

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.05.0520

· 论 著 ·

肿瘤相关成纤维细胞通过 IL-6/STAT3 通路介导胰腺癌中髓源性抑制细胞的分化

张冰冰, 唐海双, 张 晶*, 郑建明*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨胰腺导管腺癌(PDAC)中肿瘤相关成纤维细胞(CAF)介导髓源性抑制细胞(MDSC)分化相关作用机制及生物学意义, 为揭示 CAF 和 MDSC 通过重塑胰腺癌微环境促进胰腺癌进展提供理论基础和实验依据。**方法** 分离纯化 PDAC 肿瘤组织中原代 CAF, 以人包皮成纤维细胞(HFF)作为对照, 通过实时荧光定量 PCR、酶联免疫吸附试验检测筛选 CAF 中表达上调的细胞因子。分别使用 CAF 和 HFF 培养上清培养人外周血单个核细胞(PBMC), 观察 PBMC 的分化情况, 研究上述细胞因子参与调节 MDSC 分化、发挥募集作用的具体机制。**结果** 分离的原代 CAF 表达活化标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和成纤维细胞激活蛋白 a (FAPa), 对照细胞 HFF 不表达 α -SMA 和 FAPa。CAF 培养上清中白细胞介素 6 (IL-6)、基质细胞衍生因子 1 (SDF-1)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的表达量均高于 HFF 培养上清 (P 均 <0.01), 而且 IL-6、SDF-1、MCP-1 的表达量随培养时间的延长而增加 (P 均 <0.01)。与 HFF 培养上清相比, CAF 培养上清能够促进更多的 PBMC 分化成 CD13^{hi} 高表达的中性粒细胞样 MDSC (CD13^{hi}-nMDSC; $P<0.01$)。在培养体系中单独加入人重组 IL-6 蛋白可以诱导 PBMC 向 CD13^{hi}-nMDSC 分化 ($P<0.01$), 单独加入人重组 SDF-1 或 MCP-1 蛋白不能诱导 CD13^{hi}-nMDSC 亚群的增加; 加入 IL-6 中和抗体或信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 抑制剂 FLN32 后能够明显减少由 CAF 培养上清诱导的分化 ($P<0.05$)。**结论** CAF 可通过 IL-6/STAT3 通路促进 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC。

[关键词] 胰腺肿瘤; 肿瘤微环境; 肿瘤相关成纤维细胞; 髓源性抑制细胞; 细胞分化

[中图分类号] R 735.9

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2019)05-0520-08

Cancer-associated fibroblasts mediate differentiation of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer through IL-6/STAT3 pathway

ZHANG Bing-bing, TANG Hai-shuang, ZHANG Jing*, ZHENG Jian-ming*

Department of Pathology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism and biological significance of differentiation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) mediated by cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), so as to provide theoretical and experimental basis for revealing the roles of CAFs and MDSCs in promoting the progression of pancreatic cancer by remodeling the pancreatic cancer microenvironment. **Methods** We isolated and purified primary CAFs from PDAC tumor tissues, and screened the up-regulated cytokines in CAFs by quantitative real-time PCR and enzyme-like immunosorbent assay. The human foreskin fibroblasts (HFFs) were used as controls. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were cultured with supernatant of CAFs and HFFs, respectively. The differentiation of PBMCs was observed and the mechanisms of the above cytokines in regulating the differentiation and recruitment of MDSCs were studied. **Results** The biomarkers (α -smooth muscle actin [α -SMA] and fibroblast activation protein a [FAPa]) were detected in the isolated primary CAFs, but not found in the HFFs. The expression levels of interleukin 6 (IL-6), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) in the culture supernatant were significantly gradually increased in

[收稿日期] 2019-03-18 **[接受日期]** 2019-05-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81502466), 海军军医大学(第二军医大学)校级教学研究和改革项目(JYC2016028). Supported by National Natural Science Foundation of China (81502466) and Teaching Research and Reform Project of Naval Medical University (Second Military Medical University) (JYC2016028).

[作者简介] 张冰冰, 硕士生. E-mail: 1553342961@qq.com

*通信作者(Corresponding authors): Tel: 021-31161784, E-mail: zhangjing@smmu.edu.cn; Tel: 021-31161784, E-mail: jmzheng1962@163.com

the CAFs than those in the HFFs (all $P < 0.01$). Compared with culture supernatant of HFFs, the culture supernatant of CAFs promoted more PBMCs to differentiate into CD13-high expression neutrophil-like MDSCs (CD13^{hi}-nMDSCs; $P < 0.01$). IL-6 human recombinant protein alone in the co-culture system could induce the differentiation of PBMCs into CD13^{hi}-nMDSCs ($P < 0.01$). SDF-1 or MCP-1 human recombinant protein alone could not induce the increase of CD13^{hi}-nMDSCs subpopulation. IL-6 neutralizing antibody or signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) blocker FLLL32 could significantly inhibit the differentiation induced by the culture supernatant of CAFs ($P < 0.05$). **Conclusion** CAFs can promote the differentiation of PBMCs into CD13^{hi}-nMDSCs via the IL-6/STAT3 pathway.

