

· 论 著 ·

[文章编号]1000-8861(2010)03-0242-04

肝癌发展中 FasL 及其受体 Fas/DcR3 的表达分析

刘忠臣, 罗芳洪[△], 陈彩霞, 杨东海, 范 鑫, 程小峰, 庄国洪*

[摘要] 目的 研究小鼠肿瘤发生早期肿瘤坏死因子超家族成员 FasL 及其受体的表达特点, 及其与免疫调节相关分子表达的时空关系, 探讨其在诱导肿瘤免疫耐受中的作用。方法 建立小鼠实体瘤模型, 采用 RT-PCR 方法检测肿瘤组织中可溶性 FasL、Fas 及 DcR3、TGF-β、IL-10 在肿瘤发生不同时相的表达, 同时应用 ELISA 方法定量检测血清中 TGF-β、IL-10 的表达。结果 在早期的肿瘤组织中 Fas 的表达先于 DcR3, 其后 DcR3 大量表达, 而 Fas 的表达则下调直至丢失, DcR3、FasL 同时表达并上调, TGF-β 和 IL-10 也随肿瘤的表达而上调。TGF-β 同 DcR3 的表达具有空间位置的一致性。FasL、DcR3、TGF-β 和 IL-10 的表达水平同肿瘤的生长呈正相关。结论 随着肿瘤不断的生长, 肿瘤局部的免疫应答逐渐趋向于负调节, FasL、DcR3 在诱导肿瘤免疫耐受的过程中可能发挥着重要作用。

[关键词] FasL; DcR3; Fas; 肝癌

[中国分类号] R392.12

[文献标识码] A

Analysis of FasL and Fas/DcR3 expression in hepatocellular cancer development

LIU Zhongchen, CHEN Caixia, YANG Donghai, FAN Xin, CHEN Xiaofeng

Department of Gastrointestinal Surgery, Zhong shan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] To evaluate the role of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily member FasL and its receptors in immunologic tolerance, we characterized the expression of FasL and its receptors, and their relation with immunoregulation related cytokines. We built a murine model and measured the expressions of soluble FasL, Fas, DcR3, TGF-β, IL-10 in tumor at different phases by using RT-PCR, at the same time we detected the levels of TGF-β and IL-10 in serum by ELISA. At early phases of tumorigenesis, the Fas expression was ahead to DcR3, as time went on, DcR3 expression increased but the expression of Fas was down-regulated. DcR3 and FasL expression up-regulated simultaneously; expression levels of TGF-β and IL-10 were up-regulated with development of tumorigenesis. In addition, the expression levels of FasL, DcR3, TGF-β, and IL-10 were positively related with tumor growth. The results shows that FasL and DcR3 maybe play an important role in inducing immunologic tolerance in tumorigenesis.

[Key words] Fas, DcR3, FasL, Hepatocellular cancer

FasL 是 TNF 超家族成员之一, 在维持免疫系统正常发育、平衡、调节中起重要作用。FasL 有两种受体, 死亡受体 Fas(Apo-1/CD95)、诱骗受体 3(Decoy Receptor 3, DcR3)。当 FasL 与 Fas 结合时, 可诱导表达 Fas 的细胞发生凋亡。DcR3 是分泌蛋白, 由于其缺乏胞内区, 故不能传导凋亡信号, 其通过竞争性的与 FasL 和 LIGHT 结合抑制 FasL 的凋亡作用^[1-2]。

对 DcR3 的研究发现其在许多肿瘤、自身免疫性疾病中高表达。DcR3 在肿瘤组织及血清中浓度的高低与其恶性度呈正相关, 故 FasL/Fas、DcR3 的异常表达与自身免疫系统疾病、肿瘤免疫有关^[3]。

本实验采用小鼠肝癌细胞 H22 建立了小鼠实

体瘤模型, 检测肿瘤早期肿瘤组织中 FasL/Fas 与 DcR3 表达特点, 检测免疫调节相关因子的表达, 探讨 FasL 及其受体与免疫调节相关因子表达的时空关系, 探讨它们在肿瘤免疫耐受相关机制中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料 H22 肝癌细胞株购自中国典型培养物保藏中心(武汉)。18~20g 雌性 Balb/c 小鼠购自上海实验动物中心, Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶、Taq 聚合酶均购自上海生物工程公司。ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 引物的设计与合成 如表 1, 引物序列均根据 CenBank 中提供的序列而设计, 由上海生物工程公司合成。

