

# SQL<sub>E</sub> 敲除促进黑色素瘤肿瘤微环境 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润发挥抗肿瘤效应

丁瑶<sup>1</sup> 刘雯<sup>2</sup> 廖亦然<sup>1</sup> 雷舜<sup>3</sup> 张妍<sup>2</sup> 陈叶梓<sup>2</sup> 龚奕<sup>1</sup> 黄启钊<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨黑色素瘤细胞鲨烯环氧化物合酶(SQL<sub>E</sub>)基因敲除调控肿瘤微环境T细胞浸润影响机体抗肿瘤效应的作用及其分子机制。方法 使用SQL<sub>E</sub>敲除的B16F10细胞系分别接种免疫完全和免疫缺陷小鼠,明确基因敲除对肿瘤细胞恶性表型的自主和非自主性调控,进一步使用抗体阻断、Luminex多因子检测和流式细胞等技术探索SQL<sub>E</sub>基因敲除对细胞因子/趋化因子分泌及免疫浸润的影响,结合生物信息学分析,验证SQL<sub>E</sub>表达与免疫浸润和临床预后的相关性。结果 与免疫缺陷型小鼠相比,敲除SQL<sub>E</sub>显著抑制免疫完全小鼠肿瘤增殖,延长小鼠生存期。SQL<sub>E</sub>敲除诱导肿瘤细胞分泌细胞因子和趋化因子,增加肿瘤微环境CD8<sup>+</sup>T细胞浸润从而改善机体抗肿瘤效应。生物信息学分析提示SQL<sub>E</sub>及其对应的免疫浸润标志物与黑色素瘤患者临床预后明显相关。结论 SQL<sub>E</sub>通过细胞因子和趋化因子调控肿瘤微环境参与机体抗肿瘤效应,有望成为新的肿瘤免疫药物靶点和疗效预测分子指标。

**关键词** 鲨烯环氧化物合酶;黑色素瘤;肿瘤微环境;肿瘤免疫

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)08-1315-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.08.005

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)是由实体肿瘤细胞、基质细胞、免疫细胞等多种细胞和相关信号物质共同构成的高度复杂的生态系统。抑制性TME导致效应免疫细胞,如抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润不足或功能丧失,是肿瘤细胞逃逸免

疫监视和肿瘤免疫治疗疗效不佳的主要原因<sup>[1-2]</sup>。实体肿瘤细胞是塑造TME的主导因素,针对肿瘤细胞调控TME的作用机制,靶向和重塑TME,对于改善机体抗肿瘤免疫效应,提高免疫治疗疗效具有关键意义。

鲨烯环氧化物合酶(squalene epoxidase, SQL<sub>E</sub>)是胆固醇生物合成的限速酶,研究<sup>[3-5]</sup>表明多种肿瘤存在SQL<sub>E</sub>拷贝数扩增导致的过表达,并可通过胆固醇依赖或非依赖的方式调控肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭和分化等恶性生物学特性。然而,SQL<sub>E</sub>在TME形成和调控中的作用尚不清楚。该研究通过小鼠黑色素瘤模型,探讨SQL<sub>E</sub>基因敲除(knockout, KO)调控TME从而影响机体抗肿瘤效应的作用及潜在机制,为以SQL<sub>E</sub>为切入点的TME靶向策略提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** SPF级雄性C57BL/6小鼠50只,SPF级雄性裸鼠20只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,均为4~6周龄,体质量18~22g。购买的小鼠在SPF级动物房适应性饲养1周后用于动物实验。

**1.1.2 主要材料和仪器** B16F10细胞系购自美国ATCC平台;PX458质粒购自美国Addgene平台;DMEM高糖培养基、RPMI-1640、Opti-MEM培养基、胎牛血清、100×双抗L-谷氨酰胺、0.25%胰蛋白酶、Lipofectamine 3000转染试剂、BCA蛋白浓度试剂盒、ECL化学发光底物、Live/Dead细胞活性染料购自美国Thermo Fisher公司;10%蛋白预制胶、RIPA裂解液、细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒、细胞周期流式检测试剂盒、改良Lowry法蛋白浓度检测试剂盒、辣根过氧化物酶偶联二抗购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF转印膜、细胞Caspase-3活性显色试剂盒、Percoll购自美国Sigma公司;SQL<sub>E</sub>兔多抗(12544-1-AP)、

2024-05-20 接收

基金项目:重庆市自然科学基金创新发展联合基金重点项目(编号:CSTB2023NSCQ-LZX0010);国家自然科学基金(编号:81702443)

作者单位:<sup>1</sup>重庆大学附属肿瘤医院一期病房,重庆 400030

<sup>2</sup>重庆医科大学免疫创新与转化研究院,重庆 400016

<sup>3</sup>陆军军医大学基础医学院免疫学教研室,重庆 400038

作者简介:丁瑶,女,硕士,住院医师;

龚奕,女,博士,副主任医师,责任作者,E-mail: gongyi\_95@163.com;

黄启钊,男,博士,教授,责任作者,E-mail: huangqizhao1988@163.com

GAPDH 小鼠单抗(60004-1-1g)购自美国 Proteintech 公司; 流式细胞用抗体及克隆号: CD4(αCD4, clone RM4-5)、CD8α(αCD8, clone 53-6.7)、CD19(αCD19, clone HIB19)、FOXP3(αFOXP3, clone MF-14)、CD44(αCD44, clone IM7) 购自美国 Biolegend 公司; P15E MHC 四聚体(TS-M507-1) 购自日本 MBL 公司; 小鼠中和抗体: CD8α(αCD8α, clone YTS169.4)、C-X-C 基序趋化因子受体 3(C-X-C motif chemokine receptor 3, CXCR3)(αCXCR3, clone CXCR3-173)、IgG 对照抗体购自美国 Bio X Cell 公司。细胞培养箱(型号: MCO-20AIC) 购自日本三洋公司; 全自动酶标仪(型号: Infinite 200 PRO) 购自瑞士 Tecan 公司; 蛋白垂直电泳转印系统(型号: Mini-protein Tetra Cell)、化学发光成像系统(型号: Chemi-Doc Imaging) 购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞分析仪(型号: BD LSRFortessa) 和流式细胞分选仪(型号: BD FACSArial III) 购自美国 BD 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 和 *SQLE* 敲除细胞使用 D10 培养基(高糖 DMEM + 10% 胎牛血清 + 2 mmol/L L-谷氨酰胺 + 100 U/ml 青链霉素双抗) 培养于 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱。待细胞融合度达到约 80% 时使用 0.25% 胰蛋白酶消化并传代, 取状态良好的对数期细胞用于实验。

