

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.06.019

鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ 的 MDSC 检测钟运超,黄静静,张骞予,张康[△]

(广西壮族自治区梧州市人民医院/右江民族医学院附属梧州医院肿瘤科,广西梧州 543000)

[摘要] **目的** 探讨鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ 的髓源性抑制细胞(MDSC)的分布比例,为鼻咽癌免疫治疗提供有益指导。**方法** 选择该院肿瘤科收治的 45 例鼻咽癌患者和 20 例健康志愿者作为健康对照组,均在第 1 次化疗前和第 2 周期诱导化疗后 7 d 抽取患者外周血标本,同时抽取健康对照组人群外周血;并在流式细胞仪上做 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ 的 MDSC 测定。**结果** 鼻咽癌患者外周血存在 MDSC 比例明显高于健康对照组($P<0.05$)。而且随着Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期分期的升高,鼻咽癌患者外周血 MDSC 比例也逐渐升高($P<0.05$)。鼻咽角化癌、鼻咽分化型非角化癌和未分化型非角化癌 3 种不同病理类型鼻咽癌患者外周血 MDSC 比例均高于健康对照组($P<0.05$)。3 种不同病理类型的鼻咽癌患者外周血 MDSC 比例也差异有统计学意义($P<0.05$)。经过 2 周期诱导化疗后各期鼻咽癌的患者外周血 MDSC 比例均有显著降低($P<0.05$),但其比例水平仍然高于健康对照组人群。**结论** 鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ 的 MDSC 比例明显升高,提示可能与鼻咽癌免疫逃避有关,值得进一步研究。

[关键词] 外周血;髓源性抑制细胞;鼻咽肿瘤**[中图法分类号]** R739.6**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)06-0783-03Detection of peripheral blood HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC in patients with nasopharyngeal carcinomaZHONG Yunchao, HUANG Jingjing, ZHANG Qianyu, ZHANG Kang[△]

(Department of Oncology, Wuzhou Municipal People's Hospital/Affiliated Wuzhou Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Wuzhou, Guangxi 543000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the distribution proportion of peripheral blood HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the patients with nasopharyngeal carcinoma(NPC) to provide a beneficial guidance for NPC immunotherapy. **Methods** Forty-five NPC patients and 20 healthy volunteers as the healthy control group were selected. The peripheral blood sample was collected before the first time chemotherapy and on 7 d after the second cycle induction chemotherapy, meanwhile the peripheral blood sample was collected in the healthy control group; then HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC were detected by the flow cytometry. **Results** The peripheral blood MDSC ratio of NPC patients was significantly higher than that of healthy control group($P<0.05$). With the NPC stageⅡ,Ⅲ andⅣ increase, the peripheral blood MDSC ratio was gradually increased ($P<0.05$). The MDSC ratio of NPC patients with three different pathological types of keratin type squamous carcinoma, differentiated and undifferentiated type non-keratin type squamous carcinoma was significant higher than that of healthy control group($P<0.05$). The peripheral blood MDSC ration also had statistical difference among the NPC patients with 3 kinds of different pathological type($P<0.05$). The peripheral blood MDSC ratio in NPC patients with different stages was significantly decreased after 2-cycle induction chemotherapy ($P<0.05$), but its ratio level was still higher than that of the healthy control group. **Conclusion** The peripheral blood HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC ratio in the NPC patients is significantly increased, suggesting that which may be related with NPC immune escape and is worth further study.

