

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.19.002
文章编号: 1005-8982 (2023) 19-0007-09

胃癌专题·论著

胃癌间充质干细胞促进胃癌细胞 PD-L1表达的特征观察*

魏凌¹, 孙丽², 王倩倩¹, 朱伟¹

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学附属昆山医院 检验科,
江苏 昆山 215300)

摘要: 目的 探讨胃癌来源的间充质干细胞(GCMSC)促进胃癌细胞程序性死亡配体1(PD-L1)表达的具体特征, 为进一步研究GCMSC促进肿瘤细胞PD-L1表达机制及胃癌的靶向治疗提供依据。**方法** 采用细胞贴壁法从胃癌组织中分离出GCMSC, 流式细胞仪分析GCMSC表面标志物, 采用成脂和成骨分化实验评价GCMSC的多向分化能力。流式细胞术分选PD-L1阴性和PD-L1阳性胃癌细胞。收集GCMSC条件培养基(GCMSC-CM)处理胃癌细胞, 分别采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting检测胃癌细胞PD-L1的mRNA和蛋白表达。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测胃癌患者血清游离PD-L1和白细胞介素-8(IL-8)水平。**结果** 成功分离鉴定GCMSC, 结果发现GCMSC-CM处理24、48和72 h后, SGC-7901细胞的PD-L1表达均上调($P < 0.05$), GCMSC-CM处理MGC-803细胞24、48和72 h后, MGC-803细胞PD-L1表达也上调($P < 0.05$)。然而, 去除GCMSC-CM后48 h, SGC-7901和MGC-803的PD-L1表达又逐渐恢复。当IL-6或IL-8在GCMSC-CM中被阻断时, 与GCMSC-CM组比较, 这种促进作用被逆转, 尤其是IL-8的作用更明显($P < 0.05$)。胃癌患者血清游离PD-L1与IL-8呈正相关($r = 0.347, P < 0.05$)。流式细胞术结果显示, 经GCMSC-CM再次处理后, PD-L1阳性胃癌细胞PD-L1表达能够再次升高($P < 0.05$), 而PD-L1阴性的胃癌细胞PD-L1的表达仍然不升高($P > 0.05$)。**结论** GCMSC-CM促进胃癌细胞中PD-L1表达, 并依赖GCMSC-CM的持续作用。胃癌细胞具有异质性, 其PD-L1表达对GCMSC具有不同的反应性。

关键词: 胃癌; 间充质干细胞; 程序性死亡配体1; 白细胞介素-8; 异质性

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Characterization of gastric cancer mesenchymal stem cells promoting PD-L1 expression in gastric cancer cells*

Wei Ling¹, Sun Li², Wang Qian-qian¹, Zhu Wei¹

(1. The School of Medicine, Jiangsu University, Jiangsu, Zhenjiang 212013, China; 2. The Department of Clinical Laboratory, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan, Jiangsu 215300, China)

Abstract: Objective To investigate the specific characteristics of gastric cancer-derived mesenchymal stem cells (GCMSCs) in promoting programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in gastric cancer cells. This study aims to provide a basis for further research into the mechanism by which GCMSCs promote tumor cell PD-L1 expression and targeted therapy for gastric cancer. **Methods** GCMSCs were isolated from gastric cancer tissues using an adherent culture method. Flow cytometry was used to analyze the surface markers of GCMSCs, and

收稿日期: 2023-05-29

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81972313, No: 82203547); 江苏省青年科学基金(No: BK20210136)

[通信作者] 朱伟, E-mail: zhuwei@ujs.edu.cn

[作者简介] 魏凌, 现工作单位为南京中医药大学附属镇江市中医院

adipogenic and osteogenic differentiation experiments were conducted to evaluate the multi-directional differentiation ability of GCMSCs. Flow cytometry was used to sort PD-L1-negative and PD-L1-positive gastric cancer cells. Conditioned medium from GCMSCs (GCMSC-CM) was collected and used to treat gastric cancer cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of PD-L1 in gastric cancer cells. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of free PD-L1 and interleukin-8 (IL-8) in the serum of gastric cancer patients. **Results** GCMSCs were successfully isolated and identified. The results showed that PD-L1 expression in SGC-7901 cells was upregulated after treatment with GCMSC-CM for 24, 48, and 72 hours ($P < 0.05$). PD-L1 expression in MGC-803 cells also increased after treatment with GCMSC-CM for 24, 48, and 72 hours ($P < 0.05$). However, PD-L1 levels gradually returned to baseline after 48 hours of GCMSC-CM removal in SGC-7901 ($P < 0.05$) and MGC-803 ($P > 0.05$) cells. When IL-6 or IL-8 was blocked in GCMSC-CM, the promoting effect was reversed compared to the GCMSC-CM group, especially with IL-8 inhibition ($P < 0.05$). Serum levels of free PD-L1 and IL-8 in gastric cancer patients were positively correlated ($r = 0.347$, $P < 0.05$). Flow cytometry results showed that PD-L1 expression in PD-L1-positive gastric cancer cells could be upregulated again after re-treatment with GCMSC-CM ($P < 0.05$), while PD-L1 expression in PD-L1-negative gastric cancer cells remained unchanged ($P > 0.05$). **Conclusion** GCMSC-CM promotes PD-L1 expression in gastric cancer cells, depending on sustained exposure to GCMSC-CM. Gastric cancer cells exhibit heterogeneity in their response to GCMSCs regarding PD-L1 expression.

