

TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义*

崔杰¹ 王永华¹ 于芹超¹ 刘静² 公欣海¹ 纪传彪¹

[摘要] 目的:探讨 TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统在膀胱尿路上皮癌免疫逃逸机制中的作用及其与膀胱癌生物学行为的关系。方法:采用免疫组化染色法检测 60 例膀胱尿路上皮癌和 10 例正常膀胱组织中 TLR-4、B7-H1、PD-1、Fas 及 FasL 的表达。结果:TLR-4 在正常膀胱组织中均有表达,而在膀胱尿路上皮癌中表达有所降低;B7-H1、PD-1、Fas、FasL 在正常膀胱组织中无表达或表达极低,而在膀胱尿路上皮癌中的表达均明显增高,并且其表达与肿瘤的病理分级和临床分期密切相关,同时 B7-H1 表达与复发亦密切相关。结论:TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统可能与膀胱尿路上皮癌的免疫逃逸密切相关,在膀胱尿路上皮癌的发生发展中可能存在着 TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统的活化和相关免疫抑制分子表达的上调。

[关键词] 膀胱肿瘤;免疫逃逸

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)02-0105-04

The expression and significance of TLR4-mediated immune escape signal transduction system in bladder urothelial carcinoma

CUI Jie¹ WANG Yonghua¹ YU Qinchao¹ LIU Jing² GONG Xinhai¹ JI Chuanbiao¹

(¹Department of Urology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, 266000, China; ²Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University)

Corresponding author: WANG Yonghua, E-mail: doctorwangyonghua@yahoo.cn

Abstract Objective: To investigate the mechanism of the TLR-4-mediated immune escape signal transduction system in bladder urothelial carcinoma and their relationship with the biological behavior of bladder cancer. **Method:** Samples from 60 patients with bladder urothelial carcinoma and 10 cases with normal bladder tissue were examined for TLR-4, B7-H1, PD-1, Fas and FasL expression by immunohistochemical staining. **Result:** TLR-4 positivity was observed in all normal bladder tissue, while decreased expression in bladder urothelial carcinoma; There were no expression or very low expression of B7-H1, PD-1, Fas and FasL in normal bladder tissue, but in bladder urothelial carcinoma the positive expression of those proteins were significantly higher, and those proteins expression were closely correlated with tumor pathological grade and clinical stage, at the same time the B7-H1 expression was also correlated with recurrence. **Conclusion:** TLR-4-mediated signal transduction system may be associated with bladder urothelial carcinoma immune escape, and activation of TLR-4-mediated immune escape signal transduction system may exist in the development of bladder urothelial carcinoma and along with TLR-4-mediated signal transduction system related immunosuppressive molecule upregulation.

Key words bladder urothelial carcinoma; immune escape

肿瘤细胞的免疫逃逸现象是肿瘤发生发展的重要原因之一,对肿瘤免疫逃逸机制的研究一直是攻克肿瘤道路上的一个热点和难点。我们前期研究发现在膀胱癌内确实存在着免疫逃逸现象,而这也可能是膀胱癌易复发和恶性进展的重要原因之一^[1]。Toll 样受体 4(Toll like receptor-4, TLR-4)是参与机体免疫应答启动环节的重要免疫调节因子,最近有研究发现 TLR 信号途径的异常活化可以导致肿瘤细胞免疫失衡,从而发生免疫逃

逸^[2]。那么 TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统与膀胱癌的免疫逃逸之间有无联系?目前国内外尚未见文献报道。为此,本研究应用免疫组织化学方法检测膀胱尿路上皮癌中 TLR-4、B7-H1、PD-1、Fas 和 FasL 的表达,借以探讨 TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统在膀胱癌免疫逃逸机制中的作用及其与膀胱癌生物学行为的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2009~2011 年青岛大学医学院附属医院泌尿外科手术切除并经病理检查证实的膀胱尿路上皮癌标本 60 例,所有标本均经病理科医生复检。其中男 46 例,女 14 例,年龄 25~82 岁,平均 64

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号 81101932)

¹ 青岛大学医学院附属医院泌尿外科(山东青岛,266000);

² 青岛大学医学院附属医院儿科

通信作者:王永华, E-mail: doctorwangyonghua@yahoo.cn

岁。初发肿瘤 44 例,复发肿瘤 16 例。病理分级按 WHO1999 年标准分级分为低级别组 26 例,高级别组 34 例。临床分期按 UICC 的 TNM 标准分期分为非浸润型组($T_{a\sim 1}$)32 例,浸润型组($T_{2\sim 4}$)28 例。另外取 10 例正常膀胱组织作为对照。

