

肿瘤来源的抑制性细胞因子影响树突状细胞的 微观流变特性并导致免疫应答恶化*

曾 柱¹⁾ 王国涛³⁾ 许晓风¹⁾ 龙金华⁴⁾ 邢俊杰¹⁾ 张颖娉¹⁾
肖 俊⁵⁾ 段学燕⁴⁾ 唐 岩³⁾ 唐军民³⁾ 孙大公^{2)**}

¹⁾ 北京大学基础医学院生物物理系, 北京 100083; ²⁾ 北京大学医学部公共教学部医学物理教研室, 北京 100083;

³⁾ 北京大学基础医学院解剖学和组织胚胎学系, 北京 100083; ⁴⁾ 贵州省黔东南州人民医院肿瘤科, 凯里 556000;

⁵⁾ 贵州省贵阳医学院物理教研室, 贵阳 550004)

摘要 现已证明, 在肿瘤发生过程中, 司职抗原呈递的树突状细胞的功能存在缺陷和紊乱, 从而导致了免疫系统的显著受抑和肿瘤的免疫逃逸. 为了探索肿瘤的免疫逃逸机制, 利用生物物理学和微观流变学的方法研究了肿瘤来源因素对树突状细胞(dendritic cells, DCs)分化过程的影响. 发现来源于肿瘤微环境的细胞因子等成分, 导致 DCs 的渗透脆性增加、细胞膜脂流动性显著下降, 而且细胞的转录水平和能量状态也明显改变, 导致 DCs 的抗原摄取能力和活化幼稚 T 细胞的能力显著下降. 所以, DCs 的微观流变特性的改变也许是肿瘤免疫逃逸机制的一个方面.

关键词 树突状细胞, 肿瘤来源的抑制性细胞因子, 免疫逃逸机制, 渗透脆性, 膜流动性, 细胞基因的转录水平和能量状态, 免疫应答

学科分类号 R318.01

树突状细胞(DCs)是一种特化的、迄今所知功能最为强大的抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APCs), 它在启动和放大天然和适应性免疫应答方面均发挥着关键的作用^[1~4]. 在体内, 未成熟 DCs (immature dendritic cells, imDCs) 主要位于非淋巴组织, 具有很强的抗原摄取能力^[5], 获取抗原后, imDCs 通过血管或淋巴管到达二级淋巴组织. 在抗原的摄取和处理过程中, imDCs 逐渐分化成为成熟 DCs (mature dendritic cells, mDCs), mDCs 表达大量的抗原肽-MHC 复合体和其他的信号分子于细胞表面, 这对于幼稚 T 细胞的活化来说是必需的^[2,3,5]. 病原体释放的产物, 如脂多糖 LPS 和局部组织产生的肿瘤坏死因子 TNF α 或白介素 1 (IL-1), 是 DCs 活化的介导者, 它们能引起 DCs 向淋巴组织的 T 细胞区迁移^[6]. DCs 同样也能够向 T 细胞呈递特异性的肿瘤抗原并且诱导有效的抗肿瘤免疫应答^[7]. DCs 能够指挥几乎所有的免疫元件, 所以它也是肿瘤疫苗接种的靶点和工具^[8]. 肿瘤微环境由免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞和细胞外基质构成, 是肿瘤形成、增殖和生存的主要场所^[9]. 肿瘤细胞能够分泌抑制性细胞因子来逃脱机体的免

疫监视, 这些细胞因子包括白介素 10(IL-10)、转化生长因子 β (TGF β) 和血管内皮生长因子(VEGF)等, 它们是构成肿瘤微环境的最主要成分^[10~13]. Monti 等^[14]发现, 肿瘤微环境产生的 MUC1 粘蛋白导致 IL-10 增加, IL-12 减少是引起 T 细胞应答受损的原因之一. McBride 等^[15]认为: IL-10 通过调节细胞表面分子来改变 DCs 的功能, 导致 T 细胞应答受损. Tsujitani 等^[16~19]发现 DCs 的数量和肿瘤浸润的程度呈负相关. 现在人们普遍认为: 恶性肿瘤形成的过程中 DCs 功能发生异常改变, 但是潜在的机制目前尚不完全清楚^[20~24], 而且这些研究几乎都是从生物化学和免疫学的角度来考虑问题. 有学者认为, APCs 质膜的物理组织以不同的方式来调控抗原呈递和 T 细胞的增殖过程^[25]. 但是, 通过探索肿瘤微环境和 DCs 生物物理特性间的关系来研究肿瘤的免疫逃逸机制在国内外未见报道. 细胞的渗透脆性和膜流动性在生物物理学领域是两个重要

*国家自然科学基金资助项目(10572007, 30270355).