Keywords: gastric cancer; mesenchymal stem cells; PD-L1; IL-8; heterogeneity

近年来,程序性死亡受体 1(programmed death-1, PD-1)/程序性死亡配体 1(programmed death-ligand 1, PD-L1)是导致肿瘤免疫逃逸的重要免疫检查点之一。PD-L1 在多种肿瘤中表达,通过与活化 T 细胞上的 PD-1 结合导致 T 细胞功能受损,从而抑制 T 细胞的激活,还能与其他免疫抑制信号协同作用,促进免疫抑制微环境的形成^[1]。有研究表明,阻断多发性骨髓瘤细胞 PD-L1 的表达后, T 细胞对骨髓瘤细胞的细胞毒性明显增强^[2]。在非小细胞肺癌中, PD-L1 可通过作用于巨噬细胞,诱导 CD4⁺T 细胞向 Treg 细胞分化,促进肿瘤进展^[3]。间充质干细胞作为肿瘤微环境中重要的基质细胞之一,具有自我更新及多向分化的潜能^[4]。近年来研究发现,间充质干细胞通过细胞间相互作用和旁分泌功能在固有免疫和适应性免疫中发挥重要的免疫调节作用^[5]。研究表明,胃癌来源的间充质干细胞(gastric cancer mesenchymal stem cell, GCMSC)通过分泌白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8),上调胃癌细胞 PD-L1 的表达,促进肿瘤免疫逃逸和耐药^[6-7]。然而, GCMSC 促进胃癌细胞 PD-L1 表达的具体特征不明确。本研究观察 GCMSC 对胃癌细胞 PD-L1 表达的促进作用,并探究胃癌细胞 PD-L1 表达对 GCMSC 的反应性和异质性,为进一步研究 GCMSC 调控肿瘤细胞 PD-L1 的表达机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

1.1.1 GCMSC 分离与胃癌细胞株的培养 GCMSC 的分离获得江苏大学伦理委员会的批准。将江苏大学附属昆山医院收治的胃癌患者手术取得的新鲜胃癌组织置于 75% 乙醇中 30 s,冲洗表面的血液等杂质后转移至含有 10 000 u/mL 链霉素和青霉素的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中 15 min 备用。在超净台中将胃癌组织用无菌手术剪和镊子分成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块,均匀铺于 60 mm 细胞培养皿中,在 37 °C、5% 二氧化碳细胞培养箱中培养 15 min 后加入 1 mL 含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的无菌 α -MEM 营养液,继续培养 10 d 左右,每隔 3 天更换新鲜培养基。显微镜下观察胃癌组织附近细长梭形呈漩涡状分布的细胞即为 GCMSC,待 GCMSC 密度扩增至 70% ~ 80% 时,将 GCMSC 用 0.25% 胰蛋白酶消化离心后继续扩增 6 ~ 10 代,选择状态较好的细胞用于实验。原代胃癌细胞来源于患者的胃癌组织,将患者的新鲜胃癌组织绞碎,在 3 mg/mL IV 型胶原酶(北京索莱宝科技有限公司, cas: 9001-12-1)中分离,并在 37 °C 下稀释,然后将组织悬液置于培养皿中,在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养。胃癌细胞株 SGC-7901 和 MGC-803[美国模式培养物集存库

(American type culture collection, ATCC)]用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基于 37 °C、5% 二氧化碳饱和湿度培养箱中培养。采用 2.5 g/L 胰酶消化细胞, 每 3~5 d 传代。

1.1.2 制备 GCMSC 条件培养基(GCMSC condition medium, GCMSC-CM) GCMSC 在 100 mm 细胞培养皿中培养, 当细胞融合度达 70% 左右时更换新鲜培养基。48 h 后收集细胞培养上清液, 3 300 r/min 离心 5 min, 采用 33 mm、0.22 μm 一次性针头式滤器过滤上清液, 置入 -80 °C 冰箱冷冻保存备用。

1.2 方法

1.2.1 GCMSC 成脂成骨诱导 将 0.1 mL Supplement Mix I 和 Supplement Mix II 加入 100 mL 基础分化培养基中配制成完全分化培养基。取 3~6 代 GCMSC 接种于 6 孔细胞培养板, 用含有 10% FBS 的 α-MEM 置于 37 °C、5% 二氧化碳的饱和湿度培养箱中培养。24 h 后观察细胞, 待细胞融合度达到 80% 左右时更换 2 mL BI MSCgo™ 间充质干细胞成脂或成骨诱导分化培养基(南京福麦斯生物技术有限公司)继续培养 12 d, 每 3 d 换液。油红 O 及茜素红染色步骤参照 Viva Cell Biosciences 试剂盒(上海龙田生物技术有限公司)说明书。根据试剂盒说明书步骤对诱导完成的细胞进行染色, 观察细胞内脂滴及矿化结节形成大小和数量。

1.2.2 流式细胞仪检测表面标记及细胞分选 PD-L1 阴性和 PD-L1 阳性胃癌细胞 取待测胃癌细胞株 SGC-7901 按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中培养 48 h。0.25% 胰酶消化细胞, 3 300 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 3 次, 弃上清液, 收集细胞团块保存于 1.5 mL EP 管中, 400 μL PBS 重悬, 分别加入 3 μL 相应流式抗体。4 °C 避光孵育 30 min, 3 300 r/min 离心 5 min 后 200 μL PBS 重悬。流式细胞仪检测表面标记表达, FlowJo 7.6 软件分析检测结果。采用流式细胞仪分选 PD-L1 阴性和 PD-L1 阳性胃癌细胞。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测 PD-L1 mRNA 表达 在 GCMSC-CM 中加入 IL-8 和 IL-6 的中和抗体, 浓度为 5 μg/mL, 室温孵育 1 h 后作用于胃癌细胞株 SGC-7901 和 MGC-803, 24 h 后收集细胞。将细胞分为 4 组: 以 GCMSC-CM 未处理组

