

Id2 通过 PI3K/AKT 通路调控 Tcm 细胞的代谢重编程抑制结肠癌细胞生长

刘枋^{1,2,3}, 潘春丽², 周智锋^{1,3}, 陈淑萍^{1,3}, 叶韵斌^{1,2,3} (1. 福建医科大学肿瘤临床医学院, 福建省肿瘤医院 肿瘤免疫学研究室, 福建 福州 350014; 2. 福建医科大学 基础医学院, 福建 福州 350122; 3. 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014)

[摘要] **目的:** 探讨分化抑制因子 2(Id2)在诱导生成中央记忆性 T(Tcm)细胞及增强 T 细胞抗肿瘤持久性中的作用。**方法:** 磁珠分选 CD8⁺ 初始 T 细胞, 与负载癌胚抗原(CEA)的树突状细胞(DC)共培养, 经白介素-2(IL-2)或 IL-7/15/21/23 分别诱导培养效应 T(Teff)或 Tcm 细胞; qPCR 和 WB 法分别检测 T 细胞中 Id2 和 Id3 mRNA、蛋白表达; 慢病毒敲减 T 细胞中 Id2 基因, 用流式细胞术检测其 T 细胞记忆表型; WB 法检测 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达; Seahorse 能量代谢仪分析细胞外酸化速率(ECAR)和耗氧速率(OCR); 斑马鱼结肠癌 HCT116 细胞移植瘤模型分析 Teff 和 Tcm 细胞的抗肿瘤差异, 进一步观察敲减 Id2 基因的 Tcm 细胞(Tcm-shId2)对第二次移植瘤的生长抑制。**结果:** Tcm 细胞高表达 Id3 mRNA ($P < 0.05$), 而 Teff 细胞高表达 Id2 mRNA ($P < 0.001$)。成功构建敲减 Id2 基因的 Tcm 细胞(Tcm-shId2)且其 Id3 表达明显上调, 敲减 Id2 可促进 Tcm 细胞的形成 ($P < 0.05$)。Tcm-shId2 细胞通过 PI3K/AKT 通路进行代谢重编程, 有效抑制斑马鱼体内结肠癌移植瘤的生长, 对第二次移植瘤也能产生显著抑制作用 ($P < 0.01$)。**结论:** Id2 可能通过调控 PI3K/AKT 通路改变 T 细胞代谢模式, 从而促进 CD8⁺ T 细胞向 Tcm 细胞分化, 有效抑制结肠癌移植瘤的生长。

[关键词] 分化抑制因子 2; 中央记忆性 T 细胞; T 细胞分化; PI3K/AKT 信号通路; 代谢重编程

[中图分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 06-0570-09

Id2 regulates the metabolic reprogramming of Tcm cells through the PI3K/AKT pathway to inhibit colorectal cancer cell growth

LIU Fang^{1,2,3}, PAN Chunli², ZHOU Zhifeng^{1,3}, CHEN Shuping^{1,3}, YE Yunbin^{1,2,3} (1. Laboratory of Immuno-Oncology, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, Fujian, China; 3. Fujian Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of inhibitor of differentiation 2 (Id2) in inducing the generation of central memory T (Tcm) cells and enhancing the anti-tumor persistence of T cells. **Methods:** CD8⁺ naïve T cells were sorted with magnetic beads and then co-cultured with carcinoembryonic antigen (CEA)-loaded dendritic cells (DCs). These cells were induced into effector T (Teff) or Tcm cells by interleukin-2 (IL-2) or IL-7/15/21/23, respectively. The mRNA and protein expression of Id2 and Id3 in T cells were detected using qPCR and WB, respectively. Id2 gene in T cells was knocked down using lentivirus, and the T cell memory phenotype was analyzed by flow cytometry. The expression of PI3K/AKT pathway-related proteins was examined by WB. The extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) were assessed using a Seahorse extracellular flux analyzer. A zebrafish colorectal cancer HCT116 xenograft model was employed to analyze the anti-tumor differences between Teff and Tcm cells. The effect of Id2 gene knockdown in Tcm cells (Tcm-shId2) on the growth inhibition of secondary xenografts was also observed. **Results:** Tcm cells exhibited high expression of Id3 mRNA ($P < 0.05$), whereas Teff cells showed high expression of Id2 mRNA ($P < 0.001$). Tcm cells with Id2 knockdown (Tcm-shId2) were successfully constructed, showing significantly upregulated Id3 expression. Knockdown of Id2 promoted the formation of Tcm cell ($P < 0.05$). Tcm-shId2 cells underwent metabolic reprogramming via the PI3K/AKT pathway, which effectively suppressed the growth of colorectal cancer xenografts in zebrafish and also produced significant inhibitory effects on secondary tumor growth ($P < 0.01$). **Conclusion:** Id2 gene may regulate T cell metabolism through the PI3K/AKT signaling pathway,

[基金项目] 福建省卫生计生科研人才培养项目医学创新课题(No. 2018-CX-9); 福建省科技创新联合资金(No. 2018Y9108); 福建省自然科学基金(No. 2023J011247); 福建省科技创新联合资金(No. 2024Y9607)

[作者简介] 刘枋(1981—), 女, 博士, 副主任技师, 主要从事肿瘤免疫学的研究

[通信作者] 叶韵斌(扫码获取作者联系方式)



promoting the differentiation of CD8⁺ T cells into Tcm cells and effectively inhibiting the growth of colorectal cancer xenografts.

[Key words] inhibitor of differentiation 2 (Id2); central memory T (Tcm) cell; T cell differentiation; PI3K/AKT signal pathway; metabolic reprogramming

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(6): 570-578. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.06.002]

T 细胞过继回输已逐渐成为抗肿瘤免疫治疗的重要策略,目前多使用终末分化的效应 T 细胞(effector T cell, Teff 细胞)。尽管 Teff 细胞在治疗初期对肿瘤细胞表现出强大的杀伤作用,但其应答后往往迅速耗竭且缺乏免疫记忆,难以产生持久的抗肿瘤免疫应答^[1-2]。中央记忆性 T 细胞(central memory T cell, Tcm 细胞)分化程度较低,具有较强的增殖能力和持久的免疫记忆,能够在体内长期存活,再次接触同一抗原时能迅速响应,因此成为 T 细胞过继回输的理想选择。优化 Tcm 细胞的诱导策略,有望为基因修饰的工程化 T 细胞提供更合适的细胞载体,进一步增强抗肿瘤效应和持久性^[3-4]。长寿命记忆性 T 细胞的形成和维持通常受到转录因子的调节。分化抑制因子(inhibitor of differentiation, Id)通过负性调控转录因子碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix protein, bHLH)的活性来影响 T 细胞的分化^[5]。研究^[6-7]表明,Id2 低表达或 Id3 高表达有助于长寿命记忆性 T 细胞的形成。但 Id 分子是如何诱导 T 细胞向中央记忆表型分化?哪些信号通路或代谢途径参与其中?对于复发肿瘤,Tcm 细胞是否仍然能保持强效的抗肿瘤作用?这些问题尚无明确的答案。本文就 Id2 和 Id3 在诱导生成 Tcm 细胞中的作用及可能机制作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离自健康供者外周血,已通过福建省肿瘤医院伦理委员会的审查(伦理审批号:2017-053-01)。人结肠癌细胞 HCT116(CEA 阳性)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,培养于含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 McCoy's 5A 培养液。斑马鱼由福州百维斯生物科技有限公司提供。

