

· 肿瘤专题研究 ·

mTOR 信号通路在调控卵巢癌 CD4⁺ Treg 糖代谢中的作用

付鑫^{1,2}, 吴茗^{1,2,3}, 陈献⁴, 刘书娜^{1,2}, 张磊^{1,2}, 李荣^{1,2}, 徐娟^{1,2}, 陶子琦^{1,2}, 王婷^{1,2}, 王芳^{1,2*}¹南京医科大学第一附属医院检验学部, ²国家医学检验临床医学研究中心分中心, 江苏 南京 210029; ³复旦大学附属儿科医院, 国家儿童医学中心, 上海 201102; ⁴深圳市宝安区妇幼保健院检验科, 广东 深圳 518000

[摘要] 目的:初步探讨 mTOR 信号通路在卵巢癌患者 CD4⁺ Treg (CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} 调节性 T 细胞)糖代谢过程中的作用。方法:流式细胞术检测卵巢癌患者(ovarian cancer, OC)、卵巢良性肿瘤患者(benign ovarian tumor, BOT)以及健康对照者(healthy controls, HC)外周血 CD4⁺ Treg 中 mTOR⁺ 细胞的百分比;建立 CD4⁺ Treg 与 SKOV3 共培养体系,检测共培养前后 mTOR⁺ 的 CD4⁺ Treg 百分比,使用雷帕霉素抑制 mTOR 信号后,采用比色法检测 CD4⁺ Treg 细胞糖摄取和糖酵解水平,采用实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-PCR)和 Western blot 检测 CD4⁺ Treg 细胞糖代谢相关基因和蛋白的表达水平。结果:卵巢癌患者外周血中 mTOR⁺ 的 CD4⁺ Treg 百分比显著高于健康对照组[(77.4±8.12)% vs. (64.19±9.7)% , $P < 0.01$],与 SKOV3 共培养后 CD4⁺ Treg 中 mTOR⁺ 细胞百分比明显升高($P < 0.05$), mTOR 信号通路相关基因和蛋白表达水平也升高;抑制 SKOV3 生长环境中 CD4⁺ Treg 的 mTOR 信号后其糖代谢相关基因和蛋白表达水平显著下降,糖摄取(193.49±13.28 vs. 174.05±14.58, $P < 0.01$)和糖酵解水平(21.97±0.87 vs. 4.85±1.54, $P < 0.001$)也明显下降。结论:卵巢癌患者 CD4⁺ Treg 中 mTOR 及其下游信号通路明显活化, mTOR 信号通路可通过调节 CD4⁺ Treg 的糖摄取和糖酵解水平,并调控糖代谢相关基因和蛋白的表达水平,影响 CD4⁺ Treg 的糖代谢进程。

[关键词] 卵巢癌;调节性 T 细胞; mTOR 信号;糖代谢**[中图分类号]** R737.31**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)05-604-07**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230503

Role of mTOR signaling pathway in regulating CD4⁺ Treg glucose metabolism in ovarian cancer

FU Xin^{1,2}, WU Ming^{1,2,3}, CHEN Xian⁴, LIU Shuna^{1,2}, ZHANG Lei^{1,2}, LI Rong^{1,2}, XU Juan^{1,2}, TAO Ziqi^{1,2}, WANG Ting^{1,2}, WANG Fang^{1,2*}¹Department of Laboratory Medicine, ²Branch of National Clinical Research Center for Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ³Children's Hospital of Fudan University, National Children's Medical Center, Shanghai 201102; ⁴Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Baoan Women's and Children's Hospital, Shenzhen 518000, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role of mTOR signaling pathway in CD4⁺ regulatory T cell (Treg) glucose metabolism in ovarian cancer patients. **Methods:** Flow cytometry was used to detect the percentage of mTOR⁺ CD4⁺ Treg in peripheral blood with ovarian cancer (OC) patients, benign ovarian tumor (BOT) patients and healthy controls (HC). We established a coculture system of human CD4⁺ Treg with ovarian cancer cell SKOV3, and detected the percentage of mTOR⁺ CD4⁺ Treg before and after co-culture. After mTOR signal was inhibited by rapamycin, the glucose uptake and glycolysis levels of CD4⁺ Treg were detected by colorimetry, and the expression levels of genes and proteins related to glucose metabolism in CD4⁺ Treg were detected by real-time quantitative PCR and Western blot. **Results:** The percentage of mTOR⁺ CD4⁺ Treg in peripheral blood of ovarian cancer patients was significantly higher than that of healthy controls [(77.4±8.12)% vs. (64.19±9.7)% , $P < 0.01$]. After co-culture with SKOV3, the percentage of mTOR⁺ CD4⁺ Treg were elevated ($P < 0.05$), and the levels of mTOR signaling pathway related genes and proteins also increased. After inhibition of

