

氩氦冷冻消融治疗前后荷瘤鼠程序性死亡配体-1 的表达变化

赵 丽¹, 李泳群², 冯华松²

(1.安徽医科大学海军临床学院,安徽 合肥 230022;2.海军总医院,北京 100048)

摘 要: [目的] 探讨冷冻治疗对荷瘤鼠单个核细胞表面程序性死亡配体-1(PD-L1)分子表达的影响。[方法] 流式细胞术检测冷冻术后 2h、3d、7d 对照组和冷冻治疗组荷瘤鼠外周血和脾脏单个核细胞表面 PD-L1 分子的动态表达。[结果] 对照组单个核细胞表面 PD-L1 表达水平逐渐升高($P<0.01$),冷冻治疗组逐渐下降($P<0.05$);与对照组相比,冷冻治疗术后 2h PD-L1 分子表达有过性升高,但 3d、7d 后显著下降($P<0.01$)。[结论] 单个核细胞表面 PD-L1 分子表达水平随 Lewis 肺癌进展逐渐增强,冷冻治疗可能可以通过降低 PD-L1 分子的表达水平,提高抗肿瘤免疫活性。

关键词: 冷冻治疗;肺肿瘤;程序性死亡配体-1

中图分类号: R73-36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)07-0567-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.07.B008

Changes of Expression of Programmed Death Ligand-1(PD-L1) in Tumor-bearing Mice Before and After Argon-Helium Cryoablation

ZHAO Li¹, LI Yong-qun², FENG Hua-song²

(1. Naval Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230022, China;

2. Chinese PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of cryoablation on the expression of programmed death ligand-1(PD-L1) on the surface of mononuclear cells of tumor-bearing mice. [Methods] The expression of PD-L1 on the mononuclear cells of peripheral blood and spleen in control group and cryotherapy group was determined by flow cytometry after 2 hours, 3 days, 7 days of Argon-Helium cryoablation. [Results] The expression level of PD-L1 on the surface of mononuclear cells gradually increased in the control group ($P<0.01$), but it gradually decreased in the cryotherapy group ($P<0.05$). Compared with control group, the expression level of PD-L1 increased after 2 hours of cryoablation, but significantly decreased after 3 days and 7 days ($P<0.05$). [Conclusion] The expression level of PD-L1 on the surface of mononuclear cells increases gradually with tumor progression of Lewis lung cancer, and Argon-Helium cryoablation possibly enhances the anti-tumor immune activity by reducing the expression level of PD-L1.

Subject words: cryoablation; lung neoplasms; programmed death ligand-1(PD-L1)

氩氦冷冻消融治疗近年来已经发展成为中晚期实体瘤的主要微创治疗技术之一,具有显著减轻肿瘤负荷,并发症少而轻微等特点,进而有效提高患者的生存率^[1]。既往研究显示,冷冻治疗促进淋巴细胞肿瘤特异性干扰素分泌,提高自然杀伤细胞(NK)、细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的特异性杀伤活性^[2],但

具体机制并未阐明。程序性死亡受体-1(PD-1)/程序性死亡配体-1(PD-L1)信号通路参与肿瘤免疫逃逸过程,PD-L1 的表达程度可能与非小细胞肺癌(NSCLC)患者的临床分期、淋巴结转移等呈正相关,与肺癌细胞的分化程度、肿瘤浸润性 T 淋巴细胞数量、预后等呈负相关^[3-5]。本研究建立 C57/BL 小鼠 Lewis 肺腺癌皮下移植瘤动物模型,应用流式细胞术检测冷冻治疗前后荷瘤鼠外周血及脾脏单个核细胞表面 PD-L1 分子的表达变化,探讨冷冻治疗可能的

基金项目: 首都医学发展科研基金(NO.2007-2025)

通讯作者: 冯华松,主任医师,教授,博士后;海军总医院呼吸内科,北京市海淀区阜成路 6 号(100048);E-mail: fenghs99@163.com

收稿日期: 2014-05-22; **修回日期:** 2014-08-16

分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞系

C57/BL 近交系小鼠 72 只, 清洁级, 雌性, 6~8w, 体重 (19±1)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物合格证号: SCXK(京)2009-0007。Lewis 肺癌细胞系由中国医学科学院肿瘤医院中心实验室保存并提供。

