

基础研究 · Basic Research

SOCS1拮抗物pJAK2多肽可增强树突状细胞的抗肿瘤作用

何蕙香^{1,2}, 陈玉强^{1,2}, 颜江华³, 丁园², 王勇军², 王生育³, 叶燕华², 许英艺², 李巧珍²

1. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330000; 2. 中国人民解放军第一七四医院肿瘤治疗中心, 福建 厦门 361003; 3. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005

[摘要] 目的: 探讨细胞因子信号转导抑制因子-1 (suppressors of cytokine signaling 1, SOCS1) 拮抗物 pJAK2 多肽 (氨基酸序列号为 1001—1013) 参与树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 的体外诱导培养后对 DCs 抗肿瘤作用的影响。方法: 采集健康人外周血, 离心获得单个核细胞, 用重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF) 及重组人白细胞介素-4 (recombinant human interleukin-4, rhIL-4) 诱导 DCs, 第 5 天分为 4 组: 单纯 DCs 培养 (对照) 组、抗原负载 (Lysate-DCs) 组、多肽修饰 (pJAK2-DCs) 组和抗原与多肽共培养 (Lysate + pJAK2-DCs) 组, 第 6 天各组加入肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 促成熟。倒置显微镜下观察 DCs 形态; FCM 法检测 DCs 表型; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 细胞毒实验检测各组细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 对胃癌细胞 BGC-823 的靶向杀伤作用; ELISA 法检测白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 和 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 的水平。结果: 与未加入诱导剂组相比, 各组均成功诱导出成熟 DCs, 均高表达 CD80、CD83、CD86 和人类白细胞 DR 抗原 (human leukocyte antigen DR, HLA-DR), 但以 Lysate + pJAK2-DCs 组的表达水平最高。在 10 : 1 ~ 30 : 1 的效靶比范围内, CTL 杀伤作用与效靶比呈正相关。当效靶比为 30 : 1 时, 对照组的 CTL 杀伤率达 (19.77 \pm 2.34) %, 低于其他 3 组 ($P < 0.01$), 而 Lysate + pJAK2-DCs 组较 Lysate-DCs 组及 pJAK2-DCs 组都高 ($P < 0.05$)。Lysate + pJAK2-DCs 组培养上清液中 IL-12 及 IFN- γ 的分泌水平明显高于对照组 ($P < 0.01$)。结论: SOCS1 拮抗物 pJAK2 多肽 (1001—1013) 可增强 DCs 对胃癌细胞的抗原递呈及特异性抗肿瘤作用。

[关键词] 胃肿瘤; 细胞因子信号转导蛋白抑制因子; 树突状细胞; 细胞系, 肿瘤; pJAK2 多肽

[中图分类号] R730.3; R735.2 [文献标志码] A

[文章编号] 1000-7431 (2013) 06-0509-06

pJAK2 polypeptide, an antagonist of suppressors of cytokine signaling-1, can enhance the antitumor effect of dendritic cells

HE Hui-xiang^{1,2}, CHEN Yu-qiang^{1,2}, YAN Jiang-hua³, DING Yuan², WANG Yong-jun², WANG Sheng-yu³, YE Yan-hua², XU Ying-yi², LI Qiao-zhen²

1. Medical College of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China; 2. Department of Oncology, NO. 174 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Xiamen 361003, Fujian Province, China; 3. Cancer Research Center, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

[ABSTRACT] Objective: To investigate the effect of pJAK2 polypeptide, an antagonist of SOCS1 (suppressors of cytokine signaling 1), on antitumor effect of *in vitro* cultivation-induced DCs (dendritic cells). Methods: Peripheral blood was collected from the healthy volunteers, and the PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) were isolated. DCs were induced by rhGM-CSF (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) and rhIL-4 (recombinant human interleukin-4). On the fifth day, DCs were divided into four groups: control group, Lysate-DCs group, pJAK2-DCs group, and Lysate + pJAK2 DCs group. On the sixth day, TNF- α (tumor necrosis factor- α) was added into each group. The morphological features of DCs were observed under an inverted microscope; the phenotypes were detected by FCM (flow cytometry); the killing effect of CTLs (cytotoxic T lymphocytes) on gastric