为 Control 组、GCMSC-CM 处理组、GCMSC-CM+anti-IL-8 组及 GCMSC-CM+anti-IL-6 组。向各组收集好的细胞中加入 1 mL TRIzol 裂解液, 室温静置 10 min 后用移液枪吹打细胞转移至 1.5 mL EP 管。加入 200 μL 氯仿, 手动震荡 30 s, 4 °C 静置 15 min 直至分层。吸取 300 μL 上清液, 加入 300 μL 异丙醇, 4 °C 下静置 2 h。4 °C、11 441 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加入 DEPC 水配制的 75% 乙醇, 4 °C、9 342 r/min 离心 10 min。弃上清液, 自然晾干至沉淀呈半透明状, 加入 20 μL DEPC 水溶解沉淀, 分光光度计检测 RNA 纯度及浓度, 置入 -80 °C 冰箱冷冻保存备用。qRT-PCR 检测 mRNA, 严格按照试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司, CW2602M)说明书操作。将提取的 RNA、Primer Mix、dNTP Mix、DTT、RT Buffer、HiFiScript 及无 RNA 酶水置于冰上解冻备用, 按比例配制 20 μL 反应体系: dNTP Mix 4 μL, Primer Mix 2 μL, 5 × RT Buffer 4 μL, DTT 2 μL, Total RNA 1 μg, HiFiScript 1 μL, RNase free ddH₂O 补足至 20 μL。采用定量分析仪(ABI Quanstudio 3)进行逆转录, 42 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 min, 进行 qRT-PCR, 得出 CT 值后采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。PD-L1: 正向引物 5'-TCACTTGTAATTCTGGGAGC-3', 反向引物 5'-CTTTGAGTTTGTATCTTGATGCC-3', 引物长度 124 bp。内参基因 GAPDH: 正向引物 5'-GGAGCGAGATCCCCTCCAAAAT-3', 反向引物 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3', 引物长度 197 bp。

1.2.4 Western blotting 检测 PD-L1 蛋白表达 在 GCMSC-CM 中加入 IL-8 中和抗体及 IgG, 浓度为 5.0 μg/mL, 室温孵育 1 h 后作用于胃癌细胞株 SGC-7901, 24 h 后收集细胞。Rapamycin 预处理胃癌细胞株 SGC-7901, 浓度为 0.1 μmol/L, DMSO 量与 Rapamycin 一致, 1 h 后撤除并加入 GCMSC-CM 继续培养 24 h 后收集细胞。将细胞分为 6 组: 以 GCMSC-CM 未处理组为 Control 组、GCMSC-CM 处理组、GCMSC-CM+IgG 组、GCMSC-CM+anti-IL-8 组、GCMSC-CM+Reparixin 组及 GCMSC-CM+DMSO 组。采用 PIPA 裂解液提取收集好的细胞全蛋白, BCA 蛋白测定试剂盒(CWBIO)定量检测 PD-L1 蛋白表达。以 150 μg 为蛋白上样量, 向电泳槽中加入 1 L

电泳液，60 V 电泳 2 h 后配制转膜液预冷，将蛋白分离胶转印至甲醇活化后的聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上 (350 mA, 2 h, 4 ℃)，50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2~3 h，倒去封闭液，加入稀释后的一抗，4 ℃ 孵育过夜。次日将 PVDF 膜置于 TBST 缓冲液中，于室温轻轻摇动洗膜 30 min，每 10 min 更换 TBST 缓冲液。倒去 TBST，加入相应二抗，37 ℃ 孵育 1 h，TBST 清洗 30 min。滴加 HRP 发光底物用全自动凝胶成像仪进行 PVDF 膜成像。内参蛋白是 GAPDH (南京福麦斯生物技术有限公司)。

1.2.5 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA) 检测血清游离 PD-L1 和 IL-8 水平 收集胃癌患者手术前血清样本，分装后 -80 ℃ 冷冻保存，采用 ELISA 检测血清游离 PD-L1 (sPD-L1) 和 IL-8 的水平，具体步骤参照 ELISA 试剂盒 (南京福麦斯生物技术有限公司) 说明书。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析的 Newman-Keuls 检验, 两两比较用非配对 *t* 检验; 相关性分析用 Pearson 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GCMSC 鉴定结果

体外成脂成骨诱导实验显示，GCMSC 可诱导分化为骨细胞和脂肪细胞 (见图 1A)。免疫表型分析显示，GCMSC 中 CD45、CD34、CD19 呈低表达，CD105、CD90 和 CD29 呈高表达 (见图 1B)。