1.2 试剂与仪器

红细胞裂解液购自天津灏洋生物制品有限公司, 产品批号: NH4CL2009; 藻红蛋白标记的抗鼠 PD-L1(anti-mouse B7-H1 (CD274) PE MIH5) 及同型对照 (Rat IgG-2a K Isotype Control PE) 购自 eBioscience 公司; 离心机: 白洋医用低速离心机, 型号: B320A; 流式细胞仪: 贝克曼公司, 型号: COULTER Epics XL.MCL; 氩氮冷冻治疗系统和 1.47mm 冷冻探针: 以色列伽利略公司 Cryo-Hit 低温冷冻手术系统。

1.3 造模与分组

Lewis 肺癌细胞从液氮罐内取出, 37℃ 迅速解冻复苏后, 接种于小鼠右侧腋窝皮下, 10d 后移植瘤生长直径达 2.0cm 左右, 选择生长良好、瘤体无破溃的荷瘤鼠, 脱颈处死, 无菌条件下剥离肿瘤, 清除坏死组织, 充分碾磨, 制备肿瘤细胞悬液, 调整细胞数为 2×10^7 个/ml, 取 0.2ml 肿瘤细胞悬液接种于小鼠右后肢腹侧皮下, 1 周后游标卡尺测量, 挑选长径为 8mm 的荷瘤鼠 72 只, 开始实验。按随机数字表方式随机选取, 分为对照组和冷冻治疗组, 每组 36 只, 每组根据检测时间不同分为 2h、3d、7d 3 组。

1.4 氩氮冷冻消融治疗

荷瘤鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 0.05ml 麻醉、固定后, 右下肢瘤体皮肤常规备皮、消毒, 将直径为 1.47mm 的冷冻探针刺入肿瘤中央, 冷冻治疗组启动氩气冷冻, 时间为 40s, 中央温度最低可达 -140℃, 启动氩气复温 30s 至 10℃, 完成冷冻治疗循环。对照组将冷冻探针置于瘤体内 40s 后取出, 而不予冷冻治疗。术后皮肤常规消毒, 正常喂食。

1.5 标本取材

分别于术后 2h、3d、7d, 取对照组和冷冻治疗组

荷瘤鼠, 采集 EDTA-K2 抗凝的眼眦静脉血 100μl, 分装置于 2 个流式管中; 脱颈处死荷瘤鼠, 75% 的酒精浸泡 5min, 超净台无菌条件下取出新鲜脾脏组织, 剪碎碾磨, 200 目筛网过滤 2 次后离心, 1ml PBS 混匀, 制备单细胞悬液, 50μl 分装置于 2 个流式管中。

1.6 流式细胞术检测单个核细胞表面 PD-L1 表达

新鲜采集的外周血和脾脏细胞 2 组流式管进行标记后, 分别加入 PD-L1 IgG-PE 和 IgG-2a K 同型对照, 每组均在加入抗体后 4℃ 避光孵育 30min, 然后加入红细胞裂解液 1ml, 混匀后静止, 直到液体清亮后离心弃上清, 加入 10 倍体积的 PBS 洗涤 2 遍, 150μl 1% 多聚甲醛固定后置于 4℃, 24h 内上机检测。

1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示, 组间同一时间点均数比较采用 *t* 检验, 组内不同时间点多组均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冷冻治疗术后不同时间 Lewis 肺腺癌荷瘤鼠外周血 PD-L1 的表达变化

对照组外周血单个核细胞表面 PD-L1 分子表达水平逐渐升高, 冷冻治疗组表达率逐渐下降, 两组组内差异均具有统计学意义。冷冻治疗术后 2h PD-L1 表达水平较对照组有一过性升高, 但 3d、7d 时明显低于对照组, 差异均具有统计学意义 (Table 1, Figure 1)。

