

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.009

肿瘤细胞对血清补体杀伤耐受的机制研究*

吴林峰¹ 雷小英^{2△} 颜真² 孙建斌² 向安²

(1 第四军医大学药理学系 2010 级学员一队 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学药理学系药物基因组学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨肿瘤细胞耐受血清补体杀伤的分子机制。**方法:**将表达不同血型抗原的肿瘤细胞与添加同血型血清的培养基孵育,获得耐受血清杀伤的肿瘤细胞。无血清悬浮培养肿瘤干细胞,对耐受血清杀伤的肿瘤细胞和肿瘤干细胞分别提取 mRNA,进行反转录 PCR,检测肿瘤干细胞干性标志物和补体调节蛋白的表达情况;干扰补体调节蛋白,检测肿瘤细胞对血清补体的杀伤情况。**结果:**对分别表达血型抗原 A、B 和 H 的 HT-29、KATO III、MCF7 肿瘤细胞均获得耐受血清杀伤的耐受细胞,耐受细胞高表达三种膜性补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59,以及部分肿瘤干细胞干性标志物;spheroid 悬浮球肿瘤干细胞高表达上述三种膜性补体调节蛋白,特别是 CD46;在肿瘤细胞中腺病毒干扰 CD46 的表达,可显著增强血清补体对肿瘤细胞的杀伤率。**结论:**补体调节蛋白 CD46 分子可通过增强肿瘤细胞的干性而介导肿瘤细胞对血清补体的杀伤耐受。

关键词:补体;补体调节蛋白;CD46

中图分类号:R730.231 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5833-04

Exploring the Molecular Mechanism of Tumor Resistance to Complement Attack of Human Serum*

WU Lin-feng¹, LEI Xiao-ying^{2△}, YAN Zhen², SUN Jian-bin², XIANG An²

(1 The team 1 of students, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Pharmacogenomics, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: The molecular mechanism of tolerance to complement of human serum in tumor cells was explored. **Methods:** Tumor cells resistant to the complement killing of human serum were obtained by culturing tumor cells expressing blood antigen in 1640 medium with the addition of human serum and spheroid stem-like tumor cells were cultured in medium without serum. mRNA was extracted from resistant tumor cells and spheroid cells and reverse-transcript PCR was performed to detect the expression of markers and complement regulatory proteins; the cytolysis rate was determined by interfering CD46 in tumor cells with recombinant adenovirus. **Results:** Resistant HT-29, KATO III and MCF7 cells expressing blood antigen A, B and H, respectively to complement attack of human serum expressed higher level of membrane complement regulatory proteins CD46, CD55 and CD59 than that of parental tumor cells. In addition, spheroid stem-like tumor cells displayed a high level of CD46, CD55 and CD59, especially CD46. Finally, down-regulation of CD46 expression with adenovirus can significantly enhance the cytolysis of tumor cells induced by human serum. **Conclusions:** Complement regulatory molecular CD46 can mediate tumor resistance to complement killing by up-regulating the stemness of tumor cells.

Key words: Complement; Complement regulatory protein; CD46

Chinese Library Classification(CLC): R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5833-04

前言

肿瘤免疫编辑这一理论认为,免疫系统能够在某个阶段清除异常的转化细胞^[1]。时有报道肿瘤患者发生了自发性肿瘤回归^[2-4]。而人群调查研究结果提示,确诊前的恶性肿瘤自发清除的机率比预料的要高^[5-8]。实验研究证实,适应性免疫和固有免疫的某种必须成分缺乏将会增加化学物诱变的肿瘤发生的敏感性^[9]。其中,细胞介导的肿瘤免疫编辑获得了较广泛的关注,而补体,固有免疫系统的效应分子,在肿瘤免疫编辑中的作用仍有争议^[10-13]。

