

## 论著·基础研究

## 结直肠癌中自然杀伤细胞表型及功能初探

冯响皎<sup>1</sup>, 刘健悦<sup>1</sup>, 戚炀炀<sup>1</sup>, 孙 晶<sup>2</sup>, 沈 蕾<sup>1,3</sup>

1. 上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海市免疫学研究所, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科, 上海市微创外科临床医学中心, 上海 200025; 3. 上海交通大学医学院附属瑞金医院免疫与疾病研究中心, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·初步探究结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者肿瘤组织中免疫微环境的组成, 分析自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK 细胞) 在 CRC 中的比例、表型及功能特征。**方法**·收集 CRC 患者肿瘤组织及配对的癌旁组织和匹配的 CRC 患者外周血样本, 消化组织制备成单细胞悬液, 使用流式细胞术检测各类免疫细胞比例, 通过 t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 降维与统计学分析, 描述 CRC 肿瘤免疫微环境的特征。运用流式细胞术检测肿瘤组织和癌旁组织中 NK 细胞表面活化分子的表达情况, 包括 CD16、CD27、CD69、晚期活化标志人类白细胞抗原-DR (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)、细胞耗竭标志 T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白结构域 3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM-3)。运用流式细胞术探究 CD38 分子在 NK 细胞上的表达水平, 描述 CD38<sup>high</sup>NK 细胞的表型特征。利用细胞刺激剂激活 NK 细胞, 通过流式细胞术内染色检测 NK 细胞的功能, 包括细胞因子  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) 的表达水平。**结果**·收集 25 例 CRC 患者肿瘤组织及配对的癌旁组织和 15 例匹配的 CRC 患者外周血样本。CRC 肿瘤组织中包含 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞及髓系细胞等免疫细胞。与癌旁组织相比, 肿瘤组织中 T 淋巴细胞 ( $P=0.000$ ) 和髓系细胞 ( $P=0.026$ ) 的比例显著升高, NK 细胞 ( $P=0.007$ ) 的比例显著降低, B 淋巴细胞比例差异无统计学意义。与癌旁组织相比, 肿瘤组织中 NK 细胞表面 CD27 ( $P=0.000$ )、CD69 ( $P=0.001$ ) 表达水平显著降低, 同时 CD16 ( $P=0.008$ )、HLA-DR ( $P=0.000$ ) 和 TIM-3 ( $P=0.024$ ) 的表达水平显著升高, 呈现晚期活化和耗竭表型。NK 细胞按 CD38 的表达水平可分为 CD38<sup>high</sup>NK 和 CD38<sup>low</sup>NK 2 个亚群。与癌旁组织相比, 肿瘤组织 CD38<sup>high</sup>NK ( $P=0.003$ ) 比例显著降低, CD38<sup>low</sup>NK 比例差异无统计学意义。相比 CD38<sup>low</sup>NK, CD38<sup>high</sup>NK 的 CD27 高表达, CD16、NKp46、CD57、CD94、HLA-DR 和 CD158a 低表达 (均  $P=0.000$ ), 处于早期分化和未活化的状态。肿瘤浸润的 NK 细胞与癌旁组织相比, 分泌细胞因子 IFN- $\gamma$  ( $P=0.032$ )、TNF- $\alpha$  ( $P=0.042$ ) 和 GM-CSF ( $P=0.019$ ) 的水平显著降低, 表明 NK 细胞杀伤功能受损。**结论**·CRC 患者肿瘤组织中 NK 细胞浸润减少, 早期分化状态的 CD38<sup>high</sup>NK 细胞亚群下降, 分泌细胞因子的能力下降并呈现耗竭表型。这些结果提示 NK 细胞在 CRC 中功能受损, 介导的抗肿瘤免疫应答下降。

**[关键词]** 自然杀伤细胞; 结直肠癌; CD38**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.06.006 **[中图分类号]** R392.12 **[文献标志码]** A

## Phenotype and function of NK cell in colorectal cancer

FENG Xujiao<sup>1</sup>, LIU Jianyue<sup>1</sup>, QI Yangyang<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>2</sup>, SHEN Lei<sup>1,3</sup>

1. Shanghai Institute of Immunology; Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Department of General Surgery, Shanghai Minimally Invasive Surgery Center, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 3. Center for Immune-Related Diseases at Shanghai Institute of Immunology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the composition of immune cells in tumor microenvironment of colorectal cancer (CRC), and examine the proportion, phenotype and effector function of natural killer (NK) cells in CRC. **Methods**·Fresh tumor tissues, paired normal tissues adjacent to tumor, and peripheral blood samples in the same cohort were collected from CRC patients. Tissues were digested and prepared into single cell suspension. The major immune cell lineages were detected by flow cytometry. t-Distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) and statistical analysis were used to analyze the composition of immune cells in tumor microenvironment of CRC. To analyze the phenotype of NK cells, the expression levels of activation markers, including CD16,

**[基金项目]** 国家重点研发计划 (2020YFA0509203); 上海市科学技术委员会“科技创新行动计划”基础研究领域项目 (20JC1410100)。**[作者简介]** 冯响皎 (1987—), 女, 硕士生; 电子信箱: xujiao\_feng@163.com。**[通信作者]** 沈 蕾, 电子信箱: lshen@shsmu.edu.cn。**[Funding Information]** National Key Research and Development Program of China (2020YFA0509203); Shanghai Science and Technology Commission Science and Technology Innovation Program in Basic Research Area (20JC1410100)。**[Corresponding Author]** SHEN Lei, E-mail: lshen@shsmu.edu.cn。

CD27, CD69, human leukocyte antigen-DR (HLA-DR), and T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3 (TIM-3), were detected by flow cytometry. NK cell subsets: CD38<sup>low</sup>NK cells and CD38<sup>high</sup>NK cells were also examined by flow cytometry. To assess the effector function of NK cells, they were stimulated with cell stimulation cocktail and the expression levels of interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) were measured by flow cytometry. **Results** Twenty-five pairs of fresh tumor tissues and normal tissues adjacent to tumor, and 15 peripheral blood samples in the same cohort were collected from CRC patients. The tumor microenvironment of CRC included diverse immune cell types, including T cells, B cells, NK cells and myeloid cells. The proportions of T cells ( $P=0.000$ ) and myeloid cells ( $P=0.026$ ) in tumor tissues were significantly higher than those in normal tissues. By contrast, the proportion of NK cells ( $P=0.007$ ) in tumor was significantly reduced. The proportion of B cells was comparable between tumor and normal tissues. Compared to normal tissues, NK cells in tumor tissues expressed significantly lower CD27 ( $P=0.000$ ) and CD69 ( $P=0.001$ ), while the expression levels of CD16 ( $P=0.008$ ), HLA-DR ( $P=0.000$ ) and TIM-3 ( $P=0.024$ ) were significantly elevated. The results indicated that NK cells in CRC tumor exhibited a phenotype of late activation and exhaustion. According to the expression level of CD38, NK cells could be divided into two subsets, CD38<sup>high</sup>NK cells and CD38<sup>low</sup>NK cells. The proportion of CD38<sup>high</sup>NK cells ( $P=0.003$ ) in tumor tissues was significantly lower than that in normal tissues, while the proportion of CD38<sup>low</sup>NK cells was unaffected. Compared to CD38<sup>low</sup>NK cells, CD38<sup>high</sup>NK cells expressed higher CD27, meanwhile significantly less CD16, NKp46, CD57, CD94, HLA-DR and CD158a ( $P=0.000$ ). These results suggested that CD38<sup>high</sup>NK cells were at early differentiation state. The secretion of cytokines IFN- $\gamma$  ( $P=0.032$ ), TNF- $\alpha$  ( $P=0.042$ ), and GM-CSF ( $P=0.019$ ) by tumor-infiltrated NK cells was significantly decreased compared to that in normal tissues. The results showed that the function of tumor-infiltrated NK cells was impaired. **Conclusion** Together, these data suggest that NK cell compartment is disrupted in tumor tissues of CRC, leading to the impaired anti-tumor immunity mediated by NK cells.