[Key words] peripheral blood; myeloid-derived suppressor cells; nasopharyngeal neoplasms

鼻咽癌是东南亚最常见的头颈部恶性肿瘤,放射治疗是其主要的治疗手段。鼻咽癌在临床确诊时 70% 以上是中晚期。但中晚期的鼻咽癌 5 年生存率仍低。主要失败的原因是局部复发和远处转移。免疫治疗在降低复发和远处转移方面有独到的优势。目前,免疫治疗已成为恶性肿瘤新的治疗方法。而免疫治疗主要集中在免疫逃逸的研究。髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)可以通过多种机制介导肿瘤免疫逃逸,促进肿瘤的发生、发展。因此 MDSC 是继调节性 T 细胞之后的另外一个备受关注的细胞,是一群缺乏淋巴细胞标志,未分化完全的骨髓源性异质性细胞群,是树突状细胞,巨噬细胞和(或)粒细胞前体。MDSC 在人外周血的分子标志为 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺。MDSC 在鼻咽癌领域研究较少。为进一步了解 MDSC 在鼻咽癌患者外周血 HLA-

DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ 的 MDSC 比例情况,本研究对 45 例鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC 进行了检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1 月至 2015 年 7 月在本医院住院的 45 例鼻咽癌患者,其中男 23 例,女 22 例,年龄 60~65 岁(平均 62.5 岁)。均经病理组织确诊(鼻咽角化癌 8 例,鼻咽分化型非角化癌 14 例,未分化型非角化癌 23 例)。按照国际抗癌联盟 2009 年分期标准进行分期,其中Ⅱ期 10 例、Ⅲ期 15 例、Ⅳ期 20 例。全部病例均在放疗前均接受了 2 周的奈达铂联合 5-FU(NF 方案)的诱导化疗。全部病例均在第 1 次化疗前及第 2 周期诱导化结束后 7 d 抽取患者外周血,同时签署知情同意书,并获得本院伦理委员会批准。另外抽取 20 例健康志愿者

的外周血作为健康对照组。所有研究对象既往无肿瘤和系统疾病史,脏器功能基本正常,无伴有严重并发症等。

1.2 流式细胞仪检测 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC 的表达水平

1.2.1 试剂与仪器 CD11b FITC(美国 BD 公司),CD33PE(美国 BD 公司),CD14 FITC(美国 BD 公司),HLA-DR -APC(美国 BD 公司),FACSTM Permeabilizing Solution2(10×),购自美国 BD 公司,BD FACSTM lysing Solution(10×),购自美国 BD 公司,PBS 由博士德生物工程有限公司生产,台式离心机 Labofuge 400R Thermo Fisher 产品;BD FACSCalibur 流式细胞仪(BECTON DICKINSON),漩涡混匀仪(VORTEX-GENIE)。

1.2.2 检测方法 依据实验 Panel 为样本管编号,将待用抗体置于冰盒上备用。在试管中按 Panel 加入试剂规格要求的膜表面抗体;根据细胞计数结果加入适量的样本量;低速混匀 3 s,室温孵育 20 min;向每个试管中加入红细胞裂解液 2 mL,混匀,在室温避光 10 min;温育后立即在室温离心 1 500 r/min,5 min;弃上清液,加 2 mL PBS 重悬,低速混匀 3 s,室温离心 1 500 r/min,5 min,倒掉上清液;加入 1 mL 破膜剂室温避光 10 min,室温离心 1 500 r/min,5 min,弃上清液;加 2 mL PBS 洗涤,低速混匀 3 s,室温离心 1 500 r/min,5 min,弃上清液;加入细胞内标记抗体,低速混匀 3 s,室温孵育 30 min;向试管中加 2 mL PBS 重悬,低速混匀 3 s,室温离心 1 000 r/min,5 min,倒掉上清液;最后加入 0.5 mL 含 1%多聚甲醛 PBS 重悬,上机检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用方差分析,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 鼻咽癌患者与健康对照组人群外周血 MDSC 的分布情况 II、III、IV 期鼻咽癌患者外周血和健康对照组人群外周血均存在 MDSC,分别是 $(0.89 \pm 0.22)\%$ 、 $(1.19 \pm 0.20)\%$ 、 $(1.58 \pm 0.39)\%$ 和 $(0.20 \pm 0.02)\%$,鼻咽癌患者外周血存在 MDSC 比例明显高于健康对照组人群($F = 104.92, P < 0.05$)。而且随着 II、III、IV 期分期的升高,鼻咽癌患者外周血 MDSC 比例也逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 不同病理类型的鼻咽癌患者外周血 MDSC 分布情况 本研究检测了鼻咽角化癌、鼻咽分化型非角化癌和未分化型非角化癌 3 种不同病理类型患者外周血 MDSC 分布,结果显示:鼻咽角化癌、鼻咽分化型非角化癌和未分化型非角化癌 3 种不同病理类型鼻咽癌患者外周血 MDSC 比例分别是 $(0.85 \pm 0.23)\%$ 、 $(1.21 \pm 0.20)\%$ 、 $(1.46 \pm 0.44)\%$,均高于对照组人群的比例 $(0.20 \pm 0.02)\%$ ($F = 71.82, P < 0.05$)。3 种不同病理类型的鼻咽癌患者外周血 MDSC 比例也有差异($P < 0.05$),其中以未分化型非角化癌表达最高,达 $(1.46 \pm 0.44)\%$ 。

