DOI:10.16016/j.2097-0927.202411078

NK细胞特异性敲除UTX以性别差异方式调控黑色素瘤肺转移

黄 沛[1],王洪晨[2],黄 河[3],谢佳新[1],吴 玉[1],周思敏[1],廖馨怡[1],管 潇[4] 陆军军医大学(第三军医大学):[1]高原军事医学系高原作业医学教研室,[2]药学与检验医学系临床血液学教研室,重庆;[3]联勤保障部队第九四〇医院神经内科,甘肃兰州;[4]重庆医药高等专科学校,重庆

[**摘要**] **目的** 探究X染色体编码的表观调节因子UTX对自然杀伤(natural killer,NK)细胞抗肿瘤活性的调控作用。**方法** 采用*Ncr1-iCre*工具雄鼠与$UTX^{fl/fl}$雌鼠杂交,获得F1代$Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/-}$雄鼠,进而将F1代小鼠与$UTX^{fl/fl}$雌鼠杂交,获得对照雄鼠$Ncr1\text{-}iCre^{-}UTX^{fl/-}$(M-对照)和NK细胞特异性敲除UTX雄鼠$Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/-}$(M-敲除);以及对照雌鼠$Ncr1\text{-}iCre^{-}UTX^{fl/fl}$(F-对照)和UTX基因敲除雌鼠$Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/fl}$(F-敲除)。UTX基因敲除小鼠通过尾静脉注射黑色素瘤细胞B16F10,观察肺脏转移的肿瘤结节数量;并通过流式细胞术分析肺脏NK细胞比例($CD3^{-}CD19^{-}NK1.1^{+}$)、数量、成熟分子KLRG1和CD11b、表达活化受体NKG2D和CD69及效应分子穿孔素、颗粒酶B、CD107a和干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)的改变;继而将分选的NK细胞与B16F10细胞共培养,通过流式细胞术检测B16F10细胞凋亡的改变。**结果** 与M-对照雄鼠相比较,M-敲除雄鼠肺脏黑色素瘤结节数量显著减少($P<0.05$);肺脏NK细胞比例和数量均显著增加($P<0.01$);NK细胞成熟标志分子KLRG1和CD11b比例无显著改变;NK细胞毒性分子穿孔素表达增加($P<0.01$),而效应分子颗粒酶B、脱颗粒标志分子CD107a,以及细胞因子IFN-γ无统计学差异;NK细胞与B16F10细胞共培养导致肿瘤细胞凋亡显著增加($P<0.05$)。相比于F-对照雌鼠,F-敲除雌鼠肺脏黑色素瘤结节数量无统计学差异;肺脏NK细胞比例和数量显著增加($P<0.05$);KLRG1和CD11b比例显著减少($P<0.01$);NK细胞穿孔素表达增加,颗粒酶B、CD107a和IFN-γ表达均显著减少($P<0.01$);NK细胞与B16F10细胞共培养,肿瘤细胞凋亡显著减少($P<0.05$)。**结论** NK特异性敲除UTX以性别差异方式调控小鼠黑色素瘤肺转移。

[**关键词**] 肺转移;黑色素瘤;NK细胞;性别;UTX

[**中图法分类号**] R73-362;R734.2;R739.5 [**文献标志码**] A

NK cell-specific knockout of UTX modulates pulmonary metastasis of melanoma in a sex-dependent manner

HUANG Pei[1], WANG Hongchen[2], HUANG He[3], XIE Jiaxin[1], WU Yu[1], ZHOU Simin[1], LIAO Xinyi[1], GUAN Xiao[4]

[1]Department of High Altitude Operational Medicine, Faculty of High Altitude Military Medicine, [2]Department of Clinical Hematology, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing; [3]Department of Neurology, No. 940 Hospital of Joint Logistics Support Force, Lanzhou, Gansu; [4]Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of X chromosome encoded epigenetic regulator UTX in

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年项目(82204398);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2022NSCQ-MSX0410);联勤保障部队第九四〇医院高层次培养人才工程年轻储备力量项目(2024-G3-6)

[**通信作者**] 管 潇,E-mail:343482960@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:黄沛,王洪晨,黄河,等.NK细胞特异性敲除UTX以性别差异方式调控黑色素瘤肺转移[J].陆军军医大学学报,2025,47(8):807-815. DOI:10.16016/j.2097-0927.202411078.

Citation: HUANG P, WANG H C, HUANG H, *et al*. NK cell-specific knockout of UTX modulates pulmonary metastasis of melanoma in a sex-dependent manner[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(8): 807-815. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202411078.

NK cell-mediated anti-tumor activity. **Methods** Male *Ncr1-iCre* mice were crossed with female $UTX^{fl/fl}$ mice to generate F1 $Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/-}$ male mice, which were further crossed with female $UTX^{fl/fl}$ mice to obtain male $Ncr1\text{-}iCre^{-}UTX^{fl/-}$ control mice (M-Con) and NK-specific deletion of UTX male mice $Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/-}$ (M-KO), as well as female $Ncr1\text{-}iCre^{-}UTX^{fl/fl}$ control mice (F-Con) and UTX-deficient female mice $Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/fl}$ (F-KO). UTX-deficient mice were injected with melanoma cell line B16F10 *via* tail vein to observe pulmonary metastatic tumor nodules. Moreover, flow cytometry was applied to detect the proportion and quantity of pulmonary NK cells ($CD3^{-}CD19^{-}NK1.1^{+}$), maturation makers KLRG1 and CD11b, activation receptors NKG2D and CD69, and effector molecules, including perforin, granzyme B, CD107a, and IFN-γ. Then pulmonary NK cells were sorted and co-cultured with B16F10 cells, and the apoptosis of the melanoma cells was measured with flow cytometry. **Results** Compared with the M-Con mice, the M-KO mice presented less number of pulmonary tumor nodules ($P<0.05$), increased proportion and quantity of NK cells in the tumor microenvironment ($P<0.01$), though no obvious changes in the ratio of NK maturation makers KLRG1 to CD11b, enhanced expression level of cytotoxic molecule perforin ($P<0.01$), but no changes in the expression of effector molecule granzyme B, degranulation marker CD107a and cytokine IFN-γ in NK cells. Co-culture of NK cells and B16F10 cells promoted the apoptosis of tumor cells ($P<0.05$). Compared with the F-Con mice, the F-KO mice had no statistical difference in the number of pulmonary tumor nodules, but larger proportion and number of NK cells ($P<0.05$), decreased ratio of KLRG1 to CD11b ($P<0.01$), elevated level of perforin but decreased levels of granzyme B, CD107a and IFN-γ in NK cells ($P<0.01$). The co-culture of NK cells and B16F10 cells reduced the apoptosis of tumor cells in F-KO female mice ($P<0.05$). **Conclusion** NK-specific deletion of UTX regulates pulmonary metastasis of melanoma in a sex-dependent manner.

