doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.10.003

### CD39的临床意义及其与肝癌浸润 T 细胞耗竭的相关性分析\*

肖淑秀<sup>1</sup> 林志远<sup>2</sup> 宋正清<sup>1</sup> 姚梦菲<sup>3</sup> 卢莉莉<sup>1</sup>△ (1复旦大学附属中山医院生物治疗中心 上海 200032;2 复旦大学附属中山医院泌尿外科 上海 200032; 3 复旦大学附属中山医院核医学科 上海 200032)

摘要 目的:探索 CD39 分子(编码基因 ENTPD1)在原发性肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达、临床意义及其 与 HCC 中免疫浸润和 T 细胞耗竭的相关性。方法:TIMER、GEPIA、Kaplan-Meier Plotter、TCGA 等数据库分析 CD39 在肝癌中的 差异性表达、与免疫浸润的关系、相关基因的表达及其与肝癌患者预后的关系。免疫荧光染色、细胞测序和流式检测验证临床 HCC 患者的癌及癌旁组织中 CD39 的差异性表达及其和 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭特性的相关性。结果:(1) 生物信息学分析结果显示: CD39 在多种肿瘤组织中表达上调(包括 HCC)(P<0.05);且其表达水平与 HCC 的临床预后等显著相关(P<0.05);与 CD39 低表 达组相比, HCC 中 CD39 高表达组患者无复发生存期(relapse-free survival, RFS)(P=0.025)和无进展生存期(progression-free survival, PFS)(P=0.026)较短;CD39 与 HCC 肿瘤微环境中 CD8<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、巨噬细胞等免疫细胞浸润水平均有明显正相关。(2)临床 HCC 样本验证:免疫荧光和流式结果显示 CD39 在癌组织中的表达水平高于癌旁正常组织,与耗竭相关分子 LAYN、TIM3、CT-LA4 等共表达,且在耗竭 CD8<sup>+</sup>T 细胞中表达比例显著高于非耗竭细胞。结论:CD39 在 HCC 肿瘤组织及浸润的 CD8<sup>+</sup>T 细胞中高 表达,与 HCC 的 RFS、PFS、免疫细胞浸润等紧密相关,且参与 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭。

关键词:肝癌;CD39;CD8<sup>+</sup>T细胞耗竭;生信分析

中图分类号:R-33;R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)10-1815-07

## Analysis of CD39 Clinical Significance Hepatocellular Carcinoma and Its Correlation with T Cell Exhaustion\*

XIAO Shu-xiu<sup>1</sup>, LIN Zhi-yuan<sup>2</sup>, SONG Zheng-qing<sup>1</sup>, YAO Meng-fei<sup>3</sup>, LU Li-li<sup>1</sup>

(1 Clinical Center for Biotherapy, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China;

2 Department of Urology Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China;

3 Department of Nuclear Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the expression and clinical significance of CD39 (encoding gene ENTPD1) in Hepatocellular carcinoma and its correlation with immune infiltration and T cell exhaustion in HCC tumor microenvironment. **Methods:** The mRNA expression of CD39 in HCC and its correlation with immune infiltration, correlated genes and prognosis of HCC were assessed by TIMER, GEPIA, Kaplan-Meier Plotter databases. The differential expression of CD39 in HCC specimens and its relationship with CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion were further verified by immunofluorescence, cell sequence and flow cytometry. **Results:** (1) Bioinformatics data showed that CD39 expression was upregulated in a variety of tumor tissues (including HCC) (P < 0.05). And its expression level was significantly related to the clinical prognosis of HCC. HCC patients with high expression of CD39 had shorter relapse-free survival (P=0.026) and progression-free survival (P=0.026) than those low expression group. The results of immune infiltration analysis indicated that CD39 expression level was positively correlated with the infiltration levels of CD8<sup>+</sup>T, CD4<sup>+</sup>T, and macrophages in HCC tumor microenvironment. (2) Immunofluorescence and flow cytometry results revealed that transcriptional and protein levels of CD39 were both higher in HCC tumors than adjacent tissues. And, CD39 was co-expressed with LAYN, TIM3 and CTLA4, and the expression level of CD39 in exhausted CD8<sup>+</sup>T cells was significantly higher than that in non-exhausted cells. **Conclusions:** CD39 is highly expressed in HCC tumor tissues and CD8<sup>+</sup>T cells, which is closely related to RFS, PFS and immune cell infiltration of HCC. And, CD39 participates in CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion process, which may be a potential immunotherapy target for HCC patients.

