

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.014

· 临床研究 ·

胃癌患者外周血和肿瘤组织中高表达 CD14⁺ DR^{low/-} 髓源抑制性细胞

戴夫¹, 李海文¹, 彭琼¹, 林沪², 李元元²(1. 安徽医科大学第三附属医院 消化内科, 安徽合肥 230061; 2. 解放军第302医院 生物治疗中心, 北京 100039)

[摘要] 目的: 探讨胃癌患者外周血和肿瘤组织中 CD14⁺ DR^{low/-} 髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 的表达及其与肿瘤病理特征的关系。方法: 选取2009年3月至2010年10月安徽医科大学第三附属医院胃癌患者43例(I期9例、II期13例、III期14例、IV期7例), 另采集26例正常健康者作为对照组。流式细胞术检测外周血、瘤组织中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达水平, 分析 MDSCs 表达水平与肿瘤病理特征的相关性。结果: 胃癌患者肿瘤组织中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达显著高于自身外周和健康对照者外周血的表达水平[2.87 ± 1.93]% vs [2.37 ± 1.7]% , [0.89 ± 0.47]% , $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$], 后两者间差异也有统计学意义($P < 0.01$)。CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达与胃癌的恶性程度呈正相关, 晚期胃癌组织内 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 表达明显增加(I : II : III : IV = [1.15 ± 0.78]% : [1.71 ± 0.92]% : [2.25 ± 1.24]% : [4.85 ± 2.37]% , $P < 0.05$)。同时, 肿瘤浸润组织与非浸润组织的 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 表达也有明显差异[3.90 ± 1.67]% vs [2.62 ± 1.53]% , $P < 0.05$]。结论: CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 在胃癌患者外周血和肿瘤组织中均高表达, 与胃癌的发生、发展密切相关。

[关键词] 胃癌; 髓源的抑制性细胞; 免疫逃逸; 免疫监视

[中图分类号] R735.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)03-0311-04

Myeloid-derived suppressor cells highly expressing CD14⁺ DR^{low/-} in peripheral blood and tumor tissues of stomach carcinoma

DAI Fu¹, LI Hai-wen¹, PENG Qiong¹, LIN Hu², LI Yuan-yuan²(1. Department of Gastroenterology, Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061, Anhui, China; 2. Research Center for Biological Therapy, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of CD14⁺ DR^{low/-} myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in peripheral blood and tumor tissues of gastric carcinoma (GC) patients and its relationship with clinicopathological of GC. **Methods:** Forty-three stomach carcinoma patients (9 stage I, 13 stage II, 14 stage III, 7 stage IV) were selected from Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Mar. 2009 to Oct. 2010), and 26 healthy volunteers were used as control. CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs expression in peripheral blood and gastric carcinoma tissues was detected by flow cytometry, and its relationship with clinicopathological of GC was analyzed. **Results:** CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs expression in GC tissues was significantly higher than those in peripheral blood of GC patients and healthy controls ([2.87 ± 1.93]% vs [2.37 ± 1.7]% , [0.89 ± 0.47]% , $P < 0.05$ and $P < 0.01$), and CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs expression in peripheral blood of GC patients was also higher than that in healthy controls ($P < 0.01$). CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs expression in GC tissues was positively correlated with their malignancy stage and significantly increased in advanced GC (stage I : II : III : IV = [1.15 ± 0.78]% : [1.71 ± 0.92]% : [2.25 ± 1.24]% : [4.85 ± 2.37]% , $P < 0.05$). Meanwhile, CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs expression in tumor infiltration tissues was significantly higher than that in tumor un-infiltration tissues ([3.90 ± 1.67]% vs [2.62 ± 1.53]% , $P < 0.05$). **Conclusion:** CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs are highly expressed in peripheral blood and GC tissues, and relates to the development and progression of GC.

[基金项目] 国家“十一五”科技重大专项(No. 2009ZX10004-309)。Project supported by the National “the Eleventh Five-Year” Major Science and Technology Program of China (No. 2009ZX10004-309)

[作者简介] 戴夫(1961-),男,教授,主任医师,硕士生导师,主要从事消化系统疾病的临床研究工作。E-mail: hefeiyiyuan@gmail.com

[通信作者] 戴夫(DAI Fu, corresponding author), E-mail: hefeiyiyuan@gmail.com

[**Key words**] gastric carcinoma; myeloid-derived suppressor cells; immune escape; immune surveillance

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 311-314]

髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是一群具有免疫抑制功能的髓系细胞, 在肿瘤患者的癌组织和外周血中数量有大幅度的增加, 且与肿瘤的大小和恶性程度有一定的相关性^[1]。研究^[2]发现, 外周血中存在一群未成熟的单核细胞, 即表达单核细胞表面标记 CD14、低表达 HLA-DR 的一群单核形态的髓源的抑制性细胞。胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率居各类肿瘤的首位。胃癌占胃原发性肿瘤的 95% 以上, 胃癌发生率男性为 47/10 万, 女性为 24/10 万^[3]。本研究旨在探讨 CD14⁺ DR^{low/-} MDSC 在胃癌患者外周血及肿瘤组织中的表达情况, 为进一步阐明胃癌发生机制和寻找新的治疗靶点提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象和主要材料

选择 2009 年 3 月至 2010 年 10 月入住我院的胃癌患者 43 例, 入组患者均符合胃癌的组织学诊断标准, 年龄 18 ~ 65 岁, 中位年龄 50 岁, 无合并其他系统肿瘤, 近期没有外伤和感染性疾病。按照胃癌的临床分期标准^[4,5], 其中 I 期 9 例、II 期 13 例、III 期 14 例、IV 期 7 例。另外选择健康志愿者 26 人(健康对照组), 平均年龄(62.30 ± 10.87)岁, 既往无胃癌等相关疾病, 近期无外伤、感染性疾病及自身免疫性疾病。对照组年龄、性别与胃癌患者组相匹配。入组人员均签署知情同意书, 并获得本单位伦理委员会批准。留取两组人员的外周血和手术切除的部分肿瘤组织。

荧光抗体 CD14-APC、HLA-DR-PerCP 购自美国 BD Pharmingen 公司, 流式细胞仪 FACS Calibur 购自美国 BD 公司。

1.2 流式细胞仪检测外周血和肿瘤组织 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达水平

取新鲜外周全血 100 μl, 加 CD14-APC(5 μl)、HLA-DR-PerCP(20 μl), 混匀后置 4 °C 避光孵育 20 min, 然后加 1 ml 红细胞裂解液置于避光处 3 min, 离心 1 500 × g, 5 min。倾倒入清后再加 1 ml PBS, 振荡后再次离心 1 500 × g, 5 min, 弃去上清, 加 1% 多聚甲醛固定后用流式细胞仪检测, 用 FlowJo 软件分析流式细胞术数据。为便于比较, 外周血和肿瘤组织中的 MDSCs 比例均取与总淋巴细胞数的比值。

1.3 肿瘤浸润组织和非肿瘤浸润组织内淋巴细胞

的分离方法

为了分析组织淋巴细胞中 MDSCs 的比例, 采用过滤膜将组织中淋巴细胞分离出来, 以便于流式细胞术分析。以肿瘤组织为例, 非肿瘤浸润组织中淋巴细胞分离的方法与之相同。肿瘤组织浸泡至少量缓冲液(PBS)中, 剪切成小块; 使用毛面玻片研磨组织, 至细碎糊状; 将研磨组织通过筛网过滤(150 ~ 200 目), 过滤组织转移至离心管内; 在冰上静置 10 min, 1 200 转瞬间离心沉降(转速达至 1 200 之后, 立即停止即可); 上清液转移至第一次沉降上清液混合到一起, 离心 2 500 × g、20 min; 弃上清, 沉淀重悬后与淋巴细胞分离液按照 4: 6 体积分层叠加, 离心 2 500 × g、20 min; 吸取中间单个核细胞层, 重悬于 10 ml PBS, 离心 2 000 × g、15 min; 弃上清, 重悬于 10 ml PBS, 离心 1 500 × g、10 min; 再次弃上清, 重悬、计数, 供下一步染色用。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料若呈正态分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料多组间比较: 若符合正态分布, 用一维方差分析(One Way Anova); 若不符合正态分布, 用 Mann-Whitney U 检验; 配对资料选用 Wilcoxon *t* 检验。P < 0.05 或 P < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 在胃癌患者外周血和肿瘤组织中的表达

胃癌患者外周血中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达高于健康者[(2.37 ± 1.71)% vs (0.89 ± 0.47)%, P < 0.01], 而胃癌患者肿瘤组织中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs(MDSCs 与肿瘤组织中总淋巴细胞的比值)表达高于外周血, [(2.87 ± 1.93)% vs (2.37 ± 1.71)%, P < 0.05; 图 1]。结果说明胃癌患者外周血的 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 数量高于健康者。

2.2 不同分期的胃癌组织中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达水平

在不同分期的胃癌组织中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达都不相同, 恶性度高的癌组组中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 表达明显高于恶性度低的胃癌组织(P < 0.01, 图 2A)。患者外周血和肿瘤组织中 MDSCs 表达配对分析发现, 肿瘤浸润组织淋巴细胞中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 表达明显高于外周血和非肿瘤

