论著

文章编号:1000-5404(2012)02-0172-03

肾细胞癌源性 exosomes 体外诱导单核细胞分化为 PD-L1 髓源性抑制细胞

张 俊[1],吴小候[1],陈 刚[1],罗春丽[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院泌尿外科[1],检验医学院[2])

[摘要] **目的** 研究肾细胞癌源性 exosomes 诱导人外周血单核细胞分化为髓源性抑制细胞及该细胞 PD-L1 分子表达情况的效应。**方法** 超滤和蔗糖重水密度梯度离心相结合的方法分离纯化肾细胞癌源性 exosomes。Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,贴壁法获取外周血单核细胞。倒置显微镜观察获得的单核细胞形态。流式细胞仪检测单核细胞比例及活性、经 exosomes 诱导的单核细胞活性情况、髓源性抑制细胞(MDSCs)及其上 PD-L1 分子的表达情况。**结果** 贴壁的单核细胞形状为圆形或类圆形具少许短小伪足状突起;贴壁法获得的单核细胞比例达 83.5%,活细胞比例约 90.0%;髓源性抑制细胞的生成较对照组明显增加[(8.91±0.21)% *vs*(3.19±0.91)%, $P<0.05$],且该髓源性抑制细胞表达 PD-L1 较对照组明显增高[(88.93±8.57)% *vs* (44.53±5.35)%, $P<0.05$];体外经 exosomes 诱导刺激的单核细胞损伤率较对照组明显升高[(39.93±16.51)% *vs*(12.87±2.43)%, $P<0.05$]。**结论** 肾细胞癌源性 exosomes 在体外能够促进单核细胞损伤,诱导单核细胞分化为髓源性抑制细胞,且该髓源性抑制细胞表达 PD-L1 增高,可能是其抑制 T 细胞免疫功能的负性调节机制之一。

[关键词] exosomes;肾细胞癌;髓源性抑制细胞;PD-L1;细胞损伤
[中图法分类号] R737.11;R392.2;R394-33 [文献标志码] A

Renal cell carcinoma-derived exosomes induce monocytes to differentiate into PD-L1 myeloid derived suppressor cells *in vitro*

Zhang Jun[1], Wu Xiaohou[1], Chen Gang[1], Luo Chunli[2] ([1]Department of Urology, First Affiliated Hospital, [2]Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To assess the process of renal cell carcinoma-derived exosomes (RCC-exo) inducing human peripheral blood monocytes to differentiate into myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and determine the expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) in the differentiated cells. **Methods** RCC-exo were isolated and purified by ultrafiltration and sucrose gradient centrifugation, and characterized by transmission electron microscopy. Ficoll density gradient centrifugation was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donor, and monocytes were amplified and purified from PBMC, which characterized by inverted microscopy. The obtained monocytes were induced by RCC-exo for 48 h, and those without treatment served as control. Flow cytometry were used to analyze the impairment of monocytes, the presence of MDSCs and the expression of PD-L1. **Results** Attached monocytes were round or round-like in shape, with a few pseudopod processes. The yield rate was 83.5%, and 90.0% obtained cells were alive. Compared with control group, RCC-exo obviously impaired monocytes [(39.93±16.51)% *vs* (12.87±2.43)%, $P<0.05$)], and promoted myeloid cells differentiation into MDSCs [(8.91±0.21)% *vs* (3.19±0.91)%, $P<0.05$]. Among the obtained cells, the percentage of PD-L1 MDSCs was (88.93±8.57)%, significantly higher than that of control group [(44.53±5.35)%, $P<0.05$]. **Conclusion** RCC-exo induces monocytes impairment, and the cells differentiate into MDSCs with significantly increased PD-L1. PD-L1 and PD-1 interaction may be one of the pathways that MDSCs suppress T cells immune response.

