

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.002

· 基础研究 ·

## 癸酸能够活化 CD8<sup>+</sup> T 细胞并提高其抗肿瘤免疫反应能力

张翀<sup>a</sup>, 金海振<sup>b,▲</sup>, 周纯<sup>a</sup>, 胡惠惠<sup>c</sup>, 王娟<sup>d</sup>, 王秦兰<sup>a,e</sup> (上海市胸科医院/上海交通大学医学院附属胸科医院  
a. 重症医学科; b. 中心实验室; c. 放疗科; d. 科教部; e. 呼吸与危重症医学科, 上海 200030)

**[摘要]** **目的:** 探究中链脂肪酸癸酸对 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化的影响, 及其对 CD8<sup>+</sup> T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应的作用和机制。**方法:** 建立 C57BL/6 小鼠黑色素瘤 B16F10 皮下荷瘤模型, 随机分为癸酸组 (10 mg/kg 癸酸灌胃) 和对照组 (等量溶剂灌胃), 观察癸酸对小鼠肿瘤生长以及生存率的影响, 采用流式细胞术检测肿瘤微环境中浸润 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化水平。建立 B16F10-OVA 和 OT-I T 细胞共培养体系, 采用流式细胞术检测癸酸对 CD8<sup>+</sup> T 细胞的肿瘤细胞杀伤能力的影响。采用  $\alpha$ -CD8 抗体清除 B16F10 荷瘤小鼠体内 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 观察对小鼠肿瘤体积的影响。小鼠原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞经癸酸处理后, 采用 WB、ELISA 及 qPCR、流式细胞术检测 T 细胞受体 (TCR) 活化、效应细胞因子产生以及增殖和代谢水平。在 B16F10 荷瘤小鼠模型中, 观察  $\alpha$ -PD-1 抗体联合癸酸给药对小鼠肿瘤生长以及生存率的影响。**结果:** 在小鼠黑色素瘤荷瘤模型中, 与对照组相比, 癸酸组小鼠移植瘤体积显著降低且生存率显著提高 (均  $P < 0.05$ ), 肿瘤浸润 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。经癸酸处理的 OT-I T 细胞对 B16F10-OVA 细胞的杀伤水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。在荷瘤小鼠模型中用  $\alpha$ -CD8 抗体清除 CD8<sup>+</sup> T 细胞后, 癸酸对移植瘤的抑制作用显著降低 ( $P < 0.0001$ )。小鼠原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞经癸酸处理后, TCR 活化水平显著升高、细胞因子 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的产生增多、线粒体代谢水平显著上调 (均  $P < 0.05$ )。在黑色素瘤荷瘤小鼠模型中, 癸酸与  $\alpha$ -PD-1 抗体联用, 能够显著抑制小鼠移植瘤生长并提高其生存率 (均  $P < 0.05$ )。**结论:** 癸酸能够促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化、增强其抗肿瘤免疫反应能力。

**[关键词]** 抗肿瘤免疫; 癸酸; CD8<sup>+</sup> T 细胞; 程序性死亡蛋白-1

**[中图分类号]** R730.54; R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0437-08

## Decanoic acid activates CD8<sup>+</sup> T cells and enhances their anti-tumor immune responses

ZHANG Chong<sup>a</sup>, JIN Haizhen<sup>b,▲</sup>, ZHOU Chun<sup>a</sup>, HU Huihui<sup>c</sup>, WANG Juan<sup>d</sup>, WANG Qinlan<sup>a,e</sup> (a. Department of Critical Care Medicine; b. Department of Central Laboratory; c. Department of Radiation Oncology; d. Department of Science & Education; e. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shanghai Chest Hospital & Chest Hospital Affiliated to School of Medicine of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of midchain fatty acid decanoic acid on CD8<sup>+</sup> T cell activation and its effect and mechanism in CD8<sup>+</sup> T cell-mediated anti-tumor immune response. **Methods:** Subcutaneous melanoma B16F10 cells tumor-bearing C57BL/6 mouse models were established and randomly divided into the decanoic acid group (10 mg/kg decanoic acid by gavage) and the control group (equal amount of solvent by gavage). The effect of decanoic acid on the growth of mouse tumors and their survival rate were measured. The activation of tumor-infiltrated CD8<sup>+</sup> T cells in the tumor microenvironment was detected by flow cytometry. The  $\alpha$ -CD8 mAb was used to deplete CD8<sup>+</sup> T cells in B16F10 tumor-bearing mice, and the effect on the tumor volume was observed. Mouse primary CD8<sup>+</sup> T cells were treated with decanoic acid, and T cell receptor (TCR) activation, effector cytokine production as well as proliferation and metabolism levels were detected by WB, ELISA, qPCR, and flow cytometry. In B16F10 tumor-bearing mouse model, the effects of administration of  $\alpha$ -PD-1 mAb combined with decanoic acid on the growth of mouse tumors and mouse survival rate were observed. **Results:** In the mouse melanoma model, compared with those in the control group the volume of mouse transplanted tumors significantly reduced and mouse survival rate significantly increased in the decanoic acid group. (both  $P < 0.05$ ). The expression levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells were significantly higher in the decanoic acid group than that in the control group ( $P < 0.01$ ). The killing ability of OT-I T cells against B16F10-OVA cells was significantly elevated after treatment

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82371755); 上海交通大学“交大之星”计划医工交叉研究基金(No. YG2023QNA40)

**[作者简介]** 张翀(1993—), 女, 硕士, 主要从事抗病毒、抗肿瘤免疫学研究, E-mail: FreyaCC9@hotmail.com; 金海振(1990—), 男, 硕士, 主要从事抗肿瘤免疫学研究, E-mail: haizhenjin@126.com。▲为共同第一作者

**[通信作者]** 王秦兰, E-mail: wangq15@163.com; 王娟, E-mail: Janewang008@hotmail.com

with decanoic acid ( $P < 0.01$ ). The suppressive effect of decanoic acid on transplanted tumors was significantly reduced after CD8<sup>+</sup> T cells were depleted with  $\alpha$ -CD8 mAb in the melanoma mouse model ( $P < 0.0001$ ). Mouse-derived primary CD8<sup>+</sup> T cells treated with decanoic acid showed significantly higher levels of TCR activation, increased production of cytokines IL-2 and IFN- $\gamma$ , and significantly up-regulated the mitochondrial metabolic level (all  $P < 0.05$ ). In the melanoma mouse model, decanoic acid in combination with  $\alpha$ -PD-1 mAb significantly inhibited tumor growth and increased the survival rate (both  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Decanoic acid can enhance the anti-tumor immune responses by promoting CD8<sup>+</sup> T cell activation.