1.3 目的基因的 RT-PCR 扩增 用 Trizol 试剂提取肿瘤部位组织及相关部位中的总 RNA, 并进行逆转录反应。以 2~4 μl 逆转录产物为模板, 分别以扩

基金项目: 厦门科技计划项目(3502Z20083008)资助
作者单位: 361004, 厦门大学附属中山医院胃肠外科(刘忠臣); 361005, 厦门大学医学院抗癌研究中心(罗芳洪, 陈彩霞, 杨东海, 范鑫, 程小峰, 庄国洪)
* 通信作者: 庄国洪, Tel: 0592-2180587, E-mail: zhuanguogong@yahoo.com.cn
[△]共同第一作者

表 1 DcR3 等的引物序列表

Tab 1 Sequences of the forward and reverse primers used in this study

Primers	P1/P2	Sequences
DcR3	P1	5'- GGCTCGAGTGCTCCAGAAGGACCATGA- 3'
	P2	5'- GAGGATCCGAGGAAGAGCCTGGCACATT- 3'
Fas	P1	5'- CATGACAATCCAGGAAGC- 3'
	P2	5'- CCAAGGTCCTTCTGGACC - 3'
FasL	P1	5'- GCATGCTCGTACTAGGCC - 3'
	P2	5'- CCAATGTACTGGTGGAGG - 3'
TGF-β	P1	5'- GACATCTCACACAGTATATA- 3'
	P2	5'- TCCACTTCCAACCCAGGTC - 3'
IL-10	P1	5'- GCCTGGCTCAGCACTGCTAT - 3'
	P2	5'- CCACTGCCTTGCTCTTATTT - 3'

增 DcR3、Fas、FasL、TGF-β、IL-10 基因的引物,以 β-actin 基因为内参照,进行 PCR 反应条件为:94 °C 45 s,52 °C 45 s,72 °C 1 min,共 30 个循环,最后再于 72 °C 延伸 10 min。

1.4 检测各基因的表达 将 36 只小鼠随机分成 6 组 (A~F 组,每组 6 只),在每组小鼠的右侧大腿肌肉接种 1×10^5 肝癌细胞 H22。分别于接种后的第 2、4、6、8、10、12 天处死 A~F 组的小鼠。取各组接种部位的组织、肿瘤与正常肌肉交界处的组织、瘤周的肌肉组织和小鼠左侧大腿肌肉组织,从中提取总 RNA 后,进行 RT-PCR 检测 DcR3、Fas、FasL、TGF-β、IL-10 的表达。实验中以每只小鼠左侧大腿肌肉作为对照。采用凝胶成像分析系统分析各基因的表达。另外,通过 ELISA 试剂盒检测各细胞因子在血清中的含量。

1.5 检测肿瘤的生长状况 A~F 组小鼠处死解剖后,称取瘤质量(以 g 为单位表示)。统计时取每组瘤质量的均值。

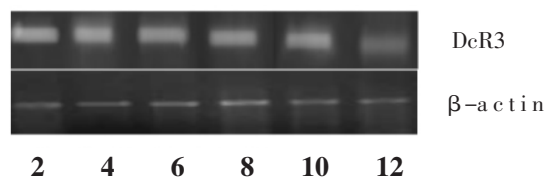
1.6 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DcR3 mRNA 在小鼠不同部位的表达 在接种 H22 细胞后的第 4 天,接种部位可以检测到 DcR3 有表达,第 6 天开始表达上调,其表达随着时间的延长而增加;在肿瘤与正常肌肉交界处的组织 DcR3 在第 2 天有表达,之后表达上调。对照小鼠左侧正常大腿肌肉、接种 H22 细胞的周围肌肉组织中 DcR3 均有表达,表达有下调现象,小鼠左侧正常大腿肌肉至第 12 天无 DcR3 表达(图 1)。

2.2 FasL/Fas mRNA 在不同部位的表达变化 在

T	-	+	+	+	+	+
S	+	+	+	+	+	+
F	+	+	+	+	+	+
L	+	+	+	+	+	+



T represents muscle where inoculated tumor cells; S representing the peripheral muscle of tumor; F represents the muscle beyond the tumor; L means the normal muscle of the left leg

