

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0272-05

重组可溶性 PD-1 免疫抑制性受体增强抗小鼠 H22 肝癌的免疫效应

贺宇飞, 张桂梅, 王小红, 张 慧, 袁 野, 李 东, 冯作化(华中科技大学同济医学院生化与分子生物学系, 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨真核表达 PD-1 的重组可溶性分子(sPD-1)增强肿瘤局部免疫效应的作用机制。方法: 采用半定量 RT-PCR 方法检测 PD-1 的配体 PD-L1 和 PD-L2 在小鼠 H22 肝癌细胞和癌组织中的表达水平, 流式细胞仪检测其在激活 T 细胞表面的表达; 体外细胞杀伤实验检测 sPD-1 作用于肿瘤细胞或脾细胞对 Hsp70-H22 抗原肽复合物激活的脾细胞杀伤 H22 肝癌细胞的影响; 体内抑瘤实验评价局部转染表达 sPD-1 的抗瘤作用。结果: H22 肿瘤细胞本身表达 PD-L1 基因, PD-L1 和 PD-L2 基因在癌组织中的表达高于正常肌肉组织和单纯癌细胞; PD-L1 亦表达于激活的 T 细胞表面; sPD-1 可增强抗原特异性激活的淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤效应; 在肿瘤接种部位肌注转染表达 sPD-1 可显著抑制 H22 肿瘤生长。结论: 在肿瘤局部表达可溶性受体 sPD-1 阻抑 PD-L/PD-1 通路, 既可作用于免疫细胞来提高其正向免疫力, 同时也可拮抗 H22 细胞通过 PD-L 对免疫细胞的抑制作用, 可望成为提高肿瘤基因治疗疗效的一种新手段。

[关键词] PD-1; 免疫耐受; 肝癌; 可溶性受体; 基因治疗

[中图分类号] R730.3; R735.7 [文献标识码] A

Augmentation of Antitumor Immune Effect on Mouse H22 Hepatocarcinoma by Recombinant Soluble PD-1 (sPD-1) Inhibitory Immunoreceptor

HE Yu-fei, ZHANG Gui-mei, WANG Xiao-hong, ZHANG Hui, YUAN Ye, LI Dong, FENG Zuo-hua(Department of Biochemistry & Molecular Biology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the mechanism of the enhanced antitumor immune effect of the locally expressed soluble molecule sPD-1 on mouse H22 hepatoma. **Methods:** The mRNA expression level of PD-L1 and PD-L2, the ligands of PD-1, were investigated in mouse H22 cells as well as H22 tumor tissues by using semi-quantitative RT-PCR method. The cytotoxicity assay *in vitro* was used to evaluate the lysis activity of HSP70-peptides complex-stimulated spleen cells on H22 cells when the tumor cells or spleen cells were pretreated with sPD-1. The antitumor effect of sPD-1 on H22 hepatoma was investigated by experiment *in vivo* after mice were inoculated with H22 tumor cells. **Results:** PD-L1 but not PD-L2 mRNA was expressed in H22 hepatoma cells. Both PD-L1 and PD-L2 mRNAs were expressed in tumor tissues of tumor-bearing mice and upregulated as compared with muscle tissues in normal mice. Blocking PD-Ls on either tumor cells or spleen cells by sPD-1 mediated enhanced lysis of H22 cells by HSP70-peptides complex-stimulated spleen cells. sPD-1 also mediated strong antitumor immune effects on mouse H22 tumor model *in vivo*. **Conclusion:** The results provide a novel antitumor method of expression of soluble receptor of PD-1 in tumor sites by local gene therapy, which could block the action of PD-Ls on both immune cells and H22 tumor cells, and then increase the antitumor immune activity.

[Key words] PD-1; immune tolerance; hepatocarcinoma; soluble receptor; gene therapy

* T 细胞对肿瘤的特异性免疫耐受往往使肿瘤逃避免疫攻击、持续存在和发展。在免疫耐受形成过程中, T 细胞表面的负调控受体起着重要作用, 其中 PD-1 是最重要的负调节性受体。PD-1 的配体有 2 个: PD-L1^[1](亦称 B7-H1)和 PD-L2^[2](亦称 B7-DC)。PD-Ls

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(No. 2002CB513100)