** 通讯联系人. Tel: 010-82802419, E-mail: rheol@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2005-12-31, 接受日期: 2006-01-29

的参数. 同样地, 现已证明傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 能够反映细胞在 DNA 或 RNA 和蛋白质水平的变化^[26,27]. 基于我们以前的工作^[28~31]和对不同发育阶段 DCs 生物物理和微观流变特性的研究^[32,33], 发现 DCs 的结构和功能紧密相关, 所以我们推测: 肿瘤在免疫逃逸形成的过程中, 可能伴随有 DCs 微观流变特性的改变. 在本研究中, 为了研究肿瘤来源因素对 DCs 微观流变特性以及其抗原摄取、处理和呈递的影响, 我们利用培养的人红白血病肿瘤细胞株 Jurkat 上清模拟 DCs 分化的微环境, 结果证明了我们的推测, DCs 的微观流变特性的确发生了显著改变, 这和 DCs 启动特异性免疫应答的功能是密切相关的, 所以, DCs 受损的微观流变特性可能是肿瘤免疫逃逸机制的一个重要方面.

1 材料与方法

1.1 人红白血病细胞株 Jurkat 培养上清 (SJC) 的制备

人红白血病细胞株由本实验室培养. PBS 清洗过的 Jurkat 细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$) 在 RPMI1640-10% 胎牛血清中培养, 培养条件是 37°C , 5% CO_2 和 95% 湿度. 当细胞处于对数生长期时, 收集培养上清, 然后用微孔滤膜 ($0.2 \mu\text{m}$) 过滤后于 -80°C 冻存, 备用.

1.2 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) 和肿瘤坏死因子 (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: RPMI 1640 (美国 GIBCO 公司)、胎牛血清 (FBS, 美国 HyClone 公司)、2 mmol/L 谷氨酸酰胺、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 mg/L 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 Miltenyi 公司.

1.3 单核细胞和树突状细胞的获得

根据本实验室以前的方法分离和诱导树突状细胞^[32,33], 简述如下: 人外周血单个核细胞经贴壁后, 用含抗 CD3、CD7、CD19、CD45RA、CD56 和 IgE 的鸡尾酒抗体的免疫磁珠 (Miltenyi Biotec) 通过阳性选择去除 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, 获得高纯度的 CD14⁺ 单核细胞. 收集 5×10^6 个 CD14⁺ 单核细胞加

入含 100 $\mu\text{g/L}$ rhGM-CSF、1 000 U/ml rhIL-4 和含 40% 的人 Jurkat 细胞培养上清液的完全培养液中培养至第 7 天, 收集悬浮细胞即为未成熟 DC. 未成熟 DC 中加入 100 U/ml TNF α 培养 3 天即为成熟的 DCs, 命名为 DCs + SJC (imDCs + SJC 和 mDCs + SJC). 对照组未成熟 DC 除不加入 Jurkat 细胞培养上清液外, 其余均与上述步骤相同, 命名为 DCs (imDCs 和 mDCs).

1.4 荧光偏振

参照文献[34]. 收集细胞 ($2 \times 10^6/\text{ml}$), 用 PBS 洗 2 次 (1 000 r/min, 5 min). 用 PBS 将细胞配成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液. 将细胞悬液与等体积浓度为 2×10^{-6} mol/L 的 DPH 溶液 (2×10^{-3} mol/L 的 DPH 原液稀释 1 000 倍) 混合, 37°C 孵育 30 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将细胞重悬于 PBS 中 (此步可以省略, 因为 DPH 只在非极性溶液中才发荧光). 用荧光分光光度计 (Hitachi 850 Fluorescencespectrophotometer, 日本日立公司) 测量上述各类 DCs + SJC 与对照组细胞在偏振片于不同角度时的荧光强度 I , 激发波长 (λ_{ex}) 为 360 nm, 发射波长 (λ_{em}) 为 430 nm, 标记的细胞在 2 h 之内测完, 整个过程要求细胞存活. 荧光偏振度 p 值根据 Amumi 法^[35]计算. 每一实验至少测量 3 次.

1.5 渗透脆性

参照文献[36]. 用 PBS (pH 7.4, 295 mOsm/kg) 和蒸馏水以不同比例混合, 配成不同渗透压的 PBS 溶液, 渗透压范围在 0~295 mOsm/kg 之间. 将细胞配成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的悬液, 将悬液以每份 100 μl 分别置于 Ependorff 管中, 离心 (1 000 r/min, 5 min) 后弃上清, 再分别加入 500 μl 不同渗透压的 PBS 溶液, 充分混匀, 静置 30 min. 用细胞计数板计各管中上述各类 DCs + SJC 与对照组 mDCs 的完整细胞数, 以 295 mOsm/kg 管的细胞数为标准, 其他管中的细胞数除以标准细胞数, 得到各种渗透压下的未破碎细胞百分数, 绘制渗透脆性曲线. 每一实验至少测量 3 次.