CD8⁺ 初始 T 细胞(naïve T cell, Tn 细胞)分选试剂盒和磁珠分选柱均购自德国 Miltenyi Biotec 公司,抗 CD3/CD28 抗体偶联磁珠和 DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,重组人白细胞介素-2(recombinant human interleukin-2, rhIL-2)、rhIL-7、rhIL-15、rhIL-21 及 rhIL-23 均购自美国 PeproTech 公司,KBM-581 培养液购自美国 Corning 公司,McCoy's 5A 培养液购自美

国 GIBCO 公司,FBS 购自美国 GIBCO 公司,Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液购自美国 GE 公司,细胞总 RNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,Id2 和 Id3 引物由北京梓熙生物科技有限公司合成,逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,兔抗人 Id2、Id3、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、GAPDH、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体均购自美国 CST 公司,慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司,Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒、细胞线粒体压力测试试剂盒和乙莫克舍(etomoxir)均购自美国安捷伦科技有限公司,AKT 抑制剂 MK-2206 购自美国 MCE 公司,红色荧光染料 DiI 和绿色荧光染料 DiO 均购自大连美伦生物有限公司。

1.2 磁珠分选 CD8⁺ Tn 细胞

采集 30 mL 健康供者外周血,用 Ficoll-Paque 淋巴细胞分离液分离 PBMC,300 × g 离心 10 min,弃上清液。每 1 × 10⁷ 个细胞加 40 μL 缓冲液和 10 μL CD8⁺ Tn 细胞生物素标记抗体混合液,冰浴 10 min 后加入 30 μL 缓冲液和 20 μL 抗生物素微珠,继续冰浴 15 min,洗涤、弃上清液。每 1 × 10⁸ 个细胞重悬于 500 μL 缓冲液,收集通过分离柱后流下的细胞悬液获得 Tn 细胞。每 1 × 10⁷ 个 Tn 细胞加 80 μL 缓冲液和 20 μL CD8⁺ 微珠,冰浴 15 min,加入 1~2 mL 缓冲液,300 × g 离心 10 min,弃上清液。每 1 × 10⁸ 个细胞重悬于 500 μL 缓冲液。将分选柱移出磁场,洗脱得到 CD8⁺ Tn 细胞。

1.3 诱导培养 Teff 和 Tcm 细胞

将树突状细胞(DC)负载癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)后,按 10:1 比例与 CD8⁺ Tn 细胞共培养于 12 孔板中,加入 CD3/CD28 抗体偶联磁珠刺激活化 CD8⁺ Tn 细胞(磁珠:T 细胞 = 1:100)、另加入 IL-2 或细胞因子组合(IL-7/15/21/23)分别诱导 Teff 或 Tcm 细胞。IL-2 剂量为 300 IU/mL,其他因子剂量均为 25 ng/mL。每 3 d 更换一次新鲜培养基,同时补充相应的细胞因子。

1.4 构建敲减 Id2 基因的 CD8⁺ Tcm 细胞

将 CD8⁺ Tn 细胞(4 × 10⁵ 个/500 μL·孔)接种于 12 孔板中,加入不同类型慢病毒并分组:(1)空白对照组不加慢病毒;(2)阴性对照组加入 40 μL 空载慢病毒和 2 μL polybrene;(3) Tcm-shId2 组加入 40 μL shId2 慢病毒和 2 μL polybrene。各组均加入细胞因

子组合(IL-7/15/21/23)和CD3/CD28抗体偶联磁珠, 200 × g 离心1 h后培养4 h, 补充KBM581培养液(500 μL/孔), 每3~4 d更换新鲜培养液, 荧光显微镜下观察细胞荧光表达。

1.5 qPCR法检测各组细胞中Id2和Id3 mRNA表达

收集T细胞, 用TRIzol法提取其总RNA, 逆转录成cDNA后, 用DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit进行PCR扩增。逆转录条件: 42 °C 15 min、95 °C 5 min、4 °C 5 min。PCR扩增条件: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s、60 °C 10 s、72 °C 20 s, 共40个循环。Id2正向引物为5'-AACGACTGCTACTCCAAGCTC-3', 反向引物为5'-ATAGTGGGATGCGAGTCCAG-3'; Id3正向引物为5'-AGCCAGGTGGAAATCCTAC-3', 反向引物为5'-AAGCTCCTTTTGTCGTTGG-3'; GAPDH正向引物为5'-ACAGTCCATGCCATCACTG-3', 反向引物为5'-AGTAGAGGCAGGGATGAT-3'。以GAPDH为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标基因mRNA的相对表达水平。

1.6 WB法检测Id2、Id3及PI3K/AKT通路相关蛋白的表达

收集T细胞, 用蛋白裂解液提取其总蛋白, 用BCA法测定样本的蛋白浓度。取30 μg蛋白样品进行SDS-PAGE, 电转至PVDF膜, 用3% BSA室温封闭1 h, TBST洗涤3次后, 分别加入兔抗人Id2抗体(1:500稀释)、p-PI3K抗体(1:1 000稀释)、PI3K抗体(1:1 000稀释)、Id3抗体(1:1 000稀释)、p-AKT抗体(1:1 000稀释)、AKT抗体(1:1 000稀释)、或GAPDH抗体(1:1 000稀释), 4 °C下处理过夜。TBST洗涤3次后, 加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:3 000稀释)室温下处理1 h, 化学发光试剂盒显影, 用凝胶成像系统拍照, Image J软件对目的条带进行灰度分析。根据灰度值, 计算p-PI3K和p-AKT蛋白的相对表达量, 分别以PI3K和AKT为内参。

1.7 流式细胞术检测T细胞记忆表型

收集 5×10^5 个T细胞, 加入兔抗人CD45RA或CD62L抗体各5 μL, 室温下处理15 min后, PBS洗涤2次, 经BD公司canto II流式细胞仪检测T细胞表型, 所有检测均设置同型对照。

