[文章编号] 1671-587X(2026)04-0881-12 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260401

趋化因子受体6表达在肿瘤免疫微环境中作用的生物信息学分析及其对调节性T淋巴细胞功能的影响

李佳鑫，张欣阳
（北京大学未来技术学院生物医学工程系，北京 100871）

[摘 要] **目的：**探讨肿瘤组织中CXC基序趋化因子受体6（CXCR6）与免疫检查点分子表达及$CD4^+$T淋巴细胞浸润丰度的关系，阐明其对调节性T淋巴细胞（Treg）中功能的影响及其潜在作用机制。**方法：**生物信息学分析采用肿瘤免疫估计资源（TIMER）数据库，收集10种实体瘤的转录组及免疫浸润数据，通过Pearson相关性分析法分析*CXCR6*与免疫检查点分子及$CD4^+$T淋巴细胞浸润丰度的相关性。采用健康人外周血单个核细胞（PBMCs），分离扩增$CD4^+$T淋巴细胞并诱导为Treg细胞，构建CXCR6 shRNA1～4#重组慢病毒载体。实验分为空白组（不加Treg）、对照组和CXCR6敲低组，经慢病毒转染后，将Treg与$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞（CTLs）、T2肿瘤靶细胞共培养。采用流式细胞术检测Treg的纯度，荧光计数法测定靶细胞裂解率，酶联免疫吸附试验（ELISA）检测各类细胞中细胞因子水平，RNA测序技术检测细胞中差异基因的表达水平，实时荧光定量PCR（RT-qPCR）法检测*CXCR6*的敲低效率和细胞中肽酶抑制因子6（*PI16*）mRNA表达水平。**结果：**生物信息学分析，*CXCR6*在10种实体瘤中与免疫检查点分子及$CD4^+$T淋巴细胞浸润丰度均呈高度正相关关系（$P<0.01$），且与肿瘤纯度呈负相关关系（胶质母细胞瘤除外）（$P<0.01$）。实验成功获得高纯度$CD4^+$T淋巴细胞（90.13%±3.7%）及$CD25^+Foxp3^+$Treg细胞（69.6%±3.4%），CXCR6-KD3#敲低效率最高（$P<0.05$）。与对照组比较，CXCR6敲低组靶细胞裂解率升高（$P<0.01$），Treg细胞中γ干扰素（IFN-γ）及肿瘤坏死因子α（TNF-α）水平升高（$P<0.01$），Treg细胞中*PI16* mRNA表达水平升高（$P<0.01$），差异基因富集于胞外基质空间、细胞迁移调控及磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）-蛋白激酶B（Akt）通路。**结论：***CXCR6*与10种实体瘤的免疫检查点分子表达及$CD4^+$T淋巴细胞浸润高度相关，主要定位于肿瘤免疫微环境。敲低Treg细胞中*CXCR6*表达可减弱其免疫抑制功能并促进CTLs分泌相关细胞因子，其机制可能与上调Treg细胞中*PI16* mRNA表达水平有关。

[关键词] CXC基序趋化因子受体6；免疫检查点；调节性T淋巴细胞；细胞毒性T淋巴细胞；免疫逃逸；肿瘤微环境；免疫治疗靶点
[中图分类号] R392.1 [文献标志码] A

[收稿日期] 2025-08-12 [录用日期] 2025-12-02
[基金项目] 国家自然科学基金项目（82150005）
[作者简介] 李佳鑫（1995—），女，内蒙古自治区包头市人，博士后，理学博士，主要从事肿瘤免疫治疗相关方面的研究。
[通信作者] 李佳鑫（E-mail：jiaxinli2020@pku.edu.cn）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

Bioinformatics analysis on effect of chemokine receptor 6 expression on tumor immune microenvironment and its impact on regulatory T lymphocyte function

LI Jiaxin, ZHANG Xinyang
(Department of Biomedical Engineering, School of Future Technology, Peking University, Beijing 100871, China)

ABSTRACT **Objective**: To discuss the relationship between CXC motif chemokine receptor 6 (CXCR6) expression in tumor tissue and the expression of immune checkpoint molecules as well as the infiltration abundance of $CD4^+$ T lymphocytes, and to clarify its impact in the function of regulatory T lymphocytes (Tregs) and underlying mechanism. **Methods**: Bioinformatics analysis was performed using Tumor Immune Estimation Resource (TIMER) database. Transcriptomic and immune infiltration data of 10 solid tumors were collected. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlations of *CXCR6* with immune checkpoint molecules and the infiltration abundance of $CD4^+$ T lymphocytes. In the experiments, the human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy individuals were used. The $CD4^+$ T lymphocytes were isolated and expanded, and then induced into the Treg cells. Recombinant lentiviral vectors of CXCR6 shRNA1－4# were constructed. The experiment was divided into blank group (without Treg), empty vector Treg group (control group), and CXCR6 knockdown group. After lentiviral transfection, the Treg cells were co-cultured with $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and T2 tumor target cells. Flow cytometry was used to detect the purity of Treg cells; fluorometric counting method was used to detect the lysis rate of target cells; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of cytokines in the cells; RNA sequencing was used to detect the expression levels of differential genes in the cells; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the knockdown efficiency of *CXCR6* and the expression level of peptidase inhibitor 16 (*PI16*) mRNA. **Results**: The bioinformatics analysis results showed that *CXCR6* was highly positively correlated with immune checkpoint molecules and the infiltration abundance of $CD4^+$ T lymphocytes in 10 solid tumors ($P<0.01$), and was negatively correlated with tumor purity (except for glioblastoma)($P<0.01$). The flow cytometry results showed that high-purity $CD4^+$ T lymphocytes (90.13%±3.7%) and $CD25^+Foxp3^+$ Treg cells (69.6%±3.4%) were successfully obtained. The RT-qPCR results showed that CXCR6-KD3# had the highest knockdown efficiency ($P<0.05$). The fluorometric counting method results showed that compared with control group, the lysis rate of target cells in CXCR6 knockdown group was increased ($P<0.01$). The ELISA results showed that compared with empty control group, the levels of interferon-γ (IFN-γ) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in CXCR6 knockdown group were increased ($P<0.01$). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression level of PI16 mRNA in Treg cells in CXCR6 knockdown group was increased ($P<0.01$). The RNA sequencing results showed that the differential genes were enriched in the extracellular matrix space, regulation of cell migration, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway. **Conclusion**: *CXCR6* is highly correlated with the expression of immune checkpoint molecules and $CD4^+$ T lymphocyte infiltration in 10 solid tumors, and is mainly localized in the tumor immune microenvironment. Knockdown of *CXCR6* expression in Treg cells can attenuate their immunosuppressive function and promote the secretion of related cytokines by CTLs, and the mechanism may be related to the upregulation of *PI16* mRNA expression level in the Treg cells.

