

炎症细胞因子诱导 Tca8113 细胞表达 PD-L1 的作用研究*

卢礼兵, 陈 娇, 冯 云, 周陈晨, 张 平[△]

四川大学 口腔疾病研究国家重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 通过研究炎症细胞因子对人舌鳞状细胞癌细胞 Tca8113 中程序性死亡因子配体-1(programmed death 1 ligand-1, PD-L1)的表达的影响,探讨肿瘤炎症微环境在肿瘤细胞免疫逃逸中的作用和机制。**方法** 用流式细胞分析术(FCM)检测 Tca8113 在各种炎症细胞因子[白介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)以及其他诱导条件[牙根卟啉单胞菌代谢产物(Pg-sup)及活化外周血单个核细胞的代谢产物(PHA-sup)]处理下 PD-L1 的表达变化。**结果** PHA-sup、Pg-sup 液、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等炎症相关细胞因子均能诱导 Tca8113 中 PD-L1 的表达,与未做处理的 Tca8113(对照组)比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但 IL-2 诱导后 PD-L1 的表达与对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。与单个炎症细胞因子诱导比较,炎症细胞因子组合诱导的 PD-L1 表达均有增高($P < 0.05$),炎症细胞因子在诱导 PD-L1 表达中相互之间存在协同效应,其中,IL-1 β +IFN- γ 、TNF- α +IFN- γ 以及 IL-1 β +IL-6+IFN- γ +TNF- α 这 3 组的表达量高于其他各组($P < 0.05$)。**结论** 肿瘤微环境炎症细胞因子促进肿瘤细胞表达 PD-L1,在肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用。

【关键词】 炎症细胞因子 程序性死亡因子配体-1 Tca8113

Inflammatory Factors Promote the Expression of PD-L1 in Tca8113 LULi-bing, CHEN Jiao, FENG Yun, ZHOU Chen-chen, ZHANG Ping[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: pingzhang68@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of immunologic escape in the tumor microenvironment, study the expression of programmed death 1 ligand-1 (PD-L1) in Tca8113 with treatment of inflammatory factors. **Methods** The expression of PD-L1 treated with inflammatory factors (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ) was detected by flow cytometry (FCM). **Results** The expression of PD-L1 in Tca8113 was up-regulated conspicuously with treatment of inflammatory factors ($P < 0.05$), including: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ . And the factors played the role in synergistic effects, most significantly in the groups of IL-1 β +IFN- γ , TNF- α +IFN- γ and IL-1 β +IL-6+IFN- γ +TNF- α . But the influence of IL-2 on the expression of PD-L1 was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** With the up-regulated expression of PD-L1, the tumor would be escaped more easily from the immunoreactions, while there were an abundance of inflammatory factors in the tumor microenvironment.

【Key words】 Inflammatory factors PD-L1 Tca8113

炎症细胞因子是免疫系统的辅助因子,主要来源于炎症细胞,例如巨噬细胞、中性粒细胞等。人们曾一度认为这些免疫系统的辅助因子应该能对肿瘤有着一定的抑制作用,然而研究发现,炎症反应的强度和肿瘤的发生率呈正相关^[1]。炎症细胞因子在肿瘤的发生发展中的作用机制至今尚未探明,现在学者普遍认为,炎症细胞因子就如同一把双刃剑对肿瘤有着促进和抑制的双重作用。

程序性死亡因子配体-1(PD-L1)是 B7 家族成员,又名 B7-H1、CD274,对 T 细胞的增殖及细胞因子的分泌起负性调控作用^[2],参与肿瘤免疫逃逸^[3]。

有研究发现,许多肿瘤组织中 PD-L1 的表达率较高^[4,5]。白介素(IL)-1 β 、IL-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)是炎症微环境中常见的几种细胞因子,是淋巴细胞及其他炎症细胞分泌的几种主要炎症细胞因子。我们前期的研究发现,IFN- γ 对人舌鳞状细胞癌细胞 Tca8113 的 PD-L1 表达有明显促进作用,在本研究中我们通过研究炎症细胞因子对 Tca8113 细胞中 PD-L1 表达的影响,探讨炎症细胞因子在肿瘤细胞发生免疫逃逸中的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

