



申请代码	H1604
受理部门	
收件日期	
受理编号	8150110884



# 国家自然科学基金 申请书

(2015版)

资助类别： 青年科学基金项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称： 新辅助放化疗对直肠癌区域淋巴结中CD169阳性T细胞的影响和调控机制

申请人： 张荣欣                      电话： 020-87343456

依托单位： 中山大学

通讯地址： 广东省广州市东风东路651号

邮政编码： 510060                      单位电话： 02084111595、84115962

电子邮箱： zhangrx@sysucc.org.cn

申报日期： 2015年03月04日

国家自然科学基金委员会



中文摘要	<p>直肠癌患者接受术前新辅助放化疗可以有效的降低肿瘤分期、提高保肛率、降低局部复发率。但目前尚不清楚新辅助治疗是否以及如何影响组织的抗肿瘤免疫应答。我们新近发现：在直肠癌引流淋巴结中存在一群CD169+CD8+T细胞亚群，该亚群在对新辅助治疗有效组患者淋巴结中的比例明显高于治疗无效组。提示，CD169+T细胞可能参与了抗肿瘤免疫应答，与新辅助治疗效果密切相关。以此为基础，本课题拟结合临床样本分析和实验模型来：1) 明确直肠癌淋巴结中浸润的CD169+T细胞的功能与表型；2) 研究肿瘤微环境调控T细胞表达CD169的具体机制；3) 探讨新辅助治疗中的多类不同化疗药物对CD169+T细胞数量和功能的影响；4) 利用大规模临床样本探讨该细胞亚群对新辅助效果的预测能力。所得结果将帮助我们理解新辅助治疗对机体免疫系统影响的具体机制，为筛选合适的患者进行新辅助治疗后的强化治疗提供理论依据。</p>
英文摘要	<p>Colorectal cancer patients received preoperative neoadjuvant chemoradiation can achieve tumor down staging, better sphincter reserve rate, and lower local recurrence rate. It is still unclear whether neoadjuvant therapy can trigger antitumor immune response in those patients. Our recent study demonstrated that there is a group of CD169 + CD8 + T cells in regional lymph nodes of rectal cancer, especially in the lymph nodes of patients who respond better to neoadjuvant therapy than those who did not. We hypothesize that CD169 + T cells may participate in antitumor immune response, which could influence the effect of neoadjuvant therapy. To gain a better understanding of this assumption, we plan to use clinical sample analysis and experimental studies to: 1) characterize the phenotype and function activities of CD169 + T cells in rectal cancer ; 2) dissect the underlying mechanism that regulate the generation and function of CD169+ T cells of tumor microenvironment; 3) investigate the impact of different types of chemotherapy drugs on CD169 + T cell; 4) validate the above hypothesis in large clinical samples. The results obtained from this project will help us to better understand the mechanism of immune system, and to select the appropriate patient after neoadjuvant therapy for the following intensive treatment.</p>



## 国家自然科学基金项目资金预算表（定额补助）

项目名称：新辅助放化疗对直肠癌区域淋巴结中CD169阳性T细胞的影响和调控机制

项目负责人：张荣欣

金额单位：万元

序号	科目名称	金额	备注
	(1)	(2)	(3)
1	一、项目资金支出	30.0000	/
2	(一) 直接费用	25.0000	
3	1、设备费	0.0000	
4	(1) 设备购置费	0.0000	
5	(2) 设备试制费	0.0000	
6	(3) 设备改造与租赁费	0.0000	
7	2、材料费	15.8000	用于购置项目必需的实验材料及试剂
8	3、测试化验加工费	4.1000	用于测序，荧光定量PCR，激光共聚焦等
9	4、燃料动力费	0.0000	
10	5、差旅费	0.5000	会议产生的交通费及注册费
11	6、会议费	0.0000	
12	7、国际合作与交流费	0.0000	
13	8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费	1.0000	文章发表所需版面费
14	9、劳务费	3.6000	用于支付研究生的劳务费用
15	10、专家咨询费	0.0000	
16	11、其他支出	0.0000	
17	(二) 间接费用	5.0000	无法在直接费用里支出的费用
18	其中：绩效支出	1.2500	
19	二、自筹资金	0.0000	



## 预算说明书

一、本项目经费合计：30万元

(一) 直接费用：25万元

1、设备费：无。

2、材料费：15.8万元。

A. 常用耗材：3.1万元

淋巴细胞分离液，600元/500ml/瓶，5瓶，共0.3万元；  
DMEM液体培养基，300元/1L，10升，共0.3万元；  
RPMI液体培养基，300元/1L，10升，共0.3万元；  
胎牛血清(Hyclone)，3000元/500ml/瓶，2瓶，共0.6万元；  
柠檬酸缓冲液，20元/2L/包，100包，共0.2万元；  
Tris-EDTA修复液(pH8.0, pH 9.0, pH 9.5)，100元/100ml/瓶，10瓶；0.1万元；  
二甲苯，100元/500ml/瓶，20瓶，共0.2万元；  
无水乙醇，100元/500ml/瓶，20瓶，共0.2万元；  
PCR管，10000个/箱，200元/箱，15箱，共0.3万元；  
细胞培养板，1500元/100块/箱，2箱，共0.3万元；  
细胞培养瓶，1500元/100个/箱，2箱，共0.3万元；

B. 常用抗体：10.2万元

CD169单抗(PE, 100T)，CD3单抗(APC, 100T)，CD8单抗(PE, FITC, 100T)，CD14单抗(PE, FITC, 100T)，CD8单抗(PE, FITC, 100T)，CD8单抗(PE, FITC, 100T)，IFN $\gamma$ 单抗(PC7, 100T)，TNF $\alpha$ 单抗(PC7, 100T)，CTLA4单抗(PC7, 100T)，均为4000元/100T/瓶，各1瓶，共3.6万元；  
Perforin(PC7, 100T)，Granzyme B(PC7, 100T)，CD62L(APC, 100T)，CD45RA(PC7, 100T)，CD69(FITC, 100T)，HLADR(PC7, 100T)，PD-1(PC7, 100T)，IL-10(FITC, 100T)，均为4000元/100T/瓶，各1瓶，共3.2万元；  
CD169抗体，3000元/200ug，2支，共计0.6万元；  
CD8抗体，4000元/200ug，1支，共0.4万元；  
CD68抗体，4000元/200ug，1支，共0.4万元；  
CD3抗体，4000元/200ug，1支，共0.4万元；  
山羊-抗鼠/兔IgG(荧光488, 555, 633)，4000元/500ul，2支，共0.8万元；  
山羊-抗鼠/兔Ig-HRP，4000元/1ml，2支，共0.8万元；

C. 其他试剂：1.8万元

CD14磁珠，6000元/kit，2kit，共1.2万元。  
Pan T磁珠，6000元/kit，1kit，共0.6万元。  
化疗药物：共0.4万元  
5-FU，2元/支，42支，共0.0084元  
奥沙利铂，2604元/支，1支，共0.2604元  
CTP11，1312元/支，1支，共0.1312元

D. 动物实验费用0.7万元

C57BL/6J小鼠，30元/只，200只，共0.6万元；  
蛋白纯化填料：0.1万元。

3、测试化验加工费：4.1万元

1) 测序费用，每次费用50元，预计需测序100次，共需要0.5万元；  
2) 荧光定量PCR，每小时费用100元，预计需要使用80小时，共需要0.8万元；  
3) 激光共聚焦，每小时费用100元，预计需要130小时，共需要1.3万元；  
4) 流式分选，每小时费用100元，预计需要150小时，共需要1.5万元；  
4、燃料动力费：无

5、差旅费：合计0.5万元

参加广东省大肠癌会议：每年一次，每次参加2人，交通费平均往返车费约500元，按照3年计算。合计3次 $\times$ 2人 $\times$ 500元=0.3万元。参加广东省大肠癌会议：注册费500元/人 $\times$ 2人 $\times$ 2年=0.2万元。

6、会议费：无

7、国际合作与交流费：无。

8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费 1万元  
本项目预计在国外期刊发表论文2-3篇。该费用用于支付版面费或者论文修改费用。

