

· 基础研究 ·

## CCR8在卵巢癌浸润性Treg上的表达与意义

陶子琦<sup>1,2</sup>, 茅晔鹏<sup>1,2</sup>, 刘书娜<sup>1,2</sup>, 娄鉴芳<sup>1,2</sup>, 付鑫<sup>1,2</sup>, 张磊<sup>1,2</sup>, 严丽娜<sup>1,2,3</sup>, 王婷<sup>1,2</sup>, 王芳<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院检验学部, <sup>2</sup>国家医学检验临床医学研究中心分中心, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>南京市妇幼保健院妇科, 江苏 南京 210004

**[摘要]** 目的:分析趋化因子受体8(C-C motif chemokine receptor 8, CCR8)在卵巢癌肿瘤浸润性调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)中的表达,探讨CCR8对Treg分化的作用。方法:构建C57BL/6小鼠卵巢癌细胞ID8荷瘤模型;流式细胞术检测小鼠肿瘤组织、脾脏和外周血中Treg上CCR8的表达比例,CCR8<sup>+</sup>Treg上免疫检查点相关蛋白程序性细胞死亡蛋白1(programmed cell death protein 1, PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CTLA-4)、可诱导的T细胞共刺激分子(inducible T cell costimulators, ICOS)、淋巴细胞激活基因3(lymphocyte activation gene 3, LAG-3)的表达;流式细胞术检测CCR8变构抑制剂AZ084加入前后对C57BL/6小鼠脾脏中初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Treg分化的影响。结果:卵巢癌荷瘤小鼠肿瘤中Treg上的CCR8表达相比脾脏、外周血的Treg显著增高;相比CCR8<sup>-</sup>Treg, CCR8<sup>+</sup>Treg上免疫检查点相关蛋白表达更高;AZ084有效抑制小鼠脾脏中初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Treg的分化。结论:CCR8<sup>+</sup>Treg在肿瘤浸润性Treg中占主要比例,CCR8作为卵巢癌浸润性Treg的主要标志物,变构CCR8蛋白可以抑制Treg的分化。靶向消除CCR8<sup>+</sup>Treg可为改善卵巢癌肿瘤微环境的免疫抑制状态提供新思路。

**[关键词]** 卵巢癌;趋化因子受体8;调节性T细胞;趋化因子

**[中图分类号]** R737.31

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)03-305-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN230821

### Expression and significance of CCR8 on tumor-infiltrating Treg cells in ovarian cancer

TAO Ziqi<sup>1,2</sup>, MAO Yepeng<sup>1,2</sup>, LIU Shu'na<sup>1,2</sup>, LOU Jianfang<sup>1,2</sup>, FU Xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>1,2</sup>, YAN Li'na<sup>1,2,3</sup>, WANG Ting<sup>1,2</sup>, WANG Fang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, <sup>2</sup>Branch of National Clinical Research Center for Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Gynaecology, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210004, China

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the expression of C-C motif chemokine receptor 8 (CCR8) in tumor-infiltrating regulatory T (Treg) cells in ovarian cancer and to investigate the role of CCR8 in Treg cell differentiation. **Methods:** An ID8 ovarian cancer cell-bearing model was established in C57BL/6 mice. The flow cytometry was used to detect the expression proportion of CCR8 on Treg in mouse tumor tissues, spleens and peripheral blood, and the expression levels of programmed cell death protein 1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), inducible T-cell costimulator (ICOS) and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) on CCR8<sup>+</sup>Treg cells. The flow cytometry was also used to detect the changes in the differentiation ratio of naive CD4<sup>+</sup>T cells to Treg cells in the spleens of C57BL/6 mice before and after the addition of the CCR8 conformational inhibitor AZ084. **Results:** The expression of CCR8 on Treg cells in the tumors of ovarian cancer-bearing mice was significantly higher, compared with that in the spleens and peripheral blood. Compared with CCR8<sup>-</sup>Treg cells, CCR8<sup>+</sup>Treg cells also had a higher expression of immune checkpoint related proteins. AZ084 effectively inhibited the differentiation of naive CD4<sup>+</sup>T cells into Treg cells in the mouse spleens. **Conclusion:** CCR8<sup>+</sup>Treg cells constitute the major proportion of tumor-infiltrating Treg cells, and CCR8 acts as a primary marker of ovarian cancer-infiltrating Treg cells. Conformational modulation of the CCR8 protein can inhibit the differentiation ratio of Treg cells. The targeted elimination of

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82273199);江苏省自然科学基金(BK20221417)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangfang@njmu.edu.cn

CCR8<sup>+</sup> Treg cells may provide new insights for improving the immunosuppressive state of tumor microenvironment in ovarian cancer.

[Key words] ovarian cancer; C-C motif chemokine receptor 8; regulatory T cell; chemokine

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(03): 305-312]

