三级淋巴器官(TLO)诱导形成及其在 抗肿瘤免疫中的功能研究^{*}

陈 红^{1,2}, 胡 翔¹, 张惠媛^{1,2}, 胡洪波^{1,2△}

1.四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室(成都 610041); 2.四川大学华西医院免疫和血液研究中心(成都 610041)

【摘要】目的 在体外诱导形成三级淋巴器官(tertiary lymphoid organs, TLO), 并评价其在抗肿瘤免疫中的功能。 方法 利用慢病毒系统在NIH3T3细胞上过表达淋巴毒素-β受体(lymphotoxin-beta receptor, LTβR), 并检测LTβR-NIH3T3细胞中LTβR的过表达效率; 通过免疫印迹实验和qPCR探究过表达LTβR的NIH3T3细胞内非经典核因子(nuclear factor, NF)-κB信号通路的情况。构建B16-OVA黑色素瘤小鼠荷瘤模型, 探究LTβR-NIH3T3细胞诱导TLO形成的能力及抗 肿瘤效果。结果 利用慢病毒感染在NIH3T3细胞中过表达LTβR, 流式检测发现GFP⁺细胞比例达99%。过表达LTβR能 在NIH3T3细胞内激活非经典NF-κB信号通路。小鼠肿瘤模型结果表明, 注射LTβR-NIH3T3细胞能在肿瘤附近诱导形成淋 巴样组织, 并促进了T细胞和MHC II⁺巨噬细胞的浸润, 明显抑制荷瘤小鼠的肿瘤生长, 并延长小鼠生存期。结论 LTβR-NIH3T3细胞通过诱导TLO的形成, 促进抗肿瘤免疫, 为肿瘤免疫治疗提供新的思路。

【关键词】 三级淋巴器官 抗肿瘤免疫 非经典NF-кB信号通路

Induction and Anti-Tumor Function of Tertiary Lymphoid Organs $CHEN Hong^{1,2}$, $HU Xiang^{1}$, $ZHANG Hui-yuan^{1,2}$, $HU Hong-bo^{1,2\Delta}$. 1. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Center for Immunology and Hematology Research, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China Δ Corresponding author, E-mail: hongbohu@scu.edu.cn

[Abstract] Objective To induce the development of tertiary lymphoid organs (TLO) in a mouse model of melanoma and to evaluate TLO's functions in antitumor immunity. **Methods** Lymphotoxin-beta receptor (LT β R) was overexpressed in NIH3T3 cells through the lentivirus system and the overexpression efficiency of LT β R in LT β R-NIH3T3 cells was examined. Western blot and qPCR were used to examine the non-canonical nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in NIH3T3 cells overexpressing LT β R. B16-OVA melanoma mouse model was constructed to explore the induction of TLO and anti-tumor functions of TLO in LT β R-NIH3T3 cells. **Results** LT β R was overexpressed in NIH3T3 cells through the lentivirus system, and flow cytometry showed that the proportion of GFP⁺ cells reached 99%. The overexpression of LT β R activated the non-canonical NF- κ B signaling pathway in NIH3T3 cells. Findings from the mouse tumor model suggest that the injection of LT β R-NIH3T3 cells successfully induced the development of lymphoid tissue around the tumor and enhanced the tumor infiltration of T cells and MHC II ⁺ macrophages, significantly inhibiting tumor growth and prolonging the survival of tumor-bearing mice. **Conclusion** LT β R-NIH3T3 cells promoted anti-tumor immunity by inducing TLO development, which may provide new perspectives for tumor immunotherapy.