2.2 冷冻治疗术后不同时间 Lewis 肺腺癌荷瘤鼠脾脏 PD-L1 的表达变化

对照组脾脏单个核细胞表面 PD-L1 分子表达逐渐升高, 与外周血呈现同一趋势, 表明 PD-L1 分子表达水平可能随着 Lewis 肺癌进展逐渐增强。冷冻术后 PD-L1 分子表达逐渐下降, 动态变化与外周血类似, 术后 2h PD-L1 表达较对照组显著升高, 且比外周血更为明显, 但 3d、7d 后较对照组明显降低 (Table 2, Figure 2)。这一动态变化表明, 冷冻治疗虽然短时间内刺激单个核细胞表面 PD-L1 分子表达增加, 但长期有下调 PD-L1 分子表达的作用。

Table 1 Dynamic changes of PD-L1 on peripheral blood mononuclear cells at different time between control group and cryotherapy group[n=12, ($\bar{x}\pm s$, %)]

Time	Control group	Cryotherapy group	<i>t</i>	<i>P</i>
2h	16.55±1.91*	20.41±1.22 [#]	-7.824	0.000
3d	18.18±1.50*	16.97±1.15 [#]	2.231	0.036
7d	21.53±1.17*	15.89±1.09 [#]	12.224	0.000
<i>F</i>	45.960	50.141	—	—
<i>P</i>	0.000	0.000	—	—

Note: *: $P<0.01$; #: $P<0.05$.

Table 2 Dynamic changes of PD-L1 on splenic mononuclear cells between control group and cryotherapy group[n=12, ($\bar{x}\pm s$, %)]

Time	Control group	Cryotherapy group	<i>t</i>	<i>P</i>
2h	19.44±1.19*	26.37±1.34*	13.411	0.000
3d	21.18±1.35*	19.83±1.16*	-2.630	0.015
7d	25.59±1.83*	17.58±1.22*	12.590	0.000
<i>F</i>	55.000	161.765	—	—
<i>P</i>	0.000	0.000	—	—

Note: *: $P<0.01$.

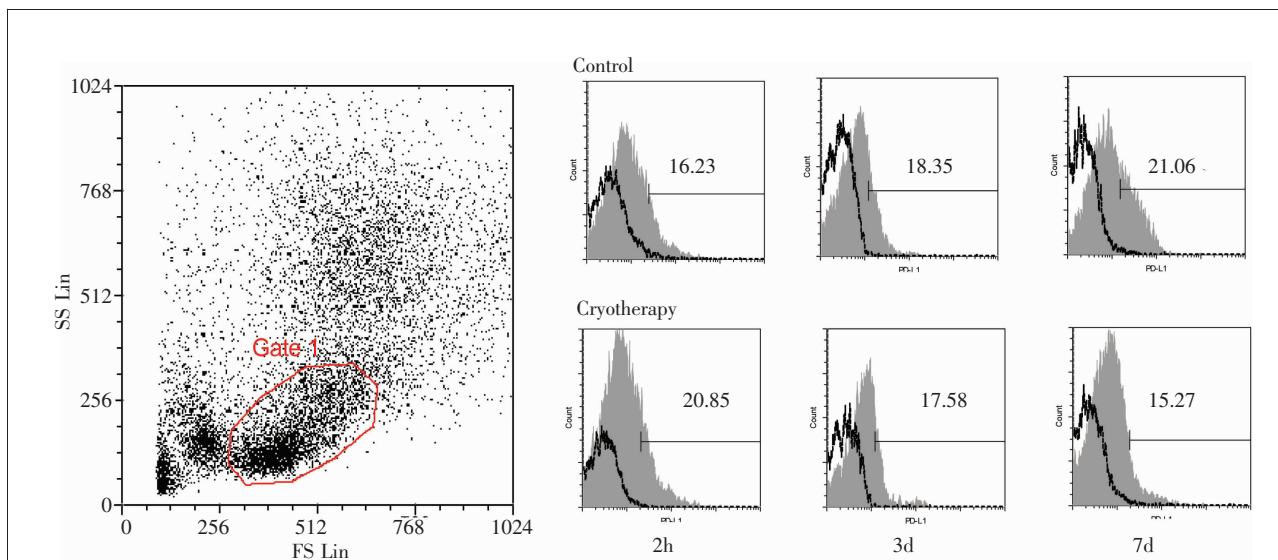


Figure 1 The gating strategy and expression profiles of PD-L1 on peripheral blood mononuclear cells

