

肿瘤相关成纤维细胞促进肺癌细胞表达PD-L1

何海洋 齐陆玉 肖永生 侯伊玲

【摘要】背景与目的 肿瘤相关成纤维细胞 (tumor-associated fibroblasts, TAF) 是肿瘤微环境的重要组成部分, 可抑制免疫细胞的功能。在肿瘤免疫中CD8⁺T细胞发挥重要的作用, T细胞膜表面程序性死亡因子1 (programmed death factor 1, PD-1), 与其配体PD-L1 (programmed death factor ligand 1, PD-L1) 结合对T细胞的激活起负调节作用。本研究旨在探讨TAF对肺癌细胞PD-L1表达的影响。方法 我们以肺癌细胞株H1975、H520和TAF细胞进行Transwell非接触式共培养48 h的H1975、H520细胞为实验组, 单独培养的H1975、H520细胞为对照组, 两组培养条件一致。倒置显微镜计数实验组和对照组H1975、H520细胞数、流式细胞仪分别检测实验组和对照组肺癌细胞PD-L1的蛋白表达率、RT-PCR分别检测实验组和对照组肺癌细胞PD-L1 mRNA的表达。结果 每100 μm^2 细胞计数, H1975细胞实验组为(46 \pm 21)个, 对照组为(16 \pm 5)个 ($P<0.05$); H520细胞实验组为(38 \pm 10)个, 对照组为(12 \pm 5)个 ($P<0.05$)。PD-L1蛋白表达率, H1975细胞实验组为(20.93% \pm 3.54%), 对照组为(12.58% \pm 2.52%) ($P<0.05$); H520细胞实验组(19.26% \pm 3.04%), 对照组为(11.60% \pm 2.65%) ($P<0.05$)。mRNA表达水平, H1975细胞实验组为(16.45 \pm 1.25) pg/mL, 对照组为(7.78 \pm 1.27) pg/mL ($P<0.05$); H520细胞实验组为(15.38 \pm 2.02) pg/mL, 对照组为(7.20 \pm 1.58) pg/mL ($P<0.05$)。结论 TAF促进肺癌细胞株H1975、H520的生长, 增强细胞株PD-L1表达。

【关键词】肺肿瘤; 肿瘤相关成纤维细胞; PD-1/PD-L1; 肿瘤免疫逃逸

Tumor Associated Fibroblasts Promote PD-L1 Expression in Lung Cancer Cells

Haiyang HE¹, Luyu QI², Yongsheng XIAO³, Yiling HOU²

¹Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; ²Hospital Affiliated to Logistics College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; ³Tianjin 4th Centre Hospital, Tianjin 300162, China

Corresponding author: Yiling HOU, E-mail: xinxindebaba@sina.com

【Abstract】 Background and objective Tumor-associated fibroblasts (TAF) is an important part of TME, which inhibits the function of immune cells. CD8⁺ T cells play a significant role in tumor immunity. T-cell membrane possesses a distinct type of molecule with a negative regulatory function. Upon interaction with its corresponding ligand [programmed death factor ligand 1 (PD-L1)], programmed death factor 1 (PD-1) is activated and thus inhibits the kinase activity of T cells. This study aims to explore the possible effects of TAF on PD-L1 expression in lung cancer cells. **Methods** Lung cancer cell lines H1975 and H520 were co-cultured with (experiment) or without TAF (control) via Transwell assay for through 48 hours under the same culture condition. H1975 and H520 cells were counted using a microscope. The protein and mRNA expression levels of PD-L1 were detected by FCM assay and PCR analysis, respectively. **Results** The numbers of lung cancer cells in 100 μm^2 for H1975 and H520 cells are (46 \pm 21) and (38 \pm 10) in the experiment group, respectively, and (16 \pm 5) and (12 \pm 5) in the control group, respectively ($P<0.05$). The expression levels of the PD-L1 protein in H1975 and H520 cells are (20.93% \pm 3.54%) and (19.26% \pm 3.04%) in the experiment group, respectively, and (12.58% \pm 2.52%) and (11.60% \pm 2.65%) in the control group, respectively ($P<0.05$). The mRNA expression levels in H1975 and H520 cells are (16.45 \pm 1.25) and (15.38 \pm 2.02) pg/mL in the experiment group, respectively, and (7.78 \pm 1.27) and (7.20 \pm 1.58) pg/mL ($P<0.05$) in the control group, respectively ($P<0.05$). **Conclusion** TAF promotes the growth and increases the expression of PD-L1 in H1975 and H520 cells.