**1.2.2 CRISPR/Cas9 敲除细胞株构建** 使用在线工具 Chopchop(<https://chopchop.cbu.uib.no/>) 设计两条针对 *SQLE* 基因的 sgRNA 序列, 分别靶向 1 号外显子和 2 号外显子, 以 PX458 质粒作为骨架连接合成的 sgRNA 序列构建敲除质粒。Lipofectamine 3000 转染敲除质粒至 B16F10 细胞, 转染后 48 h 流式分选 GFP 阳性细胞至 96 孔板单细胞培养。待单细胞克隆形成后, 消化离心取少量细胞提取基因组 DNA, 根据设计网站提供的 PCR 引物序列扩增基因编辑区域, Sanger 测序确定基因组编辑位点和效率。

**1.2.3 动物模型和处理** 使用 B16F10 亲本对照细胞和 *SQLE* 基因敲除细胞建立小鼠皮下移植瘤。取对数期培养细胞消化离心, PBS 重悬后, 血球计数板计数并调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$  /ml, 使用胰岛素注射器于小鼠左下腹皮下接种 100 μl 细胞悬液 ( $0.5 \times 10^6$  个细胞)。每天观察小鼠状态, 每周使用游标卡尺测量肿瘤体积 2 次并记录长径 a 和横径 b。移植瘤体积按照体积  $V = (a \times b^2) / 2$  计算。实验达到预设时间点或小鼠肿瘤体积达到 2 000 mm<sup>3</sup> 即

终止实验。抗体清除和中和抗体阻断实验, 使用 PBS 配置相应浓度抗体, 根据实验设计腹腔注射, 注射体积 100 μl。

**1.2.4 Western blot** 按照 10<sup>6</sup> 个细胞/100 μl 的比例加入预冷 RIPA 裂解液, 细胞刮刮取细胞, 冰上裂解 30 min, 离心去除沉淀后取蛋白上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 调整浓度一致后, 加入 6 × 上样缓冲液至终浓度 1 ×, 95 °C 煮样 10 min。使用蛋白电泳预制胶恒压 200 V 行 SDS 凝胶电泳, 恒流 250 mA 湿法转印 2 h 至 0.45 μm PVDF 膜, 封闭液室温封闭 1 h 后 4 °C 摇床孵育 SQLE 或 GAPDH 一抗(1 : 2 000) 过夜。次日清洗转印膜, 室温孵育辣根过氧化物酶偶联二抗(1 : 10 000) 1 h, 洗膜液清洗后使用 ECL 发光底物显影记录结果。

**1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖** 细胞按照  $1 \times 10^5$  /孔/100 μl 接种于 96 孔板, 设置 5 个复孔。培养 12、24、48、72 h, 测量前每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 37 °C 孵育 1 h 后酶标仪检测 450 nm 吸光度值, 以测量时间点吸光度值与培养起始时间点 0 h 吸光度值的比值作为细胞相对增殖活力, 记录数据并绘制生长曲线。

**1.2.6 细胞周期检测** 将细胞传代至 6 孔板中, 贴壁后 1% 血清培养基同步 24 h。恢复 10% 胎牛血清培养 2 h, 消化离心收集细胞。使用 75% 乙醇于 -20 °C 固定 1 h, 轻柔吹打混匀。PBS 清洗细胞后加入 Rnase A 溶液 20 μl, 37 °C 水浴 30 min。70 μm 细胞筛网制备单细胞悬液后加入 400 μl PI 溶液, 轻柔混匀, 4 °C 避光孵育 1 h。每组设置 3 个复孔, 生物学重复 3 次, 流式细胞仪检测结果。

**1.2.7 Caspase-3 活性检测** 将细胞传代至 6 孔板中, 贴壁后以 EBSS 培养 24 h 诱导凋亡。预冷裂解液裂解消化收集的细胞, 使用改良 Lowry 法测量蛋白浓度。吸取 10 μl 蛋白(50 μg), 加入 90 μl 检测缓冲液。加入 10 μl Ac-DEVD-pNA, 37 °C 避光反应 3 h 进行检测。酶标仪检测 405 nm 吸光度值, 通过待测细胞吸光度值与空白对照细胞吸光度值的比值计算 Caspase-3 的相对活性。每组设置 3 个复孔, 生物学重复 3 次。

**1.2.8 肿瘤浸润 T 细胞流式细胞检测** 荷瘤小鼠处死后, 用剪刀小心剥离移植瘤置于 RPMI-1640 培养基, 移至 100 μm 筛网研磨过滤, 使用上层 40%, 下层 60% 的 Percoll 2 100 r/min, 离心 30 min 分离肿瘤浸润免疫细胞。吸取中间界面细胞, 2% 血清 PBS 清洗后配置流式抗体, 冰上表面染色 30 min,

2% 血清 PBS 清洗两遍,使用 BD LSRFortessa 流式细胞仪检测。检测结果使用 Flowjo10.8 软件分析。

**1.2.9 Luminex 多因子检测** 待测细胞接种于 T75 培养瓶,培养 2~3 d 至细胞密度达到 80%~90% 时,吸取 1 ml 培养上清液至离心管。4 °C、13 000 r/min 高速离心 10 min 去除细胞和细胞碎片,吸取上清液至离心管,−80 °C 保存或干冰寄送至上海 LabEx 公司检测。

**1.2.10 生物信息学分析** 使用 TIMER 数据库和 GEPIA2 数据库分析 *SQL*E 与免疫浸润和黑色素瘤患者预后相关性。

**1.3 统计学处理** 使用 Graphpad Prime 8.0 软件进行统计学分析和制图,数据以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。符合正态分布和方差齐性的两组数据间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。多个样本不同时间点的生长曲线统计分析使用双因素方差分析。生存曲线使用 Log-rank 检验并作两两比较。

## 2 结果

**2.1 *SQL*E 基因敲除抑制 C57/BL6 小鼠皮下移植瘤生长** 根据在线 sgRNA 设计工具预测结果,选取两条切割效率高且脱靶效应低的 sgRNA 用于敲除 B16F10 细胞 *SQL*E 基因。如图 1A 所示,敲除细胞 KO#1、KO#2 所设计的 sgRNA 分别针对小鼠 *SQL*E

