

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

聚肌胞对活化早期T细胞PD-1表达的诱导及对黑色素瘤生长的抑制作用

陈婷, 林万尊, 郑伟丽, 谢贤和, 王自力

引用本文:

陈婷, 林万尊, 郑伟丽, 等. 聚肌胞对活化早期T细胞PD-1表达的诱导及对黑色素瘤生长的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(03): 222-226.

CHEN Ting, LIN Wanzun, ZHENG Weili, et al. Polyinosinic-polycytidylic Acid Mediates PD-1 Expression in T Cells at Early Stage of Activation and Inhibits Melanoma Growth[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2019, 46(03): 222-226.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1213>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

程序性死亡受体1和淋巴细胞激活基因3在食管胃交界部腺癌围手术期的表达及意义

Expression of Programmed Cell Death 1 and Lymphocyte Activation Gene 3 in Perioperation of Adenocarcinoma of Esophagogastric Junction and Related Significance

肿瘤防治研究. 2019, 46(05): 436-439 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1518>

新型免疫检查点—恶性肿瘤免疫治疗研究进展

New Immune Checkpoint: Advances in Immunotherapy for Malignant Tumors

肿瘤防治研究. 2018, 45(12): 1027-1035 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0545>

分子影像引导肿瘤免疫治疗新进展

Progress of Molecular Imaging-guided Tumor Immunotherapy

肿瘤防治研究. 2018, 45(1): 47-51 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.0971>

抑制乳腺癌患者自体CD3AK细胞PD-1的表达对杀伤MCF-7/adr细胞的影响

Improvement of Cytotoxicity of Autologous CD3AK Cells in Breast Cancer Patients to MCF-7/adr Cells by Suppressing PD-1 Expression

肿瘤防治研究. 2017, 44(9): 580-584 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0154>

PD1/PD-L1激活促进癌症发生、发展和转移的研究进展

Novel Findings on Activation of PD1/PD-L1 that Contributes to Cancer Development and Metastasis

肿瘤防治研究. 2017, 44(6): 423-427 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0087>



杂志官网



微信公众号

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1213

• 基础研究 •

聚肌胞对活化早期T细胞PD-1表达的诱导及对黑色素瘤生长的抑制作用

陈婷, 林万尊, 郑伟丽, 谢贤和, 王自力

Polyinosinic-polycytidylic Acid Mediates PD-1 Expression in T Cells at Early Stage of Activation and Inhibits Melanoma Growth

CHEN Ting, LIN Wanzun, ZHENG Weili, XIE Xianhe, WANG Zili

Chemotherapy Department, First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

Corresponding Author: WANG Zili, E-mail: wangzili83@163.com

Abstract: Objective To investigate the expression level of programmed cell death protein 1 (PD-1) in T cells at the early stage of activation (T cells remained in spleen, before migration to target organ). **Methods** C57BL/6 mice (6-8 weeks old) were immunized with Poly I:C peptide vaccine after randomly grouping. Mice spleen cells were harvested 7 days after immunization. The effects of Poly I:C on the activation of antigen specific or nonspecific T cells were evaluated. PD-1 expression on the antigen specific CD8⁺T cells was also detected. Furthermore, correlation between the anti-tumor effects of Poly I:C and CD8⁺T cells was assessed by CD8 cell knockout. **Results** Poly I:C significantly promoted the activation of antigen specific or nonspecific T cells in mice spleens. Although antigen specific T cells increased the expression of PD-1, they could still synthesize IFN- γ , a T cell functional marker. Meanwhile, Poly I:C significantly inhibited the growth of melanoma *in vivo* ($P=0.0243$), which was correlated with CD8⁺T cells. **Conclusion** Poly I:C could promote the activation of T cells; although, T cells at the early stage of activation (remained in spleen) enhanced the expression of PD-1, they are still functional.