［**Key words**］ pulmonary metastasis; melanoma; NK cells; sex; UTX

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82204398), the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2022NSCQ-MSX0410), and the Young Reserve Project of Top Talent Cultivation Program of No. 940 Hospital of Joint Logistic Support Force(2024-G3-6). Corresponding author: GUAN Xiao, E-mail: 343482960@qq.com

自然杀伤(natural killer，NK)细胞属于Ⅰ型固有淋巴细胞，是机体固有免疫功能的主要承担者[1]。NK细胞是肿瘤免疫监视“第一反应者”，能够自发地识别体内异常细胞，通过直接的细胞毒作用，如分泌穿孔素和颗粒酶B等迅速杀伤癌细胞；也可以分泌细胞因子，如干扰素-γ(interferon-γ，IFN-γ)以及趋化因子，募集和激活其他免疫细胞以启动适应性免疫反应。目前NK细胞已成功应用于肿瘤的免疫细胞过继转移治疗[2]。前期研究已发现多种调节NK细胞抗肿瘤效应功能的免疫治疗策略，如细胞因子等[3]，然而位于性染色体的基因对NK细胞抗肿瘤功能的调控作用尚不清楚。

UTX(由KDM6A编码)是X染色体编码的表观修饰调控因子，在小鼠和人类中都能逃脱X染色体失活(X-chromosome inactivation，XCI)[4]，在雌性和雄性组织和细胞中表达水平存在显著差异[5-6]。以往研究显示，UTX可通过具有催化活性的JmjC结构域介导2/3甲基化的组蛋白H3赖氨酸27(H3K27me2/3)特异性去甲基化[7]，或通过蛋白质相互作用发挥不依赖去甲基化酶的功能[8]。UTX的功能与同源基因表达、胚胎发育和细胞重编程有关，广泛调控多种细胞分化发育，如胚胎干细胞、造血系统、心血管系统等。近年来，UTX被证实能够抑制肿瘤的发生发展，且在多种人类癌症中高频发生突变[9-11]。2023年一项研究首先揭示UTX在NK细胞中表现出不依赖性激素的性别依赖性表达，且正向调控NK细胞抗病毒活性[12]。然而，UTX对雄性和雌性NK细胞介导的抗肿瘤活性的差异调控作用尚缺乏研究。

因此，本研究将*Ncr1-iCre*工具小鼠[13]与$UTX^{fl/fl}$小鼠杂交，获得NK细胞特异性敲除UTX小鼠，进而通过尾静脉注射B16F10细胞构建黑色素瘤肺转移模型，观察UTX缺失对雄鼠和雌鼠肿瘤微环境NK细胞发育和效应功能的影响，以及对黑色素瘤肺脏转移的调控作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器来源

$UTX^{fl/fl}$小鼠(NM-CKO-190054)购自上海南方模式

动物中心;*Ncr1-iCre*小鼠(110127)购自北京百奥赛图医药科技公司。DirectPCR(Tail)购自美国VIAGEN公司,蛋白酶K购自北京天根生化科技公司,Premix *Taq*™(TaKaRa *Taq*™ Version 2.0 plus dye)购自大连宝生物工程有限公司,黑色素瘤细胞系B16F10(CL-0319)购自武汉普诺赛生命科技公司。PCR检测试剂盒、V型胶原酶、DNA酶Ⅰ购自美国Sigma-Aldrich公司,DMEM培养基、RPMI1640培养基、胎牛血清和青霉素-链霉素购自美国Gibco公司;Anti-CD16/CD32、Anti-CD3(17A2)、Anti-CD19(6D5)、Anti-NK1.1(PK136)、Anti-CD11b(M1/70)、Anti-KLRG1(2F1)、Anti-CD69(H1.2F3)、Anti-NKG2D(CX5)、Anti-CD107a(ID4B)、anti-GranzymeB(QA18A28)、anti-Perforin(S16009A)、Annexin V凋亡染色试剂盒皆购自美国BioLegend公司;Anti-IFN-γ(XMG1.2)、固定穿孔试剂盒和蛋白转运抑制剂购自美国BD Biosciences公司,Percoll购自美国Cytiva公司,红细胞裂解液购自北京索莱宝科技公司,Foxp3转录因子染色试剂盒、PMA和离子霉素购自美国Invitrogen公司。Cellometer K2图像细胞仪购自美国Nexcelom Bioscience公司,FACS Canto流式细胞分析仪和FACS Aria Ⅲ流式细胞分选仪购自BD Biosciences公司。

1.2　构建NK细胞特异性敲除UTX小鼠

将C57/BL6 $UTX^{fl/fl}$雌鼠与*Ncr1-iCre*雄鼠杂交,获得F1代$Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/-}$雄鼠,进而将F1代小鼠与$UTX^{fl/fl}$雌鼠杂交,最终获得同窝对照组雄鼠$Ncr1\text{-}iCre^{-}UTX^{fl/-}$(M-对照)和敲除雄鼠$Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/-}$(M-敲除)各60只,以及同窝对照组雌鼠$Ncr1\text{-}iCre^{-}UTX^{fl/fl}$(F-对照)和敲除雌鼠$Ncr1\text{-}iCre^{+}UTX^{fl/fl}$(F-敲除)各60只(图1)。所有小鼠饲养于SPF动物房。小鼠饲养温度维持在22~25 ℃,湿度为40%~70%,昼夜节律为12 h。所有实验小鼠为8~12周龄。所有动物实验方案经过陆军军医大学动物伦理委员会批准并遵循相关规定(AMUWEC20223534)。

