

·临床观察与报道·

PD-1/PD-L1在膀胱癌患者外周血T细胞和肿瘤细胞表达

黄 韬, 龙兆麟, 吴世皓, 华庆生, 张信基

(南方医科大学附属顺德第一人民医院泌尿外科, 广东 顺德 528300)

摘要:【目的】探讨PD-1/PD-L1在膀胱肿瘤患者外周血T细胞和膀胱肿瘤细胞上表达的特点及临床意义。【方法】选取我科收治的64例原发性膀胱癌患者作为实验组(浅表性46例,浸润性18例),对照组为正常人群,共15例。分别取外周血,通过流式细胞仪检测CD8⁺T淋巴细胞表明PD-1的表达量;另外取肿瘤患者膀胱癌组织和正常人群的膀胱肿瘤行免疫组化检测膀胱细胞或膀胱肿瘤细胞表面PD-L1的表达情况。【结果】膀胱癌患者外周血中CD8⁺T淋巴细胞PD-1的表达量明显高于对照组[(2.25±0.60)% vs (0.68±0.17)% , $P < 0.001$],其中浸润性膀胱癌患者外周血T细胞PD-1的表达高于浅表性膀胱癌患者[(3.04±0.46)% vs (0.68±0.17)% , $P < 0.001$];膀胱肿瘤细胞和正常膀胱组织细胞PD-L1的表达率分别为:40.6%(26/64)和0(0/15, $P < 0.001$),其中浸润性膀胱肿瘤细胞与浅表性膀胱肿瘤细胞PD-L1的表达率无明显差异(41.3% vs 38.8%, $P > 0.01$)。【结论】外周血中PD-1在CD8⁺T细胞的表达水平可间接反映膀胱癌的进展程度,膀胱肿瘤细胞表面高表达PD-L1,但与肿瘤的进展无相关。

关键词:PD-1/PD-L1; CD8⁺T细胞;膀胱肿瘤细胞;免疫组化

中图分类号:R737.14

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)04-0628-04

PD-1/PD-L1 Expressed on T Cell and Bladder Cancer Cell

HUANG Tao, LONG Zhao-lin, WU Shi-hao, HUA Qing-sheng, ZHANG Xin-ji

(Department of Surgery, Shunde First People's Hospital Affiliated of Southern Medical University, Shunde 528300, China)

Corresponding to: ZHANG Xin-ji, E-mail: zhangxinjimd@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate the characteristics of PD-1/PD-L1 expressed on T cell and bladder cancer cell and clinical significance. 【Methods】 64 patients with primary bladder cancer were into experiment group and 10 normal people were into control group. Peripheral bloods were used to test the PD-1 expressed on CD8⁺ T lymphocytes by flow cytometry. Immunohistochemistry staining was used to detect the PD-L1 expression in tumor and normal specimen. 【Results】 PD-1 expressed on CD8⁺T lymphocytes was (2.25±0.60)% in experiment group and (0.68±0.17)% in control group, respectively ($P < 0.001$). And the PD-1 expression on T cell in invasive bladder cancer patient was significant higher than superficial bladder cancer patients [(3.04±0.46)% vs (0.68±0.17)% , $P < 0.001$]. The expression of PD-L1 in experiment group was higher than control group, (26/64 vs 0/15, $P < 0.001$). But there was no different between invasive and superficial bladder cancer patients, (41.3% vs 38.8%, $P > 0.01$). 【Conclusions】 Expression of negative stimulatory molecule PD-1 in CD8⁺T lymphocytes of peripheral blood is significantly correlated with bladder cancer advanced. Bladder cancer cell was strongly expressed PD-L1, and this expression is not related to cancer advanced.

