

顺铂对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响及机制

杨 静, 胡万芹, 肖 肖, 魏 洁, 寇 蓬, 杨丽华
(昆明医科大学第二附属医院, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨顺铂对宫颈癌 TC-1 细胞表面程序性凋亡配体 PD-L1 表达的影响及其作用机制, 为提高宫颈癌化疗效果提供理论依据。 **方法** MTT 方法检测顺铂对 TC-1 细胞的增殖活力, 筛选顺铂最适作用浓度; 免疫组化方法检测顺铂、PKD 阻断剂 GÖ 6976 对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响。 **结果** (1) 顺铂对 TC-1 细胞具有显著的增殖抑制作用, IC₅₀ 值为 25.5 μg/mL; (2) 顺铂处理 24 h 后 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达为 (64.96 ± 11.55) %, 阴性对照组为 (39.59 ± 5.99) %, 2 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); (3) 顺铂联合 PKD 阻断剂 GÖ 6976 处理 TC-1 细胞 24 h 后 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达为 (61.56 ± 3.43) %, 顺铂单独处理的 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达为 (79.54 ± 5.09) %, 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 顺铂可增加 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达, 阻断 PKD 途径可显著抑制顺铂对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达增加的程度, 顺铂可能是通过 PKD 途径影响 PD-L1 表达的。

[关键词] 顺铂; 宫颈癌; 程序性凋亡配体 1 (PD-L1); 蛋白激酶 D (PKD)

[中图分类号] R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 04-0015-04

The Effect and Its Mechanism of Cisplatin on the Expression of PD-L1 in TC-1 Cell Surface

YANG Jing, HU Wan-qin, XIAO Xiao, WEI Jie, KOU Peng, YANG Li-hua

(Dept. of Gynaecology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** The study was aimed to investigate the effect and its mechanism of cisplatin on the expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) in TC-1 cell surface, in order to provide an experimental basis to improve the therapeutic efficacy for cervical cancer. **Methods** The concentration of cisplatin was optimized by MTT method through detecting the cells proliferation vitality. Then, the expressions of PD-L1 in TC-1 cells treated by cisplatin and PKD blocker GÖ6976 were measured by immunohistochemistry. **Results** (1) The proliferation of TC-1 cells were inhibited by cisplatin with the IC₅₀ value of 25.5 μg/mL; (2) The expression of PD-L1 in TC-1 cell surface were (64.96 ± 11.55) % in cisplatin group, which was (39.59 ± 5.99) % in negative control group. There was a significant difference between the two groups ($P < 0.05$); (3) The expression of PD-L1 in TC-1 cell surface treated by cisplatin combined with PKD blocker GÖ6976 were (61.56 ± 3.43) % after 24 h, which were (79.54 ± 5.09) % in cisplatin group, and the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Cisplatin can promote the expression of PD-L1 in TC-1 cell surface which could be significantly inhibited by the PKD pathway blocked. Hence, cisplatin might influence the expression of PD-L1 through PDK pathway.

[Key words] Cisplatin; Cervical cancer; Programmed death ligand-1; PKD

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一^[1]。有研究认为, 患者的预后与化疗的敏感性密切相关, 因此 探讨化疗效果影响因素, 是提高宫颈癌患者治疗效果的重要策略。

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究面上基金资助项目 (2012FB162)

[作者简介] 杨静 (1987~), 女, 湖北荆州市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事妇科肿瘤临床工作。

[通讯作者] 杨丽华. E-mail: 13759481789@163.com

目前认为, 肿瘤化疗效果除了与肿瘤细胞对化疗药物敏感性有关外, 还与机体免疫状态有关, 机体免疫抑制或免疫逃逸是影响化疗效果的主要原因之一^[2]. T 淋巴细胞的一种阴性调节信号分子程序性凋亡配体 1 (PD-L1) 是近年来发现的与肿瘤免疫逃逸相关的重要分子之一^[3]. 有研究^[4]表明内源抗肿瘤介质 (如干扰素 γ , interferon- γ , INF- γ) 或抗肿瘤治疗诱导下某些肿瘤细胞可高表达 PD-L1, 抑制 T 淋巴细胞活性, 从而影响治疗效果. Zhang 等^[5]报道紫杉醇、依托泊苷、5-Fu 3 种化疗药物诱导乳腺癌细胞表面 PD-L1 表达增加, 促进 PD-L1 引起的 T 细胞凋亡. Qin X 等^[6]亦报道应用顺铂后肝癌细胞株 H22 过度表达 PD-L1.

