

· 论 著 ·

IL-6 抑制 LPS 诱导的小鼠髓源性 DCs 成熟的实验研究

赵永亮,余佩武,罗华星,雷 晓,刘 伟,饶 芸

(第三军医大学西南医院普外科,重庆 400038)

摘要:目的 观察白细胞介素-6(IL-6)对于内毒素(LPS)诱导的小鼠髓源性树突状细胞(DC)成熟效应的抑制作用。方法 分离小鼠骨髓细胞,采用黏附法结合 GM-CSF 和 IL-4 刺激法在体外培养髓源性 DCs(BMDCs)。用相差倒置显微镜观察 BMDCs 的形态特点。用 LPS 诱导 DC 成熟。采用 FACS 结合混合淋巴细胞反应,观察 IL-6 处理与否,LPS 诱导的 BMDCs 在表型和刺激同种淋巴细胞增殖功能上的变化。结果 形态观察和 FACS 分析的结果表明:体外成功培养了纯度较高的高表达 CD11c 的 BMDCs,LPS 能明显诱导 BMDCs 表面 MHC-II 类分子和共刺激分子 CD40 的表达上调;而经过 IL-6 处理后,LPS 诱导 BMDCs 表面 CD80、CD86、CD40 表达上调的能力被显著削弱($P<0.05$)。混合淋巴细胞反应显示,与单独用 LPS 处理的 BMDCs 相比,经 IL-6 处理后的 BMDCs 刺激同种淋巴细胞增殖的能力明显减弱,并呈剂量依赖关系($P<0.05$)。结论 IL-6 能明显抑制 LPS 诱导的 BMDCs 成熟,可能是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一。

关键词:髓源性树突状细胞;白细胞介素-6;脂多糖

中图分类号:R730.2;R-332

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)08-0911-03

Suppression effect of IL-6 on the maturation of mouse bone marrow derived dendritic cells induced by LPS

ZHAO Yong-liang, YU Pei-wu, LUO Hua-xing, et al.

(Department of General Surgery, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the suppression effect of IL-6 on the maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) induced by LPS. **Methods** To obtain immature BMDCs, mouse bone marrow cells were isolated and cultured in complete culture medium containing GM-CSF and IL-4 following the removal of the nonadherent cells. The cell morphology was observed by using a phase contrast inverted microscope. The maturation of BMDCs was induced by LPS. The expression of surface costimulation molecules on LPS-treated BMDCs with or without IL-6 treatment was analyzed by fluorescence activated cell sorter (FACS). The stimulation ability on allogeneic T cells of LPS-treated BMDCs in the presence or absence of IL-6 was evaluated by allogeneic mixed lymphocyte reaction (MLR). **Results** DCs were generated from mouse bone marrow with normal morphology and high purity. Compared with BMDCs incubated with LPS only, LPS-treated DCs cultured in the presence of IL-6 expressed much lower levels of CD40, CD80 and CD86, and exhibited much weaker activity in stimulating the proliferation of allogeneic T cells ($P<0.05$). **Conclusion** IL-6 exerts a negative effect on the maturation and immunologic functions of BMDCs induced by LPS.

Key words: bone marrow derived dendritic cells (BMDCs); interleukin (IL-6); lipopolysaccharide (LPS)

树突状细胞(dendritic cells, DCs)作为机体内功能最强大的抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs),在诱导和维持机体抗肿瘤特异性免疫应答中具有核心作用。DC 的免疫刺激功能在很大程度上取决于其成熟度,成熟 DC (mature DCs, mDCs) 因为其高表达多种共刺激分子和黏附分子,主要诱导免疫激活;而未成熟 DCs (immature DCs, iDCs) 由于缺乏甚至不表达共刺激分子,不能活化 T 细胞而是诱导 T 细胞的无能 and 凋亡,与免疫耐受的产生有关。大量资料表明,肿瘤组织中 DC 分化成熟障碍所致的 mDC 数量和功能异常,是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一^[1]。目前有研究提示肿瘤微环境中的多种免疫抑制性细胞因子如 IL-10、TGF- β 、VEGF 等与肿瘤组织中 DC 分化与成熟障碍有关^[2]。IL-10 是最先被发现能显著抑制 DC 表面共刺激分子表达的细胞因子^[3]。在临床肿瘤患者的研究中发现 VEGF 能够抑制 DC 分化成熟,高血清水平的 VEGF 与外周血 iDCs 比例异常增加有关^[4]。