**[Key words]** natural killer cell (NK cell); colorectal cancer (CRC); CD38

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC), 包括结肠癌和直肠癌, 是一种常见的高致死性恶性肿瘤。CRC 在全球各类癌症中发病率排名第三, 死亡率排名第二<sup>[1]</sup>, 5 年生存率为 65%<sup>[2]</sup>。我国 CRC 的发病率近年来呈现上升的趋势<sup>[3]</sup>。2020 年, 中国、欧洲和北美地区的 CRC 新发病例数量超过全球新发病例总数的一半<sup>[4]</sup>。CRC 的发病源自肠道腺上皮细胞的异常增殖<sup>[5]</sup>, 大多数患者被确诊时已处于中晚期<sup>[6]</sup>。

CRC 的发生发展是一个多基因、多因素、多阶段的过程<sup>[7]</sup>。人体免疫系统在 CRC 的发生发展中发挥重要作用, 主要效应细胞组分包括自然杀伤细胞 (natural killer cell, NK 细胞)、CD4<sup>+</sup>T 细胞, CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞<sup>[8]</sup>等。NK 细胞是一类具有细胞毒性的固有淋巴细胞, 无需预先致敏即可杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞<sup>[9]</sup>。同时, NK 细胞通过分泌细胞因子  $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等促炎性细胞因子, 抑制肿瘤细胞增殖和血管生成等过程, 参与抗肿瘤免疫的调控<sup>[10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>显示肿瘤组织中 NK 细胞的浸润水平和患者的预后相关。有研究发现 CRC 患者外周血<sup>[12]</sup>、肿瘤组织<sup>[13]</sup>、转移性肝肿瘤<sup>[14]</sup>中的 NK 细胞比例越高, 均预示着患者的临床结局更好。

在 CRC 中, 肿瘤浸润的 NK 细胞数量、表型和功能都会发生改变。HALAMA 等人<sup>[15]</sup>发现与癌旁组

织相比, 实体瘤中 NK 细胞的浸润数量显著减少。一项体外实验的研究<sup>[16]</sup>将 NK 细胞和人结肠癌细胞共培养后发现, NK 细胞凋亡比例增加, 其表面活化性受体 CD16 分子表达下调。基于癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库的分析<sup>[17]</sup>显示: 预后较差的 CRC 患者, 其肿瘤浸润的 NK 细胞表面表达程序性死亡受体 1 (programmed death 1, PD-1)、程序性死亡受体-配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 等免疫耗竭基因显著上调。另外, JOBIN 等人<sup>[18]</sup>发现 CRC 患者外周血中的 NK 细胞分泌细胞因子 IFN- $\gamma$  的含量降低。这些研究表明, CRC 中 NK 细胞的活性和功能可能受损, 阻碍其识别和杀伤肿瘤, 介导了肿瘤的免疫逃逸。然而, 现有研究对 NK 细胞在 CRC 肿瘤微环境中的表型和功能变化关注较少。

免疫疗法是当前治疗包括 CRC 在内的多种实体瘤的主流方法之一<sup>[19]</sup>。由于 NK 细胞非特异性杀伤的特性, 基于 NK 细胞的肿瘤免疫疗法在近年来不断涌现<sup>[20]</sup>。临床研究<sup>[19]</sup>发现, 85% 的 CRC 患者分子分型为错配修复稳定 (proficient mismatch repair, pMMR) 型或低频微卫星不稳定 (low microsatellite instability, MSI-L) 型, 其对免疫检查点抑制剂疗法无响应或响应较差。深入研究肿瘤浸润 NK 细胞的表型和功能, 有利于我们寻找更新的 NK 细胞治疗靶点, 提高治疗反应性和响应率。

本研究使用患者的新鲜 CRC 肿瘤组织和癌旁组

织,制备单细胞悬液,运用流式细胞术检测CRC肿瘤微环境中的免疫细胞组成,深入探索NK细胞的表型特征和功能状态,以期为准预测和临床治疗提供参考,助力发展靶向NK细胞的治疗新策略。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

**1.1.1 临床样本** 选取2022—2023年在上海交通大学医学院附属瑞金医院胃肠外科就医的CRC患者为研究对象。所有样本均采集自患者手术当天。纳入标准如下:①患者既往均未接受抗肿瘤治疗。②患者过去5年未出现进展或需要治疗的其他恶性肿瘤。③术后病理诊断为CRC。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 流式抗体抗人CD16/32、CD3-PE-Cy7、CD45-APC、CD19-BV650、CD56-BV650、CD19-BV605、CD158a-PE、TNF- $\alpha$ -APC、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)-BB700 (BioLegend, 美国),流式抗体抗人CD3-BUV805、CD56-PE-CF594、CD11c-BV510、CD11b-BV786、CD14-APC-Cy7、CD16-BUV737、CD38-BV421、人类白细胞抗原-DR (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)-PE-Cy5、CD69-BB790、T细胞免疫球蛋白与黏蛋白结构域3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM-3)-BB750、CD27-BUV496、CD57-BV786、NKp46-PE-Cy7、CD94-PE-CF594、IFN- $\gamma$ -BV711、死活细胞染料Fixable viability stain 570 (BD Biosciences, 美国),二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、eBioscience™细胞刺激试剂盒、eBioscience™固定破膜叉头框蛋白P3 (forkhead box protein P3, FOXP3)/转录因子(transcription factor)染色缓冲液试剂盒(赛默飞, 美国),乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid, HEPES]、RPMI1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) (Gibco, 美国),Ⅷ型胶原酶(type Ⅷ collagenase, Col Ⅷ)、脱氧核糖核酸酶Ⅰ(deoxyribonuclease I, DNase I) (Sigma Aldrich, 美国),淋巴细胞分离液Lymphoprep (Serumwerk Bernburg, 德国),20×磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate

buffered saline, PBS) (上海生工生物工程股份有限公司)。1300-A2生物安全柜(Thermo Fisher Scientific, 美国),5810R高速离心机(Eppendorf, 德国),HX-20TS智能恒温摇床(上海沪析实业有限公司),FACSymphony A3流式分析仪(BD Biosciences, 美国)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 人外周血单个核细胞提取** 取新鲜抗凝全血,按照1:1比例加入1×PBS将血液进行稀释,以降低血液黏稠度,轻柔混匀后备用。向无菌15 mL离心管内加入适量的Lymphoprep溶液,将稀释后的血样按体积比(Lymphoprep:稀释全血)1:2的比例缓慢平铺到Lymphoprep液面上方,注意保持两液界面分层清晰。随后室温800×g离心20 min,设置升速5,降速1。离心结束后,管内液面从上至下依次为稀释血浆层、外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)层、分离液层和红细胞层,先吸走血浆层,再小心吸取中间白膜层即PBMC层并转移至15 mL离心管中,向离心管中加入10 mL的1×PBS重悬细胞,随后室温500×g离心5 min,弃上清液,再重复用1×PBS清洗1~2次即可用于后续试验。1 mL人外周血约能提取1×10<sup>6</sup>个PBMC。