图 1 RT-PCR 分析 DcR3 mRNA 水平的表达

Fig 1 mRNA expression of DcR3 measured by RT-PCR

接种部位,第 2、4、6 天,肿瘤组织中 FasL 高表达,接种后第 4 天表达量最高,第 8~12 天表达下降,肿瘤与正常肌肉交界处组织, FasL 持续表达,在瘤周和左侧大腿肌肉组织中则未检测到 FasL 表达,在接种后的肿瘤中心组织和肿瘤与正常肌肉交界处的组织中未检测到 Fas 的表达。在作为对照的小鼠左侧大腿肌肉、肿瘤周围肌肉组织中均有检测到 Fas 的表达,呈下降趋势(图 2)。

2.3 FasL/Fas 与 DcR3 mRNA 在不同组织部位的表达比较 采用 RT-PCR 检测了 FasL、Fas 及 DcR3 在不同部位中的相对表达量。结果显示,在接种后第 8 天,各组织中 DcR3 表达量均高于 Fas 的表达量。DcR3 在肿瘤与肌肉交界处组织中的表达量高于在肿瘤周围肌肉组织中的表达量。在接种后第 12 天, Fas 只在肿瘤周围的肌肉组织中有检测到表达,在肿瘤中心、肿瘤与肌肉交界处组织及左腿肌肉中均未

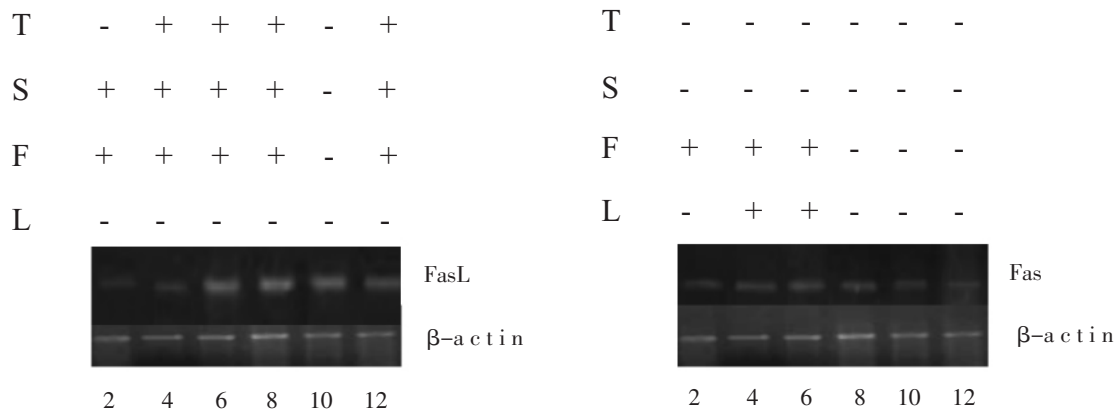


图 2 RT-PCR 分析 Fas、FasL mRNA 水平的表达

Fig 2 mRNA expression of Fas and FasL measured by RT-PCR

见表达 ,DcR3 在肿瘤与肌肉交界处组织中的表达量最高 ,在肿瘤中心组织中的表达量次之 ,在瘤周围肌肉组织中的表达量最低。FasL 高表达的部位 DcR3 的表达量也较高 ,反之亦然。提示 FasL 同 DcR3 在肿瘤组织中的表达 ,不仅有时相上的一致性 ,而且还存在空间上的一致性。

2.4 TGFβ、IL-10 mRNA 在不同部位的表达变化 在接种肿瘤后第 2 天 ,即可检测到 TGF-β 和 IL-10 的少量表达 ,随着时间的推移其表达上调 ,TGF-β 较

IL-10 上调更明显。肿瘤与肌肉交界处、瘤周组织和左侧大腿肌肉第 2~12 天均检测到 TGF-β 和 IL-10 表达 ,且表达上调。以上提示 随着时间的推移肿瘤局部组织中的免疫反应逐渐趋向于负调节(图 3)。