Key words: Polyinosinic-polycytidylic acid; Immunotherapy; CD8⁺T cells; CD4⁺T cells

摘要: 目的 探讨活化早期阶段(脾组织内,未向靶器官迁移的)T细胞程序性死亡受体1(PD-1)表达情况。**方法** 6~8周龄C57BL/6小鼠随机分组后,以Poly I:C肽疫苗免疫,7天后获取小鼠脾细胞,观察Poly I:C对非特异性及特异性T细胞活化的影响,并检测特异性CD8⁺T细胞表面PD-1表达。同时,通过敲除CD8细胞观察Poly I:C的抗肿瘤效应是否与CD8⁺T细胞相关。**结果** 小鼠经Poly I:C免疫后,脾组织内非特异性及特异性T细胞活化均显著增强;活化的特异性CD8⁺T细胞虽高表达PD-1,但仍可合成T细胞功能性分子IFN- γ 。此外, Poly I:C能显著抑制荷瘤小鼠黑色素瘤生长($P=0.0243$),且该效应与CD8⁺T细胞有关。**结论** Poly I:C可以促进T细胞活化;活化早期的(脾组织内)T细胞虽高表达PD-1,但仍具有功能。

关键词: 聚肌胞; 免疫治疗; CD8⁺T细胞; CD4⁺T细胞

中图分类号: R730; R739.5

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

肿瘤微环境可以通过多种机制导致免疫逃逸,其中程序性死亡受体1(PD-1)介导信号发挥关键作用。PD-1是一种I型跨膜蛋白受体,表达于多种免疫细胞(包括活化的T细胞)表面,部分肿瘤细胞高表达PD-1配体PD-L1,PD-1与配体结合后诱导

T细胞功能障碍,即T细胞衰竭,衰竭型T细胞无法合成IFN- γ 。临床上广泛应用的抗PD-1治疗就是为了挽救衰竭型T细胞^[1-3]。Tumeh等^[4]指出抗PD-1治疗黑色素瘤有效的前提是治疗前肿瘤组织中存在能被PD-1信号调节的CD8⁺T细胞。然而,PD-1在T细胞活化后的哪个阶段开始表达并抑制T细胞功能?是否所有表达PD-1的T细胞都是衰竭型T细胞?这些问题仍不明确。因此,本课题聚焦T细胞的活化阶段,研究T细胞活化初期PD-1表达情况。

Poly I:C是合成的双链RNA类似物,为Toll样受体3(TLR3)配体,TLR3广泛分布于多种免疫细胞表面,包括树突状细胞和自然杀伤细胞等。Poly

收稿日期: 2018-08-23; 修回日期: 2018-11-07

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2016J01453)

作者单位: 350005 福州, 福建医科大学附属第一医院化疗科

通信作者: 王自力, E-mail: wangzili83@163.com

作者简介: 陈婷(1994-),女,硕士在读,主要从事肿瘤免疫治疗的研究

I:C与受体结合后能有效激活非特异性免疫系统并促进T细胞活化^[5-6]。我们以黑色素瘤荷瘤小鼠为模型,研究发现Poly I:C可以有效促进T细胞活化;同时,小鼠经OVA肽+Poly I:C免疫后7天,处于活化早期阶段的(仍在脾组织内,还未向靶器官迁移的)特异性CD8⁺T细胞表达PD-1,这部分细胞仍然具有功能,可以合成T细胞功能性标志IFN- γ 。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂、材料与仪器

健康清洁级6~8周龄雌性C57BL/6小鼠购于上海斯莱克公司。B16F10小鼠黑色素瘤细胞购于中科院上海细胞库。鸡卵清蛋白(OVA₂₅₇₋₂₆₄)抗原肽(OVA肽): SIINFEKL合成于上海淘普生物技术公司。CD8体内敲除抗体购于美国InvivoMab公司。Poly I:C购于美国InvivoGen公司。FITC标记的抗鼠CD3抗体、APC标记的抗鼠CD3抗体、PE标记的抗鼠IFN- γ 抗体、Percp cy5.5标记的抗鼠CD8抗体、APC标记的抗鼠CD4抗体和FITC标记的抗鼠PD-1抗体购于美国eBioscience公司。胞内染色试剂盒和PMA购于美国BD公司。PBS磷酸盐缓冲液(粉剂)购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司; DMEM高糖培养基购于美国Ionomycin公司。Ionomycin购于爱必信公司; 仪器: A6流式细胞仪, 37℃恒温培养箱。

