

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240314

· 论 著 ·

肿瘤相关成纤维细胞通过 SDF-1/CXCR4 通路介导胰腺导管腺癌中髓源性抑制细胞的迁移

张冰冰^{1△}, 胡 豪^{2△}, 石渝川², 刘雪霏², 祝 峙³, 张 晶^{3*}

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九七〇医院病理科, 烟台 264001
2. 海军军医大学 (第二军医大学) 第一附属医院病理科, 上海 200433
3. 海军军医大学 (第二军医大学) 第二附属医院病理科, 上海 200003

〔摘要〕 **目的** 探讨胰腺导管腺癌 (PDAC) 中肿瘤相关成纤维细胞 (CAF) 调节 CD13 高表达的中性粒细胞样髓源性抑制细胞 (CD13^{hi}-nMDSC) 迁移的机制, 为 PDAC 的免疫治疗提供实验依据和潜在分子靶标。**方法** 从 5 例 PDAC 患者的胰腺癌组织中分离纯化 CAF, 用细胞免疫荧光、流式细胞术鉴定 CAF 表型和纯度, 用 qPCR、ELISA 技术检测 CAF 中相关细胞因子的表达。用 Transwell 系统构建 CAF 条件培养基及髓源性抑制细胞 (MDSC) 迁移系统, 观察 MDSC 的迁移情况, 研究上述细胞因子参与调节 MDSC 迁移的具体作用机制。**结果** 分离的原代 CAF 表达活化标志物成纤维细胞激活蛋白 (FAP) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), 对照包皮成纤维细胞 (HFF) 不表达 FAP 和 α -SMA。qPCR 结果显示 CAF 中 IL-6、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) mRNA 的表达高于 HFF; CAF 培养上清中 IL-6、MCP-1、SDF-1 的含量均高于 HFF 培养上清 (均 $P < 0.01$), 且随培养时间的延长而升高。与 HFF 条件培养基和普通培养基 (RPMI 1640) 相比, CAF 条件培养基能招募更多的总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC (均 $P < 0.01$); 在培养体系中单独加入 SDF-1 重组蛋白可以诱导总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移, 并且加入 SDF-1 中和抗体或 CXCR4 趋化因子受体 4 (CXCR4) 阻断抗体后能够减少 CAF 条件培养基诱导的 CD13^{hi}-nMDSC 迁移 (均 $P < 0.01$); 虽然单独加入 MCP-1 也可以诱导总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移, 但 CD13^{hi}-nMDSC 迁移的数量明显少于 SDF-1 实验组; IL-6 重组蛋白不能引起总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移。**结论** CAF 可通过 SDF-1/CXCR4 通路介导 PDAC 中总 MDSC 及 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移。

〔关键词〕 胰腺肿瘤; 肿瘤微环境; 肿瘤相关成纤维细胞; 髓源性抑制细胞; 细胞迁移

〔引用本文〕 张冰冰, 胡豪, 石渝川, 等. 肿瘤相关成纤维细胞通过 SDF-1/CXCR4 通路介导胰腺导管腺癌中髓源性抑制细胞的迁移 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46 (7): 838-846. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240314.

Cancer-associated fibroblasts mediate migration of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic ductal adenocarcinoma through SDF-1/CXCR4 pathway

ZHANG Bingbing^{1△}, HU Hao^{2△}, SHI Yuchuan², LIU Xuefei², ZHU Zhi³, ZHANG Jing^{3*}

1. Department of Pathology, No. 970 Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Yantai 264001, Shandong, China
2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the mechanism by which cancer-associated fibroblasts (CAFs) regulate CD13-high expression neutrophil-like myeloid-derived suppressor cell (CD13^{hi}-nMDSC) migration in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), so as to provide potential molecular targets and experimental evidences for immunotherapy in patients. **Methods** CAFs were isolated and purified from pancreatic cancer tissues of 5 PDAC patients. The phenotype and purity of

〔收稿日期〕 2024-05-12 **〔接受日期〕** 2024-12-17

〔基金项目〕 上海市自然科学基金 (22ZR1477600), 上海市医学创新研究项目 (23Y11902500), 上海市东方英才计划 (QNWS2024100), 海军军医大学面上孵化基金 (2023MS038). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (22ZR1477600), Shanghai Medical Innovation Research Project (23Y11902500), Shanghai Oriental Talent Program (QNWS2024100), and Incubation Fund of Naval Medical University (2023MS038).

〔作者简介〕 张冰冰, 硕士, 主治医师. E-mail: 1553342961@qq.com; 胡 豪, 住院医师. E-mail: hh_chpathology@163.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). E-mail: zhangjing@smmu.edu.cn

CAFs were identified by immunofluorescence and flow cytometry. The expression of related factors in CAF was detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). CAF conditioned medium and myeloid-derived suppressor cell (MDSC) migration system were constructed by Transwell to observe the migration of MDSCs and to study the specific mechanisms by which the aforementioned cytokines participate in regulating the migration of MDSCs. **Results** The isolated primary CAFs expressed activation biomarkers fibroblast activation protein (FAP) and α -smooth muscle actin (α -SMA), while the human foreskin fibroblasts (HFFs) of control cells did not express FAP and α -SMA. qPCR results showed that the mRNA expression levels of interleukin 6 (*IL-6*), monocyte chemotactic protein 1 (*MCP-1*), and stromal cell-derived factor 1 (*SDF-1*) in CAFs were higher than those in HFFs (all $P < 0.01$). The contents of IL-6, MCP-1, and SDF-1 in the CAF culture supernatant were significantly higher than those in the HFF culture supernatant (all $P < 0.01$), and the secretion content increased with the prolongation of culture time. Compared with HFF conditioned medium and regular medium (RPMI 1640), CAF conditioned medium could recruit more total MDSCs and CD13^{hi}-nMDSCs (all $P < 0.01$). The addition of SDF-1 recombinant protein alone in the culture system could induce the migration of total MDSCs and CD13^{hi}-nMDSCs, and the addition of SDF-1 neutralizing antibodies or C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) blocking antibodies could significantly reduce the migration of CD13^{hi}-nMDSCs induced by CAF conditioned medium (all $P < 0.01$). Although MCP-1 alone could also induce the migration of total MDSCs and CD13^{hi}-nMDSCs, the number of CD13^{hi}-nMDSCs migrating was significantly less than that of the SDF-1 experimental group. The IL-6 recombinant protein did not induce the migration of total MDSCs or CD13^{hi}-nMDSCs. **Conclusion** CAFs can mediate the migration of total MDSCs and CD13^{hi}-nMDSCs in PDAC through SDF-1/CXCR4 pathway.