[**Key words**] exosomes; renal cell carcinoma; myeloid derived suppressor cells; programmed death ligand 1; cell impairment

Corresponding author: Wu Xiaohou, E-mail: wuxiaohou80@hotmail.com

髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是一种来源于骨髓组织的异质性细胞,可为树突状细胞、巨噬细胞和(或)粒细胞的前体细胞,具有强大的抑制 T 细胞免疫反应的能力,肾癌患者肿瘤组织及外周血中均检测到 MDSCs 的异常聚集且与患者预后呈负相关[1-3]。动物实验发现肿瘤源性 exosomes

[通信作者] 吴小候,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com

能诱导单核细胞分化为 MDSCs 聚集于肿瘤组织及外周血,并促进肿瘤生长及逃逸[4-6]。程序性死亡配体 1(programmed death ligand 1,PD-L1)可表达于多种肿瘤细胞及免疫细胞,是作用于 T 细胞的负性免疫调节分子,通过与 T 细胞表面的 PD-1 受体结合,下调 T 细胞介导的抗肿瘤免疫。那么体外经肿瘤源性 exosomes 诱导的人单核细胞能否分化为具有免疫抑制功能的 MDSCs 并异常表达 PD-L1 产生免疫抑制作用,目前还不得而知。我们用肾细胞癌源性 exosomes 体外诱导刺激人单核细胞,探讨其分化为 MDSCs 的能力,同时检测生成的 MDSCs 异常表达 PD-L1 的情况,为肾癌免疫逃逸中的免疫缺陷探寻可能的新机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

肾癌细胞株 786-0 由重庆医科大学检验系提供。单核细胞采自重庆市血液中心健康人白细胞滤过盘;分析纯蔗糖、99.99 重水购自 Sigma 公司。淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,胎牛血清、RPMI1640 购自 Gibco 公司,抗人 PE-CD11b、FITC-CD14 单克隆抗体购自 BioLegend 公司,抗人 PE-CY7-PD-L1 单克隆抗体购自 BD 公司。

1.2 肾癌细胞株 786-0 的培养和肾癌细胞源性 exosomes 的分离提纯

收集肾癌细胞株 786-0 培养上清液后,按蔗糖重水梯度离心超滤法分离提纯肾癌源性 exosomes[7]。以 RPMI1640 将肾细胞癌源性 exosomes 配置为 100 ng/ml 浓度,保存于 -80 ℃备用。

1.3 人外周血单核细胞的分离及鉴定

取重庆市血液中心健康人新鲜的废弃白细胞滤过盘,加入 D-Hanks 液约 20 ml 充分稀释混匀后将白细胞从滤过盘中冲洗出来。将淋巴细胞分离液约 4 ml 注入各离心管底部,小心加入滤过盘冲洗液约 4 ml 于淋巴细胞分离液上 1 000 × g 离心 20 min,去除上清液吸取离心液与上清液交界处云雾状单个核细胞层。PBS 液洗涤离心单个核细胞 2 次,将洗涤后的细胞置于培养皿中,加入含 20% 胎牛血清的 RPMI1640,于 37 ℃,5% CO_2 条件下培养 12 h,洗去非贴壁细胞,获得贴壁细胞。倒置显微镜观察贴壁细胞形态,洗脱后流式细胞仪检测 CD14 细胞比例及活性。

1.4 单核细胞的诱导分化

调整贴壁细胞浓度为 1.0×10^6/ml。加入 12 孔板,每孔 1 ml,实验组每孔加入含 20% 胎牛血清和 100 ng/ml 肾细胞癌源性 exosomes 的 RPMI1640 培养液 1 ml;对照组每孔加入含 20% 小牛血清的 RPMI1640 培养液 1 ml,培养 48 h。

1.5 髓源性抑制细胞的测定及其 PD-L1 表达情况

在加入肾细胞癌源性 exosomes 诱导刺激 48 h 后,洗脱贴壁细胞,用 3 种荧光标记的 CD11b、CD14 和 PD-L1 单克隆抗体标记细胞,流式细胞仪检测贴壁细胞中髓源性抑制细胞($CD11b^+CD14^-$)表达情况及该细胞上 PD-L1 表达情况;PI 标记该单核细胞,流式细胞仪检测实验组和对照组中单核细胞损伤情况,实验设置 3 个复孔。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组测量的方差分析。