Key words: PD-1/PD-L1; CD8⁺ T lymphocyte; bladder cancer cell; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(4): 628-631; COV3]

膀胱癌(bladder cancer)是威胁人类健康最常见的泌尿系恶性肿瘤。浅表性膀胱癌通过经尿道膀胱肿瘤切除术和术后膀胱灌注化疗后,仍存在

较高的复发率和进展率^[1]。膀胱癌治疗后的高复发率及其恶性进展的生物学行为提示可能存在免疫逃逸。程序性死亡因子1受体/配体(PD-1/PD-L1)

收稿日期:2017-03-02

基金项目:国家自然科学基金(81272844)

作者简介:黄韬,副主任医师, E-mail: sddlhuangtao@163.com; 张信基,通信作者,硕士,主治医师, E-mail: zhangxinjimd@163.com

在调节T淋巴细胞介导的细胞免疫中发挥着非常重要的作用,已成为近几年免疫治疗的研究热点。机体对肿瘤产生免疫反应的重要环节是活化T细胞。T淋巴细胞的活化需要抗原提呈信号和协同刺激信号的协同作用,协同刺激分子通过为淋巴细胞提供正性或负性的调控信号参与机体免疫应答^[2]。PD-1/PD-L1是协同刺激分子家族中具备负向调控作用的重要成员之一,能够通过抑制T细胞的活化和增殖,减弱机体的抗肿瘤免疫反应,从而负向调控免疫应答^[3]。膀胱癌在发生和发展过程中T细胞表面PD-1和肿瘤细胞表面PD-L1的表达量的变化及其与肿瘤进展的相关性目前尚未见报道。我们通过回顾性分析,比较健康人群和膀胱肿瘤患者(浅表性和浸润性)肿瘤细胞表面PD-L1和外周血CD8⁺T细胞表面PD-1的表达量,探讨PD-1/PD-L1的表达与膀胱肿瘤发生和发展的关系及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象和分组

选取2013年2月至2016年8月我院泌尿外科住院部收治的首诊原发性膀胱癌患者,共64例,平均年龄56岁,其中男性43例,女性21例。经过术后病理确诊,其中浅表性膀胱癌46例(pTa 11例,pT1 35例),浸润性膀胱癌18例(pT2 12例,pT3 4例,pT4 2例)。对照组是同期在我科住院的患者经膀胱镜活检病理诊断证实为正常膀胱组织的人群,共15例,平均年龄52岁,其中男性8例,女性7例。所有患者术前均未行放化疗(包括药物膀胱灌注),无并发其他脏器肿瘤。由于膀胱原位癌虽然属于浅表性膀胱癌,但其分化差,恶性程度高,其恶性程度与分级不符,故不予纳入本研究。本研究经患者知情同意并经本院伦理委员会批复。

1.2 流式细胞仪分析外周血CD8⁺T细胞PD-1的表达

取新鲜静脉血10 mL,经肝素钠抗凝处理后,与等量的PBS液充分混匀,滴管沿管壁缓慢加入至10 mL淋巴细胞分层液中,室温水平离心2 000 r/min(离心机半径 $r = 13.5$ cm),离心20 min,小心吸取单个核细胞层液体(中间层),PBS洗涤3次后重悬,室温水平离心1 500 r/min,离心10 min,弃上

清,再次PBS重悬后离心1 500 r/min,离心10 min,最后所得沉淀悬于缓冲液中计数单个核细胞。取100 μ L单核细胞混悬液(10^6 /mL),分别加入CD8(APC标记)和PD-1(PE标记)流式抗体各1 μ L,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min后上流式细胞仪检测,并用FlowJo软件分析相关数据。

1.3 免疫组化分析肿瘤细胞表面PD-L1的表达

取肿瘤组织石蜡切片,经烤片、脱蜡、水化、抗原修复等过程,加入体积分数为3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶后,加入一抗anti-PD-L1,4 $^{\circ}$ C冰箱过夜(12 h),PBS清洗,先后加入Polymer helper以及二抗+辣根过氧化物酶,DAB染色,苏木素复染,透明,中性树胶封片。所有切片均在同一条件同一批次内完成染色。

在高倍镜下随机选取3个不连续视野进行观察,以细胞膜或细胞浆内呈现棕色或者棕黄色颗粒作为染色阳性标准,计算阳性染色细胞占总细胞数的百分比。其中超过5%的肿瘤细胞胞膜或胞浆表达PD-L1被认为是高表达PD-L1。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0进行统计学分析,数据采用均数 \pm 标准差表示,两组统计资料均数比较采用两独立样本非参数检验,取检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

