

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.003

· 基础研究 ·

单细胞测序揭示 Ly6E 分子对乳腺癌 4T1 细胞移植瘤微环境中 DC 浸润及功能的抑制作用

吴越¹, 陈焱婷¹, 朱艳阳^{1,2}, 兰海林¹, 周琳琳^{1,2}, 张秋玉^{1,2} (1. 福建医科大学免疫治疗研究院, 福建福州 305122; 2. 肿瘤免疫药物开发国家与地方联合工程研究中心, 福建福州 305122)

[摘要] **目的:** 本研究利用单细胞 RNA 测序分析技术(scRNA-seq)初步探索乳腺癌 4T1 细胞表达淋巴细胞抗原 6 复合物 E(Ly6E)调控肿瘤免疫微环境(TIME)的潜在机制。**方法:** 利用 CRISPR-Cas9 技术构建 *Ly6e* 基因敲除小鼠乳腺癌 4T1 细胞(Ly6E-KO), 观察其与野生型细胞(Ly6E-WT)体外增殖和体内生长能力的差异。流式细胞术分选两类肿瘤组织中的 CD45 阳性细胞, 再进行 scRNA-seq 分析。对于测序结果, 首先利用 Seurat 软件包筛选差异表达基因谱, 根据标记基因进行注释; 再利用 Cellchat 和 Monocle2 软件分析细胞互作关系和特定免疫细胞的演化轨迹。**结果:** 与 Ly6E-WT 相比, Ly6E-KO 体外增殖能力无显著差异, 但体内生长能力显著降低($P < 0.001$)。ScRNA-seq 分析显示, Ly6E-KO 移植瘤浸润 DC 比例显著高于 Ly6E-WT, 且 DC 处于更加活跃的增殖和分裂状态; 三种 DC 亚群(pDC、cDC1 和 cDC3)与 T 细胞均存在显著的互作关系。同时发现, Ly6E-KO 肿瘤中浸润 T 淋巴细胞增殖、活化及效应相关的基因表达水平均升高, 提示 Ly6E-KO 具有更强抗肿瘤能力。最后, 本研究对人类乳腺癌队列的 scRNA-seq 数据进行了分析, 进一步证实了上述发现。**结论:** 肿瘤细胞 *Ly6e* 基因敲除后可通过增加 TIME 中 DC 活化及浸润, 继而增强机体抗肿瘤免疫应答。

[关键词] 淋巴细胞抗原 6 复合物 E; 肿瘤免疫微环境; 单细胞测序; 树突状细胞; 乳腺癌

[中图分类号] R730.3; R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)08-0759-10

Single-cell sequencing reveals the inhibitory role of Ly6E on DC infiltration and function in the microenvironment of 4T1 breast cancer cell transplanted tumor

WU Yue¹, CHEN Yiting¹, ZHU Yanyang^{1,2}, LAN Hailin¹, ZHOU Linlin^{1,2}, ZHANG Qiuyu^{1,2} (1. Institute of Immunotherapy, Fujian Medical University, Fuzhou 305122, Fujian, China; 2. National Collaboration Center in Immuno-Oncology, Fuzhou 305122, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily explore the potential mechanisms by which lymphocyte antigen 6 complex, locus E (Ly6E) regulates tumor immune microenvironment (TIME) in breast cancer 4T1 cells using single-cell RNA transcription sequencing technology (scRNA-seq). **Methods:** A mouse breast cancer 4T1 cell line with *Ly6e* gene knockout (Ly6E-KO) was constructed by CRISPR-Cas9 technology. The *in vitro* proliferation and *in vivo* growth capabilities of Ly6E-KO cells were compared to those of the wide type 4T1 cells (Ly6E-WT). CD45-positive cells from both types of tumor tissues were sorted by flow cytometry and analyzed using scRNA-seq. The sequencing results were first screened for differentially expressed gene profiles using the Seurat software package and annotated based on marker genes. Then, Cellchat and Monocle2 software were used to analyze the cell-to-cell interactions and the evolutionary trajectories of specific immune cells. **Results:** Compared with Ly6E-WT, Ly6E-KO cells showed no significant difference in *in vitro* proliferation capability but demonstrated significantly reduced *in vivo* growth capability ($P < 0.001$). ScRNA-seq analysis showed that the proportion of infiltrated DCs in Ly6E-KO cell transplanted tumors was significantly higher than that in Ly6E-WT cell transplanted tumors, and the DCs were in a more active state of proliferation and division. Three DC subsets (pDC, cDC1 and cDC3) showed significant interactions with T cells. Additionally, genes related to T lymphocyte proliferation, activation and effector functions were more highly expressed in Ly6E-KO tumors, suggesting that Ly6E-KO offers stronger anti-tumor capabilities. Finally, scRNA-seq data from a human breast cancer cohort were analyzed, further confirming the above findings. **Conclusion:** *Ly6e* gene knockout in tumor cells can enhance the anti-tumor immune response by increasing DC activation and infiltration in TIME.

[基金项目] 福建省科技创新联合基金重点项目(No. 2021Y9036)

[作者简介] 吴越(1998—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫环境调控机制研究。E-mail: wuyue@fjmu.edu.cn

[通信作者] 张秋玉, E-mail: qiuyu.zhang@fjmu.edu.cn

[Key words] lymphocyte antigen 6 complex, locus E (Ly6E); tumor immune microenvironment (TIME); single-cell sequencing; dendritic cell (DC); breast cancer

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(8): 759-768. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.003]

淋巴细胞抗原 6 复合物 E (lymphocyte antigen 6 complex, locus E, Ly6E), 又称干细胞抗原-2 (stem cell antigen-2, SCA-2)、胸腺共享抗原-1 (thymic shared antigen-1, TSA-1) 等, 是淋巴细胞抗原 6 (LY6) 家族的重要成员之一^[1-2]。来自不同课题组的研究显示, 肿瘤组织高表达的 Ly6E 与卵巢癌、浸润性乳腺癌、前列腺癌、胃癌和肺癌等多种类型肿瘤患者的预后不良密切相关, 提示 Ly6E 可作为肿瘤患者预后判断的一个重要指标^[3-6]。鉴于 Ly6E 蛋白在肿瘤细胞中高表达, 多个课题组制备靶向 Ly6E 的抗体偶联药物并证实具有抗肿瘤疗效^[7-9]。ALHOSSINY 等^[10]研究发现, Ly6E 在乳腺癌患者肿瘤组织中高表达, 且可能通过 TGF- β /smad 信号通路介导肿瘤的发生、发展, 提示 Ly6E 可能通过调控肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 介导肿瘤免疫逃逸。然而, 关于 Ly6E 如何调控 TIME, 相关的研究文献极其有限。单细胞 RNA 测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 技术的快速发展使得识别罕见和新型免疫细胞类型并可揭示 TIME 中的不同免疫细胞亚群可能的互作机制^[11]。为了探索 Ly6E 对 TIME 可能的免疫调控机制, 本研究在筛选 Ly6E 表达水平不同的小鼠肿瘤细胞株的基础上, 通过构建 *Ly6e* 基因敲除及野生型 4T1 小鼠乳腺癌细胞株, 利用 scRNA-seq 研究两类肿瘤细胞原位荷瘤模型中 TIME, 通过比较分析免疫细胞亚群的特征及不同细胞间互作机制, 旨在探明肿瘤细胞表达 Ly6E 在 TIME 中的潜在调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

