

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.012

免疫细胞单细胞测序对肿瘤免疫治疗疗效预测的意义

Significance of single cell sequencing of immune cells in predicting the efficacy of cancer immunotherapy

王琦 综述;蒋敬庭 审阅(苏州大学附属第三医院 肿瘤生物诊疗中心,江苏省肿瘤免疫治疗工程技术研究中心,苏州大学细胞治疗研究院,江苏 常州 213003)

[摘要] 免疫检查点抑制剂及CAR-T细胞的基础及临床转化研究已成为肿瘤研究的热点之一。免疫治疗已在多种类型的肿瘤中应用,并可观察到持续的应答和显著的生存优势,但仍有部分患者并未受益,如何对免疫治疗疗效进行有效的预测,是亟待解决的问题。单细胞测序技术是在单个细胞水平上,对基因组、转录组、表观组进行高通量测序,揭示单个细胞的基因结构和基因表达状态,反映细胞间的异质性,破解多种类型肿瘤的免疫微环境及外周血循环免疫细胞的亚型及图谱,分析肿瘤细胞及肿瘤微环境的异质性,在发掘新的疾病诊断标志物、分辨细胞亚型、治疗靶标及在个体化治疗方面具有独特的优势。

[关键词] 单细胞测序;单细胞RNA转录组测序;免疫治疗;疗效预测;生物标志物;肿瘤微环境;免疫细胞

[中图分类号] R730.51;R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)05-0472-06

免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 及嵌合抗原受体修饰 T (chimeric antigen receptor T, CAR-T) 细胞的基础及临床转化研究是肿瘤研究的热点之一。ICI 治疗在多种类型肿瘤中观察到持续的应答和显著的生存优势,但部分患者并未受益^[1-2]。CAR-T 细胞疗法在血液系统肿瘤中取得了显著疗效^[3],但由于在多种实体瘤中的疗效欠佳^[4],其临床应用仍受到一定的阻碍。如何对免疫治疗疗效进行有效的预测,是亟待解决的问题之一。目前用于预测 ICI 治疗应答的生物标志物主要包括 PD-L1 的表达、高度微卫星不稳定性、肿瘤突变负荷、T 细胞炎性基因表达谱^[5]、肠道微生物群的特定特征^[6]等,但在多种类型肿瘤中的预测效果不统一,且整体的预测有效率较低。单细胞测序技术,是在单个细胞水平上对基因组、转录组、表观组进行高通量测序分析的一项新技术。利用单细胞测序技术揭示肿瘤细胞及肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 的异质性,对寻找有效的抗肿瘤免疫治疗疗效预测指标具有重要的价值。本文就近年来单细胞测序获得的免疫细胞亚群状态作为免疫治疗疗效预测的生物标志物的研究进展进行综述,旨在为寻找有效的抗肿瘤免疫治疗疗效预测指标提供新的思路。

1 CD8⁺T 细胞

目前基于单细胞测序技术的研究结果^[7]显示, TME 中的免疫细胞具有显著差异。T 细胞在抗肿瘤免疫治疗中起重要作用,其中,CD8⁺T 细胞的增殖与 ICI 治疗应答相关。因此,CD8⁺T 细胞在肿瘤监测、编辑及控制过程中发挥重要作用。

1.1 组织浸润 CD8⁺T 细胞

在一项针对接受 PD-1 单抗帕博利珠单抗 (pembrolizumab) 或纳武单抗 (nivolumab) 治疗晚期黑色素瘤的研究^[8]中,发现 40 例患者肿瘤组织中高表达 PD-1 和 CTLA-4 (PD-1^{hi}CTLA-4^{hi}) 的浸润性 CD8⁺T 细胞的比例增加,与治疗应答和无进展生存期 (PFS) 密切相关,并且这部分 CD8⁺T 细胞具有耗竭性 T 细胞的表型。耗竭性肿瘤浸润性 CD8⁺T 细胞的相对丰度预示着对抗 PD-1 治疗的应答,可用于筛选对治疗有较高临床应答的患者。

