

· 技术与方法 ·

PEDF 对小鼠树突细胞表型及免疫功能影响的实验研究*

李婵玉, 韩 健, 韩 磊, 黄 威, 朱书力, 郑秀惠, 郭建新, 李 力[△]
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科中心, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨色素上皮衍生因子(PEDF)对小鼠骨髓源性树突细胞(BMDCs)表型及其免疫功能的影响。方法 从小鼠骨髓中分离单个核细胞(MNC),用小鼠重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、小鼠重组白细胞介素-4(rmIL-4)培养 5 d 后将其分为 5 组,实验组分别加入 50、100、200 ng/mL PEDF,阳性对照中加 1 μg/mL 脂多糖(LPS),阴性对照中加等量的 RPMI1640 培养基(对照组),继续培养 3 d。流式细胞术(FCM)分析 DCs 表面 CD11c、CD80、CD86 表达情况,混合淋巴细胞反应(MLR)检测 BMDCs 对 T 细胞的刺激能力,ELISA 法检测其培养上清液中 IL-12 水平。结果 PEDF 处理后的 BMDCs 明显上调了 CD11c、CD80 和 CD86 的表达,并能明显增强 T 细胞的活性,促进其分泌 IL-12。结论 PEDF 可明显上调体外培养的小鼠 BMDCs 免疫标记分子的表达,并增强其免疫活性。

关键词:色素上皮衍生因子;树突细胞;表型;免疫

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)12-1480-03

Effects of PEDF on phenotypic and immunologic function of dendritic cells*

Li Chanyu, Han Jian, Han Lei, Huang Wei, Zhu Shuli, Zheng Xiuhui, Guo Jianxin, Li Li[△]
(Obstetrics and Gynecology Center, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery,
Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effects of pigmentary epithelium derived factor(PEDF) on the phenotypic and immunologic function of murine-derived dendritic cells(BMDCs). **Methods** Mononuclear cells(MNCs) isolated from murine bone marrow were cultured in RPMI1640 medium containing rmGM-CSF and rmIL-4 for 5 d, and were divided into five groups. MNCs were stimulated for 3 d with either 50, 100, 200 ng/mL PEDF, 1 μg/mL LPS(positive control) or RPMI1640(negative control). The expression of CD11c, CD80 and CD86 on DCs surface were analyzed by the fluorescence activated cell sorting(FCM). The ability of PEDF-induced BMDCs to stimulate T cell maturation were determined by the CCK-8 method and the level of IL-12 in the culture supernatant was detected by ELISA. **Results** The PEDF-treated BMDCs expressed high levels of CD11c, CD80 and CD86, enhanced the immunological activities of T lymphocyte and its secretion of IL-12 when compared with untreated DCs. **Conclusion** PEDF can significantly up-regulate the expression of DCs immunological labelled molecule in in vitro cultured murine and increase its immunological competence.

Key words: pigmentary epithelium derived factor; dendritic cells; phenotype; immunity

色素上皮衍生因子(pigmentary epithelium derived factor, PEDF)是一种肿瘤发生时表达异常的肿瘤相关分子,属丝氨酸蛋白酶抑制因子超基因家族成员,在成人正常组织中(脑、肝、骨、眼、卵巢等)广泛存在,具有抑制新生血管的生成,营养和保护神经以及抗肿瘤的作用^[1]。既往研究表明, PEDF 可以通过抑制血管生成或促进肿瘤细胞凋亡而抑制多种肿瘤的生长^[2-5],同时,也能够活化巨噬细胞,并可能通过抑制肿瘤的增殖、促进巨噬细胞募集、上调白细胞介素(IL)-10的合成等,从而发挥抗肿瘤和免疫调节作用^[6-8]。

树突细胞(dendrite cells, DCs)是目前发现的机体内最重要、功能最强的抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)。作为机体初始免疫应答的始动开关, DCs 最大的特点是体内唯一能够直接激活初始 T 细胞进行增殖,从而启动免疫应答的中心环节,决定着免疫应答的方向,而巨噬细胞仅能刺激活化 T 细胞或记忆性 T 细胞,说明由 DCs 激活的细胞免疫应答可能在机体抗肿瘤免疫中发挥着较巨噬细胞更加关键的作用。而且,在细胞来源方面, DCs 与巨噬细胞具有相同的前体。

