

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.07.043

CTLA-4 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤患者外泌体的表达及初步机制研究 *

陈 艳¹ 梁 奇² 杨志武² 刘 珊² 陈 文^{3Δ}

(益阳市中心医院 1 中西医结合科; 2 血液科 湖南 益阳 413200; 3 解放军总医院第八医学中心 北京 100091)

摘要 目的: 探讨细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 患者外泌体的表达及初步机制。**方法:** 2019 年 6 月至 2020 年 11 月就诊于本院的 DLBCL 患者纳入本研究, 分为缓解组和复发组; 选取来医院体检的健康志愿者做为对照组; 采用试剂盒分离外泌体, CD63 抗体包被磁珠结合后, 流式细胞术检测 CTLA-4⁺ 外泌体的比例; 流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 的比例。**结果:** 相对于对照组, 缓解组 DLBCL 患者 CTLA-4⁺ 外泌体的比例升高了 37.42%; 复发组 DLBCL 患者 CTLA-4⁺ 外泌体的比例为 6.04%, 相对于缓解组, 差异具有显著的统计学意义; 复发组 DLBCL 患者 CD4/CD8⁺T 细胞比值和 Treg 细胞比例分别为 0.85 和 0.44%, 相对于缓解组, 差异均具有显著的统计学意义; 相关性分析结果显示 CTLA-4⁺ 外泌体比例与 CD4/CD8⁺T 细胞比值呈负相关, 而与 Treg 细胞比例呈正相关。**结论:** CTLA-4⁺ 外泌体比例在 DLBCL 患者显著升高, 且与淋巴瘤的治疗效果和抗肿瘤免疫反应均具有紧密的相关性。

关键词: 弥漫大 B 细胞淋巴瘤; CTLA-4; 外泌体; 肿瘤免疫

中图分类号: R733.4 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2021)07-1396-05

Expression of CTLA-4 in Exosomes of Diffuse Large B Cell Lymphoma and Its Primary Mechanism*

CHEN Yan¹, LIANG Qi², YANG Zhi-wu², LIU Shan², CHEN Wen^{3Δ}

(1 Department of Integrated TCM & Western Medicine; 2 Department of Hematology, Yiyang Central Hospital, Yiyang, Hunan, 413200, China; 3 The 8th medical center of PLA General Hospital, Beijing, 100091, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) in exosomes of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). **Methods:** DLBCL patients admitted to our hospital from June 2019 to November 2020 were included in this study, and were divided into remission group and recurrent group. Healthy volunteers who came to the hospital for physical examination were selected as the control group. The exosomes were isolated with the kit, and the ratio of CTLA-4⁺ exosomes was detected by flow cytometry after the magnetic beads coated with CD63 antibody were bound. The ratios of CD4⁺T cells, CD8⁺T cells and regulatory T cells (Treg cells) were measured by flow cytometry. **Results:** Compared with the control group, the proportion of CTLA-4⁺ exosomes in remission DLBCL patients increased by 37.42%. The proportion of CTLA-4⁺ exosomes in recurrent DLBCL patients was 6.04%, and the difference was statistically significant compared with remission group. The CD4/CD8⁺T cell ratio and Treg cell ratio of DLBCL patients in the recurrent group were 0.85 and 0.44% respectively, and the differences were statistically significant compared with those in the remission group. Correlation analysis showed that the ratio of CTLA-4⁺ exosomes was negatively correlated with the ratio of CD4/CD8⁺T cells, but positively correlated with the ratio of Treg cells. **Conclusions:** CTLA-4⁺ exosome proportion is significantly increased in DLBCL patients, and it is closely correlated with the treatment effect of lymphoma and anti-tumor immune response.