通过对 ICI 治疗的黑色素瘤患者 48 个肿瘤组织样本中的 16 291 个免疫细胞进行单细胞 RNA 转录组测序 (single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 分析,根据 CD8⁺T 细胞的状态分为两个亚群:高表达与记忆、激活及细胞存活等相关基因 (IL-7R、TCF7、REL、FOXP1、FOSL2 和 STAT4) 并且低表达共刺激相关分子的 CD8_G 亚群,高表达耗竭相关基因 (CD38、HAVCR2、ENTPD1、PDCD1、BATF、LAG3、CTLA4 和 PTPN6) 的 CD8_B 亚群。在对治疗有应答的患者中,CD8_G/CD8_B 比例 >1。并且发现肿瘤组织中 TCF7⁺CD8⁺T 细胞的比例可以预测患者的应答率以及提示更好的预后结果^[9]。

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No.81972869);常州市第十一批科技计划 (社会发展科技支撑) 项目 (No. CE20215030);常州市卫生健康委员会青苗人才计划项目 (No.CZQM2020018);常州市卫生健康委员会青年人才科技项目 (No. QN202103)

[作者简介] 王琦 (1988—),女,博士生,主要从事肿瘤免疫治疗相关研究, E-mail: wangqi88@suda.edu.cn

[通信作者] 蒋敬庭, E-mail: jiangjingting@suda.edu.cn

对接受抗 PD-1 治疗黑色素瘤患者的研究^[10]发现, 利用 33 例肿瘤组织的 scRNA-seq 的数据分析了 CD8⁺T 细胞浸润程度及促进免疫逃逸的肿瘤细胞的状态, 设定了一种肿瘤细胞表达的免疫抵抗性程序, 该程序与 T 细胞的排除和免疫逃逸相关。这种免疫抵抗性程序在 ICI 治疗之前就已表达, 是原位“冷”TME 的一个特征。并且在 112 例黑色素瘤患者的队列研究中验证了在 ICI 治疗前这种免疫抵抗性程序能用来预测患者对抗 PD-1 治疗的临床疗效。

有研究^[11]通过结合 scRNA-seq 及单细胞 TCR 测序 (single cell TCR sequencing, scTCR-seq) 技术, 追踪基底细胞癌或鳞状细胞癌患者抗 PD-1 治疗前后肿瘤组织的 TCR 克隆及转录表型, 发现其克隆性增殖的 CD8⁺CD39⁺T 细胞共表达慢性 T 细胞活化和耗竭的标志分子。然而, 在这种情况下, 克隆性增殖的 T 细胞克隆不是来自预先存在的肿瘤浸润淋巴细胞, 而是来自同一肿瘤中之前未观察到的新的克隆型。患者对抗 PD-1 治疗的应答依赖于肿瘤招募新的 T 细胞克隆取代先前存在的耗竭 T 细胞的内在能力, CD8⁺CD39⁺T 细胞或许在未来可以成为预测患者免疫治疗效果的有效指标。由于肿瘤组织取样较为困难, 如果选择更容易获取的外周血样本, 则具有更好的可操作性。

1.2 外周血 CD8⁺T 细胞

在一项针对接受帕博利珠单抗治疗的 IV 期黑色素瘤患者的单细胞测序研究^[12]中, 通过获得其治疗前后的外周血免疫细胞图谱, 从而确定了外周血循环耗竭性 CD8⁺T 细胞的药效动力学变化。另外, 对 ICI 治疗无应答的患者, 不仅仅是由于无法诱导免疫重塑, 还与 T 细胞恢复和肿瘤负荷之间的不平衡相关。通过验证队列证实, 患者外周血循环 Ki67⁺PD-1⁺CD8⁺T (肿瘤特异性) 细胞比例与基线水平处肿瘤负荷的比值越高, 提示患者有较好的临床疗效。