1.3　NK细胞特异性敲除UTX小鼠基因型鉴定

小鼠基因型鉴定按照DirectPCR(Tail)说明书所示方法进行操作。小鼠经麻醉后剪取0.5~1.0 cm鼠尾,加入鼠尾裂解液和蛋白酶K,55 ℃孵育6 h,85 ℃孵育45 min,并将样本置于冰上冷却。将上述鼠尾样本按照4 ℃,8 000×*g*离心5 min,取上清按照Premix *Taq*™说明书进行操作,进行PCR扩增反应和琼脂糖凝胶电泳。相关基因引物序列见表1。

1.4　构建B16F10肺转移模型

黑色素瘤细胞系B16F10(CL-0319)未列入国际细胞系鉴定委员会常见错误鉴定细胞系数据库,且使用短串联重复分析(short tandem repeat,STR)鉴定正确,购买后使用支原体PCR检测试剂盒检测支原体污染呈阴性。B16F10细胞用DMEM培养基添加10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素培养2~3代后使用。将1.2构建的NK细胞的特异性敲除UTX小鼠经尾静脉注射20万B16F10细胞,14 d后将小鼠用4%~5%异氟烷麻醉并颈椎脱位处死,立即对肺脏肿瘤结节进行计数和流式分析。

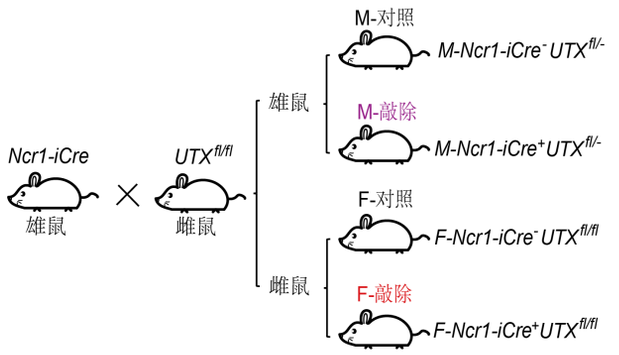


图1　NK细胞特异性敲除UTX小鼠构建示意图

表1　小鼠基因鉴定PCR引物序列

基因	引物序列(5'→3')
UTX	上游:TCTCTATGCACTGGATGTAT
	下游:AAAAGATGTTAAGGGTTGTT
Ncr1-icre	上游:AATTGGTCTGGCATGCATAATC
	突变:CACACCGGCCTTATTCCAAG
	野生型:AGTAGGAAGGAAATATTCCCATGG

1.5　流式细胞分析

流式细胞分析方法参照文献[14]和试剂说明书进行操作。

1.5.1　组织样本处理　　荷瘤小鼠肺脏组织处理方法参照文献进行操作[15-16]。小鼠经麻醉后处死,取肺脏,剪碎后用1 mg/mL Ⅳ型胶原酶、0.1 mg/mL DNA酶Ⅰ以及RPMI1640培养基在37 ℃消化30 min;再用30% Percoll进行密度梯度离心;使用红细胞裂解液裂解红细胞,使用含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基终止裂解红细胞并按照室温以300×*g*离心6 min,重悬细胞,得到单细胞悬液。

1.5.2　表面抗体染色　　表面蛋白CD3、CD19、NK1.1、CD11b、KLRG1、CD69、NKG2D和CD107a染色方法如下:取100 μL单细胞悬液,加入CD16/CD32抗体进行封闭。再加入适量表面抗体,避光孵育15 min,PBS洗1次,按照以室温300×*g*离心6 min,可加入200 μL PBS重悬细胞,立即使用FACS Canto流式细胞分析仪检

测,或直接进行下一步胞内蛋白染色。单细胞悬液经过稀释后,采用图像细胞仪进行细胞计数。

1.5.3 胞内蛋白染色 胞内蛋白颗粒酶B或穿孔素染色按照文献[17]和Foxp3转录因子染色试剂盒说明书进行染色。将上述表面抗体染色后的细胞样本,加入200 μL固定穿孔液(按照固定穿孔浓缩液:稀释液=1:3配制),震荡混匀,避光放置2 h。用1×固定穿孔缓冲液将样本洗1次,按照室温以600×*g*离心6 min,重悬样本,加入胞内蛋白抗体颗粒酶B或穿孔素,避光30 min,再洗1次,用200 μL PBS重悬细胞。

1.5.4 细胞因子染色 细胞因子IFN-γ按照文献[18]和固定穿孔试剂盒说明书进行染色。肺脏单细胞悬液用PMA和离子霉素以及蛋白质转运抑制剂刺激6 h,PBS洗1次,进行表面抗体染色,加入固定穿孔液避光固定2 h;将样本用1×固定穿孔缓冲液洗1次,按照室温以600×*g*离心6 min,重悬样本,加入IFN-γ抗体,避光30 min,再洗1次,用200 μL PBS重悬细胞。

1.5.5 体外检测NK细胞杀伤功能 检测NK细胞体外杀伤功能按照文献和试剂盒说明书进行。分离M-对照、M-敲除雄鼠或F-对照、F-敲除雌鼠肺脏组织NK细胞,按照上述方法进行表面抗体染色,使用FACS Aria Ⅲ流式细胞分选仪分选NK细胞($CD3^-CD19^-NK1.1^+$),分选后的NK细胞纯度>95%。根据CFSE说明书标记B16F10细胞,将分选的NK细胞与标记后的B16F10细胞共培养4 h,检测肿瘤细胞凋亡的改变。按照Annexin V凋亡染色试剂盒说明书进行肿瘤细胞凋亡染色。按照以下方法进行计算:肿瘤细胞被杀伤后的死亡率=实验组肿瘤细胞死亡率−对照组肿瘤细胞自然死亡率。

