

论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0438-04

PD-1⁺肿瘤浸润性 CD8⁺T 淋巴细胞的表型鉴定及功能研究

李小红, 陈陵, 朱波 (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所)

[摘要] 目的 从肿瘤局部分离衰竭性 CD8⁺T 淋巴细胞(CD8⁺PD-1⁺T 细胞), 并对其功能进行研究, 初步探讨机体免疫系统无法有效杀伤和清除肿瘤的原因。方法 C57BL/6 小鼠皮下注射 Lewis 肺癌细胞株建立小鼠肿瘤模型。将肿瘤制成单细胞悬液后, 染细胞表面标志。采用流式细胞术从肿瘤局部分选 CD8⁺PD-1⁺T 淋巴细胞及 CD8⁺PD-1⁻T 淋巴细胞, 体外经非特异性刺激后行细胞内因子染色, 检测 IFN- γ 分泌能力。CFSE 细胞染色检测其增殖活性。结果 肿瘤局部成功分离得浸润性 CD8⁺T 淋巴细胞, 其中将近 80% 的细胞高表达衰竭表型 PD-1⁺。CFSE 结果显示 CD8⁺PD-1⁺T 细胞较 CD8⁺PD-1⁻T 细胞增殖活性明显下降; 细胞内因子染色后流式细胞术检测结果显示肿瘤局部 CD8⁺PD-1⁺T 细胞较 CD8⁺PD-1⁻T 细胞 IFN- γ 分泌能力降低约 50%。结论 肿瘤局部存在一群免疫衰竭性 T 细胞, 可能参与了肿瘤的免疫逃逸。

[关键词] 肿瘤; T 淋巴细胞; PD-1

[中图分类号] R392.12; R73-35; R730.3

[文献标志码] A

Identification of tumor-infiltrating CD8⁺PD-1⁺T-lymphocytes in Lewis lung cancer

Li Xiaohong, Chen Ling, Zhu Bo (Center of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To identify the biological function of tumor-infiltrating CD8⁺PD-1⁺T-lymphocytes in Lewis lung cancer. **Methods** The implanted tumor model was established by subcutaneous injection of Lewis lung cancer cells into C57BL/6 mice. CD8⁺PD-1⁺T-lymphocytes and CD8⁺PD-1⁻T-lymphocytes were isolated from transplanted tumors by flow cytometry and labeled with CFSE to follow their proliferation. The IFN- γ level in isolated cells was analyzed by intracellular cytokine staining. **Results** CD8⁺T-lymphocytes existed in transplanted tumors. Some of those CD8⁺T-lymphocytes also expressed PD-1, which has been identified as a marker of exhausted T cells. In comparison with CD8⁺PD-1⁻T-lymphocytes, the proliferation rate of CD8⁺PD-1⁺T-lymphocytes significantly decreased and the IFN- γ secretion was suppressed. **Conclusion** The tumor-infiltrating CD8⁺T-lymphocytes that express PD-1 do not have normal function, which may be the reason for tumor-infiltrating lymphocytes not killing tumor cells effectively.

[Key words] tumor; T lymphocyte; PD-1

Corresponding author: Zhu Bo, E-mail: oncology_bozhu@yahoo.com.cn

机体 T 细胞免疫在控制肿瘤的发生、发展过程中起到了重要作用^[1-4]。其中肿瘤局部浸润性 CD8⁺T 淋巴细胞在机体抗肿瘤免疫应答中发挥了关键作用。近年来发现, 肿瘤患者体内存在免疫抑制机制^[5], 妨碍机体对肿瘤的清除, 导致肿瘤长期定植, 表现为 T 淋巴细胞功能障碍与增殖能力减弱^[6]。PD-1 已被公认为是衰竭性 T 淋巴细胞的表面标志^[7]。阻断 PD-1-PD-1L 通路可以部分恢复衰竭性 T 细胞的功能^[8-10]。为确认肿瘤局部是否存在衰竭性 T 淋巴细胞, 并进一步研究其功能特点, 揭示肿瘤在体内长期定植的原因, 本研究通过小鼠皮下注射 Lewis 肺癌细胞株, 建立了小鼠肿瘤模型; 从肿瘤局部分离得到 CD8⁺PD-1⁺T 细胞, 并对细胞自身特点与功能做了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

