

mTORC1-HIF1 α 通路基因在人 CD8⁺调节 T 细胞中的表达及意义

张晓洁^{1,2}, 吴 梦¹, 陈 献¹, 娄鉴芳¹, 黄珮珺¹, 黄 蕾¹, 孙瑞红¹, 王 芳^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029; ²江苏省妇幼保健院检验科, 江苏 南京 210036)

[摘要] 目的:探讨 mTORC1-HIF1 α 通路基因在人 CD8⁺调节性 T 细胞中的表达及意义。方法:建立人卵巢癌细胞系 SKOV3 与健康人 CD8⁺ T 细胞体外共培养体系,设置 CD8⁺ T 细胞单独培养组为对照组。共培养 5 d 后,收集各组 CD8⁺ T 细胞,荧光定量 PCR 检测 2 组 CD8⁺ T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 (mTORC1、HIF1 α 、Glut1、PKM2、GPI、TPI、Eno1 及 LDH α) mRNA 表达水平;Western blot 检测 2 组 CD8⁺ T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 (mTORC1、HIF1 α 及 PKM2) 蛋白表达水平;收集 14 例卵巢癌,12 例卵巢良性肿瘤及 12 例健康体检者外周血,磁珠阳选法分离 CD8⁺ T 细胞,荧光定量 PCR 检测卵巢癌患者 CD8⁺ T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平,并与卵巢良性肿瘤及健康体检者做比较研究。结果:与单独培养组相比,共培养组 CD8⁺ T 细胞 mTORC1、HIF1 α 、PKM2、GPI 及 TPI mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$);Western blot 结果显示,共培养组 CD8⁺ T 细胞 mTORC1、HIF1 α 及 PKM2 蛋白表达水平也显著低于对照组 ($P < 0.05$);卵巢癌组 CD8⁺ T 细胞中 mTORC1、HIF1 α 、Glut1、PKM2、GPI 及 TPI 表达量显著低于健康对照组 ($P < 0.05$);卵巢癌组 mTORC1、PKM2、GPI 及 TPI 表达量明显低于卵巢良性肿瘤组 ($P < 0.05$);卵巢良性组 mTORC1-HIF1 α 通路各基因表达水平与健康对照组间无显著性差异。结论:卵巢癌微环境诱导的 CD8⁺调节性 T 细胞低表达 mTORC1-HIF1 α 通路基因,mTORC1-HIF1 α 通路在卵巢癌微环境中 CD8⁺调节性 T 细胞代谢及分化过程中具有重要意义。

[关键词] 卵巢癌;CD8⁺ T 细胞;调节性 T 细胞;mTORC1-HIF1 α 通路

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)12-1418-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20161202

Expressions and significances of mTORC1-HIF1 α pathway genes in human CD8⁺ regulatory T cell

Zhang Xiaojie^{1,2}, Wu Meng¹, Chen Xian¹, Lou Jianfang¹, Huang Peijun¹, Huang Lei¹, Sun Ruihong¹, Wang Fang^{1*}

(¹Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Clinical Laboratory, Jiangsu Women and Children Health Hospital, Nanjing 210036, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions and significances of mTORC1-HIF1 α pathway genes in human CD8⁺ regulatory T cell. **Methods:** Coculture system of CD8⁺ T cells and SKOV3 were conducted *in vitro*, CD8⁺ T cells cultured alone group acted as control group. At day 5, CD8⁺ T cells were collected, and used to examine the expression of eight glycolysis genes by quantitative real-time reverse transcriptase (qRT)-PCR (mTORC1, HIF1 α , Glut1, PKM2, GPI, TPI, Eno1, and LDH α). Western blot was used to detect the expression of mTORC1, HIF1 α and PKM2. We collected peripheral blood from 14 ovarian cancer (OC) patients, 12 benign diseases, and 12 healthy females. CD8⁺ T cells were then separated using a CD8-positive isolation kit. The expressions of mTORC1, HIF1 α , Glut1, PKM2, GPI, TPI, Eno1, and LDH α in CD8⁺ T cells from OC patients was detected by qRT-PCR and compared with that in patients with ovary benign tumor (BOT) and healthy volunteers. **Results:** Compared with CD8⁺ T cells cultured without SKOV3 cells, glycolysis gene expression showed varying degrees of decline in CD8⁺ T cells cultured with SKOV3 cells. The expression of mTORC1, HIF1 α , PKM2, GPI, and TPI was significantly decreased in co-cultured cells compared with the control group. Results showed that the expression of mTORC1, HIF1 α , and PKM2 decreased significantly ($P < 0.05$) in CD8⁺ T cells cultured with SKOV3 cells compared with control group. HIF1 α and Glut1 mRNA had lower expression levels in CD8⁺ T cells from OC patients than those from healthy controls (both $P < 0.05$). mTORC1, PKM2, GPI, and TPI were also expressed at lower levels in OC patients than those in either BOT patients or healthy controls (both $P < 0.05$). The expression of mTORC1-HIF1 α pathway genes