9、劳务费：合计3.6万元  
用于非在职的参加研究的在读研究生和临时聘用人员的劳务费发放。本项目有3名在读研究生进行相关实验。每人400元/月，资助3年：400元/月 $\times$ 3人 $\times$ 10月/年 $\times$ 3年=3.6万元。

10、专家咨询费：无。

(二) 间接经费：5万元

绩效支出：1.25万元

二、自筹资金：无。

(详细说明见正文资金预算说明)



## 报告正文

### 1. 立项依据与研究内容 (4000-8000 字):

(1) 项目的立项依据。(研究意义、国内外研究现状及发展动态分析,需结合科学研究发展趋势来论述科学意义;或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录)

#### 研究意义:

结直肠癌是全世界发病率很高的一种恶性肿瘤。我国结直肠癌发病率的特点为直肠癌多见,且多为中低位直肠癌。目前直肠癌患者接受术前新辅助放化疗已成为了标准的治疗模式。术前放化疗可以有效的降低肿瘤分期、提高保肛率、降低局部复发率。新近的研究表明,放化疗除了直接对肿瘤细胞产生杀伤,还能够通过影响免疫微环境状态来帮助清除肿瘤。但目前关于直肠癌新辅助治疗对机体免疫微环境影响的相关研究甚少。

我们的前期研究发现:肠癌引流淋巴结中存在一群 $CD169^+CD8^+$ T细胞。有意思的是,通过对40例经新辅助治疗的肠癌患者的术后淋巴结石蜡切片进行免疫荧光多重染色及统计分析发现:对新辅助治疗有效组的患者淋巴结中 $CD169^+$ T细胞比例明显高于治疗失败组。提示, $CD169^+$ T细胞可能参与了抗肿瘤免疫应答,与新辅助治疗效果密切相关。以此为基础,本课题拟结合临床样本分析和实验模型系统阐明:直肠癌淋巴结中浸润的 $CD169^+$ T细胞的功能与表型;研究肿瘤微环境调控T细胞表达 $CD169$ 的具体机制;探讨新辅助治疗中的多类不同化疗药物对 $CD169^+$ T细胞数量和功能的影响;利用大规模临床样本探讨该细胞亚群对新辅助效果的预测能力。所得结果有助于我们理解新辅助治疗的具体作用机制,并为新的肿瘤分子分期标准以及筛选合适的患者进行新辅助治疗后的强化治疗提供新的理论依据。

#### 国内外研究现状及发展动态:

结直肠癌是全世界上发病率很高的一种恶性肿瘤。我国结直肠癌发病率的特点为直肠癌多见,且多为中低位直肠癌。目前直肠癌的综合治疗成为了标准的治疗模式[1]。局部进展期的直肠癌(临床分期为II期或者III期)患者进行新辅助放化疗(RCT)结合全直肠系膜切除(TME)的根治术已经逐步成为治疗中下段进展期直肠癌的标准模式。术前放化疗可以有效的降低肿瘤分期、提高保肛率、降低局部复发率[1-3]。按照标准治疗方案,直肠癌患者在接受了术前放化疗之后,仍需要接受4-6个月的氟尿嘧啶类药物的



辅助化疗[4]，但是这种治疗方案也受到质疑[5]。根据临床研究 EORTC22921 的最新结果显示对新辅助放化疗反应良好的患者更加能够从术后的辅助治疗中获益更多[6]。目前临床上使用较多的为 TRG 分级（肿瘤消退程度分级）[7]，但其主要基于对残留肿瘤细胞的情况进行评价，未能评估周围淋巴结情况，且与广泛使用的 TNM 分期的契合度并不好，所以尚未能够成为一个完美的评价系统[8]。如何更好的评估新辅助治疗效果以及筛选合适患者进行术后的辅助治疗是目前临床亟待解决的问题。

肿瘤的发生发展是癌细胞与免疫系统长期“共进化”的结果，肿瘤局部的免疫状态能显著影响肿瘤进展[9, 10]。既往的研究往往关注在放化疗通过直接 DNA 损伤以及细胞 DNA 修复来对肿瘤细胞进行杀伤。然而，近年来的研究发现[11-13]，放化疗除了直接作用于肿瘤细胞对其进行杀伤，还能通过主动的调控免疫系统平衡来帮助清除肿瘤。例如，经照射死亡的肿瘤细胞表面的 CRT 能够加快肿瘤细胞被抗原递呈细胞（APC）识别，并释放能够被 APC 识别的抗体。死亡的肿瘤细胞还能释放 HMGB1 迅速通过 TLR4 途径来激活 APC [14, 15]。被激活的 APC 往往携带肿瘤特异性抗原迁移至肿瘤引流区域的淋巴结。而淋巴结不在放射治疗的范围内，初始 T 细胞往往会被迁移至此的 APC 激活，扩增，并获得杀伤功能。具有杀伤功能的效应 T 细胞再迁移至经照射的肿瘤区域，或者对放射治疗范围之外的肿瘤细胞行使抗肿瘤功能。

化疗药物除了直接杀伤肿瘤细胞也能通过各种途径影响机体的免疫状态。5-FU、奥沙利铂（Oxaliplatin）和伊立替康（CPT11）是直肠癌常用的化疗药物。Vincent 等研究发现，5-FU 能够杀伤髓系来源抑制性细胞（MDSC），而对于具有肿瘤杀伤功能的 CD8<sup>+</sup>T 细胞的影响不大[16]。Apolloni 等进一步的研究发现 5-FU 能够选择性触发 MDSC 细胞的凋亡，其机制是 MDSC 中 5-FU 代谢过程中重要的 TS 酶表达量较低，使其受 5-FU 诱导死亡的影响更大[17]。与 5-FU 的作用相类似，奥沙利铂能够降低 Treg[18]以及 MDSC 细胞数量，继而增强 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例和功能，提高免疫系统对于肿瘤细胞的杀伤[19, 20]。然而，伊立替康（CPT11）的作用效果则相反。Kanterman 等发现不同化疗方案（FOLFOX vs. FOLFIRI）会对肠癌患者外周血中 MDSC 的比例产生截然相反的影响；在小鼠模型中的研究证实其原因是 CPT11 能够抑制 MDSC 细胞的凋亡以及分化，从而保持了 MDSC 的免疫抑制功能，进而导致肿瘤进展[21]。这些结果说明，不同化疗药物会对免疫系统的产生截然不同的影响；因此，明确不同化疗药物调控免疫应答的机理将有助于临床选择合适的化疗方案。



化疗能通过调控免疫平衡来影响肿瘤进展，临床研究也证实**对免疫微环境的评估能进一步帮助临床预测新辅助的治疗效果**。Gianni 等的临床研究报道，在接受紫杉醇和阿霉素新辅助治疗的乳腺癌患者中，术前活检组织中的免疫相关基因表达谱与患者的病理完全缓解程度相关[22]。另一项囊括了超过 1000 份新辅助治疗活检的乳腺癌样本的临床研究结果也显示，肿瘤浸润淋巴细胞的密度与患者对新辅助化疗反应程度相关[23]。在肠癌中，大规模的临床研究已证实局部微环境中的 CD45RO<sup>+</sup>记忆 T 细胞或者 CD8<sup>+</sup>效应 T 细胞数量的增多有益于单纯经手术切除治疗的肠癌患者的临床预后；通过对肠癌免疫微环境评估来预测患者预后的免疫评分方法优于现有的临床分期[24, 25]。但目前关于新辅助治疗对对肠癌微环境影响及相关机制研究甚少。

