

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.010

· 临床研究 ·

Tim-3在食管癌患者T细胞表面的表达及其临床意义

郑雨佳^a, 杨惠云^{ab}, 吴倩^a, 王丹^a, 张震^a, 赵松^c, 齐宇^c, 张毅^{ac}, 黄岚^a(郑州大学 a. 第一附属医院 生物细胞治疗中心; b. 生命科学学院; c. 第一附属医院 胸外科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的:** 探讨Tim-3在食管癌患者T细胞表面的表达及其临床意义。**方法:** 收集2016年9月至2018年4月郑州大学第一附属医院胸外科25例食管癌患者的新鲜肿瘤组织和癌旁组织及配对的外周静脉血,同时取10例健康人外周静脉血。流式细胞术检测25例食管癌患者癌组织及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中T细胞Tim-3、早期凋亡分子和因子的表达水平,并分析了Tim-3⁺T细胞的比例与临床病理参数的关系。qPCR检测肿瘤组织及癌旁组织中Tim-3的表达水平。运用TCGA数据库进一步验证Tim-3在肿瘤组织和癌旁组织中的表达水平及其与预后的关系。**结果:** 结果发现Tim-3在食管癌患者肿瘤组织T细胞表达水平较高($P<0.01$)。Tim-3⁺T细胞功能呈耗竭状态($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且食管癌微环境中T细胞表面Tim-3的表达与淋巴结转移和临床分期密切相关(均 $P<0.01$)。**结论:** Tim-3在食管癌患者T细胞表面的表达导致T细胞功能耗竭,提示Tim-3可能成为一个潜在的食管癌治疗靶点。

[关键词] 食管癌; Tim-3; T细胞; 免疫检查点

[中图分类号] R735.1; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0312-05

Tim-3 expression on T cell surface in patients with esophageal cancer and its clinical significance

ZHENG Yujia^a, YANG Huiyun^{ab}, WU Qian^a, WANG Dan^a, ZHANG Zhen^a, ZHAO Song^c, QI Yu^c, ZHANG Yi^{ac}, HUANG Lan^a(a. Biotherapy Center of the First Affiliated Hospital; b. College of Life Sciences; c. Thoracic Surgery of the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of Tim-3 on the surface of T cells in patients with esophageal cancer, and to explore its clinical significance. **Methods:** Fresh tumor tissues, paracancerous tissues, and peripheral blood were collected from 25 patients with esophageal cancer at the first affiliated Hospital of Zhengzhou University from September 2016 to April 2018. Peripheral blood from 10 healthy subjects was also collected during the same time period. The expressions of Tim-3, early apoptotic molecules and intrinsic factors in tumor tissues and peripheral blood PBMCs of 25 esophageal cancer patients were determined by flow cytometry. Also, the correlation between Tim-3⁺T cell proportion and pathological parameters was investigated. The expression of Tim-3 in tumor tissues and paracancerous tissues was detected by fluorescence quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). TCGA database was used to further verify the expression of Tim-3 in tumor tissues and paracancerous tissues, as well as its relationship with prognosis. **Results:** Tim-3 expression on T cells was higher in tumor tissues from esophageal cancer patients ($P<0.01$). Tim-3⁺T cell function was in an exhausted status ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the expression of Tim-3 on the surface of T cells in esophageal cancer microenvironment was closely related to lymph node metastasis and clinical staging (all $P<0.01$). **Conclusion:** Taken together, Tim-3 expression on the surface of T cells could induce T cell dysfunction in patients with esophageal cancer, suggesting that Tim-3 may serve as a potential therapeutic target for esophageal cancer.

[Key words] esophageal cancer; Tim-3; T cells; immune checkpoint

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(3): 312-316. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.010]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81773045);河南省医学科技攻关计划资助项目(No.201702005)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81773045), and the Subsidized Project of Medical Science and Technology Research Program of Henan Province (No.201702005)

[作者简介] 郑雨佳(1993-),女,硕士生,主要从事肿瘤免疫治疗的研究,E-mail:zhengyujia0909@163.com

[通信作者] 黄岚(HUANG Lan, corresponding author),博士,副教授,硕士生导师,主要从事肿瘤免疫治疗的研究,E-mail:lanhuang@zzu.edu.cn; 张毅(ZHANG Yi, co-corresponding author),博士,教授,主任医师,博士生导师,主要从事肿瘤免疫微环境的研究,E-mail:yizhang@zzu.edu.cn

