

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.002

· 研究快报 ·

## CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在小鼠乳腺癌模型中对 CD8<sup>+</sup> T 细胞的抑制作用

徐 林, 徐 薇, 蒋正刚, 熊思东\* (复旦大学免疫生物学研究所, 上海医学院免疫学系, 上海 200032)

[摘要] 目的: 观察 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> 调节性 T 细胞 (简称 CCR6<sup>+</sup> Tregs) 体内对 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能的抑制作用, 并探讨其与肿瘤免疫逃逸的关系。方法: 建立 4T1 乳腺癌细胞荷瘤裸鼠模型, FACS 分选 CCR6<sup>+</sup> Tregs, 检测其 Foxp3 的表达; FACS 分选 4T1 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞, CFSE 标记后分别与 CCR6<sup>+</sup> Tregs 或 CCR6<sup>-</sup> Tregs 共同过继转入 4T1 荷瘤裸鼠体内, 观察荷瘤裸鼠肿瘤生长情况和小鼠存活时间; FACS 检测肿瘤组织中 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖、细胞因子 IFN- $\gamma$  的产生和颗粒酶 B 的表达情况。结果: CCR6<sup>+</sup> Tregs 和 CCR6<sup>-</sup> Tregs 均高表达 Foxp3; CCR6<sup>+</sup> Tregs 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞共转输组 4T1 荷瘤裸鼠肿瘤的生长明显快于 CCR6<sup>-</sup> Tregs 共转输组和 CD8<sup>+</sup> T 细胞单转输组, 同时该组荷瘤裸鼠生存时间也明显缩短 ( $P < 0.05$ ); CCR6<sup>+</sup> Tregs 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞共转输组 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖、IFN- $\gamma$  的产生和颗粒酶 B 的表达均明显低于 CCR6<sup>-</sup> Tregs 共转输组和 CD8<sup>+</sup> T 细胞单转输组 ( $P < 0.05$ )。结论: CCR6<sup>+</sup> Tregs 在体内可以有效抑制 CD8<sup>+</sup> T 细胞的功能, 其在肿瘤免疫逃逸和肿瘤发生、发展中发挥重要作用。

[关键词] 调节性 T 细胞; CCR6; CD8<sup>+</sup> T 细胞; 乳腺肿瘤; 过继转输

[中图分类号] R392.11; R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0431-05

## Inhibitory effect of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> regulatory T cells against CD8<sup>+</sup> T cells in mouse mammary carcinoma model

XU Lin, XU Wei, JIANG Zheng-gang, XIONG Si-dong\* (Faculty of Immunology, Institute of Immunobiology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> regulatory T cells (CCR6<sup>+</sup> Tregs) against CD8<sup>+</sup> T cells *in vivo*, and to investigate its relationship with tumor immune escape. **Methods:** Mouse mammary carcinoma models were established by inoculating mammary carcinoma 4T1 cells into nude mice. CCR6<sup>+</sup> Tregs were isolated by FACS, and the Foxp3 expression on CCR6<sup>+</sup> Tregs was further analyzed by FACS. 4T1 specific CD8<sup>+</sup> T cells were labeled with CFSE after isolation by FACS, and then transferred into 4T1 bearing nude mice combined with or without CCR6<sup>+</sup> Tregs or CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> regulatory T cells (CCR6<sup>-</sup> Tregs). Tumor growth and survival of 4T1 bearing mice were observed. The proliferation, IFN- $\gamma$  production, and granzyme B expression of CD8<sup>+</sup> T cells were examined by FACS. **Results:** Both CCR6<sup>+</sup> Tregs and CCR6<sup>-</sup> Tregs expressed high levels of Foxp3. The tumors in CCR6<sup>+</sup> Tregs and CD8<sup>+</sup> T cells co-transferred mice grew faster than those in CCR6<sup>-</sup> Tregs co-transferred and CD8<sup>+</sup> T cell-transferred groups. The survival period of 4T1 bearing mice was significantly decreased in CCR6<sup>+</sup> Tregs co-transferred group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the proliferation, IFN- $\gamma$  production and granzyme B expression of CD8<sup>+</sup> T cells were also dramatically decreased in CCR6<sup>+</sup> Tregs co-transferred group compared with those in CCR6<sup>-</sup> Tregs co-transferred and CD8<sup>+</sup> T cell-transferred groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CCR6<sup>+</sup> Tregs can effectively inhibit the function of CD8<sup>+</sup> T cells, which might play an important role in tumor immune escape, tumor development and progress.

