

文章编号:1000-5404(2013)09-0901-04

论著

膀胱肿瘤患者外周血源性树突状细胞表型及免疫功能变化

刘 星,梁 平,周 波,张克勤,靳风烁,李彦锋 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科)

[摘要] **目的** 探讨膀胱肿瘤患者外周血源性树突状细胞(dendritic cells, DCs)的表型及免疫功能变化。**方法** 通过密度梯度离心法从膀胱肿瘤患者和正常人外周血分离单个核细胞,加 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导培养树突状细胞,采用流式细胞仪检测 2 组 DCs 表达程序性死亡配体-1(PD-L1)、CD1a、HLA 和 CD83 的变化,混合淋巴细胞反应检测其刺激 T 淋巴细胞增殖能力和 ELISA 法检测分泌 IL-10 和 IL-12 的变化。**结果** 膀胱肿瘤患者外周血 DCs 表达 PD-L1 $[(95.06 \pm 4.06)\% \text{ vs } (76.63 \pm 6.90)\%]$ 和分泌 IL-10 $[(214.00 \pm 13.75) \text{ pg/mL vs } (83.78 \pm 7.95) \text{ pg/mL}]$ 的水平显著高于正常组 ($P < 0.05$), DCs 表达 CD83 $[(16.20 \pm 1.91)\% \text{ vs } (35.53 \pm 1.58)\%]$ 及刺激淋巴细胞增殖的能力均低于正常组水平 ($P < 0.05$)。**结论** 膀胱肿瘤患者外周血源性树突状细胞高表达 PD-L1、低表达 CD83 及过多分泌 IL-10 可能是膀胱肿瘤发生免疫逃逸的原因之一。

[关键词] 膀胱肿瘤;树突状细胞;PD-L1

[中图分类号] R329.24;R392.2;R737.14

[文献标志码] A

Phenotype and metergasis of dendritic cells from peripheral blood of bladder carcinoma patients

Liu Xing, Liang Ping, Zhou Bo, Zhang Keqin, Jin Fengshuo, Li Yanfeng (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the phenotype and metergasis of dendritic cells (DCs) in peripheral blood of patients with bladder carcinoma. **Methods** DCs were isolated from the peripheral blood of patients with bladder carcinoma and healthy subjects by density gradient centrifugation, respectively, and then the 2 groups of DCs were cultured *in vitro* with rhGM-CSF and rhIL-4 induction. The expression levels of PD-L1, CD1a, HLA and CD83 on the DCs were detected by flow cytometry, and the proliferation of lymphoid cells stimulated by the 2 groups of DCs were tested by mixed lymphocyte reaction. ELISA was used to measured the levels of IL-10 and IL-12 secreted by the 2 groups of DCs. **Results** The expression level of PD-L1 $[(95.06 \pm 4.06)\% \text{ vs } (76.63 \pm 6.90)\%]$ and the content of IL-10 secreted by DCs $(214.00 \pm 13.75 \text{ vs } 83.78 \pm 7.95 \text{ pg/mL})$ were significantly higher in the bladder carcinoma patients than in the normal control, whereas, CD83 expression level was significantly reduced $[(16.20 \pm 1.91)\% \text{ vs } (35.53 \pm 1.58)\%, P < 0.05]$. Moreover, the proliferation of lymphoid cells stimulated with DCs was decreased in patient group than in healthy subject group. **Conclusion** Bladder carcinoma patients' DCs have a phenotype of over-expressing PD-L1, over-secreting IL-10 and down-expressing CD83. The changed phenotype may be one of possible mechanisms of immune evasion of the tumor.