IL-6 是一种多功能的细胞因子,在免疫调节、血细胞生成、炎症和肿瘤发生等方面发挥重要的作用。其受体属于促红细胞受体超家族,广泛表达在淋巴样、非淋巴样细胞的表面。IL-6 和 IL-6R 的异常表达参与了多发性骨髓瘤、自身免疫疾病和前列腺癌的发生^[5]。大量研究显示:大多数肿瘤细胞可分泌

IL-6,而且高血清水平的 IL-6 与肿瘤恶变及不良预后密切相关^[6]。在多发性骨髓瘤患者体内发现了 DC 的数量、表型及功能异常与骨髓瘤本身过度分泌 IL-6 密切相关^[7]。肾细胞癌细胞系通过 IL-6 依赖的机制抑制 CD34⁺ 造血干细胞分化为 DCs。对于其他疾病如 AIDS 的研究也同样发现,IL-6 的过量表达与免疫抑制有关。这些研究不仅表明了 IL-6 具有免疫抑制功能,而且间接提示 IL-6 可能通过抑制 DC 的正常分化与成熟,来实现其免疫抑制。IL-6 对于 DC 分化成熟究竟有着怎样的影响及其相关的分子机制还不清楚。本研究拟在体外分离培养未成熟的小鼠髓源性 DCs (BMDCs),并用 LPS 诱导 iDCs 成熟,通过 DCs 表型分析及免疫刺激功能检测,观察给予 IL-6 与否,对于 DC 分化成熟产生的影响,为深入研究其相关的分子机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 Balb/c 和 C57BL/6 近交系小鼠,雌性,6~8 周龄,体质量(20 \pm 2)g,均购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 小鼠淋巴细胞分离液为天津 TBD 公司产品。rmGM-CSF、rmIL-4 和 rmIL-6 购自 R&D 公司。LPS (Escherichia coli 026:B6) 购自 Sigma 公司。PE 标记的抗小鼠 CD11c

单克隆抗体(mAb)、FITC 标记的抗小鼠 I-A、CD80、CD86、CD40 mAb 以及相应的同型对照抗体为 BD PharMingen 公司产品。³H-TdR 购自北京同位素公司。

1.3 小鼠 BMDCs 诱导培养与处理 参考 Inaba 等^[8]的方法并稍作改进。简言之, Balb/c 小鼠断颈处死, 无菌条件下取出股骨和胫骨, 用 RPMI-1640 培养基反复冲洗骨髓腔, 冲洗得到的细胞混悬液经 100 目筛网过滤, 用 ACK 裂解缓冲液(0.15 M NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)去除红细胞, 约可得到(4~6)×10⁷骨髓细胞/只。用完全 RPMI-1640 培养基(含 10% FBS, 10 ng/mL rmGM-CSF, 10 ng/mL rmIL-4、青链双抗)悬浮骨髓细胞, 置于一一次性无菌培养瓶中, 37 °C CO₂ 孵箱中孵育。2 d 后更换培养基, 小心吸弃非黏附细胞。以后隔天半量换液, 同时补加 rmIL-4 和 rmGM-CSF, 培养 6 d 可以观察到松散成团的 iDCs, 用相差倒置显微镜观察培养期间的 BMDCs 形态。将收获的 iDCs 用完全 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至 1×10⁶ 个/mL, 分为 A、B 两组, A 组同时加入 LPS (1 μg/mL) 和 mL-6 (50 ng/mL), 而 B 组仅加入 LPS (1 μg/mL) 作为对照。继续培养 24 h 后, 用 FACS 检测细胞表型, 并进行混合淋巴细胞反应。