[Key words] regulatory T cell; CCR6; CD8<sup>+</sup> T cell; mammary carcinoma; adaptive transfer

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 431-435]

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2007CB512401);上海市医学领军人才基金资助项目(No. LJ06011)。Supported by the National High Technology Research and Development Program (973 Program) of China (No. 2007CB512401); the Program for Outstanding Medical Academic Leader of Shanghai (No. LJ06011)

[作者简介] 徐 林(1977-),男,重庆市人,博士,主要从事肿瘤免疫方面的研究。现工作于贵州省遵义医学院医学免疫学教研室

\* 通信作者( Corresponding author )。E-mail: sdxiongfd@126.com

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞是 Sakaguchi 等<sup>[1]</sup>首先报道的一群具有免疫调节功能的 T 细胞亚群, 其主要通过细胞与细胞接触的方式发挥作用, 能显著抑制多种免疫细胞的功能。已有的研究表明, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞在肿瘤免疫、感染免疫、自身免疫以及移植免疫中均发挥了重要作用<sup>[2-4]</sup>。

近年来的研究显示, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞具有异质性, 可根据其膜分子表达的不同分为不同的群体, 并且这些不同的群体在体内免疫反应中的作用显著不同<sup>[5-7]</sup>。人们发现在 IBD 模型中, 只有 CD103<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞才能有效迁移到炎症反应局部, 从而发挥免疫抑制作用, 而 CD103<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的抑制能力较弱<sup>[8]</sup>。另外, 研究者们<sup>[9]</sup>还报道 CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞才可以在体内有效抑制 NOD 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的功能, 抑制小鼠胰腺炎的发生。这些研究显示了 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞不同亚群在体内免疫调节中作用的复杂性<sup>[10]</sup>。因此深入探讨 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞的不同亚群在不同免疫反应中的作用, 不但对于免疫反应调节机制的阐明, 而且对于免疫反应的有效干预均具有重要意义。

在对肿瘤免疫逃逸机制的探讨中, 本课题前期研究发现, 在肿瘤局部存在着一群 CCR6<sup>+</sup>的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞, 其具有记忆细胞的表型和功能。为了进一步探讨 CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞(以下简称 CCR6<sup>+</sup>Tregs; 对应的 CCR6<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞简称为 CCR6<sup>-</sup>Tregs)在肿瘤免疫逃逸中的作用, 本课题在前期实验的基础上进一步检测了小鼠乳腺癌模型中 CCR6<sup>+</sup>Tregs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞功能的抑制效应, 并初步探讨其在肿瘤免疫逃逸中的作用, 以期深入理解 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞记忆亚群在肿瘤发生、发展中的作用及其确切机制, 为肿瘤防治策略的改进提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、细胞系和主要试剂

BALB/c 小鼠和裸鼠(H-d、4~6 周龄、雌性)由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[合格证号: SCXY(沪)2007-2005], 饲养于 SPF 级环境。4T1 细胞为 BALB/c 鼠源性乳腺癌细胞系, 由本室冻存。<sup>3</sup>H-TdR(3.7 × 10<sup>4</sup> Bq/μl)购自北京中科院原子核研究所。异硫氰酸荧光素(FITC)标记或藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠 CCR6 抗体、抗小鼠 CD25 抗体购自 BD 公司, PE-CY5 标记或 APC 标记的抗小鼠 CD4 抗体或抗小鼠 CD25 抗体和 FITC 标记的抗

小鼠 Foxp3 抗体试剂盒购自 eBioscience 公司, PE-标记的 CD8 抗体购自 BD 公司, FITC 标记的抗小鼠 IFN-γ、抗小鼠颗粒酶 B(granzyme B)抗体购自 eBioscience 公司。CFSE 购自 Alexis 公司。其它试剂均为分析纯级。

### 1.2 乳腺癌小鼠模型的建立及 CD8<sup>+</sup>细胞过继转移治疗实验

4T1 培养于含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素及 2 mmol 谷氨酰胺的 RPMI1640 细胞培养基中, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。收集对数生长期的细胞, BALB/c 小鼠皮下接种(2 × 10<sup>5</sup> 细胞/只)。当肿瘤大小 2 mm × 2 mm 时, 判断为模型建立成功。荷瘤小鼠然后分为 3 组进行 4T1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞过继转移治疗: 单转移 CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组及 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组, 每组 6 只小鼠。观察小鼠成瘤时间及肿瘤生长状况, 连续 60 d 观察荷瘤小鼠生存情况。

