

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.003

阻断 DKK1 通过促进 CD4⁺ T 细胞 Th1 型极化改善抗肿瘤免疫应答

周啸宇¹, 施涛², 张翼鹏², 宋雪如², 罗钰婷², 魏嘉^{1,2} (1. 南京中医药大学鼓楼临床医学院 南京鼓楼医院 肿瘤科, 江苏 南京 210000; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤科, 江苏 南京 210000)

[摘要] **目的:** 探讨恶性肿瘤中 Dickkopf-1 (DKK1) 表达对 CD4⁺ T 细胞极化的影响及其作为肿瘤免疫治疗靶点的潜在价值。**方法:** 利用生物信息学方法分析 DKK1 在多种类型肿瘤组织和癌旁组织中的表达水平, 分析 DKK1 表达与肿瘤患者预后及肿瘤微环境免疫浸润间的相关性。利用流式细胞术检测 DKK1 蛋白对 CD4⁺ T 细胞表型变化的影响。构建黑色素瘤 B16F10 细胞小鼠皮下移植瘤模型, 观察阻断 DKK1 对小鼠移植瘤生长和移植瘤组织中免疫细胞浸润与表型的影响。**结果:** DKK1 mRNA 表达水平在多种肿瘤组织中显著高于癌旁组织, DKK1 高表达与多数肿瘤患者的不良预后相关且在多数肿瘤中 DKK1 对 CD4⁺ T 细胞抗肿瘤免疫应答功能有重要负性调节作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。流式细胞术检测结果显示, DKK1 蛋白刺激可显著降低 CD4⁺ T 细胞中 T-bet、IFN- γ 及 CD107a 表达水平 (均 $P < 0.01$)。在小鼠皮下黑色素瘤模型中发现, 阻断 DKK1 可以显著抑制小鼠移植瘤的生长 ($P < 0.01$), 有效改善抗肿瘤免疫应答, 表现为 Th1 细胞 (T-bet⁺ CD4⁺) 占比显著升高 ($P < 0.001$), 效应性 CD8⁺ T 细胞 (CD44⁺ CD62L⁻) 占比显著升高 ($P < 0.01$), Th2 细胞 (GATA3⁺ CD4⁺) 与 Treg 细胞占比显著下降 (均 $P < 0.01$)。**结论:** 阻断 DKK1 可有效促进 CD4⁺ T 细胞向 Th1 型极化, DKK1 具有作为肿瘤免疫治疗靶点的潜在价值。

[关键词] DKK1; CD4⁺ T 细胞; Th1 极化; 肿瘤微环境; 免疫治疗

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)07-0662-07

DKK1 blockade improves anti-tumor immune response by promoting Th1 type polarization of CD4⁺ T cells

ZHOU Xiaoyu¹, SHI Tao², ZHANG Yipeng², SONG Xueru², LUO Yuting², WEI Jia^{1,2} (1. Department of Oncology, Nanjing Drum Tower Hospital, Drum Tower Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, Jiangsu, China; 2. Department of Oncology, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Dickkopf-1 (DKK1) expression on CD4⁺ T cell polarization in malignant tumors and its potential value as a target for cancer immunotherapy. **Methods:** Bioinformatics algorithm was used to analyze the expression of DKK1 in multiple types of tumor tissues and adjacent tissues, and the correlation between the expression of DKK1 and the prognosis of cancer patients and immune infiltration of tumor microenvironment. The effect of DKK1 protein on the phenotype of CD4⁺ T cells was analyzed by flow cytometry *in vitro*. A melanoma B16F10 cell mouse subcutaneous transplantation tumor model was established to observe the effects of blocking DKK1 on the growth of mouse transplantation tumor and immune cell infiltration and phenotype in transplantation tumor tissues. **Results:** The mRNA expression levels of DKK1 in many kinds of tumor tissues were significantly higher than those in adjacent tissues. High expression of DKK1 was related to the poor prognosis of most tumor patients. In most types of tumors DKK1 played important negative regulatory role in CD4⁺ T cell anti-tumor immune response ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of flow cytometry *in vitro* showed that DKK1 protein stimulation significantly decreased the expression levels of T-bet, IFN- γ and CD107a in CD4⁺ T cells (all $P < 0.01$). In the mouse subcutaneous melanoma model, it was found that blocking DKK1 could significantly inhibit the growth of transplanted tumors ($P < 0.01$) and effectively improve the anti-tumor immune responses including the proportion of Th1 cells (T-bet⁺ CD4⁺) increasing significantly ($P < 0.001$), the proportion of effector CD8⁺ T cells (CD44⁺ CD62L⁻) increasing significantly ($P < 0.01$), and the proportion of Th2 cells (GATA3⁺ CD4⁺) and Treg cells decreasing significantly (both $P < 0.01$). **Conclusion:** Blocking DKK1 can effectively promote the phenotypic polarization of CD4⁺ T cells to Th1. DKK1 has potential value as a target for tumor immunotherapy.