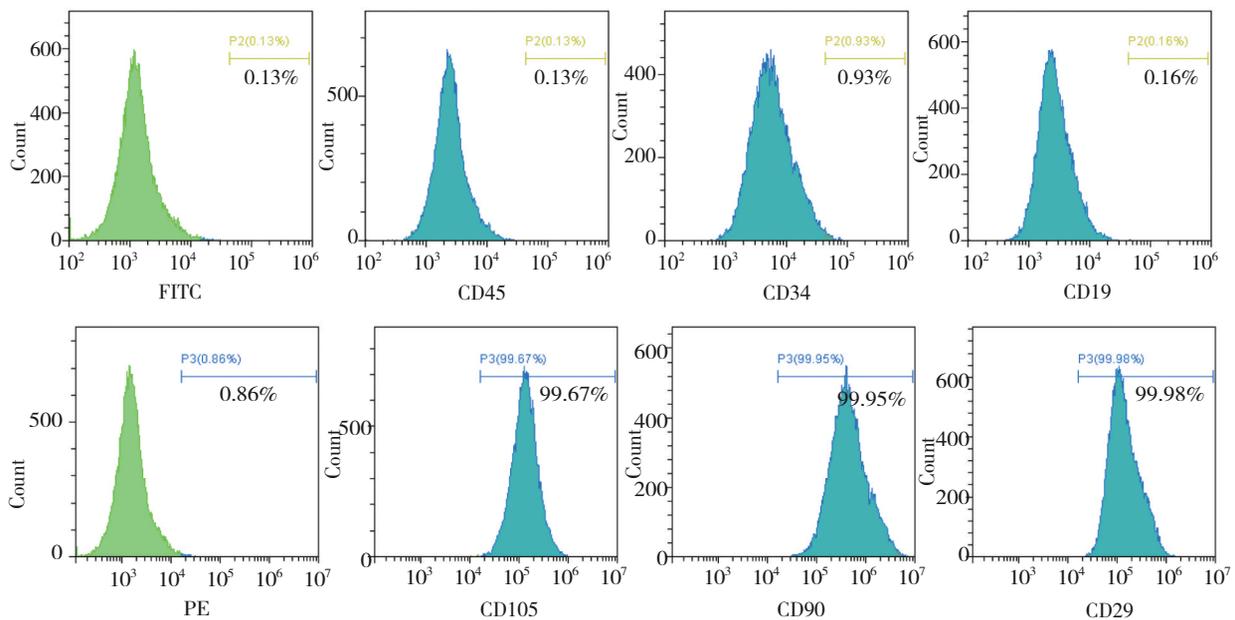
2.2 GCMSC-CM 促进胃癌细胞株 PD-L1 表达的持续性

GCMSC-CM 处理 SGC-7901 细胞 24、48 和 72 h



对照 成脂实验 成骨实验

A 尼康生物显微镜 (×100, 标尺 50 μm)。



B FITC 标记显示 GCMSC 低表达 CD45、CD34、CD19; PE 标记显示 GCMSC 高表达 CD105、CD90、CD29。

图 1 GCMSC 鉴定

后, PD-L1 mRNA 相对表达量分别为(5.07 ± 0.45)、(5.09 ± 0.53)、(4.93 ± 0.20), 去除 GCMSC-CM 24、48 h 后, PD-L1 mRNA 相对表达量分别为(2.26 ± 0.18)、(1.84 ± 0.14), 未处理为(1.01 ± 0.16)。6 个不同时间的 PD-L1 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=69.670, P=0.000$)。GCMSC-CM 处理 SGC-7901 细胞 24、48、72 h 后, SGC-7901 细胞的 PD-L1 mRNA 相对表达量较未处理时均上调; 去除 GCMSC-CM 后 48 h, SGC-7901 细胞的 PD-L1 mRNA 相对表达量逐渐恢复(见图 2A)。

GCMSC-CM 处理 MGC-803 细胞 24、48 和 72 h 后, PD-L1 mRNA 相对表达量分别为(3.22 ± 0.05)、(2.39 ± 0.27)、(2.20 ± 0.01), 去除 GCMSC-CM 24、48 h 后, PD-L1 mRNA 相对表达量分别为(1.88 ± 0.56)、(0.60 ± 0.10), 未处理为(1.08 ± 0.42)。6 个不同时间的 PD-L1 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=13.310, P=0.000$)。GCMSC-CM 处理 MGC-803 细胞 24、48 和 72 h 后, MGC-803 细胞的 PD-L1 mRNA 相对表达量较未处理时均上调; 去除 GCMSC-CM 48 h 后, MGC-803 细胞的 PD-L1 mRNA 相对表达量逐渐恢复(见图 2B)。

Western blotting 结果也显示, GCMSC-CM 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后 PD-L1 蛋白表达增加, PD-L1 蛋白相对表达量为(1.07 ± 0.12), 去除 GCMSC-CM 后 72 h 内 PD-L1 的表达逐渐恢复, 去除 GCMSC-CM 24、48、72 h 后, PD-L1 蛋白相对表达量分别为(0.9 ± 0.05)、(0.72 ± 0.03)、(0.52 ± 0.11), 未处理为(0.78 ± 0.06)(见图 2C)。

2.3 GCMSC 通过分泌 IL-6 和 IL-8 上调胃癌细胞株中 PD-L1 的表达

IL-8 或 IL-6 中和抗体作用 GCMSC-CM 后处理 SGC-7901 和 MGC-803 细胞 24 h, 采用 qRT-PCR 检测 PD-L1 mRNA 表达。结果表明, GCMSC-CM 处理后, SGC-7901 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量为(3.87 ± 0.29), 使用 IL-8 或 IL-6 中和抗体作用 GCMSC-CM 处理组分别为(2.42 ± 0.33)、(3.09 ± 0.26), 未处理为(1.01 ± 0.12)。不同处理组 SGC-7901 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量比较, 差异有统

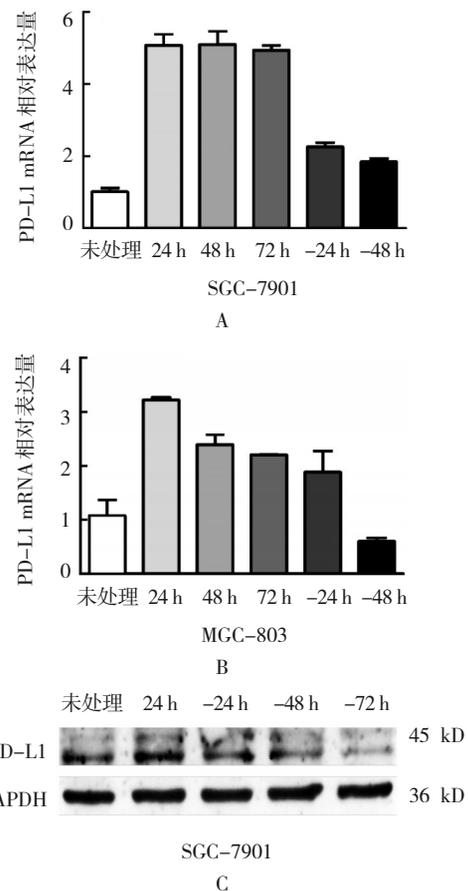


图 2 不同时间胃癌细胞株 PD-L1 mRNA 和蛋白表达的比较
A: 不同时间 SGC-7901 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量比较; B: 不同时间 MGC-803 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量比较; C: SGC-7901 细胞 PD-L1 蛋白的表达。