[基金项目] 国家自然科学基金(81272324, 81371894);江苏省实验诊断学重点实验室基金资助项目(XK201114)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: shywf74@sina.com

has no difference between benign diseases group and the healthy controls. **Conclusion:** mTORC1-HIF1 α signalling integrates the control of CD8⁺ T cells metabolism and differentiation in ovarian cancer microenvironment, which play a significant role in the immunotherapy of OC

[**Key words**] ovarian cancer cell; CD8⁺T cell; regulatory T cell; mTORC1-HIF1 α pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(12): 1418-1421, 1480]

免疫系统在阻碍肿瘤发生发展方面具有不可忽视的地位。T 细胞活化过程中能量代谢的改变在抗肿瘤免疫应答中发挥重要作用。研究报道, 肿瘤微环境可介导调控 T 细胞代谢过程进而调节其分化, 最终影响 T 细胞免疫应答过程^[1]。靶向调控 T 细胞代谢途径给肿瘤的免疫治疗提供了新的方向。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一个分子量为 289 kDa 的丝氨酸/苏氨酸激酶。mTOR 存在 2 种复合物即 mTORC1(mTOR complex 1)及 mTORC2^[2]。David^[3]发现 mTORC1 通过调节缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF1 α)表达调节 CD8⁺T 细胞中葡萄糖代谢。

调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)是一群免疫抑制细胞, 可抑制抗肿瘤免疫反应, 进而促进肿瘤的发生、发展。肿瘤细胞可通过招募与诱导 Treg 进行免疫逃逸^[4]。卵巢癌(ovarian cancer)是目前致死率最高的妇科恶性肿瘤。本实验室前期研究结果表明卵巢癌患者相对卵巢良性肿瘤及健康体检者 CD8⁺Treg 表达比例增高, 且卵巢癌细胞生长微环境可诱导 CD8⁺T 细胞向 CD8⁺Treg 方向转化^[5], 但诱导分化机制尚不明确。基于以上认识, 本研究旨在探讨 mTORC1-HIF1 α 通路在卵巢癌微环境中 CD8⁺调节性 T 细胞代谢及分化过程中的改变, 为卵巢癌患者的免疫治疗提供新的方向。

1 对象和方法

1.1 对象

外周血取自于南京医科大学第一附属医院 2015 年 9 月—2016 年 5 月就诊的 14 例卵巢癌患者与 12 例卵巢良性肿瘤患者, 平均年龄分别为 (59 \pm 14) 岁和 (36 \pm 11) 岁。选择同期在南京医科大学第一附属医院体检的健康成人女性 12 例作为健康对照组, 平均年龄为 (39 \pm 10) 岁。所有病例均经病理诊断证实, 且未曾接受过其他外科手术、化疗及免疫抑制剂治疗。

人卵巢癌细胞系 SKOV3(中国科学院细胞库); RPMI1640 培养基、McCoy's 5A 培养基、胎牛血清及

AB 血清(Hyclone 公司, 美国)。

淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司); CD8⁺T 细胞免疫阳性分选磁珠(Invitrogen Dynal 公司, 挪威); Real-time PCR 引物(南京金斯瑞生物科技有限公司); 反转录试剂盒与扩增引物(TaKaRa 公司, 日本); miRNeasy Mini Kit(Qiagen 公司, 德国); 兔抗人 mTORC1、HIF1 α 、PKM2 单克隆抗体(Cellsignal 公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理