的 1 号和 2 号外显子,下划线标明序列为可被 sp-Cas9 蛋白识别的 PAM 位点。下划线缺失序列为测序结果中敲除单克隆细胞突变位点,提示细胞基因组被切割区域分别存在 5 bp 和 2 bp 的纯合缺失突变。Western blot 结果显示,与 Control 组对照细胞相比,基因敲除细胞 *SQL*E 蛋白无明显表达,确认基因敲除成功(图 1B)。分别使用对照细胞和敲除细胞接种免疫功能完整的 C57/BL6 小鼠,以观察 *SQL*E 对肿瘤生长和小鼠生存的影响。皮下移植瘤生长曲线结果显示,与对照细胞相比,*SQL*E 基因敲除明显抑制肿瘤生长,敲除组肿瘤体积明显减小 ( $F = 134.3, P < 0.01$ ; 图 1C)。生存曲线表明 *SQL*E 基因敲除显著延长荷瘤小鼠生存时间 ( $P < 0.01$ , 图 1D)。针对不同外显子设计的两株敲除细胞系对小鼠肿瘤生长抑制和生存改善无明显差异,可排除 CRISPR/Cas9 脱靶效应。以上结果表明 *SQL*E 基因敲除能够显著抑制 C57/BL6 小鼠皮下移植瘤生长,改善小鼠生存时间。

**2.2 *SQL*E 基因敲除的抗肿瘤效应依赖机体适应性免疫系统** 研究显示 *SQL*E 主要通过细胞自主性方式 (cell-autonomous) 调控肿瘤细胞恶性表型。为确认小鼠黑色素瘤中 *SQL*E 基因敲除所诱导的抗肿瘤效应调控方式,分别使用对照细胞和敲除细胞接种适应性免疫功能缺陷的裸鼠,观察 *SQL*E 敲除对肿瘤生长和裸鼠生存的影响。实验结果显示,由基

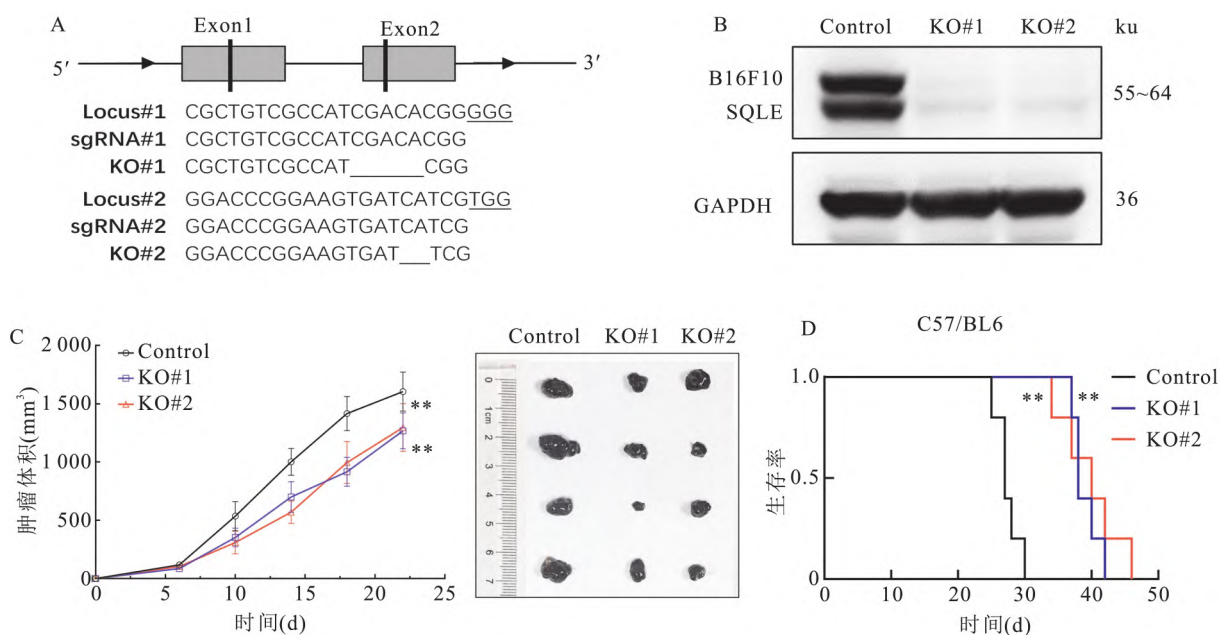


图 1 *SQL*E 基因敲除对 C57/BL6 小鼠皮下黑色素瘤生长的影响

A: 针对小鼠 *SQL*E 基因设计的 sgRNA 位点和序列示意图; B: Western blot 检测敲除细胞的 *SQL*E 蛋白表达, *SQL*E 多克隆抗体识别 55~64 ku 多个条带; C: 基因敲除细胞 C57/BL6 小鼠皮下移植瘤生长曲线和肿瘤大小; D: 荷瘤 C57/BL6 小鼠生存分析; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$

因敲除细胞与对照细胞形成的裸鼠移植瘤生长和大小差异无统计学意义 ( $F = 1.80, P > 0.05$ ; 图 2A), 裸鼠生存期无明显改善 ( $P > 0.05$ , 图 2B)。细胞实验表明敲除细胞体外增殖活力与对照细胞相比差异无统计学意义 ( $F = 0.92, P > 0.05$ ; 图 2C)。与对照细胞相比, 敲除细胞细胞周期 ( $F = 1.81, P > 0.05$ ; 图 2D) 和细胞凋亡 ( $F = 0.51, P > 0.05$ ; 图 2E) 差异均无统计学意义, 提示 *SQL*E 基因敲除可能不通过细胞自主性调控方式参与维持肿瘤恶性表型。与免疫功能完备的 C57/BL6 小鼠相比, 裸鼠皮下移植瘤和体外实验中敲除 *SQL*E 对肿瘤生长增殖无明显抑制, 提示 *SQL*E 基因敲除增强的抗肿瘤效应为依赖机体适应性免疫系统的非细胞自主调控方式。