小鼠三阴性乳腺癌细胞株 4T1 购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自集萃药康公司, 动物饲养于福建医科大学实验动物中心 SPF 级屏障系统内, 实验动物合格证号为 SCXK(粤)2020-0054, 温度维持在 20~26 °C, 湿度维持在 50%~80%, 小鼠自由采食和饮水, 每天观察状态, 实验动物使用和操作严格遵循福建医科大学动物实验管理委员会相关规定, 研究方案已通过动物福利伦理审查 (伦理审批号: 2023-Y-0430)。

FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 (#RC112-01) 购自 Vazyme 公司, PrimeScript™ RT

reagent Kit with gDNA Eraser (#RR047A) 和 TB Green Premix Ex Taq (#RR420L) 购自 TaKaRa 公司, 山羊抗鼠 Ly6E 抗体 (#NBP1-52176) 购自 Novus (中国) 公司, 驴抗山羊 IgG (#A-11055)、抗鼠 CD45 抗体 (#11-0453-82) 及 LIVE/DEAD 染色试剂 (#L34955) 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司, CRISPR 基因敲除慢病毒载体 LentiCRISPR-V2 (#52961) 购自 Addgene, 嘌呤霉素 (#540222) 购自 Sigma 公司, 流式分选仪 (BD FACS Aria III) 和流式细胞仪 (BD FACS Verse) 均购自 BD 公司, CFX96 型 qPCR 仪购自 Bio-Rad 公司。

1.2 qPCR 法分析不同小鼠肿瘤细胞株 *Ly6e* 表达水平

使用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 从体外培养的小鼠肿瘤细胞株中提取总 RNA, 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒获得 cDNA, 使用 TB Green Premix Ex Taq 试剂盒进行 qPCR。Ly6e 上游引物为 ccaggagaagaccattactgt, 下游引物为 acaccgagattgagattgacat; GAPDH 上游引物为 cctgctcaccaccttcttg, 下游引物 cctgctcaccaccttcttg。样品总体积为 25 μ L, 在 qPCR 仪器设定以下程序进行 qPCR: 95 °C 30 s; PCR 反应, 95 °C 5 s, 60 °C 30 秒, 40 个循环; 绘制溶解曲线。以 GAPDH 为内参基因, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算出 Ly6e mRNA 的相对表达水平。

1.3 流式细胞术分析不同小鼠肿瘤细胞表面 Ly6E 表达水平

制备不同小鼠肿瘤细胞系单细胞悬液, 使用山羊抗鼠 Ly6E 抗体, 驴抗山羊 IgG 对细胞进行染色, 洗涤重悬细胞后使用流式细胞仪检测。

1.4 构建 *Ly6e* 基因敲除的 4T1 细胞系

将 3 对靶向 *Ly6e* 基因的 sgRNA 序列 (sg-1: 5'-tat cacttatctgccgctg-3', 5'-cagcggcagataacgtgata-3'; sg-2: 5'-tgtaactctcaatctcgggtg-3', 5'-caccgagattgagattgaca-3'; sg-3: 5'-catgcagggaatgtcaacct-3', 5'-aggttgacattccctgcatg-3') 克隆至 CRISPR 基因敲除慢病毒载体 LentiCRISPR-V2 中, 再用 HEK293T 细胞包装慢病毒并感染 4T1 细胞, 感染 24 h 后用嘌呤霉素加压筛选, qPCR 法确定有效敲除 *Ly6e* 基因的转染细胞, 再通过亚克隆方案获取单克隆细胞, 用 qPCR 及流式细胞术鉴定 *Ly6e* 基因稳定敲除及未敲除的 4T1 细胞系, 分别命名为 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT。

1.5 构建 4T1 小鼠原位移植瘤模型并分离肿瘤组织、分选细胞

在 BALB/c 小鼠腹部右侧第二对乳腺脂肪垫内

注射 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 细胞 (5×10^5 个细胞/只), 每 3 d 用电子游标卡尺测量小鼠肿瘤的长径(a)和垂直于长径的横径(b), 皮下移植瘤平均直径按照公式计算, 即肿瘤平均直径 $= (a+b)/2$, 同时观察小鼠的饮食、活动等情况。荷瘤后第 7 天二氧化碳窒息法处死小鼠并手术剥离肿瘤组织, 制备单细胞悬液, 使用流式分选仪分选 LIVE/DEAD⁺CD45⁺ 的细胞。

1.6 scRNA-seq 及测序数据的预处理

按照 10×Genomics 公司提供的制造商方案准备 scRNA-seq 文库, 利用 Seurat 软件包进行细胞质控^[12], 将质量较低的细胞被排除在分析之外, 满足后续分析的细胞质量要求同时满足 200 条 $<nFeature_RNA < 10\ 000$ 条、线粒体基因占比 $< 10\%$ 。经过质控制后, 共成功捕获了约 25 000 个单细胞。利用 Seurat 软件包的 FindAllMarkers 函数筛选差异表达基因谱, 随后根据标记基因进行注释。

1.7 使用 CellChat 进行细胞-细胞互作分析

为了能够对细胞间通信进行系统分析, 本研究对不同的每种细胞类型进行了聚类。用 CellChat 软件包探索不同 DC 亚群和其他免疫细胞之间的配体-受体对 (<http://www.cellchat.org/>)^[13]。选择在特定簇中超过 10% 的细胞中表达的受体和配体进行后续分析。

1.8 肿瘤浸润免疫细胞亚群的轨迹推断

使用拟时序推理算法 Monocle2 进行了轨迹分析^[14], 以重建肿瘤浸润 DC 亚群的细胞分化轨迹。细胞轨迹中的不同分支可能区分特定细胞类型内分子上不同的细胞亚群。

