

B7-H4 对宫颈癌患者外周血活化 T 细胞增殖、凋亡和分泌细胞因子的影响*

张燕¹, 王婷婷¹, 徐曼^{1△}, 黄文炼¹, 罗玮², 肖琳²

(1. 重庆医科大学病理教研室/重庆医科大学分子与肿瘤研究中心 400016;

2. 重庆医科大学第一附属医院妇产科, 重庆 400016)

[摘要] **目的** 观察重组人 B7-H4 蛋白对宫颈癌患者外周血 T 细胞增殖周期、凋亡及分泌细胞因子的影响。**方法** B7-H4 分别与 15 例宫颈癌患者外周血活化淋巴细胞混合培养 48 h 后, 采用流式细胞术分析 T 细胞增殖、细胞周期、凋亡及各亚群 T 细胞的变化, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 芯片检测培养上清液细胞因子含量。**结果** 宫颈癌患者外周血 T 细胞与 B7-H4 混合培养 48 h 后, G1、G2 和 S 期的 T 细胞分别占 90.59%、8.55% 和 0.87%, 空白对照组 T 细胞各期占 92.83%、6.09% 和 1.13%; B7-H4 组 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的 Ki67 阳性率分别为 2.13%±0.13% 和 1.03%±1.33%, 空白对照组为 2.74%±0.98% 和 1.71%±1.32%。B7-H4 组较空白对照组 CD8⁺T 和 CD4⁺T 细胞占 T 细胞的比例下降, 但 CD4⁺T/CD8⁺T 比值增高, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞增多; B7-H4 组混合培养上清液中 TGF-β1 含量为 (259.25±32.78) pg/mL, 空白对照组为 (202.75±20.17) pg/mL。B7-H4 对宫颈癌患者外周血活化 T 细胞凋亡无明显影响。**结论** B7-H4 使宫颈癌患者外周血活化 T 细胞被阻滞于 G2 期, S 期细胞明显减少; B7-H4 抑制 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞增殖, 但对 Foxp3⁺T 细胞增殖和分泌 TGF-β1 可能有促进作用; B7-H4 对 T 细胞凋亡无明显影响。B7-H4 在抑制宫颈癌抗肿瘤细胞免疫中发挥作用, 它可能成为宫颈癌免疫治疗的潜在靶点。

[关键词] T 细胞周期; 宫颈肿瘤; Foxp3⁺; CD4⁺; CD8⁺**[中图分类号]** R711.74**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)26-3628-03

Influence of B7-H4 on cell proliferation, apoptosis and cytokine secretion of peripheral blood activated T cells in cervical cancer patients^{*}

Zhang Yan¹, Wang Tingting¹, Xu Man^{1△}, Huang Wenlian¹, Luo Wei², Xiao Lin²

(1. Department of Pathology, Molecular Medicine and Tumor Research Center of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To observe the in vitro influence of recombinant human B7-H4 protein on the cell proliferation cycle, apoptosis and cytokine secretion of peripheral blood activated T lymphocytes in cervical cancer patients. **Methods** After 48 h co-culture of peripheral blood T lymphocytes in 15 cases of cervical cancer with B7-H4 48 h, T lymphocytes' cell proliferation cycle, apoptosis and T lymphocytes subtypes changes were detected by FCM; the cytokines concentration in the culture supernatant was tested by ELISA array. **Results** After 48 h co-culture of peripheral blood T lymphocytes with B7-H4 48hs, G1, G2 and S phase of T cells accounted for 90.59%, 8.55% and 0.87% respectively, which of the blank group were 92.83%, 6.09% and 1.13% respectively; the Ki67 positive rates of CD4⁺T and CD8⁺T cells in the B7-H4 group were 2.13%±0.13% and 1.03%±1.33% respectively, which of the blank group were 2.74%±0.98% and 1.71%±1.32% respectively; the proportion of CD4⁺T and CD8⁺T cells accounting for T cells in the B7-H4 group was decreased compared with the blank group, but the ratio of CD4⁺T/CD8⁺T and the proportion of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T cells were increased, in addition, the TGF-β1 secretion; concentration in the co-culture supernatant in the B7-H4 group was (259.25±32.78)pg/mL, which was higher than (202.75±20.17)pg/mL in the blank group. B7-H4 had no significant influence on the peripheral blood activated T cells apoptosis. **Conclusion** B7-H4 block the peripheral blood activated T cells at G2 phase, the S phase cells are obviously decreased; B7-H4 inhibits the cellular proliferation of CD4⁺T and CD8⁺ cells, but may have the promoting effect on Foxp3⁺T proliferation and TGF-β1 secretion; B7-H4 has no significant influence on T cell apoptosis. B7-H4 plays a role in depressing anti-tumor T cell immune response of cervical cancer and may become a potential target of cervical cancer immunotherapy.