卵巢癌是最致命的妇科恶性肿瘤,由于其发病隐匿,进展迅速,且缺乏有效的早期筛查手段,多数患者确诊时已为晚期。虽然免疫治疗是卵巢癌治疗的一个有前途的新领域,多种有希望的免疫治疗手段已被研发,但仍然需要克服免疫抑制性肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)以提高免疫治疗的疗效<sup>[1-3]</sup>。TME中的免疫抑制是促进肿瘤生长与转移最为重要的前提条件之一,是肿瘤免疫治疗的主要障碍之一<sup>[4]</sup>。免疫抑制性细胞及抑制因子是肿瘤免疫抑制微环境的重要组成部分,调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是其中的重要一员,通过不依赖于细胞接触(分泌抑制性细胞因子)或依赖于细胞接触(调节抗原呈递细胞功能和介导靶细胞的溶解或凋亡)的机制发挥免疫抑制功能,阻碍肿瘤特异性免疫反应<sup>[5-7]</sup>。趋化因子-趋化因子受体(C-C motif chemokine receptor, CCR)信号介导的募集作用是肿瘤内Treg浸润的主要机制。研究显示有多个CCR通过与趋化因子配体(chemokine ligand, CCL)的结合,如CCR4-CCL17/22、CCR5-CCL5、CCR8-CCL1/18和CCR10-CCL28等,参与招募Treg到TME<sup>[8-11]</sup>。与正常组织驻留及外周Treg相比,人肺癌、乳腺癌及大肠癌等肿瘤浸润性Treg上选择性高表达CCR8<sup>[12]</sup>。而CCR8在卵巢癌肿瘤浸润性Treg上是否高表达,CCR8<sup>+</sup> Treg是否是卵巢癌肿瘤浸润Treg的主要类型,相关问题尚未明确。因此,本研究以小鼠卵巢上皮癌细胞ID8构建的卵巢癌荷瘤C57BL/6小鼠模型为对象,分析CCR8在卵巢癌肿瘤浸润性Treg中的表达,及其对Treg分化的作用。

## 1 对象和方法

### 1.1 材料

C57BL/6小鼠卵巢上皮癌细胞ID8(深圳豪泰生物公司);胎牛血清(杭州四季青公司);青霉素-链霉素溶液、红细胞裂解液和DMSO溶液(上海碧云天生物公司);高浓度基质胶(南京优宁维生物公司);RPMI 1640培养基(Hyclone公司,美国),X-Vivo 15培养基(Lonza公司,瑞士);小鼠初始CD4<sup>+</sup> T Cell提取磁珠(Miltenyi公司,德国);AZ084(Med Chem Express公司,美国);CD3e单抗、CD28单抗(eBiosci-

ence公司,美国);重组鼠IL-2(Peptide公司,美国);TGF- $\beta$ (R&D公司,美国);PE/Cyanine7标记的抗小鼠CD45、Brilliant Violet 510标记的抗小鼠CD3、FITC标记的抗小鼠CD4、PE标记的抗小鼠Foxp3、Brilliant Violet 421标记的抗小鼠CCR8、APC标记的抗小鼠细胞毒性T淋巴细胞抗原4(cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, CTLA-4)、APC标记的抗小鼠程序性细胞死亡蛋白1(programmed cell death protein 1, PD1)、APC标记的抗小鼠淋巴细胞激活基因3(lymphocyte-activation gene 3, LAG-3)、APC标记的抗小鼠可诱导的T细胞共刺激分子(inducible T cell costimulator, ICOS)等流式抗体(Biolegend公司,美国);IV型胶原酶(Gibco公司,美国);Percoll细胞分离液、透明质酸酶、DNA酶I、谷氨酰胺(Sigma公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 TCGA数据库、GTEx数据库分析

下载426例TCGA数据库中上皮性卵巢癌组织(<https://portal.gdc.cancer.gov>)与88例GTEx数据库中卵巢正常组织(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)的RNA-seq数据,以 $\log_2$ TPMI>1和 $P < 0.05$ 为显著差异标准对趋化因子CCL1、CCL18作差异分析,并基于R包-GSVA[1.46.0]中提供的ssGSEA算法,计算各类免疫细胞:Treg、中性粒细胞、B细胞、肥大细胞、Th17细胞、Tgd细胞的浸润比例,使用Spearman统计方法分析基因CCR8[ENSG00000179934.7]与各免疫细胞的相关性,使用R包-ggplot2[3.3.6]对分析结果进行可视化。

#### 1.2.2 小鼠皮下成瘤实验

本动物实验获得南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准(IACUC-2303001)。20只C57BL/6小鼠购自南京集萃药康生物科技公司。5 $\times 10^6$ 个ID8细胞在复苏后经过3次传代培养,制备成100  $\mu$ L细胞悬液,同时添加100  $\mu$ L 20 mg/mL胶原蛋白的高浓度基质胶悬液,混匀后接种在小鼠腋下至侧腹的皮下部位,接种之后,小鼠仍置于SPF环境继续生长21 d后CO<sub>2</sub>窒息处死,取脾脏、肿瘤组织、外周血样本。

#### 1.2.3 小鼠样本处理

将脾脏组织碾磨后制备成单细胞悬液,使用红

细胞裂解液分别分离出脾脏和外周血样本中的单个核细胞。将新鲜的小鼠皮下卵巢肿瘤组织剪成 $1\text{ mm}^3$ 的小块,在配制的原代组织消化液[RPMI-1640培养基+胶原酶IV( $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ )+透明质酸酶( $100\text{ ng/mL}$ )+DNA酶I( $50\text{ U/mL}$ )+谷氨酰胺( $1\text{ mmol/L}$ )+1%青霉素-链霉素溶液]中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化1 h后 $40\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤,将过滤后细胞悬液使用70% Percoll、30% Percoll梯度离心,得到单个核细胞悬液。

#### 1.2.4 流式检测小鼠样本中Treg细胞上CCR8以及免疫检查点相关蛋白的比例

将小鼠脾脏、外周血、肿瘤组织的单个核细胞悬液铺在流式管底,加入PE/Cyanine7标记的抗小鼠CD45、Brilliant Violet 510标记的抗小鼠CD3、FITC标记的抗小鼠CD4、PE标记的抗小鼠Foxp3、Brilliant Violet 421标记的抗小鼠CCR8、APC标记的抗小鼠CTLA-4、APC标记的抗小鼠PDI、APC标记的抗小鼠LAG-3、APC标记的抗小鼠ICOS等流式抗体,经孵育、破核、洗涤、固定后使用Beckman Cytoflex流式仪进行检测。