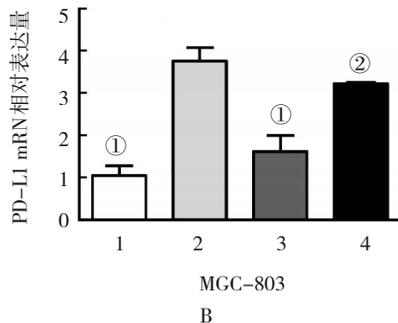
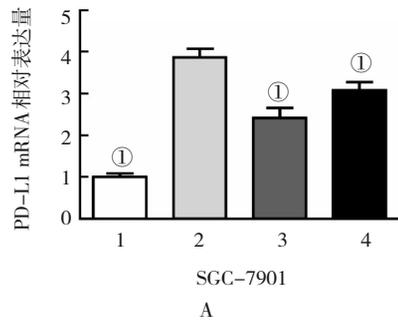
图 2 不同时间胃癌细胞株 PD-L1 mRNA 和蛋白表达的比较

计学意义($F=42.300, P=0.000$)(见图 3A)。

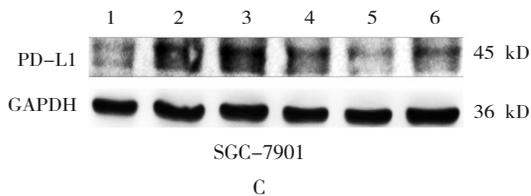
MGC-803 细胞在接受 GCMSC-CM 后处理后, PD-L1 mRNA 相对表达量为(3.76 ± 0.32), 使用 IL-8 或 IL-6 中和抗体作用 GCMSC-CM 处理组分别为(1.62 ± 0.53)、(3.22 ± 0.05), 未处理为(1.05 ± 0.33)。不同处理组 MGC-803 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=17.410, P=0.000$)(见图 3B)。

Western blotting 结果也显示, 当加入 Reparixin 时, GCMSC-CM 对 GC 细胞 PD-L1 的促进作用显著降低。GCMSC-CM 未处理组 PD-L1 蛋白相对表达量为(0.52 ± 0.06), GCMSC-CM 处理后, SGC-7901 细胞 PD-L1 蛋白相对表达量为(0.94 ± 0.08), GCMSC-CM+IgG 组和使用 IL-8 中和抗体作用 GCMSC-CM 处

理组分别为 (0.87 ± 0.07) 和 (0.70 ± 0.11) , GCMSC-CM+Reparixin 组和 GCMSC-CM+DMSO 组 PD-L1 蛋白相对表达量分别为 (0.4 ± 0.05) 和 (0.7 ± 0.09) (见图 3C)。



1: Control 组; 2: GCMSC-CM 处理组; 3: GCMSC-CM+anti-IL-8 组; 4: GCMSC-CM+anti-IL-6 组。①与 GCMSC-CM 处理组比较, $P < 0.05$; ②与 GCMSC-CM 处理组比较, $P > 0.05$ 。



1: Control 组; 2: GCMSC-CM 处理组; 3: GCMSC-CM+IgG 组; 4: GCMSC-CM+anti-IL-8 组; 5: GCMSC-CM+Reparixin 组; 6: GCMSC-CM+DMSO 组。A: 不同时间 SGC-7901 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量比较; B: 不同时间 MGC-803 细胞 PD-L1 mRNA 相对表达量比较; C: SGC-7901 细胞 PD-L1 蛋白的表达。

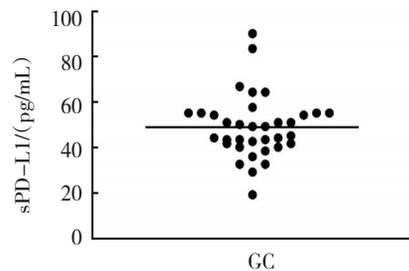
图 3 GCMSC-CM 促进胃癌细胞 PD-L1 表达

2.4 GC 患者 sPD-L1 与 IL-8 的相关性

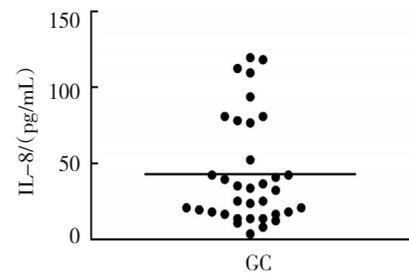
35 例 GC 患者血清 sPD-L1 水平为 (38.78 ± 1.96) , IL-8 水平为 (32.76 ± 9.71) (见图 4)。GC 患者血清 IL-8 与 sPD-L1 水平呈正相关 ($r = 0.347, P = 0.041$)。见图 5。