[Key words] cell cycle; cervical neoplasm; Foxp3⁺; CD4⁺; CD8⁺

宫颈癌患者机体内免疫环境改变造成肿瘤细胞免疫逃逸是肿瘤发生发展的原因之一, 近来研究发现一些共刺激分子参与了负性调控抗肿瘤免疫反应。B7-H4 是共刺激分子 B7 家族成员之一, 它可能与活化 T 细胞的未知受体结合, 调控 T 细胞的增殖周期和功能^[1-3]。B7-H4 在人正常组织不表达或偶见

表达, 但在多种恶性肿瘤高表达。作者前期在回顾性研究中发现, 人宫颈癌高表达 B7-H4 与肿瘤内浸润的 CD8⁺T 细胞数量减少及分泌干扰素-γ (IFN-γ) 下降有关, 但与浸润的 CD4⁺T 和 Treg 细胞数量无关^[4]。为了体外观察 B7-H4 对宫颈癌患者 T 细胞免疫的影响, 本研究采用流式细胞术分析了 B7-H4

* 基金项目: 重庆市自然科学基金 (CSTC2009BB5268)。作者简介: 张燕 (1988-), 硕士研究生, 主要从事肿瘤与免疫方面的研究。

△ 通讯作者, E-mail: 349232467@qq.com。

对外周血活化 T 细胞增殖、细胞周期、凋亡以及 T 细胞亚群的影响,用酶联免疫吸附试验(ELISA)芯片检测了 B7-H4 对 T 细胞分泌转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 收集 15 例宫颈癌患者的新鲜抗凝外周血用于体外实验。液态人重组 B7-H4 蛋白(6576-B7)购于美国 RD 公司;鼠抗人 Foxp3(No. 12-4771)、CD4-FITC(No. 11-0049)、CD8-FITC(No. 11-0086)、小鼠 IgG1-PE(No. 12-4714)和 IgG1-FITC(No. 11-4714)购自美国 eBioscience 公司,均是液态试剂;鼠抗 Ki67(液态)购自美国 BD 公司;人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司;尼龙毛购自德国 Kisker 公司;RPMI1640 培养液购自美国 Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;PHA 冻干粉购自美国 Sigma 公司;Annexin V-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司;ELISA 芯片购自 Raybiotech 公司。

1.2 外周血 T 细胞分离培养 宫颈癌患者抗凝外周血经 Ficoll 密度梯度离心后,过尼龙毛柱获得 T 细胞并接种于 24 孔板,每孔 T 细胞 $500 \mu\text{L}$ ($1 \times 10^6 / \text{mL}$),加入 PHA($10 \mu\text{g}/\text{mL}$)刺激 24 h。将 T 细胞分为两组,实验组加入终浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组人 B7-H4,空白对照组加入等体积 PBS 共培养 48 h。

1.3 T 细胞细胞周期和增殖检测 收集 T 细胞经 70%冰乙醇固定后加入 RNA 酶和 PI 染色, 4°C 避光孵育 45 min,流式细胞术检测 T 细胞周期。T 细胞分别与鼠抗人 CD4-FITC、鼠抗人 CD8-FITC 和鼠抗 Ki67-PE 避光孵育 15 min 后,流式细胞术检测 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的 Ki67 阳性率。

1.4 T 细胞凋亡检测 收集的 T 细胞经 Annexin V-PE/7-AAD、鼠抗人 CD4-FITC、鼠抗人 CD8-FITC 和鼠抗人 CD3-PE 避光孵育 15 min 后,流式细胞术检测细胞凋亡和 CD4⁺、CD8⁺ 细胞亚群比例。

1.5 分析 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞的比例 T 细胞经鼠抗人 CD4-FITC,鼠抗人 CD25-TRITC,鼠抗人 Foxp3 PE 避光孵育 15 min 后,流式细胞术检测 T 淋巴细胞内 CD4⁺CD25⁺T 细胞及 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞比例。