1.2 方法

1.2.1 小鼠免疫干预

1.2.1.1 Poly I:C对非特异性T细胞活化的影响 将6只体重相近的6~8周龄C57BL/6小鼠随机分成两组: 对照组和实验组。对照组小鼠腹腔注射200 μ l PBS, 实验组每只小鼠腹腔注射50 μ g Poly I:C (Poly I:C溶解于总量为200 μ l的PBS中)。7天后分别处死各组小鼠, 取得脾组织。

1.2.1.2 Poly I:C对特异性CD8⁺T细胞(OVA₂₅₇₋₂₆₄)活化的影响 将12只体重相近的6~8周龄C57BL/6小鼠随机分成四组: 对照组、OVA肽组、Poly I:C组和OVA肽+Poly I:C组。对照组: 小鼠腹腔注射200 μ l PBS; OVA肽组: 每只小鼠腹腔注射200 μ g OVA肽(肽段溶解于总量为200 μ l的PBS中); Poly I:C组: 每只小鼠腹腔注射100 μ g Poly I:C (Poly I:C溶解于总量为200 μ l的PBS中); OVA肽+Poly I:C组: 每只小鼠腹腔注射100 μ g Poly I:C+200 μ g OVA肽(溶解于总量为200 μ l的PBS中)。7天后分别处死各组小鼠, 取得脾组织。

1.2.2 T细胞刺激活化

研磨小鼠脾组织取得脾细胞混悬液, 红细胞裂解液去除红细胞, 300目滤网过滤, 得到脾组织白细胞悬液; 离心后重悬细胞, 使其浓度为 1×10^7 个/

毫升, 接种于96孔板, 每孔100 μ l (1×10^6 个细胞)。

(1) 研究非特异性T细胞: 每孔加入PMA、Ionomycin刺激T细胞, PMA终浓度为50 ng/ml, Ionomycin终浓度为1 μ g/ml; 并加入golgi plug 4 微升/孔。96孔板放入细胞培养箱孵育12 h。(2) 研究特异性CD8⁺T细胞(OVA)活化: 每孔加入OVA肽刺激脾细胞, OVA肽终浓度为10 μ g/ml; 并加入golgi plug 4 微升/孔。96孔板放入细胞培养箱孵育12 h。

1.2.3 细胞表面及胞内染色

取上述刺激活化的T细胞, 以CD3、CD8、CD4、PD-1等抗体进行细胞表面染色; 利用BD公司Cytotfix/Cytoperm冰上避光孵育30 min, 破细胞膜; 加入IFN- γ -PE抗体进行细胞内染色, 冰上避光孵育30 min。染色后采用A6流式细胞仪与Flowjo 7.6.1软件分析染色结果。IFN- γ ⁺CD3⁺CD8⁺细胞即活化的CD8⁺T细胞; IFN- γ ⁺CD3⁺CD4⁺细胞为活化的CD4⁺T细胞。

1.2.4 荷黑色素瘤小鼠免疫干预

取对数长期B16F10细胞, 接种在20只C57BL/6雌性小鼠的右背外侧, 每只接种 5×10^5 个B16F10细胞。10天后肿瘤生长至肉眼可见时, 将20只荷瘤小鼠随机分成四组, 分别为PBS组、CD8敲除组、Poly I:C组和Poly I:C+CD8敲除组。Poly I:C每隔5天腹腔注射一次, 每只50微克/次, 共注射3次。对照组在相应时间点腹腔注射等体积PBS。CD8敲除抗体分别在Poly I:C注射前2天、前1天及Poly I:C注射5天后进行腹腔注射, 每只500微克/次。从第一次注射Poly I:C开始, 每3天记录各组小鼠肿瘤的长径(L)和与之垂直的短径(W), 并计算肿瘤体积($V=0.52 \times L \times W^2$), 当对照组小鼠肿瘤体积超过4 000 mm³时终止荷瘤实验。

1.3 统计学方法

所有实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 5.0统计学软件进行数据处理。*t*检验、Two-way ANOVA进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Poly I:C促进小鼠非特异性T细胞活化

脾细胞经PMA/Ionomycin刺激后, Poly I:C组活化的CD8⁺与CD4⁺T细胞百分比相对于对照组显著升高, 见表1、图1A~B; Poly I:C组活化的CD8⁺与CD4⁺T细胞平均值也较对照组明显增加, 见表1、图1C~D。

