

卵巢癌细胞与巨噬细胞共培养对B7-H1 表达的影响及机制

熊海玉 马婷婷 王 秦 董晋豫 梁勤东 李紫微 张维理 涂植光*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 为了探讨卵巢癌细胞与巨噬细胞共培养后对B7-H1表达的影响及其可能机制, 利用佛波酯(PMA)诱导THP-1或外周血单核细胞分化为巨噬细胞后, 与人卵巢癌细胞株SKOV3体外非接触共培养24 h, qRT-PCR、Western blot以及流式细胞术分别检测SKOV3与巨噬细胞B7-H1的表达; 进一步利用NF- κ B、JAK2/STAT3、p38 MAPK信号通路的抑制剂作用于共培养体系, 检测B7-H1表达的变化, 以探讨其机制。结果显示, 共培养24 h后, SKOV3及巨噬细胞B7-H1 mRNA和蛋白的表达较非共培养组均显著升高($P<0.05$), 而阻断NF- κ B、JAK2/STAT3、p38 MAPK信号通路后, B7-H1的上调均明显被抑制($P<0.05$)。SKOV3与巨噬细胞共培养后B7-H1的表达升高($P<0.05$), 其机制可能涉及到NF- κ B、JAK2/STAT3、p38 MAPK信号通路的激活。

关键词 卵巢癌; B7-H1; 肿瘤相关巨噬细胞

The Effects of Ovarian Cancer Cells Co-cultured with Macrophages on the Expression of B7-H1 and Its Mechanisms

Xiong Haiyu, Ma Tingting, Wang Qin, Dong Jinyu, Liang Qindong, Li Ziwei, Zhang Weili, Tu Zhiguang*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Education Ministry, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effects of ovarian cancer cells co-cultured with macrophages on the expression of B7-H1 and its possible mechanisms, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treated THP-1 cells or human monocytes were co-cultured with human ovarian cancer cell line SKOV3 for 24 h *in vitro* without direct contact, the expression of B7-H1 in SKOV3 cells and macrophages was detected by qRT-PCR, Western blot and flow cytometry, respectively; In addition, the expression of B7-H1 was also determined after treating the coculture system with inhibitors of NF- κ B, JAK2/STAT3 or p38 MAPK signal pathways. These results suggested that the expression of B7-H1 was significantly elevated at both mRNA and protein levels in SKOV3 and macrophages after coculture for 24 h ($P<0.05$). However, the upregulation of B7-H1 expression was inhibited by blocking NF- κ B, JAK2/STAT3 or p38 MAPK signal pathways ($P<0.05$). SKOV3 cells co-cultured with macrophages promoted the expression of B7-H1 ($P<0.05$), which was possible involved in the activation of NF- κ B, JAK2/STAT3, p38 MAPK signal pathways.

Key words ovarian cancer; B7-H1; tumor-associated macrophages

收稿日期: 2013-07-20 接受日期: 2013-10-11

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81172016)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485759, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com.cn

Received: July 20, 2013 Accepted: October 11, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172016)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485759, E-mail: tuzhiguang@aliyun.com.cn

网络出版时间: 2013-11-12 12:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131112.1242.004.html>

卵巢癌是妇科三大恶性肿瘤之一, 因确诊时大多已为晚期, 5年生存率极低。近年来, 对卵巢癌免疫治疗的研究取得了重大进展, 但临床疗效却不佳。其中, 肿瘤的免疫逃避是重要原因之一。据报道, B7-H1/PD-1参与了卵巢癌的免疫逃避, 有望成为治疗的有效靶点, 但其升高机制尚未完全阐明。B7-H1(也称PD-L1、CD274)是B7家族的新成员, 是一种重要的负性协同刺激分子, 可与T细胞上的受体PD-1结合, 抑制T细胞激活及效应应答, 介导肿瘤的免疫逃避^[1]。Chen等^[2]研究证实, 肝癌组织B7-H1的表达与肿瘤相关巨噬细胞(TAM)显著相关, Bloch等^[3]也发现神经胶质瘤细胞可促进TAM的B7-H1的表达。这些研究表明, 肿瘤与其TAM可能协同促进了B7-H1的表达, 但在卵巢癌中并未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