[Key words] bladder carcinoma; dendritic cells; PD-L1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072089). Corresponding author: Li Yanfeng, E-mail: E-mail: lyf1000@yahoo.com

膀胱肿瘤是泌尿系常见恶性肿瘤,其术后高复发率已成为泌尿外科亟待解决的难题,免疫逃避是导致其复发的重要机制之一。树突状细胞是已知的体内抗

原递呈能力最强的专职抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC),能有效激活相关特异性细胞免疫反应和体液免疫反应,在肿瘤防治、免疫、器官移植等领域日益受到重视^[1]。研究表明,树突状细胞(dendritic cells, DCs)的免疫功能变化与其表面受体的表达和分化阶段有关^[2]。活化的 T 细胞在对膀胱肿瘤细胞的免疫识别、抑制和杀伤中起着关键作用;共刺激分子提

[基金项目] 国家自然科学基金(81072089)

[通信作者] 李彦锋, E-mail: lyf1000@yahoo.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130115.1727.005.html> (2013-01-15)

供的协同刺激信号作为双信号系统之一则是T细胞活化的前提^[3]。Chen等^[4]发现PD-L1作为B7家族的负性共刺激分子,能与程序性死亡分子(PD-1)结合成PD-L1/PD-1,负向调节T细胞受体(TCR)介导的信号转导和细胞因子的产生,导致T细胞功能的瘫痪。研究发现,PD-L1在肺癌、肝癌、胃癌、肾癌等多种肿瘤组织中过度表达,可能与肿瘤生物学行为密切相关^[5]。本实验通过检测膀胱肿瘤患者外周血源性DCs表达PD-L1、CD1a、HLA、CD83及其免疫功能的变化,探讨其与膀胱肿瘤发生免疫逃逸的关系。

1 资料与方法

1.1 病例选择

我院2011年11月至2012年9月,通过CT及病理检查确诊为膀胱高分级尿路上皮癌患者16例(肿瘤组),包括男性15例,女性1例,年龄42~68岁,平均52.86岁,未接受过任何手术和抗肿瘤治疗。对照组为同期无任何免疫性疾病的健康体检者14例,包括男性10例,女性4例,年龄28~48岁,平均34.28岁。受试者签署知情同意书,研究获医院伦理委员会的审批。

1.2 主要试剂

RPMI1640、青霉素-链霉素(P-S)双抗(Gibco公司),胎牛血清(Hyclone公司),Ficoll人淋巴细胞分离液(天津TBD公司),重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、白细胞介素-4(IL-4)、LPS粉剂(Peptrotech公司),PE标记小鼠抗人PD-L1、CD83与HLA-DR、FITC标记CD1a(Bioscience公司),IL-12和IL-10 ELISA检测试剂盒(北京四柏正公司)。

1.3 DCs的体外培养和鉴定

1.3.1 外周血源性DCs的体外培养 相同条件下肝素抗凝管采集正常人和膀胱肿瘤患者外周血20 mL,用密度梯度离心法分离获得贴壁生长的单个核细胞;加入1 mL含10% FBS的RPMI1640,添加rhGM-CSF、rhIL-4,使其终浓度分别为100、50 ng/mL;37℃、5% CO₂孵箱中培养;每隔60小时半量换液1次,换入含新鲜细胞因子的新鲜培养基,定期观察细胞生长情况及形态变化。第7天收集DCs进行流式检测和混合淋巴细胞反应;收集上清-70℃保存,留做EILSA检测。

1.3.2 外周血源性DCs的形态鉴定 倒置相差显微镜下观察和拍摄不同培养阶段DCs形态。收集第7天DCs培养悬液,吸入到10 mL离心管,添加入8 mL PBS稀释、混匀;600 r/min,离心8 min,重复洗涤2次后弃上清,保留少量液体冲散、混匀沉淀细胞;滴加到用赖氨酸处理过的玻片上,静置沉降30 min;4%戊二醛固定30 min后,行清洗、再固定脱水、置换、干燥镀膜等;扫描电镜下观察、拍摄照片。

1.3.3 树突状细胞表型分析 收集第7天肿瘤组及正常组DCs(2×10⁵个/管),加入荧光标记的鼠抗人PD-L1单克隆抗体、鼠抗人CD1a单克隆抗体、鼠抗人CD83单克隆抗体、鼠抗人HLA-DR单克隆抗体及相应同型对照,孵育30 min, PBS清洗2遍后,流式细胞仪检测。用Flow Jo软件分析数据。

