

文章编号 1006-8147(2023)03-0302-07

论著

## 肾癌来源的 IL4I1 介导 Treg 诱导与募集的实验研究

来佳丹,魏诗瑶,李常颖

(天津医科大学第二医院泌尿外科,天津市泌尿外科研究所,天津 300211)

**摘要** 目的:探讨肾癌细胞来源的白细胞介素4诱导蛋白1(IL4I1)对调节性T细胞(Treg)的诱导与募集作用。方法:利用公共数据库分析肾透明细胞癌(ccRCC)组织中IL4I1表达与Treg浸润的关系,通过免疫组织化学法(IHC)进行验证;构建稳定敲低IL4I1的786-O细胞系,进行转录组测序(RNA-Seq)及基因集富集分析(GSEA);实时荧光定量PCR(qPCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)比较敲低786-O细胞系IL4I1表达后肾癌细胞表达趋化因子的变化,流式细胞术(FCM)分析体外IL4I1对Treg诱导分化的影响。结果:IL4I1在ccRCC组织中过表达( $t=6.029, P<0.05$ ),并且随着IL4I1表达的升高,肿瘤组织中Treg数量增加( $F=13.69, P<0.05$ )。GSEA显示,沉默IL4I1表达的786-O细胞系和对照细胞系的差异表达谱在细胞因子和趋化因子产生及负向调节其产生的生物学过程(BP)中富集( $P_{\text{adjust}}=9.2\times 10^{-4}, 7.5\times 10^{-4}, 7.7\times 10^{-4}, 2.67\times 10^{-2}$ )。敲低IL4I1表达后,786-O细胞表达的CC趋化因子配体(CCL3、CCL4、CCL5、CCL8、CCL17、CCL19)在mRNA水平显著下调( $t=6.250, 7.716, 20.640, 5.324, 6.360, 3.484$ ,均 $P<0.05$ ),同时细胞培养上清中CCL4、CCL5浓度降低( $t=6.773, 13.64$ ,均 $P<0.05$ )。与敲低表达IL4I1细胞共培养的外周血单个核细胞中Treg比例少于对照组( $t=3.843, P<0.05$ )。结论:肾癌组织中IL4I1与Treg浸润密切相关,可能通过调控趋化因子的表达参与Treg在肿瘤局部的募集;肾癌细胞来源的IL4I1能够促进Treg的分化。

**关键词** IL4I1;肾透明细胞癌;调节性T细胞;趋化因子**中图分类号** R737.1**文献标志码** A

## Research on inducement and recruitment of Treg mediated by IL4I1 derived from renal cell carcinoma

LAI Jia-dan, WEI Shi-yao, LI Chang-ying

(Department of Urology, Tianjin Institute of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**Abstract** **Objective:** To explore the role of interleukin-4-induced-1 (IL4I1) in inducement and recruitment of regulatory T cells (Treg) in renal cell carcinoma. **Methods:** The relationship between IL4I1 expression and Tregs infiltration in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) tissues were analyzed by public database. Immunohistochemistry (IHC) was used to verify. A stable IL4I1 knockdown 786-O cell line was established, and RNA-Sequencing (RNA-Seq) and gene set enrichment analysis (GSEA) was performed. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to observe the expression changes of chemokines in renal cancer cells after knockdown of IL4I1 expression. Flow cytometry (FCM) was used to analyze the influence of IL4I1 on Treg inducement *in vitro*. **Results:** IL4I1 was over-expressed in ccRCC tissues ( $t=6.029, P<0.05$ ). The number of regulatory T cells in tumor tissues increased with the increase of IL4I1 expression ( $F=13.69, P<0.05$ ). Gene set enrichment analysis (GSEA) revealed that transcript differential expression of IL4I1-silenced 786-O cells and control cells were enriched in biological process (BP) of cytokine and chemokine production and negative regulation of their production ( $P_{\text{adjust}}=9.2\times 10^{-4}, 7.5\times 10^{-4}, 7.7\times 10^{-4}, 2.67\times 10^{-2}$ ). After IL4I1 was knocked down, the expression of CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL17 and CCL19 in 786-O cells were significantly down-regulated at mRNA level ( $t=6.250, 7.716, 20.640, 5.324, 6.360, 3.484$ , all  $P<0.05$ ), and the concentration of CCL4 and CCL5 in the supernatant decreased ( $t=6.773, 13.64$ , both  $P<0.05$ ). The proportion of Tregs in peripheral blood mononuclear cells co-cultured with IL4I1 knockdown tumor cells was less than that in control group ( $t=3.843, P<0.05$ ). **Conclusion:** In renal cancer tissue, IL4I1 expression is closely related to Treg infiltration. It may possibly play a role in the recruitment of Tregs at tumor area by regulating chemokine expression. IL4I1 derived from renal cancer cells can promote the differentiation of Treg.

