

肝癌细胞 Fas-FasL 途径反击免疫细胞

张建国* 徐高四 李 伟 杨景武 董伟家

(湖州师范学院医学院, 湖州 313000)

摘要 为了探讨肝癌细胞反击肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的机制,在体外进行肝癌细胞和 TIL 混合培养后,检测两种细胞 FasL、Fas、caspase-8 基因的表达情况,以及肿瘤细胞反击时 TIL 凋亡比例的变化。将肝癌细胞与 TIL 按照不同的比例共培养后,流式细胞术检测 TIL 凋亡率;实时荧光定量 PCR 检测肝癌细胞与 TIL FasL、Fas 和 caspase-8 基因的表达情况;以及 Western 印迹检测 FasL、caspase-8 的表达情况。不同浓度的肝癌细胞与 TIL 共同培养 48 h 后,随着肝癌细胞接种浓度的增加, TIL 凋亡率明显增加($P < 0.01$)。与正常人肝细胞相比,人肝癌细胞 FasL mRNA 表达含量明显增高($P < 0.01$)。与人肝癌细胞共同培养 24 h 后, TIL Fas、caspase-8 基因 mRNA 的表达也明显升高; TIL caspase-8 的表达也明显升高。结果表明,肝癌细胞可以通过 Fas 系统诱导 TIL 发生凋亡,这为肝癌的免疫逃逸和肿瘤反击机制提供了依据。

关键词 癌;肝细胞;肿瘤浸润淋巴细胞;免疫反击

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,世界范围内每年约有 100~125 万人死于肝癌,我国是肝癌高发国家。研究表明,肝癌病人机体免疫功能存在严重障碍。肿瘤的发生和发展与细胞凋亡的异常有密切的关系,其中,通过 Fas/FasL 途径使肿瘤细胞抵抗 Fas 介导的凋亡,以及反击免疫细胞使淋巴细胞凋亡,是肿瘤细胞免疫逃避的重要机制之一。然而, FasL 介导的凋亡在肿瘤的免疫逃逸中的作用,现在还不很明确,甚至存在争议^[1,2]。需要进一步研究,以阐明 FasL 在肿瘤发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

8 例获取肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL)的肝癌病人分别为我院附属医院住院病人。年龄 35~57 岁,平均 46.3 岁,均经 B 超、CT 或 MRI 证实。手术切除的肿瘤组织,病理学诊断为原发性肝细胞癌,以无菌操作收集于含抗生素的培养液内,用来分离肿瘤细胞和 TIL。正常肝细胞来源于肝组织(胆囊切除术时肝组织活检)标本。

1.2 主要试剂和细胞株

细胞培养试剂 RPMI1640、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。IMDM 培养液购自 Sigma 公司。人肝细胞株 HepG2 由中国细胞库典藏细胞中心提供。

1.3 从肝癌标本中分离 TIL, 原代培养

无菌条件下切除肿瘤组织表面的坏死部分和结缔组织,将瘤体剪成 3.0 mm³ 左右大小的组织块,置含抗生素的 IMDM 培养液中,加入 0.1% I 型胶原酶, 0.002% IV 型 DNA 酶和 0.1% 透明质酸酶。37 °C 磁力搅拌消化 5 h,将消化后的悬液用尼龙网滤过去除未消化完全的细胞团。用 Hanks 液洗 2 次后,将悬液置于比重为 1.077 的 100% 淋巴细胞分离液上,悬液上层用比重为 1.055 的 75% 淋巴细胞分离液(IMDM 培养液和淋巴细胞分离液的混合溶液)覆盖。2 000 r/min, 15 min 不连续密度梯度离心后,分别收集 100% 淋巴细胞分离液上的 TIL 进行培养扩增,收集 75% 淋巴细胞分离液上的肿瘤细胞冻存备用。

1.4 肝癌细胞与 TIL 共培养

1.4.1 台盼蓝染色法描绘 TIL 生长曲线 实验组:将对数生长期内的肝癌细胞按照 2×10^5 个/ml、 1×10^5 个/ml、 0.5×10^5 个/ml 接种在含 200 μ l 培养液的 96 孔板内,5% CO₂ 培养箱内培养 12 h 后,每孔分别加入 200 μ l 1×10^4 个/ml TIL 细胞悬液。对照组: 200 μ l 2×10^4 个/ml TIL 细胞悬液接种于不含肝癌细胞的培养液中。实验组和对照组均在 24、48、72 和 96 h 各取 3 孔做台盼蓝染色,计算每 ml 培养液内活细胞