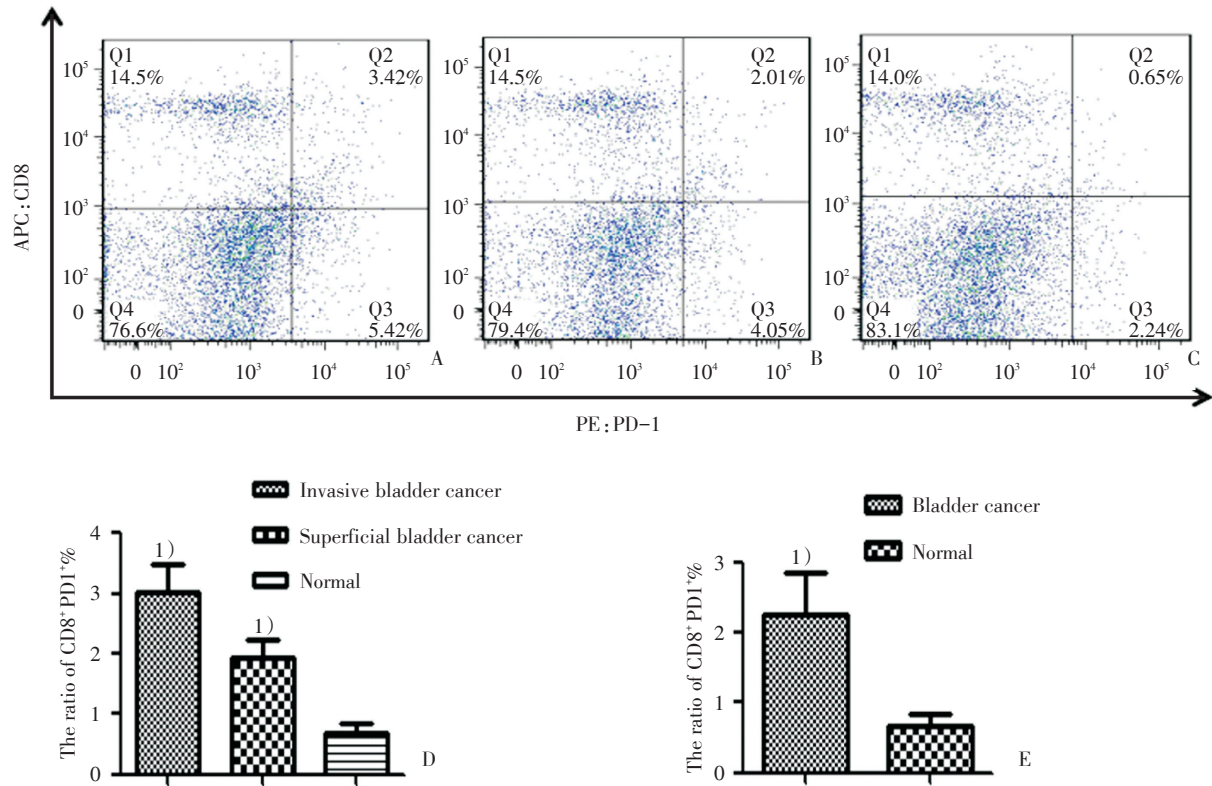
2 结果

2.1 流式细胞仪分析膀胱癌患者和对照组患者CD8⁺T细胞表面PD-1的表达量

对64例膀胱癌患者及对照组患者的外周血的CD8⁺T淋巴细胞行流式细胞仪检测,结果显示:膀胱癌患者外周血中CD8⁺T细胞PD-1的表达量明显高于对照组,差异有统计学意义[(2.25 ± 0.60)% vs (0.68 ± 0.17)%, $P < 0.001$]。其中,浸润性膀胱癌患者外周血T细胞PD-1的表达高于浅表性膀胱癌患者[(3.04 ± 0.46)% vs (0.68 ± 0.17)%, $P < 0.001$;图1]。