2.5 GCMSC-CM 促进 PD-L1 表达存在 GC 异质性

GCMSC-CM 处理 SGC-7901 24 h 后, 流式细胞术分离 PD-L1 阴性和 PD-L1 阳性细胞, 再次用 GCMSC-CM 处理分选细胞, 检测 PD-L1 的表达。流式细胞术结果显示, 再次用 GCMSC-CM 处理后, PD-L1 阳性细胞组 PD-L1 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而 PD-L1 阴性细胞组 PD-L1 表达并未升高 ($P > 0.05$) (见图 6A)。GCMSC-CM 处理 GC 组织中分离出的原代 GC 细胞, 结果显示, 原代 GC 细胞 PD-L1 水平也升高。将 GCMSC-CM 组的 PD-L1 阳性和 PD-L1 阴性细胞进行分选 (见图 6B), 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养 24 h, 结果显示, 撤除 GCMSC-CM 后, PD-L1 阳性的原代 GC 细胞中 PD-L1 的表达降低 (见图 6C)。



A: GC 患者血清 sPD-L1 水平



B: GC 患者血清 IL-8 水平

图 4 GC 患者血清 IL-8 和 sPD-L1 的水平

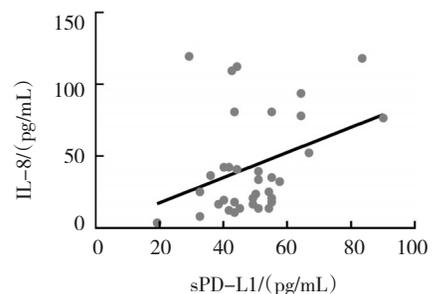
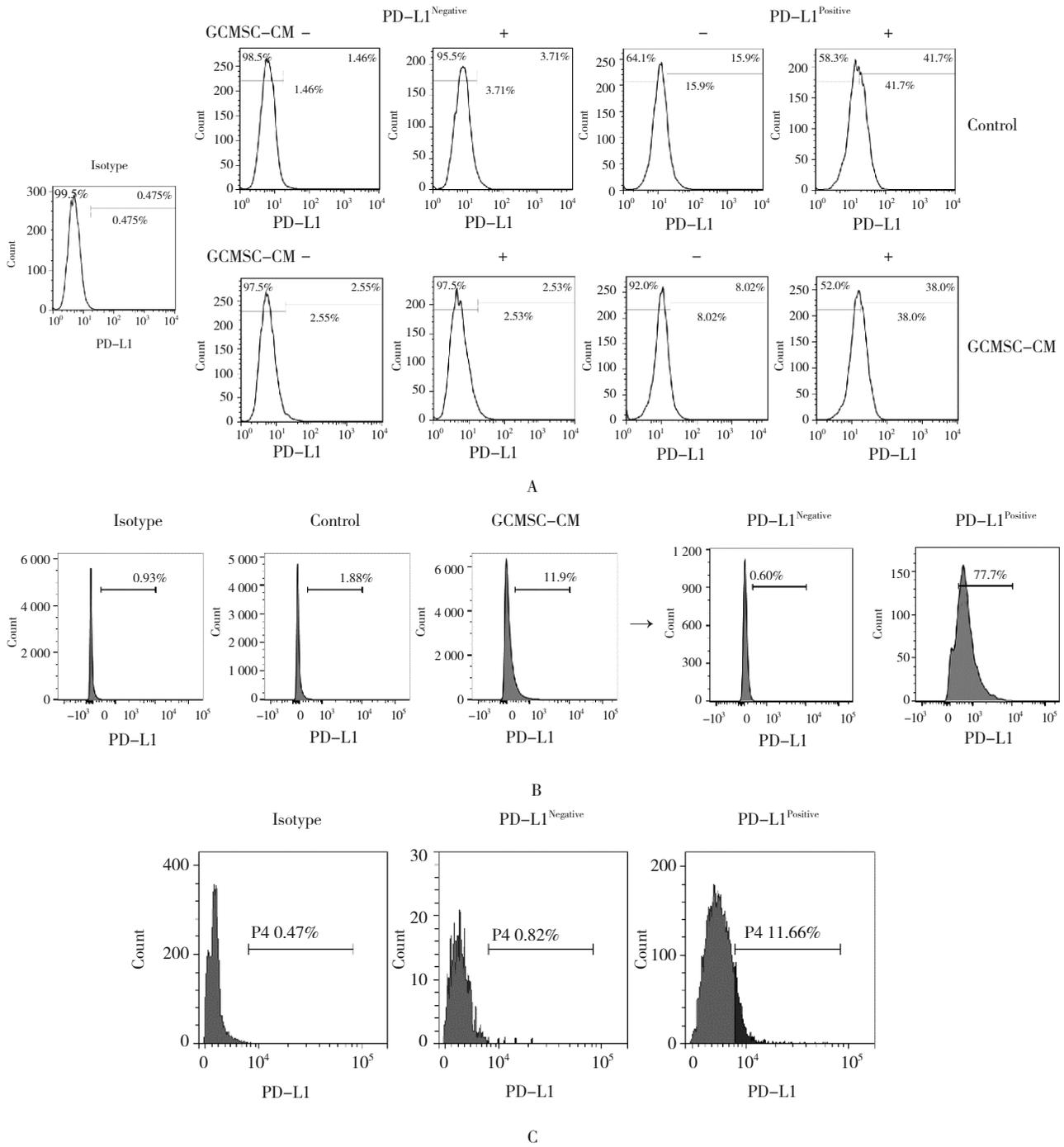


图 5 GC 患者 IL-8 和 sPD-L1 的相关性



A: SGC-7901 用 GCMSC-CM 处理 24 h, 通过流式细胞术对 PD-L1 阴性或 PD-L1 阳性细胞进行分选。用 GCMSC-CM 对细胞进行第 2 次处理, 并检测 PD-L1 水平; B: 用 GCMSC-CM 处理原代 GC 细胞 24 h, 并通过流式细胞术检测 PD-L1 水平。然后分选 GCMSC-CM 组中的 PD-L1 阴性和 PD-L1 阳性细胞; C: 将 B 中分选的原代 GC 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 再培养 24 h, 并通过流式细胞术检测 PD-L1 水平。