各组外周血为 4 mL, 共培养所用外周血为 50 mL, 采自健康献血者, 所有外周血均为 EDTA-K2 抗凝。采用淋巴细胞分离液分离单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 免疫磁珠阳选法分离 PBMC 中 CD8⁺T 细胞。

1.2.2 细胞培养及 Transwell 体外共培养体系的建立

Transwell 共培养实验是在带有 0.4 μ m 微孔内室的 6 孔板上进行。用含 10% 胎牛血清的 McCoy's 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养人卵巢癌细胞系 SKOV3。取处于对数增殖期的 SKOV3 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞悬液后铺板; 实验组为 SKOV3/CD8⁺T 细胞共培养组, Transwell 培养内室外室为 2 \times 10⁵ 个/孔 SKOV3, 内室为 1 \times 10⁶ 个/孔 CD8⁺T 细胞, 内外室均为 10% 人 AB 血清 RPMI1640 培养基。同时设 CD8⁺T 细胞单独培养组为对照组, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 5 d 后收集 2 组 CD8⁺T 细胞, 用于 Western blot 分析及 RT-PCR。

1.2.3 RNA 提取及 RT-PCR

用 miRNeasy Mini Kit 提取 1.2.1 及 1.2.2 所得 CD8⁺T 细胞 RNA, 反转录总体积为 20 μ L, 总 RNA 量为 200 μ g, 以 β -actin 为内参, 进行 mTORC1-HIF1 α 通路基因实时荧光定量 PCR 检测(ABI 7500 型)。本研究中主要涉及葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, Glut1)、人葡萄糖 6 磷酸异构酶(human glucose-6-phosphate isomerase, GPI)、磷酸甘油酯异构酶(triosephosphate isomerase, TPI)、烯醇化酶(enolase-1, Enol1)、M2 型丙酮酸激酶(pyruvate kinase

muscle 2, PKM2) 及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH α) 这 6 种调节糖酵解过程重要的酶类。

PCR 引物序列见表 1。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算。

表 1 mTORC1-HIF1 α 通路基因引物序列

Table 1 PCR primers used for the detection of mTORC1-HIF1 α pathway genes

基因	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
mTORC1	CGGACTATGACCACTTGACTC	CCAAACCGTCTCCAATGAAAGA
HIF1 α	CCATTAGAAAGCAGTTCCGC	TGGGTAGGAGATGGAGATGC
Glut1	TTGGCTCCGGTATCGTCAAC	GCCAGGACCCACTTCAAAGA
GPI	AGGCTGCTGCCACATAAGGT	AGCGTCGTGAGAGGTCACCTTG
TPI	CCAGGAAGTTCCTTCGTTGGGG	CAAAGTCGATGTAAGCGGTGG
ENO1	TCATCAATGGCGGTTCTCA	TTCCAATAGCAGCTTTCAGC
PKM2	GCCGCCTGGACATTGACTC	CCATGAGAGAAATTCAGCCGAG
LDH α	CCAGCGTAACGTGAACATCTT	CCCATTAGGTAACGGAATCG
β -actin	GAGCTACGAGCTGCCTGACC	GTAGTTTCGTGGATGCCACAG

1.2.4 Western blot 检测蛋白水平表达

裂解各组 CD8⁺T 细胞蛋白溶液,用 BCA 法进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白质/泳道加入 5 \times SDS 凝胶加样缓冲液,以 80 V 浓缩胶和 120 V 分离胶电泳分离细胞蛋白质,转膜 100 mA, 2 h。室温封闭 1 h 50 min 后,4 $^{\circ}$ C 摇床一抗孵育过夜;1 \times TBST 洗膜 10 min, 3 次;摇床上二抗室温孵育 2 h,1 \times TBST 洗膜 10 min, 3 次;加 ECL 暗室曝光。GAPDH 蛋白为内参。独立实验重复 3 次。条带图像用 Image J 软件进行吸光度值分析。