[Key words] Dickkopf-1 (DKK1); CD4⁺ T cell; Th1 polarization; tumor microenvironment; immunotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(7): 662-668. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.003]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (No. 82373263); 江苏省科技计划专项资金 (基础研究计划自然科学基金) 青年基金项目 (No. BK20230151)

[作者简介] 周啸宇 (1998—), 男, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫微环境研究。E-mail: zxy18020259364@163.com

[通信作者] 魏嘉, E-mail: jiawei99@nju.edu.cn

近年来,以免疫检查点阻断疗法为代表的肿瘤免疫疗法在临床上取得了许多令人振奋的效果,但也面临着许多挑战,如大多数患者不能产生理想的免疫应答,一些患者在初始治疗后对治疗产生耐药性等^[1]。随着对肿瘤免疫疗法的不断探索,人们逐渐发现CD8⁺T细胞的单一效应功能难以介导有效的抗肿瘤免疫应答,唯有同时激活CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞才能使肿瘤患者从现有免疫疗法中获益^[2],表明辅助性CD4⁺T细胞在抗肿瘤免疫中也发挥着至关重要的作用。最初研究^[3]认为,Dickkopf-1(DKK1)是WNT/ β -catenin通路的拮抗剂,其作为分泌型蛋白在生理状态下可由多种细胞分泌、释放进而参与胚胎生长发育过程的调节。近年来多项研究表明,DKK1在多种类型肿瘤中的表达水平相较正常组织显著升高,同时与较差的临床预后显著相关^[4-5];DKK1在炎症模型中促进CD4⁺T细胞向Th2型极化并抑制CD4⁺T细胞向Th1型极化^[6]。本研究通过阻断DKK1对肿瘤微环境中CD4⁺T细胞的影响,旨在探索DKK1对CD4⁺T细胞抗肿瘤免疫应答功能的调节机制,进一步加深对DKK1在肿瘤微环境中关键性影响的认知,从而评估与其他肿瘤免疫疗法联合应用的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 生物信息学方法分析DKK1在各种类型肿瘤中的表达及其与患者预后和免疫细胞浸润水平的关系

利用TCGA与GTEx数据库中数据分析泛癌组织及癌旁组织中DKK1 mRNA表达差异,利用基因表达谱交互分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)分析各种类型肿瘤中DKK1表达水平与患者总生存期(OS)和无病生存期(DFS)的相关性,利用肿瘤免疫浸润评估(Tumor Immune Estimation Resource, TIMER)(<https://cistrome.shinyapps.io/timer/>)和TIMER2.0(<http://timer.comp-genomics.org/>)在线分析不同免疫细胞浸润水平与多发性肿瘤中DKK1基因表达之间的潜在关系。

1.2 细胞、实验动物及主要试剂

实验所用鼠源黑色素瘤细胞B16F10由南京大学临床肿瘤研究所常规冻存。6~8周龄、体质量20~25 g的SPF级C57BL/6、BALB/c雌性小鼠(No. 202218743)购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,动物饲养于本中心SPF级屏障系统内[实验动物许可证号:SYXK(苏)2019-0059],温度维持在20~26℃,湿度维持在50%~80%,小鼠自由采食和饮水,昼夜进行12 h光照/黑暗交替并每天观察状态。实验动物使用和操作严格遵循南京大学医学院附属鼓楼医院动物实验