1.6 细胞因子含量检测 ELISA 芯片室温充分复温后,将 B7-H4 与 T 细胞共培养 48 h 的上清液各 $200 \mu\text{L}$ 分别加入芯片小孔内,室温摇床孵育 2 h 后弃孔内液体并充分清洗。再在各膜中依次加入生物素标记抗体和 Cy3-链霉亲和素孵育 2 h 并清洗。将检测液 C 和检测液 D 等量混匀,在膜表面加 $500 \mu\text{L}$ 检测混合液,反应完毕后放入芯片检测仪进行结果分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-H4 对外周血活化 T 细胞周期和增殖的影响 B7-H4 与宫颈癌患者外周血 T 细胞混合培养 48 h 后,G1 期、G2 期和 S 期的 T 细胞分别占 90.59%、8.55%和 0.87%,而空白对照组分别占 92.83%、6.09%和 1.13%,B7-H4 组的 G2 期细胞较空白对照组多,而 S 期细胞明显少于空白对照组(图 1)。

流式细胞术检测细胞增殖标志物 Ki67 结果显示,B7-H4 组宫颈癌患者外周血处于增殖期的 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞分别为 $2.13\% \pm 0.13\%$ 和 $1.03\% \pm 1.33\%$,低于空白对照组 $2.74\% \pm 0.98\%$ 和 $1.71\% \pm 1.32\%$ (图 2)。

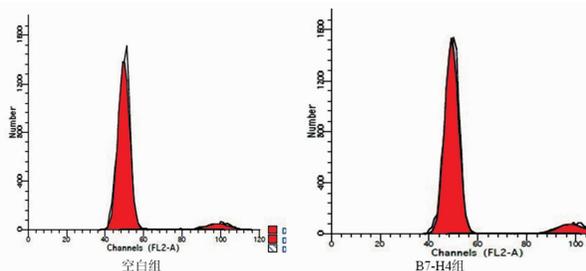


图 1 宫颈癌患者外周血 T 细胞增殖周期

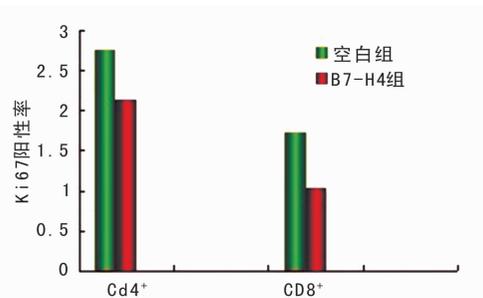


图 2 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞 Ki67 阳性率

2.2 B7-H4 对外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 和 Foxp3⁺T 细胞所占比例的影响 B7-H4 与宫颈癌患者外周血活化 T 细胞混合培养 48 h 后,CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞占 CD3⁺T 细胞的百分比分别为 $40.02\% \pm 2.70\%$ 和 $17.93\% \pm 1.90\%$;空白对照组则为 $46.75\% \pm 7.30\%$ 和 $25.98\% \pm 3.40\%$ 。B7-H4 组 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞占 CD3⁺T 细胞百分比均明显低于空白对照 ($P < 0.05$),见图 3。B7-H4 组 CD4⁺T / CD8⁺T 比值为 2.23,明显高于空白对照组的 1.79(图 3)。

本研究进一步分析 B7-H4 对宫颈癌患者外周血 T 细胞 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞的影响,结果发现与 B7-H4 共培养 48 h 后,CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的 $55.2\% \pm 1.95\%$,而空白对照组 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的 $46.4\% \pm 4.21\%$,两组间存在明显差异 ($P < 0.05$),见图 4。