健康人静脉血由重庆市血液中心提供, 人卵巢癌细胞系SKOV3, 人急性单核细胞白血病细胞系THP-1均由本实验室保存, DMEM培养基及胎牛血清购自Gibco公司, 人外周血单个核细胞分离液购自天津TBD公司, 孔径0.4 μm 的Transwell共培养小室购自Corning公司, 佛波酯(PMA)及抑制剂Bay11-7082、AG490、SB203580均购自碧云天, 抗人B7-H1(PE)、CD14(APC)单克隆抗体及同型对照均购自eBioscience公司, 兔抗人B7-H1单克隆抗体购自Abcam公司, 小鼠抗人 β -Actin抗体、HRP标记山羊抗兔IgG及山羊抗小鼠IgG抗体均购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的分离和诱导 健康人抗凝静脉血用HBSS等体积稀释后, 按照Ficoll密度梯度离心法分离得到外周血单个核细胞(PBMC)。用含10%胎牛血清的DMEM培养基调整PBMC密度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$, 置于6孔板内, 于 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养2 h。之后, 弃去未黏附细胞, 获得单核细胞。分离得到的单核细胞或 $1 \times 10^6/\text{孔}$ 的THP-1细胞用终浓度为320 nmol/L的PMA处理24 h后诱导分化为巨噬细胞。

1.2.2 巨噬细胞与卵巢癌细胞共培养 6孔板中的单核细胞或THP-1细胞经PMA处理24 h, 弃去培养基, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次, 加入新的培养基后在其上放入0.4 μm 的共培养小室并在小室上层铺入 2×10^5 的SKOV3细胞。

1.2.3 qRT-PCR检测B7-H1 收集细胞, 利用Trizol试剂提取总RNA, 逆转录为cDNA, qPCR检测B7-H1 mRNA的表达。内参 β -actin引物序列: 上游5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3', 下游5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3', 扩增产物长度为564 bp。

B7-H1引物序列: 上游5'-GGT GGT GCC GAC TAC AAG-3', 下游5'-ATT GGT GGT GGT GGT CTT AC-3', 扩增产物长度为192 bp。qPCR反应条件: 预变性 95°C 30 s, 变性 95°C 10 s, 退火 64°C 20 s, 延伸 72°C 30 s。

1.2.4 Western blot检测B7-H1蛋白的表达 收集各组细胞, 用预冷的PBS洗3次后提取总蛋白并用BCA法测定蛋白浓度。常规方法进行Western blot, 最后用ECL化学发光法显影成像, 并用Quantity One软件进行图像分析, 计算各组目的条带与内参条带的灰度值之比。

1.2.5 流式细胞术检测B7-H1的表达 收集细胞, 用预冷的PBS洗3次, 重悬后吸取100 μL 细胞悬液分别与5 μL 抗体 4°C 避光孵育30 min, PBS洗3次除去未结合的抗体, 重悬后检测。

1.2.6 抑制NF- κB 、JAK2/STAT3、p38 MAPK信号通路 巨噬细胞与SKOV3细胞分别用5 $\mu\text{mol/L}$ Bay11-7082、50 $\mu\text{mol/L}$ AG490及10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580作用1 h, 之后共培养24 h, 收集细胞, qRT-PCR及Western blot检测B7-H1的表达。

1.2.7 统计学分析 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 19.0软件分析, 根据资料的性质采用配对t检验或方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 共培养上调了巨噬细胞B7-H1的表达

