

· 老年人血液疾病专栏 ·

B7家族在非霍奇金淋巴瘤中的表达及意义

鲁 一, 韩丽娟, 慕竹青, 周林静, 孟娜娜, 马晓艳, 齐路霞, 项红霞, 何秋立, 张桂芳*

(新乡市中心医院肿瘤内科, 新乡 453000)

【摘要】目的 检测B7家族在非霍奇金淋巴瘤(NHL)中的表达, 阐明其在NHL中的作用及意义。**方法** 应用密度梯度离心法分离健康志愿者外周血单个核细胞(PBMCs), 实时荧光定量PCR(RQ-PCR)检测B7家族PD-L1和PD-L2 mRNA在B细胞淋巴瘤(B-NHL)、T细胞淋巴瘤(T-NHL)及NK/T细胞淋巴瘤(NKTL)细胞系中的表达水平。**结果** PD-L1和PD-L2 mRNA在NHL各细胞系中呈不同程度表达, T-NHL及NKTL细胞系中其表达量均明显高于正常PBMCs ($P < 0.05$), 而B-NHL细胞系中PD-L1和PD-L2 mRNA表达量与正常PBMCs相比无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** 在NHL中, B7家族中PD-L1及PD-L2可能参与了NKTL及T-NHL肿瘤的免疫逃逸, 有望成为NKTL及T-NHL肿瘤免疫治疗的新靶点。

【关键词】 淋巴瘤; 非霍奇金淋巴瘤; PD-L1; PD-L2

【中图分类号】 R733

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.11.191

Expression and significance of B7 family molecules in non-Hodgkin's lymphoma

LU Yi, HAN Li-Juan, MU Zhu-Qing, ZHOU Lin-Jing, MENG Na-Na, MA Xiao-Yan, QI Lu-Xia, XIANG Hong-Xia, HE Qiu-Li, ZHANG Gui-Fang*

(Department of Oncology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China)

【Abstract】Objective To detect the expression of B7 family molecules and illuminate their significance in non-Hodgkin's lymphoma (NHL). **Methods** Peripheral blood monocyte cells (PBMCs) were separated by density gradient centrifugation from peripheral blood samples of healthy volunteers. Real-time fluorescence quantitative PCR (RQ-PCR) was used to determine the mRNA expression levels of PD-L1 and PD-L2 in the cell lines of B cell lymphoma, T cell lymphoma and NK/T cell lymphoma (NKTL). **Results** PD-L1 and PD-L2 were expressed in NHL cell lines at different mRNA levels. Their expression was significantly higher in T cell lymphoma and NKTL cell lines than in normal PBMCs ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in their expression between B cell lymphoma cell lines and PBMCs ($P > 0.05$). **Conclusion** B7 family molecules such as PD-L1 and PD-L2 may be involved in the tumor immune escape in NKTL and T cell lymphoma, and they might be novel targets for NHL immunotherapy.

【Key words】 lymphoma; non-Hodgkin's lymphoma; PD-L1; PD-L2

Corresponding author: ZHANG Gui-Fang, E-mail: xxchzhangguifang@126.com

非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)是恶性淋巴瘤中较常见的一大类型, 主要发生于淋巴结, 也可发生于结外淋巴组织和非淋巴组织, 其肿瘤行为从惰性到侵袭性不等。预后较差的高度恶性淋巴瘤在我国发病率较高, 约占NHL的30%^[1]。NHL是一种异质性较强的疾病, 根据不同的淋巴细胞起源, 可分为B细胞淋巴瘤(B-NHL)、T细胞淋巴瘤(T-NHL)和NK/T细胞淋巴瘤(NKTL)。除少数类型外, T-NHL

及NKTL较B-NHL侵袭性强、预后差。NHL患者往往存在着免疫抑制或免疫紊乱, 我们考虑NHL可能通过某种机制逃避了机体的免疫监视和杀伤。而免疫逃逸机制的差异可能在决定NHL不同肿瘤类型中起到了关键作用。PD-L1和PD-L2是B7家族共刺激分子的重要成员。研究发现^[2,3], 多种恶性肿瘤细胞通过高表达PD-Ls, 与其受体PD-1(programmed death-1, PD-1)结合传递负性调控信号, 从而诱导肿瘤抗原特异性T