收稿日期: 2007-06-19 接受日期: 2007-07-25

湖州市自然科学基金资助项目(No.2006YZ06)

* 通讯作者。Tel: 0572-2321581, E-mail: zjgyc@163.com

数(肝癌细胞为贴壁细胞), 并描绘生长曲线, 每组重复 5 次^[3]。

1.4.2 流式细胞技术检测 TIL 凋亡率 将原代培养的肝癌细胞以 0.5×10^5 个/ml、 1×10^5 个/ml、 2×10^5 个/ml 接种于 4 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液的培养瓶内, 培养 24 h 后弃去原培养液, 加入 4 ml 2×10^4 个/ml TIL 培养液, 使效靶比为 5 : 1、10 : 1 和 20 : 1。对照组不接种肝癌细胞, 直接加入 4 ml 2×10^4 个/ml TIL 培养液。两组细胞均培养 48 h 后, 1 000 r/min 离心 10 min 收集 TIL。PBS 洗 2 遍, 调整待测标本内细胞数为 10^6 个后, 进行流式细胞学检测, 重复 5 次^[4]。膜联蛋白 V、PI 染色与实验分析过程:

(1) 细胞收集: TIL 细胞悬液收集到 10 ml 离心管中, 调整样本细胞数为 1×10^6 个/ml, 800 r/min 离心 5 min, 弃去培养液。

(2) 用温育缓冲液洗涤 1 次, 800 r/min 离心 5 min。

(3) 用 100 μ l 的标记溶液重悬细胞, 室温下避光温育 15 min。

(4) 800 r/min 离心 5 min 沉淀细胞, 温育缓冲液洗 1 次。

(5) 加入荧光(SA-FLOUS)溶液 4 $^{\circ}$ C 下温育 20 min, 避光并不时振动。

(6) 流式细胞仪分析: 流式细胞仪激发光波长用 488 nm, 用一波长为 515 nm 通带滤器检测 FITC 荧光, 另一波长大于 560 nm 的滤器检测 PI。

(7) 结果判断: 凋亡细胞对 PI 有抗染性, 坏死细胞则不能。细胞膜有损伤的细胞的 DNA 可被 PI 着色产生红色荧光, 而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。因此, 在细胞凋亡的早期 PI 不会着色而没有红色荧光信号。正常活细胞与此相似。在双变量流式细胞仪的散点图上, 活细胞为(FITC⁻/PI⁻); 坏死细胞为(FITC⁺/PI⁺); 而凋亡细胞显现(FITC⁺/PI⁻)。

1.5 实时定量 PCR 检测 FasL、Fas 和 caspase-8 基因的表达情况

分别收集肝癌细胞和 TIL, 抽提总 RNA, 逆转录成 cDNA。Mx3000p 定量 PCR 仪(Stratagene, USA), SYBR[®] Premix Ex Taq[™](购自 TaKaRa 公司), PCR 反应采用标准曲线模式。Fas 基因扩增引物为: 上游 5'-GCATCTGGACCCTCCTACCTCTG-3' 和下游 5'-GACAAA GCCACCCCAAGTTAGA-3', PCR 产物片段长度为 528 bp。FasL 引物: 上游 5'-TTCTGGTTG-CCTTGTTAGGATTG-3', 下游 5'-ACCTTGAGTT-

GGACTTGCCTGTT-3', PCR 产物长度为 201 bp。Caspase-8 引物序列为: 上游 5'-TCTGGAGCATCTG-CTGTCTG-3' 和下游 5'-CCTGCCTGGTGTCTGCAG-TT-3', 扩增产物长度为 427 bp。 β -肌动蛋白引物: 上游 5'-GGCCGGGACCTGACTGACTAC-3', 下游 5'-TCTTTGCGGATGTCCACGTC-3', PCR 产物长度为 332 bp。25 μ l 反应体系, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。每个标本重复 5 次。PCR 产物在 1.5% 琼脂凝胶中电泳, 紫外灯下观察结果。融解曲线观察 PCR 产物的特异性。

1.6 免疫印迹

将相同细胞数量的肝癌细胞、TIL 和健康人肝细胞在冰上裂解 1 h, 裂解液包含 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100 以及蛋白酶抑制剂。30 μ g 蛋白质经 10% 聚丙烯酰胺水凝胶电泳分离后, 转到硝酸纤维素膜上, Blotto 溶液(5% 脱脂牛奶, 20 mmol/L Tris pH 7.5, 500 mmol/L NaCl)中室温阻断 1 h, 然后再将膜分别在含抗 FasL 抗体、抗 caspase-8 抗体或抗 β -肌动蛋白抗体(购自晶美生物工程有限公司)的溶液中温育, 辣根过氧化物酶(HRP)聚合的 IgG 检测结果, 图像分析系统比较每个标本条带强度的变化。

