

头颈肿瘤来源的ALDH1阳性肿瘤干细胞的T细胞免疫调节特性研究

胡未鸣 任定远 赵勇

[摘要] 目的 研究头颈肿瘤来源的乙醛脱氢酶同工1(ALDH1)阳性肿瘤干细胞的T细胞免疫调节特性。方法 首先培养头颈肿瘤细胞系(UMSCC-9、UMSCC-11B和UMSCC-47),然后通过PCR、流式细胞仪等相关实验,分析比较头颈肿瘤干细胞来源的ALDH1阳性与ALDH1阴性的两类不同细胞对于预激活T细胞的增殖、活化、凋亡以及其他相关功能的影响。结果 与ALDH1阴性细胞比较,由ALDH1阳性细胞培养所得的头颈肿瘤细胞具有更强的肿瘤干细胞特性。头颈肿瘤细胞系(UMSCC-9、UMSCC-11B和UMSCC-47)的ALDH1阳性细胞对T细胞增殖抑制效率明显高于ALDH1阴性细胞,ALDH1阳性细胞共培养的T细胞中的细胞因子干扰素 γ (IFN- γ)、白介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和活化因子CD69、CD137、CD154均明显低于ALDH1阴性细胞(P 均 <0.05)。结论 与ALDH1阴性细胞比较,ALDH1阳性细胞对T细胞的免疫功能有更强的抑制作用。肿瘤干细胞在宿主免疫反应这一复杂交互作用中扮演了主导地位,且最终使肿瘤细胞实现免疫逃避。

[关键词] 肿瘤干细胞; 乙醛脱氢同工酶1; 免疫抑制; 细胞分选

T cell immunoregulatory properties of ALDH1 positive cancer stem-like cells derived from carcinoma cell lines of the head and neck HU Weiming, REN Dingyuan, ZHAO yong. Department of ENT, Zhejiang Provincial Peoples' Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the T cell immunoregulatory characteristics of ALDH1 positive cancer stem-like cells derived from carcinoma cell lines of the head and neck. **Methods** Head and neck cancer cell lines (UMSCC-9, UMSCC-11B and UMSCC-47) were cultured, and then the effects of ALDH1 positive cells and ALDH1 negative cells derived from head and neck cancer stem cells on the proliferation, activation, apoptosis and other related functions of pre-activated T cells were analyzed and compared by PCR and flow cytometry. **Results** Compared with ALDH1 negative cells, head and neck cancer cells cultured by ALDH1 positive cells had stronger characteristics of cancer stem cells. ALDH1 positive cells from head and neck cancer cell lines (UMSCC-9, UMSCC-11B and UMSCC-47) had significantly higher inhibition efficiency on T cell proliferation than ALDH1 negative cells. The cytokines IFN- γ , IL-2, TNF- α , CD69, CD137 and CD154 of T cells co-cultured with ALDH1 positive cells were significantly lower than those of ALDH1 negative cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with ALDH1 negative cells, ALDH1 positive cells have stronger inhibitory effect on T lymphocyte immune function. Tumor stem cells play a leading role in the complex interaction of host immune response, and ultimately make tumor cells achieve immune escape.

[Key words] cancer stem cell; ALDH1; immunosuppression; cell sorting

目前,头颈部肿瘤是世界上第六大常见肿瘤,

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.01.004

作者单位:310014 浙江杭州,浙江省人民医院、杭州医学院附属人民医院耳鼻咽喉头颈外科(胡未鸣),超声科(任定远);杭州市西溪医院耳鼻咽喉头颈外科(赵勇)

通讯作者:任定远,Email:huwm93@163.com

每年新增约600 000病例。局部复发和远处转移在头颈部肿瘤患者中十分常见并成为患者死亡的主要原因^[1]。肿瘤干细胞是恶性肿瘤细胞中对肿瘤的起源、生长、分化、转移、复发以及治疗逃逸起着重要作用的一类肿瘤细胞^[2,3]。越来越多的研究表明肿瘤干细胞可能优先通过免疫逃避以及免疫调节功

能来激发和维持肿瘤生长以及疾病进展^[4]。最近也有研究指出宿主的免疫耐受与肿瘤的进展存在负相关,这提示即使对于免疫功能完备的个体,肿瘤干细胞很有可能是拥有表型以及功能上特征的细胞,以此来躲避宿主的免疫监视以及免疫介导的对肿瘤细胞的排斥反应^[5]。

