

· 论著 ·

DOI: 10.12464/j.issn.0253-9802.2025-0056

# CLEC7A 调节 PD-L1 促进卵巢癌生长的作用及机制研究

陈瑶<sup>1</sup>, 孙思柏<sup>2</sup>, 许俊<sup>2</sup>✉, 何杰<sup>1,2</sup>✉

(1. 山东大学齐鲁医学院, 山东 济南 250012; 2. 中国科学技术大学附属第一医院 / 安徽省立医院临床病理中心, 安徽 合肥 230001)

**【摘要】** **目的** 明确 C 型凝集素结构域家族 7 成员 (CLEC7A) 在高级别浆液性卵巢癌 (HGSOC) 中的作用及相应的机制。**方法** 通过癌症基因组图谱 - 卵巢癌 (TCGA-OV) 数据集, 结合转录调控网络与主调控因子分析 (MRA), 明确 HGSOC 中 CLEC7A 基因对免疫相关基因的作用; 通过通路富集分析与验证, 确定了 CLEC7A 对酪氨酸激酶 (JAK) / 信号转导及转录激活因子 3 (STAT3) 通路的调节机制。分析 GSE184880 单细胞测序数据集, 揭示了 CLEC7A 低表达与高表达的 HGSOC 中免疫细胞的比例和细胞通信的差异。收集 2017 年 1 月至 2022 年 12 月在中国科学技术大学附属第一医院 / 安徽省立医院确诊并行手术治疗的 70 例 HGSOC 和 70 例卵巢透明细胞癌 (OCCC) 患者的石蜡肿瘤组织和对应癌旁组织以及临床病理资料, 比较 HGSOC 与 OCCC 预后相关因素的差异; 利用免疫组织化学染色法, 检测 CLEC7A 和 PD-L1 在 HGSOC 和 OCCC 及对应的癌旁组织中的表达水平。构建 CLEC7A 的短发夹 RNA (shRNA) 载体, 检测 CLEC7A 抑制后 HGSOC 细胞增殖和凋亡的变化。在 CLEC7A 高表达的小鼠肿瘤模型中, 观察髓系免疫抑制细胞 (MDSC)、CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例以及 MDSC 的功能变化。**结果** 转录调控网络分析显示, 叉头框蛋白 P3 (FOXP3) 与 CLEC7A 对免疫相关基因均起到调节作用, CLEC7A 不仅与患者总体生存率相关, 还在 HGSOC 肿瘤组织中呈现高表达 (均  $P < 0.05$ )。敲低 CLEC7A 后, 不仅促进了细胞凋亡, 还抑制了 HGSOC 细胞系的体内外增殖 (均  $P < 0.05$ )。CLEC7A 通过 JAK/STAT3 信号通路调控程序性死亡配体 -1 (PD-L1) 的表达。在 CLEC7A 高表达的肿瘤组织中, CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例下降, MDSC 的比例上升, 且 MDSC 的功能得到增强 (均  $P < 0.05$ )。**结论** HGSOC 中 CLEC7A 诱导了 PD-L1 的表达, 且促进了 HGSOC 的增殖与免疫抑制信号通路的激活, 可能导致 HGSOC 的恶性生长。

**【关键词】** C 型凝集素结构域家族 7 成员; 高级别浆液性卵巢癌; 程序性死亡配体 -1; JAK/STAT3 通路; 肿瘤免疫

## The role and mechanism of CLEC7A in regulating PD-L1 to promote ovarian cancer growth

CHEN Yao<sup>1</sup>, SUN Sibai<sup>2</sup>, XU Jun<sup>2</sup>✉, HE Jie<sup>1,2</sup>✉

(1. Qilu Medical College, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Clinical Pathology Center, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

Corresponding author: XU Jun, E-mail: xujun\_lab1@163.com; HE Jie, E-mail: hejie23@ustc.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To elucidate the role of C-type lectin domain family 7 member A (CLEC7A) in high-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) and its underlying mechanisms. **Methods** Using the Cancer Genome Atlas-Ovarian Cancer (CGA-OV) dataset, combined with transcriptional regulatory network analysis and master regulator analysis (MRA), the impact of CLEC7A on immune-related genes in HGSOC was determined. Pathway enrichment analysis and validation identified the regulatory mechanism of CLEC7A on the Janus Kinase (JAK) / signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway. The GSE184880 single-cell sequencing dataset was analyzed to reveal differences in immune cell proportions and cellular communication between CLEC7A low-expression and high-expression HGSOC tumors. Paraffin-embedded tumor tissues and corresponding adjacent tissues, along with clinicopathological data, were collected from 70 HGSOC and 70 ovarian clear cell carcinoma (OCCC) patients diagnosed and surgically treated at the First Affiliated Hospital of the University of Science and Technology of China/Anhui Provincial Hospital between January 2017 and December 2022. Differences in prognostic factors between HGSOC and OCCC were compared.

收稿日期: 2025-02-21

基金项目: 国家自然科学基金 (81872055)

作者简介: 陈瑶, 主治医师, 研究方向: 肿瘤病理, E-mail: cy20181008@163.com; 许俊, 通信作者, 助理研究员, 研究方向: 肿瘤生物学, E-mail: xujun\_lab1@163.com; 何杰, 通信作者, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤病理, E-mail: hejie23@ustc.edu.cn

Immunohistochemical staining was used to detect the expression levels of CLEC7A and PD-L1 in HGSOC, OCCC, and corresponding adjacent tissues. A short hairpin RNA (shRNA) vector targeting CLEC7A was constructed to assess changes in the proliferation and apoptosis of HGSOC cells both after CLEC7A inhibition. In a mouse tumor model with high CLEC7A expression, the proportion of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and CD8<sup>+</sup>T cells, as well as the functional changes of MDSCs, were observed. **Results** Transcriptional regulatory network analysis revealed that forkhead box protein P3 (FOXP3) and CLEC7A both regulate immune-related genes. CLEC7A was not only correlated with overall patient survival but also highly expressed in HGSOC tumor tissues (all  $P < 0.05$ ). Knockdown of CLEC7A promoted apoptosis and inhibited the proliferation of HGSOC cell lines both in vitro and in vivo (all  $P < 0.05$ ). CLEC7A regulated the expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) through the JAK/STAT3 signaling pathway. In CLEC7A high-expressing tumor tissues, the proportion of CD8<sup>+</sup>T cells decreased, while the proportion of MDSCs increased, and the functionality of MDSCs was enhanced (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** CLEC7A induces PD-L1 expression in HGSOC, promotes HGSOC proliferation, and activates immunosuppressive signaling pathways, potentially leading to the malignant growth of HGSOC.