一直以来,补体被认为在与恶性细胞的斗争中发挥着有益

的作用,比如,在肿瘤细胞表面可检测到模式识别分子和调理素,提示在肿瘤微环境中发生了补体的活化^[14,15];但同时,某些肿瘤细胞能够耐受补体的细胞裂解作用^[16]。我们的研究表明,膜性补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59 参与了肿瘤细胞对血清补体的杀伤耐受,特别是 CD46 分子,可通过增强肿瘤细胞的干性增强其抗性。

1 材料与方法

1.1 实验材料和主要试剂

1640 培养基(Hyclone),干细胞培养基 DMEM/F12 (1:1) 和不含维生素 A 的 B27 添加剂 (Invitrogen),EGF 和 bFGF 生长

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(30901357)

作者简介:吴林峰(1992-),男,本科,电话:18700916759, E-mail:50641566@qq.com

△ 通讯作者:雷小英, E-mail:leixiaoy@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2014-04-11 接受日期:2014-04-30)

因子(peprotech), TRIzol 和 RT-PCR 反转录试剂盒(Invitrogen), 腺病毒载体(Invitrogen), 293 A 细胞和 ViraPower Promoterless Gateway 腺病毒试剂盒(Invitrogen), 人新鲜血清收集自健康体检者, 引物合成在奥科生物公司。

1.2 方法

1.2.1 耐受补体杀伤细胞培养 我们收集了多例健康人新鲜血清, 对分别表达血型抗原 A、B 和 H 的结直肠癌 HT-29、胃癌 KATO III、乳腺癌 MCF7 肿瘤细胞进行同血型血清杀伤实验。96 孔板中接种 10^3 肿瘤细胞, 加入 10% 的人血清。台盼蓝染色计数, 计算血清对细胞的杀伤率: (死细胞数 / 细胞总数) $\times$ 100%。重复 3 次, 获得平均杀伤率, 以及标准差。杀伤率在 20% 以上称为阳性, 否则为阴性。在 10% 同血型血清孵育下存活的细胞, 扩大培养, 获得耐受细胞。

1.2.2 肿瘤干细胞培养 配置干细胞培养基: 将 DMEM/F12 (1:1)、EGF (20 ng/mL)、FGF (10 ng/mL)、ITS-G、B27 添加剂按比例配置。以 3×10^3 /mL 的密度将 HT-29、KATO III、MCF7 细胞铺于超低粘附 24 孔板中, 无血清悬浮培养 7-10 天, 获得 spheroid 球样干细胞。

1.2.3 反转录 PCR TRIzol 耐受血清的肿瘤细胞和肿瘤干细胞, 提取 mRNA, 操作步骤按照 TRIzol 说明书进行; 定量后的 mRNA 按照 Invitrogen 反转录试剂盒说明进行 cDNA 反转录。反转录生成的 cDNA 模板, 取 1-3 μ L, 分别用 CD46、CD55、CD59、OCT-4 和 β -actin 的引物, 按照 Takara SYBR Premix Ex Taq II 说明书进行, 在 ABI 7500 fast real-time PCR system 平台上进行 RT-PCR, 相对定量结果应用 PCR 仪系统软件生成。

1.2.4 腺病毒表达 siRNA 干扰 CD46 的表达 首先使用 Gateway 系统(Invitrogen), 将含 H1 启动子和 CD46 干扰引物的序列从 pSUPER 载体克隆入 pENTR 2B 中; 其次使用 ViraPower Promoterless Gateway 腺病毒表达系统试剂盒(Invitrogen), 将重组 pENTR 2B 与无启动子的 pAd/PL-DEST 腺病毒载体进行 LR 反应, 获得含 H1 启动子和 CD46 干扰序列的重组腺病毒表达载体。脂质体转染将该重组腺病毒载体导入 293A 细胞, 7-12 天后 293A 细胞大部分裂解后, 收获培养上清及 293A 细胞, 放置于 -80 $^{\circ}$ C 30 分钟, 然后再 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟, 重复 2 次后 3000 rpm 离心 15 分钟, 收获上清。100 μ L 上清感染 293A 细胞, 2-4 天后待细胞裂解后重复上述步骤, 收获上清, 10 倍稀释该病毒液, 6 孔板铺 293A 细胞, 8-12 天后计数病毒斑的数量, 计算该病毒液的滴度。

