

## CT26 细胞分泌的 BMPs 对小鼠树突状细胞和巨噬细胞表面 PD-L1 表达的影响

赵茂媛, 王喻义, 杜 驰, 罗 锋<sup>△</sup>

四川大学华西医院 肺癌中心 生物治疗国家重点实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 观察小鼠结肠癌 CT26 细胞培养上清中骨形成蛋白(BMPs)对树突状细胞(DCs)和巨噬细胞表面程序性死亡分子配体 1(programmed death-ligand 1, PD-L1)表达的影响,探讨其对免疫的调控。方法 体内实验:将皮下接种和腹腔接种 CT26 肠癌细胞的 BALB/c 荷瘤小鼠随机分为对照组、BMPs 抑制剂 LDN193189 组和 LDN193189 联合紫杉醇组,肿瘤接种第 8 天,分组给药 18 d。测量肿瘤体积和腹围,流式细胞术分别检测其瘤体或腹水中 DCs 和巨噬细胞百分比及其表面 PD-L1 阳性表达率。体外实验:对正常 BalB/c 小鼠骨髓分离培养的树突状细胞(BMDCs)和巨噬细胞(BMMs)分别做以下处理:①不作处理(对照组);②加入 CT26 上清;③与 CT26 不接触共培养;④加入 CT26 上清联合 LDN193189;⑤与 CT26 不接触共培养,加入 LDN193189;⑥加入 CT26 上清联合 LDN193189 和紫杉醇;⑦与 CT26 不接触共培养,加入 LDN193189 和紫杉醇。ELISA 检测 CT26 培养上清中是否有 BMPs 的表达,流式细胞术检测不同处理下 BMDCs 和 BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性率,RT-PCR 和 Western blot 检测干扰素调节因子 1(IRF-1)mRNA 和蛋白的表达。结果 体内实验中,LDN193189 组肿瘤体积或腹围最大,DCs 和巨噬细胞百分比及其表面 PD-L1 阳性表达率最低;体外实验中,ELISA 检测结果显示,BMPs 在 CT26 上清中有表达,其质量浓度为(0.59±0.09) ng/mL。加入 CT26 上清联合 LDN193189 和与 CT26 不接触共培养并且加入 LDN193189 组 BMDCs 和 BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性率较低,接近对照组水平。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,对照组 BMDCs、BMMs 中 *IRF-1* mRNA 和蛋白表达低于与 CT26 不接触共培养或加入 CT26 上清组;LDN193189 加入到加有 CT26 上清或与 CT26 共培养的 BMDCs 和 BMMs 中,*IRF-1* mRNA 和蛋白表达下降;而两个 LDN193189 联合紫杉醇组,*IRF-1* mRNA 和蛋白表达均增加。结论 CT26 分泌的 BMPs 增强树突状细胞和巨噬细胞表面 PD-L1 的表达。

**【关键词】** 树突状细胞 巨噬细胞 PD-L1 BMPs

### Bone Morphogenetic Proteins from CT26 Regulate the Expression of PD-L1 in Murine Dendritic Cells and Macrophages

ZHAO Mao-yuan, WANG Yu-yi, DU Chi, LUO Feng<sup>△</sup>. Department of Lung Cancer Center, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 61004, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: luofeng@medmail.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To analyze the influence of bone morphogenetic proteins (BMPs) from CT26 on PD-L1 of dendritic cells and macrophages. **Methods** *In vivo*, we respectively inoculated CT26 colon cancer cells subcutaneously and intraperitoneally to BALB/c mice. The mice were randomly assigned to three groups and treated with ① normal saline; ② BMPs inhibitor LDN193189; ③ BMPs inhibitor LDN193189 combined with paclitaxel, respectively. The treatments started on the eighth day after inoculating, when the tumor volume reached 150 mm<sup>3</sup> or the abdominal circumference was greater than 6 cm. After 2 weeks of treatments, the mice were sacrificed. The counts of dendritic cells and macrophages and the expression of PD-L1 in tumors or ascites were detected by flow cytometry (FCM). *In vitro*, the dendritic cells and macrophages from normal BALB/c mice bone marrow were exposed to: ① no treatment; ② CT26 supernatant; ③ CT26; ④ CT26 supernatant and LDN193189; ⑤ CT26 and LDN193189; ⑥ CT26 supernatant, LDN193189 and paclitaxel; ⑦ CT26, LDN193189 and paclitaxel. BMPs from CT26 was detected by ELISA. The counts of dendritic cells and macrophages and their PD-L1 expressions were detected by FCM. IRF-1 expression was detected by real-time (RT)-PCR and Western blot. **Results** *In vivo*, LDN193189 treated mice had the greatest tumor size or abdominal circumference, with least dendritic cells and macrophages and expressions of PD-L1. *In vitro*, ELISA test results showed that the concentration of BMPs in

CT26 supernatant was  $(0.59 \pm 0.09)$  ng/mL. FCM, RT-PCR and Western blot showed that dendritic cells and macrophages exposed to CT26 supernatant and LDN193189 or CT26 and LDN193189 expressed the least PD-L1 and IRF-1, which was close to those without treatment. While added the PTX to the above treatment, the expressions of PD-L1 and IRF-1 increased in the test results. **Conclusion** BMPs from CT26 up-regulate the expression of PD-L1 in murine dendritic cells and macrophages.