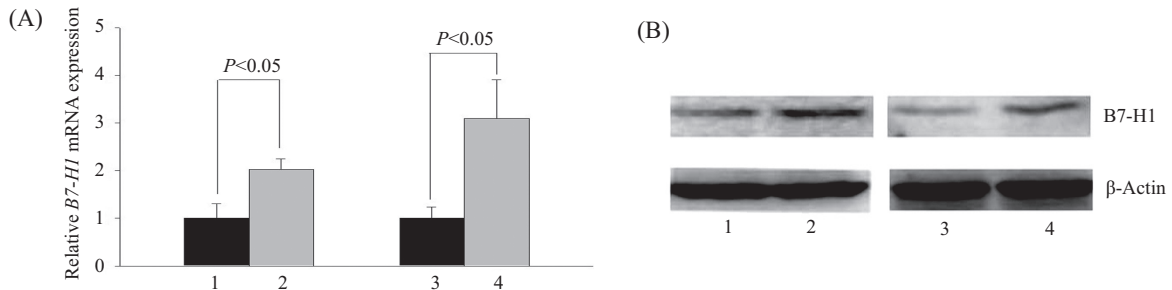
外周血单核细胞来源巨噬细胞或THP-1来源巨噬细胞与SKOV3共培养24 h, B7-H1的mRNA(图1A)和蛋白(图1B、图2A和2C)的表达都显著高于非共培养组($P < 0.05$)。

2.2 共培养促进了卵巢癌细胞SKOV3 B7-H1的表达

人外周血单核细胞或THP-1细胞经PMA诱导分化为巨噬细胞后, 完全去除PMA再与SKOV3共培养24 h, SKOV3细胞B7-H1的表达在mRNA(图3A)和蛋白水平(图3B、图2B和2D)都显著高于非共培养组($P < 0.05$)。

