

腺苷诱导耗竭型 CD8⁺T 细胞影响肾癌细胞迁移及凋亡*

陈明明^{1,2}, 刁建伟³, 王俊霖², 李昊², 王黎², 姚启盛², 陈从波²

(1. 锦州医科大学, 辽宁 锦州 121000; 2. 湖北医药学院附属太和医院 泌尿外科, 湖北 十堰 442000;
3. 朝阳市第二医院 泌尿外科, 辽宁 朝阳 122000)

摘要: **目的** 探索腺苷是否诱导耗竭型 T 细胞生成以及对肾透明细胞癌细胞迁移和凋亡的影响。**方法** 流式细胞术检测肾透明细胞癌及癌旁组织中 CD8⁺T 细胞及耗竭表型分子 3 (TIM-3) 的表达。生物信息学分析肾透明细胞癌及癌旁组织中基因表达差异, 寻找影响 T 细胞耗竭基因。利用 shRNA 技术构建稳定敲除该基因的肾透明细胞癌 786-O 细胞株, 检测细胞的迁移、凋亡等生物学行为。制备不同肿瘤条件培养基, 培养 CD8⁺T 细胞, 研究敲除基因后的肾透明细胞癌细胞对耗竭型 T 细胞的影响。**结果** 肾透明细胞癌与癌旁组织相比高表达 CD8⁺T 细胞及 TIM-3。生物信息学分析发现腺苷合成限速酶 NT5E (CD73) 在肾透明细胞癌中的表达高于癌旁组织。检测临床标本发现肾透明细胞癌组织中腺苷及 CD73 的表达高于癌旁组织。与对照组比较, 敲除 NT5E 组的 786-O 细胞迁移能力下降及凋亡增加。敲除 NT5E 的肿瘤条件培养基培养的 CD8⁺T 细胞中程序性死亡蛋白 1 表达减少, 抑制 T 细胞增殖能力下降。**结论** 肾透明细胞癌组织存在耗竭型 CD8⁺T 细胞、腺苷及 CD73 的高表达。敲除 NT5E 的肾透明细胞癌 786-O 细胞迁移能力下降、凋亡增加。敲除 NT5E 可减少腺苷合成, 减少耗竭型 T 细胞的生成。

关键词: 肾透明细胞癌; 腺苷; 耗竭型 CD8⁺T 细胞; NT5E (CD73); CD8⁺T 细胞; 肿瘤微环境
中图分类号: R737.11

Influence of depletion type CD8⁺ T cells induced by adenosine on migration and apoptosis of renal carcinoma cells*

CHEN Mingming^{1,2}, DIAO Jianwei, WANG Junlin², LI Hao², WANG Li², YAO Qisheng², CHEN Congbo²

(1. Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Urology, Tahe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Department of Urology, Chaoyang Second Hospital, Chaoyang, Liaoning 122000, China)

Abstract: **[Objective]** To investigate the induction of exhausted T cell generation by adenosine and its impact on the migration and apoptosis of renal clear cell carcinoma cells. **[Methods]** Flow cytometry was employed to assess the expression of CD8⁺ T cells and the exhaustion marker TIM-3 in renal clear cell carcinoma and adjacent tissues. Bioinformatics analysis was conducted to identify genes that influence T cell exhaustion in renal clear cell carcinoma and adjacent tissues. Stable knockdown of the gene was achieved in renal clear cell carcinoma 786-O cells using shRNA technology, and the cellular behaviors including migration and apoptosis were assessed. Various tumor-conditioned media were prepared to culture CD8⁺ T cells and investigate the impact of gene knockout in renal clear cell carcinoma cells on exhausted T cells. **[Results]** Renal clear cell carcinoma exhibited elevated expression levels of CD8⁺ T cells and TIM-3 in comparison to adjacent tissues. Bioinformatics analysis revealed increased expression of adenosine synthesis rate-limiting enzyme NT5E (CD73) in renal clear cell carcinoma. Clinical specimens exhibited higher expression levels of adenosine and CD73 in renal clear cell carcinoma tissues when compared to adjacent tissues. Knockout of NT5E in 786-O cells led to reduced migration ability and enhanced apoptosis compared to the control group. CD8⁺ T cells cultured in tumor-conditioned media with NT5E knockout exhibited diminished expression of programmed death protein 1 and decreased proliferation capacity. **[Conclusion]** Renal clear cell carcinoma tissues display exhausted CD8⁺ T cells and elevated expression of adenosine and CD73. Knockout of NT5E in renal clear cell carcinoma 786-O cells diminishes migration ability and enhances apoptosis. Knockout of NT5E can decrease adenosine synthesis and attenuate the generation of exhausted T cells.

收稿日期: 2023-09-06

* 基金项目: 湖北省十堰市市级引导性科研项目 (22Y40)

[通信作者] 陈从波, E-mail: ccbefy@163.com; Tel: 13907284825

Keywords: renal clear cell carcinoma; adenosine; exhausted T lymphocytes; NT5E (CD73); CD8⁺ T cells; tumor microenvironment

肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是泌尿生殖系统常见肿瘤之一, 然而一些患者在初诊时肿瘤已发生转移, 严重影响了患者预后^[1]。人体免疫系统可识别并清除肿瘤, 利用针对免疫检查点如程序性细胞死亡蛋白 1 (programmed cell death protein 1, PD-1)、程序性细胞死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 的中和抗体来恢复免疫功能; 或输入嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 来正向增强免疫功能的免疫治疗已成为多种肿瘤的治疗手段^[2-4]。研究表明, CD8⁺T 细胞高度浸润的晚期肾癌患者预后较差^[5]。在肿瘤或慢性感染中, T 细胞受到抗原持续刺激, 记忆性 T 细胞不能有效地分化, T 细胞功能低下, 称之为耗竭型 T 细胞 (T cell exhaustion, Tex)。文献报道在黑色素瘤、肝癌等恶性肿瘤中, CD8⁺T 细胞以效应型细胞为主, 而在肾癌中, CD8⁺T 细胞浸润以耗竭型细胞为主^[6-7]。该现象提示 ccRCC 微环境中可能存在肿瘤特异性免疫抑制因素, 诱导了耗竭型 CD8⁺T 细胞的生成。因此探索影响耗竭型 T 细胞生成的分子, 恢复免疫应答对肾癌的治疗意义重大。