[基金项目] 国家自然科学基金(81772779);深圳市宝安区科技创新计划基础研究项目(2020JD462)

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

mTOR signal of CD4⁺Treg in SKOV3 growth environment, the glucose uptake (193.49 ± 13.28 vs. 174.05 ± 14.58 , $P < 0.01$) and glycolysis level (21.97 ± 0.87 vs. 4.85 ± 1.54 , $P < 0.001$) were decreased significantly. Glucose metabolism-related genes and proteins were also significantly reduced. **Conclusion:** mTOR and its downstream signaling pathway are significantly activated in peripheral blood CD4⁺Treg of ovarian cancer patients, and mTOR signaling pathway can affect glucose metabolism of CD4⁺Treg by regulating glucose metabolism-related genes and protein levels.

[Key words] ovarian cancer; regulatory T cell; mTOR signaling; glucose metabolism

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(05): 604-610]

卵巢癌(ovarian cancer, OC)是严重威胁女性健康的恶性肿瘤,其死亡率居生殖系统恶性肿瘤前列^[1],由于其发病隐匿,发展迅速,容易在盆腹腔脏器广泛转移,多数卵巢癌患者初诊时已为晚期,预后极差。目前卵巢癌的基本治疗方案仍是根治性手术联合辅助性化疗,但卵巢癌化疗易耐药且易复发,治疗效果不甚理想^[2],迫切需要新的有效治疗策略。免疫治疗有望成为最有希望的一种新型治疗方案,CD4⁺调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)介导的肿瘤微环境中的免疫抑制是肿瘤免疫治疗的关键障碍^[3]。研究发现,T细胞在肿瘤微环境中被激活后其代谢方式发生改变,而不同的代谢方式又会影响T细胞的分化 and 功能发挥。肿瘤微环境中的“Warburg效应”也与抑制性T细胞的产生相关,从而促进肿瘤免疫逃逸^[4]。全面了解Treg的代谢特征以及控制代谢的关键调控分子对控制或逆转肿瘤免疫抑制微环境至关重要。本课题组前期研究表明,在卵巢癌细胞SKOV3的生长环境中,CD4⁺T细胞中Foxp3阳性细胞比例上升,糖代谢水平增强^[5-6],而其中介导糖代谢水平改变的关键调控分子有待研究。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种关键的调节细胞生存、代谢和免疫的蛋白激酶^[6],作为细胞内非常重要的信号转导通路,其在调控卵巢癌CD4⁺Treg糖代谢中的作用尚未有报道。本研究从卵巢癌患者外周血CD4⁺Treg中mTOR信号活化情况入手,探究mTOR信号在调控CD4⁺Treg的糖代谢中的作用,为寻找卵巢癌新的免疫治疗靶点提供思路。

1 对象和方法

1.1 对象

收集2020年6月—2021年1月就诊于南京医科大学第一附属医院和南京市妇幼保健院的卵巢癌患者(OC)、卵巢良性肿瘤患者(ovarian benign tumor patients, BOT)和健康志愿者(healthy controls, HC)

外周血标本各10例。病例入组标准:临床诊断明确、未经任何治疗的初诊患者,无其他重大传染病史,不伴其他严重疾病,并排除糖尿病患者。本研究经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准(伦审号:2017-SRFA-064)。

健康对照外周血由健康志愿者提供。人卵巢浆液性囊腺癌细胞株SKOV3来源于中科院上海细胞库。

淋巴细胞分离液Ficoll(天津灏洋生物制品有限公司);鼠抗人CD4、鼠抗人CD25、鼠抗人CD127、鼠抗人mTOR抗体(BD公司,德国);CD3/CD28 T细胞扩增磁珠(Invivogen公司,美国);PCR引物(南京金斯瑞生物科技有限公司);RNeasy Micro Kit(Qiagen公司,美国);KRPB缓冲液(北京雷根生物技术有限公司);Prime Script RT reagent Kit(TaKa Ra公司,日本);糖摄取分析试剂盒(Biovision公司,美国);兔抗人GAPDH单克隆抗体(上海碧云天生物技术有限公司);SYBR Premix Ex TaqTM II(大连宝生物工程技术有限公司);兔抗人p-mTOR单克隆抗体、兔抗人p-P70S6K单克隆抗体、兔抗人p-4E-BP1单克隆抗体、兔抗人LDH- α 单克隆抗体、兔抗人Glut1单克隆抗体、兔抗人PKM2单克隆抗体、兔抗人GPI单克隆抗体、兔抗人HIF-1 α 单克隆抗体(Cell Signaling公司,美国);糖酵解分析试剂盒(Cayman公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 流式检测外周血中mTOR⁺CD4⁺Treg百分比