1.4 淋巴细胞增殖能力检测

另收集外周血20 mL,分离获得T淋巴细胞,调整浓度为3×10⁶/mL(作为反应细胞);收获各组第7天DCs用25 μg/mL丝裂霉素去增殖,调整浓度3×10⁵/mL(作为刺激细胞),以50 μL/孔悬液加入96孔板中,每组设3个复孔;添加培养基使各孔终体积均为200 μL,混匀后放入37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中培养96 h。每孔加入CCK8约20 μL,继续培养约3 h;上酶标仪检测(测定波长为450 nm)。增殖指数(proliferation indices)PI=肿瘤组D(450)/空白组D(450)值。

1.5 ELISA检测DCs上清分泌IL-12和IL-10的情况

具体操作步骤按说明书进行,显色后15 min内用酶标仪检测D(450)值。最后样品D(450)值=测得D(450)值-空白孔D(450)值,根据标准曲线求出最后的分泌值。

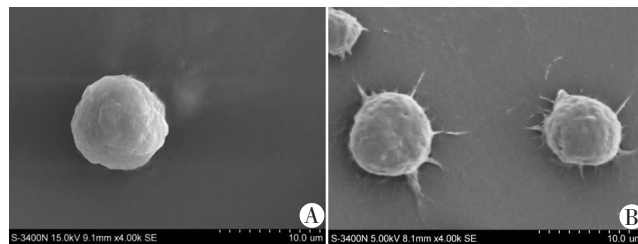
1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.00统计软件进行配对t检验分析变量间的差异性。

2 结果

2.1 膀胱肿瘤DCs的形态观察

显微镜下观察:分散贴壁的单个核细胞诱导培养第2天后,细胞形态变得不规则,少量细胞开始聚集成簇,半悬浮生长。培养第4天可见悬浮细胞团数量增多,细胞体积增大,呈棒槌状,细胞周边可见毛刺状突起。培养第7天,细胞团开始散开,细胞体呈圆球形,均有较长的毛刺状突起,为典型DCs(图1)。肿瘤组与正常组DCs比较形态无明显区别。



A:未成熟DCs;B:成熟DCs

图1 扫描电镜观察DCs形态(×4000)

2.2 DCs表型分析

通过rhGM-CSF、rhIL-4在体外诱导膀胱癌患者和正常人外周血源性DCs,流式细胞仪检测发现:两者表达CD1a和HLA无明显差异[(90.04±5.06)% vs (85.65±4.81)%,(73.63±3.05)% vs (68.31±5.90)%],从表型上证明所培养细胞为DCs。肿瘤组DCs表达PD-L1显著高于正常组[(95.06±4.06)% vs (76.63±6.90)%],差异有统计学意义(P<0.05),但CD83表达明显低于正常组[(16.20±1.91)% vs (35.53±1.58)%],差异有统计学意义(P<0.05)。说明肿瘤组DCs在成熟度上不如正常组,并且高表达负性共刺激因子PD-L1。

2.3 混合淋巴细胞反应

成熟DCs有较强的刺激T淋巴细胞增殖的能力,MTT法检测两组DCs对T细胞增殖反应的结果提示:正常组PI值高于

肿瘤组 $[(2.14 \pm 0.70) vs (1.50 \pm 0.45)]$, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明正常人外周血 DCs 与膀胱肿瘤患者外周血 DCs 相比有较强的刺激淋巴细胞增殖的能力。

2.4 ELISA 法检测 IL-10 和 IL-12 的分泌

肿瘤组 DCs 分泌 IL-10 量与正常组比较 $[(214.00 \pm 13.75) pg/mL vs (83.78 \pm 7.95) pg/mL]$, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 2 组分泌 IL-12 的量 $[(44.79 \pm 5.51) pg/mL vs (37.17 \pm 3.72) pg/mL]$, 差异无统计学意义($P = 0.26$)。说明膀胱肿瘤外周血源性 DCs 与正常人 DCs 相比, 分泌负性细胞因子 IL-10 能力更强。