1.7 统计学处理

SPSS 11.5 统计软件包分析结果, 多个样本均数的比较用单因素方差分析, *P* 值小于 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 台盼蓝染色法观察 TIL 生长曲线

肝癌细胞与 TIL 共培养后, TIL 生长曲线如图 1 所示。随着肝癌细胞浓度的增加, 培养时间的延长, TIL 生长受抑制的程度越来越明显(TIL 细胞浓度单位: 10^4 个/ml)。

2.2 流式细胞技术检测 TIL 凋亡情况

不同浓度的肝癌细胞与 TIL 共同培养 48 h 后, 流式细胞技术检测 TIL 凋亡率, 结果如表 1。随着肝癌细胞接种浓度的增加, TIL 凋亡率明显增加, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$)。

与 TIL 共同培养 72 h 后, 膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒(购自北京博奥森生物技术公司)计算每组培养液内凋亡 TIL 数, 并描绘凋亡曲线, 每组重复 3 次, 结果如图 2。TIL 死亡的途径与 FasL 介导的凋

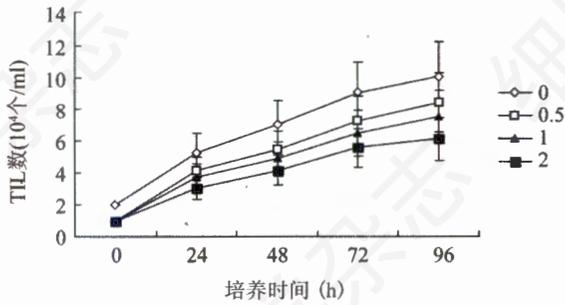


图1 不同浓度肝癌细胞与TIL共培养后, TIL生长曲线(肝癌细胞浓度单位: 10^5 个/ml)

表1 流式细胞技术检测TIL凋亡率结果

肝癌细胞接种浓度(10^5 个/ml)	TIL 凋亡率(%)
0	1.88 ± 0.23
0.5	5.53 ± 0.29
1.0	11.24 ± 0.44
2.0	18.69 ± 0.58

对照组相比, $P < 0.01$ 。

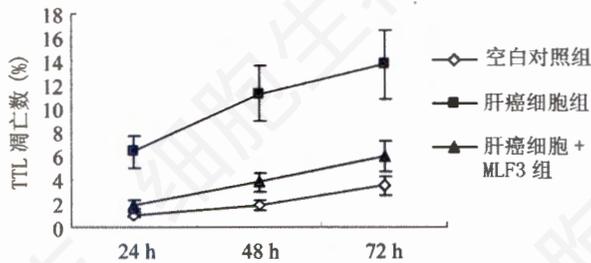


图2 不同处理组在培养24 h、48 h和72 h时间点, TIL凋亡比例的变化

亡有关, 这种死亡方式能被抗FasL抗体(MFL3, 购自北京ABCAM公司, 终浓度250 ng/ml)所阻断。肝癌细胞组: 肝癌细胞以 1.0×10^5 个/ml与 2.0×10^4 个/ml TIL混合培养; 空白对照组未加肝癌细胞; 肝癌细胞+MLF3组与肝癌细胞组相同, 还加入了MLF3。

2.3 荧光定量PCR

荧光定量PCR检测了人肝癌细胞与健康人肝细胞FasL mRNA表达含量的情况, 以及与人肝癌细胞共同培养0 h、24 h时, TIL Fas、caspase-8基因mRNA的表达变化。如图3所示, 与正常人肝细胞相比, 人肝癌细胞FasL mRNA表达含量明显增高($P < 0.01$)。与人肝癌细胞共同培养(肝癌细胞/TIL为10:1)24 h后, TIL Fas、caspase-8基因mRNA的表达也明显升高(图4A, $P=0.024$; 图4B, $P=0.027$)。

2.4 Western印迹分析

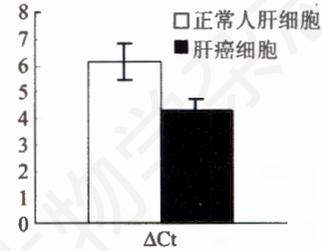


图3 人肝癌细胞与正常人肝细胞FasL mRNA的表达比较($\Delta C_t = C_t_{FasL} - C_t_{\beta\text{-肌动蛋白}}$)