**【Key words】** CLEC7A; High-grade serous ovarian carcinoma; PD-L1; JAK/STAT3 pathway; Tumor immunity

高级别浆液性癌 (high-grade serous ovarian carcinoma, HGSOC) 是卵巢癌中最常见且侵袭性最强的亚型, 年发病率大约为 (2~3) /100 000, 5年病死率超过 50%, 占有卵巢癌总数的 70%<sup>[1]</sup>。由于其早期症状不明显, 约 70% 的患者在确诊时已处于晚期, 总体预后较差<sup>[2-5]</sup>。通过手术和化学治疗等标准治疗手段, HGSOC 患者的 5 年生存率仍低于 50%。近年来, 免疫检查点抑制剂如程序性死亡受体-1/程序性死亡配体-1 (programmed death-1/programmed death ligand-1, PD-1/PD-L1) 抑制剂在多种实体瘤中显示出疗效, 但在 HGSOC 中的应用效果有限<sup>[6-10]</sup>。研究表明, 单独使用 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗 HGSOC 的客观缓解率仅约 10%~15%。这种有限的疗效可能与 HGSOC 的肿瘤微环境、PD-L1 表达水平以及肿瘤突变负荷等因素有关。此外现有研究显示, 尽管聚 ADP-核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 抑制剂治疗可以通过上调干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 增加 PD-L1 的表达, 但患者对免疫治疗的反应性仍不理想, 其机制有待进一步的研究<sup>[4]</sup>。

CLEC7A 主要表达于巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞等免疫细胞表面, 当其与配体结合后, 可通过内含的免疫受体酪氨酸激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 调节下游信号通路的激活<sup>[11-13]</sup>, 然而, CLEC7A 在肿瘤细胞中的表达及其与免疫治疗之间的关联尚未被报道。为此, 本研究通过生物信息学方法分析 CLEC7A 在 PD-1/PD-L1 免疫调控中的作用, 并以临床标本免疫组织化学染色 (免疫组化) 及体外细胞试验等方式探讨 CLEC7A 在 HGSOC 恶性生长中的作用及相应机制, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物信息学分析

#### 1.1.1 转录调控网络分析

全部公共数据集分析使用 R 语言完成, 使用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) biolinks 软件提取 HGSOC 转录组数据和临床数据, 计算与 PD-1/PD-L1 基因相关的基因, 同时提取免疫相关基因, 并用 RTN 软件构建基于转录调控网络, 行主调控因子分析 (master regulator analysis, MRA) 算法对 PD-1/PD-L1 相关基因的调控能力进行排序, 再用 RedeR 软件进行网络可视化。

#### 1.1.2 生存分析与信号通路分析

TCGA-卵巢癌 (ovarian cancer, OV) 数据集下载、标准化流程同上。用 survival 和 survminer 软件计算 CLEC7A、叉头框蛋白 P3 (forkhead Box P3, FOXP3) 的表达对总体生存率的影响。TCGA-OV 的 RNA-seq 数据在提取出 HGSOC 患者信息后, 使用 limma 包计算得到 CLEC7A 高表达组中上调的基因后, 使用 clusterProfiler 包计算上调的基因中信号通路的富集。

#### 1.1.3 GSE184880 数据集分析

GSE184880 scRNA 测序数据包含 4 例对照组织与 7 例 HGSOC 组织, 使用 Seurat 包读取单细胞数据集, 进行数据预处理。标准化后的数据集聚类, 结合 RunUMAP 函数或 RunTSNE 函数进行可视化, 使用 scType 包对不同集群的细胞进行注释。CellChat 包进行细胞通信分析, 评估 CLEC7A 表达分组对免疫细胞通信的影响。提取免疫细胞亚群并使用 subset 函数选择对应细胞, 并使用 DimPlot 函数绘制 CLEC7A 高表达组和低表达组的

t-SNE 图。

## 1.2 临床病理特征及免疫组化检测

### 1.2.1 病理样本和临床数据收集

选择 2017 年 1 月至 2022 年 12 月在中国科学技术大学附属第一医院 / 安徽省立医院确诊并行手术治疗的 HGSOC 患者和卵巢透明细胞癌 (ovarian clear cell carcinoma, OCCC) 病例。纳入标准: ① 有明确的病理诊断结果; ② 患者临床资料完整, 能够准确评估病理分级与临床预后分析。排除标准: ① 无法评估原发病灶者; ② 术前接受过放射治疗和 (或) 化学治疗者。经纳入和排除标准筛选后, 设  $\alpha$  为 0.05, 统计功效设为 80%, 总体标准差预设为 10, 具有统计学意义的  $\delta$  差值设为 5, 从而估算出每组样本量为 63, 为进一步增强统计学效能, 将样本量定为 70, 并通过随机抽样最终确定样本。最终纳入 70 例 HGSOC 和 70 例 OCCC 石蜡肿瘤组织和对应的癌旁组织, 并收集患者相应的临床资料。本研究经中国科学技术大学附属第一医院 / 安徽省肿瘤医院医学研究伦理委员会审批 (批件号: 2025-BLK-03), 且所有入选患者均对本研究知情并签署知情同意书。

### 1.2.2 高级别浆液性卵巢癌和卵巢透明细胞癌中 CLEC7A 和 PD-L1 表达的免疫组织化学染色检测

石蜡标本均以 10% 中性甲醛固定, 包埋后以 4  $\mu\text{m}$  厚连续切片, 采用 En Vision 两步法染色, 分别加入一抗 CLEC7A (美国 Cell Signaling Technology 公司)、二抗、3, 3'-二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 显色, 苏木精复染细胞核。采用 Autostainer Link 48 半自动免疫组化染色仪 (美国 Agilent 公司) 检测 PD-L1 的表达, 一抗 PD-L1 购自美国 Agilent 公司。

评价标准: CLEC7A 阳性棕黄色主要定位于细胞核 / 浆, 根据细胞着色强度和阳性细胞百分比进行半定量计分, 0~2 分为不表达, 3~5 分为低表达, 6 分及以上为高表达。PD-L1 采用联合阳性评分 (Combined Positive Score, CPS), 计算阳性活肿瘤细胞 (任何强度的细胞膜或细胞质染色) 及阳性淋巴细胞和巨噬细胞 (任何强度的细胞膜或细胞质染色) 占有活肿瘤细胞的百分比, 结果采用 0~100 表示。每次实验均设置阴、阳性对照。

## 1.3 体外细胞实验

### 1.3.1 细胞分组与培养

人 HGSOC 细胞系 OVCAR-3 购自北京协和细胞资源中心, 细胞类别为传代细胞, 为第 10 代细胞,

培养条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温、5%  $\text{CO}_2$  的湿润环境, 采用 DMEM 并添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)。功能验证实验中, Scramble、CLEC7A shRNA 载体均购自美国 Sigma 公司。OVCAR-3 细胞分为对照组 (CON)、敲减组 (CLEC7A shRNA) 组后, 分别转染 Scramble、CLEC7A shRNA 载体, 每组重复 3 次取平均值, 48 h 后检测各组 CLEC7A 在蛋白、mRNA 水平的变化。

### 1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 CLEC7A 的 mRNA 表达水平

实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR) 以 TriZol 裂解液 (德国 Sigma-Aldrich 公司) 取  $2 \times 10^6$  个 OVCAR-3 细胞进行裂解, 依次加入氯仿和异丙醇进行 RNA 分离和沉淀, 提取总 RNA, 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 反转录为模板 DNA, SYBR 染料法 (日本 TaKaRa 公司) 检测 mRNA 水平的表达。以 GAPDH 基因为内参, 得到 GAPDH 与 CLEC7A 的 Ct 值后, 使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法对 CLEC7A 基因的相对表达量进行定量, 实验重复 3 次, 取平均值。

### 1.3.3 蛋白免疫印迹法检测 CLEC7A 及相关通路的蛋白表达

OVCAR-3 细胞使用 RIPA 裂解液裂解后制样电泳。一抗分别为 GAPDH (美国 Cell Signaling Technology 公司)、CLEC7A (美国 Abcam 公司)、酪氨酸激酶 (janus kinase, JAK, 美国 Cell Signaling Technology 公司)、磷酸化 (p)-JAK (美国 Cell Signaling Technology 公司)、信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3, 美国 Cell Signaling Technology 公司)、p-STAT3 (美国 Cell Signaling Technology 公司), 以 GAPDH 为内参, 进行蛋白相对定量。