2 结果

2.1 单核细胞的培养、比例及活性鉴定

将来自于白细胞滤过盘的单个核细胞贴壁 12 h 后,充分洗去非贴壁细胞后,倒置显微镜观察贴壁的单核细胞形态为圆形或类圆形,具少许短小伪足状突起(图 1)。贴壁细胞分布呈现中心均匀,周边聚集的现象。流式细胞仪检测贴壁细胞中单核细胞($CD14^+$)的表达情况发现,$CD14^+$ 细胞占贴壁细胞的 83.5%,活细胞约占贴壁细胞的 90.0%。

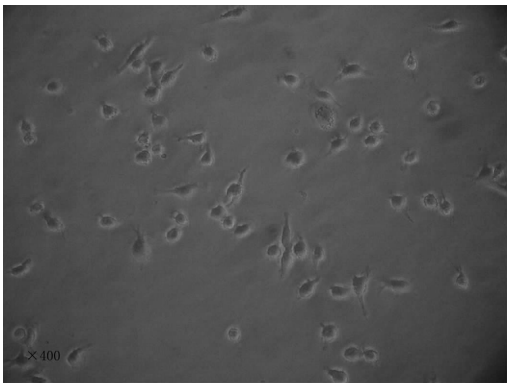


图 1 倒置显微镜下观察贴壁的单核细胞形态 (×400)

2.2 髓源性抑制细胞的表达

将肾细胞癌源性 exosomes 加入单核细胞刺激 48 h 后,流式细胞仪检测发现,对照组表达少许的髓源性抑制细胞[(3.19 ± 0.91)%],而实验组中髓源性抑制细胞表达明显增加[(8.91 ± 0.21)%],差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 髓源性抑制细胞表达 PD-L1

将肾细胞癌源性 exosomes 加入单核细胞培养 48 h 后,流式细胞仪检测发现,实验组髓源性抑制细胞表达 PD-L1 较对照组明显升高[(88.93 ± 8.57)% *vs* (44.53 ± 5.35)%],差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 单核细胞损伤测定

将肾细胞癌源性 exosomes 加入单核细胞培养 48 h 后,PI 标记单核细胞行流式细胞仪检测发现,实验组单核细胞损伤率明显高于对照组[(39.93 ± 16.51)% *vs* (12.87 ± 2.43)%, $P < 0.05$]。

3 讨论

髓源性抑制细胞(MDSCs)是一种来源于骨髓组织的非成熟细胞,是树突状细胞、巨噬细胞和(或)粒细胞的前体,其异常扩增、活化可抑制多种免疫细胞功能。MDSCs 在肿瘤微环境的高浓度聚集可能是形成免疫"赦免区"的原因之一,但其抑制损伤免疫细胞的机制还不清楚。目前研究认为,活化的 MDSCs 表达高水平的精氨酸酶Ⅰ(ARGⅠ),ARGⅠ分解环境中 T 细胞活化所必需的氨基酸——精氨酸和胱氨酸,从而导

致T细胞的CD3ζ链合成下降或缺失,致使$CD4^+$和$CD8^+$T细胞活化信号传递受阻,$CD4^+$T和$CD8^+$T细胞活化障碍[8-10]。对肾癌患者的研究也发现,肾癌微环境中髓源性抑制细胞呈高浓度聚集,肾癌组织中浸润性淋巴细胞表现为功能缺陷、失能或凋亡,外周血中ARG Ⅰ显著增加,IFN-γ生成明显降低,T细胞CD3ζ链表达明显降低,而在去除髓源性抑制细胞后,T细胞的功能得到恢复,CD3ζ链表达也增加[1-3]。

动物实验研究观察到肿瘤源性exosomes能在体内诱导单核细胞分化为具有免疫抑制功能的MDSCs,从而促进肿瘤进展与逃逸[4-6]。肿瘤源性exosomes表达的HSP72、PGE2和TGF-β等通过诱导髓源性细胞分泌IL-6、VEGF、GM-CSF等肿瘤相关因子及炎性介质促进MDSCs的活化和扩增,进而促进肿瘤进展[6,11]。本研究显示:体外经肾细胞癌源性exosomes诱导刺激的人单核细胞分化为髓源性抑制细胞显著增加。利用富含肿瘤相关抗原及特异抗原的人肾细胞癌源性exosomes作用于人单核细胞,有效诱导了MDSCs的生成,提示发生于荷瘤小鼠体内的现象可能同样存在肿瘤患者,其诱导产生的MDSCs可能在抑制T细胞的某些功能上具有肿瘤特异性。