1.9 基因集富集分析

利用 org. Hs. eg. db, clusterProfiler, enrichplot 和 ggplot 2 个数据包, 对 Ly6E-KO 与 Ly6E-WT 中 DC 的差异基因进行基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)。根据《GSEA 用户指南》的建议 (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/>): 小于 0.25 的错误发现率 (FDR) 和小于 0.05 的调整后 P 值表明差异具有统计学意义。

1.10 单样本基因集富集分析及细胞周期等 DC 功能相关分数评分

根据给定的基因表达谱, 应用单样本基因富集分析 (single-sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 计算富集分数。该分数代表每个样本中某一基因集的绝对富集程度。细胞周期评分使用 Seurat 软件包内置的 Cell-Cycle Scoring 功能进行细胞周期分析。本研究细胞周期分群使用既往文献报道已定义的 43 个 G1/S 和 54 个 G2/M 细胞周期基因的核心集合^[15]。

1.11 利用乳腺癌患者单细胞测序数据分析 Ly6E 表达水平与免疫细胞浸润关系

利用基因组学数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中 GSE176078 数据集, 即 26 例原发性未经治疗的单细胞测序数据^[15], 引用肿瘤微环境单细胞数据库 (Tumor Immune Single-cell Hub, TISCH) 网站 (<http://tisch.comp-genomics.org>) 相关注释结果对该数据集细胞亚群注释并在此基础上进行分析^[16]。

1.12 统计学处理

体外细胞和体内肿瘤生长的数据采用 GraphPad Prism 8 软件进行绘图和数据分析, 单细胞测序结果使用 R studio 软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验, 多点时间的计量资料采用重复测量的方差分析, t 检验及方差分析前确认数据呈正态分布并进行方差齐性检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ly6e 基因敲除后对 4T1 细胞生长能力的影响

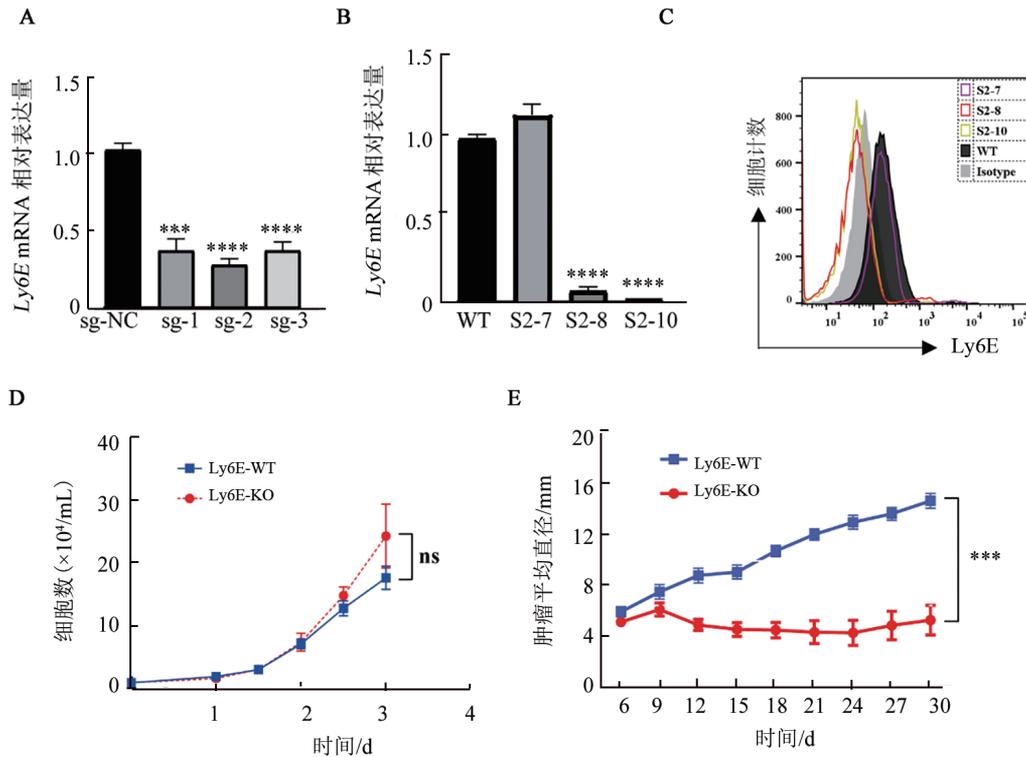
利用 CRISPR 技术构建了 3 个靶向 Ly6e 基因的 sg-RNA 慢病毒表达载体并转染 4T1 细胞, qPCR 显示均可显著降低 Ly6e 基因的表达 (图 1A)。随后, 选择 Sg-2 转染 4T1 细胞, 通过亚克隆方法筛选 Ly6e 基因低表达的单克隆细胞株, qPCR 和流式细胞术分析均表明: S2-8 和 S2-10 克隆的 Ly6e 基因表达显著降低 ($P < 0.000\ 1$)。最后, 选择 Ly6e 基因稳定敲除 S2-8 克隆与未敲除的 S2-7 克隆, 分别命名为 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT (图 1B、C)。两株细胞体外生长能力无差异 (图 1D), 但在乳腺原位荷瘤模型中 Ly6E-KO 肿瘤生长速度显著降低 (图 1E, $P < 0.001$)。

2.2 移植瘤组织 scRNA-seq 数据聚类分析获取标志细胞群和标志基因

为了探讨肿瘤细胞 Ly6e 基因敲除后是否影响 TIME 浸润的免疫细胞, 本研究构建了 4T1 小鼠乳腺癌原位移植瘤模型, 荷瘤第 7 天成瘤率为 100%。荷瘤第 7 天, Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 组肿瘤大小差异无统计学意义, 分离肿瘤组织中 CD45 阳性细胞进行 scRNA-seq, 共获取了 25 547 个细胞样本 (13 721 个来自 Ly6E-KO 和 12 276 个来自 Ly6E-WT) 进行分析。通过 UMAP 聚类和亚群特征分析, 结合既往报道的 scRNA-seq 免疫细胞分类依据^[16-17], 本研究将这些免疫细胞分为 8 个亚群: 包括 T 细胞 (表达 *Cd3D*)、B 细胞 (表达 *Cd79a* 和 *Cd79b*, *Cd19*)、成纤维细胞 (Fibro, 表达 *Colla1* 和

Colla2)、中性粒细胞(Neu, 表达 *Ly6g* 和 *S100a9*), DC (表达 *Itgax*)、巨噬细胞(M1型表达 *Itgam* 和 *Csf1*; M2型表达 *Itgam* 和 *Arg1*)及 MDSC(表达 *Il1b* 和 *Arg2*) (图2A)。同时,本研究比较分析两类肿瘤 TIME 免疫细胞类型组成差异,发现在 Ly6E-KO 中, DC、T