1.8 各组T细胞细胞外酸化速率(extracellular acidification rate, ECAR)和耗氧速率(oxygen consumption rate, OCR)的检测

收集T细胞, 用预热的检测液重悬细胞并计数, 调整细胞密度至 1×10^6 个/mL, 接种100 μL细胞悬液到每个微孔, 低速离心使细胞附着于孔底。将微孔板放置于37 °C、无CO₂的培养箱中处理1 h。按照糖酵解速率测定试剂盒或细胞线粒体压力测定试剂盒

说明书操作, Seahorse细胞能量代谢分析仪检测OCR或ECAR。长链脂肪酸氧化压力测试实验分析脂肪酸氧化(fatty acid oxidation, FAO)通路抑制剂Etomoxir处理前后Tcm-shId2细胞OCR的改变。线粒体压力测定实验和长链脂肪酸氧化压力测试实验分析AKT抑制剂MK-2206处理前后Tcm-shId2细胞OCR的改变。

1.9 斑马鱼移植瘤模型

Teff和Tcm细胞抑制移植瘤生长的比较: 斑马鱼受精48 h后, 用三卡因麻醉斑马鱼, 通过毛细玻璃管将结肠癌细胞HCT116(标记红色荧光染料DiI)显微注射到卵黄囊中, 每条斑马鱼注射200个细胞, 体式荧光显微镜下选择异种移植成功的斑马鱼, 此时记为0 h。注射HCT116细胞24 h后, 同样在卵黄囊部位注射T细胞(标记绿色荧光染料DiO), 细胞数与肿瘤细胞相同, 分为3组: PBS组; Teff细胞组和Tcm细胞组。24 h和48 h后在体式荧光显微镜下拍照, 通过Image J软件计算每条鱼的荧光面积。

敲减Id2基因前后Tcm细胞抑制移植瘤生长的比较: 肿瘤细胞和T细胞的荧光标记及注射方式同上。第一次注射HCT116细胞24 h后, 注射Tcm或Tcm-shId2细胞, 次日进行HCT116细胞的第二次注射(模拟肿瘤复发)。48 h和72 h在体式荧光显微镜下拍照, 通过Image J软件计算每条鱼的荧光面积。

1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 9.0软件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, 组间两两比较采用独立样本 t 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 Tcm细胞高表达Id3 mRNA而Teff细胞高表达Id2 mRNA

qPCR法检测IL-2组(即Teff细胞组)和IL-7/15/21/23组(即Tcm细胞组)CD8⁺T细胞中Id2和Id3 mRNA的表达。结果(图1)显示, 与IL-7/15/21/23组Tcm细胞比较, 第7天后IL-2组Teff细胞中Id2 mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Id3 mRNA的检测结果与之相反, IL-7/15/21/23组Tcm细胞的Id3 mRNA表达水平均明显高于IL-2组Teff细胞(均 $P < 0.001$)。实验结果说明, Id2、Id3与T细胞记忆表型的形成有关联。

2.2 成功构建Tcm-shId2细胞且其Id3表达明显上调

用慢病毒敲减CD8⁺Tcm细胞中的Id2基因, 荧光显微镜观察慢病毒感染情况。shId2敲减组与阴性对

照组的慢病毒感染效率相似,细胞荧光表达率达90%以上(图2A)。空白对照与阴性对照组Id2和Id3 mRNA和蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而shId2敲减组的Id2 mRNA和蛋白表达均明显降低

(图2B、C,均 $P < 0.01$),Id3 mRNA和蛋白表达则显著增加(图2B、C, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。实验结果说明,实验成功地构建了Tcm-shId2细胞,该细胞Id3表达明显上调。

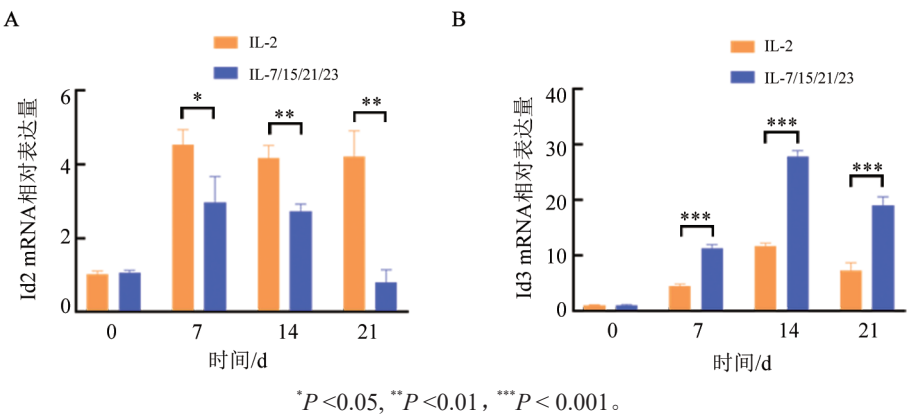
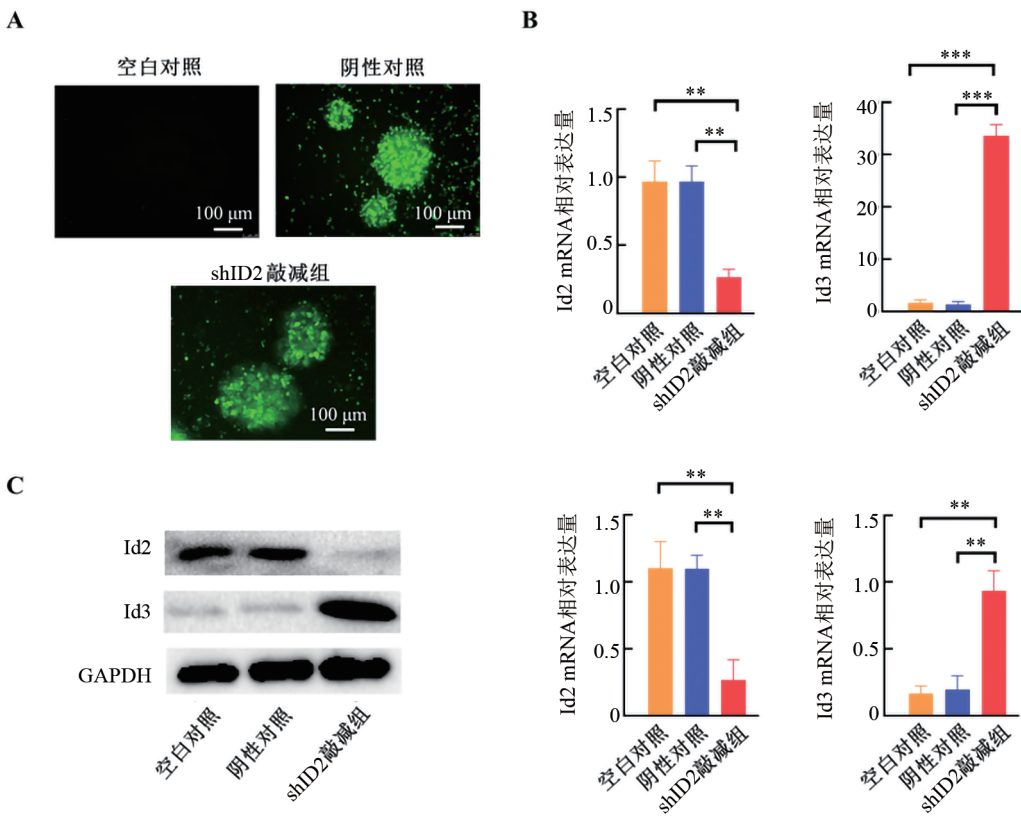