细胞的凋亡和免疫无能,促使肿瘤的免疫逃逸。我们考虑NHL可能通过高表达B7家族,与其受体PD-1相互作用,从而介导肿瘤的免疫逃逸。本文主要检测PD-L1和PD-L2在NHL中的表达,并探讨其意义,旨在为NHL各淋巴瘤亚型寻找新的免疫治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI 1640培养基购自Solarbio生物公司;无支原体胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青公司;人AB血清由河南省中心血站提供;非必需氨基酸购自Thermo公司;人淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物公司;RNA提取试剂盒购自北京天根生物公司;逆转录试剂盒购自Fermentas;引物均由上海生工合成;SYBR Green Mixture购自北京康为世纪。

1.2 细胞系及培养

NKTL细胞系SNK-6及SNK-8由日本千叶大学Norio Shimizu教授惠赠,培养于含人AB血清(10%)和IL-2(1000U/ml)的RPMI 1640培养基中。YTS细胞系由美国Mayo医学中心Scott Kaufmann教授惠赠,培养于含非必需氨基酸(1%)和FBS(10%)的RPMI 1640培养基中。急性T淋巴细胞白血病细胞系Jurkat、间变大细胞淋巴瘤细胞系Karpas-299、皮肤T-NHL细胞系Hut-78、B-NHL细胞系LY-1和LY-8、Burkitt's淋巴瘤细胞系Ramos均购自中国科学院上海细胞生物研究所,均用含FBS(10%)的RPMI 1640培养基培养。所有细胞系均置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养,每2~3d换液。取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 外周血单个核细胞的提取

收集健康志愿者新鲜外周血,肝素抗凝,用等体积的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS; pH = 7.2)稀释;吸取2倍体积的淋巴细胞分离液置于离心管中,毛细滴管吸取已稀释的血标本沿管壁缓慢加入分离液面上(切勿冲破液面),3000转/min离心20min;然后吸取中间白色云雾层,所得即为外周血单个核细胞(peripheral blood monocyte cells, PBMCs),经PBS洗涤,2000转/min离心5min后弃上清,重复操作3次,最后用少量PBS重悬。

1.4 总RNA的提取及逆转录

取 5×10^6 个/ml对数生长期的细胞,操作按离心柱法RNA提取试剂盒说明书,收集RNA约70 μ l。经

纯度检测所有样品的D260/D280均在1.85~2.00之间。逆转录操作按Fermentas逆转录试剂盒程序,反应条件:42℃、60min,70℃、5min,4℃、暂停。所得cDNA保存于-20℃冰箱备用。

1.5 实时荧光定量PCR检测

实时荧光定量PCR(real time fluorescence quantitative PCR, RQ-PCR)检测B7家族PD-L1和PD-L2 mRNA在B-NHL、T-NHL及NKTL细胞系中的表达水平。按SYBR Green Mixture试剂盒说明书操作。以PBMCs的 β -actin基因为内参照,引物序列如下。PD-L1: F1 CTT CTT ATT ATG CCT TGG TGT TGC A, R1 GGA ATA CGT CTC CTC CAA ATG TG; PD-L2: F1 CAA CAT GGC TGC TTC ACA TTT T, R1 TGT GGT GAC AGG TCT TTT TGT TGT; β -actin: F1 TCA CGT GGA CAT CCG CAA AG, R1 CTG GTA GGT GGA CAG GG。扩增产物分别为146bp, 110bp及205bp。反应条件:预变性95℃、10min,变性95℃、15s,变性/延伸60℃、1min,40个循环。溶解曲线分析:95℃、15s,60℃、1min,95℃、15s,60℃、15s,得到相应Ct值,应用ABI 7500 Fast System软件进行分析,实验重复3次。

1.6 统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-L1和PD-L2 mRNA的扩增曲线和溶解曲线