细胞和 M1 型巨噬细胞的比例高于 Ly6E-WT, 而 M2 型巨噬细胞则呈相反趋势(图 2B、C)。这些结果表明, *Ly6e* 基因敲除后肿瘤组织抗肿瘤免疫应答能力更强。



A: qPCR 分析 *Ly6e* 基因的有效敲除 sg-RNA 载体; B、C: qPCR 和流式细胞术分析 *Ly6e* 基因敲除的单克隆细胞株; D: Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 细胞株体外增殖能力的比较; E: Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 原位荷瘤后生长能力的比较。
ns: 差异无统计学意义, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图1 *Ly6e* 基因敲除对 4T1 肿瘤细胞体外增长及体内生长的影响

2.3 Ly6E-KO 肿瘤组织中 DC 亚群的浸润比例显著高于 Ly6E-WT

鉴于 Ly6E-KO 肿瘤组织中 DC 浸润比例高于 Ly6E-WT, 本研究进一步对 DC 亚群进行再聚类和特征分析。DC 谱系分为浆细胞样 DC(plasma-cell like DC, pDC)和常规 DC(conventional DC, cDC), 且基于既往 scRNA-seq 研究的定义^[18-19], 将 DC 分成三个不同的亚群: pDC(表达 *Ms4a4c*)、cDC1(表达 *Arsb*、*Ckb* 和 *FGD2*)及 cDC3(表达 *Ccr7*、*Lamp3*、*Fscn1*) (图 3A)。结果显示: 三种 DC 亚群在 Ly6E-KO 中比例均高于 Ly6E-WT(图 3B)。三种 DC 亚群拟时序轨迹演化分析显示: DC 可能经历从 pDC 到 cDC1, 最终转变为 cDC3 的过程(图 3C)。为了验证这一假设, 本研究比较了这三种 DC 亚群 4 个方面特征的差异, 即成熟度、迁移能力、免疫调节分子、以及 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)相关活化分子的表达水平。结果显示, 相较于其他两个亚群, cDC3 表现出更高的成熟

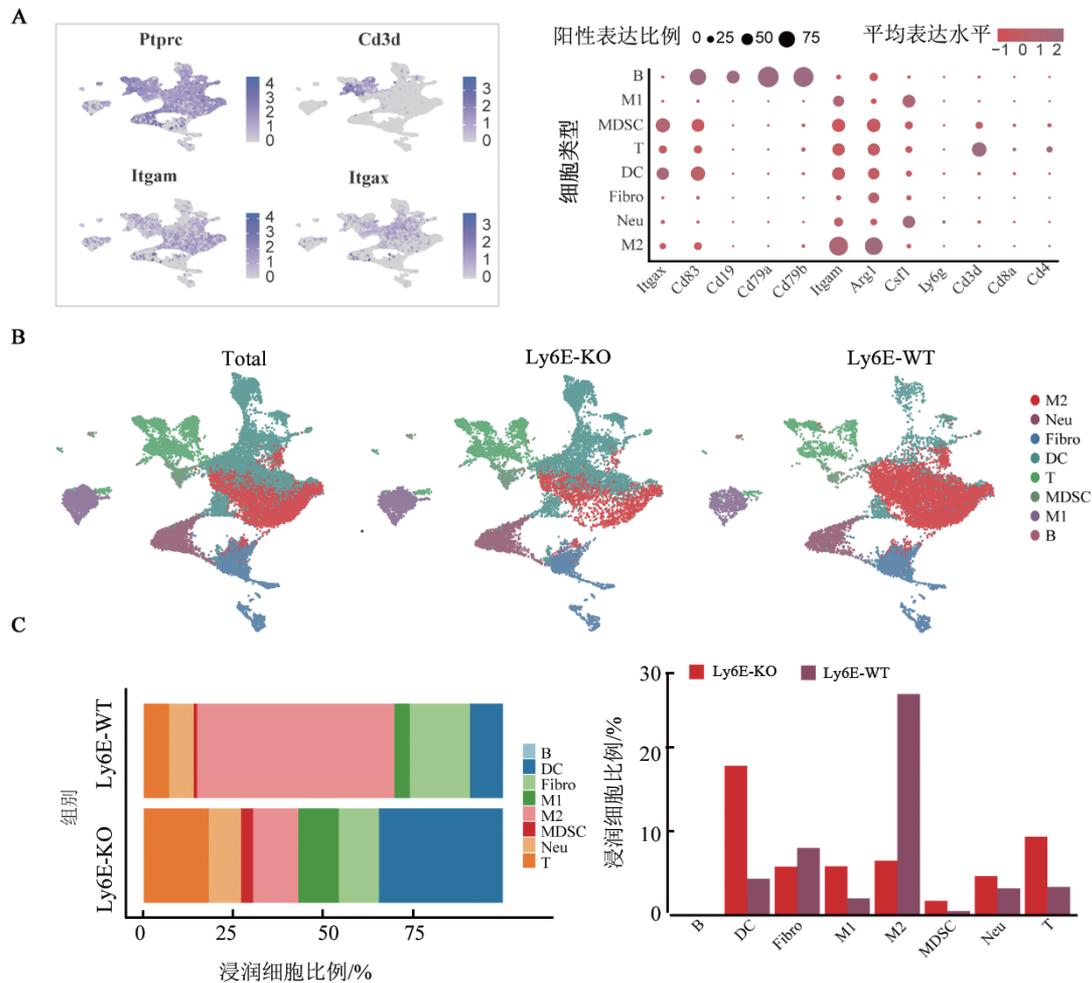
度、迁移及调节能力; 以 TLR 为主的 DC 活化相关基因表达水平较低, 而 Cd274 等免疫抑制分子表达水平较高(图 3D)。由此可见, Ly6E-KO 肿瘤浸润 DC 比例高于 Ly6E-WT, 提示 *Ly6e* 基因敲除的肿瘤细胞更容易发生肿瘤抗原的提呈及启动 T 细胞应答。

2.4 TIME 中 DC 亚群与其他免疫细胞间通信的鉴定

为了更加明确 DC 与其他免疫细胞的关系, 本研究使用 CellChat 工具确定细胞间通信, 结果如图 4A 所示: 在 DC 亚群之间或与 T、M1、M2、中性粒细胞等之间观察到大多数相互作用, 提示 DC 细胞亚群在 TIME 的细胞间通讯中起着核心作用; 三种 DC 亚群对 M2 细胞群体的传出作用最强(图 4A)。考虑到 TIME 中 DC 细胞主要发挥抗原提呈及活化 T 细胞的作用, 本研究重点分析 DC 不同亚群与 T 淋巴细胞的相互作用, 结果显示: DC 细胞不同亚群与 T 细胞间均有紧密联系; 作为初始状态的 DC 亚群, pDC 对 T 细胞的传入作用最强(图 4B)。随后, 本研究探索 DC 细