**1.2.2 人结直肠癌样本消化处理** 将新鲜的肿瘤组织和癌旁正常组织样本转移到含有8 mL预冷过的RPMI1640培养皿中,用剪刀和镊子去除其上的脂肪、血管和纤维组织。用镊子夹住组织,使用预冷的1×PBS冲洗2次,用湿纸巾轻轻地吸干组织,称取癌旁正常组织和肿瘤组织各1 g用于消化。用剪刀将癌旁组织切成大小约为0.3 cm<sup>3</sup>的小块,将癌旁组织放入含有20 mL癌旁组织洗液的50 mL离心管中,在恒温摇床中37℃,1×g洗涤60 min。用剪刀把肿瘤组织剪成两半,放入含有20 mL肿瘤组织洗液的50 mL离心管中,在恒温摇床中37℃,1×g洗涤15 min。洗涤完成后,对于肿瘤组织,使用涡旋仪涡旋振荡2 min。对于癌旁组织,用手用力摇晃离心管2 min,振荡摇晃后,500×g离心5 min去除上清液,再用30 mL的1×PBS冲洗至少2次,以洗去残留的DTT或EDTA。随后,分别将肿瘤组织/癌旁组织放入1.5 mL的EP管中,用剪刀剪成小块。再分别转移至含有20 mL消化液的50 mL管离心管中,放入恒温摇床中,37℃,1×g消化30 min。消化结束后用手剧烈摇晃离心管3~



5 min, 直到肿瘤组织和癌旁组织变成小块, 然后用 100  $\mu\text{m}$  细胞过滤器滤掉残余组织, 将细胞悬液收集到新的 50 mL 离心管中, 室温下 500 $\times g$  离心 5 min 后弃去上清, 加入 12 mL RPMI1640 完全培养基重悬细胞。为去除样本中的肿瘤细胞、红细胞和碎片等, 向 50 mL 离心管中加入 12 mL Lymphoprep, 在其上层等比缓慢加入前面制备好的细胞悬液, 室温下 1 400 $\times g$  离心 25 min, 升速 1, 降速 1, 离心结束后弃去上层悬液, 吸取中间层的淋巴细胞, 加入 10 mL PBS 缓冲液, 室温下 500 $\times g$  离心 5 min, 去除上清, 加入适量 RPMI1640 完全培养基重悬细胞备用。肿瘤组织洗液、癌旁组织洗液及消化液配置相关信息见表 1。

表 1 试剂配置  
Tab 1 Reagent formulation

Reagent name	System
Tumor wash buffer	
PBS (1 $\times$ )	Up to 20 mL (for 1 g biopsies)
DTT (2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ )	65 $\mu\text{L}$ (final 6.5 mmol $\cdot\text{mL}^{-1}$ )
FBS	2 mL (10%)
Normal wash buffer	
PBS (1 $\times$ )	Up to 20 mL (for 1 g biopsies)
HEPES (1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ )	300 $\mu\text{L}$ (final 15 mmol $\cdot\text{mL}^{-1}$ )
EDTA (0.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ )	200 $\mu\text{L}$ (final 5 mmol $\cdot\text{mL}^{-1}$ )
DTT (2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ )	10 $\mu\text{L}$ (final 1 mmol $\cdot\text{mL}^{-1}$ )
FBS	2 mL (10%)
Tissue digestion buffer	
RPMI1640 (+10%FBS, +1%P/S)	Up to 40 mL (for 2 g biopsies)
Col VIII	45.7 $\mu\text{L}$ (final 0.38 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ )
DNase I	26.8 $\mu\text{L}$ (final 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ )

1.2.3 流式细胞染色 取消化好的细胞先按体积比 1 : 100 加入 Fc 端封闭剂 (Anti-CD16/32), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min。对于细胞表面染色, 首先使用死活细胞染料 Fixable viability stain 570 室温孵育 10 min 来标记死细胞, 细胞表面蛋白标志如 CD45、CD3、CD56、CD11b、CD11c 等的染色按体积比 1 : 200 比例稀释抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, 然后加入 1 $\times$ PBS 离心洗涤。对于细胞内部蛋白如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  及 GM-CSF 等的染色, 先用 Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒将细胞 4  $^{\circ}\text{C}$  固定透化 45 min, 再按体积比 1 : 100 比例稀释胞内抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h, 1 $\times$ PBS 洗涤后用 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞等待上机检测。染色过程中离心程序均为 400 $\times g$ , 5 min。流式细胞分析检测使用 BD FACSymphonyA3 流式分析仪, 数据分析使用 FlowJo<sup>TM</sup> v10.9.0 软件。

1.3 统计学分析  
本研究使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据的统计学分析。定量资料用  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用 Student's  $t$  检验或 Mann-Whitney  $U$  检验。定性资料以频数 (百分比) 表示。 $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般情况描述  
研究共纳入 CRC 患者病例 25 例, 收集临床样本包括 25 例肿瘤组织及配对的癌旁组织、15 例匹配的外周血样本 (取自前述 25 例患者)。患者的临床和病理特征详见表 2。