KEYWORDS CXC Motif chemokine receptor 6; Immune checkpoint; Regulatory T lymphocyte; Cytotoxic T lymphocyte; Immune escape; Tumor microenvironment; Immunotherapy target

调节性T淋巴细胞（regulatory T lymphocyte，Treg）作为免疫系统的关键负调控细胞，通过抑制$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞（cytotoxic T lymphocytes，CTLs）的活化与增殖维持免疫稳态[1]。趋化因子受体6（CXC motif chemokine receptor 6，CXCR6）作为趋化因子C-X-C基元配体16[chemokine (C-X-C motif) ligand 16，CXCL16]的特异性受体，在免疫细胞迁移、组织定位及功能调控中发挥核心作用，其异常表达与肿瘤进展密切相关[2-3]。研究[4-5]显示：*CXCR6*基因表达与多种肿瘤预后相关，且与$CD8^+$T淋巴细胞浸润高度相关，$CD8^+$T淋巴细胞中CXCR6表达对持续抗肿瘤效应至关重要；同时，肿瘤细胞中CXCR6上调可促进其生长、迁移及侵袭[6]。然而，CXCR6在Treg中的功能尚未明确：虽有研究[7]发现CXCR6在Treg表面特异性表达，可能参与其组织浸润，但尚无研究阐明其是否通过调控Treg功能影响肿瘤免疫；免疫检查点分子［程序性死亡受体1（programmed cell death protein 1，PD-1）和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4（cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4，CTLA-4）］是Treg功能失调的重要原因[8]，但CXCR6与这些免疫检查点分子的关联性研究仍较缺乏，无法明确其在肿瘤免疫抑制网络中的定位。

既往研究[9-11]多聚焦于CXCR6在细胞迁移调控中的作用，且对Treg的调控机制研究未涉及CXCR6-肽酶抑制因子16（petidase inhibitor 16，PI16）轴。本研究利用肿瘤免疫估计资源（Tumor Immune Estimation Resource，TIMER）数据库分析10种实体瘤中*CXCR6*与免疫检查点分子及$CD4^+$T淋巴细胞浸润的关系，明确其在肿瘤免疫微环境中的表达特征；再通过慢病毒介导的CXCR6敲低、共培养实验及RNA测序，阐明CXCR6对Treg功能的影响及下游分子机制，为肿瘤免疫治疗联合靶点的筛选提供新视角。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 母细胞瘤细胞T2采购自武汉普诺赛生命科技有限公司并使用附赠培养基培养。所有外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）来自于上海雅裕生物科技有限公司，所有标本均经本院伦理委员会批准（伦理审批号：院伦快〔2022〕09号），受试者知情同意。人外周血$CD4^+$T淋巴细胞分离试剂盒、RPMI 1640培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、Lipofectamine 3000、TRIzol试剂、γ-干扰素（interferon-γ，IFN-γ）和肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测试剂盒均购自美国赛默飞世尔科技公司，异硫氰酸荧光素标记抗人CD3单克隆抗体（anti-human CD3-fluorescein isothiocyanate，anti-hCD3-FITC）、藻红蛋白标记抗人CD4单克隆抗体、别藻蓝蛋白/荧火810荧光标记抗人叉头蛋白P3单克隆抗体（anti-human Forkhead box protein P3 -Allophycocyanin/Fire 810，anti-hFOXP3-APC/Fire810）和藻红蛋白标记抗人CXC趋化因子受体6单克隆抗体购自美国BIOLEGEND生物科技有限公司，慢病毒载体pLVX-Puro和包装质粒pPAX2/PMD2G购自武汉森灵生物科技有限公司质粒平台，羧基荧光素琥珀酰亚胺酯示踪染料[5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester，CFSE]荧光染料购自美国西格玛奥德里奇公司。Illumina HiSeq测序平台购自北京诺禾致源生物科技有限公司，BD LSRFortessa™工作站购自美国BD医疗公司，高内涵活细胞成像和分析系统购自瑞孚迪生物医学（上海）有限公司，尼康Ts2倒置荧光显微镜购自日本尼康公司。

1.2 *CXCR6*基因表达与免疫检查点分子表达及$CD4^+$T淋巴细胞浸润程度的相关性分析 利用TIMER数据库(http://timer.comp-genomics.org)网络服务器（一款整合多种癌症类型免疫浸润分析的综合资源平台）进行分析[12]。输入*CXCR6*基因相关性分析参数、$CD4^+$T淋巴细胞亚群数据及癌种数据库，获取肿瘤免疫学、临床及基因组学特征，采用Pearson相关性分析法计算相关性系数。

1.3 Treg细胞和效应T淋巴细胞的分离、诱导及鉴定 取健康人外周血，通过密度梯度离心分离PBMC。使用预清洗的CD4 Dynabeads进行磁珠分选：将PBMC稀释后，2 ℃～8 ℃、600 g离心10 min，保留上清备用，加入磁珠并在室温孵育30 min；将孵育后的混合物置于磁力架上，磁性吸

附$CD4^+$T淋巴细胞，经磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）清洗3次后获得纯化$CD4^+$T淋巴细胞。将$CD4^+$T淋巴细胞接种于含10%热灭活血清的RPMI 1640培养基中，加入CD3抗体、100 U·mL^{-1}重组白细胞介素2(interleukin-2,IL-2)、50 μg·L^{-1}重组转化生长因子β(transforming growth factor beta，TGF-β）及T2肿瘤细胞碎片，激活扩增并诱导$CD4^+$T淋巴细胞分化为Treg细胞。取上述磁珠分选后的剩余细胞混合物，再次用$CD8^+$ Dynabeads孵育，分选对应样本的$CD8^+$效应T淋巴细胞，分选后的$CD8^+$T淋巴细胞接种于含10%血清（56 ℃热灭活30 min）的RPMI 1640培养基中，加入CD3抗体和100 U·mL^{-1}重组IL-2进行激活扩增，备用。

1.4 流式细胞术检测细胞中细胞标志物和CXCR6蛋白表达 将分离扩增的$CD4^+$T淋巴细胞和体外诱导7～10 d后的Treg细胞进行离心收集，PBS缓冲液清洗3次，重悬细胞进行CD3、CD4、CD25、FOXP3或CXCR6抗体染色，使用染色缓冲液清洗3次后采用7-AAD死活染料标记细胞死活，孵育5 min后使用流式细胞仪检测，根据未染色NC组信号强度划分CD3、CD4、CD25、FOXP3和CXCR6的阳性群，并将阳性群的占比代表对应蛋白阳性表达率。

1.5 *CXCR6*敲低的Treg细胞制备 使用赛默飞世尔在线工具设计针对*CXCR6*的4条短发夹RNA（short hairpin RNA，shRNA）序列1～4#（CXCR6-KD1～4#），将序列克隆至pLVX-Puro载体，挑取单克隆菌落经测序验证正确后，与包装质粒共转染293T细胞以包装慢病毒。72 h后收集病毒上清，经0.45 μm滤膜过滤去除细胞碎片后，采用20%蔗糖梯度在4 ℃、82 700×g条件下超速离心纯化病毒。测定病毒有效滴度后，于－80 ℃冰箱保存备用。病毒以感染复数（multiplicity of infection，MOI）=15的感染复数感染Treg细胞，经嘌呤霉素筛选5 d获得稳定细胞株，通过流式细胞术验证*CXCR6*的敲低效率。shRNA序列见表1。

表1 *CXCR6*敲低shRNA序列

Tab.1 *CXCR6* knockdown shRNA sequences

Sequence ID	Sense(5′－3′)	Anti-sense(5′－3′)
CXCR6-KD1#	CCGGGCGCATTCTCATGGAGAAGTTCTCGAGA-ACTTCTCCATGAGAATGCGCTTTTT	AAAAAGCGCATTCTCATGGAGAAGTTCTCGAGA-ACTTCTCCATGAGAATGCGCCCGG
CXCR6-KD2#	CCGGGCTTGCTCATCTGGGTGATATCTCGAGA-TATCACCCAGATGAGCAAGCTTTTT	AAAAAGCTTGCTCATCTGGGTGATATCTCGAGA-TATCACCCAGATGAGCAAGCCCGG
CXCR6-KD3#	CCGGCTCACCATGATTGTCTGCTATCTCGAGA-TAGCAGACAATCATGGTGAGTTTTT	AAAAACTCACCATGATTGTCTGCTATCTCGAGA-TAGCAGACAATCATGGTGAGCCGG
CXCR6-KD4#	CCGGCTGAGGACAATTCCAAGACTTCTCGAGA-AGTCTTGGAATTGTCCTCAGTTTTT	AAAAACTGAGGACAATTCCAAGACTTCTCGAGA-AGTCTTGGAATTGTCCTCAGCCGG

