

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.10.008

肾细胞癌中自然杀伤细胞的可塑性及其临床作用的研究*

夏 洋¹, 张琼方^{2△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科 400010; 2. 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室/重庆医科大学病毒性肝炎研究所/重庆医科大学附属第二医院感染科 400010)

[摘要] **目的** 检测自然杀伤细胞(NK细胞)在肾细胞癌(RCC)患者癌组织和癌旁组织中可塑性及其与疾病的相关性。**方法** 收集30例RCC患者的癌组织和癌旁组织,经过密度梯度离心法获得组织浸润的淋巴细胞,采用流式细胞术检测组织浸润的淋巴细胞中NK细胞比例,统计其表型分布的特征,并分析其变化与肿瘤分期之间的相关性。**结果** 与癌旁组织(8.53±3.00)%相比,癌组织中NK细胞的比例明显增加(14.43±3.96)%;且与癌旁组织比,癌组织中NK细胞高表达1型固有淋巴细胞(ILC1)的表面标志CD127[(7.97±2.65)% vs. (12.66±2.88)%]、CD49a[(8.70±3.90)% vs. (16.49±5.02)%]、TRAIL[(13.77±3.82)% vs. (19.76±3.75)%],低表达NK细胞的转录因子Eomes[(9.20±3.41)% vs. (4.82±1.20)%]。同时ILC1样细胞的比例随着肿瘤TNM分期增高逐渐增多。**结论** RCC患者癌组织中NK细胞转换为ILC1样细胞,且与疾病进展密切相关。

[关键词] 癌,肾细胞;杀伤细胞,自然;细胞可塑性;淋巴细胞;流式细胞术

[中图法分类号] R692.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)10-1585-04

Plasticity of natural killer cells and its clinical role in renal cell carcinoma*

XIA Yang¹, ZHANG Qiongfang^{2△}

(1. Department of Urinary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases/Ministry of Education, Institute for Viral Hepatitis, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To detect the plasticity of natural killer cells (NK cells) in tumor tissues and adjacent tissues of patients with renal cell carcinoma (RCC) and their correlation with disease. **Methods** The tumor tissues and adjacent tissues of 30 patients with RCC were collected. The infiltrating lymphocytes were obtained by density gradient centrifugation, and the proportion of NK cells in infiltrating lymphocytes was detected by flow cytometry. The characteristics of their phenotypic distribution were analyzed, and the correlation between the changes and tumor stage was analyzed. **Results** Compared with the adjacent tissues [(8.53±3.00)%], the proportion of NK cells in tumor tissues [(14.43±3.96)%] increased significantly. Compared with the adjacent tissues, intrinsic lymphocyte cell type 1 (ILC1) related surface markers, including CD127 [(7.97±2.65)% vs. (12.66±2.88)%], CD49a [(8.70±3.90)% vs. (16.49±5.02)%], and TRAIL [(13.77±3.82)% vs. (19.76±3.75)%] increased in NK cells of tumor tissues, and Eomes [(9.20±3.41)% vs. (4.82±1.20)%], a transcription factor of NK cells, decreased in NK cells of tumor tissues. The proportion of ILC1-like cells gradually increased with the progress of TNM stage. **Conclusion** NK cells in tumor tissues transformed into ILC1-like cells in patients with RCC, and these ILC1-like cells were closely related to disease progress.

[Key words] carcinoma, renal cell; killer cells, natural; cell plasticity; lymphocytes; flow cytometry

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是泌尿外科常见恶性肿瘤,其发病率位居泌尿生殖系统肿瘤第

2位^[1-4]。关于RCC的发病机制至今尚未完全阐明,目前普遍认为其发生、发展的过程与机体的免疫功能

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81802545/81902474)。 作者简介:夏洋(1989—),住院医师,博士,主要从事肾脏疾病的发病机制及治疗研究。 △ 通信作者, E-mail:304367@cqmu.cn。

