

网络出版时间: 2020-5-8 15:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.006.html>

MAIT 细胞在结直肠癌患者外周血中频率、表型及功能改变

邵春艳¹ 朱云¹ 仲飞^{1,2} 王华^{1,3,4}

摘要 目的 探究结直肠癌患者与健康对照组相比,外周血黏膜相关恒定 T (MAIT) 细胞的频率、表型及功能的变化。方法 采用密度梯度离心法从健康供者和结直肠癌患者的外周血中分离出外周血单个核细胞 (PBMCs),并用佛波脂酸 (PMA) + 离子霉素刺激使 MAIT 细胞活化,通过流式细胞仪检测 MAIT 细胞的频率、表型及活化后胞内细胞因子的产生情况。结果 ① 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的频率与绝对数均低于健康对照组 ($P = 0.022, P < 0.001$)。② 同一患者,化疗前后外周血 MAIT 细胞的频率与绝对数无差异 ($P = 0.507, P = 0.743$)。③ 与健康对照组相比,结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞表面分子的水平,PD-1 分子和 CD69 分子有差异 ($P = 0.049, P < 0.001$),Tim-3 分子无差异 ($P = 0.757$)。④ 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的功能与健康对照组相比无差异 ($P = 0.545, P = 0.121$)。⑤ MAIT 细胞的频率和绝对数与临床肿瘤分期无显著关联 ($P = 0.261, P = 0.173$)。结论 与健康人群相比,结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的频率和绝对数降低,表型改变,但在功能上无变化,且化疗对结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的频率基本无影响,MAIT 细胞频率与肿瘤分期亦无关联。

关键词 黏膜相关恒定 T 细胞; 结直肠癌; 外周血 T 淋巴细胞; 流式细胞术; 免疫监测

中图分类号 R 730.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)05-0682-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.05.006

黏膜相关恒定 T (mucosal-associated invariant T , MAIT) 细胞是一种类先天样 T 淋巴细胞^[1],表达半恒定的 T 细胞受体 (T cell receptor , TCR),其发育依赖于主要组织相容性复合体 (the major his-

2020-01-26 接收

基金项目: 安徽省皖江学者计划; 中国博士后科学基金 (编号: 2016M590560)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

² 安徽医科大学附属阜阳医院肿瘤内科, 阜阳 236000

³ 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

⁴ 安徽医科大学肝病研究所, 合肥 230032

作者简介: 邵春艳, 女, 硕士研究生;

仲飞, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 18226616729@163.com;

王华, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wanghua@ahmu.edu.cn

toxicity complex , MHC) Ib 类分子相关蛋白 1 (MHC class I-related protein 1 , MR1)^[2]。该细胞可被维生素 B 代谢产物等激活^[3], 活化后产生多种促炎及免疫调节细胞因子, 间接调节着各种免疫, 包括肿瘤免疫^[4]。如 MAIT 细胞产生的 IFN-γ 可激活 NK 细胞、T 细胞等, 从而间接促进抗癌作用^[5]。此外, 其表面表达的 C 型凝集素 NKG2D 在肿瘤的免疫监视中也同样发挥着重要的作用^[5]。

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发生发展与肿瘤及肿瘤浸润的淋巴细胞也有密切的关系^[6]。MAIT 细胞是近来广受关注的一类免疫细胞, 在临床疾病中亦有研究^[7]。现选取结直肠癌患者, 对其外周血循环 MAIT 细胞进行研究, 探讨结直肠癌患者与正常健康者对比, 外周血 MAIT 细胞频率、表型及功能的变化, 化疗前后 MAIT 细胞频率有无改变, 以及外周血 MAIT 细胞频率与临床肿瘤分期之间的关系。

1 材料与方法

1.1 外周血样本的获取 样本为肝素化人外周血约 2 ml, 取自安徽医科大学第一附属医院体检中心的 49 例健康供者, 年龄 36~87 (58.40 ± 1.76) 岁, 排除肝肾心脑等重要器官疾病, 排除自身免疫性疾病、恶性肿瘤, 及近期无发热、无感染等病史的健康体检者, 和已确诊的 51 例结直肠癌患者, 年龄 38~79 (60.17 ± 1.68) 岁。

1.2 PBMC 的制备 将按等倍体积稀释的人外周血样本缓慢平铺于 4 ml 的人外周血淋巴细胞分离液 (Ficoll 液) 上, 以转速 2 000 r/min, 25 °C, 30 min 离心; 巴氏吸管从已经分层的样本中, 缓慢吸取云雾状白膜层, 即为单个核细胞层, 并用 1 × PBS 溶液洗涤 2 遍, 即得 PBMC。本研究已通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会的批准。