1.6 $T2^{NY\text{-}ESO\text{-}1}$细胞处理和$CD8^+$T细胞受体工程化T细胞（engineered T cell receptor-T cell，TCR-T）制备 使用带有mCherry的慢病毒载体稳转构建mCherry-T2淋巴瘤细胞系，细胞在含10%血清的RPMI 1640培养基中培养。红色荧光稳定表达后，在共培养前使用NY-ESO-1肽段对T2细胞进行脉冲处理，使抗原肽稳定附着在T2细胞表面，获得能够利用荧光进行计数的T细胞受体（T cell receptor，TCR）特异性识别靶细胞$T2^{NY\text{-}ESO\text{-}1}$。$CD8^+$T淋巴细胞经过激活扩增后第3天进行anti-NY-ESO-1 TCR慢病毒感染，获得特异性识别NY-ESO-1抗原的$CD8^+$CTLs细胞。

1.7 直接共培养体系中Treg细胞作用后各组CTLs杀伤功能检测 取上述$CD8^+$ TCR-T淋巴细胞，经CFSE标记后，与CXCR6敲低修饰或含绿色荧光蛋白（green fluorescence protein，GFP）空载修饰的Treg细胞和$T2^{NY\text{-}ESO\text{-}1}$靶细胞按比例（Treg细胞：效应T淋巴细胞：靶细胞=1∶0.25∶1）共培养。48 h后，采用荧光细胞计数仪统计$mCherry^+$细胞数，以未加入T淋巴细胞的阴性对照（negative control，NC）组靶细胞数量为基准进行归一化处理，计算靶细胞裂解率（归一化结果代表靶细胞杀伤率）。右侧靶细胞裂解率=（1－实验组平均荧光面积/NC组平均荧光面积）×100%。直接共培养体系的建立见图1。

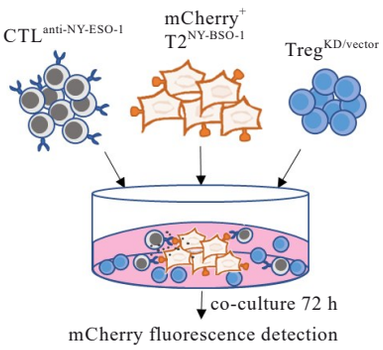


图1 直接共培养体系示意图

Fig. 1 Schematic diagram of direct co-culture system

1.8 ELISA法检测2组共培养体系上清中IFN-γ和TNF-α水平 将采用“1.7”步骤方法建立的共培养体系铺于96孔细胞培养板，每组设3个复孔。共培养72 h后，收集上清。于96孔细胞培养板中加入100 μL稀释后IFN-γ或TNF-α捕获抗体，4 ℃孵育过夜。弃去孔内溶液，用含0.05% Tween20的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline with Tween-20，PBST）洗涤3次后，用含1%牛血清白蛋白或10% FBS的PBST缓冲液封闭。洗涤后，加入稀释后上清100 μL，37 ℃孵育1 h。用PBST缓冲液洗涤3次后，每孔加入新鲜稀释的酶标抗体，37 ℃孵育0.5～1 h，PBST缓冲液洗涤。加入新鲜配制的底物溶液100 μL，37 ℃孵育10～30 min后，加入终止液终止反应。于450 nm处测定吸光度（A）值，绘制标准曲线，用已知浓度标准品绘制标准曲线，以测定A值带入标准曲线换算样本的实际浓度。。

1.9 Bulk RNA测序和数据分析 收集T2细胞和效应T淋巴细胞共培养后的CXCR6敲低组及对照组Treg细胞，TRIzol法提取总RNA并检测浓度，反转录获得cDNA文库并委托南京金唯智生物科技有限公司建立二代测序文库，文库经金唯智质控浓度和片段分布后进行illumina测序平台测序。测序结果采用fastqc软件进行质控过滤，数据清洗后使用trim-galore工具净化原始测序数据，将预处理后的数据使用Hisat2和featureCounts与参考基因组或转录组进行比对，得到基因或转录本的表达量以及基因表达矩阵。计算各基因的变换倍数（fold change，FC），采用DESeq2软件筛选差异表达基因（$|\log_2 FC|>1$，$P<0.05$），通过基因本体论（Gene Ontology，GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）信号通路富集分析预测其功能。

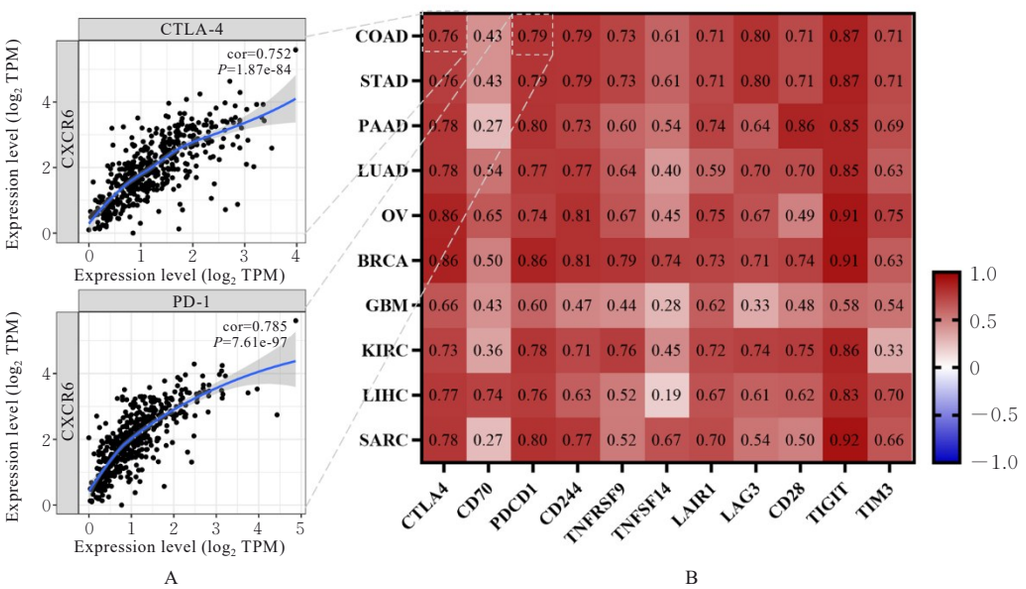
1.10 RT-qPCR法检测CXCR6敲低组和对照组Treg细胞中*PI16* mRNA表达水平 采用天根总RNA提取试剂盒（含TRIzol试剂）提取细胞总RNA，利用FastKing一步法反转录荧光定量试剂盒在同一反应管内完成RT-qPCR反应，引物终浓度为2.5 μmol·L^{-1}，以*GAPDH*为内参。引物序列：*PI16*-F 5′-GCGTGAGCAC-TACAACCTCAG-3′，*PI16*-R 5′-GCACACCAGTAATTCGATGTTGG-3′[13]；*GAPDH*-F 5′-AGATCCCTCCAAAATCAA-GTGG-3′，*GAPDH*-R 5′-GGCAGAGATGATGAC-CCTTTT-3′。采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算2组细胞中*PI16* mRNA表达水平。