有着密切的联系^[5]。固有淋巴细胞(innate lymphoid cells, ILC)是近年来新发现的参与固有免疫的异质性淋巴细胞,在免疫系统发挥重要的作用,其中早年发现的自然杀伤细胞(natural killer cell, NK 细胞)和淋巴组织诱导细胞也被纳入这一新的细胞类群当中。根据固有淋巴细胞分泌的细胞因子可将其分为三大群,1 类 ILC 以分泌干扰素(IFN)- γ 为标志,包括 NK 细胞和 ILC1;2 类 ILC 以产生白细胞介素(IL)-5、IL-9、IL-13 等细胞因子为标志;3 类 ILC 则由淋巴组织诱导细胞和 ILC3 组成,以产生 IL-17、IL-22 为标志^[6-8]。免疫细胞在疾病的进展过程中会发生不同亚群间的转换,即为免疫细胞的可塑性。学者研究发现不同的 ILC 细胞亚群也可发生转换,说明其存在可塑性。有研究表明,肿瘤中 NK 细胞可转换形成 ILC1 样细胞,降低其杀伤效应,促进肿瘤的进展^[9]。而 NK 细胞这种可塑性在 RCC 中尚少有报道。因此,本研究采用流式细胞术对 RCC 患者癌组织和癌旁组织中 NK 细胞进行检测和分析,探索 NK 细胞可塑性与 RCC 之间的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2017 年 1 月至 2019 年 12 月重庆医科大学附属第二医院收治的 30 例 RCC 患者,其中男 18 例、女 12 例,年龄 30~80 岁,临床分期 I 期 10 例、II 期 12 例、III 期 6 例、IV 期 2 例。其中, I~III 期患者均行 RCC 根治术治疗,而 IV 期患者行姑息性减瘤手术治疗。本研究纳入患者治疗前血常规、肝功能及肾功能均正常,且无自身免疫性疾病,无急、慢性炎症反应,不伴有其他原发性恶性肿瘤。纳入患者手术前未使用任何化疗及靶向免疫治疗。本研究经重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准同意[科伦预审(2018)134 号]。单克隆流式抗体购自美国 BD 公司,胶原酶购自美国 Sigma IV-Aldrich 上海公司, DNA 酶购自上海生物生工公司。

1.2 方法

将获得的 RCC 癌组织和癌旁组织置于 10 cm 培养皿中,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)清洗两遍。弃上清液,将组织置于 200 目膜之上,使用 5 mL 注射器活塞末端研磨后加入常温 Ficoll 淋巴细胞分离液。研磨后的组织碎片经 1% 胶原酶和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA 酶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中消化 1 h。再经常温 Ficoll 淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,获得组织淋巴细胞。调整组织细胞浓度为 1×10^6 个/mL,每管取 100 μL ,按试剂说明加入适量体积荧光标记的 BD 公司单克隆流式抗体:利用 CD45、CD3、CD56 检测 NK 细胞的频数,并同时检测 NK 细胞上 ILC 相关细胞标志 CRTH2、CD117、NKp44、CD49a、CD127、TRAIL 及

Eomes 的表达。使用 IgG 作为阴性对照。外标抗体(CRTH2、CD117、NKp44、CD49a、CD127、TRAIL)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min。将外标完成后的细胞悬液弃上清液后,加入 2% 多聚甲醛(PFA)细胞固定液,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定,加细胞穿膜液(0.1%)后离心,弃上清液,按试剂说明书加入内标(Eomes)流式抗体,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 、共孵育 2 h。流式缓冲液洗涤后,用 BD Canto II 流式仪(美国)检测,并用 FlowjoV10 流式软件分析流式数据。

1.3 统计学处理

统计学软件 Graphpad Prism8. 3. 0 进行处理分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织浸润的 NK 细胞频数规律分布

组织浸润 CD45⁺CD3⁻CD56⁺ 的 NK 细胞圈门策略略见图 1A。流式细胞术分别检测 30 例 RCC 患者癌组织及癌旁组织中 NK 细胞的比例。与癌旁组织(8.53 ± 3.00)% 相比,癌组织中 NK 细胞的比例(14.43 ± 3.96)% 明显上调($P < 0.001$,图 1B)。