[Key words] Tertiary lymphoid organs Anti-tumor immunity Non-canonical NF-κB signaling pathway

癌症是严重威胁人类健康的世界公共卫生问题之一。二级淋巴器官(secondary lymphoid organs, SLO)的发育起始于胚胎阶段,在出生后早期完成。临床上,在肿瘤基质、浸润边缘和/或核心中发现淋巴组织的增生,被称为三级淋巴器官(tertiary lymphoid organs, TLO)^[1-2]。 TLO是成体中出现的异位淋巴器官,通常发生于感染、器 官移植、自身免疫性疾病和肿瘤等慢性炎症条件下,其细 胞组成和功能与SLO相似^[3-4]。在发育机制上,非经典核 因子(nuclear factor, NF)-кB 信号通路是SLO与TLO形成 所必需的,该通路的激活依赖肿瘤坏死因子(tumornecrosis factor, TNF)超家族成员,如淋巴毒素-β受体 (lymphotoxin-beta receptor, LT β R)、淋巴毒素 (lymphotoxin, LT) α 1 β 2、LIGHT等^[5-6]。基质细胞分泌趋 化因子CXCL13,将淋巴组织诱导细胞(lymphoid tissue inducer, LTi)募集到炎症部位, LTi分泌LT α 1 β 2,与基质细 胞表面表达的LT β R相互作用,激活基质细胞产生血管内 皮生长因子,促进高内皮小静脉(high endothelial venules, HEVs)的发育,并上调黏附分子VCAM-1、ICAM-1 和 MAdCAM-1^[7-8]。LT β -LT β R和IL-17-IL17R联合作用,活化

^{*} 国家自然科学基金(No.82025002、No.81871232)和科技部重点研发专项(No. 2019YFA0110200)资助

[△] 通信作者, E-mail: hongbohu@scu.edu.cn

各种趋化因子和趋化因子配体的表达,如CXCL13(结合 CXCR5),CCL19和CCL21(结合CCR7)^[9-10]。这些趋化因 子从附近的HEVs募集更多的淋巴细胞,逐渐形成有序的 淋巴组织^[11]。TLO具有与适应性免疫反应的产生相关的 特征,包括T细胞区、B细胞区和HEVs^[12]。

在肺癌、结直肠癌、黑色素瘤和乳腺癌等多个不同 肿瘤类型中,均鉴定到TLO,多数情况下TLO的存在与良 好的预后相关,提示TLO可能具有诱导持久的抗肿瘤反 应的能力^[13-16]。目前已在多个课题组开发利用趋化因子、 细胞因子、抗体和抗原提呈细胞等诱导形成TLO,从而促 进淋巴细胞浸润,增强抗肿瘤免疫反应^[17-21]。本研究通过 在基质细胞中过表达LTβR诱导形成TLO,研究其形成的 分子机制并评价其抗肿瘤免疫效果。今后可结合免疫检 查点抑制剂,成为癌症治疗的有效途径。

1 材料和方法

1.1 实验质粒、细胞和实验动物

实验所用质粒pGFP-Myc空白质粒、CopGFP-MycmLtbr质粒、PsPAX2质粒和VSVg质粒均为本实验室构建 和保存。

实验所用小鼠胚胎成纤维细胞系NIH3T3和人胚肾 细胞系HEK293T来源于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)。小鼠黑色素瘤B16-OVA细胞由西南医院刘 新东教授惠赠。

实验所用小鼠为野生型C57B6小鼠,购自恩斯维尔生物科技有限公司。小鼠的饲养、管理和所有动物实验都按四川大学动物伦理管理委员会要求进行。

1.2 实验试剂

免疫印迹实验抗体p100/p52(美国Cell signaling Technology公司); LaminB(美国Santa cruz公司); βactin(美国SIGM公司); 羊抗鼠IgG-HRP和羊抗兔IgG-HRP(北京索莱宝公司); 流式抗体FITC-CD11c、PE-CD11b、PerCP-Cy5.5-Ly6C、PE-Cy7-Ly6G、APC-Cy7-CD45、Brilliant Violet 510-I-A/I-E、Pacific Blue-F4/80、 PE-Cy7-CD19、FITC-CD3、APC-CD4、Pacific Blue-CD8和Brilliant Violet 711-CD4(美国Biolegend公司); PE-Cy7-Foxp3(美国ebioscience公司); DMEM高糖培养基和 RPMI-1640培养基(美国HyClone公司); 青霉素/链霉素 (Corning)。