1.4 流式细胞术分析 DC 表型 DCs 作 Fc 受体封闭处理后, 分别用 PE 标记的抗小鼠 CD11c mAb、FITC 标记的抗小鼠 I-A、CD80、CD86、CD40 以及相应的同型对照抗体与待测细胞室温避光孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次后, 用流式细胞仪分析 BMDCs 各表面分子的表达情况。

1.5 混合淋巴细胞反应 用小鼠淋巴细胞分离液无菌分离 C57BL/6 小鼠脾细胞, 用 ACK 裂解缓冲液(0.15 M NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)去除红细胞后, 洗涤离心, 用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬脾细胞, 并置于培养瓶中, 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 2 h, 取悬浮细胞为反应细胞, 调整细胞浓度至 1×10⁶/mL。于 96 孔板中每孔加入 100 μL 脾细胞悬液, 而后每孔分别加入 100 μL 经 20 Gy 剂量辐照处理后的、不同浓度梯度的 A 组或 B 组的 Balb/c 小鼠 BMDCs 作为刺激细胞(使反应细胞与刺激细胞之比分别为 100 : 1, 10 : 1, 1 : 1)轻柔混匀, 于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 4 d。于培养结束前 18 h, 每孔加入 ³H-TdR 1 μCi; 培养结束后用多头细胞收集仪收集细胞, 用 β 液闪仪测定 cpm 值, 结果以 3 复孔的均值表示。

1.6 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS11.0 统计软件包进行处理, 原始数据作方差齐性检验后作方差分析, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠 BMDCs 的形态观察 经相差倒置显微镜观察, 培养 24 h 可见贴壁细胞形成集落; 第 2~4 天集落逐渐增加, 形如半贴壁的葡萄串状; 第 5~6 天, 集落丰富, 细胞表面突起可见大量细胞脱落。

2.2 IL-6 明显抑制 LPS 诱导的 BMDCs 分化成熟 收获 iDCs, 加入 LPS(1 μg/mL)孵育 24 h, 诱导 DC 成熟。FACS 检测这群 DC 的表面 CD11c、I-A、CD80、CD86 及 CD40 的表达情况。LPS 诱导后的 BMDCs 高表达 CD11c、MHC-II 类分子以及 CD40(图 1), 表明体外培养的 BMDCs 纯度较好, 而且 LPS 能够有效诱导 BMDCs 分化成熟。联合用 LPS 和 IL-6 处理过的 A 组 BMDCs 表面共刺激分子 CD80、CD86、CD40 的表达水平显著低于单独用 LPS 处理后的 B 组 BMDCs (P<0.05)(图

2), 提示 IL-6 对于 LPS 诱导 DC 成熟的过程具有明显的抑制效应。

2.3 经 IL-6 处理后的小鼠髓 BMDCs 对同种淋巴细胞的刺激能力显著减弱 混合淋巴细胞反应显示, 与 B 组 BMDCs 相比, A 组刺激同种淋巴细胞增殖的能力明显减弱 (P<0.05), 并呈剂量依赖关系。提示 IL-6 能明显抑制 BMDCs 刺激同种 T 细胞增殖能力(图 3)。

