

S180 骨肉瘤细胞 TLRs 表达及其与肿瘤耐受的相关性

历 春^{1,2},付海英¹,李 欣¹,刘白楠¹,刘昊川¹,李 一¹

Expression of TLRs in S180 Osteosarcoma and Relationship between TLRs and Tumor Tolerance

LI Chun^{1,2},FU Hai-ying¹, LI Xin¹,LIU Bai-nan¹,LIU Hao-chuan¹,LI Yi¹

1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University

Corresponding Author: LI Yi, E-mail: yilili19@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To examine the expression of TLRs in S180 osteosarcoma cells in vitro and at earlier and advanced stages of tumor-bearing mouse in vivo; To reveal the expression of TGF-β and IL-10 after stimulating the S180 osteosarcoma cells by LPS in vitro; And to explore the mechanisms of tumor tolerance induced by TLRs express in tumor cells. **Methods** S180 ascites carcinoma models were established. The expression of TLRs mRNA in S180 osteosarcoma cells in vitro, and at earlier and advanced stages of tumor-bearing mouse in vivo as well as the changes of TGF-β and IL-10 after stimulating the S180 osteosarcoma cells by LPS were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The changes of TGF-β protein were detected by ELISA. **Results** S180 osteosarcoma cells could express TLR1~7 and TLR 9, while couldn't express TLR8 in vitro. The expression of TLR4 and TLR9 was higher in earlier stage than that in advanced stage. The expression of TLR4 was in significant difference in different stages($P<0.05$). The express of TLR1, TLR2, TLR3, TLR5, TLR6, and TLR7 was lower in earlier stage than that in advanced stage, while showed no significant difference($P>0.05$). The expression of TGF-β and IL-10 increased and depended on time after stimulating S180 osteosarcoma cells using LPS at 10 μg/ml level. **Conclusion** S180 in osteosarcoma cells could express many kinds of TLRs, and the TLRs expression changed in different stage. Thus the express of TLRs in S180 osteosarcoma cells played different roles in different stages during the development of tumor. The activation of TLR4 could promote the expression of TGF-β and IL-10, and then enhanced the tolerance of tumor cells.

Key words: TLRs; Tumor; Immune tolerance; TGF-β; IL-10

摘要:目的 探讨 TLRs 在诱导 S180 骨肉瘤细胞免疫耐受中的作用,为肿瘤临床的免疫治疗提供新的思路。**方法** 建立 S180 腹水癌早晚期模型,采用 RT-PCR 方法检测体外 S180 骨肉瘤细胞和荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLR1-9 mRNA 的表达水平,以及 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞前后 TGF-β 和 IL-10 mRNA 表达变化,ELISA 方法检测 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞前后肿瘤上清液中 TGF-β 蛋白分泌的含量。**结果** 体外 S180 骨肉瘤细胞表达 TLR1-7 和 TLR9, TLR8 不表达。荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达不同,TLR4、9 表达早期高于晚期,其中 TLR4 的高表达有统计学意义($P<0.05$); TLR1、2、3、5、6 和 7 表达晚期高于早期,但差异无统计学意义($P>0.05$)。10 μg/ml 的 LPS 在不同时间点体外刺激 S180 骨肉瘤细胞后 IL-10 mRNA 表达水平平均上调,且有时间依赖关系, TGF-β 在 mRNA 和蛋白水平也均有增加。**结论** 体外 S180 骨肉瘤细胞表达多种 TLRs, 荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 表达的不同在肿瘤发展的不同时期可能发挥不同的作用, S180 骨肉瘤细胞 TLR4 信号通路活化后可能通过促进 TGF-β 和 IL-10 的分泌从而参与肿瘤的免疫耐受。

关键词: Toll 样受体; 肿瘤; 免疫耐受; 转化生长因子-β; 白介素-10

中图分类号: R730. 3 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2010)03-0315-04