1.6 统计学分析

采用IBM SPSS26.0进行统计,柱状图采用GraphPad Prism绘制。每个散点代表1只小鼠样本。满足正态分布的计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用配对或非配对双侧*t*检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NK细胞敲除UTX以性别差异方式调控黑色素瘤肺转移

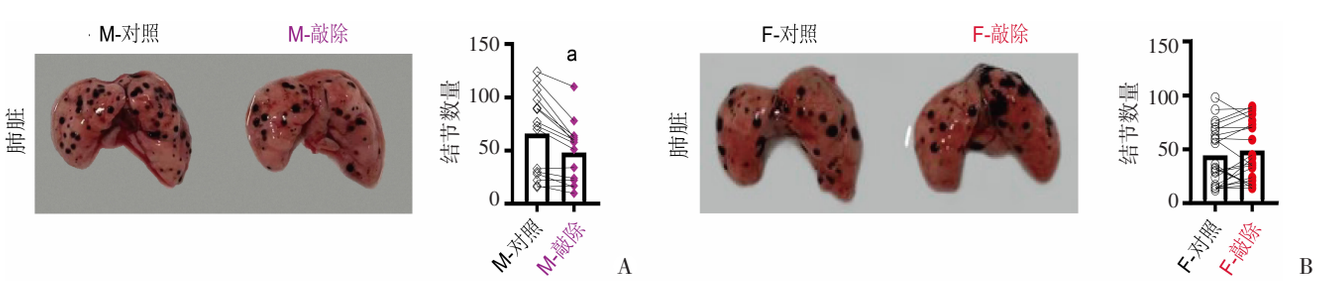
为探究UTX对NK细胞抗黑色素瘤肺转移的调控作用,本研究观察了UTX缺失小鼠肺脏转移的肿瘤结节数量。相比于M-对照,M-敲除雄鼠肺脏肿瘤结节数量显著减少($P<0.05$,图2A)。然而相比于F-对照,F-敲除雌鼠肿瘤结节数量无统计学差异(图2B)。以上结果证实,雄性小鼠NK细胞敲除UTX基因抑制黑色素瘤肺转移(定植和生长),雌性小鼠NK细胞敲除UTX基因对黑色素瘤肺转移无显著影响。

2.2 UTX调控肿瘤微环境NK细胞数量以及成熟标志分子KLRG1和CD11b

进一步分析黑色素瘤肺转移灶NK细胞发育和成熟标志分子KLRG和CD11b的变化。与M-对照相比,M-敲除雄鼠肺脏NK细胞($CD3^-CD19^-NK1.1^+$)比例和数量均显著增加($P<0.01$)。相比于F-对照雌鼠,F-敲除雌鼠NK细胞比例和数量显著增加($P<0.05$,图3A、B)。相比于M-对照,M-敲除雄鼠NK细胞成熟标志分子$KLRG1^+$和$CD11b^+$比例无统计学差异(图3C、E)。与F-对照相比,F-敲除雌鼠NK细胞$KLRG1^+$和$CD11b^+$比例显著降低($P<0.01$,图3D、F)。以上结果表明,黑色素瘤肺转移肿瘤微环境UTX能抑制雄性和雌性小鼠NK细胞数量,而UTX促进雌性小鼠NK细胞表达成熟标志分子KLRG1和CD11b。