[作者简介] 贺宇飞(1976-), 男, 湖北武汉人, 博士研究生, 主要从事肿瘤生物和基因治疗方面的研究

[通讯作者] 冯作化, E-mail: fengzhg@public.wh.hb.cn

既表达于免疫细胞,也表达于非免疫器官如心、肺和骨骼肌等。此外 PD-Ls 尚表达于一些肿瘤细胞并参与了肿瘤的免疫逃避^[3],抗 PD-L1 抗体在动物实验中可产生抗肿瘤效应^[4]。本文研究中,采用含有小鼠 PD-1 胞外段编码区的真核质粒表达载体 pPD-1A,表达重组可溶性 PD-1 胞外段(sPD-1),研究 sPD-1 阻断 PD-L/PD-1 相互作用,增强 T 细胞杀瘤效应以及对小鼠肝癌的局部基因治疗作用。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞

雄性 Balb/c 小鼠购自湖北省医学实验动物中心。BHK 细胞株和 H22 小鼠肝癌细胞株购自中国典型培养物保藏中心(武汉),2 种细胞均培养于含 10% 胎牛血清 DMEM (Gibco) 中,H22 细胞亦通过腹腔接种进行体内传代。正常小鼠脾细胞、热休克蛋白 70 (HSP70) -H22 抗原肽复合物刺激的小鼠脾细胞的制备参见文献[5],脾细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 (Gibco) 中。

1.2 质粒

空载体 pcDNA3.1 为 Invitrogen 公司产品。pPD-1A 为在 pcDNA3.1 基础上构建的含 PD-1 胞外段编码区的真核表达质粒,经测序序列正确,其表达产物为可溶性并可有效结合 PD-1 配体(另文发表)。质粒用常规碱变性法抽提,然后采用精胺(Sigma)纯化法^[6]除去大部分细菌脂多糖(LPS),紫外分光光度计定量及计算纯度,用于实验的质粒的纯度大于 98%,LPS 含量用 LAL 方法检测低于 1.5 EU/ μ g。

1.3 半定量 RT-PCR

总 RNA 用 TRIzol 试剂(Gibco)提取,按说明书进行。RNA 分别提取来自正常和接种有 H22 肝癌细胞的 Balb/c 小鼠(每组 3 只)的后腿肌肉或瘤组织,RNA 经 Dnase I (Promega)处理 0.5 h 后,以 6 μ g RNA 进行逆转录(30 μ l 体系),以 2 μ l 逆转录产物进行 PCR,每 PCR 管内同时扩增待检测基因及 β -actin 的 cDNA,预实验确定 26 个循环最佳。所用引物为:PD-L1(扩增 322bp)5':5'-GTGAAACCCCTGAGTCT TATCC-3',3':5'-GACCATTCTGAGACAATTCC-3';PD-L2(扩增 361 bp)5':5'-CATCGCTTTGATCTTC CTGG-3',3':5'-CCTGAAAGTCATTAGGAGCC-3';PD-1 胞外段(扩增 441bp)5':5'-GGATCTCATATGTCA GGGTGGCT-TCTAGAGG -3',3':5'-CCTGGTGAATTCATTGAAACCG-GCC TTCTGG-3' -3';内参 β -actin(扩增 542 bp)5':5'-ATGGGTCAGAAGGACTCCTATG -3',3':5'-ATCTCCTGCTCGAAGTCTAGAG-3'。引物扩增的区域均至少跨

越一个剪接点(即在相应基因中跨越至少一个内含子)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色分析,分析特异性条带的光密度情况,换算成与内参 β -actin 的比值。

1.4 流式细胞仪检测

HSP70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞于刺激 48 h 后收集,PBS 洗 1 次后,加入含 2% 胎牛血清的 PE 标记的抗 PD-L1 单克隆抗体(eBioscience),4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,PBS 洗 2 次,上流式细胞仪检测(FACS-Calibur, Becton Dickinson)。

1.5 细胞转染

参考脂质体 Dospere (BM 公司)说明书,在 24 孔板中进行。BHK 细胞密度在 60% ~ 80% 时转染,每孔用脂质体 2 μ l,pPD-1A 质粒为 0.5 μ g,转染 24 h 后加 800 μ g/ml G418 筛选,培养 3 周后上清用于体外 T 细胞的杀伤检测。稳定转染的细胞经提取总 RNA 进行 PD-1 胞外段表达的 RT-PCR 检测,表明有明显的相应 RNA 表达,其蛋白产物经报告基因检测表明主要是分泌型的。