### 1.3.4 细胞增殖和凋亡实验

细胞增殖实验: 采用 CCK-8 法 (日本同仁化学研究所), 在 OVCAR-3 细胞中, 分别设置 CON 对照组和 CLEC7A-shRNA 组, 感染 48 h, 加入 1/10 体积的 CCK-8 试剂, 酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度。将各时间点的吸光度值与 0 h 的吸光度值相比, 计算增殖指数。

细胞凋亡实验: 采用膜联蛋白 V (Annexin V)-别藻青蛋白 (allophycocyanin, APC) / 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染法 (天津三箭生物公司), 实验流程按照说明书进行。使用流式细胞仪检测细胞凋亡, 并将 Annexin V APC 阳性细胞定义

为凋亡细胞。

JC-10 染色法 (美国 ABP Biosciences 公司) 染色细胞, 实验流程按照说明书进行。使用流式细胞仪检测 FL1 通道、FL2 通道, 并将 FL2 阳性细胞定义为活细胞, FL2 阴性细胞定义为凋亡细胞。

### 1.3.5 流式细胞术检测 PD-L1 的表达

PD-L1 流式细胞检测抗体购自美国 BD Biosciences 公司, STAT3 抑制剂 Stattic 购自美国 Selleckchem 公司。将 OVCAR-3 细胞分为 CON 组 (对照组) 和 CLEC7A 组 (实验组), 并分别转染 CON (空载的 EGFP-pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-3xFlag 载体) 与 CLEC7A 过表达载体 (丰晖生物公司设计, 骨架质粒为 EGFP-pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro-3xFlag 载体), 转染 48 h。CLEC7A 细胞用  $1.0 \times 10^{-5}$  mol/L 的 Stattic 处理 24 h。消化细胞为单细胞悬液, 标记 PD-L1 PE 抗体。使用流式细胞仪检测 CON 组、CLEC7A 组和 CLEC7A+Stattic 组细胞表面 PD-L1 的表达。实验重复 3 次, 取平均值。

## 1.4 小鼠荷瘤实验

小鼠荷瘤实验流程由中国科学技术大学伦理委员会批准 (批件号: 202407111005000167828)。

裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 均为雌性, 6~8 周龄, 体质量为 18~22 g, 分为 CON 组与 CLEC7A shRNA 组, 每组 5 只。将 OVCAR-3 细胞分为 CON 组 (对照组) 和 CLEC7A shRNA 组 (实验组), 同时将裸鼠分为 CON 组和 CLEC7A shRNA 组, 每组 5 只, CON 组每只小鼠注射  $1 \times 10^7$  个 CON 组细胞, CLEC7A shRNA 组小鼠每只小鼠注射  $1 \times 10^7$  个 CLEC7A shRNA 组细胞, 注射部位为右侧背部皮下。注射 21 d 后, 安乐死小鼠, 计算 2 组小鼠原位肿瘤体积的大小, 计算公式为  $V_{\text{肿瘤}} = LW^2/2$ , 其中  $V$  为体积 (单位为  $\text{mm}^3$ ),  $L$  为肿瘤的最长径 (单位为 mm),  $W$  为垂直于最长径的短径 (单位为 mm)。

BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, BALB/c 小鼠性别、周龄和体质量的要求同裸鼠, 将 OVCAR-3 细胞和 BALB/c 小鼠分为 CON 组和 CLEC7A 组 (实验组), 每组各 5 只, CON 组每只小鼠注射  $1 \times 10^7$  个 CON 组细胞, CLEC7A 组小鼠每只小鼠注射  $1 \times 10^7$  个 CLEC7A 组细胞, 注射部位为右侧背部皮下。21 d 后安乐死小鼠, 收集原位肿瘤, 并消化为单个细胞, 一部分细胞标记 CD11b-FITC、Gr-1-PE, 并将 CD11b 和 Gr-1 双阳性细胞作为 MDSC 细胞, 另一部分标

记 CD3-PE-Cy7、CD4-APC-Cy7 和 CD8-APC (以上标志物均购自美国 BioLegend 公司), 并将 CD3 和 CD8 双阳性且 CD4 阴性的细胞作为  $\text{CD8}^+$ T 细胞, 比较 CON 组和 CLEC7A 组之间 MDSC 以及  $\text{CD8}^+$ T 细胞比例差异。

选取 BALB/c 小鼠, 得到小鼠脾脏单细胞悬液后, 标记 CD3 并流式分选得到 T 细胞, 同时分离得到 CON 组和 CLEC7A 组移植瘤中的 MDSC, 将 MDSC 与 T 细胞混合, 加入终浓度为  $2.5 \times 10^{-6}$  mol/L 的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE) 染料 (美国 Thermo 公司)。将染色后的细胞接种于含有抗 CD28 抗体的培养基中, 72 h 后, 使用流式细胞仪检测 CFSE 荧光强度。以未接受抗体刺激的细胞为对照, 计算 CD28 抗体刺激组 (未混入 MDSC)、CON 组 (CON 组 MDSC 与 T 细胞混合)、CLEC7A 组 (CLEC7A 组 MDSC 与 T 细胞混合) 中增殖的 T 细胞比例, 实验重复 3 次, 结果取平均值。

## 1.5 统计学方法

使用 R 4.3.3 (2024-02-29 ucrt)。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组独立样本的比较使用  $t$  检验, 多组比较采用方差分析, 组间两两比较使用 LSD- $t$  检验, 相关性分析使用 Pearson 相关性分析。生存分析使用单因素 Cox 分析。双侧  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