使用 10 倍稀释的病毒液感染肿瘤细胞 HT-29, 并与 10% 的同血型人血清孵育, 计算杀伤率; 对照腺病毒和干扰 CD46 的腺病毒感染后 24 h, 无血清干细胞培养基培养, 计数干细胞成球率。

2 结果

2.1 耐受血清杀伤细胞高表达膜性补体调节蛋白和部分干性标志物

自 2010 年始, 在西京医院收集健康人血清多例。获得的血清, 分别对 HT-29、KATO III 和 MCF7 进行同血型血清杀伤实验。将 A 型血清与表达血型抗原 A 的 HT-29 细胞孵育, B 型血清与表达血型抗原 B 的 KATO III 细胞孵育, O 型血清与表达

血型抗原 H 的 MCF7 细胞孵育, 获得耐受血清杀伤的肿瘤细胞。以 HT-29 肿瘤细胞为模型, 扩大培养存活的耐受肿瘤细胞, TRIzol 裂解提取 mRNA, 反转录成 cDNA, 进行 RT-PCR。与该亲本肿瘤细胞相比, 耐受肿瘤细胞 CD46、CD55 和 CD59 的表达水平均有不同程度的增高, 且干性标记 Lin28a 的表达水平明显增高, c-Myc、Klf4、catenin、CD44 和 Nanog 的表达也都有不同程度的增加, 而 Sox2 表达水平变换不明显(图 1 A 和 B)。

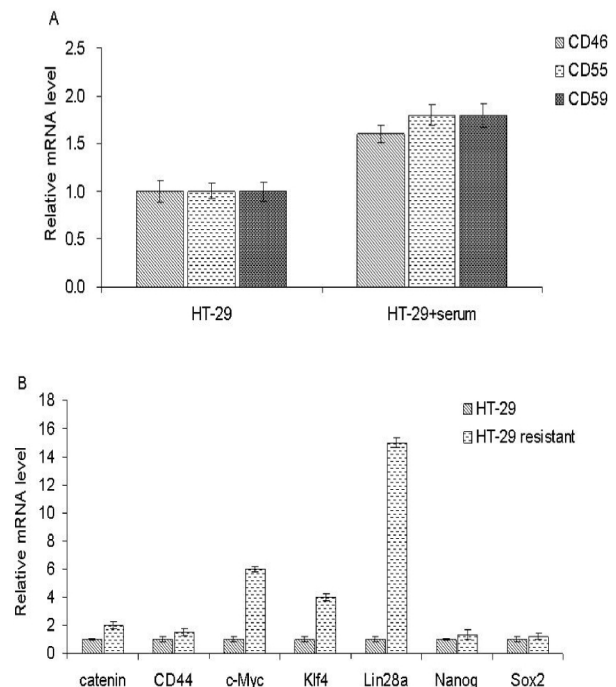


图 1 膜性补体调节蛋白在耐受肿瘤细胞和亲本肿瘤细胞中的 mRNA 表达水平。A, 耐血清杀伤肿瘤细胞与亲本肿瘤细胞的比较; B, 耐受细胞部分干性标记的表达

Fig.1 The mRNA level of membrane complement regulatory proteins in resistant cancer cells and parental cancer cells. A, Comparison of resistant cancer cells with parental cancer cells; B, The expression of stemness markers in resistant cancer cells

2.2 HT-29 spheroid 球样干细胞膜性补体调节蛋白的表达高于亲本肿瘤细胞

HT-29 spheroid 球样干细胞(图 2 A 和 C), 其干性标志分子 Lin28a、Nanog、 β -catenin、Klf4、OCT4 和 CD44 的表达均有不同程度的增高。其中, β -catenin 与 OCT4 增高非常明显, 这与耐受细胞表达的干性标记分子略有不同。与亲本肿瘤细胞相比, spheroid 球样干细胞 CD46、CD55 和 CD59 的表达水平均有不同程度的增高(图 2 B)。