1.11 统计学分析 采用Graphpad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。各组CD4阳性率、CXCR6阳性率、CD25和FOXP3双阳性率、靶细胞裂解率、IFN-γ和TNF-α水平以及*PI16* mRNA表达水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，2组间样本均数比较采用两独立样本t检验，多组间样本均数比较采用双因素方差分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。相关性分析采用两变量基因在特定癌种患者人群的表达量矩阵计算Pearson相关系数进行评估，Pearson相关系数的取值范围为－1～1，接近1代表强正相关关系；接近－1代表强负相关关系；接近0代表两个变量之间无线性关系。肿瘤纯度是一种数据库语言，是指肿瘤微环境中肿瘤细胞所占的比例。肿瘤微环境是围绕癌细胞形成的复杂免疫细胞环境，微环境中细胞中高表达的基因预计与肿瘤纯度呈负相关关系，而肿瘤细胞中高表达的基因则相反。因此，在相关系数计算的过程中引入了肿瘤纯度参数作为参考，该模块有助于识别与某个目标基因的表达相关的癌症类型和特定肿瘤浸润免疫细胞亚群。

2 结 果

2.1 *CXCR6*基因表达与免疫检查点分子的相关性 利用肿瘤免疫浸润分析数据库TIMER在10种实体瘤中进行分析，以结直肠腺癌（colon adenocarcinoma，COAD）为例，在COAD中，*CXCR6*表达与*PD-1*（$r=0.785$，$P<0.0001$）和*CTLA-4*（$r=0.752$，$P<0.01$）呈显著正相关关系（图2A）。对COAD、肺腺癌（lung adenocarcinoma，LUAD）、胃腺癌（stomach adenocarcinoma，STAD）、胰腺癌（pancreatic adenocarcinoma，PAAD）、胶质母

细胞瘤（glioblastoma multiforme，GBM）、卵巢浆液性囊腺癌（ovarian serous cystadenocarcinoma，OV）、浸润性乳腺癌（breast invasive carcinoma，BRCA）、肾透明细胞癌（kidney renal clear cell carcinoma，KIRC）、肝癌（liver hepatocellular carcinoma，LIHC）和肉瘤（sarcoma，SARC）肿瘤中 *CXCR6* 与 *PD-1*、*CTLA-4* 和淋巴细胞活化基因 3（lymphocyte activation gene-3，*LAG-3*）等 11 个免疫检查点基因表达相关性进行统计，*CXCR6* 表达在多种肿瘤中与免疫检查点分子表达有强正相关关系（图 2B）。



A：Correlation between expression levels of *CXCR6* mRNA and immune checkpoint *CTLA-4* and *PD-1* mRNA in COAD；B：Pearson correlation coefficient heat map of 11 immune checkpoint molecules and *CXCR6* expression in different types of cancers.

图 2 肿瘤中 *CXCR6* mRNA 表达水平与 11 种免疫检查点基因表达的相关性

Fig. 2 Correlation of *CXCR6* mRNA expression levels in tumors with expression of 11 kinds of immune checkpoint genes

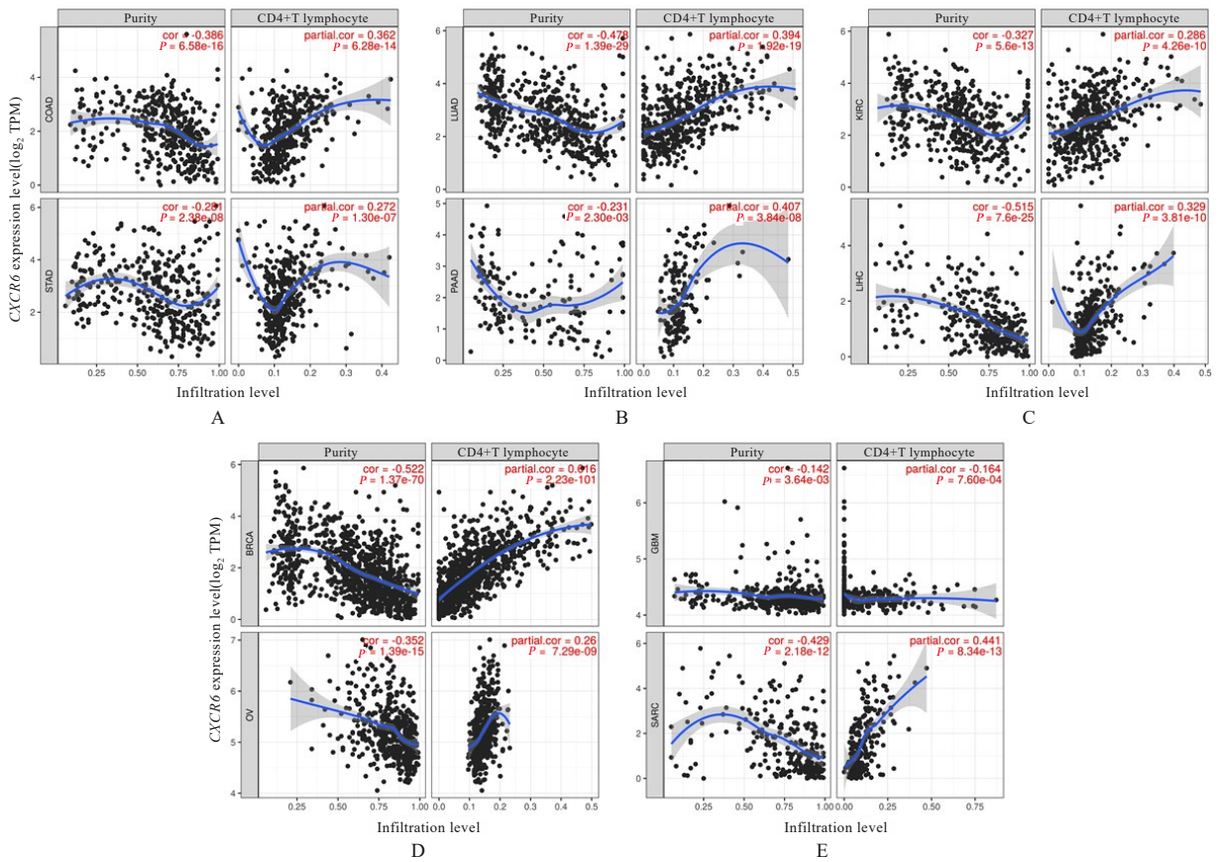
2.2 *CXCR6* 基因表达与 $CD4^+$T 淋巴细胞浸润程度的相关性 利用肿瘤免疫浸润分析数据库 TIMER 在 COAD、LUAD、STAD、PAAD、GBM、OV、BRCA、KIRC、LIHC 和 SARC 肿瘤中分析 *CXCR6* 与 $CD4^+$T 淋巴细胞浸润程度相关性，除 GBM 外，*CXCR6* 在 9 种癌组织中与肿瘤纯度呈显著负相关关系（$P<0.01$），表明 *CXCR6* 在微环境中高表达而非在肿瘤细胞中高表达；*CXCR6* 与 $CD4^+$T 淋巴细胞浸润程度呈显著正相关关系（$P<0.01$）。见图 3。