[**Key words**] pancreatic neoplasms; tumor microenvironment; cancer-associated fibroblast; myeloid-derived suppressor cells; cell migration

[**Citation**] ZHANG B, HU H, SHI Y, et al. Cancer-associated fibroblasts mediate migration of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic ductal adenocarcinoma through SDF-1/CXCR4 pathway[J]. Acad J Naval Med Univ, 2025, 46(7): 838-846. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240314.

胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 是常见的消化系统恶性肿瘤病种, 具有高侵袭性、预后差的特点, 5 年预期生存率不足 10%^[1]。近年来, PDAC 的发病率以每年 0.5%~1% 的速度增长, 在中国 2022 年肿瘤死因中居第 6 位, 在美国肿瘤相关死亡中居第 3 位, 预计未来 10 年内 PDAC 的发病率将继续上升, 到 2030 年将成为肿瘤第二大致死病种^[2-3]。

PDAC 是肿瘤间质最丰富的实体肿瘤之一, 间质中存在丰富的肿瘤相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblast, CAF)。CAF 通过分泌多种细胞因子参与募集免疫抑制细胞, 阻止免疫细胞杀伤肿瘤细胞, 帮助胰腺癌细胞逃避宿主免疫杀伤^[4-5]。髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 是肿瘤间质微环境中最重要的免疫抑制细胞群, 其可分泌过氧化物酶、一氧化氮合酶、TGF- β 、IL-10 和环氧合酶 2, 发挥免疫抑制作用^[6]。有研究表明集落刺激因子 1 (colony stimulating factor 1, CSF-1) / 集落刺激因子 1 受体 (colony stimulating factor 1 receptor, CSF-1R) 信号通路是肿瘤相关巨噬细胞分化和存活的关键

调节因子, CSF-1R 抑制剂可以耗竭肿瘤相关巨噬细胞从而发挥抗肿瘤作用, 但在实体肿瘤中, 单纯使用 CSF-1R 抑制剂疗效不明显^[7]。Kumar 等^[8]发现 CAF 能通过促进中性粒细胞样 MDSC (neutrophil-like MDSC, nMDSC) 在肿瘤中的聚集来抑制 CSF-1R 抑制剂的抗肿瘤作用。成纤维细胞激活蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 是一种具有双酶活性的丝氨酸蛋白酶, Liu 等^[9]推测以 FAP 为靶点的嵌合抗原受体 T 细胞 (chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 可以耗竭肿瘤中的 CAF, 进而抑制 MDSC 的募集, 促进 CD8⁺ T 细胞和序贯治疗靶向密封蛋白 18.2 (claudin 18.2, CLDN18.2) 的 CAR-T 在肿瘤组织中的浸润与存活, 最终增强以 CLDN18.2 为靶点的 CAR-T 治疗 PDAC 的疗效。基质细胞衍生因子 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 又称 CXC 基序趋化因子配体 (C-X-C motif chemokine ligand, CXCL) 12, Sun 等^[10]发现在乳腺癌中奥拉帕尼可以降低 CAF 释放 SDF-1 α , 从而抑制 MDSC 的募集, 增加 CAR-T 的抗肿瘤活性。这些研究成果均表明, CAF 参与肿瘤免疫抑制微环境的形成, 并与 MDSC 密切相关。

本课题组前期研究发现, CD13^{hi} 表达的 MDSC 是 PDAC 中发挥免疫抑制功能的主要细胞亚群, 其在胰腺癌患者外周血及肿瘤组织中明显增多^[11]。胰腺癌中 CAF 通过 IL-6/STAT3 通路促进外周血单个核细胞分化为 CD13^{hi}-nMDSC^[12], 但在 PDAC 中 CAF 招募并参与 MDSC 迁移的机制尚不明确。本研究旨在探讨 PDAC 癌组织中 CAF 调节 CD13^{hi}-nMDSC 迁移的机制, 为揭示 CAF 和 MDSC 通过重塑胰腺癌微环境促进胰腺癌进展提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 组织标本、细胞及试剂 5 例 PDAC 组织及 3 例 PDAC 患者的脾脏组织均来自于海军军医大学第一附属医院手术切除标本, 本研究经海军军医大学第一附属医院伦理委员会审批, 所有患者均签署知情同意书。8 例患者中男 6 例、女 2 例, 年龄为 (67.37±7.41) 岁, 术前均未接受放疗及化疗, 均行胰腺癌根治性切除手术治疗, 术后病理结果均为 PDAC。人包皮成纤维细胞 (human foreskin fibroblast, HFF) 及成人皮肤成纤维细胞 (human dermal fibroblast-adult, HDF-a) 由上海富衡生物科技有限公司提供。

