD3 结合于 Foxp3 的 CNS1 序列, 在 iTreg 的分化中起着重要的作用。但对抑制 Foxp3 转录信号几乎没有研究涉及。

UCLA 的帅克实验室(Shuai Ke)从鉴定 Pias1 敲除鼠入手, 发现 Pias1 敲除鼠 nTreg 在外周淋巴器官的比例和绝对数目与相应野生型鼠相比, 都有很大提高, 并且按常规方法在 Pias1 敲除鼠无法成功诱导 EAE; 进一步发现 Pias1 敲除鼠相比野生型鼠高分泌 TGF- β 、低分泌 IL-17 和 IFN- γ 。通过 CHIP 检测发现, Pias1 结合在 Foxp3 的启动子序列上, 而不结合于 Foxp3 的 CNS1 和 CNS2 序列; 同时对 Foxp3 的启动子序列甲基化分析显示, 在胸腺发育中, 从 CD4⁺ CD8⁺ 到 CD4⁺ CD25⁻ 再到 CD4⁺ CD25⁺, Foxp3 启动子序列的甲基化程度逐步降低, 而 Pias1 敲除鼠在上述 3 个阶段 Foxp3 启动子序列的甲基化程度比野生型鼠明显降低, 同时通过 REA 检测也证实在 Pias1 敲除鼠中, Foxp3 启动子序列开放性得到提高。进一步地免疫共沉淀实验证明, Pias1 和 DNMT3A 和 DNMT3B 形成复合物, 结合在 Foxp3 的启动子序列上, 由于 Pias1 的缺失, DNMT3A 和 DNMT3B 对 Foxp3 启动子结合下降, 从而 Foxp3 启动子甲基化降低, 启动子序列的开放性提高, 造成在 Pias1 敲除鼠中 nTreg 的增加。

上述研究结果表明, 在胸腺发育中, Pias1 通过结合于 Foxp3 启动子序列并招募染色质修饰酶, 如 DNMT3A、DNMT3B 以及 HP1 等, 从而造成 Foxp3 启动子序列高度甲基化, 使 Foxp3 启动子处于封闭和静息状态。nTreg 在胸腺中的分化发育是一个多步骤的过程, 在 CD4 单阳性阶段, TCR 信号可以上调 CD25, 从而在此后可以对 IL-2 信号作出反应。Pias1 从启动子序列的解离可以进一步促进 Foxp3 的转录, 但具体是什么信号造成 Pias1 从 Foxp3 启动子序列解离至今仍然是一个谜。

帅克教授的研究表明, Pias1 通过对 Foxp3 启动子表观遗传学的修饰, 负向调控 Foxp3 转录活性, 这是目前为止发现的唯一一个负向调控 Foxp3 转录活性的机制, 而且是通过表观遗传学的修饰达到调控转录的目的。

[田军 摘译, 许雄飞 审阅. Liu B, Tahk S, Ke S, et al. *Sciences*, 2010, 330(6003): 521-525]