**【Key words】** Dendritic cells Macrophages PD-L1 BMPs

骨形成蛋白(BMPs)属于转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族,是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白<sup>[1]</sup>。最初作为能够在体内诱导骨和软骨形成的因子为人们所认识,对骨骼的胚胎发育和再生修复起重要作用<sup>[2]</sup>。BMPs的信号通过与其两种受体(BMPRI和BMPRII)的复合体相互作用实现。BMPRI是两种膜结合丝氨酸/苏氨酸激酶的复合体,BMPRII受体磷酸化激活I型受体,BMPRI再磷酸化激活smad蛋白<sup>[1,3]</sup>。结合在一起的smad1/5/8与smad4形成复合物转入细胞核内刺激靶基因的转录<sup>[1,4]</sup>。如今,BMPs被认为是与人类器官生长、保护以及更新有关的多功能蛋白<sup>[5]</sup>。活化的BMPs受体复合物可以激活依赖/不依赖smad的信号通路<sup>[1,6]</sup>,与包括肿瘤在内的多种临床征象有密切关系<sup>[1]</sup>。在免疫系统,BMPs抑制骨髓的B淋巴细胞,影响免疫细胞的成熟<sup>[7-9]</sup>。单核细胞来源的树突状细胞(DCs)和巨噬细胞既能表达BMPRI,又能分泌BMPs。重组或者自/旁分泌的BMPs有助于单核细胞来源的DCs成熟,促进其抗原提呈功能<sup>[10]</sup>。BMP6可以活化小鼠的巨噬细胞株RAW 264.7,介导白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 分泌增加<sup>[11-12]</sup>。BMP2可以介导结肠癌细胞凋亡<sup>[13]</sup>,抑制人类乳腺癌细胞增殖<sup>[14]</sup>。过表达BMP9下调PI3K/AKT通路,抑制人类骨肉瘤细胞的生长和转移<sup>[15]</sup>。在某些肿瘤中,BMPs表达有所减少<sup>[16-17]</sup>。本研究探讨肿瘤细胞分泌的BMPs对DCs和巨噬细胞表面程序性死亡分子配体1(programmed death-ligand 1,PD-L1)表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株和动物** 小鼠结肠癌细胞CT26购自美国模式菌种收集中心(ATCC)细胞库。5周龄的雌性BALB/c小鼠购自北京华阜康生物科技有限公司。购回的小鼠饲养在本实验室SPF级动物房中,自由进食。饲养后1~2周开始进行动物实验。

**1.1.2 主要试剂仪器** RPMI1640培养基(Life Technologies公司),CD11b、CD11c、CD274、PD-L1、F4/80抗体(Ebioscience公司),胶原酶I型(Gibco公司),磷酸缓冲盐溶液(PBS,pH7.2~7.4)、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、人巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、IL-4购于Peprotech公司,BMPs抑制剂LDN193189(Stemgent Asterand公司)和紫杉醇(paclitaxel,PTX,Hospira Australia Pty Ltd公司)。流式细胞仪MoFlo(Beckman公司)。70  $\mu$ m滤过器(BD公司)。

### 1.2 体内实验

**1.2.1 荷瘤小鼠模型建立** 雌性BALB/c小鼠30只,随机选取15只小鼠在其背部右后侧皮下接种CT26细胞(每只 $1 \times 10^6$ 个),其余15只在其腹腔接种CT26细胞(每只 $5 \times 10^5$ 个)。于接种后第8天开始,每2d用游标卡尺测量1次并计算肿瘤的体积和腹围。肿瘤体积= $0.5 \times$ 肿瘤长径 $\times$ (短径)<sup>2</sup>。接种后第26天,所有小鼠均处死,解剖取下其皮下肿瘤或抽取其腹水。

**1.2.2 体内实验分组及处理** 将皮下接种和腹腔接种CT26肠癌细胞的BALB/c荷瘤小鼠随机分为三组:生理盐水组(每只予100  $\mu$ L/12h)、BMPs抑制剂LDN193189[3 mg/(kg $\cdot$ 12h)]组以及LDN193189[3 mg/(kg $\cdot$ 12h)]联合紫杉醇(PTX 10 mg/kg,每周3次)组。肿瘤接种第8天,肿瘤体积增至150 mm<sup>3</sup>左右或腹围大于6 cm时,开始分组腹腔注射给药。持续18d后处死小鼠,取其原发瘤和腹水。

**1.2.3 流式细胞术** 流式细胞术检测肿瘤微环境中DCs(CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>)、巨噬细胞(F4/80<sup>+</sup>)及其表面PD-L1阳性表达率。取小鼠肿瘤,剪碎,装入15 mL离心管中,每管加入3~5 mL I型胶原酶(1 mg/mL),置于37  $^{\circ}$ C摇床消化90 min或以上;消化后的样品离心弃上清,加PBS洗涤2遍再重悬;重悬的细胞置于4  $^{\circ}$ C冰箱静置1~2 h,根据悬液浓度取上清100~200  $\mu$ L,计数后加入流式管内。抽

取小鼠腹水,装入 15 mL 离心管中,离心后弃上清,加 PBS 洗涤 2 遍再重悬。根据分组检测情况依次加入抗体,每种每管加 1  $\mu$ L,随后置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱避光孵育 30 min;上机检测前用 PBS 洗涤 2 次后重悬。另设空白对照。记录 DCs 和巨噬细胞的数量占总收取细胞数的百分比,以及它们各自表面 PD-L1 阳性表达率。

### 1.3 体外实验

**1.3.1 CT26 细胞培养** CT26 接种于含体积分数 10% 胎牛血清 (FCS)、100 U/mL 青/链霉素的 RPMI1640 培养液,37  $^{\circ}$ C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养。

