



# 转录因子 Runx3 对维持 T 细胞记忆表型的影响

高佳东, 吕正兵, 钱 程

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 为了探究转录因子 Runx3 在人外周血 T 细胞中的功能, 通过检测 T 细胞亚群中该基因的表达差异, 并在过表达 *Runx3* 基因后分析 T 细胞亚群分布, 进一步比较抑制性受体和下游基因的表达差异。结果表明: *Runx3* 主要表达于初始 T 细胞亚群中, 与对照组相比, 过表达 *Runx3* 可显著提高 T 记忆干细胞比例, 且 PD1、Tim3 以及 Lag3 的表达显著降低; RT-qPCR 结果表明, *Runx3*-T 细胞中 *Blimp1* 表达显著降低, *SIRT1* 表达显著升高。因此, *Runx3* 蛋白可能通过调控 T 细胞分化和维持记忆表型相关基因 *Blimp1* 和 *SIRT1* 来提高 T 记忆干细胞比例, 从而能够维持 T 细胞功能, 延缓其衰竭。研究结论可为改进 T 细胞免疫疗法提供了重要的理论依据。

**关键词:** Runx3; T 细胞; 记忆干细胞; 抑制性受体; 分化

中图分类号: Q28

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2021)05-0423-07

## The effect of transcription factor Runx3 on maintaining the memory phenotype of T cells

GAO Jiadong, LÜ Zhengbing, QIAN Cheng

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** In order to explore the function of the transcription factor Runx3 in T cells in human peripheral blood, this paper examines the expression differences of this gene in T cell subsets, analyzes the distribution of T cell subsets after overexpression of Runx3 gene, and compares the expression difference between inhibitory receptor and downstream gene. The results show that *Runx3* is mainly expressed in naive T cell subsets. Compared with the control group, overexpression of Runx3 can dramatically increase the ratio of T memory stem cell and reduce the expressions of PD1, Tim3 and Lag3. RT-qPCR results show that the expression of *Blimp1* in Runx3-T cells significantly decreases, while the expression of *SIRT1* significantly increases. Therefore, Runx3 protein probably increase the ratio of T memory stem cells by regulating the differentiation of T cells and maintaining genes *Blimp1* and *SIRT1* related to memory phenotype, so as to maintain the functions of T cells and delay their failure. This study provides an important theoretical basis for improving T cell immunotherapy.

**Key words:** Runx3; T cell; memory stem cell; inhibitory receptor; differentiation

## 0 引 言

T 细胞是人体免疫系统的重要组成部分, 基于 T 细胞开展的免疫细胞疗法是当今临床医学的研究

热点之一, 尤其是嵌合抗原受体设计的 T 细胞疗法 (CAR-T) 和 T 细胞受体免疫疗法 (TCR-T) 已被证明在治疗肿瘤中具有良好效果, 但仍存在易复发的不足<sup>[1]</sup>。易复发是 T 细胞免疫疗法存在的主要问

收稿日期: 2020-09-02 网络出版日期: 2021-02-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFC1303405)

作者简介: 高佳东 (1994—), 男, 浙江杭州人, 硕士研究生, 主要从事细胞免疫治疗方面的研究。

通信作者: 钱 程, E-mail: cqian8634@gmail.com

题之一,提高 T 细胞的存续能力是解决易复发的举措之一<sup>[2]</sup>。T 细胞存续能力是指 T 细胞在肿瘤组织中存活并发挥功能的能力,而降低 T 细胞分化程度,是提高 T 细胞存续能力的手段之一<sup>[3]</sup>。

存活期长、具有自我更新能力的记忆 T 细胞是适应性免疫系统对病原体和肿瘤作出二次免疫应答的一个关键因素<sup>[4]</sup>。大多数效应 T 细胞在杀伤后凋亡,而记忆 T 细胞存活期更长,可达数年,接受相同抗原刺激后可迅速活化,并分化为效应 T 细胞,再次介导免疫应答<sup>[5]</sup>。记忆 T 细胞中的 T 记忆干细胞(T memory stem cell, Tscm)细胞是一种分化程度较低的 T 细胞亚群,其在细胞功能上类似于初始 T 细胞(T native cell, Tn)细胞,具有较高的自我更新能力和多潜能性,并能够分化成中央记忆 T 细胞(Central memory cell, Tcm)、效应记忆 T 细胞(T effector memory cell, Tem),且存活能力、抗肿瘤活性均高于 Tcm 和 Tem<sup>[6]</sup>。抗原特异性 Tscm 在抗原消除后优先存活,并长期稳定存在<sup>[7]</sup>,一个长寿命的 Tscm 细胞在没有死亡或分化的情况下大约能存活 12 年<sup>[5]</sup>,因此,Tscm 可以作为体现 T 细胞存续能力的指标之一。