管理委员会相关规定,已通过动物福利伦理审查(伦理审批号:2020AE01064)。

RPMI 1640培养基购自美国Corning公司,胎牛血清、双抗(青霉素/链霉素)均购自美国Gibco公司,IV型胶原酶购自美国Sigma公司,红细胞裂解液购自中国索莱宝公司,Mouse CD4⁺T Cell Isolation Kit购自德国Miltenyi Biotec公司,DKK1一抗由美国Abcam公司提供,Anti-mouse-CD3-FITC、Anti-mouse-CD8-APC、Anti-mouse-CD44-PE、Anti-mouse-CD62L-PC5.5、Anti-mouse-CD4-APC、Anti-mouse-CD4-Percp/Cy5.5、Anti-mouse-Foxp3-AF647、Anti-mouse-Tbet-PE、Anti-mouse-GATA3-PC5.5、Anti-mouse-Foxp3-AF647流式抗体均购自美国BioLegend公司,InVivoMAbanti-mouseCD3、InVivoMAbanti-mouseCD28均购自美国BioXcell公司。

1.3 细胞培养

黑色素瘤细胞B16F10为贴壁细胞,培养于含有10%胎牛血清、1%青链霉素双抗溶液的RPMI 1640培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.4 体外CD4⁺T细胞分选与培养

将BALB/c小鼠处死后,在75%乙醇溶液中固定10 min,于超净台中分离小鼠脾并用70 μ m细胞滤器轻柔研磨,随即用生理盐水冲洗,收集研磨后液体并以300 $\times$ g离心5 min,弃上清液后加入4 mL红细胞裂解液重悬,室温裂解4 min后加入5倍体积的生理盐水终止细胞裂解,以300 $\times$ g离心5 min,弃上清液后用生理盐水重悬小鼠脾细胞,置入4℃冰箱预冷备用。再通过使用Mouse CD4⁺T Cell Isolation Kit磁珠分选出CD4⁺T细胞,流式细胞仪检测分选纯度,若超过90%,提示分选成功。将上述分选后CD4⁺T细胞置入含50 ng/mL的IL-2的完全培养基中培养,使细胞悬液终密度为1 $\times$ 10⁶个/mL,以每孔1 mL加入96孔板中。

1.5 流式细胞术检测DKK1蛋白对CD4⁺T细胞表型变化的影响

将CD4⁺T细胞分为四组:第一组为对照组,第二组加入DKK1蛋白(100 ng/mL),第三组加入anti-CD3(2 μ g/mL)和anti-CD28(2 μ g/mL),第四组加入DKK1蛋白(100 ng/mL)、anti-CD3(2 μ g/mL)和anti-CD28(2 μ g/mL),置于37℃细胞培养箱中培养4 d。将细胞转移至1.5 mL离心管中,500 $\times$ g离心5 min,去上清液,每管用200 μ L PBS重悬细胞,加入IFN- γ 、CD107a流式抗体各2 μ L,4℃避光反应30 min,清洗后每管加入250 μ L固定/破膜液,4℃下处理20 min,清洗后取适量细胞因子流式抗体(Tbet),用洗涤缓冲液稀释至50 μ L,重悬细胞,4℃避光作用30 min;清洗后用100 μ L染色缓冲液重悬细胞后,上流式细胞仪检测CD4⁺T细胞表型及功能变化。

1.6 小鼠皮下黑色素瘤模型的建立、DKK1单抗治疗及疗效观察

选取C57BL/6雌鼠以建立黑色素瘤模型。将12只C57BL/6小鼠以随机表法分为两组,分别为DKK1抗体组和对照组,每组各6只并加上耳标。在左侧腹股沟皮下注射B16F10细胞(1×10^5 个/只)。

DKK1抗体在小鼠皮下黑色素瘤模型的抗肿瘤效果评价:肿瘤当天记为Day0(D0)。在第1天(D1),向DKK1抗体组小鼠腹腔注射200 μ L的10 mg/kg DKK1单克隆中和性抗体(mDKN-01),对照组注射同体积的生理盐水,前2次每3 d给药1次,后2次每2 d给药1次,共4次。从治疗开始,每2~3 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),皮下移植瘤体积按照如下公式计算:瘤体积= $a \times b^2/2$,同时每3 d称量小鼠体重,观察小鼠的饮食、活动等情况。