FBS、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 透明质酸酶、胰蛋白酶、胶原蛋白酶及 DNA 酶 I 购自美国 Sigma 公司; RNA 提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司; qPCR 仪购自日本 TaKaRa 公司, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体、波形蛋白 (vimentin) 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; PerCP-Cy5.5 标记的抗人 CD33 抗体、Pacific blue 标记的抗人类白细胞抗原 DR (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR) 抗体、PE-Cy7 标记的抗人 CD15 抗体、FITC 标记的抗人 CD11b 抗体、PE 标记的抗人 CD13 抗体、APC 标记的抗人 CD14 抗体、PE 标记的抗人 FAP 抗体、人 IL-6 ELISA 检测试剂盒、人单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) ELISA 检测试剂盒购自美国 BioLegend 公司; 人 SDF-1 ELISA 检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司; SDF-1 (CXCL12) 中和抗体、CXC 基序趋化因子受体 (C-X-C motif chemokine receptor, CXCR) 4 阻断抗体购自美国 R&D 公司。

引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 原代 CAF 的分离培养 收集 5 例 PDAC 患者手术后新鲜的肿瘤组织样本, 使用眼科剪剪碎, 用透明质酸酶 (0.1 mg/mL)、DNA 酶 I (0.1 mg/mL)、胶原蛋白酶 (1 mg/mL) 配制的消化酶体系消化 1 h, 加入适量含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基终止消化, 用孔径为 70 μ m 的细胞过滤器过滤, 离心后去上清。将细胞沉淀重悬后放入培养箱中培养, 当细胞融合度达到 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞, 按照 1:1 比例传代, 12 h 后换液, 利用成纤维细胞与其他细胞差速贴壁的原理, 将贴壁慢的内皮细胞、胰腺癌细胞等杂细胞除去, 传代培养至第 3~4 代时细胞形态趋于一致。

1.3 原代 CAF、HDF-a 和 HFF 鉴定 采用流式细胞术鉴定原代 CAF、HDF-a 和 HFF 的 FAP 表达情况。将 CAF 用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞, 离心、沉淀, 使用 FACS 缓冲液 (100 μ L/10⁶ 细胞) + 1% FBS 重悬细胞, 然后加入 FAP 抗体 (10 μ L/10⁶ 细胞), 4 $^{\circ}$ C 环境下避光孵育 30 min, 上机检测 FAP 阳性细胞比例。采用细胞免疫荧光技术进行 α -SMA 和波形蛋白表型鉴定。将胰蛋白酶消化后的 CAF 用 6 mL 培养基重悬, 在玻片中央滴加数滴细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 3 h, 待细胞贴壁后用 4% 多聚甲醛溶液固定, 破膜, 滴加 α -SMA 抗体、波形蛋白抗体, 置于湿盒内 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 滴加二抗, 室温下避光孵育 50 min, 滴加 DAPI 复染细胞核, 封片后拍照。

1.4 CAF 和 HFF 中相关细胞因子表达的检测 采用 qPCR 法检测相关细胞因子 mRNA 的表达。收集 1×10⁶ 个细胞, 提取总 RNA 并检测 RNA 纯度, 反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板、 β -肌动蛋白为内参照基因进行 qPCR 扩增。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 10 s、72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环。引物序列如下: *IL-6* 正向引物为 5'-CACTGGTCTTTTGGAGTTTGAG-3', 反向引物为 5'-GGACTTTTGTACTCATCTGCAC-3'; *SDF-1* 正向引物为 5'-CCAACGTC AAGCATCTCAAAT-3', 反向引物为 5'-CACACTTGTCTGTTGTGTTCT-3'; *MCP-1* 正向引物为 5'-AGAATCACCA GCAGCAAGTGTCC-3', 反向引物为 5'-TTGCTTG TCCAGGTGGTCCATG-3'; *FAP* 正向引物为 5'-TG GTATAGCAGTGGCTCCAGTCTC-3', 反向引物为

5'-ATCTGCTGTTCCGTGGATGAGAAG-3'; *IL-1 β* 正向引物为 5'-GCCAGTGAAATGATGGCTTATT-3', 反向引物为 5'-AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG-3'; CC 基序趋化因子配体 (C-C motif chemokine ligand, *CCL*) 5 正向引物为 5'-CCTCGC-TGTCATCCTCATTGCTAC-3', 反向引物为 5'-CTTGACCTGTGGACGACTGCTG-3'; *CXCL1* 正向引物为 5'-TCCTGCGAGTGGCACTGCTG-3', 反向引物为 5'-CTGGCAGCGCAGTTCACTGG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

使用 ELISA 检测试剂盒检测 CAF 及 HFF 培养上清中 IL-6、MCP-1、SDF-1 含量。将原代分离的 CAF 及 HFF 以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 加入 1 mL 含 1% FBS 的 RPMI 1640 培养基, 分别培养 24、48、72 h, 用 0.22 μm 滤膜过滤去除杂质及细胞碎片, 然后按照 ELISA 检测试剂盒说明书步骤进行检测。

1.5 分选人脾脏 MDSC 及 CD13^{hi}-nMDSC 将 PDAC 患者脾脏组织置于 6 cm 培养皿中, 并加入适量的无菌 PBS, 用 5 mL 注射器橡胶塞末端磨碎, 用孔径为 70 μm 的细胞过滤器过滤 2 遍, 离心后弃上清; 加入红细胞裂解液裂解红细胞, 离心后重悬; 加入 HLA-DR、CD33、CD11b、CD14、CD13、CD15 抗体 (10 $\mu\text{L}/10^6$ 细胞), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用流式细胞仪分选总 MDSC (表型为 HLA-DR⁻/CD33⁺/CD11b⁺) 和 CD13^{hi}-nMDSC (表型为 HLA-DR⁻/CD33⁺/CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺/CD13⁺), 用于后续实验。