乙醛脱氢同工酶1(aldehyde dehydrogenase1, ALDH1)是在人体内表达的一种胞质净化同工酶,它可以氧化细胞内的乙醛,并对于早期干细胞分化过程中视黄醇以及视黄酸的氧化起作用^[6]。最近有研究表明 ALDH1 是头颈肿瘤干细胞表面的特殊标志物,并且它在头颈肿瘤干细胞的自我更新以及维持其致癌性中都起着极其重要的作用^[7,8]。本次研究采用 Aldefluor 试验法以及荧光活化细胞分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)从三种人类头颈肿瘤细胞系中分选出 ALDH1 阳性细胞和 ALDH1 阴性细胞,并且对两者的免疫特性进行比较。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞系和细胞培养 头颈部肿瘤细胞系 UM-SCC-9、UMSCC-11B 和 UMSCC-47 来自美国细胞培养中心。培养环境:37℃、5%CO₂、饱和湿度的孵育箱。人体外周血单核细胞由健康志愿者捐赠并采用聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离得到,并置于 Quantum 263 培养液中培养。本次研究时间为 2016 年 5 月至 2017 年 12 月。

1.2 Aldefluor 试验和细胞分选 根据试剂盒说明书指导,通过 Aldefluor Assay Kit (由加拿大 Stem-Cell Technologies 生产)与人体 ALDH1 的特殊相互作用的原理来最优化分选头颈部肿瘤细胞系的 3 个干细胞系^[9]。然后采用 Aria cell sorter 分选机(由美国 Becton Dickenson 生产)进行分选。在 24 h 以及 6 d 之后,分别通过 BD-FACS Callibur 流式细胞仪(由美国 Becton Dickenson 生产)对分离的细胞进行 ALDH1 表达检测。同时使用二乙基氨基偶氮苯处理过的同条件细胞作为阴性对照。

1.3 人体外周血单核细胞和肿瘤细胞共培养 使用 24 孔直径 0.4 μm 微孔膜的 Transwell 盘(由美国 Corning 公司生产)来进行双腔对照试验。分选出来的 ALDH1 阳性和阴性细胞在下层的腔内培养,人体外周血单核细胞和肿瘤细胞以 5:1 的比率在上层的腔内培养。人体外周血单核细胞与分选的 ALDH1 阳性或阴性细胞共培养 6 d。然后以 50 μl 流式细胞仪缓冲液中 5×10⁴ 细胞数的密度进行进一步流式细胞术。

阳性结果的细胞数百分比=总的抗体阳性染色的细胞百分比-荧光细胞的百分比

1.4 流式细胞仪分析 人体外周血单核细胞与分选的 ALDH1 阳性或阴性细胞共培养 6 d 后的样本在 4℃ 黑暗中保存 30 min,然后将染色的细胞通过流式细胞仪缓冲液冲洗 2 次后再次置入 100 μl 流式细胞仪缓冲液重悬以进行流式细胞计数,通过 FACS Calibur 和 BD CellQuest Pro 分析软件分析结果,具体分析指标为细胞因子干扰素 γ(interferon γ, IFN-γ)、白介素 2(interleukin 2, IL-2)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α) 和活化因子 CD69、CD137、CD154 等。

1.5 实时定量 PCR 及免疫印迹分析 所有的 RNA 都是通过 TRIzol 试剂(由美国 Invitrogen 公司生产)提取,并采用 NanoDrop 测定 RNA 浓度及纯度,然后逆转录生成 cDNA(由德国 Qiagen 公司生产)。采用 RT-qPCR 及免疫印迹试剂盒行相关实验检测转录因子 Sox2、Oct4 和 Nanog; 数据使用改良性 2^{-ΔΔCt} 值的方法进行统计学分析。蛋白质的主要提取物(20 μg)采用免疫印迹分析^[10]。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件进行分析。计量数据采用均数描述,组间差异采用 *t* 检验。设 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 头颈肿瘤细胞来源的 ALDH1 阳性细胞的干性特征