Key words: Hepatocellular carcinoma; CD39; CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion; Bioinformatics analysis Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.7 Document code: A Article ID: 1673-6273(2023)10-1815-07

<sup>\*</sup>基金项目:上海市科委 "科技创新行动计划 "扬帆计划项目(20YF1406100);上海市卫健委科研计划项目(20204Y0229)

作者简介:肖淑秀(1990-),女,技师,硕士,主要从事肝癌免疫基础研究,E-mail: 15800603991@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者: 卢莉莉(1989-), 女, 主管技师, 博士, 主要从事肝癌基础研究及免疫治疗临床研究工作, E-mail: lu.lili@zs-hospital.sh.cn (收稿日期: 2023-01-23 接受日期: 2023-02-17)

#### 前言

HCC 免疫微环境主要由各种免疫细胞和因子所构成,是 HCC 微环境研究的核心和重点,微环境的免疫失衡,是其重要 特征之一,且与不良预后紧密相关<sup>[12]</sup>。HCC 局部形成的免疫抑 制性微环境导致 T 细胞呈现增殖、抗肿瘤效应功能降低的耗竭 状态,促使肿瘤免疫逃逸及肿瘤恶性进展<sup>[34]</sup>。探究 T 细胞耗竭 的机制及研发新的生物标志物,以此逆转 T 细胞耗竭是近来肿 瘤免疫治疗的研究热点。

CD39(胞外核苷酸三磷酸二磷酸水解酶 1,由 ENTPD1 基 因编码)作为 ATP 代谢为腺苷(Adenosine)的关键分子,在多种 恶性肿瘤及各类免疫细胞(NK、CD8T等)中表达上调<sup>[5]</sup>。CD39 高表达被认为是不良预后和疾病进展的标志,低水平的 CD39+ Treg 与黑色素瘤患者的无复发生存率提高相关<sup>[68]</sup>。近来研究发 现,肺癌组织分离出的 CD39hi CD8+TIL 表达相关基因的水平 与细胞的增殖和耗竭相关,且低表达 TNF-α、IFN-γ<sup>[9-11]</sup>。CD39 可能是肿瘤特异性 CD8+TIL 和患者对 CD8+TIL 定向癌症免疫 疗法产生应答的预测生物标记物[12,13]。目前 CD39 在 HCC 中的 临床意义及与 T 细胞耗竭相关的的作用研究较少,探索 CD39 的功能和细胞耗竭特性对开发新的抗肿瘤策略具有重要的临 床意义。本文利用生信数据库及实验数据分析 CD39 在 HCC 中的差异表达,与免疫细胞、免疫分子浸润水平、细胞耗竭的相 关性,确定了 CD39 在 HCC 及 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭中的重要作用。 本研究为深入研究 HCC 中细胞耗竭的机理及耗竭逆转策略提 供理论支持。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

1.1.1 **主要试剂与仪器** 四型胶原酶,DNA 酶和透明质酸酶 均购于 Gibco 公司; 胎牛血清(FBS)购于 Gibco 公司; RPMI 1640 培养液和 LymGro 无血清淋巴细胞培养基购于上海源培 生物科技有限公司; Ficoll 淋巴细胞分离液,购于 GE Healthcare Life Sciences 公司; 流式检测抗体 CD3-Bv510、CD4-percpcy5.5、 CD8-APC、CD8-APC-Cy7、CTLA4-PE-Cy7、TIM3-PerCP-Cy5.5、 CD39-FITC、CD25-APC、CD127-PE 购于 Biolegend 公司; CD39 免疫荧光一抗抗体(兔抗人),荧光二抗(羊抗兔)均购于 Sino Biological 公司; 免疫荧光切片机、荧光显微镜等均来自上海徕 卡仪器有限公司; 流式细胞仪(BD FACS Canto II),来自 BD 公 司; 恒温水浴箱(ZSXH-625)和摇床来自上海智成分析仪器制 造有限公司; CO<sub>2</sub> 恒温培养箱和高速离心机,均来自 Thermo Fisher 公司。