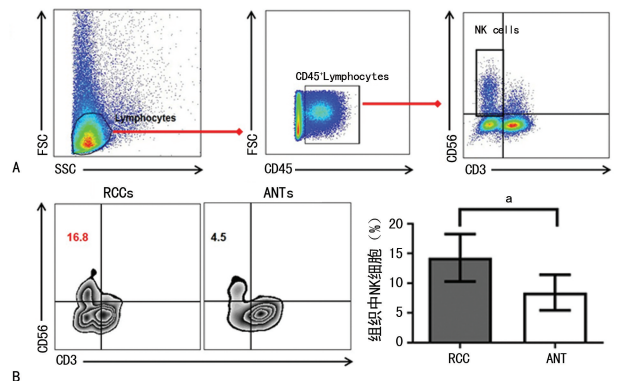
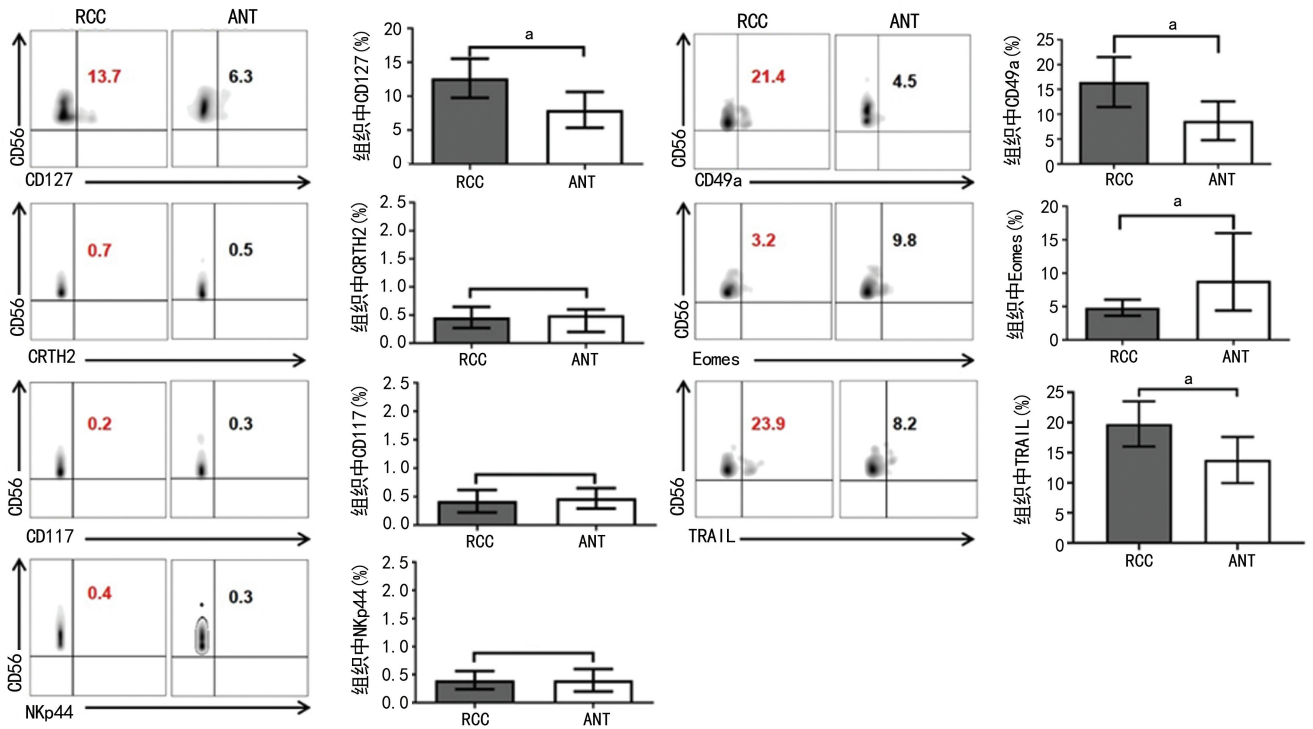


