

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.011

LAP⁺ CD4⁺ T 细胞在结直肠癌肿瘤微环境中的分布情况及其临床意义

钟武¹, 江志远², 钟世彪², 张磊昌², 黄家豪², 张森², 陈利生², 曹云飞²(1. 赣州市人民医院 普外一科, 江西 赣州 341000; 2. 广西医科大学第一附属医院 结直肠肛门外科, 广西南宁 530021)

[摘要] **目的:** 检测 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞在结直肠癌患者肿瘤微环境中的分布情况, 分析其与 CD4⁺ CD25⁺ Treg 及患者临床病理特征的相关性, 初步探讨 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞在结直肠癌发生、发展中的作用。**方法:** 收集 2014 年 1 月至 2014 年 3 月期间广西医科大学第一附属医院结直肠肛门外科收治并行手术治疗的 50 例结直肠癌患者临床病理资料, 采集所有患者术前外周血、术中肿瘤组织和距离癌组织边缘 10 cm 以上的相应癌旁组织标本, 同时采集本科室 25 例健康志愿者外周血作为对照组; 流式细胞术检测各标本中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞和 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的分布比例, 比较结直肠癌患者与健康志愿者外周血中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞分布比例差异、结直肠癌肿瘤组织与相应癌旁组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞分布比例差异; 分析 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞和 CD4⁺ CD25⁺ Treg 与临床病理特征的相关性。**结果:** 50 例结直肠癌患者和 25 位健康志愿者外周血及组织标本 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞比例, 结直肠癌患者外周血[(9.44 ± 3.18)%] 高于正常人外周血[(1.49 ± 1.00)% , $P=0.000$], 结直肠癌患者肿瘤组织[(11.76 ± 3.74)%] 高于相应癌旁组织[(3.87 ± 1.64)% , $P=0.000$]; 其中肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞的分布比例最高。肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞与 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞成正相关($r=0.327$, $P=0.02$); LAP⁺ CD4⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例与肿瘤的 TNM 分期、远处转移及 CEA 水平相关($P<0.05$)。**结论:** LAP⁺ CD4⁺ T 细胞易聚集于结直肠癌肿瘤组织中, 可能参与了结直肠癌的发生、发展, 起到促进肿瘤生长、转移的作用。

[关键词] LAP⁺ CD4⁺ T 细胞; 调节性 T 细胞; 结直肠癌; 肿瘤微环境

[中图分类号] R735.3; R730.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)05-0612-07

Distribution of LAP⁺ CD4⁺ T cells in colorectal cancer microenvironment and its clinical significance

Zhong Wu¹, Jiang Zhiyuan², Zhong Shibiao², Zhang Leichang², Huang Jiahao², Zhang Sen², Chen Lisheng², Cao Yunfei
(1. Department of General Surgery, Ganzhou People's Hospital, Ganzhou 341000, Jiangxi, China; 2. Department of Colorectal and Anal Surgery, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** This study aimed: (1) to determine the distribution of LAP⁺ CD4⁺ T cells in the tumor microenvironment of colorectal cancer (CRC); (2) to analyze the associations of LAP⁺ CD4⁺ T cells with CD4⁺ CD25⁺ Treg and clinicopathological variables; and (3) to evaluate the role for LAP⁺ CD4⁺ T cells in CRC development and progression. **Methods:** Clinicopathologic data of 50 CRC patients who were hospitalized and received surgical treatment in the Colorectal and Anal Department of Guangxi Medical University-Affiliated First Hospital of between January, 2014 and March, 2014 were collected. Preoperative peripheral blood, intraoperative tumor tissue and corresponding para-carcinoma tissue (over 10 cm from the tumor margins) specimens were collected for all patients. Peripheral blood samples were collected from 25 healthy volunteers for the purpose of control. Proportions of LAP⁺ CD4⁺ T cells and CD4⁺ CD25⁺ Treg in all samples were determined by flow cytometry. Associations of LAP⁺ CD4⁺ T cells with CD4⁺ CD25⁺ Treg and clinicopathological variables were analyzed. **Results:** The proportion of LAP⁺ CD4⁺ T cells in the peripheral blood was significantly higher in CRC patients (9.44 ± 3.18%) than in healthy controls (1.49 ± 1.00%) ($P=0.000$), and was also significantly higher in tumor tissue (11.76 ± 3.74%) than in the corresponding para-carcinoma tissue (3.87 ± 1.64%) in CRC patients (P