1.3 主要仪器

PCR仪(美国Eppendorf公司);荧光定量PCR仪、蛋白 电泳仪、蛋白质电泳系统和酶标仪(美国Bio-Rad公司); 流式细胞分析仪(美国BD公司);电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo公司);水浴超声仪(昆山超声仪器厂);恒 温水浴箱(美国PolyScience公司);超纯水系统(美国 Millipore公司);恒温摇床(ZHCHENG);小型高速离心机 (德国Sorvall PICO公司);小型低温高速离心机(德国 Sorvall FRESCO公司);低速离心机(德国Heraeus Megafuge公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 NIH3T3细胞过表达LTβR及验证 将CopGFP-Myc-mLtbr质粒、PsPAX2质粒和VSVg质粒通过磷酸钙法 转染HEK293T细胞,转染后8~12 h换新鲜含1%青霉素/ 链霉素和10%胎牛血清的高糖DMEM完全培养基,培养 36 h后收集病毒上清。提前1 d将NIH3T3细胞铺于6孔板 中,铺板细胞数为每孔1×10⁶。吸走6孔板中的培养基,加 入1 mL病毒上清,2000×g,30 ℃离心60 min。离心结束, 放入37 ℃细胞孵箱。6 h后换液,继续培养40 h后,消化感 染后的NIH3T3细胞,进行流式分析检测感染效率(用BD FACSAria III 分选高表达GFP的细胞)。为进一步得到 LTβR-NIH3T3稳定表达细胞系,利用流式分选出高表达 LTβR的LTβR-NIH3T3细胞,通过qPCR进一步鉴定流式 分选前后Ltbr的表达水平。以转染pGFP-Myc空白质粒的 NIH3T3细胞(Vector-NIH3T3)作为对照。

1.4.2 Western blot检测LTβR-NIH3T3细胞非经典NFκB通路 将未转染的NIH3T3细胞、Vector-NIH3T3细胞 和LTβR-NIH3T3细胞裂解后,提取胞浆蛋白和核蛋白, BCA法测定蛋白浓度。免疫印迹实验检测细胞质P100加 工以及P52/RelB入核情况。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋 白,转膜后牛奶封闭1h,4℃孵育一抗α-P100、α-P52、α-RelB、LaminB和β-actin过夜,洗膜,室温孵育二抗1h,曝 光。以目的蛋白与内参蛋白光密度值的比值作为目的蛋 白的相对表达量。

1.4.3 qPCR检测LTβR-NIH3T3细胞非经典NF-κB通路 提前1d将Vector-NIH3T3和LTβR-NIH3T3细胞铺于6孔 板中,细胞数为每孔1×10⁶。分别设不处理(Control)组和 anti-LTβR激活型抗体刺激24 h组,收集细胞Trizol裂解, 酚氯仿提取RNA逆转录为cDNA, qPCR检测基因*Ccl*19、 *Ccl*21、*Madcam*1、*Icam*1、*Vcam*1的mRNA表达水平,188 为内参基因。基因引物序列见表1。反应条件为:预变性 95 ℃ 5 min;变性95 ℃ 15 s,退火59 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 30 s;循环35次。结果用2^{-ΔΔC}法计算mRNA的相对表达量。 1.4.4 小鼠黑色素瘤模型建立和检测 SPF级的C57B6小 鼠养至6~8周,打耳钉标记并剃毛。胰酶消化B16-OVA 细胞,用PBS重悬至浓度为1×10⁷ mL⁻¹,吹匀后用胰岛素针 吸取100 μL细胞悬液注射至小鼠裸露皮下。接瘤后第