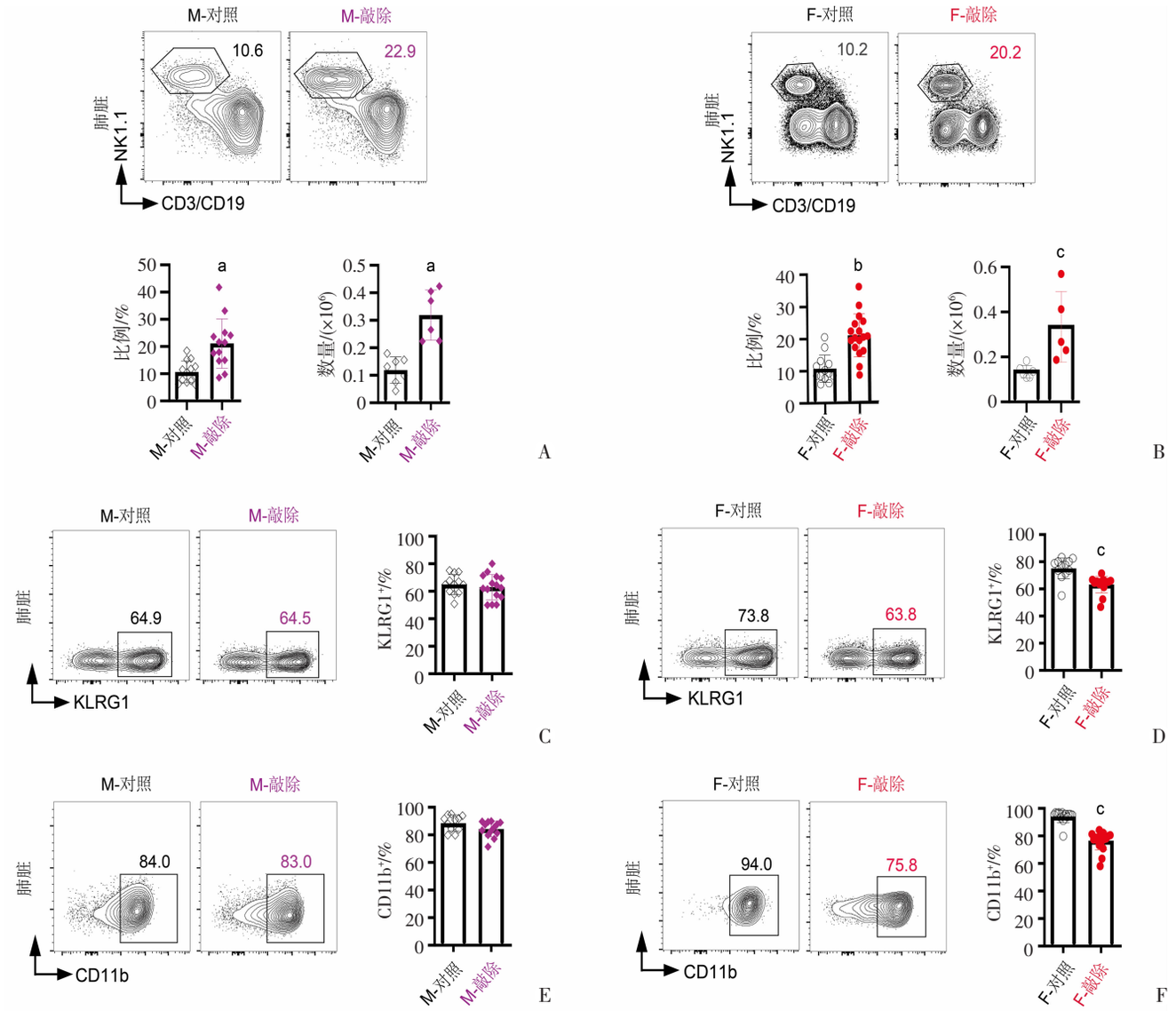
2.3 UTX对肿瘤微环境NK细胞活化受体NKG2D和CD69表达无调控作用

相比于M-对照,M-敲除雄鼠肺脏NK细胞NKG2D和CD69平均荧光强度均无统计学差异(图4A、C)。相比于F-对照,F-敲除雌鼠肺脏NK细胞NKG2D和CD69平均荧光强度(geometric mean fluorescence intensity,



A:尾静脉注射B16F10细胞后M-对照和M-敲除雄鼠黑色素瘤肺转移肿瘤结节数量($n=17$, $\bar{x}\pm s$);a:$P<0.05$,与M-对照比较;B:尾静脉注射B16F10细胞后F-对照和F-敲除雌鼠黑色素瘤肺转移肿瘤结节数量($n=22$, $\bar{x}\pm s$)

图2 NK细胞特异性敲除UTX小鼠黑色素瘤肺转移



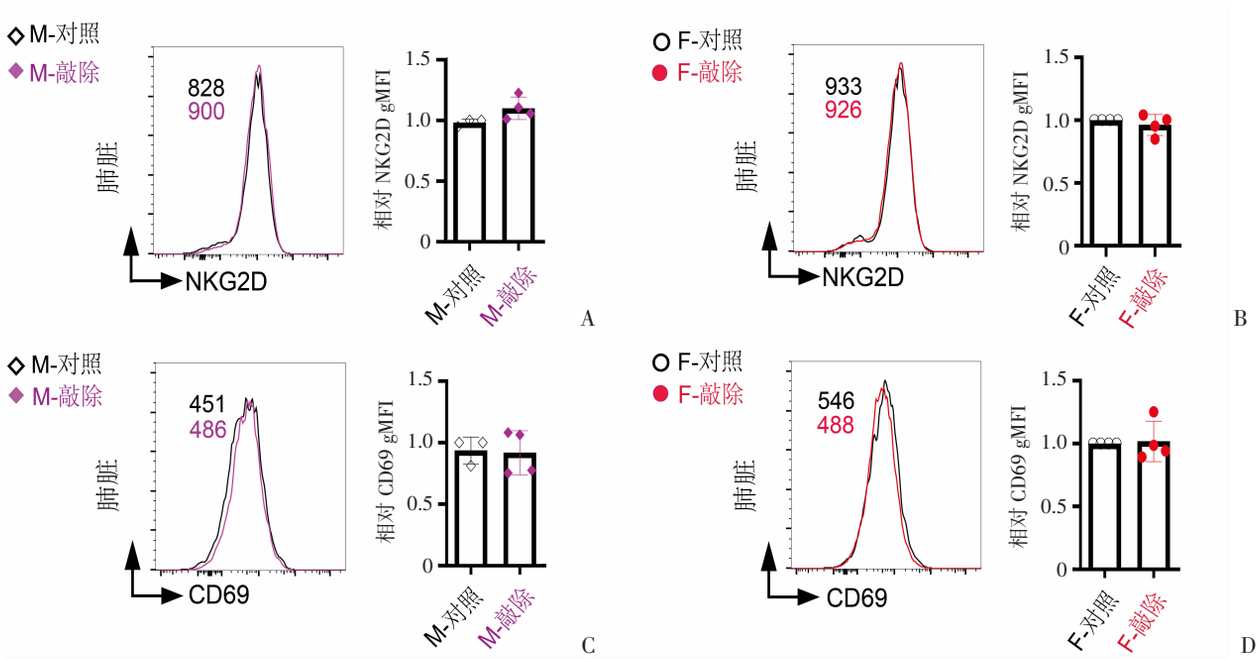
a:P<0.01,与M-对照比较;b:P<0.01,c:P<0.05,与F-对照比较;A:流式细胞术检测M-对照和M-敲除雄鼠NK细胞($CD3^-CD19^-NK1.1^+$)比例(n=13,$\bar{x}\pm s$)和数量(n=7,$\bar{x}\pm s$);B:流式细胞术检测F-对照和F-敲除雌鼠NK($CD3^-CD19^-NK1.1^+$)比例(n=13,$\bar{x}\pm s$)和数量(n=6,$\bar{x}\pm s$);C:流式细胞术检测M-对照和M-敲除雄鼠NK细胞$KLRG1^+$比例(n=12,$\bar{x}\pm s$);D:流式细胞术检测F-对照和F-敲除雌鼠NK细胞$KLRG1^+$比例(n=12,$\bar{x}\pm s$);E:流式细胞术检测M-对照和M-敲除雄鼠NK细胞$CD11b^+$比例(n=11,$\bar{x}\pm s$);F:流式细胞术检测F-对照和F-敲除雌鼠NK细胞$CD11b^+$比例(n=14,$\bar{x}\pm s$)