**1.3.2 体外分离培养 DCs 和巨噬细胞** 颈椎脱臼法处死正常 BALB/c 小鼠,取其完整的股骨、胫骨,剔净周围组织,冲洗髓腔 4~5 次,收集沉淀的骨髓细胞获得单细胞悬液。一部分骨髓细胞加入装有 RPMI1640 含 GM-CSF 30 ng/mL、IL-4 20 ng/mL 的完全培养基培养,隔天半定量换液,第 10 天流式分选收获骨髓来源的树突状细胞 (BMDCs)。另一部分骨髓细胞加入装有 RPMI1640 含 M-CSF 20 ng/mL 的完全培养基培养,隔天半定量换液,第 5 天流式分选收获骨髓来源的巨噬细胞 (BMMs)。

**1.3.3 体外实验分组及处理** 对正常 BALB/c 小鼠骨髓分离培养的 BMDCs 和 BMMs 分别做以下分组处理:① 不作处理 (对照组);② 加入 CT26 上清;③ 与 CT26 不接触共培养;④ 加入 CT26 上清联合 LDN193189;⑤ 与 CT26 不接触共培养,加入 LDN193189;⑥ 加入 CT26 上清联合 LDN193189 和紫杉醇;⑦ 与 CT26 不接触共培养,加入 LDN193189 和紫杉醇;并设空白对照。其中上清取自 CT26 单独培养 72 h 后,其用量分别占 BMDCs 和 BMMs 培养体系的 1/3,LDN193189 终浓度为 30 nmol/L,PTX 终浓度为 1 nmol/L,共培养 72 h。

**1.3.4 ELISA 检测 BMPs 的含量** 取单独培养 72 h 的 CT26 上清,采用小鼠 BMPs 检测试剂盒测定 CT26 上清中 BMPs 的质量浓度,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.3.5 流式细胞术检测 BMDCs、BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性率** 细胞处理和分组同 1.3.3,然后上机检测。

**1.3.6 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测干扰素调节因子 1 (IRF-1) mRNA 表达** IRF-1 是干扰素调节因子 (IRF) 家族的成员。取共培养 72 h 后的 BMDCs 和 BMMs,细胞总 RNA 提取采用 TRIzol

法,经逆转录后得到 cDNA,然后采用 ABI 7900 Real-time PCR 仪进行基因片段扩增。设计相应的 PCR 引物序列。IRF-1 mRNA 上游 5'-ACAGGTG TCACCCATGCCTTC-3';下游 5'-GGCTGCCAC TCAGACTGTTCA-3'。反应条件:95  $^{\circ}$ C 10 min,60.1  $^{\circ}$ C 30 min,67  $^{\circ}$ C 5 s,共 40 次循环,反应结束后绘制溶解曲线。扩增曲线上设定循环基线和阈值, $\beta$ -actin 为内参照,通过测量循环值,计算各样本的基因拷贝数,并计算各样本的标准曲线的目标量,然后除以参考基因的量,以获得一个标准化的目标值。

**1.3.7 Western blot 检测 IRF-1 蛋白的表达** 收集小鼠 BMDCs 和 BMMs,细胞裂解液 100  $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,进行 12 g/L SDS-PAGE,转移至 PVDF 膜。以 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,然后加入一抗 (1:1 000 稀释) 4  $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗涤 3 次,加入二抗 (1:1 000) 孵育 1 h 后,再洗涤 3 次。最后采用化学发光法检测目的条带,以  $\beta$ -actin 为内参照,以 IRF-1/ $\beta$ -actin 灰度值的比值为 IRF-1 蛋白的相对表达量。

### 1.4 统计学方法

采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体内实验

**2.1.1 各组荷瘤鼠肿瘤体积及腹围的比较** 见图 1。LDN193189 组小鼠肿瘤体积和腹围大于对照组 ( $P < 0.05$ ),LDN193189 联合紫杉醇处理的小鼠其肿瘤体积和腹围最小 ( $P < 0.05$ )。

**2.1.2 荷瘤鼠瘤体及腹水中 DCs、巨噬细胞百分比及表面的 PD-L1 表达阳性率** 见图 2 及附表。LDN193189 组小鼠的肿瘤组织和癌性腹水中的 DCs 和巨噬细胞百分比以及 PD-L1 的表达阳性率均低于对照组 ( $P < 0.05$ ),而 LDN193189 联合紫杉醇组小鼠肿瘤组织和癌性腹水中的 DCs 及巨噬细胞百分比和其 PD-L1 表达阳性率较 LDN193189 组均有提高 ( $P < 0.05$ ),但与对照组比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 体外实验