图1 IL-2和IL-7/15/21/23诱导的CD8⁺T细胞中Id2(A)和Id3(B)mRNA的表达



A: 荧光显微镜下观察各组细胞的慢病毒感染效率; B: qPCR法检测各组CD8⁺T细胞中Id2和Id3 mRNA的相对表达量; C: WB法检测各组CD8⁺T细胞中Id2和Id3蛋白表达。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图2 CD8⁺Tcm细胞慢病毒感染效率及Id2、Id3 mRNA和蛋白的表达

2.3 敲减Id2可促进Tcm细胞的形成

为了观察敲减Id2基因是否有助于诱导生成Tcm细胞,通过流式细胞术检测Id2基因敲减前后Tcm细胞亚群(CD45RA⁻CD62L⁺)的变化,检测结果(图3)显示,与空白对照和阴性对照相比,敲减Id2基因后Tcm细胞比例均明显增加(均 $P < 0.05$)。实验结果说明,

在细胞因子IL-7/15/21/23组合的刺激下,敲减Id2基因有助于诱导产生更多的Tcm细胞。

2.4 敲减Id2可抑制Tcm细胞的PI3K/AKT信号通路

为了探索Id2基因敲减诱导生成Tcm的具体机制,用WB法检测Id2基因敲减前后PI3K/AKT信号通路蛋白的表达变化,检测结果(图4)显示,3组细胞

中 PI3K、AKT 蛋白的表达均无明显差异,但 Tcm-shId2 组 p-PI3K、p-AKT 与对照组相比均显著上调(均

$P < 0.01$, 图4),提示 Id2 介导的 Tcm 细胞的形成可能依赖于 PI3K/AKT 信号通路。

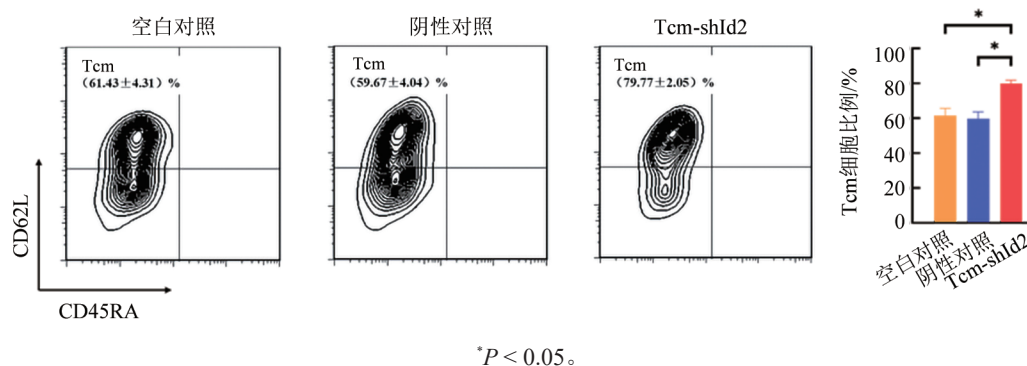


图3 敲减 Id2 后 CD8⁺ Tcm 亚群变化

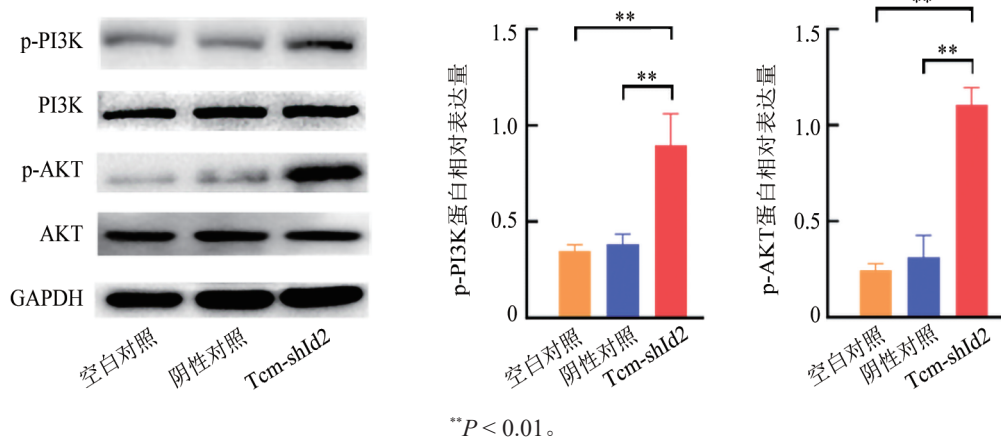


图4 Id2 基因调控对 Tcm 细胞中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

2.5 Tcm-shId2 细胞通过 PI3K/AKT 通路进行代谢重编程

为了观察 T 细胞向中央记忆表型转变过程中代谢特征的变化,通过糖酵解速率测试实验和线粒体压力测试实验分别检测 ECAR 和 OCR,结果(图5)显示, T_{eff} 细胞的 ECAR 均明显高于 Tcm 细胞和 Tcm-shId2 细胞(图5A, 均 $P < 0.01$),而 Tcm 和 Tcm-shId2 细胞之间未见显著差异。实验结果说明, T_{eff} 细胞主要利用糖酵解将葡萄糖转化为丙酮酸,进而生成 ATP 以支持其增殖和效应功能。在线粒体压力测试实验中,与 T_{eff} 细胞比较, Tcm 细胞表现出更高的 OCR ($P < 0.001$),敲减 Id2 后 Tcm 细胞的 OCR 进一步升高(图5B, $P < 0.05$)。实验结果提示, Tcm 和 Tcm-shId2 细胞生成过程中线粒体呼吸明显增强,氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)依赖线粒体呼吸所产生的电子流和质子梯度驱动 ATP 合酶合成 ATP,为 T 细胞向中央记忆表型分化提供能量。