腺苷是一种广泛分布的内源性核苷, 主要由细胞内三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 降解生成。在多数肿瘤中腺苷被证实为肿瘤微环境中的一种促癌分子, 不仅直接参与肿瘤的增殖、侵袭和转移, 还能够抑制免疫功能^[8-9]。然而腺苷是否诱导肾癌微环境中浸润性 CD8⁺T 细胞分化为耗竭型 T 细胞, 是否对肾癌的转移及侵袭有影响, 国内外报道较少。因此本研究的目的旨在探索腺苷对 ccRCC 细胞生物学行为及对 CD8⁺T 细胞分化的影响, 以期对肾癌的治疗提供新的免疫治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

人源性肾透明细胞癌 786-O 购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。组织标本: 收集了 2021 年 9 月以来, 在十堰市太和医院泌尿外科行肾癌根治性切除的 30 例病理学诊断为 ccRCC 患者的标本。标本于离体后 15 min 内收集完成, 所得标本分 3 份, 一份于冰上制备匀浆用于腺苷含量检测, 一份提取 T 细胞, 一份标记后-80℃冻存。所有标本来源及信息均可查阅, 所有标本来

源患者均于术前签署知情同意书, 并获得伦理委员会的认可。主要试剂: RPMI 1640 培养基购于 HyClone 公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购于 Moregate Biotech 公司。RNA 提取试剂、cDNA 合成试剂盒和实时定量聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。蛋白提取试剂、BCA 蛋白定量试剂盒及人腺苷 ELISA 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。Annexin V、PI 双标记细胞凋亡试剂盒及 CD73 抗体购自 Abmart (上海) 公司。CD73 敲低的慢病毒载体系统购自上海吉凯生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 组织中 T 细胞提取 新鲜肾癌及癌旁组织于冰磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 中清洗、称重并研磨。纱布过滤、离心弃上清。预冷 PBS 重悬沉淀, 加入胶原酶 IV、透明质酸酶及脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 混匀后离心。PBS 稀释终止反应。反复吹打沉淀制备单细胞悬液, 纱布过滤, 弃除沉淀后离心弃上清。沉淀加入 3 倍体积的红细胞裂解液于冰上反应。预冷 PBS 终止反应, 离心弃上清。70% percoll 液体重悬上述沉淀后将 40% percoll 液体贴壁缓慢加入重悬液体中, 即可见明显分层, 离心弃除中层 1 cm 以上液体。吸取中层液体并加入 3 倍体积生理盐水, 离心弃上清后所得沉淀即为 T 细胞。配置 percoll 液体: (40% percoll : 0.4 mL 生理盐水+3.6 mL percoll+6 mL RPMI 1640 培养基; 70% percoll : 0.7 mL 生理盐水+6.3 mL percoll+3 mL RPMI 1640 培养基)。

1.2.2 T 细胞条件培养 处于对数生长期的 786-O 细胞及 shNT5E 的 786-O 细胞经过-80℃反复冻融 5 次并收集肿瘤培养基。将活化的 T 细胞接种于 6 孔板, 按比例稀释条件培养基 (肿瘤培养基 : T 细胞专用培养基=1 : 1) 并细胞培养 24 h, 观察细胞状态进行后续实验。

1.2.3 Western blot 实验 收集细胞后蛋白裂解液裂解并提取细胞总蛋白, BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。上样蛋白, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 洗膜后加入一抗, 4℃孵育过夜, 次日用 TBST 洗膜后, 加入山羊抗兔免疫

球蛋白 G(IgG) 二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜, 膜上滴加增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 发光液后凝胶成像仪曝光条带, Image J 分析条带灰度值。

1.2.4 实时定量 PCR 实验 提取细胞总 RNA, 通过逆转录反应合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 加入实时定量 PCR 反应试剂和正反向引物, 在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 反应。引物如下: CD73 正义链: 5'-ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA-3'。CD73 反义链: 5'-GCATAAAGCCCTACAGCAACT-3'。GAPDH 正义链: 5'-AGCTCACTGGCATGGCCTTC-3'。GAPDH 反义链: 5'-CGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'。反应条件: 预变性 95℃ 30 s; 变性 95℃ 5 s, 退火延伸 60℃ 5 s, 共 40 个循环。采用 GAPDH 为内参基因, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析结果, 计算 mRNA 相对表达水平。

1.2.5 慢病毒转染 取对数生长期的 786-O 细胞, 通过细胞换液、胰蛋白酶消化等操作使细胞分散为单细胞, 调整细胞浓度接种至 6 孔板, 每孔的细胞数约为 5×10^4 个, 待细胞融合达 20%~30% 时进行慢病毒转染。转染慢病毒前, PBS 润洗贴壁 786-O 细胞两遍, 786-O 细胞按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) =5 转染, 慢病毒转染体系为无血清培养基、慢病毒载体及助转染试剂 Trans P 液, 转染 12 h 后, 观察细胞状态, 向慢病毒转染体系内加入适量不含胎牛血清的基础培养基, 1 d 后更换至完全培养基继续培养, 隔日换液, 转染 72 h 后倒置荧光显微镜下观察细胞内增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 的表达情况, 荧光率即为阳性感染率, 阳性感染率应在 80% 以上。

1.2.6 细胞划痕试验 shNT5E 的 786-O 细胞及对照组细胞按 $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 在 6 孔板细胞表面划痕, 吸除培养基, PBS 润洗 3 遍, 加入无血清 1640 基础培养基, 培养 48 h; 于倒置显微镜 10×10 倍视野下观察并拍照, 分别记录 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h 面积。根据空白面积变化计算细胞迁移率, 细胞迁移率=(最开始的空白面积-某一时间点空白区域面积)/最开始空白面积。