### 1.3 肿瘤浸润淋巴细胞的分离

乳腺癌荷瘤小鼠荷瘤 17 d 后放血处死, 剥离肿瘤, 将肿瘤剪成小组织块, 以 IV 型胶原酶(100 mg/ml)37 °C 消化 1 h。收集单细胞悬液, 再加入相同浓度的 IV 型胶原酶(100 mg/ml), 37 °C 继续消化, 如此反复直到组织块全部消化。在离心管中加入 5 ml 的 Ficoll 淋巴细胞分离液(密度 1.081), 将等体积的肿瘤细胞单细胞悬液缓慢叠加在淋巴细胞分离液上方, 600 × g、室温离心 30 min, 离心后, 吸出界面层细胞, 即肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TILs), PBS 洗 2 次, 备用。

### 1.4 流式分选 CCR6<sup>+</sup>Tregs 和 CCR6<sup>-</sup>Tregs

常规分离 4T1 荷瘤 BALB/c 小鼠脾细胞, 用 PerCP 标记的抗鼠 CD4 抗体、PE 标记的抗鼠 CD25 抗体和 FITC 标记的抗鼠 CCR6 的抗体染色, 4 °C 孵育 30 min, 用 PBS 洗去游离的抗体, 重悬后用流式细胞仪分选 CCR6<sup>+</sup>Tregs 和 CCR6<sup>-</sup>Tregs, 用于后续实验。

### 1.5 流式分选 4T1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞

常规分离丝裂霉素 C 灭活处理 4T1 细胞免疫 BALB/c 小鼠的脾细胞, 在体外用丝裂霉素 C 灭活处理的 4T1 再刺激 4 d, 然后用 PE 标记的 CD8 抗体染色, 流式分选 4T1 特异的 CD8<sup>+</sup>T 细胞, 用于过继转移实验。

### 1.6 流式细胞技术检测 IFN-γ 和颗粒酶 B 的表达

取 4T1 荷瘤裸鼠的 TILs, 用 PBS 洗涤后, 调整细胞密度至 2 × 10<sup>6</sup>/ml, 取 100 μl 细胞悬液, 加入

PE 标记的抗鼠 CD8 抗体染色,然后经固定、穿膜后,用 PBS 洗涤 2 次,再加入 FITC 标记的抗鼠 IFN- $\gamma$  的抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,用 PBS 洗去游离的抗体,重悬后用流式细胞仪检测 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞 IFN- $\gamma$  的产生情况;检测 CD8<sup>+</sup>T 细胞的颗粒酶 B (granzyme B)表达时,TILs 先进行 PE 标记的抗鼠 CD8 抗体染色,然后经过固定、打孔后,用 PBS 洗涤 2 次,再加入 FITC 标记的抗鼠颗粒酶 B 的抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,用 PBS 洗去游离的抗体,重悬后用流式细胞仪检测。

### 1.7 CFSE 法检测淋巴细胞增殖

用流式分选 CD8<sup>+</sup>T 细胞,然后重悬于 PBS 中,加入 CFSE(5  $\mu\text{mol/L}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  标记 15 min,加入等体积的 10% 小牛血清/PBS,洗涤 3 次以去除游离 CFSE 后备用。BALB/c 裸鼠皮下接种 4T1 细胞 7 d 后,将  $2 \times 10^6$  CFSE 标记的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞与 CCR6<sup>+</sup>Tregs 或 CCR6<sup>-</sup>Tregs(比例 2:1)共同经尾静脉注射到荷瘤小鼠体内,治疗 10 d 后取出肿瘤,分离肿瘤浸润淋巴细胞,FACS 分析 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖情况。

### 1.8 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计分析采用 SPSS10.0 软件,用 ANOVA 进行多组数据的检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCR6<sup>+</sup>Tregs 中 Foxp3 的表达