**Key words** IL4I1; clear cell renal cell carcinoma; regulatory T cell; chemokines

免疫治疗是目前肾癌的重要辅助治疗手段之一,免疫检查点阻断(ICB)治疗如PD-1/PD-L1免疫疗法,被列入转移性或不可切除性肾透明细胞癌(ccRCC)的一线/二线治疗方案<sup>[1]</sup>,然而相当一部分

患者难以从该疗法中获益。白细胞介素4诱导蛋白1(IL4I1)是一种分泌性氨基酸代谢酶,因其能在B细胞上被白细胞介素4诱导表达而得名,在天然免疫中发挥多重免疫负性调节作用<sup>[2-5]</sup>。在一项应用帕博利珠单抗克隆抗体(单抗)联合吡咯酮2,3-双加氧酶1(IDO1)抑制剂治疗晚期恶性黑色素瘤失败的临床研究数据中发现,免疫治疗后肿瘤组织中

**基金项目** 天津医科大学第二医院重点实验室基金(ZDSYS202308)**作者简介** 来佳丹(1997-),女,硕士在读,研究方向:泌尿系统肿瘤微环境;通信作者:李常颖, E-mail: cli\_cvrl@tmu.edu.cn。

IL4I1 的表达显著增高,提示其表达可能是影响免疫治疗效果的关键<sup>[6]</sup>。课题组前期研究发现,IL4I1 高表达促进肾癌细胞的增殖和迁移,且与患者不良预后密切相关<sup>[7]</sup>。然而作为免疫调控因子,IL4I1 是否参与肾癌免疫抑制微环境形成、促进免疫逃逸,尚未见相关报道。本文着力探究 IL4I1 在 ccRCC 中的表达与其对 ccRCC 中调节性 T 细胞(Treg)诱导与募集的影响。

## 1 材料与方法

1.1 数据库分析 利用在线肿瘤免疫浸润数据库 TIMER2.0(<http://timer.cistrome.org/>)分析 ccRCC 中 IL4I1 的表达水平与肿瘤中 Treg 浸润、Treg 的关键指标 CD4、CD25(IL2RA)、FOXP3 以及趋化 Treg 浸润的关键趋化因子表达水平之间的相关性。

1.2 细胞系与试剂 人 ccRCC 细胞系 786-O、胎牛血清(Biological Industries),RPMI-1640 基础培养基、青霉素-链霉素双抗(源培生物),IL4I1 shRNA 慢病毒载体(吉凯基因),TRIzol、IC 固定缓冲液、渗透缓冲液 10X、反转录试剂盒(ThermoFisher Scientific),FS Universal SYBR Green Master (Roche),PCR 引物(生工生物),IL4I1 检测试剂盒(酶联免疫吸附试验法)(CLOUD-CLONE),抗-IL-4I1/LAO 抗体(Abcam,ab222102),抗  $\beta$ -微管蛋白(C66)mAb (Abmart),PE 鼠抗人 CD25、PE 小鼠抗人 CD3(BD 制药),PE/Cyanine7 抗人 CD4、APC 抗人 FOXP3(e-Bioscience)。

1.3 免疫组织化学法 本研究中使用的组织样本经天津医科大学第二医院伦理审查委员会批准。40例原发性 ccRCC 组织切片经过脱腊、水化和抗原修复后,转移至湿盒,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温避光孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性,5% BSA 室温封闭 15 min,滴加一抗 4℃避光孵育过夜。滴加二抗 37℃孵育 30 min 后加入 DAB 显色、复染,染色结果于光学显微镜下观察并判读。

免疫组化结果判读标准:IL4I1 表达于细胞质中,黄色或棕黄色染色定义为阳性表达。按蛋白表达强弱划分染色强度:不表达,0分;弱表达,1分;中等表达,2分;强表达,3分。按阳性细胞占视野细胞数量的百分比判定染色面积:无阳性细胞,0分;<10%,1分;10%~25%,2分;25%~50%,3分;>50%,4分。采用双盲法读片,评分=染色强度+染色面积,1~2分为(-),3~4分为(+),5分为(++),6~7分为(+++)。<sup>[8]</sup>

1.4 构建 IL4I1 敲低表达的肾癌细胞模型 由吉凯基因构建 IL4I1 shRNA 慢病毒载体和阴性对照慢

病毒载体并进行病毒滴度的检测。人 ccRCC 细胞系 786-O 于 RPMI1640 全培养基(含有 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)中培养。将 786-O 以  $1 \times 10^5$  个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,至细胞汇合度到 30%~50%,更换 1 mL 加入 5  $\mu$ L 病毒及 40  $\mu$ L 相应感染增强液的全培养基,继续培养 12~16 h 后更换为常规培养基继续培养。用含 5  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的完全培养基筛选具有嘌呤霉素抗性的 786-O 细胞,得到实验组 786-O-sh 和对照组 786-O-ctrl 细胞。所有细胞均置于 5%CO<sub>2</sub> 的 37℃培养箱中培养。

1.5 Western 印迹 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白样品后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜),用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T 室温封闭 1 h,加入一抗于 4℃孵育过夜。用辣根过氧化物酶(HRP)耦联的二抗将样品室温孵育 1 h 后曝光,显影,利用 Image J 进一步分析蛋白表达量。