**[Key words]** anti-tumor immunity; decanoic acid; CD8<sup>+</sup> T cell; programmed death protein-1 (PD-1)

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 437-444. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.002]

CD8<sup>+</sup> T细胞是机体抗肿瘤免疫反应的主要细胞亚群,其活化是发挥抗肿瘤功能的先决条件<sup>[1-3]</sup>。然而在肿瘤发生发展过程中,CD8<sup>+</sup> T细胞的活化通常处于抑制状态<sup>[4]</sup>,因此探索能够增强CD8<sup>+</sup> T细胞活化的潜在药物及其作用机制成为关键的科学问题<sup>[5-10]</sup>。癩酸(decanoic acid)属于中链饱和脂肪酸的一种,主要从椰子油和棕榈油等天然产物中提取,也存在于哺乳动物的乳汁中<sup>[11]</sup>。研究<sup>[12-16]</sup>表明,癩酸在肿瘤生长以及细胞生长发育过程中发挥重要的促进作用,其可通过调节肿瘤细胞周期或促进凋亡相关基因的表达,进而抑制乳腺癌、结直肠癌和皮肤癌细胞的生长;通过增强线粒体功能指标柠檬酸合成酶的活性保护神经元;通过抑制ERK活性,进而抑制破骨细胞发育;也能够阻断AKT和ERK1/2信号通路,干扰线粒体功能,进而抑制细胞增殖和侵袭。但是,癩酸在CD8<sup>+</sup> T细胞及其抗肿瘤免疫反应中的作用尚不明确。本研究探讨癩酸在CD8<sup>+</sup> T细胞活化中的作用,以及在促进CD8<sup>+</sup> T细胞抗肿瘤免疫反应中的作用和机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

癩酸购自陶术公司(T3379,粉末剂型;使用时称取2 mg,用1.16 mL DMSO溶解,储存浓度为10 mmol/L),RPMI 1640、MEM培养基和胎牛血清均购自Gibco公司, RNA提取试剂盒(220011)购自飞捷公司, RNA反转录(11123ES60)和qPCR(11202ES08)检查试剂盒均购自YEASEN公司。

体内实验级小鼠同型对照抗体 Isotype IgG2a (2A3, BE0089)、 $\alpha$ -CD8 抗体(克隆号:53-6.7, BE0061)和 $\alpha$ -PD-1 抗体(克隆号:RMP1-14, BE0146)均购自Bio X cell公司, WB实验所用抗p-S6(5364S)、抗p-P70S6K(9204S)、抗 $\beta$ -actin(4970S)抗体以及细胞裂解液(9803S)均购自CST公司,抗磷酸化-淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(phosphorylated-lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, p-LCK)抗体(Y394)(MAB7500)和重组小鼠IL-2(rmIL-2, MX2816041)均购自R&D公司,磷酸酶抑制剂

(04906837001)和蛋白酶抑制剂(04693116001)均购自罗氏公司, OVA<sub>257-264</sub>多肽购自吉尔生化公司, HRP显影液购自圣尔公司, PVDF膜(IPVH00010)购自默克公司, 流式用抗CD45(克隆号:30-F11, APC-cy7)、抗CD8(克隆号:53-6.7, APC)、抗IFN- $\gamma$ (克隆号:XMG2.2, PE)、抗-TNF- $\alpha$ (克隆号:MP6-XT22, PE-cy7)抗体及IL-2(431001)和IFN- $\gamma$ (430801)ELISA检测试剂盒均购自BioLegend公司, 抗鼠CD3 $\epsilon$ (克隆号:145-2C11, 553057)、CD28(克隆号:37.51, 553294)抗体均购自BD公司, LIVE/DEAD细胞活力检测试剂盒(L34957)、CFSE(C34554)和Foxp3/转录因子染色试剂盒(2159394)均购自Thermo公司, 线粒体荧光探针MitoTracker<sup>®</sup> Deep Red FM(40743ES50)购自YEASEN公司。垂直电泳和转膜设备购自Bio-Rad公司, Fortessa流式细胞仪购自BD公司, qPCR仪购自ABI公司。

### 1.2 细胞培养

从WT小鼠中分离的CD8<sup>+</sup> T细胞在完全RPMI 1640培养基(10% FBS, 0.05 mM 2-巯基乙醇, 1 mmol/L NEAA)中培养。简要过程:颈椎脱臼处死小鼠, 取脾组织置于预冷PBS中, 再于滤网上用研磨棒研磨, 收集研磨后的液体, 300 $\times$ g离心5 min, 裂解红细胞后制备为单细胞悬液备用。随后用美天旋磁珠分选试剂盒按照说明书操作分选CD8<sup>+</sup> T细胞, 具体步骤:每1 $\times$ 10<sup>7</sup>个细胞用80  $\mu$ L PBS重悬, 加入20  $\mu$ L CD8磁珠, 混匀后于4  $^{\circ}$ C处理15 min, 加入2 mL PBS重悬, 300 $\times$ g离心5 min, 再用1 mL PBS重悬细胞, 加入LS柱子中, 将LS柱置于磁极中, 待细胞液流完后, 往LS柱中加入3 mL PBS, 用LS柱匹配的活塞推细胞至15 mL离心管, 300 $\times$ g离心5 min, 收集沉淀即为CD8<sup>+</sup> T细胞。