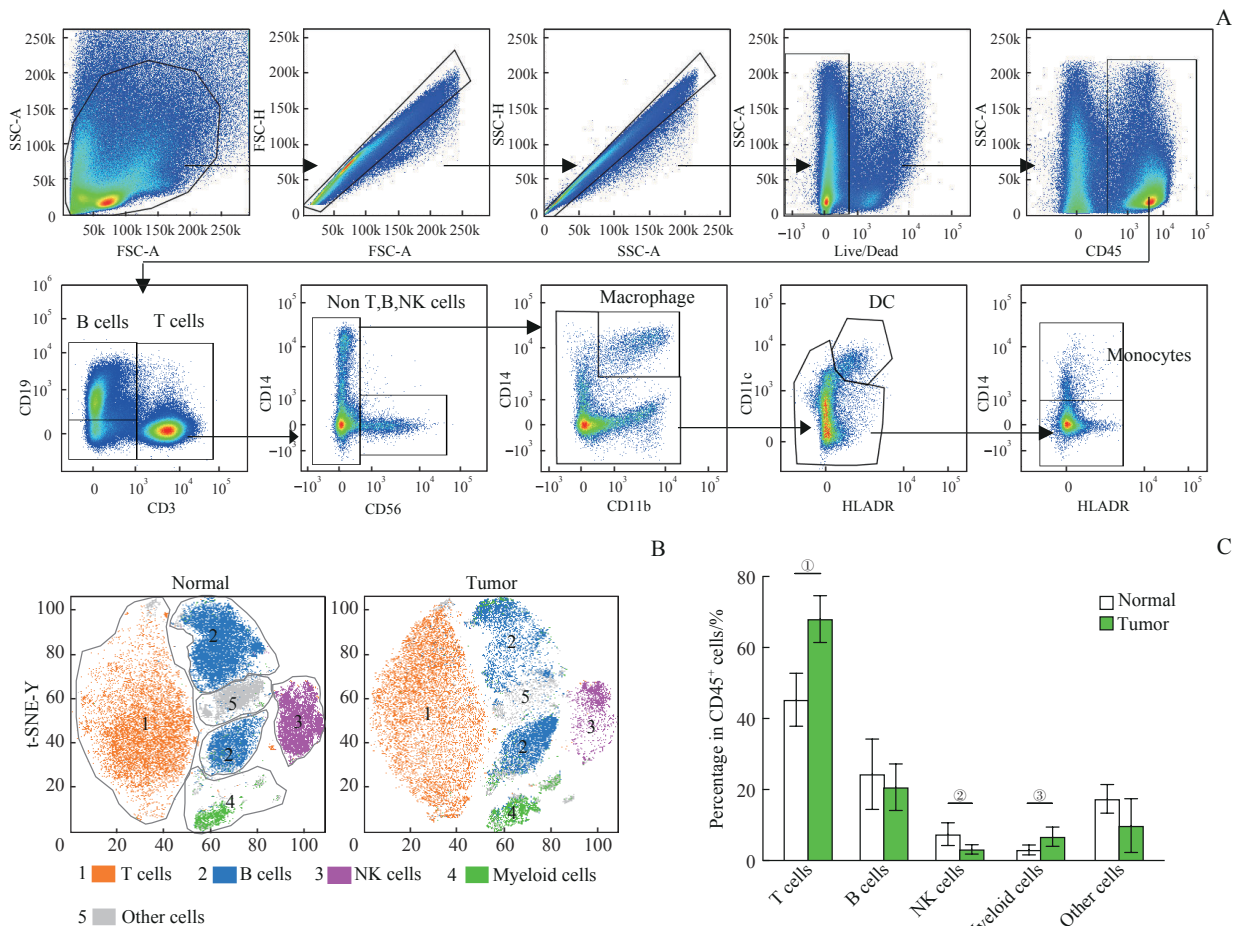
表 2 25 例结直肠癌患者的临床和病理特征  
Tab 2 Clinical and pathological characteristics of 25 colorectal cancer patients

Characteristic	Colorectal cancer patient (n=25)
Age/year	62.4 $\pm$ 11.8
Gender/n(%)	
Male	9 (36.0)
Female	16 (64.0)
Pathological T stage/n(%)	
T2	3 (12.0)
T3	18 (72.0)
T4	4 (16.0)
Pathological N stage/n(%)	
N0	14 (56.0)
N1	6 (24.0)
N2	5 (20.0)
Pathological M stage/n(%)	
M0	24 (96.0)
M1	1 (4.0)
TNM stage/n(%)	
I	2 (8.0)
II	12 (48.0)
III	10 (40.0)
IV	1 (4.0)

2.2 结直肠癌免疫微环境的构成  
取 CRC 患者的新鲜肿瘤组织和配对的癌旁组织样本制备成单细胞悬液, 运用流式细胞术检测肿瘤微环境中浸润的各类免疫细胞的比例。根据流式抗体组合标记将免疫细胞分为各类亚群 (图 1A): T 淋巴细胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>)、B 淋巴细胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)、NK 细胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)、巨噬细胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>

CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>)、树突状细胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>)、单核细胞 (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD11c<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>)，其中巨噬细胞、树突状细胞和单核细胞统称为髓系细胞。使用FlowJo软件对肿瘤组织和癌旁组织中的免疫细胞进行t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 降维分析 (图1B)，

可见肿瘤微环境中主要的免疫细胞亚群为T淋巴细胞、B淋巴细胞、NK细胞、髓系细胞 (myeloid cells) 和其他细胞。对比肿瘤组织和癌旁组织中这5类细胞的比例 (图1C)，结果显示T淋巴细胞 ( $P=0.000$ ) 和髓系细胞 ( $P=0.026$ ) 在肿瘤组织中的比例明显高于癌旁组织，而NK细胞 ( $P=0.007$ ) 在肿瘤组织中的比例明显低于癌旁组织。



**Note:** A. Gating strategy of T cells, B cells, NK cells, macrophages, dendritic cells and monocytes in colorectal cancer sample. B. t-SNE dimensionality reduction analysis of immune cell components in colorectal cancer samples. C. Percentage of T cells, B cells, NK cells, myeloid cells and other cells in CD45<sup>+</sup> immune cells in tumor and normal tissues ( $n=25$ ). ① $P=0.000$ , ② $P=0.007$ , ③ $P=0.026$ .