图 1 肾脏组织 NK 细胞圈门策略;B:比较 RCC 患者癌组织及癌旁组织中 NK 细胞频数。ANT:癌旁组织;^a: $P < 0.001$ 。

图 1 RCC 癌组织及癌旁组织中 NK 细胞的频数比较

2.2 RCC 浸润的 NK 细胞具有 ILC1 细胞样特性

流式进一步检测 RCC 患者癌组织及癌旁组织中 NK 细胞上 ILC 相关细胞标志 CD127、CRTH2、CD117、NKp44、CD49a、Eomes 及 TRAIL,见图 2。与癌旁组织相比,癌组织中 NK 细胞高表达 ILC1 细胞标志 CD127[(7.97 ± 2.65)% vs. (12.66 ± 2.88)%, $P < 0.001$],CD49a[(8.70 ± 3.90)% vs. (16.49 ± 5.02)%, $P < 0.001$],TRAIL[(13.77 ± 3.82)% vs. (19.76 ± 3.75)%, $P < 0.001$],低表达 NK 细胞固有的转录因子 Eomes[(9.20 ± 3.41)% vs. (4.82 ± 1.20)%, $P < 0.001$]。而 ILC2 相关的细胞标志 CRTH2[(0.46 ± 0.16)% vs. (0.46 ± 0.19)%, $P > 0.05$], ILC3 相关的细胞标志 NKp44[(0.41 ± 0.12)% vs. (0.40 ± 0.16)%, $P > 0.05$]及 NK 细胞受体 CD117[(0.47 ± 0.17)% vs. (0.42 ± 0.20)%, $P > 0.05$]并



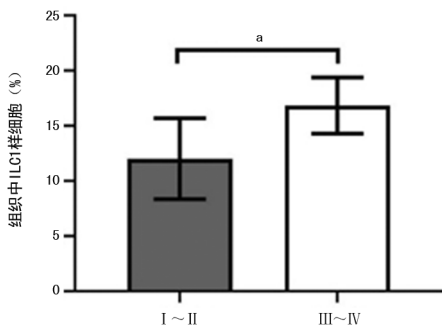
ANT: 癌旁组织; ^a: $P < 0.001$.

图 2 RCC 患者癌组织及癌旁组织中 NK 细胞上 ILC1 相关细胞标志的表达比较

无明显变化。

2.3 ILC1 样细胞与临床相关性分析

根据肿瘤特性、淋巴结范围、是否远处转移采用 TNM 分期, 将纳入研究的 30 例 RCC 患者分为 I 期、II 期、III 期、IV 期, 比较不同分期患者 ILC1 样细胞的频数分布, 见图 3。临床分期在 III~IV 期的 RCC 患者癌组织中 ILC1 样细胞的比例明显高于 I~II 期的 RCC 患者 [$(16.84 \pm 2.55)\%$ vs. $(12.03 \pm 3.67)\%$, $P < 0.001$, 图 3]。



^a: $P < 0.001$.

图 3 RCC 患者不同分期癌组织中 ILC1 样细胞比例比较

3 讨论

RCC 是最常见的肾脏恶性肿瘤, 其发病率和病死率仅次于膀胱癌, 并且呈逐年上升的趋势, 是影响居民健康的主要肿瘤之一。目前临床诊断出 RCC 时, 已经有 1/4~1/3 的患者出现转移病灶, 而转移患者的中位生存期只有 8~12 个月, 5 年的生存率不足 10%^[1-3]。晚期 RCC 对放疗、化疗、内分泌治疗等多

种治疗手段均不敏感, 所以有必要寻找新的治疗方式。RCC 因其具有较高的自发消退率及存在大量组织浸润淋巴细胞, 是少数的具有较强免疫原性的肿瘤^[6]。研究 RCC 免疫功能及其免疫细胞状态发生变化的机制, 对寻求解决免疫治疗的方法有着重要的参考价值^[10-12]。目前对固有免疫细胞在肿瘤中的大多数研究尚处在探索阶段, 对于 RCC NK 细胞的研究, 则主要集中在其表面受体的变化上^[13]。本研究初步探索 NK 细胞在 RCC 中的可塑性, 以期为固有免疫应用于 RCC 的临床治疗提供初步的实验数据。