B16F10和B16F10-OVA细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养。培养条件均为37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>。B16F10-OVA细胞购自ATCC细胞库。

从OT-I小鼠的淋巴结获得OT-I T细胞。简要过程:将转基因小鼠OT-I颈椎脱臼处死, 取淋巴结, 研磨后制备为单细胞悬液, 使用5  $\mu$ g/mL OVA<sub>257-264</sub>多肽刺激1 d, 离心并置于含有1 ng/mL重组小鼠蛋白IL-2

的新鲜培养基中再培养 2 d, 即为原代 OT-I T 细胞。

### 1.3 小鼠皮下荷瘤模型的构建及功能检测

C57BL/6 小鼠(7-8 周龄, 雄鼠)购自江苏华创生物公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2020-0009。所有小鼠均饲养在上海交通大学医学院附属上海市胸科医院 SPF 设施中, 实验动物使用许可证号: SYXK(沪)2023-0020。所有的动物实验都使用了年龄和性别匹配的小鼠。动物被随机分配到实验组。所有动物实验均经上海市胸科医院动物机构爱护使用委员会批准。小鼠肿瘤测量/体积符合实验动物使用与管理委员会守则。

为检测癸酸的体内抗肿瘤功能, 构建皮肤黑色素瘤皮下荷瘤小鼠模型。向 C57BL/6 小鼠腹腔注射阿福丁麻醉(1.25%阿福丁, 0.2 mL/10 g 体质量), 用 PBS 清洗 B16F10 细胞一次, 然后将 B16F10 细胞( $2 \times 10^5$  个)用 100  $\mu$ L PBS 重悬, 皮下注射于小鼠背部(记为 Day 0)。待到 Day 7, 观察到小鼠背部皮下肿瘤直径约为 4~6 mm 即为造模成功, 将其随机分为 2 组( $n=5\sim 10$ )并给药: (1)对照组, 每只小鼠用 100  $\mu$ L 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)灌胃; (2)实验组: 每只小鼠用 100  $\mu$ L 溶解于 CMC-Na 的癸酸(10 mg/kg)灌胃。从第 7 天起, 每 2 d 测量一次肿瘤体积, 每天记录动物存活率。肿瘤体积=长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径 $\times 0.5$ 。

为验证癸酸在体内是否通过 CD8<sup>+</sup> T 细胞发挥抗肿瘤效应, 如上法构建黑色素瘤皮下荷瘤小鼠模型(Day 0), 在 Day 7 随机分为 4 组( $n=5\sim 10$ ): 对照组+同型 IgG2a, 对照组+ $\alpha$ -CD8, 癸酸+同型 IgG2a, 癸酸+ $\alpha$ -CD8。分别在 Day 6、Day 7、Day 9 和以后每隔 2 d 腹腔注射  $\alpha$ -CD8 抗体(100  $\mu$ g/只), 按上述方式记录肿瘤生长和生存率。

为了探究癸酸联用  $\alpha$ -PD-1 抗体的抗肿瘤功能, 如上法构建黑色素瘤皮下荷瘤小鼠模型(Day 0), 并在 Day 7 随机分为 4 组( $n=5\sim 10$ ): 对照组+同型 IgG2a, 对照组+ $\alpha$ -PD-1, 癸酸+同型 IgG2a, 癸酸+ $\alpha$ -PD-1。分别在 Day 7、Day 11、Day 15 和以后每隔 3 d 腹腔注射  $\alpha$ -CD8 抗体(200  $\mu$ g/只), 按上述方式记录肿瘤生长和生存率。

### 1.4 流式细胞术检测移植瘤内浸润 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化情况

于 Day 15 用颈椎脱臼法处死小鼠, 剥离肿瘤并将其剪碎, 加入 DNase I (0.1 mg/mL) 和胶原酶 D (1 mg/mL), 在 37  $^{\circ}$ C 摇床上(200 rpm/min)消化 30 min, 经研磨后用 70  $\mu$ m 滤网去除团块并收集细胞。Percoll 法分离肿瘤微环境中的免疫细胞: 使用 3 mL 的 50% Percoll 重悬细胞, 将 3 mL 的 70% Percoll 缓缓加入底部, 采用升降速分别为 1 和 0, 于室温下

900 $\times$ g 离心 20 min, 轻柔吸出中间云雾层, 转移至新的 15 mL 离心管, 加入 10 mL PBS, 500 $\times$ g 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 用 LIVE/DEAD(BV510)染液(1:1 000)及抗 CD45(1:500)、抗 CD8(1:500)、抗 IFN- $\gamma$ (1:100)、抗 TNF- $\alpha$ (1:100)抗体染色, 用 Foxp3/转录因子染色试剂盒进行细胞膜固定、打孔。用流式细胞仪检测并收集数据, 采用 FlowJo 10.8.1 软件进行数据分析。

### 1.5 流式细胞术检测癸酸对 OT-I T 细胞杀伤 B16-OVA 细胞能力的影响

将原代 OT-I T 细胞分为对照组和癸酸组, 分别用 DMSO(与癸酸组等体积的溶剂)或癸酸(5  $\mu$ mol/L)处理 2 h, 收集细胞后用预热的 PBS 洗 2 次, 再分别与 B16F10-OVA 细胞按不同效靶比(1:1、4:1、10:1)共培养, 16~24 h 后收集细胞, 用 LIVE/DEAD 细胞活力检测试剂盒和抗 CD8 抗体(1:500)染色。用流式仪检测并收集数据, 采用 FlowJo 10.8.1 进行数据分析。

### 1.6 WB 法检测癸酸处理对 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 TCR 活化相关蛋白表达的影响

将原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞用 DMSO 或癸酸(5  $\mu$ mol/L)处理 2 h, 然后用 1  $\mu$ g/mL anti-mouse CD3 $\epsilon$  和 1  $\mu$ g/mL anti-mouse CD28 刺激 0、15 和 30 min。收集细胞, 用细胞裂解液冰上裂解 15 min, 裂解液中含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂。BCA 法测定蛋白含量后取 50  $\mu$ g 的蛋白于 99  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 行 10% SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜上。用于免疫印迹的抗体: 抗 p-S6、抗 p-P70S6K、抗 p-LCK(Y394)、抗  $\beta$ -actin 抗体。使用 ECL 发光液和 ChemiDoc 成像系统(AI600)检测蛋白质表达。