1.6 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)

分别收集不同分化阶段的细胞 2×10^6 个, 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°C 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 1 500~1 800 cm^{-1} , 分辨率 4 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: 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. 每一样品至少测量 3 次.

1.7 imDCs 的吞噬能力

imDCs 的主要功能是摄取抗原. 细胞的吞噬抗原能力根据 Chen 等^[37]的方法检测, 用流式细胞仪测量细胞对 FITC 标记的右旋糖酐颗粒 (Sigma 公司) 的摄入量来衡量细胞的吞噬能力. 2×10^5 个细胞悬浮于 500 μ l RPMI1640 中, 加入 500 mg/L FITC 标记的右旋糖酐颗粒, 颗粒大小为 43.2 ku, 于 37°C 分别孵育 30 min、1 h 和 2 h 后, 收集的细胞用含 2% 胎牛血清的 PBS 洗 3 次以去除未被吞噬的颗粒. 然后, 细胞用含 5% 多聚甲醛冷 PBS 固定 30 min, 上流式细胞仪检测上述各类 DCs + SJC 与对照组 imDCs 细胞.

1.8 mDCs 的同种异体混合淋巴反应 (MLR)

mDCs 的主要功能是使 T 细胞增殖. mDCs 的功能活性用初级同种异体混合淋巴反应来测定, 用人的 T 细胞作为应答细胞. 将新鲜的外周血单个核细胞悬液通过尼龙毛柱, 用 PBS 洗柱, 即可得到同种异体 T 细胞. MLR 在圆底 96 孔板上进行以确保 mDCs 与 T 细胞之间的有效接触. mDCs 和 mDCs + SJC 分别以梯度浓度 ($10^2 \sim 10^6$ 个/孔) 加入 3 个复孔中, 每孔加入 1×10^5 个 T 细胞, 用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基补至每孔总体积 200 μ l. 细胞增殖用 ^3H -thymidine 摄入量 (5Ci/mmol, 1 μ Ci/孔, DuPont-NEN, Boston, MA) 来检测. 细胞摄入 ^3H -thymidine 的量用 MicroBeta TRILUX 液体闪烁计数器 (WALLAC, Gaithersburg, MD) 测定. 数值用每分钟计数 (count per minute, cpm) 表示.

1.9 统计处理

每一实验在相同条件下至少重复 3 次, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 所有的数据用 SAS 统计软件的 ANOVA 处理, 当 $P < 0.05$ 时, 差异被认为有统计意义.

2 结 果

2.1 荧光偏振

荧光偏振度 p 与细胞膜脂双层的流动性成反比关系^[38], 用来描述膜脂分子运动的情况. 如图 1 所示, 与正常培养的 imDCs 和 mDCs 相比, imDCs + SJC 和 mDCs + SJC 的 p 值显著增加 ($^*P < 0.01$ 和 $^{**}P < 0.05$), 说明 SJC 能够抑制 DCs 膜

脂分子的运动.

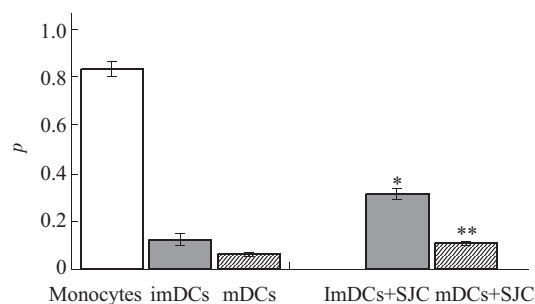


Fig. 1 The fluorescence polarization of cells under normal and tumor microenvironment

Compared with DCs, the membrane fluidities of DCs+SJC significantly decreased ($^*P < 0.01$ 和 $^{**}P < 0.05$).

2.2 渗透脆性

如图 2 所示, imDCs 和 mDCs 与对应的 imDCs + SJC 和 mDCs + SJC 相比, 渗透脆性明显增加 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$), 说明 SJC 能够损伤 DCs 的抗低渗能力, 这可能会导致 imDCs + SJC 和 mDCs + SJC 在体内迁移时更容易受到低渗或剪切力的破坏.

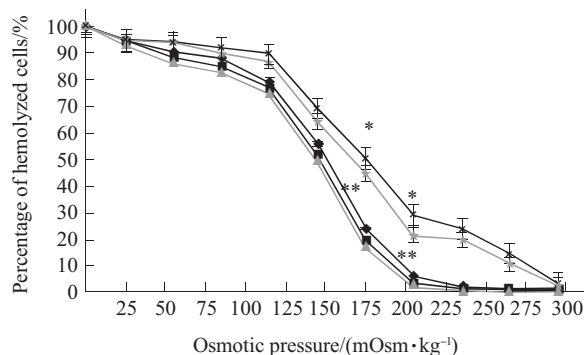


Fig. 2 The osmotic fragility curves of DCs under different culturing media

The percentages of hemolyzed cells of imDCs+SJC and mDCs+SJC were markedly higher than those of corresponding imDCs and mDCs ($^*P < 0.01$ and $^{**}P < 0.001$). ◆—◆: Monocyte; ■—■: imDC; ▲—▲: mDC; ★—★: imDC + SJC; ×—×: mDC+SJC.