图 6 GC 细胞中 PD-L1 表达存在对 GCMSC-CM 反应异质性

3 讨论

肿瘤微环境中, 免疫细胞和细胞因子在调控肿瘤生长及转移中发挥了重要作用。PD-L1 作为一个免疫抑制分子能够被肿瘤细胞等多种细胞调控。近年来, 免疫检查点抑制剂 (ICIs) 疗法, 尤其是抗

PD-1/PD-L1 疗法, 已成为除化疗和放疗外应用最普遍的胃癌治疗手段之一。但 PD-L1 在肿瘤微环境中具体受到哪些细胞影响尚未阐明^[8-15]。

间充质干细胞是一群多能干细胞, 拥有自我更新及多向分化的能力, 具有免疫调节功能, 最初是

骨髓中分离获得,目前已经可以从多种组织中获取,如脐带、皮肤、肌肉、骨髓和脂肪组织等^[16-18]。早期实验研究证明骨髓间充质干细胞通过旁分泌可溶性细胞因子或 Exosomes 促进肿瘤体内生长及血管形成^[19-20]。骨髓间充质干细胞对肿瘤具有趋向性,在多种趋化因子的作用下到达肿瘤微环境并被驯化为肿瘤相关间充质干细胞^[21]。多发性骨髓瘤患者来源的骨髓间充质干细胞可通过 PD-1/PD-L1 轴诱导 CD8⁺T 细胞死亡,抑制 CD8⁺T 细胞穿孔素和颗粒酶 B 的释放并促进骨髓瘤细胞免疫逃逸^[22]。本团队在临床胃癌组织中分离培养出较骨髓间充质干细胞具有更强促瘤潜能的 GCMSC^[23]。实验结果表明,胃癌微环境中 T 细胞、GCMSC 及肿瘤细胞相互作用共同调节 PD-L1 表达,进一步促进胃癌细胞抵抗 CTL 的细胞毒性作用并发生免疫逃逸^[24-26]。

本研究从胃癌患者组织中分离培养出 GCMSC 并收集 GCMSC 上清液。胃癌细胞与 GCMSC-CM 共培养 24、48 和 72 h 后,PD-L1 表达均明显升高,然而当撤除 GCMSC-CM 后,胃癌细胞的 PD-L1 表达均无法保持在一个较高水平,表明胃癌细胞 PD-L1 表达的升高依赖于 GCMSC-CM 的持续作用。为了进一步验证 GCMSC 对胃癌细胞 PD-L1 的作用,本研究使用 IL-6 和 IL-8 的中和抗体抑制了胃癌细胞中 IL-6 和 IL-8 的表达,当使用 IL-6 或 IL-8 中和抗体阻断 GCMSC-CM IL-6 或 IL-8 与其受体结合时,GCMSC-CM 促进 PD-L1 表达作用被逆转,尤其是阻断 IL-8 后效果更明显,表明 IL-8 通过与 CXCR1/2 相互作用激活偶联 G 蛋白,进而激活信号分子调控基因表达。Reparixin 是 CXCR1/2 激活的非竞争性变构抑制剂。Western blotting 检测结果也显示,当加入 Reparixin 时,GCMSC-CM 对 GC 细胞 PD-L1 的促进作用明显减弱。同时,ELISA 结果显示胃癌患者血清 IL-8 和 PD-L1 的表达呈正相关,进一步证明 GCMSC 通过 IL-6 和 IL-8 促进 PD-L1 的表达。为进一步探讨 GCMSC 上调胃癌细胞 PD-L1 表达是否存在异质性,本研究用流式细胞术将 GCMSC-CM 处理后的胃癌细胞分为 PD-L1 阴性和 PD-L1 阳性细胞群,结果显示,PD-L1 阳性细胞群被 GCMSC-CM 再次作用后,PD-L1 水平持续升高而 PD-L1 阴性细胞群没有明显变化。这些结果表明 GCMSC 对胃癌细胞 PD-L1 的上调作用的异质性,不同细胞对 GCMSC-CM 处理的

反应不同,其具体机制还需进一步探索。WEI 等^[27]分析 9 769 例肿瘤患者的临床资料,其中包含 32 种不同类型的肿瘤,发现不同免疫微环境下 PD-L1 阳性肿瘤细胞存在异质性。巨噬细胞通过激活 NF- κ B 信号上调肿瘤细胞 PD-L1 表达,进而促进肿瘤细胞恶性增殖、血管形成及肿瘤转移,并抵抗传统化疗药物、CTL 的细胞毒性作用及抗 PD-1/PD-L1 抗体治疗;而活化的 T 细胞激活 STAT1 信号形成的 PD-L1 阳性肿瘤细胞则敏感且易发生凋亡。此现象揭示了肿瘤内部微环境的复杂性,深入了解肿瘤微环境,阐明肿瘤细胞 PD-L1 表达的调控机制对提高免疫治疗效率非常关键。

综上所述,GCMSC-CM 通过 IL-6 和 IL-8 上调胃癌细胞中 PD-L1 的表达并且这种上调作用依赖于 GCMSC-CM 的持续作用。此外,GCMSC-CM 对胃癌细胞的作用取决于胃癌细胞本身 PD-L1 的表达。本研究仅阐述了 GCMSC-CM 影响胃癌细胞 PD-L1 的异质性,后续将深入探索其具体机制,为 GCMSC 治疗胃癌提供新的思路。

参 考 文 献 :