Runx3 蛋白是 T 细胞发育途径中重要调控因子,作为 Runx 转录因子家族的重要成员,Runx3 可结合到目的基因的增强子和启动子中的核心 DNA 序列,激活或抑制转录下游靶基因<sup>[8-10]</sup>。在 T 细胞发育过程中,Runx3 主要参与前 T 细胞的发育,Runx3 和 ThPOK 交叉拮抗调节是 T 细胞分化为辅助细胞和细胞毒性谱系的关键,Runx3 负责在 CD8<sup>+</sup> T 细胞中建立 CD4 沉默<sup>[11]</sup>。在 T 细胞活化后,Runx3 参与维持 CD8<sup>+</sup> 效应 T 细胞(T effector cell, Te)发挥细胞毒性功能<sup>[12]</sup>,但其分子调控机制

仍不明确。本文通过分析 Runx3 在不同 T 细胞亚群中的表达差异,进一步探究 Runx3 在 T 细胞中的功能,期望为改进 T 细胞的免疫疗法提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

pL-luc-2A-GFP 质粒由本实验室保存;Runx3 cDNA ORF Clone-Human 购于北京义翘神州科技有限公司;PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase、DNA 连接酶、PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 购于 TaKaRa 公司;Endo-Free Plasmid Maxi Kit 购于 Omerga 公司;FastDigest *Nhe*I、FastDigest *Eco*RI、M-PER<sup>™</sup> Mammalian Protein Extraction Reagent 购于 Thermo 公司;琼脂糖购于上海生工生物工程股份有限公司;PCR 引物购于南京金斯瑞生物科技有限公司(PCR 和 RT-qPCR 的引物序列分别见表 1 和表 2);Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System、GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix 购于 Promega 公司;Runx3 抗体(R3-5G4)购于 Santa Cruz 公司;PE/Cy7 anti-human CD3、Brilliant Violet 510<sup>™</sup> anti-human CD8、Brilliant Violet 421<sup>™</sup> anti-human CD45RA、PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD45RO、Brilliant Violet 605<sup>™</sup> anti-human CD62L、Brilliant Violet 711<sup>™</sup> anti-human CD95 (Fas)、PE anti-human CD197 (CCR7)、APC anti-human CD366 (Tim-3)、Brilliant Violet 421<sup>™</sup> anti-human CD223 (Lag-3)、PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD279 (PD-1)均购于 Biolegend 公司;BUV395 Mouse Anti-Human CD4 购于 BD 公司。

表 1 PCR 引物序列

引物名称	序列
<i>Nhe</i> I-Runx3-F	CTAGCTAGCATGCGTATTCCCGTAGACCCAAGCACCAGCCGC
<i>Eco</i> RI-Runx3-R	CCGGAATTCGTAGGGCCGCCACACGGC

表 2 RT-qPCR 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增子
<i>GAPDH</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	131 bp
<i>Runx3</i>	GGCAATGACGAGAAGTACTCCG	GATGGTCAGGGTGAAACTCTTCC	123 bp
<i>ITGAL</i>	CTGCTTTTGCCAGCCTCTCTGT	GCTCACAGGTATCTGGCTATGG	117 bp
<i>SPP1</i>	CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG	GCACCATCAACTCCTCGCTTTC	146 bp
<i>GATA3</i>	ACCACAACCACACTCTGGAGGA	TCGGTTTCTGGTCTGGATGCCCT	128 bp
<i>CD103</i>	GACATGGATGGAAGCACGGACT	CTCAGTATGCGTGCCAAGGAGA	132 bp
<i>Blimp1</i>	CAGTTCCTAAGAACGCCAACAGG	GTGCTGGATTACATAGCGCATC	131 bp
<i>SIRT1</i>	TAGACACGCTGGAACAGGTTGC	CTCCTCGTACAGCTTCACAGTC	129 bp

## 1.2 方法

### 1.2.1 pL-Runx3-2 A-GFP 过表达载体的构建

*NheI-Runx3-EcoRI* 基因片段由 Runx3 cDNA ORF Clone-Human 质粒载体通过 PCR 获得, 共计 1263 bp, 将 *NheI-Runx3-EcoRI* 基因片段和慢病毒载体 pL-luc-2A-GFP 用 *NheI*、*EcoRI* 双酶切, 分别切胶回收目的片段, 在 16 °C 连接, 转化感受态细胞后, 涂布于含浓度为 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体平板上, 37 °C 培养过夜后, 通过挑选单克隆、酶切验证后进行测序鉴定重组载体 pL-Runx3-2A-GFP (8438 bp)。