1.2.7 人腺苷 ELISA 试剂盒检测腺苷含量 新鲜肾透明细胞癌组织及癌旁组织加入预冷生理盐水低温匀浆。离心取上清液做待测样本。试剂盒板条静置室温。板条上设置标准孔及样本孔, 在标准孔加入不同浓度的腺苷标准品。在样本孔加入

待测样本, 加入样本稀释液。样本孔及标准孔各加入辣根过氧化物酶标记的抗体, 使用封板膜封闭并孵育。弃除板内液体, 每孔加入底物 A 及底物 B, 避光孵育。孔内加入中止反应液, 测定 450 nm 波长光密度 (optical density, OD) 值。绘制标准曲线计算各样本浓度。

1.2.8 流式细胞术检测凋亡 取对数生长期的各组细胞, 消化后收集于流式管中。六孔板 PBS 洗涤两次, 加入不含乙二胺四乙酸(EDTA) 的胰酶消化, 待细胞逐渐变圆且部分细胞悬浮时, 完全培养基终止消化。重悬细胞离心弃上清, 预冷 PBS 洗涤细胞, 重悬后计数, 后重悬于 1×10^6 细胞/mL。将 100 μ L 细胞悬液 (1×10^5 个细胞) 转移至 5 mL 流式管中。加入 5 μ L 两种流式抗体。轻轻旋转细胞, 室温避光孵育 15 min。每个管中加入 400 μ L $1 \times$ 结合缓冲液。1 h 内使用流式细胞仪上机分析。

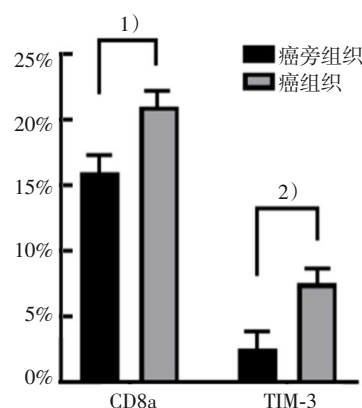
1.3 统计学方法

使用 SPSS Statistics 23 对实验数据进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾透明细胞癌与癌旁组织中 CD8⁺T 细胞及耗竭型 CD8⁺T 细胞表达水平

选取 10 例肾透明细胞癌与癌旁组织并分离 T 细胞, 利用流式细胞术检测 CD8⁺T 细胞及耗竭表型分子 3(TIM-3) 的表达, 结果显示肾透明细胞癌组织中 CD8⁺T 细胞和 TIM-3 阳性细胞比例明显高于癌旁组织 ($P < 0.05$), 说明肾透明细胞癌组织中存在耗竭型 CD8⁺T 细胞浸润。见图 1。



1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 。

图 1 肾透明细胞癌及癌旁组织中 CD8⁺T 细胞及 TIM-3 的表达差异

2.2 肾透明细胞癌与癌旁组织中 NT5E (CD73) 表达水平

为探索影响耗竭型 CD8⁺T 细胞产生的分子，通过 GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) 分析多种肿瘤基因差异，发现肾透明细

胞癌中 NT5E 基因高表达。见图 2。
为了进一步研究 NT5E 与肾透明细胞癌的关系，从 TCGA 数据库中分析肾透明细胞癌及癌旁组织中 NT5E 表达量。结果显示肾透明细胞癌组织中 NT5E 的表达明显高于癌旁组织，见图 3。