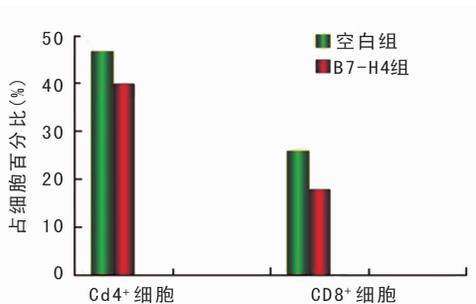


图 3 B7-H4 对外周血 T 细胞亚群的影响

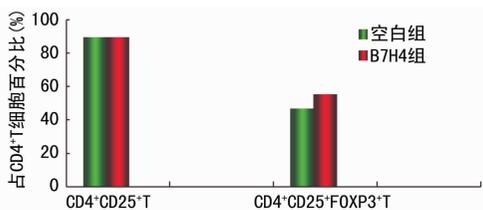


图 4 B7-H4 对外周血 Foxp3⁺T 细胞亚群的影响

2.3 B7-H4 对外周血活化 T 细胞凋亡的影响 B7-H4 蛋白与宫颈癌患者外周血活化混合培养 48 h 后,T 细胞的平均凋

亡率为 $36.2\% \pm 1.4\%$, 空白对照组平均凋亡率 $34.5\% \pm 1.5\%$, 两组间无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 5。

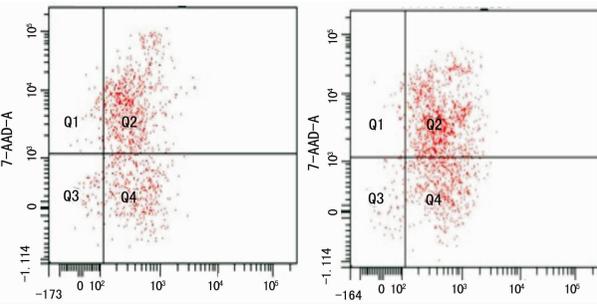


图 5 宫颈癌患者外周血 T 细胞凋亡比例

2.4 B7-H4 对 T 细胞分泌 TGF- β 1 的影响 ELISA 芯片检测结果显示, B7-H4 与活化 T 细胞共培养 48 h 后, 上清液中 TGF- β 1 含量为 (259.25 ± 32.78) pg/mL, 空白对照组为 (202.75 ± 20.17) pg/mL, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究采用重组人 B7-H4 与子宫颈癌患者外周血活化 T 细胞混合培养 48 h 后, 观察到 B7-H4 使 T 细胞周期阻滞于 G2 期, 且 S 期细胞 (DNA 合成) 明显减少, 该结果与 Park 等^[5]报道 B7-H4 表达于 EBV⁺ 淋巴瘤细胞株, 可使其细胞周期阻滞相似。本研究进一步检测 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞增殖标记物 Ki67 的阳性率, 发现 B7-H4 使活化 T 细胞中处于增殖状态的 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞减少, 但 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值高于空白对照组, 提示 B7-H4 抑制 CD8⁺ T 细胞增殖的作用强于 CD4⁺ T 细胞。该结果与本课题组前期观察到子宫颈癌组织内 B7-H4 高表达与局部浸润的 CD8⁺ T 细胞减少有关, 与 CD4⁺ T 细胞数量无明显关系相一致。

CD4⁺ T 细胞包括辅助 T 细胞和调节 T 细胞亚群, 辅助 T 细胞不仅促进 T 细胞分化成熟并发挥细胞免疫功能, 也促进 B 细胞产生抗体^[6]; 调节 T 细胞则通过与靶细胞直接接触或分泌 TGF- β 1 负性调节免疫反应, 抑制抗肿瘤免疫^[7]。文献报道 Treg 细胞在肿瘤局部浸润的淋巴细胞中比例增高, 肿瘤患者外周血和局部淋巴结内 Treg 细胞数量也增多, 且 Treg 细胞与肿瘤进展以及肿瘤治疗效果不佳有关^[8-9]。因转录因子叉状头 Foxp3 是调节性 T 细胞最具特征性的标志物, 本研究用 Foxp3 标记 Treg 细胞, 发现 B7-H4 与宫颈癌患者外周血活化 T 细胞共培养 48 h 后, CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 细胞比例明显高于空白对照组, 提示 B7-H4 可能对 Foxp3⁺ Treg 细胞的增殖有促进作用, 但该作用有待进一步实验证实。邓敏端^[10]也发现宫颈鳞癌组织中 Foxp3 表达明显比正常宫颈上皮组织和 CIN 高; Zeng 等^[11]报道 Foxp3⁺ Treg 细胞在宫颈癌细胞的发生和发展过程中起到重要作用; Tuve 等^[12]观察到宫颈癌患者外周血 Treg/CD8⁺ T 细胞比值增高, 小鼠的子宫颈癌模型也存在该现象。仅去除小鼠体内的 Treg 细胞不能抑制肿瘤生长, 如果同时在肿瘤局部联合抑制细胞毒 T 细胞相关抗原 4 则能增强抗肿瘤免疫, 抑制肿瘤生长。提示肿瘤局部 CD8⁺ T 细胞减少和 Treg 细胞增多与宫颈癌发生发展明显相关。陈春燕等^[13]发现 B7-H4 和 Foxp3 在乳腺癌均高表达, 并且与肿瘤临床分级和淋巴结转移相关, 而且 Treg 细胞在肿瘤内浸润淋巴细胞中所占的比例越高, 肿瘤患者的生存率就越低^[14-15], 因此作者推测 B7-H4 抑制 CD8⁺ T 细胞增殖和免疫功能, 可能促进 Foxp3⁺ T 细胞增殖, 从而使宫颈癌局部微环境的免疫水平低

