

## 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<sup>1,2</sup>, 胡翔<sup>1</sup>, 张惠媛<sup>1,2</sup>, 胡洪波<sup>1,2△</sup>

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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-κB信号通路

**Induction and Anti-Tumor Function of Tertiary Lymphoid Organs** CHEN Hong<sup>1,2</sup>, HU Xiang<sup>1</sup>, ZHANG Hui-yuan<sup>1,2</sup>, HU Hong-bo<sup>1,2△</sup>. 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  
△ 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 (LTβR) was overexpressed in NIH3T3 cells through the lentivirus system and the overexpression efficiency of LTβR in LTβR-NIH3T3 cells was examined. Western blot and qPCR were used to examine the non-canonical nuclear factor (NF)-κB signaling pathway in NIH3T3 cells overexpressing LTβR. B16-OVA melanoma mouse model was constructed to explore the induction of TLO and anti-tumor functions of TLO in LTβR-NIH3T3 cells. **Results** LTβR was overexpressed in NIH3T3 cells through the lentivirus system, and flow cytometry showed that the proportion of GFP<sup>+</sup> cells reached 99%. The overexpression of LTβR activated the non-canonical NF-κB signaling pathway in NIH3T3 cells. Findings from the mouse tumor model suggest that the injection of LTβR-NIH3T3 cells successfully induced the development of lymphoid tissue around the tumor and enhanced the tumor infiltration of T cells and MHC II<sup>+</sup> macrophages, significantly inhibiting tumor growth and prolonging the survival of tumor-bearing mice. **Conclusion** LTβR-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)<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3-4]</sup>。在发育机制上, 非经典核

因子(nuclear factor, NF)-κB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(tumor-necrosis factor, TNF)超家族成员, 如淋巴毒素-β受体(lymphotoxin-beta receptor, LTβR)、淋巴毒素(lymphotoxin, LT)α1β2、LIGHT等<sup>[5-6]</sup>。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LTα1β2, 与基质细胞表面表达的LTβR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<sup>[7-8]</sup>。LTβ-LTβR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)<sup>[9-10]</sup>。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<sup>[11]</sup>。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<sup>[12]</sup>。

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<sup>[13-16]</sup>。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<sup>[17-21]</sup>。本研究通过在基质细胞中过表达LT $\beta$ R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-Myc-m*Ltbr*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); $\beta$ -actin(美国SIGMA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LT $\beta$ R及验证** 将CopGFP-Myc-m*Ltbr*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 $1 \times 10^6$ 。吸走6孔板中的培养基,加入1 mL病毒上清,2 000 $\times$ g,30  $^{\circ}$ C离心60 min。离心结束,放入37  $^{\circ}$ C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LT $\beta$ R-NIH3T3稳定表达细胞系,利用流式分选出高表达LT $\beta$ R的LT $\beta$ R-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LT $\beta$ R-NIH3T3细胞非经典NF- $\kappa$ B通路** 将未转染的NIH3T3细胞、Vector-NIH3T3细胞和LT $\beta$ R-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1 h,4  $^{\circ}$ C孵育一抗 $\alpha$ -P100、 $\alpha$ -P52、 $\alpha$ -RelB、LaminB和 $\beta$ -actin过夜,洗膜,室温孵育二抗1 h,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LT $\beta$ R-NIH3T3细胞非经典NF- $\kappa$ B通路** 提前1 d将Vector-NIH3T3和LT $\beta$ R-NIH3T3细胞铺于6孔板中,细胞数为每孔 $1 \times 10^6$ 。分别设不处理(Control)组和anti-LT $\beta$ R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*Ccl19*、*Ccl21*、*Madcam1*、*Icam1*、*Vcam1*的mRNA表达水平,18S为内参基因。基因引物序列见表1。反应条件为:预变性95  $^{\circ}$ C 5 min;变性95  $^{\circ}$ C 15 s,退火59  $^{\circ}$ C 30 s,延伸72  $^{\circ}$ C 30 s;循环35次。结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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 $1 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup>,吹匀后用胰岛素针吸取100  $\mu$ L细胞悬液注射至小鼠裸露皮下。接瘤后第

