

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.017

VEGF-C/VEGFR3 通路对肿瘤患者外周血来源 DC 的影响

李玉灵,赵华,魏枫,杨莉莉,任秀宝(天津医科大学肿瘤医院 免疫室,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室,天津 300060)

[摘要] **目的:**通过体外培养肿瘤患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)来源的 DC,探讨 VEGF-C/VEGFR3 信号通路对 DC 功能的影响。**方法:**采用 GM-CSF 和 IL-4 共同诱导的方法培养 DC,分别采用 VEGF-C (VEGF-C-DC),LPS(LPS-DC)或 LPS + VEGF-C(LPS + VEGF-C-DC)诱导,同时设未处理组即未成熟 DC 细胞(imDC);流式细胞术检测 DC 表面 CD80、CD83、VEGFR3 和 TLR4 的表达情况,同时采用免疫荧光法检测 VEGFR3 在 DC 的表达;ELISA 方法检测不同处理组的 DC 上清中 IL-6、TNF- α 、IL-12 的分泌情况。**结果:**LPS-DC 高表达 VEGFR3;LPS-DC 和 LPS + VEGF-C-DC 高表达 CD80 和 CD83,明显高于 imDC(18.56% vs 8.52%, $P < 0.05$),显示出成熟 DC 的表型特征;与 LPS-DC 相比,LPS + VEGF-C-DC 表面 TLR4 的表达下调,LPS + VEGF-C-DC 上清液中细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-12 的分泌减少。**结论:**VEGF-C/VEGFR3 通路通过降低 DC 表面 TLR4 的表达减少其细胞因子的分泌,对 DC 起负向免疫调控作用。

[关键词] 肿瘤;血管内皮生长因子受体 3;血管内皮生长因子 C;Toll 样受体 4;树突状细胞

[中图分类号] R730.21

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)03-0392-05

Influence of VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway on dendritic cells derived from peripheral blood of tumor patients

LI Yuling, ZHAO Hua, WEI Feng, YANG Lili, REN Xiubao (Department of Immunotherapy, Cancer Institute and Hospital Affiliated to Tianjin Medical University; National Clinical Research Center of Cancer; Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:**To culture peripheral blood mononuclear cell (PBMC) derived DCs of cancer patients *in vitro* and investigate the effect of VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway on the functions of DCs. **Methods:** DCs were cultured using GM-CSF and IL-4 co-stimulating method, and then induced by VEGF-C (VEGF-C-DC), LPS (LPS-DC) or LPS + VEGF-C (LPS + VEGF-C-DC), respectively; and immature DCs (imDCs) was used as control group. The expressions of CD80, CD83, VEGFR3 and TLR4 on DCs surface were evaluated by flow cytometry. The expression of VEGFR3 was detected by immunofluorescence method. The secretions of IL-6, TNF- α and IL-12 in different treatment groups were detected by ELISA method. **Results:** VEGFR3 was highly expressed in LPS-DC. The expressions of CD80 and CD83 on LPS-DC and LPS + VEGF-C-DC were much higher than that on imDC and VEGF-C-DC (18.56% vs 8.52%, $P < 0.05$), and showed phenotypic characteristics of mature DCs. Moreover, compared with LPS-DC, the expression of TLR4 on LPS + VEGF-C-DC was down-regulated, and the secretion of IL-6, TNF- α and IL-12 in LPS + VEGF-C-DC supernatant were also decreased. **Conclusion:** The VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway can decrease DCs cytokine secretion through down-regulating TLR4 expression and act as a negative regulator of DCs immune response.