人肝癌细胞FasL mRNA的 ΔC_t 值显著低于正常肝细胞的 ΔC_t 值, 即与内参照更接近, $P < 0.01$ 。

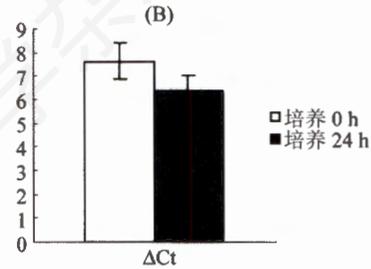
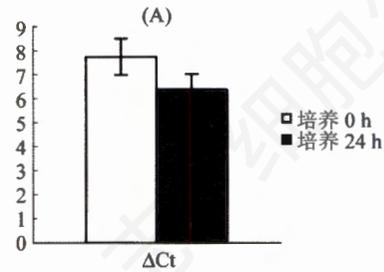


图4 与人肝癌细胞共同培养24 h后, TIL Fas、caspase-8基因mRNA的表达也明显升高, P 值分别为0.024和0.027

A: $\Delta C_t = C_t_{Fas} - C_t_{\beta\text{-肌动蛋白}}$; B: $\Delta C_t = C_t_{Caspase-8} - C_t_{\beta\text{-肌动蛋白}}$ 。

Western印迹分析证实, 与肝癌细胞相比, 健康人肝细胞其FasL表达水平显著下降, 如图5(A)所示; 与人肝癌细胞共同培养一段时间后, TIL caspase-8的表达也明显升高(图5B)。

3 讨论

研究表明^[5,6], 当细胞膜表面的Fas与FasL结合后, Fas胞浆侧的死亡结构域通过一个被称为FADD/MORT1的接头分子募集caspase-8激酶, 并引起caspase-8的自激活, 从而启动表达Fas细胞的程序性死亡(或称凋亡)。

TIL表面有大量Fas抗原, 与肝癌细胞膜上的FasL结合后, 启动caspase级联效应, 导致TIL发生凋亡。本实验将不同浓度的肝癌细胞与TIL共同培养后, 通过不同的方法检测TIL的凋亡情况, 几种方

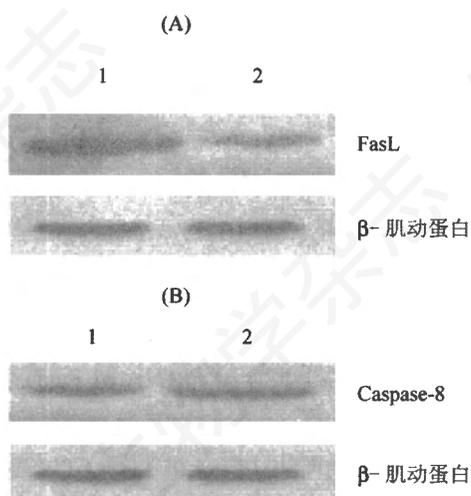


图5 Western 印迹

(A)肝癌细胞与健康人肝细胞 FasL 表达比较(1: 肝癌细胞; 2: 健康人肝细胞); (B)人肝癌细胞共同培养 24 h 后, TIL caspase-8 的表达也明显升高(1: 培养 0 h; 2: 培养 24 h 后)。

法均证实, 表达 FasL 的肝癌细胞能诱导 TIL 发生凋亡。TIL 细胞死亡的途径与 FasL 介导的凋亡有关, 因为这种死亡方式能被抗 FasL 抗体所阻断(图 2)。而且, 随着肝癌细胞接种浓度的增加, TIL 的凋亡率也随之增加。随着肝癌细胞浓度的增加, 培养时间的延长, TIL 生长受抑制的程度越来越明显。

肝癌的发生、发展与肝癌细胞的凋亡密切相关^[7]。也有作者发现^[8-10], 肝癌细胞能通过上调 FasL 的表达来杀伤细胞毒性 T 淋巴细胞, 进而逃避机体免疫系统的杀伤效应。本实验中发现, 肝癌细胞中 FasL mRNA 的含量较正常肝细胞有显著的增加($P < 0.01$), 并经蛋白质免疫印迹分析证实, 这可能是肝癌细胞通过某种自分泌或旁分泌机制, 使得癌细胞 FasL 的表达上调, 与浸润于肝癌组织中的 TIL(高表达 Fas)相互作用, 诱发其凋亡, 使得肝癌细胞得以逃避淋巴细胞的杀伤作用, 这一点也可得到有关研究结果的印证^[8]。与 HepG2 人肝癌细胞共同培养 24 h 后, TIL Fas、caspase-8 基因 mRNA 的表达也明显升高($P < 0.05$)。肝癌细胞不仅通过低表达 Fas 来逃避机体的