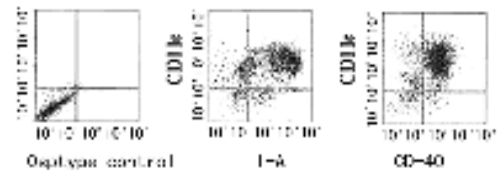


图 1 LPS 诱导 BMDCs 分化成熟

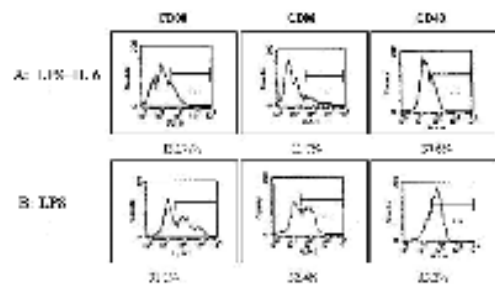


图 2 IL-6 抑制 LPS 诱导的 BMDCs 表面共刺激分子上调

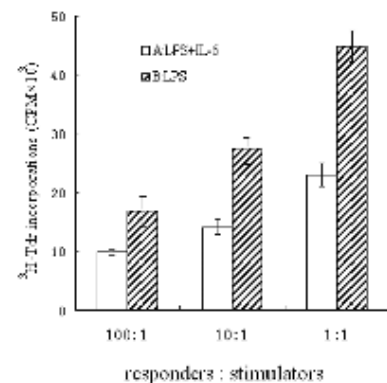


图 3 混合淋巴反应

3 讨 论

DCs 来源于骨髓造血祖细胞(haematopoietic progenitor cells, HPCs), 其前体主要是未成熟髓样细胞(immature myeloid cells, iMCs), iMCs 最终可分化为粒细胞、巨噬细胞和 DCs。DCs 刚离开骨髓时还是 iDCs, iDCs 表面低表达甚至不表达 MHC-II 类分子和共刺激分子如 CD40、CD80 和 CD86。一旦 iDCs 遭遇抗原后, 并在一些活化因子如 LPS 等作用下可分化为 mDCs, 其表面 MHC-I、II 类分子及共刺激分子的表达显著上调。在触发机体 T 细胞反应过程中, 不同成熟阶段的 DC 所表达的特征性表面分子或分泌的不同细胞因子决定了机体发生免疫反应的类型, 包括免疫激活或免疫耐受。过去 10 年中, 人们发现绝大多数肿瘤患者体内的抗肿瘤免疫反应微乎其微, 即便采取主动免疫策略仍难以诱导出有效的肿瘤保护性免疫应答, 这在很大程度上归因于肿瘤自身具有免疫逃逸及诱导机体免疫耐受的能力, 其最重要机制之一就是荷瘤机体内的 DCs 分化成熟障碍, 具体表现为: (1)mDCs 绝对数量减少; (2)iDCs 比例增加但不能上调 MHC-II 类分子和共刺激分子

的表达,也不能产生相应的细胞因子;(3)iMCs 蓄积^[9]。以往的研究表明肿瘤细胞可以产生大量的 IL-6,而这可能与 DC 分化成熟障碍有关,但对于 IL-6 是否调节 DC 分化成熟尚缺乏直接证据。

为了观察 IL-6 对 DC 分化成熟的直接作用,本研究在成功诱导出大量的纯度较高的 CD11c+BMDcs 基础上,利用组合性细胞表面标志和 MLR 来综合判断给予 IL-6 处理与否,LPS 诱导的 DC 成熟情况。LPS 是 G⁻ 细菌的主要致病物质,通常在 DC 培养的后期用 LPS 刺激 24~48 h,便可以诱导 DC 分化成熟,表现为:MHC-II 类分子、共刺激分子和某些黏附分子表达增加,刺激同种异基因 T 细胞增殖能力提高等。本研究通过 FACS 检测证实 iDCs 培养液中仅加入微量的 LPS,短时间内便可诱导得到表型和免疫学功能均相当稳定的 mDCs。MLR 实验结果也表明了由 LPS 诱导成熟的 DC 具有强大的免疫刺激功能。LPS 联合 IL-6 处理组的 DC 表面共刺激分子 CD40、CD80 和 CD86 的表达水平明显低于单独给予 LPS 处理组的 DC,由于这些共刺激分子是 DC 成熟的标志,提示 IL-6 可明显阻止 LPS 诱导的 DC 成熟。MLR 实验也同样表明,IL-6 处理的 DC 和对照组相比,其刺激同种 T 细胞增殖能力显著下降。已有研究证实 DC 在不同分化阶段动态表达 IL-6 的信号传导链 IL-6R,即 gp¹³⁰ 分子^[10]。因此,推测 IL-6 与 DC 表面的 gp¹³⁰ 结合后,启动胞内相应的信号转导级联反应,从而调节 DC 的分化与成熟,其具体的分子机制有待进一步研究。