【Key words】 Lung neoplasms; Tumor-associated fibroblasts; Programmed death factor 1/Programmed death factor ligand 1; Immune escape

This study was supported by the grant from Key Laboratory Open Fund Project of Amy (to Yiling HOU)(No.JY1406).

本研究受全军重点实验室开放基金项目(No.JY1406)资助

作者单位: 300162 天津, 武警后勤学院(何海洋); 300162 天津, 武警后勤学院附属医院(齐陆玉, 侯伊玲); 300162 天津, 天津市第四中心医院(肖永生)(通讯作者: 侯伊玲, E-mail: xinxindebaba@sina.com)

肿瘤细胞可以逃避免疫系统的监视即免疫逃逸,以往的研究主要集中在肿瘤细胞在免疫逃逸中自身的改变,关于肿瘤微环境对免疫逃逸的影响知之甚少。肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts, TAF)是肿瘤微环境的重要组成部分,它不同于正常的纤维细胞,具有特殊的生理、生化特点,可抑制免疫细胞的功能^[1]。TAF表达跨膜蛋白——成纤维细胞激活蛋白 α (fibroblast activation protein α , FAP α),在糖基化形态下具有二肽胺酶及胶原酶活性的同源二聚体。FAP α 选择性地表达于90%以上的人上皮性肿瘤,包括乳腺癌、肺癌、结直肠癌及卵巢癌等基质成纤维细胞的包膜或胞浆中,良性及癌前病变的上皮肿瘤中FAP α 表达通常为阴性^[2](对于非肿瘤组织, FAP表达于胰腺细胞及伤口愈合的基质纤维瘤细胞表面)。

目前已知的TAF细胞的主要功能包括:①细胞表面FAP通过发挥二肽胺酶和肽链内切酶活性,降解和重建肿瘤与宿主之间的基质,促进肿瘤细胞向胶原底部迁移,从而有利于肿瘤细胞从原发部位脱离,协助癌细胞侵袭和远距离转移^[3];②通过产生VEGF、FGF等血管内皮细胞生长因子或招募内皮祖细胞,诱导肿瘤基质中血管内皮细胞网络的形成,促进肿瘤血管生成从而促进肿瘤进展^[4];③免疫抑制功能:分泌TGF- β (transforming growth factor- β)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)、IL-4、IL-1B以促进Treg(regulatory cells)、肿瘤相关巨噬细胞的生成^[5];分泌生长因子、细胞因子、蛋白酶、胞外基质蛋白,干扰T细胞免疫应答;抑制免疫效应细胞。

在肿瘤免疫中CD8⁺T细胞发挥重要的作用,T细胞的细胞膜上有一类分子对T细胞的激活具有负调节作用,这类分子被称为共抑制分子。主要的共抑制分子包括细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)和程序性死亡受体1(programmed death 1, PD-1)。PD-1^[6]表达于多种细胞表面,在外周遇到相应的配体PD-L1(programmed death factor ligand 1, PD-L1)时被激活,抑制T细胞激酶活性,抑制细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)分泌 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)等细胞因子,同时也可以抑制NK细胞和B细胞的增殖和功能。有研究^[7]观察到破坏FAP阳性TAF细胞能够激活机体免疫系统,增加IFN- γ 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 的释放,促进效应T细胞活化,因而本研究旨在探讨TAF对肺癌细胞免疫检点抑制分子PD-L1表达的是否有影响。

1 材料及方法

1.1 实验材料 人肺癌细胞系H1975、H520购于中科院上海细胞库;人肺癌组织取自已签署知情同意书患者组织样本;胎牛血清购于Gibco, DMEM/F12培养基购于Hyclone, 胰蛋白酶购于Sigma;流式抗体PD-L1-PE、Mouse Ig G1 K Isotype Control购于ebioscience; Vimrntin、FAP α 、CEA、CA125单克隆抗体购于ABCAM;反转录试剂盒TRIzol购于Life Technologies; SuperScript[®] III反转录酶购于Life Technologies; PCR扩增试剂盒购于TaKara;实验引物来自Quantitech Qiagen;流式细胞仪使用BD LSRII;实时定量PCR使用Bio-Rad iCycler iQ; Transwell小室使用Millicell PISP12R48悬挂式细胞培养皿。