在接受抗 PD-1 治疗的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者中, 也观察到类似的结果^[13]。在免疫治疗后, 约 70% 的患者 Ki-67⁺PD-1⁺CD8⁺T 细胞增加, 且这些增殖的 CD8⁺T 细胞具有效应样表型 (HLA-DR⁺、CD38⁺ 和 Bcl2^{lo}), 表达共刺激分子 (CD28、CD27 和 ICOS), 并具有高水平的 PD-1 和 CTLA-4 共表达。并且 80% 对免疫治疗应答的患者都出现了 PD-1⁺CD8⁺T 细胞应答, 而 70% 的疾病进展患者存在延迟或缺失的 PD-1⁺CD8⁺T 细胞应答, 提示 PD-1⁺CD8⁺T 细胞具有重要的预测意义。

收集接受抗 PD-1/PD-L1 治疗的 IIIb~IV 期 NSCLC 患者治疗前后的外周血样本, 流式细胞术分离 PD-1⁺CD8⁺T 细胞的 TCR β 链的 CDR3 区进行

scTCR-seq。治疗前 PD-1⁺CD8⁺TCR 多样性高的患者具有更好的应答及 PFS, 治疗后 PD-1⁺CD8⁺TCR 克隆性增加的患者具有更长的 PFS^[14]。因此, 外周血 PD-1⁺CD8⁺T 细胞 TCR 的多样性和克隆性可作为 NSCLC 患者对 ICI 治疗应答的重要标志物。

2 CD4⁺T 细胞

抗 PD-1 治疗对经典霍奇金淋巴瘤 (classical Hodgkin lymphoma, cHL) 非常有效, cHL 患者的 9p24.1 染色体上的 CD274 (PD-L1) 和 PDC1LG2 (PD-L2) 基因经常出现拷贝数增加。但在 cHL 这种 MHC I 阴性的肿瘤中, 抗 PD-1 治疗的作用机制仍未明确。通过 scTCR-seq 检测 CheckMate 205 II 期临床试验 (NCT02181738)^[15] 治疗的 56 例抗 PD-1 治疗应答 cHL 患者对的外周血免疫细胞特征。治疗前, TCR 受体库多样性高的患者及在治疗期间有 TCR 克隆扩增的患者疗效最佳。在治疗过程中, CD4⁺T 细胞的受体库多样性增加, 在获得完全缓解的患者中尤为显著, 说明个体免疫微环境很大程度上影响 ICI 治疗的疗效。

另外, 针对接受抗 PD-1 治疗的 NSCLC 患者^[16], 利用 scRNA-seq 及 scTCR-seq 技术鉴定了单个外周血 T 细胞克隆, 并监测了它们在免疫治疗期间的动态变化。结果发现, 肿瘤相关 CD4⁺T 细胞的细胞毒性显著高于 CD8⁺T 细胞, 且随着疾病进展, 外周血效应 T 细胞中的肿瘤相关 CD4⁺T 细胞比例迅速降低, 提示其具有作为预测标志物的潜力。

在接受抗 PD-1/抗 CTLA-4 治疗的黑色素瘤患者^[17]中, 表达 PD-1 的 CD4⁺FOXP3⁺T 细胞 (4PD-1^{hi}) 是一种非传统型的抑制性 T 细胞, 4PD-1^{hi} 在肿瘤内的积累会增加肿瘤负荷。抗 CTLA-4 治疗会引起瘤内和外周血 4PD-1^{hi} 数量的增加, 并呈剂量依赖性。但抗 CTLA-4 联合抗 PD-1 治疗可以减少这个效应并提高抗肿瘤的活性。4PD-1^{hi} 细胞亚群是治疗应答的不良预后因素。

目前, 依托单细胞技术的 CD4⁺T 细胞的免疫治疗研究较少, 但其在肿瘤免疫中的重要角色会随着单细胞测序技术的广泛应用而不断被挖掘出来, 并在预测免疫治疗疗效方面发挥不可忽视的作用。

3 B 细胞

临床前研究^[18]表明, 新辅助 ICI 治疗与辅助治疗相比, 可提高自发转移性乳腺癌小鼠模型的 OS 率和抗原特异性 T 细胞应答。在一项新辅助 ICI 治疗 (纳武单抗 vs 纳武单抗+伊匹单抗) 高风险可切除的黑色素瘤的随机 II 期临床试验 (NCT02519322)^[19] 中, 联合治疗的实际有效率高达 45%, 比单药的实际有效率 25% 提高了 80%, 治疗效果得到了大幅度提升, 患者 OS 延长。相对于治