1.1.2 临床标本 肝癌患者新鲜肿瘤组织样本及外周血取自 复旦大学附属中山医院肝脏外科,因诊断为肝癌,接受肝癌切 除术的原发性肝癌患者。所取癌组织为术中切除的病变组织, 经病理明确为 HCC;癌旁组织取自距肿瘤病灶 2 cm 以上的肝 脏组织,经病理确诊不含癌细胞。该研究经复旦大学附属中山 医院伦理委员会批准,严格遵循赫尔辛基宣言及政府相关的研 究要求。

#### 1.2 方法

1.2.1 生信分析 (1)TIMER 数据库分析 CD39 的差异性表

达和与免疫浸润的关系:登录 TIMER 数据库,进入 Gene De 子 文件,输入 ENTPD1 (CD39 的编码基因),提交得到 ENTPD1 在不同肿瘤组织及其对应的正常组织中的表达水平的差异结 果;选择 Gene 子目录,输入 ENTPD1 基因名,选择 LIHC,选择 purity adjustment 选项矫正肿瘤纯度,提交得到 HCC 中,ENTPD1 与CD8T、CD4T、DC、巨噬细胞等免疫细胞浸润水平的关系; 输入 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭相关的免疫分子如 "LAYN, CTLA4, HAVCR2(TIM3)",分析 ENTPD1 与耗竭分子的共表达情况和 相关性。(2)Kaplan-Meier Plotter 数据库生存分析 CD39 对 HCC 患者预后的临床意义:进入数据库,选择 HCC 目录,输入 ENTPD1(953), survival 依次选择 OS、PFS、RFS、DSS, 设定年 龄、性别、肿瘤分期等控制条件,提交得到 ENTPD1 表达水平的 高低对肝癌患者 OS、RFS、PFS 等的影响情况。分析采用 Log-rank 检验, 以 P<0.05 为具有显著性差异。(3)CD39 正负相 关基因筛选:利用 Linked Omics 数据库(http://www.linkedomics.org/), 选择靶点 "ENTPD1", "HCC" 肿瘤类型, TC-GA\_LIHC (RNAseq)数据集, Pearson Correlation test 统计分析 与 CD39 表达呈正、负相关的基因,以 P<0.01 为界值,正相关 基因 FDR 值设为 r>0.73, 负相关基因 FDR 值设为 r<-0.45。(4) TCGA 数据库分析癌及癌旁中 ENTPD1 表达水平差异:从 TC-GA数据库(http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/)中下载并预处理 mRNAseq 测序数据,共计具有完整随访记录的 417 例 HCC 患 者,统计分析癌及癌旁组织中 ENTPD1 mRNA 表达水平。

1.2.2 **肿瘤浸润淋巴细胞的分离** 获取手术切除的 HCC 患者 癌及癌旁组织,使用 75%医用酒精及 1 PBS 清洗组织 2 次,剪 去组织上的脂肪、结缔组织及坏死组织。将组织剪成 1-2 mm 的 小块,并将剪碎的小块移入装有 RPMI 1640 (含 1% FBS)的 15 mL 离心管,加入终浓度为 1 mg/mL 的四型胶原酶,25 μg/mL 的 DNA 酶及 0.1 mg/mL 的透明质酸酶,37 ℃培养箱,摇床轻 微消化孵育 1.5 h。加入预冷的 2 倍体积的 RPMI 1640 以终止 消化,过 70 μm 细胞筛,加入到等体积的 Ficoll 上,2000 rpm, 升 1 降 0,室温离心 20 min。离心结束后,取中间白膜层(淋巴 细胞层),加入适量 PBS 洗涤,1800 rpm,离心 5 min,用适量含 1% FBS 的 PBS 重悬细胞,准备好的细胞悬液放置在冰上。