3 讨论

膀胱肿瘤是我国最常见的泌尿系恶性肿瘤, 即使近年来荧光膀胱镜下膀胱肿瘤切除术率的提高, 但其术后高复发率的难题仍未得到有效控制, 究其原因可能与免疫逃逸的发生相关。随着免疫治疗在肿瘤防治领域研究的深入, 大多数学者将目光聚焦到了人体内抗原递呈能力最强的 DCs 上。聂志林等^[6] 研究发现膀胱肿瘤组织中浸润 DCs 数目的下降可能是膀胱肿瘤发生免疫逃逸的原因之一。本实验在相同条件下检测膀胱肿瘤患者及正常对照组外周血源性 DCs 表面特异性抗原表达及其免疫功能变化, 进一步探讨 DCs 与膀胱肿瘤发生免疫逃逸的关系。研究表明, 与 DCs 功能相关的表面抗原 CD1a、HLA、CD83、PD-L1 等^[7]。Prechtel 等^[8] 研究发现 CD83 在 DCs 早期低表达甚至不表达, 当 DCs 成熟时才表达, 是 DCs 的成熟标志。在不同 DCs 分化成熟阶段和受不同外界微环境细胞因子(如 IL-10 等)的影响下, DCs 表面分化抗原表达和免疫功能也发生不同变化。本实验研究发现: 肿瘤组中 DCs 表达 CD83 水平明显低于正常组, 说明可能受膀胱肿瘤外周血微环境中某些因素的影响, 肿瘤组 DCs 多处于未成熟状态; 未成熟 DCs 的抗原递呈能力较弱, 这可能是膀胱肿瘤患者 DCs 无法有效激活免疫反应, 导致免疫逃逸的原因之一。

PD-L1 是近年发现的负性共刺激分子, 与受体 PD-1 结合后, 可抑制 T 细胞增殖并促进 DCs 分泌 IL-10, 诱导特异性抗原 T 细胞凋亡, 导致肿瘤细胞对机体的免疫逃逸^[12-13]。淋巴细胞增殖反应是 DCs 激活淋巴细胞并发挥免疫功能的表现; DCs 分泌不同的细胞因子则可诱导 Th0 细胞向不同的方向(Th1/Th2)分化, 决定后续免疫反应是向 Th1 型还是 Th2 型应答漂移, 代表性分子主要有 IL-12 和 IL-10^[9]。IL-12 是诱导 Th0 向 Th1 分化的关键因子, 能激发 NK、LAK 及 T 细胞的增殖、分化等, 起到正向调节免疫反应的作用^[10]。IL-10 致 Th2 分化, 是公认的免疫反应负调节因子, 可抑制 DC 的产生和分化成熟, 下调正性共刺激

分子的表达, 并可抑制 Th1 细胞的分化, 而 Th1 细胞是诱导淋巴细胞分泌 IFN- γ 、IL-12、IL-2、TNF 等肿瘤杀伤因子的主要功能细胞^[11]。本实验提示: 膀胱肿瘤患者血源性 DCs 高表达负性共刺激分子 PD-L1, 分泌高浓度 IL-10, 然而刺激 T 淋巴细胞增殖能力减弱。因此推论肿瘤组 DCs 高表达 PD-L1, 导致 DCs 表面正负性共刺激分子失调, 可能促进负性细胞因子 IL-10 的进一步分泌; 在微环境中存在高浓度的 IL-10 可能是阻碍其 DCs 发育成熟, 诱导免疫应答向 Th2 型分化, 抑制 DCs 有效发挥其抗原递呈功能, 刺激 T 淋巴细胞增殖的原因之一。Brown 等^[14] 曾用 PD-L1 单抗阻断 IL-10 预处理 DCs 的 PD-L1 通路后, DCs 的刺激淋巴增殖能力显著增强, 从侧面也支持本实验的结论。膀胱肿瘤患者发生免疫逃逸的原因除了其自身的抗原性很弱, 可以通过抗原调变等途径逃避免疫系统的监视外^[15], 另一个重要原因就是肿瘤患者 DCs 免疫功能缺陷。此外, 在部分膀胱肿瘤患者中发现其复发肿瘤已不在原来位置, 提示膀胱肿瘤的复发机制除了免疫逃逸外, 可能与肿瘤多生发中心灶的形成有关; 生发中心是在 T 细胞依赖性抗体应答过程中于外周组织内形成的特殊结构, 滤泡树突细胞在生发中心反应的形成中也起着重要作用, 但是机制尚未完全明确, 所以可进一步着手血性转移复发患者的 DCs 功能变化及多生发中心灶的研究, 多角度探索膀胱肿瘤的复发机制。