**2.2.1 CT26 细胞培养上清 BMPs 的质量浓度** ELISA 检测结果显示,CT26 上清中 BMPs 质量浓度为 (0.59  $\pm$  0.09) ng/mL。

**2.2.2 流式细胞术检测 BMDCs、BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性率** 见图 3。对照组 BMDCs、

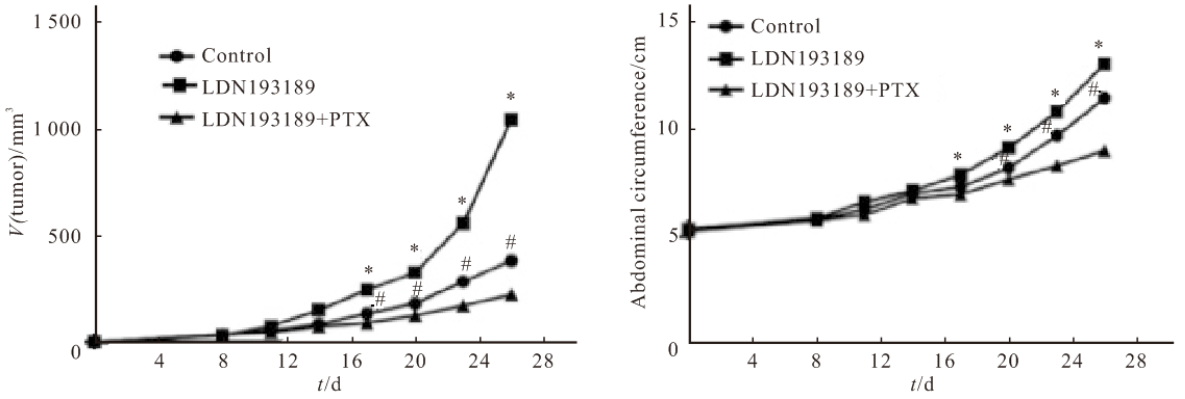


图 1 各组荷瘤鼠皮下移植瘤和腹围大小比较

Fig 1 Size of tumor and abdominal circumference of tumor-bearing mice

\*  $P < 0.05$ , vs. control and LDN193189+PTX groups at the same time point; #  $P < 0.05$ , vs. LDN193189+PTX group at the same time point

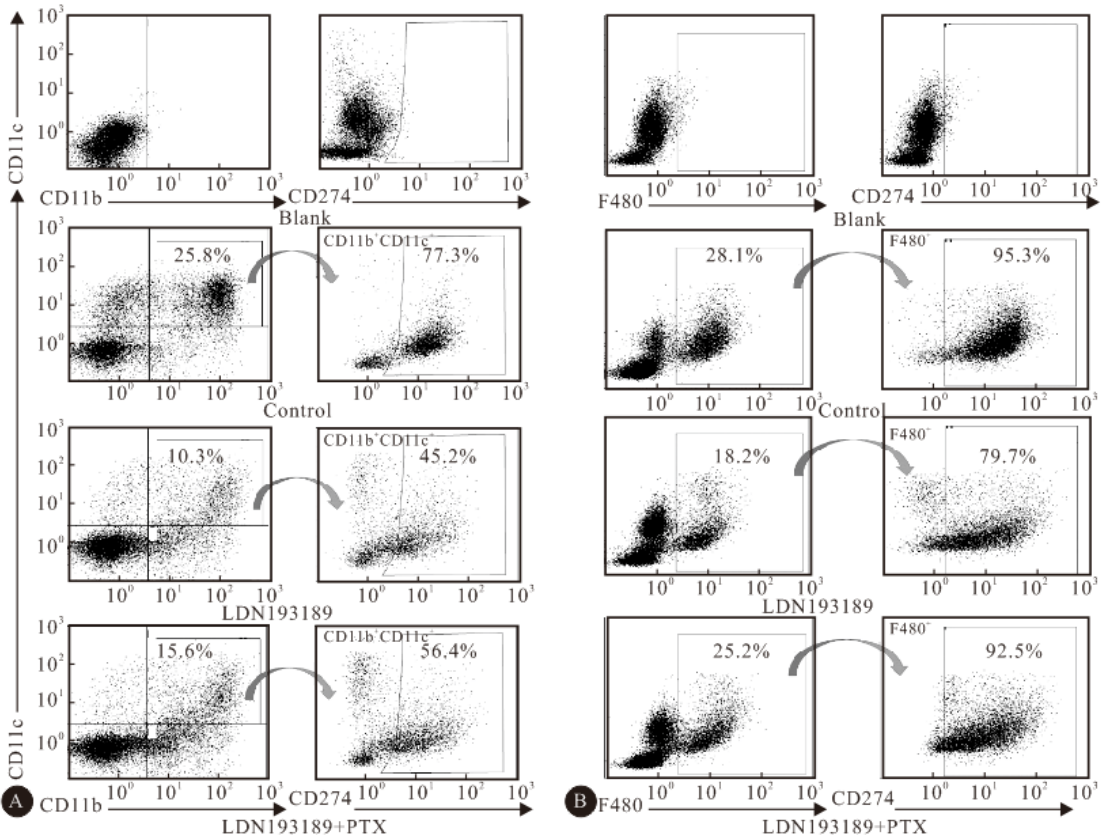


图 2 流式细胞术检测腹水中的 DCs(A)和巨噬细胞(B)百分比以及 PD-L1 的表达阳性率

Fig 2 Counts of dendritic cells (A) and macrophages (B) and their PD-L1 expression in malignant ascites of tumor-bearing mice

附表 各组小鼠的肿瘤组织和癌性腹水中的巨噬细胞和 DCs 百分比以及 PD-L1 的表达阳性率

Table Counts of dendritic cells and macrophages and their PD-L1 expression in subcutaneous xenografts or malignant ascites of tumor-bearing mice

Group	n	Tumor tissue/%				Malignant ascites/%			
		Proportion of DCs	PD-L1 expression in DCs	Proportion of macrophages	PD-L1 expression in macrophages	Proportion of DCs	PD-L1 expression in DCs	Proportion of macrophages	PD-L1 expression in macrophages
Control	3	2.7±0.3△	89.7±2.4△	2.7±0.4△	68.7±2.1△	25.8±3.3△	77.3±5.4△	28.1±2.9△	95.3±2.2△
LDN193189	3	1.3±0.6▲	78.2±1.2▲	1.7±0.1▲	55.2±5.0▲	10.8±2.1▲	45.2±3.1▲	18.2±1.7▲	79.9±3.1▲
LDN193189+PTX	3	3.7±0.4	96.5±2.9	2.6±0.2	66.6±3.2	15.6±1.9	56.4±6.0	25.3±3.1	92.5±1.6
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