应用RQ-PCR对NHL各细胞系PD-L1和PD-L2 mRNA的表达进行相对定量分析,获得单峰溶解曲线。峰的形状锐利,显示扩增产物为特异序列(图1)。

2.2 NHL各细胞系中PD-L1、PD-L2 mRNA的相对表达量

以正常PBMCs为对照,NKTL细胞系(SNK-6、SNK-8和YTS)和T-NHL细胞系(Jurkat、Karpas-299和Hut-78)中,PD-L1和PD-L2 mRNA表达量均明显高于正常PBMCs($P < 0.05$)。B-NHL细胞系(LY-1、LY-8和Ramos)中,PD-L1和PD-L2 mRNA表达量与正常PBMCs无明显差异($P > 0.05$)。详见图2和图3。

3 讨论

恶性淋巴瘤在全世界范围内的发病率及死亡率呈逐年增高趋势,占恶性肿瘤的4.1%,位居恶性肿

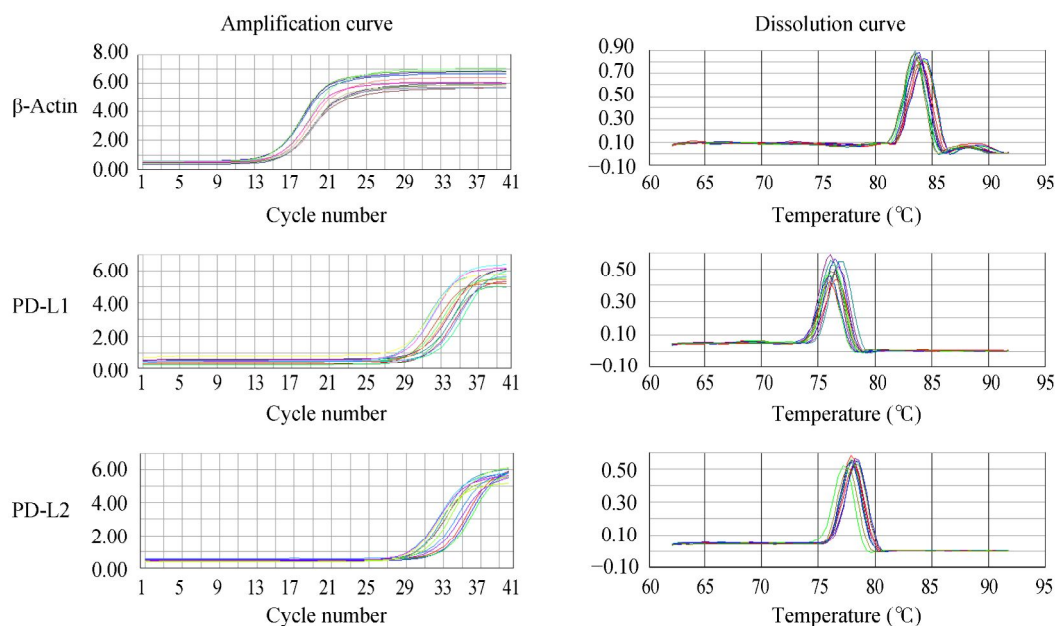


图1 NHL各细胞系中PD-L1和PD-L2 mRNA的扩增曲线和溶解曲线
Figure 1 The amplification curves and dissolution curves of mRNA of PD-L1 and PD-L2 in NHL cell lines

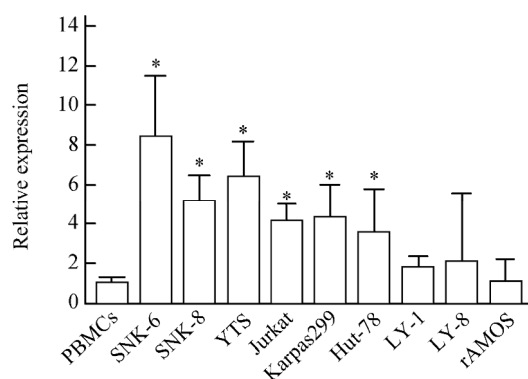


图2 NHL各细胞系中PD-L1 mRNA的相对表达量
Figure 2 The relative expression of PD-L1 mRNA in NHL cell lines ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)
PBMCs: peripheral blood monocyte cells. Compared with PBMCs group, * $P < 0.05$

