

放疗联合抑制 *STAT3* 表达对肿瘤浸润树突状细胞成熟的影响*

张启芳¹, 吴昌学¹, 禹文峰¹, 官志忠¹, 柏 华^{2**}

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学第三附属医院 医学实验中心, 贵州 都匀 558000)

[摘要] 目的: 研究放疗联合抑制信号转导与转录激活因子3(*STAT3*)表达对肿瘤浸润树突状细胞(TIDCs)成熟的影响。方法: 在BALB/c小鼠大腿皮下接种小鼠恶性B细胞淋巴瘤A20细胞形成肿瘤,在肿瘤内注射*STAT3*基因特异的shRNA质粒并进行放疗;从肿瘤中富集TIDCs,采用荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)方法检测TIDCs中*STAT3* mRNA表达水平,蛋白染色方法检测磷酸化*STAT3*蛋白表达水平和DCs表面分子MHCII、CD40及CD80的表达,用流式细胞仪收集细胞染色数据。结果: 放疗联合抑制*STAT3*表达显著降低肿瘤浸润TIDCs中*STAT3* mRNA表达水平和*STAT3*蛋白磷酸化水平;与单独放疗相比,放疗联合抑制*STAT3*表达显著增加肿瘤浸润TIDCs表面分子MHCII、CD40、CD80及CD86的表达水平。结论: 放疗联合抑制*STAT3*治疗表达能促进肿瘤浸润TIDCs的成熟。

[关键词] 信号转导与转录激活因子3; 放射疗法; 淋巴瘤, B细胞; 树突状细胞; 肿瘤浸润

[中图分类号] R730.5; R733.1; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)11-1162-04

Combining Radiotherapy with *STAT3* Silencing Promotes the Maturation of Tumor-infiltrating Dendritic Cell

ZHANG Qifang¹, WU Changxue¹, YU Wenfeng¹, GUAN Zhizhong¹, BAI Hua²

(1. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Medical Experimental Center, Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Duyun 558000, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of combination of radiotherapy with *STAT3* silencing on the maturation of tumor-infiltrating dendritic cells. **Methods:** Murine malignant B cell lymphoma A20 cells were subcutaneously implanted in BALB/c mice to grow tumors. Tumors were treated with a plasmid expressing *STAT3*-specific shRNA by intratumor injection and local radiation. Tumor-infiltrating dendritic cells (TIDCs) were enriched from tumors. *STAT3* mRNA level in TIDCs was determined by qPCR, phospho-*STAT3* level by intracellular staining and subsequent data collected by flow cytometry. The expression of MHCII, CD40, CD80 and CD86 were determined by extracellular staining and subsequent data collected by flow cytometry. **Results:** Combination of radiotherapy with *STAT3* silencing inhibited *STAT3* mRNA and decreased phosphorylation level of *STAT3*. Compared to radiotherapy alone, *STAT3* silencing plus radiotherapy significantly upregulated the expression of MHCII, CD40 and CD80. **Conclusions:** Radiotherapy combined *STAT3* inhibition promotes the maturation of tumor-infiltrating dendritic cells.

[Key words] signal transducer and activator of transcription; radiotherapy; lymphoma, B cell; dendritic cells; tumor-infiltration

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81560482); 贵州省“2011 协同创新中心”资助项目[黔教合协同创新中心(2014)06]; 贵州省科技厅重大专项[黔科合计 Z 字(2012)4010]; 贵州省科技厅科技计划项目[黔科合 LG 字(2012)009]

**通信作者 E-mail: 842031616@qq.com

网络出版时间: 2015-10-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20151013.1228.018.html>

套细胞淋巴瘤(Mantle cell lymphoma, MCL)是所有 B 细胞非霍奇金淋巴瘤中预后较差的肿瘤之一^[1-2]。MCL 患者对化疗加单克隆抗体的一线治疗初始反应良好,但几乎所有的 MCL 患者最终会复发,并对进一步的治疗反应越来越差^[3-5]。树突状细胞(dendritic cells, Dcs)是机体中最主要的抗原提呈细胞,在抗肿瘤免疫反应中起重要作用^[6-9]。在肿瘤微环境中,肿瘤细胞分泌细胞因子白介素-6(interleukin-6, IL-6)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)、白介素-11(interleukin-11, IL-11)、分泌转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等^[10-14]抑制浸润在肿瘤组织中的 DCs 成熟,致使他们成为耐受性 DCs,导致肿瘤细胞免疫逃逸。信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, *STAT3*)信号通路的激活是抑制 DCs 成熟的一个关键^[15-17]。本研究采用小鼠恶性 B 细胞淋巴瘤 A20 细胞,利用低剂量放疗诱导免疫原性的细胞死亡激活小鼠免疫系统,同时抑制 *STAT3* 表达,探讨联合放疗与抑制 *STAT3* 表达对肿瘤浸润树突状细胞(tumor-infiltrating dendritic cells, TIDCS)成熟的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