#### 1.2.5 体外诱导小鼠Treg细胞实验

雌性C57BL/6小鼠,6~8周龄,体重 $18\sim 20\text{ g}$ 。2%戊巴比妥麻醉小鼠,无菌操作下取脾脏,碾磨匀浆分离脾脏细胞,裂解红细胞后得到单个核细胞,以磁珠提取初始 $\text{CD4}^+$ T细胞。圆底96孔板以 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ CD3单抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 包被过夜后,加入 $15\text{ ng/mL}$ hTGF- $\beta$ 、 $30\text{ U/mL}$ 鼠IL-2、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ CD28单抗,将初始 $\text{CD4}^+$ T细胞以X-Vivo 15培养基调至 $1\times 10^6$ 个/mL铺在圆底96孔板中,隔天半定量换液并传代。AZ084是一种强效的CCR8变构拮抗剂,其 $\text{K}_i$ 值为 $0.9\text{ nmol/L}$ ,以DMSO作为溶剂溶解 $10\text{ mg}$ AZ084粉末,将其制备为AZ084储存液( $5\text{ mmol/L}$ )。依据不同处理方式分为AZ084组、DMSO组与MOCK组。AZ084组在诱导过程中每日加入 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的CCR8变构拮抗剂AZ084,DMSO组在诱导过程中每日加入与AZ084组同体积的DMSO溶液,MOCK组为空白对照,只诱导分化不做其他任何处理。诱导培养3~5 d,流式检测 $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ Treg细胞的比例。

#### 1.3 统计学方法

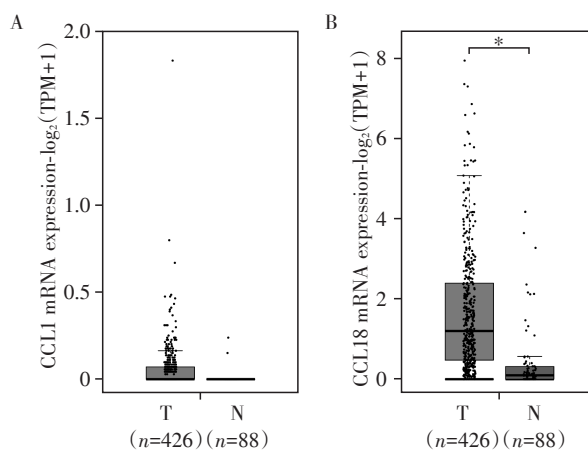
所有数据使用SPSS 25.0统计软件进行数据分析,各组数据均以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间的比较,符合正态分布的数据用独立样本 $t$ 检验,多组间比较用单因素方差分析,非正态性分布数据采用Mann-Whitney检验。 $P<0.05$ 为差异有统

计学意义。

## 2 结果

### 2.1 趋化因子CCL18在卵巢癌与癌旁组织中的表达存在显著差异

利用TCGA与GTEX公共数据库获取上皮性卵巢癌组织以及卵巢正常组织的RNA-seq数据,分析CCL1 mRNA与CCL18 mRNA在卵巢癌中的表达情况,发现CCL1基因在人类卵巢癌组织( $n=426$ )与卵巢正常组织( $n=88$ )中无明显差异(图1A),CCL18基因在人类卵巢癌组织中显著上调(非配对样本, $P<0.05$ ,图1B)。同时对CCL1、CCL18的受体CCR8作免疫浸润分析与Spearman相关性分析,绘制棒棒糖图(图2),结果显示CCR8基因与卵巢癌浸润的Treg细胞具有高相关性( $R=0.592$ , $P<0.05$ )。



A: Chemokine CCL1 mRNA expression in epithelial ovarian cancer tissues of TCGA (T group,  $n=426$ ) and normal ovarian tissues of GTEX (N group,  $n=88$ ). B: Chemokine CCL18 mRNA expression in epithelial ovarian cancer tissues of TCGA (T group,  $n=426$ ) and normal ovarian tissues of GTEX (N group,  $n=88$ ),  $P<0.05$ .

图1 趋化因子CCL1和CCL18 mRNA在TCGA上皮性卵巢癌组织数据集和GTEX卵巢正常组织数据集中的表达水平

Figure 1 Chemokine mRNA expressions of CCL1 and CCL18 in epithelial ovarian cancer tissues of TCGA and normal ovarian tissues of GTEX

### 2.2 CCR8及免疫检查点相关蛋白PD-1、CTLA-4、LAG-3、ICOS在卵巢癌小鼠模型的肿瘤组织、外周血及脾脏中Treg上的表达情况

采用 $\text{CO}_2$ 窒息法处死8例C57BL/6卵巢癌荷瘤小鼠,对其皮下瘤模型进行瘤体大小测量,根据公式 $V=1/2\times a\times b^2$ ( $a$ 为长轴, $b$ 为短轴)计算得出肿瘤体积为 $800\sim 1\ 200\text{ mm}^3$ (图3)。采用流式细胞术(图4)