### 1.2.2 慢病毒制备及 T 细胞的感染

10% FBS 的 DMEM 完全培养基培养 293T 细胞, 取含  $1 \times 10^7$  个 293T 细胞液约 8 mL, 铺于 10 cm 培养皿中, 过夜培养。转染前 2 h, 弃培养基加 5 mL 5% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。将 13  $\mu\text{g}$  混合包装质粒(RRE、REV、2G 质粒体积比为 4:3:6)和 25  $\mu\text{g}$  目的质粒, 轻柔混匀, 再向混合液中加入 60  $\mu\text{L}$  2.5 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$ , 用去离子水补足至 600  $\mu\text{L}$ 。将 600  $\mu\text{L}$  的 2 $\times$  HBS 缓冲液逐滴加入质粒溶液中充分混匀, 37 °C 静置 3 min 将混合液加至预先温育的 5 mL DMEM 培养基中, 混匀 37 °C 静置 4 min, 将混合液轻柔倒入培养皿中, 混匀后 37 °C 培养。4 h 后弃去细胞上清, 换成含 5% FBS 的 DMEM 完全培养基继续培养。培养 48 h 后, 收集细胞上清 1000 r/min 室温离心 5 min 后过滤, 加入 2.5 mL 50% 的 PEG6000、950  $\mu\text{L}$  4 mol/L 的 NaCl, 4 °C 静置 2 h 后 1000 r/min, 4 °C 离心 1 h, 取 200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬病毒, 取 1  $\mu\text{L}$  感染  $1 \times 10^5$  个 CHO 细胞使用流式的方法检测滴度。用 Beads 活化人外周血来源的 PBMC 细胞, 24 h 后加入等量 Runx3 病毒以感染 T 细胞, 并加入聚凝胺以提高感染率, 培养 24 h 后换液(10%FBS 的 1640 培养基+双抗+25 ng/mL 的 IL7、IL15、IL21), 于 37 °C 培养箱继续培养。

### 1.2.3 流式细胞术检测阳性率

在病毒感染第 10 天检测 Runx3-T 的阳性率, 以不加病毒的 T 细胞为对照组, 分别取含  $5 \times 10^5$  个细胞的培养液 1 mL, 1000 r/min 室温离心 5 min 后弃上清, 用 PBS 清洗 1 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  1% 的 FBS 的 PBS 重悬, 加 2  $\mu\text{L}$  所需要抗体孵育 30 min, 中途每隔 10 min 摇晃一次以充分孵育。加 1 mL PBS 清洗 1 次, 1000 r/min 室温离心 5 min 后用 200  $\mu\text{L}$  1%FBS 的 PBS 重悬, 转移至流式上样管,

上机检测。

### 1.2.4 蛋白提取及 Western blot 分析

取  $1 \times 10^6$  个细胞用 PBS 清洗后加入 M-PER 裂解液(预加蛋白酶抑制剂), 冰浴 30 min 后 14000 r/min, 4 °C 离心 5 min 收上清; 按照 4:1 比例加入 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 100 °C 变性 10 min。配置 10% 的 SDS-PAGE 胶, 100 V 恒压电泳 2 ~ 3 h 后, 300 mA 恒流 100 min 将蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, PBST 洗净浮色后剪下目的条带, 分别用 Runx3(1:200)和 GAPDH(1:2000)一抗 4 °C 孵育过夜。次日用 PBST 清洗后, 于摇床上室温孵育 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5000)1 h, PBST 清洗后加显色液上机拍照保存。

### 1.2.5 总 RNA 的提取

取含  $1 \times 10^6$  个细胞的细胞悬液 1 mL 于 RNase 和 DNase I Free 的离心管中 1000 r/min 室温离心 5 min 弃去上清, 加入 1 mL trizol 裂解细胞, 室温静置 5 min 后加入 trizol 的 1/5 体积量的氯仿, 剧烈振荡, 室温静置 5 min。12000 r/min, 4 °C 离心 15 min 吸取上清液加入等体积的异丙醇, 混匀后静置 10 min。12000 r/min, 4 °C 离心 10 min 后弃上清, 加入 DEPC 水稀释的 75% 乙醇 1 mL, 12000 r/min, 4 °C 离心后弃上清。室温自然晾干沉淀, 加入 20  $\mu\text{L}$  的 RNase-free 水溶解沉淀, -80 °C 保存。