1.2 人肺癌肿瘤相关成纤维细胞培养 分离培养并纯化人肺癌相关成纤维细胞:无菌条件下切取肺癌患者手术切除获得的新鲜肺癌组织标本,去除血块及脂肪组织,适量II型胶原酶消化成细胞团或单个细胞,终止消化并过200目筛网;转入无菌离心管中,1,200 rpm离心5 min,弃上清,加入适量含20%小牛血清的DMEM/F12培养液重悬,细胞计数后按 1×10^6 个/mL接种于无菌培养瓶,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。48 h后首次换液,此后每2-3天换液1次。待细胞融合度达到85%,进行细胞传代;自第2次传代起,根据成纤维细胞与肿瘤细胞生长速度及贴壁能力的差异,应用消化法及反复贴壁法纯化细胞,将纯化后的细胞继续培养,每8-10天进行纯化、传代1次。如此反复至第5代。

消化一皿贴壁生长3 d的细胞,1,000 rpm离心5 min,弃上清,重悬并计数,稀释细胞浓度至 1×10^6 个/mL。以100 μ L/接种于24孔板,24 h后使用质量分数4%多聚甲醛固定,膜通透后,用山羊血清封闭30 min,加入特异性一抗波形蛋白(Vimentin)、FAP α 、癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,漂洗后加入荧光标记二抗,室温孵育1 h,随后DAPI染核10 min,加入抗荧光淬灭封片剂后,显微镜下观察。试验重复3次。

1.3 肺癌细胞复苏与传代 从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出H1975、H520冻存细胞,快速将其置于37 $^{\circ}$ C水浴中解冻,移至含有6 mL完全培养液的15 mL离心管中,1,200 rpm离心5 min。弃上清,6 mL完全培养基重悬,接种到T25培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养。第2天,换用6 mL新鲜完全培养基继续培养。待细胞融合度达到85%,进

行细胞传代。

1.4 共培养体系的建立 取第5代TAF，消化收集制成细胞悬液；分别消化收集传代第2天的H1975、H520细胞制成细胞悬液。设共培养组为实验组，肺癌细胞单独培养组为对照组，培养条件一致。调整TAF细胞密度 5×10^5 置于Transwell下室，H1975、H520 3×10^5 置于Transwell上室。24 h细胞贴壁生长，更换上下室培养液。培养24 h倒置显微镜观察细胞生长状态。200倍镜下随机选取5个视野计数细胞数量。

1.5 流式细胞仪检测 收集上室实验组H1975、H520细胞与单独培养H1975、H520细胞， 4°C 1,000 rpm离心5 min。弃上清，重悬并计数，稀释细胞浓度至 1×10^6 个/mL，每组分别取100 $\mu\text{L} \times 2$ 样本。共培养组设为实验组，单独培养组设为对照组，并设置同型对照组。吸取实验组和对照组100 μL 细胞悬液，加入PD-L1-PE抗体2.5 μL ，同型对照组加入PE标记鼠IgG1同型抗体，混匀置于 4°C 避光孵育30 min。2 mL PBS洗涤一次，300 μL PBS重悬，样本于BD LSRII检测，各组细胞重复3次。

1.6 RNA提取与实时定量RT-PCR 总RNA提取：收集用于流式检测剩余细胞1,000 rpm离心5 min，弃上清，溶解于TRIzol试剂，具体操作详见说明书。

cDNA合成：1 μg 总RNA使用SuperScript[®] III反转录酶反转录，PCR为20 μL 体系iQ SYBR Green Supermix，cDNA 1:100稀释。

1.7 统计学分析 流式检测数据分析均于FlowJo 9.8软件进

行，Mann Whitney U检验（GraphPad Prism软件）应用于比较组数据之间的差异。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 检测分离细胞特定蛋白表达 原代分离肺癌组织样本，纯化、培养5代，免疫荧光染色显微镜观察其具备成纤维细胞相关特性，Vimentin阳性表达（图1A），同时TAF标志物蛋白FAP α 表达阳性（图1B）；而肺癌相关肿瘤标志物CEA、CA125表达呈阴性（图1C，图1D），说明所得细胞为肺癌TAF。

2.2 共培养肺癌细胞生长状态 肺癌细胞与TAFs共培养48 h后倒置显微镜观察，实验组肺癌细胞生长密度高，贴壁良好，无明显的脱落、坏死，具有肺癌细胞正常的形态（图2A，图2B）。对照组细胞生长密度较实验组低，可见细胞皱缩而不能贴壁而漂浮于培养液中（图2C，图2D）。细胞计数结果，H1975实验组每100 μm^2 细胞数为（ 46 ± 21 ）个，对照组细胞数为（ 16 ± 5 ）个。H520实验组每100 μm^2 细胞数为（ 38 ± 10 ）个，对照组细胞数为（ 12 ± 5 ）个。