使用Ficoll液密度梯度离心法分离外周血单个核细胞,于流式管中加入一定浓度的抗体如下:鼠抗人CD4、鼠抗人CD25、鼠抗人CD127、鼠抗人mTOR抗体,经孵育、洗涤后使用BD FACS Calibur流式细胞仪检测。

1.2.2 流式分选和扩增CD4⁺Treg细胞

抽取健康志愿者外周血50 mL, Ficoll液分离外周血单个核细胞,无菌条件下加入以下抗体:鼠抗人CD4、鼠抗人CD25、鼠抗人CD127,室温孵育

20 min, 全程注意避光操作, 最后用 PBS 清洗 2 次, 并进行流式分选(BD FACS Aria II), 收集分选的细胞铺入圆底 96 孔板中, 并加入 Treg 细胞扩增磁珠进行细胞培养。

1.2.3 SKOV3 细胞与 CD4⁺ Tregs 共培养体系的建立

体系最终体积 1.5 mL/孔, 在 Transwell 板的下室加入 2×10⁵ 个 SKOV3 细胞, 在上室加入 8×10⁵ 个 CD4⁺ Tregs, 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养 72 h 后, 收集共培养前、后各组的 CD4⁺ Treg 细胞, 用于后续实验。

1.2.4 荧光定量 PCR

各处理组 CD4⁺ Treg 细胞分别收集, 使用 RNeasy Micro Kit 试剂盒按说明书步骤提取总 RNA, 并调整

RNA 浓度为 500 ng/mL, 采用 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s 条件下进行 RNA 逆转录, 荧光定量 PCR 用于检测 mTOR 信号通路相关 AKT、Rheb、mTOR、HIF-1 α 、4E-BP1、TSC2、P70S6K 基因、糖代谢相关 TPI、PKM2、Glut3、ENO1、Glut1、LDH- α 、GPI 基因的 mRNA 表达水平, 扩增程序: 按 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒推荐程序。引物序列见表 1。

1.2.5 细胞总蛋白提取和 Western blot

收集各组 CD4⁺ Tregs, 蛋白裂解液用于提取细胞总蛋白, 测定浓度后加入 5×蛋白上样缓冲液进行稀释, 金属浴加热煮沸, -20 °C 保存。随后使用 10%

表 1 引物序列一览表
Table 1 PCR primer sequences

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
β -actin	GAGCTACGAGCTGCCTGACG	GTAGTTTCGTGGATGCCACAG
AKT	CTGAGATTGTGTGACCCCTGGA	CACAGCCCCGAAGTCTGTGATCTTA
TSC2	ATAGCTGTTACCTCGACGAGT	TGCAGGGAGACCTCTATGTCC
mTOR	ATGCTTGGAACCGGACCTG	TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT
P70S6KP70	AGAACTTCTGGCTCGAAAGGT	CGACAGGTGTCTGACGTGTAA
4E-BP1	CTATGACCCGAAATTCCTGATGG	CCCGCTTATCTTCTGGGCTA
Rheb	AGGGTCATGACGCAGCGAGT	TGCGTCGGGGCGACGTTTTA
Glut3	GCTCTCTGGGATCAATGCTGTGT	CTTCTTGCCCTTCCACCAGA
HIF-1 α	CCATTAGAAAGCAGTCCCGC	TGGGTAGGAGATGGAGATGC
Glut1	TTGGCTCCGGTATCGTCAAC	GCCAGGACCCACTTCAAAGA
GPI	AGGCTGCTGCCACATAAGGT	AGCGTCGTGAGAGGTCACCTTG
ENO1	TCATCAATGGCGTTCTCA	TTCCCAATAGCAGTCTTCAGC
PKM3	GCCGCCTGGACATTGACTC	CCATGAGAGAAATTCAGCCGAG
LDH- α	CCAGCGTAACGTGAACATCTT	CCCATTAGGTAACGGAATCG
TPI	AGGCATGTCTTTGGGGAGTC	AGTCCTTCACGTTATCTGCCA

分离胶进行 Western blot 电泳, 浓缩胶用 80 V 电泳, 至蛋白压缩至分离胶且 marker 分散后将电压调整为 100 V。待电泳结束, 以 100 mA 转膜 1 h 50 min, 载有蛋白的 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉溶液、室温摇晃下封闭 3 h 后, 放入一抗中 4 °C 孵育过夜, 次日 1×TBST 洗膜 3 次后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2 h, 1×TBST 再次洗膜 3 次, PVDF 膜表面均匀加入发光试剂后曝光成像。

1.2.6 糖摄取实验

收集各组 CD4⁺ Tregs 细胞, PBS 清洗计数, 加入 3×10⁵ 个/孔细胞于平底 96 孔板中, 每孔用无血清培养基补足体积至 100 μ L, 饥饿细胞过夜, 第 2 天用 PBS 洗涤细胞后, 加入 2% BSA 的 KRPH 缓冲液 100 μ L/孔, 预孵育 40 min 后, 加入 10 mmol/L 2-脱氧