### 1.2.6 cDNA 制备和实时荧光定量 PCR 分析

去除基因组 DNA 反应体系: 1  $\mu\text{g}$  RNA, 2  $\mu\text{L}$  5 $\times$  gDNA Eraser Buffer, 1  $\mu\text{L}$  gDNA Eraser, RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  补足 10  $\mu\text{L}$ , 室温反应 5 min。逆转录反应体系: 上一步反应液 10  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  PrimeScript RT Enzyme Mix I, 1  $\mu\text{L}$  RT Primer Mix, 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  PrimeScript Buffer 2 (for Real Time), 4  $\mu\text{L}$  RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$ , 反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 35 s。实时荧光定量 PCR 反应体系: 5  $\mu\text{L}$  2 $\times$  GoTaq  $\text{qPCR}$  Master Mix, 0.2  $\mu\text{L}$  上游引物, 0.2  $\mu\text{L}$  下游引物, 0.1  $\mu\text{L}$  100 $\times$  CXR, 4.5  $\mu\text{L}$  cDNA 模板。反应条件: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 40 个循环。

### 1.2.7 统计学分析

数据采用 Graphpad Prism 8 统计学软件进行 *t* 检验分析, 以  $p < 0.05$  为显著差异, 具有统计学意义。

## 2 结果分析

### 2.1 Runx3 在 T 细胞亚群中的表达水平

Runx3 可能与 T 细胞分化相关<sup>[13]</sup>, 本文对分离的

T 细胞进行体外培养,通过流式细胞仪观察分析细胞的分化表型,结果如图 1(a)所示。由图 1(a)可知,检测不同培养天数的 T 细胞亚群分布(Tn:CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD95<sup>-</sup>、Tscm:CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>、类 T 记忆干细胞,T memory stem-like cell, Tscm-like:CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>、Tcm:CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD197<sup>+</sup>、Tem:CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup>、Te:CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CD197<sup>-</sup>),结果发现 T 细胞在体外培养状态下会经历逐级分化,其中 Tn 在活化前占比最高,Tscm 比例在培养第 7 天达到高峰,Tscm-like 和 Tcm 比例在培养第 9 天达到高峰,Tem 和 Te 在培养第 17 天达到高峰。接着通过 RT-qPCR 检测 *Runx3* 在 T 细胞活化前及培养第 5、10 天和 15 天不同分化时间的表达,结果用 *Runx3* 比对内参 GAPDH 相对表达倍数表示,结果如图 1(b)所示。图 1(b)显示:T 细胞在活化前 *Runx3* 表达较高,活化后 *Runx3* 表达量下调。取未活化 T 细胞(0 d)分别分选 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Tn,T 细胞培养第 9 天分别分选 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞门下 Tscm、Tscm-like 和 Tcm,T 细胞培养第 17 天分别分选 CD3<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞门下 Tem 和 Te,并通过 RT-qPCR 检测上述亚群细胞中 *Runx3* 相对表达倍数,初始 T 细胞中的 *Runx3* 表达高于其他亚群,初始 T 细胞中的 *Runx3* 表达均高于其他亚群(图 1(c)–(e))。以上结果说明外周血来源的 T 细胞中,*Runx3* 主要表达于 Tn 细胞亚群中。

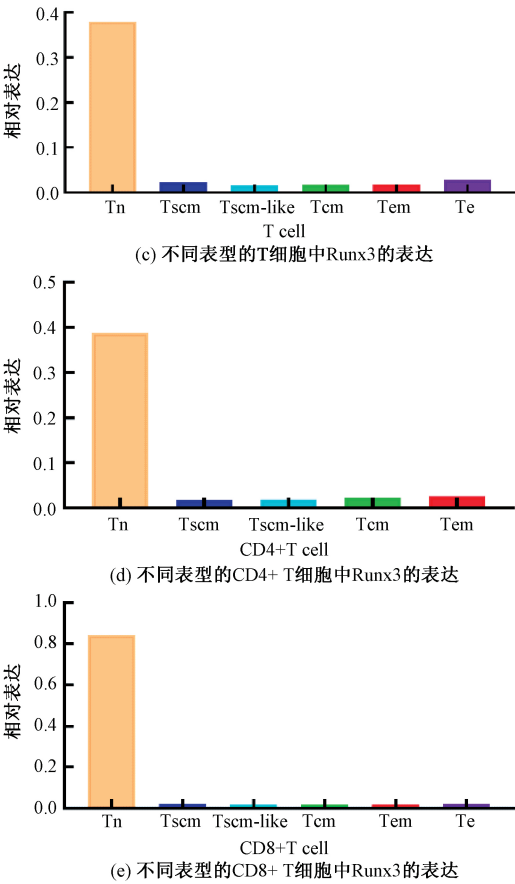
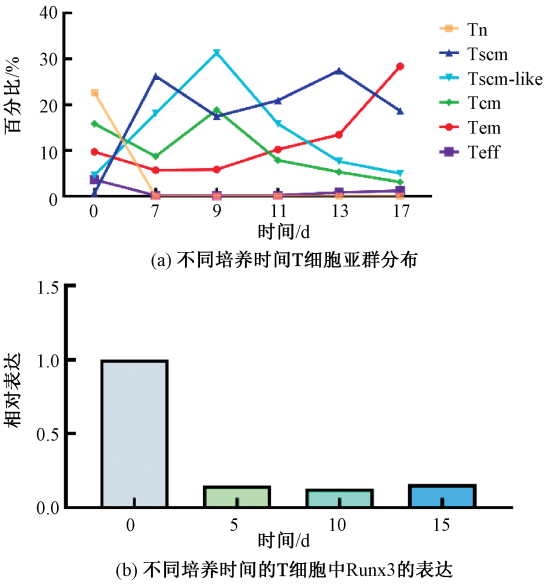