2.1.1 头颈肿瘤细胞系的 ALDH1 阳性与 ALDH1 阴性细胞的特性展示(以 UMSCC-9 为例)见封三图 1

由封三图 1 可见,UMSCC-9 细胞系的 ALDH1 阳性细胞比 ALDH1 阴性细胞能形成更具有干细胞特性的球状细胞。

2.1.2 头颈肿瘤细胞系分选出的 ALDH1 阳性和 ALDH1 阴性细胞的 Sox2、Nanog 和 Oct4 的 mRNA 表达见图 2

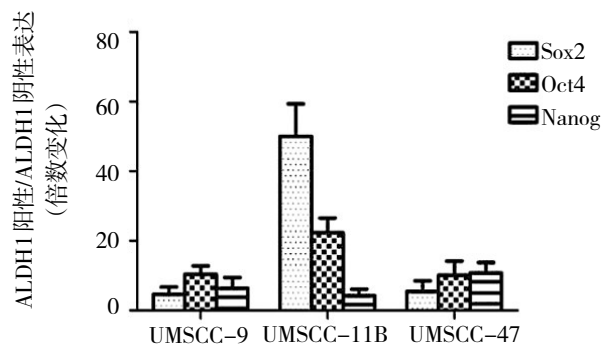


图 2 头颈肿瘤细胞系分选出的 ALDH1 阳性和 ALDH1 阴性细胞的 Sox2、Nanog 和 Oct4 的 mRNA 相对表达

由图2可见, Sox2、Nanog 和 Oct4 在 UMSSC-9、UMSSC-11B 和 UMSSC-47 的 ALDH1 阳性和 ALDH1 阴性细胞中的具体表达用倍数表示, 倍数变化0以上说明效率为正, 即 ALDH1 阳性细胞比 ALDH1 阴性细胞克隆效率高。

2.1.3 头颈肿瘤细胞系分选出的 ALDH1 阳性和 ALDH1 阴性细胞的 Sox2、Nanog 和 Oct4 的蛋白质表达水平见图3

由图3可见, 来自 UMSSC-9、UMSSC-11B 和 UMSSC-47 的 ALDH1 阳性细胞的3种代表性转录因子 Sox2、Nanog 和 Oct4 的蛋白质水平明显更高。