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81260316); 广西研究生教育创新计划资助项目(No. YCBZ2014032)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81260316), and the Innovation Project of Guangxi Graduate Education(No. YCBZ2014032)

[作者简介] 钟武(1984-), 男, 江西省赣州市人, 博士生, 主要从事结直肠癌的基础与临床研究, E-mail: zhongwu0016@163.com

[通信作者] 曹云飞(Cao Yunfei, corresponding author), E-mail: caoyunfei126@126.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20151017.1632.014.html>

=0.000). LAP⁺CD4⁺T cells were positively correlated with CD4⁺CD25⁺Treg cells in tumor tissues ($r = 0.327$, $P = 0.02$) and also with TNM staging, distant metastasis and CEA levels ($P < 0.05$). **Conclusion:** LAP⁺CD4⁺T cells are prone to aggregate in the CRC tissue, thus promoting CRC growth and metastasis.

[**Key words**] LAP⁺CD4⁺T cells; regulatory T cells; colorectal cancer; tumor microenvironment

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 612-618]

肿瘤发生、发展的过程包含免疫系统中不同免疫细胞间及不同效应分子间复杂的反应,效应 T 细胞在抑制肿瘤的发生、发展中扮演着重要的角色^[1]。以往的研究^[2]显示,肿瘤微环境中的 T 细胞与恶性肿瘤患者的临床进程存在相关性,在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者中,高密度的肿瘤浸润记忆 T 细胞与低转移和低复发率相关,且有更高的生存率。另一方面,调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)和骨髓来源的抑制性细胞的升高及其迁徙至肿瘤微环境中起着阻碍抗肿瘤免疫和促进肿瘤生长的作用^[3,4]。潜伏相关多肽(latency-associated peptide, LAP)是一种与 TGF- β 氨基末端非共价结合的前肽,两者结合后产生一种潜态的 TGF- β 复合体, TGF- β 生物活性的激活需要该复合体的解离。最近,有报道^[5]称 LAP⁺CD4⁺T 细胞是一种新的抑制性细胞亚群,在体外可抑制效应 T 细胞的增殖,这些细胞通过 IL-10 和 TGF- β 介导其抑制作用。目前, LAP⁺CD4⁺T 细胞多局限于自身免疫性疾病中的研究,而在肿瘤中作用的研究少见报道^[6-7]。因此,本研究通过流式细胞术检测结直肠癌患者和健康志愿者外周血、肿瘤组织和相应癌旁组织中 LAP⁺CD4⁺T 细胞的分布情况,分析 LAP⁺CD4⁺T 细胞与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞及患者临床病理因素的相关性,初步探讨 LAP⁺CD4⁺T 细胞在结直肠癌肿瘤微环境中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2014 年 1 月至 2014 年 3 月广西医科大学第一附属医院结直肠肛门外科收治并行手术治疗的结直肠癌患者临床病理标本和资料,所有患者术后病理均明确诊断为结直肠癌;剔除结直肠癌术后复发和术前接受化疗、放疗或免疫治疗,以及存在自身免疫性及感染性疾病患者,共 50 例患者纳入本研究。其中男性 31 例、女性 19 例,结肠癌 22 例、直肠癌 28 例,年龄范围 26 ~ 77 岁,平均(58.4 ± 12.5)岁;按 TNM 分期: I + II 期 23 例, III + IV 27 例。采集 50 例患者术前外周血标本,术中采集新鲜结直肠癌组织及相应癌旁组织标本(距肿瘤 10 cm 结直肠

黏膜,病理明确切缘阴性)。另采集健康成年志愿者外周血标本 25 例,健康成人志愿者为本科室同期诊断为 II - III 期内痔住院患者,所有患者均行电子结肠镜检查排除结直肠疾病,查体问诊排除有肿瘤病史、自身免疫性疾病或感染性疾病患者,其中 II 期内痔 4 例、III 期内痔 21 例,年龄范围 24 ~ 71 岁,平均(56.5 ± 11.7)岁,与肠癌组比较 $P > 0.05$ 。本研究获得患者本人和家属同意并签署知情同意书,研究文案和程序获得本院伦理委员会审批。

1.2 主要试剂

75%、100% Ficoll-hypaque、DNA 酶、两性霉素 B、L-谷氨酰氨购自上海索莱宝生物科技有限公司,佛波醇乙酯(PMA)、Golgistop(蛋白质转运抑制剂)、透明质酸酶购自美国 Sigma 公司,胶原酶 IV 购自上海瑞齐生物科技有限公司,离子霉素(ionomycin)购自江苏碧云天公司,胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素购自诺亚药业有限公司,多聚甲醛剂购自江天化学品有限公司, Anti-Human LAP PE、Anti-Human CD4 FITC、Anti-Human CD25 APC 及同型抗体购自美国 eBioscience 公司。