[Key words] pancreatic neoplasms; tumor microenvironment; tumor-associated fibroblasts; myeloid-derived suppressor cells; differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(5): 520-527]

胰腺癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤,在我国肿瘤死因中位居第6位^[1]。据估计,胰腺癌的发病率将继续上升,到2020年将成为第二大致死肿瘤病种^[2]。胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)是胰腺癌中最常见的病理类型,具有进展快、侵袭性强、预后差的特点,目前临床上虽采取手术切除、化学治疗等多种治疗手段,但PDAC患者的5年生存率仍低于5%^[3]。因此探明PDAC的发生和进展机制、寻找合适的生物分子靶点对于丰富胰腺癌的治疗策略、改善患者预后意义重大。

PDAC是肿瘤间质最丰富的实体肿瘤之一,在部分病例PDAC组织中间质成分甚至远多于肿瘤成分^[4]。PDAC间质包括肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)、免疫细胞、神经、血管、细胞外基质和可溶性蛋白(如细胞因子和生长因子)等^[5]。PDAC中大量增殖活化的CAF近年来备受关注,2015年Lo等^[6]发现成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)表达阳性的CAF可通过诱导T淋巴细胞凋亡与低反应性、抑制免疫细胞对肿瘤细胞恶性表型的识别、招募免疫抑制细胞等途径在PDAC中发挥免疫抑制功能;2017年Deng等^[7]报道CAF能够通过分泌基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)募集免疫抑制细胞,抑制免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,帮助胰腺癌细胞逃避宿主免疫监视。髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)是被招募到肿瘤间质微环境中最重要的免疫抑制细胞群^[8],也是在肿瘤、感染等病理条件下骨髓细胞分化受阻形成的具有免疫抑制功能的异质细胞群^[9]。招募到肿瘤部位的MDSC能够通过分泌精氨酸酶1(arginase 1, Arg-1)耗竭淋巴细胞所需营养物质^[10],并可通过

诱导氧化应激等方式抑制T淋巴细胞和自然杀伤细胞的功能^[11]。

本课题组在前期研究中发现,中性粒细胞样MDSC(neutrophil-like MDSC, nMDSC)在胰腺癌患者外周血及肿瘤组织中明显增多,根据CD13分子表达差异分为CD13高表达的nMDSC(CD13^{hi}-nMDSC)和CD13低表达的nMDSC(CD13^{low}-nMDSC),其中CD13^{hi}-nMDSC是发挥免疫抑制功能的主要细胞群^[12]。虽然有研究证实肿瘤间质分泌的细胞因子可能与MDSC的分化、迁移有关,但在PDAC中CAF参与MDSC分化的相关机制目前尚不明确。本研究旨在研究胰腺癌中CAF对MDSC的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 5例PDAC患者胰腺癌组织及5名健康志愿者外周血样本均来自于海军军医大学(第二军医大学)长海医院,人包皮成纤维细胞(human foreskin fibroblast, HFF)由上海富衡生物细胞库提供。含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI 1640培养液购自美国Gibco公司,透明质酸酶、DNA酶I、胶原蛋白酶购自美国Sigma公司,RNAfast200 RNA提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司,PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green Premix Ex Taq II购自日本TaKaRa公司,淋巴细胞分离液购自挪威Axis-Shield公司, α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体、波形蛋白(vimentin)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,流式抗体、人白细胞DR抗原(human leukocyte DR antigen, HLA-DR)、CD11b、CD33、CD13、CD14、CD15、FAPa以及人重组白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)、单

核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、SDF-1 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 Biolegend 公司, MCP-1、SDF-1、IL-6 和 IL-6 中和抗体购自美国 R&D 公司, Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) /信号转导与转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 3 抑制剂 FLLL32 购自美国 Selleck 公司。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。本研究经海军军医大学 (第二军医大学) 长海医院伦理委员会审批, 所有患者均签署知情同意书。

1.2 原代 CAF 的分离培养 收集 5 例 PDAC 患者术后新鲜肿瘤组织标本, 使用眼科剪将组织剪碎, 用透明质酸酶 (0.1 mg/mL)、DNA 酶 I (0.1 mg/mL)、胶原蛋白酶 (1 mg/mL) 配制的消化酶体系消化 1 h, 70 μ m 细胞滤器过滤, 离心, 去上清, 将沉淀重悬后放入 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后轻柔换液, 48 h 后再次换液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗 2~3 次, 去掉未贴壁的细胞和细胞碎片。当细胞融合度达到 80%~90% 时, 以 1:1 比例传代, 12 h 后换液, 利用差速贴壁的原理将贴壁晚的胰腺