[Key words] tumor vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3); vascular endothelial growth factor C (VEGF-C); Toll-like receptor 4 (TLR4); dendritic cell (DC)

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 392-396. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.017]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81401888);天津市科委应用基础基金资助项目(No. 13JCYBJC41400, No. 14JCTPJC00476)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81401888) and the Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Tianjin City (No. 13JCYBJC41400, No. 14JCTPJC00476)

[作者简介] 李玉灵(1989-),女,山东省德州市人,硕士生,主要从事肿瘤的生物治疗相关研究,E-mail:liyuling0220@163.com

[通信作者] 任秀宝(REN Xiubao, corresponding author),E-mail:rwziyi@yahoo.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160428.1652.006.html>

DC 在启动初始 T 细胞反应中发挥重要作用,是连接固有免疫反应和适应性免疫反应的桥梁^[1]。但是,DC 的免疫功能经常存在缺陷。在存在大量免疫活化因子的肿瘤微环境中,何种机制诱导了 DC 功能障碍的发生,至今尚未完全阐明。VEGFR3 是淋巴管内皮细胞标志物,近来研究证实它在肿瘤免疫中发挥重要作用,多种免疫细胞,包括骨髓来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)、Treg 和单核巨噬细胞都被发现有 VEGFR3 的表达,并且参与了肿瘤局部免疫抑制微环境的形成^[2]。VEGF-C 是 VEGF 家族成员,是 VEGFR3 的特异性配体。多种肿瘤组织,例如结肠癌、胃癌和卵巢癌都可以分泌大量 VEGF-C,并和肿瘤预后呈负相关^[3]。有研究^[4]发现,VEGFR3 表达于人角膜组织中的 DC,并推测与 DC 的转运有关。但 VEGFR3 在肿瘤患者 PBMCs 来源的 DC 的表达情况尚未见报道。因此,本研究检测肿瘤患者 PBMC 来源的 DC 表面 CD80、CD83 和 VEGFR3 的表达水平,旨在探讨 VEGF-C/VEGFR3 信号通路对 DC 功能的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集天津市肿瘤医院生物治疗科 2014 年 6 月至 2015 年 6 月期间收治肿瘤患者的外周血 10 例,年龄 40~67 岁,平均年龄 50.7 岁。其中男、女性各 5 例,包括 III~IV 期结直肠癌 4 例,3 例肝、肺或卵巢转移;III~IV 期非小细胞肺癌 6 例(肺腺癌、肺鳞癌各 3 例),脑、股骨或肝转移 3 例。所有患者采血前一个月内未接受过化、放疗。所有标本收集均征得患者或家属同意并签署知情同意书,研究方案经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂

无血清培养基(GT-T551)购自日本 TaKaRa 公司,DC 培养基购自德国 CellGenix 公司。rhIL-4 和 rhGM-CSF 购自美国 Invitrogen 公司,LPS 购自美国 Sigma 公司,VEGF-C 购自美国 Abcam 公司,Ficoll 购自中国医学科学院血液研究所。PE 标记的 CD80、CD83 及其同型对照 IgG2a 抗体,FITC 标记的 CD11c 及同型对照抗体 IgG1,APC 标记的 VEGFR3 和 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体均购自美国 Biolegend 公司。Anti-VEGFR3 一抗购自美国 Millipore 公司,荧光二抗购自北京中杉金桥公司,ELISA 试剂盒购自北京达科为公司。

1.3 肿瘤患者 DC 的诱导培养

取 3~4 ml 患者外周血,Ficoll 密度梯度离心法

分离 PBMC。轻轻吸取白膜层,用 PBS 洗两遍,调整细胞密度为 $(3 \sim 5) \times 10^6$ 个/ml,用 GT-T551 重悬,孵育 2 h 后,去除未贴壁细胞,用 DC 培养基培养,并加入 rhGM-CSF(1 000 U/ml)和 rhIL-4(1 000 U/ml),第 3 天半量换液。培养第 5 天,收集上层悬浮细胞,调整细胞密度为 8×10^5 个/ml 铺入六孔板中,分别采用 VEGF-C(记作 VEGF-C-DC,加入 VEGF-C 50 ng/ml),LPS(记作 LPS-DC,加入 LPS 100 ng/ml)和 LPS + VEGF-C(记作 LPS + VEGF-C-DC,加入 LPS 100 ng/ml,VEGF-C 50 ng/ml)诱导,同时设未处理组即未成熟 DC(imDC),24 h 后收集各组的 DC 上清液于 -80°C 分装保存,备 ELISA 检测。