2.3 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)

图 3 为所得到的正常培养条件下 DCs 傅里叶变换红外光谱示意图. 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^[39~42], 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^[39,40]，2 800~3 000 cm⁻¹ 范围内的峰来自膜磷脂中 C—H 伸展振动。

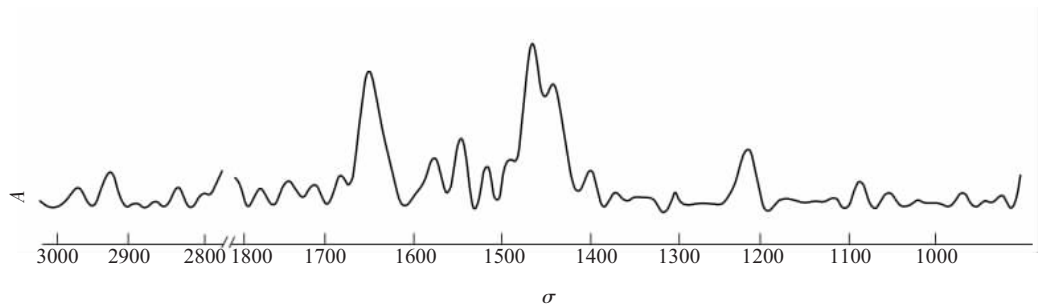


Fig. 3 The schematic drawing of typical DCs FTIR spectrum (deconvolution) under normal culturing conditions

将样品与重水空白对照差减谱进行傅里叶变换去卷积，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. Ramesh 等^[43]认为， A_{1020}/A_{1045} 对应于 DNA/amide II，反映细胞的增殖状态， A_{1121}/A_{1545} 对应于 RNA/amide II，反映细胞的转录状

态， A_{1030}/A_{1080} 对应于糖 / 磷酸盐，反映细胞的代谢更新情况， A_{1030}/A_{2924} 对应于糖 / 磷脂，反映细胞内消耗自由葡萄糖以进行磷脂重新合成的情况. 所有的光谱经过傅里叶自去卷积处理，没有波数漂移. DCs 和 DCs + SJC 对应的不同波数的吸收强度比经统计分析后，结果如表 1 所示.

Table 1 Ratios of cellular infrared absorption intensity under different condition ($\bar{x} \pm s$)

Cell types		A_{1020}/A_{1545}	A_{1121}/A_{1545}	A_{1030}/A_{2924}	A_{1030}/A_{1080}
		DNA /Amide II	RNA/Amide II	Glucose/Phospholipids	Glucose/Phosphate
DCs	imDCs	3.812±0.031	2.953±0.074	1.274±0.052	0.753±0.033
	mDCs	0.531±0.027	1.219±0.045	0.169±0.053	0.957±0.051
DCs+SJC	imDCs	3.655±0.028	1.822±0.057*	1.383±0.063	0.569±0.012*
	mDCs	0.583±0.067	0.877±0.032**	0.125±0.033*	0.765±0.043**

Compared with corresponding DCs respectively: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 imDCs 的吞噬能力

imDCs 和 imDCs+SJC 的抗原吞噬能力，用细胞对 FITC 标记的 43.2 ku 右旋糖酐的摄入量来衡量. 如图 4 所示，摄入右旋糖酐颗粒的 imDCs 和 imDCs + SJC 细胞数是时间的函数. 与 imDCs 相比较，imDCs + SJC 的抗原吞噬能力显著地被肿瘤微环境来源的因素所降低 (* $P < 0.01$).

2.5 SJC 对 mDCs 刺激能力的影响

我们用 MLR 来进一步研究 SJC 对 mDCs 刺激能力的影响以及验证前面的实验结果. 结果如图 5 所示，mDCs + SJC 的刺激能力与 mDCs 相比显著下降 (* $P < 0.01$).

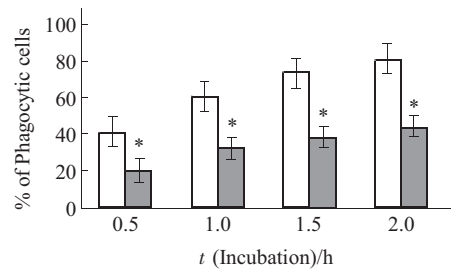


Fig. 4 The phagocytic activities of imDCs and imDCs+SJC Cells (2×10^5) were incubated at 37°C with 25 mg/L FITC-dextran particles (43.2 ku). The numbers of cells that phagocytosed the particles were determined by flow cytometry. Data represent the $\bar{x} \pm s$. The results showed that the ability to phagocytosis of imDCs+SJC significantly was impaired (* $P < 0.01$) by the factors derived from tumor. □: imDCs; ■: imDCs + SJC.