1.2.3 流式细胞检测分析 计数取出 1~2× 10<sup>6</sup> 个细胞,离心 弃上清;加入 100 μL 流式抗体重悬细胞,冰上避光孵育 30 min; 加入 1 mL 含 1 % FBS 的 PBS 离心,用 200 μL 含 1 % FBS 的 PBS 重悬细胞,过 200 目尼龙膜转移至流式管,上机检测, Flowjo 软件分析检测数据。

1.2.4 组织免疫荧光染色 获取的 HCC 癌及癌旁组织分别 用 4 mL 2 %多聚甲醛固定后用于 IF 染色分析:a. 冰冻切片从 -20 ℃冰箱拿出后烤 30 min,先 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min; b.接 着 0.2 % Trion X-100 RT 下 固定 10 min,然后重复 PBS 洗涤 3次;c. 吸掉 PBS,用 100 μL 5 %的 BSA 进行封闭,RT 下 30 min;d. 吸掉封闭液,直接加 50 μL 一抗(1:200)稀释液避光孵 育,4 ℃过夜,16 h 左右;e. 夹出玻片,PBS 洗涤 3 次,加 80 μL HRP 标记的二抗稀释液(1:500)到玻片上 RT 下避光孵育 1 h; f. 孵育结束后,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;g.加 80 μL DAPI 染 色液到玻片上,RT 下避光染色 10 min;h. PBS 洗 3 次,用吸水 纸吸去多余液体,滴一滴甘油在载玻片上,把小玻片倒扣放在 甘油上,不要有气泡;i.在玻片周围滴加指甲油固定玻片;

#### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析。相关性分析使用 Pearson Correlation test 相关性分析。组间差异比较采用单因素 方差分析,当 P<0.05 认为有显著性差异。

#### 2.1 ENTPD1 mRNA 在肝癌中的差异性表达

TIMER 数据库分析 ENTPD1 在不同肿瘤类型及其对应的 癌旁正常组织中的表达水平差异,结果显示其在 LIHC、KIRC、 CHOL、THCA 等多种肿瘤组织中表达量显著高于癌旁组织(图 1A)。GEPIA 数据库分析表明 HCC 的癌组织中 ENTPD1 表达 水平显著上调(图 1B)。





HCC 癌及癌旁组织表达情况

Fig.1 Differential expression levels of ENTPD1 in diverse tumor and normal tissues (A) The mRNA expression level of ENTPD1 in human cancers was analyzed by TIMER database; (B) Comparison of ENTPD1 in normal and HCC tumor tissues using the GEPIA website.

#### 2.2 ENTPD1 表达与 HCC 患者预后相关性分析

Kaplan-Meier Plotter 数据库分析 CD39 与 HCC 患者预后 的关系,结果显示 CD39 高表达的患者具有较差的无进展生存

期 (PFS)P=0.026,0.55 (0.32-0.94)(图 2A) 和无复发生存期 (RFS)P=0.025,HR=0.44(0.21-0.92)(图 2B)。



图 2 CD39 表达水平与 HCC 的无进展生存期(PFS)(A)和无复发生存期(RFS)(B)的关系

Fig.2 Correlation analysis between CD39 expression level and progression-free survival (PFS) (A) and recurrence-free survival (RFS) (B) in HCC

#### 2.3 CD39 相关性基因分析

利用 Linked Omics 数据库分析与 CD39 正负相关的基因, 以 P<0.01 为界值,检索出 7622 个正相关基因,2743 个负相 关基因(图 3A);以 r<-0.45 为界限与 PCYT2,EEFSEC,DCXR, Clorf66,PEBP1 等 11 个基因显著负相关(图 3B),以 r>0.73 为 界限,HCC 中 CD39 的表达与 FMNL3, SYT11, RAB31, KCTD12, TMEM173 等 13 个基因显著正相关(图 3C)。 2.4 CD39 与肝癌微环境中免疫细胞、耗竭性分子浸润水平的 关系

TIMER 数据库分析 CD39 与 HCC 免疫微环境之间的关系,输入基因名 "ENTPD1",结果显示 ENTPD1 与 CD8<sup>+</sup>T、CD4<sup>+</sup>T、Macrophages、DCs 等细胞的浸润显著正相关(*P*<0.001)(图 4A)。此外,ENTPD1 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭性分子如 LAYN、CTLA4、HAVCR2 等共表达且呈正相关(*P*<0.001)(图 4B)。



图 3 CD39 相关基因分析. (A) HCC 中与 CD39 相关的基因分布散点图;(B) 与 CD39 负相关性的基因热图(前 50 位);(C) 与CD39 正相关性的基因热图(前 50 位);

Fig.3 CD39-related genes analysis. (A) Scatterplot of CD39-related genes distribution in HCC; (B) Gene heatmap negatively correlated with CD39 (top 50); (C) Gene heatmap positively correlated with CD39 (top 50).