[基金项目] 1. 南京军区医学科技创新课题资助项目 (编号: 10MA068)

2. 福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2010D013)

3. 厦门市科技计划创新项目 (编号: 3502z20104014)

Correspondence to: CHEN Yu-qiang (陈玉强)

E-mail: chen_yq707@163.com

Received 2013-01-11 Accepted 2013-04-01

cancer BGC-823 cells was evaluated by LDH (lactate dehydrogenase) cytotoxicity test; the concentrations of IL-12 (interleukin-12) and IFN- γ (interferon- γ) were detected by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Results: Mature DCs presented typically morphological and phenotypic features; the DCs in Lysate + pJAK2-DCs group had the highest expression levels of CD80, CD83, CD86 and HLA-DR (human leukocyte antigen DR). When the ratio of effectors to target cells ranged from 10 : 1 to 30 : 1, the killing activity of CTLs had a positive correlation with the ratio. When the ratio of effectors to target cells was 30 : 1, the killing activity of CTLs in the control group was (19.77 \pm 2.34)%, which was lowest as compared with the other groups ($P < 0.01$), meanwhile the killing activity of CTLs in Lysate + pJAK2-DCs group was higher than those in Lysate-DCs and pJAK2-DCs groups ($P < 0.05$). The levels of IL-12 and IFN- γ secretion in Lysate + pJAK2-DCs group were apparently higher than those in the control group ($P < 0.01$). Conclusion: An antagonist of SOCS1, pJAK2 polypeptide, can enhance the ability of antigen presentation and specific antitumor effect of DCs on gastric cancer cells.

[KEY WORDS] Stomach neoplasms; Suppressors of cytokine signaling proteins; Dendritic cells; Cell line, tumor; pJAK2 polypeptide

[TUMOR, 2013, 33 (06): 509-514]

细胞因子信号转导抑制因子 (suppressors of cytokine signaling, SOCS) 是新近发现的具有抑制 Janus 激酶 - 信号转导和转录活化因子 (Janus kinase-signal transduction and activators of transcription, JAK-STAT) 信号转导的一类蛋白。SOCS 家族包括 SOCS1 ~ SOCS7 及细胞因子诱导的含 SH2 区域蛋白 (cytokine-inducible SH2 containing protein, CIS), 它们的蛋白质结构近似, 均由 N 区 (氨基端) 位于中央的 SH2 区和羧基端的 SOCS 盒组成^[1]。SOCS1 是该家族中研究较深入的成员之一, 它可与 JAK 激酶结合而抑制其活性, 从而抑制包括白细胞介素 -12 (interleukin-12, IL-12) IL-6、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 和 IFN- α 等在内的多种细胞因子的信号转导。另外, 研究表明 SOCS1 还参与 T 细胞的调节及分化, 抑制树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 成熟, 在免疫耐受中具有重要作用^[2]。

pJAK2 多肽是 SOCS1 的特异性拮抗物, 它通过与细胞因子受体 JAK2 的自动磷酸化位点竞争性结合 SOCS1 上的激酶抑制区 (kinase inhibitory region, KIR), 从而抑制 SOCS1 的功能。pJAK2 多肽抑制 SOCS1 功能在抗肿瘤、抗病毒中的应用研究已有多项报道^[3,4]。本研究将制备合成的 SOCS1 拮抗物 pJAK2 多肽 (氨基酸序列号为 1001—1013) 参与 DCs 的体外诱导培养, 获得具有更强抗原递呈及特异性抗肿瘤作用的 DCs 疫苗, 以期 DCs 的抗肿瘤临床应用提供新的思路。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂和材料 RPMI 1640 培养液购

自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 PAA 公司; 人淋巴细胞分离液购自天津美德太平洋科技有限公司; 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor, rhGM-CSF) 重组人白细胞介素 -4 (recombinant human interleukin-4, rhIL-4) 和肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 购自厦门特宝生物工程股份有限公司; 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 标记的流式单克隆鼠抗人 CD80、CD83、CD86 和人类白细胞 DR 抗原 (human leukocyte antigen DR, HLA-DR) 分子抗体以及 IL-12 和 IFN- γ ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 胃癌细胞株 BGC-823 由厦门大学医学院抗癌研究中心常规传代培养。