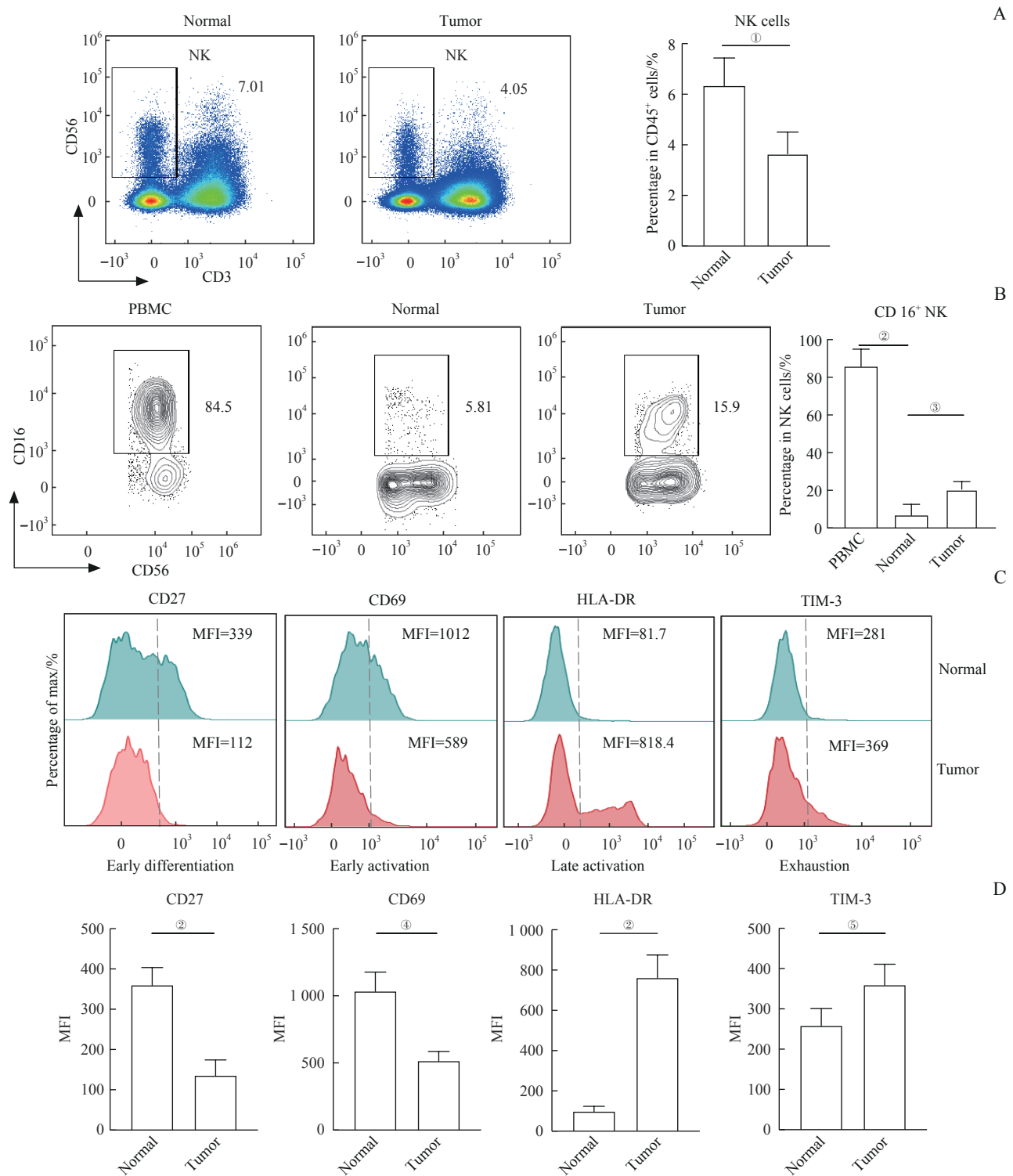
图1 结直肠癌免疫微环境的组成分析

Fig 1 Analysis of the immune microenvironment composition in colorectal cancer

### 2.3 肿瘤组织中NK细胞比例下降且呈现耗竭状态

通过流式细胞术发现肿瘤组织中NK细胞的比例 ( $P=0.007$ ) 显著低于癌旁组织 (图2A)。为进一步了解NK细胞的亚群及表型特征变化，对NK细胞的表面活化分子进行检测。对比患者外周血、肿瘤组织和癌旁组织中NK细胞上CD16的表达 (图2B)，发现在肿瘤组织和癌旁组织中NK细胞表面CD16分子的表达 ( $P=0.000$ ) 显著低于外周血，而肿瘤组织中NK细胞的CD16分子表达 ( $P=0.008$ ) 显著高于癌旁组

织，说明肠道组织中的NK细胞表型与外周血差异较大。此外，通过检测细胞表面早期分化标志CD27、早期活化标志CD69、晚期活化标志HLA-DR、细胞耗竭标志TIM-3分子在肿瘤组织和癌旁组织中的表达情况 (图2C)，发现CD27 ( $P=0.000$ ) 和CD69 ( $P=0.001$ ) 在肿瘤组织中表达显著下调，HLA-DR ( $P=0.000$ ) 和TIM-3 ( $P=0.024$ ) 表达显著上调。检测结果提示肿瘤组织中的NK细胞呈现晚期活化和耗竭表型。



**Note:** A. Representative flow cytometry analysis and percentage of NK cells in normal and tumor tissues ( $n=25$ ). B. Representative flow cytometry analysis and percentage of CD16<sup>+</sup>NK cells in PBMC, normal and tumor tissues ( $n_{\text{PBMC}}=15$ ,  $n_{\text{normal}}=25$ , and  $n_{\text{Tumor}}=25$ ). C. Representative flow cytometry analysis of the expression of CD27, CD69, HLA-DR and TIM-3 on NK cells in normal and tumor tissues. D. The expression levels of CD27, CD69, HLA-DR and TIM-3 on NK cells in normal and tumor tissues ( $n=25$ ). ① $P=0.007$ , ② $P=0.000$ , ③ $P=0.008$ , ④ $P=0.001$ , ⑤ $P=0.024$ . MFI—mean fluorescence intensity.

**图2** 肿瘤组织中NK细胞比例减少且呈现耗竭表型

**Fig 2** NK cells in CRC tumor tissues were reduced and showed an exhaustion phenotype

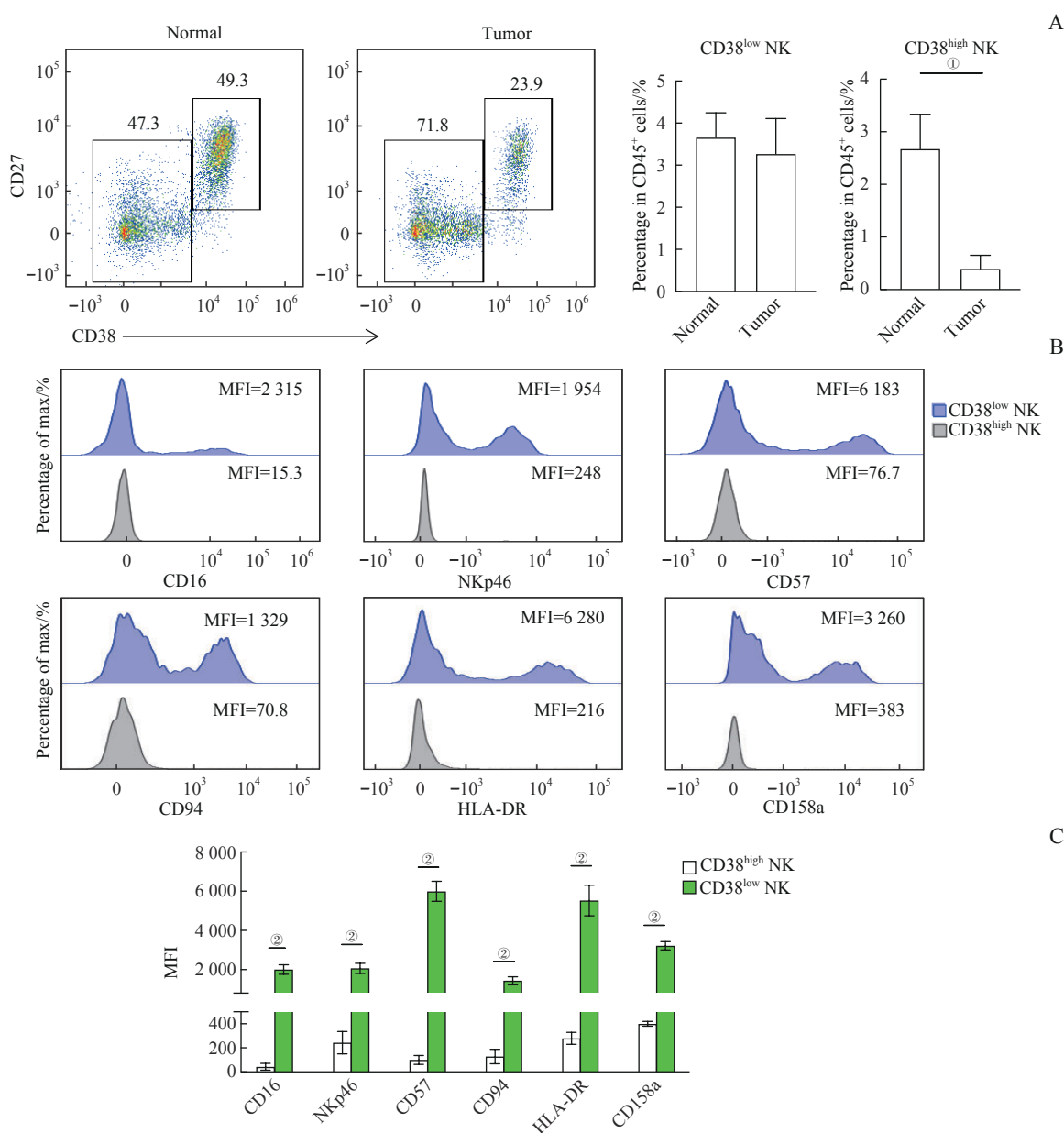
## 2.4 CD38<sup>high</sup>NK细胞亚群在结直肠癌肿瘤组织中显著减少