2.2 Poly I:C促进特异性CD8⁺T细胞活化

取对照组、OVA肽组、Poly I:C组、OVA肽+Poly I:C组的脾细胞, 加入OVA肽刺激, 通过胞内IFN- γ 染色检测初次活化的OVA特异性CD8⁺T细胞数(IFN- γ ⁺)。与Poly I:C组相比, OVA肽+Poly I:C组OVA特异性CD8⁺T显著增加, 见表2、图2。

表1 PBS组与Poly I:C组活化的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞及数量

Table1 Number and percentage of activated CD8⁺T and CD4⁺T cells in PBS and Poly I:C groups

Number & percentage	Control group	Poly I:C group	t	P
Splenocyte count($\times 10^7$)	6.92 \pm 1.30	8.46 \pm 0.43		
IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ T cells(%)	4.64 \pm 1.06	9.88 \pm 0.66*	2.984	0.0406
Activated CD8 ⁺ T cells($\times 10^6$)	0.21 \pm 0.14	0.89 \pm 0.18*	4.403	0.0117
IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ T cells(%)	4.44 \pm 0.46	6.65 \pm 0.48*	2.884	0.0449
Activated CD4 ⁺ T cells($\times 10^6$)	1.75 \pm 0.54	2.87 \pm 0.12*	3.493	0.0251

Note: *: P<0.05, compared with control group

2.3 活化的特异性CD8⁺T细胞与非活化的CD8⁺T细胞PD-1表达差异

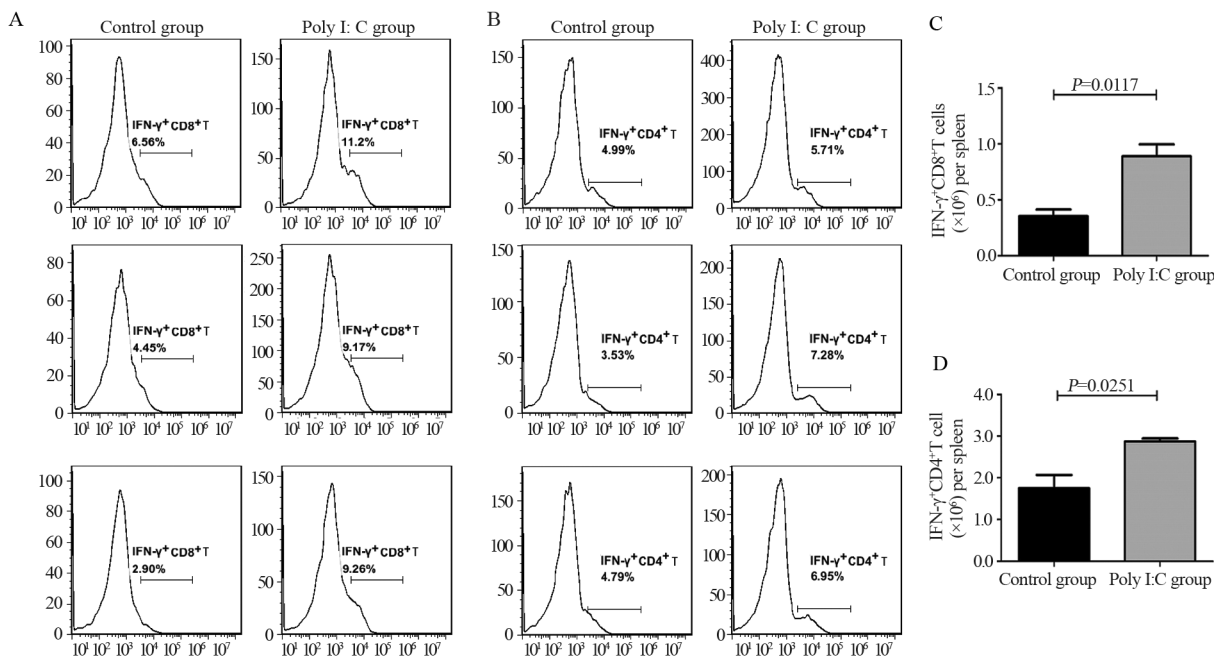
取OVA肽+Poly I:C组的脾细胞，加入OVA肽刺激，检测初次活化的OVA特异性CD8⁺T细胞（IFN- γ ⁺）与非活化的CD8⁺T细胞（IFN- γ ⁻）表面PD-1表达差异。结果显示：IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞高表达PD-1，见图3。这一结果说明在OVA肽+Poly I:C免疫后7天，还在脾组织内，尚未向靶器官迁移的特异性CD8⁺T细胞已经开始表达PD-1。