收稿日期:2008-10-24;修回日期:2009-01-04
作者单位:1. 130021 长春,吉林大学白求恩医学部基础医学院免疫学教研室;2. 吉林市北华大学基础医学院病理教研室
通信作者:李一, E-mail: yilili19@yahoo. com. cn
作者简介:历春(1972-),女,博士在读,讲师,主要从事肿瘤免疫耐受的研究

0 引言

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是目前发现能识别病原微生物上的高度保守结构基序——病原相关分子模式的一类受体,主要表达于免疫细胞尤其是巨噬细胞和树突状细胞表面,在机体的天然免疫和获得性免疫中发挥重要作用。先前的研究多数集中于免疫细胞上的 TLRs,近来有实验表明,肿瘤细胞也可以表达多种 TLRs^[1],但表达在肿瘤细胞的 TLRs 在肿瘤发生发展过程中的作用尚不明确。为了研究肿瘤细胞 TLRs 的表达特点及意义,我们以小鼠 S180 骨肉瘤细胞作为研究对象,通过检测体外 S180 骨肉瘤细胞和荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达,以及在 TLR4 的配基脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) 体外激活 S180 骨肉瘤细胞 TLR4 信号通路后免疫抑制因子 TGF-β 和 IL-10 表达水平的变化,进一步探讨 TLR4 在肿瘤免疫耐受中发挥的可能作用。

1 材料与方法

1.1 动物

ICR 小鼠 10 只(雌性,4~6 周龄,体重 18~22 g),由吉林大学实验动物中心提供。

1.2 药品和试剂

IMDM 干粉培养基购自 GIBCO 公司;新生小牛血清购自杭州四季青公司;TGF-β ELISA 试剂盒购自天津津脉公司;LPS 为 Sigma 分装;引物由上海生工合成;Trizol 试剂购自 GIBCO 公司;AMV 逆转录酶、RNasin 与 Ex Tag DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司。

1.3 细胞培养

S180 骨肉瘤细胞株由教研室传代保存,常规培养于含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液中,置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养。

1.4 早晚期荷瘤小鼠的制备

在小鼠腹腔左侧,以 2×10⁵ 细胞/只接种 S180 骨肉瘤细胞,小鼠模型早期在造模第 7 天处死(*n* = 5),晚期在第 15 天处死(*n* = 5)。

1.5 RT-PCR 方法检测肿瘤细胞 TLR1-9 和 TGF-β、IL-10 mRNA 表达

用 Trizol 试剂提取肿瘤细胞中的总 RNA,并进行逆转录反应,cDNA 的逆转录采用 TaKaRa 的 AMV RTase,按说明书进行操作,见表 1。

1.6 ELISA 检测肿瘤上清液中 TGF-β 分泌的量按说明书进行操作。

1.7 不同时间 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞取 S180 骨肉瘤细胞加入 6 孔板,每孔 2×10⁶

个细胞。实验组分为 4 组,加入 10 μg/ml 的 LPS 后分别在 12 h、24 h、36 h、48 h 取细胞进行相关检测。对照组不加 LPS,每组设 3 个复孔。

1.8 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验法,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。采用 SPSS 10.0 统计软件包处理数据。

2 结果

2.1 体外 S180 骨肉瘤细胞和荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达

为了研究体外 S180 骨肉瘤细胞及体内不同时期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达情况,采用半定量 RT-PCR 方法检测体外 S180 骨肉瘤细胞和荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达。结果显示,体外 S180 骨肉瘤细胞表达 TLR1-7 和 TLR9,TLR8 不表达,见图 1。TLRs 在肿瘤早晚期表达不同,荷瘤鼠体内 S180 骨肉瘤细胞 TLR4、9 表达早期高于晚期,其中 TLR4 的高表达有统计学意义(*P* < 0.05);TLR1、2、3、5、6 和 7 表达晚期高于早期,但无统计学差异(*P* > 0.05),见图 1、图 2。以上结果表明 S180 骨肉瘤细胞可表达多种 TLRs,在肿瘤发生的不同时期其表达不同,而在早期高表达 TLR4 是否可能是利于肿瘤自身生长的需要,我们进一步选用 LPS 体外激活 TLR4 信号通路观察免疫耐受因子表达水平的变化。