胞不同亚群对 T 细胞通讯的配体-受体对, 结果显示: pDC 亚群对 T 淋巴细胞交互配体-受体最多; 相比于其他两个 DC 亚群, cDC3 亚群对 T 淋巴细胞交互配

体-受体中 CCL5-CCR5 及 CCL5-CCR1 的通讯概率较高(图 4C)。



A: 免疫亚群标记基因的 UMAP 可视化分析(左图), 8 个免疫细胞亚群的代表性标记表达(右图), 点大小表示表达标记的细胞的比例, 点颜色显示标记的平均表达水平; B: Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 肿瘤中 8 个免疫细胞亚群的 UMAP 可视化分析; C: 两种肿瘤组织中 8 个免疫细胞亚群浸润比例分析。

图 2 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 移植瘤 TIME 的特征

2.5 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 肿瘤组织中 DC 的功能特性

鉴于 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 中 DC 浸润能力存在差异, 本研究进一步比较分析 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT DC 的细胞周期评分, 结果发现, 在 Ly6E-KO 中 DC 多处于 G2M、S 期(图 5A), 说明 Ly6e 基因敲除肿瘤组织中 DC 处于更加活跃的增殖和分裂状态。差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)分析结果显示, Ly6E-KO 中 DC 的 *Cxcl16*、*Ccr7*、*Mfge8* 基因的表达显著高于 Ly6E-WT(图 5B)。GSEA 分析 DC 通路显示, Ly6e 基因敲除肿瘤组织中 DC 的抗肿瘤相关通路上调, 如 TNF- α 、IFN- α 和 IFN- γ 等通路; 同时观察到能量代谢相关的通路下调, 如氧化磷酸化等(图 5C)。为了进一步探索 Ly6e 基因敲除肿瘤组织 DC 功能的改变是否影响 T 细胞表型及功能, 本研究比较分

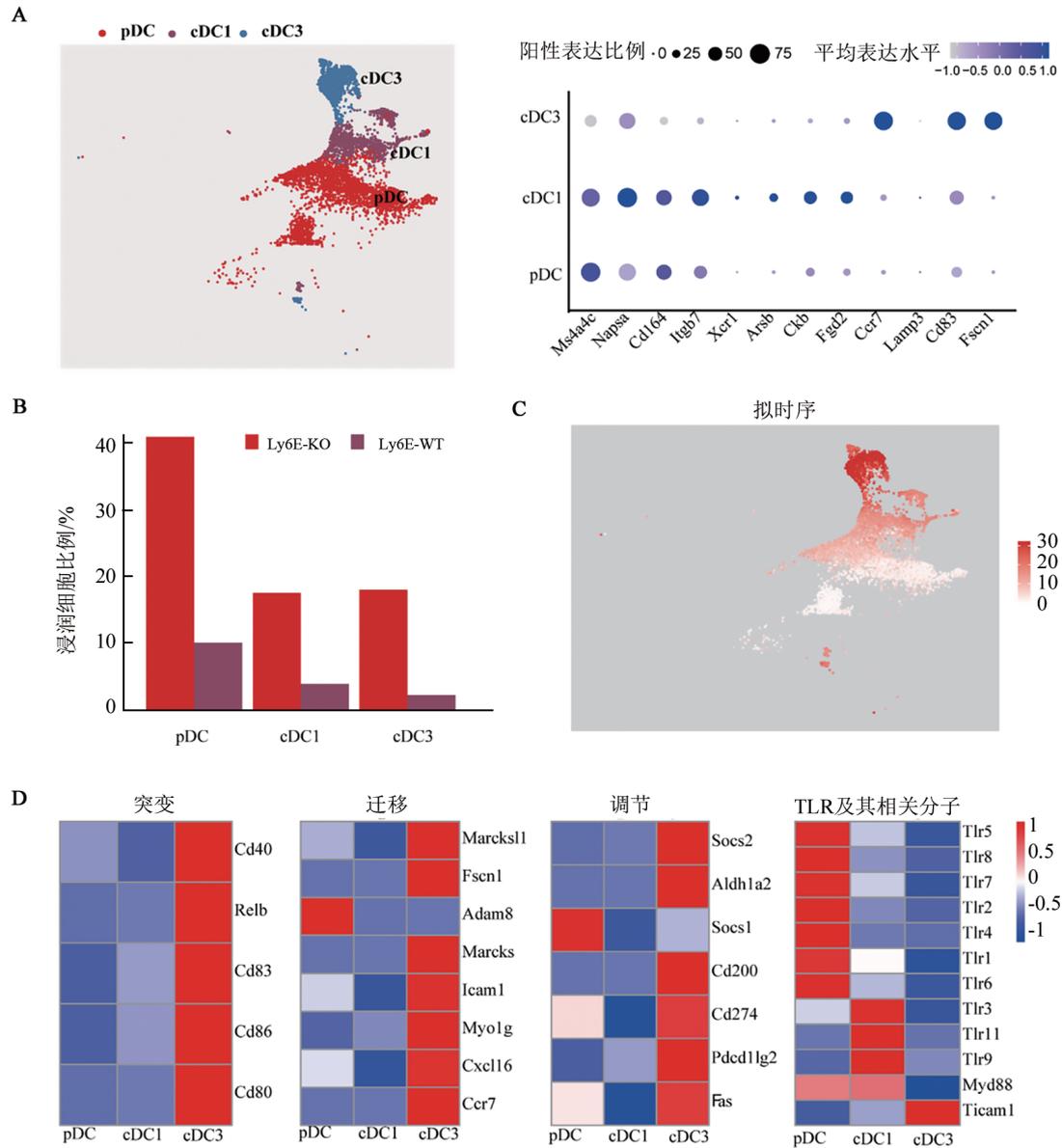
析 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 组织中 T 细胞表型及功能相关基因表达水平, 结果显示, Ly6e 基因敲除后 T 细胞增殖、活化及效应相关的基因均显著升高, 包括细胞因子及活化效应分子(*IL2*、*Ifng* 和 *Gzmb*)及共刺激与抑制分子(*Ccr7*、*Cd28*、*Icos*、*Tnfrsf9*、*Ctla4*、*Lag3*)等(图 5D)。