免疫监视作用, 而且还通过癌细胞 FasL 的高表达, 使之接触的淋巴细胞(表达 Fas)凋亡, 最终使肝癌细胞逃脱机体的免疫杀伤作用, 得以增殖和转移。

在体内, 细胞膜表面表达 FasL 的过程受到多种因素的影响, FasL 能被基质金属蛋白酶 7 剪接成可溶性 FasL^[11]。研究显示^[12], 前炎症形式的 FasL 主要以膜结合形式存在, 而可溶性 FasL 则以非炎症形式存在, 其作用与以膜结合形式的 FasL 相反。因而在体内, 可溶性 FasL 与膜结合 FasL 的比值可能最终决定 FasL 的作用方向。我们曾将人肝癌细胞培养 72 h 后的上清液, 加入肝癌细胞株 HepG2 细胞培养液中, 结果发现, 加入培养上清液前后, 癌细胞株 HepG2 细胞 FasL、Fas、caspase-8 基因的表达无显著变化。这就提示, 肿瘤内部微环境是肿瘤细胞生长代谢的结果, 而不是原因^[13,14]。然而, 肿瘤组织内部本身就是一个免疫抑制性区域, 肿瘤细胞能产生一系列免疫抑制性细胞因子, 如转化生长因子 β 、白细胞介素 10、前列腺素和神经节苷脂等, 这些物质能下调抗肿瘤免疫细胞的活性, 这样的环境对 FasL 的抗炎作用和下调免疫应答是有利的^[15]。

王磊博士在本研究中曾给予帮助和启发, 特此感谢!

参考文献(References)

- [1] Restifo NP. *Nat Med*, 2000, 6: 493
- [2] O'Connell J et al. *Nat Med*, 2001, 7: 271
- [3] Repp AC et al. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2001, 239: 752
- [4] Fukuzawa K et al. *J Gastroenterol*, 2001, 36: 681
- [5] Shima Y et al. *Hepatology*, 1999, 30: 1215
- [6] Suzuki A et al. *Hepatology*, 2000, 32: 796
- [7] Ito Y et al. *Br J Cancer*, 2000, 82: 1211
- [8] Hahne M et al. *Science*, 1996, 274: 1363
- [9] Roskams T et al. *J Pathol*, 2000, 191: 150
- [10] Nagao M et al. *Hepatology*, 1999, 30: 413
- [11] Mariani SM et al. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 2303
- [12] Hohlbaum AM et al. *J Exp Med*, 2000, 191: 1209
- [13] Ahamad M et al. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53: 844
- [14] Ryan AE et al. *Cancer Res*, 2005, 65: 9817
- [15] Salazar-Onfray F et al. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18: 171

Immune Counterattack Mechanisms by Fas-FasL Pathway of Hepatocellular Carcinoma

Jian-Guo Zhang*, Gao-Si Xu, Wei Li, Jin-Wu Yang, Wei-Jia Dong
(Huzhou Teachers College Medical College, Huzhou 313000, China)

Abstract To investigate the mechanisms of hepatic cancer cells inducing apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) *in vitro*, hepatic cancer cells were co-cultured with TILs in different effector-target ratio. Apoptotic ratios of TILs were screened by flow cytometry (FCM). Expression levels of mRNA of FasL, Fas and caspase-8 in hepatic cancer cells and TILs were tested by real time PCR. FasL and caspase-8 expression were screened by immunoblotting. After co-culturing with hepatic cancer cells, apoptotic ratios of TILs were increased with the ascending number of hepatic cancer cells ($P < 0.01$). Compared with the normal hepatic cells from healthy donors, FasL mRNA expression level of hepatic cancer cells was significantly increased ($P < 0.01$). After 24 hour's co-culturing with hepatic cancer cells, Fas and caspase-8 mRNA expression levels of TILs were significantly higher than before co-culturing ($P < 0.05$). After co-culturing with hepatic cancer cells, caspase-8 expression of TILs was significantly higher than before. The results suggested that hepatic cancer cells could induce apoptosis of TILs through Fas system, providing a evidence for the metastasis and counterattack of hepatic cancer cells.

Key words carcinoma; hepatocellular; tumor-infiltrating lymphocytes; counterattack

Received: June 19, 2007 Accepted: July 25, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Huzhou City (No.2006YZ06)

*Corresponding author. Tel: 86-572-2321581, E-mail: zjgyc@163.com