

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.31.002

# PD-L1 在结肠癌患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> 调节性 T 细胞中的表达及其临床意义\*

梁姣姣<sup>1</sup>, 居颂文<sup>1</sup>, 高志欣<sup>2Δ</sup>

(南京医科大学附属苏州医院北区:1. 消化系疾病与营养研究中心;2. 消化科, 苏州 215008)

**[摘要]** **目的** 探讨 PD-L1 在结肠癌患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞上的表达及其与肿瘤病理分期之间的相关性。**方法** 采用流式细胞术分析了 47 例结肠癌患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞的含量及其 PD-L1 的表达。**结果** 和健康人比较, 结肠癌患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞的含量显著上升, 并且 PD-L1 的表达明显升高。进一步的分析表明, PD-L1 的表达和结肠癌的病理分期呈正相关, 而术后患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞 PD-L1 的表达则显著下降。**结论** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞数量及 PD-L1 表达的升高可能导致了免疫抑制的增强, 这可能是促进肿瘤免疫逃逸的重要因素。

**[关键词]** PD-L1; 结肠癌; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞

**[中图分类号]** R735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)31-4324-03

**The clinical expression significance of PD-L1 on the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells in the peripheral blood of colon cancer\***

Liang Jiaojiao<sup>1</sup>, Ju Songwen<sup>1</sup>, Gao Zhixin<sup>2Δ</sup>

(1. Research Center of Digestive Diseases and Nutrition; 2. Department of Gastroenterology, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215008, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of PD-L1 in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells in the peripheral blood of colon cancer and the correlation with clinical stage. **Methods** The expression of PD-L1 on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells from 47 samples of the peripheral blood of colon cancer was analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with those from healthy donor, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells and expression of PD-L1 on these cells increased significantly ( $P < 0.01$ ). Further analysis showed that expression of PD-L1 increased with the increase of clinical stage of colon cancer ( $P < 0.01$ ), and decreased significantly after postoperation ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Increase of proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg cells and the expression of PD-L1 may enhance the suppression of antitumor immunity, and thereby promote tumor immunoescape.

**[Key words]** PD-L1; colonic neoplasms; T-lymphocytes, regulatory; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup>

调节性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(regulatory T, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg) 细胞是机体重要的负性免疫调节成分。Treg 细胞约占外周 CD4<sup>+</sup> 细胞的 5%~10%, 这类细胞数量虽少但功能强大在机体免疫稳态维持、肿瘤免疫等方面发挥着重要作用<sup>[1-5]</sup>。FOXP3 在 Treg 细胞发育和功能中起关键作用, 是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞特异性的标记<sup>[6]</sup>。新近研究发现, 健康人外周血 T 淋巴细胞中 CD127 和 Foxp3 的表达呈负相关, CD127 可以识别 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg 细胞与活化的 T 细胞, 因此, 根据细胞表面 CD127 表达, 可将 Treg 细胞定义 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞<sup>[7-8]</sup>。Treg 细胞通过细胞间接触依赖机制发挥作用或分泌 IL-10 和 TGF-β1 等细胞因子, 抑制 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和树突状细胞等其他免疫细胞的活性和功能<sup>[9]</sup>。PD-L1 是新发现的 B7 家族中的共刺激分子, PD-L1 与 T 细胞表面的相应配体 PD-1 结合, 传递负反馈信号, 抑制 T 细胞的激活和效应应答, 肿瘤细胞表达的 PD-L1 能抑制细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的抗肿瘤活性, 从而逃避免疫攻击<sup>[9-11]</sup>。而 PD-L1 在肿瘤患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞上的表达及临床意义目前研究较少, 本研究探讨了结肠癌患者外周血中 PD-L1 在 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞上的表达及其与肿瘤病理分期及患者荷瘤状况之间的相关性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 分别采集结肠癌患者血样 47 份, 其中男 25

份, 女 22 份, 年龄 31~82 岁, 平均 62.5 岁, 同时采集健康人血样 10 份作对照, 其中男 5 份, 女 5 份, 年龄 26~80 岁, 平均 49.2 岁。患者样本来自南京医科大学附属苏州医院北区和苏州大学附属第二人民医院。所有患者样本在化学治疗、放射治疗之前采集。