图 1 *Runx3* 在不同培养时间和不同表型中的相对表达量

2.2 *Runx3* 过表达载体的构建和病毒包装

由于 *Runx3* 在低分化状态的 T 细胞中高表达,为了探究 *Runx3* 是否有利于改善 T 细胞的功能,本文在 T 细胞中进行 *Runx3* 的外源表达。为了方便指示 *Runx3* 的表达,选择 *Runx3* 和 GFP 共表达系统,*Runx3* 和 GFP 之间选择自剪切多肽 P2A 连接,*Runx3* 基因通过 PCR 在 5' 和 3' 两端分别添加 *Nhe*I 和 *Eco*RI 酶切位点,并与 pL-luc-2A-GFP 表达载体通过酶切、连接、转化等分子克隆技术,构建得到 pL-*Runx3*-2A-GFP 表达载体,大小为 8438 bp (见图 2(a))。构建得到的质粒分别通过 *Nhe*I、*Eco*RI 双酶切验证(见图 2(b))。将构建获得的 pL-*Runx3*-2A-GFP 表达载体进行慢病毒包装及纯化,并感染 CHO 细胞检测病毒滴度为  $6.66 \times 10^8$  个/mL。病毒感染 293T 细胞 2 d 后提取蛋白,通过流式细胞术和 Western blot 检测均验证能检出 *Runx3* 蛋白的表达(图 2(c)),表明成功获得 *Runx3* 过表达慢病毒。



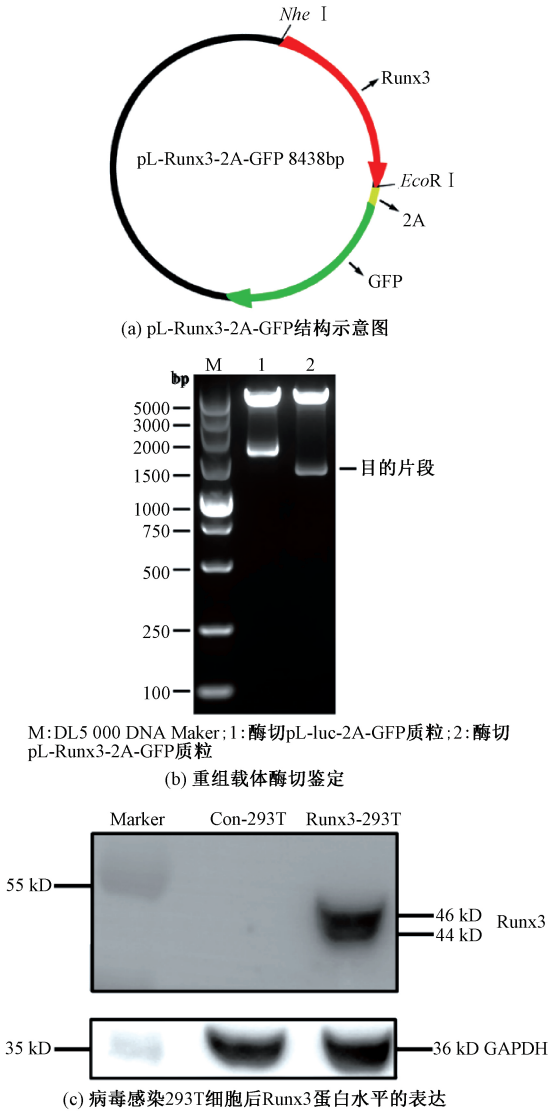
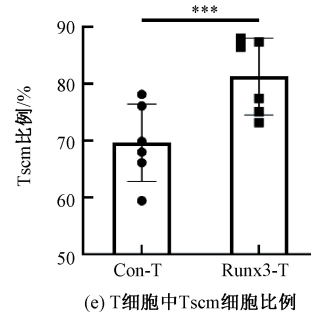
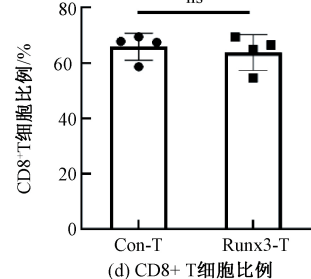
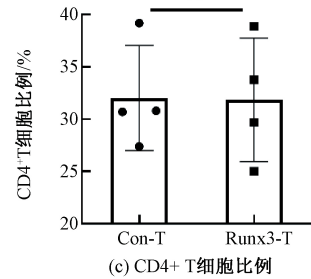
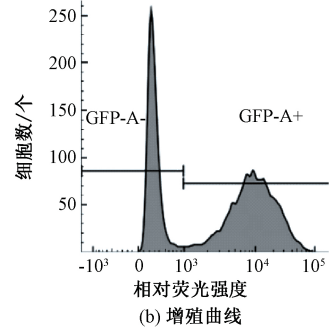
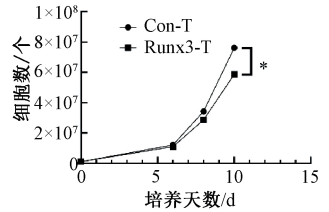