1.3 主要试剂和仪器 人系列单克隆荧光抗体 FITC-CD3 (OKT3), PE-TCR/γδ (B1), APC-TCRVα7.2 (3C10), Brilliant Violet 605-CD161 (HP-3G10), Brilliant Violet 421-PD1 (EH12.2H7), PE-CD69 (FN50), APC/Cy7-Tim-3 (F38-2E2), PE/Cy7-

IFN- γ (B27), Brilliant Violet 421-TNF- α (MAb11)。所有流式抗体购自美国 Biolegend 公司; Ficoll 液(P8610)购自北京 Solarbio 公司; PMA(P8139)、离子霉素(407951)购自美国 Sigma 公司; 莫能霉素(420701)购自美国 Biolegend 公司; BD FACS 流式细胞仪购自美国 BD(Becton, Dickinson and Company)公司; 检测所得数据通过流式分析软件 FlowJo_V10 进行数据分析。

1.4 MAIT 细胞频率的检测及数据获取 将制备好的 PBMC 用移液枪依次加入标记好的 5 ml 离心管内, 加入小鼠血清 20 μ l 封闭细胞表面 Fc 段, 防止非特异性结合; 再按实验方案加入预先制备的细胞表面检测荧光抗体、同型对照荧光抗体及单染色荧光抗体, 避光, 置于 4 °C 环境 30 min 进行标记, 最后用 1 × PBS 溶液洗涤后上机检测, 并在检测前用单染色管调整至最佳的检测电压及补偿值。通过逐步圈门, 计算出 MAIT/CD3 + T 细胞的比例(%); 收集临床血常规信息, 进一步计算出每 ml 全血 MAIT 细胞的绝对数($\times 10^4$ /ml)。诸多关于 MAIT 细胞研究的报道, 外周血 MAIT 细胞可定义为 CD3 + $\gamma\delta$ -CD161 + + V α 7.2 + T 细胞^[6-8], 本文亦采取相同的圈门策略。

1.5 MAIT 细胞功能检测 将制备好的 PBMC 用 1 × PBS 溶液洗 1 遍, 用完全培养基重悬后, 依次加入 24 孔培养板, 每个培养孔体系控制在细胞数量 1×10^6 /ml, 体积 1 ml; 并向孔内加入刺激剂 PMA、离子霉素及蛋白转运阻断剂莫能霉素, 置于 37 °C、5%

CO₂ 的细胞培养箱内进行 4 h 的细胞刺激。刺激完成后, 依次进行细胞外染色、胞膜固定、破膜及细胞内因子染色等步骤, 最后以 300 μ l 重悬液上机检测。并注意在设门时, 淋巴细胞群位置的变化。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 和 Graph Pad Prism5.0 统计软件对流式仪结果进行统计学分析, 然后应用独立样本或配对样本 t 检验进行数据处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 进行各图内组间均数的比较; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的频率和绝对数降低 如图 1(A4) 所圈出的即为 MAIT 细胞。图 1B 为外周血 MAIT 细胞占 CD3 + T 细胞的比例以及全血中 MAIT 细胞绝对数在结直肠癌组及健康对照组之间的水平比较; 流式结果显示与健康对照组相比, 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的比例(图 1B1, $t = 1.40 \pm 0.13 / 1.97 \pm 0.21 P = 0.022$) 和绝对数(图 1B2, $t = 1.23 \pm 0.13 / 2.23 \pm 0.24 P < 0.001$) 均降低。

2.2 化疗因素对结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞频率的影响 共 8 例患者, 对同一患者化疗前后共收集 2 次不同的血样本, 并进行 MAIT 细胞频率的相关检测。由图可以看出, 化疗前后外周血 MAIT 细胞的频率变化无统计学差异, 即化疗基本不影响结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞频率的变化(图 2A: $t = 1.23 \pm 0.26 / 1.03 \pm 0.15 P = 0.507$; 图 2B: $t = 0.28 \pm 0.06 / 0.26 \pm 0.04 P = 0.743$)。