1.2 肿瘤细胞抗原的制备 将液氮中保存的 BGC-823 细胞复苏后传代培养, 取处于对数生长期的细胞用于实验。收集细胞, 悬浮细胞密度为 1×10^7 个/mL, 置入液氮内 10 min; 取出后迅速置于 37 $^{\circ}$ C 水浴溶解, 反复 3 次后, 经锥虫蓝染色后, 在光学显微镜下观察可见细胞裂解率达 99%; 然后 2 000 $\times g$ 离心 30 min, 上清液经 0.2 μ m 微孔滤膜过滤, 液氮或 -80 $^{\circ}$ C 分装保存备用。该裂解产物 (Lysate) 作为抗原用于刺激 DCs。

1.3 多肽合成 SOCS1 拮抗物 pJAK2 (1001-1013) 的氨基酸序列为 ¹⁰⁰¹LPQDKEYYKVKKE, 其中下划线 Y 为磷酸化的酪氨酸。多肽由吉尔生化 (上海) 有限公司合成, 纯度为 98.0% 以上。

1.4 DCs 的体外诱导培养和形态观察 新鲜采集健康志愿者抗凝外周血 50 mL, 用 37 $^{\circ}$ C PBS 稀释 1 倍, 沿管壁缓缓倒入盛有淋巴细胞分离

液 (Ficoll-Hypaque, 密度为 1.077 g/L) 的离心管中 (血液和分离液体积比为 1 : 1), 使界面清晰。梯度离心 (室温, 800 × *g*, 20 min), 取界面细胞, 置入 50 mL 离心管中, 用无钙镁 PBS 悬浮细胞, 离心 (800 × *g*, 10 min), 清洗细胞 2 次, 再次离心 (250 × *g*, 10 min), 待血小板洗净后即获得外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液重悬细胞, 并调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 加入 6 孔板, 置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养 2 h, 吸掉上清液, 用 37 °C 预温的培养液洗去非黏附细胞 (冻存, 用于 LDH 细胞毒实验), 获得贴壁细胞, 每孔再加入 3 mL 完全培养液以及细胞因子 rhGM-CSF (终浓度 1 000 U/mL) 和 rhIL-4 (终浓度 500 U/mL), 进行培养。隔天半量换液, 并补充等量细胞因子。倒置显微镜下每天观察其生长状况、形态及数量变化情况, 并拍照。培养第 5 天将 DCs 分为单纯 DCs 培养 (对照) 组、抗原 0.2 mg/mL 负载 (Lysate-DCs) 组、pJAK2 多肽 15 μmol/L 修饰 (pJAK2-DCs) 组、抗原 0.2 mg/mL 与 pJAK2 多肽 15 μmol/L 共培养 (Lysate + pJAK2-DCs) 组, 继续培养 24 h 后, 各组均加入 TNF-α 20 ng/mL 以促进 DCs 成熟, 第 7 天时收获 DCs。此时的细胞为成熟 DCs, 流式细胞仪检测 DCs 表型, 上清液于 - 80 °C 冰箱保存, 用于 ELISA 法检测 IL-12 水平。

1.5 FCM 法检测 DCs 表型 收集部分第 5 天分组前未成熟 DCs (immature DCs, iDCs) 及第 7 天各组促成熟后的 DCs 细胞, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次 (200 × *g*, 10 min), 调整细胞密度为 5×10^6 个/mL, 取 50 μL 细胞悬液, 按说明书加入 PE 标记的 CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR 荧光抗体, 设未加抗体的细胞悬液作为对照。于室温避光标记 30 min 后, PBS 洗涤 2 次后重悬细胞, 流式细胞仪分析 DCs 的表型。应用 Cell-Quest 软件进行结果分析, 以 FSC/SSC 设门, 排除死细胞和杂细胞, 确定 DCs 群体, 以荧光通道、该通道内收集到的细胞数量分别为横、纵坐标制图。阳性率 = 荧光阳性的细胞数 / 总细胞数 × 100%, 该值扣除空白细胞对照组的阳性率即为细胞表型分子表达水平。

1.6 LDH 细胞毒实验 复苏上述冻存的 PBMCs 中非贴壁细胞, 用自制的尼龙毛柱分离 T 淋巴细胞, 即自体 T 细胞。将 T 细胞与 DCs 按一定细胞比例 (1 : 10) 加入 96 孔培养板中混合培养, 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 条件下培养 72 h; 同时设单一 T 细胞孔和单一 DCs 孔作为