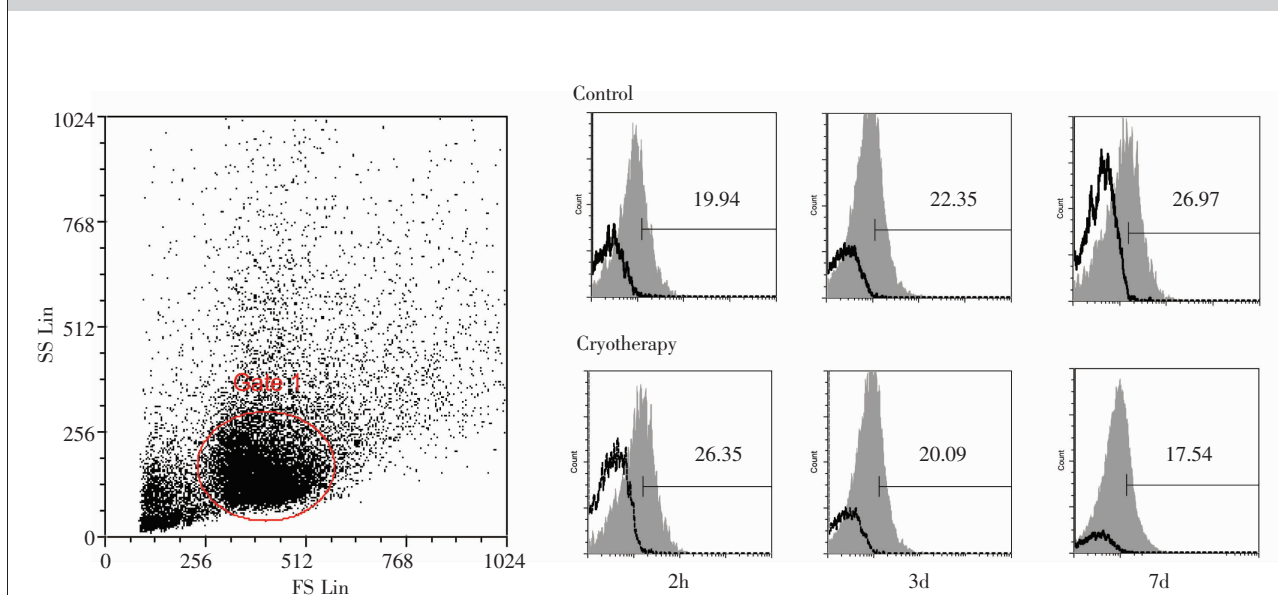


Figure 2 The gating strategy and expression profiles of PD-L1 on the mononuclear cells of spleen

3 讨论

PD-L1 表达于多种肿瘤细胞和活化的 T、B、DC 细胞表面, CD8⁺T 细胞以抗原特异性方式从抗原呈递细胞获得功能性 PD-L1, 导致周围表达 PD-1 的效应细胞凋亡^[6]。研究发现肿瘤相关性 PD-L1 的表达程度与肝癌、尿路上皮癌、大肠癌等侵袭性正相关, 是前两者术后复发的高危因素, 是恶性胸膜间皮瘤、乳腺浸润性导管癌等预后的高风险分子^[7-11]。研究亦证实 PD-L1 在 NSCLC 的肿瘤细胞、肿瘤相关成纤维细胞、肿瘤浸润性树突细胞和巨噬细胞表面均存在不同程度表达; NSCLC 可能通过表皮生长因子受体基因 *EGFR* 的突变上调 PD-L1 的表达^[12], 维持 DC 不成熟状态, 减少淋巴细胞的激活, 增强 Treg 的抑制功能^[3, 13-15]。目前特异性 PD-L1 IgG4 (S228P) 单克隆抗体已在既往认为免疫治疗无效的 NSCLC 中显示出一定疗效, 改变了 NSCLC 免疫治疗现状, 提示冻融联合 PD-L1 拮抗剂可能在 NSCLC 治疗中取得更为理想的治疗效果, 但目前关于冷冻治疗对 PD-L1 表达影响的研究甚少。本实验同时检测冷冻术后外周血和脾脏 PD-L1 分子的表达变化, 试图较为全面地了解冷冻治疗对外周血和整个机体免疫系统 PD-L1 分子表达的影响。