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

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Length/bp
<i>Ltbr</i>	CATGCTAGCATGCGCCTGCCCGGGCCTC	TGAGCGGCCGCTCAGAGGTCTTGGCATCCTAGTG	212
<i>Ccl19</i>	GAAAGCCTTCCGCTACCTTC	GAGGTGCACAGAGCTGATAG	92
<i>Ccl21</i>	TCCGAGGCTATAGGAAGCAA	CTTCCTCAGGGTTGCACAT	108
<i>Madcam1</i>	GAGCAAGAAGAGGAGATACAAGAG	TGGTGACCTGGCAGTGAAG	117
<i>Icam1</i>	GTGCTTTGAGAACTGTGGCA	GGTCCTTGCTACTTGCTG	119
<i>Vcam1</i>	GGAAGCTGGAACGAAGTATCC	AAACACTTGACCGTGACCG	109
18S	ACAGGGAGAAAGCGCAAAAC	TGTGGCCTTGTGGTGAAGAG	237

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 $1 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ , 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 $V=0.5 \times a \times b^2$  ( $a$ 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 °C 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 mm<sup>3</sup>, 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<sup>+</sup>细胞比例达99%, 转染效率高; LTβR-NIH3T3细胞相较于Vector-NIH3T3细胞, LTβR<sup>+</sup>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

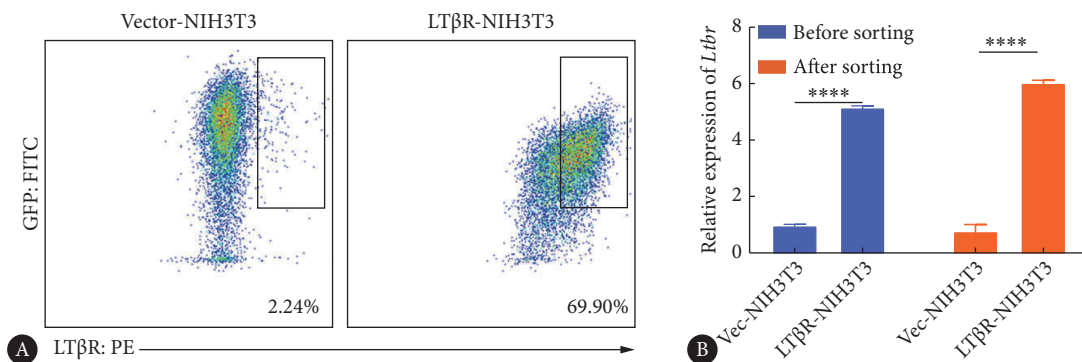


图 1 检测LTβR-NIH3T3细胞中LTβR的过表达效率

Fig 1 Examination of LTβR overexpression in LTβR-NIH3T3 cells

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

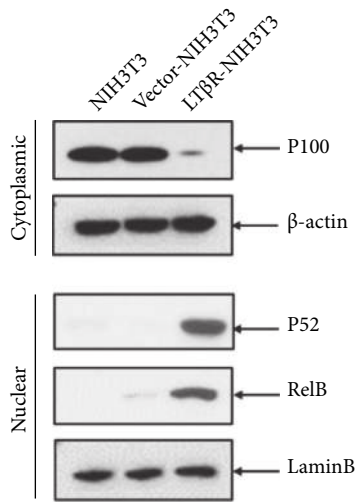


图 2 Western blot检测非经典NF-κB通路在LTβR-NIH3T3细胞中的激活  
Fig 2 Western blot was used to examine the activation of non-canonical NF-κB pathway in LTβR-NIH3T3 cells.

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

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*Ccl19*、*Ccl21*的表达量均提高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),黏附因子*Madcam1*、*Icam1*和*Vcam1*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*Ccl19*、*Ccl21*的表达增加,其中*Ccl21*的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),黏附因子*Madcam1*、*Icam1*和*Vcam1*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症细胞浸润增加,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<sup>+</sup>细胞浸润增加,其中CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞(包括CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞)和CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>巨噬细胞占活细胞的比例和单位体积(每mm<sup>3</sup>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 II<sup>+</sup>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<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>巨噬细胞比例增加,单位体积(每mm<sup>3</sup>肿瘤)中的细胞绝对数量显著增加,MHC II<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>巨噬细胞比例和单位体积(每mm<sup>3</sup>肿瘤)中的细胞绝对数量均无明显变化(图6A,6B);MHC II<sup>+</sup>(F4/80<sup>+</sup>)比例增加(图6C),提示LTβR-NIH3T3细胞通过促进巨噬细胞向MHC II<sup>+</sup>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。