PD-L1属于B7家族,是作用于T细胞的负性免疫调节分子。PD-L1通过与PD-1受体结合,下调T细胞介导的抗肿瘤免疫,介导特异性T细胞凋亡、损伤、无应答及细胞因子生成障碍[12-14]。肾癌环境中肿瘤细胞异常表达PD-L1分子,相应T细胞则异常表达PD-1[15],提示经过肾细胞癌源性exosomes诱导的髓源性抑制细胞也可能异常表达PD-L1并与T细胞PD-1受体相互作用,抑制T细胞功能。本研究也证实实验组中MDSCs表达负性调节分子PD-L1明显增加,但此处PD-L1能否对T细胞发挥上述抑制效应,还需进一步研究。

肿瘤源性exosomes能够诱导活化的T细胞凋亡。而Valenti等[16]观察到肿瘤源性exosomes抑制单核细胞凋亡。而本实验却观察到实验组中单核细胞大量损伤,提示肾细胞癌源性exosomes可能存在某种诱导单核细胞损伤的机制。

经肾细胞癌源性exosomes诱导生成的MDSCs表达PD-L1远远高于对照组,那么活化的MDSCs可能也可通过PD-L1与T细胞的PD-1受体结合,阻止或降低T细胞免疫功能的发挥,有可能为我们提供除精氨酸酶Ⅰ途径外MDSCs抑制T细胞功能的另一条新途径。本实验中还发现经肾细胞癌源性exosomes诱导刺激的单核细胞损伤率明显增加,提示还存在促进单核细胞损伤、凋亡的机制,具体是哪些信号途径参与上述行为,还需要进一步研究阐明。

参考文献:

[1] Zea A H, Rodriguez P C, Atkins M B, *et al*. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3044 - 3048.

[2] Ochoa A C, Zea A H, Hernandez C, *et al*. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(2 Pt 2): 721s - 726s.

[3] Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, *et al*. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(24): 8270 - 8278.

[4] Yu S, Liu C, Su K, *et al*. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 6867 - 6875.

[5] Valenti R, Huber V, Iero M, *et al*. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression [J]. Cancer Res, 2007, 67(7): 2912 - 2915.

[6] Xiang X, Poliakov A, Liu C, *et al*. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes[J]. Int J Cancer, 2009, 124(11): 2621 - 2633.

[7] 刘安全, 吴小候, 罗春丽. HepaCAM蛋白通过exosomes途径分泌到细胞外并抑制肿瘤细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(2): 168 - 171.

[8] Srivastava M K, Sinha P, Clements V K, *et al*. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine [J]. Cancer Res, 2010, 70(1): 68 - 77.

[9] Rodriguez P C, Quiceno D G, Ochoa A C. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression[J]. Blood, 2007, 109(4): 1568 - 1573.

[10] Nagaraj S, Schrum A G, Cho H I, *et al*. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells[J]. J Immunol, 2010, 184(6): 3106 - 3116.

[11] Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, *et al*. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells[J]. J Clin Invest, 2010, 120(2): 457 - 471.

[12] Dong H, Strome S E, Salomao D R, *et al*. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion [J]. Nat Med, 2002, 8(8): 793 - 800.

[13] Dong H, Zhu G, Tamada K, *et al*. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes[J]. Immunity, 2004, 20(3): 327 - 336.

[14] Wilcox R A, Feldman A L, Wada D A, *et al*. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders [J]. Blood, 2009, 114(10): 2149 - 2158.

[15] Thompson R H, Dong H, Lohse C M, *et al*. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6): 1757 - 1761.

[16] Valenti R, Huber V, Filipazzi P, *et al*. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes [J]. Cancer Res, 2006, 66(18): 9290 - 9298.

(**收稿**:2011-08-27;**修回**:2011-09-26)

(编辑 吴培红)