2.3 肺癌细胞株H1975、H520 PD-L1蛋白表达率 通过流式细胞仪分析共培养及单独培养肺癌细胞悬液，H1975细胞PD-L1蛋白表达率，实验组为（ $20.93\% \pm 3.54\%$ ），对照组为（ $12.58\% \pm 2.52\%$ ）（ $P < 0.05$ ），H520细胞PD-L1蛋白表达率，实验组（ $19.26\% \pm 3.04\%$ ），对照组为（ 11.60% ）。

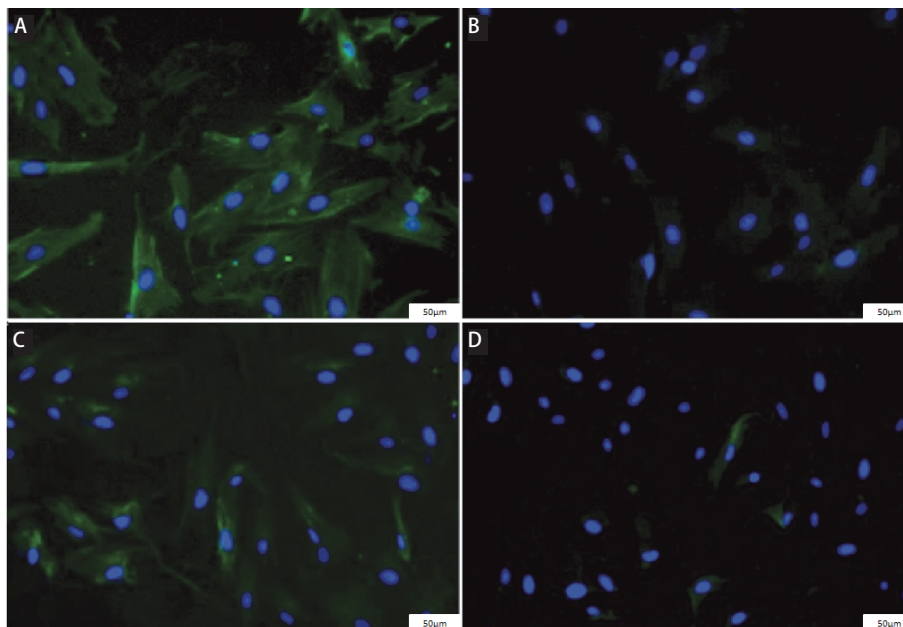


图1 检测分离细胞特定蛋白表达（100 \times ）。TAF标志物Vimentin (A)、FAP α (B) 表达呈阳性，肺癌相关标志物CEA (C)、CA125 (D) 表达呈阴性。

Fig 1 Test the specific protein expression of isolated cells (100 \times). The express of TAF specific proteins Vimentin (A), FAP α (B) were positive, while lung cancer related markers CEA (C), CA125 (D) were negative. FAP α : fibroblast activation protein α ; TAF: tumor-associated fibroblasts; CEA: carcinoembryonic antigen; CA125: carbohydrate antigen 125.

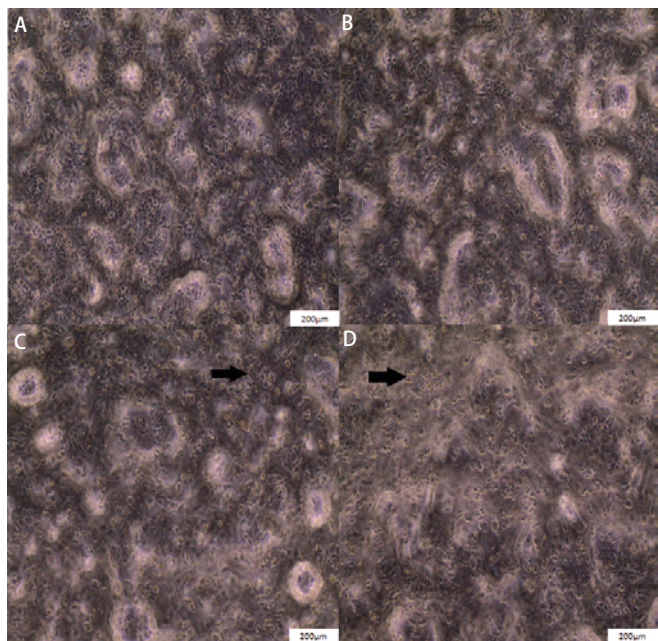


图 2 共培养肺癌细胞生长状态。共培养 48 h 后肺癌细胞 (200×) : A: 实验组 H1975 细胞; B: 实验组 H520 细胞; C: 对照组 H1975 细胞; D: 对照组 H520 细胞。箭头位置细胞皱缩不能贴壁而漂浮于培养液中。