- [1] YU X F, LI W, LIU H D, et al. PD-L1 translocation to the plasma membrane enables tumor immune evasion through Mib2 ubiquitination[J]. J Clin Invest, 2023, 133(3): e160456.
- [2] MEZZADRA R, SUN C, JAE L T, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators[J]. Nature, 2017, 549(7670): 106-110.
- [3] ROMERO Y, WISE R, ZOLKIEWSKA A. Proteolytic processing of PD-L1 by ADAM proteases in breast cancer cells[J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(1): 43-55.
- [4] LI C H, ZHAO H, WANG B. Mesenchymal stem/stromal cells: developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics[J]. Transl Oncol, 2021, 14(1): 100948.
- [5] PRIYADARSHANI P, MORTENSEN L J. Investigating lipid mechanisms of MSC immune modulation using metabolic and phenotypic single cell profiling[J]. Cytotherapy, 2020, 22(5S): S97.
- [6] SUN L, WANG Q Q, CHEN B, et al. Human gastric cancer mesenchymal stem cell-derived IL15 contributes to tumor cell epithelial-mesenchymal transition via upregulation Tregs ratio and PD-1 expression in CD4⁺ T cell[J]. Stem Cells Dev, 2018, 27(17): 1203-1214.
- [7] WANG Q Q, HUANG C, WANG D Q, et al. Gastric cancer derived mesenchymal stem cells promoted DNA repair and cisplatin resistance through up-regulating PD-L1/Rad51 in gastric cancer[J]. Cell Signal, 2023, 106: 110639.

- [8] SONG N, BAI M, CHE X F, et al. PD-L1 upregulation accompanied with epithelial-mesenchymal transition attenuates sensitivity to ATR inhibition in p53 mutant pancreatic cancer cells [J]. *Med Oncol*, 2020, 37(5): 47.
- [9] TU X Y, QIN B, ZHANG Y, et al. PD-L1 (B7-H1) competes with the RNA exosome to regulate the DNA damage response and can be targeted to sensitize to radiation or chemotherapy[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(6): 1215-1226.e4.
- [10] CAO D L, QI Z H, PANG Y Y, et al. Retinoic acid-related orphan receptor C regulates proliferation, glycolysis, and chemoresistance via the PD-L1/ITGB6/STAT3 signaling axis in bladder cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(10): 2604-2618.
- [11] SHEN B, HUANG D Y, RAMSEY A J, et al. PD-L1 and MRN synergy in platinum-based chemoresistance of head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2020, 122(5): 640-647.
- [12] WANG H B, YAO H, LI C S, et al. HIP1R targets PD-L1 to lysosomal degradation to alter T cell-mediated cytotoxicity[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1): 42-50.
- [13] SUN L L, LI C W, CHUNG E M, et al. Targeting glycosylated PD-1 induces potent antitumor immunity[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(11): 2298-2310.
- [14] YU J X, HODGE J P, OLIVA C, et al. Trends in clinical development for PD-1/PD-L1 inhibitors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 163-164.
- [15] SHAO L L, HOU W Z, SCHARPING N E, et al. IRF1 inhibits antitumor immunity through the upregulation of PD-L1 in the tumor cell[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(8): 1258-1266.
- [16] ZHOU T, YUAN Z N, WENG J Y, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 24.
- [17] VASANTHAN J, GURUSAMY N, RAJASINGH S, et al. Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy[J]. *Cells*, 2020, 10(1): 54.
- [18] HOU W H, DUAN L, HUANG C Y, et al. Cross-tissue characterization of heterogeneities of mesenchymal stem cells and their differentiation potentials[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 781021.
- [19] SILVA J D, KRASNODEMBSKAYA A D. Investigation of the MSC paracrine effects on alveolar-capillary barrier integrity in the *in vitro* models of ARDS[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2269: 63-81.
- [20] BAGLIO SR, LAGERWEIJ T, PÉREZ-LANZÓN M, et al. Blocking tumor-educated MSC paracrine activity halts osteosarcoma progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(14): 3721-3733.
- [21] JIANG Y J, CHAO C C, CHANG A C, et al. Cigarette smoke-promoted increases in osteopontin expression attract mesenchymal stem cell recruitment and facilitate lung cancer metastasis[J]. *J Adv Res*, 2022, 41: 77-87.
- [22] LIU Z, MI F, HAN M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit CD8⁺ T cell immune responses via PD-1/PD-L1 pathway in multiple myeloma[J]. *Clin Exp Immunol*, 2021, 205(1): 53-62.
- [23] SUN L, HUANG C, ZHU M L, et al. Gastric cancer mesenchymal stem cells regulate PD-L1-CTCF enhancing cancer stem cell-like properties and tumorigenesis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 11950-11962.
- [24] SUN L, WANG Q Q, CHEN B, et al. Gastric cancer mesenchymal stem cells derived IL-8 induces PD-L1 expression in gastric cancer cells via STAT3/mTOR-c-Myc signal axis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 928.
- [25] XU R M, ZHAO X D, ZHAO Y Y, et al. Enhanced gastric cancer growth potential of mesenchymal stem cells derived from gastric cancer tissues educated by CD4⁺ T cells[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(2): e12399.
- [26] WU C, CAO X L, XU J, et al. Hsa_circ_0073453 modulates IL-8 secretion by GC-MSCs to promote gastric cancer progression by sponging miR-146a-5p[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 119: 110121.
- [27] WEI Y, ZHAO Q Y, GAO Z L, et al. The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(8): 3347-3360.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 魏凌, 孙丽, 王倩倩, 等. 胃癌间充质干细胞促进胃癌细胞 PD-L1 表达的特征观察[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(19): 7-15.

Cite this article as: WEI L, SUN L, WANG Q Q, et al. Characterization of gastric cancer mesenchymal stem cells promoting PD-L1 expression in gastric cancer cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(19): 7-15.