疗无应答的患者, B细胞信号在对治疗有应答的患者中富集。同样是依托NCT02519322随机II期临床试验的一项研究^[20]发现, 接受新辅助ICI治疗的黑色素瘤的应答者CD20⁺B细胞和三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure, TLS)的密度以及TLS与肿瘤面积的比值均高于无应答者, 尤其在治疗早期获得的肿瘤标本中, 这样的现象更为明显, 也说明治疗早期肿瘤组织中的免疫细胞浸润状态的预测价值高于治疗前的肿瘤组织。应答患者存在显著的免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链克隆性及B细胞受体(B-cell receptor, BCR)多样性增加, 表明B细胞在抗肿瘤免疫中的活跃性。与T细胞和其他免疫标志物相比, B细胞相关基因(MZB1、JCHAIN和IGLL5)在应答患者中高表达, 有望改变B细胞功能的基因标志(FCRL5、IDO1、IFNG和BTLA)在应答患者中富集。在单变量分析中, 仅B细胞的信号就能预测患者有无应答, 当纳入其他免疫细胞浸润的成分进行多变量分析时, 表明B细胞不是单独发挥作用, 可能与其他免疫细胞亚群协同作用。

在转移性黑色素瘤患者临床样本中对B细胞抗肿瘤应答的研究^[21]发现, OS率的提高与肿瘤相关CD8⁺T细胞和CD20⁺B细胞的同时存在有关, 而其他临床特征无关。对TLS形成的分子标志物CXCR5、CXCL13及CD20进行免疫荧光染色, 显示TLS在CD8⁺T细胞和CD20⁺B细胞同时存在的肿瘤内形成。随后通过scRNA-seq获取富含TLS的黑色素瘤的相关基因特征, 包括已知的B细胞特异表达基因CD79B, 在活化的B细胞中上调表达的基因CCR6, 还有其他类型免疫细胞表达的相关基因等, 可预测患者在接受ICI治疗后的结局。富含B细胞的肿瘤伴有TCF7⁺幼稚T细胞和/或记忆性T细胞的增加, 表明富含B细胞的TLS在黑色素瘤免疫微环境中发挥关键性作用。

软组织肉瘤(soft-tissue sarcoma, STS)代表一类包括50多种组织学亚型的肿瘤, 不同亚型患者的临床表现往往不典型, 对ICI等疗法的应答差异很大。通过对608例STS标本进行基因表达谱分析^[22], 根据TME的不同分为五种肉瘤免疫表型(sarcoma immune classes, SIC): 免疫低(A和B)、免疫高(D和E)以及血管高度形成(C)组。E组的特征是存在丰富的包含T细胞和滤泡DC的TLS及B细胞。SIC和B细胞可以预测STS患者的OS, 即使在不同CD8⁺T细胞及细胞毒性的背景下[表达PDCD1(PD-1)、CD274(PD-L1)或FOXP3], B细胞仍是最主要的预后因素。

4 髓系细胞

肿瘤浸润髓系细胞是TME中最主要的抗原提呈

细胞, 也是肿瘤发生、发展及免疫治疗过程中的关键调节因子, 主要包括巨噬细胞、DC、多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)和单核细胞。

髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)是由多种具有抑制功能的细胞构成的群体, 主要分为粒细胞样MDSC(G-MDSC)、单核细胞样MDSC(M-MDSC)、多形核MDSC(PMN-MDSC)等类型, 是肿瘤免疫逃逸的关键因素。在接受伊匹单抗治疗前的黑色素瘤患者外周血中, 低水平的M-MDSC预示较长的OS^[23]; 在接受H3.3K27M特异性肿瘤疫苗治疗后的弥漫性中线胶质瘤(diffuse midline glioma, DMG)患者外周血中低水平的MDSC预示较长的OS^[24]; 在接受抗PD-1治疗的NSCLC患者外周血中, 较高水平的调节性T(regulatory T, Treg)细胞和较低水平的PMN-MDSC或M-MDSC预示较长的OS^[25]; 另外一项研究^[26]中, 接受抗PD-1治疗的NSCLC患者外周血中, 无应答患者MDSC的扩增和募集显著高于应答患者, 其中, 无应答患者Lox-1⁺PMN-MDSC数量在抗PD-1治疗后增加, 说明Lox-1⁺PMN-MDSC可能是NSCLC患者中免疫抑制MDSC, 是预测治疗无应答的潜在标志物。