CD169（又名唾液酸粘附素）作为唾液酸依赖的巨噬细胞粘附分子 [26]。CD169 的胞外结构域由 17 个免疫球蛋白组成，是免疫球蛋白超家族的最大成员之一[27]。由于缺乏相应的酪氨酸依赖的胞内信号传导结构域，CD169 的功能倾向于促进细胞间的粘附而非信号传导。之前的研究主要报道 CD169 组成型表达于组织固有的巨噬细胞 (M $\phi$ ) 上，该群巨噬细胞亚群主要分布于脾脏，淋巴结等二级淋巴器官[28]。CD169 在 M $\phi$  上的表达与其促炎症功能的发挥密切相关，可参与 B 细胞，iNKT，以及 CD8<sup>+</sup>T 细胞的活化[29, 30]。在脂多糖诱导小鼠的免疫应答过程中发现，生发中心形成的早期阶段，CD169<sup>+</sup>M $\phi$  在脾脏 B 细胞滤泡区以及 T-B 细胞交界处均有分布[31]。利用病毒颗粒 (VSV)，抗原微粒（载有模式抗原的荧光微粒）和免疫复合物等摄取实验，证实 CD169<sup>+</sup>M $\phi$  摄取并呈递抗原，促进 B 细胞活化[32, 33]。通过小鼠淋巴结双光子活体成像观察到，在引流淋巴结中，CD169<sup>+</sup>M $\phi$  将引流至此的肿瘤死细胞吞噬，并进行抗原呈递，将其交叉递呈给 CD8<sup>+</sup>T 细胞，并进一步诱发其增殖。虽然目前大多集中在 M $\phi$  表达 CD169 的相关功能机制研究，但也有文献发现，淋巴结中被膜下窦的 M $\phi$  可以在抗原呈递的同时通过其表面的膜泡，使其发生接触的 IL-7R $\alpha^{\text{hi}}$ CCR6<sup>+</sup>淋巴细胞获得 CD169 的表型[34, 35]。与文献报道的现象一致，我们前期在对直肠癌患者淋巴结组织进行流式和免疫荧光多重染色发现：肠癌引流淋巴结的窦状区中除了表达 CD169 的 M $\phi$ ，还存在一群 CD169<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞。通过荧光多重染色和共聚焦可观察到这群细胞会与 M $\phi$  发生接触，提示这群 T 细胞可能是在接受抗原呈递后获得了 CD169 的表型。有意思的是，我们通过对 40 例经新辅助治疗的肠癌患者的术后淋巴结石蜡切片进行免疫荧光多重染色，统计 CD169<sup>+</sup>T 细胞比例，结果发现：对新辅助治疗有效应组的患者淋巴结中 CD169<sup>+</sup>T 细胞比例明显高



于治疗无效组（详见工作基础）。提示，**CD169<sup>+</sup>T** 细胞可能参与了新辅助治疗引起的抗肿瘤免疫反应。

目前，关于肠癌淋巴结中存在的这群特殊的 CD169<sup>+</sup>T 细胞的特性、功能和临床意义等尚不清楚。因此，综合文献报道和我们的前期结果，本项目拟开展以下研究：首先鉴定淋巴结中 CD169<sup>+</sup>T 细胞功能表型；阐明肿瘤微环境调控 T 细胞表达 CD169 的具体机制，以及不同化疗药物对 CD169<sup>+</sup>T 细胞的影响及相应机制；最后利用大规模临床样本明确该细胞亚群对新辅助效果的预测能力。所得结果将有助于我们理解新辅助治疗影响免疫系统的具体机制，为新的肿瘤分子分期标准以及筛选合适的患者进行强化的辅助化疗提供新的理论依据。

### 主要参考文献：

1. Rodel, C., T. Liersch, H. Becker, R. Fietkau, W. Hohenberger, T. Hothorn, U. Graeven, D. Arnold, M. Lang-Welzenbach, H.R. Raab, H. Sulberg, C. Wittekind, S. Potapov, L. Staib, C. Hess, K. Weigang-Kohler, G.G. Grabenbauer, H. Hoffmanns, F. Lindemann, A. Schlenska-Lange, G. Folprecht, R. Sauer, and G. German Rectal Cancer Study, *Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(7): p. 679-87.
2. Boland, P.M. and M. Fakih, *The emerging role of neoadjuvant chemotherapy for rectal cancer*. *J Gastrointest Oncol*, 2014. **5**(5): p. 362-73.
3. Damin, D.C. and A.R. Lazzaron, *Evolving treatment strategies for colorectal cancer: a critical review of current therapeutic options*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(4): p. 877-87.
4. Bujko, K., R. Glynne-Jones, and M. Bujko, *Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomised trials*. *Ann Oncol*, 2010. **21**(9): p. 1743-50.
5. Bosset, J.F., G. Calais, L. Mineur, P. Maingon, S. Stojanovic-Rundic, R.J. Bensadoun, E. Bardet, A. Beny, J.C. Ollier, M. Bolla, D. Marchal, J.L. Van Laethem, V. Klein, J. Giralt, P. Clavere, C. Glanzmann, P. Cellier, L. Collette, and E.R.O. Group, *Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(2): p. 184-90.
6. Collette, L., J.F. Bosset, M. den Dulk, F. Nguyen, L. Mineur, P. Maingon, L. Radosevic-Jelic, M. Pierart, G. Calais, R. European Organisation for, and G. Treatment of Cancer Radiation Oncology, *Patients with curative resection of cT3-4 rectal cancer after preoperative radiotherapy or radiochemotherapy: does anybody benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy? A trial of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(28): p. 4379-86.
7. Karamitopoulou, E., S. Thies, I. Zlobec, K. Ott, M. Feith, J. Slotta-Huspenina, F. Lordick, K. Becker, and R. Langer, *Assessment of tumor regression of esophageal adenocarcinomas after neoadjuvant chemotherapy: comparison of 2 commonly used scoring approaches*. *Am J Surg Pathol*, 2014. **38**(11): p. 1551-6.
8. Min, B.S., N.K. Kim, J.Y. Pyo, H. Kim, J. Seong, K.C. Keum, S.K. Sohn, and C.H. Cho, *Clinical impact of tumor regression grade after preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer: subset*



- analyses in lymph node negative patients.* J Korean Soc Coloproctol, 2011. **27**(1): p. 31-40.
9. Wang, R.A., Q.L. Li, Z.S. Li, P.J. Zheng, H.Z. Zhang, X.F. Huang, S.M. Chi, A.G. Yang, and R. Cui, *Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize.* J Cell Mol Med, 2013. **17**(1): p. 205-11.
  10. Fridman, W.H., F. Pages, C. Sautes-Fridman, and J. Galon, *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
  11. Prise, K.M., G. Schettino, M. Folkard, and K.D. Held, *New insights on cell death from radiation exposure.* Lancet Oncol, 2005. **6**(7): p. 520-8.
  12. Galluzzi, L., M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications.* Cell Death Differ, 2007. **14**(7): p. 1237-43.
  13. Galon, J., B. Mlecnik, G. Bindea, H.K. Angell, A. Berger, C. Lagorce, A. Lugli, I. Zlobec, A. Hartmann, C. Bifulco, I.D. Nagtegaal, R. Palmqvist, G.V. Masucci, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, M. Asslaber, C. D'Arrigo, F. Vidal-Vanaclocha, E. Zavadova, L. Chouchane, P.S. Ohashi, S. Hafezi-Bakhtiari, B.G. Wouters, M. Roehrl, L. Nguyen, Y. Kawakami, S. Hazama, K. Okuno, S. Ogino, P. Gibbs, P. Waring, N. Sato, T. Torigoe, K. Itoh, P.S. Patel, S.N. Shukla, Y. Wang, S. Kopetz, F.A. Sinicrope, V. Scripcariu, P.A. Ascierto, F.M. Marincola, B.A. Fox, and F. Pages, *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours.* J Pathol, 2014. **232**(2): p. 199-209.
  14. Obeid, M., A. Tesniere, F. Ghiringhelli, G.M. Fimia, L. Apetoh, J.L. Perfettini, M. Castedo, G. Mignot, T. Panaretakis, N. Casares, D. Metivier, N. Larochette, P. van Endert, F. Ciccocanti, M. Piacentini, L. Zitvogel, and G. Kroemer, *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.* Nat Med, 2007. **13**(1): p. 54-61.
  15. Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, A. Criollo, C. Ortiz, R. Lidereau, C. Mariette, N. Chaput, J.P. Mira, S. Delalogue, F. Andre, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel, *The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy.* Immunol Rev, 2007. **220**: p. 47-59.
  16. Vincent, J., G. Mignot, F. Chalmin, S. Ladoire, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Martin, L. Apetoh, C. Rebe, and F. Ghiringhelli, *5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity.* Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3052-61.
  17. Apolloni, E., V. Bronte, A. Mazzoni, P. Serafini, A. Cabrelle, D.M. Segal, H.A. Young, and P. Zanovello, *Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes.* J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6723-30.
  18. Cao, Y., C. Li, Q. Zhang, Y. Wang, and R. Xia, *Extracellular ubiquitin enhances the suppressive effects of regulatory T cells on effector T cell responses.* Clin Lab, 2014. **60**(12): p. 1983-91.
  19. Gonzalez-Aparicio, M., P. Alzuguren, I. Mauleon, J. Medina-Echeverz, S. Hervas-Stubbs, U. Mancheno, P. Berraondo, J. Crettaz, G. Gonzalez-Aseguinolaza, J. Prieto, and R. Hernandez-Alcoceba, *Oxaliplatin in combination with liver-specific expression of interleukin 12 reduces the immunosuppressive microenvironment of tumours and eradicates metastatic colorectal cancer in mice.* Gut, 2011. **60**(3): p. 341-9.
  20. Hernandez-Alcoceba, R. and P. Berraondo, *Immunochemotherapy against colon cancer by gene transfer of interleukin-12 in combination with oxaliplatin.* Oncoimmunology, 2012. **1**(1): p. 97-99.
  21. Kanterman, J., M. Sade-Feldman, M. Biton, E. Ish-Shalom, A. Lasry, A. Goldshtein, A. Hubert, and M. Baniyash, *Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes.* Cancer Res, 2014. **74**(21): p. 6022-35.
  22. Gianni, L., M. Zambetti, K. Clark, J. Baker, M. Cronin, J. Wu, G. Mariani, J. Rodriguez, M. Carcangiu, D. Watson, P. Valagussa, R. Rouzier, W.F. Symmans, J.S. Ross, G.N. Hortobagyi, L. Pusztai, and S. Shak, *Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer.* J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7265-77.



23. Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B.M. Muller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Torne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel, and G. von Minckwitz, *Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 105-13.
24. Pages, F., A. Kirilovsky, B. Mlecnik, M. Asslaber, M. Tosolini, G. Bindea, C. Lagorce, P. Wind, F. Marliot, P. Bruneval, K. Zatloukal, Z. Trajanoski, A. Berger, W.H. Fridman, and J. Galon, *In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(35): p. 5944-51.
25. Mlecnik, B., M. Tosolini, A. Kirilovsky, A. Berger, G. Bindea, T. Meatchi, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, F. Pages, and J. Galon, *Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction*. J Clin Oncol, 2011. **29**(6): p. 610-8.
26. Crocker, P.R. and S. Gordon, *Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages*. J Exp Med, 1986. **164**(6): p. 1862-75.
27. Crocker, P.R., S. Mucklow, V. Bouckson, A. McWilliam, A.C. Willis, S. Gordon, G. Milon, S. Kelm, and P. Bradfield, *Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4490-503.
28. Hartnell, A., J. Steel, H. Turley, M. Jones, D.G. Jackson, and P.R. Crocker, *Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations*. Blood, 2001. **97**(1): p. 288-96.
29. Ikezumi, Y., T. Suzuki, S. Hayafuji, S. Okubo, D.J. Nikolic-Paterson, H. Kawachi, F. Shimizu, and M. Uchiyama, *The sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(12): p. 2704-13.
30. Martinez-Pomares, L. and S. Gordon, *CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation*. Trends Immunol, 2012. **33**(2): p. 66-70.
31. Berney, C., S. Herren, C.A. Power, S. Gordon, L. Martinez-Pomares, and M.H. Kosco-Vilbois, *A member of the dendritic cell family that enters B cell follicles and stimulates primary antibody responses identified by a mannose receptor fusion protein*. J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 851-60.
32. Martinez-Pomares, L. and S. Gordon, *Antigen presentation the macrophage way*. Cell, 2007. **131**(4): p. 641-3.
33. Veninga, H., E.G. Borg, K. Vreeman, P.R. Taylor, H. Kalay, Y. van Kooyk, G. Kraal, L. Martinez-Pomares, and J.M. den Haan, *Antigen targeting reveals splenic CD169 macrophages as promoters of germinal center B-cell responses*. Eur J Immunol, 2014.
34. Barral, P., P. Polzella, A. Bruckbauer, N. van Rooijen, G.S. Besra, V. Cerundolo, and F.D. Batista, *CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes*. Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 303-12.
35. Kuka, M. and M. Iannacone, *The role of lymph node sinus macrophages in host defense*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1319**: p. 38-46.



(2) 项目的研究内容、研究目标, 以及拟解决的关键科学问题。(此部分为重点阐述内容)

### 研究内容:

我们在前期研究中观察到: 在直肠癌患者引流淋巴结中存在一群  $CD169^+CD8^+$ T 细胞, 通过对新辅助治疗的肠癌患者的术后淋巴结样本进行染色统计发现, 对新辅助治疗有效组的患者淋巴结中  $CD169^+$ T 细胞比例明显高于治疗失败组, 提示该群细胞具有一定的抗肿瘤能力, 并与新辅助治疗密切相关。以此为基础, 本项目拟结合临床样本分析和实验模型, 以  $CD169^+$ T 细胞为主要研究对象, 结合临床病理和预后资料, 进行以下研究:

- 1) 鉴定肠癌引流淋巴结中  $CD169^+$ T 细胞功能/表型, 分析其对肿瘤进展的影响, 明确该细胞亚群的抗肿瘤潜能。
- 2) 设计体外实验阐明肿瘤微环境调控 T 细胞表达  $CD169$  的具体机制。
- 3) 结合小鼠模型, 探讨不同化疗药物对于免疫系统, 特别是  $CD169^+$ T 细胞的影响。
- 4) 利用大规模样本研究, 明确该细胞亚群对新辅助治疗效果的预测能力。

### 具体内容如下:

#### 第一部分: $CD169^+$ T 细胞的功能/表型鉴定

- 1)  **$CD169^+$  T 的表型鉴定:** 利用肠癌患者手术切除后的肿瘤以及匹配的肠旁和中间组淋巴结的新鲜组织标本, 分离组织浸润淋巴细胞, 利用流式细胞术比较肿瘤、肠旁以及中间组淋巴结中各淋巴细胞亚群的组成和比例, 鉴定  $CD169^+$ T 细胞的细胞因子表达谱(抗炎症或促炎症), 和细胞膜上受体(抗肿瘤或者免疫抑制)表达等。拟检测的指标包括:  $CD62L$ ,  $CD45RA$ ,  $CD127$ ,  $CD69$ ,  $HLA-DR$ ,  $PD-1$ ,  $CD107a$ ,  $Perforin$ ,  $Granzyme B$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  等。
- 2)  **$CD169^+$ T 细胞的功能:** 利用免疫磁珠或者流式分选在体外富集  $CD169^+$ T 细胞, 与 CSFE 标记的肠癌细胞系进行共培养, 通过 PI 染色检测  $CD169^+$ T 细胞的杀伤能力。
- 3) **临床样本验证:** 收集 300 例肠癌患者淋巴结石蜡标本, 利用免疫荧光多重染色标记  $CD169^+CD8^+$ T 细胞, 结合患者的临床资料及随访, 分析  $CD169^+CD8^+$ T 细胞与临床分期以及患者临床预后的关系。通过以上研究明确  $CD169^+$ T 细胞的



表型以及抗肿瘤功能，初步验证我们的假说。

## 第二部分：T 细胞表达 CD169 的调控机制

T 细胞表达 CD169 可能存在两种途径：（1）微环境因素直接诱导 T 细胞的 CD169 表达；（2）T 细胞在与 CD169<sup>+</sup>M $\phi$  接触后间接捕获了 M $\phi$  表面的 CD169 分子。因此，我们将从两方面进行探讨：