2.3 CD46 的干扰可降低 HT-29 的成球率, 提高 HT-29 细胞对血清的杀伤率

CD46 干扰和对照腺病毒感染 HT-29 细胞 24 h, 之后换用无血清干细胞培养基筛选, 12 天后出现明显成球率的差别, 干扰 CD46 后 HT-29 细胞的成球率明显减少 ($P < 0.05$) (图 3 A 和 B)。腺病毒干扰 CD46 的 HT-29 细胞, 正常培养基培养, 与对照腺病毒感染的 HT-29 细胞(图 3 C), 分别进行同型血清杀伤实验, CD46 干扰后, HT-29 细胞对同型血清的杀伤敏感性增加, 杀伤率由 41% 增至 50% ($P < 0.05$)。

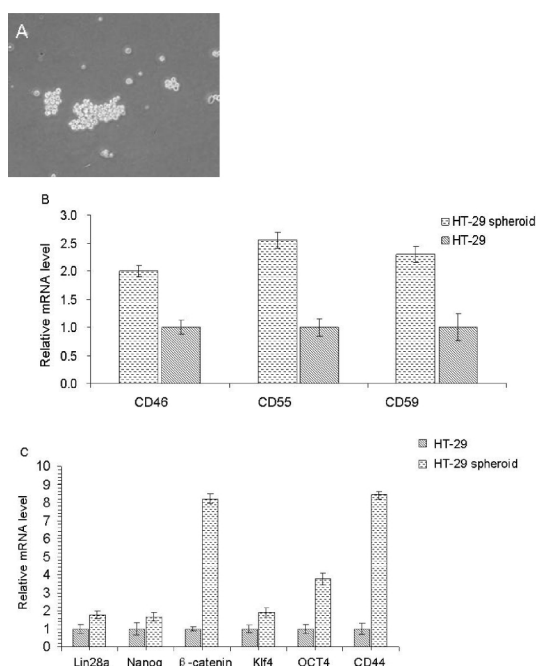


图2 膜性补体调节蛋白在 spheroid 球样干细胞和亲本肿瘤细胞中的 mRNA 表达水平。A, HT-29 spheroid 球样干细胞;B, spheroid 球样干细胞膜性补体调节蛋白表达水平;C, HT-29 spheroid 球样干细胞干性分子的表达

Fig.2 The mRNA level of membrane complement regulatory proteins in spheroid stem-like cancer cells and parental cancer cells. A, Image of HT-29 spheroid stem-like cells; B, The mRNA expression level in spheroid stem-like cell and parental cancer cells; C, The expression of stemness markers in spheroid stem-like cancer cells

3 讨论

在循环系统,补体系统发生持续的低水平活化,以消灭可能的潜在的感染入侵或从原发部位脱落到血液的肿瘤细胞。我们的研究表明,补体参与抗癌免疫,健康患者血清中的补体成分可有效杀伤肿瘤细胞,这与以前的报道一致^[17,18]。但在肿瘤免疫编辑的后期,补体的免疫清除作用往往失效,甚至活化片段 C5a 可促进肿瘤的生长^[19]。

补体对肿瘤细胞免疫清除失败,部分原因在于肿瘤细胞可耐受补体的攻击。多种机制导致机体保护肿瘤细胞免受补体攻击,包括膜性补体调节蛋白(membrane complement regulatory proteins, mCRPs)在肿瘤细胞的表达、肿瘤细胞分泌可溶性补体抑制因子等。膜性补体调节蛋白 mCRPs,包括 CD35、CD46、CD55 和 CD59;可溶性补体抑制因子,包括 C1 抑制子、factor H、factor-H 样蛋白、factor I 和 C4BP。它们在补体活化的不同阶段,调控或阻止补体的活化^[13]。大量研究结果表明,多种肿瘤细胞至少表达一种 mCRP 分子,除 CD35 外,大多数实体瘤都表达 mCRPs,并在多种肿瘤细胞系及原代肿瘤细胞中证实 mCRPs 呈现高表达,且各 mCRP 分子在肿瘤细胞系与原代肿瘤细胞中的表达情况基本一致,如,CD46、CD55 和 CD59 在结直肠癌、肺癌、胃癌和白血病中的表达较高,且在原代肿瘤细胞中的表达高于正常细胞^[20]。我们的研究也验证了上述实验结论。

mCRP 分子中的 CD46,不仅是补体调节蛋白,还是免疫调节分子。我们研究发现,下调 CD46 的表达,可增强 HT-29 细胞的成球率,提示 CD46 与 HT-29 肿瘤干细胞的干性维持有一定