### 1.7 流式细胞术检测癸酸处理对 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖和线粒体代谢的影响

增殖水平检测: 原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞用癸酸(5  $\mu$ mol/L)或等量 DMSO 溶剂处理 2 h, 收集细胞后用预热 PBS 清洗 2 次, 5  $\mu$ mol/L CFSE 在 37  $^{\circ}$ C 水浴中标记 20 min, 再置于 5 mL 预温的完全培养基中, 5 min 后 300 $\times$ g 离心 5 min, 用预温 PBS 洗涤细胞 2 次, 将细胞铺入已包被 1  $\mu$ g/mL 抗鼠 CD3 $\epsilon$  和 1  $\mu$ g/mL 抗鼠 CD28 抗体的 96 孔板中, 培养基内添加 1 ng/mL rmlL-2。2 d 后收集细胞, 用 LIVE/DEAD(BV510)染液(1:1 000)和抗 CD8 抗体(1:500)染色, 随后用流式仪检测并收集数据, 采用 FlowJo 10.8.1 软件进行数据分析。

线粒体代谢检测: 细胞处理同上, 先用 LIVE/DEAD(APC-Cy7)染液(1:1 000)和抗 CD8 抗体(1:500)染色, 收集细胞后用 250 nmol/L MitoTracker<sup>®</sup> 在 37  $^{\circ}$ C 培养箱中染色 30 min, 用新鲜培养基重悬细胞, PBS 清洗 1 次, 用流式仪检测并收集数据, 采用 FlowJo 10.8.1 进行数据分析。

### 1.8 ELISA 和 qPCR 法检测癸酸处理对原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IL-2 和 IFN- $\gamma$ 表达的影响

ELISA 检测: 原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞用 DMSO 或癸酸 (5  $\mu$ mol/L) 处理 4 h, 收集培养上清, 使用 IL-2 和 IFN- $\gamma$  试剂盒按照操作说明书进行检测。

qPCR 检测: 细胞分组处理同上, 收集细胞, 裂解细胞并提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 进行 qPCR 检测 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的 mRNA 水平, 所用引物序列: IL-2 的正向引物为 5'-GTGCTCCTTGTC AACAGCG-3', 反向引物为 5'-GGGGAGTTTCAGGTTCTGTA-3'; IFN- $\gamma$  的正向引物为 5'-ATGAACGCTACACACTGCATC-3', 反向引物为 5'-CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC-3';  $\beta$ -actin 的正向引物为 5'-GACCTGACTGACTACCTCATGAAGAT-3', 反向引物为 5'-GTCACACTTCATGATGGAGTTGAAGG-3'。qPCR 循环条件: 第一步(循环数 1)预变性, 95 $^{\circ}$ C 5 min; 第二步(循环数 40), 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s、60 $^{\circ}$ C 退火 20 s、72 $^{\circ}$ C 延伸

1 min; 第三步(循环数 1)为溶解曲线阶段, 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 1 min、95 $^{\circ}$ C 15 s。

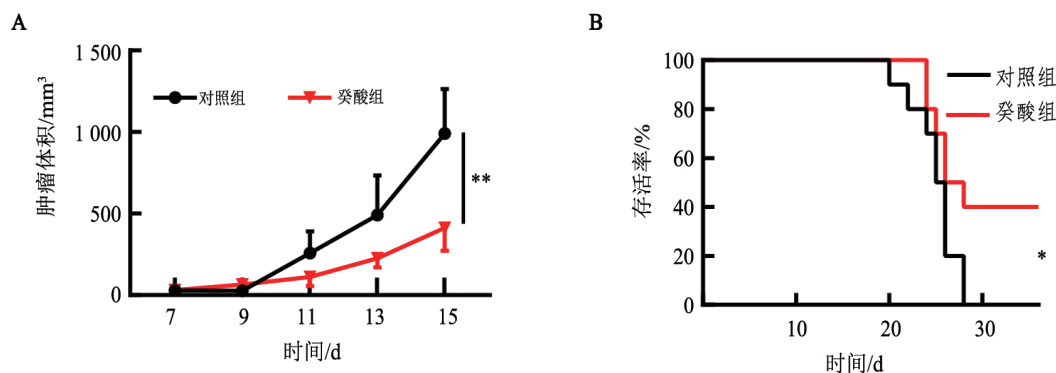
### 1.9 统计学处理

上述主要实验均独立重复 3 次。采用 GraphPad 软件进行统计分析, 两组实验数据的统计学差异采用非配对样本 *t* 检验或 Two-way ANOVA 分析, 生存率差异采用 Log-rank (Mantel-Cox) 进行分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 癸酸显著抑制 B16F10 细胞小鼠移植瘤生长

成功构建 C57BL/6 小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞皮下荷瘤模型, 灌胃给予癸酸和 CMC-Na 对照处理后, 如图 1 所示, 与对照组相比, 癸酸组小鼠移植瘤生长受到明显抑制 ( $P < 0.01$ , 图 1A), 小鼠生存率显著提高 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。