2.6 乳腺癌患者肿瘤组织测序结果提示 Ly6E 表达水平与 DC 功能相关

根据 TISCH 网站对于 GSE176078 数据集细胞注释的结果, 单独分析了 26 例患者肿瘤细胞中 Ly6E 的转录水平(图 6A), 并根据其中位数值将肿瘤患者分为 Ly6E^{High} 组($n=13$)和 Ly6E^{Low} 组($n=13$), 分析两组患者肿瘤浸润各类免疫细胞比例差异。有意义的发现是 Ly6E^{Low} 肿瘤微环境中 T 细胞浸润水平和细胞毒性

T细胞功能相关基因(*GZMB*、*GZMH*、*GZMK*、*PRF1*)表达均高于 *Ly6E*^{high}组(图6B)。鉴于两组浸润DC比例无显著差异,进一步对两组DC的细胞周期进行评

分,发现 *Ly6E*^{low}组中DC多处于G2M、S期且 *CCR7*等基因的表达高于 *Ly6E*^{high}组(图6C)。与小鼠模型获得的结果基本一致。



A: *Ly6E*-KO及 *Ly6E*-WT肿瘤微环境中DC不同亚群的UMAP可视化(左图),3个DC亚群的代表性基因表达水平(右图),点大小表示表达标记的细胞的比例,点颜色显示标记的平均表达水平;B:3个DC亚群在两类肿瘤浸润比例;C:3个DC亚群的伪时间发育轨迹,颜色表示伪时间状态;D:3个DC亚群相关功能基因相对聚类平均值,颜色代表平均表达水平。

图3 *Ly6E*-KO及 *Ly6E*-WT肿瘤浸润DC亚群的特征

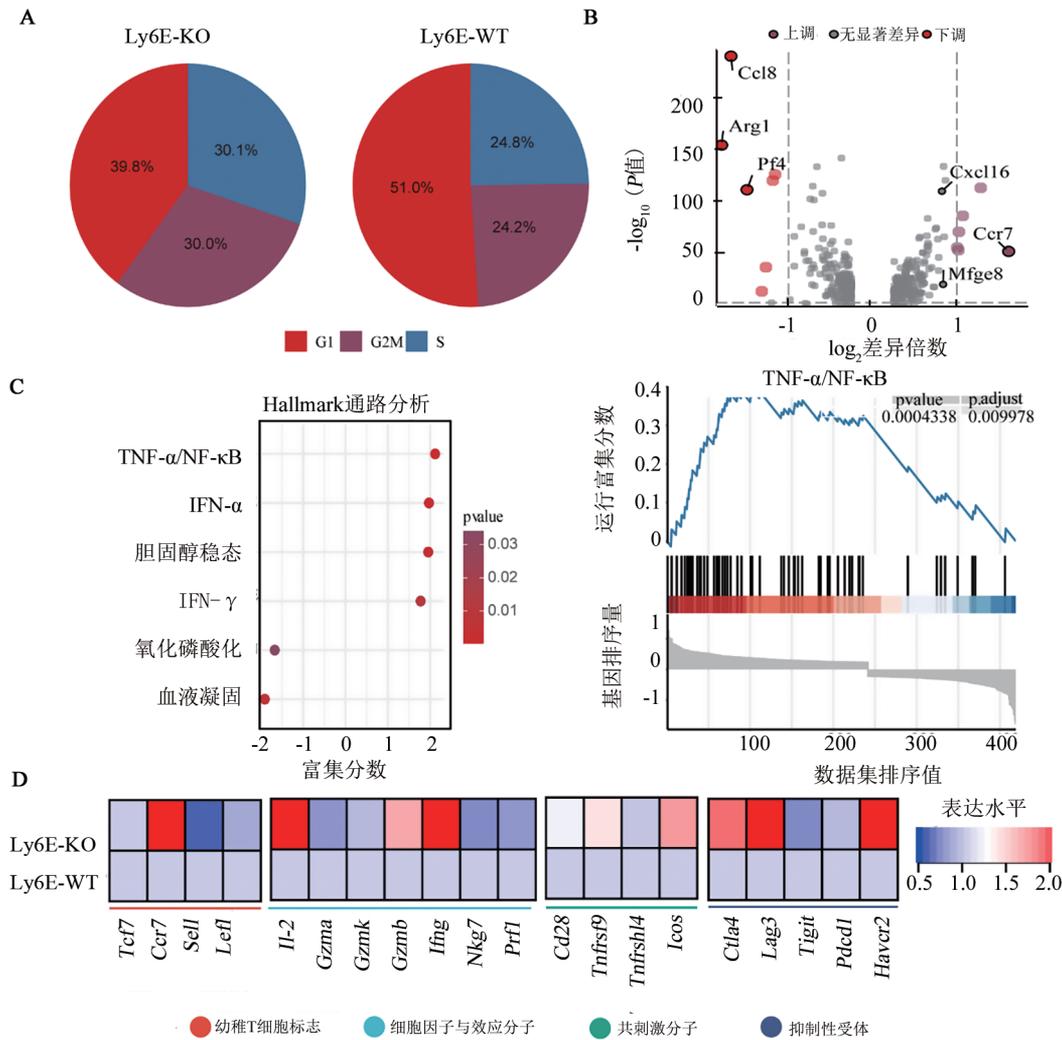
3 讨论

*Ly6e*基因广泛表达于各种淋巴细胞,包括T细胞、B细胞、巨噬细胞、DC、中性粒细胞以及NK细胞等。*Ly6E*抗原蛋白主要定位于细胞膜上,以GPI结构的锚定蛋白形式存在^[20]。近年来已有多个文献报道,*Ly6e*基因高表达于多种肿瘤组织中,包括在肺癌、头颈部肿瘤、卵巢癌、黑色素瘤,以及胚胎性肿瘤

等^[3-6]。通过免疫组织化学可检测到 *Ly6E*蛋白在胃癌、头颈部肿瘤、胰腺癌、肺癌与乳腺癌患者的肿瘤组织中表达,而正常组织中未检测 *Ly6E*蛋白的表达^[9]。早在1987年,NODA等^[21]用小鼠T细胞杂交瘤细胞株研究发现,IFN- γ 选择性上调静息T细胞中 *Ly6E*蛋白表达,推测 *Ly6E*蛋白可能参与调控T细胞应答。此外,ALHOSSINY等^[10]研究也显示,在人乳腺癌肿瘤组织中,*Ly6E*表达水平与PD-L1和CTLA-4