食管癌是全球癌症相关死亡的主要原因之一。在全球范围内,大约一半的食管癌病例发生在中国^[1]。尽管食管癌的诊疗在早期发现、精确诊断和联合治疗方面取得了很大进步,但食管癌的整体5年生存率仍然很低^[2,3]。免疫监视功能的失调在肿瘤发生和发展过程发挥着重要的作用。肿瘤微环境中T细胞的功能障碍或衰竭是肿瘤发病的关键机制^[4-5]。目前,恢复T淋巴细胞抗肿瘤活性的免疫疗法已成为癌症治疗的重要手段^[6]。免疫检查点被认为是肿瘤微环境中抑制T细胞功能的关键机制,是肿瘤免疫及免疫治疗领域的研究热点^[7]。Tim-3首先被发现于Th1细胞表面表达,能够抑制免疫应答,参与诱导免疫耐受^[8]。Tim-3是调节T细胞免疫应答的关键分子,在慢性病毒感染和肿瘤中,其持续表达导致T细胞功能耗竭^[9-10]。本研究主要检测了食管癌患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)以及肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)中CD3⁺T细胞上的Tim-3的表达情况,并探讨Tim-3的表达和患者的病理分期的相关性,为Tim-3成为食管癌治疗的潜在的免疫检查点提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 临床资料及标本来源

收集2016年9月至2018年4月郑州大学第一附属医院胸外科25例食管癌患者的新鲜肿瘤组织和癌旁组织及配对的外周静脉血5 ml,同时取10例健康志愿者外周血5 ml。患者年龄45~79岁,平均(62.28±1.77)岁。按照2009年美国国立综合癌症网络(NCCN)指南临床分期标准分期:I+II期17例、III+IV期8例。所有患者术前均未接受过放、化疗,所有标本均经病理诊断确诊。所有患者均签署了知情同意书,人体标本采集的协议得到了郑州大学第一附属医院伦理委员会的批准(科研-2016-LW-52)。

1.2 主要试剂

肿瘤分离试剂盒购自德国美天旎公司,人外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司,流式荧光抗体均购自美国BioLegend公司, RNA提取试剂TRIzol和反转录试剂盒均购自日本TaKaRa Bio公司,PCR试剂荧光染料为美国罗氏产品,BFA、PMA、离子霉素购自美国sigma公司。

1.3 PBMC及TIL的制备

将稀释过后的健康志愿者外周血缓慢加入到淋巴细胞分离液的上层(血液制品与淋巴细胞分离液的体积之比为2:1),2 500×g离心25 min,用无菌吸管小心吸取白膜层置于另一无菌离心管中,加入适

量PBS,1 500×g离心10 min,得到的沉淀物即PBMC。肿瘤组织按照美天旎肿瘤分离试剂盒标准步骤处理,消化成单细胞悬液,用70 μm的筛网滤过后,按照上述PBMC的制备方法提取出TIL。

1.4 流式细胞术检测细胞Tim-3分子表达、细胞因子分泌和细胞凋亡情况

(1)细胞表面染色:将PBMC和TIL用PBS洗涤后,离心弃上清,避光加入流式表面抗体,包括7-氨基放线菌素D(7AAD)-PerCP、CD3-APC-Cy7、CD56-PE-Cy7、Tim-3-PE。避光4℃孵育20 min后使用流式细胞仪检测CD3⁺T细胞表面Tim-3分子(CD3⁺CD56⁻为CD3⁺T细胞)表达情况。(2)细胞胞内因子染色:向TIL加入佛波酯(PMA)(50 mg/L)、离子霉素(750 mg/L)和布雷非德菌素A(BFA),在37℃、5%CO₂培养箱中培养6 h。后将细胞收集于1.5 ml离心管中,1 500×g离心5 min,弃上清。用PBS洗涤细胞,离心弃上清后避光加入流式检测用表面抗体7AAD-PerCP、CD3-APC-Cy7、CD56-PE-Cy7、Tim-3-PE等,避光4℃孵育20 min,每管加入200 μl 4%多聚甲醛固定,4℃避光固定30 min后,1 500×g离心5 min,弃上清。加入5×破膜剂400 μl,4℃避光孵育1 h,1 500×g离心5 min,弃上清300 μl。每管细胞避光加胞内抗体IFN-γ-APC,4℃避光孵育20 min,使用流式细胞仪检测细胞因子分泌情况。(3)细胞凋亡检测:用PBS清洗细胞,弃上清,加200 μl Annexin V binding 缓冲液重悬,避光加入流式抗体7AAD-PerCP、CD3-APC-Cy7、CD56-PE-Cy7、Tim-3-PE、Annexin V-APC,避光4℃孵育20 min,使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 qPCR实验检测癌组织中Tim-3 mRNA表达水平