2.2 膀胱肿瘤细胞表面PD-L1的表达

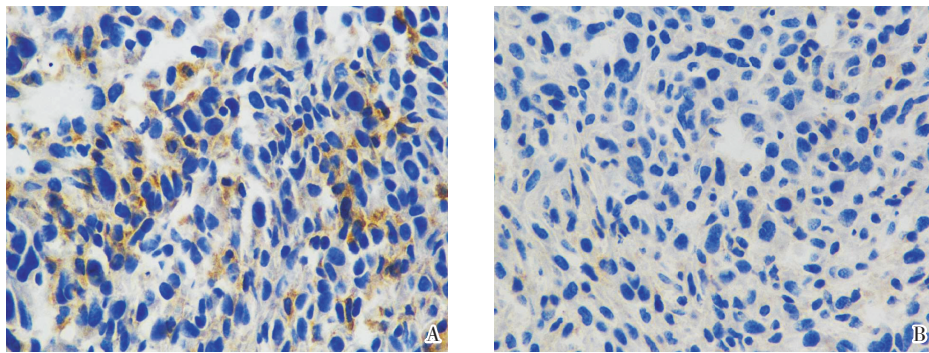
免疫组化结果显示膀胱肿瘤细胞和正常膀胱组织细胞PD-L1的表达率分别:40.6%(26/64)和0(0/15), $P < 0.001$ 。进一步观察,我们发现,浸润性膀胱肿瘤细胞与浅表性膀胱肿瘤细胞PD-L1的表达率无明显差异,表达率分别为41.3%(19/46)和38.8%(7/18, $P > 0.01$,图2)。



A: Invasive bladder cancer group, $n = 18$; B: Superficial bladder cancer group, $n = 46$; C: Normal group, $n = 15$, Q2 indicated that the percentage of PD-1 expressed on CD8⁺ T cell; D: The comparison of the ratio of PD-1 expressed on CD8⁺ T cell in invasion bladder cancer, superficial bladder cancer and normal groups; E: The comparison of the ratio of PD-1 expressed on CD8⁺ T cell between bladder cancer and normal groups. 1) $P < 0.001$.

图1 流式细胞仪分析外周血 CD8⁺T 细胞 PD-1 表达

Fig.1 Flow cytometry analysis of PD-1 expressed on CD8⁺ T cell in peripheral blood.



A: Bladder cancer($\times 400$); B: Normal($\times 400$).The brown staining of the cytoplasm or cytoplasm indicated the positive expression of PD-L1.

图2 免疫组化染色分析膀胱组织细胞胞膜或胞浆 PD-L1 的表达图

Fig.2 The PD-L1 expressed on bladder cancer cell by immunohistochemical analysis

3 讨论

膀胱癌作为泌尿外科最常见的恶性肿瘤,具有多中心性、易复发和易浸润性生长等特点,目前

膀胱癌的标准治疗仍然无法有效降低其复发和进展率。究其原因,考虑与抗肿瘤治疗过程中出现的免疫逃逸相关。而 PD-1/PD-L1 信号正是许多肿瘤细胞实现免疫逃逸的主要途径^[4]。

PD-1/PD-L1 是一对免疫共刺激因子,同属 I

型跨膜蛋白^[5]。在免疫应答的负性调控方面发挥着重要作用。PD-1主要表达于各种程度的活化的T细胞表面^[6]。PD-L1在正常情况下表达于造血细胞、胰岛等组织器官表面,也表达于多种人类实体肿瘤细胞表面。在健康人群中,PD-1/PD-L1信号通路的激活能够有效降低免疫反应对周围组织的损害,避免自身免疫疾病的发生^[7]。但在肿瘤环境下,激活的PD-1/PD-L1信号通路可减弱抗原特异性T淋巴细胞的增值,减少具有抗肿瘤作用的细胞因子的产生,从而诱导免疫耐受,最终导致免疫逃逸^[8-9]。近两年,国外研究者通过临床研究证实PD-1/PD-L1单抗在晚期膀胱肿瘤患者的治疗方面疗效可观,耐受性较好,且副作用较传统的化疗小^[10]。