1.6 实时荧光定量 PCR(qPCR) 细胞在 TRIzol 中重新悬浮和裂解,收集细胞总 RNA 测定浓度后使用逆转录试剂盒反转录得到互补 DNA (cDNA),加入 Fast Start Universal SYBR Green Master 和目标基因引物,按照 95℃预变性 10 min,95℃ 15 s,53℃ 60 s,40 次循环的反应条件进行检测。反应结束后根据  $\Delta\Delta$ Ct 法分析基因的相对表达量。所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因名称	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
IL4I1	ACTCGCCCGAAGACATCTAC	CATCCTCGGACATCACGTCTC
CCL3	CGGTGTCATCTTCTAACC	TCGCTGACATATTTCTGGAC
CCL4	CTGTGTCGATCCCACTGAATC	TCAGTTCAGTTCCAGGTCATACA
CCL5	AACAAGGGCAAGCTTTGTC	TTGATGTAATCCCGAACCC
CCL8	TGGAGAGCTACACAAGAATCACC	TGGTCCAGATGCTTCATGGAA
CCL17	GAGCCATTCCCTTAGAAAAG	AGGCTTCAAGACCTCTCAAG
CCL19	TACATCGTGAGGAACCTTCCACT	CTGGATGATGCGTTCTACCCA
GAPDH	ACAACITTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC

注:IL4I1:白细胞介素 4 诱导蛋白 1;CCL:CC 趋化因子配体;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.7 有参转录组测序(RNA-Seq) 细胞长至 90%左右密度,在培养瓶中加入 1 mL Trizol,收集混合物至 EP 管中,保存在-80℃备用;每组细胞准备 3 个重复样,由联川生物进行 RNA 测序和初步分析。

1.8 细胞免疫荧光(IF) 细胞接种于灭菌细胞爬片上,4%多聚甲醛固定,0.5%Triton X-100 室温透膜,1%BSA 溶液封闭,加入一抗后于 4℃孵育过夜。复温,滴加荧光二抗室温避光孵育 1 h,DAPI 孵育 5 min 进行核染色,封片后,尽快于荧光显微镜下进行

图像观察及采集。

1.9 酶联免疫吸附试验(ELISA) 收集48 h细胞培养上清液,1 000×g离心20 min后收集上清,严格按照ELISA试剂盒说明书操作,检测实验组和对照组细胞上清液中IL4I1、CCL4、CCL5蛋白浓度。

1.10 外周血单个核细胞(PBMC)的体外培养 经医院伦理委员会批准、签署知情同意后收集健康志愿者外周血,通过Ficoll密度梯度离心法提取PBMC,细胞计数后按照肿瘤细胞:PBMC=1:2的比例将PBMC接种于含有贴壁786-O细胞的6孔板中,加入含有1 000 IU/mL IL-2的STM培养基,于37℃培养48 h后收集细胞进行流式染色检测其中Treg细胞比例。

1.11 流式细胞术(FCM) 收集含有PBMC的培养液,4℃PBS洗涤两遍后,用100 μL PBS重悬细胞,加入膜蛋白流式抗体,混合均匀后于4℃避光孵育60 min。孵育结束后用预冷PBS洗涤两遍,加入IC Fixation Buffer置于4℃冰箱固定30 min。洗涤后,用1×Permeabilization Buffer重悬细胞至100 μL,加入胞内蛋白流式抗体,避光,4℃,60 min。冷PBS洗涤两遍,重悬后上机检测。