顺铂是宫颈癌的一线化疗药物, 广泛应用于各期宫颈癌患者. 但目前尚无顺铂对宫颈癌细胞 PD-L1 表达影响效应的研究. 故本课题通过免疫组化研究顺铂对宫颈癌 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响以及可能的作用途径, 为提高宫颈癌化疗效果提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

细胞株: 鼠肺上皮细胞株 TC-1, 是鼠源性的 HPV16 阳性的肿瘤细胞株, 由美国约翰霍普金斯大学医学院 TC WU 教授惠赠. 兔抗鼠 PD-L1 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, MTT 购自碧云天生物技术研究, DMSO 购自 GIBCO, 顺铂和 GÖ6976 购自 SIGMA, SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自康为世纪.

1.2 细胞培养

TC-1 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素、链霉素浓度均为 100 UI/mL 的 DMEM 培养基, 置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃ 恒温培养箱内培养. 常规换液传代, 取对数生长期的细胞进行实验.

1.3 MTT 法检测顺铂对 TC-1 细胞活力的影响

TC-1 细胞接种于 96 孔板, 加含顺铂终浓度分别为 0、15、22.5、33.8、50.6 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基, 24 h 加 MTT, 4 h 加 DMSO, 振荡、酶标仪测量 OD 值, 计算细胞存活率.

1.4 顺铂对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响

细胞分为生理盐水组和顺铂组, 顺铂组加入含浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂的培养基, 生理盐水组加入含生理盐水的培养基, 每孔 500 μL . 24 h 后免疫组化方法检测 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达, 具体方法为 4% 多聚甲醛固定细胞, 3% H₂O₂ 封闭内源

性过氧化物酶, 加 PD-L1 多克隆抗体, 4℃ 过夜后加生物素化山羊抗兔二抗, DAB 显色, 苏木素复染, 观察、拍照.

1.5 PDK 阻断剂 GÖ 6976 对顺铂引发的 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达变化的影响

细胞分成 4 组, DMSO+ 生理盐水组 (阴性对照组)、PKD 阻断剂 GÖ 6976 组、顺铂组、顺铂联合 PKD 阻断剂 GÖ 6976 组. DMSO+ 生理盐水组加入含生理盐水和 DMSO 的培养基, GÖ 6976 组加入含 5 μM GÖ 6976 的培养基, 顺铂组加入含浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂的培养基, 顺铂组 + PKD 阻断剂 GÖ 6976 组加入含 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂和 5 μM GÖ 6976 的培养基, 24 h 后同 1.4 法应用免疫组化方法检测 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达.

1.6 PD-L1 表达评判标准

PD-L1 阳性表达呈棕黄色至棕褐色颗粒或团块, 定位在细胞膜和胞质内, 每组随机选取 10 张染色细胞片, 计数有阳性染色的细胞及所有细胞的个数, 计算平均阳性细胞百分率. 所得的数值以 ($\bar{x} \pm s$) 表示. 每个实验重复 3 次.

1.7 统计学方法

采用 SPSS 软件对数据进行统计分析处理, 计量资料比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 顺铂对 TC-1 细胞增殖活力的影响

分别用含 15、22.5、33.8、50.6 $\mu\text{g/mL}$ 顺铂的培养液处理 TC-1 细胞 24 h 后, 细胞的平均抑制率为 38.9%、47.2%、50.9%、56.6%. 顺铂对 TC-1 细胞的增殖具有抑制作用, 且呈浓度依赖性, 顺铂对 TC-1 细胞的 IC₅₀ 为 25.5 $\mu\text{g/mL}$.

2.2 顺铂对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响

顺铂组 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达为 (64.96 \pm 11.55) %, 阴性对照组为 (39.59 \pm 5.99) %, 与阴性对照组相比, 顺铂处理后的 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1、图 1.

2.3 PDK 阻断剂 GÖ6976 对顺铂引起的 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达变化的影响

与对照组 DMSO+ 生理盐水组相比, 顺铂组、顺铂联合 PDK 阻断剂 GÖ 6976 组细胞表面 PD-L1 的表达显著增高, 而顺铂联合 PDK 阻断剂 GÖ6976 与顺铂组相比, 联合组细胞表面 PD-L1 的表达显

著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表1、图2.