△ $P < 0.05$ , vs. LDN193189 group; ▲ $P < 0.05$ , vs. LDN193189+PTX group

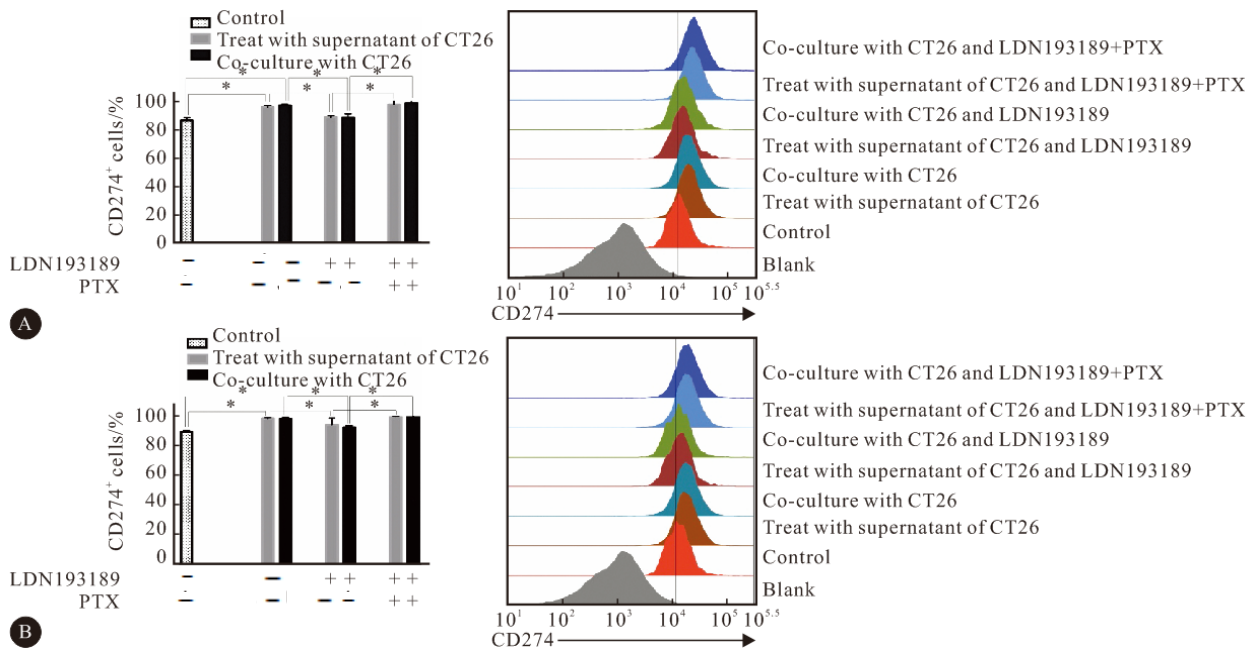


图 3 流式细胞术检测 BMDCs(A)、BMMs(B) 表面的 PD-L1 表达阳性率

Fig 3 PD-L1 expression in BMDCs (A) and BMMs (B) detected by flow cytometry (\* P<0.05)

BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性(CD274<sup>+</sup>)率低于与 CT26 不接触共培养或加入 CT26 上清组 ( $P$  均 < 0.05); LDN193189 加入到加有 CT26 上清或与 CT26 共培养的 BMDCs 和 BMMs 中, BMDCs、BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性率几乎下降至对照组水平 ( $P > 0.05$ ), 与 CT26 不接触共培养或加入 CT26 上清组比较, 差异有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05); 而 LDN193189 联合紫杉醇加入已加有 CT26 上清或与 CT26 共培养的 BMDCs 和 BMMs 中, BMDCs、BMMs 表面的 PD-L1 表达阳性率增加, 与单加入 LDN193189 的两组比较, 差异有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05)。即, CT26 细胞可分泌 BMPs, BMPs 上调 BMDCs 和 BMMs 表面 PD-L1 的表达, LDN193189 可抑制 BMPs 的上调作用, 而

PTX 可逆转 LDN193189 引起的对 PD-L1 的抑制。  
**2.2.3 RT-PCR、Western blot 检测 IRF-1 mRNA 和蛋白的表达** 见图 4、图 5。对照组 BMDCs、BMMs 中 IRF-1 mRNA 表达低于与 CT26 不接触共培养或加入 CT26 上清组 ( $P$  均 < 0.05); LDN193189 加入到加有 CT26 上清或与 CT26 共培养的 BMDCs 和 BMMs 中, IRF-1 mRNA 表达下降, 与 CT26 不接触共培养或加入 CT26 上清组比较, 差异有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05); 而 LDN193189 联合紫杉醇加入已加有 CT26 上清或与 CT26 共培养的 BMDCs 和 BMMs 中, IRF-1 mRNA 表达增加, 与其它各组比较, 差异均有统计学意义 ( $P$  均 < 0.05)。IRF-1 蛋白的表达变化同 IRF-1 mRNA 表达一致。