Table 1 Sequences and rength of queek primers				
	Gene	Forward $(5' \Rightarrow 3')$	Reverse (5'→3')	Length/bp
	Ltbr	CATGCTAGCATGCGCCTGCCCCGGGCCTC	TGAGCGGCCGCTCAGAGGTCTTGGCATCCTAGTG	212
	Ccl19	GAAAGCCTTCCGCTACCTTC	GAGGTGCACAGAGCTGATAG	92
	Ccl21	TCCGAGGCTATAGGAAGCAA	CTTCCTCAGGGTTTGCACAT	108
	Madcam1	GAGCAAGAAGAGGAGATACAAGAG	TGGTGACCTGGCAGTGAAG	117
	Icam1	GTGCTTTGAGAACTGTGGCA	GGTCCTTGCCTACTTGCTG	119
	Vcam1	GGAAGCTGGAACGAAGTATCC	AAACACTTGACCGTGACCG	109
	18S	ACAGGGAGAAAGCGCAAAAC	TGTGGCCTTGTGGTGAAGAG	237

表 1 qPCR引物序列及长度 Table 1 Sequences and length of qPCR primers

9天,将荷瘤小鼠随机分为两组:Vector-NIH3T3组(n= 11), LTβR-NIH3T3组(n=15)。分别消化Vector-NIH3T3 和LTβR-NIH3T3细胞,同样重悬至浓度为1×10⁷ mL⁻¹,在 小鼠大腿后侧皮肤进行皮下注射。接瘤后第10天开始, 每两天记录小鼠肿瘤体积及存活情况,小鼠肿瘤体积计 算方法为V=0.5×a×b²(a为最长径,b为最短径),并绘制肿 瘤生长曲线。接瘤后第21天,处死荷瘤小鼠,剖离小鼠肿 瘤并测量肿瘤质量,分别取Vector-NIH3T3(Vec)组和 LTβR-NIH3T3(LTβR)组的部分肿瘤加入体积分数为4% 多聚甲醛固定用于病理切片和HE染色,其余肿瘤剪碎, 加入终质量浓度为1 mg/mL的胶原酶Ⅳ和100 μg/mL的 DNase I 消化肿瘤, 37 ℃摇晃孵育30 min, 进行流式染 色,分析肿瘤浸润淋巴细胞。同时绘制小鼠生存曲线,此 为独立实验,从小鼠接瘤后第10天开始记录小鼠存活情 况直至其死亡,但若肿瘤体积超过2 000 mm³,按动物伦 理要求小鼠将被处死,在生存曲线上记录为死亡。

1.5 统计学方法

两个样本间比较采用双侧未配对t检验;多个样本间

比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);多组间比 较采用多因素方差(Two-way ANOVA)分析;Kaplan-Meier生存曲线分析采用log-rank检验。P<0.05为差异有 统计学意义。

2 结果

2.1 构建LTβR-NIH3T3细胞系

利用慢病毒感染,在NIH3T3细胞中过表达LTβR,流 式检测发现GFP⁺细胞比例达99%,转染效率高;LTβR-NIH3T3细胞相较于Vector-NIH3T3细胞,LTβR⁺细胞比例 增加至近70%(图1A)。同时,qPCR进一步证明,流式分 选能提高LTβR-NIH3T3细胞中过表达*Ltbr*水平(图1B), 上述结果均表明过表达LTβR的NIH3T3细胞构建成功。 2.2 过表达LTβR对NIH3T3细胞非经典NF-κB通路的激

活作用 Western blot结果显示,相较于NIH3T3细胞和

Vector-NIH3T3细胞, 过表达 LTβR的NIH3T3细胞胞质内 P100减少, 细胞核内P52和RelB增加(图2)。qPCR结果显



Fig 1 Examination of LTBR overexpression in LTBR-NIH3T3 cells

A: Flow cytometry analysis of the expression of LTBR in Vector-NIH3T3 and LTBR-NIH3T3 cells; B: qPCR analysis of the expression of *Ltbr* in Vector-NIH3T3 and LTBR-NIH3T3 cells including before and after sorting. ****P<0.000 1, n=3.

38





The relative molecular mass goes from top to bottom: 100×10^3 , 44×10^3 , 52×10^3 , 70×10^3 , 68×10^3 .