2.3 NF- κB 、JAK2/STAT3和p38 MAPK信号通路对B7-H1表达的影响

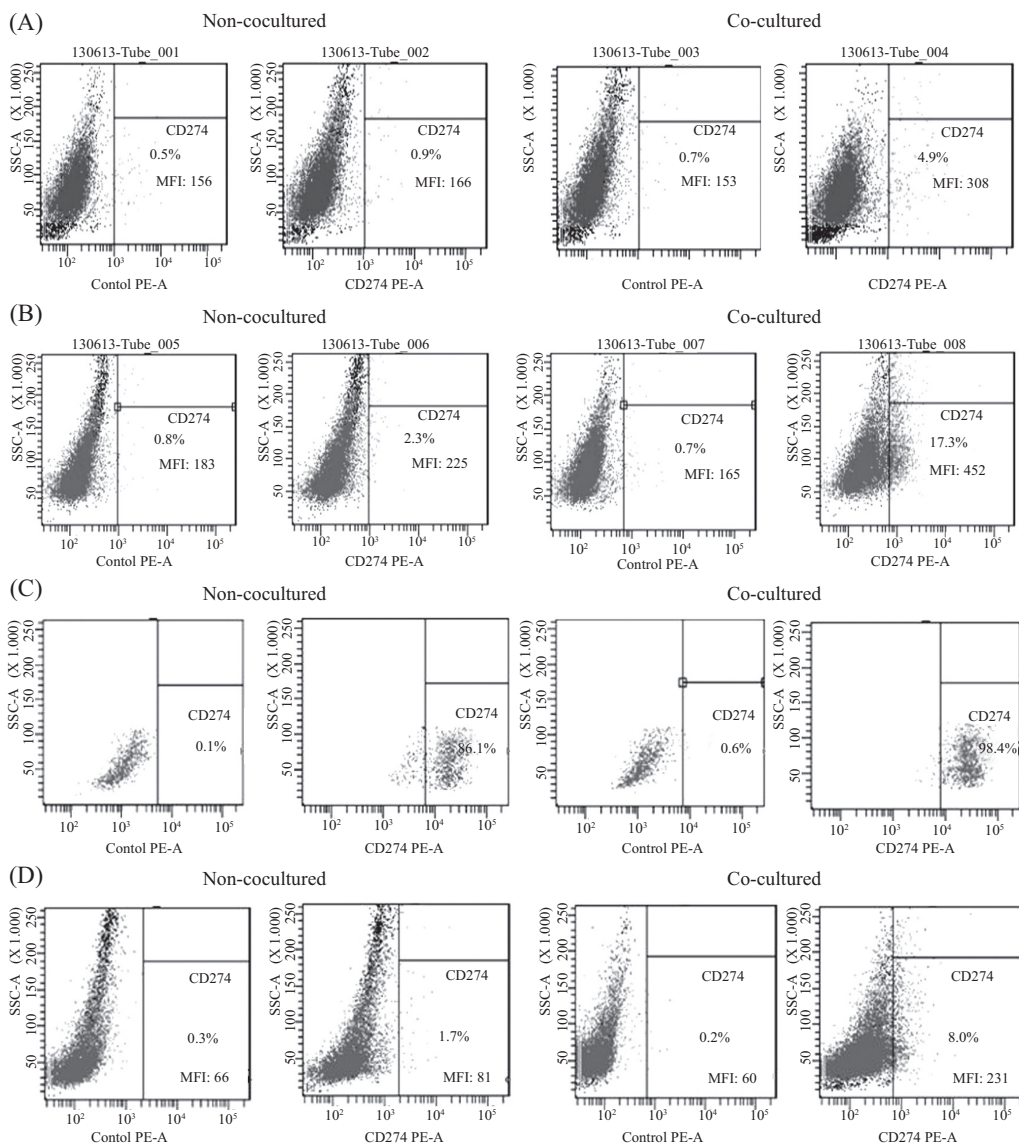
利用NF- κB 、JAK2/STAT3、p38 MAPK的抑制



1: 外周单核来源巨噬细胞; 2: 外周单核来源巨噬细胞与SKOV3细胞共培养后; 3: THP-1来源巨噬细胞; 4: THP-1来源巨噬细胞与SKOV3细胞共培养后。
 1: monocyte-derived macrophages; 2: monocyte-derived macrophages after coculture with SKOV3; 3: THP-1-derived macrophages; 4: THP-1-derived macrophages after coculture with SKOV3.

图1 qRT-PCR(A)和Western blot(B)检测巨噬细胞B7-H1的表达

Fig.1 The expression of B7-H1 in macrophages was detected by qRT-PCR (A) and Western blot (B)

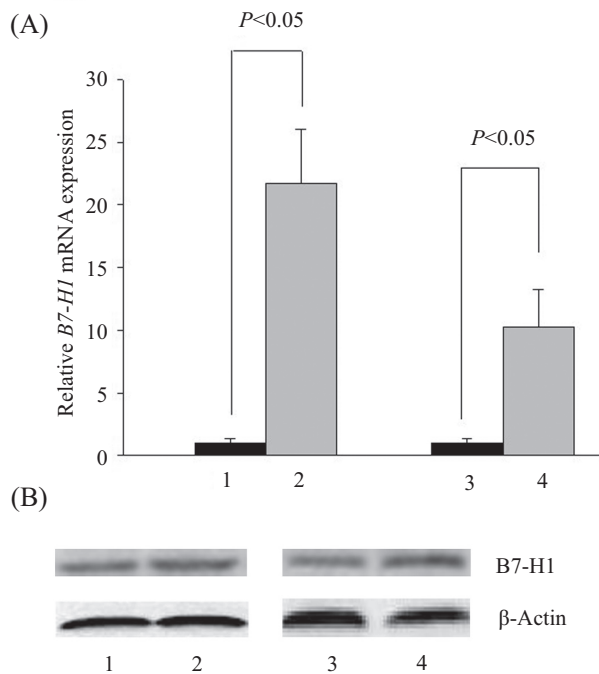


A: THP-1来源巨噬细胞; B: SKOV3细胞; C: 外周单核来源巨噬细胞(图中数据表示CD274在CD14阳性细胞中所占的比例); D: SKOV3细胞; MFI: 平均荧光强度。

A: THP-1-derived macrophages; B: SKOV3 cells; C: monocyte-derived macrophages (the data was percentage of CD274⁺ cells in CD14⁺ cells); D: SKOV3 cells; MFI: mean fluorescence intensity.

图2 流式细胞术检测B7-H1的表达

Fig.2 The expression of B7-H1 was determined by flow cytometry



1: SKOV3不共培养; 2: SKOV3与外周血单核细胞来源巨噬细胞共培养后; 3: SKOV3不共培养; 4: SKOV3与THP-1来源巨噬细胞共培养后。
1: SKOV3 cells; 2: SKOV3 cells after coculture with monocyte-derived macrophages; 3: SKOV3 cells; 4: SKOV3 cells after coculture with THP-1-derived macrophages.