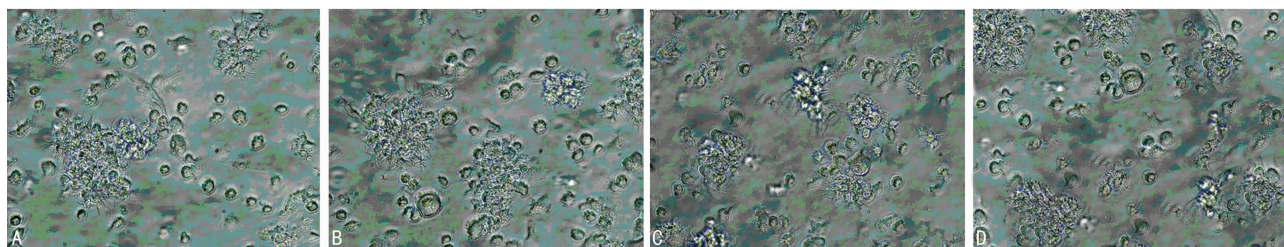
往研究发现, PEDF 在宫颈癌巢中的表达下降^[5],同时宫颈癌巢中的 DCs 不成熟^[9]。故 PEDF 可能与二者之间均具有相互作用,但目前对于 PEDF 与 DCs 之间关系的研究涉足不够,因此,本研究旨在探讨 PEDF 是否可以通过对 DCs 免疫活性的影响发挥抗肿瘤的免疫作用。

1 材料与方法

1.1 材料 实验小鼠:C57BL/6 小鼠、BALB/c 小鼠各 20 只,鼠龄 6~8 周,体质量 18~20 g,均购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。主要实验试剂:小鼠重组粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)、小鼠重组白细胞介素-4(rmIL-4)(PEPROTECH, 美国),单克隆抗体 PE-CD11c、PE-CD80、PE-CD86 及 PE 同型对照抗体(eBioscience, 美国), mouseIL-12 ELISA 试剂盒(BD 公司, 美国),丝裂霉素, CCK-8 试剂(Sigma, 美国), RPMI1640 培养基、胎牛血清(FBS)(Hycnone, 美国),红细胞裂解液(139.60 mmol/L NH₄Cl, 16.96 mmol/L Tris, 用 1 mol/L HCl 调节 pH 为 7.12)由本实验室配制; RPMI1640 完全培养基:以 RPMI 1640 培养基为基础,加入

* 基金项目:国家卫生行业科研专项基金资助项目(201002013)。
△ 通讯作者, Tel: (023)68757926; E-mail: cqjili@tmmu.edu.cn。

作者简介:李婵玉(1987-), 硕士研究生,主要从事妇科肿瘤的诊治研究。



A:LPS组;B:PEDF50组;C:PEDF100组;D:PEDF200组。

图1 LPS组和各实验组3d后相差显微镜下BMDCs形态(×200)

10%的FBS、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素。

1.2 方法

1.2.1 C57BL/6小鼠骨髓源DCs(bone marrow-DCs, BM-DCs)培养及分组 无菌状态下分离C57BL/6小鼠股骨和胫骨,RPMI1640培养基冲出骨髓细胞,离心,弃去上清液,用红细胞裂解液溶解红细胞,加RPMI1640培养基洗两遍,然后用含20 ng/mL的rmGM-CSF,20 ng/mL的rmIL-4的完全培养基悬浮细胞,利用细胞技术板调整细胞密度至 2.5×10^5 个/孔,置于24孔板中,于37℃5%的CO₂中孵育,隔天全量换液,培养第5天时,将细胞分为5组,即实验组分别加入50、100、200 ng/mL PEDF(分别为PEDF50组、PEDF100组、PEDF200组),阳性对照组中加1 μg/mL脂多糖(LPS)(LPS组),阴性对照加等量的RPMI1640培养基(对照组),培养至第8天。