葡萄糖(2-DG) 10 μ L/孔, 孵育 20 min, 按说明书充分反应后检测 412 nm 波长的吸光度值, 每 10 min 检测 1 次, 糖摄取水平为吸光度值根据标准曲线将细胞摄取葡萄糖类似物 2-DG 的含量换算得到。

1.2.7 糖酵解水平测定

收集各组 CD4⁺ Treg 细胞, PBS 洗涤后, 于 96 孔板中加入细胞 3×10⁵ 个/孔, 加入 RPMI 1640 培养基补足体积为 200 μ L/孔, 培养箱中培养 24 h 后离心收集上清液, 比色法检测上清液中 L-乳酸的含量, 再根据标准曲线转化为糖酵解水平。

1.3 统计学方法

所有数据使用 SPSS 25.0 统计学软件进行数据分析, 同时使用 Image Lab 软件提取 Western blot 图像的数据。各组数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,

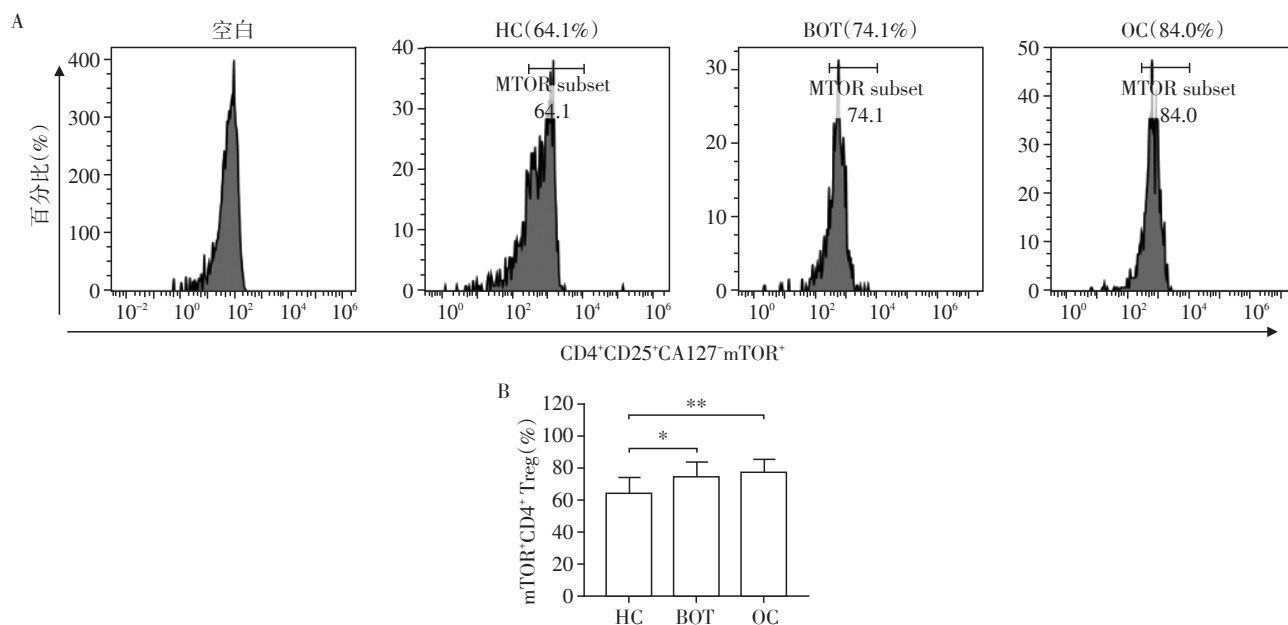
两组间的对比在正态性检验之后用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌患者外周血中 mTOR⁺的 CD4⁺Treg 百分比升高

OC、BOT 和 HC 组外周血,分离得到外周血单个

核细胞后,应用流式细胞术检测其 mTOR⁺ CD4⁺ Treg 的百分比(图 1),结果显示 OC 外周血中 mTOR⁺ CD4⁺ Treg 比例显著高于 HC [(77.4 ± 8.12)% vs. (64.19 ± 9.7)% , $P < 0.01$], OC 组与 BOT 组相比差异无统计学意义 [(77.4 ± 8.12)% vs. (74.6 ± 9.25)% , $P > 0.05$],表明 OC 患者外周血中 mTOR⁺ 的 CD4⁺ Treg 比例升高。



A: 流式检测代表图; B: mTOR⁺的 CD4⁺Treg 百分比统计图。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n=10$)。