对照。以胃癌细胞 BGC-823 为靶细胞, 各组刺激 T 细胞产生的细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 作为效应细胞, 按效靶比 30 : 1、20 : 1 和 10 : 1 分别加入 96 孔培养板中, 然后置于 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 以及饱和湿度条件下培养 4 h, 均设 3 个复孔。采用 LDH 细胞毒实验法测定 CTL 活性: 吸取上清液 50 μL, 置于 96 孔板中, 加入 LDH 基液 50 μL, 室温避光 30 min, 加入 50 μL 终止液终止反应, 490 nm 波长处测吸光度 (*D*) 值。按下列公式计算 BGC-823 细胞的杀伤率: 杀伤率 = (实验组 *D* 值 - 效应细胞自然释放组 *D* 值 - 靶细胞自然释放组 *D* 值) / (靶细胞最大释放组 *D* 值 - 靶细胞自然释放组 *D* 值) × 100%。

1.7 ELISA 法测定细胞培养上清液中 IL-12 和 IFN-γ 的含量 取第 5 天分组前 iDCs、第 7 天各组 DCs 培养上清液即成熟 DCs 以及这些成熟 DCs 按 1 : 10 比例刺激 T 细胞 72 h 后的培养上清液, 采用 ELISA 方法分别检测 iDCs 和成熟 DCs 各组培养上清液中 IL-12 含量, 以及成熟 DCs 诱导刺激出的 CTL 组培养上清液中 IFN-γ 的含量。按试剂盒操作说明书进行检测, 每组设 3 个复孔。以标准品浓度作为横坐标, 对应的吸光度 (*D*) 值作为纵坐标, 根据线性回归方程绘制标准曲线, 再依据标准品线性回归方程换算出各样品中分泌的细胞因子浓度。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件对实验结果进行统计学分析。各组实验的结果数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间均数比较采用方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外诱导培养过程中 DCs 的形态学变化 倒置显微镜下观察可见, 从贴壁获得 PBMCs 到细胞因子诱导分化出成熟 DCs 的整个培养过程中, 细胞形态呈现动态变化。PBMCs 培养 2 h 后细胞呈贴壁生长, 在加入 rhGM-CSF 及 rhIL-4 培养 24 h 后出现少量悬浮细胞, 但大部分细胞仍贴壁生长, 并成簇排列, 形态未见异常; 培养 2 d 后, 悬浮细胞增多, 且形态不规则, 有毛刺状突起; 各组培养第 7 天时, 可见大部分细胞悬浮生长, 细胞体积明显增大, 且外形不规则, 细胞膜呈树突状突起, 细胞质丰富, 具有典型 DCs 形态, 各组间形态无明显差异 (图 1)。

2.2 诱导成熟的 DCs 表面表达成熟表型标志蛋白 体外诱导 7 d 后, FCM 法检测成熟 DCs 表型,

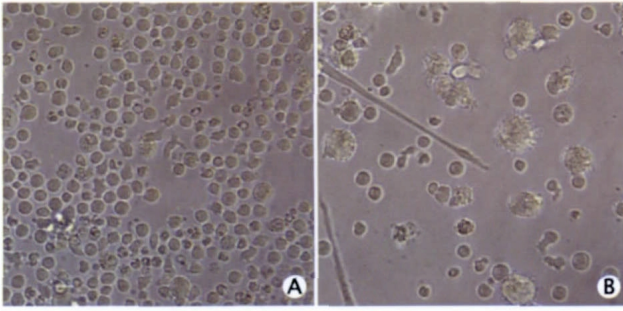


Fig. 1 The morphologic changes of DCs (dendritic cells) at different incubation time points were observed under an inverted phase contrast microscope ($\times 400$). **A:** PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) were cultured with rhGM-CSF (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) and rhIL-4 (recombinant human interleukin-4) for four days; **B:** PBMCs were cultured with rhGM-CSF, rhIL-4 and TNF- α (tumor necrosis factor- α) for seven days.