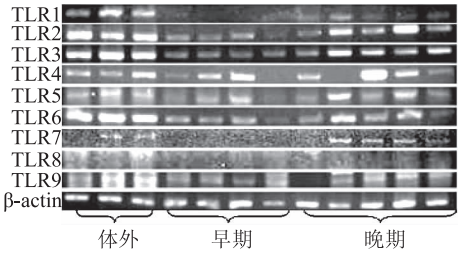


图 1 体外 S180 骨肉瘤细胞和荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达

Figure 1 The expression of TLRs on S180 osteosarcoma cells in vitro, and at earlier and advanced stages of tumor-bearing mouse in vivo

2.2 S180 骨肉瘤细胞 TLR4 信号通路对 TGF-β 和 IL-10 表达的影响

2.2.1 不同时间 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞 TGF-β 和 IL-10 mRNA 的表达水平

为了观察 TLR4 信号通路对免疫耐受因子表达水平的变化,我们采用 RT-PCR 方法检测了 TLR4 配体 LPS 在 10 μg/ml 时体外刺激 S180 骨肉瘤细胞 12 h、24 h、36 h 和 48 h 后 TGF-β 和 IL-10

表 1 总 RNA 提取

Table 1 Total RNA extraction

Gene Primers	Size(bp)	Reaction parameters	Cycles
TLR1 S: 5'- CCCTCATCTTCTACTGTATC -3' AS: 5'- TCACCTTTAGCTCATTGTGG -3'	315	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR2 S: 5'- GTCTTTCACCTCTATTCCCTC -3' AS: 5' - GTCTCTACATTTCTATCCTG -3'	360	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR3 S: 5'-CCGCCCTCTTCGTAACCTGACC-3' AS: 5'-GCGGCCCCGAAAACATCCTT-3'	392	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR4 S: 5'- GAAACTCAGCAAAGTCCCTG -3' AS: 5' - GAAAGGCTTGGTCTTGAATG -3'	542	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 61 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR5 S: 5'- CTTCGGCTGTTTTCCTGTGG -3' AS: 5'-CTTCCTGGATGATGTTGCTG -3'	389	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR6 S: 5'-CCAAAGACCTGCCACCAAGAAC -3' AS: 5'- CACTAAGTCCAGAAGAATGC -3'	398	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 61 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR7 S: 5'-AGAAACCTCCAGGAAC-3' AS: 5'-CATACACAATAAAAAGCATC-3'	1 756	96 ℃ 2 min, 96 ℃ 1 min, 54 ℃ 1 min, 72 ℃ ,1. 5 min, 72 ℃ 10 min	35
TLR8 S: 5'-CAGAGTTGGATGTTAAGAGAGA-3' AS: 5' -GTATATAACTGGTGTCTTCCA-3'	459	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	40
TLR9 S: 5'- CTCTCTCCATACACTGAACTC -3' AS: 5'- TGCTCTGCATCATCTGCCTC -3'	456	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	40
TGF-β S: 5'-GCCCTGGATACCAACTATTGC-3' AS: 5'-GCAGGAGCGCACAAATCATGTT-3'	360	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 72 ℃ 10 min	35
IL-10 S: 5'-ATGCAGGACTTTAAGGGTACTTGGGTT-3' AS: 5'-ATTTCGGAGAGAGGTACAAACGAGGTTT-3'	392	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 72 ℃ 10 min	35
β-actin S: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' AS: 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	320	94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ ,1 min, 72 ℃ 10 min	25