# 2.5 HCC 临床样本中 CD39 表达情况及其与 T 细胞耗竭的 关系

数据库分析了 CD39 与临床预后及肝癌微环境中免疫浸 润及 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭的关系,接着采用临床 HCC 患者标本进 行进一步验证。癌及癌旁组织 IF 染色结果均显示 CD39 在癌 组织中表达比例高于癌旁组织(图 5A),单细胞测序数据(来自 TCGA)结果和免疫荧光结果一致(图 5B)。此外,分离癌组织中 浸润的免疫细胞进行流式检测,CD39 在 CD8<sup>+</sup>T 细胞中表达比 例最高,其次是 Treg 细胞和辅助性 CD4<sup>+</sup>T 细胞(图 5C)。测序 数据(来自 TCGA)显示 ENTPD1 在癌组织中的耗竭性细胞中 表达上调(图 5D),流式检测结果指示癌组织浸润的耗竭 CD8<sup>+</sup>T 细胞中 CD39 表达比例显著高于癌旁组织,且 CD39 和 LAYN、CTLA4、TIM3 等耗竭性特征分子共表达(图 5E)。以上 数据均表明 CD39 在 HCC 肿瘤中过度表达,且参与细胞耗竭, 可能作为潜在的治疗靶点。

#### 3 讨论

CD39 是一种胞外酶, Jeremy 等<sup>[4]</sup>发现 CD39 高表达在多种恶性肿瘤中, 如肾癌、肉瘤癌、膀胱癌等。内皮细胞、NK、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)等细胞中也呈现高水平表达。CD39 的表达 受 到 多 种 因 素 的 调 控 , 如 TGFβ/SOX4、TCR/IL-2、IL-27/STAT-1 信号通路、IL-35、IL-4 等均参与调控 CD39 的表

达<sup>[15-18]</sup>。众多研究表明,CD39 在 TIL、Treg、CD8<sup>+</sup>T 细胞中表达 显著升高,且参与恶性肿瘤的发生发展和不良预后。在黑色素 瘤、鳞状细胞癌中,高水平的 CD39 与较低的 RFS 相关<sup>[19,20]</sup>。透 明细胞肾细胞癌患者肿瘤浸润的 CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞导致预后 不良和免疫逃逸<sup>[21]</sup>。CD39 还可促进肿瘤的生长和转移,CD39 过表达的小鼠结肠癌模型中,原位肿瘤及转移瘤的数量、大小 均明显增强<sup>[22,21]</sup>。

众多研究指出 CD39 主要是通过 CD39/CD73 信号轴调控 肿瘤微环境中的腺苷途径,将 eATP 转化为 ADP 和 cAMP,最 终生成抑制性的细胞外腺苷,促进肿瘤的发展<sup>[2425]</sup>。CD39 的上 调是肿瘤通过耗尽 TME 中的免疫刺激性 eATP 来逃避抗肿瘤 策略的有效机制。Treg 细胞表达的 CD39 通过水解酶的作用促 进腺苷的产生,进而作用于效应性 T 细胞的 A2A 受体,发挥抑 制 T 细胞的迁移、增殖、抗肿瘤功能<sup>[2627]</sup>。而 CD39/CD73 的阻 断,可限制 ATP 或 AMP 转化为腺苷,抑制肿瘤的生长和转移, 提高 CD8<sup>+</sup>T 细胞和 NK 的抗肿瘤效应<sup>[2831]</sup>。Jeremy 等<sup>[14]</sup>研究表 明,CD39 的抑制剂 BY40 可解除肿瘤对效应 T 细胞增殖的抑 制作用,恢复 CTL 和 NK 细胞的杀伤活性。 Liu<sup>[32]</sup>等人在膀胱 癌小鼠肿瘤模型中发现,POM-1 抑制 CD39 活性可抑制肿瘤生 长、提高荷瘤小鼠的总生存期。值得注意的是 CD39 的抑制也 可重塑肿瘤微环境,提高肿瘤内 NK、cDC1 和CD8<sup>+</sup>T 细胞比 例,降低 Treg 细胞负荷,减弱抑制性的免疫微环境<sup>[33]</sup>。