浸润组织[(3.90 ± 1.67)% vs (2.62 ± 1.53)% , $P < 0.01$, 图 2B]。进一步统计学处理, CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 与年龄、性别、血细胞计数(WBC、RBC、HGB、PLT)、生化指标(ALT、AST、ALB、TBIL)、肿瘤免疫(CA-125、CA19-9、CEA)等无明显相关性($P > 0.05$)。

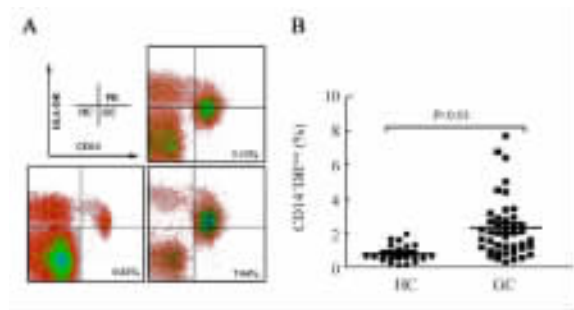


图 1 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 在胃癌患者和对照者外周血和肿瘤组织中的表达

Fig. 1 Expression of CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs in peripheral blood and tumor tissue of gastric carcinoma patients

A: Flow cytometry results; B: Mean values; HC: Healthy control; GC: Gastric cancer; PB: Peripheral blood

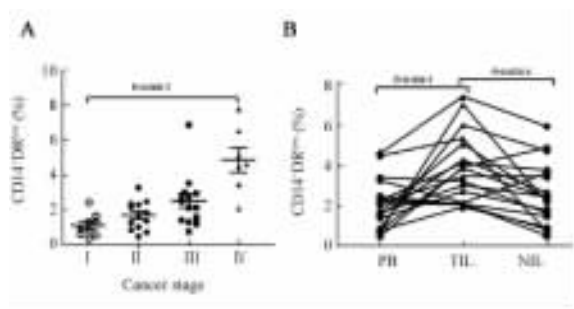


图 2 不同分期胃癌组织中 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达
Fig. 2 Expression of CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs in gastric carcinoma tissues of different stages

A: Comparison among different stages of gastric cancer;
B: Comparison between peripheral blood and tissues of gastric cancer. PB: Peripheral blood; TIL: Tumor-infiltrating lymphocyte; NIL: Non tumor-infiltrating

3 讨论

在某些病理情况下,如肿瘤、炎症、外伤及感染等,均可以检测到 MDSCs 在体内的扩增,尤其在荷瘤小鼠的脾脏、血液及肿瘤组织,贯穿整个肿瘤生长过程,且与肿瘤的大小和恶性程度有一定的相关性^[6]。在小鼠体内,MDSCs 定义为骨髓系分化抗原 GR1⁺ 和 CD11b⁺。这群细胞在小鼠骨髓中含有

20% ~ 30%、脾脏中含有 2% ~ 4%。最新研究^[7]发现,小鼠体内的 MDSCs 根据 GR1 的两个不同表位特异性抗体水平的差异,鉴定了两个不同 MDSCs 亚群:粒细胞样 MDSCs,具有 CD11b⁺ LY6G⁺ LY6C^{low} 的表型;单核细胞样 MDSCs,具有 CD11b⁺ LY6G⁻ LY6C^{low} 的表型。在人体内,尚无确定的表型用于鉴定 MDSCs。最近, Hoechst 等^[8]发现,肝癌患者外周血中存在一种不成熟的单核细胞,这群高 CD14、低或不低 HLA-DR 分子,形态上具有单核细胞的特征,高 CD11b、CD11c、CD33、CD16、CCR2^[9-10] 等。体外功能实验发现,这群细胞具有很强的免疫抑制功能,能抑制 CD4、CD8 阳性 T 细胞的增殖和分泌细胞因子,并促使其凋亡;还能诱导调节性 Treg 的表达增加,间接的抑制体内免疫反应。