* 国家自然科学基金(No. 30972764)资助

[△] 通讯作者, E-mail: pingzhang68@hotmail.com

Tca8113 细胞株,牙龈卟啉单胞菌 ATCC33277 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. g.*)均为本实验室留存,小牛脑心浸液培养基(BHI, Oxoid Ltd., England), RPMI1640 (Gibco, USA), 小牛血清(Gibco, USA), 人淋巴细胞分离液(Ficoll 配制, 上海郎顿生物技术有限公司), 苯甲基磺酰氟(PMSF, 上海生科生物科技有限公司, 溶于 DMSO 使终浓度为 100 mmol/L, -20°C 储存备用), PE 标记的抗人 PD-L1 抗体(BioLegend, USA), 植物血凝素(PHA, Sigma, USA), IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 均购自上海普欣生物技术有限公司, IFN- γ (PeproTech, USA)。

1.2 *P. g.* 代谢产物(Pg-sup)以及 *P. g.* 蛋白抗原(Pg)的制备

P. g. 培养于 BHI 液体培养基中,置于含体积分数 80% N_2 、10% CO_2 和 10% H_2 的厌氧环境中培养 24 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清 Pg-sup 以及细菌沉淀, 上清 0.22 μm 滤器过滤后 -20°C 存储备用。

以 PBS 重悬细菌沉淀,按照 1:100 (V/V) 比例加入蛋白酶抑制剂 PMSF, 采用反复冻融联合超声裂解的方法对细菌进行裂解, 然后 18 000 r/min 离心 15 min, 收集上清即得 Pg, 0.22 μm 滤器过滤后 -20°C 存储备用。

1.3 外周血单个核细胞(PBMC)的提取及活化 PBMC 细胞代谢产物(PHA-sup)的制备

用密度梯度离心法分离 PBMC, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHA 刺激 PBMC 细胞活化 72 h 后, 1500 r/min 离心 12 min 收集上清即得 PHA-sup, -20°C 存储备用。收集 PHA 刺激的 PBMC 备用。另外收集未使用 PHA 刺激的 PBMC 细胞的上清(Unst), -20°C 存储备用。

1.4 细胞培养

Tca8113 细胞培养于含 10% (V/V) 小牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 IU/mL 链霉素的 RPMI1640 完全培养基中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.5 流式细胞术检测 PD-L1 的表达情况

Tca8113 以 2×10^5 /孔的密度种于 6 孔板中,过夜贴壁生长,设置未做处理的正常 Tca8113 作为对照组,实验组分别加入以下试剂进行诱导。

①单独诱导:分别加入 PHA-sup, 20% (V/V); Pg-sup, 20% (V/V); PHA, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Pg, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Unst, 20% (V/V), 炎症细胞因子(IL-

1 β , 20 ng/mL; IL-2, 2000 IU/mL; IL-6, 20 ng/mL; TNF- α , 10 ng/mL; IFN- γ , 10 ng/mL)。

②组合诱导:对于单独诱导无效的炎症细胞因子(与对照组比较 $P > 0.05$),予联合单独诱导中效果最明显的炎症细胞因子诱导。对于单独诱导有效的炎症细胞因子(与对照组比较 $P < 0.05$),予以两两联合及全部联合诱导。

加入上述试剂培养 72 h 后收集细胞, PBS 洗涤后加入 PE 标记的 PD-L1 抗体, 孵育 30 min 后 PBS 洗去残留的抗体, 上机检测 PD-L 的表达。实验重复 3 次。

1.6 统计学方法

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据间比较先采用方差分析, 然后两两比较采用 t 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PHA-sup 和 Pg-sup 对 Tca8113 细胞表达 PD-L1 的影响

如图 1 所示, 与对照组相比, PHA-sup 以及 Pg-sup 对 PD-L1 的表达有促进作用 ($P < 0.05$), 对比直接使用 PHA、Pg 以及 Unst 组中 PD-L1 的低表达, 提示促进 PD-L1 高表达的主要因素源于高活化的 T 细胞所分泌的细胞因子, 以及 Pg-sup 中的相关细胞因子。