该实验从 DC 表型和免疫刺激功能等方面证实,IL-6 可以对抗 LPS 诱导 DC 分化成熟,使其具有与不成熟 DC 类似的低水平 CD80、CD86、CD40 表达的免疫表型,并表现出刺激 T 细胞增殖的能力明显减弱。提示 IL-6 是一种 DC 分化抑制性因子,其这种效应可能参与肿瘤免疫逃逸。本研究为 IL-6 抑制 DC 分化成熟提供了一个比较直接的实验证据,并从 IL-6 抑制 DC 分化成熟这一角度部分解释了肿瘤免疫逃逸的机制,同时表明 IL-6 有望作为新的肿瘤治疗靶标。

参考文献:

- [1] Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction[J]. *Adv Cancer Res*, 2004,

92:13.

- [2] Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(12):941.
- [3] McBride JM, Jung T, Vries JE, et al. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses[J]. *Cell Immunol*, 2002, 215(2):162.
- [4] Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo[J]. *Blood*, 1998, 92(11):4150.
- [5] Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later[J]. *Int Rev Immunol*, 1998, 16(3):249.
- [6] Blay JY, Negrier S, Combaret V, et al. Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(12):3317.
- [7] Ratta M, Fagnoni F, Curti A, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6[J]. *Blood*, 2002, 100(1):230.
- [8] Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor[J]. *J Exp Med*, 1992, 176(6):1693.
- [9] Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5):1755.
- [10] Larregina AT, Morelli AE, Kolkowski E, et al. Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants[J]. *Immunology*, 1997, 91(2):303.

(收稿日期:2009-08-23 修回日期:2009-09-29)

(上接第 910 页)

3.3 手术方式选择 手术方式选择的原则:(1)一般行肺叶切除术,如病变累及 2 个肺叶可加做相应肺叶或肺段切除;(2)双侧病变或广泛病变,则可切除病变较重的一侧受累肺叶,其残留症状经内科处理多能得到良好控制^[5]。有文献报道虽然肺段切除可保留较多健康肺组织,但除舌段外,其他部位的支气管扩张以肺叶切除为宜。全肺切除对良性疾病是高风险手术,在支气管扩张的手术治疗中不值得提倡^[6]。本组 1 例患者因左肺毁损,失去正常肺功能而行全肺切除术,术后患者的日常生活完全不能自理。因此,掌握好手术适应证及病变切除的范围,可降低死亡率和并发症的发生率,提高治疗效果。

参考文献:

- [1] 顾恺时. 胸心外科手术学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986:323.
- [2] Prieto D, Bemardo J, Matas MJ, et al. Surgery for bronchi-

ectasis[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2001, 20(1):19.

- [3] L. ucidarme O, Grenier P, Coche E, et al. Bronchiectasis: comparative assessment with thin-section CT and helical CT[J]. *Radiology*, 1996, 200(3):673.
- [4] Kutlay H, Cangir AK, Enon S, et al. Surgical treatment in bronchiectasis: analysis of 166 patients[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002, 21(4):634.
- [5] Mazieres J, Murriss M, Didier A, et al. Limited operation for severe multi-segmental bilateral bronchiectasis[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2):382.
- [6] Ashour M, Kattan K, Rafay MA, et al. Current surgical therapy for bronchiectasis[J]. *World J Surg*, 1999, 23(1):1096.

(收稿日期:2009-11-24 修回日期:2009-12-27)