**1.2 方法** 采用聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)密度梯度离心法从肝素全血中分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。各种合适滴度的单克隆抗体与单细胞悬液在 4℃ 条件下孵育染色 20 min。同时用同型对照的单克隆抗体孵育单细胞悬液, 以判断非特异性染色的程度。然后应用 FACSCalibur 流式细胞仪上机检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验; 计数资料采用率表示, 组间采用  $\chi^2$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

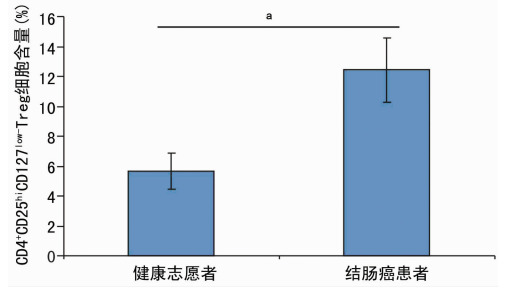
**2.1 结肠癌患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞上 PD-L1 的表达** 结肠癌患者以及健康志愿者的 PBMCs 分别标记抗不同的荧光抗体(CD4-FITC 单抗、CD25-PECy5 单抗、CD127-APC 单抗、PD-L1-PE 单抗, BD 公司)。流式细胞术分析 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup> Treg 细胞的含量及其 PD-L1 的表达。与健康志愿者比较, 结肠癌患者的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low/-</sup>

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373149); 江苏省科技计划项目(BK20151195); 苏州市科技计划项目资助(SYS201363)。

作者简介: 梁姣姣(1988-), 本科, 主要从事肿瘤免疫学研究。 Δ 通讯作者, E-mail: humoab@hotmail.com。

Treg 细胞的百分含量明显增加 ( $P < 0.01$ ), 见图 1, 且  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞 PD-L1 分子的表达明显上升 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。进一步的分析表明, PD-L1 分子在 III 期和 IV 期患者  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞上的表达明显高于 I 期和 II 期患者, 见图 3。

**2.2  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg PD-L1 的表达与肿瘤患者的荷瘤状况相关性** 结肠癌患者手术前和手术后 3 周的 PBMCs 分别标记 CD4-FITC 单抗、CD25-PECy5 单抗、CD127-APC 单抗、PD-L1-PE 单抗, 流式细胞仪分析  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞上 PD-L1 的表达。研究结果表明, 术后结肠癌患者  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 上 PD-L1 的表达较术前明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ 。

