

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.008

· 临床研究 ·

PD-1 在急性 T 淋巴细胞白血病细胞中的表达及其临床意义

温春媚^{1a}, 李自宣^{1a}, 王禹^{1a}, 朱学军³, 孟会敏^{1a}, 鞠杰^{1a}, 张亭亭^{1a}, 张秀艳^{1a}, 袁磊⁴, 安钢力^{1a}, 杨林^{1a,1b,1c,2} (1. 苏州大学 a. 医学部 唐仲英血液学研究中心; b. 血液协同创新中心; c. 放射医学与辐射防护国家重点实验室, 江苏苏州 215123; 2. 博生吉医药科技(苏州)有限公司, 江苏苏州 215123; 3. 江苏省中医院暨南京中医药大学附属医院 中心实验室 血液科, 江苏南京 210023; 4. 北京大学第三医院 血液科, 北京 100191)

[摘要] **目的:**探讨 PD-1 分子在急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)患者来源的肿瘤细胞(T-ALL 细胞)中的表达及其临床意义。**方法:**选用 2015 年 12 月江苏省中医院血液科提供的 1 例 T-ALL 细胞、4 例健康志愿者提供的 PBMC 和博生吉医药科技(苏州)有限公司提供的人 293T/PD-1 细胞,将 T-ALL 细胞经尾静脉注射到 B-NDG 小鼠构建 T-ALL 细胞异种移植瘤模型,用流式细胞术检测移植瘤小鼠脾中获得的细胞是否主要是由 T-ALL 细胞组成。用流式细胞术检测 T-ALL 细胞中 PD-1 蛋白的表达,用 RT-PCR 进一步验证 T-ALL 细胞中 PD-1 mRNA 表达水平。对 T-ALL 细胞中 PD-1 基因进行 SNP 测序,以检测 PD-1 基因 DNA 序列是否发生改变。在体外使用 PD-1 抑制剂研究其对 T-ALL 细胞增殖、凋亡以及相关因子 mRNA 表达水平的影响。**结果:**成功构建小鼠 T-ALL 细胞异种移植瘤模型,用流式细胞术确认了该例疾病是 T-ALL。T-ALL 细胞中 PD-1 mRNA 和蛋白均高表达(均 $P < 0.01$)。PD-1 基因的第 5 个外显子的一个碱基由胞嘧啶突变成胸腺嘧啶。在体外 PD-1 抑制剂对 T-ALL 细胞的增殖和凋亡均无明显影响;PD-1 抑制剂上调抑癌蛋白 IGFBP3 mRNA 表达,降低促癌蛋白 SULT1A3 mRNA 表达(均 $P < 0.01$)。**结论:**PD-1 在 T-ALL 细胞中高表达,PD-1 可作为临床上 T-ALL 诊断及治疗的靶点。

[关键词] 急性 T 淋巴细胞白血病;程序性死亡受体 1;表达;生长

[中图分类号] R730.5; R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)07-0768-08

Expression of PD-1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells and its clinical significance

WEN Chunmei^{1a}, LI Zixuan^{1a}, WANG Yu^{1a}, ZHU Xuejun³, MENG Huimin^{1a}, JU Jie^{1a}, ZHANG Tingting^{1a}, ZHANG Xiuyan^{1a}, YUAN Lei⁴, AN Gangli^{1a}, YANG Lin^{1a,1b,1c,2} (1a. Cyrus Tang Hematology Center, 1b. Collaborative Innovation Center of Hematology, 1c. State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Persongen Bio Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 3. Department of Hematology, Central Laboratory, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China; 4. Department of Hematology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and clinical significance of PD-1 molecule in tumor cells (T-ALL cells) derived from the patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). **Methods:** T-ALL cells from one patient and PBMCs from four healthy volunteers provided by the Department of Hematology in Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine in December 2015, and human 293T/PD-1 cells provided by Persongen Bio Therapeutics (Suzhou) Co., Ltd. were used for this study. The mouse T-ALL xenograft model was constructed by injecting T-ALL cells into tail vein of B-NDG mice, and flow cytometry was used to

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81872431, No. 31471283);国家重点研发计划(No. 2016YFC1303403);协同创新重大项目(No. XYXT2015304);江苏省“六大人才高峰工程”(No. SWYY-CXTD-010);江苏省科技发展计划(No. BE2016809);南京市科技发展计划(No. 201503011, No. 18030801126)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872431, No. 31471283), National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFC1303403), the Collaborative Innovation Major Project (No. XYXT2015304), the Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (No. SWYY-CXTD-010), the Science and Technology Development Program of Jiangsu Province (No. BE2016809), and the Nanjing Science and Technology Development Program (No. 201503011, No. 18030801126)

[作者简介] 温春媚(1993-),女,硕士生,主要从事血液肿瘤基础与临床治疗研究;E-mail: 2497007113@qq.com

[通信作者] 安钢力(AN Gangli, corresponding author), 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤免疫治疗方面的研究, E-mail: gangli_an@suda.edu.cn; 杨林(YANG Lin, co-corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail: yanglin@suda.edu.cn

verify whether the cells obtained from the spleen of transplanted mice were mainly consisted of T-ALL cells. Flow cytometry was used to study the protein expression of PD-1 in T-ALL cells, and RT-PCR was applied to further verify the mRNA expression of PD-1 in T-ALL cells. The PD-1 gene in T-ALL cells was sequenced by SNP genotyping to detect whether the DNA sequence of PD-1 gene changed. PD-1 inhibitor was used *in vitro* to study their effects on proliferation, apoptosis, and the mRNA expression levels of related factors in T-ALL cells. **Results:** The mouse T-ALL xenograft model was successfully constructed and verified by flow cytometry as T-ALL. PD-1 was highly expressed at both mRNA and protein levels in T-ALL cells (all $P < 0.01$). A C-to-T mutation was detected in the fifth exon of the PD-1 gene. PD-1 inhibitor had no significant effect on proliferation and apoptosis of T-ALL cells *in vitro*; PD-1 inhibitor up-regulated the mRNA expression of tumor-suppressor protein IGFBP3 and decreased the mRNA expression of oncoprotein SUL1A3 (all $P < 0.01$). **Conclusion:** PD-1 is highly expressed in T-ALL cells, and PD-1 could be used as a target for clinical diagnosis and treatment for T-ALL.