1.6 Transwell 系统检测 MDSC 迁移 收集 CAF 或 HFF 培养上清作为条件培养基。对从 PDAC 患者脾脏组织分选的 MDSC 进行计数, 将 1×10^5 个 MDSC (分为总 MDSC、CD13^{hi}-nMDSC 两部分实验) 加入 Transwell (孔径 5 μm) 上室。第 1 部分实验将总 MDSC 分为 6 组, 分别将普通培养基 (RPMI 1640)、CAF 条件培养基 (20%)、HFF 条件培养基 (20%)、重组 IL-6 蛋白 (10 ng/mL)、重组 SDF-1 蛋白 (10 ng/mL)、重组 MCP-1 蛋白 (10 ng/mL) 加入 24 孔板中 (Transwell 下室); 第 2 部分实验将 CD13^{hi}-nMDSC 分为 8 组, 分别将普通培养基 (RPMI 1640)、CAF 条件培养基 (20%)、HFF 条件培养基 (20%)、重组 IL-6 蛋白 (10 ng/mL)、重组 SDF-1 蛋白 (10 ng/mL)、

重组 MCP-1 蛋白 (10 ng/mL)、CAF 条件培养基 (20%) + SDF-1 (CXCL12) 中和抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、CAF 条件培养基 (20%) + CXCR4 阻断抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入 24 孔板中 (Transwell 下室)。将 Transwell 系统放于细胞培养箱中培养 3 h 后, 用细胞计数仪计数穿入下室的 MDSC 细胞数。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (事后多重比较采用最小显著性差异法)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 PDAC 肿瘤组织分离的原代 CAF 纯度及表型鉴定 CAF 由 PDAC 患者手术标本分离获得, 采用差速贴壁的原理纯化 3~4 代后, 光学显微镜下观察可见细胞形态稳定, 呈长梭状成纤维样结构, 未见内皮细胞等杂细胞 (图 1A)。采用流式细胞术检测细胞中活化标志物 FAP 的表达情况, 结果显示分离的原代 CAF 细胞株中超过 90% 的细胞为 FAP⁺ 细胞, HDF-a 也大多表达 FAP, 但 HFF 基本为 FAP⁻ 细胞 (图 1B)。采用细胞免疫荧光技术检测细胞中 α -SMA 和波形蛋白的表达情况, 结果显示 CAF 细胞株均明显表达 α -SMA 和波形蛋白, HDF-a 表达波形蛋白、少量表达 α -SMA, HFF 表达波形蛋白而 α -SMA 表达缺失 (图 1C)。上述结果提示, 分离的原代 CAF 纯度高, 均表达成纤维活化标志物 α -SMA、FAP 和波形蛋白, 符合实验要求; HFF 缺失 α -SMA 和 FAP 表达, HDF-a 表达 FAP、少量表达 α -SMA, 因此选取 HFF 作为后续实验中的对照细胞。

2.2 PDAC 肿瘤组织分离的原代 CAF 细胞因子表达 使用 qPCR 技术检测 5 株 CAF 及对照细胞 HFF 中细胞因子在 mRNA 水平的表达情况, 结果显示 CAF 中 *IL-6*、*MCP-1*、*SDF-1* mRNA 表达量明显高于 HFF (均 $P < 0.01$, 图 2A)。用 ELISA 试剂盒检测培养 24、48、72 h 的细胞培养上清中 IL-6、MCP-1、SDF-1 的含量, 结果显示 IL-6、MCP-1、SDF-1 在 CAF 培养上清中的含量随着培养时间的延长而升高, 并且在各时间点的含量均高于 HFF (均 $P < 0.01$, 图 2B~2D)。