癌细胞、内皮细胞等非成纤维细胞除去, 传代培养 3~5 代后细胞形态趋于一致。

1.3 原代 CAF 表型鉴定 采用细胞免疫荧光技术和流式细胞术鉴定原代 CAF 及 HFF 的表型。细胞免疫荧光鉴定: 使用胰酶将 CAF 或 HFF 消化成单个细胞, 离心, 重悬, 将悬液滴加在载玻片中央, 置于 5% CO₂ 培养箱中培养 3 h, 固定、破膜, 然后滴加 α -SMA 抗体 (1:200)、波形蛋白抗体 (1:200), 置于湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 PBS 漂洗 2~3 次, 加入二抗, 用 DAPI 复染细胞核, 封片拍照。流式细胞术鉴定: 使用胰酶将 CAF 或 HFF 消化成单个细胞, 离心, 重悬, 加入 PE 标记的抗人 FAPa 抗体 (10 μ L/10⁶ 个细胞), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 上机检测, 计算 FAPa 阳性细胞群比例。

1.4 CAF 中相关细胞因子表达检测 采用实时荧光定量 PCR 法检测 CAF 和 HFF 中细胞因子 mRNA 的表达。收集 1 $\times$ 10⁶ 个细胞, 提取总 RNA 并检测 RNA 纯度, 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板、 β -actin 为内参照基因进行实时荧光定量 PCR, 反应体系为 20 μ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环; 引物序列见表 1。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 用于实时荧光定量 PCR 反应的细胞因子引物序列

Tab 1 Primer sequences of each cytokine for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>IL-6</i>	CAC TGG TCT TTT GGA GTT TGA G	GGA CTT TTG TAC TCA TCT GCA C
<i>SDF-1</i>	CCA ACG TCA AGC ATC TCA AAA T	CAC ACT TGT CTG TTG TTG TTC T
<i>MCP-1</i>	AGA ATC ACC AGC AGC AAG TGT CC	TTG CTT GTC CAG GTG GTC CAT G
<i>FAPa</i>	TGG TAT AGC AGT GGC TCC AGT CTC	ATC TGC TGT TCC GTG GAT GAG AAG
<i>IL-1β</i>	GCC AGT GAA ATG ATG GCT TAT T	AGG AGC ACT TCA TCT GTT TAG G
<i>CXCL1</i>	TCC TGC GAG TGG CAC TGC TG	CTG GCA GCG CAG TTC AGT GG
<i>CCL5</i>	CCT CGC TGT CAT CCT CAT TGC TAC	CTT GAC CTG TGG ACG ACT GCT G

IL: Interleukin; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; FAPa: Fibroblast activation protein a; CXCL1: Chemokine ligand 1; CCL5: Chemokine 5

采用 ELISA 检测 CAF 培养上清中相关细胞因子蛋白的表达。将 CAF 和 HFF 2 种细胞分别以 1 $\times$ 10⁶/mL 的密度加入 10 cm 培养皿中, 在培养皿中加入含 1% FBS 的 DMEM 培养液培养细胞; 分别收集 2 种细胞培养 24 h 和 48 h 的培养上清, 用 0.22 μ m 滤膜过滤去除杂质及细胞碎片后, 在微孔板中加入实验样品 (培养上清) 及标准品, 室温孵育 2 h; 洗板, 加入检测抗体, 室温孵育 1 h; 再

次洗板后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素溶液反应 30 min; 洗板后加入显色底物 TMB 反应 15 min, 然后加入终止溶液, 立刻用酶标仪检测 450 nm 及 570 nm 处的光密度值。

1.5 CAF 对 MDSC 分化的影响及细胞因子在分化中的作用 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离健康志愿者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 并计数, 在 6 孔板内

加入 2×10^6 个细胞/孔。将 CAF 和 HFF 培养至 70%~80% 融合后, 将培养液换成含 1% FBS 的 DMEM 培养液, 培养 48 h 后收集培养上清。分别采用 6 种培养体系培养 PBMC, 即单纯培养液 (对照组)、含 20% CAF 培养上清的培养液、含 20% HFF 培养上清的培养液、含 $10 \mu\text{g/mL}$ 人重组 IL-6 蛋白的培养液、含 $10 \mu\text{g/mL}$ 人重组 SDF-1 蛋白的培养液、含 $10 \mu\text{g/mL}$ 人重组 MCP-1 蛋白的培养液, 分别培养 7 d。在上述培养体系中加入 IL-6 中和抗体, 以不加 IL-6 中和抗体的培养液为对照, 将 PBMC 培养 7 d。在上述培养体系中加入 JAK2/STAT3 抑制剂 FLNLL32, 以二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 作为对照, 培养 7 d。培养上清、细胞因子和培养液每 2~3 d 更换 1 次。用流式细胞术鉴定 PBMC 的表型变化, 检测指标为 HLA-DR、CD11b、CD33、CD13、CD14 和 CD15。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 PDAC 肿瘤组织分离的原代 CAF 纯度及表型鉴定 从 PDAC 肿瘤组织中分离的 CAF 纯化