小鼠恶性 B 细胞淋巴瘤 A20 细胞购自美国 ATCC 公司, *STAT3* 探针购自 Universal Probe Library(UPL), 兔抗 *STAT3* (sc-8019)、羊抗 β -actin (sc-1616)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(ZB-2301)、兔抗羊二抗(ZB-2306)购自美国 Santa Cruz 公司,小鼠 DCs 富集试剂盒(The StemSep™ Mouse Dendritic Cell Enrichment Kit)购自加拿大 STEMCELL Technologies 公司,荧光标记抗体主要组织相容性复合体(MHC)II、CD40、CD80 购自美国 eBiosciences, Phospho-Tyr705-*STAT3* Alexa Fluor 647 购自 BD Biosciences, 胎牛血清、1x Antibiotic-Antimycotic、1640 培养液 Gibco 公司, RNeasy Plus kit 购自 Qiagen 公司, cDNA 合成试剂盒(iScript)购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 把 A20 细胞放于含 10% 胎牛血清和 1x Antibiotic-Antimycotic 的 RPMI

1640 培养液, 5% CO_2 的 37 °C 培养箱中培养。

1.2.2 小鼠带瘤实验 在 100 μL 1 × PBS 中制备含 5×10^6 的 A20 细胞悬浮,并接种于 BALB 小鼠大腿皮下。根据公式 $V = L \times W^2/2$ 计算肿瘤体积(V 为体积, L 为瘤体的长, W 为宽)。待瘤块长至约 150 mm^3 时,随机分为 3 组,每组 6 只,分别为 PBS 组、放疗 + 空质粒组(RT + empty)、放疗 + shRNA (RT + shRNA)组,分别于放疗前、放疗当天和第二天瘤内注射等量 1 × PBS、空载体和 *STAT3* 基因特异 pFLU-EGFP-Puromycin *STAT3* shRNA 质粒(按小鼠体重 0.50 mg/kg),放疗前瘤内注射 *STAT3* 基因特异 shRNA 质粒 1 次,肿瘤处放疗 10 Gy,放疗当天和第二天按小鼠体质量 0.50 mg/(kg · 次)瘤内注射质粒。放疗第三天收肿瘤。

1.2.3 肿瘤 CDs 富集 用手术刀切碎肿瘤组织,加入胶原蛋白酶-IV/脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)处理,置于含 5% CO_2 的 37 °C 培养箱 30 min,加入细胞培养液 RPMI, 2 000 r/min 离心 10 min,用 RPMI 洗细胞一次,计数细胞;按小鼠 DCs 富集试剂盒说明书操作,富集小鼠 TIDCs,用流式细胞仪验证。

1.2.4 *STAT3* mRNA 表达水平 采用荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)方法,采用 RNeasy 试剂提取细胞总 RNA,按 iScript 反转录试剂盒说明书合成 cDNA,用 qPCR 检测 *STAT3* mRNA 表达水平。用 ProbeFinder Version 2.45(Roche)软件设计探针-引物,探针购自 Universal Probe Library(UPL), *STAT3* 上游引物序列为 5'-CTGCCTAGATCGGCTAGAAAAC-3',下游引物序列为 5'-CCCTTTGTAGGAACTTTTTC-3',内参照 TATA-box binding protein(*TBP*)采用 Roche's Reference Assays。qPCR 反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s(40 个循环)。采集待测基因和内参照 *TBP* 的荧光信号值,计算 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 及相对含量(RQ), $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.2.5 细胞内或细胞膜蛋白染色 染色缓冲液洗肿瘤 DCs 1 次,小鼠 CD16/32 抗体和小鼠血清封闭细胞膜 Fc γ II/III 受体,冰上孵育 10 min, 2 000 r/min 离心 10 min(细胞内蛋白需用 1.6% 多聚甲醛固定、预冷的甲醇破膜,染色缓冲液清洗 2 次,每次 2 000 r/min 离心 10 min),加入用染色缓冲液稀释荧光标记抗体,冰上避光孵育 30 min,染色缓冲液清洗 2 次,重悬细胞,用流式细胞仪收集数据,用 flowjo 软件(treestar)分析数据。

1.3 统计学分析

采用 Graphpadprism 6.0 自带统计分析软件处

理数据,每组实验重复 3 次,数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组单变量实验间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA); $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