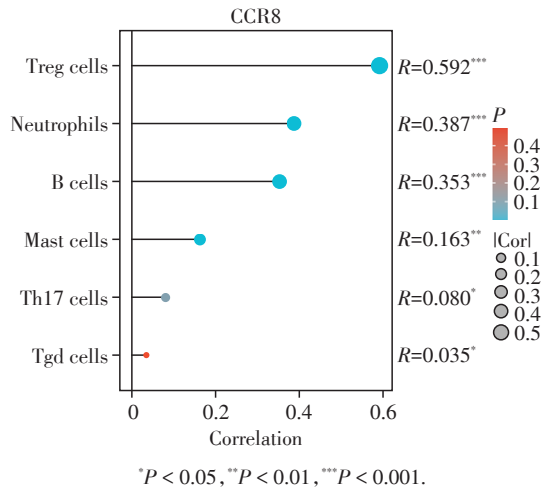


图2 人卵巢癌免疫细胞与CCR8基因的Spearman相关性分析

Figure 2 Spearman correlation analysis between the CCR8 gene expression and immune cell infiltration in human ovarian cancer

检测8例荷瘤小鼠的肿瘤组织(图5)、外周血(图6)、脾脏(图7)的单个核细胞悬液中Treg细胞上的CCR8表达,结果显示小鼠肿瘤浸润性的CCR8<sup>+</sup>Treg占总Treg的比例为(74.3±13.2)%,而在小鼠脾脏、外周血中分别为(44.0±8.5)%、(16.9±7.8)%,小鼠肿瘤中浸润性CCR8<sup>+</sup>Treg占总Treg的比例显著高于小鼠脾脏、外周血。小鼠外周血、脾脏、肿瘤中浸润性CCR8<sup>+</sup>Treg中PD-1<sup>+</sup>细胞亚群的比例分别为(16.4±8.8)%、(50.0±16.4)%、(80.0±12.4)%,LAG-3<sup>+</sup>细胞亚群的比例分别为(11.3±6.9)%、(19.6±11.7)%、(74.0±8.7)%,ICOS<sup>+</sup>细胞亚群的比例分别为(18.3±10.5)%、(20.9±7.5)%、(72.3±6.8)%,CTLA-4<sup>+</sup>细胞亚群的比例分别为(13.5±6.7)%、(26.1±16.9)%、(49.1±15.7)%。小鼠肿瘤浸润性CCR8<sup>+</sup>Treg中PD-1<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>、ICOS<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>细胞亚群的比例显著高于脾脏和外周血(Mann-Whitney检验,  $P < 0.05$ , 图8)。

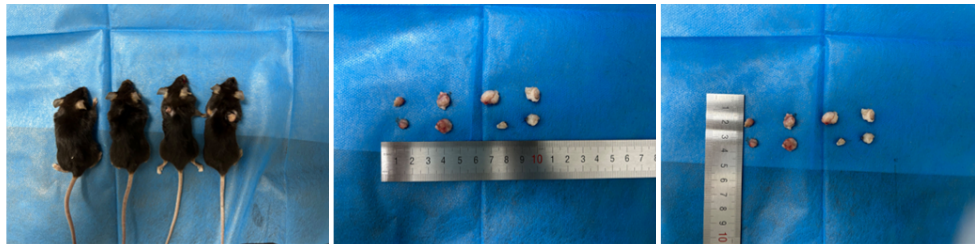
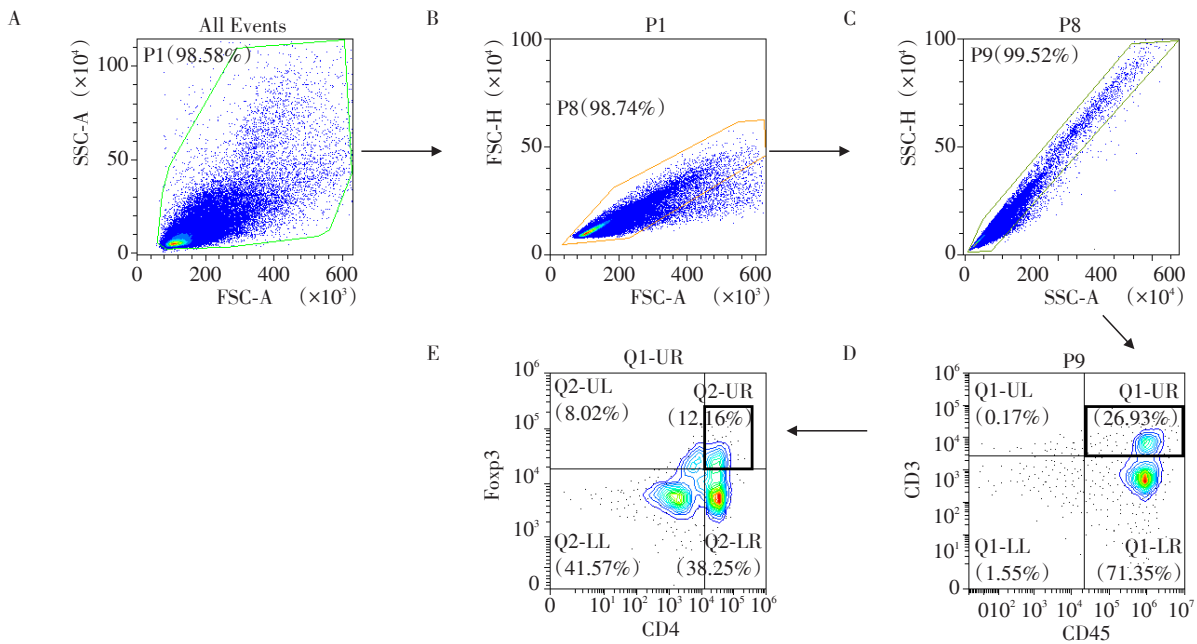