2.2 来自头颈肿瘤细胞系的 ALDH1 阳性细胞对 T 细胞增殖和免疫功能的阻断作用

2.2.1 ALDH1 阳性细胞与 ALDH1 阴性细胞对 T 细

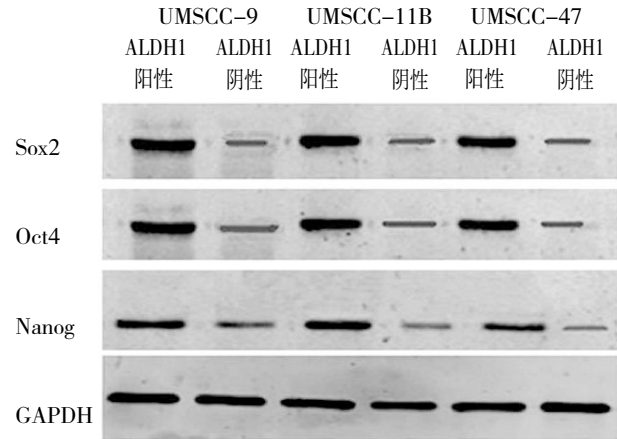


图3 头颈肿瘤细胞系分选出的 ALDH1 阳性和 ALDH1 阴性细胞的 Sox2、Nanog 和 Oct4 的蛋白质表达水平

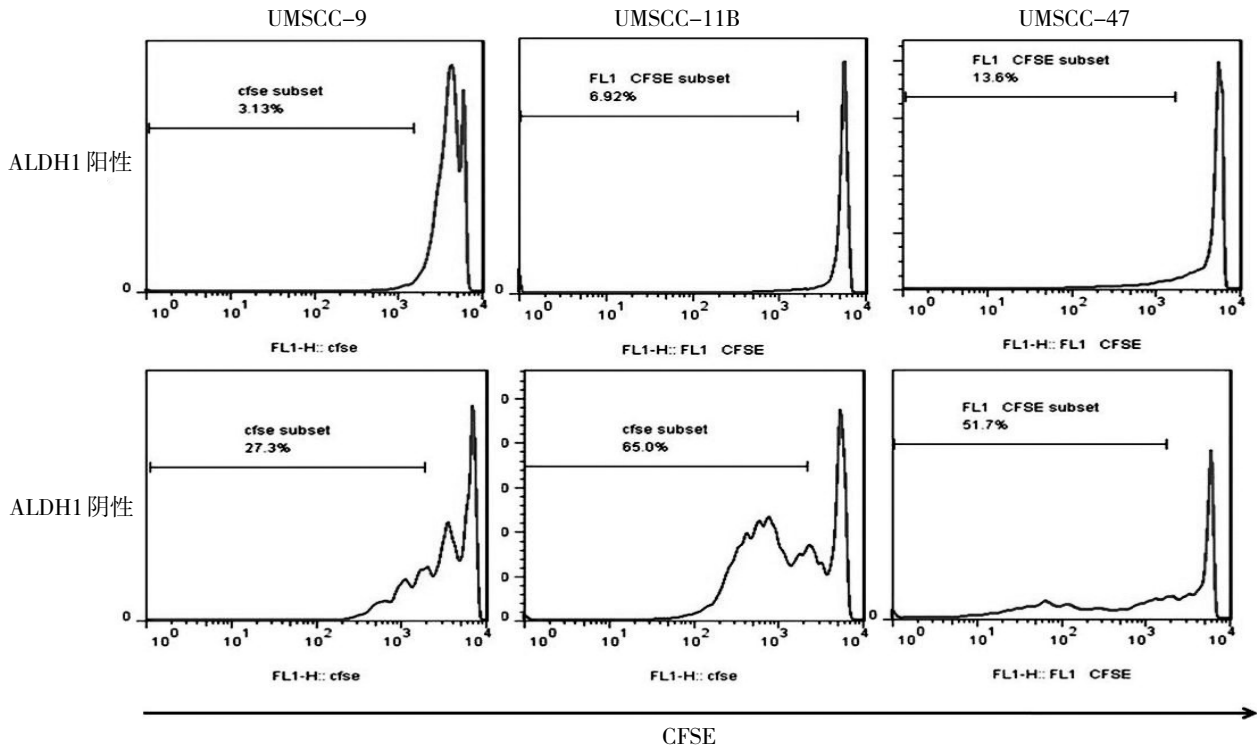


图4 ALDH1 阳性细胞与 ALDH1 阴性细胞对 T 细胞扩增率

由图4可见, 来自 UMSSC-9、UMSSC-11B 和 UMSSC-47 的 ALDH1 阳性细胞对 T 细胞的扩增率明显低于 ALDH1 阴性细胞, 即 ALDH1 阳性细胞对 T 细胞增殖抑制效率明显高于 ALDH1 阴性细胞(t 分别=2.65、3.03、2.34, P 均 <0.05)。

2.2.2 头颈部肿瘤干细胞系对于活化因子的抑制作用见图5

由图5可见, 与来自 UMSSC-9、UMSSC-11B 和 UMSSC-47 的 ALDH1 阴性细胞共培养的 T 细胞中的活化因子 CD69、CD137、CD154 的表达比较, ALDH1 阳性细胞共培养的 T 细胞中的 CD69、CD137、

CD154 明显下降(t 分别= 2.69、2.92、3.43; 5.75、4.82、3.95; 8.06、3.50、3.75, P 均 <0.05)。

2.2.3 头颈部肿瘤干细胞系对于细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 表达的抑制作用见图6

由图6可见, 与来自 UMSSC-9、UMSSC-11B 和 UMSSC-47 的 ALDH1 阴性细胞共培养的 T 细胞中的细胞因子 IFN- γ 、IL-2、TNF- α 的表达比较, ALDH1 阳性细胞共培养的 T 细胞中的细胞因子 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 明显下降, 差异均有统计学意义(t 分别=4.59、4.70、3.98; 3.30、4.76、3.89; 3.17、3.05、3.43, P 均 <0.05)。