1.6 体外肿瘤杀伤实验

采用 MTT 检测法^[5],效应细胞与靶细胞的比例分别为 4:1,8:1,16:1。在研究 sPD-1 对淋巴细胞影响效应的实验中,靶细胞为正常的 H22,在制备 HSP70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞时,于激活培养过程中在培养液中加 30% 体积的 pPD-1A 质粒转染细胞上清。在研究 sPD-1 对瘤细胞影响效应的实验中,将靶细胞 H22 与 pPD-1A 质粒转染细胞上清孵育 1 h,再与 HSP70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞(效应细胞)混合,进行杀伤实验。在进行杀伤实验前,对被含 sPD-1 的上清处理过的细胞用 PBS 洗 1 次。2 批实验中均设置 2 组对照:靶细胞均为体外培养的正常 H22 细胞,效应细胞为正常脾细胞(对照 A)或 HSP70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞(对照 B)。

1.7 动物抑瘤实验

Balb/c 小鼠每组 8 只,每组分别于右后腿肌肉接种腹水型 H22 细胞 1×10^4 或 1×10^5 /只(于 100 μ l PBS 中),于接种后第 3 天起,治疗组每只小鼠肌注 100 μ g pPD-1A 质粒(于 100 μ l 生理盐水中),生理盐水对照组肌注 100 μ l 生理盐水,空载体对照组注射 100 μ g pcDNA3.1 质粒,隔天 1 次,共 6 次。在可触及肿瘤时开始用游标卡尺测量瘤大小,瘤体积计算公式为:长 \times 宽²/2。于第 39 天(1×10^4 接种)和第 22 天(1×10^5 接种)解剖小鼠称瘤重。动物实验重复 2 次。

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{对照组瘤重} - \text{实验组瘤重}}{\text{对照组瘤重}} \times 100\%$$

1.8 组织病理分析

动物抑瘤实验结束时同时取对照组和治疗组治疗部位肌肉组织,10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色观察肌纤维及间质病理变化情况。

1.9 统计学处理

组间差异显著性均采用 Student-*t* 检验。

2 结果

2.1 小鼠 H22 肝癌细胞及相应瘤组织中 PD-L1 和 PD-L2 的表达

H22 肿瘤细胞本身表达 PD-L1 基因,但不表达 PD-L2,在同样条件下进行检测,只检测到 PD-L1 的 mRNA,未检测 PD-L2 的 mRNA(图 1)。在正常的肌肉组织中,PD-L1 和 PD-L2 也有一定的表达水平。H22 接种于肌肉组织形成肿瘤后,瘤组织中 PD-L1 和 PD-L2 基因的表达高于正常肌肉组织中的表达水平,亦高于单纯 H22 癌细胞中的表达水平(图 1),提示肿瘤组织中多种细胞表达 PD-L1/PD-L2,形成肿瘤微环境中免疫耐受的一种重要机制。

图 1 PD-1 配体 PD-L1 和 PD-L2 的表达情况

Fig. 1 mRNA expression of PD-L1 and PD-L2

2.2 激活 T 细胞表面 PD-L1 的表达

我们制备的 HSP70-H22 抗原肽复合物激活的脾淋巴细胞(绝大部分为 T 细胞)含有相似比例的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞^[5],流式细胞仪检测表明大部分(>97%)激活细胞的表面表达 PD-L1,提示 T 细胞表达 PD-L 可能是肿瘤微环境中 PD-L 的一部分。

2.3 sPD-1 对抗原特异性激活脾细胞杀伤活性的影响

在用 HSP70-H22 抗原肽复合物激活脾淋巴细胞的过程中以 sPD-1(pPD-1A 转染细胞上清)处理脾细胞,激活后的脾淋巴细胞对 H22 细胞的杀伤活性明显提高(图 2,处理组在各效靶比与对照组相比,均为 $P < 0.05$)。

2.4 sPD-1 作用于 H22 靶细胞对杀伤作用的影响

以 sPD-1 先处理 H22 靶细胞,结果显示同样可以提高激活效应细胞对 H22 细胞的杀伤率(图 3,处理组

在各效靶比与对照组相比,均为 $P < 0.05$)。

2.5 体内转染表达 sPD-1 对 H22 肿瘤生长的抑制作用

图 2 pPD-1A 表达产物处理脾细胞对杀伤率的影响

Fig. 2 Enhanced cytotoxicity after spleen cells were treated with expression product of pPD-1A

图 3 pPD-1A 表达产物处理 H22 对杀伤率的影响

Fig. 3 Enhanced cytotoxicity after H22 cells were treated with expression product of pPD-1A

