

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000659

肝癌细胞对人未成熟树突状细胞基因表达谱的影响

杨 晖, 胡祖权, 董 蓉, 薛 慧, 龙金华, 李 龙, 曾 柱

(贵州医科大学生物与工程学院生物技术教研室, 贵阳 550004)

【摘要】目的:检测肝癌细胞微环境对人未成熟树突状细胞(imature dendritic cells, imDCs)基因表达谱的影响。**方法:**采用免疫磁珠阴性选择从人外周血分离 CD14⁺单核细胞, 在体外经粒-巨噬细胞采落刺激因子和白介素 4 诱导培养分化为 imDCs, 与 Bel 7402 肝癌细胞在 Transwell 中共培养 48 h 后, 抽提 imDCs 的总 RNA, 利用人树突状细胞基因芯片检测其基因表达谱的变化。**结果:**与肝癌细胞共培养后, 共有 1 531 个基因的表达发生改变(与对照组相比, 变化表达倍数 ≥ 2), 其中上调 598 个, 下调 933 个, 这些基因主要涉及信号转导、免疫应答、细胞黏附等功能。**结论:**肝癌细胞微环境能够影响 imDCs 多个基因的表达, 这些基因的功能与 imDCs 的分化、成熟和功能有关, 为进一步深入研究肝癌细胞对 DCs 免疫功能影响的分子机制奠定了基础。

【关键词】未成熟树突状细胞; 肝癌微环境; 基因芯片; 表达谱

【中图分类号】R318.04

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-03-17

Effect of hepatocellular carcinoma cells on changes of gene expression profiles in immature dendritic cells

Yang Hui, Hu Zuquan, Dong Rong, Xue Hui, Long Jinhua, Li Long, Zeng Zhu

(College of Biology and Engineering, Guizhou Medical University)

【Abstract】Objectives: To detect the influence of hepatocellular carcinoma cells micro-environment on the gene expression profiles in immature dendritic cells (imDCs). **Methods:** CD 14⁺ monocytes were collected by immunomagnetic beads from fresh harvested whole blood via negative selection. ImDCs were obtained by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) and recombinant human interleukins-4 (rhIL-4) induction for 5 d *in vitro*. The collected imDCs were co-cultured with hepatoma cells Bel 7402. After 48 h, total RNA of the cells was collected, and human dendritic cells gene array was used to detect and analyze the changes of functional genes in imDCs. **Results:** After co-cultured with hepatoma cells, a total of 1 531 genes were changed (fold changes ≥ 2 compared with that of control group), of which 598 up-regulated and 933 down-regulated. These genes were involved in signal transduction, immune response, cell adhesion, etc. **Conclusion:** The micro-environment of hepatocellular carcinoma can affect many genes regulation and expression of imDCs. These genes have influence on the differentiation, maturation and functions of imDCs. It is of significance to further understand the molecular mechanism of the hepatoma cells' influence on the immune function of imDCs.

【Key words】immature dendritic cells; hepatocellular carcinoma micro-environment; microarray; expression profiles

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是目前发现的

作者介绍: 杨 晖, Email: 248542265@qq.com,

研究方向: 树突状细胞生物学。

通信作者: 曾 柱, Email: zengzhu100@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81460254, 11162003, 31260227); 贵州省留学回国人员科技活动基金资助项目(编号: 2013-8); 贵州省优秀青年科技人才支持计划资助项目(编号: 2011-24); 贵州省科学技术基金资助项目(编号: 黔科合 J 字[2013]2058); 贵州省科技计划资助项目(编号: 黔科合 LH 字[2014]7092 号); 贵州省留学回国人员科技活动基金资助项目(编号: 2013-8); 贵阳市科技计划项目资助项目(筑科合同[20141001]37 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150603.1235.001.html>

(2015-06-03)

体内功能最强大的抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs), 因表面有许多树枝状突起而得名, 起源于骨髓 CD34⁺造血干细胞, 分布于全身所有组织^[1-2]。其功能是扫视外周组织, 识别并结合病原体, 将病原体加工成抗原肽, 与主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子一同表达在 DCs 表面, 呈递给初始 T 淋巴细胞, 激活体内特异性的免疫应答, 因此, DCs 是连接固有免疫与特异性免疫应答的“枢纽”^[1]。根据其分化阶段不同, DCs 分为未成熟 DCs(imature DCs, imDCs)和成熟 DCs(mature DCs, mDCs), imDCs 具有较强的迁移和吞