首先从 4T1 荷瘤小鼠脾细胞中通过 FACS 分选出 CCR6<sup>+</sup>Tregs 和 CCR6<sup>-</sup>Tregs,进一步检测其 Foxp3 的表达情况。结果显示,CCR6<sup>+</sup>Tregs 和 CCR6<sup>-</sup>Tregs 均高表达 Foxp3,两者间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (图 1)。

### 2.2 CCR6<sup>+</sup>Tregs 联合 CD8<sup>+</sup>T 细胞转输促进 4T1 移植瘤的生长

4T1 细胞先皮下接种 BALB/c 裸鼠,7 d 后转输 4T1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞,同时按 2:1 比例共转输 CCR6<sup>+</sup>Tregs 或 CCR6<sup>-</sup>Tregs,动态测量肿瘤的生长情况。结果显示,与 CD8<sup>+</sup>T 细胞组相比,CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组的肿瘤生长明显加快( $P < 0.05$ ),更重要的是 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组肿瘤生长明显快于 CD8<sup>+</sup>T 细胞组和 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组( $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 2.3 CCR6<sup>+</sup>Tregs 联合 CD8<sup>+</sup>T 细胞转输缩短 4T1 荷瘤裸鼠生存时间

如图 3 所示,CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组小鼠

的生存时间比 CD8<sup>+</sup>T 细胞组有明显的缩短( $P < 0.05$ ),重要的是,CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组的生存时间较 CD8<sup>+</sup>T 细胞组和 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组均有明显缩短( $P < 0.05$ )。

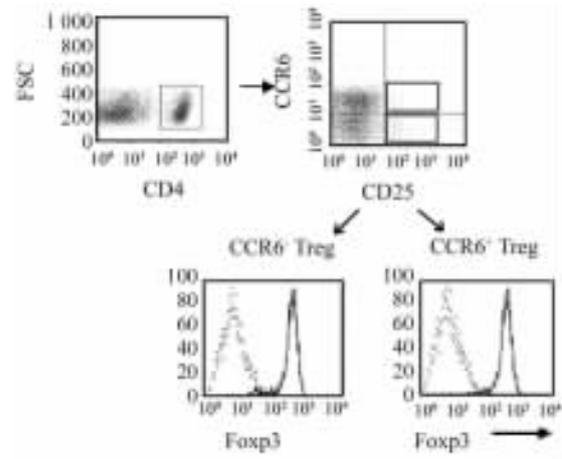


图 1 CCR6<sup>+</sup>Tregs 中 Foxp3 的表达

Fig.1 Expression of Foxp3 on CCR6<sup>+</sup>Tregs

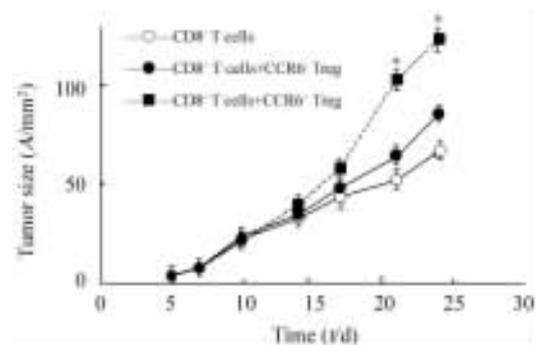


图 2 CCR6<sup>+</sup>Tregs 联合 CD8<sup>+</sup>T 细胞转输促进荷瘤裸鼠 4T1 肿瘤的生长

Fig.2 CCR6<sup>+</sup>Tregs combined with CD8<sup>+</sup>T cells promoted tumor growth in 4T1 bearing nude mice

\*  $P < 0.05$  vs CD8<sup>+</sup>T cells or CD8<sup>+</sup>T cells + CCR6<sup>-</sup>Treg

### 2.4 CCR6<sup>+</sup>Tregs 抑制体内 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖

结果显示,与 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组与 CD8<sup>+</sup>T 细胞组相比,CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖能力明显削弱,从( $71.28 \pm 7.14$ )% 分别下降为( $58.4 \pm 6.44$ )% 和( $36.4 \pm 5.43$ )% ( $P < 0.05$ ,图 4),这表明 CCR6<sup>+</sup>Tregs 可以在体内更有效地抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖。

### 2.5 CCR6<sup>+</sup>Tregs 抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$ 的产生

4T1 特异的 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 CCR6<sup>+</sup>Tregs 共转输 4T1 荷瘤裸鼠,10 d 后检测肿瘤组织 CD8<sup>+</sup>T 细胞的 IFN- $\gamma$  的分泌。结果显示,与 CD8<sup>+</sup>T 细胞组比较,

CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$  的分泌率从( 12. 84  $\pm$  3. 58 )% 下降到( 2. 46  $\pm$  0. 46 )%(  $P < 0. 05$  );CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$  的阳性率也降为( 6. 07  $\pm$  1. 34 )%(  $P < 0. 05$  )。且 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$  的阳性率明显低于 CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组(  $P < 0. 05$ , 图 5 )。

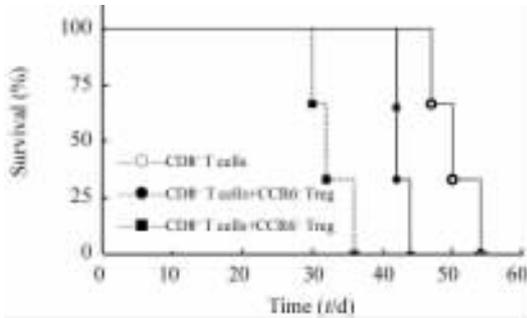


图3 CCR6<sup>+</sup>Tregs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞转输的 4T1 荷瘤裸鼠生存时间的影响

Fig.3 Effect of CCR6<sup>+</sup>Tregs on survival time of tumor bearing mice transferred with CD8<sup>+</sup>T cells

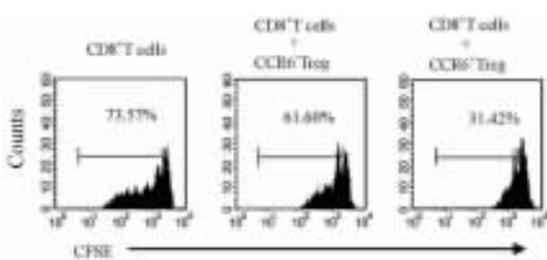


图4 CCR6<sup>+</sup>Tregs 抑制体内 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖  
Fig.4 CCR6<sup>+</sup>Tregs inhibited proliferation of CD8<sup>+</sup>T cells in vivo

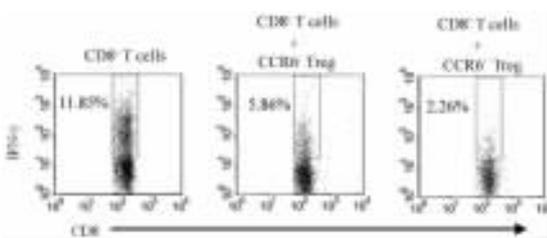


图5 CCR6<sup>+</sup>Tregs 抑制体内 CD8<sup>+</sup>T 细胞 IFN- $\gamma$  的产生  
Fig.5 CCR6<sup>+</sup>Tregs inhibited IFN- $\gamma$  production of CD8<sup>+</sup>T cells in vivo

2.6 CCR6<sup>+</sup>Tregs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞的颗粒酶 B 表达的影响

4T1 特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 CCR6<sup>+</sup>Tregs 共转输 4T1 荷瘤裸鼠,10 d 后检测肿瘤组织 CD8<sup>+</sup>T 细胞中

颗粒酶 B 的表达情况。结果显示,与 CD8<sup>+</sup>T 细胞组比较,CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>+</sup>Tregs 组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞中颗粒酶 B 的阳性率从( 12. 44  $\pm$  2. 33 )% 下降到( 3. 69  $\pm$  0. 89 )%(  $P < 0. 05$  );CD8<sup>+</sup>T 细胞 + CCR6<sup>-</sup>Tregs 组的 CD8<sup>+</sup>T 细胞中颗粒酶 B 的阳性率也降为( 6. 97  $\pm$  1. 27 )%(  $P < 0. 05$  )( 图 6 )。

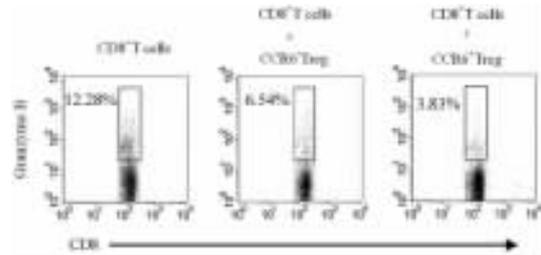


图6 CCR6<sup>+</sup>Tregs 抑制体内 CD8<sup>+</sup>T 细胞中颗粒酶 B 的表达  
Fig.6 CCR6<sup>+</sup>Tregs inhibited granzyme B expression of CD8<sup>+</sup>T cells in vivo