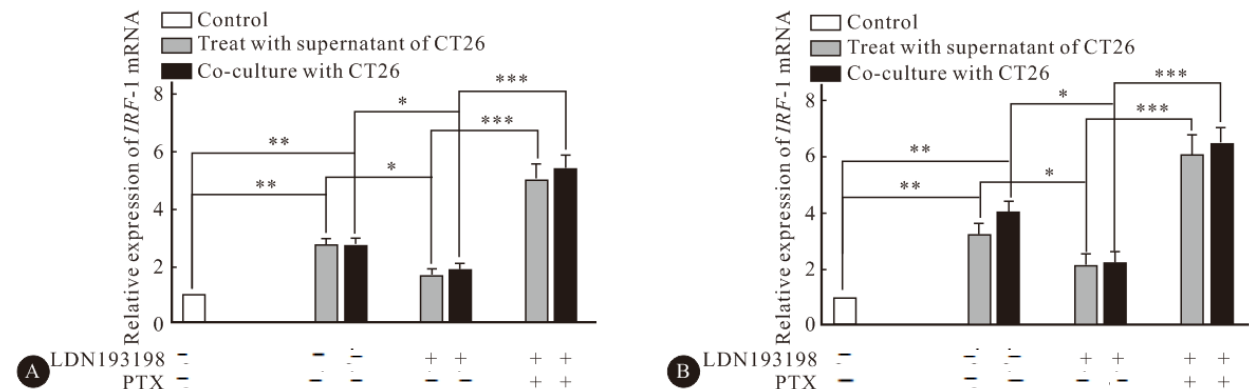


图 4 RT-PCR 检测 BMMs (A)、BMDCs (B) 中 IRF-1 mRNA 的表达

Fig 4 The expression of IRF-1 mRNA in BMMs (A) and BMDCs (B) detected by RT-PCR (\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001)

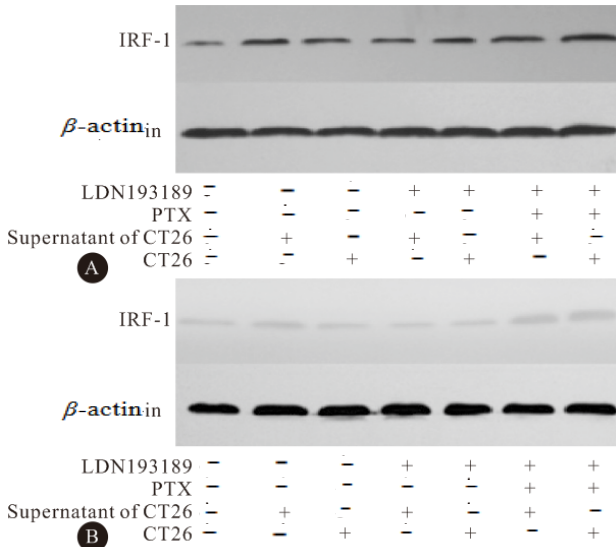


图 5 Western blot 检测 BMDCs(A)、BMMs(B)中 IRF-1 蛋白的表达  
Fig 5 The expression of IRF-1 in BMDCs (A) and BMMs (B) detected by Western blot

### 3 讨论

BMPs 最初被发现是其直接促进异位骨和软骨的形成。最近它们被视为多功能蛋白,并且与肿瘤的进展有关<sup>[6]</sup>。各种癌细胞<sup>[13]</sup>和一些免疫细胞<sup>[7-8,10]</sup>均可分泌 BMPs。PD-L1 是广泛表达于抗原呈递细胞的共抑制分子<sup>[18]</sup>,与 T 细胞表面的受体 PD-1 结合后,能够引起免疫反应<sup>[19]</sup>。

BMP 信号可通过各种途径来促进原发肿瘤的生长,如促进小鼠骨髓间充质干细胞分化<sup>[20]</sup>,上调促凋亡基因 *bax* 和下调抗凋亡蛋白 Bcl-2<sup>[21]</sup>等。也有报道显示,BMPs 通过上调 Axin 蛋白<sup>[22]</sup>或诱导的 DNA 损伤反应<sup>[23]</sup>抑制癌细胞的生长和迁移。另外,重组或自分泌/旁分泌的 BMPs 可有助于活化 DCs 和巨噬细胞<sup>[10,24]</sup>。近年来,PD-L1 被看作 DCs 和巨噬细胞活化的标志<sup>[25-26]</sup>。虽然以前的研究表明,BMPs 激活巨噬细胞(RAW 264.7),刺激其炎性细胞因子的产生<sup>[11-12]</sup>,同时抑制其增殖<sup>[10,27]</sup>。随着 BMP 信号增强,表达于 DCs 和巨噬细胞表面的 PD-L1 增多,抗原提呈细胞的抗原提呈功能也随之提升,与 T 细胞表面的 PD-1 的结合也增强<sup>[28]</sup>。在本实验中,我们证实了 CT26 可分泌 BMPs。我们还发现与 CT26 不接触共培养,或者加入 CT26 上清的 BMDCs 和 BMMs,PD-L1 表达均增加。此外,加入抑制剂 LDN193189 后,PD-L1 升高受到抑制。本研究体内实验结果显示,在分别采用了 LDN193189 处理的小鼠的肿瘤组织和癌性腹水中

的巨噬细胞和 DCs 比例以及 PD-L1 的表达均低于未注射 LDN193189 的对照组。此结果与肿瘤的大小、腹围的变化一致,对于 LDN193189 处理的小鼠,DCs 和巨噬细胞的 PD-L1 的表达较低,其肿瘤体积和腹围也较大。这些结果表明,CT26 分泌的 BMPs 上调 DCs 和巨噬细胞表面 PD-L1 的表达,并且封锁 CT26 分泌的 BMPs,减少 DCs 和巨噬细胞的比例以及其 PD-L1 的表达。本项实验研究不仅进行了 BMPs 的研究,而且同时创新性结合了肿瘤和免疫细胞作用的研究,对临床肿瘤的治疗具有重大作用。