1.7 流式细胞术检测小鼠移植瘤组织中免疫细胞的浸润水平与表型

第13天通过颈椎脱臼法处死小鼠,取皮下移植瘤组织,将肿瘤组织剪碎,置于6孔板中,每孔加含1 mg/mL的IV型胶原酶、2 mL DNA酶(100 U/mL)的RPMI 1640培养基,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中消化2 h后,应用70 μ m滤器研磨过滤,再加入适量红细胞裂解液裂解细胞,最终获得单细胞沉淀。加入流式抗体染色后用100 mL PBS重悬细胞,上流式细胞仪检测,应用Flowjo软件分析CD4⁺T细胞(CD3、CD4、T-bet、GATA-3)、CD8⁺T细胞(CD3、CD8、CD44、CD62L)和Treg细胞(CD3、CD4、foxp3、CD25)浸润水平及表型。

1.8 统计学处理

采用SPSS软件(v25.0)和GraphPad Prism软件(v9.0)对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。连续变量组间对比采用非配对双尾t检验;两组以上数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)、双因素方差分析(Two-way ANOVA)和Tukey检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DKK1 mRNA在多种肿瘤中的表达水平

基于TCGA和GTEx数据库分析了34种肿瘤组织和癌旁组织中DKK1 mRNA的表达差异,结果(图1)显示,与癌旁组织相比,在多形性胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)、肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)、食管癌(esophageal carcinoma, ESCA)、胃和食管癌(stomach and esophageal carcinoma,

STES)、胃腺癌(stomach adenocarcinoma, STAD)、头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSC)、肾透明细胞癌(kidney renal clear cell carcinoma, KIRC)、肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC)、肝细胞肝癌(liver hepatocellular carcinoma, LIHC)、肾母细胞瘤(Wilms tumor, WT)、胰腺癌(pancreatic adenocarcinoma, PAAD)、子宫肉瘤(uterine carcinosarcoma, UCS)、急性淋巴细胞白血病(acute lymphocyte leukemia, ALL)、胆管癌(cholangiocarcinoma, CHOL)组织中DKK1 mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),在低级别脑胶质瘤(brain lower grade glioma, LGG)、乳腺浸润癌(breast invasive carcinoma, BRCA)、肾乳头状细胞癌(kidney renal papillary cell carcinoma, KIRP)、混合肾癌[pan-kidney cohort (KICH+KIRC+KIRP), KIPAN]、前列腺癌(prostate adenocarcinoma, PRAD)、皮肤黑色素瘤(skin cutaneous melanoma, SKCM)、膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BLCA)、甲状腺癌(thyroid carcinoma, THCA)、卵巢浆液性囊腺癌(ovarian serous cystadenocarcinoma, OV)、急性髓细胞样白血病(acute myeloid leukemia, LAML)、肾嫌色细胞癌(kidney chromophobe, KICH)组织中DKK1 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),在胶质细胞瘤(glioma, GBMLGG)、子宫内膜癌(uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC)、宫颈鳞癌和腺癌(cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma, CESC)、结肠腺癌(colon adenocarcinoma, COAD)、结直肠癌(colorectal cancer, CRC)、直肠腺癌(rectum adenocarcinoma, READ)、睾丸生殖细胞瘤(testicular germ cell tumor, TGCT)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(pheochromocytoma and paraganglioma, PCPG)、肾上腺皮质癌(adrenocortical carcinoma, ACC)组织中DKK1 mRNA无显著差异。

2.2 DKK1高表达与多数肿瘤患者的预后不良相关

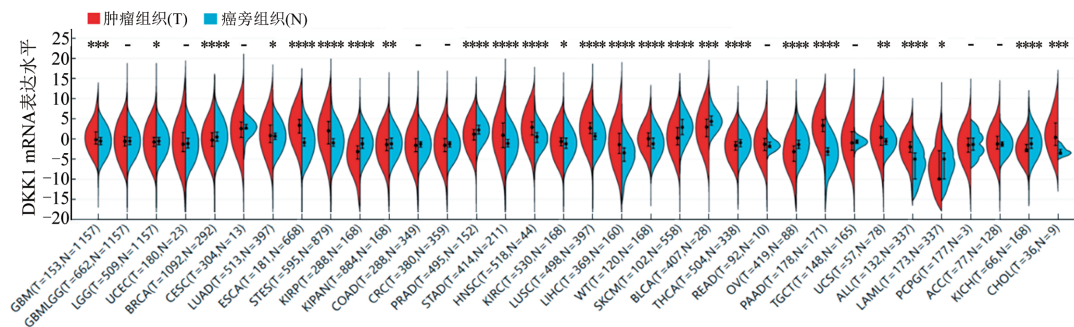
通过DKK1的表达水平将肿瘤病例分为DKK1高表达组和DKK1低表达组,利用GEPIA2网站分析DKK1表达水平与各类型肿瘤患者OS、DFS之间的相关性(图2)。OS分析结果显示,DKK1高表达与HNSC、STAD、PAAD、LUAD预后不良相关(均 $P < 0.01$)。DFS分析结果显示,DKK1高表达与HNSC、STAD、PAAD、LUAD预后不良相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上数据提示,DKK1高表达与多数肿瘤患者的预后不良相关,表明DKK1可以作为多个实体瘤的预后标志物。