研究发现, 随着肿瘤进展, 外周血及脾脏单个核细胞表面 PD-L1 分子的表达水平逐渐增强, 这可能与中后期荷瘤鼠整体免疫应答能力下降有关, 这个结论与肝细胞癌肿瘤浸润性单核细胞表面 PD-L1 分子表达水平随疾病进展逐渐增高一致^[16], 与既往研究发现 NSCLC、膀胱癌、乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌肿瘤细胞表面 PD-L1 分子表达水平与临床分期正相关和可溶性 PD-L1 随着肺癌进展逐渐升高相符^[17]。

早先的动物模型已经显示冷冻消融刺激器官的炎症反应, Jansen 等指出冷冻过程中细胞膜裂解释放的酶类在解冻循环后被激活, 产生较激光热疗和射频消融更为强大而持久的炎症和凝固反应。较大肝转移癌冷冻治疗后血清 IL-1、IL-6、TNF- α 等水平瞬时明显升高, 前列腺癌冷冻术后 4 周血清 TNF- α 和 IFN- γ 水平高于术前及术后 8 周^[19]。而目前研究已表明炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 等可促进单核细胞和肿瘤细胞表面 PD-L1 的表达^[20, 21], 提

示冷冻治疗可能通过炎症因子作用影响 PD-L1 的表达。此外, 有研究发现肿瘤细胞本身的存在, 对 IL-10 等刺激单核细胞表面 PD-L1 的表达及单核细胞分泌 IL-10 刺激自身 PD-L1 的表达上调起到重要作用^[22]。

本研究结果显示, 冷冻术后 2h, 外周血和脾脏单个核细胞表面 PD-L1 的表达水平与对照组相比有一过性升高, 一方面可能因为低温冷冻刺激肿瘤细胞、间质细胞、免疫细胞等瞬间释放大细胞因子和炎症因子, 导致 PD-L1 表达上调。另一方面也可能由于机体对超低温冷冻发生应激反应所致。在随后 3d、7d 的观察分析中发现, 冷冻组单个核细胞表面 PD-L1 分子的表达水平呈现逐渐下降趋势, 与对照组比较显著降低。PD-L1 表达水平的降低可能因为冷冻治疗使肿瘤细胞裂解, 大量被封肿瘤抗原释放, 有效地激活肿瘤特异性免疫应答, 冷冻周边肿瘤细胞表达凋亡信号, 刺激机体产生冷冻免疫抗体, 消灭残留癌细胞, 导致肿瘤负荷显著减轻^[23], 诱导 PD-L1 增生的作用减弱; 也可能由于荷瘤鼠机体恢复正常状态, 慢性炎症因子产生减少导致。与此前周霖等^[24]研究冷冻治疗前后肝癌患者外周血细胞 1w 与 4w 的 PD-1 动态变化类似。此外, Campbell 等^[25]也发现冷冻保存能够显著减少外周血 CD3⁺/CD8⁺ T 细胞和 CD45⁺/CD14⁺ 单核细胞表面 PD-1 和 PD-L1 分子的表达。本实验冷冻治疗对 PD-L1 表达的影响, 结合周霖^[24]和 Campbell 等^[25]的研究表明, 冷冻治疗对 PD-1/PD-L1 途径发挥一定的抑制作用。

综上所述, 冷冻治疗对肺癌除了直接破坏瘤体, 杀伤癌细胞的作用外, 还可能具有一定的激活机体主动免疫的作用。其中, 冷冻治疗后 PD-L1 的降低可能是引发机体产生抗癌免疫反应的机制之一, 而冷冻术后联合 PD-L1 拮抗剂治疗 NSCLC 可能是一种可供考虑的冷冻免疫治疗新策略。

参考文献:

- [1] Feng HS, Duan YY, Nie ZS, et al. Clinical study on targeted Argon-Helium cryotherapy in treatment for 725 cases with pulmonary neoplasm [J]. Bulletin of Chinese Cancer, 2007, 16(11): 906-909. [冯华松, 段蕴铀, 聂舟山, 等. 氩氦靶向治疗肺部肿瘤 725 例临床研究[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(11): 906-909.]
- [2] Li YQ, Feng HS, Huang YZ, et al. Argon-Helium cryotherapy treated lung cancer cells combined with IL-2 stimu-