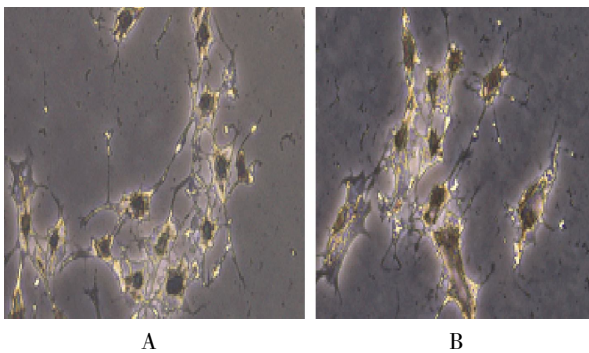


图1 顺铂对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响 (倒置显微镜 $\times 200$)

Fig. 1 The effect of cisplatin on the expression of PD-L1 in TC-1 cell surface

A: 阴性对照组; B: 顺铂组.

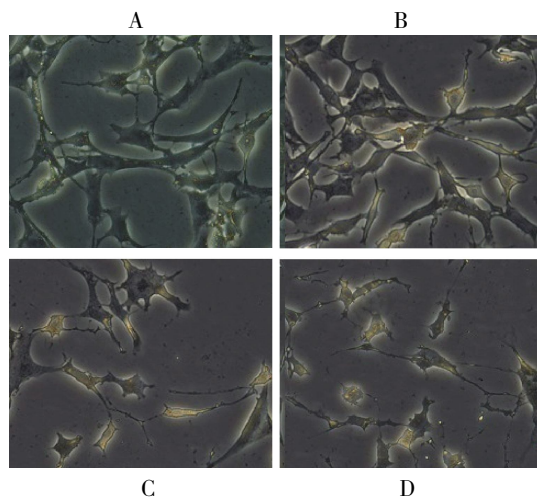


图2 顺铂及 G6976 对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响 (倒置显微镜 $\times 200$)

Fig. 2 The effect of cisplatin combined with G6976 on the expression of PD-L1 in TC-1 cell surface

A: DMSO + 生理盐水组; B: G6976 组; C: 顺铂组; D: 顺铂 + G6976 组.

表1 顺铂及 G6976 对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of cisplatin combined with G6976 on the expression of PD-L1 in TC-1 cell surface ($\bar{x} \pm s$)

分组	PD-L1 表达 (%)
DMSO + 生理盐水组	46.9 \pm 3.9
G6976 组	49.2 \pm 4.9
顺铂组	79.5 \pm 5.1*
顺铂 + G6976 组	61.5 \pm 3.4**

与 DMSO + 生理盐水组比较, * $P < 0.05$; 顺铂组比较, ** $P < 0.05$.

3 讨论

PD-L1 是 B7 家族新成员, 叫程序性死亡配体 1 (Programmed death ligand-1, PD-L1), 是抗原呈递细胞 (antigen-presenting cell, APC) 表面表达的一种表面糖蛋白. T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞以及大量非淋巴细胞的组织细胞上均有 PD-L1 表达. 正常生理情况下, PD-L1 表达较低, 当发生肿瘤等病理情况时, 肿瘤细胞表面呈现 PD-L1 过度表达. PD-L1 表达增加, 与 T 淋巴细胞受体表面程序性死亡受体 (programmed death-1 receptor, PD-1) 结合增加, 提供的抑制性信号增加, 导致 T 调节细胞 (T regulate cells, Treg) 活性增强及抗肿瘤 T 细胞失能, 抑制 T 细胞的分化和增殖, 诱导 T 细胞失能或凋亡, 使肿瘤细胞发生免疫逃逸^[7]. 持续性病毒与细菌感染、肿瘤等多种病理情况均可出现 PD-L1 过度表达. 内源抗肿瘤介质 (如干扰素 γ , interferon- γ , INF- γ) 或抗肿瘤治疗诱导下某些肿瘤细胞亦可高表达 PD-L1, 抑制 T 淋巴细胞活性. 本研究应用顺铂后 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达增加, 提示应用顺铂后可增加 PD-L1 在肿瘤细胞表面的表达, 这可能是影响顺铂化疗效果的原因之一.

目前, 关于化疗药物促进肿瘤细胞表面 PD-L1 表达增加的作用机制研究较少, Qin X 等^[8]认为顺铂使肝癌细胞上 PD-L1 表达增加是通过 Erk /MAPK 途径. Liang 等^[9]报道雷公藤甲素可以减少干扰素 γ 导致的乳腺癌细胞表面 PD-L1 的表达. Chen 等^[9]发现干扰素 γ 通过蛋白激酶 D2 (PKD2) 途径增加口腔鳞状细胞癌细胞表面 PD-L1 的表达.