2.4 Poly I:C显著抑制小鼠黑色素瘤生长

给予荷黑色素瘤小鼠PBS、CD8敲除、Poly I:C与CD8敲除、单用Poly I:C等方式干预，四组荷瘤小鼠肿瘤生长差异有统计学意义（ $F=17.116, P<0.0001$ ），见图4。与对照组相比，Poly I:C组小鼠黑色素瘤生长明显减慢（ $F=7.8353, P=0.0243$ ）；经CD8敲除后，Poly I:C的抗肿瘤作用被明显削弱（即Poly I:C+CD8敲除组 vs. Poly I:C组： $F=7.3425, P=0.0285$ ）。

3 讨论

PD-1信号在T细胞衰竭过程中发挥重要作用。动物实验显示：肿瘤组织中大多数T细胞都是衰竭型T细胞，无法合成IFN- γ ；阻断PD-1/PD-L1信号，可以抑制T细胞衰竭，促进部分肿瘤浸润T细胞合成IFN- γ ^[7]；因此，PD-1是T细胞衰竭的标志。然而，也有学者发现患者体内可识别自身肿瘤抗原的T细胞都表达PD-1，指出PD-1表达是预示T细胞能产生抗肿瘤免疫的标志^[8-9]。考虑到PD-1表达可能具有不同效应，非常有必要研究PD-1是在T细胞活化后的哪个阶段开始表达及该阶段的T细胞功能。要解决上述问题，首先需要活化T细胞，并探



A: gating on CD3⁺CD8⁺ cells, the percentage of IFN- γ ⁺CD8⁺T cells was analyzed; B: gating on CD3⁺CD4⁺ cells, the percentage of IFN- γ ⁺CD4⁺T cells was analyzed; C: the average number of IFN- γ ⁺CD8⁺T cells per spleen in each group; D: IFN- γ ⁺CD4⁺T cell count per spleen in each group

图1 Poly I:C促进PMA/ionomycin介导的非特异性T细胞活化

Figure1 Poly I:C promoted PMA/ionomycin-mediated activation of nonspecific T cells

表2 Poly I:C对小鼠OVA特异性CD8⁺T细胞活化的影响

Table2 Effects of Poly I:C on activation of OVA specific CD8⁺T cells

	Control group	OVA peptide group	Poly I:C group	OVA peptide +Poly I:C group	t	P
Splenocyte count ($\times 10^7$)	10.73 \pm 2.50	8.00 \pm 3.40	10.48 \pm 3.13	14.23 \pm 1.22		
Percentage of OVA specific CD8 ⁺ T cells in all CD8 ⁺ T cells (%)	0.56 \pm 0.09	0.89 \pm 0.14	1.22 \pm 0.20	2.78 \pm 0.28	4.594	0.0101*
OVA specific CD8 ⁺ T cells ($\times 10^4$)	7.63 \pm 3.50	13.25 \pm 5.34	13.95 \pm 3.72	35.77 \pm 3.21	3.907	0.0174*