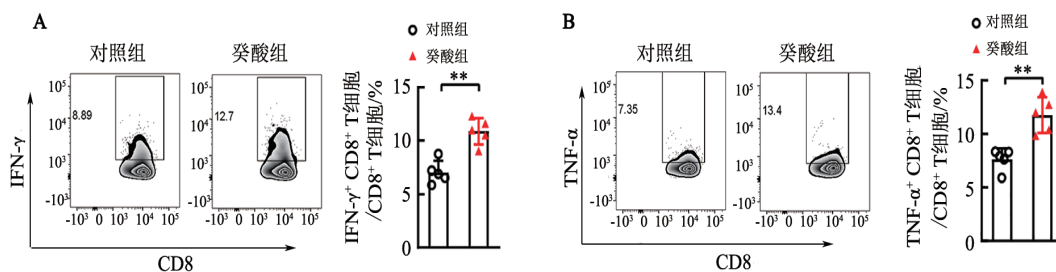
A: 2 组荷瘤小鼠皮下瘤的体积比较 ( $n=5$ ); B: 2 组荷瘤小鼠的存活率比较 ( $n=10$ )。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 1 癸酸抑制 B16F10 细胞小鼠移植瘤的生长而提高小鼠生存率

### 2.2 癸酸促进肿瘤微环境中 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化

分离肿瘤微环境中的免疫细胞, 流式细胞术检测肿瘤浸润的 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化水平, 结果如图 2 所

示, 癸酸组 CD8<sup>+</sup> T 细胞内 IFN- $\gamma$  (图 2A) 和 TNF- $\alpha$  (图 2B) 水平显著高于对照组 (均  $P < 0.01$ ), 说明癸酸能够促进肿瘤微环境中 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活化。



\*\* $P < 0.01$ ,  $n=5$ 。

图 2 癸酸显著促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 IFN- $\gamma$ (A) 和 TNF- $\alpha$ (B) 的表达

### 2.3 癸酸处理提高 OT-I T 细胞对 B16F10-OVA 细胞的杀伤能力

用癸酸处理 OT-I T 细胞, 随后将其与 B16F10-

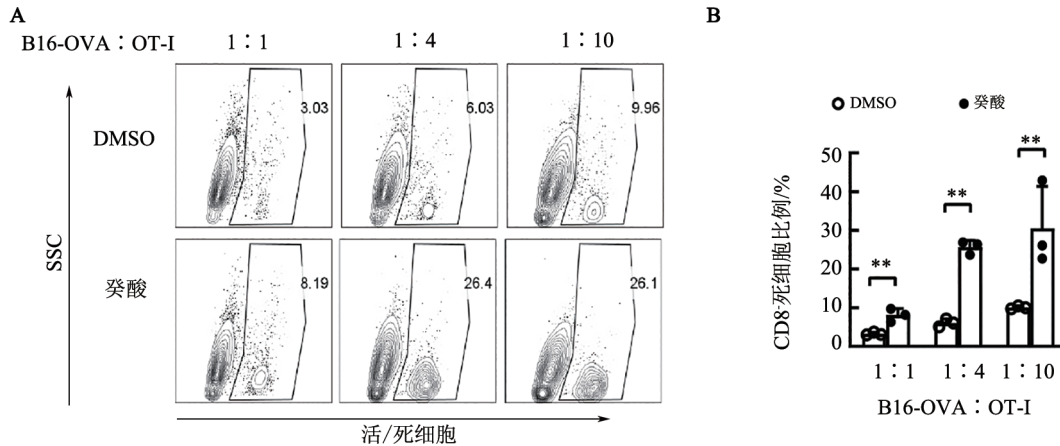
OVA 细胞以不同效靶比 (1:1、4:1、10:1) 共培养, 流式细胞术检测 B16F10-OVA 细胞的死亡率, 结果如图 3 所示, 在各效靶比下, 癸酸组中 B16F10-OVA 细

胞的死亡率均显著低于 DMSO 组(均  $P < 0.01$ )。

#### 2.4 癸酸通过 CD8<sup>+</sup> T 细胞发挥抗肿瘤效应

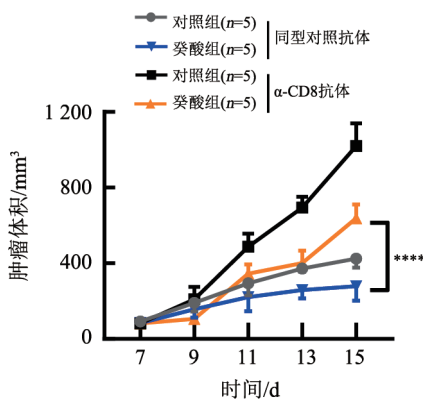
为了探究癸酸是否通过 CD8<sup>+</sup> T 细胞发挥体内抗肿瘤效应, 首先构建 B16F10 荷瘤小鼠模型, 向其注射  $\alpha$ -CD8 抗体以清除荷瘤小鼠体内 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 监测小鼠肿瘤生长。结果(图 4)显示, 清除 CD8<sup>+</sup> T 细胞后, 小鼠肿瘤生长显著加快, 且移植瘤体积较预先注

射同型抗体的未清除 CD8<sup>+</sup> T 细胞的小鼠更大; 清除 CD8<sup>+</sup> T 细胞后, 癸酸组小鼠移植瘤体积较未清除 CD8<sup>+</sup> T 细胞时显著升高( $P < 0.0001$ ), 提示清除 CD8<sup>+</sup> T 细胞会减弱癸酸对移植瘤生长的抑制作用, 表明体内癸酸对小鼠肿瘤生长的抑制作用与 CD8<sup>+</sup> T 细胞有关。



A: 流式细胞术检测共培养体系中肿瘤细胞的死活染色; B: B16F10-OVA 细胞的死亡率统计图。与 DMSO 组比较, \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图3 癸酸处理增强 OT-I T 细胞对 B16F10-OVA 的杀伤能力



\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n = 5$ 。

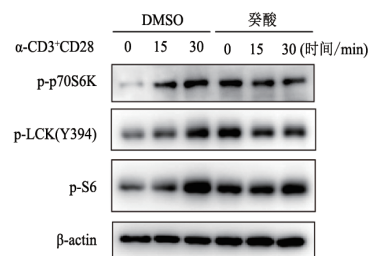
图4 癸酸通过 CD8<sup>+</sup> T 细胞发挥抗肿瘤作用

#### 2.5 癸酸促进小鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞的效应功能

TCR 信号活化是 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化的必要条件, 为了明确癸酸对 CD8<sup>+</sup> T 细胞的 TCR 信号活化情况的影响, 分选小鼠野生型幼稚 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 用癸酸处理, WB 法检测癸酸对幼稚 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR 信号下游 S6 蛋白及其激酶 p70S6K 磷酸化的影响。结果(图 5)显示, 癸酸处理提高了幼稚 CD8<sup>+</sup> T 细胞中 S6 和 p70S6K, 以及 TCR 信号第一激酶 LCK 的磷酸化水平, 表明癸酸促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR 信号活化。