MDSCs 的免疫抑制功能与肿瘤的发生、发展有十分密切的关系^[4-5],主要是抑制宿主免疫监视和促使肿瘤细胞的免疫逃逸^[11]。MDSCs 促进肿瘤发展可概括为两个方面,一方面 MDSCs 可以促进多种血管形成因子,如 VEGF^[12]、bFGF(basic fibroblast growth factor)和 MMPs 等^[13],这些因子能够直接促进肿瘤血管的形成。此外,研究^[14]发现, G-CSF 能够上调 MDSCs 表面的 Bv8 蛋白,该蛋白能够从骨髓动员更多的 MDSCs 到达外周。另一方面, MDSCs 可以通过分泌的 ARG1、iNOS 和 ROS 抑制 T 细胞介导的特异性抗肿瘤免疫及 NK 细胞和巨噬细胞介导的天然抗肿瘤免疫^[15-16]。高水平的 ARG1、ARG1 可以分解环境中存在的 T 细胞活化所必需的精氨酸,从而导致 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的活化受阻^[17]。此外, MDSCs 还能下调 TCR 相关 ξ 链, ξ 链导致 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的活化所需要信号不能传递;或者 MDSCs 可以诱导 T 细胞阻滞在 G₀/G₁ 周期。MDSCs 可以下调 naïve T 细胞淋巴结归巢必需分子 CD62L, 致 naïve T 细胞不能有效迁移到能够接受肿瘤抗原刺激的淋巴结,导致活化的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞数量减少。MDSCs 还可以通过消耗环境中 T 细胞活化所必需的半胱氨酸,从而阻断 T 细胞的活化。

本实验中同样发现, CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 在胃癌患者外周血中表达升高,而且在肿瘤组织浸润的淋巴细胞中所占比例外周血还要高,这说明胃癌的发生可能也与 MDSCs 有关。进一步的分析还发现,恶性度高的肿瘤组织内 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 比恶性低的肿瘤组织内 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 要高。

CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 在胃癌患者外周血和肿瘤组织升高,说明胃癌的发生与这群 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 的表达变化必然存在某种联系^[18]。有观点

认为, MDSCs 的免疫抑制功能可以作为肿瘤治疗的新靶点^[19-20], 即通过免疫手段降低肿瘤患者体内 MDSCs 的水平, 恢复免疫监视功能, 增强自体免疫细胞(CTL、ADCC、NK 等)等免疫清除能力^[21]。对 MDSCs 在胃癌中的进一步深入研究有望为进一步明确胃癌发生机制、寻求新的生物治疗方案打下基础。但是关于这群 CD14⁺ DR^{low/-} MDSCs 细胞的表型特点还需进一步明确, 其来源和抑制机制等还需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9 (3): 162-174.
- [2] Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(1): 234-243.
- [3] Lordick F, Grenacher L, Rocken C, et al. [Diagnosis and treatment of gastric cancer] [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2010, 135 (34/35): 1671-1682, 1683-1686.
- [4] Piazuelo MB, Epplein M, Correa P. Gastric cancer: an infectious disease [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2010, 24(4): 853-869.
- [5] Bornschein J, Kandulski A, Selgrad M, et al. From gastric inflammation to gastric cancer [J]. *Dig Dis*, 2010, 28(4/5): 609-614.
- [6] Nagaraj S, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 601(2): 213-223.
- [7] Munera V, Popovic P J, Bryk J, et al. Stat 6-dependent induction of myeloid derived suppressor cells after physical injury regulates nitric oxide response to endotoxin [J]. *Ann Surg*, 2010, 251 (1): 120-126.
- [8] Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(1): 234-243.
- [9] Zhang J, Patel L, Pienta K J. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1): 41-48.
- [10] Mildner A, Mack M, Schmidt H, et al. CCR2 + Ly-6 Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system [J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 9): 2487-2500.
- [11] 刘秋燕, 曹雪涛. MDSCs 与肿瘤免疫逃逸 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(4): 319-324.
- [12] Gerber HP, Olazoglu E, Grewal IS. Targeting inflammatory cells to improve anti-VEGF therapies in oncology [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2010, 180: 185-200.
- [13] Melani C, Sangaletti S, Barazzetta F M, et al. Amino-biphosphate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (23): 11438-11446.
- [14] Morales JK, Kmiecik M, Knutson KL, et al. GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1- bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123 (1): 39-49.
- [15] Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011.
- [16] Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor [J]. *Hepatology*, 2009, 50(3): 799-807.
- [17] Hanson EM, Clements VK, Sinha P, et al. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells [J]. *J Immunol*, 2009, 183(2): 937-944.
- [18] Chalmin F, Mignot G, Ghiringhelli F. [Myeloid-derived suppressor cells: a key player in cancer] [J]. *Med Sci (Paris)*, 2010, 26(6/7): 576-579.
- [19] Lee JM, Seo JH, Kim YJ, et al. Agonistic anti-CD137 monoclonal antibody treatment induces CD11bGr-1 myeloid-derived suppressor cells [J]. *Immune Netw*, 2010, 10(3): 104-108.
- [20] Livesey KM, Tang D, Zeh HJ, et al. Autophagy inhibition in combination cancer treatment [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(12): 1269-1279.
- [21] Ko JS, Bukowski RM, Fincke JH. Myeloid-derived suppressor cells: a novel therapeutic target [J]. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11 (2): 87-93.

[收稿日期] 2011-02-15

[修回日期] 2011-04-20

[本文编辑] 韩丹

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