图3 C57BL/6小鼠卵巢癌皮下瘤代表图

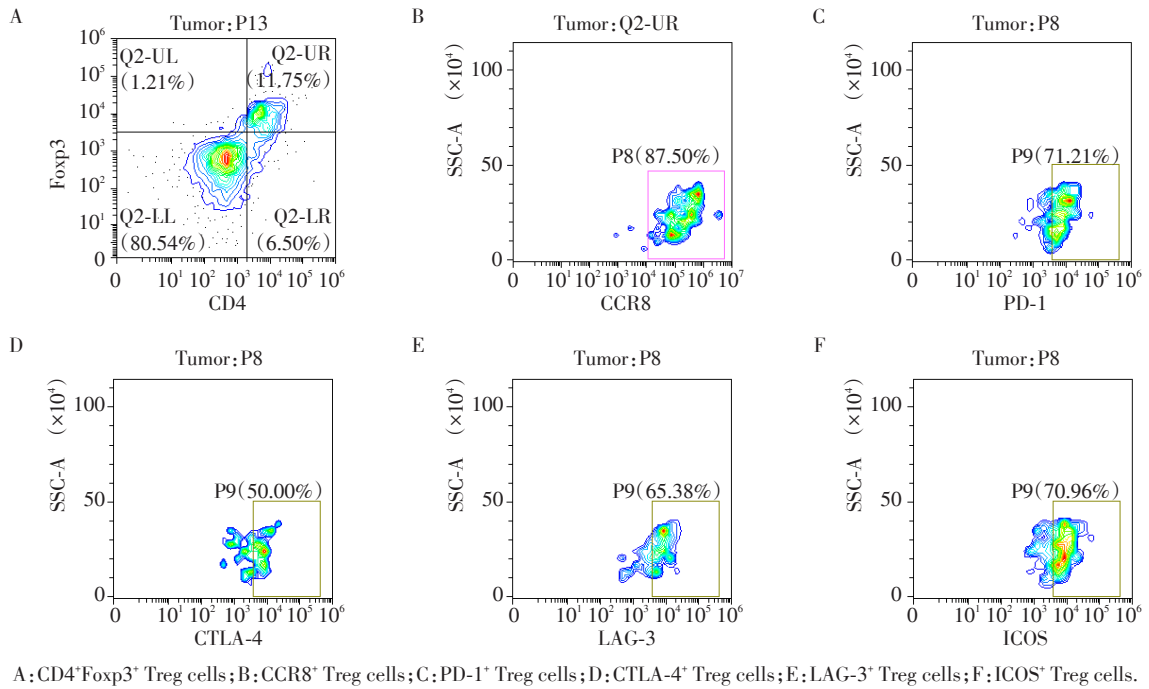
Figure 3 Representative images of subcutaneous tumors in C57BL/6 mice of ovarian cancer



A: Lymphocytes; B: Sing cells(FSC); C: Single cells(SSC); D: CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T cells; E: CD4<sup>+</sup>Fopx3<sup>+</sup>Treg cells.

图4 小鼠模型来源样本流式细胞术检测方案

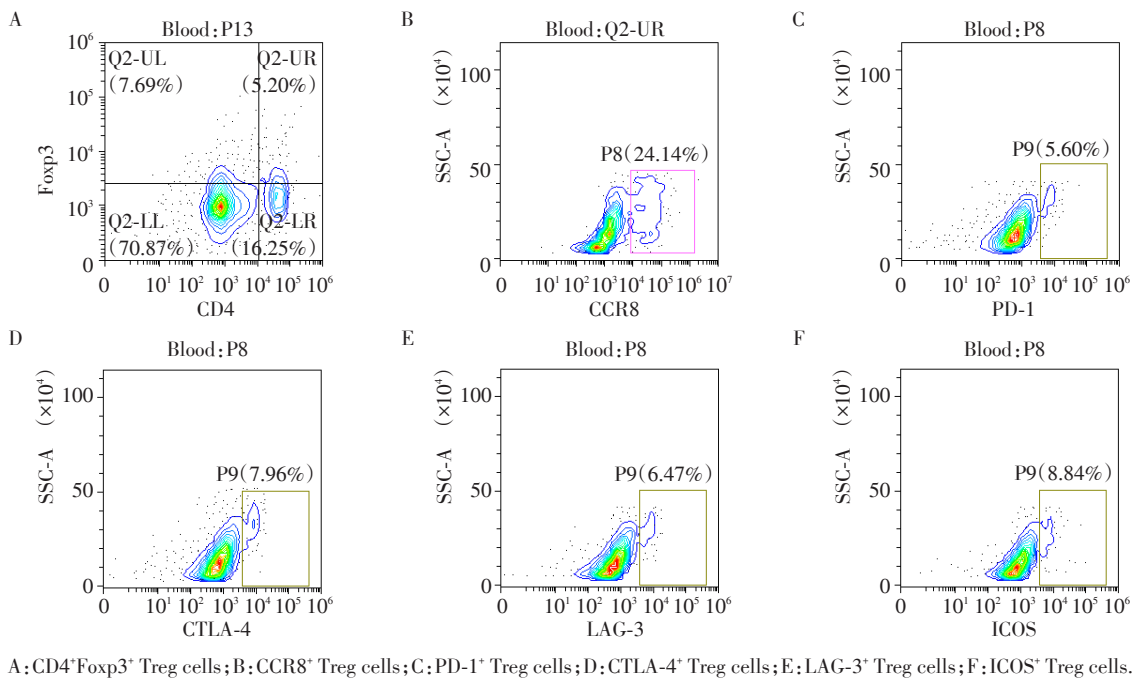
Figure 4 A flow cytometry strategy for samples from the mouse model



A: CD4<sup>+</sup>Fcpx3<sup>+</sup> Treg cells; B: CCR8<sup>+</sup> Treg cells; C: PD-1<sup>+</sup> Treg cells; D: CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells; E: LAG-3<sup>+</sup> Treg cells; F: ICOS<sup>+</sup> Treg cells.