- 1) **直接诱导**：利用流式分选获得 CD169<sup>+</sup>和 CD169<sup>-</sup>两群 T 细胞，提取 RNA，用 Real-time PCR 检测 CD169 的 mRNA 含量。若胞内存在 CD169 的 mRNA 说明 T 细胞具有合成 CD169 的能力。接下来将设计相应的因子刺激，筛选诱导 T 细胞表达 CD169 分子的关键因素，并通过相应的抗体阻断实验验证该因子的 CD169 表达的影响。此外，还会根据实验结果，设计共培养实验，探讨微环境中的不同免疫细胞与 CD169<sup>+</sup> T 细胞的相互作用及其机制。
- 2) **间接捕获**：若上述实验发现 CD169<sup>+</sup> T 细胞的胞内并不存在 CD169 的 mRNA，那么 T 细胞表面的 CD169 分子很可能是在接受抗原呈递的过程中，通过与 CD169<sup>+</sup>M $\phi$  接触间接捕获所得。那么，我们将设计相应的 M $\phi$  与 T 细胞共培养实验，例如用肿瘤上清处理 M $\phi$ ，或者吞噬过凋亡/坏死肿瘤细胞的 M $\phi$  与 T 细胞共培养，利用 transwell 小室设置细胞接触组或者不接触组，在不同时间点检测 T 细胞上 CD169 的表达情况，验证 T 细胞上 CD169 的表达是否依赖与 CD169<sup>+</sup>M $\phi$  的相互接触作用。

## 第三部分：不同化疗药物对 CD169<sup>+</sup>T 细胞的影响

- 1) **小鼠模型**：构建肠癌移植瘤小鼠模型，用不同化疗药物（5-FU，奥沙利铂以及 CTP11）处理，设计不同化疗药物处理组，对比治疗前后肿瘤淋巴结中 CD169<sup>+</sup>T 细胞以及各淋巴细胞亚群的组成和比例变化，分析不同化疗药物对患者免疫微环境组成的影响。
- 2) **临床样本验证**：对比有/无接受新辅助治疗，以及接受不同化疗方案的患者肿瘤组织和淋巴结，检测上述细胞亚群的组成和比例，对动物实验的结果进行验证，阐明不同化疗方案对 CD169<sup>+</sup>T 细胞的影响。

## 第四部分：CD169<sup>+</sup>T 细胞对新辅助治疗效果的预测能力

前瞻性收集 100 例接受新辅助治疗局部进展期直肠癌患者的肿瘤组织和淋巴结。利用免疫荧光多重染色标记 CD169<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞，结合患者的临床资料及随访，明确



CD169<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞与患者接受新辅助治疗的临床获益之间的关系，以及作为新辅助治疗效果的预测指标和筛选需要进一步接受辅助治疗的患者的可行性。

## 研究目标

本项目拟结合实验模型，临床样本检测和小鼠模型，首先鉴定 CD169<sup>+</sup>T 细胞的功能表型，探讨新辅助治疗对肠癌免疫环境的影响及临床意义；阐明不同化疗药物对肠癌免疫系统，特别是 CD169<sup>+</sup>T 细胞的作用机制；明确 CD169<sup>+</sup>T 细胞对新辅助治疗效果的评价能力，为筛选合适患者进行术后强化治疗提供理论依据。

## 拟解决的关键科学问题

1、鉴定 CD169<sup>+</sup>T 细胞的功能表型，阐明该细胞亚群的抗肿瘤潜能，探讨以该群细胞评价新辅助治疗效果的可行性。

2、以 CD169<sup>+</sup>T 细胞为主要研究对象，阐明目前临床常用的肠癌化疗药物对肠癌免疫系统的影响以及其中的作用机理。为临床选择合理的化疗方案提供理论依据。

## (3) 拟采取的研究方案及可行性分析。(包括有关方法、技术路线、实验手段、关键技术等说明)

### 拟采取的研究方案：

本课题所需的规范化临床样本收集已获得本中心标本资源库的大力支持。所用的研究技术和方法多为分子生物学和细胞生物学的常用成熟技术，简述如下：

#### 1) 临床组织标本是本项目的基础，主要包括：

**新鲜肿瘤组织：**取配对的肠癌肿瘤组织、近端和远端淋巴结组织（预计 30 例），利用从中分离出组织中浸润免疫细胞，供多重染色和流式检测分析 T 细胞亚群的表型和功能，或通过流式细胞分选得到目标亚群的细胞用于相关的体外功能实验。

**肿瘤石蜡组织：**所有入组患者均为我中心诊断为局部进展期直肠癌的患者。患者在治疗前均已经完善肠镜检查，获得了病理诊断为腺癌。选取肠癌患者的肿瘤以及引流淋巴结的石蜡包埋标本，供连续切片和免疫组化染色。共有两组样本：

- a) 回顾性样本：拟收集 300 例。用于分析 CD169<sup>+</sup>T 细胞与患者临床预后的关系。为直接接受手术治疗的直肠癌患者。



- b) 前瞻性样本: 拟入组 100 例。用于评价 CD169<sup>+</sup>T 细胞对新辅助治疗的预测能力。所有患者年龄为 18-70 岁, 病理确诊为直肠腺癌, 有直肠超声以及盆腔 MRI 诊断为直肠肿瘤侵犯全层或者肠周围有肿大淋巴结。所有患者接受采用调强放疗设计五野调强放疗或容积调强放疗, P-GTV 给予 50Gy/25F, P-CTV 给予 46Gy/25F。同期予以 XELOX 方案化疗 2 程。目前我们已经开始了相关样本的收集工作。

患者选取的肠旁淋巴结以及中央组淋巴结的定义依据中国卫生部制定的《结直肠癌诊疗规范》中定义。直肠癌肠旁淋巴结包括: 结肠壁上淋巴结, 沿边缘动脉分布淋巴结, 沿乙状结肠动脉最下分支分布淋巴结, 沿直肠上动脉分布淋巴结, 直肠中动脉旁淋巴结, 以及直肠下动脉周围淋巴结。中央组淋巴结, 沿肠系膜下动脉起始部分布淋巴结。

## 2) 免疫荧光多重染色和定量分析

采用 PerkinElmer Opal (TSA)多标记染色试剂盒进行免疫荧光多重染色, 设置必要的阳性及阴性对照, 保证信号的特异性。染色后利用 Vectra<sup>TM</sup> 智能切片扫描系统对染色后切片, 并结合 inForm<sup>TM</sup> 分析软件进行多光谱图像分析。首先训练并分割待分析的组织区域。区分实质、间质及空白区域, 并设置细胞划分参数。使用小样本训练软件识别信号强度及细胞大小。通过对比同型对照染色信号读取临界值。根据设定好的参数对批量切片中的特定细胞数量进行定量分析。

## 3) 细胞的分离与培养

**肠癌细胞株:** 拟采用 SW620, HT-29 人结直肠癌细胞系, 以及小鼠结直肠癌细胞系 CT26 等, 均为国际常用肠癌细胞株 (ATCC)。细胞培养按常规进行。按本实验室已发表文献收集肿瘤上清 (Kuang et al. J Clin Invest 2014;124:4657)。

**健康人外周血分离单核细胞和 T 细胞:** 健康人新鲜的白膜 (buffy coat) 由广州血液中心提供。Ficoll 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞后, 用 CD14<sup>+</sup>磁珠纯化单核细胞, 用 Pan T 磁珠纯化 T 细胞, 步骤按照产品说明书进行。得到的细胞纯度达 95% 以上。细胞培养方法参考已发表文献 (Kuang et al. J Clin Invest 2014;124:4657)。

## 4) 细胞共培养模型

从健康人新鲜白膜 (buffy coat) 中分离单个核细胞, 同时利用 Pan T 磁珠纯化 CD3<sup>+</sup>T 细胞冻存备用。单核细胞经 7 天培养后获得 M $\phi$ , 或者加入肿瘤上清处理获得肿瘤相关



巨噬细胞 (TAM)。T 细胞复苏并用 CFSE 进行标记, 与 M $\phi$  以 1:1 的比例共培养, 并加入 0.5 $\mu$ g/ml 的 Anti-CD3 和 0.1 $\mu$ g/ml 的 Anti-CD28。培养两天后, 更换为含有 5U/ml 重组 IL-2 的培养液。不同时间点收集细胞进行流式检测。方法参考已发表文献 (Kuang et al. Hepatology 2010;51:154)。