传统化疗药物紫杉醇可通过诱导的巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)调控小鼠巨噬细胞的活化和迁移<sup>[29-30]</sup>,激活免疫细胞产生抗肿瘤作用<sup>[31]</sup>。我们把 LDN193189 联合紫杉醇加入已加有 CT26 上清或与 CT26 共培养的 BMDCs 和 BMMs 中,结果显示,BMDCs 和 BMMs 表达 PD-L1 增加,紫杉醇可逆转 LDN193189 引起的对 PD-L1 的抑制。在体内给予小鼠 LDN193189 联合紫杉醇处理后,DCs 及巨噬细胞的比例和其 PD-L1 表达在恶性腹水及皮下肿瘤中均有提高。此结果也与肿瘤的大小、腹围的变化一致,LDN193189 联合紫杉醇处理的小鼠的 DCs 和巨噬细胞的 PD-L1 的表达较高,其肿瘤体积和腹围也最小。由此,紫杉醇不仅能活化 DCs 和巨噬细胞,还能克服封锁 BMPs 信号对 DCs 和巨噬细胞产生的抑制作用。

IRF-1 是干扰素调节因子家族的成员,在对宿主防御细胞反应的调节中表现出显著功能,能够活化各种免疫细胞,通过 TLR-MyD88 依赖的信号诱导 DC 和巨噬细胞 PD-L1 的表达<sup>[32-34]</sup>。已有研究表明,IRF-1 可被重组或自分泌/旁分泌 BMPs 所调节<sup>[10,24]</sup>,在 DCs 中被认为是 BMPs 的基因靶<sup>[25]</sup>。在本研究中,对照组与另外加入抑制剂 LDN193189 的实验组 DCs 和巨噬细胞 IRF-1 的表达水平较为接近。在体内实验中,我们发现 LDN193189 联合紫杉醇加入 CT26 上清或 CT26 共培养组 IRF-1 mRNA 的 PD-L1 表达最高。结合“IRF-1 调控 PD-L1”的结论<sup>[20]</sup>,我们推测紫杉醇通过上调 DCs 和巨噬细胞的 IRF-1,增加 PD-L1 的表达,改善 LDN193189 介导的 PD-L1 下调,活化 DCs 和巨噬细胞。

BMP10 能抑制乳腺和前列腺癌细胞生长,及其预后不良和疾病进展<sup>[16-17]</sup>,增加 BMP2 表达可诱导结肠癌细胞凋亡<sup>[13]</sup>,过表达 BMP9 抑制骨肉瘤细

细胞的生长和迁移<sup>[15]</sup>。在此基础上与我们的研究结果相结合,可产生特别的意义:体外增强基于 DCs 或巨噬细胞的抗肿瘤疫苗临床效率并不显著。肿瘤细胞通过免疫耐受和免疫抑制,减弱刺激 DCs 和巨噬细胞的效应,从而限制了临床的应用和推广<sup>[35]</sup>。如果联合 BMPs,那么 DCs 和巨噬细胞疫苗或许可以增强其刺激效果。此外,鉴于多种传统的化疗药物可以刺激 DCs 和巨噬细胞<sup>[36]</sup>,化疗和抗原呈递细胞疫苗联合可能有相互促进的效果。

### 参 考 文 献

- [1] URIST MR. Bone; formation by autoinduction. *Science*, 1965,150(3698):893-899.
- [2] MIYAZONO K, KAMIYA Y, MORIKAWA M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*,2010,147(1):35-51.
- [3] BRAGDON B, MOSEYCHUK O, SALDANHA S, *et al.* Bone morphogenetic proteins;a critical review. *Cell Signal*, 2011,23(4):609-620.
- [4] NOHE A, KEATING E, KNAUS P, *et al.* Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*,2004,16(3):291-299.
- [5] WAGNER DO, SIEBER C, BHUSHAN R, *et al.* BMPs; from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal*,2010, 3(107): mr1 [2016-07-21]. <http://stke.sciencemag.org/content/3/107/mr1>. doi: 10.1126/scisignal.3107mr1.
- [6] SIEBER C, KOPF J, HIEPEN C, *et al.* Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*,2009, 20(5/6):343-355.
- [7] KERSTEN C, DOSEN G, MYKLEBUST JH, *et al.* BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis——upregulation of Id1 and Id3. *Exp Hematol*,2006,34(1):72-81.
- [8] CEJALVO T, SACEDON R, HERNANDEZ-LOPEZ C, *et al.* Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology*, 2007, 121(1): 94-104.
- [9] YOSHIOKA Y, ONO M, OSAKI M, *et al.* Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol*,2012,42(3):749-759.
- [10] MARTÍNEZ VG, HERNÁNDEZ-LÓPEZ C, VALENCIA J, *et al.* The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol Cell Biol*,2011,89(5):610-618.
- [11] KWON SJ, LEE GT, LEE JH, *et al.* Bone morphogenetic protein-6 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Immunology*,2009,128(1 Suppl): e758-e765 [2016-07-21]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2009.03079.x/abstract;jsessionid=E427A83E0C32B3B17FEE4B149F6D8876.f02t02>.
- [12] LEE GT, JUNG YS, LEE JH, *et al.* Bone morphogenetic protein 6-induced interleukin-1beta expression in macrophages requires PU. 1/Smad1 interaction. *Mol Immunol*,2011,48(12/13):1540-1547.
- [13] KODACH LL, BLEUMING SA, PEPPELENBOSCH MP, *et al.* The effect of statins in colorectal cancer is mediated through the bone morphogenetic protein pathway. *Gastroenterology*,2007,133(3):1272-1281.
- [14] YE S, PARK BH, SONG KJ, *et al.* *In vivo* inhibition of bone morphogenetic protein-2 on breast cancer cell growth. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2013, 38(3): E143-E150 [2016-07-21]. [https://www.researchgate.net/publication/233738080\\_In\\_Vivo\\_Inhibition\\_of\\_Bone\\_Morphogenetic\\_Protein-2\\_on\\_Breast\\_Cancer\\_Cell\\_Growth](https://www.researchgate.net/publication/233738080_In_Vivo_Inhibition_of_Bone_Morphogenetic_Protein-2_on_Breast_Cancer_Cell_Growth). doi: 10.1097/BRS.0b013e31827db4c6.
- [15] YE L, KYNASTON H, JIANG WG. Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway. *J Urol*,2009,181(6):2749-2759.
- [16] YE L, BOKOBZA S, LI J, *et al.* Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*,2010,101(10):2137-2144.
- [17] KAWASAKI K, AKASHI S, SHIMAZU R, *et al.* Mouse toll-like receptor 4. MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem*,2000,275(4):2251-2254.
- [18] YU PB, DENG DY, LAI CS, *et al.* BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification. *Nat Med*,2008,14(12):1363-1369.
- [19] GABRIELE L, OZATO K. The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev*,2007,18(5/6): 503-510.
- [20] MARTINEZ VG, HIDALGO L, VALENCIA J, *et al.* Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells. *Eur J Immunol*,2014,44(4):1031-1038.
- [21] BARBER DL, WHERRY EJ, MASOPUST D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*,2006,439(7077):682-687.
- [22] KISHI Y, FUJIHARA H, KAWAGUCHI K, *et al.* PARP inhibitor PJ34 suppresses osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells by modulating BMP-2 signaling pathway. *Int J Mol Sci*,2015,16(10):24820-24838.
- [23] KALLIONIEMI A. Bone morphogenetic protein 4—a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet*, 2012,205(6):267-277.
- [24] TAILOR P, TAMURA T, OZATO K. IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells. *Cell Res*,