长链脂肪酸也是线粒体呼吸所需的代谢底物,本研究进一步用 FAO 通路抑制剂乙莫克舍处理

Tcm-shId2 细胞,发现其 OCR 明显降低(图5C, $P < 0.01$),提示 FAO 也是 Tcm-shId2 细胞所依赖的代谢途径之一。

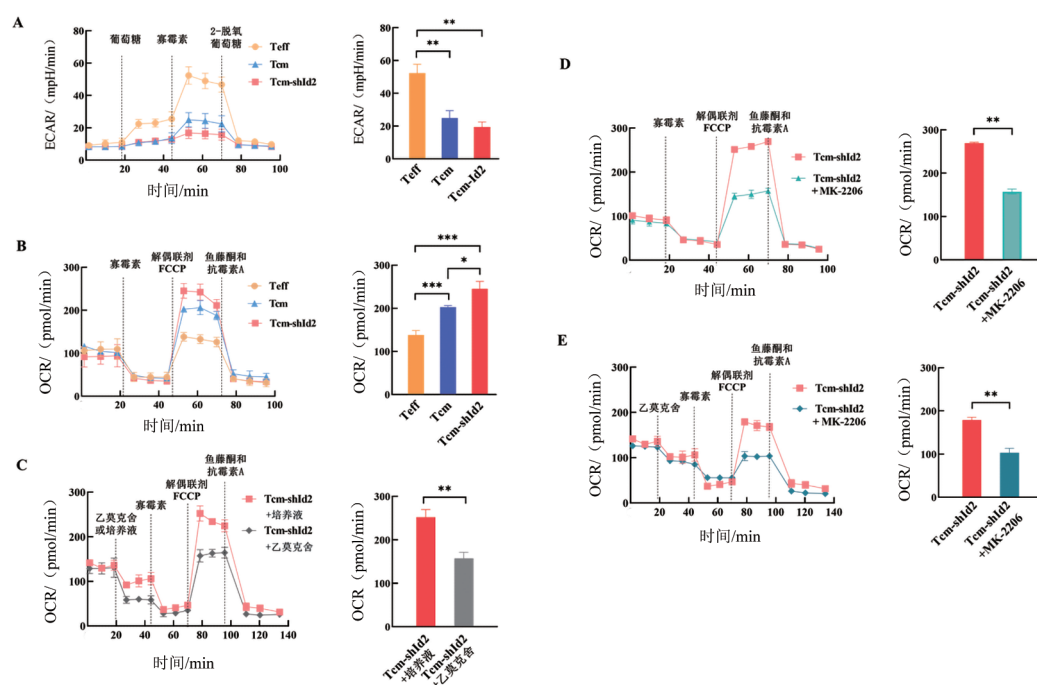
为了进一步探讨 Id2 介导的 PI3K/AKT 通路对 Tcm 细胞代谢的影响,用 AKT 抑制剂 MK-2206 处理 Tcm-Id2 细胞,发现 OXPHOS 和 FAO 均被显著抑制(图5D、E, $P < 0.01$)。由此可知, Id2 可能通过 PI3K/AKT 通路调节 T 细胞代谢途径,将其由糖酵解向 OXPHOS 和 FAO 转变,从而促进 T 细胞中央记忆表型的分化。

2.6 Tcm 细胞有效抑制斑马鱼结肠癌移植瘤的体内生长

斑马鱼移植瘤模型因鱼体透明、实验周期短、低成本等优点成为肿瘤免疫学研究理想的模式动物。在斑马鱼卵黄囊显微注射结肠癌细胞 HCT116(标记红色荧光染料 Dil)24 h 后,在同样的位置注射 T_{eff} 或 Tcm 细胞(标记绿色荧光染料 DiO),次日通过体式荧光显微镜观察肿瘤细胞和免疫细胞的荧光强度,分析 T 细胞对肿瘤的生长抑制,斑马鱼移植瘤实验示意

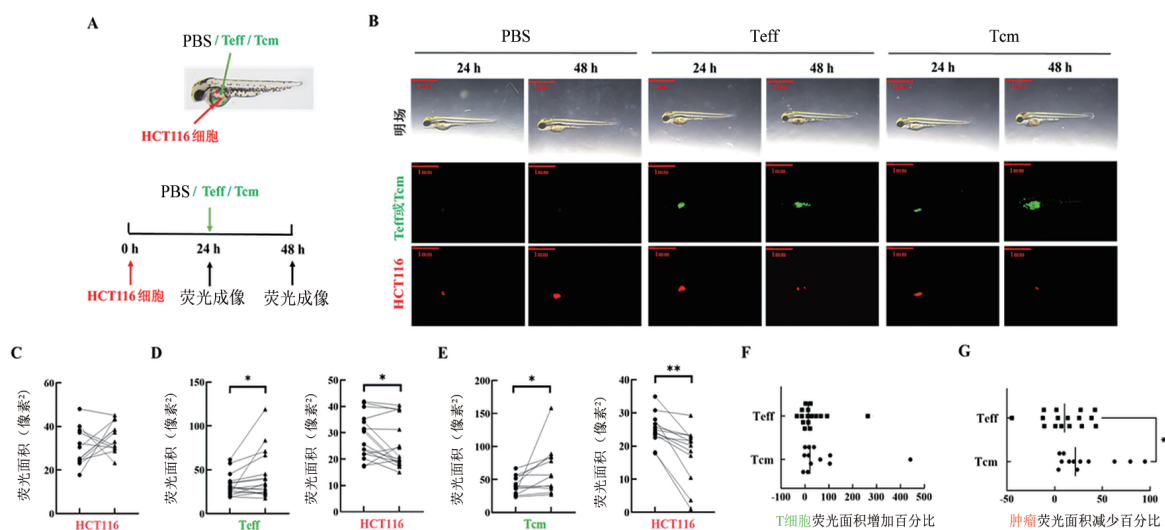
图见图 6A。各组肿瘤细胞(HCT116)或 T 细胞(Teff 或 Tcm 细胞)的荧光表达情况见图 6B, Teff 或 Tcm 细胞注射 24 h 后均出现不同程度的增殖(图 6D、6E, $P < 0.05$),但两者间差异无统计学意义(图 6F)。PBS 组大部分肿瘤的荧光面积增加,说明肿瘤呈增长趋

势(图 6C)。相比之下, Teff 组($P < 0.05$)和 Tcm 组($P < 0.01$)肿瘤的荧光面积显著减少(图 6D、E), Tcm 组荧光面积减少更为明显(图 6G)。实验结果说明, Tcm 细胞在体内具有较强的增殖能力,并能显著抑制结肠癌细胞的生长。