[Key words] T-cell acute lymphoblastic leukemia; programmed death receptor-1; express; growth

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(7): 768-775. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.07.008]

急性 T 淋巴细胞白血病 (T-acute lymphoblastic leukemia, T-ALL) 是一种高度侵袭性的血液肿瘤, 占儿童 ALL 的 15%, 占成人 ALL 的 25%^[1]。目前, T-ALL 的化疗治疗方案并不理想, 在儿童患者中不能完全缓解, 而在成人患者中的缓解率不超过 50%^[2]。因此, 寻找 T-ALL 早期诊断和预后监测的生物标志物具有重要的临床意义。PD-1 是 T 细胞上的共抑制性分子。在慢性炎症或肿瘤中, PD-1 会在 T 细胞中高表达, 使 T 细胞处于功能耗竭性的状态^[3-4]。用抗体阻断 PD-1/PD-L1 信号通路可以恢复耗竭性 T 细胞的活性和功能, 活化免疫系统对肿瘤的杀伤能力^[5-7]。在临床上, 多种 PD-1/PD-L1 抑制性抗体被美国 FDA 批准上市, 用于治疗多种实体瘤和多种血液肿瘤^[8-10]。但是在 T-ALL 细胞中是否有 PD-1 的表达及其作用如何, 目前尚未见到明确的报道。本课题检测 1 例 T-ALL 患者来源的肿瘤细胞 (T-ALL 细胞) 中 PD-1 表达水平, 并且在 T-ALL 细胞的体外实验中研究 PD-1 抑制剂对肿瘤细胞增殖和凋亡以及相关因子 mRNA 表达水平的影响, 旨在为临床上寻找 T-ALL 诊断及治疗的分子靶点提供依据。

1 资料与方法

1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

T-ALL 细胞来源: 2015 年 12 月由江苏省中医院收治的 1 例男性 19 岁 T-ALL 患者, 在单倍体异基因造血干细胞移植后半年复发, 多次化疗不能缓解, 供者淋巴细胞输注失败, 目前为疾病终末期, 病情难以控制, 预后极差。T-ALL 细胞的免疫表型: CD7、CD3、CD2、CD4、CD5 和 cCD3 阳性, CD34、HLA-DR、CD8、CD19、CD79a、CD56、CD13、CD117、CD22、CD33、CD10、CD20 和 MPO 阴性。在细胞采集前告知患者或家属并签署知情同意书。

健康人 PBMC 来源: 从 4 例健康人 (自愿) 各抽取 40 ml 外周静脉血, 用 Ficoll-Paque Plus 梯度分离出

PBMC, 用于后续实验。

人 293T/PD-1 细胞由博士吉医药科技 (苏州) 有限公司提供。

NOD-*Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1}*/Bcgen 小鼠 (成熟 T、B 淋巴细胞和 NK 细胞缺陷; B-NDG 小鼠) 由中国北京百奥塞图公司提供, 实验动物合格证号为 No.201814853。MEM- α 培养基为 Gibco 公司产品, DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS) 为 HyClone 公司产品, Supergrow 细胞培养添加剂为中国深圳达科为公司产品, 人 IL-2、SCF、IL-7、胰岛素、FLT3 配体为中国上海近岸科技有限公司产品。Cytotfix/Cytoperm 固定破膜试剂盒为 BD 公司产品, Power SYBR Green PCR Master Mix 为 ABI 公司产品, CFSE 探针为 Invitrogen 公司产品, 7-aminoactinomycin D (7-AAD) 为 BD Pharmingen 公司产品, FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒为 BD 公司产品, 淋巴细胞分离液 Ficoll-Paque 为 Pharmacia Piscataway NJ 产品, TIANamp 基因组 DNA 试剂盒为中国北京天根生化公司产品, 微量 RNA 提取试剂盒为 Omega 公司产品, RNA 逆转录试剂盒为 Thermo Scientific 公司产品。CD45-FITC 抗体、PD-1-APC 抗体为 Miltenyi 公司产品, 纯化的 CD3 抗体、IgG2a、 κ -FITC 同型对照抗体为 BD 公司产品, CD3-FITC 抗体、CD5-FITC 抗体、CD7-PE 抗体、CD45-APC 抗体、CD7-PECY5 抗体、CD33-APC 抗体、CD19-FITC 抗体、CD56-APC 抗体为 BD Biosciences 公司产品, PD-1 抗体、IgG1 同型对照抗体为 Bioxcel 公司产品。

1.2 小鼠 T-ALL 细胞异种移植瘤模型的建立及细胞培养

由于 T-ALL 细胞在体外无法长时间培养, 为了扩增足够数目的 T-ALL 细胞以供后续实验, 在 B-NDG 小鼠上构建了白血病异种移植模型。5 周龄、雌性 B-NDG 小鼠尾静脉注射 5×10^6 个 T-ALL 细胞 ($n=6$)。第 23~30 天时处死动物, 将小鼠的脾细胞进行研磨、红细胞裂解, 用流式细胞术检测其纯度, 用抗人