图5 小鼠卵巢癌肿瘤浸润性CCR8<sup>+</sup> Treg细胞比例与表型流式检测图

Figure 5 Proportion and phenotype of tumor infiltrating CCR8<sup>+</sup> Treg cells in mouse ovarian cancer tissues detected by flow cytometry analysis



A: CD4<sup>+</sup>Fcpx3<sup>+</sup> Treg cells; B: CCR8<sup>+</sup> Treg cells; C: PD-1<sup>+</sup> Treg cells; D: CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells; E: LAG-3<sup>+</sup> Treg cells; F: ICOS<sup>+</sup> Treg cells.

图6 小鼠外周血中CCR8<sup>+</sup> Treg细胞比例与表型流式检测图

Figure 6 Proportion and phenotype of CCR8<sup>+</sup> Treg cells in mouse peripheral blood detected by flow cytometry analysis

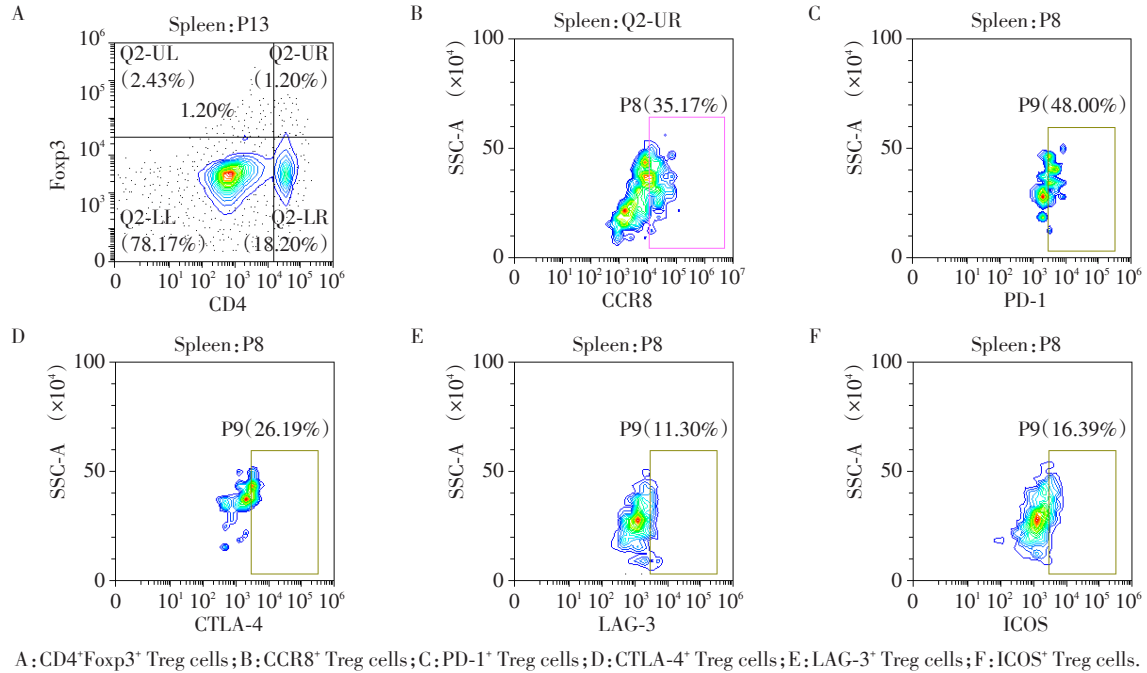
2.3 体外实验中CCR8拮抗剂抑制小鼠的初始CD4<sup>+</sup> T细胞向Treg细胞的诱导分化

小鼠脾脏的初始CD4<sup>+</sup> T细胞向Treg细胞诱导分化,结果显示AZ084组、DMSO组、MOCK组的Treg细胞分化比例分别为(29.1±8.8)%、(52.2±

9.6)%、(70.6±16.7)%,AZ084组与DMSO组、MOCK组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,图9)。