Note: *: OVA peptide+Poly I:C group vs. Poly I:C group

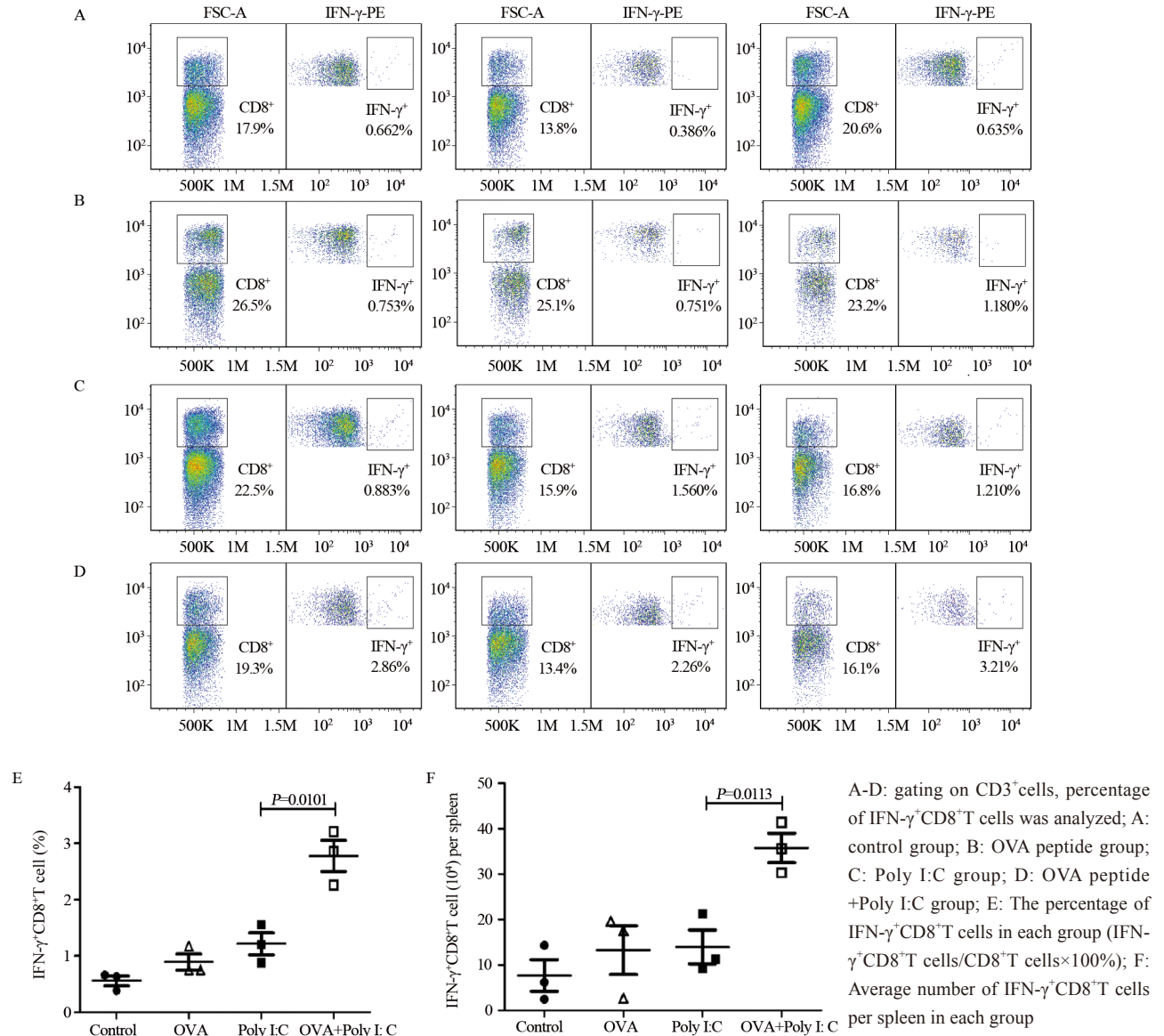
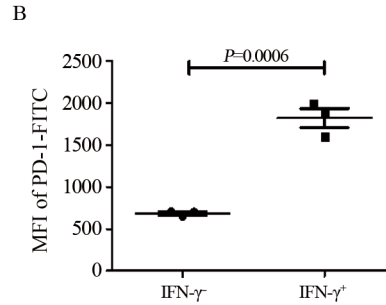
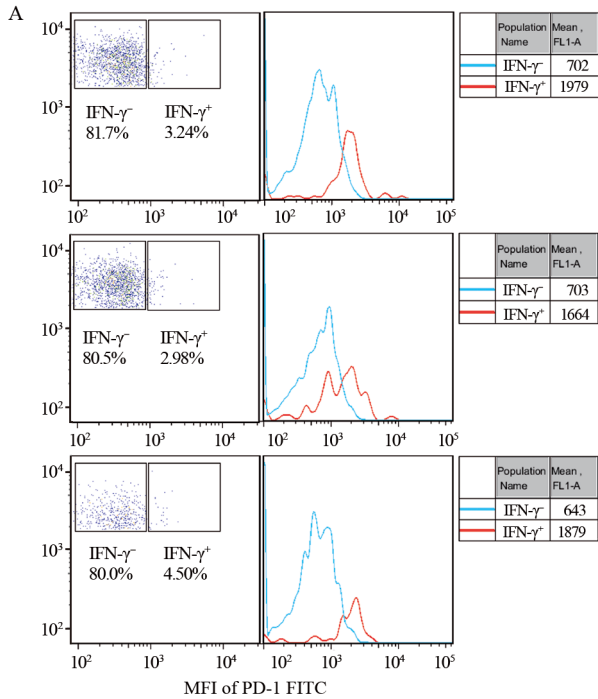