2.5 ELISA 检测血清中 TGFβ、IL-10 的表达 将血清稀释 100 倍 ,检测 TGF-β、IL-10 的含量 ,对比标准样品 ,结果显示 TGF-β 和 IL-10 在血清中的含量呈上升状态 ,与 RT-PCR 的结果一致 ,见表 2。

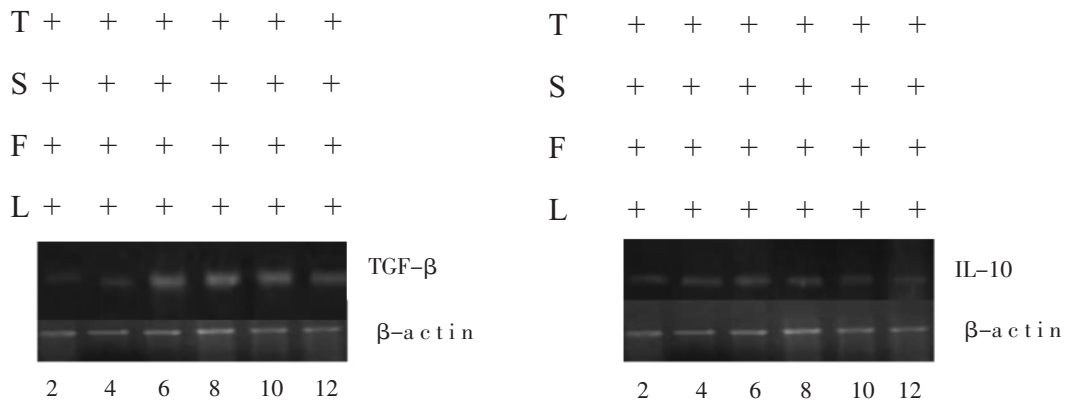


图 3 RT-PCR 分析 TGFβ、IL-10 mRNA 水平的表达

Fig 3 Expression of TGFβ and IL-10 mRNA measured by RT-PCR

表 2 ELISA 分析血清中 TGF-β、IL-10 的浓度

Tab 2 Concentration of TGF-β and IL-10 in serum detected by ELISA

Cytokines	(ng/ml)					
	d2	d4	d6	d8	d10	d12
TGF-β	2.63	3.06	3.77	5.03	5.05	9.51
IL-10	0.52	1.39	2.82	3.08	6.18	7.62

2.6 FasL、Fas 及 DcR3 mRNA 的表达与肿瘤生长的相关性 将荷瘤小鼠处死后 ,测定瘤质量显示 :第 2、4、6 天 ,未见肿瘤明显生长 ,第 6~8 天肿瘤突然迅速生长 ,第 8~12 天 ,瘤质量已有明显增长。如前面的结果所示 ,第 8~12 天 DcR3 mRNA 的表达水平持

续升高 ;以上说明 ,肿瘤的加速生长同 FasL、DcR3 的大量表达以及 Fas 表达的下调存在时相上的一致性。相关性检验发现 FasL、DcR3 的表达同瘤质量之间存在正相关性 ;而 Fas 的表达量同瘤质量之间存在负相关性(图 4)。

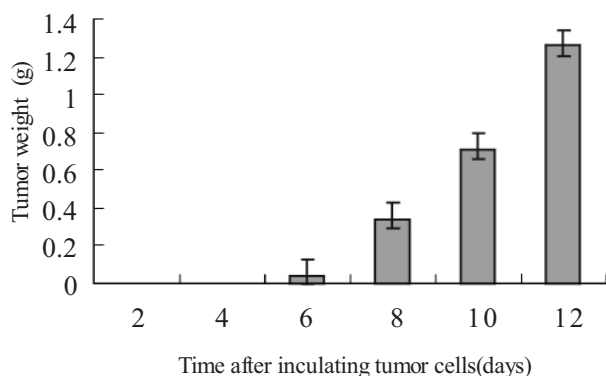


图 4 接种肿瘤细胞后在不同的时间称量肿瘤的重量

Fig 4 The tumor weights quantified at different time after inoculating tumor cells