3 讨论

近年来,记忆性 T 细胞在肿瘤免疫中的作用得到了人们的关注<sup>[11-15]</sup>。人们发现在肿瘤局部存在的 T 细胞主要是表达 CD45RO 的记忆细胞<sup>[16]</sup>,并且肿瘤局部记忆性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例与患者的预后密切相关<sup>[17]</sup>。这些研究表明,记忆性 T 细胞在肿瘤免疫反应中发挥了重要作用。对于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞而言,人们也发现在肿瘤患者的骨髓和引流淋巴结中存在的 Tregs 表达记忆性标记 CD45RO<sup>[18-19]</sup>,这提示在肿瘤免疫中也存在 Tregs 的记忆亚群。本课题前期研究中已经发现,在肿瘤免疫中 CCR6<sup>+</sup>Tregs 在肿瘤局部存在显著富集(数据未显示)。为了进一步阐明 CCR6<sup>+</sup>Tregs 在肿瘤免疫中的作用,本实验通过荷瘤裸鼠的体内转输实验来观察 CCR6<sup>+</sup>Tregs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞功能的抑制作用。结果发现 CCR6<sup>+</sup>Tregs 和 CCR6<sup>-</sup>Tregs 均可以在体内有效抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞介导的抗肿瘤免疫效应,肿瘤生长明显快于 CD8<sup>+</sup>T 细胞单转输组,荷瘤小鼠的存活时间也显著缩短。但 CCR6<sup>+</sup>Tregs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞抗肿瘤效应的抑制作用比 CCR6<sup>-</sup>Tregs 更显著。这提示 CCR6<sup>+</sup>Tregs 可以较 CCR6<sup>-</sup>Tregs 更有效抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应。

为了进一步确定该结果,本实验检测了 CCR6<sup>+</sup>Tregs 和 CCR6<sup>-</sup>Tregs 对 CD8<sup>+</sup>T 细胞增殖和细胞因子 IFN- $\gamma$  产生的影响。结果显示 CCR6<sup>+</sup>Tregs 可以在体内更有效地抑制 CD8<sup>+</sup>T 细胞的增殖和细胞因

子IFN- $\gamma$ 的产生。另外,结果还显示,CCR6<sup>+</sup>Tregs共转输组肿瘤局部CD8<sup>+</sup>T细胞的颗粒酶B的表达水平明显低于CCR6<sup>-</sup>Tregs共转输组和CD8<sup>+</sup>T细胞单转输组,提示CD8<sup>+</sup>T细胞功能成熟度的降低。这些结果都进一步表明CCR6<sup>+</sup>Tregs可以较CCR6<sup>-</sup>Tregs在体内更有效地抑制CD8<sup>+</sup>T细胞的功能。Zhao等<sup>[20]</sup>的研究发现,CD103<sup>+</sup>的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞可以有效抑制GVHD的发生,并认为只有CD103<sup>+</sup>调节性T细胞才能有效迁移到免疫反应局部,从而发挥免疫抑制功能有关。然而,Joerg等<sup>[21]</sup>却发现在GVHD模型中,CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T调节细胞才能更有效地定居于淋巴结,从而参与免疫保护效应。这可能与不同亚群Tregs在体内不同的定位有关,至于其确切的作用机制还需进一步的深入研究探讨。

总之,本研究发现CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>记忆性调节性T细胞可以在体内更有效地抑制CD8<sup>+</sup>T细胞介导的抗肿瘤效应,提示CCR6<sup>+</sup>Tregs不但参与了肿瘤的免疫逃逸,而且可能在长期的肿瘤发生、发展过程中发挥了关键作用。本研究结果为后续研究深入阐明调节性T细胞记忆亚群在肿瘤免疫逃逸中的作用和机制,以及肿瘤的临床免疫治疗提供了新的实验依据。