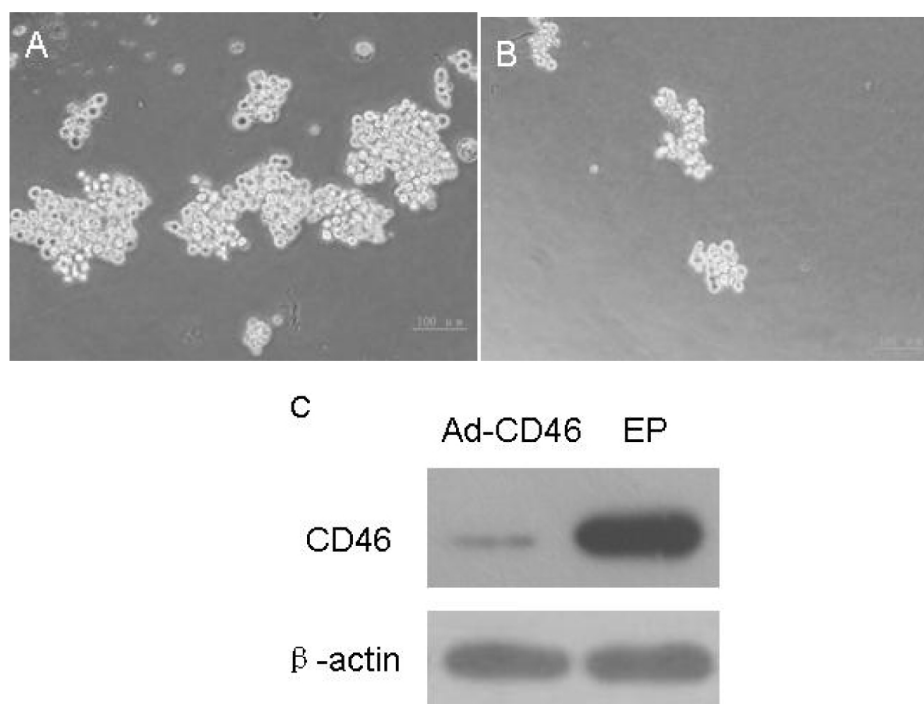


图3 腺病毒干扰 CD46 降低 HT-29 的干细胞成球数。A,对照病毒载体的 HT-29 悬浮球;B,干扰 CD46 的 HT-29 悬浮球;C, Western-blot 提示正常培养条件下 HT-29 干扰腺病毒后 CD46 表达明显减少

Fig.3 The spheroid was decreased by interfering CD46 with recombinant adenovirus in HT-29 cells. A, Spheroids in HT-29 cells infected with empty recombinant adenovirus (control); B, Spheroids in HT-29 cells infected with combinant adenovirus interfering CD46; C, CD46 expression was down-regulated by adenovirus interfering CD46 in HT-29 cells cultured in 1640 medium with 10% fetal calf serum

关联。Karsten 和 Fricc 等人发现, Notch 家族成员 Jagged1 是 CD46 的重要配体, CD46 通过调节 Notch 受体及配体的表达, 抑制 IFN- γ 、诱导 IL-10 的分泌, 进而影响患者全身性 Th1 型免疫反应^[21,22]。由于 Notch 信号调控干细胞的自我更新, 我们及他人研究结果提示, CD46 可能通过 Jagged1 调控肿瘤干细胞的自我更新特性, 这一推测还需后续的实验结果验证。

参考文献(References)