下, 有利于癌细胞的免疫逃逸。

TGF- β 1 在肿瘤进展过程中具有双向调节作用, 在肿瘤早期通过促进细胞凋亡和阻滞细胞增殖而抑制多种上皮性肿瘤细胞生长; 但在肿瘤晚期能下调肿瘤微环境免疫水平、促进肿瘤血管形成和肿瘤进展。本实验观察到在与 B7-H4 共培养 48 h 后的 T 细胞上清液中 TGF- β 1 的含量较空白对照组增高, 流式细胞术检测到 Foxp3⁺ T 细胞在 CD4⁺ T 细胞中所占比例增高, 提示 B7-H4 蛋白可能对 Treg 细胞增殖和分泌 TGF- β 1 均有促进作用, 从而使宫颈癌局部的抗肿瘤免疫水平下降, 促进宫颈癌进展。由于收集宫颈癌患者外周血 Foxp3⁺ T 细胞数量有限, 本研究无法进一步观察 B7-H4 对 Foxp3⁺ T 细胞的直接作用。

本研究还观察到 B7-H4 组与空白对照组间 T 细胞的凋亡率无显著差别, 提示 B7-H4 对外周血活化 T 细胞凋亡无明显影响。虽然有研究者观察到恶性肿瘤细胞表达 B7-H4 基因影响瘤细胞凋亡, 如朱森良等^[6]发现沉默前列腺癌 DU145 细胞的 B7-H4 基因后, 癌细胞增殖减弱而凋亡细胞增多; Salceda 等^[17]观察到敲除乳腺癌细胞的 B7-H4 基因可导致肿瘤细胞凋亡增多, 但两位作者均观察到 B7-H4 表达于瘤细胞影响其增殖和凋亡, 与本实验的研究方法完全不同。

综上所述, B7-H4 抑制 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞增殖, 但可能促进 Foxp3⁺ Treg 细胞增殖, 使宫颈癌微环境 T 细胞亚群分布发生改变, 同时 Foxp3⁺ Treg 分泌 TGF- β 1 增多, 导致宫颈局部微环境对癌细胞的免疫监视和清除能力下降, 在子宫颈癌的发生发展中发挥重要作用。B7-H4 有望作为临床宫颈癌诊断、判断预后及免疫治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] Park GB, Song H, Kim YS et al. Cell cycle arrest induced by engagement of B7-H4 on Epstein-Barrvirus-positive B-cell lymphoma cell lines[J]. Immunology, 2009, 28(3): 360-368.
- [2] Caigan Du, Yuzhou Wang, et al. The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development [J]. J Exp & Clin Cancer Res, 2011, 30: 12.
- [3] He C, Qiao H, Jiang H, et al. The inhibitory role of B7-H4 in antitumor immunity: association with cancer progression and survival [J]. Clin Dev Immunol, 2011, 695834. doi:10.1155/2011/695834.
- [4] 王婷婷, 徐曼, 耿卫朴, 等. B7-H4 在人子宫颈癌的表达及其与肿瘤内浸润 T 细胞亚群的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 9(28): 812-816.
- [5] Park GB, Song H, Kim YS, et al. Cell cycle arrest induced by engagement of B7-H4 on Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma cell lines [J]. Immunology, 2009, 128(3): 360-368.
- [6] Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity[J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(2): 203-216.
- [7] Heiber JF, Geiger TL. Context and location dependence of adaptive Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cell formation during immunopathological conditions[J]. Cell Immunol, 2012, 279(1): 60-65.
- [8] Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, (下转第 3633 页)