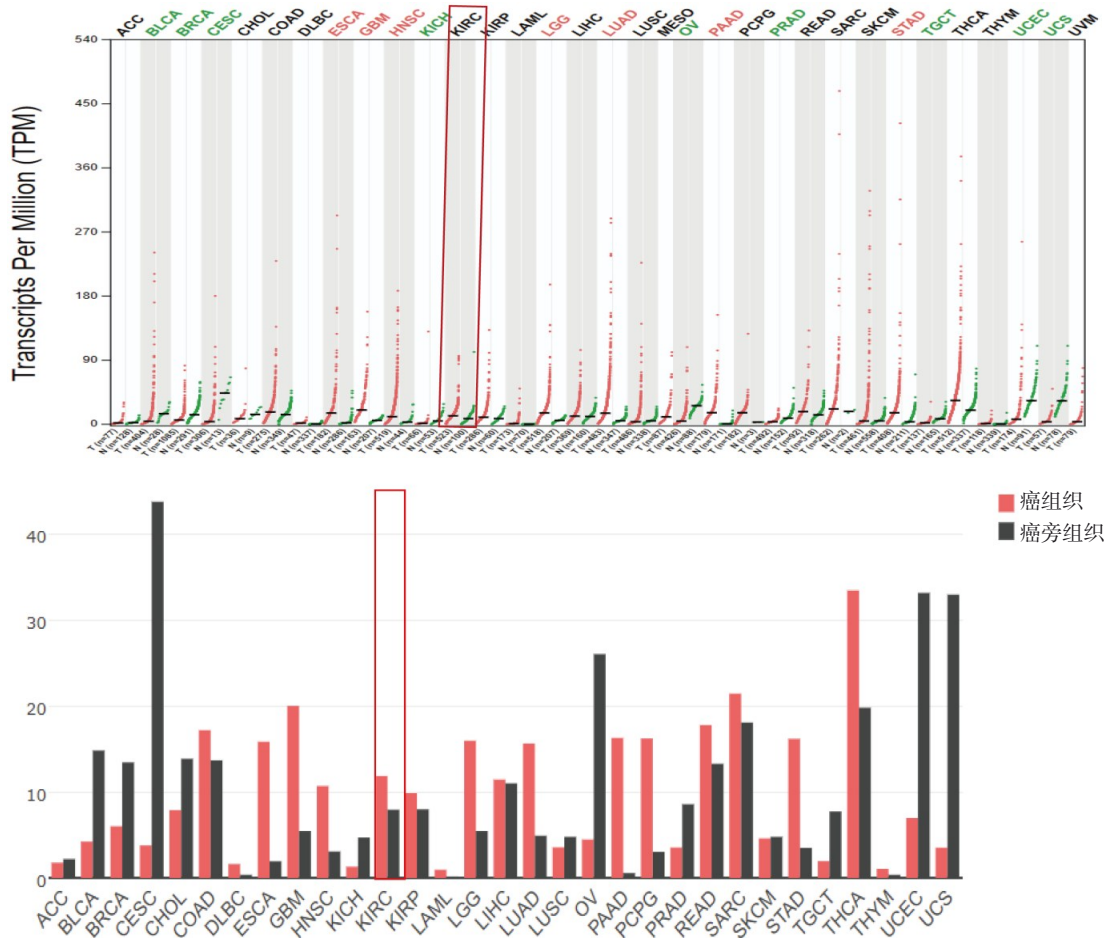


图 2 GEPIA 数据库不同肿瘤中 NT5E 基因表达水平

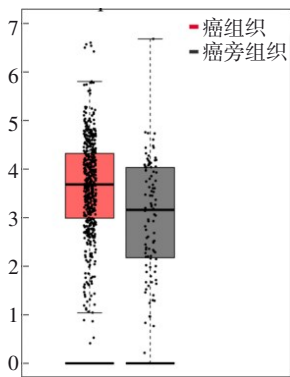


图 3 TCGA 数据库中肾透明细胞癌与癌旁组织中 NT5E 表达量

为了进一步研究 CD73 (NT5E) 与肾透明细胞癌的关系，检测肾透明细胞癌与癌旁组织中 CD73

及腺苷水平。结果如图 4A、图 4B 所示，与癌旁组织比较，肾透明细胞癌组织中 CD73 在 mRNA 和蛋白水平都高表达 ($P<0.05$)。图 4C 显示肾透明细胞癌组织中腺苷含量明显高于癌旁组织 ($P<0.05$)。

2.3 建立低表达腺苷的肾透明癌细胞株

使用 NT5E (CD73) 敲低的慢病毒载体系统，构建稳定敲除 NT5E 的 786-O 细胞株。结果如图 5A 所示，对照组和 shRNA-NT5E 组都表达绿色荧光，说明病毒感染成功。图 5B 显示 shRNA-NT5E 组与对照组比较，NT5E 的 mRNA 表达明显降低，差异有统计学意义 ($P<0.001$)。图 5C 显示 shRNA-NT5E 组与对照组比较，CD73 蛋白表达明显降低。图 5D 显示与对照组比较，shRNA-NT5E 组腺苷含量明显降低，差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