1.3 流式细胞术检测结直肠癌患者和健康志愿者外周血中 LAP⁺CD4⁺T 淋巴细胞的水平

采集 3 ml 结直肠癌患者外周血于含肝素钠的抗凝管中。加 3 ml 100% 的 Ficoll-hypaque 于 15 ml 离心管中,沿管壁缓慢加入 3 ml 全血于淋巴细胞分离液上层,2 500 × g 离心 20 min,吸取中间云雾状层于 10 ml 离心管,加 PBS 3 ml 洗涤,1 500 × g 离心 10 min,弃上清,洗涤 2 次,注意保护沉淀。加 RPMI 1640 将细胞沉淀重悬,细胞计数,调整细胞密度为 2 × 10⁶/ml。每份标本分成 2 管(实验管和同型对照管),每管 400 μ l,混匀,实验管加入表面抗体 Anti-Human-LAP-PE 5 μ l、Anti-Human-CD4-FITC 5 μ l、Anti-Human-CD25-APC 5 μ l;同型对照管加入相应的同型抗体。室温,避光孵育 15 min。加 PBS 3 ml,2 100 × g 离心 5 min,弃上清,注意保护沉淀。沉淀加入 1% 多聚甲醛 400 μ l 重悬,过滤细胞悬液移入流式检测管,上流式仪检测。

1.4 流式细胞术检测结直肠癌组织及相应癌旁组织中 LAP⁺CD4⁺T 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例

选取结直肠癌组织及相应癌旁组织标本于 25 ml 烧杯中剪碎成 1 mm³ 大小组织碎块, 放入 10 ml 配置好的组织消化液中, 室温、磁力搅拌, 消化 2 h。消化后的细胞悬液用 100 目 + 200 目的不锈钢网过滤。滤液移入 15 ml 离心管中, 1 500 × g 离心 5 min, 弃上清。沉淀加 PBS 4 ml 重悬, 震荡, 混匀为细胞悬液。另取 15 ml 离心管, 依次加入 100%、75% 的 Ficoll-hypaque 各 2 ml, 倾斜离心管, 将 4 ml 细胞悬液沿管壁缓慢加入于上层。1 500 × g 离心 15 min, 吸取 100% 和 75% Ficoll-hypaque 两层之间云雾状细胞层于 10 ml 离心管, 加 PBS 3 ml, 1 500 × g 离心 10 min, 弃上清, 注意保护沉淀。沉淀加 RPMI 1640 重悬, 细胞计数, 调整密度至 2 × 10⁶/ml。每个标本分成 2 管(试验管和同型对照管), 每管 400 μl, 试验管加入表面抗体 Anti-Human-LAP-PE 5 μl; Anti-Human-CD4-FITC 5 μl、Anti-Human-CD25-APC 5 μl, 同型对照管加入相应的同型抗体室温, 避光孵育 15 min。加 PBS 3 ml, 2 100 × g 离心 5 min, 弃上清, 注意保护沉淀。沉淀加入 1% 多聚甲醛 400 μl 重悬, 悬液移入流式检测管上机检测。

1.5 统计学处理

采用 Flowjo 7.6.1 及 SPSS17.0 统计学软件分别对流式细胞术检测结果及实验数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以百分率表示, 非正态性检验采用非参数法 K-S 检验, 两组间的比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析, 相关性检验采用 Pearson 法, 所有检测均为双侧检验, 以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌患者外周血中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞占 CD4⁺ 淋巴细胞的比例显著增加

流式细胞术检测结果(图 1、2)显示, 与健康志愿者相比, 结直肠癌患者外周血中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例显著增加 [(9.44 ± 3.18)% vs (1.49 ± 1.00)% , *P* < 0.001]。

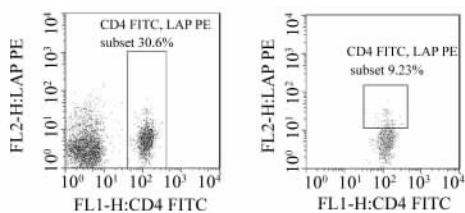


图 1 CRC 患者外周血中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴

细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例
Fig. 1 LAP⁺ CD4⁺ T/CD4⁺ T lymphocyte proportion in peripheral blood of CRC patients