1.2.2 BMDCs形态学观察 显微镜下观察细胞的形态变化。

1.2.3 流式细胞术(FCM)检测 FCM检测细胞CD11c、CD80、CD86的表达,取第8天培养细胞 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL,进行FCM分析。

1.2.4 ELISA检测培养上清液中IL-12的表达 培养第8天,取培养细胞上清液,5 000 r/min离心5 min,取上清液,用mouseIL-12试剂盒测定各组IL-12的表达,按照试剂盒中说明书操作。根据标准品浓度制定标准曲线,得到方程式:

$$Y = 0.2621 + 0.0029924X \quad (1)$$

1.2.5 混合淋巴细胞反应(MLR) 细胞培养第8天,各取 1×10^6 个/mL BMDCs细胞悬液作为刺激细胞(经丝裂霉素C处理),同时无菌取BALB/c小鼠脾脏淋巴细胞 1×10^7 个/mL,于96孔板每孔加入反应细胞和刺激细胞各100 μL,并设反应细胞自身对照。培养96 h后每孔加入20 μL CCK-8试剂,继续培养4 h,培养结束后用酶标仪读取450 nm时的光密度(OD)值,并计算刺激指数(stimulating index, SI),其公式:

$$SI = \text{实验组 } OD_{450} / \text{对照组 } OD_{450} \quad (2)$$

1.3 统计学处理 所有数据采用SPSS13.0统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学改变 光学显微镜下可见,细胞培养至第5天为未成熟BMDCs,细胞疏松贴壁生长,呈团状,细胞表面有少许突起,形态上体积较小。培养第5天各组BMDCs加入相应刺激因子继续培养3 d后,LPS组和各实验组细胞生长旺盛,树突样突起明显增多增长,长短不一,呈簇状生长,为比较典型形态的成熟DC的特征,各组之间无明显差别,见图1。

2.2 PEDF处理后对BMDCs免疫标记分子表达的影响 不

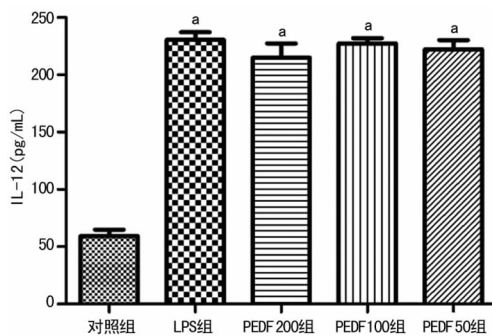
同浓度的PEDF处理BMDCs后,CD11c、CD80、CD86的表达均增加,与对照组比较,LPS组和PEDF各浓度组CD11c、CD80、CD86的表达明显上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是LPS组与PEDF各浓度组比较,BMDCs表面CD11c、CD80、CD86的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 各组BMDCs免疫标记分子表达比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD11c	CD80	CD86
对照组	54.60 ± 15.13	52.47 ± 6.18	49.63 ± 5.95
LPS组	89.70 ± 3.82 ^a	92.73 ± 4.68 ^a	77.30 ± 5.07 ^a
PEDF200组	92.53 ± 3.13 ^a	93.30 ± 3.22 ^a	79.13 ± 6.10 ^a
PEDF100组	87.43 ± 7.98 ^a	94.10 ± 2.76 ^a	78.27 ± 1.99 ^a
PEDF50组	92.80 ± 3.81 ^a	92.77 ± 3.50 ^a	77.53 ± 2.94 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

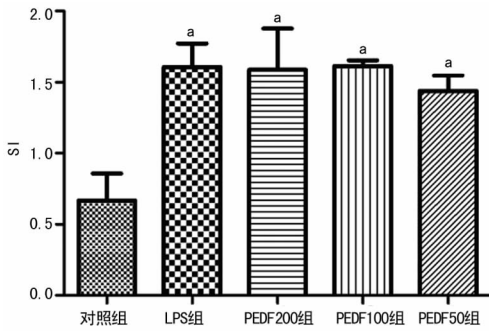
2.3 不同处理组IL-12表达水平比较 PEDF200组、PEDF100组、PEDF50组的IL-12分别为(214.83 ± 12.64)、(227.47 ± 4.58)、(222.27 ± 8.01)pg/mL,与对照组(59.27 ± 5.57)pg/mL比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与LPS组(230.59 ± 6.59)pg/mL比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);LPS组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PEDF各浓度组比较,IL-12表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。各处理组IL-12的表达水平,见图2。