图1 倒置显微镜下观察不同培养时间段 DCs 形态学变化 ($\times 400$)

表 1 不同条件下培养的 DCs 表面表达表型标志分子水平

Table 1 The expression levels of molecular markers indicating cellular phenotype on the surface of DCs (dendritic cells) under different cultured conditions

Group	$(\bar{x} \pm s, \%, n=3)$			
	CD80	CD83	CD86	HLA-DR
iDCs	9.99 \pm 3.9	5.89 \pm 1.2	10.70 \pm 1.6	26.62 \pm 5.3
Control (DCs)	70.58 \pm 2.6	73.00 \pm 3.1	78.00 \pm 1.8	80.27 \pm 3.4
Lysate-DCs	72.94 \pm 4.2	76.53 \pm 1.9	80.12 \pm 3.4	82.18 \pm 2.5
pJAK2-DCs	75.75 \pm 2.3 [*]	78.22 \pm 2.1 [*]	81.30 \pm 3.6	82.85 \pm 2.8
Lysate + pJAK2-DCs	77.31 \pm 3.0 ^{**}	81.71 \pm 2.8 ^{**}	86.03 \pm 2.0 ^{**}	87.28 \pm 2.4 ^{**}

HLA-DR: Human leukocyte antigen DR. iDCs: Immature DCs, which were treated with rhGM-CSF (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) and rhIL-4 (recombinant human interleukin-4) for 5 days. The mature DCs were induced from iDCs by treatment with 20 ng/mL TNF- α on the sixth day. Compared with the control group, the other three mature DCs groups were additionally treated with Lysate (0.2 mg/mL), pJAK2 polypeptide (15 μ mol/L) and Lysate (0.2 mg/mL) plus pJAK2 polypeptide (15 μ mol/L) on the fifth day, respectively. The phenotypes of these DCs were analyzed by immunofluorescence staining ($n = 3$). ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs the control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs Lysate-DCs group.

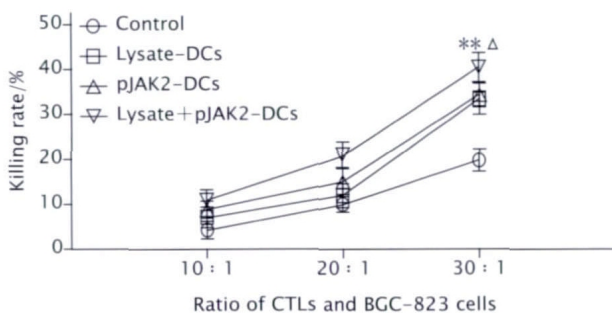


Fig. 2 CTLs (cytotoxic T lymphocytes) induced by different mature DCs (dendritic cells) to kill gastric cancer BGC-823 cells were assayed by LDH (lactate dehydrogenase) cytotoxicity test ($n=3$). Control: Mature DCs alone; Lysate-DCs: Mature DCs treated with Lysate (0.2 mg/mL); pJAK2-DCs: Mature DCs treated with pJAK2 polypeptide (15 μ mol/L); Lysate + pJAK2-DCs: Mature DCs treated with Lysate (0.2 mg/mL) and pJAK2 polypeptide (15 μ mol/L). ^{**} $P < 0.01$, vs the control group; ^{*} $P < 0.05$, vs Lysate-DCs group.

图2 各组 DCs 诱导 CTLs 对胃癌 BGC-823 细胞的杀伤性

检测结果见表 1。各组诱导出的成熟 DCs 均高表达 CD80、CD86、CD83 和 HLA-DR；抗原与多肽共培养 (Lysate + pJAK2-DCs) 组各免疫表型标志分子的表达水平最高，且与 Lysate-DCs 组相比，差异有统计学意义 (CD83、CD86、HLA-DR, $P < 0.05$; CD80, $P < 0.01$)；而且 pJAK2-DCs 组的 CD83 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 诱导成熟的 DCs 刺激 CTL 对胃癌细胞的杀伤活性 以胃癌细胞 BGC-823 为靶细胞，在 10 : 1 ~ 30 : 1 的效靶比范围内，诱导成熟的 DCs 刺激 CTL 对 BGC-823 细胞的杀伤作用与效靶比呈正相关。当效靶比为 30 : 1 时，对照组的 CTL 杀伤率达 (19.77 \pm 2.34) %，低于其他 3 组 ($P < 0.01$, 图 2)；pJAK2-DCs 组与 Lysate-DCs 组之间差异无统计学意义；而抗原与多肽共培养的 Lysate + pJAK2-DCs 组 CTL 杀伤率较二