### 5) 小鼠肠癌移植瘤模型

选取 4-6 周龄清洁级 BABL/c 小鼠, 按照常规方法体外培养 CT26 细胞系, 收获对数期细胞, 按照  $1 \times 10^7$  个/ml 浓度, 每只小鼠腋窝皮下接种 0.2ml。皮下成瘤后进行随机分组, 每组 20 只。实验组分为: 单独 5-FU 治疗, 单独奥沙利铂治疗, 单独 CTP11 治疗, 以及 5-FU 与奥沙利铂, 5-FU 与 CTP11 联合治疗组; 对照组给予相应空白处理。治疗前后观察并记录动物体重、治疗中副反应。收取移植瘤标本测量肿瘤体积和瘤重。收取治疗后不同时间动态 (12 小时, 1 天, 3 天, 7 天和 14 天) 的脾脏, 肿瘤组织和淋巴结, 消化分离出免疫细胞。流式检测细胞亚群和 CD169<sup>+</sup>T 细胞的比例和表型变化。阐明不同化疗药物对免疫微环境的影响及机制。

以上研究涉及到的 Real-time PCR、Western blot、ELISA、流式细胞术、免疫荧光、免疫组化等均按常规实验方法进行。

### (4) 本项目的特色与创新之处;

- 1) 系统研究新辅助治疗所造成的直肠癌免疫微环境改变及其产生抗肿瘤效应的具体机制, 帮助理解新辅助治疗影响机体免疫系统的具体机制。
- 2) 阐明 CD169<sup>+</sup>T 细胞作为新的一群 T 细胞亚群的作用及调控机制, 为预测新辅助治疗效果提供新的标志物。

### (5) 年度研究计划及预期研究结果 (包括拟组织的重要学术交流活动、国际合作与交流计划等)。

#### 年度研究计划:

**2016.1-2016.12** 完成临床样本的流式检测, 鉴定 CD169<sup>+</sup>T 细胞的表型/功能, 初步阐明 CD169<sup>+</sup>T 细胞的抗肿瘤能力。按照拟定的入组标准收集回顾性以及前瞻性研究的



肠癌临床样本，为后续工作做准备。

**2017.1-2017.12** 利用细胞生物学以及小鼠实验，阐明肿瘤微环境调控 CD169<sup>+</sup>T 细胞的具体机制。继续前瞻性样本的收集工作。

**2018.1-2018.12** 根据上述实验结果在小鼠模型上探讨不同化疗药物对 CD169<sup>+</sup>T 细胞的影响。完成相关临床样本的资料采集及临床随访，进行相关的预后统计分析。

**预期研究结果：**

成果主要以论文发表的形式体现，拟在国内外有影响的学术期刊上发表论文2-3篇，其中SIC收录论文1-2篇，争取有1篇IF>5.0。

NSFC 2015



## 2. 研究基础与工作条件

### (1) 工作基础(与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩);

课题负责人张荣欣，2007年毕业于南昌大学，2012年获得中山大学肿瘤学博士学位（导师：潘志忠），2012年至今就职于中山大学肿瘤防治中心，任主治医师。从事结直肠癌的综合治疗工作，主要研究方向为直肠癌放化疗综合治疗，参与2项直肠癌放化疗的III期临床研究；依托于临床研究的基础上，利用PI3K/PTEN/AKT/mTOR传导通路基因多态性进行了直肠癌放化疗敏感性预测的相关基础研究，相关研究正在整理发表论文。同时，与郑利民教授实验室合作进行了肠癌免疫微环境相关的研究，在肠癌引流淋巴结中鉴定出了一群独特的CD169<sup>+</sup>T细胞亚群，该细胞亚群与肠癌新辅助治疗密切相关，现将相关研究成果简述如下：

#### 1) 直肠癌淋巴结中存在CD169<sup>+</sup>T细胞亚群

CD169（又名唾液酸粘附素）作为唾液酸依赖的巨噬细胞（M $\phi$ ）粘附分子，以往的研究主要集中在巨噬细胞上，参与B细胞，iNKT，以及CD8<sup>+</sup>T细胞的活化。我们前期对肠癌手术切除患者的肿瘤引流淋巴结进行组织原位的免疫荧光多重染色，结果发现，CD169不仅表达在CD68<sup>+</sup>M $\phi$ 上，还表达在CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T细胞表面（图1）。同时，收集肠癌患者外周血以及匹配的淋巴结组织样本，分离其中的淋巴细胞进行流式检测，证实CD169分子特异性的存在于CD8<sup>+</sup>T细胞，而相应的外周血和肿瘤组织中T细胞并不表达（图2）。目前关于CD169<sup>+</sup>T细胞的相关功能/表型尚不清楚。

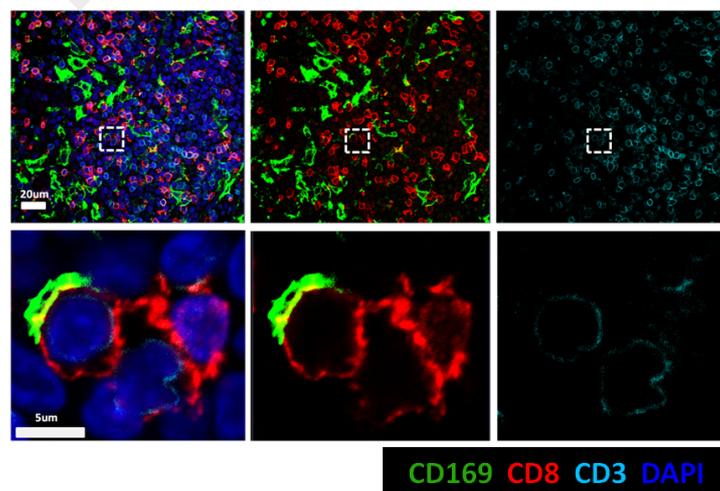


图1.直肠癌淋巴结的组织原位观察到窦状区中存在CD169<sup>+</sup>T细胞

对直肠癌淋巴结石蜡切片进行免疫荧光多重染色，利用共聚焦显微镜进行观察发现：CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T细胞表达CD169（绿色）分子。

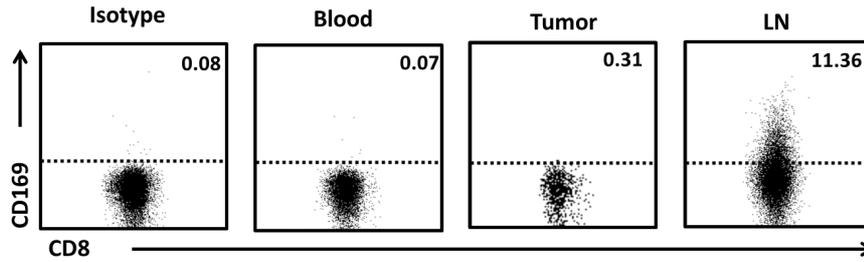


图 2. 直肠癌淋巴结中 T 细胞表达 CD169

利用流式细胞术检测肠癌患者的外周血，肿瘤组织以及淋巴结组织样本，发现一群 CD169<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>T 细胞特异性的存在肠癌淋巴结。LN，肿瘤引流淋巴结。

## 2) T 细胞表达 CD169 的可能机制

参考已有文献，我们推测 T 细胞表达 CD169 可能存在两种途径：微环境因素直接诱导 T 细胞的 CD169 表达；或者是 T 细胞在与 CD169<sup>+</sup>Mφ 接触后间接捕获了 Mφ 表面的 CD169 分子。为了验证假设，我们对肠癌淋巴结中分离得到的淋巴细胞进行细胞涂片，结合免疫荧光和共聚焦检测，发现 CD8<sup>+</sup>T 细胞上的 CD169 分子表达呈现弥散（图 3A）和表面捕获（即 Bled-Catching，图 3B）两种模式。同时结合淋巴结组织原位观察可发现，CD169<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞与 CD169<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ 存在接触，提示 CD169<sup>+</sup> Mφ 可能是 T 细胞表面 CD169 的来源之一（图 4）。这些结果提示 T 细胞表面 CD169 分子存在直接表达和间接捕获两种途径。但其中的具体机制目前尚不清楚。