3 讨论

肿瘤细胞逃避免疫攻击的途径是多样的, 其中包括: ①表达 DcR3 等阻断受体以阻断 TNF 所介导的凋亡; ②表达凋亡介导配体如 TRAIL, 以介导免疫细胞的凋亡。此外, DcR3 还作为一种效应因子, 使 CD4⁺ Th0 细胞更多地向 Th2 细胞分化^[4-6]。Th2 型 T 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 细胞因子, 过度的 Th2 细胞应答, 则可削弱机体对感染因子的保护性防御机制^[7-8]。

本实验侧重研究了 DcR3 与 Fas、FasL 在肿瘤的不同发生阶段的表达特点, 进一步证实 DcR3 与 Fas 相互拮抗的作用, 本实验的结果显示: FasL 的表达与肿瘤的发生呈正相关, 而在肿瘤组织中未检测到 Fas 表达, 只在早期肿瘤与肌肉的交界处检测到其微量表达, 此结果提示肝癌细胞有可能是通过消除自身 Fas 的表达而逃逸 FasL 诱导的凋亡, 或者通过调节侵入的淋巴细胞表达可溶性 Fas 来中和 FasL 的作用, 从而逃避免疫监视并有利于发生转移。因此肿瘤发生和发展很可能与 Fas 表达异常和功能异常有关。

另外在肿瘤的中心组织及肿瘤的周边肌肉组织中从第 4 天开始有测到极微量的 DcR3 表达, 之后 DcR3 表达持续上调, 至第 8 天其表达量达到最高, 之后有下调趋势, 但肿瘤中心的下调趋势明显大于肿瘤与肌肉交界处的趋势。提示随着肿瘤的进展 DcR3 表达上调, 并且肿瘤生长具有浸润性, 故在肿瘤与肌肉交界处 DcR3 的表达下调趋势缓慢, 以上

结果提示 DcR3 的表达特点与肿瘤生长相关。

我们检测到在肿瘤发展过程中细胞因子 TGF- β 、IL-10 的表达水平持续上调。这些细胞因子属于 Th2 型细胞因子, 过度的 Th2 细胞应答, 可削弱机体对感染因子的保护性防御机制应答, 这说明随着肿瘤的生长肿瘤局部的免疫应答逐渐趋于负调节。提示 TGF- β 和 IL-10 的表达可能与诱导肿瘤免疫耐受相关。

在肝癌发展过程中, 肿瘤细胞通过异常表达 Fas 或使 Fas 功能失常而逃逸 FasL 诱导肿瘤细胞凋亡的功能; 同时, 肿瘤细胞大量表达 DcR3 来竞争结合 FasL 从而逃避机体的免疫监视。肿瘤细胞还通过调控 TGF- β 和 IL-10 等 Th2 型细胞因子的分泌来诱导肿瘤免疫耐受, 肿瘤通过抑制凋亡和诱导免疫耐受等而发展。

【参考文献】

- [1] Migone TS, Zhang J, Luo X, et al. TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator[J]. *Immunity*, 2002, 16 (3): 479-92.
- [2] Hayashi S, Miura Y, Nishiyama T, et al. Decoy receptor 3 expressed in rheumatoid synovial fibroblasts protects the cells against Fas-induced apoptosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(4): 1067-1075.
- [3] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer[J]. *Nature*, 1998, 396(6712): 699-703.
- [4] 刘瑞振, 张长弓, 何琼, 等. 抗人 DcR3 单克隆抗体的制备、鉴定及其应用[J]. *免疫学杂志* 2009 25(1) 34-38.
- [5] Chang YC, Hsu TL, Lin HH, et al. Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75 (3): 486-94.
- [6] Hsu TL, Wu YY, Chang YC, et al. Attenuation of Th1 response in decoy receptor 3 transgenic mice [J]. *J Immunol*, 2005, 175 (8): 5135-5145.
- [7] 李文珠, 李迎, 罗芳洪, 等. 诱骗受体 DcR3 对佐剂型关节炎大鼠模型的作用分析[J]. *免疫学杂志* 2008 24(1): 23-28.
- [8] Tokumasa N, Suto A, Kagami SI, et al. Expression of Tyk2 in dendritic cells is required for IL-12, IL-23, and IFN- γ production and the induction of Th1 cell differentiation [J]. *Blood*, 2007, 110 (2): 553-560.

(收稿日期 2009-03-23, 修回日期 2009-10-19)

(编辑 李海鸥)