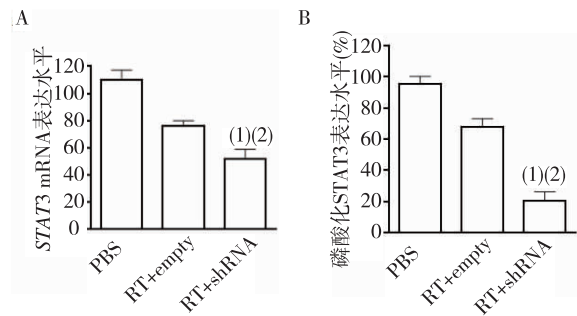
2.1 *STAT3* mRNA 和 *STAT3* 磷酸化蛋白表达水平

与 PBS 组和 RT + empty 组比较, RT + shRNA 组 *STAT3* mRNA 表达水平和磷酸化 *STAT3* 蛋白表达水平均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),分别被抑制了 50% ~ 60% 和 80%,说明放疗联合 *STAT3* 基因特异的 shRNA 可以有效地抑制肿瘤浸润 DCs 中 *STAT3* 表达。

2.2 TIDCs 表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平

与 PBS 组和 RT + empty 组比较, RT + shRNA 组 MHCII、CD40 及 CD80 平均荧光强度均显著增

加,差异有统计学意义($P < 0.05$),分别增加了 50%、60% 和 80%,说明放疗联合 *STAT3* 基因特异的 shRNA 可以有效增加 TIDCs 表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平。

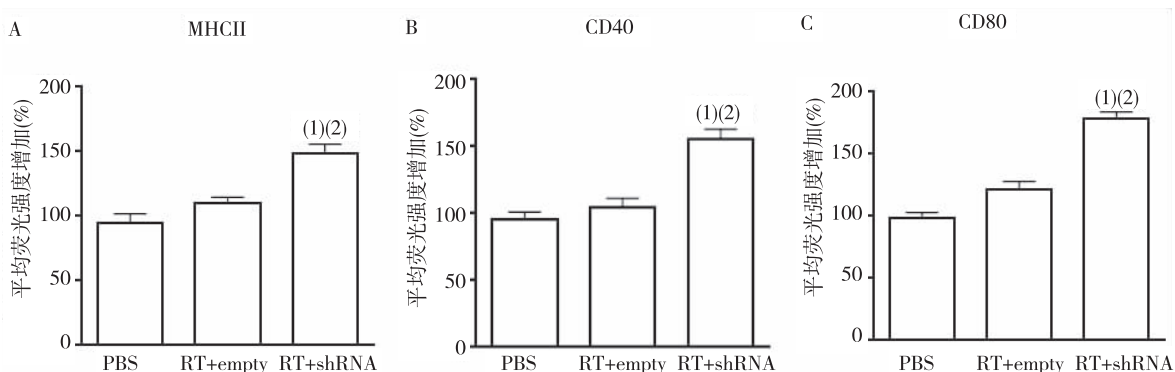


⁽¹⁾ 与 PBS 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与 RT + empty 组比较, $P < 0.05$

图 1 TIDCs *STAT3* mRNA 和 *STAT3*

磷酸化蛋白表达水平

Fig. 1 Radiotherapy combined with *STAT3* shRNA silenced *STAT3* mRNA and decreased *STAT3* Activity



⁽¹⁾ 与 PBS 组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与 RT + empty 组比较, $P < 0.05$

图 2 TIDCs 表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平

Fig. 2 The expression levels of MHCII, CD40 and CD80

3 讨论

MCL 是一种进展快、无法治愈的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤亚型。本研究应用 *STAT3* 基因特异 pFLU-EGFP *STAT3* shRNA 质粒注射恶性 B 细胞淋巴瘤并给肿瘤处 10 Gy 放疗处理,探讨肿瘤浸润 DCs 表面分子 MHCII、CD40 及 CD80 的表达水平,结果发现,应用 *STAT3* 基因特异 shRNA 联合放疗可上调肿瘤浸润 DCs 的表面 MHCII 类分子与共刺激分子(CD40 和 CD80)的表达,有效地促进肿瘤浸润 DCs 成熟。

免疫细胞能够杀死肿瘤化疗耐药细胞^[7-8],激

活 MCL 患者的免疫系统可引起机体持续的免疫应答^[12]。因此,激活具有抗原提呈功能的 DCs 成为治疗肿瘤的首选策略之一。DCs 迁移能力强,浸润到肿瘤组织,但肿瘤细胞分泌细胞因子可抑制浸润在肿瘤组织中的 DCs 成熟,成为耐受性 DCs^[10-14]。耐受性 DCs 表面 MHC II 类分子与共刺激分子(CD40 和 CD80)均为低表达或不表达,不能有效的提呈抗原激活 CD8⁺ T 细胞杀伤肿瘤细胞,导致了肿瘤细胞免疫逃逸^[6-9]。*STAT3* 调控 DCs 分化和成熟,抑制 *STAT3* 表达能促进 DCs 分化和成熟^[10-12,15-16]。放疗在杀死肿瘤细胞的同时,还诱导细胞死亡,因死亡细胞具有免疫原性,激活机体免疫系统,消除远端病灶^[18-19];但大剂量放疗对癌