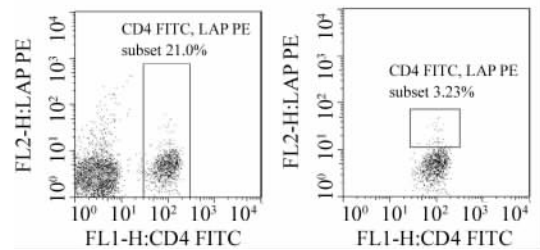


图 2 健康志愿者外周血中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例

Fig. 2 LAP⁺ CD4⁺ T/CD4⁺ T lymphocyte proportion in peripheral blood of healthy volunteers

2.2 结直肠癌患者肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例显著增加

流式细胞术检测结果(图 3、4)显示, 与相应癌旁组织相比, 结直肠癌患者肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例显著增加 [(11.76 ± 3.74)% vs (3.87 ± 1.64)% , *P* < 0.01]。

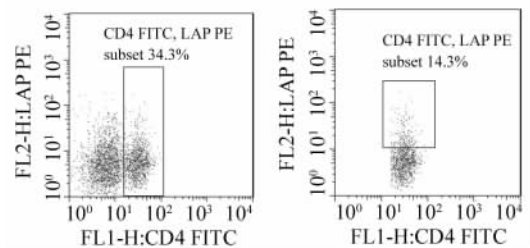


图 3 CRC 组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例

Fig. 3 LAP⁺ CD4⁺ T/CD4⁺ T lymphocyte proportion in CRC tissues

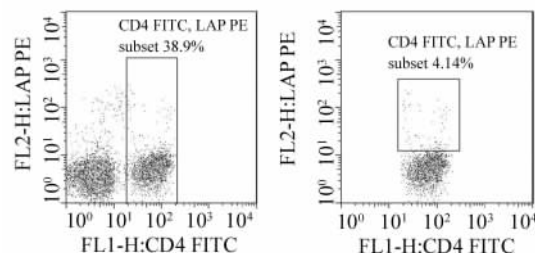


图 4 CRC 癌旁组织中 LAP⁺ CD4⁺ 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例

Fig. 4 LAP⁺ CD4⁺ T/CD4⁺ T lymphocyte proportion in CRC adjacent tissues

2.3 结直肠癌患者肿瘤微环境中 LAP⁺CD4⁺T 细胞的分布特征

流式细胞术检测结果(图5)显示,LAP⁺CD4⁺T 淋巴细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的比例大小依次为:肿瘤组织,CRC 外周血,相应癌旁组织,健康志愿者外周血,四组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

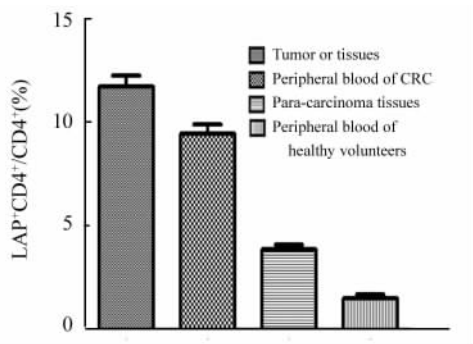


图5 不同标本中 LAP⁺CD4⁺T 占 CD4⁺T 淋巴细胞比例的比较

Fig. 5 Proportion of LAP⁺CD4⁺T/CD4⁺T cells among different specimens

2.4 肿瘤组织中 CD4⁺LAP⁺T 细胞与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞表达相关性

流式细胞术检测结果(图6)显示,肿瘤组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞占 CD4⁺T 淋巴细胞的比例为 (13.61 ± 5.86)% ;Pearson 相关性分析结果(图7)表明,在肿瘤组织中 LAP⁺CD4⁺T 细胞与 Treg 细胞的表达比例呈成正相关($r = 0.327, P = 0.02$)。

2.5 结直肠癌患者肿瘤组织中 LAP⁺CD4⁺T 细胞与临床病理因素的相关性分析

分析结果(表1)表明,LAP⁺CD4⁺T 淋巴细胞水平与 CRC 患者年龄、性别、肿瘤部位、病理类型、分化程度、肠梗阻及 CA-199 无相关性($P > 0.05$);与肿瘤的 TNM 分期、远处转移、CEA 水平相关($P < 0.05$)。