图 1 结肠癌患者外周血中  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞含量明显增加

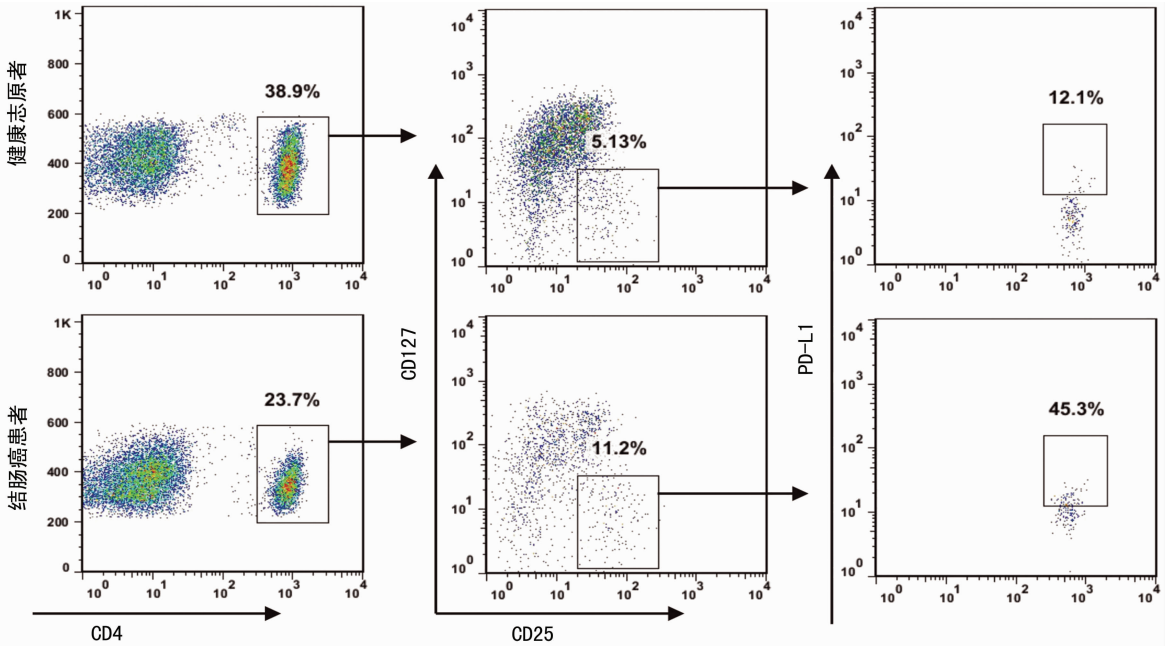
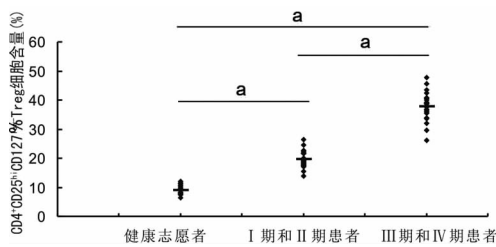
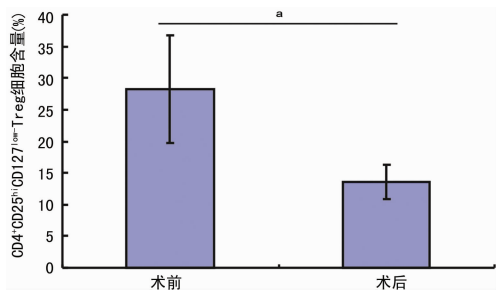


图 2 PD-L1 分子在结肠癌患者外周血  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 中表达升高



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ 。

图 3 PD-L1 分子在不同分期结肠癌患者外周血  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞中表达变化



<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ 。

图 4 手术后 PD-L1 分子在结肠癌患者外周血  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 中表达下降

### 3 讨论

诸多报道表明, Treg 细胞的增加是导致肿瘤逃逸的重要因素。例如, 在非小细胞肺癌和卵巢癌患者肿瘤浸润淋巴细胞中 Treg 的含量明显增多<sup>[12-13]</sup>。在胃肠道肿瘤患者中  $CD4^+ CD25^-$  T 细胞明显减少而 Treg 细胞数量增多, 且 Treg 细胞数量的增高与较差的预后和较低的生存率高度相关<sup>[14]</sup>。Treg 数量的增加在头颈部鳞癌、肝癌、多发性骨髓瘤等许多肿瘤患者中也均有报道<sup>[15-16]</sup>。本研究也证实, 在结肠癌患者外周血中  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞的百分含量明显增加。进一步的研究表明  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞上 PD-L1 表达明显升高。统计分析结果表明, 晚期患者 PD-L1 的表达水平明显高于早期患者。手术后患者  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞上 PD-L1 表达明显降低。PD-L1 分子在 Treg 细胞上的表达水平与肿瘤分期密切相关, 随着肿瘤的缩小或切除, PD-L1 分子的表达水平会随之不同程度下降, 说明 PD-L1 表达水平与肿瘤负荷相关。PD-L1 是重要的免疫抑制分子, PD-L1 与 PD-1 结合后抑制 T 细胞、B 细胞、NK 细胞功能, 从而介导肿瘤免疫逃逸。因此, 本研究结果提示, PD-L1 分子在  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞上的表达水平升高可能导致了  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞免疫抑制功能的提高, 进而增强了对其他免疫细胞的抗肿瘤能力的抑制, 而随着肿瘤的进展 PD-L1 分子的表达水平随之升高,  $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low/-}$  Treg 细胞的免疫抑制功能进一步增强。因此, PD-L1 分子在