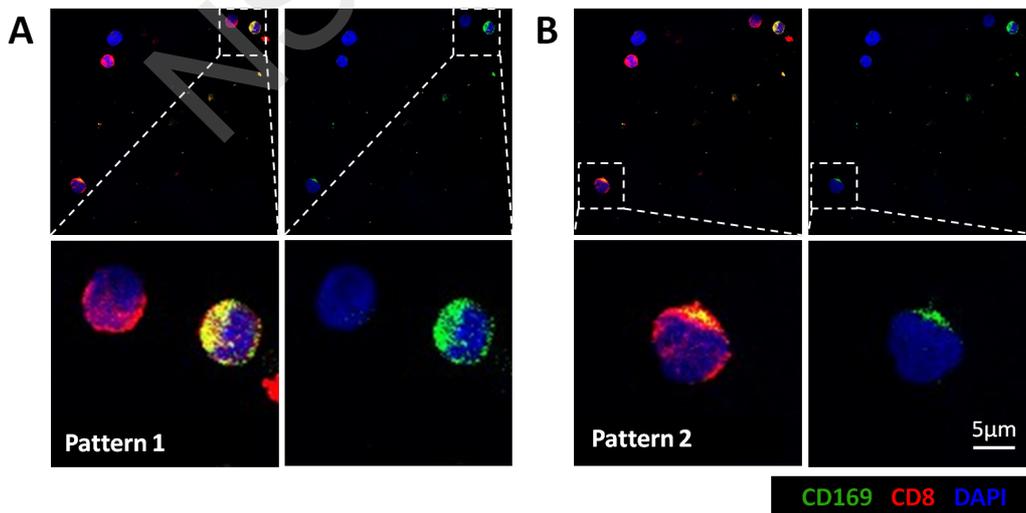


图 3. T 细胞表面 CD169 分子的表达模式

对淋巴结中分离出的单个核细胞进行细胞涂片，免疫荧光染色确认 CD8<sup>+</sup>T 细胞表达 CD169，且可分为弥散（B）和表面捕获，即 Bled-Catching（C）两种模式。

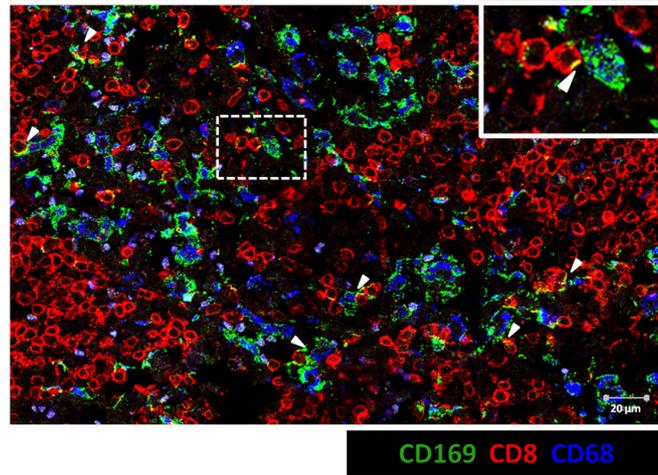


图 4. CD169<sup>+</sup>T 细胞与 Mφ 存在相互接触

对直肠癌淋巴结石蜡切片进行免疫荧光多重染色，利用共聚焦显微镜进行观察发现 CD169<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞与 CD169<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>Mφ 存在接触。

### 3) CD169<sup>+</sup>T 细胞亚群与新辅助治疗效果的关系

新辅助放化疗除了直接对肿瘤细胞产生杀伤，还会影响机体的免疫系统。我们选取了 40 例（20 例治疗有效，20 例治疗失败）经新辅助治疗肠癌患者的术后淋巴结石蜡切片，利用免疫荧光多重染色，利用 Inform 分析软件读取阳性信号（图 5A），统计发现，治疗成功组患者的淋巴结中 CD8<sup>+</sup>，CD169<sup>+</sup>以及 CD8<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup>双阳性细胞的数目明显增多（ $P < 0.0001$  图 5B）。提示，新辅助治疗能显著影响肠癌患者的免疫系统，产生抗肿瘤免疫应答。而 CD169<sup>+</sup>T 细胞在其中扮演的角色和具体作用机制尚不清楚。

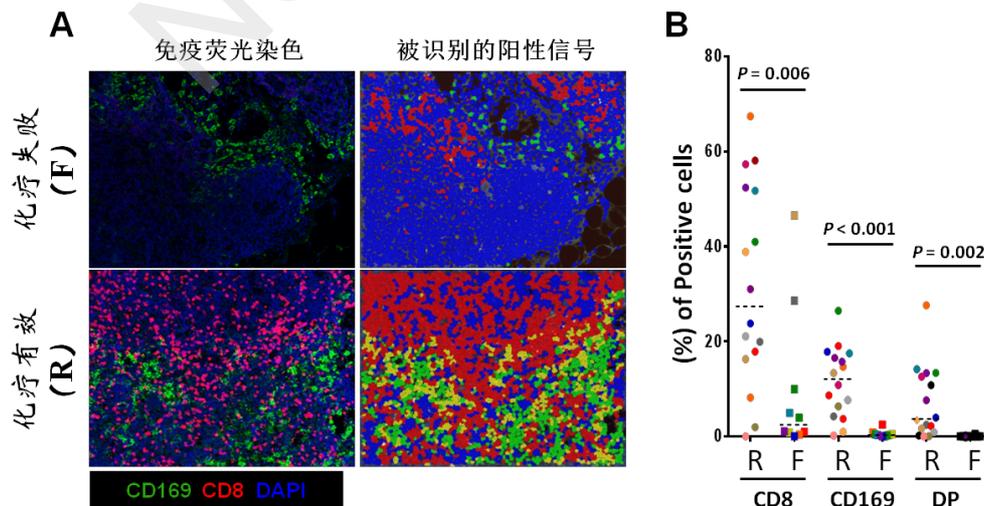


图 5. CD169<sup>+</sup>T 细胞亚群与新辅助治疗效果的关系

选取 40 例（20 例治疗无效，20 例治疗有效）经新辅助治疗肠癌患者的术后淋巴结石蜡样本。（A）利用免疫荧光多重染色（左列），利用 Inform 分析软件读取阳性信号（右列）。（B）统计 CD8<sup>+</sup>，CD169<sup>+</sup>以及 CD8<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup>阳性细胞数目与患者临床获益的关系。R: Response, 治疗有效; F, Failure, 治疗失败。



**(2) 工作条件** (包括已具备的实验条件, 尚缺少的实验条件和拟解决的途径, 包括利用国家实验室、国家重点实验室和部门开放实验室等研究基地的计划与落实情况)

中山大学肿瘤防治中心融医院、研究所于一体, 拥有功能齐全、设施先进的现代化医疗科研大楼, 同时是世界卫生组织癌症合作研究中心、肿瘤学国家重点学科和华南肿瘤学国家重点实验室, 并设有国家级 GCP 中心。具有良好的实验条件 (包括细胞培养室、动物实验中心、分子生物学和细胞生物学常用仪器、中心实验室的仪器分析、蛋白质组学实验室等), 提供多种公共实验技术服务如病理切片制作、基因测序、比较基因组杂交、电子显微镜观察、荧光显微镜使用、核酸蛋白定量分析、流式细胞仪分析、高效液相色谱分析等。具有的大型仪器有流式细胞仪, 冷冻离心干燥仪, 同位素或荧光凝胶分析系统, 超速冷冻离心机, 高速大容量冷冻离心机, 电子显微镜, CGH/FISH 系统, 倒置荧光显微镜,  $-140^{\circ}\text{C}$  细胞冻存器,  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱等实验设施。实验设备与条件均能满足本研究需要。

中山大学肿瘤防治中心结直肠科是 CSCO 青年专家委员会以及广东省大肠癌专业委员会的主任单位, 利用相应平台积极在全国以及全省范围内推广结直肠癌规范化治疗; 2000 年即开始了在直肠癌新辅助放化疗的探索。近年来, 五次获得中山大学 5010 项目的支持, 参与了 AVANT 等大型国际多中心临床研究, “985” 工程, “211” 工程和 “863” 计划, 国家自然科学基金, 省自然科学基金等在内的科研课题 10 项。相关研究成果多次于 ASCO 或者 ESMO 年会上进行海报展示及口头汇报, 并于 2014 年受邀参加 ASCO 年会的审稿工作。我科每年平均收治患者 2000 余人, 完成结直肠癌手术 1200 余台。具有按规范化标准收集的、含完善临床和随访资料的组织标本库。为本项目的顺利开展打下了良好基础。