Lewis 肺癌细胞株(购自中国科学院上海细胞库)高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)培养 3~4 d, 胰酶(购自 Hyclone)消化后制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5×10^7 /mL。

1.2 建立小鼠肿瘤模型

雌性 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 6~8 周龄, 体质量(22 \pm 2)g, 购自重庆医科大学实验动物中心。所有动物实验经第三军医大学实验动物管理及伦理委员会审核通过。

实验分实验组和对照组, 每组 5 只小鼠。实验组小鼠双上肢腋下注射 Lewis 肺癌细胞, 2×10^7 /只。对照组以培养基代替。同样方法注射。

1.3 肿瘤浸润性 T 淋巴细胞(TIL)的制备

实验组小鼠注射肺癌细胞后 3 周, 无菌条件下取 Lewis 肺癌移植瘤标本, 除去黄色脂肪组织及血块置于含双抗的 PBS 中浸泡 5 min(使用含双抗的 PBS 目的是为了尽量保证无菌, 避免

[通信作者] 朱波, E-mail: oncology_bozhu@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.1741.017.html> (2012-12-19)

污染),充分剪碎,研磨制成单细胞悬液,经小鼠淋巴细胞分离液密度梯度离心后收集白膜层,DMEM培养基重悬,置入250 mL细胞培养瓶,37 °C,5% CO₂培养箱贴壁3 h。收集未贴壁细胞,其中即含有肿瘤浸润性T淋巴细胞。

1.4 流式抗体与细胞分选

抗小鼠CD8抗体(APC),抗小鼠PD-1抗体(PE),抗小鼠IFN- γ 抗体(PE-CY7)及同型对照均购自BD公司。未贴壁细胞经CD8⁻APC、PD-1⁻PE抗体4 °C 30 min染色后,经BD FACSAria流式细胞仪分选得CD8⁺PD-1⁺T细胞和CD8⁺PD-1⁻T细胞。

1.5 羧基荧光素二醋酸琥珀酸亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)染色

参考Quah等^[11]的染色方案进行。CFSE终浓度为1 μ mol/L。CFSE染色后细胞铺与96孔平底板,5 000/孔。CD3抗体5 μ g/mL,CD28抗体2 μ g/mL,mIL-2 10 U/mL 37 °C体外刺激0、1、3、5、7 d后分别进行流式检测。设不染色空白对照孔。

1.6 细胞内因子染色(ICS)

CD8⁺PD-1⁺T细胞和CD8⁺PD-1⁻T细胞体外经佛没酯(phorb-12-myristate-13-acetate,PMA)(终浓度50 ng/mL)、离子霉素(终浓度1 μ g/mL)刺激5 h后采用标准程序染细胞内因子IFN- γ ^[12]。细胞内因子染色试剂盒购自BD公司。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,组间差异方差齐采用单因素方差分析;方差不齐采用秩和检验。

2 结果

2.1 肿瘤局部浸润性CD8⁺T细胞分离与鉴定

为确定肿瘤局部是否存在浸润性淋巴细胞,肿瘤局部分离得单个核细胞后染CD8⁺表型,发现确存在肿瘤浸润性CD8⁺T淋巴细胞(图1A),为进一步明确CD8⁺T细胞亚群,复染PD-1,发现存在一CD8⁺T细胞亚群高表达衰竭性表型PD-1(图1B)。