**2.3 *SQL*E 基因敲除的抗肿瘤效应依赖 CD8<sup>+</sup> T 细胞** T 细胞和 B 细胞是适应性免疫系统的主要响应者, 为确认 *SQL*E 敲除影响的适应性免疫细胞类型, 使用流式细胞术对 C57/BL6 移植瘤浸润的免疫细胞进行分析。结果显示, 敲除细胞肿瘤浸润的总 CD4<sup>+</sup> T 细胞、调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 细胞和总 B 细胞频率、数量较对照细胞肿瘤无明显变化 (数据未列出)。如图 3 A、B 所示, 对照细胞肿瘤和敲除细胞肿瘤浸润的 CD8<sup>+</sup> T 细胞频率分别为 (0.03 ± 0.01) % 和 (0.08 ± 0.02) %, 细胞计数分别为

为 (1.44 ± 0.32) × 10<sup>5</sup> /g 肿瘤和 (2.81 ± 0.54) × 10<sup>5</sup> /g 肿瘤, 差异均有统计学意义 ( $t_{\text{频率}} = 9.23, P < 0.01$ ;  $t_{\text{计数}} = 9.23, P < 0.01$ )。进一步使用识别 B16F10 肿瘤特异性抗原 (tumor specific antigen, TSA) P15E 蛋白的 MHC 四聚体对肿瘤抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞进行染色分析, 如图 3C、D 所示, 对照细胞和敲除细胞肿瘤浸润细胞中抗原特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞的频率分别为 (0.020 ± 0.005) % 和 (0.040 ± 0.008) %, 细胞计数分别为 (0.64 ± 0.24) × 10<sup>5</sup> /g 肿瘤和 (1.36 ± 0.35) × 10<sup>5</sup> /g 肿瘤, 敲除组细胞频率和计数均较对照组增加 ( $t_{\text{频率}} = 11.65, P < 0.01$ ;  $t_{\text{计数}} = 10.93, P < 0.01$ )。如图 3E 所示, 使用 CD8α 抗体清除荷瘤小鼠 CD8<sup>+</sup> T 细胞, 能够逆转 *SQL*E 基因敲除诱导的抗肿瘤免疫效应, 表现为敲除细胞皮下移植瘤生长 ( $F = 0.85, P > 0.05$ ; 图 3F) 和小鼠生存期 ( $P > 0.05$ ; 图 3G) 均较对照细胞差异无统计学意义。这些结果提示 *SQL*E 基因敲除的抗肿瘤效应依赖机体 CD8<sup>+</sup> T 细胞。

**2.4 *SQL*E 基因敲除诱导细胞因子和趋化因子增强抗肿瘤效应** 对细胞因子和趋化因子的响应是免疫细胞迁移浸润 TME 的主要方式, 肿瘤细胞通过控制细胞因子和趋化因子的生成和释放调控 TME 中免疫细胞的种类和数量。使用 Luminex 多因子检测

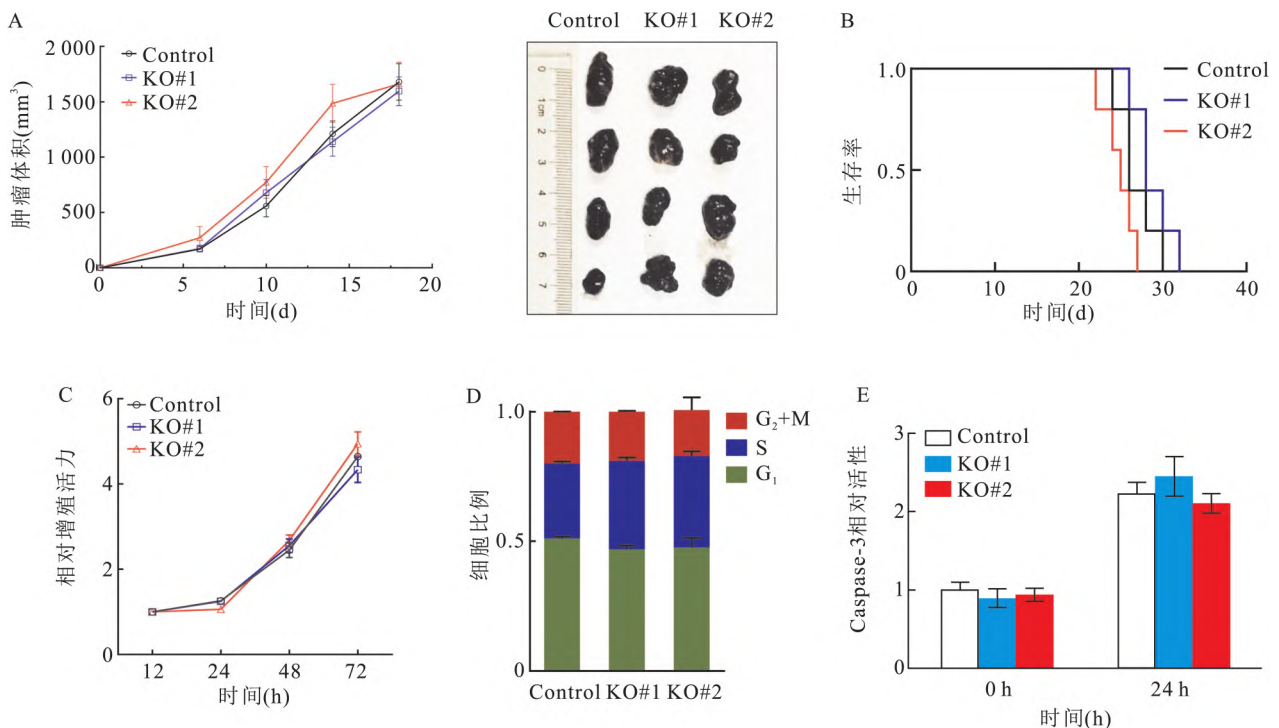


图 2 *SQL*E 基因敲除的抗肿瘤效应依赖机体适应性免疫系统

A: 基因敲除细胞裸鼠皮下移植瘤生长曲线和肿瘤大小; B: 荷瘤裸鼠生存分析; C: *SQL*E 基因敲除对细胞 CCK-8 体外增殖的影响; D: *SQL*E 基因敲除对细胞周期的影响; E: *SQL*E 基因敲除对 Caspase-3 活性的影响