TRIzol法提取食管癌肿瘤组织中的总RNA,根据逆转录试剂盒的标准步骤逆转录成cDNA,在通过qPCR检测食管癌癌组织中Tim-3的变化。目标基因Tim-3引物序列F:5'-GCAGGGCAGATAGGCATTCT-3',R:5'-CTGCTGCTACTACTTACAAGGTC-3';内参基因GAPDH引物F:5'-GGAGCCAAAAGGGTCATCACTC-3',R:5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'。随后,按试剂盒说明建立终体积为20 μl的PCR反应体系2 μl逆转录产物、10 μl SYBR Green Mix、上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μl。PCR热循环参数为:95℃5 min,然后3步反应:94℃变性30 s,60℃退火30 s,进行45个循环。检测结果采用2^{-ΔΔCt}法进行计算。实验重复3次。

1.6 TCGA数据库验证肿瘤组织中Tim-3的表达水平与预后的关系

TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/>)数据库下载食管癌数据库,GraphPad Prism 7.0分析Tim-3的表达

及与病理信息及临床预后的关系。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件和 GraphPad Prism 7.0 作图软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tim-3 在食管癌患者 PBMC、TIL 中 T 细胞表面

的表达水平增高

流式细胞术检测结果(图1)显示, 与食管癌患者 PBMC 相比, 肿瘤微环境中 T 细胞表面 Tim-3 的表达水平明显提高 [$(19.67 \pm 3.504)\%$ vs $(1.584 \pm 0.2333)\%$, $P < 0.01$]; 食管癌患者 PBMC 和 TIL 中 T 细胞表面 Tim-3 的表达均较健康人明显提高 [$(1.584 \pm 0.23)\%$ vs $(0.39 \pm 0.10)\%$, $P < 0.01$; $(19.67 \pm 3.50)\%$ vs $(0.39 \pm 0.10)\%$, $P < 0.01$]。表明食管癌患者 T 细胞表面的 Tim-3 表达水平增高。

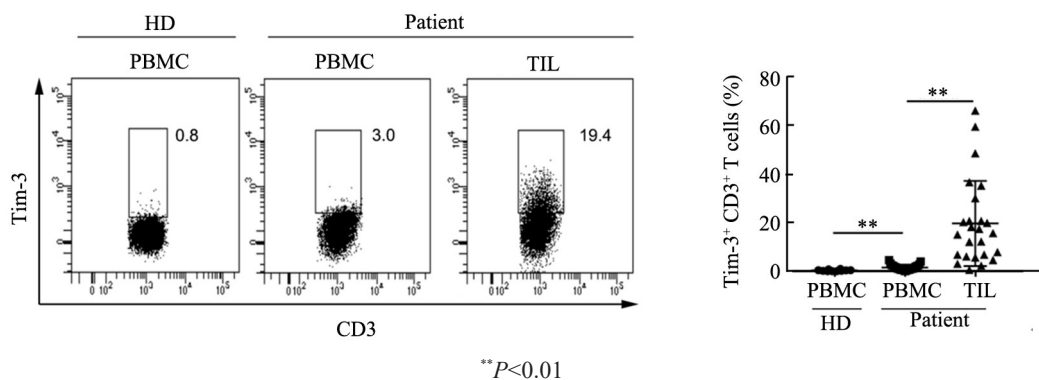


图1 Tim-3在食管癌患者PBMC和TIL中T细胞表面的表达情况

Fig. 1 Tim-3 expression on the surface of T cells in PBMC and TIL of patients with esophageal cancer

2.2 Tim-3⁺ CD3⁺ T 细胞分泌 IFN- γ 能力明显减弱

流式细胞术检测结果(图2)显示, Tim-3⁺的 CD3⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 水平较 Tim-3⁻的 CD3⁺ T 细胞明显降低 [$(16.82 \pm 2.33)\%$ vs $(27.1 \pm 4.70)\%$, $P < 0.05$], 表明 Tim-3⁺ T 细胞分泌功能较 Tim-3⁻ T 细胞明显下降。

组织中 CD3⁺ T 细胞中的表达

流式细胞术检测结果, Tim-3 在食管癌淋巴结转移患者肿瘤微环境中 T 细胞表面的表达水平明显增高 ($P < 0.05$, 图4A); 肿瘤临床 III~IV 分期的患者 TIL 中 T 细胞表面 Tim-3 的表达水平明显高于 I~II 分期 ($P < 0.01$, 图4B)。