者单独刺激组 (即 pJAK2-DCs 组与 Lysate-DCs 组) 都高 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.4 DCs 培养上清液中 IL-12 及 INF- γ 的分泌水平 ELISA 法检测各组 DCs 培养上清液中 IL-12 的分泌水平，结果见图 3A；各成熟 DCs 刺激自体 T 淋巴细胞 72 h 后，形成的 CTL 细胞的培养上清液中 INF- γ 分泌水平检测结果见图 3B。结果显示，成熟 DCs 的 IL-12 水平较刺激成熟前明显升高，对照组达 (188.0 \pm 19.13) pg/mL，但另外 3 组的分泌水平又明显高于对照组 ($P < 0.01$)；4 组细胞中 INF- γ 的分泌水平分别为 (96.17 \pm 9.55) (125.29 \pm 13.17) (136.81 \pm 10.31) 和 (159.68 \pm 19.80) pg/mL，抗原与多肽共培养的 Lysate + pJAK2-DCs 组的分泌水平明显高于对照组 ($P < 0.01$)。

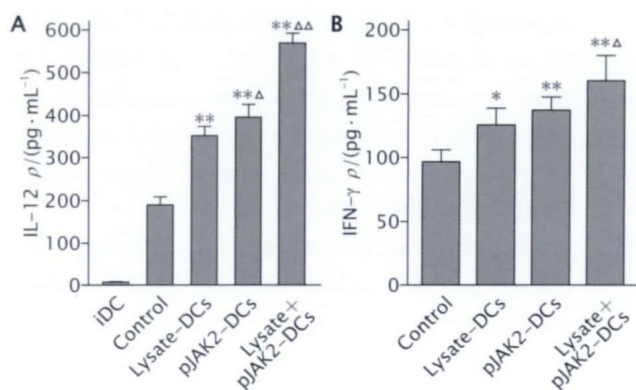


Fig. 3 The levels of secreted IL-12 (interleukin-12) and IFN- γ (interferon- γ) in different mutant DCs (dendritic cells) were detected by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ($n=3$). A: IL-12 was secreted in culture supernatants from immature DCs and mature DCs. B: IFN- γ was secreted in culture supernatants from CTLs (cytotoxic T lymphocytes) induced by mature DCs. Control: Mature DCs alone; Lysate-DCs: Mature DCs treated with Lysate (0.2 mg/mL); pJAK2-DCs: Mature DCs treated with pJAK2 polypeptide (15 μ mol/L); Lysate + pJAK2-DCs: Mature DCs treated with Lysate (0.2 mg/mL) and pJAK2 polypeptide (15 μ mol/L). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs the control group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, vs Lysate-DCs group.

图3 不同组 DCs 培养上清液中 IL-12(A)及 IFN- γ (B) 的分泌水平

3 讨论

DCs 是唯一能激活初始型 T 细胞的抗原递呈细胞 (antigen presenting cell, APC), 其功能与成熟状态密切相关, 它决定着特异性免疫应答对抗原的选择性并提供共刺激信号, 能有效地活化 CD8⁺ CTL, 产生体内外抗肿瘤效应, 在肿瘤细胞免疫和体液免疫中均发挥重要作用^[5,6]。目前, 关于 DCs 疫苗的制备及应用于肿瘤治疗的相关研究已经成为热点之一。SOCS1 作为一个各种细胞因子如 IFN- γ 、IL-2、IL-6、IL-7、IL-12 或 IL-15 负调控的信号, 是通过抑制 DCs、T 细胞和其他免疫细胞中的 JAKs 发挥作用。相关研究表明, SOCS1 在 DCs 的诱导分化及成熟过程中参与负反馈调节^[7]。

近年来, 多项研究发现抑制 DCs 中 SOCS1 的表达能有效地增强抗原特异性的抗肿瘤免疫。Subramanya 等^[8] 采用 siRNA 沉默 SOCS1 的表达可诱导培养人骨髓来源的 DCs, 分化成熟的 DCs 提高了对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的反应, 并有更强的混合淋巴细胞反应。远洋等^[9] 研究结果显示: SOCS1 沉默联合喉癌 Hep-2 抗原致敏的 DCs 可显著上调表面分子