1.4 流式细胞术检测 DC 表面 CD80、CD83 和 VEGFR3 的表达

分别收集不同处理组 DC 细胞,PBS 洗两遍,调整细胞密度为 5×10^5 个/ml,200 μl /管,以 PE-CD80、PE-CD83、FITC-CD11c、APC-VEGFR3、APC-TLR4 抗体标记 DC,避光孵育 30 min,洗涤后用 4% 多聚甲醛固定,流式细胞术检测,分析不同刺激组 DC 表面 CD11c CD80、CD11c CD83、CD11c VEGFR3 和 CD11c TLR4 的表达情况。

1.5 免疫荧光检测 DC 表面 VEGFR3 的表达

取少量 LPS 刺激后的 DC 进行甩片,4% 多聚甲醛固定后荧光染色,小鼠抗人 VEGFR3 一抗稀释比例 1:100,山羊抗小鼠荧光二抗 1:200,激光共聚焦扫描显微镜观察。

1.6 ELISA 法检测 DC 细胞因子分泌水平

取预留的 DC 上清液,ELISA 检测不同组别 DC 上清中 IL-6、TNF- α 、IL-12 的分泌水平,具体操作步骤参照试剂盒说明书。

1.7 统计学处理

运用 SPSS19.0 进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态性检验和方差齐性检验后,组间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS-DC 表面 VEGFR3 高表达

流式细胞术检测结果(图 1)表明,LPS-DCs 表面 CD80 和 CD83 的表达率明显高于 imDC 组($P < 0.05$),提示经 LPS 刺激后,DC 表现出成熟 DC 表型。同时,LPS-DC 表面 VEGFR3 表达率明显高于 imDC [$(18.56 \pm 5.25)\%$ vs $(8.52 \pm 4.04)\%$, $P < 0.05$]。同时免疫荧光法也验证了 VEGFR3 在 LPS-DC 表面的表达(图 2)。

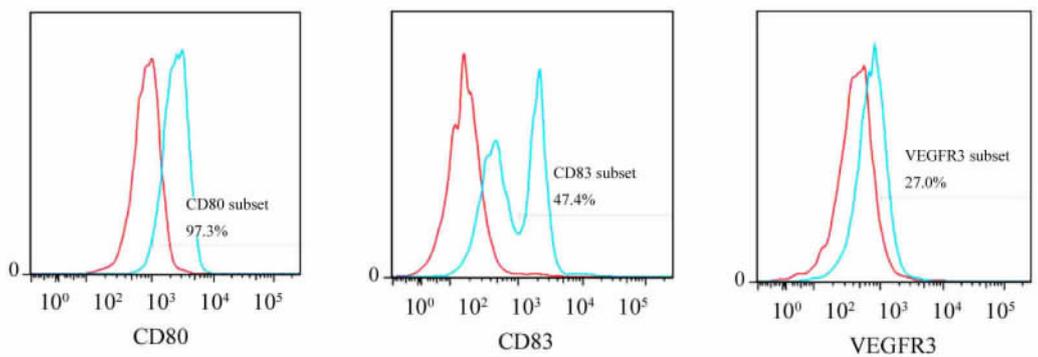


图1 LPS 刺激后 DC 表面 CD80、CD83 和 VEGFR3 高表达
 Fig. 1 Upregulation of CD80、CD83 and VEGFR3 on DC after LPS stimulation
 Red line: imDC; Blue line:LPS-DC