Fig 2 Lung cancer cells growth after 48 h. After 48 h co-cultured lung cancer cells (200×): A: Co-cultured H1975 cells; B: Co-cultured H520 cells; C: Control H1975 cells; D: Control H520 cells. Arrows: shrunk cells floating in the culture medium.

±2.65%) (P<0.05)。实验组 H1975 细胞 (图 3A)、H520 细胞 (图 3C) PD-L1 表达水平分别较其单独培养对照组 (图 3B、图 3D) 高。

2.4 RT-PCR 分析人肺癌肿瘤相关成纤维细胞对 H1975、H520 细胞 PD-L1 mRNA 表达的影响 如表 1 所示, H1975 细胞 PD-L1 mRNA 的表达量实验组高于对照组 (P<0.05), H520 细胞 PD-L1 mRNA 的表达量实验组高于对照组 (P<0.05)。

3 讨论

肿瘤微环境是肿瘤细胞与围绕在肿瘤细胞周围的血管、神经、淋巴管以及上皮细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、纤维细胞, 以及生长因子、趋化因子、抗体、激酶等多种小分子物质, 一起构成的一个庞大网状结构, 为

表 1 H1975, H520 细胞 PD-L1 mRNA 表达

Ta 1 The PD-L1 mRNA expression in H1975, H520

Group	H1975 (pg/mL)	H520 (pg/mL)
Experiment group	16.45±1.25	15.38±2.02
Control group	7.78±1.27*	7.20±1.58*

*: P<0.05.

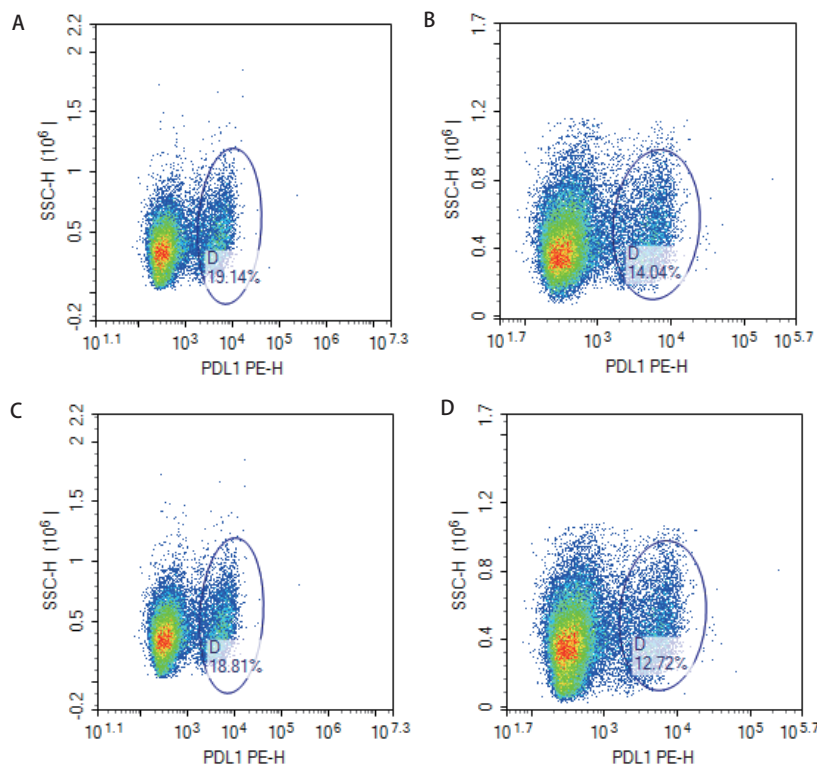


图 3 肺癌细胞株 H1975、H520 PD-L1 蛋白表达率。H1975 细胞 PD-L1 蛋白表达率, 共培养组 19.14% (A), 单独培养组 14.04% (B); H520 细胞 PD-L1 蛋白表达率, 共培养组 18.81% (C), 单独培养组 12.27% (D)。

Fig 3 The PD-L1 protein expression in H1975 and H520. The expression of PD-L1 protein in H1975 is 19.14% in the experiment group (A) and 14.04% in the control group (B). The expression of PD-L1 protein in H520 is 18.81% in the experiment group (C) and 12.72% in the control group (D).