图2 Poly I:C促进OVA特异性CD8⁺T细胞活化
Figure2 Poly I:C promoted activation of OVA specific CD8⁺T cells

索PD-1表达与T细胞功能性分子IFN- γ 之间的关系。病原微生物介导的宿主T细胞活化机制为解决这一问题提供了新思路。当机体遇到免疫原性强的病原体感染时，可以快速有效激活天然免疫系统，促进特异性免疫应答，这一过程中，病原体相关分子识别模式（PAMPs）发挥关键作用。PAMPs指病原微生物所含有的某些高度保守的分子，这些分子可以和吞噬细胞（如树突状细胞、巨噬细胞等）表面的模式识别受体（PRR）结合，激活非特异免疫系统并提呈抗原，最终促进T细胞活化。PRR包括甘露糖受体、清道夫受体、Toll样受体（TLR）等；Poly I:C是TLR3配体，有研究报道Poly I:C可以促进树突状细胞表达CD80、CD86^[10-11]。由于抗原提呈细胞表面CD80/CD86可以与T细胞表面CD28结合并为T细胞活化提供第二

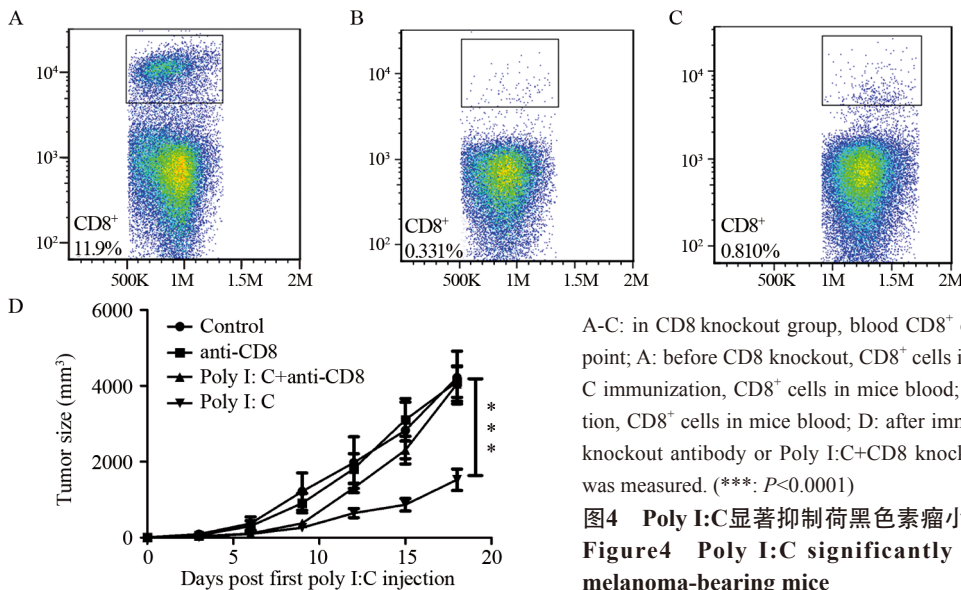
信号，因此Poly I:C具有促进T细胞活化的潜能，我们的实验结果也证实Poly I:C可以促进脾脏内特异性及非特异性T细胞活化。我们的研究显示Poly I:C免疫后7天，脾组织内初次活化的特异性CD8⁺T细胞可以合成IFN- γ 并高表达PD-1，且Poly I:C的抗肿瘤效应和CD8⁺T细胞有关。这一发现说明：（1）PD-1表达是早期事件，初次活化的、仍在外周淋巴器官内未向靶器官迁移的CD8⁺T细胞就已经开始表达PD-1；（2）脾组织内表达PD-1的CD8⁺T细胞是功能性的，可以合成IFN- γ ，且Poly I:C的抗肿瘤效应与活化的CD8⁺T细胞有关；（3）进一步证实，在CD8⁺T细胞活化的不同阶段，PD-1表达具有不同的效应；外周淋巴器官内可以合成IFN- γ 的CD8⁺T细胞高表达PD-1，说明PD-1也可以是T细胞的功能性标志。