图 4 ENTPD1 与肿瘤微环境免疫浸润及耗竭的相关性. (A) ENTPD1 与 HCC 中免疫细胞浸润水平之间的关系; (B) ENTPD1 与 CD8'T 细胞中耗 竭性分子表达水平之间的关系

Fig.4 Correlation of ENTPD1 with immune infiltration and cell exhaustion in the tumor microenvironment (A) Relationship between ENTPD1 and levels of immune cell infiltration. (B) Relationship between ENTPD1 and exhaustion molecules expression levels in CD8<sup>+</sup>T cells.

最近有报道发现,CD39 成为区分肿瘤相关性 TIL 关键分 子。卵巢癌患者肿瘤组织中,CD39 在 CD8<sup>+</sup>TIL 细胞中高表达, 且和 CD103 共表达,CD39<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL 细胞被认为是具有 肿瘤反应性的 T 细胞,并与卵巢癌患者的免疫治疗和预后紧密 相关<sup>[3437]</sup>。此外,CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞具有调节特性,CD39 可能参 与调控肿瘤中 CD8<sup>+</sup>Treg 的抑制能力,分离的 CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细 胞确实在体外对 T 细胞增殖产生抑制作用<sup>[8]</sup>。单细胞测序技术 的应用发现 CD39<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞表现耗竭细胞的特性,并将 CD39 描述为细胞耗竭的标志,CD39 可识别 HBV、HCV 感染 中耗竭的病毒特异性 CD8<sup>+</sup>T 细胞<sup>[9,34,38]</sup>。CD39hiCD8<sup>+</sup>TIL 低表达 IFN-γ、TNF-α 和 IL-2。CD39 与多种抑制受体共表达(PD1、 TIGIT、TIM3 等),与肿瘤进展相关性较高<sup>[34]</sup>。Vignali<sup>[11]</sup>等人的 研究表明在耗竭 T 细胞中,氧不足驱动的 CD39 介导的抑制功 能阻碍了抗肿瘤免疫。

近些年在 HCC 中, CD39 与细胞耗竭相关的研究较少, 且 细胞耗竭的具体机制有待深入探究。本课题首先通过 TIMER

和 GEPIA 数据库分析发现,肝癌组织中 CD39 表达水平显著 高于癌旁组织,提示 CD39 可能是 HCC 中的一个抑癌基因。同 时,Kaplan-Meier Plotter 生存曲线结果表明 CD39 高表达的 HCC患者临床预后(RFS、PFS)较差。以上结果提示 CD39 高表 达是 HCC 患者预后不良的因素。通过 LinkedOmics 数据库进 一步探究 CD39 在 HCC 中的作用,结果显示 CD39 与 FMNL3,SYT11,RAB31 等显著正相关,与 PCYT2,EEFSEC, DCXR 等显著负相关,表明这些分子可能是调控 CD39 的上、 下游分子。进一步通过 TIMER 数据库分析得出 CD39 与 HCC 微环境免疫细胞浸润水平显著正相关,且与 CD8T 细胞耗竭 代表性分子共表达,提示 CD39 可能在 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭中发挥 重要作用。临床 HCC 组织样本免疫荧光、细胞测序和流式检测 结果与生信分析结果一致。综上,CD39与HCC生存、肿瘤微环 境中免疫细胞及免疫分子浸润水平、细胞耗竭的相关性分析提 示在 HCC 微环境和 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭中可能具有重要的作用。 CD39 可能作为评估 HCC 患者免疫治疗疗效的潜在性分子,以 CD39为研究靶点,探究细胞耗竭的相关机制,可能有效逆转耗 竭细胞的抗肿瘤效应。