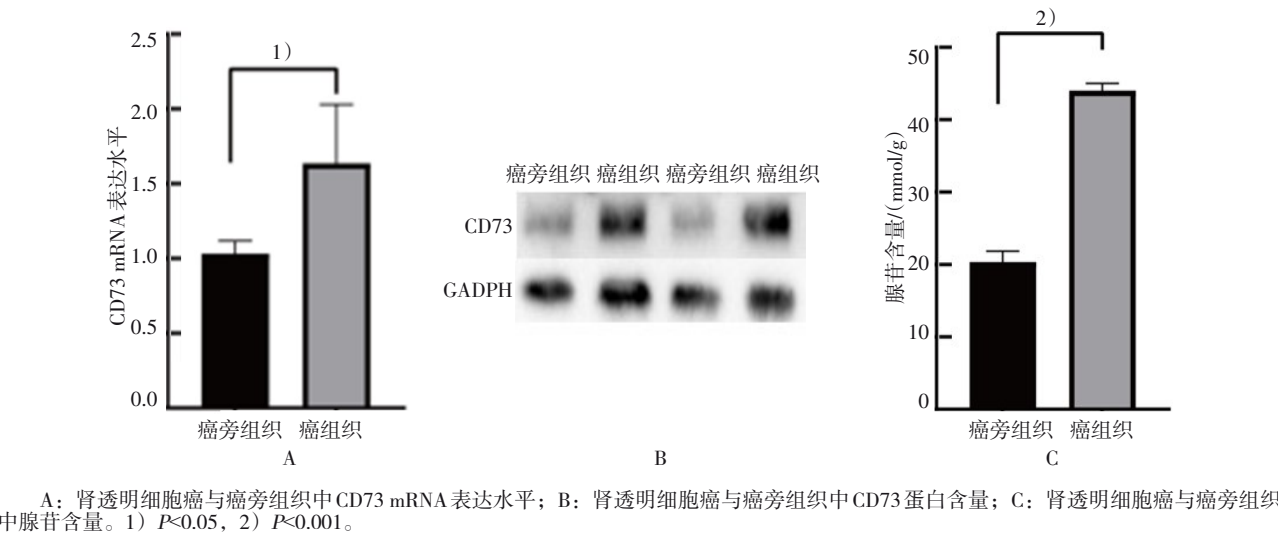


图 4 肾透明细胞癌与癌旁组织中 CD73 及腺苷含量的表达

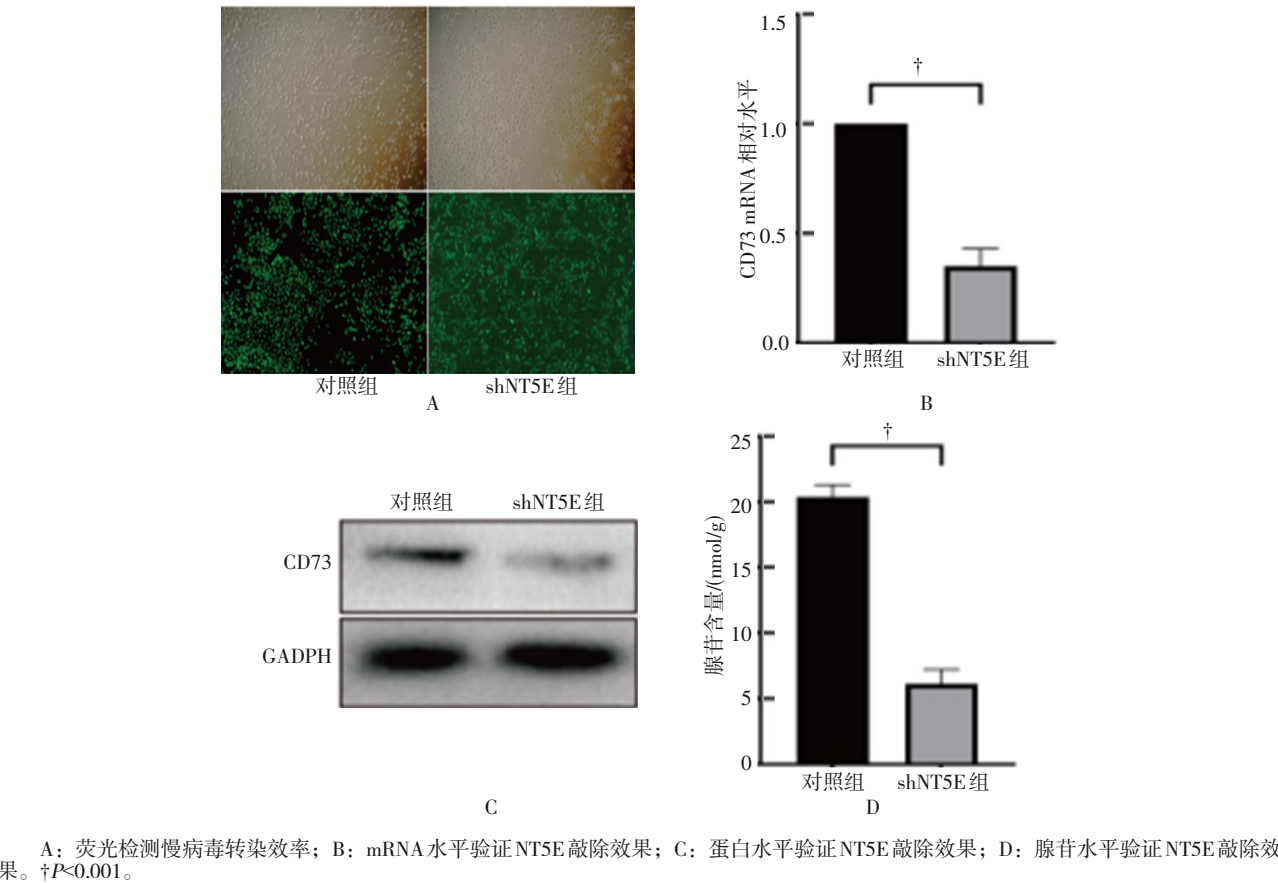


图 5 低表达腺苷的肾透明细胞癌细胞株的建立

2.4 敲除 NT5E 对 786-O 细胞迁移的影响

观察细胞在 12 h 和 24 h 后的划痕面积，发现 shRNA-NT5E 组细胞划痕面积都明显大于对照组。结果提示敲除 NT5E 可抑制 786-O 细胞的迁移。见图 6。

2.5 敲除 NT5E 对 786-O 细胞凋亡的影响

利用 Annexin V、PI 双标记细胞凋亡试剂盒，

检测细胞凋亡率。结果显示与对照组比较，敲除 NT5E 后，Annexin V 或 PI 单阳性及双阳性细胞比例都增加 ($P < 0.05$)，说明敲除 NT5E 可促进 786-O 细胞的凋亡。见图 7。

2.6 敲除 NT5E 对 CD8⁺T 细胞耗竭的影响

收集 shNT5E 组及对照组 786-O 细胞条件培养基，培养 CD8⁺T 细胞 24 h 后，检测耗竭型 T 细胞表

型及 T 细胞增殖情况。结果如图 8A 所示，与对照组比较，shNT5E 组 3 种免疫负性调控分子 TIM-3、PD-1 和 CTLA-4 在 mRNA 水平表达降低。图 8B 显示与对照组比较，shNT5E 组的 PD-1 表达明显降低，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。图 8C 显示 shNT5E 的 786-O 肿瘤条件培养基抑制 T 细胞增殖

(Ki-67) 能力下降，与对照组比较，敲除组共培养 T 细胞 Ki67 比例增加，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。综上提示敲除 NT5E，能降低肿瘤共培养 CD8⁺T 细胞的耗竭，降低对 T 细胞增殖的抑制。