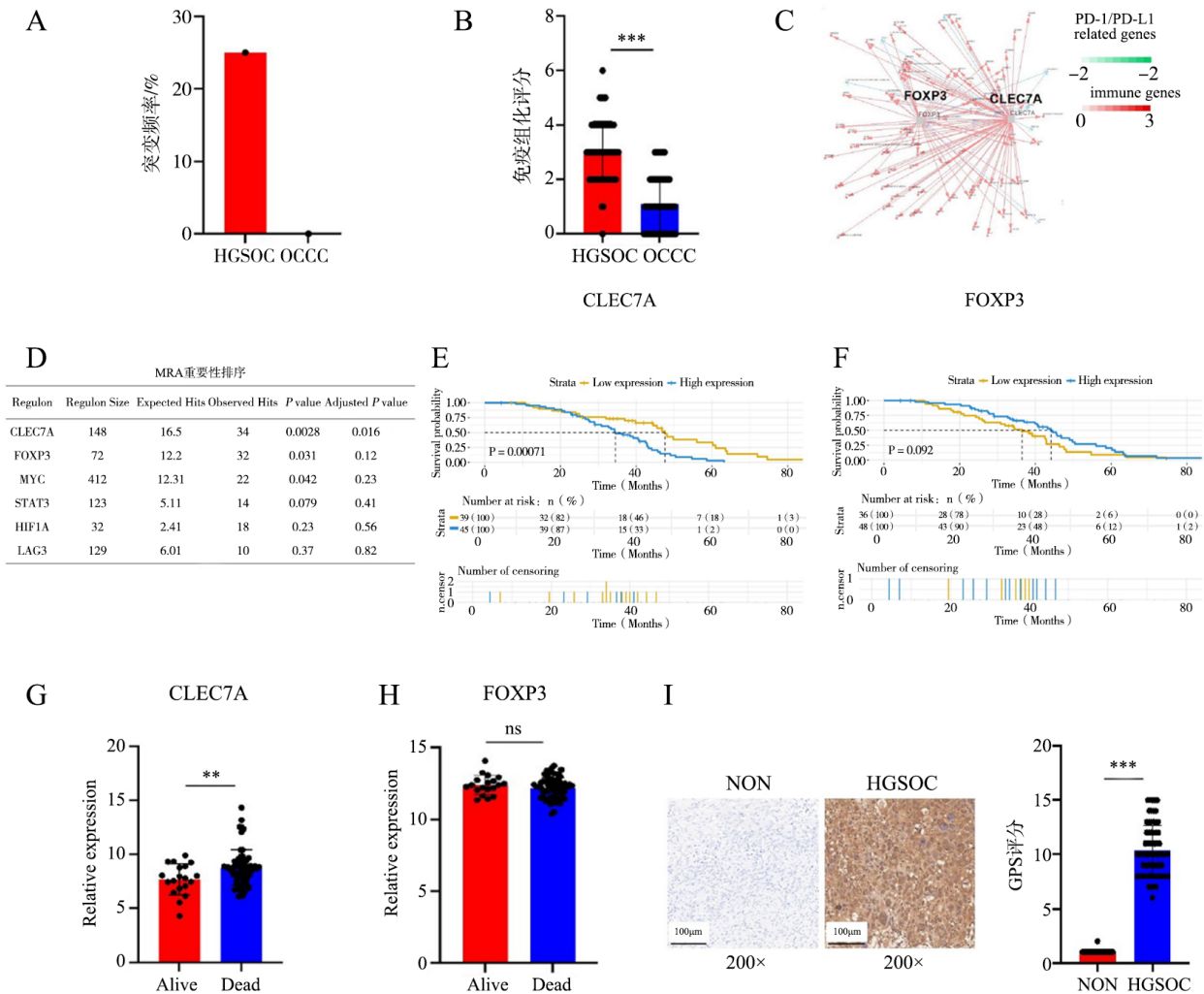
### 2.1 转录调控网络分析确定 CLEC7A 为高级别浆液性卵巢癌中与 PD-1/PD-L1 相关的基因

转录调控网络分析显示, HGSOC 较其他卵巢癌亚型 (如 OCCC) 具有更高的乳腺癌易感基因 1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 突变频率 (图 1A)。HGSOC 亚型相对于 OCCC, 也具有更高的 PD-L1 表达水平 (图 1B)。HGSOC 的 5 年生存率为 25%, 而 OCCC 的 5 年生存率则高达 70%。HGSOC 和 OCCC 患者的年龄分别为 ( $56.12 \pm 12.45$ ) 岁和 ( $55.69 \pm 11.64$ ) 岁, 临床分期分别为  $2.26 \pm 1.32$  和  $2.16 \pm 1.41$ , 雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 与孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 之比 (阳性为 1, 阴性为 0) 分别为  $0.38 \pm 0.13$  和  $0.52 \pm 0.24$ , Ki-67 分别为 ( $61.51 \pm 21.15$ )% 和 ( $26.16 \pm 23.64$ )%, 是否复发 (复发为 1, 不复发为 0) 分别为  $0.57 \pm 0.16$  和  $0.12 \pm 0.08$ , 肿瘤体积分别为 ( $3.12 \pm 1.23$ )  $\text{cm}^3$  和

( $1.63 \pm 1.28$ )  $\text{cm}^3$ 。主要的差异在于 BRCA1 基因突变频率与 PD-L1 表达水平。

进一步通过分析 TCGA-OV 数据集，表明在 PD-1/PD-L1 相关基因中，FOXP3 与 CLEC7A 对免疫相关基因具有调节能力 (图 1C)，MRA 分析也表明了 FOXP3 与 CLEC7A 是具有调节能力的基因 (图 1D)。CLEC7A 高表达的患者总体生存率差于

CLEC7A 低表达的患者 (图 1E)，且 CLEC7A 在死亡的患者中表达升高 (图 1G)，而 FOXP3 与患者总体生存率并不相关 (图 1F)，且在生存与死亡的患者中表达无差异 (图 1H)。免疫组织化学染色结果也证实了高表达的 CLEC7A 主要集中在肿瘤细胞中，且高于邻近的正常组织 (图 1I)。



注：A 为高级别浆液性卵巢癌和卵巢透明细胞癌中，乳腺癌易感基因 BRCA1 突变频率的差异；B 为检测高级别浆液性卵巢癌和卵巢透明细胞癌中，PD-L1 免疫组织化学染色得分比较差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )；C 为在 TCGA-OV 数据集中，鉴定出高级别浆液性卵巢癌与其他亚型卵巢癌中的差异表达基因，使用转录调控网络分析，确定调控免疫相关基因的 PD-1/PD-L1 通路相关基因；D 为使用 MRA 算法对免疫相关基因的调节能力进行排序；E、F 为在 TCGA-OV 数据集中，CLEC7A、FOXP3 基因表达水平与患者总体生存率之间的相关性；G、H 为在 TCGA-OV 数据集中，CLEC7A 基因在转归结局为生存和死亡的患者之间的表达差异，FOXP3 基因在转归结局为生存和死亡的患者之间的表达差异；I 为免疫组化 (En Vision 两步法染色) 检测 70 例 HGSOV 与对应的癌旁组织中 CLEC7A 在蛋白水平的表达，NON 为癌旁正常组织；组间比较， $ns P > 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

图 1 转录调控网络分析确定 CLEC7A 为高级别浆液性卵巢癌中与 PD-1/PD-L1 相关的基因

Figure 1 Transcriptional regulatory network analysis identifies CLEC7A as a gene associated with PD-1/PD-L1 in HGSOV

## 2.2 CLEC7A 促进高级别浆液性卵巢癌细胞的增殖, 抑制其凋亡

随后构建了具有 CLEC7A 敲低能力的 CLEC7A shRNA(图 2A)。RT-qPCR 结果显示, CLEC7A shRNA 抑制 CLEC7A mRNA 水平的表达(图 2B)。敲低 CLEC7A 表达后, OVCAR-3 细胞凋亡增加(图 2C)。JC-10 染色证实, CLEC7A 敲低使线粒体途径的凋亡增加(图 2D)。CCK-8 结果显示, CLEC7A 敲低后 OVCAR-3 的体外增殖能力下降(图 2E)。裸鼠荷瘤实验显示, CLEC7A 敲低后, OVCAR-3 的体内增殖能力受限(图 2F)。

## 2.3 CLEC7A 通过 JAK/STAT3 通路激活 PD-L1 表达

HGOSC 细胞中 CLEC7A 随着处理时间的延长而升高(图 3A)。在 TCGA-OV 数据集中, CLEC7A 高表达组的高表达基因中, STAT3 信号通路富集(图 3B、C)。蛋白免疫印迹法结果显示 CLEC7A 敲低后, HGOSC 细胞中 JAK、STAT3 蛋白磷酸化降低(图 3D)。进一步构建了 CLEC7A 过表达载体, 并转入 OVCAR-3 细胞系中, RT-PCR 表明 CLEC7A 在 mRNA 水平上诱导了 CLEC7A 的表达(图 3E)。流式细胞结果显示, CLEC7A 的表达促进了 OVCAR-3 细胞系表面 PD-L1 的表达, 而使用 STAT3 抑制剂 Stattic 处理 48 h 后, OVCAR-3 CLEC7A 细胞的 PD-L1 表达下降(图 3F)。CCK-8 法结果显示, CLEC7A 过表达的 HGOSC 细胞增殖能力上升(图 3G)。免疫组化结果显示 CLEC7A 与 PD-L1 在蛋白水平上存在关联(图 3H)。