A: 糖酵解速率测试实验检测 T 细胞 ECAR; B: 线粒体压力测试实验检测细胞 OCR; C: 长链脂肪酸氧化压力测试实验分析 FAO 通路抑制剂乙莫克舍处理前后 Tcm-shld2 细胞 OCR 的改变; D、E: MK-2206 处理前后线粒体压力测试(D)和长链脂肪酸氧化压力测试(E)结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 Id2 基因对 Tcm 细胞代谢的影响



A: 注射 HCT116 细胞(红荧光)、Teff 或 Tcm 细胞(绿荧光)至斑马鱼卵黄囊的示意图; B: 接种 HCT116 细胞后 HCT116、Teff 或 Tcm 细胞的荧光表达; C: 注射 PBS 后肿瘤荧光面积的改变; D: 注射 Teff 细胞后 T 细胞及肿瘤荧光面积的改变; E: 注射 Tcm 细胞后 T 细胞及肿瘤荧光面积的改变; F: Teff 组和 Tcm 组肿瘤荧光面积增加百分比; G: Teff 组和 Tcm 组 T 细胞荧光面积减少百分比。

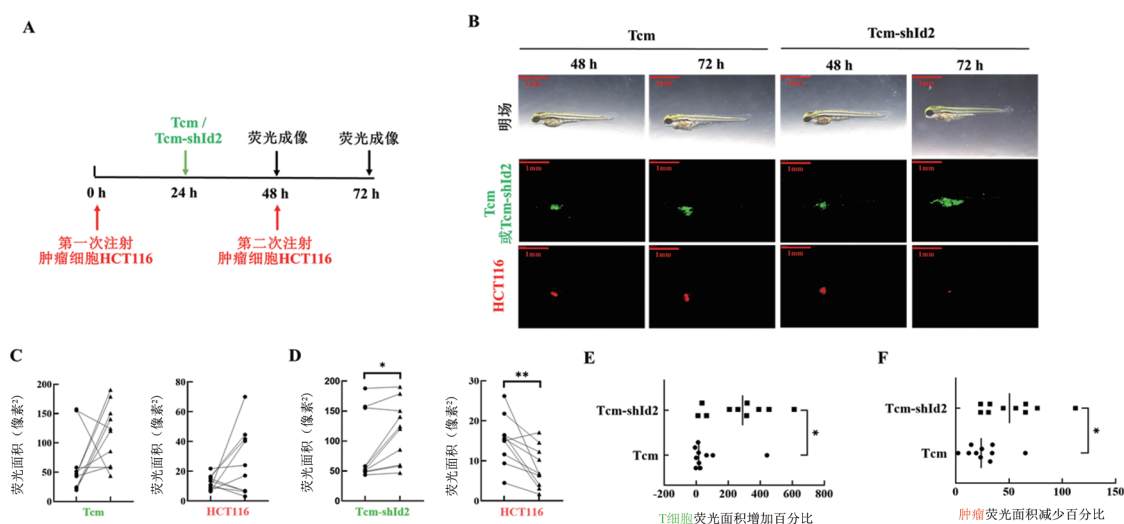
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 Tcm 细胞显著抑制 HCT116 细胞斑马鱼移植瘤的体内生长

2.7 Tcm-shId2细胞显著抑制第二次移植瘤的生长

为了探索 Id2 基因敲减对 Tcm 细胞抑瘤能力的影响,同时观察其对第二次移植瘤的杀伤,在第一次接种 HCT116 细胞后 48 h 进行肿瘤的第二次接种(图 7A),观察 Tcm 或 Tcm-shId2 细胞对 HCT116 细胞的杀伤情况。各组肿瘤细胞(HCT116)或 T 细胞(Teff 或 Tcm 细胞)的荧光表达情况见图 7B,其中 Tcm 细胞在接触第二次移植瘤后荧光面积略有增加,但未见显著性差异;肿瘤细胞的荧光面积也未见减少(图

7C)。Tcm-shId2 在接触第二次移植瘤后出现较为明显的增殖(图 7D, $P < 0.05$),肿瘤细胞荧光面积也显著减少(图 7D, $P < 0.01$)。Tcm-shId2 细胞的增殖能力明显强于 Tcm 组(图 7E, $P < 0.05$),且抑瘤效果也优于 Tcm 组(图 7F, $P < 0.05$)。由此可见,敲减 Id2 的 Tcm 细胞在首次接触 HCT116 细胞时产生了免疫记忆,再次遇到相同抗原刺激时表现出更快的增殖速度,产生更有效且持久的抑瘤作用。



A: 2次接种 HCT116 细胞(红荧光)、单次接种 Tcm 细胞或 Tcm-shId2 细胞(绿荧光)至斑马鱼卵黄囊的示意图; B: 第二次接种 HCT116 细胞后观察 HCT116、Tcm 和 Tcm-shId2 细胞的荧光表达; C: 接种 Tcm 细胞后 T 细胞以及肿瘤荧光面积的改变; D: 接种 Tcm-shId2 细胞后 T 细胞及肿瘤荧光面积的改变; E: Tcm 组和 Tcm-shId2 组肿瘤荧光面积增加百分比; F: Tcm 组和 Tcm-shId2 组 T 细胞荧光面积减少百分比。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图7 Tcm-shId2细胞对HCT116第二次移植瘤的生长抑制

3 讨论

过继性细胞免疫治疗成功与否的关键在于免疫细胞能否产生持久的抗肿瘤免疫应答。虽然 Teff 细胞在初期能迅速清除肿瘤细胞,但其易耗竭的特性难以维持长效的抗肿瘤作用。而记忆 T 细胞(memory T cell, Tm)具有免疫记忆并能长期存活,再次接触相同肿瘤抗原时能迅速响应,实现有效且持久的抗肿瘤免疫应答^[8]。根据 CD45RA 和 CD62L 的表达不同, Tm 细胞可细分为 Tcm(CD45RA⁺CD62L⁺)和效应记忆性 T 细胞(effector memory T cell, Tem)(CD45RA⁺CD62L⁻)。相较于 Tem 细胞, Tcm 细胞具有更强的增殖能力,肿瘤抗原再次刺激时能产生大量的效应细胞,同时分泌更多的细胞因子,产生更强的抗肿瘤免疫应答。研究^[9]表明, Tcm/Teff 细胞比例与免疫治疗疗效呈正相关。为了诱导培养高比例的 Tcm,前期摸索了细胞因子组合最佳方案,发现经 IL-7/15/21/23 诱导培养的 T 细胞所生成的 Tcm 细胞