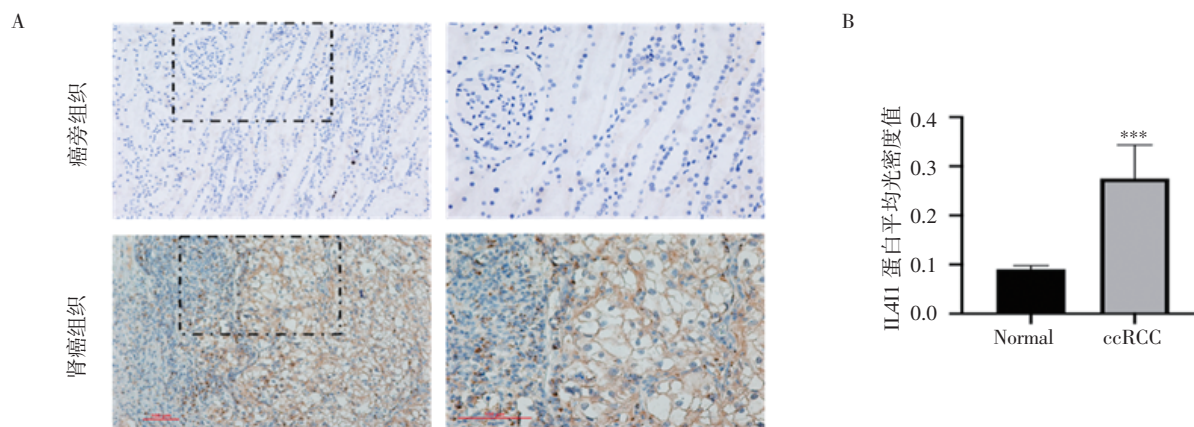
1.12 统计学处理 使用GraphPad Prism 9.0进行

统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 来表示正态分布的计量资料,采用 $t$ 检验、 $\chi^2$ 检验或方差分析进行组间比较,利用简单线性回归分析两变量之间的关系, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 IL4I1在ccRCC中的表达 在前期研究中,课题组运用UALCAN数据库分析发现,不论从mRNA水平还是蛋白水平,ccRCC中IL4I1的表达均显著高于正常肾组织。通过免疫组化进一步验证,染色结果表明与癌旁组织相比,IL4I1蛋白在肾细胞癌组织中表达水平升高(图1A、B)。ccRCC组织与癌旁组织中IL4I1表达水平存在显著差异( $\chi^2=44.56$ ,  $\nu=3$ ,  $P < 0.001$ ),见表2。

2.2 肾癌中IL4I1表达与Treg浸润水平的关系 通过TIMER2.0数据库发现,在ccRCC中IL4I1表达与Treg浸润及Treg细胞关键指标CD4、IL2RA、FOXP3都显著正相关(图2A)。免疫组化证实相较于IL4I1低表达的肾癌组织,在IL4I1表达增加的ccRCC切片中可以观察到更多的Treg细胞浸润(图2B),通过简单线性回归分析发现,IL4I1表达水平与浸润Treg细胞数量呈正相关( $r^2=0.2648$ ,  $F=13.69$ ,  $P < 0.001$ )(图2C)。



注:A:免疫组化染色显示肾癌与癌旁组织中IL4I1的表达水平;左列为100×视野,右列为200×视野;B:A的量化柱状图;IL4I1:白细胞介素4诱导蛋白1;ccRCC:肾透明细胞癌;\*\*\* $P < 0.001$

图1 IL4I1在癌旁及肾透明细胞癌组织中的表达

Fig 1 The expression of IL4I1 in paracancerous tissue and clear cell renal cell carcinoma tissue

表2 肾癌和癌旁组织中IL4I1表达情况的比较[n(%)]

Tab 2 Comparison of IL4I1 expression in renal carcinoma and paracancer tissue[n(%)]

组别	IL4I1 表达水平				$\chi^2$	P
	-	+	++	+++		
肾癌组织(n=40)	4(10.00)	13(32.50)	11(27.50)	12(30.00)	44.56	<0.001
癌旁组织(n=40)	31(77.50)	9(22.50)	0(0.00)	0(0.00)		

注:IL4I1:白细胞介素4诱导蛋白1

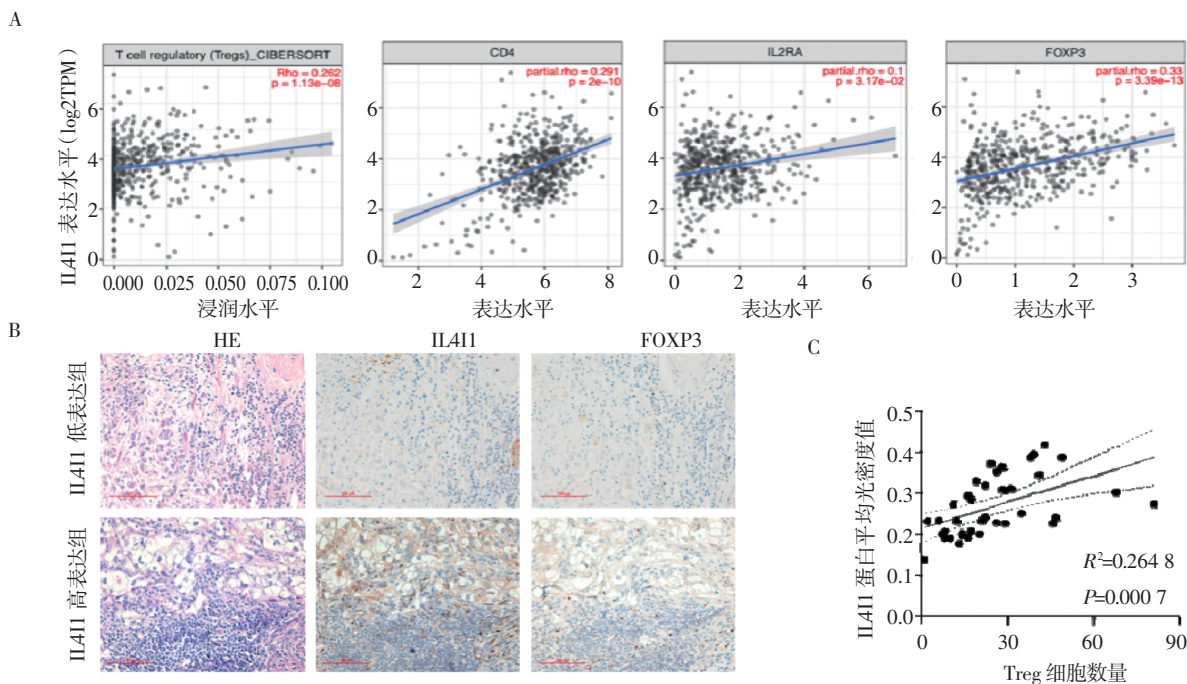
2.3 敲低表达IL4I1细胞系的构建与转录组测序的富集分析 前期实验结果表明,相较于肾皮质近曲小管上皮细胞系HK-2,ccRCC细胞系786-O的IL4I1表达水平增加<sup>[7]</sup>。Western印迹、qPCR结果显示,转染慢病毒敲低IL4I1表达后,786-O-sh细胞IL4I1的表达在蛋白水平和mRNA水平上均比786-O-ctrl组显著降低( $t=17.20$ ,  $P < 0.001$ )(图3A、B)。细胞免疫荧光的观察结果也显示,与对照组相比,