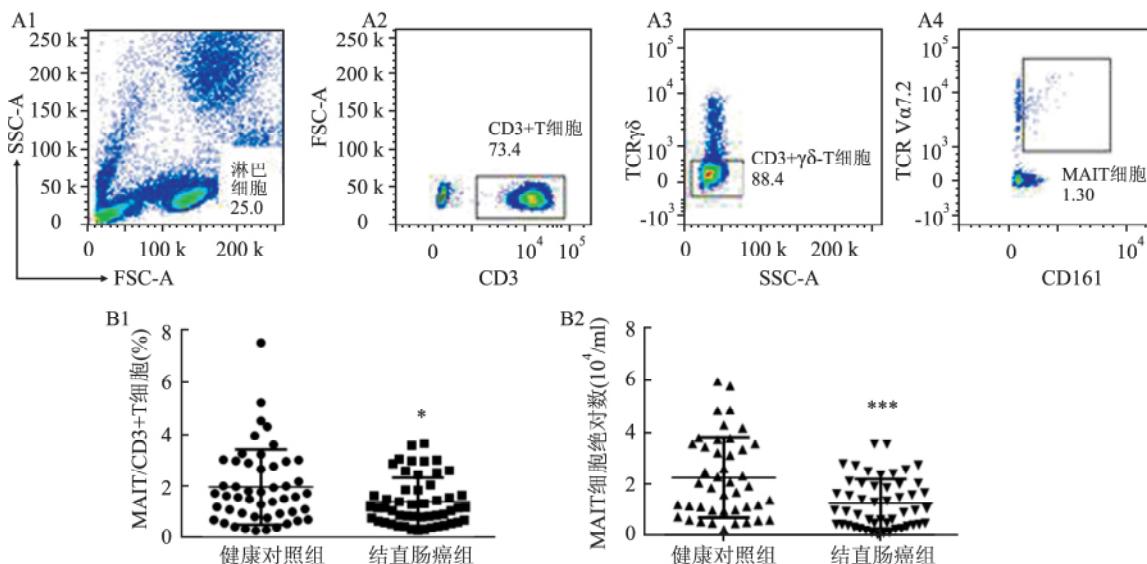


图 1 流式细胞术对人外周血 MAIT 细胞的检测及结直肠癌组与正常对照中 MAIT 细胞频率的变化情况

A: 显示 MAIT 细胞的圈门策略, 将外周血 MAIT 细胞定义为 CD3 + $\gamma\delta$ -CD161 + + V α 7.2 + T 细胞; B: 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的变化情况; 与健康对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

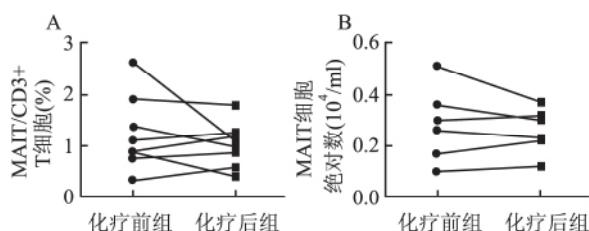


图 2 化疗前后外周血 MAIT 细胞的比例和绝对数的变化

A: MAIT/CD3 + T 的比例; B: 每 ml 全血 MAIT 细胞的绝对数($\times 10^4 / \text{ml}$)

2.3 结直肠癌患者 MAIT 细胞相关重要免疫表型的变化情况 MAIT 细胞表面存在多种表型,除常规的 CD4、CD8 等分子外,还有一些与肿瘤免疫密切相关的分子,如 PD-1、Tim-3、CTLA-4 等;另外,其活化性分子有 CD69 和 CD38。本文 我们选取其中部分表面分子进行含量测定($n = 16/16$)。结果发现与健康对照组相比,结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞表面的 PD-1 分子(图 3B 左, $t = 4.97 \pm 0.63 /$

$3.24 \pm 0.56, P = 0.049$) 和 CD69 分子(图 3B 中, $t = 27.83 \pm 2.40 / 14.07 \pm 1.88, P < 0.001$) 的测定是有差异的,但 Tim-3 分子(图 3B 右, $t = 4.10 \pm 0.52 / 4.38 \pm 0.78, P = 0.757$) 无变化;即结直肠癌患者外周血 PD-1 + MAIT、CD69 + MAIT 比例是升高的,但 Tim-3 + MAIT 细胞比例无变化。

2.4 经刺激激活后 MAIT 细胞功能的变化 将制备好的 PBMC 用完全培养基重悬,加入 24 孔培养板,每孔加入 PMA 0.5 μl 、离子霉素 1 μl 和莫能霉素 1 μl ;再对刺激后的细胞进行胞膜固定、破膜处理 加入相应抗体;最后上机检测。流式结果显示与健康对照组相比,结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞中 IFN- γ + MAIT 细胞的水平(图 4B 左, $t = 51.69 \pm 7.29 / 58.12 \pm 7.38, P = 0.545$) 和 TNF- α + MAIT 细胞的水平均无明显变化(图 4B 右, $t = 38.56 \pm 3.49 / 47.98 \pm 4.33, P = 0.121$)。说明结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的功能基本无改变。