图 1 卵巢癌患者、卵巢良性肿瘤患者和健康对照者外周血中 mTOR⁺CD4⁺Treg 比例

Figure 1 The percentages of mTOR⁺CD4⁺Treg in peripheral blood of OC, BOT and HC

2.2 卵巢癌细胞的生长促进人外周血 CD4⁺Treg 中 mTOR 的表达

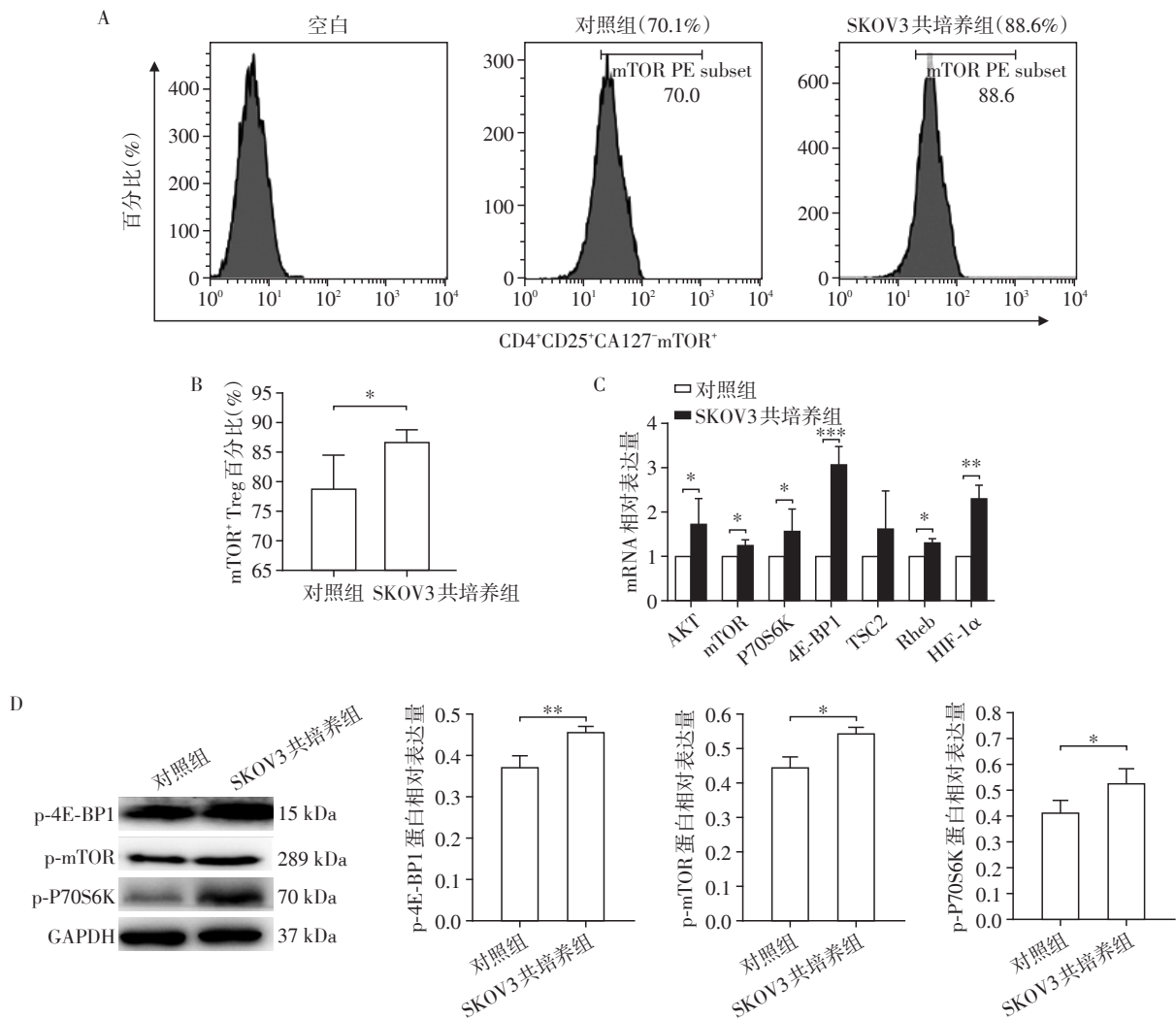
为了进一步研究 mTOR 信号通路在 CD4⁺Treg 中的作用,建立 CD4⁺Treg 与 SKOV3 共培养体系,将分选扩增后的 CD4⁺Treg 与卵巢癌细胞 SKOV3 共培养 3 d,流式分选检测 mTOR⁺的 CD4⁺Treg 百分比,结果显示 CD4⁺Treg 与 SKOV3 共培养后 mTOR⁺细胞百分比明显升高 ($P < 0.05$,图 2A、B);RT-PCR 检测其 mTOR 信号通路相关基因的表达水平,发现除 TSC2 外,SKOV3 共培养组 CD4⁺Treg 的 mTOR 信号相关基因的表达水平均高于 CD4⁺Treg 单独培养组(图 3C);Western blot 检测其 mTOR 通路相关蛋白表达水平,SKOV3 共培养组 CD4⁺Treg 的 mTOR 信号通路相关蛋白(p-mTOR, p-P70S6K、p-4E-BP1)的表达水平高于 CD4⁺Treg 单独培养组(图 2D)。以上结果提示卵巢癌细胞的生长会促进人外周血 CD4⁺Treg 中 mTOR 的表达和下游信号通路的活化。