^a: $P < 0.01$,与对照组比较。

图2 各组BMDCs IL-12表达水平比较

2.4 各组BMDCs MLR SI表达值比较 PEDF200组、PEDF100组、PEDF50组的SI表达值分别为 1.59 ± 0.29 、 1.61 ± 0.40 、 1.44 ± 0.11 ,与对照组SI表达值 0.67 ± 0.19 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与LPS组的SI表达值 1.61 ± 0.16 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),LPS组与对照组SI表达值比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PEDF各浓度组比较,SI表达值差异无统计学意义($P > 0.05$),见图3。



a: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 各组 BMDCs SI 表达值比较

3 讨论

DCs 来源于骨髓造血干细胞,作为机体的免疫监视而存在。DCs 的特性决定了其具有诱导耐受和免疫的双面性,因而如何根据其特性增强 DCs 的免疫功能已成为肿瘤免疫治疗的研究重点。在肿瘤微环境中 DCs 的成熟和活化受到抑制,不能有效地提呈抗原、激活 T 细胞^[10],因此,DCs 的成熟和活化是启动特异性免疫应答的关键步骤。DCs 的成熟和活化受到细胞因子、细胞代谢产物及细胞表面配体等多种因素的调控^[11]。在活化过程中,相应的形态、表型及免疫功能也会发生改变,从而增强宿主 DCs 的功能,改变机体免疫力,可以达到抗肿瘤的作用。

PEDF 是一种 50×10^3 的多功能分泌糖蛋白,是由人视网膜色素上皮细胞分泌的,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族^[12],广泛分布于全身各个器官,并可能通过两条途径发挥抗肿瘤活性:(1)直接增加肿瘤细胞对凋亡的敏感性;(2)通过抑制血管新生造成低氧负荷促进细胞凋亡。有研究发现 PEDF 能激发前列腺癌细胞的凋亡,也能够直接促进骨肉瘤、黑色素瘤细胞的凋亡^[2-4];在宫颈癌时,PEDF 能够通过抑制新生血管的生成,抑制肿瘤的进一步生长,而不是促进宫颈癌 Hela 细胞的凋亡^[5]。然而近年来有研究显示,除上述两种途径之外,PEDF 还能够活化巨噬细胞,促进巨噬细胞的分化^[6-8],从而起到抗肿瘤的作用。既往研究发现,对比正常宫颈组织,PEDF 在宫颈癌巢中的表达下降^[5],同时有研究者发现,对比正常宫颈组织,宫颈癌组织中的未成熟的 DCs 增加。因此,推测可能是 PEDF 的下调导致未成熟 DCs 的增加,而成熟 DCs 细胞减少^[9]。而 DCs 与巨噬细胞具有相同的前体细胞—单核细胞,故 PEDF 可能与 DCs 之间也存在相互作用,且 PEDF 对 DCs 的影响可能在抗肿瘤免疫中发挥着更加关键的作用,但目前关于 PEDF 能否活化 DCs 未见详细报道。

本研究发现,PEDF 具有诱导 BMDCs 免疫表型表达及免疫功能增强的作用。经 PEDF 刺激后,可以培养出形态与常规 LPS 培养体系相似的细胞,呈现与 BMDCs 相似的特点,细胞表面 CD11c、CD80 和 CD86 的表达较培养前明显增高。同时,经 PEDF 诱导的 BMDCs 能明显的刺激转基因外周血 T 淋巴细胞的增殖。提示 PEDF 可以明显上调体外培养的小鼠 DCs 免疫标记分子的表达并增强其抗原提呈能力。

另外,IL-12 是连接自然免疫和特异性免疫的关键成分,是已知的可增强 Th1 细胞免疫活性和 NK 细胞杀伤活性的细胞因子,在细胞免疫中发挥重要作用^[13]。本研究也提示,PEDF 可能在提高 BMDCs CD80、CD86 表达的基础上,通过增加 BMDCs IL-12 的分泌,启动特异性免疫应答、促进 Th1 细胞成熟并发挥功能。