2.3 NF 方案诱导化疗前后鼻咽癌患者外周血 MDSC 分布比例 经过 2 个周期化疗后,各期患者外周血的 MDSC 比例均有显著降低,其中 II 期化疗前 $(0.89 \pm 0.22)\%$ 、化疗后 $(0.41 \pm 0.24)\%$ ($F = 5.89, P < 0.05$),III 期化疗前 $(1.19 \pm 0.20)\%$ 、化疗后 $(0.53 \pm 0.21)\%$ ($F = 9.65, P < 0.05$),IV 期化疗前 $(1.58 \pm 0.39)\%$ 、化疗后 $(0.99 \pm 0.31)\%$ ($F = 7.72, P < 0.05$)。但其表达水平仍然高于健康对照组人群。

3 讨 论

鼻咽癌是东南亚最常见的头颈部恶性肿瘤,以广东、广西

高发。放射治疗是其主要的治疗手段。但复发和转移仍然是鼻咽癌的主要死因。研究表明:肿瘤的发生、发展与机体免疫监视,免疫耐受,免疫逃逸和免疫无能等免疫紊乱有关。免疫耐受的持续存在,引起突变的细胞对宿主体内的免疫监视功能的无反应性,出现肿瘤逃逸,与其有关的主要是 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞(Treg)细胞,肿瘤相关巨噬细胞(TAM)和髓源性抑制细胞(MDSC)等 3 种免疫抑制细胞。其中 MDSC 是一群髓源祖细胞中具有免疫抑制功能的细胞,健康人体内的含量很低,不会发生免疫抑制;但在烧伤,自身免疫疾病,急性或慢性感染等病理状态下,血清中 MDSC 比例会显著上升,进而发挥免疫抑制作用。而且是处于不同分化阶段对肿瘤具有免疫抑制作用的异质性细胞群。在人类细胞中分子标志主要表达 CD11b⁺CD33⁺但缺乏 CD14⁻和 HLA⁻DR⁻[1]。在肿瘤微环境中 MDSC 可以诱导局部免疫耐受[2],其免疫耐受不仅与肿瘤细胞本身因素如肿瘤抗原调变、MHC 分子、共刺激分子表达降低有关,也与肿瘤引起的机体免疫功能异常关系密切。主要通过以下几种机制诱导肿瘤抗原特异性的细胞免疫耐受,包括释放转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素(IL)-10 等细胞因子诱导调节 T 细胞(Treg),II 型巨噬细胞的产生间接抑制 T 细胞增殖和活性;清除半胱氨酸可以抑制正常 APC 对 T 细胞的激活;通过产生活性氧,一氧化氮合成酶和精氨酸酶抑制 T 细胞增殖,促进 T 细胞凋亡;产生膜结合型 TGF- β 以直接方式抑制 T 细胞活性等[3]。另外 MDSC 还可以在肿瘤部位分化成调节性 DC,后者引起的 T 细胞分泌 IFN- γ 能力下降[4]。而抑制或杀伤肿瘤诱导的 MDSC 可以提高 T 细胞功能[5]。大量研究表明:鼻咽癌患者出现一系列免疫功能紊乱,造成机体对微生物及其毒素的反应发生异常改变,免疫异常对鼻咽癌细胞的种植、黏附、增生具有直接或间接作用,从而诱发鼻咽癌的不断发展与恶化。鼻咽癌患者外周血的 MDSC 通过在数量上的增加等因素发挥免疫抑制效应[6]。研究报道在荷瘤小鼠和肿瘤患者的外周血中可以检测到 MDSC 细胞明显升高,并且具有很强的免疫抑制作用[7-8]。而健康者则不具有或仅有很弱的免疫抑制作用。肿瘤患者外周血 MDSC 比例显著高于健康人群,其 MDSC 数量与肿瘤分期呈正相关[9],其远处转移也与肿瘤患者外周血 MDSC 数量显著增加有关[10-11],从而直接参与肿瘤免疫逃逸和远处转移。本研究发现鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC 比例明显高于健康对照人群的 HLA-DR-CD33⁺CD14⁻CD11b⁺ MDSC 比例($P < 0.05$);随分期的上升而明显增多($P < 0.05$),与文献[12]报道相似。