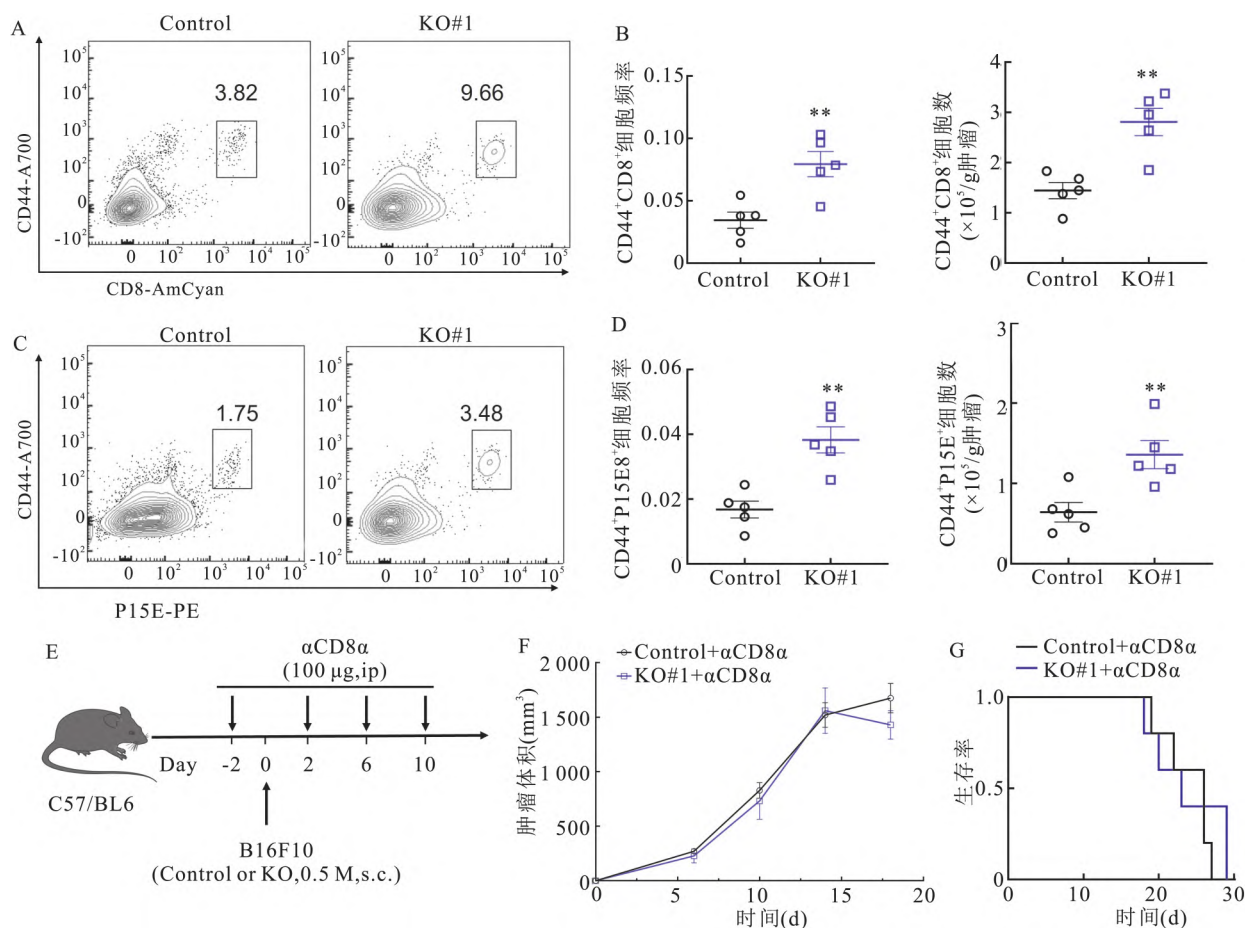


图3 *SQLE* 基因敲除的抗肿瘤效应依赖机体  $CD8^+$  T 细胞

A: 基因敲除细胞和对照细胞 C57/BL6 皮下移植瘤浸润  $CD8^+$  T 细胞的流式细胞分析; B: 肿瘤浸润  $CD8^+$  T 细胞的频率和数量; C: 敲除细胞和对照细胞 C57/BL6 皮下移植瘤浸润 P15E 肿瘤抗原特异性  $CD8^+$  T 细胞的流式细胞分析; D: 肿瘤浸润 P15E 抗原特异性  $CD8^+$  T 细胞的频率和数量; E:  $CD8^+$  T 细胞抗体清除实验设计; F:  $CD8^+$  T 细胞经抗体清除后, 基因敲除细胞和对照细胞 C57/BL6 小鼠皮下移植瘤生长曲线; G:  $CD8^+$  T 细胞经抗体清除后, 荷瘤 C57/BL6 小鼠生存分析; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$

分析肿瘤细胞培养上清中细胞因子水平, 如图 4 A 所示, 两株基因敲除细胞株上清液中 CXCL10、CXCL11、CCL5、CCL22、IL28A 和 IL29 的分泌水平较对照细胞均增高 2 倍以上 ( $F_{CXCL10} = 26.16$ ,  $F_{CXCL11} = 16.59$ ,  $F_{CCL5} = 10.38$ ,  $F_{CCL22} = 9.73$ ,  $F_{IL28A} = 9.38$ ,  $F_{IL29} = 5.16$ ; 均  $P < 0.05$ ) 其中 CXCL10 在两株敲除细胞中分别增高 4.5 倍和 4.4 倍, CXCL11 分别增高 3.1 倍和 4.3 倍, CCR5 受体对应的 CCL5 在两株敲除细胞中分别增高 2.5 倍和 2.4 倍。如图 4B 所示, 使用  $\alpha CXCR3$  抗体阻断 CXCL10、CXCL11 趋化因子配体与其受体 CXCR3 结合, 结果显示敲除细胞 IgG 组肿瘤体积和小鼠生存期较对照细胞 IgG 组降低 (图 4C,  $F = 51.55$ ,  $P < 0.01$ ; 图 4D,  $P < 0.01$ ); CXCR3 阻断抗体处理后, 对照细胞肿瘤体积和小鼠生

存期较对照细胞 IgG 组无显著差异 (图 4C,  $F = 0.24$ ,  $P > 0.05$ ; 图 4D,  $P > 0.05$ ), 而敲除细胞 CXCR3 阻断组肿瘤体积和小鼠生存期较敲除细胞 IgG 组明显逆转 (图 4C,  $F = 12.81$ ,  $P < 0.05$ ; 图 4D,  $P < 0.05$ ), 但与对照细胞 CXCR3 阻断组相比仍有显著差异 (图 4C,  $F = 23.88$ ,  $P < 0.05$ ; 图 4D,  $P < 0.05$ ), 提示 CXCR3 抗体阻断能够部分逆转 *SQLE* 基因敲除诱导的抗肿瘤免疫效应。