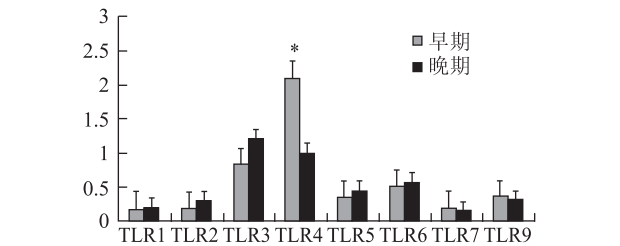


图 2 荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 表达的比较

Figure 2 The expression of TLRs in S180 osteosarcoma cells at earlier and advanced stages of tumor-bearing mouse in vivo

mRNA 的表达水平。结果显示, LPS 刺激 S180 骨肉瘤细胞后 TGF-β 和 IL-10 表达水平在不同时间点均上调, 其中 IL-10 的表达有时间依赖关系, 见图 3、4。提示 S180 骨肉瘤细胞 TLR4 信号的活化可能促进 TGF-β 和 IL-10 mRNA 的表达, 进而可能参与肿瘤的免疫耐受。

2.2.2 不同时间 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞 TGF-β 蛋白的分泌水平

我们又进一步用 ELISA 法检测了不同时间 10 μg/ml 的 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞后肿瘤上清液中 TGF-β 蛋白的分泌情况。结果显示: LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞后肿瘤上清液中 TGF-β 蛋

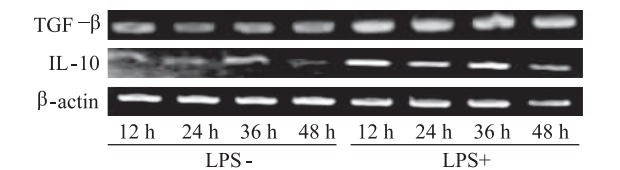


图 3 不同时间 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞 TGF-β 和 IL-10 mRNA 的表达

Figure 3 The expression of TGF-β and IL-10 mRNA after stimulating the S180 osteosarcoma cells by LPS at different time in vitro

白在不同时间的含量也略有增加, 见图 5。提示 S180 骨肉瘤细胞表面 TLR4 信号通路活化后可能促进 TGF-β 蛋白的分泌。

3 讨论

TLRs 是一种重要的模式识别受体, 主要表达于免疫细胞尤其是巨噬细胞和树突状细胞表面, 与相应配体结合后可以启动免疫应答, 促进免疫细胞分泌大量的炎症性细胞因子和趋化因子, 发挥机体的抗病源微生物感染能力保护机体的稳态。人们在对免疫系统中的 TLRs 研究的过程中, 还发现多种肿瘤细胞也可以表达多种 TLRs^[1], 小鼠结肠癌细胞株 (MC26)、乳腺癌细胞株 (4T1)、前列腺癌细胞

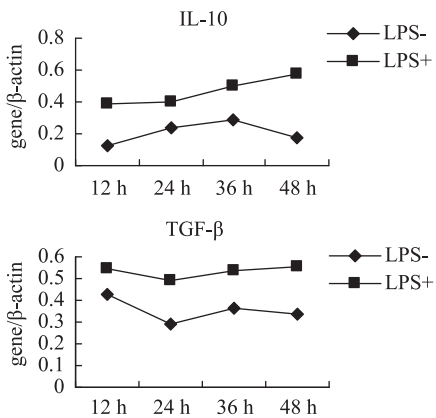


图 4 不同时间 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞 TGF-β 和 IL-10 mRNA 的表达

Figure 4 The expression of TGF-β and IL-10 mRNA after stimulating the S180 osteosarcoma cells by LPS at different time in vitro

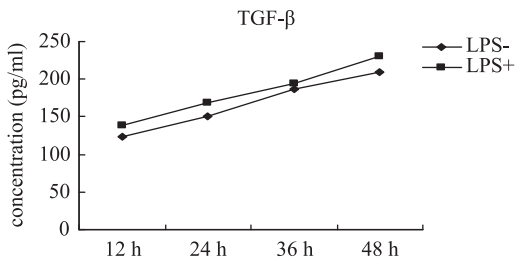


图 5 不同时间 LPS 体外刺激 S180 骨肉瘤细胞 TGF-β 蛋白的分泌

Figure 5 The expression of TGF-β protein after stimulating the S180 osteosarcoma cells by LPS at different time