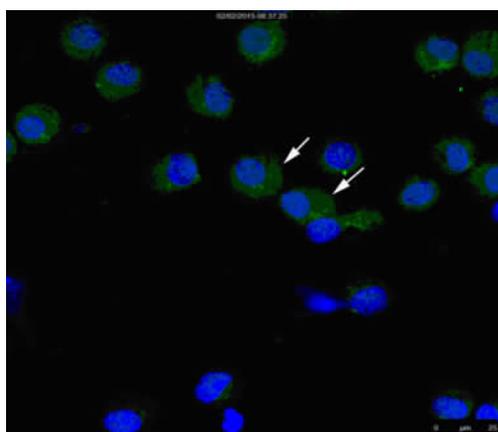


图2 免疫荧光显示 VEGFR3 在 DC 表面的表达(×200)
 Fig. 2 Expression of VEGFR3 on DC by immunofluorescence(×200)
 Arrows: VEGFR3 (green)

2.2 VEGF-C 对 DC 表型的影响

流式细胞术检测结果(图3)显示, VEGF-C-DC 的表面低表达 CD80 和 CD83, 高表达 CD11c 和 HLA-DR, 显示出未成熟 DC 的表型特征; 而 LPS-DCs 和 LPS + VEGF-C-DCs 高表达 CD80 和 CD83, 明显高于 imDC 和 VEGF-C-DC, 显示出成熟 DC 细胞的表型特征。

2.3 VEGF-C 下调 DC 表面 TLR4 表达

流式细胞术检测结果(图4)发现, LPS + VEGF-C-DC 表面的 TLR4 表达显著低于 LPS-DC 组 ($P < 0.05$), 提示 VEGF-C 下调成熟 DC 表面 TLR4 表达。

2.4 VEGF-C 对 DC 细胞因子分泌的影响

ELISA 检测结果(图5)表明, VEGF-C-DC 上清中 IL-6、IL-12p70、TNF- α 的分泌量明显低于 LPS-

DC; LPS + VEGF-C-DC 上清中 IL-6、IL-12p70、TNF- α 的分泌量显著低于 LPS-DC 组。提示 VEGF-C 能降低 DC 上清液中细胞因子的分泌。

3 讨论

DC 是体内主要的专职抗原提呈细胞, 它能够加工处理抗原并将抗原信息提呈给 T 淋巴细胞。T 细胞的完全活化依赖于双信号和细胞因子的作用, 其活化的第一信号来自于 TCR 和 MHC 分子的特异结合, 第二信号来自于 DC 表面的协同刺激分子(B7-1/CD80、B7-2/CD86)^[5]。CD83 是 DC 成熟的标志之一, DC 从前体细胞分化为具有免疫活化功能的细胞需要一个从未成熟到成熟的分化过程^[6]。本研究发现, 肿瘤患者外周血来源的成熟 DC 表面 CD80 和 CD83 在 LPS 刺激后都有明显的升高, 这是 DC 发挥功能的分子基础, 也说明了培养体系的成功。

长期以来, VEGFR 因被作为血管和淋巴管内皮细胞的标志物而备受关注, 抗 VEGF 及其受体的靶向药物已经走向临床, 发挥其显著的抗血管生成作用^[7]。VEGF 及其受体在免疫抑制中的作用是近年来备受关注的问题, Sawano 等^[8]提出, 单核细胞表面表达 VEGFR1, 并表达于单核巨噬细胞的整个分化发育过程中, 并可以作为单核细胞的标志物。研究^[9]发现, 在炎症刺激下, 巨噬细胞表面 VEGFR3 的表达会升高, 并且可以负反馈抑制 TLR4 信号通路, 从而防止巨噬细胞在细菌感染时发生过度炎症反应。但 VEGFR3 在 PB-MC 来源的 DC 的表达情况尚未见报道。在实验中, 笔者通过流式细胞术和免疫荧光法共同证明了 VEGFR3 在成熟 DC 的表达。