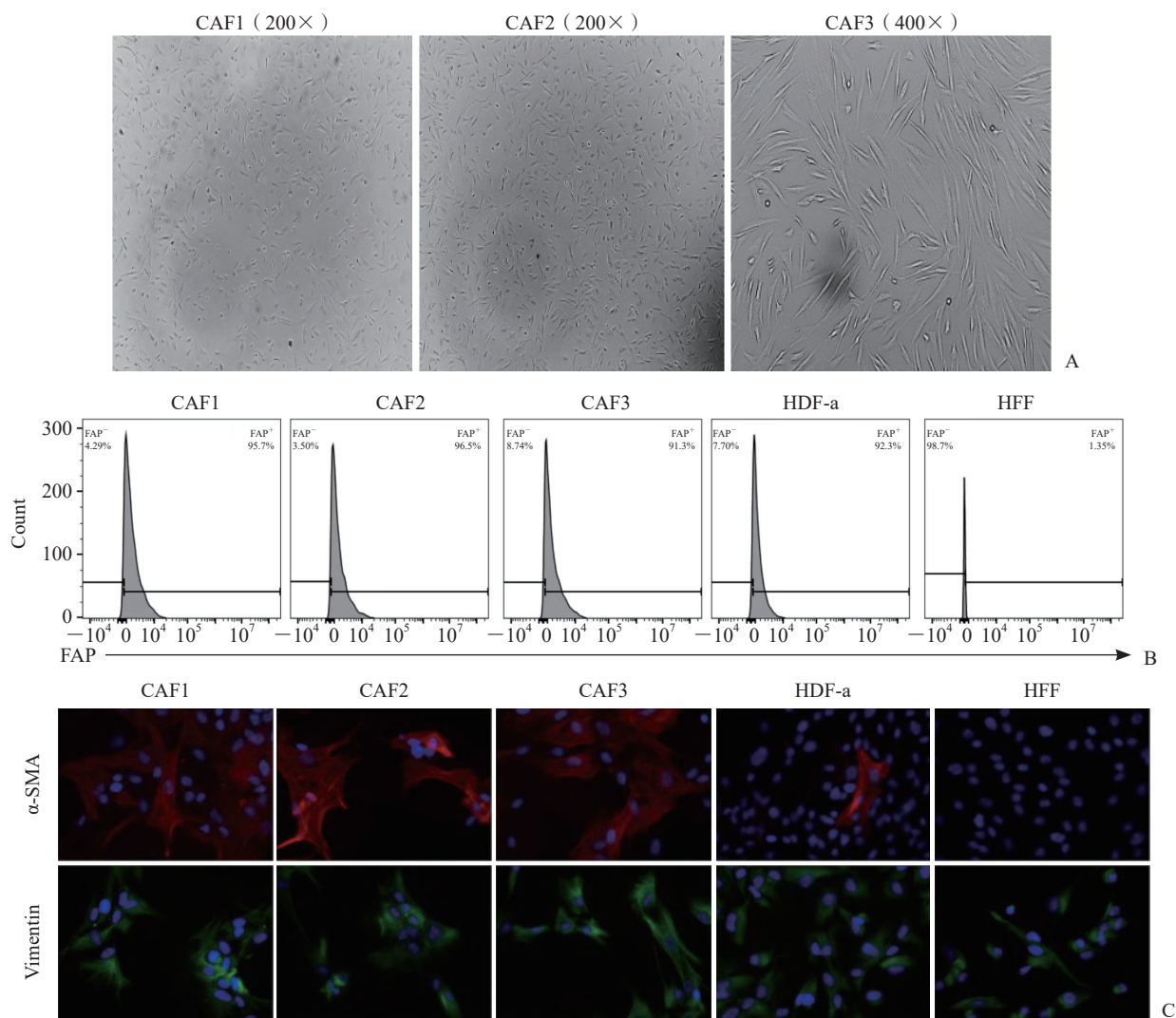


图 1 PDAC 肿瘤组织分离的原代 CAF 纯度及表型鉴定

Fig 1 Purity and phenotypic identification of primary CAFs isolated from PDAC tumor tissues

CAF1, CAF2 and CAF3 were CAFs isolated from tumor tissues of distinct PDAC patients. A: CAFs under microscope; B: The expression levels of FAP on the surface of cells were analyzed by flow cytometry; C: The expression levels of α -SMA and vimentin in cells were analyzed by immunofluorescence staining (200 $\times$), and the slide was stained with DAPI (blue), vimentin antibody (green), and α -SMA antibody (red). PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma; CAF: Cancer-associated fibroblast; FAP: Fibroblast activation protein; HDF-a: Human dermal fibroblast-adult; HFF: Human foreskin fibroblast; α -SMA: α -smooth muscle actin; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.3 CAF 通过 SDF-1/CXCR4 通路促进 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移 由图 3 可见, CAF 条件培养基比普通培养基 (RPMI 1640) 和正常成纤维细胞 HFF 条件培养基招募更多的总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC (均 $P < 0.01$)。在 Transwell 迁移实验模型下室分别加入重组 IL-6、SDF-1、MCP-1 蛋白, 结果显示重组 IL-6 蛋白不能引起总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移 (图 3A、3B); 虽然 MCP-1 也可以诱导总 MDSC 和 CD13^{hi}-nMDSC 迁移, 但 CD13^{hi}-nMDSC 迁移的数量明显少于 SDF-1 (图 3B); 重组 SDF-1 蛋白可以诱导总 MDSC

和 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移 (均 $P < 0.01$)。因此, 我们判断 SDF-1、MCP-1 参与了 PDAC 中 MDSC 的迁移, IL-6 在 MDSC 迁移中并无作用。为了进一步证实 SDF-1 的作用, 在 CAF 条件培养基中同时加入 SDF-1 中和抗体或 CXCR4 阻断抗体进行 CD13^{hi}-nMDSC 迁移实验, 结果显示加入 SDF-1 中和抗体或 CXCR4 阻断抗体后能够明显减少由 CAF 条件培养基诱导的 CD13^{hi}-nMDSC 迁移 (均 $P < 0.01$)。这提示 CAF 可通过 SDF-1/CXCR4 通路诱导 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移。