2.3 Treg 细胞和 CTL 分离及鉴定 使用 CD4 Dynabeads 磁珠分选后 $CD4^+$T 淋巴细胞纯度达（90.13±3.7）%，加入 CD3 抗体激活 T 淋巴细胞增殖并加入 5 μg·L^{-1} TGF-β 诱导培养 6 d 后，$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 细胞百分率维持在（69.6±3.4）%。见图 4。

2.4 $CD4^+$T 淋巴细胞和 Treg 细胞中 CXCR6 蛋白阳性表达率 流式细胞术检测结果显示：Treg 细胞中 CXCR6 阳性表达率为 74.7%，$CD4^+$T 淋巴细胞中 CXCR6 阳性表达率为 36.7%。见图 5。

2.5 Treg 细胞中 CXCR6 阳性表达率 慢病毒感染 Treg 后，与对照组比较，CXCR6-KD3# 敲低组细胞中 CXCR6 阳性表达率降低（$P<0.05$），CXCR6-KD1#、CXCR6-KD2# 和 CXCR6-KD4# 敲低组 CXCR6 阳性表达率差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 6 和 7。

2.6 各组靶细胞杀伤率 荧光法检测结果显示：效应 T 淋巴细胞组能靶向杀伤 T2 细胞，同时 Treg 对 CTL 的杀伤有抑制效果。$mCherry^+$ 细胞计数统计结果显示：与对照组（70.57%±3.06%）比较，CXCR6 敲低组靶细胞杀伤率（45.6%±3.06%）降低（$P<0.05$）。保持 T2 和 CTLs 细胞数不变，加入与 T2 细胞等量、4 倍和 10 倍 Treg，检测 Treg 调控的剂量依赖效应，结果显示：不同剂量 Treg 作用后，与对照组比较，CXCR6 敲低组靶细胞杀伤率均降低（$P<0.001$）。见图 8。



A：COAD(Upper panels)，STAD(lower panels)；B：LUAD(Upper panels)，PAAD(lower panels)；C：KIRC(Upper panels)，LIHC(Upper panels)；D：BRCA(Upper panels)，OV(lower panels)；E：GBM(Upper panels)，SARC(Lower panels). Pearson correlation between CXCR6 and $CD4^+$ T cells, partial correlation between CXCR6 and $CD4^+$ T cell infiltration adjusted by tumor purity. Y-axis：CXCR6 expression (log_2TPM)；X-axis：infiltration level. Correlation coefficients and *P* values are labeled. Purity：Gene expression level for tumor purity；CD4 T lymphocyte：CXCR6 expression and CD4 T infiltration scatter plot.

图3 肿瘤中*CXCR6*基因表达水平与$CD4^+$T淋巴细胞浸润程度的相关性

Fig. 3 Correlation between expression level of *CXCR6* gene and degree of $CD4^+$T infiltration in tumors

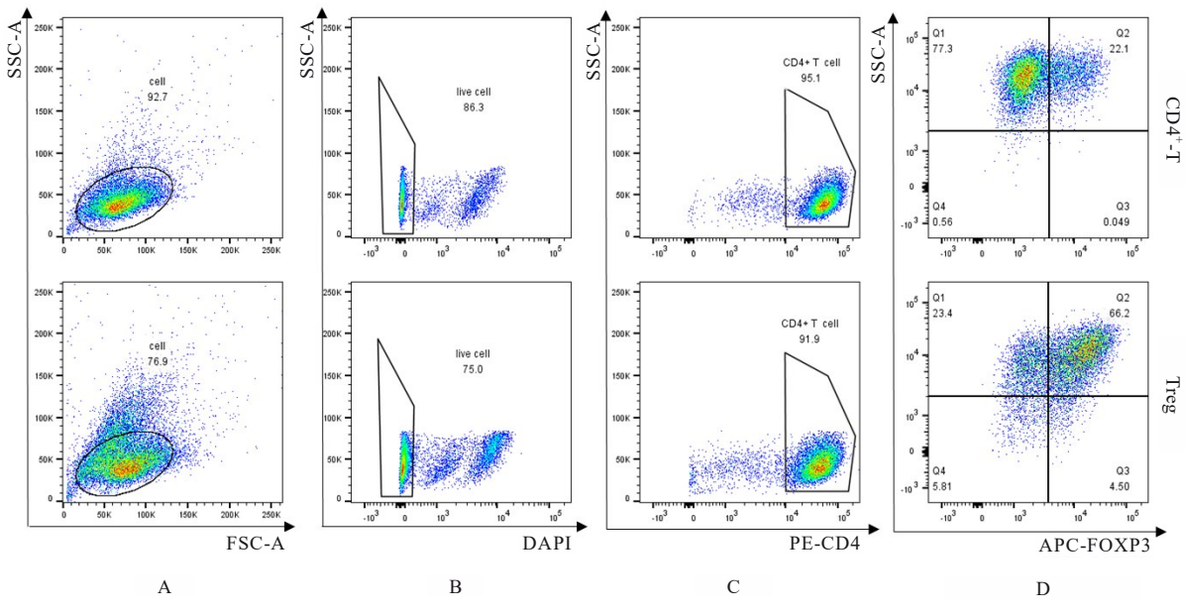
2.7 2组共培养体系上清中IFN-γ和TNF-α水平 在1∶1、4∶1和10∶1的梯度比例共培养条件下，与对照组比较，CXCR6敲低组共培养体系上清中IFN-γ（$P<0.01$）和TNF-α水平（$P<0.001$）升高。见图9。

2.8 2组Treg细胞中差异表达基因 转录组测序结果显示：与对照组比较，CXCR6敲低组Treg细胞中有82个基因显著上调，156个基因显著下调（图10A）。其中表达上调置信度最高的是*PI16*基因（$P<0.01$）；下调基因中包含C-C基元趋化因子配体1（C-C motif chemokine ligand 1，*CCL1*）、C-C基元趋化因子配体2(C-C motif chemokine ligand 2，*CCL2*)、*CXCL8*、*IL-21*、*IL-22*和*IL-9*等多种趋化因子和细胞因子（$P<0.001$），显示出更低水平的免疫活性和招募活性。为进一步探讨差异表达基因在Treg中的作用，对下调的差异表达基因进行KEGG信号通路富集分析，结果显示：除了上述显著改变的趋化因子通路和细胞因子通路外，磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）信号通路和胞外基质受体相互作用等信号通路与*CXCR6*基因表达的变化有关联（图10B）。富集分析结果显示：差异表达基因涉及多个生物学过程，包括胞外基质空间、细胞迁移调控和膜蛋白通路等（图10C）。

2.9 2组Treg细胞中*PI16* mRNA表达水平 与对照组(51.4±5.6)比较，CXCR6敲低组Treg细胞中*PI16* mRNA表达水平(22.0±2.4)升高($P<0.005$)。

3 讨 论

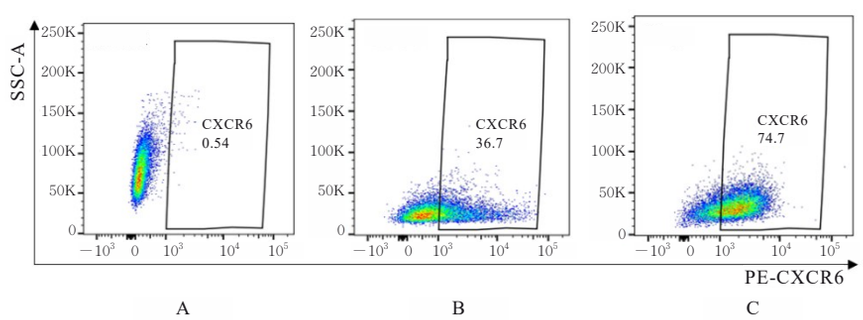
T淋巴细胞是抗肿瘤的核心参与者，能够通过抗原特异性机制识别和破坏肿瘤细胞[14-15]，不同



A: Total cell population was gated by forward scatter (FSC-A) and side scatter (SSC-A); B: Live cells were selected as $DAPI^-$ population; C: $CD4^+$ T lymphocytes were isolated *via* PE-CD4 staining; D: $CD4^+$ T cell subsets were distinguished by co-staining of APC/Fire 810-CD25 and APC-FOXP3, and Q2 quadrant represented $CD25^+FOXP3^+$ Tregs.