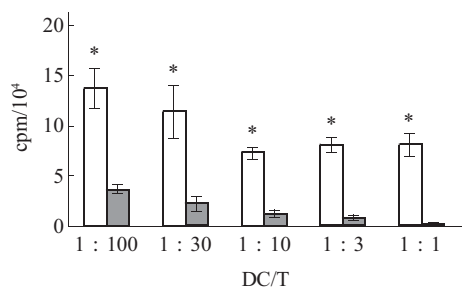


Fig. 5 Stimulatory abilities of mDCs in the MLR assay under different culturing conditions

The MLR assay was performed as described in **Materials and methods**. mDCs used as stimulators, were generated from fresh PBMC progenitors. Allogeneic T cells, obtained from PBMC of other people, serving as responders. mDCs were added in graded doses ($10^3 \sim 10^5$ cells/well) to T cells (1×10^5) and proliferation of T cells was measured by uptake of ^3H -thymidine. Data represent the $\bar{x} \pm s$. Compared mDCs with mDCs + SJC (* $P < 0.01$). The stimulatory capacities to activate T cells proliferation of SJC-coculturing mDCs were impaired by the components of SJC. □: mDCs; ■: mDCs+SJC.

3 讨 论

近年来, 基于 DCs 的免疫治疗被人们认为是目前最有希望攻克癌症的一种方法, 引起了各国学者的高度关注. DCs 是迄今所知功能最为强大的抗原呈递细胞^[44], DCs 起源于造血干细胞, 出骨髓后, 分化为淋巴系和髓系祖细胞, 来源于髓系 $\text{CD}14^+$ 单核细胞的 DCs 被人们在科研和临床上广泛采用^[45]. 从功能上来说, 摄取抗原之前的 DCs, 称为 imDCs, 其位于外周非淋巴组织, 以吞噬、巨吞饮和受体介导内吞作用等获取抗原, 具有强大的抗原摄取和处理能力. 获取抗原后, imDCs 逐渐分化为 mDCs, 向二级淋巴组织迁移, 上调 MHC I 或 II, 共刺激分子 (CD80, CD86 和 CD40 等) 和趋化因子受体 (CCR7 等) 的表达, 逐渐完善刺激幼稚 T 细胞活化增殖的能力, 同时显著下调抗原摄取能力^[4], 从而启动免疫应答或耐受.

肿瘤的低免疫原性与 DCs 的功能受抑密切相关^[7~13]. 现已证明, 肿瘤组织微环境中存在许多抑制性的细胞因子, 如转化生长因子 β (TGF β), 血管表皮生长因子 (VEGF), 白介素 IL-10, 神经节苷脂和 PGE2 等. 这些细胞因子单独或协调地抑制 DCs 的生理功能, 导致机体对肿瘤的耐受^[46~49]. 以上这些研究都是从生化和免疫学等角度来研究 DCs 的功能异常. 从生物物理学角度来看, 我们对不同发育阶段 DCs 生物物理特性的前期研究^[32,33]工作发

现, DCs 的结构和功能是紧密相关的, 所以我们推测: 肿瘤在免疫逃逸形成的过程中, 可能伴随有 DCs 生物物理特性的改变.

细胞膜脂双层的流动状态在细胞的各种功能和过程中起着极为重要的作用, 如生长和分化^[42]. 这些过程往往伴随有细胞膜流动性的特异性改变, 这主要是由于膜脂成分 (如胆固醇和磷脂的水平) 和膜脂肪酸链饱和度的变化所引起^[50]. 如图 1 所示, 在肿瘤微环境中, imDCs + SJC 和 mDCs + SJC 的荧光偏振度 p 显著增加 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 表明 DCs 膜脂分子的流动性被肿瘤来源的因素所抑制. 对于 imDCs 来说, 细胞膜的流动性下降可能会使其变形能力和运动能力变差, 导致能够到达肿瘤组织摄取抗原的 DCs 数量逐渐减少, 有文献报道, DCs 的数量和肿瘤浸润的程度呈负相关^[20~23], 我们的结果为这一结论提供了证据. 对于 mDCs 来说, 由于膜脂分子运动受到肿瘤来源因素的抑制, 可能会影响到 mDCs 与幼稚 T 细胞的相互作用过程, 如细胞受体和配体间相遇的几率减小等, 导致 DCs 的抗原呈递效率下降. 这一结果支持 Tourkova 等^[25]的结论, 他们认为: DCs 和 T 细胞间直接接触介导信号的改变是 DCs 刺激能力受损的基本机制.