示,在未处理和anti-LTβR激活型抗体刺激24 h这两种条件下,与Vector-NIH3T3细胞相比,LTβR-NIH3T3细胞中趋化因子*Ccl*19、*Ccl*21的表达量均提高,差异有统计学意义(P<0.05),黏附因子*Madcam*1、*Icam*1和V*cam*1的表达量亦增加(图3)。与未处理相比,anti-LTβR激活型抗体刺激24 h后,LTβR-NIH3T3细胞中*Ccl*19、*Ccl*21的表达增加,其中*Ccl*21的差异有统计学意义(*P*<0.05),黏附因子*Madcam*1、*Icam*1和V*cam*1的表达量增加,差异有统计学意义(*P*<0.05)。说明在过表达LTβR的NIH3T3细胞中,非

经典NF-κB信号通路被明显激活。

2.3 LTβR-NIH3T3细胞的抗肿瘤效果

与Vector-NIH3T3治疗组相比,皮下注射LTβR-NIH3T3细胞后有效抑制黑色素瘤增长,肿瘤体积更小, 肿瘤质量更轻,荷瘤小鼠生存期延长,差异均有统计学意 义(P<0.05,图4A~4C)。同时,LTβR-NIH3T3细胞治疗 小鼠的肿瘤附近出现淋巴样组织,且肿瘤切片显示肿瘤 炎性细胞浸润增加,说明TLO在肿瘤附近诱导成功(图4D)。 2.4 LTβR-NIH3T3细胞对免疫细胞浸润至肿瘤的促进 作用

流式染色结果显示(图5),注射LTβR-NIH3T3细胞治 疗后肿瘤免疫微环境中CD45⁺细胞浸润增加,其中 CD3⁺T淋巴细胞(包括CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞)和 CD11b⁺Ly6CLy6G巨噬细胞占活细胞的比例和单位体积 (每mm³肿瘤)中的细胞绝对数量均增加,提示LTβR-NIH3T3治疗的小鼠体内有更强的抗肿瘤免疫反应。

2.5 LTβR-NIH3T3细胞对巨噬细胞向MHC || ⁺促炎表型 极化的促进作用

进一步分析LTβR-NIH3T3细胞治疗后肿瘤浸润的巨 噬细胞发现, MHC II ⁺F4/80⁻巨噬细胞比例增加, 单位体 积(每mm³肿瘤)中的细胞绝对数量显著增加, MHC II ⁻ F4/80⁺巨噬细胞比例和单位体积(每mm³肿瘤)中的细胞 绝对数量均无明显变化(图6A, 6B); MHC II ⁺/(F4/80⁺)比 例增加(图6C), 提示LTβR-NIH3T3细胞通过促进巨噬细 胞向MHC II ⁺促炎表型极化, 在肿瘤微环境中增强抗原递 呈, 从而抑制肿瘤生长。





Fig 3 qPCR was done to examine the activation of non-canonical NF-κB pathway in LTβR-NIH3T3 cells

*P<0.05,**P<0.01, ***P<0.001. Vec: Vector-NIH3T3 cells; LTβR: LTβR-NIH3T3 cells. n=3.



图 4 LTβR-NIH3T3细胞的抗肿瘤效果评价

Fig 4 Evaluation of antitumor function of LT βR -NIH3T3 cells

A: Measurement of tumor size (Vec: *n*=11; LTβR: *n*=15); B: The tumor was weighted at 21 d after tumor stripping (Vec: *n*=11; LTβR: *n*=15); C: The tumor growth curves (Vec: *n*=11; LTβR: *n*=15); D: HE staining of tumor microenvironment (white triangles show lymphoid-like tissue). Vec: Vector-NIH3T3 cells; LTβR: LTβR: LTβR: NIH3T3 cells; ** *P*<0.01, Vec vs. LTβR.



图 5 LTβR-NIH3T3细胞影响肿瘤浸润免疫细胞类型

Fig 5 Composition of tumor infiltrating immune cells affected by $LT\beta R$ -NIH3T3 cells

A: Flow cytometry analysis of tumor infiltrating immune cells; B: Proportion of live cells; C: Total cell number/mm³ tumor. **P*<0.05, ***P*<0.01. Vec: Vector-NIH3T3 cells (*n*=11); LTβR: LTβR-NIH3T3 cells (*n*=15).