Key words: Diffuse large B cell lymphoma; CTLA-4; Exosome; Tumor immunity

Chinese Library Classification (CLC): R733.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)07-1396-05

前言

弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 是最常见的非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 早期症状不具有特异性, 主要表现为发热、全身淋巴结肿大

以及结外器官受累等临床症状^[1]。临床数据显示约有 40% 的 DLBCL 在治疗后数月至数年间会复发, 且这种复发很难达到临床治愈^[2]。因此, 寻找 DLBCL 诊断和治疗的潜在靶点具有十分重要临床意义。许多研究证实外泌体是 DLBCL 发生发展的重要机制, 可作为早期诊断、复发监测和疗效评估的重要指

* 基金项目: 湖南省科技创新计划项目 (2018SK52204); 国家自然科学基金青年基金项目 (31800814)

作者简介: 陈艳 (1983-), 女, 副主任医师, 主要研究方向: 肿瘤的中西医结合治疗

Δ 通讯作者: 陈文 (1987-), 男, 医学博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 肿瘤的靶向治疗,

电话: 13752985404, E-mail: 1607283686@qq.com

(收稿日期: 2020-11-28 接受日期: 2020-12-23)

标^[3-5]。细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4,CTLA-4)是重要的免疫检查点,可显著抑制抗肿瘤免疫反应,促进调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg 细胞)的扩增^[6-8]。CTLA-4 单抗已经被美国 FDA 批准进入临床治疗恶性黑色素瘤等,具有很好的治疗效果^[9]。本文拟研究 CTLA-4 在 DLBCL 患者外泌体的表达,并初步探讨其机制,为临床诊断和治疗提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 临床资料

2019 年 6 月至 2020 年 11 月就诊于益阳市中心医院的 DLBCL 患者纳入本项研究。纳入标准:年龄>18 周岁,病理诊断为 DLBCL,患者知情同意参与本研究;排除标准:合并白血病等其他恶性肿瘤、合并严重贫血等严重血液疾病、合并自身免疫系统疾病,合并糖尿病和尿毒症,合并病毒性肝炎等感染性疾病。患者经过环磷酰胺、吡柔比星和长春瑞宾系统治疗后,按照治疗效果不同,分为缓解组和复发组,同时选取来医院体检的健康志愿者做为对照组。

1.2 试剂和材料

外泌体纯化试剂盒和 CD63 抗体包被磁珠购于 Invitrogen 公司;CD63-PE、CTLA-APC、CD4-APC、CD8-PE、CD25-FITC 和 Foxp3-PE 均购于 eBioscience 公司;人淋巴细胞分离液购于天津市灏洋生物制品科技有限公司。

1.3 外泌体的分离和检测

收集各组患者的外周血,1500 转离心 10 min,收集血浆。3000×g 离心 15 min,收集上清。加入外泌体沉淀试剂,反复颠倒充分溶解沉淀物。置于 4 度冰箱中反应 30 min,1500×g 离心 30 min,弃上清。加入 CD63 抗体包被磁珠,置于样品混合器上,4 度冰箱中孵育 24h。加入 CD63-PE 和 CTLA-APC 抗体,样品混合器上孵育 1h。分离缓冲液清洗 3 次后,在流式细胞仪上检测 CD63⁺ 和 CTLA-4⁺ 外泌体的比例。

1.4 流式细胞术检测 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞的比例

收集各组患者的外周血,采用 PBS 进行同体积稀释。缓慢加入到人淋巴细胞分离液的上层。1500×g 离心 20 min 后,吸取白膜层,PBS 清洗 3 次。细胞分成两组:一组加入 CD4-APC 和 CD8-PE;一组加入 CD4-APC、CD25-FITC 和 Foxp3-PE。避光反

应 15 min 后,加入 1 mL 的 PBS。PBS 清洗 3 次后,在流式细胞仪上检测 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和 Treg 细胞的比例。

1.5 统计学方法

计量资料采用平均值±标准差表示,多组之间的比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 事后检验,Spearman 检验进行相关性分析, $P<0.05$ 认为组之间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般资料

对照组志愿者共 10 例,男性 4 例,女性 6 例,平均年龄为 60.7 岁;缓解组 DLBCL 患者共 10 例,男性 5 例,女性 5 例,平均年龄为 63.5 岁;复发组 DLBCL 患者共 10 例,男性 6 例,女性 4 例,平均年龄为 67.5 岁。对比各组患者的性别、年龄和体重等一般资料,差异均不具有统计学意义(P 均>0.05)。

2.2 复发组 DLBCL 患者 CTLA-4⁺ 外泌体的比例显著升高

对照组、缓解组和复发组外周血 CD63⁺ 外泌体比例均超过了 95%,这说明我们分离的外泌体纯度均很高。相对于对照组,缓解组 DLBCL 患者 CTLA-4⁺ 外泌体的比例升高了 37.42%,差异具有显著的统计学意义;复发组 DLBCL 患者 CTLA-4⁺ 外泌体的比例为 6.04%,相对于缓解组,差异具有显著的统计学意义。见图 1 和图 2。