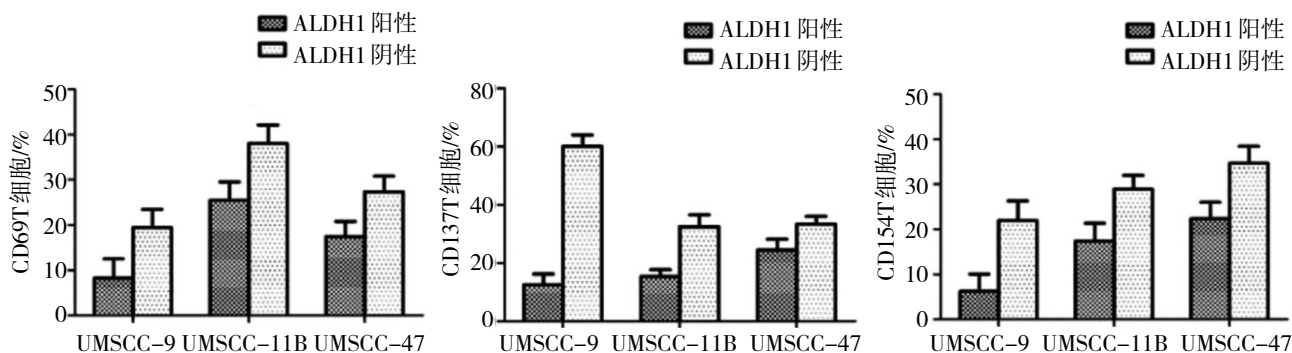


图5 头颈部肿瘤干细胞系对于活化因子的抑制作用

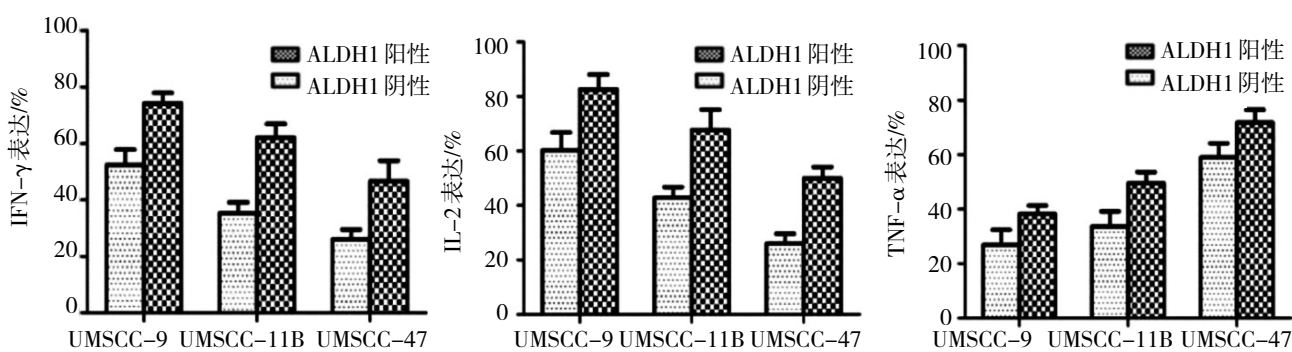


图6 头颈部肿瘤干细胞系对于细胞因子IFN-γ、IL-2、TNF-α表达的抑制作用

3 讨论

来自头颈肿瘤细胞丰富的肿瘤干细胞表型的免疫学特征尚未被准确定义,查阅国内外文献,本次研究也是对调控很多关键免疫反应的特征性的头颈肿瘤干细胞的首次研究。

肿瘤干细胞拥有将肿瘤从一个单细胞扩增、转移、复发的能力,因此可以根据它的特性将肿瘤细胞和不同的体细胞区分,比如永生、潜伏、侵袭的特征导致了肿瘤的转移和治疗后复发。ALDH1最近被证实是区分头颈肿瘤干细胞以及其他上皮肿瘤干细胞的合适标记^[11-14]。另外,对于同属于上皮肿瘤细胞的宫颈癌细胞,Chen等^[14]证实了使用10⁵ALDH1阳性细胞,进行大鼠细胞种植,2周后导致了可视的肿瘤形成,在所有的实验中作为对照的ALDH1阴性细胞未导致肿瘤形成。肿瘤与正常干细胞共享了维持自我更新的增殖物质以及关键的转录因子。作为人体胚胎干细胞多能性和共同维持自我更新及多样性调节通路的核心调控因子Oct3/4、Sox2和Nanog,在头颈肿瘤细胞来源的ALDH1阳性细胞中明显上调。