### 3 讨论

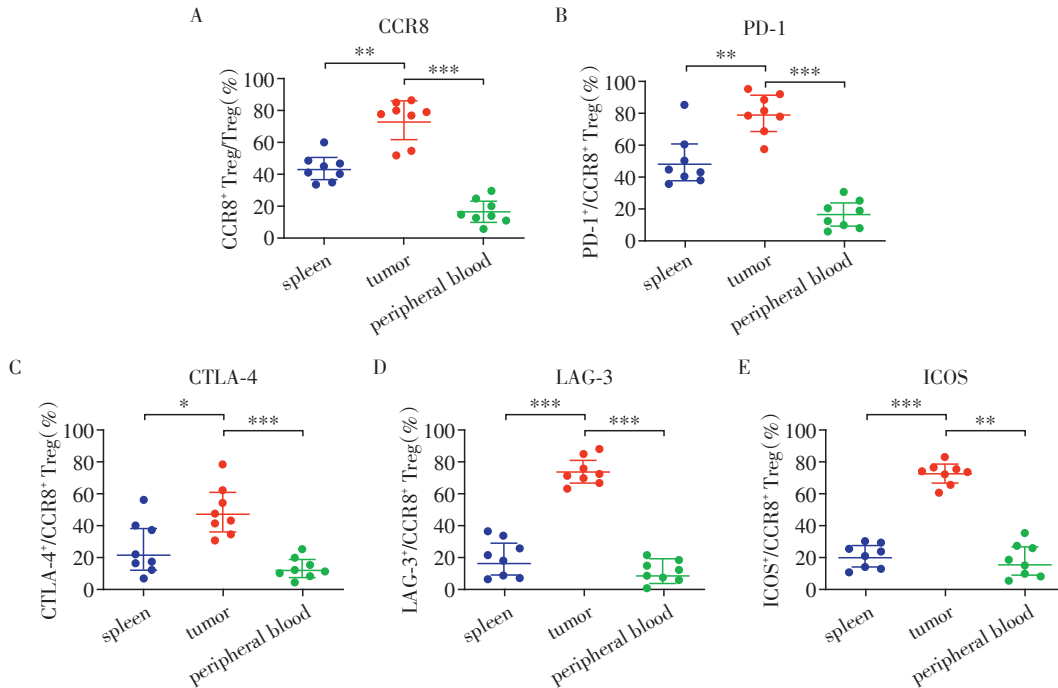
卵巢癌是病死率最高的妇科恶性肿瘤,虽然治



A: CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells; B: CCR8<sup>+</sup> Treg cells; C: PD-1<sup>+</sup> Treg cells; D: CTLA-4<sup>+</sup> Treg cells; E: LAG-3<sup>+</sup> Treg cells; F: ICOS<sup>+</sup> Treg cells.

图7 小鼠脾脏中 CCR8<sup>+</sup> Treg 细胞比例与表型流式检测图

Figure 7 Proportion and phenotype of CCR8<sup>+</sup> Treg cells in mouse spleens detected by flow cytometry analysis



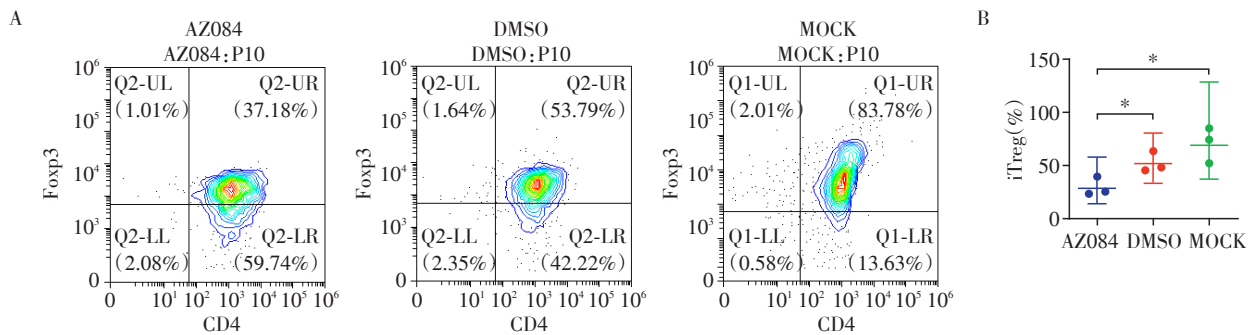
A: Analysis of the differential proportion of CCR8<sup>+</sup> subgroups in Tregs in mouse tumor tissues, spleens and peripheral blood. B: Analysis of the differential proportion of PD-1<sup>+</sup> subgroups on CCR8<sup>+</sup> Tregs in mouse tumor tissues, spleens and peripheral blood. C: Analysis of the differential proportion of CTLA-4<sup>+</sup> subgroups on CCR8<sup>+</sup> Tregs in mouse tumor tissues, spleens and peripheral blood. D: Analysis of the differential proportion of LAG-3<sup>+</sup> subgroups on CCR8<sup>+</sup> Tregs in mouse tumor tissues, spleens and peripheral blood. E: Analysis of the differential proportion of ICOS<sup>+</sup> subgroups on CCR8<sup>+</sup> Tregs in mouse tumor tissues, spleen and peripheral blood, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=8$ ).

图8 小鼠肿瘤组织、脾脏、外周血中 Treg 细胞表型分析

Figure 8 The phenotype analysis of Treg cells in mouse tumor tissues, spleens and peripheral blood

疗方法不断改进,但是卵巢癌患者的生存率并没有明显提高。近年来免疫治疗逐渐显示出巨大潜

力。TME 的复杂性和多样性对免疫治疗的效果具有重要影响。深入阐明卵巢癌免疫抑制微环境的



A: Flow cytometry analysis of naive CD4<sup>+</sup> T cell differentiating into Treg cells (iTreg) in AZ084, DMSO and MOCK groups. B: The proportional analysis of naive CD4<sup>+</sup> T cells differentiating into iTreg in AZ084, DMSO and MOCK groups, \**P* < 0.05.

图9 比较AZ084、DMSO、MOCK组初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Treg细胞分化的比例

Figure 9 Comparisons in the proportion of naive CD4<sup>+</sup> T cells differentiating into Treg cells in AZ084, DMSO and MOCK groups

产生机制,探索提高免疫治疗效果的新策略是卵巢癌治疗的研究方向。卵巢癌免疫抑制微环境形成的主要机制之一是Treg细胞抑制CD8<sup>+</sup>效应性T细胞杀伤肿瘤的功能。肿瘤浸润性Treg高度活化、增殖,具有很大的异质性<sup>[13]</sup>,而趋化因子和细胞因子依赖的募集是Treg细胞向肿瘤浸润的主要机制。如趋化因子CCL1和CCL18,由肿瘤细胞和TME内的树突状细胞分泌,与Treg细胞上的CCR8受体结合,引导它们向肿瘤部位移动<sup>[14-15]</sup>。细胞因子IL-2,通过与Treg细胞表面上的CD25(IL-2受体的α链)结合,能够促进Treg细胞的活性和增殖。在一些肠癌模型中,通过增加IL-2的浓度可以显著增加Treg细胞在TME中的数量<sup>[16]</sup>。因此,在抗肿瘤免疫治疗中,Treg细胞的调节和耗竭策略被认为是有效的方法。然而,由于缺乏对肿瘤浸润性Treg群体的良好选择性,这些策略往往导致严重的不良反应<sup>[17]</sup>。因此需要开发一种针对肿瘤浸润性Treg细胞的特异性靶向标志物。