## 2.4 高级别浆液性卵巢癌中 CLEC7A 的高表达抑制 T 细胞的增殖

前面的数据揭示了 CLEC7A 对 PD-L1 体外的调节作用, 通过单细胞测序数据集进行体内验证, 在 GSE184880 公共数据集中, CLEC7A 高表达的 HGSOC 组织中, CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例下降(图 4A)。在 BALB/c 小鼠的移植瘤中, CLEC7A 过表达的肿瘤中 MDSC 的比例上升(图 4B), 而 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例下降(图 4C)。相对于从 CON 中分离得到的 MDSC, CLEC7A 过表达的移植瘤中的 MDSC 对 T 细胞增殖的抑制能力上升(图 4D)。

## 3 讨论

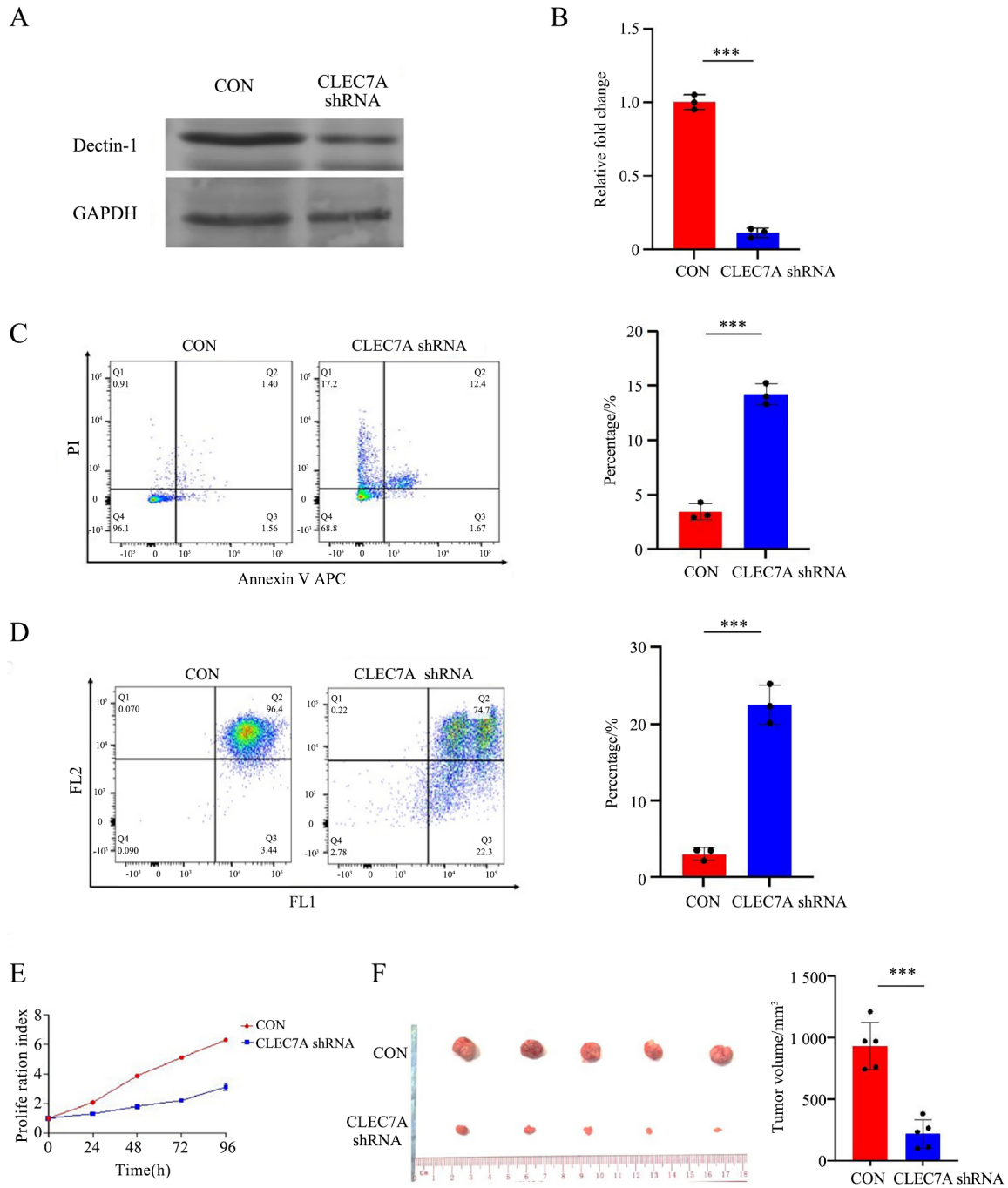
CLEC7A 也称为 Dectin-1, 是一种重要的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR), 在

先天免疫中发挥关键作用, 主要表达于巨噬细胞、树突状细胞和中性粒细胞等免疫细胞表面, 其基本功能为识别真菌细胞壁成分中的  $\beta$ -1,3- 葡聚糖, 当与  $\beta$ -1,3- 葡聚糖结合后, 通过其内含的免疫受体酪氨酸激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM), 激活下游信号通路, 包括 Syk 激酶和核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路, 进而诱导炎症因子 (如白介素 -6、转化生长因子  $\alpha$ ) 和趋化因子 (如 CXC 基序趋化因子配体 8) 的产生, 增强吞噬作用, 有效清除入侵的真菌病原体, 此外, Dectin-1 还参与调节适应性免疫反应, 通过影响树突状细胞的成熟和抗原呈递功能, 调控 T 细胞的分化和功能, 进而在抗肿瘤免疫中发挥作用<sup>[14-18]</sup>。

近年的研究揭示, CLEC7A 在多种肿瘤中表达异常, 例如胶质瘤中 CLEC7A 的高表达与患者预后不良相关<sup>[19-23]</sup>, 在胃癌中, CLEC7A 主要在肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 上表达<sup>[24-26]</sup>, 激活 TAM 中的 NF- $\kappa$ B 通路, 促进促炎因子和血管生成因子的释放, 增强肿瘤的侵袭性和转移能力, 其高表达与 T 细胞免疫耐受、肿瘤的进展和患者的不良预后相关<sup>[27]</sup>。本研究通过生物信息学以及体内外研究, 初步证实了 CLEC7A 通过免疫相关信号通路及 PD-L1 促进 HGSOC 恶性生长的作用及初步的分子机制。

本研究首先选取了 TCGA-OV 数据集, 并筛选出 HGSOC 亚型的测序数据, 通过转录调控网络分析, 结果显示 CLEC7A 在 PD-1/PD-L1 相关基因中发挥了重要作用, 调节了免疫基因的表达, 并与患者的总体生存率密切相关。在病理标本中, CLEC7A 在 HGSOC 肿瘤组织中呈现高表达。进一步的研究表明, 敲低 CLEC7A 不仅诱导了 HGSOC 细胞系的凋亡, 还抑制了增殖, 同时促进了内源性凋亡途径的激活。此外, 抑制肿瘤细胞中 PD-L1 的表达主要通过肿瘤细胞表面的 Fas 受体激活外源性凋亡途径<sup>[28]</sup>, 基于这些发现, 笔者推测 CLEC7A 不仅通过直接调节免疫反应来影响肿瘤的免疫环境, 还通过内在的细胞死亡途径参与肿瘤细胞的发生、发展。