TCR 信号传导的磷酸化导致 T 细胞活化, 以 IL-2 和效应细胞因子的产生、增殖和代谢为标志<sup>[17]</sup>。为了确定癸酸对 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化的影响, 用癸酸处理

CD8<sup>+</sup> T 细胞并检测其效应细胞因子的产生水平。IL-2 的产生是 CD8<sup>+</sup> T 细胞体外激活程序的关键和早期标志。因此, 进一步探索癸酸是否会影响 IL-2 的产生。分选小鼠原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 经癸酸处理后, ELISA 和 qPCR 检测结果(图 6)显示, 癸酸组 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IL-2 的 mRNA 和蛋白水平显著高于 DMSO 组( $P < 0.01$  或  $P < 0.0001$ , 图 6A、B)。IFN- $\gamma$  是 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化发挥抗肿瘤效应最主要的效应细胞因子之一, 因此检测癸酸对 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IFN- $\gamma$  产生的影响。癸酸处理分选的小鼠原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞, ELISA 和 qPCR 检测结果显示, 癸酸组 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IFN- $\gamma$  的 mRNA 和蛋白水平均显著高于 DMSO 组( $P < 0.01$  或  $P < 0.0001$ , 图 6C、D)。说明癸酸能够促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞效应细胞因子的产生。



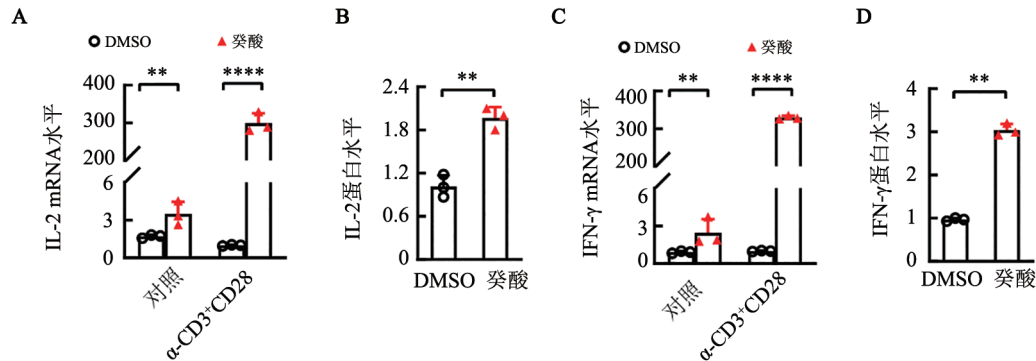
WB 检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR 活化相关蛋白的表达水平。

图5 癸酸促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR 活化

鉴于 IL-2 是促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖的关键因素,

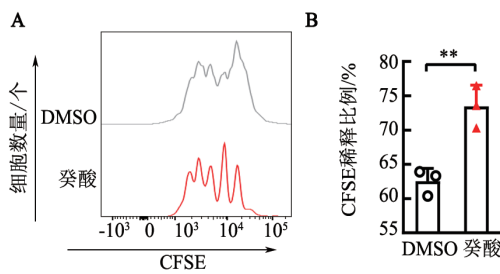
接下来检测癸酸对 T 细胞增殖的影响。分选小鼠原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 癸酸处理后用流式细胞术检测 CFSE 标记的 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖水平, 结果(图 7)显

示, 癸酸组 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖水平显著高于 DMSO 组 ( $P < 0.01$ )。



A: qPCR 法检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IL-2 的 mRNA 水平; B: ELISA 法检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IL-2 的蛋白水平; C: qPCR 法检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IFN-γ 的 mRNA 水平; D: ELISA 法检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IFN-γ 的蛋白水平。 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ 。

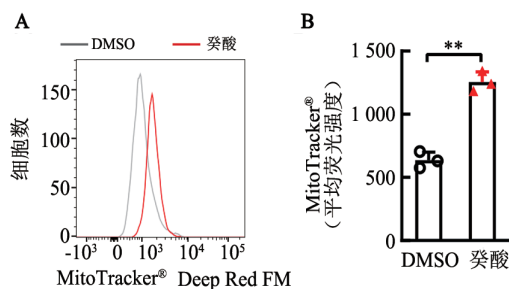
图 6 癸酸促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞 IL-2 和 IFN-γ 的产生



A: 流式细胞术检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞的增殖水平; B: 数据统计图。与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图 7 癸酸促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖

在 TCR 信号活化之后, T 细胞启动合成代谢, 从静息状态进入激活、增殖状态。线粒体生物合成能够提供能量供效应 T 细胞发挥功能。分选小鼠原代 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 癸酸处理后用流式细胞术检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 MitoTracker<sup>®</sup> 荧光强度, 结果(图 8)显示, 癸酸组 CD8<sup>+</sup> T 细胞的 MitoTracker<sup>®</sup> 荧光强度水平显著高于 DMSO 组 ( $P < 0.01$ ), 说明癸酸处理能够促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞线粒体代谢。



A: 流式细胞术检测 CD8<sup>+</sup> T 细胞 MitoTracker<sup>®</sup> 的荧光强度; B: 数据统计图。 \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ 。