3~5 代后, 光学显微镜下可见细胞形态稳定, 呈均一的长梭状成纤维样结构, 未见内皮细胞等杂细胞 (图 1)。采用细胞免疫荧光技术检测 CAF 中 α -SMA 和波形蛋白的表达情况, 结果显示 CAF 表达 α -SMA 和波形蛋白, 而 HFF 仅表达波形蛋白 (图 2A)。采用流式细胞术检测 CAF 中另一活化标志物 FAPa 的表达情况, 结果显示分离的原代 CAF 中超过 90% 的细胞 FAPa 表达阳性, 而 HFF 基本为 FAPa 阴性细胞群 (图 2B)。可见分离的原代 CAF 纯度高, 均表达活化标志物 α -SMA 和 FAPa, 符合实验要求。

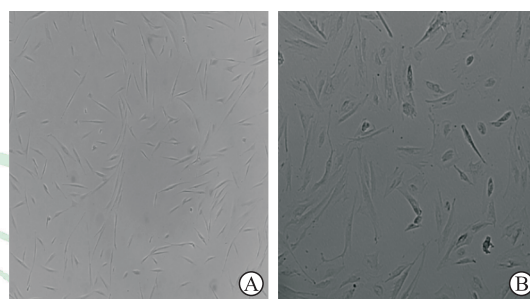


图 1 原代分离的 CAF 在显微镜下的细胞形态
Fig 1 Morphology of primary isolated cancer-associated fibroblasts (CAFs) under microscope
Original magnification: $\times 200$ (A), $\times 400$ (B)

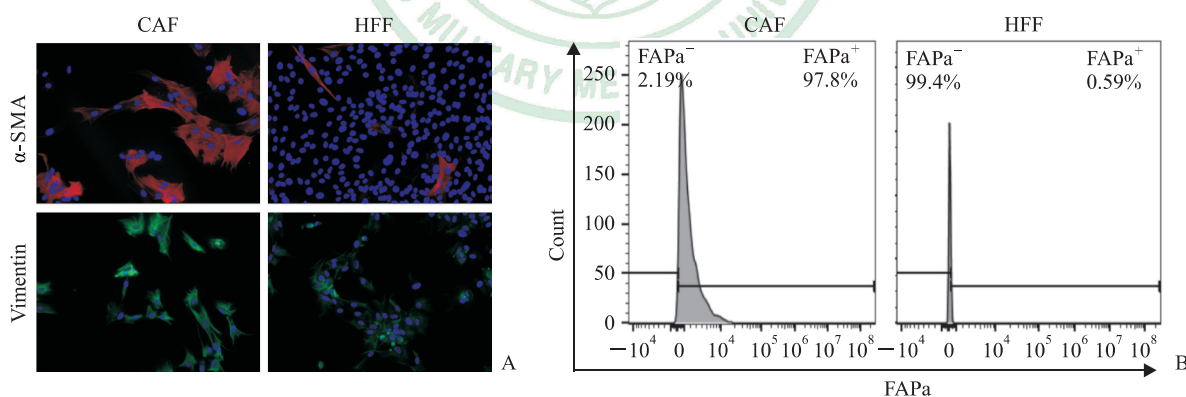


图 2 原代分离的 CAF 表型鉴定

Fig 2 Phenotypic identification of primary isolated CAFs

A: The expression levels of α -SMA and vimentin in CAFs and HFFs (control) were analyzed by immunofluorescence technique. The slide was stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue), vimentin antibody (green), and α -SMA antibody (red); B: The expression levels of FAPa on the surface of CAFs and HFFs were analyzed by flow cytometry. CAF: Cancer-associated fibroblast; α -SMA: α -Smooth muscle actin; HFF: Human foreskin fibroblast; FAPa: Fibroblast activation protein a. Original magnification: $\times 200$ (A)

2.2 PDAC 肿瘤组织分离的原代 CAF 中细胞因子的表达 从 5 例 PDAC 患者肿瘤组织中分离获得 5 株 CAF, 通过实时荧光定量 PCR 检测相关细胞因子 mRNA 表达水平, 筛选 CAF 与对照细胞 HFF

表达差异大的细胞因子, 结果显示 *IL-6*、*SDF-1*、*MCP-1* 这 3 个因子在 CAF 中的表达量均高于 HFF (P 均 < 0.01 , 图 3A)。用 ELISA 检测原代分离的 CAF 和对照细胞 HFF 培养 24 h、48 h 的培养上

清中 IL-6、SDF-1、MCP-1 的表达量,结果显示 CAF 培养上清中 IL-6、SDF-1、MCP-1 的表达量均高于 HFF 培养上清 (P 均 <0.01), 而且培养上