可能因为肿瘤源性因子(TDFs)通过 STATS 信号途径促进 MDSC 的募集和扩增有关。提示这群细胞在鼻咽癌的发生、发展中起一定作用,可以用于判断病情,协助临床分期。进一步对鼻咽角化癌,鼻咽分化型非角化癌和未分化型非角化癌 3 种类型的 MDSC 比例进行分析,发现鼻咽角化癌,鼻咽分化型非角化癌和未分化型非角化癌 3 种类型患者外周血 MDSC 比例均高于健康对照组人群($P < 0.05$)。值得注意的是,在 3 种不同病理类型之间,其外周血 MDSC 比例也存在差异($P < 0.05$),其中以未分化型非角化癌表达最高达 $(1.46 \pm 0.44)\%$ 。说明肿瘤分化程度越低,外周血中 MDSC 比例增高越明显。与文献[13-14]报道基本一致。提示其对判断患者预后具有一定意义。本研究也发现化疗在一定程度上能降低 MDSC 水平,两个周期 NF 方案化疗前后比较有显著差异($P < 0.05$),但其结果仍然比健康对照组高。说明诱导化疗是能通过减少 MDSC 的比例,能部分恢复免疫功能。

综上所述,肿瘤患者免疫功能与肿瘤发生、发展,以及对患者预后的影响已经受到广大学者们的广泛关注,本研究对鼻咽癌不同期别、不同病理类型及诱导化疗前后鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺ CD14⁻ CD11b⁺ 的 MDSC 比例做了初步研究,发现鼻咽癌患者外周血 HLA-DR-CD33⁺ CD14⁻ CD11b⁺ 的 MDSC 比例明显升高,提示可能与鼻咽癌免疫逃避有关,值得进一步研究。

参考文献

[1] ALBEITUNI S H,DING C,YAN C. Hampering immune suppressors;therapeutic targeting of myeoid-deried sup-pressor cells in cancer[J]. Cancer J,2013,19(6):490-501.

[2] TONGU M,HARASHIMA N,MONMA H,et al. metro-nomic chemotherapy with low-dose cyclophosphamide plus gemcitabine can induce anti-tumor T cell immunity in vivo[J]. Cancer Immunol Immunother,2013,62(2):283-391.

[3] GANTT S,GERVASSI A,JASPAN H,et al. The role of myeloid derived suppressor cells in immune ontogeny[J]. Front Immunol,2014,5(3):387.

[4] ZHANG H,GUTKIN D W,HAN B,et al. Origin and pharmacological modulation of tumor-asociated regulation dendric cells [J]. Int J Cancer,2014,134(11):2633-2645.

[5] GAO Q,JIANG J,CHU Z,et al. Arsenic trioxide inhibits tumor-induced myeloid-derived suppressor cells and en-hances T-cell activity[J]. Oncol Lett,2017,13(4):2141-2150.