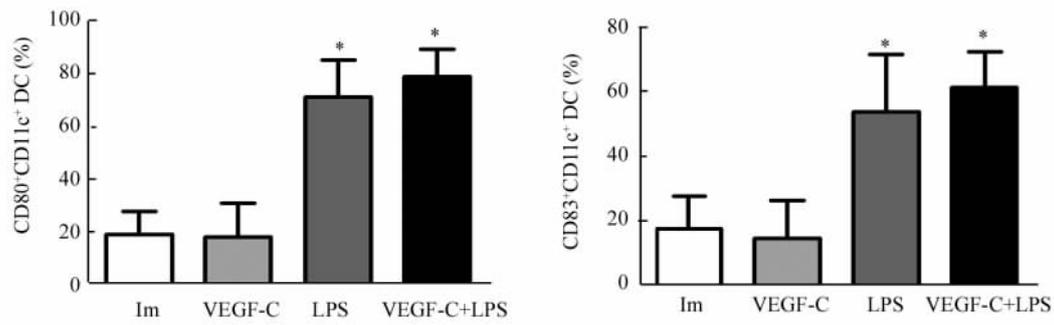


图3 VEGF-C对DC表面CD80、CD83表达的影响

Fig. 3 Influence of VEGF-C on the expression of CD80 and CD83 of DC

* $P < 0.05$ vs imDC group

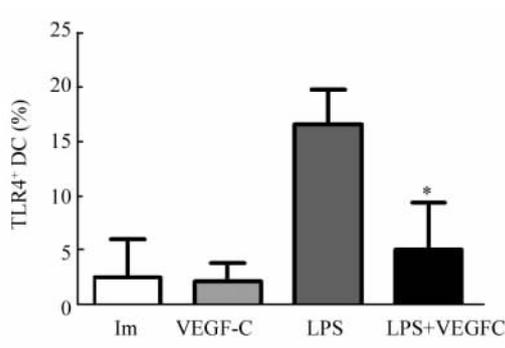


图4 VEGF-C下调DC表面TLR4的表达

Fig. 4 VEGF-C downregulate the expression of TLR4 on DC

* $P < 0.05$ vs imDC group

TLR4是DC表面存在的调节非特异性免疫反应的细胞受体,它能识别G⁻菌的细胞壁成分LPS,

具有增强DC免疫功能的作用^[10]。本研究中,给予VEGFR3的配体VEGF-C处理能导致TLR4的表达下调,提示VEGF-C/VEGFR3信号通路可以负反馈调控TLR4的表达。IL-6和TNF- α 都是具有多种生物学效应的细胞因子,前者具有促进细胞增殖分化、增强免疫反应的作用,后者在正常情况主要表现为抗肿瘤、抗感染等免疫调节作用^[11]。IL-12是介导Th1类反应的重要因子,还具有抗DC凋亡的作用^[12]。本研究结果显示,LPS通过激活DC表面的TLR4通路,增加DC分泌IL-6、TNF- α 和IL-12,而加入VEGF-C后,DC分泌的细胞因子IL-6、TNF- α 和IL-12减少,这一作用可能是VEGF-C/VEGFR3下调TLR4的表达实现的。因为肿瘤细胞可以分泌大量的VEGF-C^[13],由此作者推测,肿瘤微环境中的VEGF-C通过与DC表面的VEGFR3结合,从而负向调控肿瘤局部DC的免疫功能。