NK 细胞与 ILC1 属于 ILCs 家族第一类亚群, 他们均能分泌 IFN- γ , 但两者之间仍存在较大差异。NK 细胞具有杀伤功能, 在抗病毒及抗肿瘤中发挥重要作用。ILC1 虽然也能分泌 IFN- γ , 但其细胞毒性较低, 以发挥辅助作用为主; ILC1 严格依赖 T-bet, 而 NK 细胞在 T-bet 缺失小鼠中仍然存在^[14]; NK 细胞发育依赖转录因子 Eomes, 而 ILC1 在无 Eomes 表达时仍然正常发育。因此, Eomes 常被认为是 NK 细胞的特征性转录因子。ILC1 常与 NK 细胞具有某些共同的表面标志物, 但又有不同的表型特点, 如小鼠 NK 细胞与 ILC1 均表达 NK1.1 和 NKp46 等; 人 ILC1 表达 CD49a、TRAIL 和 CD127, 而 NK 细胞不表达^[15]。本研究将癌组织与癌旁组织进行对比, 探讨 NK 可塑性与 RCC 之间的关系。结果表明, 与癌旁组织相比, 癌组织中 NK 细胞的比例明显上调, 且高表达 ILC1 细胞标志物 CD127、CD49a、TRAIL, 低表达 NK 细胞固有的转录因子 Eomes。提示肿瘤组织中 NK 细胞

特性发生了变化,转换为 ILC1 样细胞,这与 CORTEZ 等^[9]研究观点一致。本研究同时还分析 ILC1 样细胞与 RCC 患者临床特征的关系,发现 ILC1 样细胞与 RCC 临床分期密切相关,提示 ILC1 样细胞亚群可促进肿瘤的发展。

综上所述,RCC 中存在 NK 细胞向 ILC1 样细胞转换现象。ILC1 样细胞的富集与患者肿瘤分期情况密切相关,提示患者抗肿瘤的免疫功能存在缺陷。目前细胞可塑性研究尚处于初步阶段,主要集中在干细胞分化与调控,关于免疫细胞可塑性报道较少。本研究通过对 NK 细胞可塑性研究,发现其在肿瘤中新的转换方式,将为肿瘤的免疫治疗提供重要理论依据。

参考文献

- [1] MOTZER R J, JONASCH E, MICHAELSON M D, et al. NCCN guidelines insights: kidney cancer, version 2. 2020[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(11): 1278-1285.
- [2] ESCUDIER B, PORTA C, SCHMIDINGER M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2016, 27(suppl 5): v58-v68.
- [3] ALBIGES L, POWLES T, STAEHLER M, et al. Updated European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: immune checkpoint inhibition is the new backbone in first-line treatment of metastatic clear-cell renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2019, 76(2): 151-156.
- [4] CALVO E, PORTA C, GRÜNWALD V, et al. The current and evolving landscape of first-line treatments for advanced renal cell carcinoma[J]. Oncologist, 2019, 24(3): 338-348.
- [5] BARATA P C, RINI B I. Treatment of renal cell carcinoma: current status and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(6): 507-524.
- [6] BECHT E, GIRALDO N A, DIEU-NOSJEAN M C, et al. Cancer immune contexture and immunotherapy[J]. Curr Opin Immunol, 2016, 39: 7-13.
- [7] ARTIS D, SPITS H. The biology of innate lymphoid cells[J]. Nature, 2015, 517(7534): 293-301.
- [8] EBBO M, CRINIER A, VÉLY F, et al. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(11): 665-678.
- [9] CORTEZ V S, ULLAND T K, CERVANTES-BARRAGAN L, et al. SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- β signaling[J]. Nat Immunol, 2017, 18(9): 995-1003.
- [10] LOO V, SALGIA M, BERGEROT P, et al. First-line systemic therapy for metastatic clear-cell renal cell carcinoma: critical appraisal of emerging options[J]. Target Oncol, 2019, 14(6): 639-645.
- [11] VUONG L, KOTECHA R R, VOSS M H, et al. Tumor microenvironment dynamics in clear-cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Discov, 2019, 9(10): 1349-1357.
- [12] CURTI B D. Immunotherapy in advanced renal cancer - is cure possible? [J]. N Engl J Med, 2018, 378(14): 1344-1345.
- [13] GEISSLER K, FORNARA P, LAUTENSCHLÄGE R C, et al. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(1): e985082.
- [14] DAUSSY C, FAURE F, MAYOL K, et al. T-bet and eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow[J]. J Exp Med, 2014, 211(3): 563-577.
- [15] CORTEZ V S, ROBINETTE M L, COLONNA M. Innate lymphoid cells: new insights into function and development[J]. Curr Opin Immunol, 2015, 32: 71-77.

(收稿日期: 2020-02-10 修回日期: 2020-03-29)