噬能力, mDCs 能激活初始 T 淋巴细胞^[3]。在病理条件下, DCs 的凋亡加速, 分化、成熟以及抗原呈递的功能受到严重抑制^[3-5]。

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 不仅由肿瘤细胞本身组成, 还包括内皮细胞及其前体细胞、周细胞、平滑肌细胞、多种表型纤维母细胞、肌成纤维细胞、中性粒细胞、T 细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞、树突状细胞以及细胞外基质等^[4], 近年来, 对 TME 及其相关特征的探索, 是多种恶性肿瘤如黑色素瘤、胰腺癌、肝癌等的研究重点。在 TME 中, DCs 的分化和免疫功能受到多种因素的抑制, 包括辅助 T 细胞以及 TME 中各种抑制性细胞因子等^[5]。本课题组前期实验发现了肝癌细胞微环境导致 DCs 的生物物理、微观流变学、细胞骨架的特性发生了变化^[6], 为进一步探讨其调控机理, 本实验采用基因芯片技术检测肝癌细胞微环境对人 imDCs 基因表达谱的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 新鲜人外周血浓集白细胞 采自健康志愿者, 并知情同意, 购于北京市红十字中心, 每次实验均用同型血; 肝癌细胞株 Bel 7042 由北京大学基础医学院细胞生物学系张页教授赠予。

1.1.2 实验试剂 重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rhGM-CSF) 和重组人白介素 4 (recombinant human interleukins-4, rhIL-4) 购自美国 pepco 公司; RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 人淋巴细胞分离液购自北京索来宝公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 HyClone 公司; 100 μg/ml 链霉素, 100 U/ml 青霉素购自华北制药厂; Transwell 为美国 Corning 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 PBMCs 和 imDCs 的获得及鉴定 新鲜人外周血 (肝素抗凝), 采用密度梯度离心法, 利用人淋巴细胞分离液, 收集外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 加适量无血清 RPMI 1640 培养基, 置 5% CO₂ 培养箱于 37 °C 培养 2 h 后, 收集贴壁细胞。按照课题组的试验方法获得 imDCs^[7-10]。

1.2.2 imDCs 与 Bel 7402 肝癌细胞共培养 选用孔径为 5 μm 的聚碳酸酯膜的 Transwell, 用 RPMI 1640 (全) 培养基调整细胞数, 下室接种 5 × 10⁶ 个 imDCs, 上室接种 2 × 10⁶ 个 Bel 7402 肝癌细胞 (图 1)。对照组用 1640 (全) 培养基调整 imDCs 为 5 × 10⁶ 个, 接种于 5 μm 的聚碳酸酯膜的 Transwell 的下室, 上室加入与共培养组的上室等体积的 RPMI 1640 (全) 培养基。

一起置 5% CO₂ 培养箱于 37 °C 培养 48 h 后, 收集 imDCs。

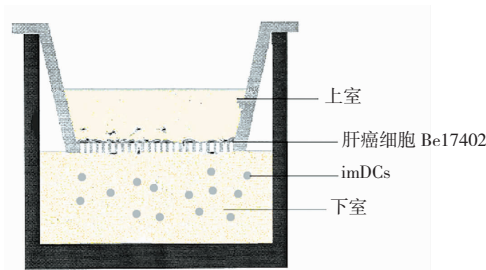


图 1 imDCs 与 Bel 7402 共培养示意图

Fig.1 Diagram of imDCs co-cultured with Bel 7402

1.2.3 RNA 的提取及质检 离心收集 imDCs, 加入 1 ml Trizol (Invitrogen 公司) 吹吸细胞, 充分混匀后冰上放置 10 min, 加入 200 μl 氯仿充分颠倒混匀, 冰上放置 5 min 后 4 °C 离心, 将上层水相 500 μl 转移到离心管中, 加入等体积的异丙醇颠倒混匀, 冰上静置 10 min, 4 °C 离心后去上清, 加入 1 ml 75% 乙醇洗涤 1 次, -20 °C 放置。用琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检验总 RNA 的完整性。

1.2.4 基因芯片分析 (由博奥生物公司完成) 以总 RNA 为模板合成单链 cDNA, 再利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA, 掺入生物素 biotin; 使用磁珠纯化 cRNA, 除去盐、酶等杂质, 并对 cRNA 进行定量; 将 cRNA 片段化成适宜杂交的大小。使用 Affymetrix GeneChip human Genome Array (型号 U133) 芯片, 进行杂交、清洗、染色、扫描, 该芯片包含 54 000 多个探针, 覆盖超过 47 000 个转录和变异, 代表大约 39 000 个人类基因特征; 最后使用 AGCC 软件 (Affymetrix GeneChip Command Console® Software) 将芯片的荧光扫描图像保存成 DAT 文件以待分析。

1.2.5 MAS 3.0 系统进行差异表达基因的 KEGG 和 GO 等统计分析 使用微阵列置信度分析软件 (significance analysis of microarray, SAM) 筛选统计上有差异的基因。差异表达的基因, 通过 Bel 7402 共培养的 mDCs 数据与对照组 mDCs 相比而得, 差异倍数 ≥ 2, 且 P 值 (P-value) < 0.05 视为差异表达。然后将基因名及比值输入博奥晶芯生物分子功能注释系统 MAS 3.0 (<http://bioinfo.Capitalbio.com/mas3/>) 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分析、京都基因和基因组的百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路分析、转录因子分析、肝癌相关基因分析。用 P 值大小反映信号通路的显著性; Q 值反映以某个 P 值阈值筛选后得到的信号通路的假阳性率, Q 值越小表明分析结果的可信度越高。