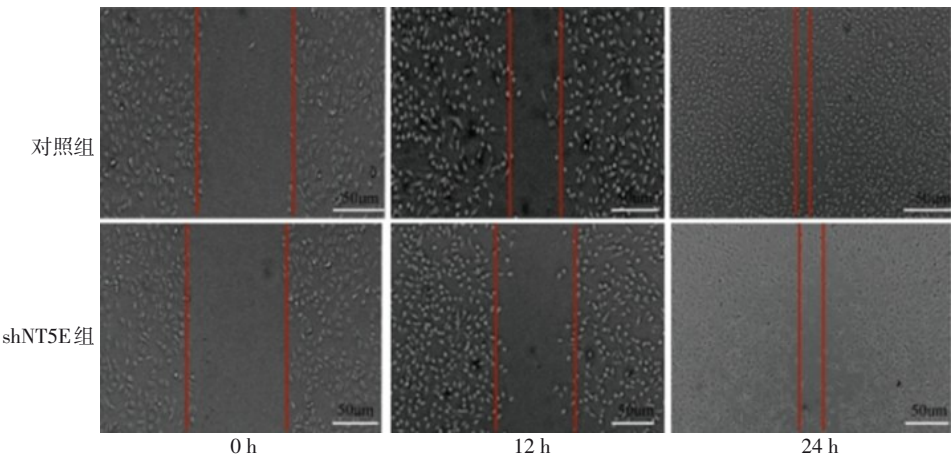
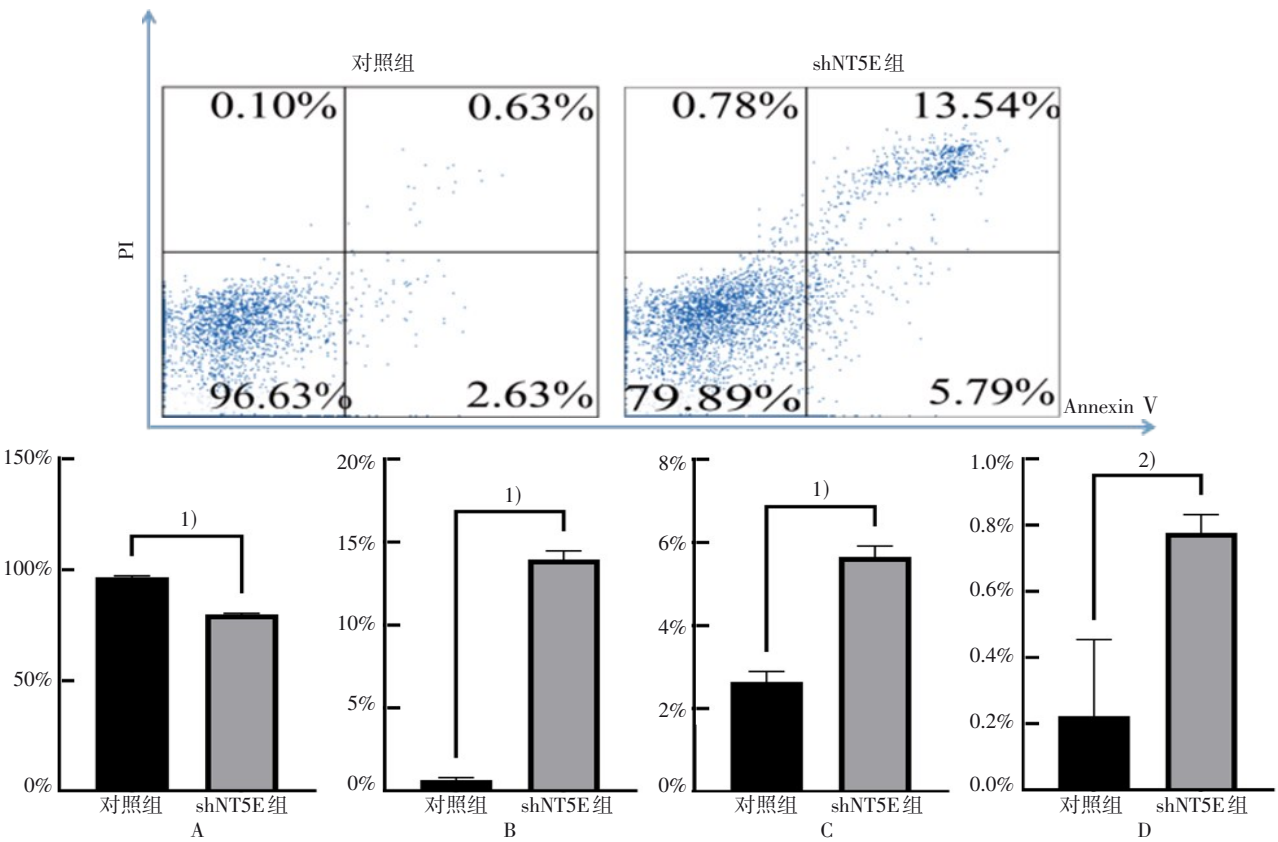
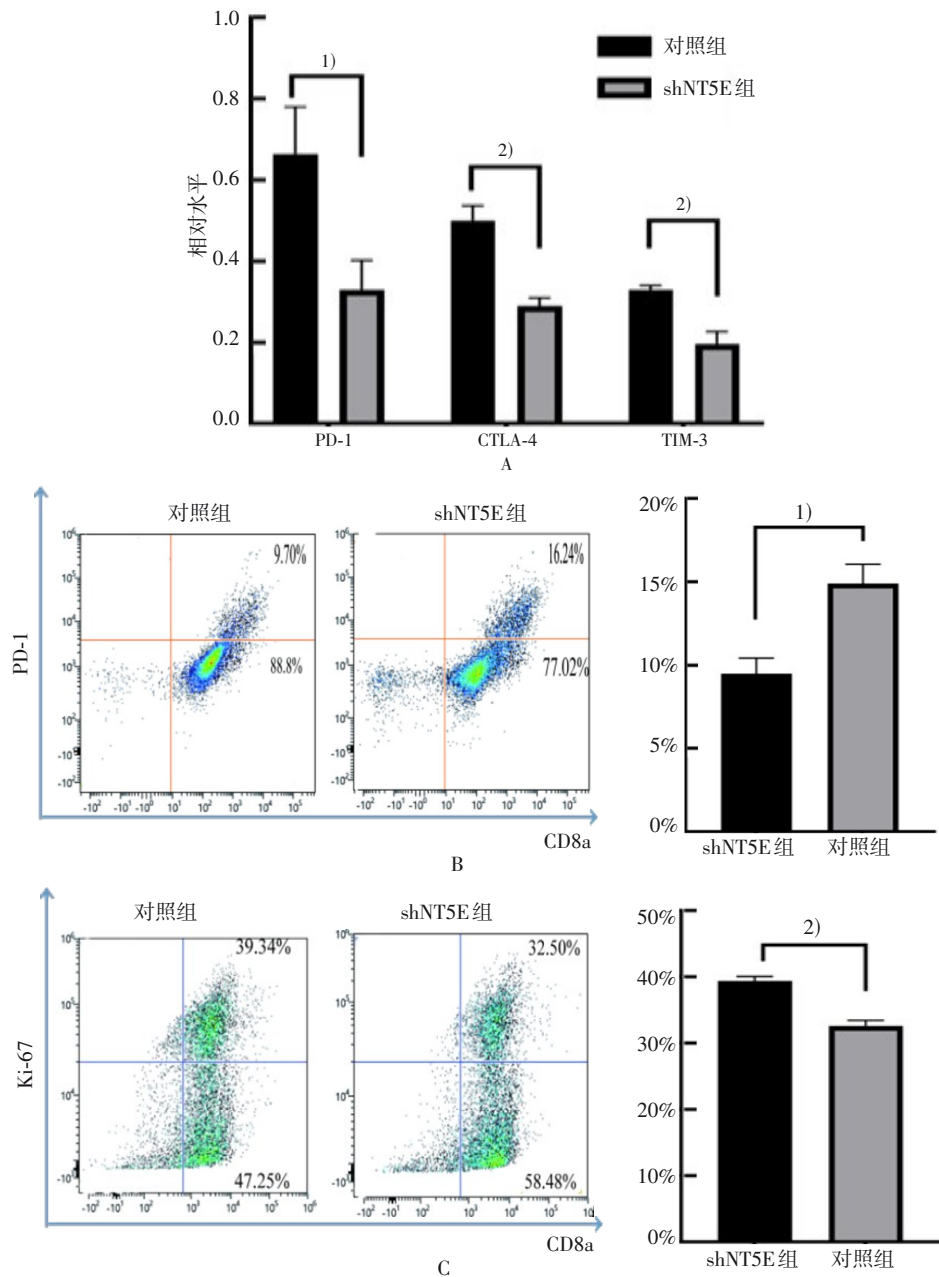