CD5、CD7、CD45 抗体染色结果显示 T-ALL 细胞接近 100%。然后, 将 T-ALL 细胞置于含 10% 胎牛血清、2.5% Supergrow 细胞培养添加物、100 ng/ml IL-2、50 ng/ml 人 SCF、10 ng/ml IL-7、20 nmol/L 胰岛素、20 ng/ml 人 FLT3 配体的 MEM- α 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。

同时构建人 PD-1 稳定表达的 293T 细胞株, 于 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养。

1.3 流式细胞术检测 T-ALL 细胞和健康人 T 细胞的表型及 cCD3 表达

收集 1×10⁶ 个细胞, 并设置好对照组, 本试验对照组是未用抗体染色的细胞作为空白对照组。将收集好的细胞用 PBS 洗 2 次, 900×g 离心 3 min, 用 100 μ l 的 PBS 重悬细胞, 各加入 1 μ l 相应的抗体, 37 °C 孵育 30 min。将所有孵育抗体的细胞用 PBS 洗 2 次, 900×g 离心 3 min, 用 500 μ l 的 PBS 重悬细胞, 最后用流式细胞仪检测。

测定细胞质内 cCD3 抗原表达用 Cytofix/Cytoperm 固定破膜试剂盒, 用 CD45-APC 进行表面染色并用纯化的抗 CD3 抗体阻断表面 CD3 抗原后, 固定、破膜, 分别用 CD3-FITC 和 IgG2a, κ -FITC 进行胞内染色。所有数据用 FACS Calibur 收集, 用 FlowJo 软件 (Tree Star, Inc.) 分析。

1.4 RT-PCR 和 qPCR 分别检测 T-ALL 细胞中 PD-1 的表达和 PD-1 抑制剂处理后 T-ALL 细胞中相关因子 mRNA 的表达

用微量 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 再用 RNA 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。按照说明将 cDNA 进行 PCR 扩增, 再把 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

应用 SYBR Green Mix 和 Q6 实时定量 PCR 系统按照以下步骤进行: 预热变性阶段: 50 °C 2 min、95 °C 2 min; PCR 阶段: 95 °C 15 s、60 °C 1 min, 共 40 个循环; 溶解曲线阶段: 95 °C 15 s、60 °C 1 min。所有样品设 3 个复孔, 实验重复 3 次。目的基因 mRNA 相对表达水平计算方法是 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, 管家基因是 β -actin。RT-PCR 和 qPCR 引物序列见表 1。

1.5 CFSE 染色和 7-AAD/Annexin V 染色检测 PD-1 抑制剂处理后 T-ALL 细胞的增殖和凋亡

用 CFSE 细胞增殖试剂盒检测细胞增殖, 按照说明将细胞用 CFSE 染色后, 计数铺板, 并加入抗 PD-1 抗体或者 IgG1 同型对照抗体 (50 μ g/ml), 分别在 0、12、24、48、72 h 用流式细胞仪检测 CFSE 荧光强度。

用 Annexin V 凋亡检测试剂盒和 7-AAD 抗体检测细胞凋亡, 分别在细胞和抗 PD-1 抗体或者 IgG1 同

型对照抗体孵育 24、48、72 h 后检测, 用 100 μ l 1×缓冲液将细胞重悬后, 加入 5 μ l 7-AAD 和 5 μ l Annexin V, 室温避光孵育 15~20 min, 再补加 300~400 μ l 1×缓冲液, 应用流式细胞仪检测 Annexin V 的阳性率。

表 1 RT-PCR 和 qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-PCR and qPCR

Gene	Sequence(-5'-3')
RT-PCR	
PD-1	F GCACGAGGGACAATAGGA R GACAATGGTGGCATACTC
qPCR	
β -actin	F CACCATTGGCAATGAGCGGTTCC R GTAGTTTCGTGGATGCCACAGG
HHLPL2	F CCCGTGAGAACCAAGAGTAAG R CCTTTCTCAGACAAACCCTGG
TIAF1	F CCCACACACTTATCCCAGAC R CAGCCCAGTGAGTACAAACC
MTPN	F CCCTGAAAAACGGAGACTTGG R CTGCCCCACAATCTGCTGCATA
CD151	F ATCATCGCTGGTATCCTCG R GTCTCGTGCCCAAAAG
MMP2	F CCTGCAAGTTTCCATTCCGC R CTTCTTGTCGCGGTCTAGT
SULT1A4	F CACCCTGTTCTCTACCTCTTC R TGTGCTGAACCATGAAGTCC
SULT1A3	F TGAGGTCAATGATCCAGGGGAA R CGCCTTTTCCATACGGTGGAAA
IGFBP3	F CCATGACTGAGGAAAGGAGCTC R TGCAGCAGGGCAGAGTCTC
CLU	F CCAATCAGGGAAGTAAGTACGTC R CTTGCGCTCTTCGTTTGTGTTT
LMNA	F AATGATCGCTTGGCGGTCTAC R CACCTCTTCAGACTCGGTGAT
MMP14	F GGATACCCAATGCCCATGGCCA R CCATTGGGCATCCAGAAGAGAGC
IGFBP6	F CATGCCGTAGACATCTGGAC R GGTAGAAGCCTCGATGGTCA
CD302	F GATGATGCGAGTTTCAAGTGGT R AGCACAGGTGTCAACTAAATCC