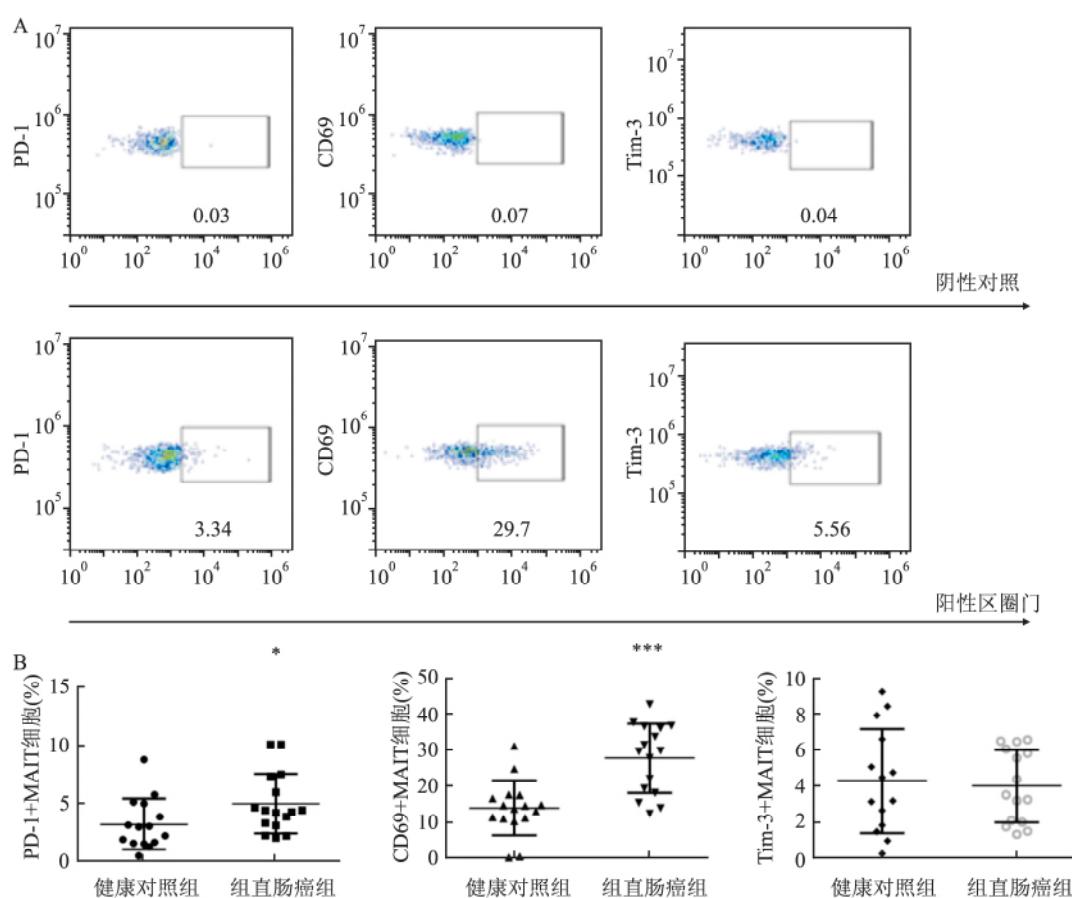


图 3 两组表面分子 PD-1、CD69 及 Tim-3 的测定

A: 阴性区的界线,与阳性区的圈门位置; B: 两组 PD-1 +、CD69 + 及 Tim-3 + MAIT 细胞的比例情况; 与健康对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