2 结果

2.1 总 RNA 质检

采用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 根据结果 (图 2) 检测到清晰的 28S 和 18S 条带, 分光光度计检验 28S/18S 亮度比值大于 1.5, 说明 RNA 没有明显的降解, 2 个样品的总 RNA 完整性良好, 可以进行探针标记。

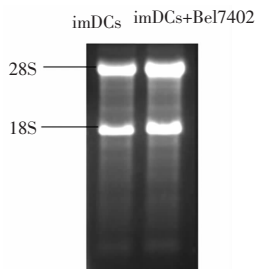


图2 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量

Fig.2 Agarose gel electrophoresis detection of the RNA quality

2.2 基因芯片表达谱

基因芯片结果显示,imDCs 与 Bel 7402 肝癌细胞共培养后,差异表达的基因共有 1 531 个(与对照组相比,变化表达倍数 ≥ 2),其中上调 598 个,下调 933 个。表达谱中的基因表达变化与本课题组前期研究^[6]相关,特别是与细胞运动相关的基因如表 1 所示。其中,17 个与抗原结合、细胞形态维持的基因上调,如 LILRA2、KRT15、ACTN4 等,其中 LILRA2 的表达增多能够抑制 DCs 的分化及其抗原呈递能力^[11]。KRT15 与细胞骨架的完整性有关^[12],ACTN4 参与运动过程中细胞丝状伪足的形成,它的增多与乳腺癌、肺癌等疾病的预后呈负相关^[13-14]。这些基因的上调,意味着在肝癌微环境中,imDCs 的抗原摄取能力可能受到一定的抑制,同时细胞骨架的结构受到影响;而在下调的基因中,有多个与细胞趋化及细胞运动相关的基因,如 CCL7、CCL8、CCL1 等下调,这会导致细胞的趋化运动能力减弱^[15],而 TBA1B 编码的蛋白与微管的组装有关^[16]。因此它们的下调,可能是导致 imDCs 摄取抗原之后无法到达二级淋巴组织的原因之一。

表 1 imDCs 与 Bel 7402 肝癌细胞共培养后的差异表达基因

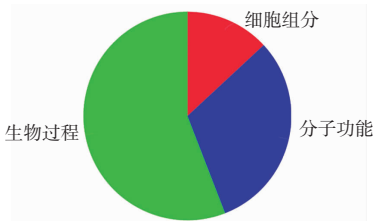
Tab.1 Differentially expressed genes of imDCs co-cultured with Bel 7402 hepatocellular carcinoma cells

上调基因	下调基因
VEGFA;FZD7;VEGFB;KRT15; BICD1;KRT2;PDLIM5; CORO2A;PDLIM5;MYO1G; FLNC;ABLIM1;POF1B;LIL- RA2;LILRA3;ACTN4;ACTN2	CCL7;CCL8;CCL1;ACTR3; RDX;PFN1;TPM3;CAPZA1; CAPZA2;YWHAH;CCL2; STMN1;CENPJ;TUBA1B; ARPC5;CENPF;LIMA1;TTL; TGFB1

2.3 差异基因的 GO 功能分析

为了进一步探究这些差异基因的生物学功能,对差异表达基因进行 GO 的统计分析。图 3 展示了所查基因对应的 GO 注释在三大分类中的分布情况。其中 55.9%涉及生物过程,31%为细胞组分,剩余 13.1%参与分子功能。表 2 和表 3 分别列出了 3 种 GO 类型最可能(P 值最小)的 10 条上调和下调基因的 GO 分类。结果显示,imDCs 与肝癌细胞共培养后,细胞凋亡、信号转导、免疫应答及黏附功能等相关基因的表达上调,如 FOXO3、MAPK7、LILRA2、ACTN2 等,这些基因的表达产物主要分布在细胞核、细胞膜、胞质、细胞外基质以及线粒体中,它们的上调不仅使 imDCs 的免疫应答能力受到

抑制^[11],而且能够加速细胞凋亡^[17],这可能导致 imDCs 摄取抗原之后还未迁移到二级淋巴组织就发生了凋亡,无法启动特异性免疫应答。另外,与 imDCs 分化增殖、转录相关基因的表达下调,如 E2F8、SPC25 等。这些基因的下调可能导致 DCs 的增殖分裂能力明显降低。



绿色代表生物过程,红色代表细胞组分,蓝色代表分子功能

图 3 与 Bel 7402 共培养的 imDCs 差异基因 GO 分析图

Fig.3 GO mapping of differentially expressed genes of imDCs co-cultured with Bel 7402

表 2 imDCs 与 Bel 7402 共培养后上调基因的 GO 分析

Tab.2 GO Term analysis of the up-regulated mRNAs (imDC+Bel 7402)