2.5 生物信息学分析 *SQLE* 相关基因与免疫细胞浸润和患者预后相关性 基于 TCGA 肿瘤数据库的免疫浸润分析提示黑色素瘤患者中 *SQLE* 表达与  $CD8^+$  T 细胞和 Th1 细胞浸润呈显著负相关 (均  $P < 0.001$ , 图 5 A)。*SQLE* 和  $CD8^+$  T 细胞浸润水平联合分析黑色素瘤患者预后, 结果如图 5B 所示,

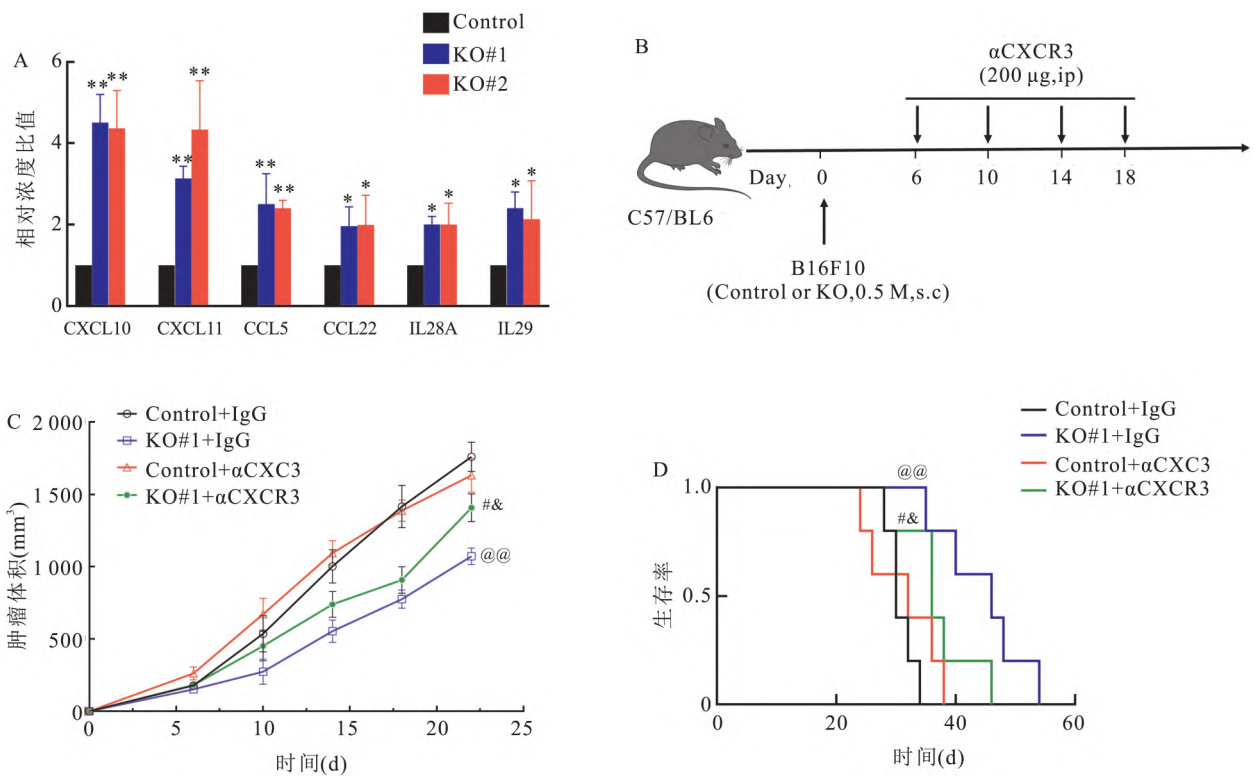


图4 SQLE 基因敲除诱导细胞因子和趋化因子增强抗肿瘤效应

A: Luminex 多因子检测分析两株基因敲除肿瘤细胞培养上清中细胞因子水平; B:  $\alpha$ CXCR3 抗体阻断实验设计示意图; C:  $\alpha$ CXCR3 抗体阻断后, 敲除细胞和对照细胞 C57/BL6 小鼠皮下移植瘤生长曲线; D: 荷瘤 C57/BL6 小鼠生存分析; 与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Control + IgG 组比较: @@  $P < 0.01$ ; 与 KO#1 + IgG 组比较: #  $P < 0.05$ ; 与 Control +  $\alpha$ CXCR3 组比较: &  $P < 0.05$

$SQLE^{low} CD8^{high}$  人群生存预后显著优于  $SQLE^{low} CD8^{low}$  人群 ( $P < 0.05$ ),  $SQLE^{high} CD8^{high}$  人群生存预后显著优于  $SQLE^{high} CD8^{low}$  人群 ( $P < 0.05$ ),  $SQLE^{low} CD8^{high}$  人群生存预后最佳, 提示  $SQLE$  表达与  $CD8^+$  T 细胞浸润可作为黑色素瘤患者预后预测的潜在指标。以  $CXCL10$ 、 $CXCL11$ 、 $CCL5$ 、 $CCL22$ 、 $IL28A$  和  $IL29$  表达作为 6 项细胞因子/趋化因子的基因集合, 分析与  $SQLE$  表达和患者预后的相关性, 结果显示  $SQLE$  表达与基因集合表达呈明显负相关 ( $P < 0.01$ , 图 5C)。以基因集合表达作为分层因素的生存分析表明基因集合表达与黑色素瘤患者总生存期 (OS) 和无病生存期 (DFS) 呈明显正相关 ( $P_{os} < 0.001$ ,  $P_{DFS} < 0.05$ ; 图 5D)。以上结果表明  $SQLE$  及其相关细胞因子/趋化因子表达可作为黑色素瘤免疫细胞浸润和患者预后的预测指标。

### 3 讨论

实体肿瘤细胞是塑造抑制性 TME 的主导因素, 鉴定肿瘤细胞调控 TME 的关键靶点, 解析肿瘤细胞调控 TME 的主要信号通路和作用方式, 不仅能加深

对肿瘤免疫中 TME 重要作用的理解, 更可为寻找将 TME 由“冷”变“热”, 提高免疫治疗响应和疗效的理想靶点提供新的策略<sup>[6-7]</sup>。该研究通过构建  $SQLE$  基因敲除小鼠黑色素瘤细胞系, 利用免疫完全和免疫缺陷小鼠移植瘤模型, 确定  $SQLE$  基因敲除通过非细胞自主性调控方式抑制肿瘤恶性生长进而改善小鼠生存。机制上  $SQLE$  敲除可能诱导肿瘤细胞分泌促炎性细胞因子和趋化因子, 增加 TME 中  $CD8^+$  T 细胞数量从而改善机体抗肿瘤效应。