PKD 家族存在于大多数真核细胞内, 胞浆、细胞核、高尔基体及线粒体内均有分布, 在细胞间信息传递过程中发挥的重要作用, 研究表明, PKD 与肿瘤的生长、发展、迁移都有着联系^[9]. 在本研究中, 加入 PKD 阻滞剂后能减少顺铂对肿瘤细胞表面 PD-L1 表达的增加程度, 提示 PKD 途径参与了顺铂使肿瘤细胞表面 PD-L1 表达增加这一过程, 这一结果与干扰素增加肿瘤细胞表面 PD-L1 表达相似. 因此, 我们推测阻断 PKD 途径可阻断化疗药物、免疫治疗引起的肿瘤细胞表面 PD-L1 表达增加, 抑制肿瘤细胞的免疫逃逸, 提高治疗效果.

总之, 顺铂可增加 TC-1 细胞表面 PD-L1 的表达, 阻断 PKD 途径可显著抑制顺铂对 TC-1 细胞表面 PD-L1 表达增加的程度, 顺铂可能是通过

PKD 途径影响 PD-L1 表达.

[参考文献]

- [1] HERNANDEZ B Y, GREEN M D, CASSEL K D, et al. Preview of hawaii cancer facts and figures 2010 [J]. Hawaii Medical Journal, 2010, 69(9): 223 - 224.
- [2] 丁爱萍, 张淑兰. 调节性T细胞在妇科肿瘤发生发展中的作用及其研究进展 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(9): 718 - 720.
- [3] FLIES D B, SANDLER B J, SZNOL M, et al. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy [J]. The Yale journal of biology and medicine, 2011, 84(4): 409 - 421.
- [4] CHEN J, FENG Y, LU L, et al. Interferon-gamma-induced PD-L1 surface expression on human oral squamous carcinoma via PKD2 signal pathway [J]. Immunobiology, 2012, 217(4): 385 - 393.
- [5] ZHANG P, SU D M, LIANG M, et al. Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis [J]. Molecular Immunology, 2008, 45(5): 1 470 - 1 476.
- [6] QIN X, LIU C, ZHOU Y, et al. Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk /MAPK signaling pathway [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2010, 56(11): 1 366 - 1 372.
- [7] HASPOT F, FEHR T, GIBBONS C, et al. Peripheral deletion of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway [J]. Blood, 2008, 112(5): 2 149 - 2 155.
- [8] LIANG M, FU J. Triptolide inhibits interferon gamma induced programmed death-1-ligand 1 surface expression in breast cancer cells [J]. Cancer Letters, 2008, 270(2): 337 - 341.
- [9] PRESTLE J, PFIZENMAIER K, BRENNER J, et al. Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment [J]. The Journal of cell biology, 1996, 134(6): 1 401 - 1 410.

(2015 - 02 - 16 收稿)

(上接第 9 页)

- translocation: not a clinically relevant phenomenon in colorectal cancer [J]. World J Surg, 2005, 29(2): 198 - 202.
- [4] PACHECO A R, SPERANDIO V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host [J]. Curr Opin Microbiol, 2009, 12(2): 192 - 198.
- [5] CLARKE M B, HUGHES D J, ZHU C, et al. The qse C sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(27): 10 420 - 10 425.
- [6] CURTIS M M, SPERANDIO V. A complex relationship: The interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host [J]. Mucosal Immunol, 2011, 4(2): 133 - 138.
- [7] RASKO D A, MOREIRA C G, LI DE R, et al. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development [J]. Science, 2008, 321(5 892): 1 078 - 1 080.
- [8] DOUGAN G. Does the Trojan horse have an Achilles' heel [J]. N Engl J Med, 2009, 360(1): 83 - 84.
- [9] WALTERS M, SIRICILI M P, SPERANDIO V. AI-3 synthesis is not dependent on luxS in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 2006, 188(16): 5 668 - 5 681.
- [10] SPERANDIO V, TORRES A G, KAPER J B. Quorum sensing Escherichia coli regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in E. coli [J]. Mol Microbiol, 2002, 43(3): 809 - 821.
- [11] LI J, ATTILA C, WANG L, et al. Quorum sensing in Escherichia coli is signaled by AI-2/LsrR: Effects on small RNA and biofilm architecture [J]. J Bacteriol, 2007, 189(16): 6 011 - 6 020.
- [12] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12): 6 640 - 6 645.
- [13] SERRA-MORENO R, ACOSTA S, HERNALSTEENS J P, et al. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes [J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 31 - 42.

(2015 - 02 - 03 收稿)