2.3 阻断 SKOV3 生长环境中 CD4⁺Treg 的 mTOR 信号后其糖摄取和糖酵解水平下降

使用 mTOR 分子抑制剂雷帕霉素阻断与 SKOV3 共培养后 CD4⁺Treg 的 mTOR 信号后,其糖代谢特征变化情况如图 3 所示。与对照组相比,雷帕霉素处理组 CD4⁺Treg 的葡萄糖摄取(OD 值: 3.31 ± 0.19 vs. 3.04 ± 0.21 , $P < 0.01$);2-脱氧葡萄糖换算值: 193.49 ± 13.28 vs. 174.05 ± 14.58 , $P < 0.01$)和糖酵解(OD 值: 1.82 ± 0.07 vs. 0.39 ± 0.13 , $P < 0.001$);L-乳酸相对值: 21.97 ± 0.87 vs. 4.85 ± 1.54 , $P < 0.001$)水平降低,差异有统计学意义,提示 mTOR 信号与卵巢癌患者 CD4⁺Treg 的糖代谢过程密切相关。

2.4 阻断 SKOV3 生长环境中 CD4⁺Treg 的 mTOR 信号后其糖代谢相关基因和蛋白水平下调

接下来,使用雷帕霉素处理与 SKOV3 共培养后的 CD4⁺Treg,RT-PCR 和 Western blot 检测其糖代谢相关基因和蛋白的表达水平,雷帕霉素处理组 CD4⁺Treg 糖代谢相关基因 Glut1、Glut3、HIF-1 α 、TPI、



A, B: 卵巢癌细胞生长环境中 mTOR⁺的 CD4⁺ Treg 百分比(A 为流式检测代表图, B 为统计图); C: SKOV3 生长环境中 CD4⁺ Treg 中 mTOR 信号通路相关基因表达水平; D: SKOV3 生长环境中 CD4⁺ Treg 中 mTOR 信号通路相关蛋白表达水平。两组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (*n* = 6)。

图2 卵巢癌细胞的生长促进人外周血 CD4⁺ Treg 中 mTOR 的表达

Figure 2 The growth of ovarian cancer cells promotes the expression of mTOR in CD4⁺ Treg in human peripheral blood

LDH-α、PKM2、ENO1、GPI 表达水平均下降(图4A), 雷帕霉素处理组的糖代谢相关蛋白 Glut1、PKM2、LDH-α、HIF-1α 表达水平也下降(图4B~F), 差异有统计学意义。提示在 SKOV3 生长环境中, mTOR 信号在调控 CD4⁺ Treg 的糖代谢过程中发挥重要作用。

3 讨论

近年来, 卵巢癌的免疫疗法发展迅速, 而卵巢癌免疫抑制微环境是肿瘤免疫逃逸和免疫治疗障碍的主要因素, Treg 细胞作为导致免疫抑制微环境形成的重要组成部分^[7], 了解与其增殖分化和抑制能力相关的重要调控分子有助于寻找肿瘤的关键治疗靶点。细胞代谢是癌细胞和免疫细胞维持其

活力和功能的关键因素, 在代谢限制的肿瘤微环境中, Treg 细胞表现出更高的糖摄取和糖酵解能力, 并依赖于有氧糖酵解维持其抑制功能^[8]。全面了解 Treg 细胞的代谢特征以及控制代谢的关键调控分子, 进而可通过调控 Treg 细胞的代谢, 使其免疫抑制功能减弱, 降低其对效应性 T 细胞功能的抑制, 从而控制或逆转肿瘤微环境中的免疫抑制状态, 有望为卵巢癌免疫治疗策略提示新思路^[9]。本课题组前期研究发现卵巢癌患者外周血中 CD4⁺ Treg 糖代谢相关因子表达增高, 糖代谢功能活跃^[5,10], 而其中调控糖代谢的关键分子尚未阐明。

mTOR 属于磷酸肌醇 3-激酶(PI3K) 相关激酶家族成员, 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激