比例最高(约 60%)^[10],但这仍未达到预期目标。在这群细胞中,发现 Id2 mRNA 呈低水平表达,而 Id3 则相反,这一发现与 KNELL 等^[11]的研究结果相一致,提示 Id2 低表达或 Id3 高表达可能有利于 T 细胞向中央记忆表型分化。由此提出科学假设:调控 T 细胞分化相关的关键基因(如 Id 分子)有可能诱导生成更高比例的 Tcm,产生更有效且持久的抗肿瘤免疫应答。

Id 分子属于 bHLH 转录因子家族,在细胞分化中起着重要作用。Id 分子能与 E 蛋白形成异源二聚体,从而阻断 E 蛋白与靶 DNA 的结合,因此可充当 E 蛋白的负性调节因子。研究^[7]表明, Id2 通过负调控 E 蛋白家族成员 E2A 的转录活性影响 Id3 的表达, Id3 是 E2A 的直接靶点。在 Id2 基因缺陷的 C57BL/6 小鼠体内,长寿命记忆性 T 细胞中 Id3 的表达水平至少上调 100 倍^[6]。说明 Id2 是决定 T 细胞分化命运的关键基因。因此,通过敲减 CD8⁺ T 细胞中的 Id2 基因,观察 Id3 基因的表达变化以及 T 细胞记忆表型的分化情况。随着 Id2 基因表达下调, Id3 mRNA 和蛋白表达

水平随之上调,诱导产生的 CD8⁺ Tcm 细胞比例高达 80% 左右。那么 Id2 是通过调控哪条信号通路诱导生成大量的 Tcm 细胞? MIYAZAKI 等^[12]发现,Id2 和 Id3 可通过 E 蛋白调控 PI3K/AKT 信号通路,从而维持淋巴祖细胞的稳态以及 T/B 淋巴细胞的自我更新。YU 等^[13]也发现,Id1 介导的 E 蛋白活性降低会导致 CD4⁺CD44^{hi} 记忆性 T 细胞亚群显著增加,这与 PI3K/AKT 信号通路的组成性激活有关。本研究同样观察到 Tcm 细胞在敲减 Id2 基因后 p-PI3K、p-AKT 表达明显上调,提示 Id2 可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路影响 Tcm 细胞的生成。

研究^[14]表明,PI3K/AKT 信号通路是调控免疫细胞代谢状态的重要通路。尤其在 T 细胞记忆表型分化过程中,AKT 磷酸化有助于增强线粒体的呼吸功能,提高 Tm 细胞对 OXPHOS 的利用。PI3K/AKT 通路还能促进脂肪酸的合成,为 T 细胞提供能量储备,支持其分化和增殖所需^[15]。本研究发现,Tcm 和 Tcm-shId2 细胞的 ECAR 明显低于 Teff 细胞,从另一侧面进一步证实抑制糖酵解有助于 T 细胞向中央记忆表型分化^[16-17]。而 Tcm 则表现出更高的 OCR,敲减 Id2 后 Tcm 的 OCR 进一步升高。说明 Id2 介导的 Tcm 细胞分化过程需要消耗大量氧气,其通过增强线粒体呼吸、促进 OXPHOS 来实现代谢重编程。经 FAO 通路抑制剂乙莫克舍处理后的 Tcm-shId2 细胞的 OCR 明显降低,提示 T 细胞记忆表型分化依赖于 FAO。FAO 生成的乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环后,进一步参与 OXPHOS 产生 ATP。在能量需求增加时,T 细胞可通过增强 FAO 来支持 OXPHOS^[18-19]。脂肪酸结合蛋白 Fabp4 和 Fabp5 缺失会显著缩短记忆性 T 细胞的寿命^[20],可见 FAO 对于维持长寿命至关重要。综上所述,Tcm 和 Teff 细胞具有不同的代谢偏好。Teff 细胞倾向于利用糖酵解途径来快速产生能量,以支持其增殖和效应功能,而 Tcm 细胞更依赖于 OXPHOS 和 FAO 来维持免疫记忆及长期存活,在面对相同肿瘤抗原时能更快、更有效地产生长期的免疫应答^[21-22]。敲减 Id2 基因的 Tcm 细胞对 OXPHOS 和 FAO 的代谢需求进一步增强,该过程可能受到 PI3K/AKT 信号通路的调控。除此之外,抑制谷氨酰胺的摄入也能促进中央记忆性 T 细胞的形成^[23]。总之,代谢重编程为解析 T 细胞记忆表型分化机制提供了重要的视角。

诱导培养高比例 Tcm 细胞的最终目的在于进一步提高 T 细胞过继回输的抗肿瘤效果。小鼠异种移植瘤模型被视为评估 T 细胞抗肿瘤功能的金标准,然而该模型实验周期较长且成本较高,斑马鱼移植瘤模型有助于弥补该缺陷。斑马鱼在胚胎发育早期缺

乏适应性免疫系统,不会对移植细胞产生排斥反应。此外,斑马鱼通体透明的特性便于研究人员观察免疫细胞在体内的增殖及其对肿瘤生长的抑制^[24-25]。前期,本团队已将斑马鱼成功地应用于胃癌^[26]和肝癌^[27]的抗肿瘤免疫研究。本研究利用该模型观察 Tcm 细胞对结肠癌细胞 HCT116 的体内杀伤。结果显示,Tcm 细胞对 HCT116 细胞的杀伤效果明显强于 Teff 细胞。为了进一步探讨 Id2 基因敲减是否有助于增强 Tcm 细胞的免疫记忆及抗肿瘤持久性,本研究对斑马鱼进行 HCT116 细胞的第二次接种,以模拟肿瘤复发,观察到 Tcm-shId2 细胞在首次接触 HCT116 细胞时即表现出显著的杀伤活性。第二次接种 HCT116 细胞时,此时的 Tcm-shId2 细胞已具有免疫记忆,抗原刺激其迅速生成大量的效应 T 细胞,表现出更有效且持久的抗肿瘤作用。

如何诱导具有免疫记忆且持久抗肿瘤作用的免疫细胞是肿瘤免疫治疗领域持续探索的科学问题。本研究通过调控 T 细胞中的 Id2 基因,并经细胞因子组合诱导培养具有免疫记忆的 Tcm 细胞,旨在进一步增强免疫记忆并提高抗肿瘤持久性。Id2 基因可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路对 T 细胞进行代谢重编程,促进其向中央记忆亚型分化,显著抑制结肠癌细胞 HCT116 的生长并有效预防肿瘤复发。未来有望将其作为基因修饰的工程化细胞载体,为实现更为有效的抗肿瘤治疗提供新思路。

[参 考 文 献]