名称	基因数目	P 值	Q 值
GO:0005515 蛋白结合	95	1.44E-80	4.45E-79
GO:0008270 锌离子结合	38	1.59E-35	1.23E-34
GO:0046872 金属离子结合	41	6.37E-30	3.59E-29
分 GO:0005509 钙离子结合	25	4.34E-29	2.24E-28
子 GO:0003700 转录因子活性	21	7.29E-23	3.23E-22
功 GO:0005524 ATP 结合	23	1.95E-22	8.07E-22
能 GO:0000166 核苷酸结合	26	6.19E-22	2.26E-21
GO:0004872 受体活性	23	4.65E-20	1.60E-19
GO:0016740 转移酶活性	21	7.67E-18	2.27E-17
GO:0043565 特定序列 DNA 结合	12	1.14E-13	2.63E-13
GO:0006355 依赖 DNA 的转录调节	37	5.95E-34	4.10E-33
GO:0007165 信号转导	34	4.47E-24	2.13E-23
GO:0006350 转录	24	3.23E-17	8.70E-17
生 GO:0055114 氧化还原	14	7.79E-16	1.93E-15
物 GO:0006915 细胞凋亡	13	1.99E-12	4.11E-12
过 GO:0006955 免疫应答	13	2.32E-12	4.64E-12
程 GO:0008285 细胞增殖负调控	8	2.43E-10	4.44E-10
GO:0007275 细胞发育	16	9.83E-10	1.56E-09
GO:0007155 细胞黏附	10	2.69E-09	3.87E-09
GO:0006468 氨基酸蛋白磷酸化	9	1.55E-08	1.96E-08
GO:0005634 细胞核	87	1.55E-83	9.61E-82
GO:0005737 细胞质	89	2.01E-74	4.16E-73
GO:0016021 整合膜	65	1.31E-52	2.03E-51
细 GO:0016020 细胞膜	65	8.80E-45	1.09E-43
胞 GO:0005576 胞外区	43	2.25E-44	2.32E-43
组 GO:0005886 质膜	51	2.77E-44	2.46E-43
分 GO:0005615 细胞外隙	23	6.58E-31	4.08E-30
GO:0005887 整合质膜	22	3.01E-22	1.16E-21
GO:0005730 核仁	16	7.32E-20	2.39E-19
GO:0005794 高尔基体	17	4.28E-18	1.33E-17

表 3 imDCs 与 Bel 7402 共培养后下调基因的 GO 分析
Tab.3 GO Term analysis of the down-regulated mRNAs
(imDC+Bel 7402)

名称	基因数目	P 值	Q 值
GO:0005515 蛋白质结合	299	2.33E-297	9.51E-295
GO:0000166 核苷酸结合	129	1.16E-146	2.37E-144
GO:0005524 ATP 结合	87	1.51E-99	2.06E-97
分 GO:0003723 RNA 结合	55	1.81E-67	1.48E-65
子 GO:0016740 转移酶活性	56	3.10E-48	1.69E-46
功 GO:0008270 锌离子结合	58	8.66E-43	3.93E-41
能 GO:0016787 水解酶活性	57	1.62E-42	6.96E-41
GO:0003677 DNA 结合	54	2.54E-38	9.87E-37
GO:0046872 金属离子结合	63	3.48E-34	1.14E-32
GO:0016874 连接酶活性	25	1.12E-29	3.15E-28
GO:0007049 细胞周期	62	3.30E-73	3.38E-71
GO:0051301 细胞分裂	45	9.50E-72	8.65E-70
GO:0007067 有丝分裂	32	5.22E-48	2.68E-46
GO:0008380 RNA 剪接	32	6.68E-45	3.22E-43
GO:0006355 依赖 DNA 的转录调节	55	5.16E-39	2.11E-37
GO:0006974 对 DNA 损伤刺激的应答	29	1.87E-37	6.98E-36
GO:0006281 DNA 修复	27	7.08E-37	2.52E-35
GO:0006260 DNA 复制	25	5.36E-34	1.69E-32
GO:0031145 后期促进复合物依赖的蛋白酶体进行泛素依赖的蛋白质降解	18	7.02E-34	2.13E-32
GO:0006350 转录	52	7.80E-34	2.28E-32
GO:0005634 细胞核	321	0	0
GO:0005737 细胞质	212	4.76E-177	1.30E-174
GO:0005739 线粒体	88	9.70E-111	1.59E-108
细 GO:0005829 细胞质基质	64	3.53E-74	4.14E-72
胞 GO:0016020 细胞膜	117	6.70E-66	4.99E-64
组 GO:0005730 核仁	48	3.18E-62	2.18E-60
分 GO:0005654 核质	50	7.06E-59	4.46E-57
GO:0016021 整合膜	87	9.83E-49	5.76E-47
GO:0005783 内质网	38	1.09E-36	3.73E-35
GO:0005759 线粒体基质	19	4.31E-25	9.81E-24