$SQLE$  是胆固醇合成的关键限速酶, 早期研究关注到多种肿瘤中存在其编码基因与 MYC 共扩增的现象, 因而被定义为保守的原癌基因之一<sup>[8]</sup>。后续研究表明  $SQLE$  高表达与包括乳腺癌、结直肠癌、肝癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展相关, 其作用方式多为自主性调控细胞增殖、凋亡、侵袭转移和分化等恶性表型, 也有报道其通过非自主调控方式, 由代谢物或肠道菌群调控肿瘤重要进程<sup>[3-5]</sup>。通过分别接种免疫完好和免疫缺陷小鼠,  $CD8^+$  T 细胞清除实验以及体外实验, 证实  $SQLE$  敲除依赖宿主适应性免疫系统改善机体抗肿瘤效应, 提示其通过非自主

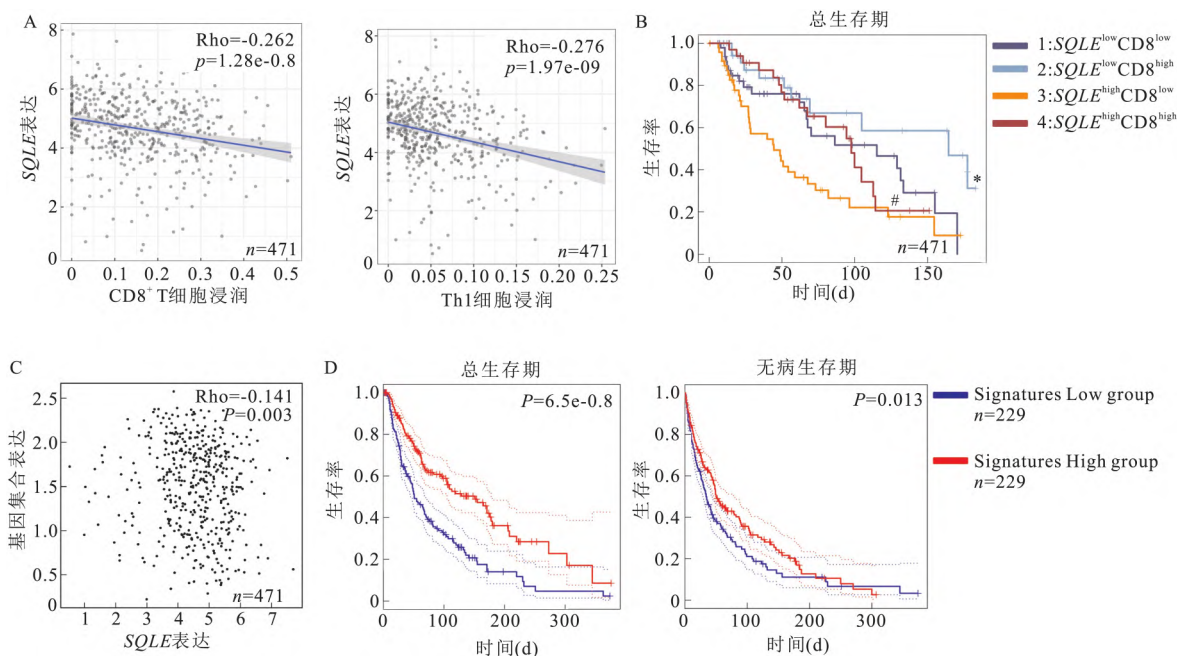


图5 生物信息学分析 *SQLE* 相关基因与免疫细胞浸润和患者预后相关性

A: 黑色素瘤患者 *SQLE* 表达与肿瘤微环境  $CD8^+$  T 细胞和  $Th1$   $CD4^+$  T 细胞浸润相关性; B: *SQLE* 和  $CD8^+$  T 细胞浸润水平与黑色素瘤患者预后相关性; C: 黑色素瘤患者 *SQLE* 表达与 *CXCL10*、*CXCL11*、*CCL5*、*CCL22*、*IL28A*、*IL29* 组成的基因集合表达的相关性分析; D: 基因集合表达与黑色素瘤患者预后相关性; 与  $SQLE^{low} CD8^{low}$  患者组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与  $SQLE^{high} CD8^{low}$  患者组比较: #  $P < 0.05$

调控方式参与黑色素瘤恶性表型。泛癌研究中发现尽管黑色素瘤中存在 *SQLE* 拷贝数扩增,但黑色素瘤总体 *SQLE* 表达与非癌组织无明显差异,提示黑色素瘤恶性表型维持可能不需要高水平 *SQLE*,部分解释体外实验中 B16F10 敲除 *SQLE* 不影响其恶性表型维持的现象<sup>[9]</sup>。流式细胞结合多因子检测发现 *SQLE* 敲除细胞促炎性细胞因子和趋化因子分泌增多,肿瘤浸润的抗原特异性  $CD8^+$  T 细胞增多,提示 *SQLE* 可能在黑色素瘤控制信号物质分泌,塑造抑制性 TME 的功能中扮演重要角色。促炎性趋化因子 *CXCL10*、*CXCL11* 等是招募  $CD8^+$  T 细胞进入肿瘤微环境的重要因素,基因敲除 *SQLE* 可能通过解除对 *CXCL10*、*CXCL11* 和 *CCL5* 等促炎信号物质的控制,招募  $CD8^+$  T 细胞和  $Th1$  细胞等效应性免疫细胞浸润进而发挥抗肿瘤作用。调节性免疫细胞,如 Treg 细胞,也可响应相关的趋化因子进入肿瘤,发挥抑制性作用<sup>[10-11]</sup>。而本研究中基因敲除细胞移植瘤中  $CD8^+$  T 细胞浸润增加,而  $CD4^+$  T 细胞和 Treg 无明显变化,提示 *SQLE* 敲除可能诱导其他机制调控抑制性免疫细胞响应细胞因子/趋化因子,从而维持 TME 中 Treg 数量平衡。目前尚无 *SQLE* 直接调控肿瘤细胞细胞因子/趋化因子产生和释放