2.2 炎症细胞因子单独诱导 PD-L1 表达情况

如图 2 所示, 与对照组 PD-L1 表达的比例 (12.0 ± 1.6)% 比较, 单独作用这几种因子后, 表达比例分别为 IL-1 β : (25.4 ± 0.5)%、IL-6: (34.7 ± 1.1)%、TNF- α : (31.6 ± 1.0)%、IFN- γ : (36.7 ± 2.2)%, 均能提高 PD-L1 的表达 ($P < 0.05$); 而 IL-2 的效果较弱, 仅 (14.7 ± 2.4)%, 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 炎症细胞因子联合作用下 PD-L1 的表达情况

对于单独诱导无效的 IL-2, 联合 IFN- γ 这一作用明显的因子进行诱导。IFN- γ 、IL-2 + IFN- γ 两组 PD-L1 表达均高于 IL-2 组 ($P < 0.05$), 但这两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

对于单独诱导有效的 4 种因子进行组合诱导 Tca8113 后, PD-L1 表达情况的变化见图 4。与炎症细胞因子单独诱导(图 2)进行比较发现, 通过炎症细胞因子的组合 PD-L1 的表达均有增高 ($P < 0.05$)。各联合组 PD-L1 表达量均增加, 与对照组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中, IL-1 β + IFN- γ 、TNF- α + IFN- γ 以及 4 种因子联合诱导

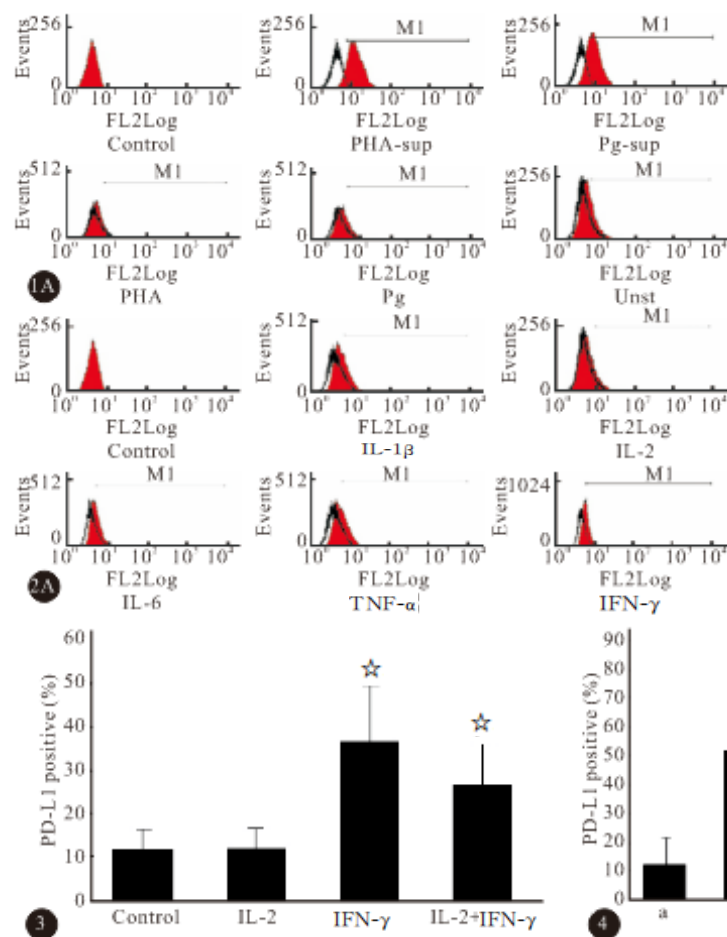


图 1 PHA-sup 和 Pg-sup 提升 Tca8113 细胞 PD-L1 的表达

图 2 IL-1 β 、IL-2、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 单独作用对 PD-L1 表达的影响图 3 IL-2 与 IFN- γ 对于肿瘤细胞 PD-L1 表达的影响

图 4 炎症细胞因子联合诱导 PD-L1 表达

Fig 1 PHA-sup and Pg-sup up-regulate the expression of PD-L1 in Tca8113

Fig 2 The influence on the expression of the PD-L1 by the

factors as followed: IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ Fig 3 The influence of IL-2 and IFN- γ upon the expression of PD-L1