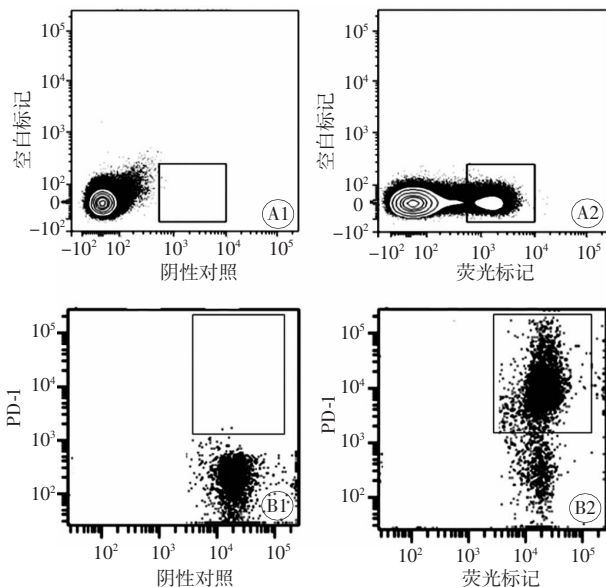


图1 肿瘤局部CD8⁺T细胞亚群分析
A1、A2:肿瘤局部单个核细胞,单染CD8;B1、B2:CD8⁺T细胞复染PD-1

2.2 CD8⁺PD-1⁺T细胞在不同组织中的分布

为进一步明确衰竭性表型PD-1是否仅表达于肿瘤浸润性CD8⁺T细胞表面,将荷瘤小鼠和正常小鼠脾脏研磨制成单细胞悬液,染色后流式分析。比较CD8⁺PD-1⁺T细胞在不同组织部位分布。结果发现CD8⁺PD-1⁺T细胞主要存在于肿瘤局部,荷瘤小鼠脾脏中也有一定的分布,而在正常小鼠的脾脏中几乎不存在(图2)。

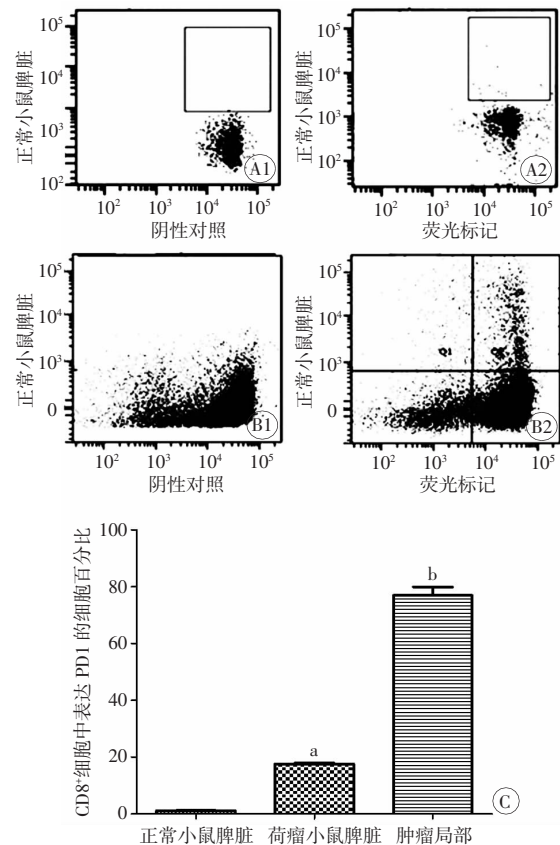


图2 不同组织CD8⁺PD-1⁺T细胞比例分布
A1、A2:流式细胞分析正常小鼠脾脏中CD8⁺PD-1⁺细胞;B1、B2:流式细胞分析荷瘤小鼠脾脏中CD8⁺PD-1⁺T细胞;C:CD8⁺PD-1⁺细胞在不同组织部位中的分布 a:P<0.05,与正常小鼠脾脏CD8⁺PD-1⁺细胞比较