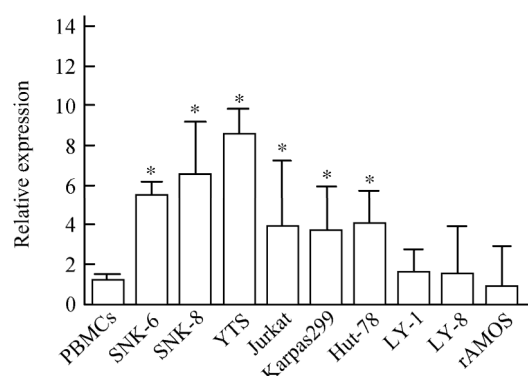


图3 NHL各细胞系中PD-L2 mRNA的相对表达量
Figure 3 The relative expression of PD-L2 mRNA in NHL cell lines ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)
PBMCs: peripheral blood monocyte cells. Compared with PBMCs group, * $P < 0.05$

瘤细胞的免疫逃逸机制在NHL不同的组织类型中起到了关键作用。

B7家族作为唯一能从抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 单向传递信号至T细胞的共刺激分子, 其成员有8种: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H1 (PD-L1/CD274), B7-DC (PD-L2/CD273), ICOS-L (CD275), B7-H3 (CD276), B7-H4和B7-H6^[4,5]。PD-L1主要诱导性表达于激活的T细胞、B细胞、APC及人类肿瘤细胞上^[5]。PD-L2和PD-L1在结构、基因序列及功能上相似, 有40%的一致性, PD-L2不仅限制性表达于APC (如: 巨噬细胞和树突状细胞) 上, 而且诱导性表达在T细胞、Th2细胞及肿瘤细胞上^[6,7]。PD-Ls主要通过与其受体PD-1结合传递负性调控信号, 诱导肿瘤抗原特异性T细胞的免疫无能或促进其凋亡, 从而使肿瘤细胞逃避机体的免疫监视和杀伤。

研究证实, PD-Ls/PD-1途径在慢性感染、炎症及自身免疫性疾病等中发挥负性调控免疫应答的作用^[7,8]。最近的研究^[9-11]显示, 在多种肿瘤微环境中 (如: 恶性黑色素瘤、肾癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌及血液系统恶性肿瘤等), PD-L1参与了肿瘤细胞的免疫逃逸。朱等^[12]发现PD-1/PD-L1途径调节了肺癌恶性胸腔积液中CD8⁺T淋巴细胞IFN- γ 的分泌, 并促进了CD8⁺T淋巴细胞的凋亡。非小细胞肺癌中PD-L1与表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 的突变状态相关, 与PD-L1阴性病例相比, PD-L1阳性病例对酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 治疗 (如: 吉非替尼、厄洛替尼)

瘤的第7位, 主要包括霍奇金淋巴瘤和NHL。NHL由于组织学分类不同, 其分子生物学行为、对治疗的反应、临床过程及预后等亦不同^[1]。我们考虑肿

更敏感,其疾病进展时间明显延长^[13]。这不仅说明PD-L1通过某种途径抑制了肺癌患者的抗肿瘤免疫,而且有助于筛选靶向治疗的优势人群,预示了抗PD-L1免疫治疗的潜在临床价值。在研究卵巢癌细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)介导的肿瘤细胞溶解中发现^[14],PD-L1高表达的肿瘤细胞其细胞溶解受到抑制,而将肿瘤细胞PD-L1基因沉默反而促进了其溶解效应。在腹膜转移的卵巢癌小鼠模型中,破坏了PD-L1基因后不仅抑制了肿瘤的生长,且延长了其生存期^[14]。这充分说明肿瘤细胞通过高表达PD-L1而逃避了CTL的细胞毒作用。