2.4 差异基因的 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 相关信号通路分析

为深入探究肝癌微环境影响 imDCs 基因表达谱的分子机制,对差异基因进行了 KEGG 分析,结果显示有 159 条信号通路与差异表达基因相关(表 4 和表 5)。其中,涉及信号转导、细胞运动、免疫应答的多条信号通路上调,如 MAPK、mTOR 以及黏着斑信号通路。而与细胞分化增殖,如细胞周期、蛋白及核苷酸代谢等的一些信号通路则表现为下调。MAPK 及 mTOR 通路能够抑制 DCs 的分化、成熟,同时抑制 DCs 激活肿瘤特异性效应 T 细胞应答,促使 Treg 细胞生成^[18-20]。因此肝癌微环境中的某些物质,可能通过这些通路,引起 imDCs 免疫应答、增殖分化、黏附^[21]、代谢^[22]发生改变,这进一步确定

了肝癌微环境能够对 imDCs 免疫功能和运动能力造成影响。

表 4 imDCs 与 Bel 7402 共培养后上调基因的 KEGG
相关信号通路分析

Tab.4 KEGG pathway analysis of the up-regulated mRNAs (imDCs+Bel 7402)

上调通路	基因数目	P 值	Q 值
膀胱癌	6	6.77E-08	1.02E-06
细胞因子与细胞因子受体相互作用	10	9.82E-07	6.20E-06
MAPK 信号通路	10	1.52E-06	8.68E-06
黏着斑	8	1.03E-05	3.84E-05
补体及凝血级联反应	5	2.64E-05	7.38E-05
肾细胞癌	5	3.04E-05	8.28E-05
肾素 - 血管紧张素系统	3	8.07E-05	1.70E-04
mTOR 信号通路	4	1.39E-04	2.64E-04
花生四烯酸代谢	4	1.99E-04	3.36E-04
氮代谢	3	2.34E-04	3.60E-04

表 5 imDCs 与 Bel 7402 共培养后下调基因的 KEGG
相关信号通路分析

Tab.5 KEGG pathway analysis of the down-regulated mRNAs (imDCs+Bel 7402)

下调通路	基因数目	P 值	Q 值
细胞周期	25	4.91E-25	1.65E-23
蛋白酶体	12	1.09E-13	1.11E-12
嘧啶代谢	13	2.77E-11	2.04E-10
DNA 聚合酶	9	1.36E-10	8.63E-10
嘌呤代谢	14	1.38E-09	7.54E-09
缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸降解	9	1.44E-09	7.72E-09
错配碱基修复	7	3.48E-09	1.78E-08
碱基切除修复	8	4.08E-09	2.04E-08
同源重组	7	1.61E-08	7.54E-08
p53 信号通路	9	5.97E-08	2.50E-07

2.5 与肝癌相关的差异基因

为了解差异基因与肝疾病的关系,将明显差异的基因录入 MAS 3.0 系统进行疾病分析(数据来源于 Gene Cards、GAD)。结果显示,上下调的基因中有 45 个与肝疾病相关,其中有 27 个基因与肝癌相关(表 6)。大部分基因产物参与糖、蛋白质的代谢,如 FBPI、LAP3 等。另外,DUSP4、DKK1、CDKN2B 等基因产物参与多条信号通路转导,如 MAPK、Wnt、TGF-β 信号通路等。通过 Gene Cards 数据库查询,其中的 FZD7、FBPI、FOXMI 基因在肝癌的发生发展中十分重要,Novoseek 评分分别为 46、17.3、14.9。根据 Gene Cards 数据库中的注释,Novoseek 评分通过对大量文献挖掘和计算,其高低一定程度上反应该基因在某疾病中的重要性。而 SERPINA1、LAP3 与肝疾病的发生发展相关,Novoseek 评分分别为 67.6、0;其余

基因,如 CA12、CCNG2、E2F2 等均与肿瘤的发生发展、预后相关。另外,PLSCR1 基因产物有抗乙肝病毒活性的作用,而乙型肝炎病毒感染是诱发肝癌的重要因素^[23],所以该基因的下调,可能进一步加快了乙型肝炎发展而来的肝癌的病情的进展。因此,以下基因的差异表达,尤其是 FZD7、FBP1、FOXM1 基因在肝癌的发生发展中起着重要的调控作用。

表 6 imDCs+Bel 7402 共培养后差异基因的疾病分析

Tab.6 Disease analysis of the deferentially expressed mRNAs (imDCs+Bel 7402)

上调基因	下调基因
GLG1;FZD7;CA12;CLK3;	E2F2;IFNG;PSMA4;KIAA0020;
FBP1;CCNG2;DUSP4;	HSPA14;LAP3;PSMC1;CALM2;
SERPINA1;SERPINB2;	CIRBP;RFC3;PLSCR1;FOXM1;
CDKN2B	HSPA9;CCNE1;DAPK1;MARS;AUH