A: Flow cytometry analysis of MHCII⁺F4/80⁻ macrophages and MHC II $^{-}$ F4/80⁺ macrophages; Ba, Bb, Bc, Bd: Proportion and total cell number/mm³ tumor of MHC II $^{+}$ F4/80⁻ macrophages and MHC II $^{-}$ F4/80⁺ macrophages; C: Ratio of MHC II $^{+}$ (F4/80⁺). * *P*<0.05, ***P*<0.01. Vec: Vector-NIH3T3 cells (*n*=11); LT β R: LT β R-NIH3T3 cells (*n*=15).

3 讨论

基因突变的积累导致肿瘤抗原的表达,触发机体的 固有免疫和适应性免疫^[22]。针对肿瘤的适应性免疫通常 发生在SLO中,肿瘤部位的DC细胞摄取肿瘤抗原后迁移 到SLO,递呈给T细胞,引起T细胞增殖和分化为多种效应 和记忆细胞类型,迁移至肿瘤部位发挥作用^[23]。在多个 肿瘤类型中,易位淋巴器官TLO的发现,补充了人们对于 抗肿瘤适应性免疫的认识^[12,16,24-25]。

TLO出现在非淋巴部位,其产生和维持依赖持续感 染或慢性炎症环境^[3]。LTβR是TNF超家族的成员之一, LTβR介导的非经典NF-κB信号通路在TLO的形成过程中 发挥关键作用^[26-27]。非经典NF-κB信号通路的中心事件是 P100加工,P100是P52的前体,激活非经典NF-κB信号通 路后,P100加工成P52并释放RelB,形成P52/RelB异二聚 体,进入细胞核内调控靶基因转录,引起下游趋化因子的 表达^[5,27]。这些趋化因子参与淋巴细胞的招募、迁移和归 巢^[8,11]。同时,TLO高表达多个趋化因子(CCL19,CCL21, CXCL12,CXCL13等),提示这些趋化因子可作为鉴定肿 瘤部位是否存在TLO的标记物^[24,28-29]。本研究在过表达 LTβR的NIH3T3细胞中观察到胞质中P100减少, P52/RelB入核增加;无论有无激活型抗体刺激,下游趋化 因子(*Ccl*19,*Ccl*21)和黏附因子(*Madcam*1,*Icam*1,*Vcam*1) 的表达在mRNA水平显著增加,说明LTβR-NIH3T3细胞 中非经典NF-κB信号通路被激活,具有诱导形成TLO的 潜能。

通过在肿瘤附近诱导TLO的形成,有助于募集各种 免疫细胞发挥局部的抗肿瘤免疫反应。为研究LTBR-NIH3T3细胞是否能够在肿瘤附近诱导TLO的形成,我们 构建了黑色素瘤小鼠模型,相较于Vector-NIH3T3细胞 组,LTβR-NIH3T3细胞治疗后,荷瘤小鼠肿瘤体积更小, 生存期延长,肿瘤附近出现淋巴样结构。HE染色显示肿 瘤微环境中免疫细胞浸润增加,流式细胞术对这些免疫 细胞类型进一步分析,T细胞和巨噬细胞占活细胞比例和 单位体积(每mm³肿瘤)中的细胞绝对数量增加。巨噬细 胞是一类高度可塑性的细胞,能够响应各种微环境信号, 极化为具有不同特性和功能的异质性群体[30]。其中, MHCⅡ⁺巨噬细胞发挥高抗原递呈作用,在肿瘤治疗中与 良好的预后相关^[31]。而F4/80⁺巨噬细胞则支持血管生成 以及表达免疫抑制分子,如程序性死亡配体1和转化生长 因子β等,促进肿瘤生长^[32-33]。本研究结果显示,LTβR-NIH3T3细胞处理后,作用于抗肿瘤的MHCⅡ+F4/80-巨噬 细胞比例增加, MHCⅡ*/(F4/80*)比例升高。上述结果表 明LTBR-NIH3T3细胞成功在黑色素瘤小鼠的肿瘤部位诱 导形成TLO,并促进了免疫细胞向肿瘤部位浸润。LTβR-NIH3T3细胞通过促进巨噬细胞向MHCII*促炎表型极 化,增强肿瘤抗原的递呈,促进T细胞的抗原特异性活化, 发挥杀伤癌细胞作用。此外,促炎表型巨噬细胞已被证 实具有在病理情况下替代LTi细胞诱导TLO形成的能力^[34]。通过将巨噬细胞重新极化为促炎表型或抑制肿瘤 相关巨噬细胞的存活、增殖、转移等策略的药物开发已 经应用于肿瘤治疗中^[32]。