A: gate on IFN- γ^+ and IFN- γ^- CD8 $^+$ T cells, comparing mean fluorescent intensity (MFI) of PD-1 between these two cell populations; B: MFI of PD-1-FITC in each group

图3 活化的OVA特异性CD8 $^+$ T细胞(IFN- γ^+)与非活化的CD8 $^+$ T细胞(IFN- γ^-)之间PD-1表达差异

Figure3 Difference of PD-1 expression between activated OVA-specific CD8 $^+$ T cells (IFN- γ^+) and non-activated CD8 $^+$ T cells (IFN- γ^-)



A-C: in CD8 knockout group, blood CD8 $^+$ cells were detected at different time point; A: before CD8 knockdown, CD8 $^+$ cells in mice blood; B: 4 days after Poly I: C immunization, CD8 $^+$ cells in mice blood; C: 8 days after Poly I:C immunization, CD8 $^+$ cells in mice blood; D: after immunization with PBS, Poly I:C, CD8 knockout antibody or Poly I:C+CD8 knockout, tumor size in different groups was measured. (***: $P < 0.0001$)

图4 Poly I:C显著抑制荷黑色素瘤小鼠肿瘤生长

Figure4 Poly I:C significantly inhibited tumor growth of melanoma-bearing mice

参考文献:

- [1] Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer[J]. Trends Immunol, 2015, 36(4): 265-76.
- [2] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J]. N Engl J Med, 2012, 366(26): 2443-54.
- [3] Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future[J]. J Clin Invest, 2015, 125(9): 3384-91.
- [4] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. Nature, 2014, 515(7528): 568-71.
- [5] Salem ML, Diaz-Montero CM, El-Naggar SA, et al. The TLR3 agonist poly(I:C) targets CD8 $^+$ T cells and augments their antigen-specific responses upon their adoptive transfer into naïve recipient mice[J]. Vaccine, 2009, 27(4): 549-57.
- [6] Ngoi SM, Tovey MG, Vella AT. Targeting Poly I:C to the TLR3-independent pathway boosts effector CD8 T cell differentiation through IFN α/β [J]. J Immunol, 2008, 181(11): 7670-80.
- [7] Ngiow SF, Young A, Jacquelot N, et al. A Threshold Level of Intratumor CD8 $^+$ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1[J]. Cancer Res, 2015, 75(18): 3800-11.
- [8] Inozume T, Hanada K, Wang QJ, et al. Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells[J]. J Immunother, 2010, 33(9): 956-64.
- [9] Gros A, Robbins PF, Yao X, et al. PD-1 identifies the patient-specific CD8 $^+$ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors[J]. J Clin Invest, 2014, 124(5): 2246-59.
- [10] Forte G, Rega A, Morello S, et al. Polyinosinic-polycytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer[J]. J Immunol, 2012, 188(11): 5357-64.
- [11] Truxova I, Pokorna K, Kloudova K, et al. Day 3 Poly (I:C)-activated dendritic cells generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials are fully comparable to standard Day 5 DCs[J]. Immunol Lett, 2014, 160(1): 39-49.

[编辑: 刘红武; 校对: 周永红]

作者贡献:

陈婷: 实施具体实验及撰写文章
林万尊、郑伟丽: 数据统计学分析、校对文章
谢贤和: 对课题思路提出建议及指导文章写作
王自力: 实验设计、提出文章思路及校对、项目负责人