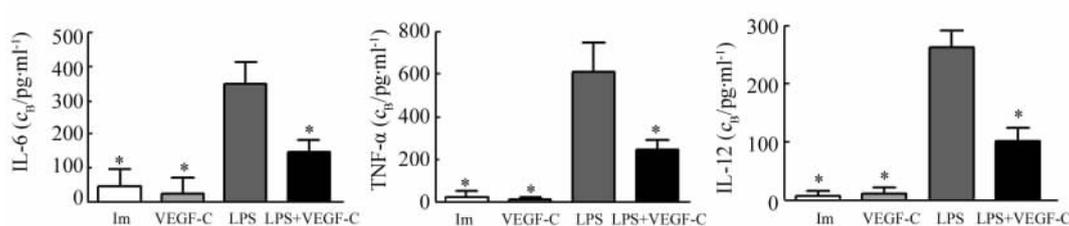


图5 VEGF-C通路降低DC细胞因子的分泌

Fig. 5 VEGF-C signaling decrease the secreted of cytokine of DC

* $P < 0.05$ vs imDC group

综上,肿瘤患者外周血来源的DC表达VEGFR3、VEGF-C/VEGFR3通路通过下调DC表面TLR4的表达,降低DC细胞因子的分泌,对DC起负向免

疫调控作用,但具体的信号传导机制尚需进一步实验研究。总之,这一新型受体的发现为认识肿瘤微环境中DC的免疫失调机制提供了新思路。

[参 考 文 献]

[1] LEE H K, IWASAKI A. Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond [J]. *Semin Immunol*, 2007, 19(1): 48-55. DOI: 10.1016/j.smim.2006.12.001.

[2] ESPAGNOLLE N, BARRON P, MANDRON M, et al. Specific inhibition of the VEGFR-3 tyrosine kinase by SAR131675 reduces peripheral and tumor associated immunosuppressive myeloid cells [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(1): 472-490. DOI: 10.3390/cancers6010472.

[3] WANG C A, TSAI S J. The non-canonical role of vascular endothelial growth factor-C axis in cancer progression [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(6): 718-724. DOI: 10.1177/1535370215583802.

[4] HAMRAH P, CHEN L, ZHANG Q, et al. Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(1): 57-68. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63630-9.

[5] VAN DER MERWE P A, DUSHEK O. Mechanisms for T cell receptor triggering [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(1): 47-55. DOI: 10.1038/nri2887.

[6] BATES J M, FLANAGAN K, MO L, et al. Dendritic cell CD83 homotypic interactions regulate inflammation and promote mucosal homeostasis [J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(2): 414-428. DOI: 10.1038/mi.2014.79.

[7] TANNOCK I F, FIZAZI K, IVANOV S, et al. Aflibercept versus placebo in combination with docetaxel and prednisone for treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer (VENICE): a phase 3, double-blind randomised trial [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(8): 760-768. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70184-0.

[8] SAWANO A, IWAI S, SAKURAI Y, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans [J]. *Blood*, 2001, 97(3): 785-791. DOI: 10.1182/blood.v97.3.785.

[9] ZHANG Y, LU Y, MA L, et al. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 in macrophages restrains TLR4-NF-kappaB signaling and protects against endotoxin shock [J]. *Immunity*, 2014, 40(4): 501-514. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.01.013.

[10] ZHANG Y, HE X, YU F, et al. Characteristic and functional analysis of toll-like receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e76464 [2015-11-21]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076464>. DOI: 10.1371/journal.pone.0076464.

[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] LIU G, BI Y, XUE L, et al. Dendritic cell SIRT1-HIF1alpha axis programs the differentiation of CD4+ T cells through IL-12 and TGF-beta1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(9): E957-965. DOI: 10.1073/pnas.1420419112.

[13] VARNEY M L, SINGH R K. VEGF-C-VEGFR3/Flt4 axis regulates mammary tumor growth and metastasis in an autocrine manner [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2): 616-628. PMID: 25973301.1.

[收稿日期] 2016-01-30 [修回日期] 2016-03-29
 [本文编辑] 党瑞山

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

参考文献题名后应标注文献类型和文献载体标识代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2015《信息与文献 参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都应标上[文献类型标识代码]或[文献类型标识代码/文献载体标识代码]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子资源类文献,如为网络期刊析出文献,题名后须标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后须标上[M/OL]。常用文献类型标识和电子文献载体标识代码见表 1。

表 1 文献类型和文献载体标识代码

文献类型	标识代码	文献类型	标识代码	载体类型	标识代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联 机 网 络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		