图3 UTX敲除小鼠肿瘤微环境NK细胞发育

gMFI)无统计学差异(图4B、D)。因此,黑色素瘤肺转移肿瘤微环境UTX对雄性和雌性小鼠NK细胞活化受体NKG2D和CD69表达没有显著调控作用。

2.4 UTX以性别差异方式调控肿瘤微环境NK细胞效应分子

为探究UTX对肿瘤微环境NK细胞效应功能的影响,本研究检测了NK细胞经典毒性分子颗粒酶B和穿孔素,以及脱颗粒标志分子CD107a的改变。相比于M-对照小鼠,M-敲除雄鼠NK细胞穿孔素gMFI表达显著增加(P<0.01),颗粒酶B蛋白表达和$CD107a^+$比例无统计学差异(图5A、C)。相比于F-对照小鼠,F-敲除雌鼠NK细胞穿孔素gMFI表达显著增加(P<0.05),然而颗粒酶B gMFI表达显著降低(P<0.01,图5B),$CD107a^+$比例显著减少(P<0.05,图5D)。进一步检测NK细胞分泌细胞因子IFN-γ的变化,相比于M-对照小鼠,M-敲除雄鼠NK细胞$IFN\text{-}\gamma^+$比例和IFN-γ gMFI表达均无统计学差异(图5E)。而相比于F-对照小鼠,F-敲除雌鼠NK细胞$IFN\text{-}\gamma^+$比例显著减少(P<0.05),



A:流式细胞术检测M-对照和M-敲除雄鼠NK细胞NKG2D gMFI(n=3, $\bar{x}\pm s$);B:流式细胞术检测F-对照和F-敲除雌鼠NK细胞NKG2D gMFI(n=4, $\bar{x}\pm s$);C:流式细胞术检测M-对照和M-敲除雄鼠NK细胞CD69 gMFI(n=3, $\bar{x}\pm s$);D:流式细胞术检测F-对照和F-敲除雌鼠NK细胞CD69 gMFI(n=4, $\bar{x}\pm s$)