CD83、CD86 和 HLA-DR 的表达, 能有效刺激 T 细胞增殖, 增加 IFN- γ 的分泌量, 最终增强 CTL 的特异性杀伤作用, 产生高效而特异性的抗喉癌免疫应答。Shen 等^[2] 及 Hong 等^[10] 研究亦有相似的结果。基于此, 本实验设想通过 SOCS1 拮抗多肽 pJAK2 参与诱导培养出具有更强抗原递呈及特异性抗肿瘤作用的 DCs 疫苗。

pJAK2 (1001—1013) 多肽是一条含有 13 个氨基酸残基的小分子多肽, 可通过人工合成大量制备, 且其氨基酸序列与体内的 pJAK2 自动磷酸化位点相同。Waiboci 等^[11] 研究表明 pJAK2 (1001—1013) 多肽具有以下作用: (1) pJAK2 多肽能一定程度地增强 IFN- γ 的活性; (2) 前列腺癌细胞经转染产生的 SOCS1 蛋白能降低 IL-6 引起的细胞内 STAT3 活化水平, 而 pJAK2 多肽能抑制 SOCS1 蛋白的这种作用; (3) pJAK2 多肽与荧光素酶报告基因启动子区的 IFN- γ 活化序列 (IFN-gamma activated sequence, GAS) 结合, 从而进一步活化 IFN- γ ; (4) pJAK2 多肽增强抗原特异性脾细胞的增殖能力。

本实验采用经典的细胞因子组合 IL-4、GM-CSF 和 TNF- α , 在培养第 5 天将 DCs 分为 4 组: 单纯 DCs 培养 (对照) 组、抗原 0.2 mg/mL 负载 (Lysate-DCs) 组、pJAK2 多肽 15 μ mol/L 修饰 (pJAK2-DCs) 组、抗原 0.2 mg/mL 与 pJAK2 多肽 15 μ mol/L 共培养 (Lysate + pJAK2-DCs) 组, 继续培养 24 h 后再加入促成熟因子。各组均成功诱导出成熟 DCs, 倒置显微镜下均见 DCs 的典型形态。流式细胞仪检测成熟 DCs 的特异性表面标志, 结果显示各组均高表达 CD80、CD83、CD86 和 HLA-DR, 但各组均以抗原与多肽共培养 (Lysate + pJAK2-DCs) 组的表达水平最高; pJAK2-DCs 组的 CD83 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$)。这提示 SOCS1 影响了 DCs 的成熟, 且 SOCS1 拮抗物 pJAK2 多肽能诱导出更成熟的 DCs。

为了说明所诱导的成熟 DCs 激活的 CTL 活性对胃癌细胞具有杀伤作用, 本研究进行 LDH 细胞毒实验。结果显示, 随效靶比的增高, CTL 杀伤效应越强。当效靶比为 30 : 1 时, 对照组 CTL 对胃癌细胞的杀伤率低于其他 3 组 ($P < 0.01$); pJAK2-DCs 组与 Lysate-DCs 组之间差异无统计学意义; 而 SOCS1 拮抗物及抗原共同培养的 Lysate + pJAK2-DCs 组的 CTL 杀伤率较单独刺激的两组 (即 pJAK2-DCs 组与 Lysate-DCs 组) 都高 ($P < 0.05$)。ELISA 法检测各组培养上清液中 IL-12 的分泌水平, 显