株(RM1)、黑色素瘤细胞株(B16)以及肺癌细胞株(LLC1)表面均表达 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR9。本研究检测了小鼠 S180 骨肉瘤细胞株,也发现表达多种 TLRs,除 TLR8 不表达外,TLR1-7 和 TLR9 均有不同程度的表达。

肿瘤细胞表达的多种 TLRs 其作用也各不相同。人乳腺癌 Cama-1^[2]和黑色素瘤 Me260^[3]表达的 TLR3 可以促进肿瘤细胞的凋亡,人大肠癌 MC26 表达的 TLR4^[1]可以促进肿瘤的耐受,鼠乳腺癌 D2F2^[4]表达的 TLR5 在早期促肿瘤生长,而晚期抑制肿瘤生长。本研究检测 S180 腹水癌早晚期模型鼠体内 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 的表达,发现 TLRs 在肿瘤早晚期的表达量有所区别,提示 TLRs 在肿瘤发展的不同时期发挥的作用可能有所不同。其中 TLR4 在体内早期表达明显升高,而肿瘤细胞上调表面分子的表达可能是利于自身的生存,参与免疫耐受,使之免于机体的免疫攻击。

有文献报道,肿瘤细胞可以分泌 TGF-β 和 IL-

10 等免疫抑制性因子,它们不仅可以抑制多种免疫细胞如 DC、NK、T 细胞和 B 细胞等的发育、成熟和功能,而且还可以促进 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的生长和功能的作用^[5-7],最终引起机体的耐受。而在肿瘤发生的早期,肿瘤细胞是否通过增强 TLR4 的表达从而参与肿瘤的免疫耐受,本研究用 TLR4 的配基 LPS 活化 S180 骨肉瘤细胞 TLR4 信号通路后进一步检测 IL-10 和 TGF-β 的表达变化。结果发现 S180 骨肉瘤细胞在 10 μg/ml 的 LPS 刺激下,免疫抑制因子 IL-10 的 mRNA 量显著增加,且有时时间依赖性。此外,TGF-β 的表达无论从 mRNA 还是蛋白水平均有上调,但没有时间依赖性,考虑可能还有其他通路的调节作用。以上研究表明 S180 骨肉瘤细胞可能在早期通过上调 TLR4 的表达促进 IL-10 和 TGF-β 的分泌,从而改善肿瘤生存的微环境,协助肿瘤细胞耐受,但是其中的信号通路有待进一步的研究。

综上所述,S180 骨肉瘤细胞表达多种 TLRs,荷瘤鼠体内早晚期 S180 骨肉瘤细胞 TLRs 表达的不同在肿瘤发展的不同时期可能发挥不同的作用,S180 骨肉瘤细胞 TLR4 信号通路活化后可能通过上调免疫抑制因子 TGF-β 和 IL-10 的表达参与肿瘤的免疫耐受,因此可以针对肿瘤 TLRs 的表达进行深入研究,这样可以期望在不久的将来能通过肿瘤 TLRs 信号通路找到更加有利于肿瘤免疫治疗的新策略。

参考文献:

[1] Huang B,Zhao J,Li H. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance [J]. Cancer Res,2005,65 (19) :5009-5014.

[2] Bruno S,Isabelle C,Marie-Clotilde R,et al. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells[J]. Journal of Immunology,2006,176(8) :4894-4901.

[3] Bruno S, Serge L, Samps M, et al. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy[J]. Clin Cancer Res,2007,13(15) :4565-4574.

[4] Lucia S, Anna R,Dario B,et al. Antitumor activity of the TLR-5 ligand flagellin in mouse models of cancer[J]. J Immunol, 2006,176(11) :6624-6630.

[5] Pyzik M, Piccirillo CA. TGF-β1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4⁺ T cell subsets[J]. J Leukoc Biol,2007,82(2) :335-346.

[6] Wahl SM,Wen J,Moutsopoulos N. TGF-β: a mobile purveyor of immune privilege[J]. Immunol Rev,2006,213:213-227.

[7] Raman D,Baughner PJ,Thu YM ,et al. Role of chemokines in tumor growth[J]. Cancer Lett,2007,256(2) :137-165.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]