2.3 复发组 DLBCL 患者 CD4/CD8⁺T 细胞比值显著降低

相对于对照组,缓解组 DLBCL 患者 CD4/CD8⁺T 细胞比值显著降低,差异具有显著的统计学意义;复发组 DLBCL 患者 CD4/CD8⁺T 细胞比值为 0.85,相对于缓解组,差异具有显著的统计学意义。相关性分析结果显示 CTLA-4⁺ 外泌体与 CD4/CD8⁺T 细胞比值呈负相关。见图 3。

2.4 复发组 DLBCL 患者 Treg 细胞比例显著升高

相对于对照组,缓解组 DLBCL 患者 Treg 细胞比例显著升高,差异具有显著的统计学意义;复发组 DLBCL 患者 Treg 细胞比例为 0.44%,相对于缓解组,差异具有显著的统计学意义。相关性分析结果显示 CTLA-4⁺ 外泌体与 Treg 细胞比例呈正相关。见图 4。

3 讨论

近几年,DLBCL 的发病呈快速上升和年轻化的趋势,给我国人民的健康带来了巨大的危害。据统计,DLBCL 占我国

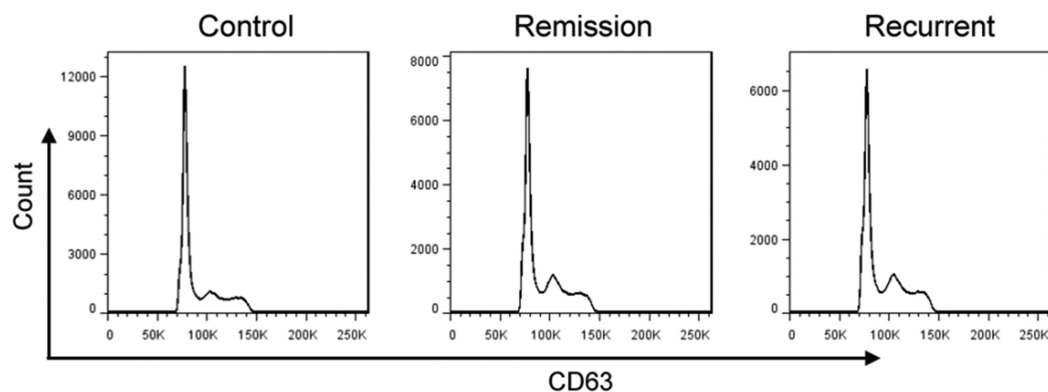


图 1 流式细胞术检测外泌体纯度

Fig.1 The purity of exosomes was detected by flow cytometry

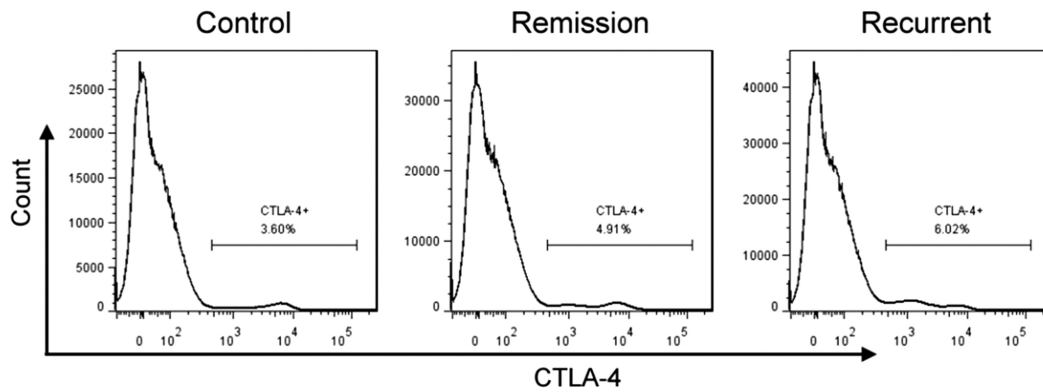


图2 复发组 DLBCL 患者 CTLA-4+ 外泌体的比例显著升高

Fig.2 The proportion of CTLA-4+ exosomes in recurrent DLBCL patients was significantly increased