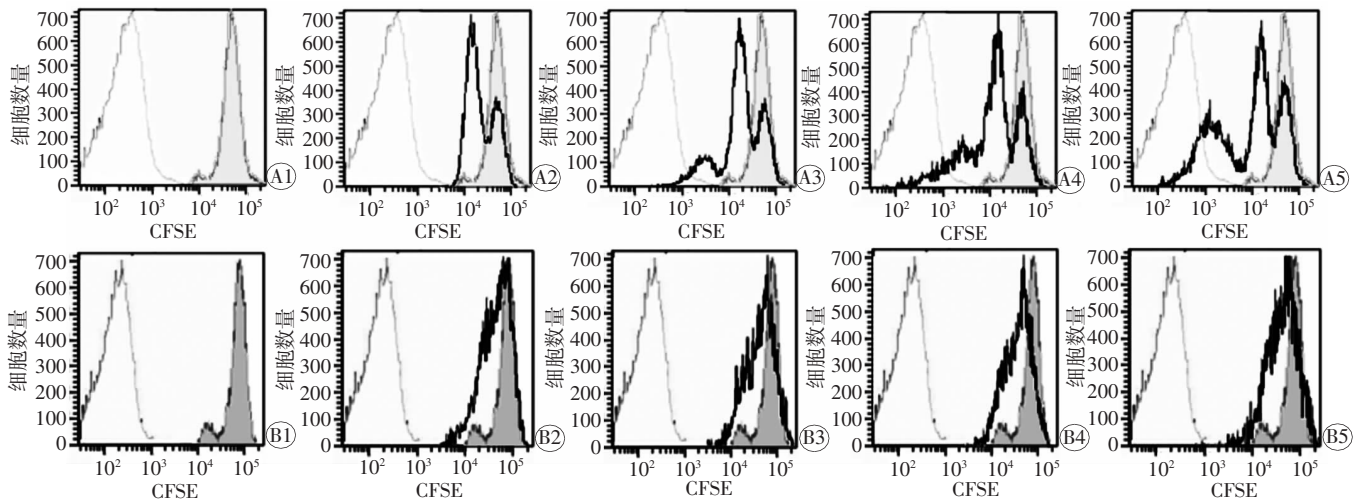
图2 不同组织CD8⁺PD-1⁺T细胞比例分布

2.3 CFSE检测细胞增殖情况

为确认肿瘤浸润性CD8⁺PD-1⁺T淋巴细胞的增殖活性是否已发生变化,流式分选CD8⁺PD-1⁺T细胞和CD8⁺PD-1⁻T细胞分别标记CFSE,同时设不染色空白对照。分别在0、1、3、5、7 d进行流式检测。结果发现CD8⁺PD-1⁺T细胞的增殖能力(图3B)较CD8⁺PD-1⁻T细胞(图3A)明显下降。

2.4 检测CD8⁺PD-1⁺和CD8⁺PD-1⁻两群细胞IFN- γ 分泌功能

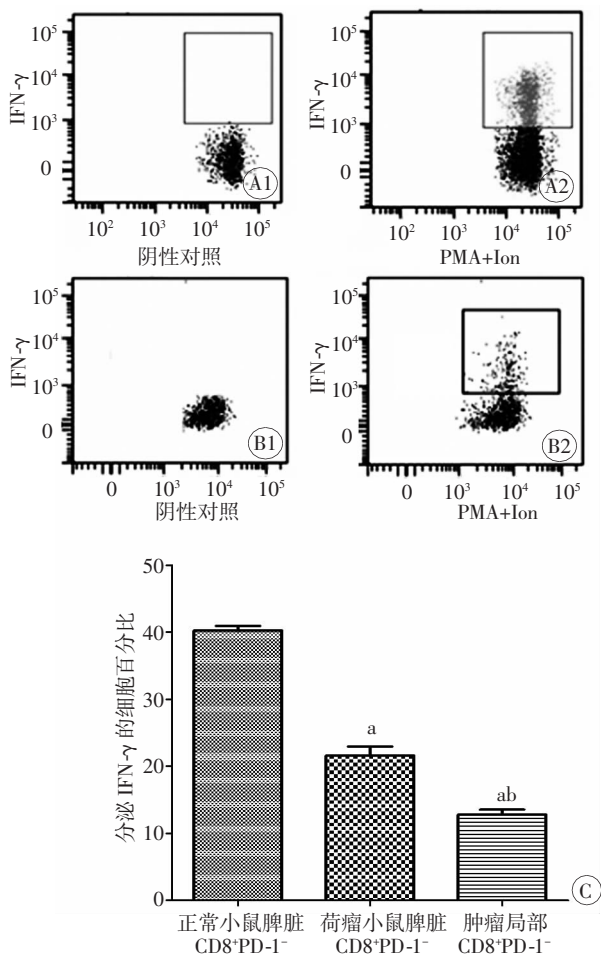
分选后CD8⁺PD-1⁺T细胞和CD8⁺PD-1⁻T细胞,体外经PMA和离子霉素非特异性刺激5 h后,行细胞内因子染色,流式检测其IFN- γ 的分泌功能。发现CD8⁺PD-1⁺T细胞IFN- γ 分泌能力明显降低(图4A、B)。统计分析显示,荷瘤小鼠肿瘤局部CD8⁺PD-1⁻T细胞IFN- γ 分泌能力较CD8⁺PD-1⁺T细胞强,但与正常小鼠脾脏中CD8⁺T细胞相比IFN- γ 分泌能力亦明显下降(图4C)。