1.6 转录组测序检测 PD-1 抑制剂处理后 T-ALL 细胞中相关分子的 mRNA 表达

收集与抗 PD-1 抗体或者 IgG1 同型对照抗体共孵育 48 h 的 T-ALL 细胞, 提取 RNA。在北京基因组研究所的 BGISEQ-500 上构建文库并进行测序。用过滤软件 SOAPnuke 进行数据过滤, 去除低质量的测序片段 (去除未知碱基 N 含量大于 5% 的测序片段)^[11]。获得的 clean reads 存储为 FASTQ 格式。用 HISAT^[12] 将 clean reads 比对到参考基因组序列, 使用

Bowtie 2 将 clean reads 比对到参考序列, 这些序列是从 NCBI 的 GRCh38.p11 (hg38) 中获得。用 RSEM 软件计算基因和转录本的表达水平^[13]。使用 DEGseq 方法来比较两组之间差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG)^[14]。

1.7 单核苷酸多态性 (SNP) 测序检测 T-ALL 细胞中 PD-1 基因 DNA 序列的改变

用 TIANamp 基因组 DNA 试剂盒提取 T-ALL 细胞中的 DNA; 分别对 PDCD-1 上的 5 个外显子进行 PCR; 纯化的 PCR 产物在 ABI 3730XL 遗传分析仪 (ABI 公司) 上测序, 并使用 Seqscape V6.5 软件 (Life Technologies 公司) 分析。参考序列是人 PDCD-1 序列 (GeneBank 号码 AF363458)。

1.8 统计学处理

体外实验数据用 GraphPad Prism 6 软件进行处理, 每组实验重复 3 次。组间比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建小鼠 T-ALL 细胞异种移植瘤模型

流式细胞术检测结果 (图 1) 显示, 从荷瘤小鼠脾获得的细胞中人 CD33、CD56、CD19 表达接近 0, 排除了该肿瘤细胞是髓系细胞、NK 细胞、B 细胞来源的可能; 而细胞中人 CD45、CD7、CD5 的表达接近 100%, 人 cCD3 的表达也达 90% 以上。结果表明, 从荷瘤小鼠脾获得的细胞主要是由 T-ALL 细胞组成。

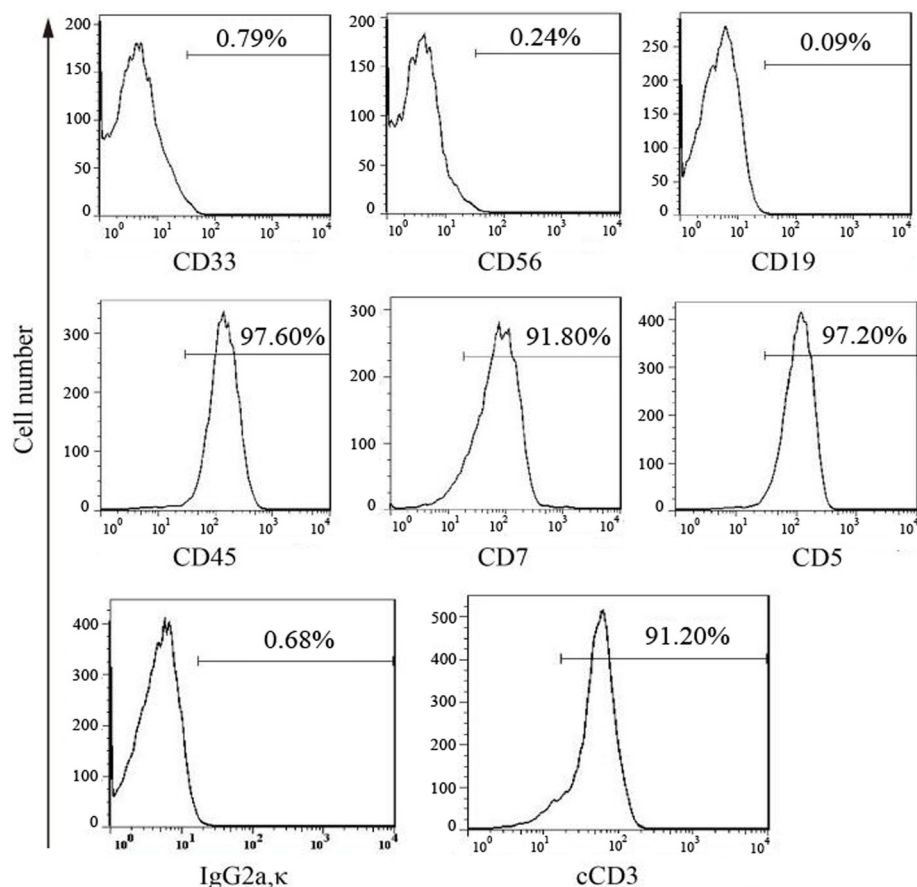


图 1 荷瘤小鼠 T-ALL 细胞异种移植模型的特征

Fig.1 Characteristics of the mouse T-ALL cell xenograft model

2.2 T-ALL 细胞中 PD-1 mRNA 和蛋白高表达

流式细胞术检测结果 (图 2A) 显示, T-ALL 细胞中 PD-1 蛋白的表达率显著高于健康人 CD3⁺T 细胞 (80%~98% vs 10%~20%, $P < 0.01$; 图 2A)。T-ALL 细胞中 PD-1 蛋白荧光强度也显著高于健康人 CD3⁺T 细胞 ($t = 7.412$, $P < 0.01$; 图 2B)。