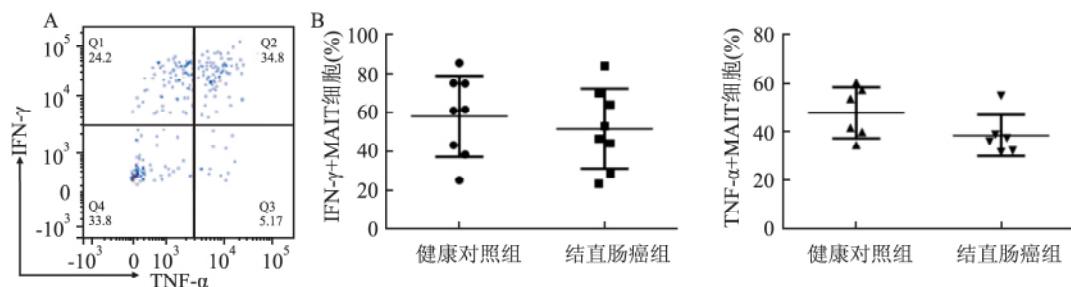


图4 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞功能的测定

A: 显示圈门策略 纵、横坐标阳性区分别表示 IFN- γ + 与 TNF- α + MAIT 细胞的比例; B: 分别显示两组 MAIT 细胞经刺激后胞内 IFN- γ 和 TNF- α 的表达水平

2.5 结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞的频率与其肿瘤分期之间的关系 对于所收集的结直肠癌患者临床肿瘤分期的数据 我们将其分组 并比较 II ~ III 期与 IV 期肿瘤患者外周血中 MAIT 细胞频率和绝对数的差异。然而并无阳性结果 (图 5 A: $t = 1.64 \pm 0.24 / 1.32 \pm 0.16, P = 0.261$; 图 5B: $t = 1.49 \pm 0.22 / 1.10 \pm 0.17, P = 0.173$)。肿瘤标志物在肿瘤的诊断及预后中也很有价值,根据其正常值范围均将患者分为两组,比较后发现差异也无统计学意义,见表 1。

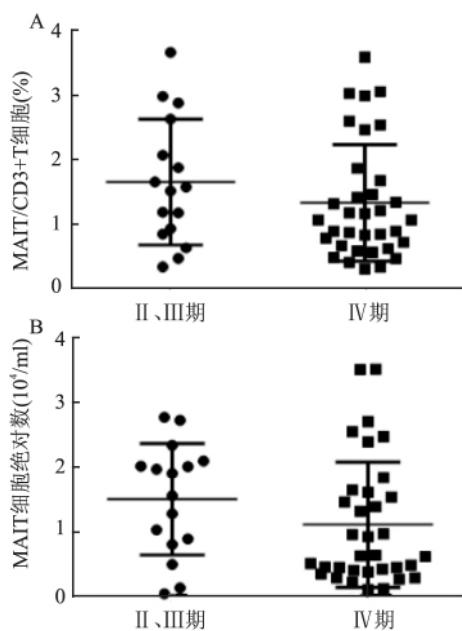


图5 外周血 MAIT 细胞频率与患者临床肿瘤分期之间的关系

3 讨论

MAIT 细胞又是一类重要的免疫细胞,在人外周血中占 1% ~ 10%^[4],在肿瘤免疫中也扮演着重要的角色。我们想了解 MAIT 细胞在肿瘤免疫、肿瘤发生发展及肿瘤治疗中的价值,故此我们初步探讨了其最基本的生物学特性,即所呈现的频率、表型

表1 临床肿瘤标志物的水平与 MAIT 细胞外周血频率之间的关系 ($\bar{x} \pm s$)

项目	数量(n)	MAIT 细胞频率 (%)	P 值
CEA (μg/L)			
≤5	18	1.63 ± 0.23	0.734
>5	13	1.75 ± 0.29	
CA19-9 (U/ml)			
≤37	23	1.65 ± 0.19	0.772
>37	8	1.77 ± 0.43	
CA72-4 (ng/ml)			
≤3.3	13	1.57 ± 0.25	0.620
>3.3	18	1.75 ± 0.25	

及功能有无变化。本研究显示:结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞频率与绝对数低于健康对照组,这与之前关于肿瘤患者外周血循环 MAIT 细胞频率降低的研究结果相一致^[9]。对于其重要表型的研究是本文一个新的研究思路,我们选取了 T 细胞活化性表面标志分子 CD69 及免疫表型 PD-1 分子和 Tim-3 分子进行定量检测,发现其中 PD-1 分子和 CD69 分子的表面含量与对照组比是有变化的。但 MAIT 细胞在功能研究上却无明显差异,这可能是由于 MAIT 细胞的刺激实验成功率较低,只有 6 ~ 8 例左右的数据,若增加样本量可能还会呈现其他不同的结果。其次,化疗前后,结直肠癌患者外周血 MAIT 细胞频率与绝对数无变化,这与我们前期的另一项实验胃癌中 MAIT 细胞的研究结论也较为一致,即化疗不改变外周血 MAIT 细胞的频率。最后,MAIT 细胞频率、绝对数与临床肿瘤分期也无关联,与肿瘤标志物 CEA、CA19-9 及 CA72-4 亦无关联。