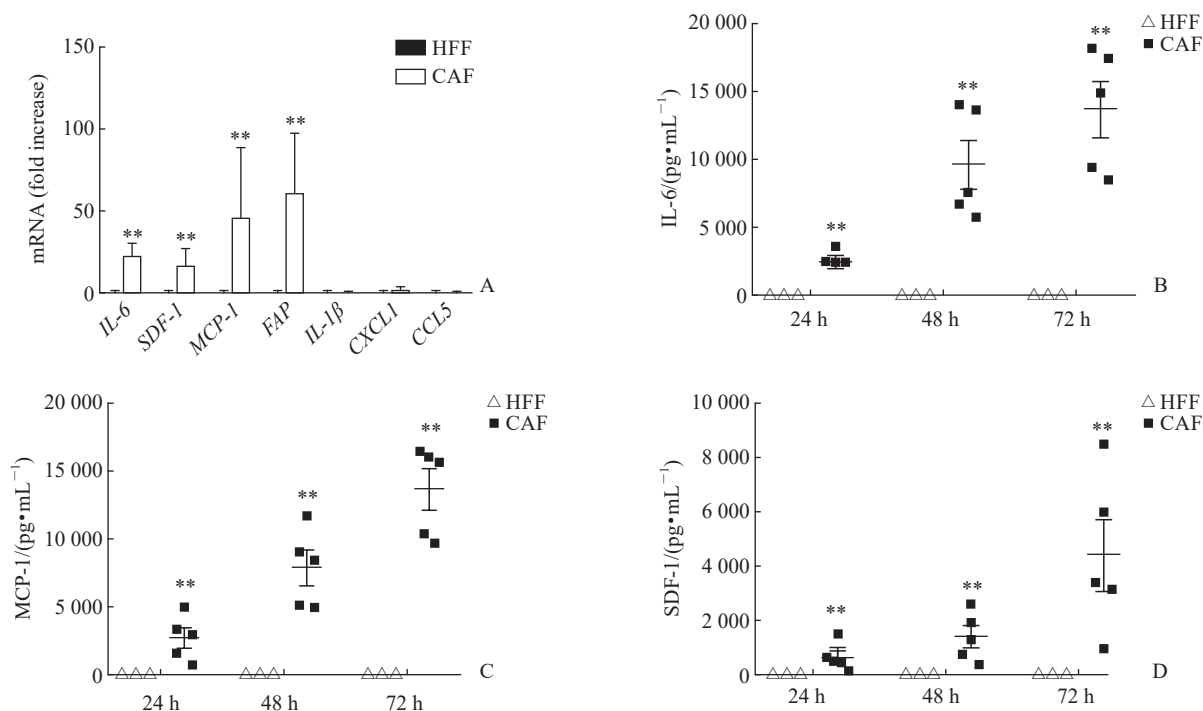


图2 PDAC 肿瘤组织分离的原代 CAF 中相关细胞因子的表达

Fig 2 Expression of related cytokines in primary CAFs isolated from PDAC tumor tissues

A: mRNA levels of cytokines in CAFs and HFFs were detected by quantitative polymerase chain reaction (** $P < 0.01$ vs HFF, $n = 5$, $\bar{x} \pm s$); B-D: Contents of IL-6, MCP-1, and SDF-1 in CAF and HFF culture supernatant detected at different time points by enzyme-like immunosorbent assay (** $P < 0.01$ vs HFF, $\bar{x} \pm s$). PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma; CAF: Cancer-associated fibroblast; HFF: Human foreskin fibroblast; IL: Interleukin; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; FAP: Fibroblast activation protein; CXCL1: C-X-C motif chemokine ligand 1; CCL5: C-C motif chemokine ligand 5.

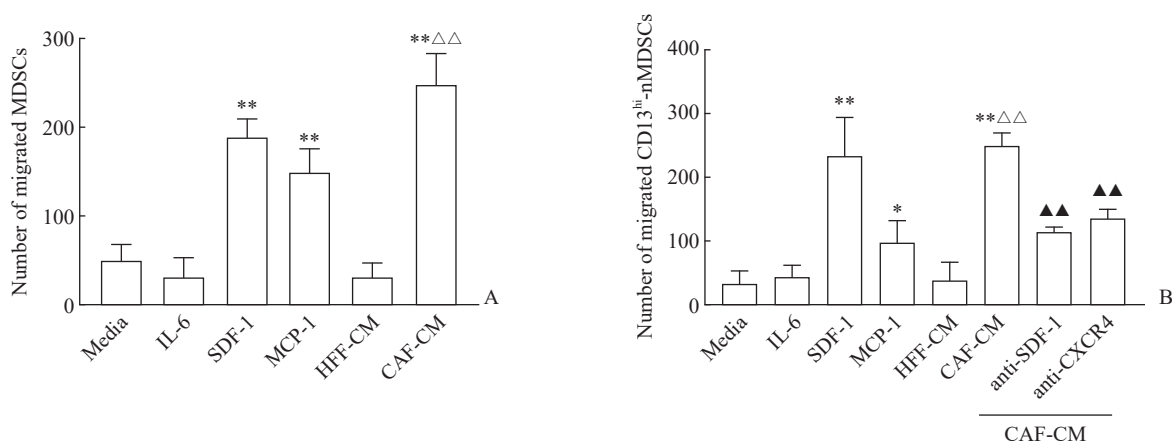


图3 CAF-CM 及相关细胞因子对 MDSC 迁移的影响

Fig 3 Effects of CAF-CM and related cytokines on MDSC migration

A: The average number of migrated MDSCs was detected by Transwell assay; B: The average number of migrated CD13^{hi}-nMDSCs was detected by Transwell assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs HFF-CM; $\triangle\triangle P < 0.01$ vs media; $\blacktriangle P < 0.01$ vs CAF-CM. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. CAF: Cancer-associated fibroblast; CM: Conditioned medium; MDSC: Myeloid-derived suppressor cell; IL-6: Interleukin 6; SDF-1: Stromal cell-derived factor 1; MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; HFF: Human foreskin fibroblast; CD13^{hi}: CD13 high expressed; nMDSC: Neutrophil-like MDSC; CXCR4: C-X-C motif chemokine receptor 4.

3 讨 论

PDAC 是胰腺癌最常见的病理类型,具有早期诊断困难、进展快、对放化疗不敏感、预后差等特点,尽管近年来医疗水平不断提高,但 PDAC 患者的 5 年预期生存率仍不足 10%^[1]。免疫治疗在多种恶性肿瘤治疗中取得实质性进展,但在 PDAC 的治疗中获益有限,这与 PDAC 独特的免疫抑制微环境密切相关^[13]。