图 2 pL-Runx3-2A-GFP 过表达载体构建和蛋白检测

### 2.3 过表达 Runx3 对 Tscm 细胞表型维持的影响

病毒感染 T 细胞后通过流式细胞术检测带有 GFP 标签蛋白的 Runx3,其表达率为 62.2%,其命名为 Runx3-T(图 3(a))。Runx3-T 细胞在培养第 6、8 天和 10 天进行细胞计数,结果如图 3(b)所示。图 3(b)表明,Runx3-T 细胞增殖速度显著低于对照组,与 Wang 等<sup>[14]</sup>在 CD8<sup>+</sup> T 细胞上过表达 Runx3 发现增殖速度降低的结果相一致。为了进一步探究过表达 Runx3 对 T 细胞的影响,通过流式细胞术检测 T 细胞中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞比例和 T 细胞亚群分布,结果显示实验组和对照组中 CD4<sup>+</sup> 细胞、CD8<sup>+</sup> 细胞比例无显著差异,说明 Runx3 过表达不影响 T 细胞 CD4 和 CD8 的表达(图 3(c)—(d))。T 细胞亚群分布显示(图 3(e)),与对照组相比,T 细胞中过表达 Runx3 后 Tscm 亚群比例显著升高。

为了确认 Runx3 过表达是否仅提高某一亚群细胞中 Tscm 比例,进一步检测 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞亚群中 Tscm 细胞比例(图 3(f)—(e))。以上结果说明在外周血来源的 T 细胞中过表达 Runx3 能影响 T 细胞表型,提高 Tscm 细胞比例,有利于维持 T 细胞的记忆表型。



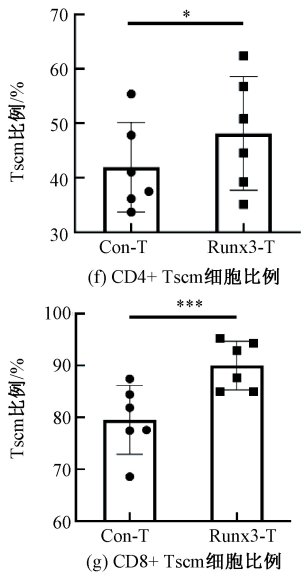


图3 Runx3 过表达对 T 细胞的表型的影响  
注:ns 表示  $p>0.05$ , \* 表示  $p<0.05$ ,\*\*\*表示  $p<0.001$ 。

2.4 Runx3 的过表达对 T 细胞抑制性受体表达的影响

Tim3、Lag3、PD1 是 T 细胞维持低分化状态的指标<sup>[15-17]</sup>,本文采用流式细胞术检测了 T 细胞在外源表达 Runx3 前后上述抑制性受体的表达,结果如图 4 所示。由图 4 可知,Runx3-T 组 Tim3、Lag3、PD1 表达量均显著低于对照组,Runx3-T 组三阴细胞比例显著高于对照组,单阳、双阳(PD1<sup>+</sup> Lag3<sup>+</sup>、PD1<sup>+</sup> Tim3<sup>+</sup>、Lag3<sup>+</sup> Tim3<sup>+</sup>)、三阳表达比例均显著低于对照组。以上结果表明,在来源于外周血 T 细胞中,过表达 Runx3 能够降低 T 细胞表面抑制性受体的表达,从而有利于延缓 T 细胞衰竭,进一步维持 T 细胞功能。