2.3 DKK1高表达与负性肿瘤免疫微环境相关

利用TIMER和TIMER2.0在线分析网站探讨不同免疫细胞浸润水平与多发性肿瘤中DKK1基因表

达之间的潜在关系,结果表明,在多数肿瘤中DKK1表达水平与6种抗肿瘤免疫细胞(B细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和DC)浸润程度呈正相关(图3A)。值得注意的是,进一步分析肿瘤组织中DKK1表达与CD4⁺ T细胞表型的相关性

发现,DKK1表达在多数肿瘤中与Th1型CD4⁺ T细胞肿瘤浸润比例负相关,而与Th2型CD4⁺ T细胞的肿瘤浸润比例正相关(图3B)。以上结果表明,在多数肿瘤中DKK1对于CD4⁺ T细胞抗肿瘤免疫应答功能的有重要负性调节作用。



与癌旁组织比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图1 用TCGA+GETx数据库分析DKK1 mRNA在泛癌非配对组织中的表达水平

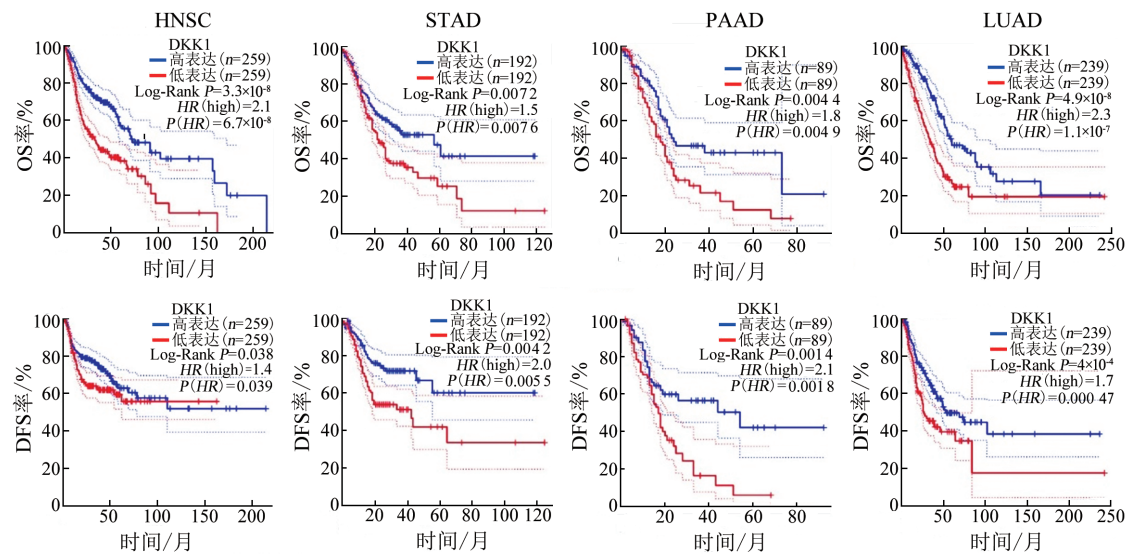


图2 TCGA数据库中DKK1 mRNA表达水平与肿瘤患者OS和DFS的相关性分析

2.4 DKK1抑制CD4⁺ T细胞Th1表型极化

流式细胞术检测结果(图4)发现,加入DKK1蛋白后,与对照组相比,实验组CD4⁺ T细胞中T-bet、IFN- γ 和CD107a的表达显著减少(均 $P<0.01$)。结果表明,DKK1可以减少Th1型CD4⁺ T细胞的产生,减弱CD4⁺ T细胞的功能和细胞毒性,DKK1能够负向调节CD4⁺ T细胞的抗肿瘤免疫应答功能。