图4 UTX敲除小鼠肿瘤微环境NK细胞活化受体表达

其gMFI表达显著降低(P<0.01,图5F)。以上研究结果证实,UTX以性别差异方式调控黑色素瘤肺转移肿瘤微环境NK细胞效应分子表达。

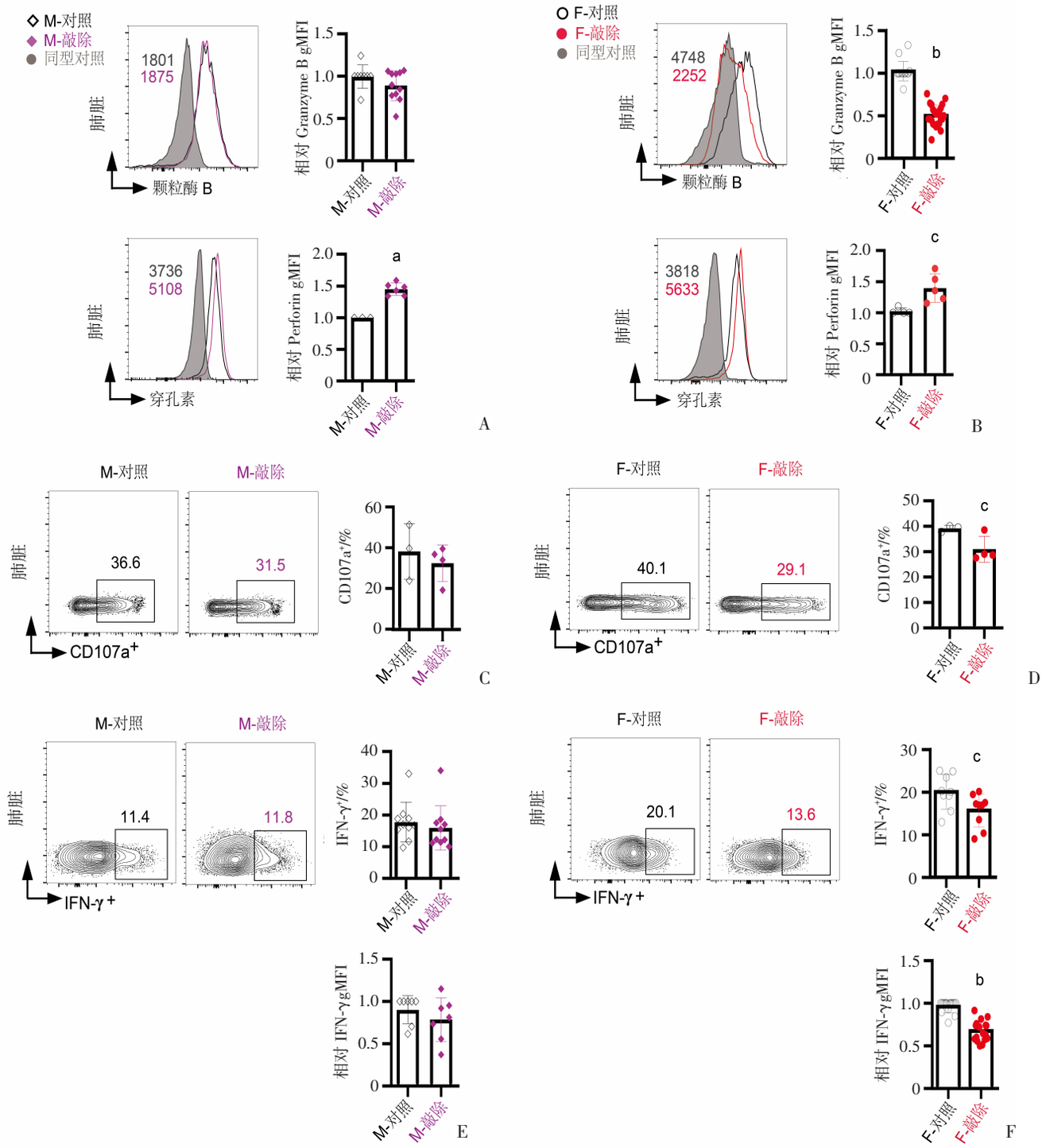
2.5 UTX以性别差异方式调控NK细胞体外杀伤黑色素瘤细胞

为进一步阐明UTX对NK细胞直接杀伤肿瘤细胞的影响,将NK细胞与B16F10细胞共培养,检测肿瘤细胞的死亡率。相比于M-对照小鼠,M-敲除雄鼠肿瘤细胞死亡率显著增加(图6A,P<0.05)。相比于F-对照小鼠,F-敲除雌鼠肿瘤细胞死亡率显著减少(P<0.05,图6B)。因此,雄性小鼠UTX抑制NK细胞直接杀伤黑色素瘤细胞,而雌性小鼠UTX促进NK细胞杀伤黑色素瘤细胞。

3 讨论

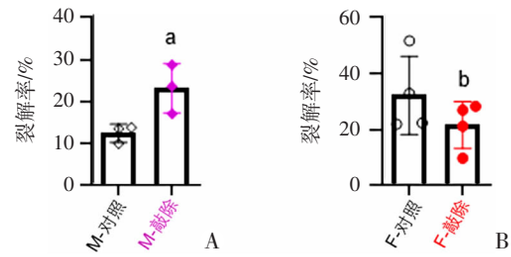
流行病学证据揭示,非生殖系统恶性肿瘤存在显著的性别二态性特征[19]。男性在超过70%的实体瘤类型中表现出更高的年龄标准化发病率,且总死亡率较女性升高。这种差异在黑色素瘤中尤为突出——男性患者发生转移的风险高于女性,且对PD-1抑制剂的客观缓解率较女性降低。这种性别特异性源于多层次的生物学差异,包括代谢、免疫和炎症等。然而,现行临床指南尚未建立基于性别的治疗分层策略,这与肿瘤免疫治疗精准化发展的需求形成显著矛盾。作为固有免疫的核心效应细胞,NK细胞不仅承担着肿瘤免疫监视的先锋功能,其过继转移疗法更在黑色素瘤临床治疗中展现出突出潜力[20]。现有研究多聚焦于常染色体编码的NK细胞调控网络[3],而性染色体(特别是X染色体表观遗传调控元件)在NK细胞抗肿瘤免疫中的功能尚缺乏研究。本研究利用NK细胞特异性UTX条件性敲除小鼠模型,阐明X染色体编码的表观遗传调控因子UTX通过多重作用机制调控NK细胞抗黑色素瘤肺转移功能,并证实其效应呈现显著性别差异:(1)抑制肿瘤微环境NK细胞数量;(2)性别特异性调控细胞毒功能;(3)差异调节IFN-γ分泌。

UTX的性别特异性表达模式已在多谱系免疫细胞中得以验证[21]。男性外周免疫细胞($CD4^+$T、$CD8^+$T、单核及B细胞)UTX转录水平显著低于女性,这与UTX在B细胞淋巴瘤、T细胞急性淋巴细胞白血病和前列腺癌的性别依赖性抑癌作用一致[22-24]。本研究发现,在黑色素瘤肺转移模型中,UTX通过性别差异机制调控NK细胞功能。在雄性小鼠中,UTX通过双重抑制肿瘤微环境NK细胞数量及其细胞毒作用,显著促进肺转移灶形成;而在雌性模型中,尽管NK细胞



a:$P<0.01$,与 M-对照比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 F-对照比较;A:流式细胞术检测 M-对照和 M-敲除雄鼠 NK 细胞颗粒酶 B(n=8, $\bar{x}\pm s$)和穿孔素 gMFI(n=3, $\bar{x}\pm s$);B:流式细胞术检测 F-对照和 F-敲除雌鼠 NK 细胞颗粒酶 B(n=16, $\bar{x}\pm s$)和穿孔素 gMFI(n=5, $\bar{x}\pm s$);C:流式细胞术检测 M-对照和 M-敲除雄鼠 NK 细胞 $CD107a^+$ 比例(n=3, $\bar{x}\pm s$);D:流式细胞术检测 F-对照和 F-敲除雌鼠 NK 细胞 $CD107a^+$ 比例(n=3, $\bar{x}\pm s$);E:流式细胞术检测 M-对照和 M-敲除雄鼠 NK 细胞 IFN-γ^+ 比例(n=7, $\bar{x}\pm s$)和 IFN-γ gMFI(n=7, $\bar{x}\pm s$);F:流式细胞术检测 F-对照和 F-敲除雌鼠 NK 细胞 IFN-γ^+ 比例(n=9, $\bar{x}\pm s$)和 IFN-γ gMFI(n=12, $\bar{x}\pm s$)

图5 UTX敲除小鼠肿瘤微环境NK细胞效应分子表达



a:$P<0.05$,与M-对照比较;b:$P<0.05$,与F-对照比较
A:流式细胞术检测M-对照和M-敲除雄鼠NK细胞对B16F10的自然细胞毒性($n=3$, $\bar{x}\pm s$);B:流式细胞术检测F-对照和F-敲除雌鼠NK细胞对B16F10的自然细胞毒性($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

图6 UTX敲除NK细胞体外杀伤B16F10细胞

数量同样受UTX抑制,但通过增强其IFN-γ分泌能力,最终维持抗黑色素瘤肺转移效应。本研究不仅拓展了UTX在黑色素瘤肺转移肿瘤免疫微环境中的调控网络,更为性染色体相关免疫调节理论提供了直接证据。

既往研究表明,静息态雄性NK细胞中UTX虽呈低表达状态,但基于CD27和CD11b表型特征的NK细胞成熟状态无显著性别差异[12]。本研究发现,UTX的缺失会导致肿瘤微环境雌性NK细胞成熟标志分子KLRG1和CD11b比例显著降低;而雄性NK细胞成熟未受影响。这提示在黑色素瘤肺转移应激条件下,雄性NK细胞可能通过UTX非依赖性机制(如UTY代偿或Y染色体基因补偿)维持成熟稳态,该补偿机制亟待单细胞测序及条件性敲除模型验证。

综上所述,本研究揭示UTX通过抑制肿瘤微环境NK细胞数量参与黑色素瘤肺转移调控,UTX以性别二态性方式调控NK效应功能及黑色素瘤肺转移,X染色体表观遗传元件是NK细胞抗黑色素瘤肺转移功能的重要调控因子。上述研究结果为探索性别适配型NK细胞疗法提供了关键分子靶标。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] SPITS H, BERNINK J H, LANIER L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense [J]. Nat Immunol, 2016, 17(7): 758-764. DOI: 10.1038/ni.3482.