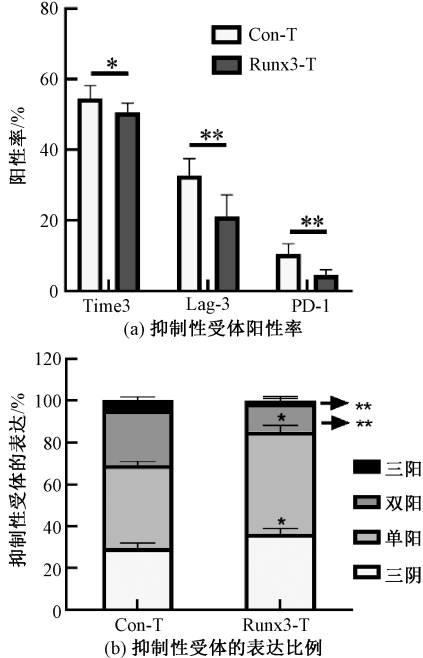


图4 T 细胞抑制性标志物的表达  
注: \* 表示  $p<0.05$ , \*\* 表示  $p<0.01$ 。

2.5 Runx3 对记忆表型维持相关基因 *Blimp1*、*SIRT1* 表达的影响

为探讨 Runx3 提高记忆细胞表型的可能途径,本文通过 RT-qPCR 检测了 Runx3 相关靶基因 (*ITGAL*、*SPP1*、*GATA3*、*CD103*、*Blimp1* 和 *SIRT1*)<sup>[18-23]</sup>,结果如图 5 所示。图 5 结果表明,Runx3-T 细胞中 *ITGAL*、*SPP1*、*GATA3*、*CD103* 的表达与对照组无显著差异( $p>0.05$ )。而相比对照组,Runx3-T 细胞中 *Blimp1* 表达显著降低( $p$  为 0.04), *SIRT1* 表达显著升高( $p$  为 0.012)。 *Blimp1* 和 *SIRT1* 均与 T 细胞的分化与记忆表型维持相关,*Blimp1* 是 CD8<sup>+</sup> 效应 T 细胞终末分化的主调控因子,*Blimp1* 缺陷的 CD8<sup>+</sup> T 细胞无法分化为终末端分化细胞,优先分化为记忆细胞<sup>[24-25]</sup>。 *SIRT1* 表达上调可维持 T 细胞低分化程度,延缓 T 细胞衰竭<sup>[26]</sup>。以上结果表明,Runx3 可能通过调控下游基因 *Blimp1* 和 *SIRT1* 影响 T 细胞表型,使 T 细胞中 Tscm 细胞占比提高。上述结果表明在 T 细胞中过表达 Runx3 可降低 T 细胞中 PD-1、Tim-3 以及 Lag3 的表达,从而维持 T 细胞功能,延缓 T 细胞衰竭。Runx3 过表达下调 *Blimp1*,上调 *SIRT1*,从而降低 T 细胞分化程度。

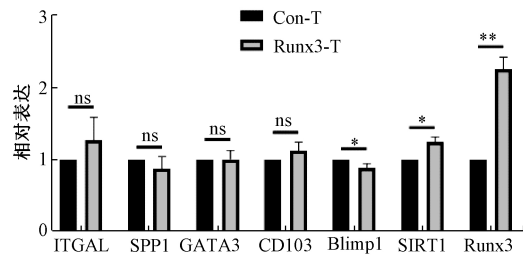


图5 Runx3 靶基因 RNA 水平表达

3 结 论

本文测定 Runx3 在不同 T 细胞亚群中的表达差异,并进一步过表达 Runx3 基因,分析 Runx3 在 T 细胞中的功能,主要结论如下:

- a) Runx3 蛋白主要表达于 Tn 细胞亚群中。
- b) T 细胞中过表达 Runx3 可通过下调 *Blimp1* RNA 水平,上调 *SIRT1* RNA 水平进一步促进 T 细胞更趋向 Tscm 表型。
- c) T 细胞中过表达 Runx3 可降低 T 细胞上 PD-1、Tim-3 以及 Lag3 的表达,从而维持 T 细胞功能,延缓 T 细胞衰竭。