2.5 阻断DKK1能够在小鼠皮下黑色素瘤模型中中介导抗肿瘤效果

黑色素瘤小鼠模型实验结果(图5)显示,与对照组相比,DKK1抗体组小鼠的肿瘤体积和质量均显著下降(均 $P<0.01$)。结果表明,腹腔注射DKK1抗体有明显的抑瘤作用,阻断DKK1能够介导

抗肿瘤效果。

2.6 阻断DKK1能够在小鼠皮下黑色素瘤模型中改善肿瘤免疫微环境

流式细胞术检测结果(图6)显示,阻断DKK1后,与对照组相比,DKK1抗体组CD8⁺ T细胞中CD44⁺ CD62L⁺表达显著升高($P<0.01$),CD4⁺ T细胞中T-bet表达显著升高($P<0.001$)、GATA-3和Foxp3⁺ CD25⁺的表达显著降低(均 $P<0.01$)。结果表明,阻断DKK1能够改善肿瘤免疫微环境,促进CD4⁺ T细胞由促肿瘤的Th2型向抗肿瘤的Th1型转变,增强CD8⁺ T细胞的抗肿瘤效应以及减弱Treg细胞的促肿瘤作用。由此可见,DKK1可以作为恶性肿瘤的免疫治疗潜在新靶点。



图3 DKK1表达水平与免疫细胞和CD4⁺ T细胞浸润表型的关系

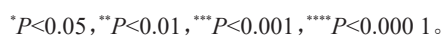
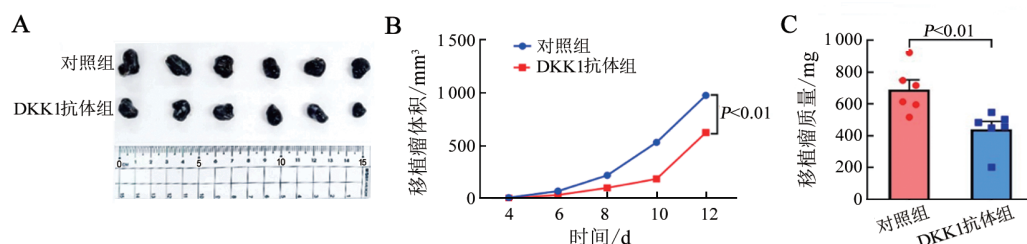


图4 DKK1蛋白诱导CD4⁺ T细胞表型向Th1型转变

3 讨论

近年来发现, DKK1在各种类型肿瘤中介导肿瘤患者不良临床预后并抑制肿瘤患者对免疫治疗的应答能力^[7]。据报道, DKK1可通过下调NK细胞功能、增强髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)活性和诱导M2型巨噬细胞的活化等途径抑制抗肿瘤免疫反应^[8-9]、促进肿瘤生长与转移等。

然而, DKK1在肿瘤微环境中对CD4⁺ T细胞的影响及其机制尚不清楚。本研究结果发现, DKK1蛋白在体外可以显著抑制CD4⁺ T细胞向Th1表型极化, 从而阻碍其抗肿瘤免疫应答功能。因此, 本研究揭示了DKK1对CD4⁺ T细胞抗肿瘤免疫应答功能的重要负性调节作用, 从而进一步加深了对DKK1在肿瘤微环境中关键性影响的认知。