图 4 Treg 细胞分离培养和表型流式鉴定

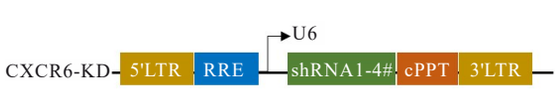
Fig. 4 Isolation and culture of Treg and identification of phenotypes with flow cytometry



A: MOCK; B: $CD4^+$T lymphocyte; C: Treg cells.

图 5 流式细胞术鉴定 Treg 细胞中 CXCR6 蛋白表达

Fig. 5 Expression of CXCR6 protein in Treg cells identified by flow cytometry



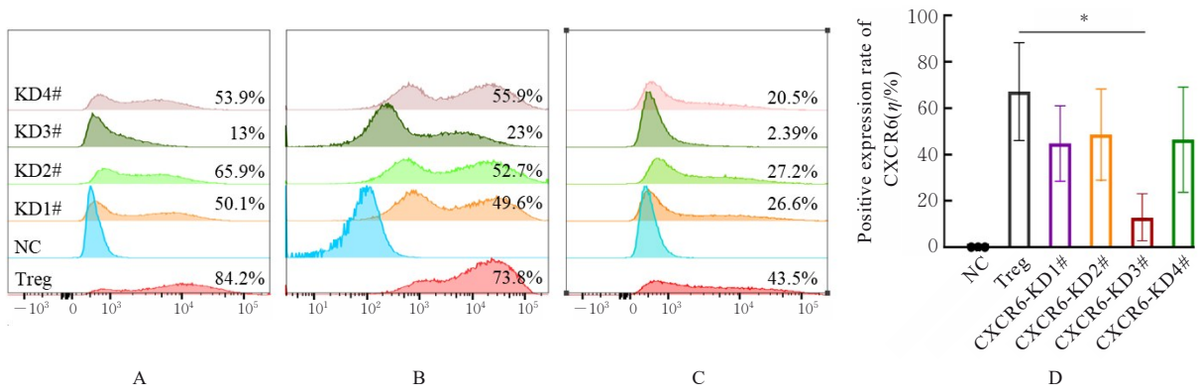
5/3′-LTR: long terminal repeat; RRE: Rev response element; cPPT: Central polypurine tract; U6: U6 promoter.

图 6 CXCR6 敲低 shRNA 慢病毒载体质粒结构

Fig. 6 Structure of CXCR6 knockdown shRNA lentiviral vector plasmid

T 淋巴细胞亚群在肿瘤进展和免疫监测中发挥不同作用[16]。其中 CTLs 通过穿孔素和颗粒酶直接对肿瘤细胞进行杀伤[17]；辅助性 T 淋巴细胞（helper T cells，Th）通过分泌细胞因子来增强 CTLs 活性并调节肿瘤微环境[18]。而 Treg 作为免疫系统的关键负调控细胞，目前已知其通过多种且非重复的机制抑制抗肿瘤免疫[19-20]，包括免疫抑制性细胞因子的分泌以及由颗粒酶/穿孔素途径介导的直接 CTL 裂解活性等[21-22]，并通过抑制效应 T 淋巴细胞功能来促进肿瘤免疫逃逸[20]。

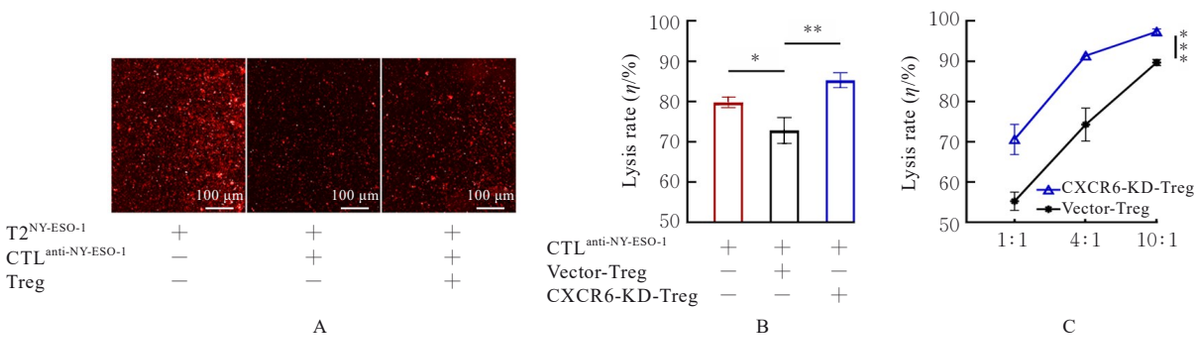
基于上述多种复杂调控环境，本研究通过生物信息学与体外实验相结合，阐释了 CXCR6 在肿瘤免疫微环境及 Treg 功能调控中的作用。首先，生物信息学分析表明：*CXCR6* 基因表达在 10 种实体瘤中与免疫检查点分子呈正相关关系，提示其参与肿瘤免疫抑制网络。研究[23]证明：Treg 可通过



A－C：Flow cytometry diagrams(A：Donor 1；B：Donor 2；C：Donor 3)；D：Histogram ($P<0.05$).

图7　Treg细胞中CXCR6敲低效率

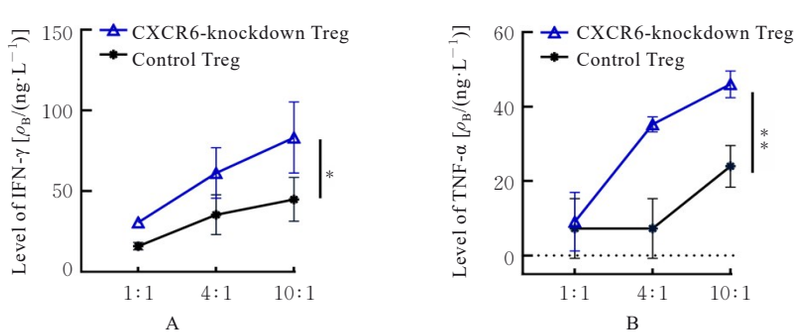
Fig. 7　Knockdown efficiencies of CXCR6 in Treg cells



A：Fluorescence imaging of T2 cells；B,C：Lysis rates ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$).