1.2 主要试剂

兔抗人 TLR-4 多克隆抗体、兔抗人 B7-H1 多克隆抗体和兔抗人 FasL 多克隆抗体均购于武汉博士德生物公司。鼠抗人 PD-1 单克隆抗体、兔抗人 Fas 多克隆抗体、PV-6000 检测试剂盒及 DAB 试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 PV-6000 免疫组织化学染色

所有标本经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋制备,连续切片厚 4 μm 。采用 PV-6000 两步免疫组化法按试剂盒说明书操作,再分别加入不同一抗孵育后,滴加 PV-6000 工作液,然后经 DAB 显色,苏木素复染,透明,中性树胶封片。所有切片均在同一条件下同一批次内完成染色。以已知阳性片作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组化结果判定

TLR-4 蛋白、B7-H1 蛋白及 FasL 蛋白均以膀胱肿瘤细胞膜或细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性染色。在高倍镜下随机观察 5 个视野,计算阳性细胞占细胞总数的百分比,阳性细胞数 $< 10\%$ 为阴性,阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性。PD-1 蛋白和 Fas 蛋白则是以肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)细胞膜或细胞质内出现棕黄色染色为阳性染色。在高倍镜下随机观察 5 个视野,计数每个视野阳性 TIL 数并取平均值,以中位数为截取值分别将其分为表达阴性和阳性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,数据间

比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR-4、B7-H1、PD-1、Fas 和 FasL 在正常膀胱组织及膀胱尿路上皮癌中的表达

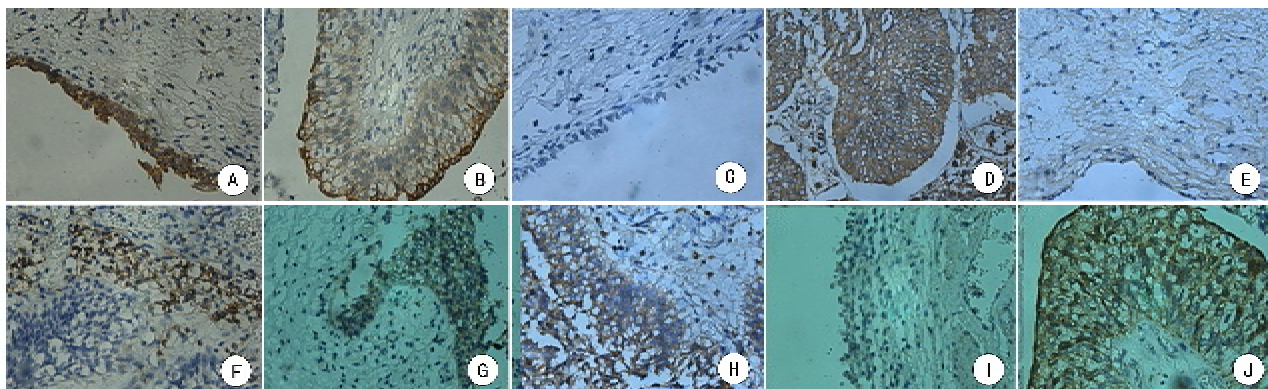
TLR-4 蛋白在正常膀胱组织中表达率为 100%(10/10),在膀胱尿路上皮癌组织中表达率为 68.3%(41/60),差异无统计学意义;B7-H1 蛋白在正常膀胱组织中无表达(0/10),在膀胱尿路上皮癌组织中表达率为 71.7%(43/60),差异有统计学意义;PD-1 蛋白在正常膀胱组织淋巴细胞中无表达(0/10),在膀胱尿路上皮癌 TIL 中表达率为 80.0%(48/60),差异有统计学意义;Fas 蛋白在正常膀胱上皮细胞中有广泛表达,但在正常淋巴细胞中表达率为 10%(1/10),在膀胱尿路上皮癌 TIL 中表达率为 83.3%(50/60),差异有统计学意义;FasL 在正常膀胱组织中无表达(0/10),在膀胱尿路上皮癌组织中表达率为 66.7%(40/60),差异有统计学意义(图 1)。