A: 第13天处死小鼠, 分离移植瘤进行分析; B: 小鼠皮下黑色素瘤模型的移植瘤体积; C: 小鼠皮下黑色素瘤模型的移植瘤质量。

图5 阻断DKK1在小鼠皮下黑色素瘤模型中抗肿瘤效应评估

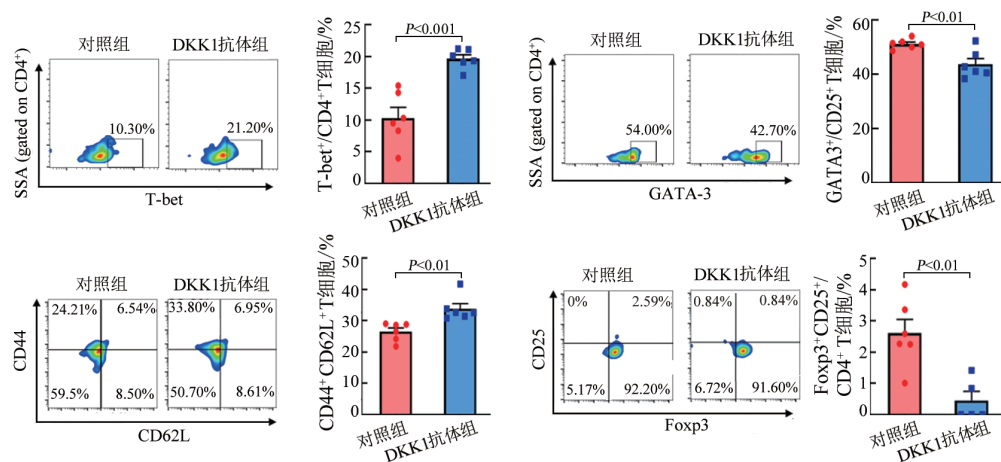


图6 阻断DKK1对黑色素瘤皮下移植瘤模型终点时T细胞的影响

虽然目前大多数临床应用的肿瘤免疫疗法依赖于CD8⁺ T细胞直接识别和杀伤肿瘤细胞的能力^[10-11], 但是这些策略会受到免疫抑制肿瘤微环境形成的限制^[12]。研究^[13-14]表明, 在肿瘤免疫中, CD4⁺ T细胞一般扮演着CD8⁺ T细胞溶解肿瘤细胞的助手和调节器的角色, CD4⁺ T细胞也有独立于CD8⁺ T细胞参与抗肿瘤免疫的能力, 在抗肿瘤免疫中发挥着重要作用。在肿瘤医学领域, “冷”肿瘤是治疗中一个巨大的障碍, 因为其缺乏免疫渗透, 免疫应答率不高^[15]。在本研究中, 通过B16F10细胞构建“冷”肿瘤模型^[16], 发现阻断DKK1可以改善黑色素瘤免疫微环境, 促进Th2型CD4⁺ T细胞向Th1型转变, 且增强CD8⁺ T细胞的抗肿瘤效应及减弱Treg细胞的促肿瘤作用, 从而促进肿瘤免疫。由此可见, DKK1可作为肿瘤免疫治疗

的潜在新靶点, 并且通过阻断DKK1恢复CD4⁺ T细胞的Th1型极化具有与其他肿瘤免疫疗法联合应用的潜在价值。

现阶段阻断DKK1和程序性死亡受体-1(PD-1)抗体联合应用于进展期胃食管腺癌患者治疗的I/II期临床试验(NCT04363801)正在开展, 其前期结果提示DKK1高表达患者的平均ORR达到90%^[17]。因此, 本研究的体内评估结果为这一临床试验的开展提供了有力的临床前证据支持。值得注意的是, CD4⁺ T细胞亚群对表达MHC II分子的肿瘤细胞具有杀伤效应功能^[14]。治疗性MHC II类疫苗可以诱导强烈的肿瘤特异性CD4⁺ T细胞反应, 促进CD4⁺和CD8⁺ T细胞在肿瘤局部浸润, 且已经有报道, MHC II类新抗原疫苗联合IL-2/CD25融合蛋白在

B16F10 荷瘤小鼠模型中的治愈率为41%^[18],这一研究证实MHC II类疫苗虽然具有治疗优势,但仍需要进一步探索恰当的联合策略,从而进一步提高治疗效果,而DKK1可能是潜在的联合治疗靶点之一。

综上所述,CD4⁺ T细胞是研究抗肿瘤免疫和潜在靶点的重要细胞,阻断DKK1可以促进CD4⁺ T细胞由Th2型向Th1型转变,从而增强CD4⁺ T细胞的抗肿瘤效果,但阻断DKK1促进CD4⁺ T细胞向Th1型极化的作用机制尚不清楚,还需要开展相关实验研究进一步探索。本研究后续将进一步验证阻断DKK1与MHC II类肽联用在小鼠肿瘤模型中的治疗效果。