通过检测CD38分子在NK细胞上的表达水平,

将NK细胞根据CD38分子的表达高低分为CD38<sup>high</sup>NK和CD38<sup>low</sup>NK 2个亚群。对比CD38<sup>high</sup>NK细胞亚群在肿瘤组织和癌旁组织中的比例(图3A),结果

可知,相比癌旁组织,肿瘤组织中的 $CD38^{high}$ NK细胞比例明显降低( $P=0.003$ ),而 $CD38^{low}$ NK细胞无显著差异,同时 $CD38^{high}$ NK相比 $CD38^{low}$ NK高表达早期分化标志CD27分子。为进一步探索 $CD38^{high}$ NK细胞亚群的表型和功能特征,分别检测细胞表面标志:活化性受体CD16、活化性受体NKp46、晚期分化标志CD57、细胞表面受体CD94、晚期活化标志HLA-DR、抑制性受体CD158a在NK细胞中的表达水平(图3B)。对比上述细胞表面标志物在 $CD38^{high}$ NK和

$CD38^{low}$ NK这2个亚群中的表达水平,结果可知,肿瘤组织中 $CD38^{high}$ NK细胞亚群的CD16( $P=0.000$ )、NKp46( $P=0.000$ )、CD57( $P=0.000$ )、CD94( $P=0.000$ )、HLA-DR( $P=0.000$ )、CD158a( $P=0.000$ )表达都明显低于 $CD38^{low}$ NK细胞亚群,说明该亚群活化程度极低(图3C)。综上结果,CRC肿瘤组织中减少的NK细胞主要是 $CD38^{high}$ NK细胞亚群,并且 $CD38^{high}$ NK细胞是一群处于早期分化和未活化状态的NK细胞。



**Note:** A. Representative flow cytometry analysis and percentage of  $CD38^{high}$ NK cells in normal and tumor tissues ( $n=25$ ). B. Representative flow cytometry analysis of the expression of CD16, NKp46, CD57, CD94, HLA-DR and CD158a in  $CD38^{high}$ NK cells and  $CD38^{low}$ NK cells in tumor tissues. C. The expression levels of CD16, NKp46, CD57, CD94, HLA-DR and CD158a in  $CD38^{high}$ NK cells and  $CD38^{low}$ NK cells in tumor tissues ( $n=25$ ). ①  $P=0.003$ , ②  $P=0.000$ .