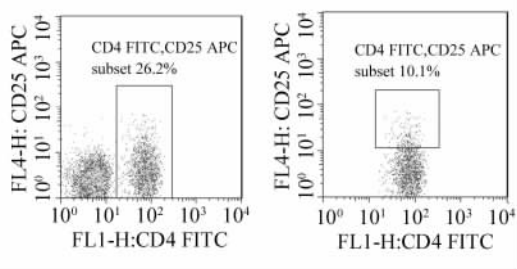


图6 CRC 肿瘤组织中 CD4⁺CD25⁺Treg 占

CD4⁺淋巴细胞比例

Fig. 6 CD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T lymphocyte proportion in CRC tumor tissues

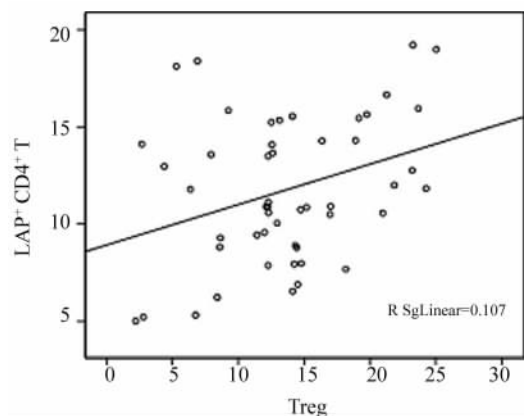


图7 LAP⁺CD4⁺T 细胞与 CD4⁺CD25⁺Treg 相关性分析

Fig. 7 Relationship between LAP⁺CD4⁺T cells and CD4⁺CD25⁺Treg

3 讨论

随着人们对肿瘤免疫机制的进一步深入研究,发现多种人类和动物恶性肿瘤模型的肿瘤组织中存在大量的免疫细胞浸润,这类细胞称之为肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)。1986年 Rosenberg 等^[8]首次从小鼠肿瘤中分离出 TIL,并发现 TIL 在体外具有特异性抗肿瘤作用,并且少量的 IL-2 可以扩增和维持其体内的抗肿瘤效应,回输扩增后的 TIL,可使小鼠原发灶和转移灶完全消退。多项研究^[9-11]表明,TIL 在肿瘤组织中的密度与肿瘤的浸润深度、转移和预后相关,具有显著的抗肿瘤作用。目前,TIL 过继免疫治疗已经进入了临床应用阶段,通过 IL-2 的刺激、体外培养扩增 TIL,再回输患者体内,发现过继 TIL 免疫治疗对恶性黑色素瘤有较好的疗效^[12]。然而,虽然过继 TIL 治疗取得了一定的疗效,但肿瘤最终都将发生进展的现实使人们认识到,在体内,可能存在某种机制使肿瘤细胞逃脱了免疫监视。目前,认为局部存在的免疫抑制性细胞亚群,例如调节性 T 细胞或髓源性抑制性细胞被认为是发生肿瘤相关性 T 细胞免疫耐受的主要的机制^[3-4]。越来越多的证据^[13]显示,TIL 是由多种来源的细胞组成,其中有效应型淋巴细胞,也有调节型淋巴细胞。Attig 等^[14]的研究发现,肾细胞癌肿瘤组织中存在两种类型的免疫细胞,一种为起着抗肿瘤作用的效应型 T 细胞,另一类则为具有抑制效应

T 细胞功能的调节性 T 细胞。目前研究的最多的调节性 T 细胞是 CD4⁺ CD25⁺ Treg, 其在自身免疫性疾病、炎症性疾病、器官移植和肿瘤等疾病的发生、发展中发挥重要的作用^[15-16]。国内外研究^[17-18]认为,

CD4⁺ CD25⁺ Treg 与机体肿瘤免疫耐受的形成、疾病的进展有关, 它通过抑制效应 T 细胞的增殖起到促进肿瘤生长、转移的作用。

表 1 结直肠肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T/CD4⁺ T 比值与患者临床病理特征的关系
Tab. 1 Correlations of LAP⁺ CD4⁺ T/CD4⁺ T ratio with clinicopathological features in CRC tissues