体内转染 pPD-1A 质粒后经 RT-PCR 检测可见明显的 PD-1 胞外段 RNA 的表达,在小剂量(1×10^4)和大剂量(1×10^5)两种接种情况下,转染 pPD-1A 质粒均对 H22 肿瘤生长有显著抑制作用,而对照生理盐水或质粒 pcDNA3.1 对肿瘤生长则没有明显影响(图 4 及结果未显示)。大剂量接种时,在接种后第 22 天,pPD-1A 治疗组有 37.5% 小鼠无肉眼可见瘤组织生成,总抑瘤率为 44.5% ($P < 0.05$)。小剂量接种时,在第 39 天,治疗组的抑瘤率为 83.8% ($P < 0.01$)。在治疗组中,荷瘤鼠肿瘤的生长速率均非常缓慢(图 4)。

2.6 体内转染 pPD-1A 后的组织病理变化

图(5)所示为对照组和 pPD-1A 质粒治疗组接种部位组织的病理切片,对照组间质有癌细胞和炎性细胞浸润,而治疗组肌肉组织较完整,虽有少量炎性细胞浸润,但肌纤维没有明显变性、坏死表现,这提示治疗

组局部并没有明显的自身免疫性炎症发生。

段。

B7 家族共刺激分子在 T 细胞的激活和耐受过程中发挥着重要作用,同时也为许多疾病的治疗提供了靶标^[7]。根据免疫调节的需要,可以通过一些外源方法来增强或抑制某些信号途径,其中单克隆抗体和可溶性受体常被用来阻断相关信号^[4]。PD-Ls 是 B7 家族中十分重要的负调节性共刺激分子,在癌细胞、抗原提呈细胞、肿瘤血管内皮细胞、激活的 T 细胞均有表达,因而也是肿瘤微环境中的重要免疫负调节分子。因此,本文研究中将 PD-Ls 作为靶点,抑制肿瘤免疫耐受机制,达到了增强抗肿瘤免疫的效果。

PD-L1 可在肿瘤细胞如肺癌、卵巢癌、结肠癌、黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌和胶质瘤^[3, 8-9]中表达,PD-L 增加肿瘤特异性 CTL 的凋亡,使肿瘤逃避免疫杀伤作用^[3]。PD-L1 也表达于树状突细胞(dendritic cells, DCs)表面,阻断 PD-L1 能够增强 DCs 激活 T 细胞的作用,进而增强抗肿瘤作用^[10]。我们的研究表明,PD-L1 也表达于绝大部分用抗原肽激活的 T 细胞表面,PD-L1 在肝癌组织中的表达明显高于正常肌肉组织,亦明显高于 H22 细胞;此外, H22 细胞本身虽不表达 PD-L2,但在 H22 瘤组织中却能检测到 PD-L2 基因的表达,且高于正常肌肉组织。这都表明肿瘤微环境中有多种细胞表达 PD-Ls,成为很强的免疫负调节因素,而利用 sPD-1 则可以起到同时阻抑 PD-L1 和 PD-L2 的功能,抑制 H22 细胞免疫逃避能力的作用。

PD-L/PD-1 是参与肿瘤免疫逃避的一条抑制性信号途径,我们利用真核表达质粒表达 sPD-1,证明了 sPD-1 能够增强免疫应答并产生抗肿瘤效果。H22 小鼠肝癌细胞表达 PD-L1,以 sPD-1 直接作用于瘤细胞,可以增强效应细胞对瘤细胞的杀伤效应。而在抗原激活 T 细胞的过程中加入 sPD-1,可显著促进 T 细胞的杀伤功能,表明 sPD-1 能够阻抑 DC 和 T 细胞表面 PD-Ls 的作用,促进 T 细胞激活。因此, sPD-1 可以产生两方面的作用:既可作用于免疫细胞来提高其正向免疫力,又可拮抗 H22 细胞通过 PD-L 对免疫细胞的抑制作用。这些结果为 pPD-1A 在体内增强抗肿瘤免疫提供了实验基础。

以 pPD-1A 质粒进行体内转染,对小鼠体内大小两种剂量的接种肿瘤模型都具有明显的治疗作用,表明 pPD-1A 在体内确实可增强抗肿瘤免疫,这与体外杀伤实验是相符的。小剂量瘤细胞接种的效应类似于体内微小肿瘤灶、化疗或术后残留灶等,大剂量接种则更易模拟肿瘤形成后的微环境,无论是何种情况,以局部基因治疗的方式阻断 PD-L/PD-1 抑制性信号途径均显示出明显的增强抗肿瘤免疫的效果。