- [1] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 329-360
- [2] Tomita Y, Yang X, Ishida Y, et al. Spontaneous regression of lung metastasis in the absence of tumor necrosis factor receptor p55 [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(6): 927-933
- [3] Iiai T, Sato Y, Nabatame N, et al. Spontaneous complete regression of hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus [J]. *Hepatogastroenterology*, 2003, 50(53): 1628-1630
- [4] Morice P, Thoury A, Sabourin JC, et al. Case 2. Spontaneous regression of peritoneal implants in borderline ovarian tumor after salpingo-oophorectomy [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(18): 3536-3538
- [5] Zahl PH, Maehlen J, Welch HG. The natural history of invasive breast cancers detected by screening mammography [J]. *Arch Intern Med*, 2008, 168(21): 2311-2316
- [6] Kaplan RM, Porzsolt F. The Natural History of Breast Cancer [J]. *Arch Intern Med*, 2008, 168(21): 2302-2303
- [7] Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(14): 1041-1046
- [8] Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al. Neuroblastoma screening at one year of age[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(14): 1047-1053
- [9] Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity [J]. *Adv Immunol*, 2006, 90: 1-50
- [10] Kolev M, Towner L, Donev R. Complement in cancer and cancer immunotherapy [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2011, 59(6): 407-419
- [11] Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, et al. Parsa AT Cancer and the complement cascade[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(11): 1453-1465
- [12] Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(1): 3-13
- [13] Markiewski MM, Lambris JD. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma [J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(6): 286-292
- [14] Lucas SD, Karlsson-Parra A, Nilsson B, et al. Tumor-specific deposition of immunoglobulin G and complement in papillary thyroid carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 1996, 27: 1329-1335
- [15] Niculescu F, Rus HG, Retegan M, et al. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer[J]. *Am J Pathol*, 1992, 140: 1039-1043
- [16] Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, et al. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms [J]. *Mol Immunol*, 1999, 36: 929-939
- [17] Ollert MW, David K, Schmitt C, et al. Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(9): 4498-4503
- [18] Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, et al. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7995-8005
- [19] Markiewski MM, DeAngelis RA, Benencia F, et al. Modulation of the antitumor immune response by complement [J]. *Nat Immunol*, 2008, 9(11): 1225-1235
- [20] Fishelson Z, Donin N, Zell S, et al. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors [J]. *Mol Immunol*, 2003, 40(2-4): 109-123
- [21] Karsten CM, Köhl J. The complement receptor CD46 tips the scales in T(H)1 self-control [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(9): 775-777
- [22] Le Fricc G, Sheppard D, Whiteman P, et al. The CD46-Jagged1 interaction is critical for human TH1 immunity [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(12): 1213-1221
- [15] Naccache JM, Bouvry D, Valeyre D. Bronchoalveolar lavage cytology resembles sarcoidosis in a subgroup of granulomatous CVID [J]. *Eur Respir J*, 2014, 43(3): 924-925
- [16] Orlando A, Thoma G, Slone DS, et al. A rapid, real-time quantitative polymerase chain reaction test for the identification of pathogens in bronchoalveolar lavage samples[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 76(3): 651-660
- [17] Lozo Vukovac E, Lozo M, Mise K, et al. Bronchoalveolar pH and inflammatory biomarkers in newly diagnosed IPF and GERD patients: A case-control study[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 15, 20: 255-261
- [18] Pacheco AP, Paradis MR, Hoffman AM, et al. Age Effects on Blood Gas, Spirometry, Airway Reactivity, and Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology in Clinically Healthy Horses [J]. *J Vet Intern Med*, 2014, 16
- [19] Chan VL, So LK, Lam JY, et al. Major haemoptysis in Hong Kong: aetiologies, angiographic findings and outcomes of bronchial artery embolisation[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(9): 1167-1173
- [20] Hayama M, Inoue H, Wada H, et al. Massive haemoptysis following dabigatran administration in a patient with bronchiectasis [J]. *BMJ Case Rep*, 2014

(上接第 5879 页)