示各组成熟 DCs 的 IL-12 表达水平较 iDCs 显著升高 ($P < 0.01$), 提示 IL-12 为成熟 DCs 所分泌。这与 Li 等^[12]的研究结果相符, 成熟 DCs 分泌 IL-12, 调节 Th0 细胞向 Th1 细胞分化, 从而介导细胞免疫应答。而 Lysate + pJAK2-DCs 组则具有较其他成熟 DCs 组更高的分泌量, 能诱导更强的 Th1 型反应。ELISA 法还测得各组 DCs 与自体 T 细胞反应刺激 CTL 后培养上清液中 IFN- γ 的分泌水平, 结果显示对照组 $<$ Lysate-DCs 组 $<$ pJAK2-DCs 组 $<$ Lysate + pJAK2-DCs 组。IFN- γ 主要由活化的 T 细胞 (包括 Th0、Th1 细胞和几乎所有 CD8⁺ T 细胞) 和 NK 细胞产生, 可促进 Th0 细胞分化为 Th1 细胞, 并抑制 Th2 细胞增殖, 促进 CTL 成熟和激活。本实验虽不能完全排除其中混杂的 NK 细胞对 CTL 杀伤效应及 IFN- γ 水平的影响, 而针对同一条件混合体系, pJAK2 参与培养的 DCs 中 IFN- γ 分泌水平较对照组高, 这间接反应了 pJAK2 参与培养的 DCs 具有更强的 CTL 活性和 Th1 功能。这与 Takahashi 等^[13]研究发现 SOCS1^{-/-} Treg 细胞可分泌高水平 IFN- γ 的结果相似。

然而, 本研究没有检测 pJAK2 多肽对 JAK-STAT 信号通路相关信号分子 (如 STAT1、STAT3 和 STAT6 等) 的磷酸化或活化的影响, 也未考虑 pJAK2 多肽在实验处理过程中可能存在的降解问题等。这些问题均有待在以后的研究中加以解决。

综上所述, 本研究应用 SOCS1 拮抗物 pJAK2 多肽 (1001—1013) 成功诱导了具有典型细胞形态、高水平的胃癌细胞杀伤作用、IL-12 和 INF- γ 均分泌的成熟 DCs, 这为培养出具有更强抗原递呈及特异性抗肿瘤作用的 DCs 疫苗奠定了实验基础, 同时为 DCs 应用于肿瘤临床治疗提供了重要依据。

[参考文献]

- [1] STARR R, WILLSON T A, VINEY E M, *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling[J]. *Nature*, 1997, 387(6636):917-921.
- [2] SHEN L, EVEL-KABLER K, STRUBE R, *et al.* Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(12):1546-1553.
- [3] AHMED C M, DABELIC R, MARTIN J P, *et al.* Enhancement of antiviral immunity by small molecule antagonist of suppressor of cytokine

- signaling[J]. *J Immunol*, 2010, 185(2):1103-1113.
- [4] ZHAO M, GAO F H, WANG J Y, *et al.* JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer[J]. *Lung cancer*, 2011, 73(3):366-374.
- [5] DENG J, ZHANG Y, FENG J, *et al.* Dendritic cells loaded with ultrasound-ablated tumor induce *in vivo* specific antitumor immune responses[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(3):441-448.
- [6] 焦庆昉, 易发平, 陈全, 等. 树突状细胞疫苗的制备及其体外诱导细胞毒性 T 淋巴细胞对宫颈癌 CaSki 细胞的杀伤作用[J]. *肿瘤*, 2011, 31(2):106-110.
- [7] BÖTTCHER I, BELLINGHAUSEN I, KÖNIG B, *et al.* Different regulation of T helper1- and T helper2-promoting cytokine signalling factors in human dendritic cells after exposure to protein *versus* contact allergens[J]. *Immunology*, 2008, 123(1):139-144.
- [8] SUBRAMANYA S, ARMANT M, SALKOWITZ J R, *et al.* Enhanced induction of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cell-targeted delivery of SOCS-1 siRNA[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(11):2028-2037.
- [9] 远洋, 王雪峰, 张扬, 等. SOCS1 沉默的树突状细胞疫苗在喉癌治疗中的实验研究[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012, 26(4):169-173.
- [10] HONG B, REN W, SONG X T, *et al.* Human suppressor of cytokine signaling 1 controls immunostimulatory activity of monocyte-derived dendritic cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(20):8076-8084.
- [11] WAIBOCI L W, AHMED C M, MUJTABA M G, *et al.* Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist[J]. *J Immunol*, 2007, 178(8):5058-5068.
- [12] LI D Y, GU C, MIN J, *et al.* Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(1):131-134.
- [13] TAKAHASHI R, NISHIMOTO S, MUTO G, *et al.* SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production[J]. *J Exp Med*, 2011, 208(10):2055-2067.

[本文编辑] 张俊彦