Treg 细胞上表达水平的监测对评价结肠癌治疗效果、疾病进展及预后具有重要价值。

#### 参考文献

- [1] Miska J, Abdulreda MH, Devarajan P, et al. Real-time immune cell interactions in target tissue during autoimmune-induced damage and graft tolerance[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(3):441-456.
- [2] Rojo JM, Ojeda G, Acosta YY, et al. Characteristics of TCR/CD3 complex CD3 epsilon chains of regulatory CD4 (+)T (Treg) lymphocytes; role in Treg differentiation in vitro and impact on Treg in vivo[J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 95(3):441-450.
- [3] Rooney CM. Can Treg elimination enhance NK cell therapy for AML? [J]. *Blood*, 2014, 123(5):3848-3849.
- [4] Sawant DV, Gravano DM, Vogel P, et al. Regulatory T cells limit induction of protective immunity and promote immune pathology following intestinal helminth infection [J]. *J Immuno*, 2014, 192(6):2904-2912.
- [5] Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(7):523-532.
- [6] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. FOXP3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells[J]. *Nature Immunol*, 2003, 4(4):330-336.
- [7] Liu WH, Putnam AL, Zhou XY, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells[J]. *J Exp Med*, 2006(203):1701-1711.
- [8] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells[J]. *J Exp Med*, 2006, 203(7):1693-1700.
- [9] Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H, a third member of

the B7 family, costimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. *Nat Med*, 1999, 5(12):1365-1369.

- [10] Cao YJ, Zhang L, Ritprajak P, et al. Immunoregulatory molecule B7-H1 (CD274) contributes to skin carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14):4737-4741.
- [11] Radvanyi L, Pilon-Thomas S, Peng W, et al. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(19):1021-1034.
- [12] Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)-CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(12):4766-4772.
- [13] Ichihara F, Kono K, Takahashi A, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(12):4404-4408.
- [14] Salama P, Phillips M, Grieu F, et al. Tumor-Infiltrating FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(2):186-192.
- [15] Schaefer C, Kim GG, Albers A, et al. Characteristics of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(5):913-920.
- [16] Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6):2457-2464.

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-07-16)

(上接第 4323 页)

- Oktay G. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities in human keloids, hypertrophic and atrophic scars: a pilot study[J]. *Cell Biochem Funct*, 2009, 27(2):81-87.
- [8] 张文, 赵洁, 毕朝晖. 心肌损伤标志物在小儿病毒性心肌炎诊断中的应用进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2009, 8(11):119-121.
- [9] 陈小婷, 欧斌贤, 唐屈, 等. 苦参碱对体外培养人增生性瘢痕成纤维细胞 MMP-1、MMP-9 表达的影响[J]. *广西医学*, 2014, 43(5):624-626.
- [10] 李文娟, 陈伟, 付小兵, 等. 基质金属蛋白酶及其抑制因子在增生性瘢痕中的表达特征及意义[J]. *感染、炎症、修复*, 2005, 6(4):207-209.
- [11] 李开通, 刘达恩, 陈小婷, 等. 水蛭素对增生性瘢痕基质金属蛋白酶-2、9 表达作用的影响[J]. *山东医药*, 2012, 52(20):28-29, 88.
- [12] Parks WC. Matrix metalloproteinases in lung repair[J]. *Eur Respir J Suppl*, 2003, 44:36s-38s.
- [13] Low TL, Hu SK, Goldstein AL. Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations [J]. *Mol Cell Biochem*, 1981, 78(2):1162-1166.
- [14] 于虎, 张朔瑒, 马瑞珏, 等. 胸腺素 β4 促进创伤愈合机制的研究进展[J]. *国际生物医学工程杂志*, 2010, 33(4):

235-238.

- [15] Sosne G, Xu L, Prach L, et al. Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 293(1):175-183.
- [16] Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, et al. Thymosin β4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair [J]. *Nature*, 2004, 432(7016):466-472.
- [17] Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, et al. Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection [J]. *Circulation*, 2008, 117(17):2232-2240.
- [18] Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin beta(4) stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells[J]. *FASEB J*, 1997, 11(6):474-481.
- [19] 朱璇. 胸腺素 β4 对人增生性瘢痕成纤维细胞胶原合成和 CTGF 表达的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2013.
- [20] 李艳, 王冠, 于虎, 等. 重组胸腺素 β4 调节 ICAM-1、MMP-2 和 LN-5 促进创伤愈合的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2008, 4(3):142-145, 163.
- [21] Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1994, 6(5):717-725.

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-07-16)