图3 qRT-PCR(A)及Western blot(B)检测SKOV3细胞B7-H1的表达

Fig.3 The expression of B7-H1 in SKOV3 was tested by qRT-PCR (A) and Western blot (B)

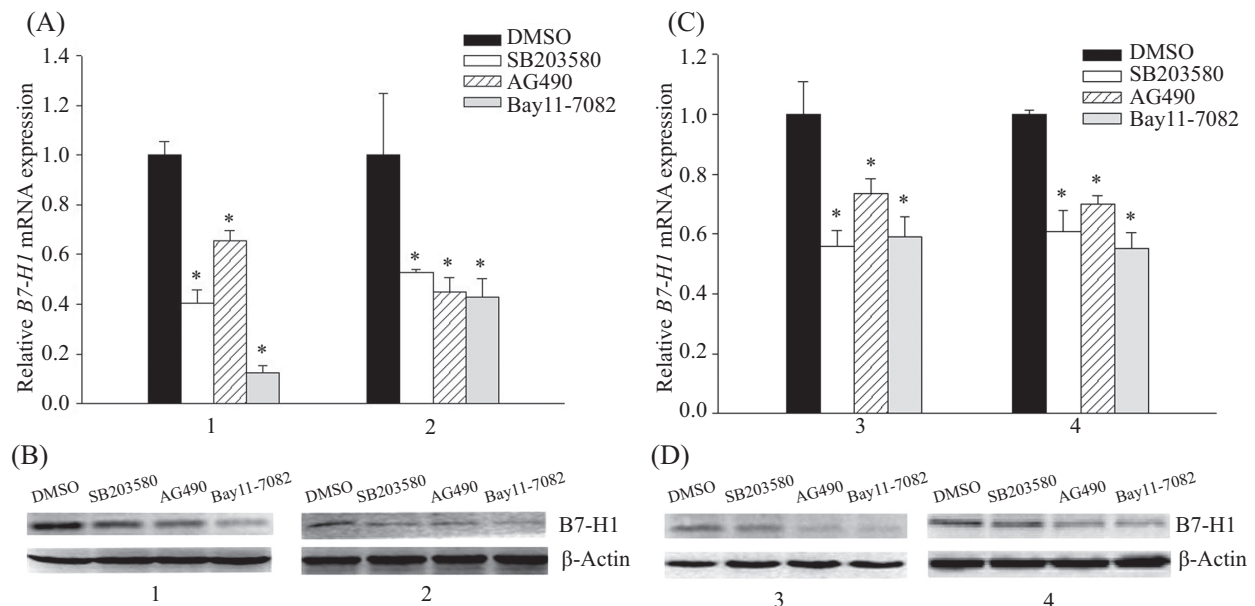
剂分别处理SKOV3和巨噬细胞1 h, 然后进行共培养, 结果如图4, 各抑制剂组较对照DMSO组B7-H1的表达全部显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤免疫治疗的基础与动物研究为肿瘤的治疗带来了希望, 然而却因为肿瘤的免疫逃避使得其临床疗效不尽如人意。因此, 对卵巢癌及其免疫系统的相互关系的进一步研究, 以期找出更为有效的免疫治疗策略显得尤为必要。

研究发现, 卵巢癌细胞及其浸润巨噬细胞、树突样细胞高表达B7-H1^[4], 但其具体机制并未完全阐明。为了进一步探讨这一机制, 本试验通过在体外模拟体内环境, 建立巨噬细胞与卵巢癌细胞非接触共培养体系, 对非培养与共培养后两种细胞B7-H1的表达进行检测。结果发现, 共培养24 h后巨噬细胞与卵巢癌细胞SKOV3 B7-H1的表达较非培养组都显著升高, 而在使用抑制剂阻断NF- κ B、JAK2/STAT3、p38 MAPK信号通路后, B7-H1的上调被明显抑制。

近来的研究发现, 炎症因子IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-27、TNF- α 、IL-10、IFN- α 、IFN- γ 等可上调不同细胞B7-H1的表达^[2]。神经胶质瘤细胞可通过诱导单核细胞产生IL-10从而上调单核细胞



1: 外周单核来源巨噬细胞; 2: SKOV3细胞; 3: THP-1来源巨噬细胞; 4: SKOV3细胞。* $P < 0.05$, 与DMSO组比较。

1: monocyte-derived macrophages; 2: SKOV3 cells; 3: THP-1-derived macrophages; 4: SKOV3 cells; * $P < 0.05$ vs DMSO group.