细胞的渗透脆性反映其抵抗低渗或剪切力的能力. 如图 2 所示, DCs+SJC 的渗透脆性比正常培养的 DCs 显著增加, 表明其抵抗低渗的能力受到了损伤. 在肿瘤宿主体内, 由于肿瘤细胞大量消耗营养并产生大量自由基引起局部微环境渗透压变化, 当 DCs 迁移到外周组织或从外周组织迁移到二级淋巴组织时, 渗透脆性的增加可能会使其物理结构更容易受到剪切力和局部渗透压变化的破坏, 从而导致到达二级淋巴组织的 DCs 数量不足或 DCs 共刺激能力下降, 这可能是肿瘤低免疫原性的原因之一.

FTIR 技术可以用来研究细胞或分子中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, 现已成为研究大分子结构和细胞内生化事件的有力武器. 所以, 在本研究中, 我们用 FTIR 技术来研究肿瘤来源的抑制性细胞因子对 DCs 分化过程的影响. 结果如表 1 所示.

DCs 和 DCs + SJC 的 DNA 和 amide II 吸收度的比值没有统计差别, 说明这两种细胞具有相似的平均生长速度, SJC 对细胞增殖相关的基因 (如细胞分裂周期基因 *cdc*) 的表达没有影响.

但是, DCs + SJC 的糖和磷酸盐及糖和磷脂的

吸收度比值明显低于 DCs ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 这种差异可能是源于这两类细胞中可利用的糖含量, 也就是说存在能量状态的差异. 由于能量状态控制着细胞的其他代谢功能, 所以我们推测: SJC 的成分, 如 IL-12、IL-10、TGF β 和 VEGF 等, 对细胞的一些关键结构如脂等有显著的影响, 并且, 也可能抑制 DCs 的各种功能, 如蛋白质和脂的代谢, 这种抑制作用不可避免地与抗原的摄取、处理和呈递过程密切相关.

RNA 和 amide II 吸收度比反映细胞基因的转录状态. DCs 的 RNA/amide II 明显高于 DCs + SJC, 说明来源于 SJC 的成分可以抑制细胞基因的转录状态, 这与一些对其他细胞的研究结果相一致^[12,51]. imDCs 的主要功能是摄取和处理抗原, 由此, 我们推测: SJC 对 imDCs 功能的抑制可能发生在抗原获取后的抗原处理阶段, 因为这一过程涉及了许多基因的表达, 如 MHC、CD1a、CD86、CD80、CD40、CD83 和 CCR7 等. 另有文献报道, SJC 中的重要成分 TGF β 能够抑制 DCs 胞浆中丰富存在的核转录因子 NF- κ B 的活性^[52,53], 导致该转录因子不能有效转位到核内而发挥其应有的功能, 由于许多细胞内的信号转导通路都涉及该转录因子, 根据我们的结果推测, DCs + SJC 转录活性的降低和功能缺陷与 NF- κ B 的活性受抑密切相关. 在临床上, DCs 的功能状态一直没有简单快捷可靠的办法来判断, 因此, 我们建议是否可以将 FTIR 技术用于临床来解决这一问题.

为了进一步验证前面的推测, 我们分别研究了肿瘤来源因素对 imDCs 吞噬右旋糖酐的能力和 mDCs 刺激 T 细胞活化能力的影响, 结果显示 (图 4 和图 5), SJC 能够显著抑制 imDCs 的抗原摄取能力 ($P < 0.01$) 和 mDCs 活化 T 细胞的能力 ($P < 0.01$). 尽管肿瘤宿主体内 DCs 的功能缺陷还有其他的因素所引起^[53], 但是这些研究都是从生物化学的角度来研究的. 从微观流变学的角度来研究 DCs 的功能缺陷, 可以使我们能够进一步了解细胞结构和功能之间的关系.

总之, 我们以上的结果证明了我们的推测: 肿瘤微环境能够影响 DCs 的生物物理特性和功能. DCs 的微观流变特性受损可能是肿瘤免疫逃逸机制的一个方面.