MDSC 是肿瘤微环境中最重要的免疫抑制细胞,其在肿瘤进展过程中大量扩增、募集,通过参与肿瘤免疫逃逸、促进肿瘤血管生成及增强肿瘤细胞的侵袭与迁移驱动肿瘤进展^[6]。MDSC 在食管癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌等肿瘤中明显增多,并且 MDSC 数量与肿瘤患者预后、免疫治疗疗效密切相关^[11,14-16]。有研究证实靶向参与招募 MDSC 的趋化因子受体能有效提高免疫治疗的抗肿瘤疗效^[17]。临床前研究显示,在多种小鼠恶性肿瘤模型中,阻断 CCL2/CCR2 趋化因子受体 (C-C motif chemokine receptor, CCR) 2 轴,可以减少肿瘤内 MDSC 的数量并提高抗肿瘤疗效^[18-20]; CXCR1/2 抑制剂能减少 MDSC 募集并激活小鼠模型 T 细胞应答,提高免疫治疗效果^[21]。CCR5 及其配体 CCL3、CCL4、CCL5 参与调控 MDSC 的募集,阻断 CCR5 可降低乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌和前列腺癌的肿瘤生长和转移潜能^[17]。CSF-1R 在乳腺癌和胰腺癌中表达上调,靶向 CSF-1R 可以抑制 MDSC 向肿瘤部位的募集并强化免疫检查点抑制剂、过继 T 细胞疗法的抗肿瘤应答^[22-23]。靶向 nMDSC 表面的关键功能受体 CD300ld 能够抑制 nMDSC 的募集及其 T 细胞抑制功能,联合使用 CD300ld 阻断剂能提高免疫治疗效果^[24]。因此,研究 MDSC 的募集机制对提高 PDAC 的免疫治疗疗效有重要意义。我们在前期研究中发现 PDAC 患者的外周血及肿瘤组织中 nMDSC 数量与健康受试者比较显著升高,并且发现了 CD13^{hi}-nMDSC 和 CD13^{low}-nMDSC 这 2 个新亚群,PDAC 肿瘤组织中以 CD13^{hi}-nMDSC 亚群增多为主;CD13^{hi}-nMDSC 分泌大量的精氨酸酶 1 抑制 T 细胞增殖,是发挥免疫抑制功能的主要细胞群^[11]。但 CD13^{hi}-nMDSC 在胰腺癌肿瘤组织中大量募集的具体机制尚不明确。

CAF 是胰腺癌间质中的主要细胞成分,在肿瘤微环境中产生大量的胶原蛋白等细胞外基质,限制药物进入肿瘤核心部位,充当免疫细胞浸润的屏障,帮助胰腺癌细胞逃避宿主免疫监视^[25]。已在肝癌、胰腺癌、胆管细胞癌等多种肿瘤的小鼠模型中证实 CAF 参与了 MDSC 的扩增、募集^[26]。本研究从 5 例 PDAC 患者的肿瘤组织中分离了原代 CAF,通过 qPCR、ELISA 技术筛选出 CAF 与对照细胞 HFF 表达差异较大的 3 种细胞因子 IL-6、SDF-1、MCP-1,并发现 CAF 条件培养基能够促进 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移。为探讨 CAF 条件培养基促进 MDSC 迁移的作用机制,在培养体系中分别加入重组 IL-6、SDF-1、MCP-1 蛋白,结果发现 SDF-1 重组蛋白可以诱导 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移,并且加入 SDF-1 中和抗体后能够明显减少由 CAF 条件培养基诱导的 CD13^{hi}-nMDSC 迁移。以上结果说明,CAF 主要通过 SDF-1 介导 CD13^{hi}-nMDSC 的迁移。

SDF-1 又称 CXCL12,属于 CXC 家族趋化因子,能够激活 2 种具有不同下游信号通路的趋化因子受体: CXCR4 和 CXCR7。CXCR4 在外周血淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞等多种免疫细胞表面及肿瘤细胞中均有明显表达^[27];在肝癌、乳腺癌、骨肉瘤中证实 MDSC 表面也表达 CXCR4^[10,28],而且 SDF-1 是 CXCR4 的唯一配体^[29]。Deng 等^[30]在体外细胞实验及小鼠肝癌模型中证实 CXCL12 能够促进 MDSC 向肿瘤组织迁移,并且 CXCR4 是肝癌患者预后不良的重要标志物之一。在胰腺癌中,有多项研究证实联合靶向 CXCR4 策略可以提高多种免疫治疗的效果^[31-32]。因此,我们推断 SDF-1 的 2 个受体中, CXCR4 可能起主要作用。为进一步研究 SDF-1 参与调节 PDAC 中 CD13^{hi}-nMDSC 迁移的具体机制,在迁移体系中加入 CXCR4 阻断抗体,发现加入 CXCR4 阻断抗体后能够明显减少由 CAF 条件培养基诱导的 MDSC 迁移,说明 CAF 可以通过 SDF-1/CXCR4 通路促进 CD13^{hi}-nMDSC 这一新亚群的迁移。

CAF 是一群异质性较大的细胞群,在不同胰腺癌患者中分离的 CAF 表型特征及细胞因子的表达量有一定差异。本研究仅分析了 5 株原代 CAF 与 CD13^{hi}-nMDSC 迁移的关系, SDF-1 的另一配体 CXCR7 是否在 CD13^{hi}-nMDSC 迁移中发挥作用尚

未研究,具有一定的局限性。在后续实验中,我们会增加样本量进一步研究 CAF 与 CD13^{hi}-nMDSC 迁移的相关机制。

综上所述,本研究对 PDAC 肿瘤微环境中的 CAF 与 MDSC 迁移的相关关系进行了探讨,发现 CAF 能够通过分泌的 SDF-1 促进 MDSC 的迁移,尤其是 CAF 可以通过 SDF-1/CXCR4 通路招募 CD13^{hi}-nMDSC 这一发挥免疫抑制功能的主要细胞群,因此参与 CD13^{hi}-nMDSC 亚群招募的关键因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 可能是 PDAC 免疫治疗的重要潜在靶点。