灰色空白为未染 CFSE(空白对照);灰色实心为 0 d 细胞尚未增殖(阳性对照);黑色空白为细胞在相应检测时间点的增殖状态

A1~A5: 分别为 0、1、3、5、7 d $CD8^+PD-1^-$ T 细胞; B1~B5: 分别代表 0、1、3、5、7 d $CD8^+PD-1^+$ T 细胞

图3 CFSE 法检测肿瘤局部 $CD8^+PD-1^+$ T 细胞和 $CD8^+PD-1^-$ T 细胞的增殖变化



A1、A2: 肿瘤局部 $CD8^+PD-1^-$ 细胞刺激后检测 IFN- γ ; B1、B2: 肿瘤局部 $CD8^+PD-1^+$ 细胞刺激后检测 IFN- γ ; C: 肿瘤局部 $CD8^+PD-1^+$ 、 $CD8^+PD-1^-$ 两群细胞与正常小鼠脾脏中 $CD8^+PD-1^-$ T 细胞经同样刺激后 IFN- γ 分泌对比 a: $P < 0.05$, 与正常小鼠脾脏 $CD8^+PD-1^-$ 比较; b: $P < 0.05$, 与肿瘤局部 $CD8^+PD-1^-$ 比较

图4 $CD8^+PD-1^+$ 和 $CD8^+PD-1^-$ 两群细胞功能应答分析

3 讨论

肿瘤严重危害人体健康,影响患者生活质量,已被列为头号致死性疾病。目前临床上主要采用手术及化疗手段进行治疗,除良性肿瘤及部分早期恶性肿瘤可起到好的治疗效果外,晚期尤其是已伴发转移的恶性肿瘤尚无有效的治疗手段。肿瘤患者常伴有免疫功能低下,表现为对肿瘤抗原无应答,无法有效清除体内肿瘤细胞。究竟何种免疫细胞在抗肿瘤过程中起到了关键作用,而其功能在肿瘤患者体内是否已发生变化,及如何增强其抗肿瘤活性已成为肿瘤研究中关注的重点。

研究^[13-15]表明机体抗肿瘤过程中, $CD8^+$ T 细胞发挥了关键作用。在急性感染过程中,初始 $CD8^+$ T 细胞接受抗原刺激后,活化并大量扩增为效应 T 细胞,当抗原清除后,有一小部分效应 T 细胞分化成记忆性 T 细胞。但是在慢性感染和肿瘤中,抗原特异性的 $CD8^+$ T 细胞由于受到抗原持久的刺激,不能有效分化成记忆性 T 细胞而逐步演变成功能紊乱的一群细胞^[9, 15],称之为衰竭性 $CD8^+$ T 细胞。这群细胞表面持续性高表达 PD-1 抑制性受体^[16-17],另外还包括 LAG-3, CD244, CD160, CTLA-4 和 Tim-3^[17-19]。它们共同调控着 $CD8^+$ T 细胞的衰竭。在慢性感染小鼠模型中,将 PD-1 和 LAG-3/Tim-3 阻断后,可有效逆转 $CD8^+$ T 细胞功能紊乱恢复其功能活性^[18-20]。但肿瘤模型中,抑制性受体通路至今尚不清楚。

本研究从 Lewis 肺癌移植模型中成功分离出肿瘤浸润性 $CD8^+$ T 淋巴细胞,对衰竭性表型 PD-1 分析发现 $CD8^+PD-1^+$ 细胞的比例将近 80%, 荷瘤小鼠脾脏