清中 IL-6、SDF-1、MCP-1 的表达量均随着培养时间的延长而升高 (P 均 <0.01 , 图 3B~3D)。

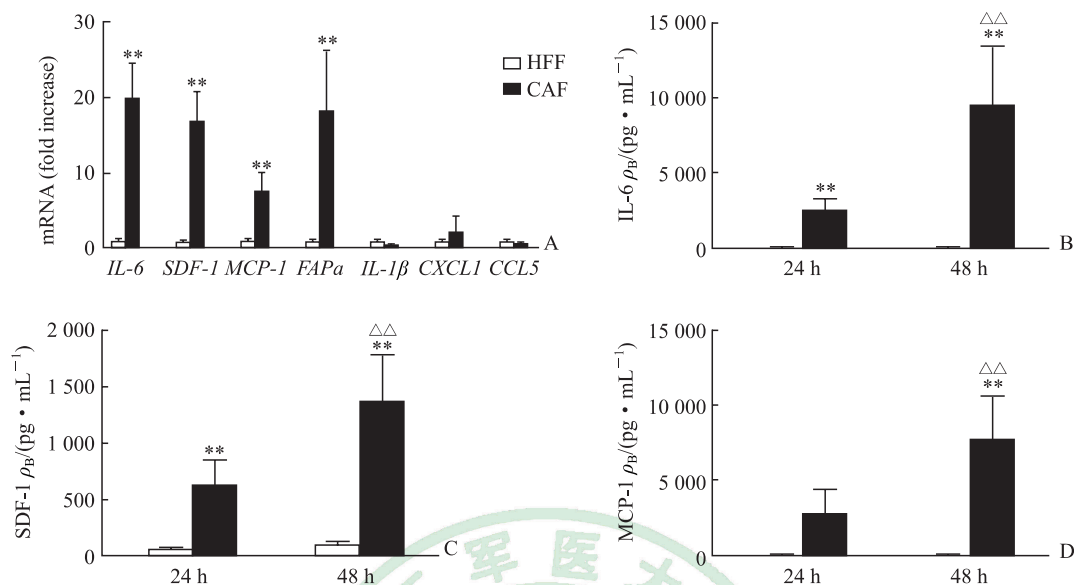


图3 原代分离的CAF中相关细胞因子的表达

Fig 3 Expression of cytokines in primary isolated CAFs

A: Expression levels of cytokines in CAFs and HFFs were detected by quantitative real-time PCR; B-D: Expression levels of IL-6, SDF-1 and MCP-1 in CAFs and HFFs culture supernatant at different time points by enzyme-like immunosorbent assay, respectively. CAF: Cancer-associated fibroblast; HFF: Human foreskin fibroblast; IL: Interleukin; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; FAPa: Fibroblast activation protein a; CXCL1: Chemokine ligand 1; CCL5: Chemokine 5. ** $P<0.01$ vs HFF; $\Delta\Delta P<0.01$ vs 24 h. $n=5, \bar{x} \pm s$

2.3 CAF 培养上清促进 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC 流式细胞术分析结果显示,用 CAF 培养上清

MDSC 比例高于与对照细胞 HFF 培养上清培养的 PBMC, 而且 CD13^{hi}-nMDSC 的数量也多于对照组培养的健康志愿者 PBMC 中 HLA-DR⁻CD11b⁺CD33⁺ (图 4A、图 4B)。