[2] VIVIER E, REBUFFET L, NARNI-MANCINELLI E, *et al*. Natural killer cell therapies[J]. Nature, 2024, 626(8000): 727-736. DOI: 10.1038/s41586-023-06945-1.

[3] STENGER T D, MILLER J S. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1356666. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1356666.

[4] GREENFIELD A, CARREL L, PENNISI D, *et al*. The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans [J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(4): 737-742. DOI: 10.1093/hmg/7.4.737.

[5] XU J, DENG X X, WATKINS R, *et al*. Sex-specific differences in expression of histone demethylases utx and uty in mouse brain and neurons[J]. J Neurosci, 2008, 28: 4521-4527. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5382-07.2008.

[6] WAINER KATSIR K, LINIAL M. Human genes escaping X-inactivation revealed by single cell expression data [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 201. DOI: 10.1186/s12864-019-5507-6.

[7] HONG S, CHO Y W, YU L R, *et al*. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(47): 18439-18444.DOI: 10.1073/pnas.0707292104.

[8] SHPARGEL K B, SENGOKU T, YOKOYAMA S, *et al*. UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development [J]. PLoS Genet, 2012, 8(9): e1002964. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002964.

[9] VAN DER MEULEN J, SPELEMAN F, VAN VLIERBERGHE P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease [J]. Epigenetics, 2014, 9(5): 658-668. DOI: 10.4161/epi.28298.

[10] TRAN N, BROUN A, GE K. Lysine demethylase KDM6A in differentiation, development, and cancer [J]. Mol Cell Biol, 2020, 40(20): e00341-20. DOI: 10.1128/MCB.00341-20.

[11] WANG L, SHILATIFARD A. UTX mutations in human cancer [J]. Cancer Cell, 2019, 35(2): 168-176. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.01.001.

[12] CHENG M I, LI J H, RIGGAN L, *et al*. The X-linked epigenetic regulator UTX controls NK cell-intrinsic sex differences [J]. Nat Immunol, 2023, 24(5): 780-791. DOI: 10.1038/s41590-023-01463-8.

[13] NARNI-MANCINELLI E, CHAIX J, FENIS A, *et al*. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(45): 18324-18329. DOI: 10.1073/pnas.1112064108.

[14] DENG Y C, KERDILES Y, CHU J H, *et al*. Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function[J]. Immunity, 2015, 42(3): 457-470. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.006.

[15] MENG M, ZHONG Z Y, SONG L, *et al*. MTOR signaling promotes rapid m6A mRNA methylation to regulate NK-cell activation and effector functions[J]. Cancer Immunol Res, 2024, 12(8): 1039-1057.DOI:10.1158/2326-6066.CIR-23-0339.

[16] 成佳楠,郭金铭,贾馨竹,等.锰佐剂通过重塑免疫微环境促进放疗的抗肿瘤作用[J].陆军军医大学学报,2024,46(13):1477-1484. DOI:10.16016/j.2097-0927.202402064.
CHENG J N, GUO J M, JIA Q Z, *et al*. Manganese promotes anti-tumor effect of radiotherapy through reshaping the immune microenvironment [J]. J Army Med Univ, 2024, 46(13): 1477-1484. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202402064.

[17] HUANG P, WANG F J, YANG Y, *et al*. Hematopoietic-specific deletion of Foxo1 promotes NK cell specification and proliferation [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1016. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01016.

[18] WANG F J, MENG M, MO B H, *et al*. Crosstalks between mTORC1 and mTORC2 variagate cytokine signaling to control NK maturation and effector function [J]. Nat Commun, 2018, 9: 4874. DOI: 10.1038/s41467-018-07277-9.

[19] HAUPT S, CARAMIA F, KLEIN S L, *et al*. Sex disparities matter in cancer development and therapy [J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(6): 393-407. DOI: 10.1038/s41568-021-00348-y.

[20] MASKALENKO N A, ZHIGAREV D, CAMPBELL K S. Harnessing natural killer cells for cancer immunotherapy: dispatching the first responders [J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(8): 559-577. DOI: 10.1038/s41573-022-00413-7.

[21] SCHMIEDEL B J, SINGH D, MADRIGAL A, *et al*. Impact of genetic polymorphisms on human immune cell gene expression [J]. Cell, 2018, 175(6): 1701-1715.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.022.

[22] LI X X, ZHANG Y L, ZHENG L T, *et al*. UTX is an escape from X-inactivation tumor-suppressor in B cell lymphoma [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2720. DOI: 10.1038/s41467-018-05084-w.

[23] VAN DER MEULEN J, SANGHVI V, MAVRAKIS K, *et al*. The H3K27me3 demethylase UTX is a gender-specific tumor suppressor in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2015, 125(1): 13-21. DOI: 10.1182/blood-2014-05-577270.

[24] KANEKO S, LI X. X chromosome protects against bladder cancer in females *via* a *KDM6A*-dependent epigenetic mechanism [J]. Sci Adv, 2018, 4(6): eaar5598. DOI: 10.1126/sciadv.aar5598.

(收稿:2024-11-18;修回:2025-03-04)
(编辑 刘秋池)