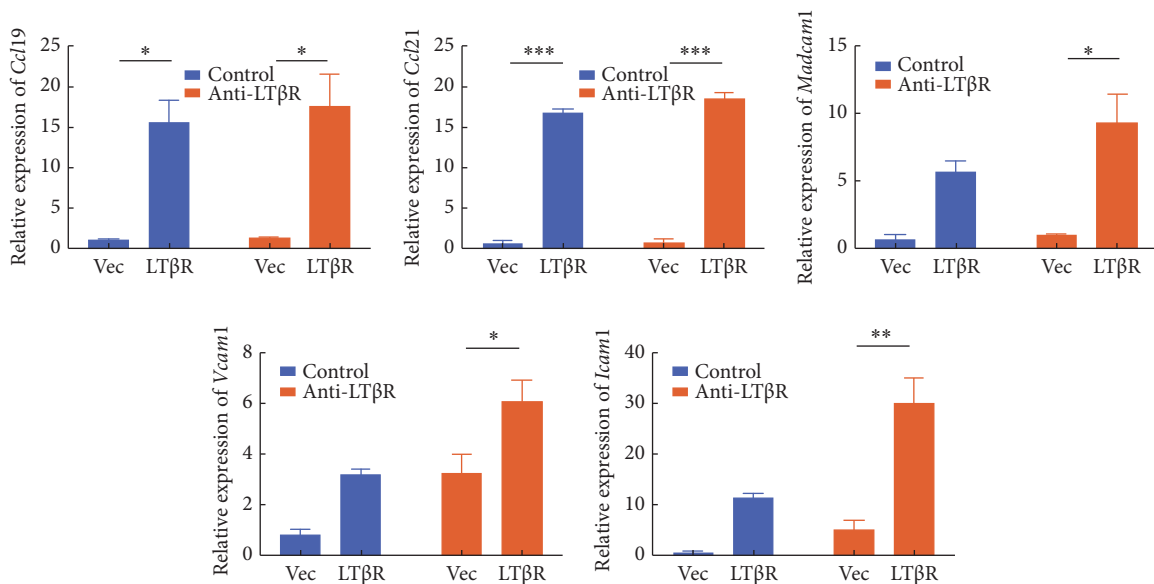


图 3 qPCR检测非经典NF-κB通路在LTβR-NIH3T3细胞中的激活

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.  $n = 3$ .