Fig 4 The

co-operation of the inflammatory factors on the PD-L1 expression

1A, 2A: Overlapped with control cells; 1B, 2B: Diagrams. $\triangle P < 0.01$, $\star P < 0.05$, vs. control; $\star P < 0.05$, vs. control and IL-2 group; $\# P < 0.05$, vs. a, b, c, e, f groups; $\blacktriangle P < 0.05$, vs. other groups. Pg: Antigen of *P. g.*; Unst: The supernatant of PBMC with untreatment of PHA; PHA-sup: The supernatant in the culture medium of PBMC activated by PHA; Pg-sup: The supernatant in the culture medium of *P. g.*; a: Control; b: IL-1 β +IL-6; c: IL-1 β +TNF- α ; d: IL-1 β +IFN- γ ; e: IL-6+TNF- α ; f: IL-6+IFN- γ ; g: TNF- α +IFN- γ ; h: IL-1 β +IL-6+TNF- α +IFN- γ

这 3 组的增幅最为显著,表达量高于其他各联合组 ($P < 0.05$),但这 3 组间表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

人体免疫系统具有免疫监视功能,能正确识别自己和非己,对非己物质进行免疫应答。然而现实条件下肿瘤却极少能自然消退,相反,肿瘤细胞在人体免疫功能的作用下仍能发展、转移,说明肿瘤在人体内存在广泛的免疫逃逸。

关于肿瘤细胞发生免疫逃逸的研究中, B7 家族的研究是近年来的热点之一。PD-L1 可以通过 CD28 非依赖性与受体 PD-1 结合共刺激 T 细胞,使 T 细胞分泌 IL-10、IFN- γ 、单核/巨噬细胞集落刺

激因子(GM-CSF),从而下调细胞免疫应答。另外, PD-L1 还可以诱导 T 细胞发生活化诱导的细胞死亡(AICD)。PD-L1 分子在多种恶性肿瘤组织中均有表达,并且与肿瘤患者的预后有关^[4,5]。

本研究发现,在混有 PHA 活化的 PBMC 上清培养条件下, Tca8113 肿瘤细胞 PD-L1 呈现高表达,提示肿瘤细胞通过表达 PD-L1 发生免疫逃逸受到炎性微环境的影响。在炎症反应中,细菌感染是常见的致炎因素,所以在炎症微环境中常常含有大量细菌代谢产物,将实验中常见牙周致病菌——牙龈卟啉单胞菌代谢产物(Pg-sup)作为诱导条件,本研究发现 Pg-sup 对 Tca8113 中 PD-L1 的表达也有明显的促进作用,这可能与致炎细菌代谢产物中所含有的各种因子有关。

近年来,炎症与肿瘤的关系受到越来越多的关注。早已得到证实,慢性炎症对肿瘤的发生、发展有着一定作用,约占所有肿瘤的 15%^[6]。许多上皮来源的肿瘤以及其周围基质中,总能找到多种免疫细胞,如吞噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等。肿瘤相关性巨噬细胞(TAMs)是浸润到肿瘤组织中的外周血单核巨噬细胞,与肿瘤关系复杂,现在普遍认为它同时发挥着促进和抑制的双向作用,其详细机制尚未探明。在胃癌、部分结直肠癌以及鼻咽癌的研究中发现 TAMs 主要发挥抑制肿瘤作用,但在肺癌、乳腺癌等肿瘤中,TAMs 的促肿瘤作用则占主导地位^[7-9]。例如,TAMs 能通过活化肿瘤细胞的 NF- κ B 和 JNK 通路,增强上皮肿瘤细胞侵袭能力^[10];TAMs 分泌的 TNF- α 活化肿瘤细胞的 NF- κ B 经典途径,诱导基质金属蛋白酶(MMP)的上调,从而增强乳腺癌细胞的侵袭能力^[11,12]。这些相关通路的研究为炎症细胞因子的作用提供了依据,TAMs 作为肿瘤微环境中重要的炎症细胞,也为许多炎症细胞因子提供了来源。