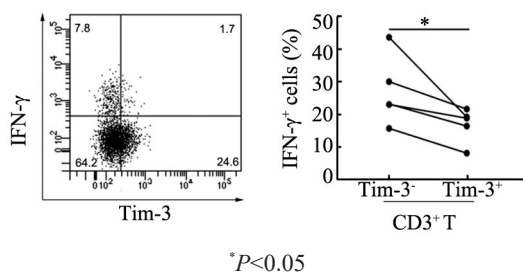


图2 Tim-3⁺ CD3⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 较 Tim-3⁻ CD3⁺ T 细胞明显降低

Fig. 2 Secretion of IFN- γ from Tim-3⁺ CD3⁺ T cells was significantly lower than that from Tim-3⁻ CD3⁺ T cells

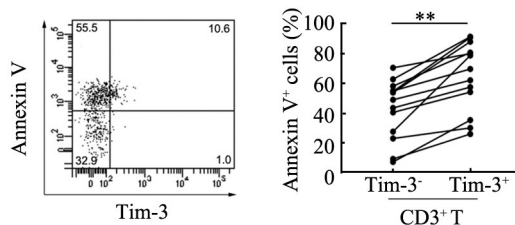


图3 Tim-3⁺ CD3⁺ T 细胞较 Tim-3⁻ CD3⁺ T 细胞更趋向于凋亡

Fig. 3 Tim-3⁺ CD3⁺ T cells were more apoptotic than Tim-3⁻ CD3⁺ T cells

2.3 Tim-3⁺ CD3⁺ T 细胞的凋亡明显增多

流式细胞术检测结果(图3)显示, Tim-3⁺ CD3⁺ T 细胞 Annexin V 的表达水平明显较 Tim-3⁻ CD3⁺ T 细胞明显提高 [$(64.98 \pm 6.39)\%$ vs $(42.71 \pm 5.59)\%$, $P < 0.01$], 表明 Tim-3⁺ CD3⁺ T 细胞更趋向于凋亡。

2.5 肿瘤组织中 Tim-3 基因水平的表达与患者预后呈负相关

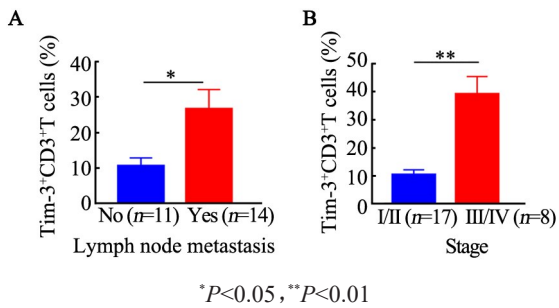
qPCR 实验检测食管癌患者癌组织及癌旁组织中 Tim-3 基因的表达水平, 结果显示, 与癌旁组织比较, 肿瘤组织中 Tim-3 的表达显著升高 (5.066 ± 1.449 vs 0.8147 ± 0.1508 , $P < 0.01$), TCGA 数据库进一步验证结果显示,

2.4 淋巴结转移和临床病理分期影响 Tim-3 在肿瘤

肿瘤组织中 Tim-3 的表达显著升高 1.812 ± 0.06216 vs 0.8461 ± 0.1839 , ($P < 0.01$; 图 5A)。将 TCGA 数据库中患者 Tim-3 的表达与临床参数进行相关性分析, 结果显示, Tim-3 的表达和肿瘤的大小和分期明显相关 ($P < 0.05$, 图 5B), 并且和患者的生存时间呈现出明显的负相关 ($P < 0.05$, 图 5C)。表明肿瘤组织中 Tim-3 基因水平的表达与患者预后呈负相关。