综上所述, PEDF 在提高机体对肿瘤细胞的免疫功能方面具有重要意义,而且, PEDF 是一种内源性因子,人体内使用安全性可能较高,并可以在体外低成本合成,与 LPS 促进 DCs 活化的诱导剂相比, PEDF 有明显的优势^[14]。因此, PEDF 可能成为一种有良好的临床应用前景的抗肿瘤制剂,可用于“早期肿瘤综合治疗”和“复发性肿瘤治疗”,也可用于提高“基于 DCs 的肿瘤治疗性疫苗”的免疫激活效率。本研究提示 PEDF 可通过上调体外培养的小鼠 BMDCs 免疫标记分子的表达并增强其免疫活性,这为 PEDF 的上述临床应用提出了初步的理论依据,同时为进一步研究 PEDF 对 DCs 表型及免疫功能影响的机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4): 258-271.
- [2] Nelius T, Samathanam C, Martinez-Marín D, et al. Positive correlation between PEDF expression levels and macrophage density in the human prostate [J]. *Prostate*, 2013, 73(5): 549-561.
- [3] Ek ET, Dass CR, Contreras KG, et al. Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(7): 616-626.
- [4] Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, et al. Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(4): 1225-1232.
- [5] Yang J, Chen S, Huang X, et al. Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium-derived factor via anti-angiogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(12): 967-974.
- [6] Cohen J, Sugita Y, Chader GJ, et al. Recombinant forms of the neurotrophic factor pigment epithelium-derived factor activate cellular metabolism and inhibit proliferation of the RAW macrophage cell line [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2000, 7(1): 51-58.
- [7] Halin S, Rudolfsson SH, Doll JA, et al. Pigment epithelium-derived factor stimulates tumor macrophage recruitment and is downregulated by the prostate tumor microenvironment [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(4): 336-345.
- [8] Yang SL, Chen SL, Wu JY, et al. Pigment epithelium-derived factor induces interleukin-10 expression in human macrophages by induction of PPAR gamma [J]. *Life Sci*, 2010, 87(1/2): 26-35.
- [9] Hayati AR, Zulkarnaen M. An immunohistochemical study of CD1a and CD83-positive infiltrating dendritic cell density in cervical neoplasia [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, 26(1): 83-88.
- [10] Tel J, Anguille S, Waterborg CE, et al. Tumoricidal activity of human dendritic cells [J]. *Trends Immunol*, 2013, 35(1): 38-46.
- [11] Gianotti L, Sargenti M, Galbiati F, et al. Phenotype and function of dendritic cells and T-lymphocyte polarization in the human colonic mucosa and adenocarcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34(8): 883-889. (下转第 1484 页)



图 5 胶布固定

图 6 戴第 2 层头网

2 结 果

本科自 2012 年 2~8 月,按照上述方法,共完成了 3 668 例次视频脑电图(平均监测时间 4~6 h),182 例次 24 h 动态脑电图检查,受检患儿年龄 26 d 至 17 岁,平均安装电极时间为 5~15 min。患儿监测过程中很少出现电极脱落及移位情况。即使有个别电极脱落,也能由技术员迅速地原位再固定。采用此方法,卸下电极只需先一并揭除两层头网及其间的胶布,然后直接剥离电极,受检者基本没有撕扯痛及任何不适感,且没有固定物残留。整个过程迅速、简便、人性化,受检患儿及家长都能接受。