肿瘤的发生、发展、侵袭及转移提供条件^[8]。而免疫系统则在抑制肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用，很多免疫缺陷的患者容易发生恶性肿瘤^[9]，接受免疫抑制治疗的患者肿瘤的发生率也高于正常人^[10]，其中T细胞介导的免疫应答特别是CD8⁺ CTL发挥重要作用，而T细胞的活化受到PD-1/PD-L1信号通路的抑制。目前已知肿瘤微环境成分之一的TAF可通过多种机制协助癌细胞扩散，基于PD-L1的免疫抑制作用，本实验探索TAF是否能促进肺癌细胞PD-L1的表达。

通过人肺癌组织分离TAF并与2种肺癌细胞H7901（人肺腺癌细胞）、H520（人肺鳞癌细胞）非接触共培养，检测肺癌细胞PD-L1 mRNA及其蛋白的表达。发现共培养组肺癌细胞数多于单独培养组，说明TAF对肺癌细胞的增殖具有促进作用。其次实验组PD-L1蛋白表达率和mRNA相对表达量相对于单独培养组均增加，从而在蛋白和基因水平上证实TAF细胞增加肺癌细胞PD-L1的表达。因采用非接触共培养的模式，我们推断TAF分泌的某些细胞因子可能在这一过程中起关键的作用，具体因子需要在后续实验中进一步探索。

肿瘤细胞表达的PD-L1常被作为预后较差的观测指标^[11]，针对PD-L1的单抗药物治疗肺癌已获得一定疗效。本实验观察到TAF有助于肺癌细胞PD-L1的表达，因而为治疗肿瘤提供了一条新思路：即将表达FAP的TAF作为靶点，阻断TAF的免疫抑制作用；同时与PD-L1单抗联用，在减少PD-1/PD-L1对CTL细胞的耗竭，增加活性CTL细胞的同时使不表达PD-L1蛋白的肿瘤细胞重新被免疫细胞所识别，利用自身的免疫系统杀死肿瘤细胞。

参 考 文 献

1 Micke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated

fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*, 2004, 45 Suppl 2: S163-S175.

- 2 Wen X, Xie Y, He X, *et al.* Fibroblast activation protein- α positive fibroblasts promote gastric cancer progression and resistant to immune checkpoint blockade. *Oncol Res*, 2016. doi: 10.3727/096504016X14768383625385. [Epub ahead of print]
- 3 Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, *et al.* Targeting inhibition of fibroblast activation protein- α and prolyl oligopeptidase activities on cells common to metastatic tumor microenvironments. *Neoplasia*, 2013, 15(4): 348-358.
- 4 Wang R, Zhang J, Chen S, *et al.* Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer*, 2011, 74(2): 188-196.
- 5 Brennen WN, Isaacs JT, Denmeade SR. Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(2): 257-266.
- 6 Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2443-2454.
- 7 Jiang GM, Xie WY, Wang HS, *et al.* Curcumin combined with FAPac vaccine elicits effective antitumor response by targeting indoleamine 2,3-dioxygenase and inhibiting EMT induced by TNF- α in melanoma. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25932-25942.
- 8 Gonzalez-Gugel E, Saxena M, Bhardwaj N. Modulation of innate immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 2016, 65(10): 1-8.
- 9 Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(1): 23-32.
- 10 Sylvie E, Jean K, Alain C. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med*, 2003, 349(6): 613.
- 11 Jr AP, Santoro IL, Tadokoro H, *et al.* The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Eur J Cancer*, 2015, 51(Suppl 3): 479-488.

(收稿: 2017-02-02 修回: 2017-03-20 接受: 2017-03-22)

(本文编辑 南娟)



Cite this article as: He HY, Qi LY, Xiao YS, *et al.* Tumor Associated Fibroblasts Promote PD-L1 Expression in Lung Cancer Cells. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2017, 20(5): 293-297. [何海洋, 齐陆玉, 肖永生, 等. 肿瘤相关成纤维细胞促进肺癌细胞表达PD-L1. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(5): 293-297.] doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2017.05.01