图 8 癸酸促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞线粒体代谢

## 2.6 癸酸增强 PD-1 抑制剂的抗肿瘤效应

肿瘤免疫检查点(如 α-PD-1)阻断治疗能够诱导肿瘤浸润 CD8<sup>+</sup> T 细胞的扩增, 为了进一步探究癸酸对 CD8<sup>+</sup> T 细胞抗肿瘤功能的影响, 构建 B16F10 细胞荷瘤小鼠模型, 用 α-PD-1 抗体处理癸酸灌胃的小鼠, 结果显示(图 9)示, 与 α-PD-1 抗体单药治疗相比, 用 α-PD-1 抗体联合癸酸治疗能够抑制小鼠移植瘤生长 ( $P < 0.0001$ ) 并提高小鼠生存率 ( $P < 0.05$ ), 表明癸酸可以增强肿瘤免疫检查点的抗肿瘤作用。

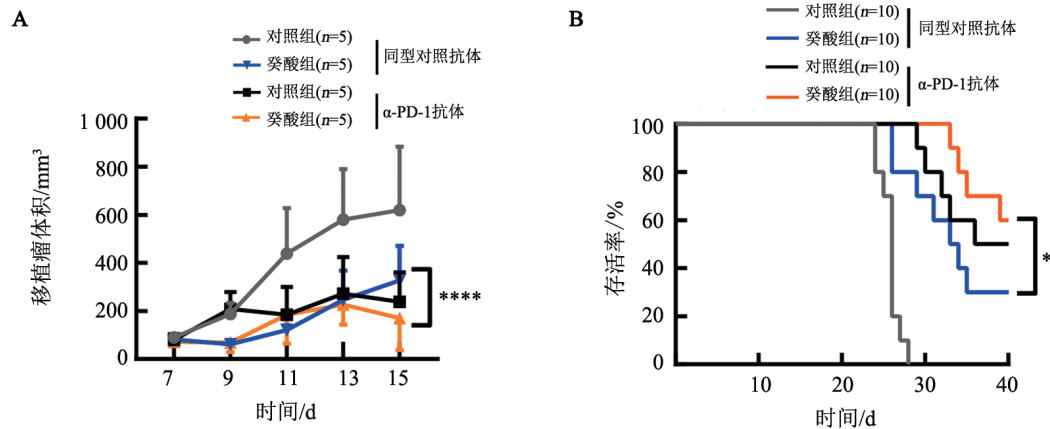
## 3 讨论

小分子或代谢物通过调控 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化增强机体抗肿瘤免疫, 是近年来肿瘤免疫学研究的热点<sup>[18-19]</sup>。已有研究报道<sup>[8]</sup>显示, 反式异油酸能够通过影响 cAMP-PKA-CREB 轴重编程 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 增强其抗肿瘤免疫反应。本团队前期的研究结果<sup>[6]</sup>显示, 双硫仑可直接结合并促进 TCR 信号激酶 LCK 的磷酸化, 重编程 CD8<sup>+</sup> T 细胞并增强其抗肿瘤免疫反应。本研究与以上报道相一致, 发现癸酸能够促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR 活化、增殖以及线粒体代谢水平, 从而增强 CD8<sup>+</sup> T 细胞的抗肿瘤免疫反应, 具有较强的研究依据。但是不足之处在于, 本研究中尚未探究癸酸在 CD8<sup>+</sup> T 细胞的潜在作用靶点, 以及与靶点相结合的作用机制, 有待进一步研究。

肿瘤的免疫检查点抑制剂等疗法临床疗效卓越, 但是仍有大部分肿瘤患者无法获益<sup>[5]</sup>。近年来, 越来越多的证据表明, 免疫联合用药方案能够显著提升免疫检查点疗效。2022 年 *Science* 杂志报道, 亚精胺通过结合线粒体三功能蛋白 (mitochondrial trifunctional protein, MTP), 增强脂肪酸氧化代谢途

径,从而增强 CD8<sup>+</sup> T 细胞对 PD-1 抑制剂的敏感性<sup>[20]</sup>。地西他滨与 PD-1 抑制剂联用,能够重编程耗竭前体 CD8<sup>+</sup> T 细胞 AP-1 家族成员的转录和表观遗传谱特征,从而抑制耗竭 T 细胞的终末分化进程,增强免疫检查点抑制剂的疗效<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,癸酸与

PD-1 抑制剂联用,能够抑制肿瘤生长并显著提高小鼠生存率,提示癸酸也能够作为 PD-1 抑制剂的潜在联合用药,进一步增强免疫检查点抑制剂的敏感性,但其中的作用机制仍有待于进一步探究。



A:4组荷瘤小鼠皮下瘤的体积比较( $n=5$ );B:4组荷瘤小鼠的生存率比较( $n=10$ )。\* $P<0.05$ ,\*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图9 癸酸增强  $\alpha$ -PD-1 抗体的抗肿瘤作用

癸酸作为一种中链饱和脂肪酸,在众多疾病中具有重要的作用。已有报道<sup>[21]</sup>显示,孕期膳食中补充中链脂肪酸可以预防后代肥胖,目前仍不清楚孕期暴露于癸酸对机体激素水平的影响。滋养细胞的正常生长和侵袭对妊娠早期着床和胎盘发育至关重要,而用于生产塑料、化妆品和纺织品的多种化学品均会影响滋养细胞的功能和活力<sup>[22]</sup>,其中癸酸能够通过影响 MAPK 和 AKT 信号通路调控滋养层细胞的存活和侵袭。此外,过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )在胎盘功能中起关键作用,因此关于癸酸对人滋养细胞中 PPAR $\gamma$  的影响也值得深入探究。癸酸不仅调节细胞的信号转导和转录活性,还直接调节激素的分泌及其功能。研究<sup>[23]</sup>显示,癸酸抑制 cAMP 诱导的雄激素合成,诱导多囊卵巢综合征大鼠的发情周期恢复至正常水平。

综上,本课题组提出“小分子介导的 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化”促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞抗肿瘤免疫的范例。本研究发现,小分子化合物癸酸能够通过促进 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化,增强 CD8<sup>+</sup> T 细胞的抗肿瘤免疫功能,为癸酸在抗肿瘤免疫反应中的潜在应用提供实验依据。

#### [参考文献]

- [1] BROWNIE R J, ZAMOYSKA R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 257-269. DOI: 10.1038/nri3403.
- [2] LACHER S B, DÖRR J, DE ALMEIDA G P, *et al.* PGE<sub>2</sub> limits

effector expansion of tumour-infiltrating stem-like CD8<sup>+</sup> T cells[J]. *Nature*, 2024, 629(8011): 417-425. DOI: 10.1038/s41586-024-07254-x.