在肿瘤微环境持续的抗原暴露和/或炎症刺激下, CD8 T细胞被激活形成CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞,是清 除癌细胞最有力的免疫细胞类型。CD8⁺T细胞的肿瘤浸 润程度是免疫检查点阻断治疗结果的预测标志物。接下 来,我们将联合抗程序性细胞死亡蛋白1治疗,验证 TLO的形成能否影响肿瘤浸润免疫细胞尤其是耗竭T细 胞的命运从而促进抗肿瘤免疫。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- DIEU-NOSJEAN M C, GIRALDO N A, KAPLON H, et al. Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. Immunol Rev, 2016, 271(1): 260–275.
- [2] SAUTES-FRIDMAN C, LAWAND M, GIRALDO N A, et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: Prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention. Front Immunol, 2016, 7: 407[2021-08-11]. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00407.
- [3] DOMBLIDES C, ROCHEFORT J, RIFFARD C, et al. Tumor-associated tertiary lymphoid structures: from basic and clinical knowledge to therapeutic manipulation. Front Immunol, 2021, 12: 698604[2021-09-14]. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.698604.
- [4] GAGO DA GRACA C, VAN BAARSEN L G M, MEBIUS R E. Tertiary lymphoid structures: Diversity in their development, composition, and role. J Immunol, 2021, 206(2): 273–281.
- [5] SUN S C. The non-canonical NF-kappaB pathway in immunity and inflammation. Nat Rev Immunol, 2017, 17(9): 545–558.
- [6] TANG H, ZHU M, QIAO J, et al. Lymphotoxin signalling in tertiary lymphoid structures and immunotherapy. Cell Mol Immunol, 2017, 14(10): 809–818.
- [7] KRISHNAMURTY A T, TURLEY S J. Lymph node stromal cells: Cartographers of the immune system. Nat Immunol, 2020, 21(4): 369–380.
- [8] DENTON A E, INNOCENTIN S, CARR E J, et al. Type I interferon induces CXCL13 to support ectopic germinal center formation. J Exp Med, 2019, 216(3): 621–637.
- [9] SAUTES-FRIDMAN C, PETITPREZ F, CALDERARO J, et al. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer, 2019, 19(6): 307–325.
- [10] LUO R, CHENG Y, CHANG D, et al. Tertiary lymphoid organs are associated with the progression of kidney damage and regulated by interleukin-17A. Theranostics, 2021, 11(1): 117–131.