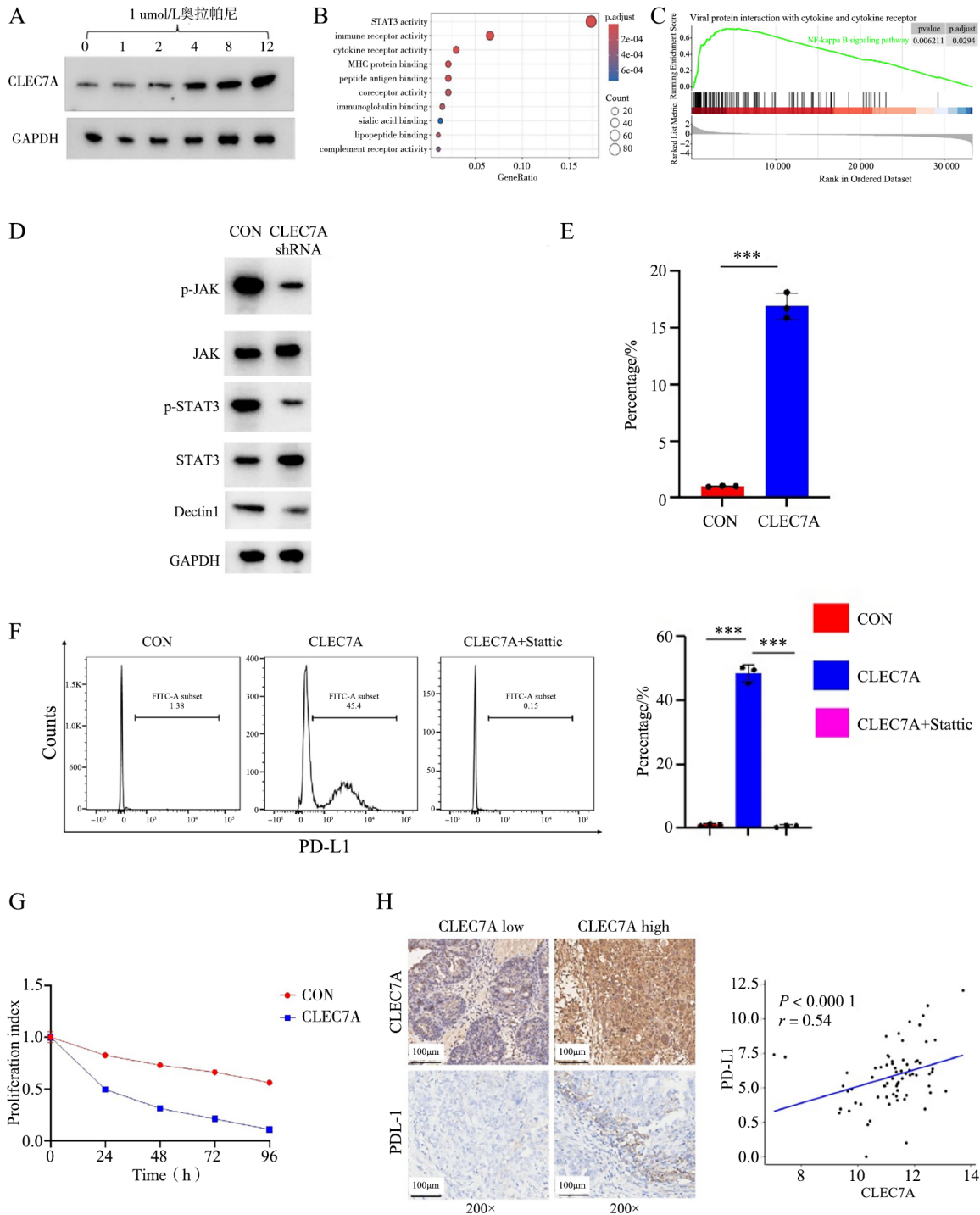
根据现有研究报道, PARP 抑制剂的重要治疗靶点为 BRCA1 缺失性突变<sup>[29-30]</sup>, 然而本研究数据显示, PARP 抑制剂能够激活 CLEC7A 的表达, 而 CLEC7A 的表达促进的细胞增殖可能成为 PARP 抑制剂治疗中的不利因素。通过通路富集分析与



注: A 为 OVCAR-3 细胞分别转入 CON、CLEC7A shRNA 载体 48 h 后, 使用蛋白免疫印迹法检测 CLEC7A 在蛋白水平的表达结果; B 为使用 RT-qPCR 检测 CON、CLEC7A shRNA1 细胞中 CLEC7A 在 mRNA 水平的表达结果; C 为 OVCAR-3 细胞分别转入 CON、CLEC7A shRNA1 载体 48 h 后, 使用 Annexin V APC/PI 双染法检测细胞凋亡变化的结果; D 为使用 JC-10 染色法检测 OVCAR-3 CON、CLEC7A shRNA1 细胞凋亡变化的结果; E 为使用 CCK-8 法检测 OVCAR-3 CON、CLEC7A shRNA1 细胞增殖变化的结果; F 为分别取  $1 \times 10^7$  个 OVCAR-3 CON 组、CLEC7A shRNA1 组细胞注射入裸鼠皮下, 21 d 后两组小鼠肿瘤体积变化的结果; 组间比较, \*\*\* $P < 0.001$ 。