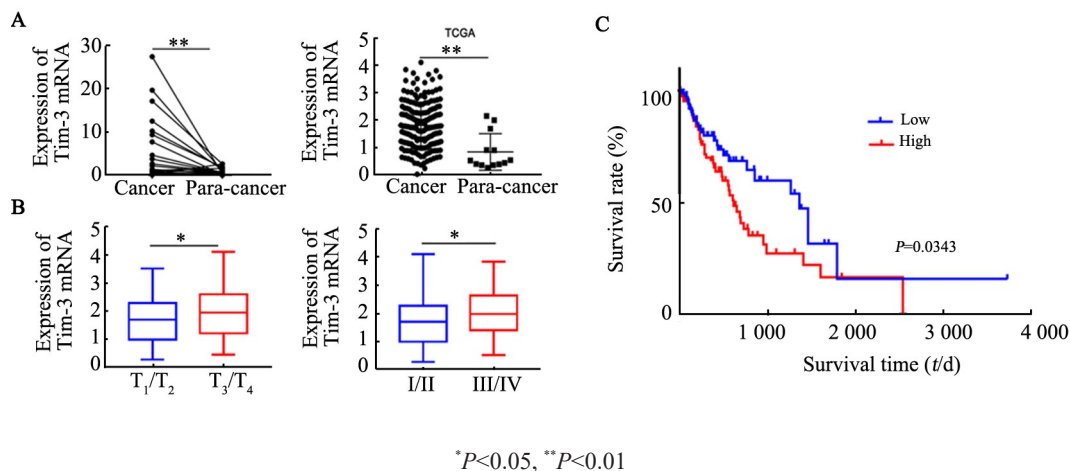
3 讨论

许多肿瘤都有逃离免疫监视的能力, 这是导致肿瘤细胞增殖和转移的主要原因。T 细胞是人体重要的免疫细胞, 在抗肿瘤过程中发挥着重要的作用。已有研究^[6]报道, T 细胞免疫功能的耗竭导致其不能更好的识别肿瘤, 杀伤肿瘤细胞, 是导致肿瘤发生逃逸的一个重要原因。目前有很多研究致力于恢复免疫细胞的功能以期提高抗肿瘤的疗效, 延长患者的寿命。近年来, 大量研究表明, PD-1、CTLA-4 的表达增高是导致 T 细胞功能下降的重要原因。许多临床实验^[11]也表明, 在黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾癌、头颈部鳞癌及泌尿系等肿瘤中 anti-PD-1、anti-CTLA-4 对肿瘤患者有一定的疗效。通过阻断免疫检查点以恢复免疫细胞的功能已取得了很大的突破, 但仍存在大量患者在使用 PD-1 和 CTLA-4 的抗体之后未能从中获益。所以发现新的免疫检查点用于临床治疗尤为重要。



A: Lymph node metastasis; B: Clinicopathological staging
图 4 淋巴结转移和临床病理分期对 Tim-3 在肿瘤组织中 CD3⁺T 细胞中表达的影响

Fig.4 Effects of lymph node metastasis and clinicopathological staging on the expression of Tim-3 on CD3⁺T cells in tumor tissues



A: Relative mRNA levels of Tim-3 in tumor tissues and normal tissues in this study or TCGA database; B: Relative mRNA levels of Tim-3 in different pathological stages; C: Kaplan-Meier analysis for survival time according to Tim-3 level

图 5 肿瘤组织中 Tim-3 基因水平的表达情况及与患者预后相关性

Fig. 5 Expression of Tim-3 gene in tumor tissues and its correlation with prognosis

Tim-3 是新一代的共抑制性分子^[12], 在肿瘤发生发展中发挥重要的作用。已有研究表明, Tim-3 在肾癌^[13]、肺癌^[14]、肝癌^[15]等肿瘤中的表达均有较高水平, 并且会促进肿瘤的进展。在肝癌中, 运用 Tim-3 抗体的封锁可以改善 T 细胞的功能, 无论是体内实验还是体外实验均已得到证实^[16]。但关于 Tim-3 在食管癌患者中的研究很少, 本文主要探究了 Tim-3 在食管癌患者外周血及肿瘤微环境中 T 细胞的表达情况及临

床意义。

本研究通过检测食管癌患者外周血中和肿瘤组织中 TIL 表面 Tim-3 的表达情况发现, Tim-3 在肿瘤微环境中 T 细胞表面表达增高。同时发现, 与健康人外周血中的 T 细胞相比, 食管癌患者 T 细胞的 Tim-3 明显增高。并且 qPCR 结果及 TCGA 数据库均证实 Tim-3 的基因表达水平在癌组织中高于癌旁组织。这些数据表明 Tim-3 在肿瘤组织部位有聚集的现象。

为了进一步了解 Tim-3 表达的意义及对 T 细胞功能的影响, 进一步检测其胞内因子分泌和细胞凋亡情况, 结果发现 Tim-3⁺ 的 T 细胞 IFN- γ 的分泌能力下降, 早期凋亡标志物 Annexin V 的表达增多。证实 Tim-3 在食管癌患者的 T 细胞表面表达中会导致 T 细胞的功能疲乏, 进而发挥免疫抑制的作用。进一步分析了 CD3⁺ T 细胞表面表达 Tim-3 与食管癌肿瘤大小及肿瘤分期的关系, 发现肿瘤越大或分期较晚的患者肿瘤微环境中 CD3⁺ T 细胞表面 Tim-3 的表达水平越高。