本研究的不足之处是通过流式检测对于人外周血 MAIT 细胞进行测定的研究方法过于单一。但研究方向、思路及内容可为后续肿瘤免疫的研究提供一些帮助。另外,对于组织中 MAIT 细胞的研究、外周血 MAIT 细胞的纯化、MAIT 细胞与癌株的共培养实验,以及细胞因子在肿瘤免疫中的具体调节机制

的探索将会是一些很有价值的研究方向。

参考文献

- [1] Koay H F , Godfrey D I , Pellicci G. Development of mucosal-associated invariant T cells[J]. *Immunol Cell Biol* , 2018 , 96(6) : 598 – 606.
- [2] Wakao H , Sugimoto C , Kimura S , et al. Mucosal-associated invariant T cells in regenerative medicine [J]. *Front Immunol* , 2017 , 8: 1711.
- [3] Meermeier E W , Harriff M J , Karamoos E , et al. MAIT cells and microbial immunity [J]. *Immunol Cell Biol* , 2018 , 96(6) : 607 – 17.
- [4] Rudak P T , Choi J , Haeryfar S M M. MAIT cell-mediated cytotoxicity: roles in host defense and therapeutic potentials in infectious diseases and cancer [J]. *J Leukoc Biol* , 2018 , 104(3) : 473 – 86.
- [5] Shaler C R , Tun-abraham M E , Skaro A I , et al. Mucosa-associ-
- ated invariant T cells infiltrate hepatic metastases in patients with colorectal carcinoma but are rendered dysfunctional within and adjacent to tumor microenvironment[J]. *Cancer Immunol Immunother* , 2017 , 66(12) : 1563 – 75.
- [6] Ling L , Lin Y , Zheng W , et al. Circulating and tumor-infiltrating mucosal associated invariant T (MAIT) cells in colorectal cancer patients[J]. *Sci Rep* , 2016 , 6: 20358.
- [7] Reantragoon R , Boonpattanaporn N , Corbett A J , et al. Mucosal-associated invariant T cells in clinical diseases [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol* , 2016 , 34(1) : 3 – 10.
- [8] Lee O J , Cho Y N , Kee S J , et al. Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults [J]. *Exp Gerontol* , 2014 , 49: 47 – 54.
- [9] Won E J Ju J K , Cho Y N , et al. Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer [J]. *Oncotarget* , 2016 , 7(46) : 76274 – 90.

Changes in frequency , phenotype and function of MAIT cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer

Shao Chunyan¹ , Zhu Yun¹ , Zhong Fei^{1,2} , et al

(¹Dept of Oncology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022;

²Dept of Oncology , Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University , Fuyang 236000)

Abstract Objective To explore the changes of frequency , phenotype and function of peripheral blood mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in colorectal cancer patients compared with healthy controls. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from human peripheral blood , which were collected from the healthy donors and colorectal cancer patients , with density gradient centrifugation , and the cells were activated by PMA + ionomycin. The frequency , phenotype and intracellular cytokine production of MAIT cells were determined by flow cytometry. **Results** ① The frequency and absolute number of peripheral blood MAIT cells with colorectal cancer patients were lower than those in healthy controls ($P = 0.022$, $P < 0.001$) . ② In the same patient , the frequency and absolute number of peripheral blood MAIT cells before and after chemotherapy were no difference ($P = 0.507$, $P = 0.743$) . ③ Compared with healthy controls , the levels of PD-1 and CD69 molecules on peripheral blood MAIT cells surface in colorectal cancer patients were both different ($P = 0.049$, $P < 0.001$) , while Tim-3 molecule level was not different ($P = 0.757$) . ④ There was no difference in the function of MAIT cells in patients with colorectal cancer compared with healthy controls ($P = 0.545$, $P = 0.121$) . ⑤ The frequency and absolute number of MAIT cells were not significantly correlated with clinical tumor stage ($P = 0.261$, $P = 0.173$) . **Conclusion** Compared with healthy controls , the frequency and absolute number of MAIT cells from peripheral blood of colorectal cancer patients decrease , the phenotype change , but the function is no difference. Chemotherapy has no effect on the frequency of MAIT cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients. The frequency of MAIT cells is not correlated with clinical tumor stage as well .

Key words mucosal-associated invariant T cell; colorectal cancer; peripheral blood T lymphocytes; flow cytometry; immune surveillance