图 2 CLEC7A 促进高级别浆液性卵巢癌细胞的增殖并抑制其凋亡

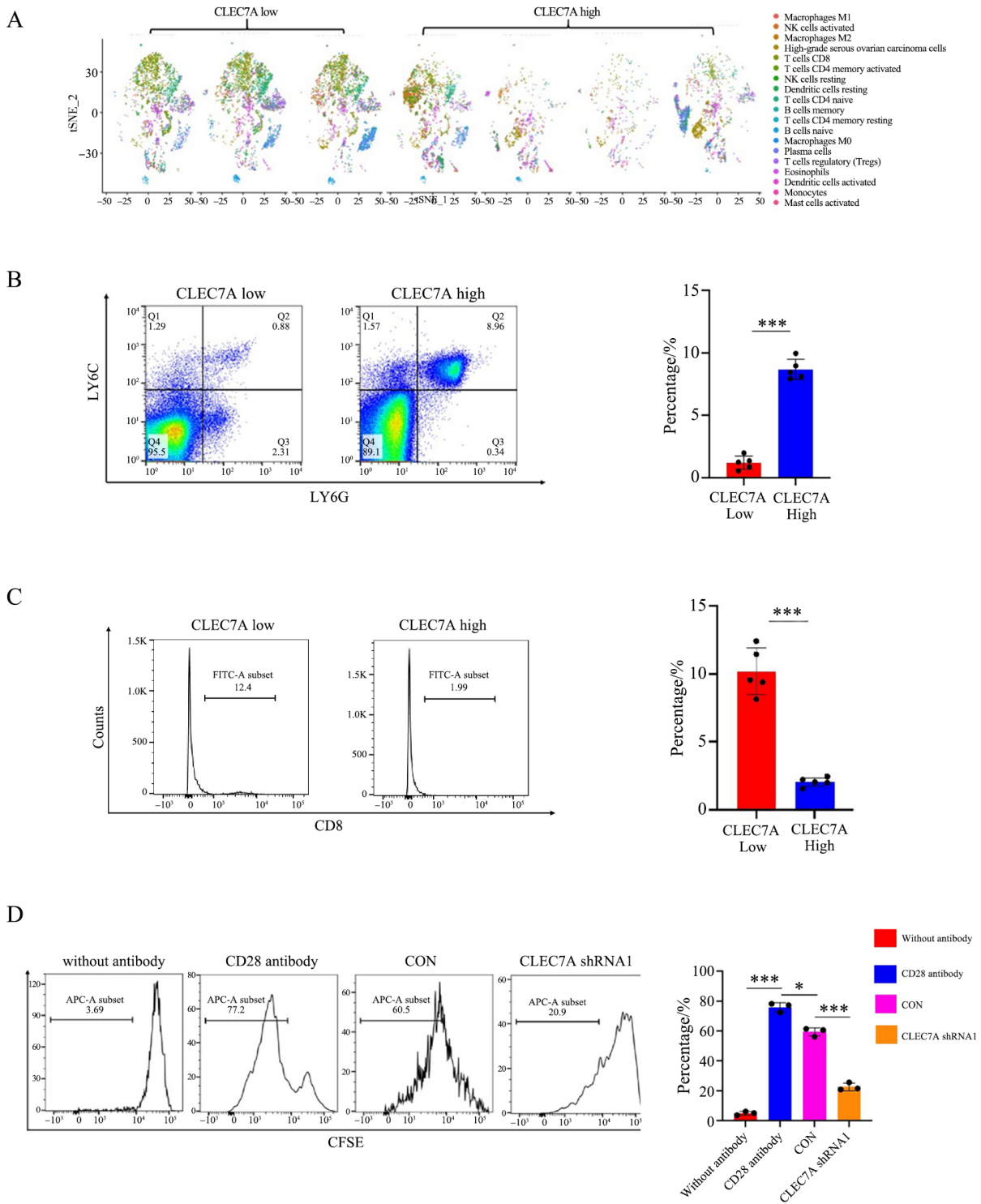
Figure 2 High expression promoted by CLEC7A is crucial for the proliferation and inhibition of apoptosis in HGSOc tumor cells



注：A 为使用  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的奥拉帕尼在不同时间点处理 OVCAR-3 细胞系，并使用蛋白免疫印迹法检测 CLEC7A 在蛋白水平的表达；B 为 TCGA-OV 数据集中，检测 HGSOC 中 CLEC7A 高表达组的信号通路的富集；C 为使用 GSEA 检测 STAT3 信号通路的富集；D 为使用蛋白免疫印迹法检测 OVCAR-3 CON、CLEC7A shRNA1 细胞中 JAK、STAT3 磷酸化的变化；E 为 OVCAR-3 细胞转入 CON 与 CLEC7A 过表达载体 48 h 后，使用 RT-qPCR 检测 CLEC7A 在 mRNA 水平的变化；F 为 OVCAR-3 CLEC7A 过表达使用 STAT3 抑制剂 Stattic 处理 48 h 后，使用流式细胞仪检测 PD-L1 的表达；G 为 CCK-8 法检测 CLEC7A 过表达与 OVCAR-3 细胞系增殖能力的关系；H 为免疫组化（En Vision 两步法染色）检测 HGSOC 石蜡标本中 CLEC7A 与 PD-L1 表达的相关性；组间比较，\*\*\* $P < 0.001$ 。

图3 CLEC7A 通过 JAK/STAT3 通路激活了 PD-L1 的表达

Figure 3 CLEC7A activates the expression of PD-L1 through the JAK/STAT3 signaling pathway



注: A 为在 GSE184880 数据集中, 比较 CLEC7A 低表达组和 CLEC7A 高表达组样本之间免疫细胞比例的变化; B 为分别取  $1 \times 10^7$  个 OVCAR-3 CON、CLEC7A shRNA1 细胞注射入裸鼠皮下, 14 d 后检测原位肿瘤中 MDSC 的变化; C 为检测 OVCAR-3 CON、CLEC7A shRNA1 原位肿瘤中, CD8<sup>+</sup>T 细胞比例的变化; D 为将 CON 与 CLEC7A 骨髓系来源的抑制性细胞 (MDSC) 分别与 T 细胞共培养后, 使用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 检测 T 细胞增殖的改变; 组间比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图 4 高级别浆液性卵巢癌中 CLEC7A 的高表达抑制了 T 细胞的增殖

Figure 4 High expression of CLEC7A in HGSOc inhibits the proliferation of T cells

蛋白免疫印迹法,进一步证实了CLEC7A能够调节JAK和STAT3的磷酸化,而CLEC7A诱导的PD-L1表达增加依赖于STAT3通路的激活。因此,在PARP抑制剂作用的细胞中,CLEC7A及其下游的STAT3通路被激活,不仅诱导了PD-L1的表达,同时还促进了细胞增殖,这成为CLEC7A调节疾病恶性生长的重要机制。

对scRNA测序数据集的分析和功能验证结果显示,在CLEC7A高表达的组织中,CD8<sup>+</sup>T细胞的比例下降,而MDSC的比例上升,进一步的T细胞增殖实验结果显示,在CLEC7A高表达的肿瘤细胞中,MDSC的功能被激活,也确定了在接受PARP抑制剂处理的HGSOC细胞系中,尽管CLEC7A的高表达促进了PD-L1的表达,但其诱导的免疫抑制信号能够大幅削弱免疫治疗的效果。

综上所述,本研究明确了在HGSOC中,CLEC7A的表达通过JAK/STAT3通路上调PD-L1的表达,同时,在体内环境下,CLEC7A的高表达诱导了免疫抑制信号通路的激活,最终促进了HGSOC的恶性生长,这一发现,为HGSOC免疫治疗相关靶点的筛选提供理论和基础研究依据,并为HGSOC药物开发提供新的思路。