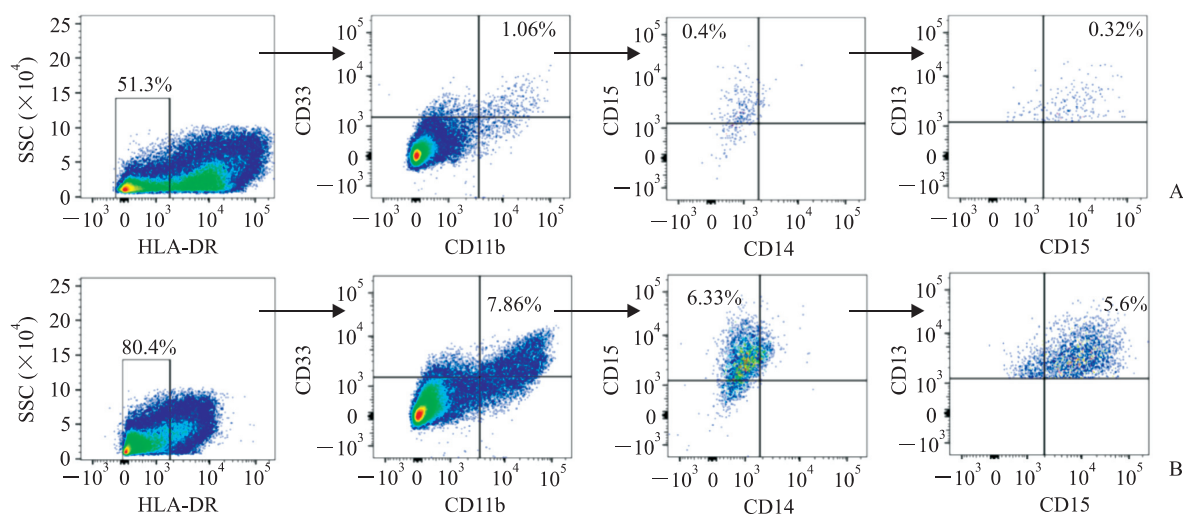


图4 流式细胞术分析 PBMC 分化情况

Fig 4 Differentiation of PBMCs detected by flow cytometry

A: The differentiation of PBMCs cultured with HFFs culture supernatant for 7 d; B: The differentiation of PBMCs cultured with CAFs culture supernatant for 7 d. PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; HFF: Human foreskin fibroblast; CAF: Cancer-associated fibroblast; HLA-DR: Human leukocyte DR antigen

为了探讨这些因子在 MDSC 分化中的作用, 在培养体系中分别加入人重组 IL-6、SDF-1、MCP-1 蛋白, 结果显示单独加入人重组 IL-6 蛋白可以诱导 PBMC 向 CD13^{hi}-nMDSC 分化 ($P<0.01$), 单独加入人重组 SDF-1 或 MCP-1 蛋白不能诱导 CD13^{hi}-nMDSC 亚群的增加, 提示 CAF 分泌的细胞因子 IL-6 可能参与介导 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC (图 5)。

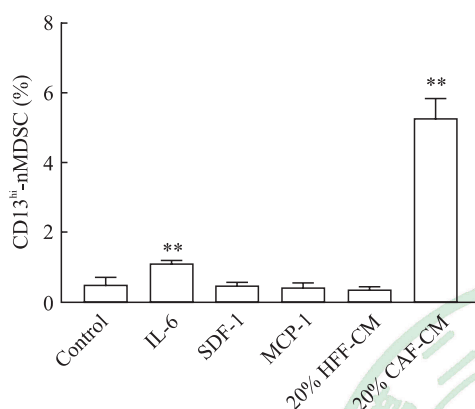


图5 培养7 d后 PBMC 中分化的 CD13^{hi}-nMDSC 亚群比例

Fig 5 Percentage of CD13^{hi}-nMDSCs subpopulation differentiated from PBMCs after 7 d of culture

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; CD13^{hi}-nMDSC: CD13-high expression neutrophil-like myeloid-derived suppressor cell; IL-6: Interleukin 6; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; HFF: Human foreskin fibroblast; CAF: Cancer-associated fibroblast; CM: Conditional medium. ** $P<0.01$ vs control group. $n=5, \bar{x} \pm s$

2.4 CAF 通过 IL-6/STAT3 通路介导 PBMC 向 CD13^{hi}-nMDSC 分化 为探究 CAF 培养上清中细胞因子参与 CD13^{hi}-nMDSC 分化的具体作用机制, 在培养体系中加入针对 IL-6 的中和抗体, 结果显示加入 IL-6 中和抗体能够减少由 CAF 培养上清诱导的分化 (图 6A, $P<0.05$), 表明 IL-6 参与介导 CD13^{hi}-nMDSC 的分化。为进一步验证 IL-6/STAT3 通路是否参与 CD13^{hi}-nMDSC 的分化过程, 在培养体系中加入 STAT3 抑制剂 FLN32, 结果显示加入 FLN32 能有效抑制 IL-6 及 CAF 培养上清诱导的 CD13^{hi}-nMDSC 分化 (图 6B, $P<0.05$)。表明 CAF 分泌的 IL-6 能通过 STAT3 通路介导 PBMC 向 CD13^{hi}-nMDSC 分化。

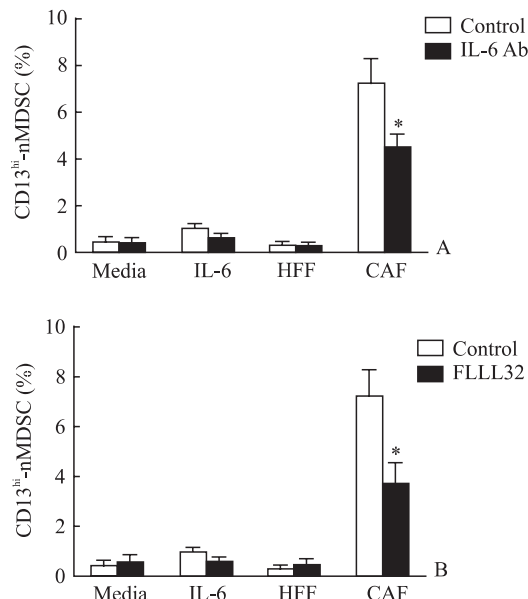


图6 IL-6 中和抗体与 STAT3 抑制剂 FLN32 对 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC 的影响

Fig 6 Effects of IL-6 neutralizing antibody (Ab) and STAT3 blocker FLN32 on proportion of CD13^{hi}-nMDSCs differentiated from PBMCs