同时, RT-PCR 法检测到了 T-ALL 细胞和健康人 PBMC 中 PD-1 的转录本 (图 2C), 结果表明, PD-1

mRNA 在 T-ALL 细胞中是有表达的。

2.3 T-ALL 细胞 PD-1 基因 (PDCD-1) 的 SNP 测序结果

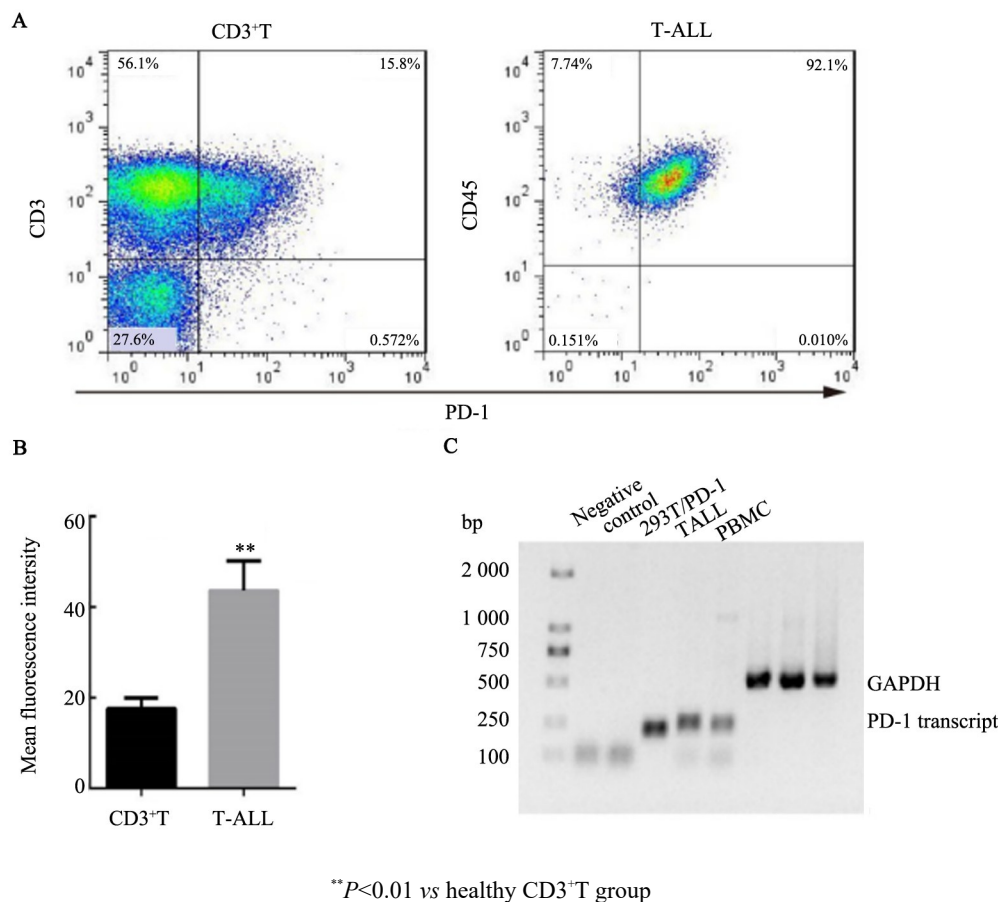
SNP 测序结果 (图 3) 显示, T-ALL 细胞中 PDCD-1 的第 5 个外显子的 1 个碱基发生单等位基因突变, 由胞嘧啶 (C) 突变成胸腺嘧啶 (T)。

2.4 在体外抗 PD-1 抗体对 T-ALL 细胞中分子表达水平的影响

CFSE 染色流式细胞术检测结果 (图 4) 显示, PD-1

抑制组和同型对照组的峰图始终是相重叠的(图4A),因此两组间T-ALL细胞的增殖差异无统计学意义($t=1.890, P>0.05$);7-AAD/Annexin V 染色流式细

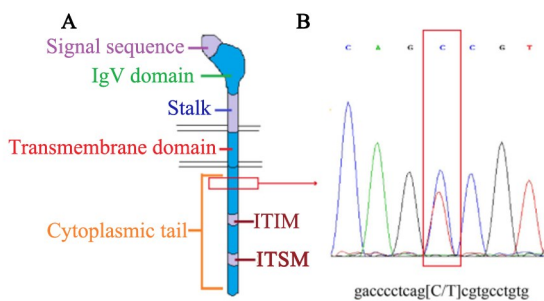
胞术检测结果(图4B)显示,两组间T-ALL细胞的凋亡差异无统计学意义($t=2.495, P>0.05$)。



A: The expression of PD-1 protein; B: The fluorescence intensity of PD-1 protein; C: The expression of PD-1 mRNA

图2 T-ALL 细胞中 PD-1 蛋白和 mRNA 高表达

Fig.2 PD-1 was highly expressed in T-ALL cells at both protein and mRNA levels



A: The structure of human PD-1 protein is shown on the left; B: The peak map and gene sequence of PDCD-1 SNP sequencing were shown on the right