- lating the immunity of peripheral blood mononuclear cells [J]. *Journal of Biomedical Engineering Research*, 2005, 24 (2): 119–120. [李泳群, 冯华松, 黄友章, 等. 氩氦刀冻融的肺癌细胞联合 IL-2 刺激人外周血单个核细胞免疫功能[J]. *生物医学工程研究*, 2005, 24(2): 119–120.]
- [3] Mu CY, Huang JA, Chen Y, et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(3): 682–688.
- [4] Ma W, Luo DZ, Chen Y, et al. Expression and clinical significance of PD-L1 and PD-1 in non-small cell lung cancer [J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2011, 27 (9): 1551–1554. [马薇, 罗殿中, 陈源, 等. PD-L1 和 PD-1 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(9): 1551–1554.]
- [5] Chen YB, Mu CY, Huang JA, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study [J]. *Tumori*, 2012, 98(6): 751–755.
- [6] Gary R, Voelkl S, Palmisano R, et al. Antigen-specific transfer of functional programmed death ligand 1 from human APCs onto CD8+ T cells via trogocytosis [J]. *J Immunol*, 2012, 188(2): 744–752.
- [7] Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and post-operative recurrence in human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3): 971–979.
- [8] Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, et al. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 56(8): 1173–1182.
- [9] Shi SJ, Wang LJ, Wang GD, et al. B7-H1 expression is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma and regulates the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): 1–11.
- [10] Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors [J]. *Neoplasia*, 2006, 8(3): 190–198.
- [11] Mansfield AS, Roden AC, Peikert T, et al. B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(7): 1036–1040.
- [12] Azuma K, Ota K, Kawahara A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non-small cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(8): 1–19.
- [13] Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(13): 3015–3029.
- [14] Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, et al. Programmed death-1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(27): 9331–9336.
- [15] Ni XY, Sui HX, Liu Y, et al. TGF- β of lung cancer microenvironment upregulates B7 H1 and GITRL expression in dendritic cells and is associated with regulatory T cell generation [J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2): 615–621.
- [16] Kuang DM, Zhao Q, Peng C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1 [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(6): 1327–1337.
- [17] Xing YF, Zhang ZL, Shi MH, et al. Expression of soluble Programmed death ligand-1 in peripheral blood of lung cancer patients and its clinical significance [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2012, 35(2): 102–106. [邢玉斐, 张增利, 施敏骅, 等. 肺癌患者外周血中可溶性程序性死亡配体-1 的表达及其临床意义 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(2): 102–106.]
- [18] Jansen MC, van Hillegerberg R, Schoots IG, et al. Cryoablation induces greater inflammatory and coagulative responses than radiofrequency ablation or laser induced thermotherapy in a rat liver model [J]. *Surgery*, 2010, 147 (5): 686–695.
- [19] Si T, Guo Z, Hao X, et al. Immunologic response to primary cryoablation of high-risk prostate cancer [J]. *Cryobiology*, 2008, 57(1): 66–71.
- [20] Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands [J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 6738–6746.
- [21] Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, et al. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation; relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 155 (1–2): 172–182.
- [22] Bloch O, Crane CA, Kaur R, et al. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12): 3165–3175.
- [23] Sabel MS. Cryo-immunology: a review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses [J]. *Cryobiology*, 2009, 58(1): 1–11.
- [24] Zhou L, Zeng Z, Shi F, et al. Changes in PD-1 and effect thereof on prognosis of patient after argon-helium cryoablation for hepatitis B related-hepatocellular carcinoma [J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2011, 36(10): 1031–1036. [周霖, 曾珍, 石峰, 等. 氩氦刀冷冻消融治疗乙型肝炎病毒相关性肝细胞癌前后 PD-1 的变化及其与预后的关系 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36 (10): 1031–1036.]
- [25] Campbell DE, Tustin NB, Riedel E, et al. Cryopreservation decreases receptor PD-1 and ligand PD-L1 coinhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16 (11): 1648–1653.