IL-6: Interleukin 6; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell; CD13^{hi}-nMDSC: CD13-high expression neutrophil-like myeloid-derived suppressor cell. * $P<0.05$ vs control group. $n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

PDAC 是常见的进展迅速、恶性程度高、死亡率高的恶性肿瘤。PDAC 患者确诊时多处于晚期, 尽管目前医疗水平已取得较大的进步, 但仍有高达 94% 的患者在确诊 5 年内死亡^[13]。因此探寻 PDAC 的发生、发展机制, 对寻找 PDAC 治疗靶点、改善患者预后意义重大。近年来, 胰腺癌肿瘤微环境在肿瘤发生、发展中的作用引起研究者的关注^[14]。Rakhra 等^[15]将肿瘤微环境比作肿瘤细胞赖以生存和增殖的“土壤”, 能够帮助肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击, 弱化抗肿瘤治疗效果。MDSC 是肿瘤微环境中最重要的免疫抑制细胞群, 在食管癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤中的表达量较高, 并且其表达量与肿瘤患者预后、免疫治疗效果密切相关^[16-18]。本课题组在前期研究中发现胰腺癌中 MDSC 以 nMDSC 升高为主, 尤其是 CD13^{hi}-nMDSC 亚群在肿瘤组织内大量扩增聚集, CD13^{hi}-nMDSC 分泌大量的 Arg-1 抑制 T 淋巴细胞增殖, 是促进免疫抑制

微环境形成的主要细胞群^[12]。

CAF 是一群处于活化状态的成纤维样细胞群,来源多样,主要包括胰腺星状细胞、肿瘤微环境中固有的成纤维细胞、上皮细胞、间充质干细胞和骨髓来源的干细胞^[19]。有研究发现在胰腺癌等肿瘤组织内星状细胞、CAF 等间质成分与肿瘤患者 MDSC 分化密切相关,CAF 分泌的细胞因子、趋化蛋白等能够促进未成熟的免疫细胞向 MDSC 分化并促进 MDSC 的募集^[20];同时也有研究证实,在肝癌中 CAF 可以通过 SDF-1 α /趋化因子受体 4 (C-X-C chemokine receptor 4, CXCR4) 途径吸引外周血中的单核细胞,并通过 IL-6 介导的 STAT3 通路诱导单核细胞分化成 CD14⁺HLA-DR⁻ MDSC^[7];这些 MDSC 能够抑制 T 淋巴细胞增殖并改变 T 淋巴细胞的表型和功能,如诱导调节性 T 细胞和 T 淋巴细胞的凋亡、上调 IL-10 表达、下调干扰素 γ 表达等^[21]。上述研究表明 CAF 与肿瘤患者体内 MDSC 的增殖活化有关,但是 PDAC 中 MDSC 尤其是 CD13^{hi}-nMDSC 分化的机制尚不清楚。

本研究通过实时荧光定量 PCR、ELISA 筛选出 CAF 与对照细胞 HFF 表达差异较大的 3 种细胞因子 IL-6、SDF-1、MCP-1,并发现 CAF 培养上清能够促进 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC。为进一步探讨 CAF 培养上清促进 MDSC 分化的作用机制,我们在培养体系中分别加入人重组 IL-6、SDF-1、MCP-1 蛋白,结果发现人重组 SDF-1、MCP-1 蛋白均不能诱导 CD13^{hi}-nMDSC 亚群的增加,而人重组 IL-6 蛋白可诱导 PBMC 向 CD13^{hi}-nMDSC 分化。目前已有研究证实 IL-6 在其他疾病中参与 MDSC 的分化,如 Deng 等^[7]发现肝癌中 CAF 分泌的 IL-6 能使 PBMC 向 MDSC 分化。为进一步证实 IL-6 在 PDAC 中调控 MDSC 的分化过程,我们在培养体系中加入 IL-6 中和抗体,结果发现 CAF 培养上清诱导 PBMC 的分化减少。以上结果说明,CAF 主要通过高表达 IL-6 介导 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC。

Mace 等^[20]证实用 CAF 培养上清培养 PBMC 可使 STAT3 快速磷酸化,且其磷酸化水平与 IL-6 刺激后的细胞相似,而 STAT1 或 STAT5 等磷酸化水平未见增加,说明 IL-6 可能主要通过 STAT3 通路促使 PBMC 向 MDSC 分化。为验证 IL-6/STAT3 通路是否参与 CD13^{hi}-nMDSC 的分化过程,我们在培养体系中加入 STAT3 抑制

剂 FLNLL32,结果发现加入 FLNLL32 后能有效抑制 IL-6 及 CAF 培养上清诱导的 CD13^{hi}-nMDSC 的分化。说明 CAF 可以通过 IL-6/STAT3 通路促进 CD13^{hi}-nMDSC 这一新亚群的扩增。