2.2 TLR-4、B7-H1、PD-1、Fas 和 FasL 蛋白表达与膀胱尿路上皮癌生物学行为的关系

TLR-4 蛋白表达率随着病理分级和临床分期的增加而降低,差异有统计学意义;而 B7-H1 蛋白、PD-1 蛋白、Fas 蛋白、FasL 蛋白表达率随着病理分级和临床分期的增加均升高,均差异有统计学意义;另外,复发组 B7-H1 蛋白表达率明显高于初发组,亦差异有统计学意义,详见表 1。

3 讨论

TLR-4 是 Toll 样受体家族的一员,是参与机体免疫应答启动环节的重要跨膜信号传递受体,其通过识别外源性配体和内源性配体,启动信号转导途径,诱导免疫效应分子表达,从而参与机体的免疫应答。在肿瘤免疫应答方面,最初研究发现



A: TLR-4 在正常膀胱组织中呈阳性表达;B: TLR-4 在膀胱癌组织中呈阳性表达;C: B7-H1 在正常膀胱组织中呈阴性表达;D: B7-H1 在膀胱癌组织中呈阳性表达;E: PD-1 在正常膀胱组织中呈阴性表达;F: PD-1 在膀胱癌组织 TIL 中呈阳性表达;G: Fas 在正常膀胱上皮细胞有表达,但在淋巴细胞上无表达;H: Fas 在膀胱癌组织 TIL 中呈阳性表达,同时肿瘤细胞也有表达;I: FasL 在正常膀胱组织中呈阴性表达;J: FasL 在膀胱癌组织中呈阳性表达。

图 1 正常膀胱组织和膀胱癌组织中 TLR-4、B7-H1、PD-1、Fas 及 FasL 的表达

表 1 TLR-4、B7-H1、PD-1、Fas 及 FasL 表达率与膀胱癌临床生物学行为的关系

指标	例数	TLR-4		B7-H1		PD-1		Fas		FasL	
		表达率/%	P 值	表达率/%	P 值	表达率/%	P 值	表达率/%	P 值	表达率/%	P 值
病理分级											
低级别	26	84.6	0.018	57.7	0.036	65.4	0.013	69.2	0.027	50.0	0.017
高级别	34	55.9		82.4		91.2		94.1		79.4	
临床分期											
非肌层浸润	32	84.4	0.004	59.4	0.024	68.8	0.020	71.9	0.028	53.1	0.017
肌层浸润	28	50.0		85.7		92.9		96.4		82.1	
初发与复发											
初发	44	70.5	0.558	63.6	0.049	75.0	0.215	77.3	0.090	61.4	0.148
复发	16	62.5		93.8		93.8		100		81.3	

TLR 信号通路的活化可以促进机体的 T 细胞抗肿瘤免疫应答^[3];然而最近研究发现,TLR 很可能是把双刃剑,TLR 信号途径的异常活化可以促使其下游通路中多种免疫抑制因子表达增加,从而介导肿瘤细胞发生免疫逃逸^[2]。其中 B7-H1/PD-1 是 TLR-4 下游信号通路中与肿瘤免疫逃逸密切相关的重要分子。

B7-H1 是共刺激分子 B7 家族的新成员,正常情况下主要表达于活化的单核细胞和 DC 表面,PD-1 是 B7-H1 的受体,主要表达于活化的 T 和 B 细胞表面。最近研究发现,B7-H1 在多种肿瘤组织中均有过度表达^[4],B7-H1 与 PD-1 结合可以提供抑制性信号,抑制 T、B 细胞的增殖活化,并诱导活化的 T 细胞发生凋亡,从而对机体的抗肿瘤免疫应答发挥负性调控作用,诱导肿瘤免疫逃逸的发生。而 Fas/FasL 是 B7-H1/PD-1 下游信号通路中与肿瘤特异性 T 细胞凋亡密切相关的重要分子。

Fas 及其配体 FasL 是近年来研究最为深入的有关细胞凋亡的膜表面分子,FasL 与 Fas 识别后可以通过 Fas 触发细胞内部的凋亡程序,使 Fas 阳性细胞发生凋亡。目前研究发现,Fas/FasL 在肿瘤的免疫逃逸机制中发挥重要作用,一方面肿瘤细胞通过减少 Fas 表达,逃避 T 淋巴细胞的攻击作用;另一方面肿瘤细胞通过表达 FasL 对 T 淋巴细胞进行免疫反击,杀伤宿主免疫细胞,从而逃避了机体对肿瘤细胞的免疫清除^[5],其中起关键性作用的是 FasL 表达的增高^[6]。