但大多数研究仅关注了PD-L1所扮演的角色,而忽视了PD-L2的表达及意义。Iwamura等^[15]发现PD-L2与T细胞受体结合后T细胞IFN- γ 的分泌受到抑制,当沉默PD-L2 siRNA后其抑制效应解除,这高度提示PD-L2是通过提供负性调控信号来调节T细胞功能的。本研究同时检测了PD-L1及PD-L2在NHL细胞系中的表达,发现PD-L1及PD-L2在T-NHL、NKTL及B-NHL细胞株中均呈不同程度表达。以正常PBMCs为对照,T-NHL细胞系及NKTL细胞系中,PD-L1和PD-L2 mRNA表达量均明显高于正常PBMCs。而B-NHL细胞系中,PD-L1和PD-L2 mRNA表达量与正常PBMCs均无明显差异。我们的研究结果充分显示,B7家族高表达于NKTL及T-NHL细胞系上,这高度提示PD-Ls可能通过对机体免疫产生抑制效应参与其肿瘤细胞的免疫逃逸。而在B-NHL中,PD-L1及PD-L2的表达量与正常PBMCs无明显差异,可能是由于PD-Ls在其免疫逃逸机制中的贡献较小,或者由其他复杂的调节机制调控。

本研究表明B7家族高表达于NKTL及T-NHL细胞系,这高度提示其可能参与了这两种淋巴瘤的免疫逃逸。PD-L1及PD-L2将成为T-NHL及NKTL免疫治疗的新靶点。我们将进一步建立功能试验及动物模型来阐述B7家族在NHL中的免疫调节功能。

【参考文献】

- [1] Sun Y, Shi YK. Manual of Medical Oncology[M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013, 355-360. [孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册[M]. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2013, 355-360.]
- [2] Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, *et al.* PD-1-PD-L1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin's lymphoma[J]. Blood, 2008, 111(6): 3220-3224.
- [3] Iwamura K, Kato T, Miyahara Y, *et al.* siRNA-mediated silencing of PD-1 ligands enhances tumor-specific human T-cell effector functions[J]. Gene Ther, 2012, 19(10): 959-966.
- [4] Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematological malignancy[J]. Blood, 2013, 121(5): 734-744.
- [5] Li Y, Wang J, Li C, *et al.* Contribution of PD-L1 to oncogenesis of lymphoma and its RNAi-based targeting therapy[J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(10): 2015-2023.
- [6] Lesterhuis WJ, Steer H, Lake RA. PD-L2 is predominantly expressed by Th2 cells[J]. Mol Immunol, 2011, 49(1-2): 1-3.
- [7] Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, *et al.* Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression[J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 656340.
- [8] Lin C, Chen X, Liu JN, *et al.* Advances of PD-1/PD-L1 signaling pathway in immune escape and treatment for non-small cell lung cancer[J]. Chin J Lung Cancer, 2014, 17(10): 734-740. [林城, 陈雄, 刘静南. PD-1/PD-L1信号通路在非小细胞肺癌免疫逃逸及其治疗中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(10): 734-740.]
- [9] Spranger S, Spaepen RM, Zha Y, *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(200): 200ra116.
- [10] Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88557.
- [11] Liu Y, Carlsson R, Ambjorn M, *et al.* PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients[J]. J Neurosci, 2013, 33(35): 14231-14245.
- [12] Zhu YX, Chen C, Huang JA, *et al.* The expression of PD-1 on CD8⁺ T cells in malignant pleural effusion of lung cancer and its biological significance[J]. Tumor, 2010, 30(9): 778-781. [朱云霞, 陈成, 黄建安, 等. PD-1分子在肺癌恶性胸腔积液CD8⁺T细胞上的表达及其生物学意义[J]. 肿瘤, 2010, 30(9): 778-781.]
- [13] DIncecco A, Andreozzi M, Ludovini V, *et al.* PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients[J]. Br J Cancer, 2015, 112(1): 95-102.
- [14] Abiko A, Mandai M, Hamanishi J, *et al.* PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6): 1363-1374.
- [15] Iwamura K, Kato T, Miyahara Y, *et al.* siRNA-mediated silencing of PD-1 ligands enhances tumor-specific human T-cell effector functions[J]. Gene Ther, 2012, 19(10): 959-966.

(编辑: 吕青远)