## [参考文献]

- [ 1 ] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases [ J ]. *J Immunol*, 1995, 155( 3 ): 1151-1164.
- [ 2 ] Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection [ J ]. *Hepatology*, 2005, 41( 4 ): 771-778.
- [ 3 ] Ramirez E, Morales JM, Lora D, *et al.* Peripheral blood regulatory T cells in long-term kidney transplant recipients [ J ]. *Transplant Proc*, 2009, 41( 6 ): 2360-2362.
- [ 4 ] Ko HJ, Cho ML, Lee SY, *et al.* CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell population [ J ]. *J Autoimmun*, 2009, [ Epub ahead of print ].
- [ 5 ] Fernandez I, Zeiser R, Karsunky H, *et al.* CD101 surface expression discriminates potency among murine FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells [ J ]. *J Immunol*, 2007, 179( 5 ): 2808-2814.
- [ 6 ] Voo KS, Wang YH, Santori FR, *et al.* Identification of IL-17-producing FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in humans [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106( 12 ): 4793-4798.
- [ 7 ] Röttschke O, Borsellino G, Battistini L, *et al.* *In vivo*-activated CD103<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Tregs: of men and mice [ J ]. *Blood*, 2008, 112( 5 ): 2129-2138.
- [ 8 ] Kerstin S, Markus F, Christiane S, *et al.* Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity *in vivo* [ J ]. *Blood*, 2005, 106( 9 ): 3097-3104.
- [ 9 ] Tarbell KV, Petit L, Zuo X, *et al.* Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice [ J ]. *J Exp Med*, 2007, 204( 1 ): 191-201.
- [ 10 ] Chen X, Subleski JJ, Kopf H, *et al.* Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells [ J ]. *J Immunol*, 2008, 180( 10 ): 6467-6471.
- [ 11 ] Lin X, Gudgeon NH, Hui EP, *et al.* CD4 and CD8 T cell responses to tumour-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, 57( 7 ): 963-975.
- [ 12 ] Gu T, Kilinc MO, Egilmez NK. Transient activation of tumor-associated T-effector/memory cells promotes tumor eradication via NK-cell recruitment: minimal role for long-term T-cell immunity in cure of metastatic disease [ J ]. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57( 7 ): 997-1005.
- [ 13 ] Nakamura Y, Watchmaker P, Urban J, *et al.* Helper function of memory CD8<sup>+</sup> T cells: heterologous CD8<sup>+</sup> T cells support the induction of therapeutic cancer immunity [ J ]. *Cancer Res*, 2007, 67( 20 ): 10012-10018.
- [ 14 ] Vella LA, Yu M, Fuhrmann SR, *et al.* Healthy individuals have T-cell and antibody responses to the tumor antigen cyclin B1 that when elicited in mice protect from cancer [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106( 33 ): 14010-14015.
- [ 15 ] Nesbeth Y, Scarlett U, Cubillos-Ruiz J, *et al.* CCL5-mediated endogenous antitumor immunity elicited by adoptively transferred lymphocytes and dendritic cell depletion [ J ]. *Cancer Res*, 2009, 69( 15 ): 6331-6338.
- [ 16 ] Joncker NT, Marloie MA, Chernysheva A, *et al.* Antigen-independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors [ J ]. *Int J Cancer*, 2006, 118( 5 ): 1205-1214.
- [ 17 ] Pagès F, Berger A, Camus M, *et al.* Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer [ J ]. *N Engl J Med*, 2005, 353( 25 ): 2654-2666.
- [ 18 ] Kawaida H, Kono K, Takahashi A. Distribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer [ J ]. *J Surg Res*, 2005, 124( 1 ): 151-157.
- [ 19 ] Brinkrolf P, Landmeier S, Altwater B, *et al.* A high proportion of bone marrow T cells with regulatory phenotype ( CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP3<sup>+</sup> ) in Ewing sarcoma patients is associated with metastatic disease [ J ]. *Int J Cancer*, 2009, 125( 4 ): 879-886.
- [ 20 ] Zhao D, Zhang C, Yi T, *et al.* *In vivo*-activated CD103<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease [ J ]. *Blood*, 2009, 113( 9 ): 2119-2120.
- [ 21 ] Joerg E, Petra H, Matthias E, *et al.* Only the CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells subpopulation protects from lethal acute GVHD [ J ]. *Blood*, 2005, 105( 3 ): 2220-2226.

[ 收稿日期 ] 2009-08-19

[ 修回日期 ] 2009-09-08

[ 本文编辑 ] 徐红梅