本研究发现,TLR-4 蛋白在正常膀胱组织中均有表达,而在膀胱尿路上皮癌中表达率有所降低,高分级组和浸润型组尤为明显,与 Ayari 等的结果一致^[7]。泌尿道上皮是天然免疫防线的第一道屏障,因此在常态下即大量表达 TLR-4 蛋白,膀胱癌中 TLR-4 蛋白表达降低的具体机制尚不清楚,可能与 TLR-4 过度活化及 TLR-4 胞内外的负反馈调控有关,但其表达量的降低与 TLR-4 信号的激活及下游信号通路的活化并不矛盾。本研究还发现,TLR-4 信号通路中下游分子 B7-H1、PD-1、Fas 和 FasL 蛋白

在正常膀胱组织中均无表达或表达极低,而在膀胱尿路上皮癌中其表达均明显增高,并且与肿瘤的病理分级和临床分期密切相关。这表明在膀胱癌的发生发展中存在着 TLR-4 介导的免疫逃逸信号的活化和相关免疫抑制分子表达的上调,其可能的机制为:膀胱癌细胞产生大量内源性配体(即损伤相关分子模式),被膀胱癌细胞表面 TLR-4 所识别,引起 TLR-4 过度活化,进而诱导其下游分子 B7-H1/PD-1 表达上调,B7-H1/PD-1 活化后进而诱导其下游 Fas/FasL 表达上调,并最终通过 Fas/FasL 途径导致效应 T 淋巴细胞凋亡,从而逃避机体的抗肿瘤免疫应答,介导免疫逃逸的发生。

另外,在对卡介苗(BCG)作用机制的研究中人们发现膀胱癌属于一种免疫原性肿瘤,BCG 可刺激膀胱癌局部产生大量肿瘤浸润性淋巴细胞,从而增强局部的细胞免疫达到抗肿瘤的效果。但 BCG 灌注治疗仍有不少膀胱癌患者复发,甚至恶性进展和转移,其原因可能与膀胱癌中存在着免疫逃逸有关。最近有研究发现在 BCG 膀胱灌注治疗复发患者肿瘤组织中同时存在着 TLR-4 表达的增加和 B7-H1 表达的增加^[8,9],因此,我们推测 TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统的活化很有可能是 BCG 膀胱灌注后仍然出现肿瘤复发的重要原因之一。

综上所述,我们认为,在膀胱尿路上皮癌的发生发展中可能存在着 TLR-4 介导的免疫逃逸信号转导系统的活化和相关免疫抑制分子表达的上调,这对于揭示膀胱癌免疫逃逸的机制,探索膀胱癌高复发性的原因,以及在此基础上寻求膀胱癌免疫治疗的新策略有着重要的意义。而该通路在肿瘤微环境中的影响因素、相互间的反馈调节机制、通路各分子间的相互作用机制以及与其他通路之间的关系等方面尚有待于进一步的研究。

[参考文献]

- 王永华,庄乾元,周四维,等.阻断 B7-H1 通路增强淋巴细胞抗膀胱肿瘤免疫效应的研究[J].中华实验外科杂志,2009,26(9):1226-1226.

3.5 盆腔脂肪增多症的治疗

由于本病的病因及自然病程不明,治疗上仍存在争议,目前尚无公认的有效治疗措施。保守治疗可以长期服用抗生素、激素治疗、控制饮食、药物减肥等,目前认为对于无上尿路梗阻及肾功能不全者暂不予手术治疗^[5],但需密切随访,如出现尿路梗阻进行性加重需积极外科干预。目前冠以 PL 减肥治疗成功的报道较多。Oka 等^[6]报道了 1 例 PL 患者体重减轻 6 kg 后,症状减轻,与 Masumori 等^[7]采用的经过 15 个月的减肥治疗的效果相似。贺大林等^[8]通过临床研究证实,口服减肥药奥利司他对治疗盆腔脂肪增多症有良好效果。