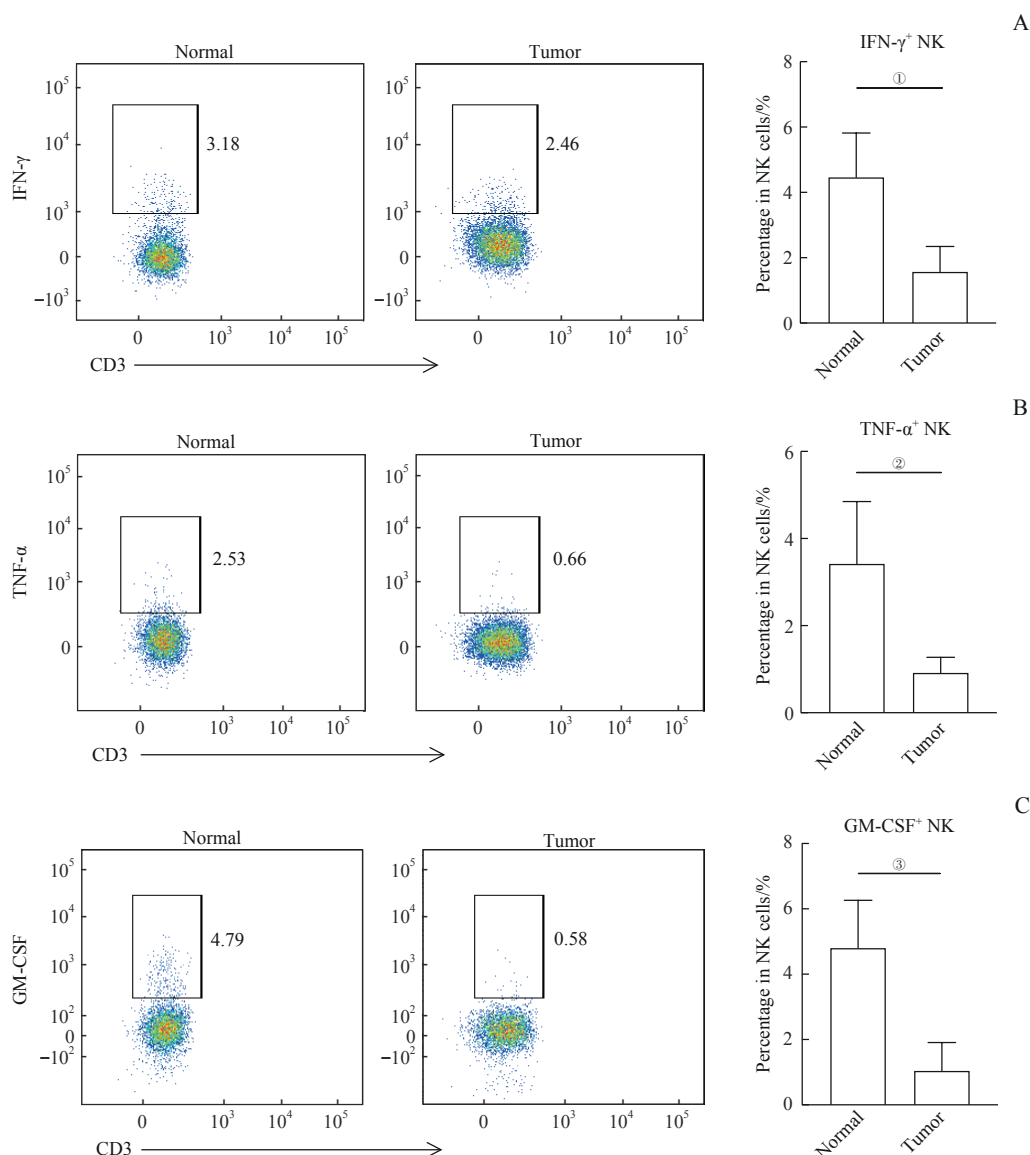
**图3**  $CD38^{high}$ NK细胞在肿瘤组织中显著减少

**Fig 3**  $CD38^{high}$ NK cells were dramatically reduced in tumor tissues

## 2.5 肿瘤组织中NK细胞功能受损

为进一步探究肿瘤免疫微环境中NK细胞的功能变化,对NK细胞分泌的IFN- $\gamma$  (图4A)、TNF- $\alpha$  (图4B)、GM-CSF (图4C)在肿瘤组织和癌旁组织中的表达水平

进行了检测,对比可知,肿瘤组织中的IFN- $\gamma$  ( $P=0.032$ )、TNF- $\alpha$  ( $P=0.042$ )、GM-CSF ( $P=0.019$ )表达均明显低于癌旁组织。综上结果说明肿瘤微环境中的NK细胞分泌细胞因子的能力减弱,提示NK细胞的功能受损。



**Note:** A. Representative flow cytometry analysis and percentage of IFN- $\gamma$ +NK cells in normal and tumor tissues ( $n=25$ ). B. Representative flow cytometry analysis and percentage of TNF- $\alpha$ +NK cells in normal and tumor tissues ( $n=25$ ). C. Representative flow cytometry analysis and percentage of GM-CSF+ NK cells in normal and tumor tissues ( $n=25$ ). ①  $P=0.032$ , ②  $P=0.042$ , ③  $P=0.019$ .

图4 肿瘤组织中NK细胞分泌细胞因子的能力减弱

Fig 4 Impaired cytokine production of NK cells in tumors

## 3 讨论

肿瘤微环境是肿瘤细胞赖以生存的复杂环境,在肿瘤的发生和发展过程中起到关键作用<sup>[21]</sup>。肿瘤微环境中存在各类免疫细胞组分,其组成结构和功能状态在不同疾病和患者体内不尽相同<sup>[22]</sup>。本研究发现,在CRC患者的肿瘤组织中T细胞和巨噬细胞、树突

状细胞等髓系细胞的比例相比癌旁组织明显上升,而NK细胞( $CD45^+CD3^+CD19^-CD56^+$ )比例明显下降。说明CRC的肿瘤微环境中NK细胞浸润减少,提示其抗肿瘤杀伤作用在实体瘤中可能受限。

人类NK细胞可以根据CD56分子的表达分为CD56<sup>bright</sup>和CD56<sup>dim</sup> 2个亚群<sup>[23]</sup>。近年来的研究<sup>[24]</sup>发现,NK细胞在不同组织中可以分化发育为不同的



亚群。肠道、肝脏、肾脏等不同组织部位驻留的NK细胞表型呈现出高度的异质性<sup>[25]</sup>。本研究发现,CRC患者的癌旁组织和肿瘤组织中表达CD16分子的NK细胞比例均明显少于外周血,说明肠道组织中NK细胞的表型与外周循环NK细胞相比差异较大。CD16分子是NK细胞的经典活化性表面受体,参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)<sup>[26]</sup>。研究同时发现,CRC肿瘤组织中CD16<sup>+</sup>NK细胞比例明显高于癌旁组织,猜测可能是肿瘤中浸润的NK细胞受到肿瘤微环境信号刺激,激活程度更高。

MEI等<sup>[27]</sup>利用单细胞多组学手段揭示了CRC中免疫抑制性的肿瘤微环境。长期暴露于肿瘤微环境中的NK细胞受到抑制性环境信号的影响,会发生功能减退,呈现耗竭状态<sup>[28]</sup>。本研究发现,晚期活化标志HLA-DR分子和细胞耗竭标志TIM-3分子在CRC患者肿瘤浸润NK细胞中的表达相比癌旁组织均明显升高。提示CRC肿瘤微环境中的NK细胞表型发生改变,呈现耗竭表型。

CD38是一种II型跨膜糖蛋白,相对分子质量为45 000,同时具有胞外酶活性和细胞受体功能。在激活钙信号,调控免疫细胞的成熟、分化、激活和免疫耐受等过程中发挥关键作用<sup>[29]</sup>。CD38分子被认为是T淋巴细胞的经典活化标志,但在NK细胞上的作用还不甚明确。本研究根据CD38分子的表达量将NK细胞分为CD38<sup>high</sup>NK细胞和CD38<sup>low</sup>NK细胞2个亚群。统计学分析结果发现相比于癌旁组织,肿瘤组织中CD38<sup>high</sup>NK细胞的比例显著减少,而CD38<sup>low</sup>NK细胞的比例无差异,说明肿瘤组织中减少的NK细胞主要为CD38<sup>high</sup>NK细胞亚群。进一步分析CD38<sup>high</sup>NK细胞亚群后发现,其细胞表面一系列表型和功能标志:活化性受体CD16、活化性受体NKP46、晚期分化标志CD57、细胞表面受体CD94、晚期活化标志HLA-DR、抑制性受体CD158a的表达均显著下调,而早期活化分子CD27表达显著上调,表明此群细胞正处于早期分化且未活化的状态。有体外实验<sup>[30]</sup>发现,CD38分子参与了NK细胞与靶细胞之间免疫突触的形成。因此CRC中CD38<sup>high</sup>NK细胞亚群的减少,可能导致了肿瘤浸润NK细胞杀伤能力的下降。

NK细胞作为人体免疫系统发挥抗肿瘤免疫监视的重要组成部分之一,不仅可以快速识别和杀伤肿瘤细胞,还可以通过分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF等细

胞因子和趋化因子,招募其他免疫细胞,并有效促进T细胞和B细胞发生二次免疫应答<sup>[28]</sup>。本研究通过检测上述3个主要细胞因子的表达水平,发现CRC肿瘤浸润NK细胞分泌IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、GM-CSF的能力对比癌旁组织均显著降低。证明CRC患者的NK细胞在肿瘤微环境中存在功能受损。综上所述,CRC肿瘤微环境中NK细胞的一系列变化可能促进了肿瘤的发生发展。

通过整理25例CRC患者的临床病理分期信息,发现大部分患者都处在TNM分期<sup>[31]</sup>的II期和III期:II期(12例)、III期(10例)。经过分析后发现不同病理分期患者的肿瘤组织和癌旁组织中NK细胞的表型和功能特征没有明显的差异,可能是由于大部分患者处在相近的疾病发展阶段。未来研究中将纳入更多I期和IV期的患者样本,以期通过比较不同分期患者获得更多有关CRC发生发展的发现。