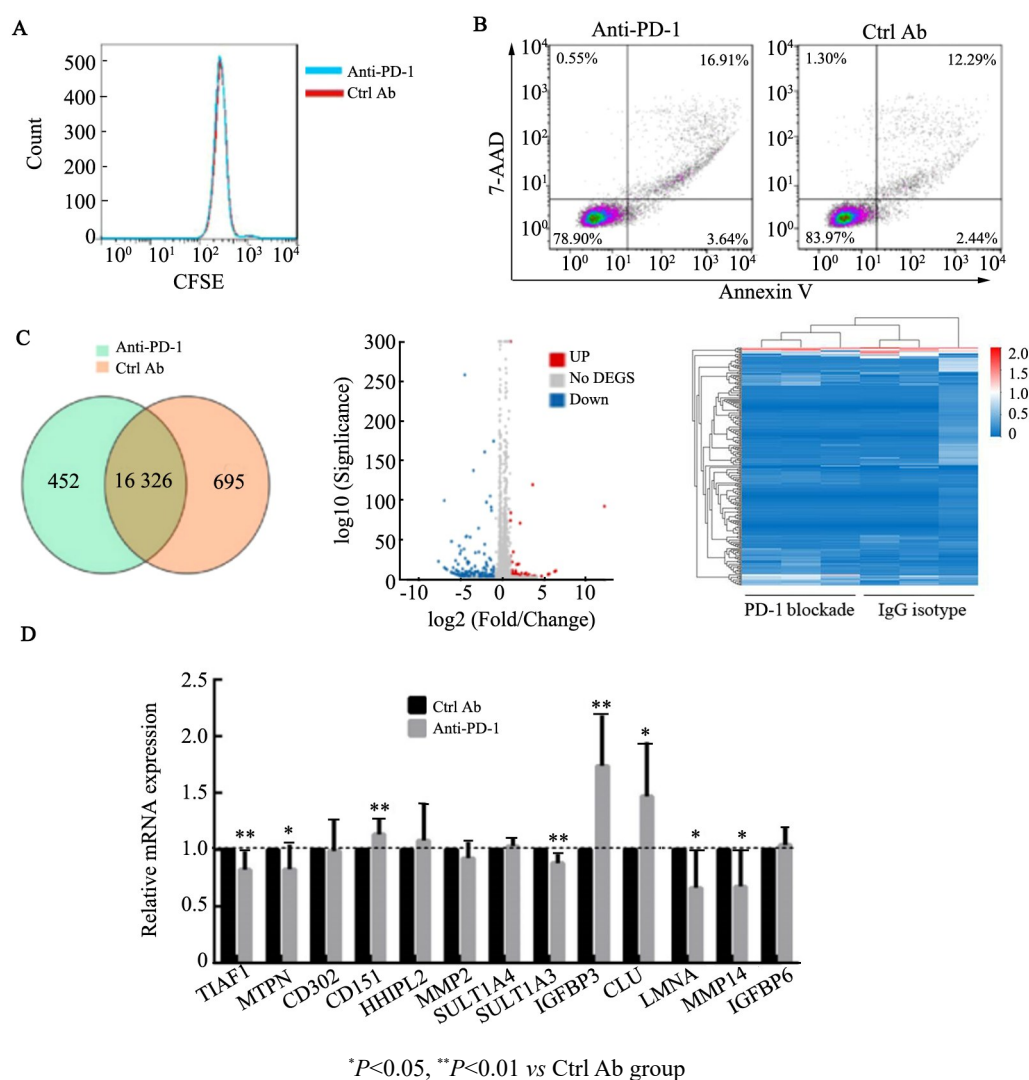
图3 T-ALL 细胞 PD-1 基因的 SNP 测序结果

Fig.3 SNP genotyping results of the PD-1 gene in T-ALL cells

转录组测序结果(图4C)显示,生物学重复样品

之间相关性达 98% 以上,PD-1 封闭抗体实验组和同型对照组间的差异基因数有 236 个。

qPCR 检测结果(图4D)显示,抗 PD-1 抗体诱导了 CD151、IGFBP3、CLU mRNA 表达($t=3.022, 4.058, 2.620$, 均 $P<0.05$),降低了 TIAF1、MTPN、SULT1A3、LMNA 和 MMP14 mRNA 表达($t=3.238, 2.428, 4.356, 2.881, 2.668$, 均 $P<0.05$),而对 CD302、HHIPL2、MMP2、SULT1A4 和 IGFBP6 mRNA 表达无影响($t=0.1263, 0.7244, 1.579, 1.351, 0.7343$, 均 $P>0.05$)。其中,IGFBP3 mRNA 表达在 PD-1 封闭抗体实验组中更高,大约是 IgG 对照组的 1.7 倍,差异具有统计学意义($t=4.058, P<0.01$);SULT1A3 mRNA 表达在 PD-1 封闭抗体实验组中较低,比 IgG 对照组下降了大约 12%,差异具有统计学意义($t=4.356, P<0.01$)。



A and B: Determination of the effects of the anti-PD-1 antibody on the proliferation (A) and apoptosis (B) of patient-derived T-ALL cells by flow cytometry; C: Transcriptome sequencing results from patient-derived T-ALL cells after the *in vitro* blockade with anti-PD-1 antibody. Venn diagram, volcano plot, and heat map are shown from left to right; D: Determination of the effects of anti-PD-1 antibody on the mRNA expression levels of some molecules in patient-derived T-ALL cells by qPCR

图4 体外抗 PD-1 抗体对 T-ALL 细胞相关分子表达水平的影响

Fig.4 Effects of anti-PD-1 antibody on expression levels of T-ALL cell related molecules *in vitro*

3 讨论

目前对 T-ALL 病理发生进展机制的研究^[1,15]显示,该病的发病及进展涉及到多种致癌过程,包括 NOTCH 信号的持续性活化、转录因子癌基因的活化突变(如 TAL1、TLX1、HOXA、c-MYB 等)、转录因子抑癌基因的丧失(如 WT1、RUNX1、GATA3、ETV6)等,还有许多非编码 RNA 是 T-ALL 细胞基因表达的重要调控者。但是在 T-ALL 细胞中 PD-1 的表达及作用尚未见报道,于是本课题对患者来源的 T-ALL 细胞中 PD-1 进行研究。成功构建了小鼠 T-ALL 细胞异种移植瘤模型,并确认了从小鼠脾获取的细胞是人 T-ALL 细胞。实验结果表明, T-ALL 细胞中 PD-1 mRNA 及蛋白水平上是存在表达的。一些美国研究