1.3 统计学方法

用 SPSS16.0 统计学软件进行数据处理,以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

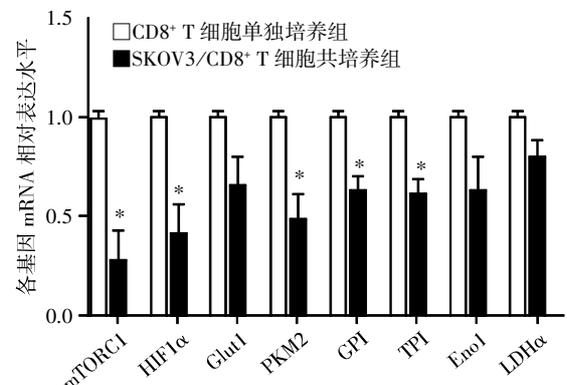
2 结果

2.1 共培养体系对 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平的影响

mTORC1 通过调节 HIF1 α 进而调节下游糖酵解相关酶,结果显示,与单独培养组相比,SKOV3/CD8⁺T 细胞共培养组 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平均下调,其中 mTORC1、HIF1 α 、PKM2、GPI 及 TPI mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$,图 1)。

2.2 共培养体系对 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因蛋白表达水平的影响

挑选 2.1 中 mRNA 下调水平比较显著的 mTORC1、HIF1 α 、PKM2 做蛋白水平的表达。Western blot 结果显示,SKOV3 与 CD8⁺T 细胞共培养后,CD8⁺T 细胞的 mTORC1、HIF1 α 及 PKM2 蛋白表达水



与单独培养组相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 共培养体系对 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平的影响

Figure 1 Level changes of mTORC1-HIF1 α mRNA in co-culture system

平显著低于 CD8⁺T 细胞单独培养组 ($P < 0.05$,图 2)。

2.3 卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组、健康对照组 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平比较

卵巢癌组 CD8⁺T 细胞中 mTORC1、HIF1 α 、Glut1、PKM2、GPI 及 TPI 表达量显著低于健康对照组 ($P < 0.05$);卵巢癌组 mTORC1、PKM2、GPI 及 TPI 表达量明显低于卵巢良性肿瘤组 ($P < 0.05$);卵巢良性组 mTORC1-HIF1 α 通路各基因表达水平与健康对照组间无显著性差异 (图 3)。各组 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平见表 2。

3 讨论

多种恶性肿瘤微环境中均存在较高水平的 CD8⁺Treg^[6-7]。Barnett 等^[8]指出降低或消除 Tregs 数量可提高卵巢癌患者的免疫应答能力。近年来研究结果表明,Tregs 分化过程中存在代谢途径的改变^[9]。通

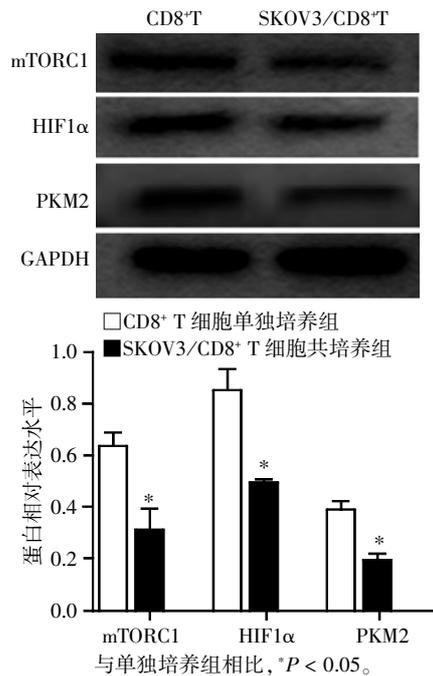
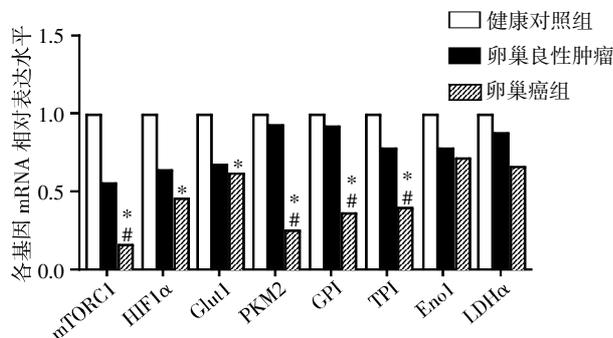


图 2 共培养体系对 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因蛋白表达水平的影响

Figure 2 Level changes of mTORC1-HIF1 α protein in co-culture system



与健康对照组相比, * $P < 0.05$; 与卵巢良性组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组、健康对照组 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平