Feature	Case(n)	LAP ⁺ CD4 ⁺ /CD4 ⁺ (%)	t	P
Age(t/a)				
<60	29	11.15 ± 2.03	0.747	0.458
≥60	21	11.96 ± 4.51		
Sex				
Male	31	11.37 ± 3.24	0.444	0.659
Female	19	11.82 ± 3.89		
Site				
Colon	22	10.35 ± 3.45	0.652	0.517
Rectum	28	11.89 ± 3.17		
TNM stage				
I + II	23	8.45 ± 2.98	4.973	0.000
III + IV	27	14.90 ± 5.58		
Pathological type				
Tubular + papillary adenocarcinoma	43	11.09 ± 3.54	1.335	0.188
Mucinous + signet ring cell	7	12.83 ± 3.26		
Carcinoma differentiation degree				
High + moderate	42	10.50 ± 3.22	0.877	0.385
Low	8	12.43 ± 3.87		
Distant metastasis				
Yes	9	12.51 ± 4.17	4.322	0.000
No	41	7.85 ± 2.61		
Bowel obstruction				
Yes	9	12.22 ± 3.49	0.904	0.470
No	41	11.15 ± 3.14		
CEA				
≤5 ng/ml	34	9.94 ± 3.15	2.692	0.010
>5 ng/ml	16	13.13 ± 4.06		
CA199				
≤37 U/ml	32	11.34 ± 3.21	0.854	0.370
>37 U/ml	18	12.42 ± 4.35		

2010 年 Gandhi 等^[5,19]在健康人体内发现了一种新型的抑制性细胞亚群 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞, 并且其抑制能力要比传统的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 高 50 倍。因此, 笔者设想这种新型的调节性 T 细胞是否和传统的 CD4⁺ CD25⁺ Treg 一样与肿瘤的进展转移密切

相关。本研究通过流式细胞术分析了 LAP⁺ CD4⁺ T 淋巴细胞在结直肠癌患者体内的分布情况, 结果显示, 结直肠癌患者外周血 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞的分布比例显示高于健康志愿者外周血(P < 0.05); 肿瘤组织中 LAP⁺ CD4⁺ T 细胞的分布比例也显著高于相

应癌旁组织($P < 0.05$);结直肠癌患者肿瘤组织也显著要高于 CRC 外周血及其他组织($P < 0.05$),这表明 LAP⁺CD4⁺T 细胞易被趋化至肿瘤组织并在局部富集。同时,本实验还分析了 LAP⁺CD4⁺T 细胞分布比例与临床病理因素的相关性,发现 LAP⁺CD4⁺T 细胞分布比例与肿瘤分期及远处转移呈正相关。以上结果表明,LAP⁺CD4⁺T 细胞可能与传统的 CD4⁺CD25⁺Treg 一样在结直肠癌的进展、转移中发挥着重要作用。

CEA 是结直肠癌的经典肿瘤标志物,与结直肠癌的预后相关,也是监测转移性结直肠癌患者系统治疗后的效果和术后复发的标志物。本研究结果显示,结直肠癌患者肿瘤组织中 LAP⁺CD4⁺T 细胞比例与血清 CEA 水平呈正相关,因此,LAP⁺CD4⁺T 细胞同 CEA 一样可能为患者预后不良的标志物,作为术后监测的指标之一。值得注意的是,我们将 LAP⁺CD4⁺T 细胞比例与结直肠癌的另一肿瘤标志物 CA-199 进行相关性分析,发现两者间无明显相关性。关于 LAP⁺CD4⁺T 细胞与肿瘤标志物相关性的具体机制尚不明确,有待于进一步的研究证实。

以上结果表明,LAP⁺CD4⁺T 细胞分布格局的改变在结直肠癌的发生、发展中起重要作用,其比例增高是抑制机体产生有效的抗肿瘤免疫应答,最终导致肿瘤的免疫逃逸,使肿瘤进行性生长的因素之一。下调 LAP⁺CD4⁺T 细胞的表达可能有助于提高机体抗肿瘤免疫,减轻肿瘤负荷。同时,对患者外周血及肿瘤浸润淋巴细胞中 LAP⁺CD4⁺T 细胞比例的分析亦有助于判断肿瘤患者的预后及转归,为结直肠癌的生物免疫治疗方案的制定提供参考。

此外,对 LAP⁺CD4⁺T 细胞与 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞进行相关性分析,结果显示,两者呈正相关。在变态反应性脑脊髓炎动物模型中 LAP⁺CD4⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺Treg 在血液、淋巴结及脾脏组织中的表达均升高^[20]。有研究^[5,20]认为,LAP⁺CD4⁺T 细胞和 CD4⁺CD25⁺Foxp3 都可分泌大量的 TGF- β ,而 TGF- β 已经被证实能在一些疾病中能够调节 CD4⁺CD25⁺Treg 的免疫抑制作用,调节性 T 细胞膜表面的结合 LAP 能与 TGF- β 相互作用,将 TGF- β 前体转化成具有活性的 TGF- β ,发挥对 Treg 的免疫调节作用。Zhang 等^[21]将 LAP⁺CD4⁺T 细胞分别与 CD4⁺CD25⁺Treg 和 CD4⁺CD25⁻T 细胞在 anti-CD3 抗体等细胞因子刺激下共培养,发现 LAP⁺CD4⁺T 细胞不仅具有抑制 CD4⁺CD25⁻T 细胞增殖的作用,还能够诱导和扩大 CD4⁺CD25⁺Treg 的数量。同时,TGF- β 1 是诱导 Treg 产生的一个重要细胞因子,