IL4I1 的表达在实验组 786-O 细胞中显著减少(图 3C)。利用联川生物平台云工具对 RNA-seq 数据进行 GSEA 富集分析,结果显示,实验组(786-O-sh)和对照组(786-O-ctrl)的差异转录谱在与细胞

因子和趋化因子产生及其负性调节相关的基因本体论生物学过程(GOBP)显著富集( $P_{\text{adjust}}=9.2 \times 10^{-4}$ 、 $7.5 \times 10^{-4}$ 、 $7.7 \times 10^{-4}$ 、 $2.67 \times 10^{-2}$ )(图 3D、E)。

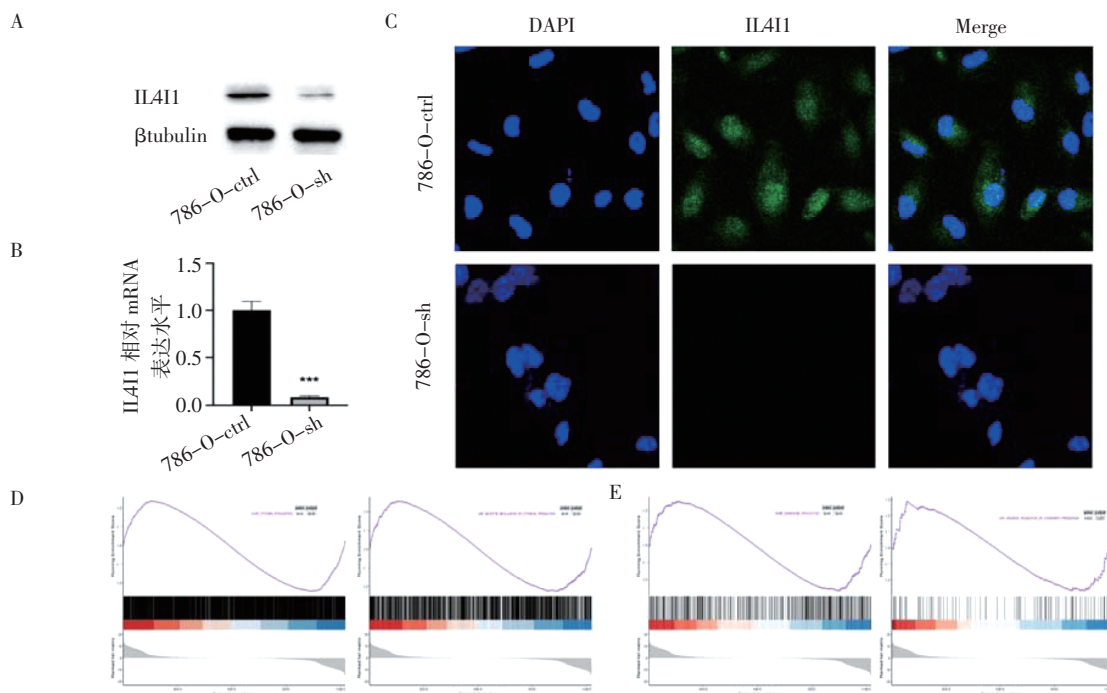
#### 2.4 IL4I1 表达与 Treg 细胞募集的关系 TIMER2.0



注:A:通过 TIMER2 数据库分析肾透明细胞癌中 IL4I1 表达与 Treg 浸润水平及 Treg 相关标志物的关系;B:200×视野下,高低表达 IL4I1 的肾癌组织中 Treg 细胞的浸润情况;C:IL4I1 的表达与肿瘤内浸润 Treg 细胞数量的关系;IL4I1:白细胞介素 4 诱导蛋白 1;FOXP3:转录因子叉头盒 P3

图 2 IL4I1 表达与肾癌内 Treg 浸润的关系

Fig 2 Relationship between IL4I1 expression and Treg infiltration in renal carcinoma



注:A、B:转染慢病毒干扰 IL4I1 表达后,786-O 细胞在 IL4I1 蛋白水平和 mRNA 水平变化;C:800×视野下,免疫荧光中实验组及对照组细胞 IL4I1 表达的差异(细胞核:DAPI,蓝;IL4I1:FITC,绿);D、E:GSEA 富集分析 IL4I1 敲低前后 786-O 细胞差异转录谱的富集基因集;IL4I1:白细胞介素 4 诱导蛋白 1;\*\*\* $P < 0.001$