2.6 差异基因的转录因子分析

为深入了解 imDCs 差异基因上下调的调控因素,通过 MAS 3.0 系统对转录因子进行了分析,数据来源于 TRANSFAC 数据库,结果表明有 21 个转录因子参与差异基因的调控,其中,FBP、E2F2、FOXM1 这 3 个基因编码的转录因子参与调控与肝癌相关差异基因的表达(表 7)。在肝癌中,转录因子 FBP 与 c-myc 原癌基因启动子结合,间接地抑制细胞周期的负调控因子以及细胞凋亡基因的转录,降低肿瘤细胞的凋亡速度^[24];转录因子 FOXM1b、HNF-3、TGT3 为同一转录因子的不同别称,它促进细胞的增殖分化,但并不诱导肝癌的发生^[25]。因此,它们的表达对于肝癌细胞增殖分化以及生命周期的调控是必不可少的因素。而 E2F2 作为一种转录激活因子,广泛地参与各种细胞周期中 DNA 的复制,多项研究表明下调肿瘤组织中的 E2F2 可以抑制肿瘤的生长,带来良好预后^[26]。综上,FBP1、FOXM1 编码的转录因子,与肝癌相关基因的调控更具有相关性,而 E2F2 的差异表达,有助于调控癌症的进展。

表 7 参与调控与肝癌相关差异基因的转录因子

Tab.7 Transcription factor analysis of the deferentially expressed mRNAs

基因	TF名称	同义名称
FBP1	FBP	FUSE-binding protein
E2F2	E2F-2	E2F-2
	FOXM1b	HFH-11B
FOXMI	HNF-3	Hepatocyte Nuclear Factor 3; HNF3
	TGT3	TGT3

3 讨 论

肝癌是世界常见的恶性肿瘤之一,病情发展迅速,手术、介入及放化疗疗效欠佳^[27]。近几十年来人

们不断探索更有效的治疗方法,基于 DCs 的抗肿瘤疫苗被认为是 1 个非常具有潜力的研究领域。2010 年,第一个 FDA 批准的 DCs 免疫治疗疫苗(Sipuleucel-T)投入临床使用,用于治疗去势抗性转移前列腺癌^[28]。然而这一治疗方法的临床应用仍面临许多困难^[29]。正常情况下,imDCs 在外周组织接受抗原刺激后迁移到二级淋巴组织发挥免疫效应,在此过程中逐渐分化为 mDCs^[3],然而过继回输到荷瘤宿主体内的 DCs 只有不到 1%迁移到二级淋巴组织,造成机体不能有效地启动抗肿瘤的特异性免疫应答^[30]。因此,研究肝癌细胞微环境中不同分化阶段 DCs 的生物物理特性及免疫功能的分子机制,可为研发更有效的基于 DCs 的抗肝癌疫苗提供理论依据和技术支持。

本实验研究肝癌细胞微环境中对 imDCs 的影响,分析了肝癌微环境中 imDCs 的基因表达变化。通过 GO 分析,发现与 Bel 7402 肝癌细胞共培养后,imDCs 中涉及信号转导、免疫应答的基因发生了上调,如 MAPK7、LILRA2,说明在肝癌微环境中,imDCs 信号转导能力增强。这可能与摄取和处理抗原信号有关。与细胞凋亡有关的基因上调,如 MAPK7、PLEKHF1 基因,这可能诱使 imDCs 的凋亡加速。

细胞的运动涉及多基因的参与,在细胞免疫功能的发挥过程中起着关键作用^[31]。通过在 Gene Cards 数据库中对与细胞迁移相关的差异基因进行检索,发现 KRT15、KRT2、BICD1、VEGFA 和 VEGFB 等基因的上调不仅意味着 imDCs 细胞完整性得以维持,并且调控 imDCs 各种免疫功能。其中一些基因产物,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可促进肿瘤细胞的免疫逃逸,已成为抗肿瘤生物治疗的重要靶点^[32]。VEGF 在 TME 中浓度高于正常组织,它除了能够促进肿瘤中新生血管的生成以外,对于大多数免疫细胞都有抑制作用^[33]。许多疾病中,VEGF 能够通过抑制 DCs 的成熟、分化和迁移,从而降低机体免疫系统对疾病的应答能力^[34-36]。比如,VEGF 可以通过抑制 DCs 分泌 IL-12;降低 DCs 表面一些共刺激分子(如 CD80)的表达;提高 DCs 中 ERK2、ERK1 的磷酸化等途径,抑制骨髓来源的 DC 的分化成熟以降低其激活 T 细胞特异性免疫应答的能力^[36]。此外,本实验中,多个参与细胞趋化、细胞骨架解离/聚合的基因,如 CCL7、CENPF、

LIMA1 和 TTL 等则发生下调。上述基因的改变,说明受肝癌微环境的影响,imDCs 的运动能力受到损害,生命周期缩短,免疫功能受到抑制。这些基因也许是解释肿瘤患者 imDCs 无法到达二级淋巴组织发挥免疫效应的关键所在。

有研究指出,MAPK 与 mTOR 通路两者间也可相互作用,调控细胞的细胞分化增殖、代谢和运动^[37]。另外,黏着斑信号通路也参与多条信号通路的调控,调节细胞的黏附、迁移和凋亡^[38]。通过 KEGG 分析,发现 MAPK、mTOR 以及黏着斑信号通路均上调,这说明肝癌微环境的某些因素,可能通过 MAPK、mTOR、黏着斑信号通路,影响 imDCs 的分化和成熟,抑制 imDCs 的免疫功能。