中也占有较高的比例,然而在正常小鼠的脾脏中却几乎不存在。由此推测,肿瘤微环境可诱导免疫细胞表型发生改变,而这是否就是机体无法有效清除肿瘤致其长期定植的原因,为此我们检测了 CD8⁺PD-1⁺T 细胞的增殖活性和 IFN- γ 分泌功能,结果发现与 CD8⁺PD-1⁻T 细胞相比,其增殖活性和 IFN- γ 的分泌能力均明显下降。说明高表达 PD-1⁺ 的肿瘤浸润性 CD8⁺T 淋巴细胞功能活性处于衰竭状态。在研究中我们还发现同样为 CD8⁺PD-1⁻T 细胞,肿瘤局部与正常小鼠脾脏部位相比,其 IFN- γ 的分泌能力明显减低,推测肿瘤微环境可能影响免疫细胞功能的发挥。

综上所述,本研究证实肿瘤局部存在浸润性 PD-1⁺CD8⁺T 淋巴细胞且其功能活性处于抑制状态,但具体调控机制尚不十分明确。目前许多研究表明微小 RNA(miR) 调控着细胞生物学进程的关键环节,如:细胞代谢、增殖、分化、凋亡^[21-22]。免疫细胞功能的发挥和调节与 miR 同样密不可分^[23]。因此,我们将对 CD8⁺PD-1⁺ 和 CD8⁺PD-1⁻ 两群细胞的 miR 谱进行比较,从中找出具有显著性差异的功能性 miR 并对其作用进行深入研究,为肿瘤免疫治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome[J]. *Science*, 2006, 313(5795): 1960-1964.

[2] Leffers N, Gooden M J, de-Jong R A, *et al.* Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(3): 449-459.

[3] Sato E, Olson S H, Ahn J, *et al.* Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(51): 18538-18543.

[4] Zhang Y L, Li J, Mo H Y, *et al.* Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways[J]. *Mol Cancer*, 2010(9): 4.

[5] Baitsch L, Fuertes-Marraco S A, Legat A, *et al.* The three main stumbling blocks for anticancer T cells[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(7): 364-372.

[6] Yi J S, Cox M A, Zajac A J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion[J]. *Immunology*, 2010, 129(4): 474-481.

[7] Wherry E J. T cell exhaustion[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(6): 492-499.

[8] Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion; an update on implications for chronic infections and tumor evasion[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(5): 739-745.

[9] Kaiser A D, Schuster K, Gadiot J, *et al.* Reduced tumor-antigen density leads to PD-1/PD-L1-mediated impairment of partially exhausted CD8(+) T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(3): 662-671.

[10] Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin J F, *et al.* Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8(+) T-cell activation[J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(1): 82-88.

[11] Quah B J, Warren H S, Parish C R. Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9): 2049-2056.

[12] Ebert L M, Liu Y C, Clements C S, *et al.* A long, naturally presented immunodominant epitope from NY-ESO-1 tumor antigen: implications for cancer vaccine design[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(3): 1046-1054.

[13] Williams M A, Bevan M J. Effector and memory CTL differentiation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2007(25): 171-192.

[14] Jameson S C, Masopust D. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches[J]. *Immunity*, 2009, 31(6): 859-871.

[15] Virgin H W, Wherry E J, Ahmed R. Redefining chronic viral infection[J]. *Cell*, 2009, 138(1): 30-50.

[16] Barber D L, Wherry E J, Masopust D, *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-687.

[17] Wherry E J, Ha S J, Kaech S M, *et al.* Molecular signature of CD8⁺T cell exhaustion during chronic viral infection[J]. *Immunity*, 2007, 27(4): 670-684.

[18] Blackburn S D, Shin H, Haining W N, *et al.* Coregulation of CD8⁺T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(1): 29-37.

[19] Jones R B, Ndhlovu L C, Barbour J D, *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(12): 2763-2779.

[20] Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, *et al.* CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(4): 887-896.

[21] Vali B, Jones R B, Sakhdari A, *et al.* HCV-specific T cells in HCV/HIV co-infection show elevated frequencies of dual Tim-3/PD-1 expression that correlate with liver disease progression[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(9): 2493-2505.

[22] Cheng A M, Byrom M W, Shelton J, *et al.* Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1290-1297.

[23] Williams A E, Perry M M, Moschos S A, *et al.* Role of miRNA-146a in the regulation of the innate immune response and cancer[J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 6): 1211-1215.

(收稿:2012-09-14;修回:2012-12-17)

(编辑 汪勤俭)