症患者副作用较大,临床常使用小剂量多次放射疗法。但对于放疗后复发患者,放疗效果较差;前人和笔者前期研究发现,放疗诱导的死亡细胞也释放如线粒体 DNA、IL-6 等因子激活残余肿瘤细胞中的 *STAT3* 蛋白,激活的 *STAT3* 蛋白又促进肿瘤生长,引起复发^[20]。这就造成多次放疗诱导肿瘤细胞多次死亡,但又多次激活肿瘤细胞中的 *STAT3* 蛋白,持续性促进肿瘤生长。因此本研究尝试一次放疗联合抑制 *STAT3* 表达是否能杀死肿瘤细胞,协同激活免疫系统,抑制残余肿瘤细胞的 *STAT3* 表达,规避放疗的不足,阻止肿瘤复发。结果发现一次放疗联合抑制 *STAT3* 表达在降低 *STAT3* mRNA 表达水平的同时引起 *STAT3* 磷酸化蛋白表达下降,上调 TIDCs 的表面 MHC II 类分子与共刺激分子(CD40 和 CD80)的表达,促进 TIDCs 成熟。这种联合治疗是否能增强恶性 B 细胞的免疫原性功能还有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] Williams ME, Dreyling MH, Kahl BS, et al. Mantle cell lymphoma: report of the 2009 mantle cell lymphoma consortium workshop [J]. *Leuk Lymphoma*, 2010(3):390-398.
- [2] Martin PA, Chadburn, Christos P, et al. Intensive treatment strategies may not provide superior outcomes in mantle cell lymphoma: overall survival exceeding 7 years with standard therapies [J]. *Ann Oncol*, 2008(7):1327-1330.
- [3] Dreyling M, Amador V, Callana M, et al. Update on the molecular pathogenesis and targeted approaches of mantle cell lymphoma (MCL)- summary of the 12 annual conference of the EUROPEAN MCL NETWORK [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014(4):1-26.
- [4] Chen Y, Wang M, Romaguera J. Current regimens and novel agents for mantle cell lymphoma [J]. *Br J Haematol*, 2014(1):3-18.
- [5] Foran JM, Cunningham D, Coiffier B, et al. Treatment of mantle-cell lymphoma with rituximab (chimeric monoclonal anti-CD20 antibody): analysis of factors associated with response [J]. *Ann Oncol*, 2000(Suppl 1):117-121.
- [6] Sabado RL, Bhardwaj N. Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move [J]. *Nature*, 2015(7543):300-301.
- [7] Palucka AK, Ueno H, Fay JW, et al. Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells[J]. *Immunol Rev*, 2007(220):129-150.
- [8] Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf IG. Dendritic cell, the immunotherapeutic cell for cancer [J]. *Ind J Med Resh*, 2004(4):133-138.
- [9] Palucka K, Hideki U, Joseph F, et al. Dendritic cells and immunity against cancer [J]. *Intern Med*, 2011(1):64-73.
- [10] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of *STAT3* in the tumour microenvironment [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007(1):41-51.
- [11] Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, et al. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells [J]. *J Immunol*, 1997(10):4772-4780.
- [12] Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells [J]. *Nat Med*, 2004(1):48-54.
- [13] Williams L, Bradley L, Smith A, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages [J]. *J Immunol*, 2004(1):567-576.
- [14] Gabrilovich DI, Chen HL, Gargis KR, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells [J]. *Nat Med*, 1996(1):1096-1103.
- [15] Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, et al. Hyperactivation of *STAT3* is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer [J]. *J Immunol*, 2004(1):464-474.
- [16] Kitamura H, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6-*STAT3* controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells [J]. *Immunity*, 2005(5):491-502.
- [17] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The *STAT3*-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation [J]. *Science*, 2014(6181):310-313.
- [18] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death in radiation therapy [J]. *OncoImmunology*, 2013(10):26536.
- [19] Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer therapy [J]. *Annu Rev Immunol*, 2013(10):51-72.
- [20] Gao C, Kozłowska A, Nechaev S, et al. TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy [J]. *Cancer Res*, 2012(17):4440-4448.

(2015-09-02 收稿,2015-09-28 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