目前已知,肝癌组织中的某些物质,如肌醇等,可以通过 mTOR 等通路引起肿瘤代谢重构,导致代谢紊乱,例如使肝癌组织中的花生四烯酸含量增多^[39]。而花生四烯酸产物能够抑制 DCs 的分化、表面分子表达、细胞因子分泌以及激活效应 T 细胞能力^[39-41]。本研究中,花生四烯酸代谢通路发生上调,另外,补体激活通路上调,嘧啶代谢、嘌呤代谢以及一些氨基酸代谢通路发生下调,因此,说明肝癌微环境中的一些异常代谢产物可能通过特定通路干扰 imDCs 的正常代谢,影响 imDCs 的分化和成熟,使其凋亡加速以及免疫功能受到抑制。另外,肝癌相关的差异基因分析结果中,也多为参与糖、蛋白质、核苷酸的代谢的基因,如 DUSP4、DKK1、CDKN2B 等基因,这进一步说明了肝癌的发生发展与 imDCs 代谢的改变密切相关。因此,癌症的异常代谢环境中 imDCs 的代谢特点可能是一个值得探索的研究方向。

通过转录因子分析,得到在差异基因中与肝癌相关的转录因子 FBP、E2F-2、FOXM1b。其中,FBP 参与糖代谢,其水平增高可诱导肝癌细胞增殖,FBP 作为转录因子,调控基因转录稳定性,促进 c-myc 等癌基因的表达^[42]。其余基因所对应的转录因子多参与基因的转录以及细胞凋亡基因的调控。因此,这些转录因子可能是影响 imDCs 的生物学性状及免疫功能的一些关键性的上游信号。

综上所述,本实验从分子生物学的角度分析了肝癌微环境中 imDCs 的基因变化,发现其对 imDCs 的影响是一个多基因、多环节的过程,imDCs 中某些

信号通路和基因的上下调,以及一些细胞运动和代谢相关的基因的差异表达,可能与肝癌细胞微环境的某些因素密切相关,并且也影响着肝癌的发生、发展及预后。深入了解影响这些基因变化的因素,以及这些基因使 imDCs 运动能力受损、代谢改变、凋亡加速及免疫功能改变的机制,是提升 DCs 抗肿瘤疫苗疗效的一个有价值的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Steinman RM. Decision about dendritic cells—past present and future[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30(4): 1–22.
- [2] Sagar D, Foss C, El Baz R. Mechanisms of dendritic cell trafficking across the blood–brain barrier[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(1): 74–94.
- [3] Yang M, Galina VS, Zhu PY, et al. Dendritic cells in the cancer microenvironment[J]. *J Cancer*, 2013, 4(1): 36–44.
- [4] Fridman WH, Remark R, Goc J. The immune microenvironment: a major player in human cancers[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2014, 164(1): 13–26.
- [5] Benencia F, Sprague L, McGinty J, et al. Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012(2): 1–15.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Zheng Q, Long J, Jia B, et al. Transforming growth factor- β 1 deteriorates microrheological characteristics and motility of matured dendritic cells in concentration-dependent fashion[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014, 56(1): 25–40.
- [9] 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]. *Biomech*, 2010, 43(12): 2339–2347.
- [10] 曾 柱, 龙金华, 陈 琳. 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(12): 1773–1778.
- [11] Lu HK, Mitchell A, Endoh Y, et al. LILRA2 selectively modulates LPS-mediated cytokine production and inhibits phagocytosis by monocytes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33478.
- [12] Khanom R, Sakamoto K, Pal SK, et al. Expression of basal cell keratin 15 and keratin 19 in oral squamous neoplasms represents diverse pathophysiologies[J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(7): 949–959.
- [13] Agarwal N, Adhikari AS, Iyer SV, et al. MTBP suppresses cell mi-