机构^[16]对数百例 T-ALL 患者进行转录组测序,测序结果显示 80.7%(213/264) T-ALL 细胞中检测(>0.5 FPKM)到 PD-1 转录本,表达量高至 146 FPKM;本实验在 EMBL-EBI Expression Atlas 网站上查阅人 T-ALL 细胞系^[17],获取了 4 个 RNA 测序数据集,发现 35.1%(13/37)人 T-ALL 细胞系中有 PD-1 转录本表达。这些统计分析出的结果和本实验的实验结果相符合,都表明了 PD-1 在人 T-ALL 细胞内存在表达这一现象的普遍性。

根据 ALL-BFM 2000 protocol 规定,在流式细胞术中用 CD45 和直角光侧散(right angle light scatter)可以区分骨髓中各种细胞,还可以区分骨髓中白血病细胞和正常细胞^[18],CD45 在双阴性的未成熟 T 细胞中呈中等表达^[19]。据报道^[20],在一组 T-ALL 患者

中用流式细胞术检测了CD45表达水平,发现在T-ALL细胞中高表达CD45,并且CD45蛋白表达与患者预后相关。所以本实验在流式中细胞术中采用CD45来圈门。根据WHO规定,T-ALL细胞特征性地表达TdT、CD7和cCD3,CD5且呈弱表达^[21],本实验用CD5、CD7、CD45、cCD3作为T-ALL细胞的鉴别标志物。

本实验对此例T-ALL细胞进行SNP测序结果显示,PD-1基因的第5个外显子的单等位基因的C突变成T,可能导致此处的蛋白质序列由甘氨酸突变成了缬氨酸,两者都属于非极性氨基酸,且突变位点在PD-1细胞内区域的功能基序ITIM、ITSM之外,所以这个突变可能对蛋白的结构和功能均无影响。

多种类型肿瘤的临床试验结果表明,PD-1/PDL1抑制剂能明显减小肿瘤、提高ORR,并延长了患者的OS,表现出持久的抗肿瘤活性和可接受的毒性^[22]。其机制就是PD-1/PD-L1抑制剂将功能受损的T细胞从耗竭的状态中释放出来,使得免疫系统能够恢复正常,发挥抗肿瘤活性^[23]。还有报道^[24]显示,在黑色素瘤细胞系中有PD-1的表达,并且通过使用PD-1抑制剂证明PD-1对该肿瘤细胞的增殖具有调控作用。这些关于PD-1抑制剂在肿瘤浸润的T细胞上和肿瘤细胞系中发挥的作用,给予本研究以启发。在本实验中,在体外将PD-1抑制剂和T-ALL细胞共孵育,观察PD-1抑制剂对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响,以及对肿瘤细胞内一些分子的mRNA表达水平的影响。结果发现,抗PD-1抗体对T-ALL细胞的增殖和凋亡均无明显影响,这可能与T-ALL细胞在体外培养时处于一种不增殖的“静息”状态有关。假如T-ALL细胞像其他细胞系一样处于正常生长状态,那么可能就可以看到细胞表型改变和PD-1封闭抗体在其中起的作用了。SULT1A3属于SULT细胞溶质磺基转移酶超家族,该家族催化各种外源性物质、激素和神经递质的硫酸盐化作用^[25]。在9例肝癌组织及细胞系中SULT1A3/4高表达;在用多巴胺诱导SULT1A3/4表达的实验中,SULT1A3/4能刺激HepG2肝癌细胞的迁移、侵袭、EMT以及促进肿瘤干细胞的活化。因此,SULT1A3/4可能是肝癌的潜在治疗靶标和早期诊断标志物^[26]。IGFBP3是胰岛素样生长因子结合蛋白3,通过IGFBP3体外过表达、体外siRNA干扰IGFBP3表达、IGFBP3敲除的小鼠模型等实验结果表明,在一些肿瘤细胞中IGFBP3能抑制细胞周期和增殖,促进细胞迁移,诱导细胞凋亡,对肿瘤生长发挥抑制肿瘤作用,如肺癌^[27]、T-ALL和B-ALL^[28]、乳腺癌^[29]。其中,研究发现在15例ALL患者的骨髓和外周血中IGFBP3表达下调。因此,IGFBP3

表达下调在ALL进展中发挥重要作用,并且IGFBP3是ALL的关键靶点^[28]。在体外实验中,PD-1阻断抗体导致T-ALL细胞中SULT1A3 mRNA表达下降,IGFBP3 mRNA表达升高,在T-ALL细胞中PD-1可能通过上调促癌蛋白SULT1A3、下调抑癌蛋白IGFBP3调控细胞的肿瘤特性。

综上,本研究首次报道了1例T-ALL患者来源的肿瘤细胞中PD-1表达,并探讨了相关分子机制。PD-1在T-ALL细胞中高表达;PD-1可能通过上调促癌蛋白SULT1A3、下调抑癌蛋白IGFBP3调控T-ALL细胞的肿瘤特性。研究结果为PD-1作为临床上T-ALL诊断及治疗的生物标志物提供了实验依据。鉴于本研究样本量少,未来将在更大数量的T-ALL患者身上对肿瘤细胞中PD-1表达及作用机制进行进一步地探索。