图8　各组靶细胞杀伤情况

Fig. 8　Killing status of cells in various groups



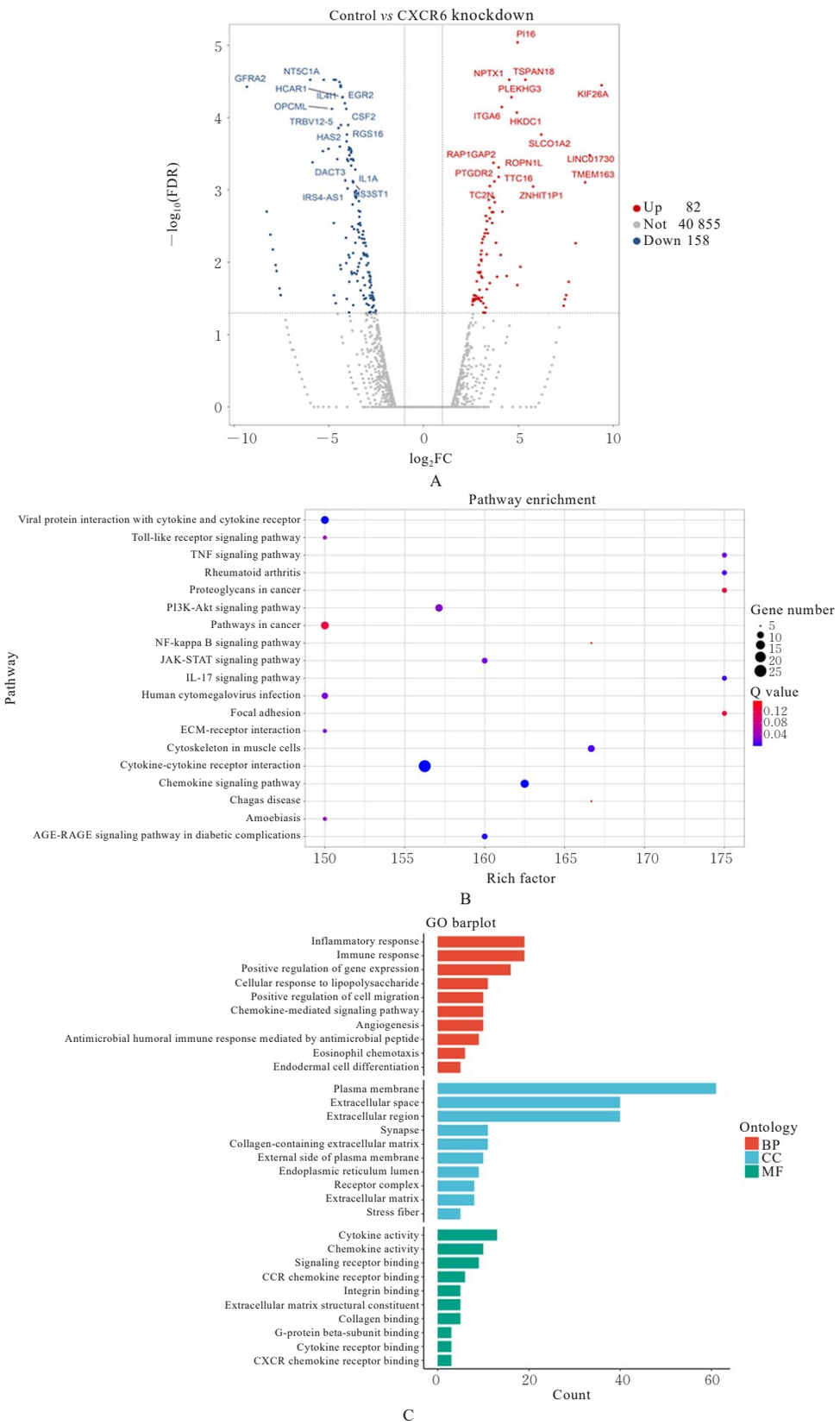
A：IFN-γ；B：TNF-α. $^{*}P<0.01$, $^{**}P<0.001$.

图9　2组共培养体系上清中IFN-γ和TNF-α水平

Fig. 9　Levels of IFN-γ and TNF-α in supernatant of co-culture system in two groups

CTLA-4依赖性反式内吞作用下调抗原提呈细胞表面的共刺激分子（CD80/CD86），损害$CD8^{+}$T淋巴细胞启动和记忆形成。研究[24]显示：阻断CTLA-4能破坏Treg细胞稳定性，造成糖酵解通路失常。上述研究均表明：CXCR6并非独立发挥作用，而是与免疫检查点分子形成协同调控网络，共同维持肿瘤免疫抑制微环境。这提示靶向CXCR6可能同时下调PD-1和CTLA-4等分子的表达，为双特异性抗体设计提供了理论依据，有望克服单一免疫检查点抑制剂的耐药性。

其次，*CXCR6*与$CD4^{+}$T淋巴细胞浸润水平呈正相关关系，明确了其在免疫微环境中的定位。临床数据[25]显示：不同状态的Treg细胞丰度与肿瘤患者预后相关性呈截然相反的结果。本研究发现：



BP：Biological process；CC：Cellular component；MF：Molecular function.

图 10 CXCR6敲低的Treg细胞与对照Treg细胞差异表达基因火山图(A)、KEGG通路富集分析(B)和GO功能富集分析(C)

Fig. 10 Volcano plot (A), KEGG pathway enrichment analysis (B), and GO functional enrichment analysis (C) of differential expression genes between CXCR6-knockdown Treg cells and control Treg cells

*CXCR6*与$CD4^+$T淋巴细胞浸润丰度呈高度正相关关系，且与肿瘤纯度呈负相关关系，提示*CXCR6*主要表达于肿瘤浸润的$CD4^+$T淋巴细胞（尤其是Treg），而非肿瘤细胞本身。上述结果从Treg的角度补充了DI PILATO等[26]的研究结果，该研究通过单细胞测序发现：黑色素瘤组织中CXCR6的表达主要在记忆和效应两种状态的CTL细胞和Treg中，且其表达与PD-1表达呈正相关关系。此外，CXCR6的配体CXCL16能在肿瘤基质细胞中高表达[27]，形成“CXCL16-CXCR6”轴，介导Treg向肿瘤微环境迁移。这一结果的意义在于：CXCR6不仅是Treg在肿瘤微环境中的“标志物”，更是其浸润的“驱动因子”，阻断CXCL16-CXCR6轴可能减少Treg向肿瘤的募集，从而改善免疫微环境。

敲低*CXCR6*会减弱Treg的抑制功能，证实其为Treg功能的关键调控因子。本研究通过体外共培养实验证实：敲低Treg中的*CXCR6*可显著提高CTLs的靶细胞杀伤率并促进IFN-γ和TNF-α的分泌，且这种效应具有剂量依赖性。CXCR6可能通过结合CXCL16激活PI3K/Akt信号通路[28]，而本研究KEGG分析也显示差异基因富集于PI3K/Akt通路，提示该通路可能是CXCR6调控Treg功能的关键信号途径。这一结果的临床启示在于：靶向Treg中的CXCR6可能“重编程”其功能，从“免疫抑制”转向“免疫许可”，为增强免疫检查点抑制剂疗效提供新策略。

*CXCR6*敲低可上调*PI16*表达，揭示其调控Treg功能的下游机制。本研究通过RNA测序及RT-qPCR结果证实：*CXCR6*敲低后Treg中*PI16* mRNA表达显著上调，而PI16是已知的Treg功能负调节因子[29-30]。LI等[29]报道：Treg中敲除*PI16*可显著增强其抑制功能，而过表达*PI16*则减弱其抑制作用；条件敲除Treg中的*PI16*基因可以促进Treg/Th17平衡向Treg显性方向或记忆表型发展[30]。本课题组提出“CXCR6/PI16”调控轴：正常情况下，CXCR6通过抑制PI16表达，维持Treg的高抑制活性；当CXCR6被敲低后，PI16表达上调，从而减弱Treg的抑制功能。这一机制的发现，为理解Treg功能的精细调控提供了新视角，也为靶向CXCR6的治疗提供了“下游验证”——通过检测PI16的表达水平，可评估CXCR6靶向治疗的疗效。