- [1] GEBHARDT T, PARK S L, PARISH I A. Stem-like exhausted and memory CD8⁺ T cells in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(11): 780-798. DOI: 10.1038/s41568-023-00615-0.
- [2] PHILIP M, SCHIETINGER A. CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(4): 209-223. DOI: 10.1038/s41577-021-00574-3.
- [3] TANG X Y, MAO X R, LING P W, *et al.* Glycolysis inhibition induces anti-tumor central memory CD8⁺ T cell differentiation upon combination with microwave ablation therapy[J/OL]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4665[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38821965/>. DOI: 10.1038/s41467-024-49059-6.
- [4] HERDA S, HEIMANN A, ALTHOFF S, *et al.* Long-term T cell expansion results in increased numbers of central memory T cells with sustained functional properties for adoptive T cell therapy[J]. *Blood*, 2019, 134(Suppl1): 1943-1943. DOI: 10.1182/blood-2019-124736.
- [5] 石金凤, 李庆伟, 王浩. 分化抑制因子在免疫细胞发育及血液恶性肿瘤发生中的调控作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(11): 1458-1465. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.06.1595.
- [6] YANG C Y, BEST J A, KNELL J, *et al.* The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8⁺ T cell subsets[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(12): 1221-1229.

- DOI:10.1038/ni.2158.
- [7] MASSON F, MINNICH M, OLSHANSKY M, *et al.* Id2-mediated inhibition of E2A represses memory CD8⁺ T cell differentiation[J]. *J Immunol*, 2013, 190(9): 4585-4594. DOI:10.4049/jimmunol.1300099.
- [8] 何以丰, 狄文. 癌相关CD8⁺记忆T细胞在过继免疫治疗中的应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(2): 116-121. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.002.
- [9] 林美西, 臧丹, 陈骏. 中央记忆型T细胞与肿瘤免疫治疗的相关性研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2023, 50(20): 1063-1067. DOI: 10.12354/j.issn.1000-8179.2023.20230627.
- [10] 潘春丽, 李洁羽, 陈淑萍, 等. IL-7/IL-15/IL-21/IL-23 体外联合刺激有效促进人CD8⁺中央记忆性T细胞生成[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(10): 872-880.
- [11] KNEILL J, ADAM BEST J, LIND N A, *et al.* Id2 influences differentiation of killer cell lectin-like receptor G1(hi) short-lived CD8⁺ effector T cells[J]. *J Immunol*, 2013, 190(4): 1501-1509. DOI: 10.4049/jimmunol.1200750.
- [12] MIYAZAKI M, MIYAZAKI K, CHEN S W, *et al.* The E-Id protein axis modulates the activities of the PI3K-AKT-mTORC1-Hif1 α and c-myc/p19Arf pathways to suppress innate variant TFH cell development, thymocyte expansion, and lymphomagenesis[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(4): 409-425. DOI:10.1101/gad.255331.114.
- [13] YU S, ZHANG J, LIU C, *et al.* Inhibition of E protein activity facilitates the quiescence exit of naïve CD4⁺ T cells through modulating PI3K-AKT signaling and TCR microcluster formation[J/OL]. *Cell Immunol*, 2020, 351: 104065[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32089259/>. DOI:10.1016/j.cellimm.2020.104065.
- [14] JONES N, VINCENT E E, CRONIN J G, *et al.* Akt and STAT5 mediate naïve human CD4⁺ T-cell early metabolic response to TCR stimulation[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2042[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31053703/>. DOI: 10.1038/s41467-019-10023-4.
- [15] MAURO C, SMITH J, CUCCHI D, *et al.* Obesity-induced metabolic stress leads to biased effector memory CD4⁺ T cell differentiation *via* PI3K p110 δ -Akt-mediated signals[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(3): 593-609. DOI:10.1016/j.cmet.2017.01.008.
- [16] TANG X Y, MAO X R, LING P W, *et al.* Glycolysis inhibition induces anti-tumor central memory CD8⁺T cell differentiation upon combination with microwave ablation therapy[J/OL]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4665[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38821965/>. DOI:10.1038/s41467-024-49059-6.
- [17] 乔万佳, 刘小军. T细胞糖代谢重编程与抗肿瘤免疫治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(1): 75-79. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2022.01.012.
- [18] SHI H, CHEN S D, CHI H B. Immunometabolism of CD8⁺ T cell differentiation in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2024, 10(7): 610-626. DOI:10.1016/j.trecan.2024.03.010.03.010.
- [19] AKDOGAN B, ROSE J R, RAHMBERG A R, *et al.* Human memory T cells show differential metabolic preferences[J/OL]. *J Immunol*, 2023, 210(Supplement_1): 87.05[2025-02-10]. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.210.supp.87.05>. DOI:10.4049/jimmunol.210.supp.87.05.
- [20] VLASOVA V V, SHMAGEL K V. T lymphocyte metabolic features and techniques to modulate them[J]. *Biochemistry*, 2023, 88(11): 1857-1873. DOI:10.1134/S0006297923110159.
- [21] KATES M, SAIBIL S D. Reprogramming T-cell metabolism to enhance adoptive cell therapies[J]. *Int Immunol*, 2024, 36(6): 261-278. DOI:10.1093/intimm/dxae007.
- [22] TAKAYANAGI S I, CHUGANJI S, TANAKA M, *et al.* A culture method with berbamine, a plant alkaloid, enhances CAR-T cell efficacy through modulating cellular metabolism[J/OL]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 685[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38834758/>. DOI:10.1038/s42003-024-06297-0.
- [23] PAN X L, WANG J J, ZHANG L J, *et al.* Metabolic plasticity of T cell fate decision[J]. *Chin Med J*, 2024, 137(7): 762-775. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002989.
- [24] YAO Y X, WANG L, WANG X. Modeling of solid-tumor microenvironment in zebrafish (*Danio rerio*) larvae[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1219: 413-428. DOI:10.1007/978-3-030-34025-4_22.
- [25] LI L Y, SHI J H, LIU W Y, *et al.* Copper overload induces apoptosis and impaired proliferation of T cell in zebrafish[J/OL]. *Aquat Toxicol*, 2024, 267: 106808[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38159456/>. DOI:10.1016/j.aquatox.2023.106808.
- [26] ZHOU Z F, LI J Y, HONG J W, *et al.* Interleukin-15 and chemokine ligand 19 enhance cytotoxic effects of chimeric antigen receptor T cells using zebrafish xenograft model of gastric cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1002361[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36618357/>. DOI:10.3389/fimmu.2022.1002361.
- [27] YE C M, LIN S Z, HONG J W, *et al.* Altered HLA-A2-restricted TP53 epitope induces specific CTL cytotoxicity against hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Eur J Immunol*, 2023, 53(5): e2250054[2025-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36794567/>. DOI: 10.1002/eji.202250054.

[收稿日期] 2025-02-10

[修回日期] 2025-04-25

[本文编辑] 向正华