[参考文献]

- [1] DURINCK K, GOOSSENS S, PEIRS S, et al. Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Exp Hematol*, 2015, 43(8): 625-639. DOI:10.1016/j.exphem.2015.05.017.
- [2] PASSARO D, QUANG C T, GHYSDAEL J. Microenvironmental cues for T-cell acute lymphoblastic leukemia development[J]. *Immunol Rev*, 2016, 271(1): 156-172. DOI:10.1111/imr.12402.
- [3] TOPALIAN S L, HODI F S, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer[J/OL]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2443-2454[2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3544539/>. DOI:10.1056/NEJMoa1200690.
- [4] DAY C L, KAUFMANN D E, KIEPIELA P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression[J]. *Nature*, 2006, 443(7109): 350-354. DOI:10.1038/nature05115.
- [5] ROSATO R R, DÁVILA-GONZÁLEZ D, CHOI D S, et al. Evaluation of anti-PD-1-based therapy against triple-negative breast cancer patient-derived xenograft tumors engrafted in humanized mouse models[J/OL]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1): 108[2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125882/>. DOI:10.1186/s13058-018-1037-4.
- [6] STROME S E, DONG H D, TAMURA H, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6501-6505.
- [7] IWAI Y, ISHIDA M, TANAKA Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12293-12297[2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129438/>. DOI:10.1073/pnas.192461099.
- [8] OK C Y, YOUNG K H. Checkpoint inhibitors in hematological malignancies[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 103. DOI:10.1186/s13045-017-0474-3.
- [9] DERMANI F K, SAMADI P, RAHMANI G, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1313-1325. DOI:10.1002/jcp.27172.

- [10] 易凡, 姜雷, 关泉林. PD-1/PD-L1 抑制剂治疗胃癌的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(7): 737-741. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.014.
- [11] COCK P J, FIELDS C J, GOTO N, et al. The sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(6): 1767-1771 [2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847217/>. DOI:10.1093/nar/gkp1137.
- [12] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J/OL]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360 [2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655817/>. DOI:10.1038/nmeth.3317.
- [13] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323. DOI:10.1186/1471-2105-12-323.
- [14] WANG L K, FENG Z X, WANG X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136-138. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp612.
- [15] VAN VLIERBERGHE P, FERRANDO A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *J Clin Invest*, 2012, 122(10): 3398-3406 [2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461904/>. DOI:10.1172/JCI61269.
- [16] LIU Y, EASTON J, SHAO Y, et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Nat Genet*, 2017, 49(8): 1211-1218 [2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5535770/>. DOI: 10.1038/ng.3909.
- [17] EMBL-EBI Expression Atlas. 2019-03-12 <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>.
- [18] STELZER G T, SHULTS K E, LOKEN M R. CD45 gating for routine flow cytometric analysis of human bone marrow specimens[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 677: 265-280.
- [19] LI S Y, JUCO J, MANN K P, et al. Flow cytometry in the differential diagnosis of lymphocyte-rich thymoma from precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma[J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 121(2): 268-274. DOI: 10.1309/K2FY-1TED-8GEG-FLNG.
- [20] CARIO G, RHEIN P, MITLÖHNER R, et al. High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol[J/OL]. *Haematologica*, 2014, 99(1): 103-110 [2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4007934/>. DOI:10.3324/haematol.2013.090225.
- [21] NAEEM S, BUKHARI M H. Antigen expression on blast cells and hematological parameters at presentation in acute lymphoblastic leukemia patients[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2015, 25(6): 407-411. DOI:06.2015/JCPSP.407411.
- [22] CONSTANTINIDOU A, ALIFIERIS C, TRAFALIS D T. Targeting programmed cell death -1 (PD-1) and ligand (PD-L1): a new era in cancer active immunotherapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 194: 84-106. DOI:10.1016/j.pharmthera.2018.09.008.
- [23] BARBER D L, WHERRY E J, MASOPUST D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection[J]. *Nature*, 2006, 439(7077): 682-687. DOI:10.1038/nature04444.
- [24] KLEFFEL S, POSCH C, BARTHEL S R, et al. Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth[J/OL]. *Cell*, 2015, 162(6): 1242-1256 [2019-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4700833/>. DOI:10.1016/j.cell.2015.08.052.
- [25] COUGHTRIE M W. Sulfation through the looking glass--recent advances in sulfotransferase research for the curious[J]. *Pharmacogenomics J*, 2002, 2(5): 297-308. DOI:10.1038/sj.tpj.6500117.
- [26] ZOU J, LI H, HUANG Q L, et al. Dopamine-induced SULT1A3/4 promotes EMT and cancer stemness in hepatocellular carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(10): 1010428317719272. DOI: 10.1177/1010428317719272.
- [27] WANG Y A, SUN Y G, PALMER J, et al. IGFBP3 modulates lung tumorigenesis and cell growth through IGF1 signaling[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(7): 896-904. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0390.
- [28] ZHOU W, WANG S Q, YING Y, et al. MiR-196b/miR-1290 participate in the antitumor effect of resveratrol via regulation of IGFBP3 expression in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1075-1083. DOI:10.3892/or.2016.5321.
- [29] O'HAN M K, BAXTER R C, SCHEDLICH L J. Effects of endogenous insulin-like growth factor binding protein-3 on cell cycle regulation in breast cancer cells[J]. *Growth Factors*, 2009, 27(6): 394-408. DOI:10.3109/08977190903185032.

[收稿日期] 2019-03-14

[修回日期] 2019-05-23

[本文编辑] 党瑞山