图 6 敲除 NT5E 对肾透明细胞癌细胞迁移的影响



A: 敲低组与对照组正常细胞比例; B: 敲低组与对照组早期凋亡细胞比例; C: 敲低组与对照组晚期凋亡细胞比例; D: 敲低组与对照组死亡细胞比例。1) $P<0.001$, 2) $P<0.05$ 。

图 7 敲除 NT5E 对肾透明细胞癌细胞凋亡的影响



A：RT-qPCR检测CD8⁺T细胞在条件培养基中耗竭指标PD-1、CTLA-4、TIM-3在mRNA水平的变化；B：流式细胞学检测CD8⁺T细胞在条件培养基中耗竭指标PD-1的变化；C：流式细胞学检测CD8⁺T细胞在条件培养基中增殖指标Ki-67的变化。1) $P<0.01$ ，2) $P<0.05$ 。

图 8 肿瘤条件培养基培养 CD8⁺T 细胞并表型检测

3 讨论

肾细胞癌起源于肾小管上皮细胞，约占成人新发恶性肿瘤的2%~3%^[10]。对于晚期肾癌患者，舒尼替尼、培唑帕尼等靶向药物为治疗带来了希望^[11]。但肾癌患者对靶向治疗存在脱靶、耐药等局限。免疫治疗已成为肿瘤治疗的可行策略。在黑色素瘤、肝癌等肿瘤中，CD8⁺T细胞浸润增多，提示患者预后较好，针对PD-1阻断的免疫治疗效果良好；但在晚期肾癌患者中，CD8⁺T细胞的高度浸

润提示预后较差^[12]。在黑色素瘤、肝癌等肿瘤中，CD8⁺T细胞以效应型细胞为主，在肾癌中，CD8⁺T细胞以耗竭型细胞为主，表现为增殖能力下降、分泌细胞因子功能低下，高表达抑制性免疫检查点PD-1和TIM-3等分子^[6-7]。耗竭型T细胞分化与肿瘤微环境中多种因素相关。①抗原负载和持续性^[13]：慢性感染或高肿瘤负荷会导致更严重的T细胞衰竭^[1]。②存在抑制T细胞功能的细胞因子^[14]：如白细胞介素10（interleukin-10, IL-10），阻断IL-10可预防或逆转T细胞耗竭。③高表达免

疫调节细胞^[15]：CD4⁺调节性 T 细胞（CD4⁺regulatory T cells, CD4⁺Treg）具有抑制效应性 T 细胞（effector T cells, Teff）活化和增殖的免疫抑制特性。感染期间，调节性 T 细胞（regulatory T cells, Treg）可增加丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV）感染以及癌症的发生^[16]。④研究发现肿瘤细胞代谢产物也参与肿瘤逃逸，抑制 T 细胞功能^[17]。

本研究发现 ccRCC 组织高表达 CD73 及腺苷，可影响耗竭型 T 细胞产生。生理状态下，细胞外腺苷处于低浓度水平。在组织损伤、感染、肿瘤细胞浸润等条件下，细胞外腺苷浓度迅速上升，可抑制免疫反应，防止过强的免疫应答对组织造成损伤。腺苷主要通过与其相应的 G 蛋白偶联受体-腺苷受体（adenosine receptor, AR）结合介导，从而抑制免疫功能^[18]。为探索影响耗竭型 CD8⁺T 细胞产生的分子，通过 GEPIA 分析多种肿瘤基因差异，发现 ccRCC 中 NT5E 基因高表达。进一步研究 NT5E 与 ccRCC 的关系，从 TCGA 数据库中分析 ccRCC 及癌旁组织中 NT5E 表达量，结果提示 ccRCC 组织中 NT5E 的表达明显高于癌旁组织。检测了 ccRCC 与癌旁组织中 CD73 及腺苷含量，结果证实了生物信息学分析的结果。构建了低表达腺苷的肾癌 786-O 细胞株并在蛋白及 mRNA 水平进行了验证。利用肿瘤条件培养基培养 CD8⁺T 细胞，体外模拟肿瘤微环境，证实了抑制腺苷表达可以降低 PD-1、TIM-3 等多种免疫检查点分子的表达以及减轻肿瘤微环境对 T 细胞增殖的抑制。