本研究存在以下局限性：①未通过*PI16*过表达/敲除实验验证其是否为CXCR6调控Treg功能的关键下游分子；②缺乏动物模型验证CXCR6在体内对肿瘤免疫的影响；③未探讨CXCR6对Treg与巨噬细胞和树突状细胞等其他免疫细胞相互作用的影响[31]。未来研究将从以下几个方面进行：①构建*PI16*基因修饰的Treg细胞，明确其在CXCR6调控中的作用；②建立荷瘤小鼠模型，验证CXCR6抑制剂与免疫检查点抑制剂的联合治疗效果；③采用单细胞测序技术，分析$CXCR6^+$Treg在肿瘤微环境中的异质性及其与临床预后的关联。

综上所述，*CXCR6*基因表达与免疫检查点分子基因表达高度相关，参与肿瘤免疫抑制网络的形成；*CXCR6*与$CD4^+$T淋巴细胞浸润有相关性，主要表达于肿瘤免疫微环境中的$CD4^+$T淋巴细胞；*CXCR6*敲低能影响Treg调节功能，是维持Treg免疫抑制功能的关键分子；*CXCR6*敲低可上调Treg中*PI16* mRNA表达水平，提示*PI16*可能是CXCR6调控Treg功能的重要下游靶分子。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

李佳鑫参与研究设计、实验操作和论文撰写及修改，张欣阳参与实验操作及统计学分析。

[参考文献]

[1] SAKAGUCHI S, MIYARA M, COSTANTINO C M, et al. FOXP3$^+$ regulatory T cells in the human immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(7):490-500.

[2] DENG L, CHEN N Y, LI Y, et al. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer[J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 2010, 1806(1): 42-49.

[3] BAO N D, FU B, ZHONG X L, et al. Role of the CXCR6/CXCL16 axis in autoimmune diseases[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 121: 110530.

[4] MENG J, YANG Y L, LV J J, et al. CXCR6 expression correlates with radiotherapy response and immune context in triple-negative breast cancer-experimental studies[J]. Int J Surg, 2024, 110(8): 4695-4707.

[5] 胡文露，张盼盼，贺玉杰，等. 血清γ-谷氨酰转移酶水平与抗黑色素瘤分化相关基因5抗体阳性皮肌炎早期死亡的关联性[J]. 郑州大学学报(医学版)，2026，61(3)：166-168.

[6] FRIDMAN W H, PAGÈS F, SAUTÈS-FRIDMAN C,

et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 298-306.

[7] MABROUK N, TRAN T, SAM I, et al. CXCR6 expressing T cells: Functions and role in the control of tumors[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1022136.

[8] LI L T, HUANG Y F, XUE R Z, et al. T cell-mediated mechanisms of immune-related adverse events induced by immune checkpoint inhibitors[J]. Crit Rev Oncol, 2025, 213: 104808.

[9] LI T T, PAN J, CHEN H Q, et al. CXCR6-based immunotherapy in autoimmune, cancer and inflammatory infliction[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(8): 3255-3262.

[10] LIANG Z, TANG Z W, ZHU C J, et al. Intestinal CXCR6^{+} ILC3s migrate to the kidney and exacerbate renal fibrosis *via* IL-23 receptor signaling enhanced by PD-1 expression[J]. Immunity, 2024, 57(6): 1306-1323.e8.

[11] LESCH S, BLUMENBERG V, STOIBER S, et al. T cells armed with C-X-C chemokine receptor type 6 enhance adoptive cell therapy for pancreatic tumours[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(11): 1246-1260.

[12] LI T W, FAN J Y, WANG B B, et al. TIMER: a web server for comprehensive analysis of tumor-infiltrating immune cells[J]. Cancer Res, 2017, 77(21): e108-e110.

[13] 吴 琴. PI16通过DOT1L影响CD4+CD25+Foxp3+调节性T细胞数量及功能参与类风湿关节炎发病的研究[D]. 南京:南京医科大学,2018.

[14] PU J, LIU T, ZHOU Y, et al. T cells in cancer: mechanistic insights and therapeutic advances [J]. Biomark Res, 2025, 13: 97.

[15] GAVIL N V, CHENG K, MASOPUST D. Resident memory T cells and cancer[J]. Immunity, 2024, 57(8): 1734-51.

[16] MA K, XU Y, CHENG H, et al. T cell-based cancer immunotherapy: opportunities and challenges [J]. Sci Bull, 2025, 70(11):1872-1890.

[17] OLIVEIRA G, WU C J. Dynamics and specificities of T cells in cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23:295-316.

[18] STEIER Z, KIM EJY, AYLARD DA, et al. The CD4 *versus* CD8 T cell fate decision: A Multiomics-Informed perspective[J]. Annu Rev Immunol, 2024, 42(1):235-58.

[19] GALASSI C, CHAN TA, VITALE I, et al. The hallmarks of cancer immune evasion[J]. Cancer Cell, 2024, 42(11):1825-63.

[20] MADDEN M Z, RATHMELL J C. The complex integration of T-cell metabolism and immunotherapy[J]. Cancer Discov, 2021, 11(7):1636-43.

[21] ZONG Y, DENG K, CHONG WP. Regulation of Treg cells by cytokine signaling and co-stimulatory molecules[J]. Front Immunol, 2024, 15:1387975.

[22] CAO X, CAI S F, FEHNIGER T A, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance [J]. Immunity, 2007 Oct.27(4): 635-646.

[23] MARANGONI F, et al. Expansion of tumor-associated Treg cells upon disruption of a CTLA-4-dependent feedback loop[J]. Cell, 184(15):3998-4015.e19.

[24] ZAPPASODI R, SERGANOVA I, COHEN IJ, et al. CTLA-4 blockade drives loss of Treg stability in glycolysis-low tumours[J]. Nature, 2021, 591:652-658.

[25] MOTOHASHI S, NISHIKAWA H. Regulatory T cells in the tumour microenvironment and their therapeutic targeting[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(5):329-346.

[26] DI PILATO M, KFURI-RUBENS R, PRUESSMANN J N, et al.CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment[J]. Cell, 2021, 184(17):4512-4530.

[27] KIM M J, SUN H J, SONG Y S, et al. CXCL16 positively correlated with M2-macrophage infiltration, enhanced angiogenesis, and poor prognosis in thyroid cancer[J]. Sci Rep, 2019; (9):13288

[28] MIR H, KAPUR N, GALES D N, et al. CXCR6-CXCL16 axis promotes breast cancer by inducing oncogenic signaling[J]. Cancers, 2021, 13(14): 3568.

[29] SUN Y K, LIN S Y, WANG H, et al. Regulatory role of PI16 in autoimmune arthritis and intestinal inflammation: implications for Treg cell differentiation and function[J]. J Transl Med, 2024, 22(1): 327.

[30] NICHOLSON I C, MAVRANGELOS C, BIRD D R, et al. PI16 is expressed by a subset of human memory Treg with enhanced migration to CCL17 and CCL20[J]. Cell Immunol, 2012, 275(1/2): 12-18.

[31] BROQUET A, GOURAIN V, GORONFLOT T, et al. Sepsis-trained macrophages promote antitumoral tissue-resident T cells[J]. Nat Immunol, 2024, 25(5): 802-819.