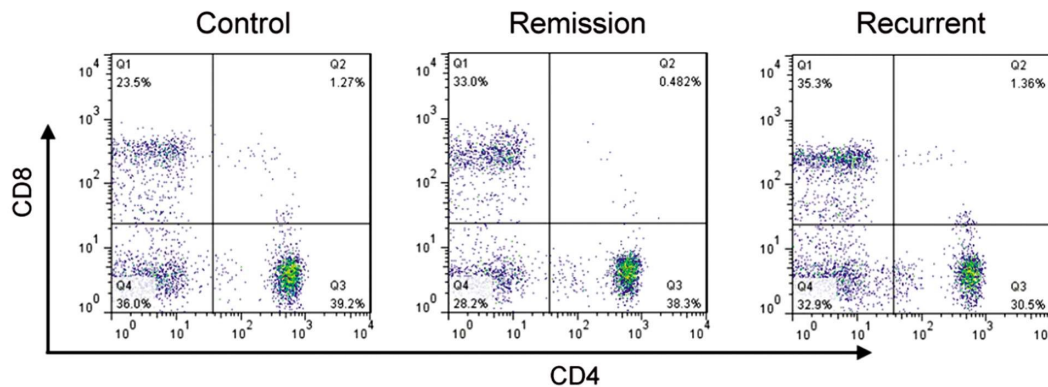


图3 复发组 DLBCL 患者 CD4/CD8⁺T 细胞比值显著降低

Fig.3 CD4/CD8⁺T cell ratio was significantly reduced in recurrent DLBCL patients

NHL 所有病例比例接近 50%^[10]。早期诊断和治疗具有十分重要的临床意义。目前 DLBCL 检测的金标准是病理诊断,然而病理穿刺对人体具有较大的创伤,且不适合长期的随访检测。外泌体是细胞分泌一种的细胞外囊泡,表面依旧保持着来源细胞的生物学标记,因此在乳腺癌、肺癌和肝癌等恶性肿瘤诊断和疗效监测中均具有广阔的应用前景^[11-13]。最新研究显示外泌体内的 microRNA 和蛋白质对淋巴瘤诊断和治疗均具有较好的应用,淋巴瘤来源的外泌体可促进淋巴瘤细胞的增殖、侵袭和远处转移等^[14]。我们的研究显示复发组 CTLA-4+ 外泌体的比例显著高于缓解组,因此在淋巴瘤治疗后的复发监测中具有一定的参考价值。

CTLA-4 也被称为 CD152, 是一种白细胞分化抗原。CTLA-4 属于重要的免疫检查点,在 Treg 细胞和滤泡调节性 T 细胞等抑制性免疫细胞表面高表达。CTLA-4 可与 B7 分子特异性的结合,诱导 T 细胞的无反应性^[15]。在器官移植领域,CTLA-4 可有效抑制同种异体排斥反应,促进移植器官的长期存活^[16]。此外,许多自身免疫性疾病和病毒感染均与 CTLA-4 的异常表达具有一定的相关性^[17]。对于恶性肿瘤患者,CTLA-4 高表达可显著抑制抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤的生长和转移。目前已经有 CTLA-4 靶向药物应用于临床治疗恶性黑色素瘤等,具有很好的疗效^[18]。我们研究显示复发组 CTLA-4+ 外泌体的比例显著高于缓解组,这种外泌体在全身形成免疫抑制的微环境,可进一步促进肿瘤的快速生长和全身转移,恶化淋巴瘤患者的病情。

T 细胞主要介导细胞免疫,是抗肿瘤免疫反应的主要细胞。在肿瘤免疫过程中,CD4⁺T 细胞通过分泌细胞因子或者直接接触,启动细胞毒性 T 细胞,发挥杀伤肿瘤细胞的功能,此外 CD4⁺T 细胞还可做为效应细胞直接发挥抗肿瘤作用^[19]。CD8⁺T 细胞的作用则主要是抑制和抗击病毒,晚期肿瘤患者体内 CD8⁺T 细胞数量的下降,可引起患者更容易发生病原体感染。相对于 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞,CD4/CD8 的比值更能反映人体内的免疫状态。CD4/CD8 的比值降低预示着人体内处于免疫抑制状态,常见于恶性肿瘤和艾滋病等^[20-22]。我们研究显示 DLBCL 患者外周血 CTLA-4+ 外泌体比例与 CD4/CD8⁺T 细胞比值呈显著的负相关性,这说明 CTLA-4+ 外泌体可在一定程度上预示人体的免疫状态,然而深入机制还需要进一步研究。