细胞-DC 祖细胞(MDPs)产生。在上述研究的基础上,本研究发现在 Ly6E-WT 的 TIME 中呈现 DC 和 M1 型巨噬细胞浸润低、M2 型巨噬细胞浸润高的情况,而 Ly6E-KO 的 TIME 则相反。因此,本研究推

测肿瘤细胞上 Ly6E 的表达促进单核细胞在 TIME 中向 M2 表型分化,后续本研究将深入探讨具体的调控机制。

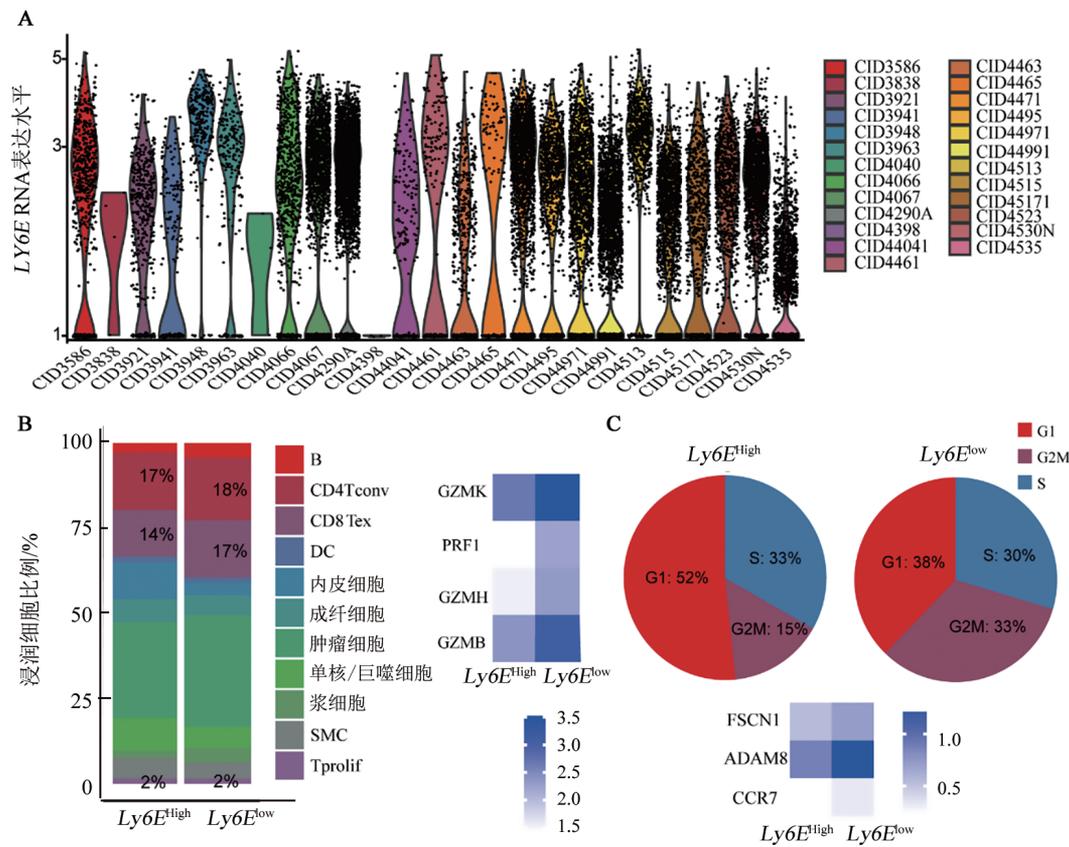


A: Ly6E-KO 及 Ly6E-WT 肿瘤微环境 DC 的细胞周期分布; B: Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 肿瘤微环境 DC-DEG 火山图, 其中 $|\text{Log}_2(\text{Fold change})| < 1$, 调整后 P 值 < 0.05 的基因被认为是显著的, 并以红色或褐色突出显示; C: DC-DEG GSEA 富集结果; D: 比较 Ly6E-KO 与 Ly6E-WT 肿瘤微环境中 T 细胞表型及功能相关基因表达水平。

图5 Ly6E-KO 和 Ly6E-WT 中 DC 和 T 淋巴细胞的功能相关基因表达差异

总之,本研究通过建立 *Ly6e* 基因敲除和野生型 4T1 肿瘤组织单细胞图谱,分析了两者在肿瘤微环境中的各免疫细胞亚群组成差异,揭示 Ly6E 对 DC 细胞浸润及功能的影响,为深入探讨 Ly6E 介导肿瘤免疫逃。然而,本研究也存在一些局限性。例如,本研究的模型是基于荷瘤小鼠的模型,这可能与人类肿瘤在免疫微环境方面存在差异。此外,本研究主要关注肿瘤细胞表达 Ly6E 的调控机制。新近,有研究报道 IFN- γ

诱导肿瘤浸润中性粒细胞表达 Ly6E, 继而促进 CD8 T 细胞活化而增强 PD-1/PD-L1 阻断剂的抗肿瘤效应^[28]。靶向 PD-1/PD-L1 的临床实践已表明, TIME 异质性是影响肿瘤免疫治疗疗效的核心因素。后续研究将进一步探讨 Ly6E 在不同类型的肿瘤微环境中的表达分布情况,深入揭示其在不同 TIME 中的调控机制,为靶向 Ly6E 的抗体偶联药物及治疗性抗体药物的临床推广应用提供基础。



A: GSE176078 数据集中 26 个乳腺癌患者的肿瘤细胞中 LY6E 转录水平; B: 按照表达水平中位数分成 $Ly6E^{high}$ 组及 $Ly6E^{low}$ 组, 两组肿瘤 TIME 中各类细胞浸润的比例(左图)和细胞毒性 T 细胞功能相关基因转录水平(右图); C: 两组肿瘤 TIME 中 DC 细胞的细胞周期分布(左图)和 *CCR7* 基因转录水平(右图)。Tconv: 常规 T 细胞; Tex: 耗竭 T 细胞; Tprolif: 具有高增殖能力的 T 细胞; SMC: 平滑肌细胞。

图 6 GEO 数据库分析 LY6E 与人乳腺癌组织浸润 DC 等免疫激活因子的相关性

[参考文献]

[1] ALTMAYER A, STARUCH M J, COFANO F, *et al.* Multiple cytokine interactions regulate Ly-6E antigen expression: cooperative Ly-6E induction by IFNs, TNF, and IL-1 in a T cell lymphoma and in its induction-deficient variants[J]. *Cell Immunol*, 1991, 138(1): 94-107. DOI: 10.1016/0008-8749(91)90135-x.