本研究发现在小鼠模型中,CCR8作为卵巢癌最稳定和差异表达的趋化因子受体,CCR8<sup>+</sup>Treg是卵巢癌浸润性Treg的主要类型,CCR8<sup>+</sup>Treg中PD-1<sup>+</sup>、CTLA-4<sup>+</sup>、ICOS<sup>+</sup>、LAG-3<sup>+</sup>亚群也显著高于脾脏和外周血液,提示CCR8<sup>+</sup>Treg可能是卵巢癌主要的浸润性Treg,在肿瘤免疫抑制微环境中发挥主导作用,其抑制性与共刺激性的亚群都比外周组织中更活跃,因此可能在卵巢癌免疫逃逸中发挥作用。同时,CCR8变构拮抗剂AZ084明显抑制初始CD4<sup>+</sup>T细胞向Treg细胞的诱导分化。最新研究也显示,在人类乳腺癌、肺癌、结肠癌、肝癌以及小鼠黑色素瘤、非小细胞肺癌等模型中,肿瘤浸润性Treg细胞上的

CCR8表达增高<sup>[18]</sup>,与本研究的结论基本一致。因此靶向卵巢癌浸润性CCR8<sup>+</sup>Treg,选择性地清除CCR8<sup>+</sup>Treg或抑制其功能,可控制或改善TME的免疫抑制状态,有利于提高卵巢癌免疫治疗的疗效。但目前研究暂不足以说明CCR8对肿瘤浸润性Treg发挥功能具有必要性,后续将进一步研究直接敲除Treg上的CCR8基因对肿瘤浸润性Treg免疫表型与功能的影响以及CCR8<sup>+</sup>Treg功能调控的分子机制,从而为卵巢癌的靶向免疫治疗提供更精准的分子诊断依据。

#### 【参考文献】

- [1] HEGDE P S, CHEN D S. Top 10 challenges in cancer immunotherapy[J]. *Immunity*, 2020, 52(1): 17-35
- [2] MERIC-BERNSTAM F, LARKIN J, TABERNEIRO J, et al. Enhancing anti-tumour efficacy with immunotherapy combinations [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10278): 1010-1022
- [3] CHARDIN L, LEARY A. Immunotherapy in ovarian cancer: thinking beyond PD-1/PD-L1 [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 795547
- [4] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(18): 4557-4566
- [5] ODUNSI K. Immunotherapy in ovarian cancer [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(suppl 8): 1-7
- [6] CANNON M J, O'BRIEN T J. Cellular immunotherapy for ovarian cancer [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(6): 677-688
- [7] 付鑫,吴茗,陈献,等. mTOR信号通路在调控卵巢癌CD4<sup>+</sup>Treg糖代谢中的作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(5): 604-610
- [8] LI C X, JIANG P, WEI S H, et al. Regulatory T cells in tu-

- mor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):1-23
- [9] WANG X, LANG M, ZHAO T, et al. Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3<sup>+</sup> Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2017, 36(21):3048-3058
- [10] JACKSON J J, KETCHAM J M, YOUNAI A, et al. Discovery of a potent and selective CCR4 antagonist that inhibits Treg trafficking into the tumor microenvironment [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(13):6190-6213
- [11] HIRATA A, HASHIMOTO H, SHIBASAKI C, et al. Intratumoral IFN- $\alpha$  gene delivery reduces tumor-infiltrating regulatory T cells through the downregulation of tumor CCL17 expression [J]. *Cancer Gene Ther*, 2019, 26(9/10):334-343
- [12] PLITAS G, KONOPACKI C, WU K M, et al. Regulatory T cells exhibit distinct features in human breast cancer [J]. *Immunity*, 2016, 45(5):1122-1134
- [13] TANAKA A, SAKAGUCHI S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy [J]. *Cell Res*, 2017, 27(1):109-118
- [14] GOMBERT M, DIEU-NOSJEAN M C, WINTERBERG F, et al. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation [J]. *J Immunol*, 2005, 174(8):5082-5091
- [15] HUANG Y M, MOTTA E, NANVUMA C, et al. Microglia/macrophage-derived human CCL18 promotes glioma progression *via* CCR8 - ACP5 axis analyzed in humanized slice model [J]. *Cell reports*, 2022, 39(2):110670
- [16] BEYER M, SCHUMAK B, WEIHRAUCH M R, et al. *In vivo* expansion of naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with colorectal carcinoma after IL-2 administration [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30422
- [17] WHITESIDE T L. FOXP3<sup>+</sup> Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity [J]. *Expert opinion on therapeutic targets*, 2018, 22(4):353-363
- [18] VAN DAMME H, DOMBRECHT B, KISS M, et al. Therapeutic depletion of CCR8<sup>+</sup> tumor-infiltrating regulatory T cells elicits antitumor immunity and synergizes with anti-PD-1 therapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(2):e001749

[收稿日期] 2023-09-04

(本文编辑:陈汐敏)



欢迎投稿 欢迎订阅