Marie 等^[22]的动物实验结果显示,TGF- β 1 能诱导 Treg 产生。Liu 等^[23]的体外实验显示,肾癌细胞系和前列腺癌细胞系分泌的 TGF- β 1 能诱导鼠的脾 CD4⁺CD25⁻T 细胞转化为 Treg。因此,本实验结果表明,LAP⁺CD4⁺T 细胞可能与 CD4⁺CD25⁺Treg 一起,共同参与了结直肠癌的发生、发展,两者之间相互联系,相互影响。

综上,在结直肠癌局部肿瘤微环境中 LAP⁺CD4⁺T 细胞比例的升高,可能控制着机体对肿瘤的免疫应答反应,促进了肿瘤的进展、转移。因此,在未来的免疫治疗中,应充分考虑通过控制肿瘤微环境中 LAP⁺CD4⁺T 细胞的活性或比例,来达到增强抗肿瘤免疫应答的目的,这为肿瘤的免疫治疗策略提供了新的思路,但 LAP⁺CD4⁺T 细胞在肿瘤微环境中的具体免疫抑制作用机制仍不明确,还有待于进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoeediting [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22: 329-360.
- [2] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome [J]. *Science*, 2006, 313(5795): 1960-1964.
- [3] Gandhi R, Anderson DE, Weiner HL. Cutting edge: immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF- β -dependent manner [J]. *J Immunol*, 2007, 178(7): 4017-4021.
- [4] Betts G, Jones E, Junaid S, et al. Suppression of tumour-specific CD4⁺ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer [J]. *Gut*, 2012, 61(8): 1163-1171.
- [5] Gandhi R, Farez MF, Wang Y, et al. Cutting edge: human latency-associated peptide⁺ T cells: a novel regulatory T cell subset [J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 4620-4624.
- [6] Wu HY, Maron R, Tukuph AM, et al. Mucosal anti-CD3 monoclonal antibody attenuates collagen-induced arthritis that is associated with induction of LAP⁺ regulatory T cells and is enhanced by administration of an emulsome-based Th2-skewing adjuvant [J]. *J Immunol*, 2010, 185(6): 3401-3407.
- [7] Wu HY, Center EM, Tsokos GC, et al. Suppression of murine SLE by oral anti-CD3: inducible CD4⁺CD25⁺LAP⁺ regulatory T cells control the expansion of IL-17⁺ follicular helper T cells [J]. *Lupus*, 2009, 18(7): 586-596.
- [8] Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *Science*, 1986, 233(4770): 1318-1321.
- [9] Liao Y, Ou J, Deng J, et al. Clinical implications of the tumor-infiltrating lymphocyte subsets in colorectal cancer [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 727.
- [10] Bland KI. Survival prediction for patients with colorectal carcinoma incorporating tumor-infiltrating lymphocyte grade [J]. *Arch Surg*,

- 2012, 147(4): 371-372.
- [11] Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(21): 2678-2683.
- [12] Sim GC, Chacon J, Haymaker C, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte therapy for melanoma; rationale and issues for further clinical development [J]. *BioDrugs*, 2014, 28(5): 421-437.
- [13] Ferrone C, Dranoff G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(26): 4045-4051.
- [14] Attig S, Hennenlotter J, Pawelec G, et al. Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(21): 8412-8419.
- [15] Guzmán-Flores JM, Portales-Pérez DP. Mechanisms of suppression of regulatory T-cells (Treg) [J]. *Gac Med Mex*, 2013, 149(6): 630-638.
- [16] Miao CH. Immunomodulation for inhibitors in hemophilia A: the important role of Treg cells [J]. *Expert Rev Hematol*, 2010, 3(4): 469-483.
- [17] Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(4): 327-334.
- [18] Whiteside TL, Mandapathil M, Szczepanski M, et al. Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs [J]. *Bull Cancer*, 2011, 98(2): E25-31.
- [19] Scurr M, Ladell K, Besneux M, et al. Highly prevalent colorectal cancer-infiltrating LAP⁺ Foxp3⁻ T cells exhibit more potent immunosuppressive activity than Foxp3⁺ regulatory T cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(2): 428-439.
- [20] Chen ML, Yan BS, Bando Y, et al. Latency-associated peptide identifies a novel CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell subset with TGF-beta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Immunol*, 2008, 180(11): 7327-7337.
- [21] Zhang X, Reddy J, Ochi H, et al. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent and associated with increases in CD4⁺ LAP⁺ and CD4⁺ CD25⁺ T cells [J]. *Int Immunol*, 2006, 18(4): 495-503.
- [22] Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, et al. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(7): 1061-1067.
- [23] Liu VC, Wong LY, Jang T, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4⁺ CD25⁻ T cells into CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta [J]. *J Immunol*, 2007, 178(5): 2883-2892.
- [收稿日期] 2015-04-22 [修回日期] 2015-08-10
- [本文编辑] 阮芳铭