图 5 肝癌中 CD39 表达及其与细胞耗竭的相关性分析. 免疫荧光(A)和测序(B)分析癌及癌旁组织 CD39 表达差异;(C) 流式检测癌组织浸润细胞 中 CD39 表达情况;测序(D)和流式(E)分析 CD39 与 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭的关系

Fig.5 Analysis of CD39 expression in HCC and its correlation with cell exhaustion. Immunofluorescence (A) and cell sequencing (B) were used to analyze CD39 expression levels in tumor and peri-tumor. (C) Flow cytometry detect CD39 expression in tumor TILs. Sequencing (D) and flow cytometry (E) analyzed the correlation between CD39 and CD8<sup>+</sup>T cell exhaustion.

本研究仍存在不足之处,首先应增加临床 HCC 样本量,利 用多种方法验证 CD39 的表达情况。其次,关于 CD39 对 T 细 胞耗竭的调控机制研究不够深入,是否影响耗竭细胞的增殖、 凋亡、效应功能?是否参与调控抑制性受体的表达?后续将进一 步通过临床样本测序、CD39 过表达 / 沉默、小鼠肿瘤模型等实 验在体内体外探究其作用,分析 CD39 调节细胞耗竭的潜在上 下游分子及相关信号通路。

#### 参考文献(References)

- Lim C J, Lee Y H, Pan L, et al. Multidimensional analyses reveal distinct immune microenvironment in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. Gut, 2019, 68(5): 916-927
- [2] Wang G, Wang Q, Liang N, et al. Oncogenic driver genes and tumor microenvironment determine the type of liver cancer [J]. Cell Death

Dis, 2020, 11(5): 313

- [3] Cheng H, Ma K, Zhang L, et al. The tumor microenvironment shapes the molecular characteristics of exhausted CD8(+) T cells[J]. Cancer Lett, 2021, 506: 55-66
- [4] Dolina J S, Van Braeckel-Budimir N, Thomas G D, et al. CD8 (+) T Cell Exhaustion in Cancer[J]. Front Immunol, 2021, 12: 715234
- [5] Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8068
- [6] Dong D N, Fan P W, Feng Y N, et al. Association between circulating CD39°CD8°T cells pre-chemoradiotherapy and prognosis in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134 (17): 2066-2072
- [7] Attrill G H, Owen C N, Ahmed T, et al. Higher proportions of CD39<sup>+</sup> tumor-resident cytotoxic T cells predict recurrence-free survival in

patients with stage III melanoma treated with adjuvant immunotherapy[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(6): 004771

- [8] Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression [J]. Blood, 2007, 110(4): 1225-1232
- [9] Canale F P, Ramello M C, Nunez N, et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8 (+) T Cells-Response[J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 5175
- [10] Martinez-Gomez C, Michelas M, Scarlata C M, et al. Circulating Exhausted PD-1 (+) CD39 (+) Helper CD4 T Cells Are Tumor-Antigen-Specific and Predict Response to PD-1/PD-L1 Axis Blockade[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(15): 3679
- [11] Vignali P, DePeaux K, Watson M J, et al. Hypoxia drives CD39-dependent suppressor function in exhausted T cells to limit antitumor immunity[J]. Nat Immunol, 2023, 24(2): 267-279
- [12] van Duijn J, van Elsas M, Benne N, et al. CD39 identifies a microenvironment-specific anti-inflammatory CD8 (+) T-cell population in atherosclerotic lesions [J]. Atherosclerosis, 2019, 285: 71-78
- [13] Zou F, Tan J, Liu T, et al. The CD39(+) HBV surface protein-targeted CAR-T and personalized tumor-reactive CD8 (+) T cells exhibit potent anti-HCC activity[J]. Mol Ther, 2021, 29(5): 1794-1807
- [14] Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity [J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3 (3): 254-265
- [15] Fang F, Cao W, Mu Y, et al. IL-4 prevents adenosine-mediated immunoregulation by inhibiting CD39 expression [J]. JCI Insight, 2022, 7(12): e157509
- [16] Li J, Wang L, Chen X, et al. CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer [J]. Oncoimmunology, 2017, 6(6): e1320011
- [17] Liu Z N, Jia W Q, Jiang T, et al. Regulation of CD39 expression in ATP-P2Y2R-mediated alcoholic liver steatosis and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 77: 105915
- [18] Sanmarco L M, Ponce N E, Visconti L M, et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during Trypanosoma cruzi infection [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(4): 857-869
- [19] Whitley M J, Suwanpradid J, Lai C, et al. ENTPD1 (CD39) Expression Inhibits UVR-Induced DNA Damage Repair through Purinergic Signaling and Is Associated with Metastasis in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma [J]. J Invest Dermatol, 2021, 141(10): 2509-2520
- [20] Harou O, Cros-Perrial E, Alix E, et al. Variability in CD39 and CD73 protein levels in uveal melanoma patients[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2022, 41(11): 1099-1108
- [21] Qi Y, Xia Y, Lin Z, et al. Tumor-infiltrating CD39(+) CD8(+) T cells determine poor prognosis and immune evasion in clear cell renal cell carcinoma patients [J]. Cancer Immunol Immunother, 2020, 69(8): 1565-1576
- [22] Kunzli B M, Bernlochner M I, Rath S, et al. Impact of CD39 and

purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer[J]. Purinergic Signal, 2011, 7(2): 231-241

- [23] Luo Y, Zong Y, Hua H, et al. Immune-infiltrating signature-based classification reveals CD103 (+) CD39 (+) T cells associate with colorectal cancer prognosis and response to immunotherapy[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1011590
- [24] Baghbani E, Noorolyai S, Shanehbandi D, et al. Regulation of immune responses through CD39 and CD73 in cancer: Novel checkpoints[J]. Life Sci, 2021, 282: 119826
- [25] Wang S, Gao S, Zhou D, et al. The role of the CD39-CD73-adenosine pathway in liver disease[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(2): 851-862
- [26] Huang S, Apasov S, Koshiba M, et al. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion [J]. Blood, 1997, 90(4): 1600-1610
- [27] Yang R, Elsaadi S, Misund K, et al. Conversion of ATP to adenosine by CD39 and CD73 in multiple myeloma can be successfully targeted together with adenosine receptor A2A blockade [J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(1): e000610
- [28] Allard B, Longhi M S, Robson S C, et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets [J]. Immunol Rev, 2017, 276(1): 121-144
- [29] Guo S, Han F, Zhu W. CD39 A bright target for cancer immunotherapy[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 151: 113066
- [30] Li X Y, Moesta A K, Xiao C, et al. Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity[J]. Cancer Discov, 2019, 9(12): 1754-1773
- [31] Perrot I, Michaud H A, Giraudon-Paoli M, et al. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies [J]. Cell Rep, 2019, 27(8): 2411-2425
- [32] Liu L, Hou Y, Deng C, et al. Single cell sequencing reveals that CD39 inhibition mediates changes to the tumor microenvironment[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6740
- [33] Zhang H, Feng L, de Andrade M P, et al. Glycoengineered anti-CD39 promotes anticancer responses by depleting suppressive cells and inhibiting angiogenesis in tumor models [J]. J Clin Invest, 2022, 132 (13): e157431
- [34] Laumont C M, Wouters M, Smazynski J, et al. Single-cell Profiles and Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Coexpressing CD39, CD103, and PD-1 in Ovarian Cancer [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(14): 4089-4100
- [35] Duhen T, Duhen R, Montler R, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8<sup>+</sup>T cells in human solid tumors [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2724
- [36] Lubbers J M, Wazynska M A, van Rooij N, et al. Expression of CD39 Identifies Activated Intratumoral CD8<sup>+</sup>T Cells in Mismatch Repair Deficient Endometrial Cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(8): 1924
- [37] Tiwari-Heckler S, Lee G R, Harbison J, et al. Extracellular mitochondria drive CD8<sup>+</sup>T cell dysfunction in trauma by upregulating CD39[J]. Thorax, 2023, 78(2): 151-159
- [38] Thelen M, Lechner A, Wennhold K, et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8 (+) T Cells-Letter [J]. Cancer Res, 2018, 78(17): 5173-5174