图 3 稳定敲低 IL4I1 细胞系的构建及差异转录谱的富集分析

Fig 3 Verification of a stable IL4I1 knockdown cell line model and enrichment analysis of transcript differential expression

数据库分析发现,多个与 Treg 募集相关的趋化因子 CC 亚家族成员与 IL4I1 表达呈正相关(图 4A)。通过 qPCR 检测 mRNA 水平上相关趋化因子的变化,观察到敲低 IL4I1 表达的肾癌细胞中 CCL3、CCL4、CCL5、CCL8、CCL17、CCL19 的表达水平显著下调( $t=6.250、7.716、20.640、5.324、6.360、3.484$ ,均 $P<0.05$ )(图 4B)。相同条件下培养 48 h,786-O-sh 组细胞上清中 CCL4、CCL5 的浓度明显低于 786-O-ctrl 组

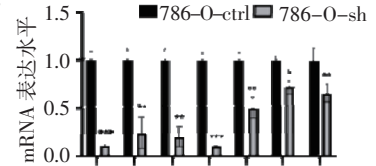
( $t=6.773、13.64$ ,均 $P<0.05$ )(图 4C)。

2.5 肾癌分泌的 IL4I1 对于 Treg 的诱导 ELISA 结果表明,培养 48 h 后,实验组细胞培养上清中 IL4I1 浓度低于对照组( $t=18.11,P<0.01$ )(图 5A)。沉默 IL4I1 基因表达后,将对照组和实验组细胞分别与 PBMC 按 1:2 的比例共培养,与对照组相比,实验组 PBMC 中 Treg 细胞的比例减少( $t=3.843,P<0.05$ )(图 5B~5D)。

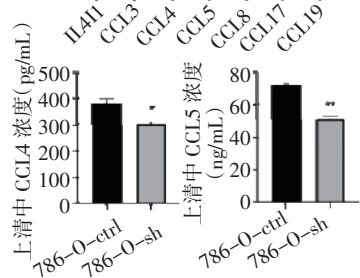
A

基因名称	与 IL4I1 表达的相关性(R)	P	对免疫细胞向肿瘤区域的募集
CCL1	0.175	***	TAM, Treg
CCL2	0.363	***	TIL, MDSC, MSC, TAM, Treg, Th17
CCL3	0.167	***	CAF, MDSC, Treg, TIL
CCL4	0.257	***	CAF, MDSC, Treg, TIL
CCL5	0.349	***	MDSC, TAM, Th17, TIL, Treg
CCL8	0.099	*	TAM, Treg
CCL17	0.268	***	TIL, Treg, Th17,
CCL19	0.114	*	TIL, Treg
CCL20	0.243	***	Treg, Th17
CCL22	0.251	***	TIL, Treg, Th17

B



C

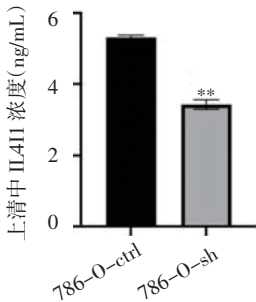


注:A:TIMER2 在线数据库分析肾癌中 IL4I1 表达与 Treg 趋化相关趋化因子表达水平的相关性;B:qPCR 检测趋化因子 mRNA 水平的表达;C:ELISA 检测细胞培养上清中趋化因子 CCL4 和 CCL5 的浓度;CCL:CC 趋化因子配体;IL4I1: 白细胞介素 4 诱导蛋白 1; \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$

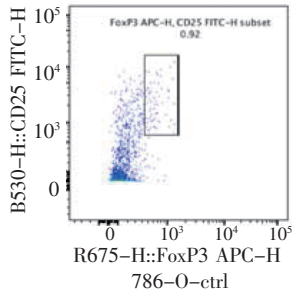
图 4 IL4I1 表达与 Treg 募集的关系

Fig 4 Relationship between IL4I1 expression and Treg recruitment

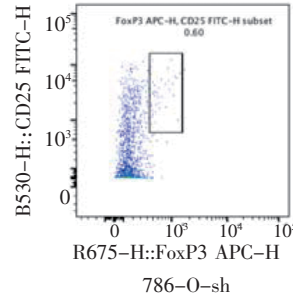
A



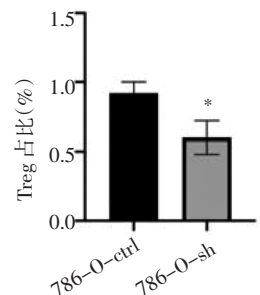
B



C



D



注:A:敲低 IL4I1 表达的 786-O 细胞在 IL4I1 蛋白分泌水平的变化;B~D:与 786-O-ctrl 细胞或 786-O-sh 细胞共培养后,PBMC 中 Treg 的比例;IL4I1:白细胞介素 4 诱导蛋白 1;PBMC:外周血单个核细胞; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.05$