图4 qRT-PCR (A、C)及Western blot (B、D)检测B7-H1的表达

Fig.4 The expression of B7-H1 was evaluated by qPCR (A,C) and Western blot (B,D)

B7-H1的表达。阻滞IL-10或IL-10受体后,这一上调作用被抑制^[3]。在对肝癌的研究中发现,由肿瘤细胞激活的单核细胞可通过自分泌TNF- α 、IL-10上调自身B7-H1的表达^[5]。另外,肝癌细胞B7-H1的表达与浸润的TAM显著相关。这些都提示TAM与肿瘤细胞交互对话后,可能通过介导相应的炎症介质的改变,促进B7-H1的表达。在肿瘤微环境中,TAM分泌的炎症因子主要通过激活NF- κ B、STAT3信号通路来促进肿瘤的发生与发展。研究表明,B7-H1的启动子区域有NF- κ B、STAT3的结合位点^[6-7],而p38 MAPK可通过调节IL-6、IL-10的表达,激活STAT3信号通路来促进B7-H1的表达^[8]。

本研究发现,巨噬细胞与SKOV3细胞共培养后促进了彼此B7-H1的表达,利用抑制剂阻断NF- κ B、JAK2/STAT3或p38 MAPK信号通路后,B7-H1的表达上调被显著抑制,提示TAM分泌的炎症因子可能是通过激活NF- κ B、STAT3、p38 MAPK信号通路,上调B7-H1表达。然而,其具体作用方式及分子机制仍有待于进一步的研究。

目前,对卵巢癌疫苗的研究主要是增强免疫原性,该研究结果提示,即使肿瘤疫苗可以有效地激活T细胞,TAM及肿瘤细胞的B7-H1仍可抑制T细胞的效应。因此,针对B7-H1的抑制剂及阻断抗体可作为治疗的新靶点,而以TAM或NF- κ B、STAT3及p38 MAPK信号通路为靶点,下调肿瘤细胞的B7-H1表达,有望增强基于肿瘤特异性CD8⁺ T细胞的免疫

治疗疗效。

参考文献 (References)

- 1 华东,孙静,茆勇,吴玉玉,周桓,朱明. B7-H1分子在肿瘤微环境中的特异表达及对调节性T细胞的诱导促进作用. 苏州大学学报(医学版)(Hua Dong, Sun Jing, Mao Yong, Wu Yuyu, Zhou Huan, Zhu Ming. Abnormal expression of B7-H1 in the tumor microenvironment and the promotion of the regulatory T cell expansion. Journal of Soochow University, Medical Science) 2011; 31(3): 444-7.
- 2 Chen J, Li GS, Meng H, Fan YC, Song YH, Wang SR. Upregulation of B7-H1 expression is associated with macrophage infiltration in hepatocellular carcinomas. Cancer Immunol Immunother 2012; 61(1): 101-8.
- 3 Bloch O, Crane CA, Kaur R. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages. Clin Cancer Res 2013; 19(12): 3165-75.
- 4 Dong HD, Chen LP. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. Mol Med 2003; 81(5): 281-7.
- 5 Kuang DM, Zhao QY, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu CY. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. Exp Med 2009; 206(6): 1327-37.
- 6 Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu XB, Paessler M. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(52): 20852-7.
- 7 Chen YW, Zhang JB, Guo GN, Ruan ZH, Jiang M, Wu SX. Induced B7-H1 expression on human renal tubular epithelial cells by the sublytic terminal complement complex C5b-9. Mol Immunol 2009; 46(3): 375-83.
- 8 Wölfle SJ, Strebovsky J, Bartz H, Saöhr A, Arnold C, Kaiser C. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. Eur J Immunol 2011; 41(2): 413-24.