参考文献

- [1] SARFATY E, KHAJOUINEJAD N, ZEWEDE M G, et al. Surgical management of pancreatic ductal adenocarcinoma: a narrative review[J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2023, 8: 39. DOI: 10.21037/tgh-23-27.
- [2] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002108.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- [4] VON AHRENS D, BHAGAT T D, NAGRATH D, et al. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 76. DOI: 10.1186/s13045-017-0448-5.
- [5] HO W J, JAFFEE E M, ZHENG L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer: clinical challenges and opportunities[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(9): 527-540. DOI: 10.1038/s41571-020-0363-5.
- [6] GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2017, 5(1): 3-8. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0297.
- [7] RIES C H, HOVES S, CANNARILE M A, et al. CSF-1/CSF-1R targeting agents in clinical development for cancer therapy[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 23: 45-51. DOI: 10.1016/j.coph.2015.05.008.
- [8] KUMAR V, DONTIREDDY L, MARVEL D, et al. Cancer-associated fibroblasts neutralize the anti-tumor effect of CSF1 receptor blockade by inducing PMN-MDSC infiltration of tumors[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(5): 654-668.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.10.005.
- [9] LIU Y, SUN Y, WANG P, et al. FAP-targeted CAR-T suppresses MDSCs recruitment to improve the antitumor efficacy of claudin18.2-targeted CAR-T against pancreatic cancer[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 255. DOI: 10.1186/s12967-023-04080-z.
- [10] SUN R, LUO H, SU J, et al. Olaparib suppresses MDSC recruitment via SDF1 α /CXCR4 axis to improve the anti-tumor efficacy of CAR-T cells on breast cancer in mice[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(1): 60-74. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.034.
- [11] ZHANG J, XU X, SHI M, et al. CD13^{hi} neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells exert immune suppression through arginase 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(2): e1258504. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1258504.
- [12] 张冰冰,唐海双,张晶,等.肿瘤相关成纤维细胞通过 IL-6/STAT3 通路介导胰腺癌中髓源性抑制细胞的分化[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(5): 520-527. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.05.0520.
- [13] ZHANG B B, TANG H S, ZHANG J, et al. Cancer-associated fibroblasts mediate differentiation of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer through IL-6/STAT3 pathway[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2019, 40(5): 520-527. DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.05.0520.
- [14] ULLMAN N A, BURCHARD P R, DUNNE R F, et al. Immunologic strategies in pancreatic cancer: making *Cold* tumors *Hot*[J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(24): 2789-2805. DOI: 10.1200/JCO.21.02616.
- [15] OHKI S, SHIBATA M, GONDA K, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation and hypoproteinemia in patients with cancer[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2): 453-458. DOI: 10.3892/or.2012.1812.
- [16] GABITASS R F, ANNELS N E, STOCKEN D D, et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(10): 1419-1430. DOI: 10.1007/s00262-011-1028-0.
- [17] DIAZ-MONTERO C M, SALEM M L, NISHIMURA M I, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2009, 58(1): 49-59. DOI: 10.1007/s00262-008-0523-4.
- [18] JOSHI S, SHARABI A. Targeting myeloid-derived suppressor cells to enhance natural killer cell-based immunotherapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 235: 108114. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108114.
- [19] WANG Y, ZHANG X, YANG L, et al. Blockade of CCL2 enhances immunotherapeutic effect of anti-PD1

- in lung cancer[J]. *J Bone Oncol*, 2018, 11: 27-32. DOI: 10.1016/j.jbo.2018.01.002.
- [19] FLORES-TORO J A, LUO D, GOPINATH A, et al. CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(2): 1129-1138. DOI: 10.1073/pnas.1910856117.
- [20] LESOKHIN A M, HOHL T M, KITANO S, et al. Monocytic CCR2⁺ myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(4): 876-886. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1792.
- [21] GREENE S, ROBBINS Y, MYDLARZ W K, et al. Inhibition of MDSC trafficking with SX-682, a CXCR1/2 inhibitor, enhances NK-cell immunotherapy in head and neck cancer models[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(6): 1420-1431. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2625.
- [22] MOK S, KOYA R C, TSUI C, et al. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(1): 153-161. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1816.
- [23] HOLMGAARD R B, ZAMARIN D, LESOKHIN A, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells with colony stimulating factor-1 receptor blockade can reverse immune resistance to immunotherapy in indoleamine 2, 3-dioxygenase-expressing tumors[J]. *EBioMedicine*, 2016, 6: 50-58. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.024.
- [24] WANG C, ZHENG X, ZHANG J, et al. CD300ld on neutrophils is required for tumour-driven immune suppression[J]. *Nature*, 2023, 621(7980): 830-839. DOI: 10.1038/s41586-023-06511-9.
- [25] YUAN S, MU W, LIU S, et al. Transforming cancer-associated fibroblast barrier into drug depots to boost chemo-immunotherapy in “shooting fish in a barrel” pattern[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(14): 13611-13626. DOI: 10.1021/acsnano.3c02272.
- [26] KOMOHARA Y, TAKEYA M. CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment[J]. *J Pathol*, 2017, 241(3): 313-315. DOI: 10.1002/path.4824.
- [27] CHEN F H, FU S Y, YANG Y C, et al. Combination of vessel-targeting agents and fractionated radiation therapy: the role of the SDF-1/CXCR4 pathway[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(4): 777-784. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.02.036.
- [28] JIANG K, LI J, ZHANG J, et al. SDF-1/CXCR4 axis facilitates myeloid-derived suppressor cells accumulation in osteosarcoma microenvironment and blunts the response to anti-PD-1 therapy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105818. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105818.
- [29] SCHIMANSKI C C, BAHRE R, GOCKEL I, et al. Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(2): 210-217. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603251.
- [30] DENG Y, CHENG J, FU B, et al. Hepatic carcinoma-associated fibroblasts enhance immune suppression by facilitating the generation of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(8): 1090-1101. DOI: 10.1038/onc.2016.273.
- [31] BOCKORNY B, SEMENISTY V, MACARULLA T, et al. BL-8040, a CXCR4 antagonist, in combination with pembrolizumab and chemotherapy for pancreatic cancer: the COMBAT trial[J]. *Nat Med*, 2020, 26(6): 878-885. DOI: 10.1038/s41591-020-0880-x.
- [32] SEO Y D, JIANG X, SULLIVAN K M, et al. Mobilization of CD8⁺ T cells via CXCR4 blockade facilitates PD-1 checkpoint therapy in human pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(13): 3934-3945. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0081.

[本文编辑] 孙 岩