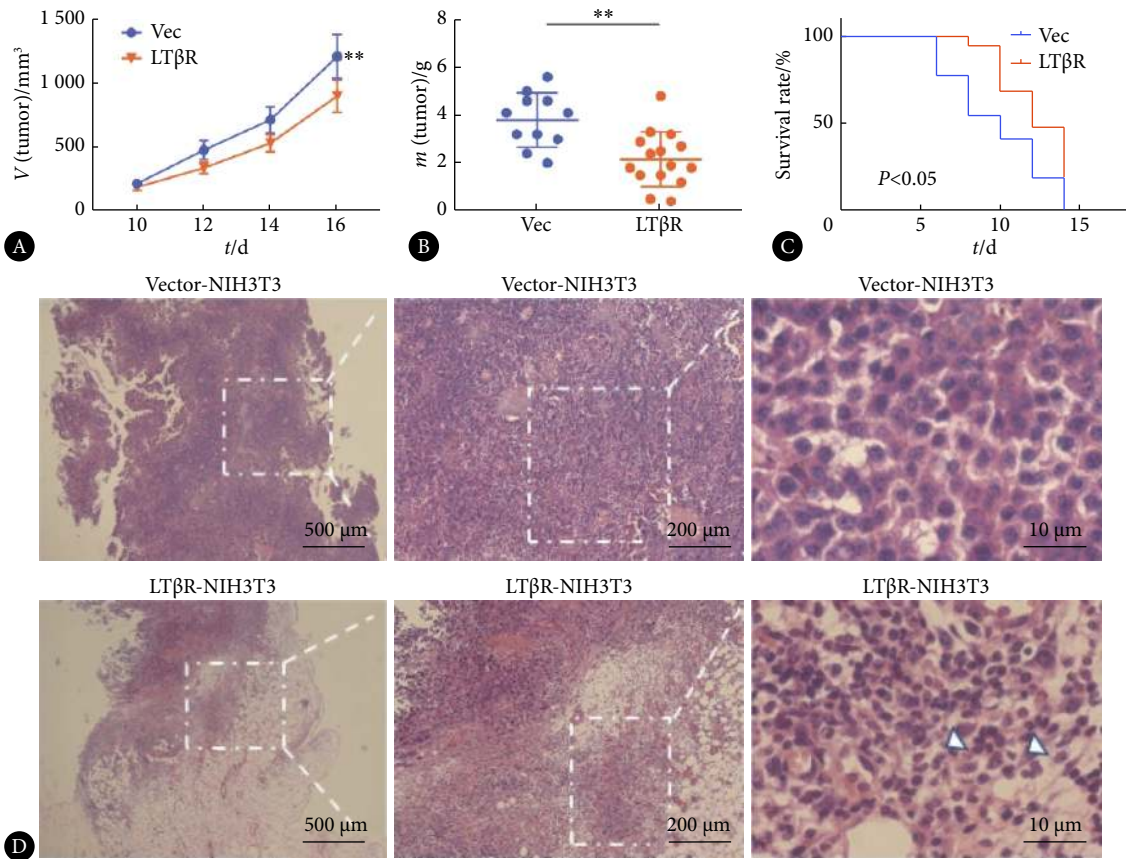


图 4 LTβR-NIH3T3细胞的抗肿瘤效果评价

Fig 4 Evaluation of antitumor function of LTβR-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-NIH3T3 cells; \*\* P<0.01, Vec vs. LTβR.

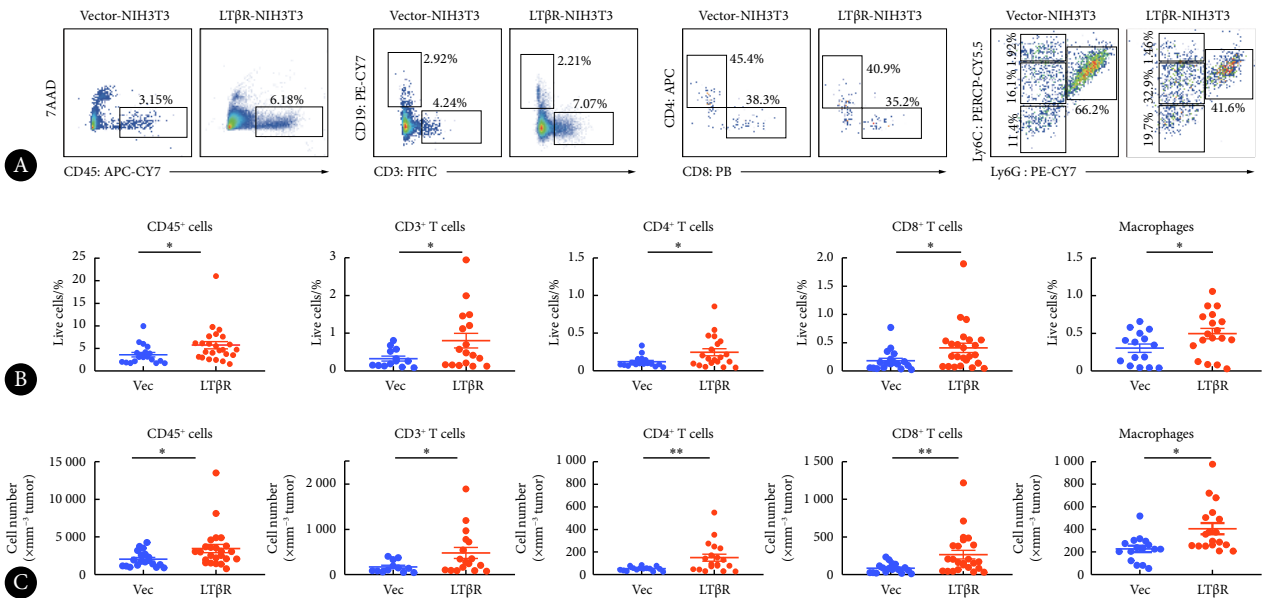


图 5 LTβR-NIH3T3细胞影响肿瘤浸润免疫细胞类型

Fig 5 Composition of tumor infiltrating immune cells affected by LTβR-NIH3T3 cells

A: Flow cytometry analysis of tumor infiltrating immune cells; B: Proportion of live cells; C: Total cell number/mm<sup>3</sup> tumor. \*P<0.05, \*\*P<0.01. Vec: Vector-NIH3T3 cells (n=11); LTβR: LTβR-NIH3T3 cells (n=15).