· 科技动态 ·

m⁶A 修饰参与调控初级 microRNA 的加工剪切

m⁶A 修饰是广泛存在于真核高等生物的 RNA 上,特别是在 mRNA 上,该修饰主要存在于 mRNA 的 CDS 区的 3'-UTR 区,特别是终止密码子附近区域,其广泛参与了 RNA 代谢的各种生物学过程,包括 RNA 剪接、RNA 出核、RNA 与蛋白相互作用和 RNA 降解等。

miRNA 成熟的第一步就是由加工复合体(RNA 结合蛋白 DGCR8 和 RNA 酶 DROSHA)介导的初级 microRNA 的剪切。该剪切过程首先需要 DGCR8 识别初级 miRNA 发夹结构中的单链 RNA,从而招募 DROSHA 酶对双链 RNA 剪切成前体 miRNA。虽然初级 miRNA 剪切加工的机制已经很明确,但 DGCR8 特异性识别并结合初级 miRNA(相对于转录子中的其他二级结构)的机制尚不清楚。该研究首先通过信息学分析发现初级 miRNA 上存在 m⁶A 修饰的保守序列 GGAC,而前体 miRNA 上却不存在该序列,通过 m⁶A 抗体免疫共沉淀测序实验证实初级 miRNA 的近端确实存在 m⁶A 修饰,而这种修饰是由 m⁶A 甲基化转移酶 METTL3 所介导的,并且该修饰在 100 多种物种中保守的初级 miRNA 上均存在。在乳腺癌细胞系中干扰 METTL3 后,发现绝大部分成熟的 miRNA 表达量显著降低,由于累积,相应的初级 miRNA 表达却显著升高,提示 METTL3 是初级 miRNA 有效剪切加工所必需的。为了证明 m⁶A 修饰在初级 miRNA 中的直接作用,作者通过体外剪切实验证实,发生了 m⁶A 修饰的体外转录的初级 miRNA 剪切效率明显高于没有发生 m⁶A 修饰的初级 miRNA。当初级 miRNA 上的 m⁶A 修饰位点突变后,其剪切效率明显降低,表明初级 miRNA 上的 m⁶A 修饰对其剪切加工非常重要。随后对 m⁶A 修饰影响初级 miRNA 剪切加工的机制做了进一步的探讨,发现 METTL3 能与 DGCR8 结合,该结合依赖 RNA 的存在。进一步研究发现 DGCR8 在体内能与发生了 m⁶A 修饰的初级 miRNA 结合,当干扰了 METTL3 后,DGCR8 结合的初级 miRNA 的量就显著减少,而 DGCR8 却不能特异性地识别 m⁶A 修饰,表明 DGCR8 是通过一种未知的 m⁶A 结合蛋白来特异性识别 m⁶A 修饰的初级 miRNA。

综上所述,该研究发现了 m⁶A 修饰是 miRNA 剪切加工过程中非常关键的转录后修饰。当 METTL3 对基因间或基因内的初级 miRNA 发生 m⁶A 修饰后,该修饰能被某未知的 m⁶A 结合蛋白特异性地识别,从而招募加工复合体(DGCR8 和 DROSHA)结合到初级 miRNA 的特异性位点,避免复合体错误地结合到其他相似的 RNA 二级结构上,从而启动初级 miRNA 的剪切加工。但该过程中特异识别 m⁶A 修饰的蛋白还未知,同时在细胞核或细胞质中发现并鉴定特异性识别 m⁶A 修饰的蛋白,仍然

是这个领域研究的重点和难点。

[郑青亮 摘译, 侯晋 审阅. Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, et al. *Nature*, 2015, 519(7544): 482-485.]