CAF 是一群来源多样的异质性细胞群,在不同胰腺癌患者中分离的 CAF 表型特征及细胞因子的表达量有一定的差异性。本研究仅分析了 5 例 PDAC 患者肿瘤组织来源的 CAF 与 CD13^{hi}-nMDSC 分化的关系,而且尚未研究 CD13^{hi}-nMDSC 向肿瘤部位聚集的机制,具有一定的局限性。在后续实验中,我们将增加样本量进一步研究 CAF 与 CD13^{hi}-nMDSC 分化和迁移的相关机制。

综上所述,PDAC 是胰腺癌中最常见的病理类型,具有进展快、侵袭性强、预后差等特点。MDSC 在 PDAC 中通过促进肿瘤免疫抑制微环境的形成,进而在 PDAC 的发生、发展过程中发挥作用。本研究对 PDAC 主要成分之一 CAF 与 MDSC 分化的关系进行探讨,发现 CAF 可能通过 IL-6/STAT3 通路促进 PBMC 分化为 CD13^{hi}-nMDSC。这一发现有助于进一步理解 PDAC 患者肿瘤免疫逃逸机制,为寻找 PDAC 新的免疫治疗靶点、探索新的治疗策略提供了新思路。

[参考文献]

- [1] CHEN W, SUN K, ZHENG R, ZENG H, ZHANG S, XIA C, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2014[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30: 1-12.
- [2] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, JEMAL A. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64: 9-29.
- [3] AIER I, SEMWAL R, SHARMA A, VARADWAJ P K. A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer[J]. Cancer Epidemiol, 2019, 58: 104-110.
- [4] FEIG C, GOPINATHAN A, NEESSE A, CHAN D S, COOK N, TUVESON A. The pancreas cancer microenvironment[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18: 4266-4276.
- [5] FARROW B, ALBO D, BERGER D H. The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer[J]. J Surg Res, 2008, 149: 319-328.
- [6] LO A, WANG L C S, SCHOLLER J, MONSLOW J, AVERY D, EVANS R A, et al. Abstract 3187: Depleting cells expressing fibroblast activation protein disrupts tumor-promoting desmoplasia[J]. Cancer Res, 2015, 75(15 Suppl): 3187.
- [7] DENG Y, CHENG J, FU B, LIU W, CHEN G, ZHANG Q, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts enhance

- immune suppression by facilitating the generation of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36: 1090-1101.
- [8] GABITASS R F, ANNELS N E, STOCKEN D D, PANDHA H A, MIDDLETON G W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60: 1419-1430.
- [9] PYZER A R, COLE L, ROSENBLATT J, AVIGAN D E. Myeloid-derived suppressor cells as effectors of immune suppression in cancer[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139: 1915-1926.
- [10] ZHU X, PRIBIS J P, RODRIGUEZ P C, MORRIS S M Jr, VODOVOTZ Y, BILLIAR T R, et al. The central role of arginine catabolism in T-cell dysfunction and increased susceptibility to infection after physical injury[J]. *Ann Surg*, 2014, 259: 171-178.
- [11] CHANG J H, JIANG Y, PILLARISSETTY V G. Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application: an updated review[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95: e5541. doi: 10.1097/MD.0000000000005541.
- [12] ZHANG J, XU X, SHI M, CHEN Y, YU D, ZHAO C, et al. CD13^{hi} neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells exert immune suppression through arginase 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2017, 6: e1258504. doi: 10.1080/2162402X.2016.1258504.
- [13] ROSSI M L, REHMAN A A, GONDI C S. Therapeutic options for the management of pancreatic cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20: 11142-11159.
- [14] KUMAR V, PATEL S, TCYGANOV E, GABRILOVICH D I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment[J]. *Trends Immunol*, 2016, 37: 208-220.
- [15] RAKHRA K, BACHIREDDY P, ZABUAWALA T, ZEISER R, XU L, KOPELMAN A, et al. CD4⁺ T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18: 485-498.
- [16] GABITASS R F, ANNELS N E, STOCKEN D D, PANDHA H A, MIDDLETON G W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60: 1419-1430.
- [17] OHKI S, SHIBATA M, GONDA K, MACHIDA T, SHIMURA T, NAKAMURA I, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation and hypoproteinemia in patients with cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28: 453-458.
- [18] DIAZ-MONTERO C M, SALEM M L, NISHIMURA M I, GARRETT-MAYER E, COLE D J, MONTERO A J. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58: 49-59.
- [19] FRANCO O E, SHAW A K, STRAND D W, HAYWARD S W. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21: 33-39.
- [20] MACE T A, AMEEN Z, COLLINS A, WOJCIK S, MAIR M, YOUNG G S, et al. Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner[J]. *Cancer Res*, 2013, 73: 3007-3018.
- [21] ZHOU J, NEFEDOVA Y, LEI A, GABRILOVICH D. Neutrophils and PMN-MDSC: their biological role and interaction with stromal cells[J]. *Semin Immunol*, 2018, 35: 19-28.

[本文编辑] 孙 岩