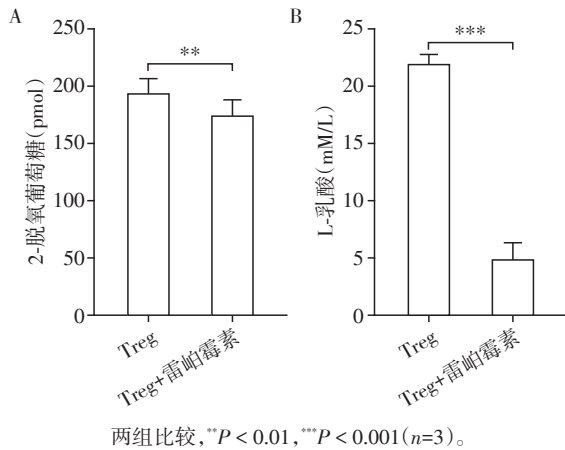


图3 SKOV3生长环境中阻断mTOR信号前后CD4⁺Treg的糖摄取(A)和糖酵解(B)水平

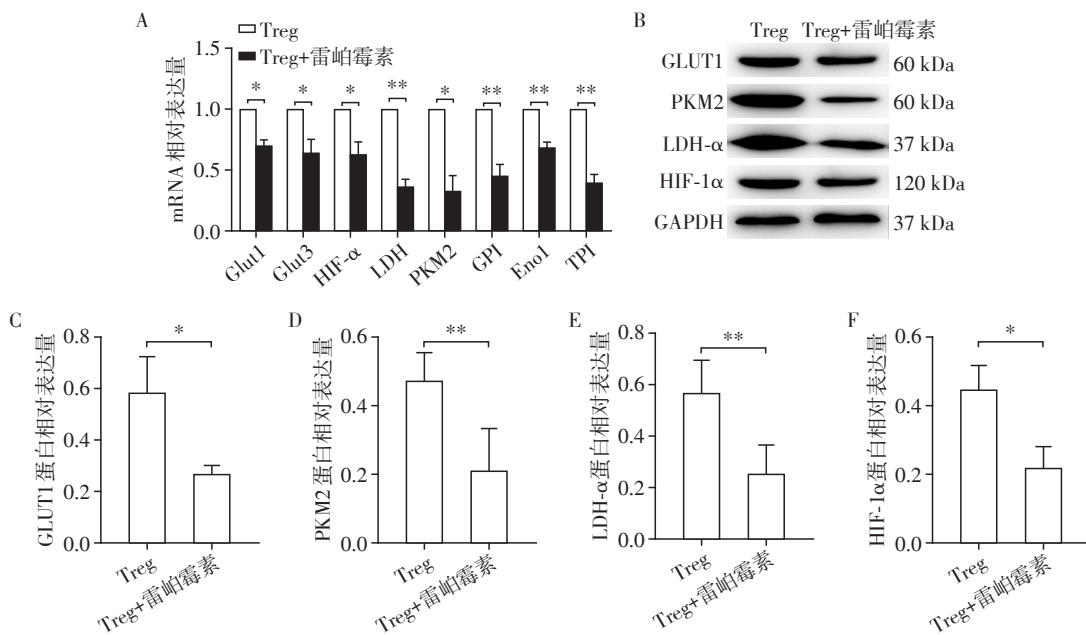
Figure 3 The glucose uptake (A) and glycolysis (B) levels of CD4⁺Treg before and after blocking mTOR signals in SKOV3 growth environment

酶^[11]。mTOR信号通路在促进细胞生长、导致凋亡、加速血管生成、介导自噬等过程中发挥着极其重要的生物学功能^[12],其在肿瘤中通常被激活,与肿瘤的发生发展密切相关^[13]。越来越多的证据表明mTOR信号传导参与了多种免疫细胞的功能调节,也是决定T细胞命运的主要参与者^[14],且mTOR信号在每个T细胞亚群中都有着不同的作用,mTORC1激活促进Th1、Th2、Th17和效应性CD8⁺T

细胞以及记忆性CD8⁺T细胞的生成,并在Treg细胞的稳定和激活中发挥重要作用^[15-16]。为满足与T细胞激活相关的能量需求,T细胞受体和共刺激信号以及细胞因子通过上游PI3K/AKT信号网络调整mTOR通路,mTOR促进T细胞代谢的关键转录调控因子HIF-1 α ,SREBP等表达,进而驱动包括与糖酵解、磷酸戊糖途径、脂质或固醇合成等过程的代谢基因的表达来调节T细胞代谢^[17]。然而,mTOR信号通路是否在调控卵巢癌生长环境中CD4⁺Treg的糖代谢中发挥重要作用仍待研究。