参 考 文 献

1 Steinman R M. The dendritic cell system and its role in

immuneogenicity. *Annu Rev Immunol*, 1991, **9** (2): 271~296

- 2 Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 1997, **9** (1): 10~16
- 3 Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, **392** (6673): 245~252
- 4 Austyn J M. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med*, 1996, **183** (3): 1287~1292
- 5 Lanzavecchia A. Mechanism of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol*, 1996, **8** (3): 328~354
- 6 Cumberbatch M, Kimber I. TNF- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology*, 1995, **84** (1): 31~35
- 7 Cao X T. The clinical research advances and foundations of dendritic cells. *J Chinese Immunol*, 1998, **14** (3): 161~168
- 8 Banchereau J, Palucka A K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*, 2005, **5** (4): 296~306
- 9 Zou W. Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews. Cancer*, 2005, **5** (4): 263~274
- 10 van Kooyk Y, Geijtenbeek T B H. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 2003, **3** (9): 697~709
- 11 Melif C J M. T-cell immunity against tumors, a delicate balancing act involving dendritic cells. *Pathol Biol*, 2001, **49** (6): 498~499
- 12 Makarenkova V P, Shurin G V. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunol*, 2003, **145** (1~2): 55~67
- 13 Moingeon P. Cancer vaccines. *Vaccine*, 2001, **19** (11~12): 1305~1326
- 14 Monti P, Leone B E, Zerbi A, *et al.* Tumor-derived muc1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *The Journal of Immunology*, 2004, 7341~7349
- 15 McBride J M, Jung T, de Vries J E, *et al.* IL-10 alter DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cellular Immunology*, 2002, **215** (1~2): 162~172
- 16 Tsujitani S, Kakeji Y Y, Watanabe A, *et al.* Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer. *Cancer*, 1990, **66** (9): 2012~2016
- 17 Becker Y. Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers-a review. *Anticancer Res*, 1992, **12** (5): 511~520
- 18 Shurin G V, Yurkovetsky Z R, Shurin M R. Tumor-induced dendritic cell dysfunction. In: Ochoa A Ed. *Mechanisms of Tumor Escape from the Immune Response*. New York: Taylor and Francis, 2003. 112~138
- 19 Shurin M R, Gabrilovich D I. Regulation of dendritic cell system by tumor. *Cancer Res Ther Control*, 2001, **11** (1): 65~78
- 20 Gabrilovich D I, Patterson S, Harvey J J, *et al.* Defects in the function of dendritic cells in murine retroviral infection. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 378~469
- 21 Garrity T, Pandit R, Wright MA, *et al.* Increased presence of CD34⁺

- cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. *Int J Cancer*, 1997, **73**(5): 663~666
- 22 Ninomiya T, Akbar S M, Masumoto T, *et al.* Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 1999, **31**(2): 323~333
 - 23 Schwaab T, Schned A R, Heaney J A, *et al.* *In vivo* description of dendritic cells in human renal cell carcinoma. *J Urol*, 1999, **162**(2): 567~577
 - 24 Thurnher M, Radmayr C, Ramoner R, *et al.* Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer*, 1996, **68**(1): 1~10
 - 25 Tourkova I L, Yurkovetsky Z R, Shruin M R, *et al.* Mechanism of dendritic cell-induced T cell proliferation in primary MLR assay. *Immunology Letters*, 2001, **78** (2): 75~82
 - 26 Yao W, Gu L, Wen Z, *et al.* Wild type p53 gene causes reorganization of cytoskeleton and, diffult migration of murine erythroleukemia cells. *Cell Motility Cytoskeleton*, 2003, **56** (1): 1~12
 - 27 Chen K, Li D, Wen Z, *et al.* Influence of expressed TRAIL on biophysical properties of the human leukemic cell line Jurkat. *Cell Research*, 2004, **14**(2): 161~168
 - 28 Yao W, Chen K, Wang X, *et al.* Influence of TRAIL gene on biomechanics properties of the human leukemic cell line jurkat. *J Biomechanics*, 2002, **35**:1659~1663
 - 29 Gu L, Jiang Y, Wang Y, *et al.* TFAR19 gene changes biophysical behavior of murine erythroleukemia cells *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2005, **43**:355~363
 - 30 Sun D, Yao W, Wang J, *et al.* Tumorigenesis of murine erythroleukemia cell line transfected with exogenous p53 gene. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2004, 17~126
 - 31 Yao W, Chen K, Wang X, *et al.* Influence of TRAIL Gene on Biomechanics Properties of the Human Leukemic Cell Line Jurkat. *Journal of Biomechanics*, 2002, **35** (12): 1659~1663
 - 32 Zeng Z, Liu X, Chien S, *et al.* Biophysical studies on the differentiations of human CD14⁺ monocytes into dendritic cells. *Cell Biochem & Biophy*, 2006, **45** (1): 19~30
 - 33 Jiang Y, Zeng Z, Wen Z, *et al.* Adhesion of monocyte-derived dendritic cells to human umbilical vein endothelial cells in flow field decreases upon maturation. *Clinical Hemorheology & Microcirculation*, 2005, **32**(4): 261~268
 - 34 Yao W, Liang Y. Changes of biophysical behavior of k562 cells for p16 gene transfer. *Clinical Hemorheology Microcirculation*, 2002, **27**(3, 4): 177~183
 - 35 Azumi M. Fluorescence assay in biology and medicine. *J Chem-Phys*, 1962, **37** (8): 2413~2420
 - 36 Wen Z Y, Li C S, Zong Y Y, *et al.* An animal model to study erythrocyte senescence with a narrow time window: alterations in osmotic fragility and deformability of erythrocytes during their life span. *Clinical Hemorheology Microciulation*, 1998, **18**(4): 299~306
 - 37 Chen B, Shi Y, Smith J D, *et al.* The role of tumor necrosis factors α in modulation the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4⁺ T cells *in vitro*. *Blood*, 1998, **91** (9): 4652~4661
 - 38 Schmid-Schönbein GW, Sung K-L P, Tözeren H, *et al.* Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophys J*, 1981, **36** (2): 243~256
 - 39 Liu K Z. Similarities between the sensitivity to 2-chlorodeoxyadenosine of lymphocytes from CLL patients and bryostatin 1-Treated WSU-CLL cells: an infrared spectroscopic study. *Cancer letters*, 1998, **127** (1~2): 185~93
 - 40 Gao T Y, Ci Y X. FTIR investingation of the interaction of tumors cells treated with caffeic acid and chlorogenic acid. *Vibrational Spectroscopy*, 2000, **24** (2): 225~231
 - 41 Le Gal J. Ultrastructural appraisal of the multidrug resistance in K562 and LR73 cell lines from FTIR. *Cancer Research*, 1993, **53** (7): 3681~3686
 - 42 Le Gal J, Morjani H, Fardel O, *et al.* Conformational changes in membrane proteins of multidrug-resistant K562 and primary rat heaptocyte cultures as studied by FTIR. *Anticancer Research*, 1994, **14** (5): 1541~1548
 - 43 Ramesh J, Salma 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
 - 44 Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 2001, **13** (1): 45~51
 - 45 Winzler C, Rovere P, Rescigno M, *et al.* Clinical applications of dendritic cell. *J Exp Med*, 1997, **185** (2): 317~328
 - 46 Gabrilovich D I, Corak J, Ciernik I F, *et al.* Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1997, **3**(3): 483~490
 - 47 Almand B, Resser J R, Lindman B, *et al.* Clinical significance of defective dendriteic cell differentiateon in cancer. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**(5): 1755~1766
 - 48 Allavena P, Pienonti L, Longoni D, *et al.* IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*, 1998, **28**(1): 359~369
 - 49 D 'Orazio T J, Niederkorn J Y. A novel role for TGF- β and IL-10 in the induction of immune privilege. *J Immunol*, 1998, **160**(5): 2089~2098
 - 50 Parola A H. In Biomembrane. In: Shinitzky M, ed. *Physical Aspects*, 2. Weinheim/New York/ Basel: Cambridge, 1993. 159~277
 - 51 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 Immunol*, 1998, **160**(3): 1224~1232
 - 52 Yamamoto T, Imoto S, Sekine Y, *et al.* Involvement of NF- κ B in TGF- β -mediated suppression of IL-4 signaling. *BBRC*, 2004, **313** (3): 627~634
 - 53 Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor induced dendritic cell defects. *Nature Reviews Immunology*, 2004, **4** (12): 941~952