3 讨 论

电极安装的固定性是脑电图检查成功的重要条件。传统的电极安装普遍采用盘状电极内注导电膏,外用火棉胶固定,常需辅以电吹风加速棉胶干燥,卸下电极时采用丙酮溶解棉胶,此种方法需时长,所用火棉胶及丙酮,具有明显的刺激性及一定的毒性^[3-5],卸下时有较明显的撕扯痛,且常有残留,不宜清洁。对于儿科受检者,由于其配合性差,头部汗腺分泌旺盛,部分婴幼儿对电吹风有着天生的畏惧,加之神经科患儿常有智力低下、意识障碍、烦躁不安等症更加增加了安装固定的难度。此外小儿受检者皮肤黏膜娇嫩,对棉胶尤易过敏,而丙酮的刺激性气味更易损伤其稚嫩的呼吸道、消化道黏膜^[6]。既往有学者对传统方法进行了改良,采取局部或全面剃头发、胶布或纱布缠绕、头网固定^[7-11],乙醇替代丙酮卸下电极^[12]等方法,本科综合上述学者的经验,并结合儿科受检者特点进行改进,最终采取电极安装后头网固定,胶布加固,头网再次固定的方法,操作简单、时间短,且电极固定牢固,记录图像清晰,所用材料均为医用材料,安全环保,受检儿无过敏现象,避免了化学刺激物对患儿及医护人员的伤害,减轻了安装技术人员的工作量。对于受检长发女患儿,采用先梳头,再固定电极的方法,兼顾了人性化及美感,被患儿及家属广泛接受。

参考文献:

[1] 刘晓燕. 临床脑电图学[M]. 北京:人民卫生出版社,

(上接第 1482 页)

[12] Chandolu V, Dass CR. Cell and molecular biology underpinning the effects of PEDF on cancers in general and osteosarcoma in particular[J]. J Biomed Biotechnol, 2012 (2012):740295.

[13] Subramanian P, Rapp M, Becerra SP. Identification of pigment epithelium-derived factor receptor (PEDF-R) antibody epitopes[J]. Adv Exp Med Biol, 2012 (723): 799-

2006:541.

[2] 大熊辉雄. 临床脑电图学[M]. 周锦华,译. 5 版. 北京:清华大学出版社,2005:11.

[3] Netherton BL, Stecker MM, Patterson T. Mechanisms of electrode induced injury. Part 3: practical concepts and avoidance[J]. Am J Electroneurodiagnostic Technol, 2007, 47(4):257-263.

[4] Young B, Blais R, Campbell V, et al. Vapors from collodion and acetone in an EEG laboratory[J]. J Clin Neurophysiol, 1993, 10(1):108-110.

[5] Ma R, Kim DH, McCormick M, et al. A stretchable electrode array for non-invasive, skin-mounted measurement of electrocardiography (ECG), electromyography (EMG) and electroencephalography (EEG) [J]. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2010(2010):6405-6408.

[6] Jarrar R, Buchhalter J, Williams K, et al. Technical tips: Electrode safety in pediatric prolonged EEG recordings [J]. Am J Electroneurodiagnostic Technol, 2011, 51(2): 114-117.

[7] 李琼仙,非明珠,李志宏,等. 胶带替代火棉胶固定动态视频脑电图电极的技术创新[J]. 大理学院学报, 2012, 11(6):81.

[8] 王宝婵,王华燕. 脑电图长期监测电极安装方法的改良[J]. 癫痫与神经电生理学杂志, 2010, 19(1):56-57.

[9] 黄毅,邢莹,张建存,等. 安装固定脑电图盘状电极的技巧介绍[J]. 现代电生理学杂志, 2004, 11(2):94-95.

[10] Kolls BJ, Olson DM, Gallentine WB, et al. Electroencephalography leads placed by nontechnologists using a template system produce signals equal in quality to technologist-applied, collodion disk leads[J]. J Clin Neurophysiol, 2012, 29(1):42-49.

[11] Berlin F, Carlile JA, de Burgo MI, et al. Technical tips: Electrode application and preventing skin breakdown techniques[J]. Am J Electroneurodiagnostic Technol, 2011, 51(3):206-219.

[12] 甘晓玲,赵力立,宋葳,等. 75%乙醇与丙酮卸下小儿长程脑电图电极的临床比较[J]. 现代电生理学杂志, 2012, 19(2):76-79,92.

(收稿日期:2013-09-28 修回日期:2013-12-12)

805.

[14] Bruns S, Pastille E, Wirsdorfer F, et al. Lipopeptides rather than lipopolysaccharide favor the development of dendritic cell dysfunction similar to polymicrobial sepsis in mice[J]. Inflamm Res, 2013, 62(6):627-636.

(收稿日期:2013-11-25 修回日期:2014-02-12)