【参 考 文 献】

- [1] MORAD G, HELMINK B A, SHARMA P, *et al.* Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade[J]. *Cell*, 2021, 184(21): 5309-5337. DOI: 10.1016/j.cell.2021.09.020.
- [2] ZANDER R, SCHAUDER D, XIN G, *et al.* CD4⁺ T cell help is required for the formation of a cytolytic CD8⁺ T cell subset that protects against chronic infection and cancer[J]. *Immunity*, 2019, 51(6): 1028-1042.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.10.009.
- [3] GLINKA A, WU W, DELIUS H, *et al.* Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction[J]. *Nature*, 1998, 391(6665): 357-362. DOI: 10.1038/34848.
- [4] KIKUCHI A, FUMOTO K, KIMURA H. The Dickkopf1-cytoskeleton-associated protein 4 axis creates a novel signalling pathway and may represent a molecular target for cancer therapy[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(24): 4651-4665. DOI: 10.1111/bph.13863.
- [5] KASOHA M, STEINBACH A K, BOHLE R M, *et al.* Dkk1 as a prognostic marker for neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer patients[J/OL]. *Cancers*, 2024, 16(2): 419[2024-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10814026/>. DOI: 10.3390/cancers16020419.
- [6] CHAE W J, EHRLICH A K, CHAN P Y, *et al.* The Wnt antagonist dickkopf-1 promotes pathological type 2 cell-mediated inflammation [J]. *Immunity*, 2016, 44(2): 246-258. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.01.008.
- [7] KAGEY M H, HE X. Rationale for targeting the Wnt signalling modulator Dickkopf-1 for oncology[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(24): 4637-4650. DOI: 10.1111/bph.13894.
- [8] D'AMICO L, MAHAJAN S, CAPIETTO A H, *et al.* Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) regulates the accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in cancer[J]. *J Exp Med*, 2016, 213(5): 827-840. DOI: 10.1084/jem.20150950.
- [9] SHI T, ZHANG Y, WANG Y, *et al.* DKK1 promotes tumor immune evasion and impedes anti-PD-1 treatment by inducing immunosuppressive macrophages in gastric cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2022, 10(12): 1506-1524. DOI: 10.1158/2326-6066.
- [10] TUMEH P C, HARVIEW C L, YEARELY J H, *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 568-571. DOI: 10.1038/nature13954.
- [11] WALDMAN A D, FRITZ J M, LENARDO M J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice[J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(11): 651-668. DOI: 10.1038/s41577-020-0306-5.
- [12] HAAS L, ELEWAUT A, GERARD C L, *et al.* Acquired resistance to anti-MAPK targeted therapy confers an immune-evasive tumor microenvironment and cross-resistance to immunotherapy in melanoma [J]. *Nat Cancer*, 2021, 2(7): 693-708. DOI: 10.1038/s43018-021-00221-9.
- [13] OH D Y, KWEK S S, RAJU S S, *et al.* Intratumoral CD4⁺ T cells mediate anti-tumor cytotoxicity in human bladder cancer[J/OL]. *Cell*, 2020, 181(7): 1612-1625.e13[2024-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7321885/>. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.017.
- [14] OLIVEIRA G, STROMHAUG K, CIERI N, *et al.* Landscape of helper and regulatory antitumor CD4⁺ T cells in melanoma[J]. *Nature*, 2022, 605(7910): 532-538. DOI: 10.1038/s41586-022-04682-5.
- [15] KHOSRAVI G R, MOSTAFAVI S, BASTAN S, *et al.* Immunologic tumor microenvironment modulators for turning cold tumors hot[J/OL]. *Cancer Commun*, 2024, 44(5): 521-553[2024-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11110955/>. DOI: 10.1002/cac2.12539.
- [16] LIU M H, XIE D Y, HU D, *et al.* *In situ* cocktail nanovaccine for cancer immunotherapy[J/OL]. *Adv Sci*, 2023, 10(31): e2207697 [2024-02-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37740439/>. DOI: 10.1002/adv.202207697.
- [17] KLEMPNER S J, CHAO J, URONIS H E, *et al.* DKN-01 and tislelizumab ± chemotherapy as a first-line (1L) and second-line (2L) investigational therapy in advanced gastroesophageal adenocarcinoma (GEA): distinguish trial[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(4_suppl): 292 [2024-02-01]. https://doi.org/10.1200/jco.2022.40.4_suppl.292. DOI: 10.1200/jco.2022.40.4_suppl.292.
- [18] HERNANDEZ R, LAPORTE K M, HSIUNG S, *et al.* High-dose IL-2/CD25 fusion protein amplifies vaccine-induced CD4⁺ and CD8⁺ neoantigen-specific T cells to promote antitumor immunity[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(9): e002865[2024-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8413969/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-002865.

【收稿日期】 2024-02-02

【修回日期】 2024-06-12

【本文编辑】 党瑞山