图 5 肾癌来源 IL4I1 对 Treg 的体外诱导

Fig 5 In vitro experiment of Treg differentiation induced by IL4I1 derived from renal cancer

### 3 讨论

肾细胞癌是最常见的泌尿系统肿瘤之一,对传统的细胞毒性化学治疗不敏感。ccRCC 是最常见的肾癌亚型,与非透明细胞肾细胞癌和其他肿瘤类型相比,它是一种高度免疫炎症性肿瘤。丰富的肿瘤浸润淋巴细胞和肿瘤细胞、细胞外基质、分泌的细胞因子等共同构成了与肾癌发生、发展和转移相关的肿瘤免疫微环境。其中,包括 Treg 在内的多种免疫细胞直接影响着肾癌免疫治疗疗效和转归。免疫细

胞的募集浸润、表型功能受多种因素的调控,如趋化因子、细胞因子等。

作为一种分泌蛋白,IL4I1 可以被免疫细胞或肿瘤细胞合成并释放到肿瘤微环境中,协助免疫抑制性微环境的形成、促进肿瘤进展。在课题组已发表的论文中,笔者通过划痕实验、CFSE 增殖实验证明了 IL4I1 高表达对肾癌肿瘤细胞迁移和增殖的促进作用<sup>[7]</sup>。既往研究证实,IL4I1 可以抑制 T 细胞受体(TCR)信号转导,调节幼稚 T 细胞分化,限制效

应 T 细胞增殖,增加 T 细胞活化的阈值,参与塑造免疫抑制性肿瘤微环境并削弱抗细胞毒性 T 细胞反应,促进肿瘤的免疫逃逸<sup>[2,9]</sup>。通过  $\gamma\delta$ T 细胞非依赖性的方式,IL4I1 促进髓源性抑制细胞和肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤部位的募集。Yue 等<sup>[3]</sup>研究显示,IL4I1 可以诱导包括 Fizzl、Arg1、MR、YM-1 在内的巨噬细胞标志物的表达,通过抑制 M1 型巨噬细胞相关细胞标志物的表达、促进巨噬细胞向 M2 型分化,抑制免疫杀伤功能,从而促进癌症的进展<sup>[3]</sup>。还有研究表明,IL4I1 具备促进 T 细胞分化为 CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞(Treg)的能力,黑色素瘤中 IL4I1 阳性细胞的浸润与 Treg 的存在正相关,与肿瘤患者的总生存期呈负相关<sup>[10-11]</sup>。

课题组运用 UALCAN 数据库发现,与正常组织相比,IL4I1 在 ccRCC 中的表达升高<sup>[7]</sup>。TIMER2.0 数据库的分析结果表明,ccRCC 中 IL4I1 的表达不仅与肿瘤内 Treg 的浸润成正比,也与 Treg 的细胞标志物 CD4、CD25(IL2RA)、FOXP3 表达正相关。通过免疫组织化学法,笔者验证了 IL4I1 在肾癌肿瘤组织中存在高表达;对肿瘤组织连续切片进行 IL4I1 及 Treg 关键分子(CD4 和 FOXP3)免疫组化显色,发现在表达 IL4I1 的 ccRCC 组织中浸润 Treg 细胞数量明显多于不表达 IL4I1 的 ccRCC 组织,即 ccRCC 肿瘤组织中 IL4I1 的表达与浸润 Treg 细胞数量呈正相关,提示 IL4I1 可能参与了肾癌中 Treg 细胞的募集和表型调控。

IL4I1 是通过何种机制参与了 Treg 的募集,值得进一步探究。既往研究表明,可溶性细胞因子、趋化因子可以调控 ccRCC 中免疫细胞的募集,在塑造 ccRCC 肿瘤微环境和调控免疫细胞浸润中发挥重要作用。血管内皮生长因子 A(VEGF-A)表达的增加与 ccRCC 中免疫细胞浸润减少相关<sup>[12-13]</sup>。白细胞介素-8 的增加则有助于形成以中性粒细胞、单核细胞浸润增加,T 细胞浸润和干扰素- $\gamma$  减少为特征的免疫抑制性肿瘤微环境<sup>[14-16]</sup>。Treg 的募集也受细胞因子和趋化因子的调控。在成功构建 IL4I1 稳定敲低的 786-O 细胞模型后,由联川生物对实验组 786-O-sh 细胞和对照组 786-O-ctrl 细胞进行 RNA 测序。GSEA 发现两组细胞转录本表达谱的差异主要富集在细胞因子产生和趋化因子的产生上,并且与对照组相比,IL4I1 敲低组细胞在细胞因子和趋化因子产生负调节相关的生物学过程转录本中富集。利用在线数据库,笔者分析了 ccRCC 中与肿瘤内 Treg 浸润相关的趋化因子 CC 亚家族成员和 IL4I1 表达之间的关系。qPCR 结果表明,与 786-O-ctrl 组