在肿瘤组织周边和间质中可以见到许多瘤浸润淋巴细胞(TIL),其生物学特性、功能以及数量都与正常组织中的淋巴细胞有着巨大区别,TIL 虽有激活,但却无法正常发挥其效应功能。在炎症环境中,T 细胞受到活化后会分泌各种炎症细胞因子,如 IL-2、IFN- γ 等,从而激活 TAMs 释放 IL-1、IL-6、TNF- α 等。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 是常见的几种炎症细胞因子,在促进炎症形成的同时,也能显著提高 Tca8113 肿瘤细胞 PD-L1 的表达,通过 PD-L1 的高表达,抑制 TIL 的增殖和功能发挥,从而抑制 T 细胞对肿瘤细胞的免疫反应。早有文献^[13,14]报道,IL-1、TNF- α 等能激活转录因子 κ B 抑制蛋白激酶- β (IKK- β),从而激活 NF- κ B 通路,而 NF- κ B 的激活对 PD-L1 的表达起着重要的调节作用。另外,根据我们前期的实验(结果待发表),IFN- γ 能通过 PKD2 途径调节 PD-L1 的表达。本研究发现,炎症细胞因子联合作用时,Tca8113 细胞 PD-L1 的表达更为显著,提示这些因子同时存在于肿瘤细胞周围时,能相互发挥协同效应,促进肿瘤细胞通过增加 PD-L1 的表达,进行免疫逃逸。

虽然 IL-2 也是重要的炎症细胞因子,在免疫应答过程中发挥着中枢性作用,但本研究发现,IL-2 单独诱导时却没有明显促进肿瘤细胞 PD-L1 的表达,而且通过与诱导效果明显较强的 IFN- γ 联合作用的对比,PD-L1 的表达未有明显提高,提示 IL-2 不能直接通过提高 PD-L1 表达促进肿瘤细胞发生免疫逃逸。但是不能排除的是,IL-2 可以通过促进淋巴细胞增殖和活化,提升其他炎症细胞因子的分泌,从而促进肿瘤细胞发生免疫逃逸。

以上结果提示,在炎症细胞和炎症细胞因子组成的微环境中,这些对炎症有明显促进作用的细胞因子,通过大幅提升 PD-L1 的表达,使肿瘤细胞发生免疫逃逸,致使炎症的加深和肿瘤的发展形成恶性循环,这也是至今肿瘤治疗过程中的难题。这些细胞因子的平衡如果能得到控制,将会成为控制肿瘤细胞生长和发展的重要手段^[15]。

本研究对几种常见细胞因子对 Tca8113 肿瘤细胞 PD-L1 的表达进行了比对和筛选,探讨了炎症环境对肿瘤免疫逃逸过程的影响。这些细胞因子是如何通过信号通路影响 PD-L1 的表达,以及完成其协同作用,这将是本研究后续工作努力探明的问题。而对炎症细胞因子在肿瘤免疫逃逸过程中功能的研究,在肿瘤的免疫治疗中具有指导性意义。

参 考 文 献

- 1 Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer; an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*, 2007; 121(11): 2373-2380.
- 2 Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*, 2000; 290(5489): 84-89.
- 3 Dong H, Strome SE, Salomao DR, *et al.* Tumor associated B7-H1 promotes T cell apoptosis; a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 2002; 8(8): 793-800.
- 4 Geng L, Huang D, Liu J, *et al.* B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008; 134(9): 1021-1027.
- 5 Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, *et al.* Survivin and B7-H1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2007; 13(6): 1749-1756.
- 6 Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology*, 2002; 16(2): 217-226.
- 7 Chen JJ, Lin YC, Yao PL. Tumor associated macrophages; the double edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol*, 2005; 23(5): 953-964.
- 8 Leek RD, Harris AL. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002; 7(2): 177-189.
- 9 Nakayama Y, Nagashima N, Minagawa N, *et al.* Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2002; 22(6C): 4291-4296.
- 10 Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, *et al.* Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF- κ B and JNK. *J Immunol*, 2005; 175(2): 1197-1205.
- 11 Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, *et al.* Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metallo proteases. *Carcinogenesis*, 2004; 25(8): 1543-1549.
- 12 Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, *et al.* Wnt 5a signaling is critical for macrophage induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; 103(14): 5454-5459.
- 13 Paul PT, Gary SF. NF- κ B; a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*, 2001; 107(1): 7-11.
- 14 Greten FR, Eckmann L, Greten TF, *et al.* IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 2004; 118(3): 285-296.
- 15 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002; 420(6917): 860-867.

(2012-03-13 收稿, 2012-07-24 修回)

编辑 吕 熙