- [3] MOROTTI M, GRIMM A J, HOPE H C, *et al.* PGE<sub>2</sub> inhibits TIL expansion by disrupting IL-2 signalling and mitochondrial function [J]. *Nature*, 2024, 629(8011): 426-434. DOI: 10.1038/s41586-024-07352-w.
- [4] YANG W, BAI Y B, XIONG Y, *et al.* Potentiating the antitumour response of CD8<sup>+</sup> T cells by modulating cholesterol metabolism[J]. *Nature*, 2016, 531(7596): 651-655. DOI: 10.1038/nature17412.
- [5] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age[J]. *Nature*, 2011, 480(7378): 480-489. DOI: 10.1038/nature10673.
- [6] WANG Q L, ZHU T, MIAO N J, *et al.* Disulfiram bolsters T-cell anti-tumor immunity through direct activation of LCK-mediated TCR signaling[J/OL]. *EMBO J*, 2022, 41(16): e110636[2024-01-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35638332/>. DOI: 10.15252/embj.2022110636.
- [7] DOSSET M, ZANETTI M. Disulfiram's journey from rubber vulcanization to T-cell activation[J/OL]. *EMBO J*, 2022, 41(16): e111862[2024-01-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9379543/>. DOI: 10.15252/embj.2022111862.
- [8] FAN H, XIA S Y, XIANG J H, *et al.* Trans-vaccenic acid reprograms CD8<sup>+</sup> T cells and anti-tumour immunity[J]. *Nature*, 2023, 623(7989): 1034-1043. DOI: 10.1038/s41586-023-06749-3.
- [9] LI X, LI Y R, DONG L, *et al.* Decitabine priming increases anti-PD-1 antitumor efficacy by promoting CD8<sup>+</sup> progenitor exhausted T cell expansion in tumor models[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(7): e165673. DOI: 10.1172/JCI165673.
- [10] ROWE J H, ELIA I, SHAHID O, *et al.* Formate supplementation enhances antitumor CD8<sup>+</sup> T-cell fitness and efficacy of PD-1 blockade

- [J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(12): 2566-2583. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-1301.
- [11] DASGUPTA S, BHATTACHARYYA D K. Dietary effect of capric acid containing soyphospholipids[J]. *J Oleo Sci*, 2009, 58(8): 395-401. DOI: 10.5650/jos.58.395.
- [12] NARAYANAN A, BASKARAN S A, AMALARADJOU M A R, *et al*. Anticarcinogenic properties of medium chain fatty acids on human colorectal, skin and breast cancer cells *in vitro*[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 5014-5027. DOI: 10.3390/ijms16035014.
- [13] HUGHES S D, KANABUS M, ANDERSON G, *et al*. The ketogenic diet component decanoic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells[J]. *J Neurochem*, 2014, 129(3): 426-433. DOI: 10.1111/jnc.12646.
- [14] KIM H J, YOON H J, KIM S Y, *et al*. A medium-chain fatty acid, capric acid, inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation via the suppression of NF- $\kappa$ B signaling and blocks cytoskeletal organization and survival in mature osteoclasts[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(8): 598-604. DOI: 10.14348/molcells.2014.0153.
- [15] MALAPAKA R R V, KHOO S, ZHANG J F, *et al*. Identification and mechanism of 10-carbon fatty acid as modulating ligand of peroxisome proliferator-activated receptors[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 183-195. DOI: 10.1074/jbc.M111.294785.
- [16] YANG C, LIM W, BAZER F W, *et al*. Decanoic acid suppresses proliferation and invasiveness of human trophoblast cells by disrupting mitochondrial function[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 339: 121-132. DOI: 10.1016/j.taap.2017.12.009.
- [17] MALISSEN B, BONGRAND P. Early T cell activation: integrating biochemical, structural, and biophysical cues[J]. *Annu Rev Immunol*, 2015, 33: 539-561. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112158.
- [18] CONG J J, LIU P P, HAN Z L, *et al*. Bile acids modified by the intestinal microbiota promote colorectal cancer growth by suppressing CD8<sup>+</sup> T cell effector functions[J]. *Immunity*, 2024, 57(4): 876-889.e11. DOI: 10.1016/j.immuni.2024.02.014.
- [19] JIA D, WANG Q W, QI Y D, *et al*. Microbial metabolite enhances immunotherapy efficacy by modulating T cell stemness in pancreatic cancer[J]. *Cell*, 2024, 187(7): 1651-1665. e21. DOI: 10.1016/j.cell.2024.02.022.
- [20] AL-HABSI M, CHAMOTO K, MATSUMOTO K, *et al*. Spermidine activates mitochondrial trifunctional protein and improves antitumor immunity in mice[J/OL]. *Science*, 2022, 378(6618): eabj3510[2024-01-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36302005/>. DOI: 10.1126/science.abj3510.
- [21] LEE D H, KANG B S, PARK H J. Effect of oxygen on volatile and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon during secondary shelf life[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(21): 11657-11666. DOI: 10.1021/jf200759d.
- [22] LIN X, XU D S, FENG Y, *et al*. Release-controlling absorption enhancement of enterally administered *Ophiopogon japonicus* polysaccharide by sodium caprate in rats[J]. *J Pharm Sci*, 2006, 95(11): 2534-2542. DOI: 10.1002/jps.20738.
- [23] INDRAN I R, LEE B H, YONG E L. Cellular and animal studies: insights into pathophysiology and therapy of PCOS[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016, 37: 12-24. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2016.03.006.

[收稿日期] 2024-01-18

[修回日期] 2024-05-10

[本文编辑] 黄静怡