本研究发现,膀胱癌患者外周血总体CD8⁺T细胞PD-1的表达率高于对照组,且浸润性膀胱癌的总体CD8⁺T细胞PD-1的表达率高于浅表性膀胱癌。由于人体本身具有免疫功能,肿瘤细胞表面的抗原能够激活机体的T细胞,产生针对肿瘤细胞的特异性免疫反应,而活化的T细胞同时能够高表达PD-1^[6]。Shi等^[11]也发现肝癌患者外周血中PD-1的表达较正常人明显升高。随着肿瘤的发展和浸润,机体内T细胞的抗原受体(TCR)被大量的肿瘤相关抗原持续刺激而激活,高表达PD-1的T细胞与其配体PD-L1相互作用后,反向抑制T细胞的增殖和活化,诱导T细胞凋亡,从而使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视和杀伤,导致肿瘤细胞的增殖得不到有效的控制,因而出现肿瘤的进展甚至转移。

本研究通过免疫组化证实PD-L1在膀胱肿瘤细胞胞膜或胞浆的阳性表达率为40.6(26/64),而在正常膀胱组织细胞无PD-L1表达。这与Mukherji等^[12]的研究结果一致。我们进一步的研究发现,浸润性膀胱肿瘤细胞与浅表性膀胱肿瘤细胞PD-L1的表达率无明显差异。究其原因,我们推测可能是:由于已有研究证实肿瘤细胞表面的PD-L1的表达主要是以IFN- γ 依赖的形式完成的^[13]。活化的T细胞可分泌多种细胞因子,包括IFN- γ ,而IFN- γ 能够诱导肿瘤细胞表面PD-L1的表达上调。与此同时,T细胞在肿瘤抗原持续刺激而被激活可高表达PD-1,激活PD-1/PD-L1信号通路,导致T细胞凋亡,凋亡状态下的T细胞分泌细胞因子的能力减弱,无法持续诱导上调

肿瘤细胞表面PD-L1的表达。具体导致T细胞凋亡的机制包括:①肿瘤细胞可以通过表达PD-L1上调活化T细胞表面Fas和FasL的表达,促进具有负性调控作用的细胞因子IL-10的分泌,导致T凋亡^[14];②DCs表面的PD-L1在肿瘤微环境的重用下表达可出现上调,从而促进T细胞分泌IL-10,抑制其分泌IL-2,进而抑制特异性T细胞的增殖和杀伤作用^[15]。

本研究发现,膀胱肿瘤患者外周血CD8⁺T细胞表面PD-1的表达明显高于对照组,且随着肿瘤的进展和浸润表达升高,说明外周血中PD-1在CD8⁺T细胞的表达水平可间接反映膀胱癌的进展程度,这可为今后的膀胱癌的临床诊疗提供一定的指导意义,特别是PD-1靶向阻断治疗提供一定的临床依据。此外,我们还证实膀胱肿瘤细胞表面高表达PD-L1,但与肿瘤的进展无相关。由于研究例数有限,且是回顾性研究,更为准确的临床验证及PD-1/PD-L1信号途径介导的膀胱肿瘤的免疫逃逸相关机制还有待进一步探索和研究。

参考文献:

- [1] Nieder AM, Simon MA, Kim SS, et al. Radical cystectomy after bacillus Calmette-Guerin for high-risk Ta, T1, and carcinoma in situ: defining the risk of initial bladder preservation [J]. *Urology*, 2006, 67(4): 737-741.
- [2] Saito T, Yokosuka T, Hashimoto-Tane A. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microcluster [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(24): 4865-4871.
- [3] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(2): 207-212.
- [4] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance [J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 568-571.
- [5] Obeid JM, Erdag G, Smolkin ME, et al. PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(11): e1235107.
- [6] Soares KC, Rucki AA, Wu AA, et al. PD-1/PD-L1

(下转封三 to page COV3)