- [11] NERVIANI A, PITZALIS C. Role of chemokines in ectopic lymphoid structures formation in autoimmunity and cancer. J Leukoc Biol, 2018, 104(2): 333–341.
- [12] RODRIGUEZ A B, ENGELHARD V H. Insights into tumor-associated tertiary lymphoid structures: Novel targets for antitumor immunity and cancer immunotherapy. Cancer Immunol Res, 2020, 8(11): 1338–1345.
- [13] WIRSING A M, ERVIK I K, SEPPOLA M, et al. Presence of highendothelial venules correlates with a favorable immune microenvironment in oral squamous cell carcinoma. Mod Pathol, 2018, 31(6): 910–922.
- [14] SAVAS P, SALGADO R, DENKERT C, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. Nat Rev Clin Oncol, 2016, 13(4): 228–241.
- [15] POSCH F, SILINA K, LEIBL S, et al. Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. Oncoimmunology, 2018, 7(2): e1378844[2021-09-12].https:// doi.org/10.1080/2162402X.2017.1378844.
- [16] CABRITA R, LAUSS M, SANNA A, *et al.* Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. Nature, 2020, 577(7791): 561–565.
- [17] JOHANSSON-PERCIVAL A, HE B, LI Z J, et al. De novo induction of intratumoral lymphoid structures and vessel normalization enhances immunotherapy in resistant tumors. Nat Immunol, 2017, 18(11): 1207–1217.
- [18] WEIDEN J, TEL J, FIGDOR C G. Synthetic immune niches for cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol, 2018, 18(3): 212–219.
- [19] WEINSTEIN A M, CHEN L, BRZANA E A, et al. Tbet and IL-36gamma cooperate in therapeutic DC-mediated promotion of ectopic lymphoid organogenesis in the tumor microenvironment. Oncoimmunology, 2017, 6(6): e1322238[2021-09-17]. https://doi. org/10.1080/2162402X.2017.1322238.
- [20] ZHU G, FALAHAT R, WANG K, et al. Tumor-associated tertiary lymphoid structures: Gene-expression profiling and their bioengineering. Front Immunol, 2017, 8: 767[2021-07-15]. https://doi.org/10.3389/ fimmu.2017.00767.
- [21] ZHU G, NEMOTO S, MAILLOUX A W, et al. Induction of tertiary lymphoid structures with antitumor function by a lymph node-derived stromal cell line. Front Immunol, 2018, 9: 1609[2021-08-24]. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01609.
- [22] ANDO M, ITO M, SRIRAT T, et al. Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity. Immunol Med, 2020, 43(1): 1–9.
- [23] FARHOOD B, NAJAFI M, MORTEZAEE K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8509–8521.
- [24] LIN Z, HUANG L, LI S, et al. Pan-cancer analysis of genomic properties and clinical outcome associated with tumor tertiary lymphoid structure. Sci Rep, 2020, 10(1): 21530.
- [25] HELMINK B A, REDDY S M, GAO J, et al. B cells and tertiary

lymphoid structures promote immunotherapy response. Nature, 2020, 577(7791): 549–555.

- [26] PIAO W, KASINATH V, SAXENA V, et al. LTbetaR signaling controls lymphatic migration of immune cells. Cells, 2021, 10(4): 747.
- [27] YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 209.
- [28] PRABHAKARAN S, RIZK V T, MA Z, et al. Evaluation of invasive breast cancer samples using a 12-chemokine gene expression score: Correlation with clinical outcomes. Breast Cancer Res, 2017, 19(1): 71.
- [29] DIEU-NOSJEAN M C. Tumor-associated tertiary lymphoid structures: A cancer biomarker and a target for next-generation immunotherapy. Adv Exp Med Biol, 2021, 1329: 51–68.
- [30] NAJAFI M, HASHEMI GORADEL N, FARHOOD B, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 2756–2765.

- [31] XU M, LIU M, DU X, et al. Intratumoral delivery of IL-21 overcomes anti-Her2/Neu resistance through shifting tumor-associated macrophages from M2 to M1 phenotype. J Immunol, 2015, 194(10): 4997–5006.
- [32] PATHRIA P, LOUIS T L, VARNER J A. Targeting tumor-associated macrophages in cancer. Trends Immunol, 2019, 40(4): 310–327.
- [33] PETRILLO M, ZANNONI G F, MARTINELLI E, et al. Polarisation of tumor-associated macrophages toward M2 phenotype correlates with poor response to chemoradiation and reduced survival in patients with locally advanced cervical cancer. PLoS One, 2015, 10(9): e0136654[2021-08-29]. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136654.
- [34] GUEDJ K, KHALLOU-LASCHET J, CLEMENT M, et al. M1 macrophages act as LTbetaR-independent lymphoid tissue inducer cells during atherosclerosis-related lymphoid neogenesis. Cardiovasc Res, 2014, 101(3): 434–443.

(2021 - 09 - 26收稿, 2021 - 12 - 09修回) 编辑 余 琳