发挥我们的临床资源优势, 通过与本中心实验研究部郑利民教授实验室合作, 已开展了部分前期工作 (详见 “立项依据” 和 “研究基础” 部分), 保证了本课题研究具有强大的技术支持。

**(3) 承担科研项目情况** (申请人正在承担或参加科研项目的情况, 包括国家自然科学基金的项目。要注明项目的名称和编号、经费来源、起止年月、与本项目的关系及负责的内容等)



无

**(4) 完成国家自然科学基金项目情况**（对申请人负责的前一个已结题科学基金项目（项目名称及批准号）完成情况、后续研究进展及与本申请项目的关系加以详细说明。另附该已结题项目研究工作总结摘要（限 500 字）和相关成果的详细目录）

无

### 3. 资金预算说明

购置单项经费 5 万元以上固定资产及设备，须逐项说明与项目研究的直接相关性及其必要性。

#### （一）直接费用

##### 1. 设备费：

无

##### 2. 材料费：

共计 15.8 万元。用于购置项目所需的各种必需的实验材料以及动物实验费用。具体明细如下：

###### A. 常用耗材：

淋巴细胞分离液，600 元/500ml/瓶，5 瓶，共 0.3 万元；

DMEM 液体培养基，300 元/1L，10 升，共 0.3 万元；

RPMI 液体培养基，300 元/1L，10 升，共 0.3 万元；

胎牛血清（Hyclone），3000 元/500ml/瓶，2 瓶，共 0.6 万元；

柠檬酸缓冲液，20 元/2L/包，100 包，共 0.2 万元；

Tris-EDTA 修复液（pH8.0，pH 9.0，pH 9.5），100 元/100ml/瓶，10 瓶；0.1 万元；

二甲苯，100 元/500ml/瓶，20 瓶，共 0.2 万元；

无水乙醇，100 元/500ml/瓶，20 瓶，共 0.2 万元；

PCR 管，10000 个/箱，200 元/箱，15 箱，共 0.3 万元；

细胞培养板，1500 元/100 块/箱，2 箱，共 0.3 万元；

细胞培养瓶，1500 元/100 个/箱，2 箱，共 0.3 万元；

###### B. 常用抗体

CD169 单抗（PE，100T），4000 元/100T/瓶，1 瓶，共 0.4 万元；



CD3 单抗 (APC, 100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD8 单抗 (PE,FITC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD14 单抗 (PE,FITC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD8 单抗 (PE,FITC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD8 单抗 (PE,FITC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
IFN $\gamma$  单抗 (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
TNF $\alpha$  单抗 (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CTLA4 单抗 (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
Perforin (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
Granzyme B (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD62L (APC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD45RA (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD69 (FITC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
HLADR (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
PD-1 (PC7,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
IL-10 (FITC,100T), 4000 元/100T/瓶, 1 瓶, 共 0.4 万元;  
CD169 抗体, 3000 元/200ug, 2 支, 共计 0.6 万元;  
CD8 抗体, 4000 元/200ug, 1 支, 共 0.4 万元;  
CD68 抗体, 4000 元/200ug, 1 支, 共 0.4 万元;  
CD3 抗体, 4000 元/200ug, 1 支, 共 0.4 万元;  
山羊-抗鼠/兔 IgG (荧光 488,555,633), 4000 元/500ul, 2 支, 共 0.8 万元;  
山羊-抗鼠/兔 Ig-HRP, 4000 元/1ml, 2 支, 共 0.8 万元;  
注明: 1) 不同颜色和种属的抗体搭配用于流式及免疫荧光多重染色。2) 具体抗体的选择将会根据项目进展情况做相应调整。

### C. 其他试剂

CD14 磁珠, 6000 元/kit, 2kit, 共 1.2 万元。

Pan T 磁珠, 6000 元/kit, 1kit, 共 0.6 万元。

化疗药物: 共 0.4 万元

5-FU, 2 元/支, 42 支, 共 84 元

奥沙利铂, 2604 元/支, 1 支, 共 2604 元

CTP11, 1312 元/支, 1 支, 共 1312 元

### D. 动物实验费用

C57BL/6J 小鼠, 30 元/只, 200 只, 共 0.6 万元;

蛋白纯化填料: 0.1 万元.



### 3、测试化验加工费：4.1 万元

- 1) 测序费用：用于分子生物学实验。每次费用50元，预计需测序100次，共需要0.5万元。
- 2) 荧光定量PCR：用于相关分子生物学实验。每小时费用100元，预计需要使用80小时，共需要0.8万元。
- 3) 激光共聚焦：每小时费用100元，预计需要130小时，共需要1.3万元。
- 4) 流式分选：用于细胞分选。每小时费用100元，预计需要150小时，共需要1.5万元。

### 4、燃料动力费：

无

### 5、差旅费：

合计 0.5 万元。主要用于本项目完成过程中在参加广东省大肠癌专业委员会等过程中发生的交通费及注册费。具体如下：

- 1) 外埠交通费：无。
- 2) 参加广东省大肠癌会议：每年一次，每次参加 2 人，交通费平均往返车费约 500 元，按照 3 年计算。合计 3 次×2 人×500 元=0.3 万元。注册费 500 元/人\*2 人\*2 年=0.2 万元。
- 3) 市内交通费：无。

### 6、会议费：

合计 0 万元。本项目进行期间，用于参加会议的注册费用。

- 1) 项目成果鉴定会会议场地，资料费：无。
- 2) 会议/会务费：无。
- 3) 其它：0 万元

### 7、国际合作与交流费：

无

### 8、出版/文献/信息传播/知识产权事务费：

合计 1 万元，具体如下：

- 1) 学术论文发表费用：合计 1 万元。
- 2) 本项目预计在国外期刊发表论文 2-3 篇。该费用用于支付版面费或者论文修改费用。
- 3) 论文、文献印刷费、上网费、文献资料费：无。

### 9、劳务费：

合计 3.6 万元。用于非在职的参加研究的在读研究生和临时聘用人员的劳务费发放。



由于课题搜集结直肠癌临床标本和进行相关实验操作，需要研究生从事标本的采集、预处理、芯片的制作、切片及分析等。本项目有3名在读研究生进行相关实验。每人400元/月，资助3年： $400\text{元/月} \times 3\text{人} \times 10\text{月/年} \times 3\text{年} = 3.6\text{万元}$ 。

#### 10. 专家咨询费：

无

#### (二) 间接经费：

合计5万元具体如下：

绩效：合计1.25万元。

#### 4. 其他需要说明的问题

无

NSFC 2015

**签字和盖章页**

申请人：张荣欣

依托单位：中山大学

项目名称：新辅助放化疗对直肠癌区域淋巴结中CD169阳性T细胞的影响和调控机制

资助类别：青年科学基金项目

亚类说明：

附注说明：

**申请人承诺：**

我保证申请书内容的真实性。如果获得资助，我将履行项目负责人职责，严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，认真开展工作，按时报送有关材料。若填报失实和违反规定，本人将承担全部责任。

签字：

**项目组主要成员承诺：**

我保证有关申报内容的真实性。如果获得资助，我将严格遵守国家自然科学基金委员会的有关规定，切实保证研究工作时间，加强合作、信息资源共享，认真开展工作，及时向项目负责人报送有关材料。若个人信息失实、执行项目中违反规定，本人将承担相关责任。

编号	姓名	工作单位名称	证件号码	每年工作时间（月）	签字
1	张嘉丽	中山大学	350181199103011744	8	
2	彭健宏	中山大学	44200019890211661x	6	
3	区庆坚	中山大学	440681198604152611	6	
4	刘超群	中山大学	430626199006235159	6	
5	孔令亨	中山大学	44010519800410273X	4	
6					
7					
8					
9					

**依托单位及合作研究单位承诺：**

已按填报说明对申请人的资格和申请书内容进行了审核。申请项目如获资助，我单位保证对研究计划实施所需要的人力、物力和工作时间等条件给予保障，严格遵守国家自然科学基金委员会有关规定，督促项目负责人和项目组成员以及本单位项目管理部门按照国家自然科学基金委员会的规定及时报送有关材料。

依托单位公章

日期：

合作研究单位公章1

日期：

合作研究单位公章2

日期：