- 2006,16(2):134-140.
- [25] LEI H, WANG J, LU P, *et al.* BMP10 inhibited the growth and migration of gastric cancer cells. *Tumour Biol*,2016,37(3):3025-3031.
- [26] LIU H, BAO D, XIA X, *et al.* An unconventional role of BMP-Smad1 signaling in DNA damage response;a mechanism for tumor suppression. *J Cell Biochem*,2014,115(3):450-456.
- [27] BRETON G, YASSINE-DIAB B, COHN L, *et al.* SiRNA knockdown of PD-L1 and PD-L2 in monocyte-derived dendritic cells only modestly improves proliferative responses to Gag by CD8(+) T cells from HIV-1-infected individuals. *J Clin Immunol*,2009,29(5):637-645.
- [28] TANIGUCHI T, OGASAWARA K, TAKAOKA A, *et al.* IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*,2001(19): 623-655[2016-07-21]. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>.
- [29] BYRD-LEIFER CA, BLOCK EF, TAKEDA K, *et al.* The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol*,2001,31(8):2448-2457.
- [30] ZIMMER SM, LIU J, CLAYTON JL, *et al.* Paclitaxel binding to human and murine MD-2. *J Biol Chem*,2008,283(41):27916-27926.
- [31] KARAKHANOVA S, MEISEL S, RING S, *et al.* ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur J Immunol*,2010,40(1):254-266.
- [32] LEE SJ, JANG BC, LEE SW, *et al.* Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett*,2006,580(3):755-762.
- [33] KLEINERT H, SCHWARZ PM, FÖRSTERMANN U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem*,2003,384(10/11):1343-1364.
- [34] EMENS LA. Chemoimmunotherapy. *Cancer J*,2010,16(4):295-303.
- [35] LI B, YANG Y, JIANG S, *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of BMP-9 inhibits human osteosarcoma cell growth and migration through downregulation of the PI3K/AKT pathway. *Int J Oncol*,2012,41(5):1809-1819.
- [36] SABADO RL, BHARDWAJ N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*,2010,2(1):37-56.

(2016-07-10 收稿,2016-10-27 修回)

编辑 沈进

(上接第 32 页)

- [8] YUAN GH, SONG WL, HUANG YY, *et al.* Efficacy and tolerability of exenatide monotherapy in obese patients with newly diagnosed type 2 diabetes; a randomized, 26 weeks metformin controlled, parallel-group study. *Chin Med J (Engl)*,2012,125(15):2677-2681.
- [9] SEGHERI M, REBELOS E, GASTALDELLI A, *et al.* Direct effect of GLP-1 infusion on endogenous glucose production in humans. *Diabetologia*,2013,56(1):156-161.
- [10] BUNCK MC, CORNER A, ELIASSON B, *et al.* Effects of exenatide on measures of  $\beta$ -cell function after 3 years in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*,2011,34(9):2041-2047.
- [11] ARMSTRONG MJ, HULL D, GUO K, *et al.* Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*,2016,64(2):399-408.
- [12] PETIT JM, CERCUEIL JP, LOFFROY R, *et al.* Effect of liraglutide therapy on liver fat content in patients with inadequately controlled type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016; jc20162775 [2016-10-04]. <http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/jc.2016-2775>. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-2775>.
- [13] CHAURASIA B, KADDAI VA, LANCASTER G, *et al.* Adipocyte ceramides regulate subcutaneous adipose browning, inflammation, and metabolism. *Cell Metab*,2016,24(6):820-834.
- [14] SO A, THORENS B. Uric acid transport and disease. *J Clin Invest*,2010,120(6):1791-1799.
- [15] NAKAJIMA K, OSHIDA H, MUNAYUKI T, *et al.* Independent association between low serum amylase and non-alcoholic fatty liver disease in asymptomatic adults: a cross-sectional observational study. *BMJ Open*,2013(3):e002235 [2013-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549261/pdf/bmjopen-2012-002235.pdf>. doi: 10.1136/bmjopen-2012-002235.

(2016-11-07 收稿,2016-11-27 修回)

编辑 吕熙