CD73 和腺苷与 ccRCC 中耗竭型 T 细胞浸润相关，可能是肿瘤免疫逃逸的原因，可成为 ccRCC 诊断和预后的标志分子及治疗靶标^[19]。针对腺苷及其限速酶 CD39、CD73 为靶点的抑制剂、中和单克隆抗体治疗肾癌及其他肿瘤已有文献报道，都说明腺苷对肾癌发病和治疗的重要性^[20]。但这些研究都处于起步阶段，未在临床使用，腺苷是重要的生理代谢成分，虽然在肿瘤和感染中发挥促进疾病进展的作用，但也有抑制炎症损伤，促进组织损伤后修复等生理功能，需要进一步研究 CD73、腺苷在不同状态下的调控及发挥作用的机制，并开发特异性针对腺苷的抗肿瘤靶向药物。CD73 不仅参与 ccRCC 肿瘤微环境中耗竭型 T 细胞调控，还直接影响肿瘤细胞凋亡和迁移^[21]。本研究表明敲除 NT5E 的 786-O 细胞迁移减少，凋亡增加。有研究发现 CD73 酶特异性抑制剂 APCP 能够以剂量依赖方式抑制肿瘤细胞的增殖及迁移；在前列腺癌、乳腺癌、黑色素瘤等恶性肿瘤中的研究也发现 CD73 高度表达，当阻断 CD39-CD73-腺

苷通路时，以上肿瘤的增殖及进展明显受到抑制^[21-23]。

本研究通过临床标本、生物信息学及细胞实验等方面证实了 ccRCC 高表达 CD73 及腺苷，并与耗竭型 T 细胞产生相关。希望为 ccRCC 的治疗提供免疫治疗策略。

参 考 文 献

- [1] RYSZ J, FRANCZYK B, ŁAWIŃSKI J, et al. Characteristics of clear cell papillary renal cell carcinoma (ccpRCC)[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 151.
- [2] KILLOCK D. CAR T cells show promise in mesothelioma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(9): 541.
- [3] YAN C, YANG QQ, ZHANG SF, et al. Single-cell imaging of T cell immunotherapy responses *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(10): e20210314.
- [4] XU WH, XU Y, WANG J, et al. Prognostic value and immune infiltration of novel signatures in clear cell renal cell carcinoma microenvironment[J]. *Aging*, 2019, 11(17): 6999-7020.
- [5] CALAGUA C, FICIAL M, JANSEN CS, et al. A subset of localized prostate cancer displays an immunogenic phenotype associated with losses of key tumor suppressor genes[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(17): 4836-4847.
- [6] 韩利民, 赵海龙. 转移性黑色素瘤靶向和免疫治疗研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(3): 321-325.
- [7] 吴虹霖, 牛翔科, 熊燕, 等. 肝细胞肝癌的免疫治疗现状及研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(22): 2771-2778.
- [8] XU ZJ, GU CC, YAO XX, et al. CD73 promotes tumor metastasis by modulating RICS/RhoA signaling and EMT in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(3): 202.
- [9] ZHOU YH, TONG L, CHU X, et al. The adenosine A1 receptor antagonist DPCPX inhibits tumor progression via the ERK/JNK pathway in renal cell carcinoma[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 733-742.
- [10] 田熙, 徐文浩, 朱殊璇, 等. 2022 年度肾细胞癌基础研究及临床诊疗新进展[J]. *中国癌症杂志*, 2023, 33(3): 191-200.
- [11] UTZSCHNEIDER DT, GABRIEL SS, CHISANGA D, et al. Early precursor T cells establish and propagate T cell exhaustion in chronic infection[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(10): 1256-1266.
- [12] GUO YG, XIE YQ, GAO M, et al. Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8⁺ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(6): 746-756.
- [13] 赵静, 魏苏, 李庆凤. 血清 IL-10、CD4⁺T 淋巴细胞在自身免疫性甲状腺炎患者中的表达及临床意义[J]. *临床和实验医学杂志*, 2021, 20(21): 2307-2311.
- [14] ARATANI S, FUJITA H, KUROIWA Y, et al. Retraction: Murine hypothalamic destruction with vascular cell apoptosis subsequent to combined administration of human papilloma virus vaccine and pertussis toxin[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 46971.
- [15] FACCIABENE A, MOTZ GT, COUKOS G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis[J]. *Cancer Res*,

2012, 72(9): 2162-2171.

[16] ZHI XL, WANG YJ, ZHOU XR, et al. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells[J]. Cancer Sci, 2010, 101(12): 2561-2569.

[17] ALLARD B, LONGHI MS, ROBSON SC, et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets[J]. Immunol Rev, 2017, 276(1): 121-144.

[18] HART ML, GORZOLLA IC, SCHITTENHELM J, et al. Retraction: hypoxia-inducible factor-1 α -dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2B adenosine receptor[J]. J Immunol, 2017, 199(5): 1942.

[19] XIONG L, WEN Y, MIAO XY, et al. NT5E and FeGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer[J]. Cell Tissue Res, 2014, 355(2): 365-374.

[20] RAVIMOHAN S, TAMUHLA N, NFANYANA K, et al. Elevated pre-antiretroviral therapy CD39⁺CD8⁺ T cell frequency is associated with early mortality in advanced human immunodeficiency virus/tuberculosis co-infection[J]. Clin Infect Dis, 2017, 64(10): 1453-1456.

[21] MOESTA AK, LI XY, SMYTH MJ. Targeting CD39 in cancer[J]. Nat Rev Immunol, 2020, 20(12): 739-755.

[22] HAIT NC, MAITI A, XU P, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor functions in the nucleus by sphingosine-1-phosphate[J]. FASEB J, 2020, 34(3): 4293-4310.

[23] BAHREYNI A, REZAEI M, KHAZAEI M, et al. The potential role of adenosine signaling in the pathogenesis of melanoma[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 156: 451-457.

(龚仪 编辑)

• 23 •