的实验研究,既往研究中 *SQLE* 可通过蛋白相互作用影响靶蛋白稳定性,或因其在胆固醇代谢中进而影响脂质代谢及其下游信号通路发挥功能<sup>[5, 12]</sup>。*SQLE* 如何调控细胞因子和趋化因子的产生和分泌,尚需进一步深入研究。

基于 TCGA 的分析证实黑色素瘤患者 *SQLE* 表达与免疫浸润和细胞因子/趋化因子表达显著相关,以 *SQLE*、 $CD8^+$  T 细胞及其相关信号物质蛋白作为预测因素与黑色素瘤患者临床预后具有显著相关性,提示 *SQLE* 可作为靶向 TME,改善免疫细胞浸润和患者预后的潜在靶点。*SQLE* 抑制剂,包括 NB-598 和 FDA 批准药物特比奈芬,已被证实对 *SQLE* 高表达肿瘤具有生长抑制效应,这些药物能否通过抑制 *SQLE* 靶向免疫浸润和重塑 TME 发挥抗肿瘤作用,或联合免疫检查点抑制剂提高其治疗反应和疗效,具有重要的临床转化潜力<sup>[13-14]</sup>。

综上所述, *SQLE* 通过细胞因子和趋化因子调控肿瘤微环境参与机体抗肿瘤效应,有望成为新的肿瘤免疫药物靶点和疗效预测分子指标。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Bejarano L , Jordao M J C , Joyce J A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment [J]. *Cancer Discov* , 2021 ,11( 4) : 933 – 59.
- [3] Zou Y , Zhang H , Bi F , et al. Targeting the key cholesterol biosynthesis enzyme squalene monooxygenase for cancer therapy [J]. *Front Oncol* , 2022 ,12: 938502.
- [4] Li C , Wang Y , Liu D , et al. Squalene epoxidase drives cancer cell proliferation and promotes gut dysbiosis to accelerate colorectal carcinogenesis [J]. *Gut* , 2022 ,71( 11) : 2253 – 65.
- [5] Mahoney C E , Pirman D , Chubukov V , et al. A chemical biology screen identifies a vulnerability of neuroendocrine cancer cells to *SQLE* inhibition [J]. *Nat Commun* , 2019 ,10( 1) : 96.
- [6] Mellman I , Chen D S , Powles T , et al. The cancer-immunity cycle: indication , genotype , and immunotype [J]. *Immunity* , 2023 ,56( 10) : 2188 – 205.
- [7] Giraldo N A , Sanchez-Salas R , Peske J D , et al. The clinical role of the TME in solid cancer [J]. *Br J Cancer* , 2019 ,120( 1) : 45 – 53.
- [8] Brown D N , Caffa I , Cirmena G , et al. Squalene epoxidase is a bona fide oncogene by amplification with clinical relevance in breast cancer [J]. *Sci Rep* , 2016 ,6: 19435.
- [9] Wu J , Hu W , Yang W , et al. Knockdown of *SQLE* promotes CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in the tumor microenvironment [J]. *Cell Signal* , 2024 ,114: 110983.
- [10] Plitas G , Rudensky A Y. Regulatory T cells in cancer [J]. *Annu Rev Cancer Biol* , 2020 ,4: 459 – 77.
- [11] Lunardi S , Lim S Y , Muschel R J , et al. IP-10/CXCL10 attracts regulatory T cells: implication for pancreatic cancer [J]. *Oncoimmunology* , 2015 ,4( 9) : e1027473.
- [12] Jun S Y , Brown A J , Chua N K , et al. Reduction of squalene epoxidase by cholesterol accumulation accelerates colorectal cancer progression and metastasis [J]. *Gastroenterology* , 2021 ,160( 4) : 1194 – 1207. e28.
- [13] Tuluhong D , Gao H , Li X , et al. Squalene epoxidase promotes breast cancer progression by regulating CCNB1 protein stability [J]. *Exp Cell Res* , 2023 ,433( 1) : 113805.
- [14] Xu R , Song J , Ruze R , et al. *SQLE* promotes pancreatic cancer growth by attenuating ER stress and activating lipid rafts-regulated Src/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Death Dis* , 2023 ,14( 8) : 497.

## Knockout *SQLE* in melanoma cells potentiates anti-tumor immunity via improving CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in tumor microenvironment

Ding Yao<sup>1</sup> , Liu Wen<sup>2</sup> , Liao Yiran<sup>1</sup> , Lei Shun<sup>3</sup> , Zhang Yan<sup>2</sup> , Chen Yezi<sup>2</sup> , Gong Yi<sup>1</sup> , Huang Qizhao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Phase I Clinical Trial Ward , Chongqing University Cancer Hospital , Chongqing 400030;

<sup>2</sup>Institute of Immunological Innovation and Translation , Chongqing Medical University , Chongqing 400016;

<sup>3</sup>Institute of Immunology , Third Military Medical University , Chongqing 400038)

**Abstract Objective** To investigate the role of squalene epoxidase (*SQLE*) knockout in anti-tumor effect via improving CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in melanoma tumor microenvironment. **Methods** Both immunodeficient and immunocompetent mice were inoculated with *SQLE* knockout B16F10 cells to determine the cell-autonomous and non-autonomous regulation of malignancy. Antibody blockade , Luminex multiplex assays , and flow cytometry were employed to explore the impact of *SQLE* gene knockout on the secretion of cytokines/chemokines and immune cell infiltration. Bioinformatics analysis was conducted to validate the correlation between *SQLE* expression and immune infiltration as well as clinical prognosis in melanoma patients. **Results** Compared with immunodeficient mice , *SQLE* knockout significantly inhibited melanoma proliferation in immunocompetent mice and prolonged their survival. *SQLE* knockout induced the secretion of cytokines and chemokines from tumor cells , improved CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in the tumor microenvironment , thereby potentiating anti-tumor immunity. Bioinformatics analysis suggested a significant correlation between *SQLE* and its corresponding immune infiltration markers with the prognosis of melanoma patients. **Conclusion** *SQLE* regulates anti-tumor immunity by controlling cytokines and chemokines releasing in tumor microenvironment , thus holding promise as a novel tumor immunotherapy target and efficacy prediction molecular indicator.

**Key words** squalene epoxidase; melanoma; tumor microenvironment; tumor immunity