相比于正常的已分化细胞,胚胎与肿瘤干细胞在细胞分裂过程中更多的处于静止期^[15]:多停留在G0期,因此对于依赖细胞周期的治疗具有更高的抵

抗力。Chen等^[14]发现球状头颈部鳞状上皮肿瘤细胞比同源的单层细胞包含更高的静止状态细胞,具有更高的干细胞特性。

肿瘤与肿瘤微环境的的相互作用及其对于免疫系统的抑制作用也是对于今后的肿瘤免疫疗法的一种挑战与机遇。许多肿瘤干细胞中的免疫抑制物质在一些肿瘤类型中已被确认。比如,Chikamatsu等^[16]报道了相比于CD44-细胞,头颈部鳞状上皮肿瘤的CD44+类干细胞表达出更强的对于抗CD3/CD28 mAb活化的T细胞增殖抑制作用。Tommaso等^[17]报道了来自健康志愿者的异体胶质母细胞的多形肿瘤干细胞可以一直抑制T细胞的有丝分裂,而与他们同样条件下使用FBS培养的非肿瘤干细胞却无此作用。本次研究结果证实了头颈肿瘤细胞来源的ALDH1阳性细胞比ALDH1阴性细胞持续地表现出对T细胞增殖更强的抑制作用。此外对于T细胞活化,ALDH1阳性细胞对比ALDH1阴性细胞抑制CD69、CD137、CD154的表达,这些被认为是T细胞活化的标志因子。本次研究进一步研究了ALDH1阳性细胞对于细胞因子产生的阻止作用,结果发现ALDH1阳性细胞在预激活T细胞中对CD3/CD28介导生成IFN-γ、IL-2和TNF-α有更强的抑制作用。这些结果表明来自头颈肿瘤细胞的AL-

DH1 阳性细胞相比 ALDH1 阴性细胞对 T 细胞增殖、活化和细胞因子的产生都有更强的免疫抑制作用。

肿瘤干细胞呈现更高的致癌性和转移率,这是由于他们产生了更多相关细胞因子和化学因子,这些因子通过自分泌或者旁分泌化学物质刺激肿瘤细胞的增殖,基质细胞的转移和增殖来形成支持肿瘤生长的血管网^[18]。

综上所述,UMSCC-9、UMSCC-11B 和 UMSCC-47 的头颈肿瘤细胞系的 ALDH1 阳性细胞群进行了一系列免疫抑制活动来躲避免疫系统的攻击。因此,以肿瘤干细胞为靶点,来进行抗肿瘤干细胞驱动的免疫抑制和免疫逃避的治疗具有现实的科学背景且具有重大的前瞻意义。

参考文献

- Sun Z, Hu W, Xu J, et al. MicroRNA-34a regulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype of head and neck squamous cell carcinoma in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(4):1339.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. *P Natl Acad Sci*, 2003, 100(7):3983-3988.
- Yu F, Deng H, Yao H, et al. Mir-30 reduction maintains self-renewal and inhibits apoptosis in breast tumor-initiating cells[J]. *Oncogene*, 2010, 29(29):4194-4204.
- Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1):41.
- Schatton T, Frank MH. Antitumor immunity and cancer stem cells[J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2009, 1176(1):154-169.
- Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, et al. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(9):1378-1384.
- Qian X. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(7):1151-1158.
- Hu W, Lin J. LSPb1 inhibits the proliferation of laryngeal squamous cell cancer and neonatal vessels via HMGB1/NF- κ B pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2016, 12(3):133-140.
- Inestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5):555-567.
- Williams A, Collard T, Paraskeva C. An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: Implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis[J]. *Oncogene*, 1999, 18(21):3199-3204.
- Silva IA, Bai S, McLean K, et al. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11):3991-4001.
- Wang Y, Zhe H, Gao P, et al. Cancer stem cell marker ALDH1 expression is associated with lymph node metastasis and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma: a study from high incidence area of northern China[J]. *Dis Esophagus*, 2012, 25(6):560-565.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-Positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(1):45-55.
- Chen HZ, Wang LJ, Lu HW, et al. Expression and functional role of ALDH1 in cervical carcinoma cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(4):1325-1331.
- Roig AI, Wright WE, Shay JW. Is telomerase a novel target for metastatic colon cancer? [J]. *Curr Color Cancer Rep*, 2009, 5(4):203-208.
- Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, et al. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Head Neck*, 2011, 33(2):208-215.
- Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3):800-813.
- Levina V, Marrangoni AM, DeMarco R, et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties[J]. *PloS one*, 2008, 3(8):e3077.

(收稿日期 2017-12-30)

(本文编辑 蔡华波)