[2] SAITOH S, KOSUGI A, NODA S, *et al.* Modulation of TCR-mediated signaling pathway by thymic shared antigen-1 (TSA-1)/stem cell antigen-2 (Sca-2)[J]. *J Immunol*, 1995, 155(12): 5574-5581.

[3] LUO L L, MCGARVEY P, MADHAVAN S, *et al.* Distinct lymphocyte antigens 6 (Ly6) family members Ly6D, Ly6E, Ly6K and Ly6H drive tumorigenesis and clinical outcome[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11165-11193. DOI: 10.18632/oncotarget.7163.

[4] LV Y, SONG Y, NI C, *et al.* Overexpression of lymphocyte antigen 6 complex, locus E in gastric cancer promotes cancer cell growth and metastasis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(3): 1219-1229. DOI: 10.1159/000487453.

[5] LI T, LIU W D, WANG C, *et al.* Multidimension analysis of the prognostic value, immune regulatory function, and ceRNA network of Ly6E in individuals with colorectal cancer[J/OL]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 5164265[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8933097/>. DOI: 10.1155/2022/5164265.

[6] KIM H J, HONG I, ROH S, *et al.* High expression of Ly6E is an independent prognostic factor of colorectal cancer patients[J/OL]. *Oncol Rep*, 2023, 49(4): 80[2024-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36866762/>. DOI: 10.3892/or.2023.8517.

[7] DELA CRUZ CHUH J, GO M, CHEN Y, *et al.* Preclinical optimization of Ly6E-targeted ADCs for increased durability and efficacy of anti-tumor response[J/OL]. *MAbs*, 2021, 13(1): 1862452 [2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7784788/>. DOI: 10.1080/19420862.2020.1862452.

[8] TOLANEY S M, DO K T, EDER J P, *et al.* A phase I study of DLYE5953A, an anti-Ly6E antibody covalently linked to monomethyl auristatin E, in patients with refractory solid tumors [J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(21): 5588-5597[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9899652/>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1067.

[9] ASUNDI J, CROCKER L, TREMAYNE J, *et al.* An antibody-drug conjugate directed against lymphocyte antigen 6 complex, locus E (Ly6E) provides robust tumor killing in a wide range of solid tumor malignancies[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(14): 3252-3262. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0156.

[10] ALHOSSINY M, LUO L L, FRAZIER W R, *et al.* Ly6E/K signaling to TGFβ promotes breast cancer progression, immune escape, and drug resistance[J/OL]. *Cancer Res*, 2016, 76(11): 3376-

- 3386[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4910623/>. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2654.
- [11] HAN X P, ZHOU Z M, FEI L J, *et al.* Construction of a human cell landscape at single-cell level[J/OL]. *Nature*, 2020, 581(7808): 303-309[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/28102262/>. DOI: 10.1038/s41586-020-2157-4.
- [12] HAO Y H, STUART T, KOWALSKI M H, *et al.* Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis [J/OL]. *Nat Biotechnol*, 2024, 42(2): 293-304[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10928517/>. DOI: 10.1038/s41587-023-01767-y.
- [13] JIN S Q, GUERRERO-JUAREZ C F, ZHANG L H, *et al.* Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat[J/OL]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1088[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7889871/>. DOI: 10.1038/s41467-021-21246-9.
- [14] QIU X J, MAO Q, TANG Y, *et al.* Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories[J/OL]. *Nat Methods*, 2017, 14(10): 979-982[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5764547/>. DOI: 10.1038/nmeth.4402.
- [15] WU S Z, AL-ERYANI G, RODEN D L, *et al.* A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1334-1347. DOI: 10.1038/s41588-021-00911-1.
- [16] HAN Y, WANG Y T, DONG X, *et al.* TISCH2: expanded datasets and new tools for single-cell transcriptome analyses of the tumor microenvironment[J]. *Nucleic Acids Res*, 2023, 51(D1): D1425-D1431. DOI: 10.1093/nar/gkac959.
- [17] MIAO Y R, ZHANG Q, LEI Q, *et al.* ImmuCellAI: a unique method for comprehensive T-cell subsets abundance prediction and its application in cancer immunotherapy[J/OL]. *Adv Sci*, 2020, 7(7): 1902880[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7141005/>. DOI: 10.1002/adv.201902880.
- [18] ZILIONIS R, ENGBLOM C, PFIRSCHKE C, *et al.* Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species[J]. *Immunity*, 2019, 50(5): 1317-1334. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.009.
- [19] LUTZ M B, ALI S, AUDIGER C, *et al.* Guidelines for mouse and human DC generation[J/OL]. *Eur J Immunol*, 2023, 53(11): e2249816[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10704271/>. DOI: 10.1002/eji.202249816.
- [20] UPADHYAY G. Emerging role of lymphocyte antigen-6 family of genes in cancer and immune cells[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 819[2024-08-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6491625/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00819.
- [21] NODA S, KOSUGI A, SAITOH S, *et al.* Protection from anti-TCR/CD3-induced apoptosis in immature thymocytes by a signal through thymic shared antigen-1/stem cell antigen-2[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(5): 2355-2360. DOI: 10.1084/jem.183.5.2355.
- [22] DEL PRETE A, SALVI V, SORIANI A, *et al.* Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(5): 432-447. DOI: 10.1038/s41423-023-00990-6.
- [23] LIU P, ZHAO L W, KROEMER G, *et al.* Conventional type 1 dendritic cells (cDC1) in cancer immunity[J/OL]. *Biol Direct*, 2023, 18(1): 71[2024-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37907944/>. DOI: 10.1186/s13062-023-00430-5.
- [24] XIAO Z H, WANG R Q, WANG X Y, *et al.* Impaired function of dendritic cells within the tumor microenvironment[J/OL]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1213629[2024-08-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37441069/>. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1213629.
- [25] KAJIHARA M, TAKAKURA K, KANAI T, *et al.* Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(17): 4275-4286. DOI: 10.3748/wjg.v22.i17.4275.
- [26] DEVALARAJA S, TO T K J, FOLKERT I W, *et al.* Tumor-derived retinoic acid regulates intratumoral monocyte differentiation to promote immune suppression[J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1098-1114. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.042.
- [27] LIU Z, WANG H, LI Z, *et al.* Dendritic cell type 3 arises from Ly6C⁺ monocyte-dendritic cell progenitors[J]. *Immunity*, 2023, 56(8): 1761-1777. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.07.001.
- [28] BENGUIGUI M, COOPER T J, KALKAR P, *et al.* Interferon-stimulated neutrophils as a predictor of immunotherapy response[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(2): 253-265. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.12.005.

[收稿日期] 2024-03-09

[修回日期] 2024-08-08

[本文编辑] 黄静怡