外科干预治疗主要是针对其尿路梗阻造成严重积水或肾功能不全,理想的方法为手术剔除多余脂肪组织,松解下段狭窄输尿管,但既往报道示本症增多的脂肪组织与盆腔脏器粘连严重,术中难以找到剥离平面,易造成脏器损害,而且术后患者的主观症状和影像学检查未见明显改善^[7]。故目前多数学者主张尿流改道术。Klein 等^[9]根据患者的年龄、体质、病情急缓程度等进行了分组治疗,如患者病情发展快,较早出现尿路梗阻或肾功能不全,应较早外科干预(如肾造瘘、放置双 J 管、尿流改道术等),若患者病情发展缓慢,可定期随访,予半年查一次肾功能,每两年一次造影及定期膀胱镜检查,必要时手术。国内有零星关于手术治疗 PL 的报道,周祥福等^[10]采用腹腔镜下清除盆腔及输尿管周围脂肪组织,松解输尿管下段的方法,近期疗效满意。何卫阳等^[11]报道了 2 例 PL 行双侧输尿管膀胱再植术及盆腔脂肪清除术,术后随访肾盂静脉造影,肾积水及输尿管扩张均有所减轻。

本例患者因左侧重复肾积水转入我院而发现患有 PL,经过减肥治疗后临床症状较前明显好转,

左肾积水好转,治疗效果较满意。所以我们认为,对于上尿路梗阻较轻,肾功能良好的患者,前期应用减肥治疗,可取得良好临床治疗效果。

[参考文献]

- 1 Zanman W, Singh V, Kumar B, et al. Pelvic lipomatosis in a child[J]. Urol Int, 2002, 69: 238—240.
- 2 Battista S, Fidanza V, Fedel M, et al. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis[J]. Cancer Res, 1999, 59: 4793—4797.
- 3 Heyns C F. Pelvic lipomatosis: a review of its diagnosis and management[J]. J Urol, 1991, 146: 267—273.
- 4 Moss A A, Clark R E, Goldberg H E, et al. Pelvic lipomatosis: a roentgenographic diagnosis [J]. AJR, 1972, 115: 441.
- 5 Berdou R, Osterhage H R, Urologische K, et al. Pelvic lipomatosis-what to do [J]? Urologe A, 2003, 42: 1244—1249.
- 6 Oka H, Hatayama T, Taki Y, et al. A case of pelvic lipomatosis[J]. Hinyokika Kyo, 1991, 37: 549—552.
- 7 Masumori N, Tsukamoto T. Pelvic lipomatosis associated with proliferative cystitis: case report and review of the Japanese literature[J]. Int J Urol, 1999, 6: 44—49.
- 8 贺大林, 赵军, 刘润明, 等. 药物治疗盆腔脂肪增多症 3 例报告[J]. 现代泌尿外科杂志, 2007, 12(2): 87—90.
- 9 Klein F A, Smith M J, Kasenetz I. Pelvic lipomatosis: 35-year experience[J]. J Urol, 1988, 139: 998—1001.
- 10 周祥福, 高新, 方友强, 等. 盆腔脂肪增多症诊治分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26(2): 125—129.
- 11 何卫阳, 苟欣, 肖明朝, 等. 盆腔脂肪增多症的诊治分析及文献复习[J]. 四川医学, 2010, 1(31): 40—41.

(收稿日期: 2012-09-01)

(上接第 107 页)

- 2 Huang B, Zhao J, Li H, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance [J]. Cancer Res, 2005, 65: 5009—5014.
- 3 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335—376.
- 4 Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity [J]. J Mol Med, 2003, 81: 281—287.
- 5 Hahne M, Rimold D, Schroter M, et al. Melanoma cells expression of Fas (APO-1/CD95) ligand; implications for tumor immune escape [J]. Science, 1996, 274: 1363—1366.
- 6 Cui H, Sherr D H, el-Khatib M, et al. Regulation of T-cell death genes: selective inhibition of FasL-but not Fas-mediated function[J]. Cell Immunol, 1996, 167:

276—284.

- 7 Ayari C, Bergeron A, LaRue H, et al. Toll-like receptors in normal and malignant human bladders[J]. J Urol, 2011, 185: 1915—1921.
- 8 李杜渐, 杨宇如, 李响, 等. 单核细胞趋化因子及钟声蛋白样受体在卡介苗灌注膀胱局部抗肿瘤免疫反应中的表达[J]. 临床泌尿外科杂志, 2006, 21(11): 859—862.
- 9 Inman B A, Sebo T J, Frigola X, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression [J]. Cancer, 2007, 109: 1499—1505.

(收稿日期: 2012-09-23)