[6] 张娜,蓝瑞隆,钟光贤. MCT1 在鼻咽癌病人外周血 MD-SC 中的表达及意义[J]. 大连医科大学学报,2016,38(2):114-117.

(上接第 782 页)

癌干细胞的相关性[J]. 中国医学科学院学报,2013,35(2):171-176.

[12] KATANODA K,YAKO-SUKETOMO H. Comparison of time trends in breast cancer mortality(1990-2006) in the world,from the WHO mortality database[J]. Jpn J Clin Oncol,2010,40(2):182-183.

[13] MESLIN F,HAMAÏ A,GAO P,et al. Silencing of prion protein sensitizes breast adriamycin-resistant carcinoma cells to TRAIL-mediated cell death[J]. Cancer Res,2007,67(22):10910-10919.

[14] ANDERSON D,SEIB C,TJONDRONEGORO D,et al. The women's wellness after cancer program;a multisite, single-blinded, randomised controlled trial protocol[J]. BMC Cancer,2017,17(1):98-99.

[15] VIVEK R,THANGAM R,NIPUNBABU V,et al. Multi-functional HER2-Antibody conjugated polymeric nano-carrier-Based drug delivery system for multi-drug-resist-ant breast cancer therapy[J]. ACS Appl Mater Inter-faces,2014,6(9):6469-6480.

[7] 李亚东,刘瑞青,刘杰,等. 非小细胞肺癌患者外周血 MD-SC 的比例及意义[J]. 中国实用医刊,2013,40(1):61-64.

[8] 郑全辉,刘英文,张雪梅. 肺癌小鼠 MDSC 和 T 细胞变化[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(5):595-599.

[9] GABRILOVICH D I,NAGARAJ S. Myeloid-derived-sup-pressor cells as regulators of the immune System[J]. Nat Rev Immunol,2009,9(3):162-174.

[10] DIAZ-MONTERO C M,SALEM M L,NISHIMURA M I,et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage,metastatic tumor burden,and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy [J]. Cancer Immunol Immunother,2009,58(1):49-59.

[11] LI Z L,YE S B,OUYANG L Y,et,al. COX-2 promotes metastasis in nasopharyngeal carcinoma by mediating in-teractions between cancer cells and myeloid-derived sup-pressor cells [J]. Oncoimmunology, 2015, 4 (11): e1044712.

[12] SINHA P,OKORO C,FOELL D,et al. proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-de-rived suppressor cells[J]. Immunol,2008,181(7):4666-4675.

[13] 吴志丹,王胜军. 髓源性抑制细胞在胃癌患者外周血的变化及临床意义[J]. 江苏大学学报(医学版),2013,23(5):414-416.

[14] 肖秀兰,任统伟. 宫颈鳞癌患者放疗前后外周血中 MDSC 和调节性 T 细胞含量变化及其与放疗敏感性的关系[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(11):843-850.

(收稿日期:2017-07-23 修回日期:2017-10-16)

[16] 顾玺,张文海. miRNA 在乳腺癌化疗耐药中的作用[J]. 中国肿瘤临床,2014,41(8):538-541.

[17] KUMAR S,KEERTHANA R,PAZHANIMUTHU A,et al. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients[J]. Indi-an J Biochem Biophys,2013,50(3):210-214.

[18] 俞万钧,汪一萍,李纪鹏,等. miR-134 调控人肺腺癌细胞顺铂耐药[J]. 中国病理生理杂志,2015,31(7):1214-1218.

[19] 阳圣,张雯,杨燕青,等. 胃癌组织 miRNA 差异表达的初步分析[J]. 上海交通大学学报(医学版),2010,30(11):1317-1323.

[20] 窦越,唐勇. 微小 RNA 在胃癌中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志,2015,42(10):780-782.

[21] GAO Y T,LIU T,HUANG Y Y. MicroRNA-134 sup-presses endometrial cancer stem cells by targeting PO-GLUT1 and Notch pathway proteins [J]. FEBS Lett,2015,589(2):207-214.

(收稿日期:2017-07-03 修回日期:2017-09-12)