本研究发现CD38<sup>high</sup>NK亚群在肿瘤组织中比例降低,但CD38分子除在多发性骨髓瘤等肿瘤细胞上高表达外,还在T细胞、B细胞、髓源抑制细胞等免疫细胞中存在高表达亚群,并发挥不同功能<sup>[32]</sup>。还需要对CD38<sup>high</sup>免疫细胞亚群进行更深入的研究,以阐明CD38在CRC实体瘤中的具体作用。

综上所述,本研究通过探索CRC患者肿瘤组织NK细胞的表型和功能特征,阐述肿瘤微环境中NK细胞呈现的功能受损和耗竭状态,揭示肿瘤细胞免疫逃逸的可能原因,以期为临床治疗和发展靶向NK细胞的免疫治疗提供新思路。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究涉及的所有实验均已通过上海交通大学医学院附属瑞金医院伦理委员会的审核批准[批准号:(2020)临伦审第(384)号]。研究遵循《赫尔辛基宣言》原则。纳入研究的患者在手术前均签署知情同意书,同意将组织样本及随访数据在匿名的情况下用于研究和发表。

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (No. 2020-384). This study was performed by following the ethical principles of *Declaration of Helsinki*. Patients included in the study signed informed consent forms before surgery that permitted the usage of specimens and clinical data for research and publication under the condition of anonymity.

## 作者贡献/Authors' Contributions

冯响皎、刘健悦参与实验实施和数据分析。沈蕾、冯响皎、刘健悦、戚扬扬、孙晶参与论文写作。沈蕾负责课题设计与实验指导。所有作者均阅读并同意最终稿件的提交。

FENG Xujiao and LIU Jianyue performed the experiments and analyzed the data. SHEN Lei, FENG Xujiao, LIU Jianyue, QI

Yangyang, and SUN Jing wrote the manuscript. SHEN Lei conceived, designed and supervised the project. All authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-12-18
- Accepted: 2024-03-06
- Published online: 2024-06-28

## 参 · 考 · 文 · 献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] SIEGEL R L, WAGLE N S, CERCEK A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(3):233-254.
- [3] XU L Y, ZHAO J H, LI Z H, et al. National and subnational incidence, mortality and associated factors of colorectal cancer in China: a systematic analysis and modelling study[J]. *J Glob Health*, 2023, 13: 04096.
- [4] LI N, LU B, LUO C Y, et al. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, Europe, and northern America[J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 255-268.
- [5] HOSSAIN M S, KARUNIAWATI H, JAIROUN A A, et al. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies[J]. *Cancers*, 2022, 14(7): 1732.
- [6] ZENG H M, RAN X H, AN L, et al. Disparities in stage at diagnosis for five common cancers in China: a multicentre, hospital-based, observational study[J]. *Lancet Public Health*, 2021, 6(12): e877-e887.
- [7] TESTA U, PELOSI E, CASTELLI G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells[J]. *Med Sci*, 2018, 6(2): 31.
- [8] MEZHEYEUSKI A, MICKE P, MARTÍN-BERNABÉ A, et al. The immune landscape of colorectal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(21): 5545.
- [9] LIU S Z, GALAT V, GALAT Y, et al. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 7.
- [10] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2): 85-100.
- [11] BRUNI D, ANGELL H K, GALON J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(11): 662-680.
- [12] TANG Y P, XIE M Z, LI K Z, et al. Prognostic value of peripheral blood natural killer cells in colorectal cancer[J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1): 31.
- [13] MENON A G, JANSSEN-VAN RHIJN C M, MORREAU H, et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(4): 493-501.
- [14] DONADON M, HUDSPETH K, CIMINO M, et al. Increased infiltration of natural killer and T cells in colorectal liver metastases improves patient overall survival[J]. *J Gastrointest Surg*, 2017, 21(8): 1226-1236.
- [15] HALAMA N, BRAUN M, KAHLERT C, et al. Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(4): 678-689.
- [16] COPPOLA A, ARRIGA R, LAURO D, et al. NK cell inflammation in the clinical outcome of colorectal carcinoma[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 33.
- [17] SORRENTINO C, D'ANTONIO L, FIENI C, et al. Colorectal cancer-associated immune exhaustion involves T and B lymphocytes and conventional NK cells and correlates with a shorter overall survival[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 778329.
- [18] JOBIN G, RODRIGUEZ-SUAREZ R, BETITO K. Association between natural killer cell activity and colorectal cancer in high-risk subjects undergoing colonoscopy[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(4): 980-987.
- [19] GANESH K, STADLER Z K, CERCEK A, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(6): 361-375.
- [20] BAI Z Y, ZHOU Y, YE Z F, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: the fundamental indication and application on immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 808964.
- [21] DE VISSER K E, JOYCE J A. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 374-403.
- [22] MASKALENKO N A, ZHIGAREV D, CAMPBELL K S. Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(8): 559-577.
- [23] CRINIER A, NARNI-MANCINELLI E, UGOLINI S, et al. Snapshot: natural killer cells[J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1280-1280. e1.
- [24] HASHEMI E, MALARKANNAN S. Tissue-resident NK cells: development, maturation, and clinical relevance[J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1553.
- [25] DOGRA P, RANCAN C, MA W J, et al. Tissue determinants of human NK cell development, function, and residence[J]. *Cell*, 2020, 180(4): 749-763. e13.
- [26] CAPUANO C, PIGHI C, BATTELLA S, et al. Harnessing CD16-mediated NK cell functions to enhance therapeutic efficacy of tumor-targeting mAbs[J]. *Cancers*, 2021, 13(10): 2500.
- [27] MEI Y, XIAO W W, HU H, et al. Single-cell analyses reveal suppressive tumor microenvironment of human colorectal cancer[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(6): e422.
- [28] MERINO A M, KIM H, MILLER J S, et al. Unraveling exhaustion in adaptive and conventional NK cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(4): 1361-1368.
- [29] GAO L, DU X H, LI J B, et al. Evolving roles of CD38 metabolism in solid tumour microenvironment[J]. *Br J Cancer*, 2023, 128(4): 492-504.
- [30] GARS M L, SEILER C, KAY A W, et al. CD38 contributes to human natural killer cell responses through a role in immune synapse formation[Z/OL]. *bioRxiv*, 2018[2023-11-16]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/349084v2#:~:text=CD38%20localizes%20and%20accumulates%20at%20the%20immune%20synapse,critical%20role%20in%20NK%20cell%20immune%20synapse%20formation>.
- [31] WEISER M R. AJCC 8th edition: colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 25(6): 1454-1455.
- [32] DWIVEDI S, RENDÓN-HUERTA E P, ORTIZ-NAVARRETE V, et al. CD38 and regulation of the immune response cells in cancer[J]. *J Oncol*, 2021, 2021: 6630295.

[本文编辑] 张慧俊