图 4 pPD-1A 体内对不同接种剂量的 H22 肝癌的抑制作用
Fig. 4 Antitumor effect of pPD-1A on mice inoculated with different dose of H22 hepatoma cells

A: 1×10^5 ; B: 1×10^4

图 5 肿瘤接种部位的肌肉组织病理分析($\times 100$)
Fig. 5 Histopathologic analysis of muscle tissues inoculated with tumor cells($\times 100$)

A: Treated with control saline; B: Treated with pPD-A

3 讨论

肿瘤免疫治疗是肿瘤治疗的一个重要研究领域,其中,针对肿瘤免疫耐受机制而研究相应的治疗策略尤为重要。利用肿瘤抗原诱导特异性免疫治疗时,需要克服肿瘤免疫耐受机制;另一方面,在无法得到肿瘤抗原(如不能手术的肿瘤患者)、或所得抗原量不足的情况下,遏制肿瘤免疫耐受机制、促进机体自身的抗肿瘤免疫应答,更成为进行肿瘤免疫生物治疗的重要手

由于 PD-1 的配体表达较广泛,包括肌肉,体内转染 pPD-1A 后是否会导致自身免疫性反应是值得注意的问题。在本研究中,pPD-1A 质粒用于肌肉局部转染,表达较局限,在我们所应用的质粒剂量时没有出现明显的自身免疫性炎症表现,提示利用局部基因治疗改善肿瘤微环境中免疫调节因素、特异性的干预负调节性共刺激分子的作用可望成为增强抗肿瘤免疫效应的一种新策略。

迄今对肿瘤的许多治疗手段都会有肿瘤治疗不彻底和复发的可能,其中很大一部分原因归于肿瘤的免疫耐受和逃避。我们进一步的实验已证实 sPD-1 与 HSP70-抗原肽复合物、sPD-1 与趋化因子 SLC 免疫治疗等均能协同产生更强的抗肿瘤免疫治疗效应(另文发表),因此,在应用其他治疗方式如放化疗、生物治疗的同时,局部抑制 PD-L/PD-1 信号途径来增强抗肿瘤免疫,可望发挥更大的抗肿瘤作用。

[参 考 文 献]

[1] Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192: 1027-1034.

[2] Latchman Y, Wood CR, Chernova T, *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2: 261-268.

[3] Dong H, Strome SE, Salomao DR, *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion[J]. *Nat Med*, 2002, 8: 793-800.

[4] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 12293-12297.

[5] 黄 波, 冯作化, 张桂梅, 等. 肿瘤细胞混合肽诱导特异性抗肿瘤免疫应答[J]. *中国科学(C 辑)*, 2002, 32: 165-171.

[6] Mourich DV, Munks MW, Murphy JC, *et al.* Spermine compaction is an efficient and economical method of producing vaccination-grade DNA[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 274: 257-264.

[7] Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes[J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 391-396.

[8] Strome SE, Dong H, Tamura H, *et al.* B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 6501-6505.

[9] Wintterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, *et al.* Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: A potential mechanism of immune paralysis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 7462-7467.

[10] Curiel TJ, Wei S, Dong H, *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 562-567.

[收稿日期] 2004 - 04 - 16

[修回日期] 2004 - 08 - 10

《细胞与分子免疫学杂志》征订启事

《细胞与分子免疫学杂志》由中国免疫学会和第四军医大学主办,是国内外公开发行的免疫学专业学术性刊物。创刊 20 年来相继被确定为我国中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库源期刊,并被国际知名检索系统如《AJ》、《CA》、《IM》及其 PubMed 等收录。

《细胞与分子免疫学杂志》刊载内容系我国生物学领域细胞免疫和分子免疫学方面的理论及应用研究成果,在促进国内外学术交流。主要栏目有基础研究、临床研究、抗体工程、技术方法、综述和信息等。适合广大生物学和医学基础及临床工作者阅读。

《细胞与分子免疫学杂志》为双月刊(逢单月出版),国际标准(A4)开本,全铜版纸印刷,彩图随文。每期正文 128 页,信息量大,单价 15 元,全年定价 90 元。欢迎订阅,邮发代号:52 - 184。

联系地址: 陕西 西安 第四军医大学校内《细胞与分子免疫学杂志》编辑部

邮政编码: 710032

电 话: 029 - 83374550

E - mail: immuedit@ fmmu. edu. cn