相比,在 786-O-sh 组(即 IL4I1 敲低表达组)中,CCL3、CCL4、CCL5、CCL8、CCL17、CCL19 的 mRNA 表达水平显著降低;通过 ELISA 进一步证实,786-O-sh 组细胞培养上清中 CCL4 和 CCL5 浓度明显降低,两项结果均提示 IL4I1 高表达的肾癌中 Treg 募集相关的趋化因子表达增高可能导致了 Treg 浸润的增加。

研究发现,IL4I1 具备促进 T 细胞分化为 CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 细胞(Treg)的能力。由此推测肾癌微环境中增加的 Treg 也可能是由肿瘤内浸润 CD4<sup>+</sup> T 细胞诱导分化而来。为了探究分泌性蛋白 IL4I1 能否将 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Treg 诱导,笔者将实验组和对照组细胞分别与 PBMC 共培养,结果显示,与 786-O-sh 组细胞共培养的 PBMC 中 Treg 比例明显低于 786-O-ctrl 组,提示 IL4I1 在 CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Treg 细胞的分化中起一定的作用。

课题组在之前的研究已经证实 IL4I1 可以增强 ccRCC 的增殖和迁移能力。本研究发现,IL4I1 除了可以增强肿瘤细胞的恶性表型外,还可以促进 Treg 分化、通过影响肿瘤微环境中趋化因子的表达调控 Treg 浸润,从而影响 ccRCC 的进展,进一步提示 IL4I1 是一个潜在的 ccRCC 治疗靶点,为肾癌的治疗方案提供了新思路。

#### 参考文献:

- [1] 周莉,盛锡楠.晚期肾癌的治疗规范—《CSCO 肾癌诊疗指南 2020》解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2020,6(4):1-6,111.
- [2] AUBATIN A,SAKO N,DECROUY X,et al. IL4-induced gene 1 is secreted at the immune synapse and modulates TCR activation independently of its enzymatic activity[J]. Eur J Immunol,2018,48(1):106-119.
- [3] YUE Y,HUANG W,LIANG J,et al. IL4I1 is a novel regulator of M2 macrophage polarization that can inhibit T cell activation via L-tryptophan and arginine depletion and IL-10 production[J]. PLoS One,2015,10(11):e0142979.
- [4] BOULLAND M L,MARQUET J,MOLINIER-FRENKEL V,et al. Human IL4I1 is a secreted L-phenylalanine oxidase expressed by mature dendritic cells that inhibits T-lymphocyte proliferation[J]. Blood,2007,110(1):220-227.
- [5] CHU C C,PAUL W E. Fig1, an interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1997,94(6):2507-2512.
- [6] SADIK A,SOMARRIBAS PATTERSON L F,ÖZTÜRK S,et al. IL4I1 is a metabolic immune checkpoint that activates the ahr and promotes tumor progression[J]. Cell,2020,182(5):1252-1270,e34.
- [7] 魏诗瑶,来佳丹,李常颖. 白细胞介素 4 诱导蛋白 1 促进肾癌进展的实验研究[J]. 天津医科大学学报,2022,28(4):366-371.
- [8] 杨谨,程婷婷,王丽娜,等. 肾透明细胞癌中 Annexin II 的表达及其临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(1):59-62.



- [9] RAMSPOTT J P, BEKKAT F, BOD L, et al. Emerging role of IL-4-induced gene 1 as a prognostic biomarker affecting the local T-cell response in human cutaneous melanoma[J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(12):2625-2634.
- [10] COUSIN C, AUBATIN A, LE GOUVELLO S, et al. The immunosuppressive enzyme IL4I1 promotes FoxP3(+) regulatory T lymphocyte differentiation[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(6):1772-1782.
- [11] SCARLATA C M, CELSE C, PIGNON P, et al. Differential expression of the immunosuppressive enzyme IL4I1 in human induced Aiolos+, but not natural Helios+, FOXP3+ Treg cells[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(2):474-479.
- [12] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle[J]. Immunity, 2013, 39(1):1-10.
- [13] KHAN K A, KERBEL R S. Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(5):310-324.
- [14] YUEN K C, LIU L F, GUPTA V, et al. High systemic and tumor-associated IL-8 correlates with reduced clinical benefit of PD-L1 blockade[J]. Nat Med, 2020, 26(5):693-698.
- [15] SCHALPER K A, CARLETON M, ZHOU M, et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors[J]. Nat Med, 2020, 26(5):688-692.
- [16] BAKOUNY Z, CHOUERI T K. IL-8 and cancer prognosis on immunotherapy[J]. Nat Med, 2020, 26(5):650-651.

(2022-12-06 收稿)

·读者·作者·编者·

## 《天津医科大学学报》对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB/T 3558.1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性还是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用  $M(QR)$  表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选择合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:应写明所用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如  $t=3.45$ ,  $\chi^2=4.68$ ,  $F=6.79$  等);在用不等式表示  $P$  值的情况下,一般情况下选用  $P>0.05$ 、 $P<0.05$  和  $P<0.01$  3 种表达方式,无须再细分为  $P<0.001$  或  $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出 95%可信区间。

本刊编辑部