本研究从卵巢癌患者外周血中mTOR⁺的CD4⁺Treg的百分比变化情况入手,结果表明,卵巢癌患者外周血中mTOR⁺的CD4⁺Treg比例升高,为进一步探究其作用,构建了SKOV3与CD4⁺Treg的共培养体系,结果与临床样本结果相符合,与SKOV3共培养组mTOR⁺的CD4⁺Treg比例也升高,且上调的mTOR信号通路相关基因和蛋白的结果说明在卵巢癌生长环境中,CD4⁺Treg的mTOR信号通路发生明显活化。为了进一步探究mTOR信号通路是否在CD4⁺Treg糖代谢中发挥作用,本研究使用雷帕霉素抑制细胞的mTOR信号激活。结果表明,雷帕霉素处理过的CD4⁺Treg的糖摄取和糖酵解水平显著下降,糖代谢相关基因和蛋白表达明显下调。

免疫代谢已经成为肿瘤免疫治疗研究的一个



A: RT-PCR; B-F: Western blot 检测及数据定量分析。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图4 阻断CD4⁺Treg的mTOR信号后其糖代谢相关基因和蛋白表达水平

Figure 4 The expression levels of glucose metabolism-related genes and proteins of CD4⁺Treg cells after blocking the mTOR signal of CD4⁺Treg

重要领域,本研究证实,mTOR信号通路可调控与卵巢癌细胞共培养的CD4⁺ Treg糖代谢,在促进免疫抑制微环境从而导致卵巢癌免疫逃逸的过程中发挥至关重要的作用。因此,在肿瘤微环境中,针对这一通路进行Treg细胞能量代谢的再编程可能是一种新的肿瘤治疗策略,有望为卵巢癌的免疫治疗提供新的靶点。有研究认为,mTOR的活性被认为是维持其抑制能力的必要条件^[18],目前的研究暂不足以说明mTOR信号通路是否与卵巢癌微环境中CD4⁺ Treg的抑制功能有关,而mTOR信号通路是否通过调控CD4⁺ Treg糖代谢进而影响其免疫抑制功能将是我们未来研究的重点。

[参考文献]

- [1] COMPTON S L E, GRIECO J P, GOLLAMUDI B, et al. Metabolic reprogramming of ovarian cancer spheroids during adhesion[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(6): 1399
- [2] MOUFARRIJ S, DANDAPANI M, ARTHOFER E, et al. Epigenetic therapy for ovarian cancer: promise and progress[J]. *Clin Epigenetics*, 2019, 11(1): 7
- [3] LI L, LIU X, SANDERS K L, et al. TLR8-mediated metabolic control of human treg function: a mechanistic target for cancer immunotherapy[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 103-123
- [4] LI T E, WANG S, SHEN X T, et al. PKM2 drives hepatocellular carcinoma progression by inducing immunosuppressive microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 589997
- [5] SHANG W, XU R, XU T, et al. Ovarian cancer cells promote glycolysis metabolism and TLR8-mediated metabolic control of human CD4⁺ T cells[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 570899
- [6] XU R, WU M, LIU S, et al. Glucose metabolism characteristics and TLR8-mediated metabolic control of CD4⁺ Treg cells in ovarian cancer cells microenvironment [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 22
- [7] HUA H, KONG Q, ZHANG H, et al. Targeting mTOR for cancer therapy[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 71
- [8] CLUXTON D, PETRASCA A, MORAN B, et al. Differential regulation of human Treg and Th17 cells by fatty acid synthesis and glycolysis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 115
- [9] 徐睿,王芳. 调节性T细胞糖代谢的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(4): 378-382
- [10] 吴茗,徐睿,刘书娜,等. 卵巢癌细胞生长环境中CD4⁺Treg细胞和CD4⁺Teff细胞的糖代谢特征初探[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(7): 999-1005
- [11] HAO E Y, WANG D H, CHEN Y F, et al. The relationship between the mTOR signaling pathway and ovarian aging in peak-phase and late-phase laying hens [J]. *Poult Sci*, 2021, 100(1): 334-347
- [12] HUANG S. mTOR signaling in metabolism and cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2278
- [13] MOSSMANN D, PARK S, HALL M N. mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(12): 744-757
- [14] SALMOND R J. mTOR regulation of glycolytic metabolism in T cells[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2018, 6: 122
- [15] VALLION R, DIVOUX J, GLAUZY S, et al. Regulatory T cell stability and migration are dependent on mTOR[J]. *J Immunol*, 2020, 205(7): 1799-1809
- [16] ALMEIDA L, LOCHNER M, BEROD L, et al. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation [J]. *Semin Immunol*, 2016, 28(5): 514-524
- [17] WAICKMAN A T, POWELL J D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function [J]. *Immunol Rev*, 2012, 249(1): 43-58
- [18] SHI H, CHAPMAN N M, WEN J, et al. Amino acids license kinase mTORC1 activity and treg cell function via small G proteins rag and rheb [J]. *Immunity*, 2019, 51(6): 1012-1027

[收稿日期] 2022-12-13

(本文编辑:唐震)