The Suppressive Cytokines Derived From Cancer Affect Microrheological Properties of Dendritic Cells Leading to Deteriorated Immune Response*

ZENG Zhu¹⁾, WANG Guo-Tao³⁾, XU Xiao-Feng¹⁾, LONG Jin-Hua⁴⁾, XING Jun-Jie¹⁾, ZHANG Ying-Yu¹⁾,
XIAO Jun⁵⁾, DUAN Xue-Yan⁴⁾, TANG Yan³⁾, TANG Jun-Min³⁾, SUN Da-Gong^{2)**}

¹⁾*Department of Biophysics, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China;*

²⁾*Department of Medical Physics, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China;*

³⁾*Department of Anatomy and Histology-Embryology, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China;*

⁴⁾*Tumor Division of People's Hospital of Qiandongnan District, Kaili 556000, China;*

⁵⁾*Department of Medical Physics of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)*

Abstract The defects and dysfunctions in antigen-presenting dendritic cells have been shown during carcinogenesis leading to human immune system can be markedly suppressed by cancer. To explore the mechanisms by which cancers escape from immune recognition, the influences of tumor microenvironment on differentiation of dendritic cells (DCs), which play an important role in tumor immunology, were studied by biophysical and microrheological methods. It was found that the components derived from tumors caused the increases in osmotic fragility and decreases in membrane fluidity of DCs, moreover, the gene transcriptional levels and energy statuses of cells were also transformed, leading to impaired capabilities of antigen uptaking and deteriorated stimulatory capacities to activate naïve T cells. The impaired microrheological properties of DCs may be one of the aspects of immune escape mechanism of tumor.

Key words dendritic cells (DCs), suppressive cytokines derived from cancer, immune escape mechanism, osmotic fragility, membrane fluidity, gene transcriptional levels and energy statuses of cells, immune responses

*This work was supported by the grants from The National Natural Science Foundation of China (10572007, 30270355).

**Corresponding author . Tel: 86-10-82802419, E-mail: rheol@bjmu.edu.cn

Received: December 31, 2005 Accepted: January 29, 2006