**利益冲突声明:** 本研究未受到企业、公司等第三方资助,不存在潜在利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] KANDALAFT L E, LANITI D D, COUKOS G. Immunobiology of high-grade serous ovarian cancer: lessons for clinical translation[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22 ( 11 ): 640-656. DOI: 10.1038/s41568-022-00503-z.
- [2] PIZARRO D, ROMERO I, PÉREZ-MIES B, et al. The prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes, PD-L1, BRCA mutation status and tumor mutational burden in early-stage high-grade serous ovarian carcinoma: a study by the Spanish Group for Ovarian Cancer Research (GEICO)[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 ( 13 ): 11183. DOI: 10.3390/ijms241311183.
- [3] FOTOPOULOU C, ROCKALL A, LU H, et al. Validation analysis of the novel imaging-based prognostic radiomic signature in patients undergoing primary surgery for advanced high-grade serous ovarian cancer (HGSOC)[J]. *Br J Cancer*, 2022, 126 ( 7 ): 1047-1054. DOI: 10.1038/s41416-021-01662-w.
- [4] BUECHEL M E, ENSERRO D, BURGER R A, et al. Correlation of imaging and plasma based biomarkers to predict response to bevacizumab in epithelial ovarian cancer (EOC)[J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 161 ( 2 ): 382-388. DOI: 10.1016/j.ygyno.2021.02.032.
- [5] XU J, DAI Y, GAO Y, et al. RAD51D secondary mutation-mediated resistance to PARP-inhibitor-based therapy in HGSOC[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 ( 19 ): 14476. DOI: 10.3390/ijms241914476.
- [6] WANG Y, DUVAL A J, ADLI M, et al. Biology-driven therapy advances in high-grade serous ovarian cancer[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134 ( 1 ): e174013. DOI: 10.1172/JCI174013.
- [7] ILLUZZI G, STANISZEWSKA A D, GILL S J, et al. Preclinical characterization of AZD5305, a next-generation, highly selective PARP1 inhibitor and trapper[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28 ( 21 ): 4724-4736. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-22-0301.
- [8] TANG Q, WANG X, WANG H, et al. Advances in ATM, ATR, WEE1, and CHK1/2 inhibitors in the treatment of PARP inhibitor-resistant ovarian cancer[J]. *Cancer Biol Med*, 2024, 20 ( 12 ): 915-921. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0260.
- [9] CHEN H, MOLBERG K, STRICKLAND A L, et al. PD-L1 expression and CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes in different types of tubo-ovarian carcinoma and their prognostic value in high-grade serous carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2020, 44 ( 8 ): 1050-1060. DOI: 10.1097/pas.0000000000001503.
- [10] MORRA F, MEROLLA F, DAMIA G, et al. The disruption of the CCDC6 - PP4 axis induces a BRCAness like phenotype and sensitivity to PARP inhibitors in high-grade serous ovarian carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41 ( 1 ): 245. DOI: 10.1186/s13046-022-02459-2.
- [11] CHIAPPA M, GUFFANTI F, BERTONI F, et al. Overcoming PARPi resistance: preclinical and clinical evidence in ovarian cancer[J]. *Drug Resist Updat*, 2021, 55 : 100744. DOI: 10.1016/j.drug.2021.100744.
- [12] SHEN J, ZHAO W, JU Z, et al. PARPi triggers the STING-dependent immune response and enhances the therapeutic efficacy of immune checkpoint blockade independent of BRCAness[J]. *Cancer Res*, 2019, 79 ( 2 ): 311-319. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1003.
- [13] KALIA N, SINGH J, KAUR M. The role of dectin-1 in health and disease[J]. *Immunobiology*, 2021, 226 ( 2 ): 152071. DOI: 10.1016/j.imbio.2021.152071.
- [14] MATA-MARTÍNEZ P, BERGÓN-GUTIÉRREZ M, DEL FRESNO C. Dectin-1 signaling update: new perspectives for trained immunity[J]. *Front Immunol*, 2022, 13 : 812148. DOI: 10.3389/fimmu.2022.812148.
- [15] YE S, HUANG H, HAN X, et al. Dectin-1 acts as a non-classical receptor of ang II to induce cardiac remodeling[J]. *Circ Res*, 2023, 132 ( 6 ): 707-722. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.122.322259.
- [16] TANG C, SUN H, KADOKI M, et al. Blocking Dectin-1 prevents colorectal tumorigenesis by suppressing prostaglandin E2 production in myeloid-derived suppressor cells and enhancing IL-22 binding protein expression[J]. *Nat Commun*, 2023, 14 ( 1 ): 1493. DOI: 10.1038/s41467-023-37229-x.
- [17] CAI R, GONG X, LI X, et al. Dectin-1 aggravates neutrophil inflammation through caspase-11/4-mediated macrophage

- pyroptosis in asthma [J]. *Respir Res*, 2024, 25 ( 1 ): 119. DOI: 10.1186/s12931-024-02743-z.
- [18] GRINGHUIS S I, KAPTEIN T M, REMMERSWAAL E B M, et al. Fungal sensing by dectin-1 directs the non-pathogenic polarization of TH17 cells through balanced type I IFN responses in human DCs [J]. *Nat Immunol*, 2022, 23 ( 12 ): 1735-1748. DOI: 10.1038/s41590-022-01348-2.
- [19] ANAYA E U, AMIN A E, WESTER M J, et al. Dectin-1 multimerization and signaling depends on fungal  $\beta$ -glucan structure and exposure [J]. *Biophys J*, 2023, 122 ( 18 ): 3749-3767. DOI: 10.1016/j.bpj.2023.07.021.
- [20] PEDRO A R V, LIMA T, FRÓIS-MARTINS R, et al. Dectin-1-mediated production of pro-inflammatory cytokines induced by yeast  $\beta$ -glucans in bovine monocytes [J]. *Front Immunol*, 2021, 12 : 689879. DOI: 10.3389/fimmu.2021.689879.
- [21] CHENG Q J, FARRELL K, FENN J, et al. Dectin-1 ligands produce distinct training phenotypes in human monocytes through differential activation of signaling networks [J]. *Sci Rep*, 2024, 14 : 1454. DOI: 10.1038/s41598-024-51620-8.
- [22] DEERHAKE M E, CARDAKLI E D, SHINOHARA M L. Dectin-1 signaling in neutrophils up-regulates PD-L1 and triggers ROS-mediated suppression of CD4<sup>+</sup>T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2022, 112 ( 6 ): 1413-1425. DOI: 10.1002/jlb.3a0322-152rr.
- [23] TIWARI R K, SINGH S, GUPTA C L, et al. Repolarization of glioblastoma macrophage cells using non-agonistic Dectin-1 ligand encapsulating TLR-9 agonist: plausible role in regenerative medicine against brain tumor [J]. *Int J Neurosci*, 2021, 131 ( 6 ): 591-598. DOI: 10.1080/00207454.2020.1750393.
- [24] WANG J, LI X, WANG K, et al. CLEC7A regulates M2 macrophages to suppress the immune microenvironment and implies poorer prognosis of glioma [J]. *Front Immunol*, 2024, 15 : 1361351. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1361351.
- [25] MENG X, TIAN L, CAI J. Editorial: Insights and implications of mechanisms shaping glioma immune landscape, immunotherapy resistance, and relevant translational research [J]. *Front Oncol*, 2024, 14 : 1485761. DOI: 10.3389/fonc.2024.1485761.
- [26] LIU X, LV K, WANG J, et al. C-type lectin receptor Dectin-1 blockade on tumour-associated macrophages improves anti-PD-1 efficacy in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2023, 129 ( 4 ): 721-732. DOI: 10.1038/s41416-023-02336-5.
- [27] WATTENBERG M M, COHO H, HERRERA V M, et al. Cancer immunotherapy via synergistic coactivation of myeloid receptors CD40 and Dectin-1 [J]. *Sci Immunol*, 2023, 8 ( 89 ): eadj5097. DOI: 10.1126/sciimmunol.adj5097.
- [28] LI Z, DUAN D, LI L, et al. Tumor-associated macrophages in anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy for hepatocellular carcinoma: recent research progress [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15 : 1382256. DOI: 10.3389/fphar.2024.1382256.
- [29] WILSON Z, ODEDRA R, WALLEZ Y, et al. ATR inhibitor AZD6738 ( ceralasertib ) exerts antitumor activity as a monotherapy and in combination with chemotherapy and the PARP inhibitor olaparib [J]. *Cancer Res*, 2022, 82 ( 6 ): 1140-1152. DOI: 10.1158/0008-5472.can-21-2997.
- [30] KIM Y N, SHIM Y, SEO J, et al. Investigation of PARP inhibitor resistance based on serially collected circulating tumor DNA in patients with BRCA-mutated ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29 ( 14 ): 2725-2734. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-3715.

(责任编辑: 林燕薇)