Figure 3 Expression of mTORC1-HIF1 α pathway genes mRNA in CD8⁺ T cells from ovarian cancer patients, benign ovarian tumor patients, and healthy controls

过调节 Treg 细胞代谢从而抑制其分化是降低肿瘤微环境中 Tregs 数量的有效措施之一^[1]。mTORC1 在 T 细胞代谢及分化过程中具有重要作用^[10]。mTORC1 能调节 HIF1 α 蛋白翻译。Finlay 等^[11]指出 mTORC1-HIF1 α 通路是调节 CD8⁺T 细胞代谢过程的重要通路。研究提示 HIF1 α 可参与葡萄糖转运及糖酵解的调节,这其中涉及到葡萄糖转运蛋白及糖酵解酶类^[12]。有学者认为 Glut1 是缺氧反应性蛋白,是 HIF1 α 的下游基因, HIF1 α 可通过缺氧反应元件

表 2 卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组、健康对照组 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平

Table 2 The differential expression of mTORC1-HIF1 α pathway genes mRNA in CD8⁺ T cell of ovarian cancer patients, benign ovarian tumor and healthy controls

	HC(n=12)	BOT(n=12)	OC(n=14)
mTORC1	14.20 \pm 1.68	15.06 \pm 2.98	16.91 \pm 1.47**
HIF1 α	2.30 \pm 1.26	2.94 \pm 0.76	4.09 \pm 1.08*
Glut1	6.32 \pm 1.30	6.90 \pm 1.36	7.03 \pm 1.15*
PKM2	1.60 \pm 0.93	1.71 \pm 0.75	3.64 \pm 2.37**
GPI	2.80 \pm 1.53	2.92 \pm 0.84	4.28 \pm 0.99**
TPI	2.77 \pm 0.76	3.12 \pm 1.45	4.18 \pm 0.89**
Eno1	3.72 \pm 1.89	4.09 \pm 0.72	4.20 \pm 0.92
LDHa	6.08 \pm 0.95	6.28 \pm 2.76	6.67 \pm 1.77

与健康对照组相比, * $P < 0.05$; 与卵巢良性组相比, # $P < 0.05$ 。

促进 Glut1 的表达,进而启动糖酵解过程^[13](图1A)。Shi 等^[14]发现 mTORC1-HIF1 α 通路是调节 TH17 和 Treg 细胞分化的关键点, HIF1 α 高表达抑制效应 T 细胞向 Treg 方向转化。

本研究结果显示,与 CD8⁺T 细胞单独培养组相比, SKOV3/CD8⁺T 细胞共培养组中 CD8⁺T 细胞 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 与蛋白表达水平均降低,提示卵巢癌细胞生长微环境诱导的 CD8⁺Treg 糖酵解水平低于正常 CD8⁺T 细胞。我们进一步检测比较卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组及健康对照组 CD8⁺T 细胞中 mTORC1-HIF1 α 通路基因 mRNA 表达水平,结果发现,卵巢癌组 CD8⁺T 细胞中 mTORC1、HIF1 α 、Glut1、PKM2、GPI 及 TPI 表达量显著低于健康对照组,卵巢癌组 mTORC1、PKM2、GPI 及 TPI 表达量明显低于卵巢良性肿瘤组,而卵巢良性组 mTORC1-HIF1 α 通路各基因表达水平与健康对照组间无显著性差异。此研究结果提示 mTORC1-HIF1 α 通路基因在人 CD8⁺Treg 细胞中低表达,靶向调控 mTORC1-HIF1 α 通路基因可调节卵巢癌微环境中 CD8⁺Treg 的诱导分化。

综上所述,卵巢癌微环境诱导的 CD8⁺Treg 低表达 mTORC1-HIF1 α 通路基因, mTORC1-HIF1 α 通路在卵巢癌微环境中 CD8⁺Treg 代谢及分化过程中具有重要意义,这不仅为更加深入地研究 CD8⁺Treg 提供了可能,也为卵巢癌的免疫治疗提供了新思路。

[参考文献]

[1] Mockler MB, Conroy MJ, Lysaght J. Targeting T cell immunometabolism for cancer immunotherapy; understand-