综上所述, Tim-3 在食管癌患者 CD3⁺ T 细胞表面表达增高, Tim-3 在 CD3⁺ T 细胞表面的表达会导致 T 细胞功能耗竭, 并且与食管癌肿瘤病理分期明显相关, 提示 Tim-3 可能成为食管癌患者免疫治疗的靶点。

[参考文献]

- [1] HE Z, LIU Z. Efficacy of endoscopic screening for esophageal cancer in China (ESECC): design and preliminary results of a population-based randomised controlled trial[J]. *Gut*, 2019, 68(2): 198-206. DOI:10.1136/gutjnl-2017-315520.
- [2] GAVIN A T, FRANCISCI S, FOSCHI R, et al. Oesophageal cancer survival in Europe: a EURO-CARE-4 study[J]. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36(6): 505-512. DOI:10.1016/j.canep.2012.07.009.
- [3] DI PIETRO M, CANTO M I, FITZGERALD R C. Endoscopic management of early adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus: screening, diagnosis, and therapy[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(2): 421-436. DOI:10.1053/j.gastro.2017.07.041.
- [4] MIRZAEI R, SARKAR S, YONG V W. T cell exhaustion in glioblastoma: intricacies of immune checkpoints[J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(2): 104-115. DOI:10.1016/j.it.2016.11.005.
- [5] THOMMEN D S, SCHUMACHER T N. T cell dysfunction in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(4): 547-562. DOI:10.1016/j.ccell.2018.03.012.
- [6] MCKINNEY E F, SMITH K G. T cell exhaustion and immune-mediated disease—the potential for therapeutic exhaustion[J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 43(1): 74-80. DOI:10.1016/j.coi.2016.09.005.
- [7] WORONIECKA K, CHONGSATHIDKIET P. T-cell exhaustion signatures vary with tumor type and are severe in glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(17): 4175-4186. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-17-1846.
- [8] MONNEY L, SABATOS C A, GAGLIA J L, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease[J]. *Nature*, 2002, 415(6871): 536-541. DOI:10.1038/415536a.
- [9] GRABMEIER-PFISTERSHAMMER K, STECHER C, ZETTL M, et al. Antibodies targeting BTLA or TIM-3 enhance HIV-1 specific T cell responses in combination with PD-1 blockade[J]. *Clin Immunol*, 2017, 183(2): 167-173. DOI:10.1016/j.clim.2017.09.002.
- [10] GEFEN T, CASTRO I, MUHAREMAGIC D, et al. A TIM-3 oligonucleotide aptamer enhances T cell functions and potentiates tumor immunity in mice[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(10): 2280-2288. DOI:10.1016/j.ymthe.2017.06.023.
- [11] LYON A R, YOUSAF N, BATTISTI N M L, et al. Immune checkpoint inhibitors and cardiovascular toxicity[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(9): 447-458. DOI:10.1016/s1470-2045(18)30457-1.
- [12] ANDERSON A C, JOLLER N, KUCHARO V K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation[J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 989-1004. DOI:10.1016/j.immuni.2016.05.001.
- [13] GRANIER C, DARIANE C, COMBE P, et al. Tim-3 expression on tumor-infiltrating PD-1(+)/CD8(+) T Cells correlates with poor clinical outcome in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(5): 1075-1082. DOI:10.1158/0008-5472.can-16-0274.
- [14] GAO J, QIU X, LI X, et al. Expression profiles and clinical value of plasma exosomal Tim-3 and Galectin-9 in non-small cell lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(3): 409-415. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.02.114.
- [15] LI F, LI N, SANG J, et al. Highly elevated soluble Tim-3 levels correlate with increased hepatocellular carcinoma risk and poor survival of hepatocellular carcinoma patients in chronic hepatitis B virus infection[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(11): 941-951. DOI:10.2147/cmar.s162478.
- [16] ZHOU G, SPRENGERS D, BOOR P P C, et al. Antibodies against immune checkpoint molecules restore functions of tumor-infiltrating T cells in hepatocellular carcinomas[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(4): 1107-1110. DOI:10.1053/j.gastro.2017.06.017.

[收稿日期] 2018-12-06

[修回日期] 2019-02-01

[本文编辑] 王映红