- gration and filopodia formation by inhibiting ACTN4s[J].Oncogene,2013,24,32(4):462-470.
- [14] Watanabe T,Ueno H,Watabe Y,et al.ACTN4 copy number increase as a predictive biomarker for chemoradiotherapy of locally advanced pancreatic cancer[J].Br J Cancer,2015,112(4):704-713.
- [15] Alvarez D,Vollmann EH,von Andrian UH.Mechanisms and consequences of dendritic cell migration[J].Immunity,2008,29(3):325-342.
- [16] Corena-McLeod M,Walss-Bass C,Oliveros A,et al.New model of action for mood stabilizers:phosphoproteome from rat pre-frontal cortex synaptoneurosomal preparations[J].PLoS One,2013,8(5):e52147.
- [17] Tao GZ,Lehwalld N,Jang KY,et al.Wnt/ β -catenin signaling protects mouse liver against oxidative stress-induced apoptosis through the inhibition of forkhead transcription factor FoxO3[J].J Biol Chem,2013,288(24):17214-17224.
- [18] Lu Y,Zhang M,Wang S,et al.P38 MAPK-inhibited dendritic cells induce superior antitumor immune responses and overcome regulatory T-cell-mediated immunosuppression[J].Nat Commun,2013,5(6):1-14.
- [19] Husaarts L1,Smits HH,Schramm G,et al.Rapamycin and omega-1:mTOR-dependent and -independent Th2 skewing by human dendritic cells[J].Immunol Cell Biol,2013,91(7):486-489.
- [20] Katholnig K,Linke M,Pham H,et al.Immune responses of macrophages and dendritic cells regulated by mTOR signalling[J].Biochem Soc Trans,2013,41(4):927-933.
- [21] Rhee I,Zhong MC,Reizis B,et al.Control of dendritic cell migration,T cell-dependent immunity,and autoimmunity by protein tyrosine phosphatase PTPN12 expressed in dendritic cells[J].Mol Cell Biol,2014,34(5):888-899.
- [22] Pearce EJ,Everts B.Dendritic cell metabolism[J].Nat Rev Immunol,2015,15(1):18-29.
- [23] Yang J,Zhu X,Liu J,et al.Inhibition of Hepatitis B virus replication by Phospholipid scramblase 1 in vitro and in vivo[J].Antiviral Res,2012,94(1):9-17.
- [24] Rabenhorst U,Beinoraviciute-Kellner R,Brezniceanu ML,et al.Overexpression of the far upstream element binding protein 1 in hepatocellular carcinoma is required for tumor growth[J].Hepatology,2009,50(4):1121-1129.
- [25] Gartel AL.Targeting FOXM1 auto-regulation in cancer[J].Cancer Biol Ther,2015,16(2):185-186.
- [26] Iwasaki T,Tanaka K,Kawano M,et al.Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells[J].Int J Oncol,2015,46(4):1543-1550.
- [27] Lin S,Hoffmann K,Schemmer P.Treatment of hepatocellular carcinoma:a systematic review[J].Liver Cancer,2012,1(3):144-158.
- [28] Raval RR,Sharabi AB,Walker AJ,et al.Tumor immunology and cancer immunotherapy:summary of the 2013 SITC primer[J].J Immunother Cancer,2014,2(1):1-11.
- [29] H Yi D,Appel S.Current status and future perspectives of dendritic cell-based cancer immunotherapy[J].Scand J Immunol,2013,78(2):167-171.
- [30] Steinman RM,Banchereau J.Taking dendritic cells into medicine[J].Nature,2007,449(9):419-426.
- [31] Teixeira A,Russo E,Halin C.Taking the lymphatic route:dendritic cell migration to draining lymph nodes[J].Semin Immunopathol,2014,36(2):261-274.
- [32] Finley SD,Popel AS.Effect of tumor microenvironment on tumor VEGF during anti-VEGF treatment:systems biology predictions[J].J Natl Cancer Inst,2013,105(11):802-811.
- [33] Morfioise F,Kuchnio A,Frainay C,et al.Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translocation-mediated mechanism[J].Cell Rep,2014,6(1):155-167.
- [34] Zanini A,Spanevello A,Baraldo S,et al.Decreased maturation of dendritic cells in the central airways of COPD patients is associated with VEGF,TGF- β and vascularity[J].Respiration,2014,87(3):234-242.
- [35] Hong CH,Lee CH,Chen GS,et al.STAT3-dependent VEGF production from keratinocytes abrogates dendritic cell activation and migration by arsenic:a plausible regional mechanism of immunosuppression in arsenical cancers[J].Chem Biol Interact,2015(227):96-103.
- [36] Gulubova M,Ivanova K,Ananiev J,et al.VEGF expression,microvessel density and dendritic cell decrease in thyroid cancer[J].Biotechnology and Biotechnological Equipment,2014,28(3):508-517.
- [37] Mendoza MC,Er EE,Blenis J.The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways:cross-talk and compensation[J].Trends Biochem Sci,2011,36(6):320-328.
- [38] Cho W,Kim H,Lee JH.Syntenin is expressed in human follicular dendritic cells and involved in the activation of focal adhesion kinase[J].Immune Netw,2013,13(5):199-204.
- [39] Beyoğlu D,Imbeaud S,Maurhofer O,et al.Tissue metabolomics of hepatocellular carcinoma:tumor energy metabolism and the role of transcriptomic classification[J].Hepatology,2013,58(1):229-238.
- [40] Teague H,Rockett BD,Harris M,et al.Dendritic cell activation,phagocytosis and CD69 expression on cognate T cells are suppressed by n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids[J].Immunology,2013,139(3):386-394.
- [41] Draper E1,Reynolds CM,Canavan M,et al.Omega-3 fatty acids attenuate dendritic cell function via NF- κ B independent of PPAR γ [J].J Nutr Biochem,2011,22(8):784-790.
- [42] Ma J,Chen M,Xia SK,et al.Prostaglandin E2 promotes liver cancer cell growth by the upregulation of FUSE-binding protein 1 expression[J].Int J Oncol,2013,42(3):1093-1104.

(责任编辑:关蕴良)