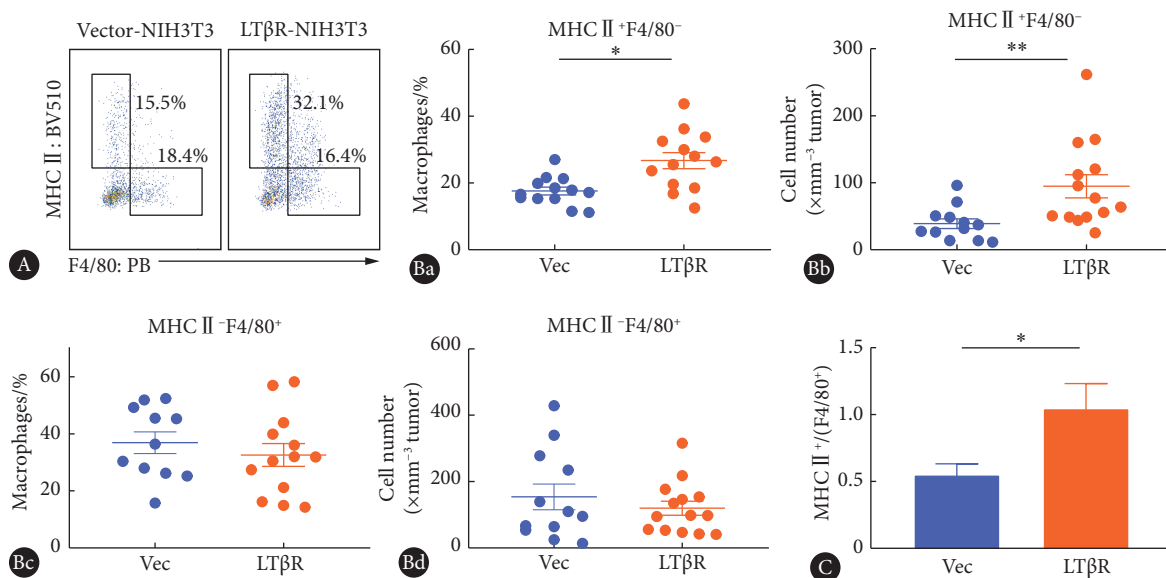


图 6 LTβR-NIH3T3细胞影响肿瘤巨噬细胞类型

Fig 6 The effect of LTβR-NIH3T3 cells on macrophages in tumors

A: Flow cytometry analysis of MHCII<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> macrophages and MHC II<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup> macrophages; Ba, Bb, Bc, Bd: Proportion and total cell number/mm<sup>3</sup> tumor of MHC II<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> macrophages and MHC II<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup> macrophages; C: Ratio of MHC II<sup>+</sup>/(F4/80<sup>+</sup>). \**P*<0.05, \*\**P*<0.01. Vec: Vector-NIH3T3 cells (*n*=11); LTβR: LTβR-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<sup>[22]</sup>。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<sup>[23]</sup>。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<sup>[12, 16, 24-25]</sup>。

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<sup>[3]</sup>。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<sup>[26-27]</sup>。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<sup>[5, 27]</sup>。这些趋化因子参与淋巴细胞的招募、迁移和归巢<sup>[8, 11]</sup>。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<sup>[24, 28-29]</sup>。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(*Ccl19*, *Ccl21*)和黏附因子(*Madcam1*, *Icam1*, *Vcam1*)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LTβR-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mm<sup>3</sup>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<sup>[30]</sup>。其中, MHC II<sup>+</sup>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<sup>[31]</sup>。而F4/80<sup>+</sup>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<sup>[32-33]</sup>。本研究结果显示, LTβR-NIH3T3细胞处理后, 作用于抗肿瘤的MHC II<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>巨噬细胞比例增加, MHC II<sup>+</sup>/(F4/80<sup>+</sup>)比例升高。上述结果表明LTβR-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MHC II<sup>+</sup>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<sup>[34]</sup>。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<sup>[32]</sup>。

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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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

- [1] 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 high-endothelial 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, MORTEZAEI K. CD8<sup>+</sup> 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