综上所述, 膀胱肿瘤患者外周血源性 DCs 高表达表面受体 PD-L1, 使其在微环境分泌过多的 IL-10, 可能是导致膀胱肿瘤患者 DCs 发育成熟缺陷, 最终导致 DCs 免疫抗原递呈能力降低、发生免疫逃逸的原因之一。随着 DCs 体外诱导扩增技术、分子生物学和基因工程技术在 DCs 疫苗构建方面的应用, 构建能在患者体内建立肿瘤特异性、持久性的免疫反应的 DCs 疫苗有望成为肿瘤免疫治疗的一种有效方式^[16-17]。结合本实验结论, 可考虑从膀胱肿瘤高表达负性共刺激分子 PD-L1 出发, 通过封闭表面 PD-L1 抗原受体或 siRNA 干扰等技术阻断 PD-L1 在 DCs 的表达, 为探索构建新型的预防膀胱肿瘤复发的 DCs 疫苗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Schnurr M, Chen Q, Shin A, *et al.* Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery[J]. *Blood*, 2005, 105(6): 2465-2472.
- [2] Honda K, Yanai H, Negishi H, *et al.* IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses[J]. *Nature*, 2005, 434(7034): 772-777.
- [3] Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2010, 134(1/2): 33-38.
- [4] Chen Y, Liu P, Gao F, *et al.* A dimeric structure of PD-L1: function-

al units or evolutionary relics[J]. *Protein Cell*, 2010, 1(2): 153-160.

[5] Inman B A, Sebo T J, Frigola X, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata; associations with localized stage progression[J]. *Cancer*, 2007, 109(8): 1499-1505.

[6] 聂志林, 靳风烁, 王洛夫, 等. 树突状细胞在膀胱癌中的浸润及其意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(14): 1365-1367.

[7] Figdor C G, de-Vries I J, Lesterhuis W J, et al. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way[J]. *Nat Med*, 2008, 10(5): 475-480.

[8] Prechtel A T, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells[J]. *Arch Dermatol Res*, 2007, 299(2): 59-69.

[9] Choi Y K, Kim Y J, Park H S, et al. Suppression of glomerulosclerosis by adenovirus-mediated IL-10 expression in the kidney[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(7): 559-568.

[10] Kim H K, Guan H, Zu G, et al. High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 79(4): 686-669.

[11] 兰卫华, 王洛夫, 张尧, 等. 环氧化酶2抑制剂对卡介苗感染的人脐血源性树突状细胞分泌的 Th1/Th2 细胞因子水平的影响

[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2011, 26(5): 385-388.

[12] Weiss J M, Subleski J J, Wigginton J M, et al. Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(11): 1705-1721.

[13] Tai N, Yasuda H, Xiang Y, et al. IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice[J]. *Clin Immunol*, 2011, 139(3): 336-349.

[14] Brown J A, Dorfman D M, Ma F R, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production[J]. *J Immunol*, 2003, 170(3): 1257-1266.

[15] Gabrilovich D I, Ciernik I F, Carbone D P. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts[J]. *Cell Immunol*, 1996, 170(1): 101-110.

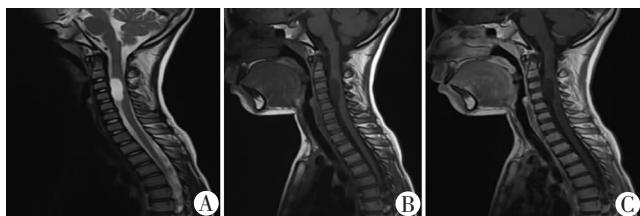
[16] Bray S M, Vujanovic L, Butterfield L H. Dendritic cell-based vaccines positively impact natural killer and regulatory T cells in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 249281.