Runx3 可促进 T 淋巴细胞趋向 Tscm 细胞,优化 T 细胞功能,对于基于人外周血 T 细胞开展的免

疫细胞治疗具有重要意义,在免疫细胞中过表达 Runx3 可提高其在体内的存续能力以及更好的维持 T 细胞功能。本文结果有望为优化基于外周血 T 细胞的免疫疗法研究提供科学依据。

### 参考文献:

- [1] Li S, Yang Z, Shen J, et al. Adoptive therapy with CAR redirected T cells for hematological malignancies [J]. *Science China-Life Sciences*, 2016, 59(4): 370-378.
- [2] Mohty M, Gautier J, Malard F, et al. CD19 chimeric antigen receptor-T cells in B-cell leukemia and lymphoma: current status and perspectives [J]. *Leukemia*, 2019, 33(12): 2767-2778.
- [3] 郑敏, 张岚. CAR-T 抗肿瘤研究的现状及展望[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2016, 54(11): 1-7.
- [4] Kumar B, Connors T, Farber D. Human T cell development, localization, and function throughout life [J]. *Immunity*, 2019, 48(2): 202-213.
- [5] Costa P, Lahoz-beneytez J, Boelen L, et al. Human T<sub>scm</sub> cell dynamics in vivo are compatible with long-lived immunological memory and stemness [J]. *PLOS Biology*, 2018, 16(6): 1-22.
- [6] Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties [J]. *Nature Medicine*, 2011, 17(10): 1290-1297.
- [7] Lugli E, Dominguez M, Gattinoni L, et al. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(2): 594-599.
- [8] Li Q, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of Runx3 expression and gastric cancer [J]. *Cell*, 2002, 109(1): 113-124.
- [9] Levanon D, Bettoun D, Harris-cerruti C, et al. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons[J]. *EMBO Journal*, 2002, 21(13): 3354-3363.
- [10] Collins A, Littman D, Taniuchi I. Runx proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2014, 9(2): 106-115.
- [11] Issuree P, Ng C, Littman D. Heritable gene regulation in the CD4: CD8 T cell lineage Choice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8(291): 118-132.
- [12] Shan Q, Zeng Z, Xing S, et al. Runx3 guards cytotoxic CD8<sup>+</sup> effector T cells against deviation towards T<sub>FH</sub> cell lineage[J]. *Nature Immunology*, 2017, 18(8): 931-939.
- [13] Nowyhed H, Huynh T, Blatchley A, et al. The nuclear receptor Nr4a1 controls CD8 T cell development through transcriptional suppression of Runx3[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 9059.
- [14] Wang D, Diao H, Getzler AJ, et al. The transcription factor Runx3 establishes chromatin accessibility of cis-regulatory landscapes that drive memory cytotoxic T lymphocyte formation[J]. *Immunity*, 2018, 48(4): 659-674.
- [15] Wolf Y, Anderson A, Kuchroo V. Tim3 comes of age as an inhibitory receptor [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2019, 20(3): 173-185.
- [16] Hui E, Cheung J, Zhu J, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition[J]. *Science*, 2017, 355(6332): 1428-1433.
- [17] Anderson A, Joller N, Kuchroo V. Lag-3, Tim-3, and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation[J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 989-1004.
- [18] Capece T, Walling B, Lim K, et al. A novel intracellular pool of LFA-1 is critical for asymmetric CD8<sup>+</sup> T cell activation and differentiation[J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(11): 3817-3829.
- [19] Abel B, Freigang S, Bachmann MF, et al. Osteopontin is not required for the development of Th1 responses and viral immunity[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(9): 6006-6013.
- [20] Renkl A, Wussler J, Ahrens T, et al. Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype[J]. *Blood*, 2005, 106(3): 946-955.
- [21] Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, et al. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN $\gamma$  in memory-type Th2 cells [J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 273-285.
- [22] Ho I, Tai T, Pai S. GATA3 and the T-cell lineage: Essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9(2): 125-135.
- [23] Hu X, Li Y, Li Q, et al. ITGAE defines CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes predicting a better prognostic survival in colorectal cancer [J]. *EBio Medicine*, 2018, 35(1): 178-188.
- [24] Crotty S, Johnston R, Schoenberger S. Effectors, and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(2): 114-120.
- [25] Kallies A, Xin A, Belz G, et al. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8<sup>+</sup> T cells and memory responses[J]. *Immunity*, 2009, 31(2): 283-295.
- [26] Kuroda S, Yamazaki M, Abe M, et al. Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation via Sirt1 expression[J]. *PNAS*, 2011, 108(36): 14885-14889.

(责任编辑:唐志荣)