除了单核细胞、T 细胞和 B 细胞等免疫细胞,人体内还存在一群抑制性免疫细胞群体,两群细胞共同作用,维持着人体免疫稳态的平衡。Treg 细胞是最重要的抑制性免疫细胞,可分泌许多抑制性细胞因子,包括白介素 10 和转化生长因子- β 等^[23]。此外,Treg 细胞表面高表达 CTLA-4,可通过细胞直接接触,抑制 T 细胞和树突细胞等^[24]。与我们的研究类似,大量研究显示淋巴瘤患者体内 Treg 细胞比例显著升高,能在一定程度上预测患者的预后和治疗效果^[25-27]。我们实验结果还显示 CTLA-4+ 外泌体与 Treg 细胞比例呈正相关,这说明 CTLA-4+ 外泌体可能具有较强的诱导免疫耐受功能,在肿瘤免疫中发挥抑制免疫监视和免疫应答的作用。

综上,CTLA-4+ 外泌体比例在 DLBCL 患者显著升高,且

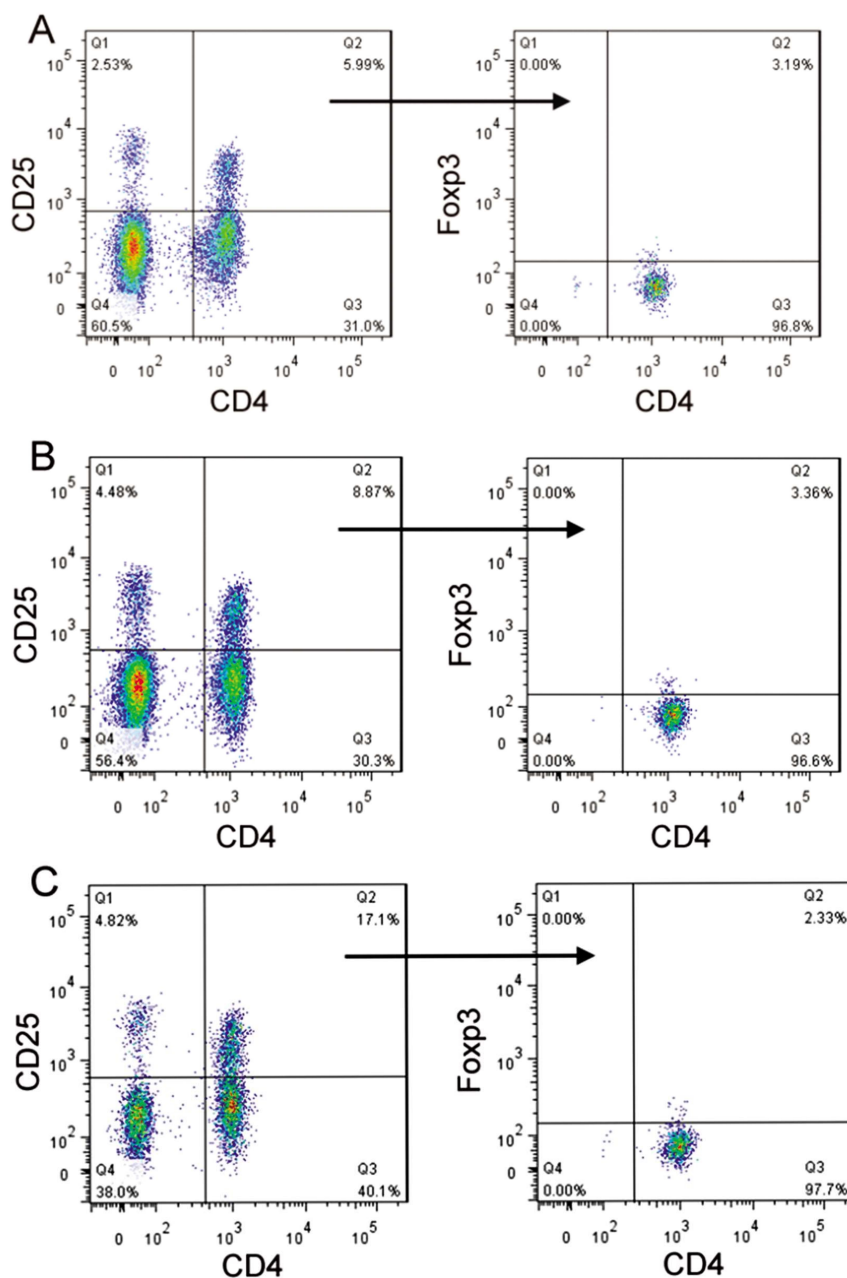


图4 复发组 DLBCL 患者 Treg 细胞比例显著升高

Fig.4 The proportion of Treg cells in recurrent DLBCL patients was significantly increased

Note: A: Control group; B: Remission group; C: Recurrent group

与淋巴瘤的治疗效果和抗肿瘤免疫反应均具有紧密的相关性。我们的研究为 DLBCL 的治疗和复发监测提供了潜在指标。

参考文献(References)

- [1] Bakhshi TJ, Georgel PT. Genetic and epigenetic determinants of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Blood Cancer J, 2020, 10(12): 123
- [2] Shi Y, Ding D, Qu R, et al. Non-Coding RNAs in Diffuse Large B-Cell Lymphoma[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 12097-12112
- [3] Zare N, Haghjooy Javanmard SH, Mehrzad V, et al. Effect of Plasma-Derived Exosomes of Refractory/Relapsed or Responsive Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma on Natural Killer Cells Functions[J]. Cell J, 2020, 22(1): 40-54
- [4] Zhu MY, Liu WJ, Wang H, et al. NSE from diffuse large B-cell lymphoma cells regulates macrophage polarization[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 4577-4595
- [5] Xiao XB, Gu Y, Sun DL, et al. Effect of rituximab combined with chemotherapy on the expression of serum exosome miR-451a in patients with diffuse large b-cell lymphoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(4): 1620-1625
- [6] Gao J, Navai N, Alhalabi O, et al. Neoadjuvant PD-L1 plus CTLA-4 blockade in patients with cisplatin-ineligible operable high-risk urothelial carcinoma[J]. Nat Med, 2020, 26(12): 1845-1851
- [7] Peng Z, Su P, Yang Y, et al. Identification of CTLA-4 associated with tumor microenvironment and competing interactions in triple negative breast cancer by co-expression network analysis[J]. J Cancer, 2020, 11(21): 6365-6375
- [8] Amaral JL, Santos SJM, Souza PFN, et al. Quantum biochemistry in cancer immunotherapy: New insights about CTLA-4/ipilimumab and design of ipilimumab-derived peptides with high potential in cancer