[17] Draube A, Klein-Gonzalez N, von-Bergwelt-Baildon M. Proving the principle: dendritic cell-based vaccines in urogenital cancers[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2011, 10(10): 1355-1357.

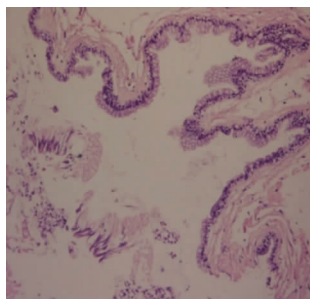
(收稿:2012-11-27;修回:2012-12-29)

(编辑 龙亮)

(上接 891 页)



A: T₂ WI 矢状位; B: T₁ WI 矢状位; C: Gd-增强扫描
图1 颈椎椎管内肠源性囊肿患者颈椎MRI表现



囊肿壁内衬单层柱状上皮细胞, 细胞质顶部见分泌上皮外组织轻度水肿
图2 颈椎椎管内肠源性囊肿患者颈部囊肿组织病理学观察 (HE ×200)

羊膜与卵黄囊之间起临时连接作用的结构), 常伴有脊柱、消化道、呼吸道的畸形。1999年WHO中枢神经系统肿瘤组织学分类将其定义为: 囊肿内壁衬有类似胃肠道上皮及能分泌黏液的上皮组织^[1-2]。临床上发病率较低, 多见于男性儿童, 男女比为2:1~3:1; 以颈段和上胸段椎管内脊髓腹侧硬脊膜下好发^[3]。临床表现主要为脊髓受压的神经系统症状。MRI多表现为脊髓腹侧髓外硬膜下的长T₁长T₂的囊状病灶, 部分病灶嵌入脊髓内。有研究者认为“脊髓嵌入征”(病灶不同程度向

脊髓中央嵌入而形成)是MR诊断肠源性囊肿的重要征象^[4-5], Gd-增强扫描无强化。本例肠源性囊肿病灶增强扫描部分囊壁可见点线样强化。这与以上特征不符, 有学者提出其强化机制可能与囊壁成分有关^[6-7]。肠源性囊肿主要与囊性神经源性肿瘤鉴别, 囊性神经源性肿瘤以胸段多见, 病灶大多可见实性成分和囊壁, 增强扫描实性成分和囊壁可强化, 病变主要沿神经根走行生长, 以此作鉴别^[8]。本病一经确诊, 应立即行手术切除治疗。本例患者年轻, 术后临床症状消失, 近期恢复良好, 远期预后还得进行随访以观察。

参考文献:

[1] 张嘉, 王振宇, 刘彬. 脊髓肠源性囊肿的诊断和治疗[J]. *中国微创外科杂志*, 2009, 9(6): 569-572.

[2] 王琦, 王颖, 郭彦, 等. 椎管内肠源性囊肿的MR诊断[J]. *实用放射学杂志*, 2008, 24(6): 799-801.

[3] 周良辅. *现代神经外科学*[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004: 484-485.

[4] 魏新华, 戴建平, 高培毅, 等. 椎管内肠源性囊肿的MRI表现[J]. *中国医学影像技术*, 2006, 22(3): 395-397.

[5] 徐安辉, 王承缘, 夏黎明. 椎管内肠源性囊肿的MRI与临床诊断[J]. *临床放射学杂志*, 2006, 25(11): 1010-1012.

[6] 陈静, 张云亭, 李威, 等. 椎管内肠源性囊肿的MRI诊断与鉴别诊断[J]. *临床放射学杂志*, 2009, 28(2): 154-157.

[7] 李森, 王民, 刘威, 等. 中枢神经系统肠源性囊肿的MRI表现与诊断[J]. *医学影像学杂志*, 2009, 19(7): 820-822.

[8] Savage J J, Casey J N, McNeill I T, et al. Neurenteric cysts of the spine[J]. *J Craniovertebr Junction Spine*, 2010, 1(1): 58-63.

(收稿:2013-02-18;修回:2013-03-19)

(编辑 汪勤俭)