- treatment[J]. *Mol Immunol*, 2020, 127: 203-211
- [9] Amaral JL, Santos SJM, Souza PFN, et al. Quantum biochemistry in cancer immunotherapy: New insights about CTLA-4/ipilimumab and design of ipilimumab-derived peptides with high potential in cancer treatment[J]. *Mol Immunol*, 2020, 127: 203-211
- [10] Sun JJ, Liu L, Wang JR, et al. Clinical outcomes of people living with human immunodeficiency virus (HIV) with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in Shanghai, China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(23): 2796-2802
- [11] Gao H, Ma J, Cheng Y, et al. Exosomal Transfer of Macrophage-Derived miR-223 Confers Doxorubicin Resistance in Gastric Cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 12169-12179
- [12] Hergueta-Redondo M, Peinado H. The influence of secreted factors and extracellular vesicles in ovarian cancer metastasis [J]. *EJC Suppl*, 2020, 15: 38-48
- [13] Ganji A, Farahani I, Shojapour M, et al. In vivo therapeutic effects of colorectal cancer cell-derived exosomes [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(11): 1439-1444
- [14] Feng Y, Zhong M, Zeng S, et al. Exosome-derived miRNAs as predictive biomarkers for diffuse large B-cell lymphoma chemotherapy resistance[J]. *Epigenomics*, 2019, 11(1): 35-51
- [15] Turbitt WJ, Orlandella RM, Gibson JT, et al. Therapeutic Time-restricted Feeding Reduces Renal Tumor Bioluminescence in Mice but Fails to Improve Anti-CTLA-4 Efficacy[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(10): 5445-5456
- [16] Perez-Santos M. Bispecific anti-PD-1/CTLA-4 antibody for advanced solid tumors[J]. *Pharm Pat Anal*, 2020, 9(5): 149-154
- [17] Aref S, El Agdar M, El Sebaie A, et al. Prognostic Value of CD200 Expression and Soluble CTLA-4 Concentrations in Intermediate and High-Risk Myelodysplastic Syndrome Patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21(8): 2225-2230
- [18] Zhang J, Liu D, Liu J, et al. Hybrid spherical nucleotide nanoparticles can enhance the synergistic anti-tumor effect of CTLA-4 and PD-1 blockades[J]. *Biomater Sci*, 2020, 8(17): 4757-4766
- [19] Liu XR, Yu JJ, Song GH, et al. Peripheral cytotoxic T lymphocyte predicts first-line progression free survival in HER2-positive advanced breast cancer[J]. *Breast*, 2020, 55: 7-15
- [20] Tian L, Wang W, Yu B, et al. Efficacy of dendritic cell-cytokine induced killer cells combined with concurrent chemoradiotherapy on locally advanced non-small cell lung cancer[J]. *J BUON*, 2020, 25(5): 2364-2370
- [21] 罗海波, 夏薇, 曹鸿挺, 等. 乙型肝炎患者外周血 T 细胞亚群、IL-6 及 IL-8 水平的表达及临床意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18 (13): 2517-2521
- [22] Crosby EJ, Hobeika AC, Niedzwiecki D, et al. Long-term survival of patients with stage III colon cancer treated with VPR-CEA(6D), an alphavirus vector that increases the CD8⁺ effector memory T cell to Treg ratio[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e001662
- [23] Godoy GJ, Paira DA, Olivera C, et al. Differences in T regulatory cells between mouse strains frequently used in immunological research: Treg cell quantities and subpopulations in NOD, B6 and BALB/c mice[J]. *Immunol Lett*, 2020, 223: 17-25
- [24] Procaccini C, Matarese G. Where Mitochondria Meet Autoimmunity: The Treg Cell Link[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(4): 507-509
- [25] Mikami N, Kawakami R, Sakaguchi S. New Treg cell-based therapies of autoimmune diseases: towards antigen-specific immune suppression[J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 67: 36-41
- [26] 丁静雅, 秦露丹, 徐勇, 等. Graves 病患者外周血中 CD4⁺CD25⁺ Treg 细胞上的 PD-1/PD-L1 的表达及意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(4): 718-723
- [27] Zavvar M, Assadiasl S, Zargaran S, et al. Adoptive Treg cell-based immunotherapy: Frontier therapeutic aspects in rheumatoid arthritis [J]. *Immunotherapy*, 2020, 12(12): 933-946

(上接第 1390 页)

- [22] 黑炜翔, 杨宗盛, 夏成兴, 等. fPSA/TPSA/PSAD 联合多参数磁共振成像 PI-RADS 评分在诊断 PSA 灰区前列腺癌中的作用[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2020, 40(2): 234-239
- [23] Byun J, Park KJ, Kim MH, et al. Direct Comparison of PI-RADS Version 2 and 2.1 in Transition Zone Lesions for Detection of Prostate Cancer: Preliminary Experience [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2020, 52(2): 577-586
- [24] 陈素静, 李建忠. PSAD 与双参数前列腺磁共振联合应用在前列腺癌诊断中的意义[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019, 39(6): 965-969
- [25] Washino S, Okochi T, Saito K, et al. Combination of prostate imaging reporting and data system (PI-RADS) score and prostate-specific antigen (PSA) density predicts biopsy outcome in prostate biopsy naïve patients[J]. *BJU Int*, 2017, 119(2): 225-233
- [26] Liu J, Dong B, Qu W, et al. Using clinical parameters to predict prostate cancer and reduce the unnecessary biopsy among patients with PSA in the gray zone[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5157