通过scRNA-seq在多形胶质母细胞瘤^[27]中观察到了一组独特的巨噬细胞亚群, 表达高水平的CD73, 能够在抗PD-1治疗后持续存在。CD73^{hi}髓系细胞高表达免疫抑制基因以及趋化因子/趋化因子受体基因(CCR5、CCR2、ITGAV/ITGB5和CSF1R)诱导GMB的免疫抑制。高表达CD73^{hi}髓系细胞信号特征的患者比低表达患者具有较短的OS。

此前, 已有诸多研究报道血浆IL-8升高与ICI治疗的不良结果相关^[28]。分析接受抗PD-L1阿特珠单抗(atezolizumab)治疗的转移性尿路上皮癌和转移性肾细胞癌^[29]患者血浆IL-8水平及外周血单个核细胞IL-8基因的表达情况, 血浆、外周血单个核细胞、肿瘤组织中高水平的IL-8与疗效不佳相关。scRNA-seq分析发现, 无应答患者与应答患者相比, 髓系细胞表达更高水平的IL-8, 且IL-8的高表达与抗原呈递机制的下调相关。因此逆转IL-8介导的髓系炎症应答, 或可改善接受ICI治疗的患者预后。基于单细胞技术逐渐完善髓系细胞特征图谱, 将获得更有价值的联合治疗靶点及预测标志物。

综上, 不同类型的免疫细胞作为免疫治疗疗效预测标志物的临床意义见表1。

5 CAR-T细胞

CAR-T细胞疗法对血液系统恶性肿瘤患者有显著疗效, 但输注后CAR-T细胞的命运并不完全清楚。

CAR-T细胞被输入到患者体内后,将暴露在一个动态的TME中,但TME和不断变化的肿瘤负荷如何随输入时间影响CAR-T细胞的状态,还未得到很好的研究。利用TCR测序、整合位点分析和scRNA-seq技术分析输注制品和输注后患者血液中的CD8⁺CAR-T细胞的克隆和基因表达特征^[30]。研究对象为I期临床试验(NCT01865617)中接受CD19-CAR-T细胞治疗的复发难治性急性B淋巴细胞白血病(B-cell acute lymphoblastic leukemia, B-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)或慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者。在治疗的早、中期,有氧代谢和细胞毒性标志物基因的表达增加。但在治疗的后期,随着肿瘤清除后,靶抗原减少,有氧代谢和细胞毒性标记基因的表达降低,抑制性受体基因的表达增加。通过分析

输注制品和输注后患者血液中CAR-T细胞的TCR克隆成分,可以追踪到单个CAR-T细胞的转录特征如何影响输注后的命运,并且输注制品中CD27⁺CD8⁺T比例与CLL患者的临床疗效相关。

B细胞成熟抗原(B cell maturation antigen, BCMA) CAR-T细胞在复发/难治性多发性骨髓瘤患者中显示出良好的疗效。在浆细胞白血病中,通过scRNA-seq分析BCMA-4-1BBz CAR-T细胞在输注前、高峰或缓解期的动态变化,发现CAR-T细胞在发育过程中从高度增殖转变为高度细胞毒性,并且CD19-CAR-T和BCMA-CAR-T细胞具有相似的转录特征,尤其是细胞输注后在体内的高峰期。因此,利用单细胞测序数据能解析患者体内CAR-T细胞的增殖及克隆状态,并辅助临床医生制定更加合理的治疗策略。

表1 不同类型免疫细胞作为免疫治疗疗效预测标志物的临床意义

免疫细胞类型	临床意义	参考文献
组织浸润CD8 ⁺ T细胞	CD8 ⁺ T(PD-1 ^{hi} CTLA-4 ^{hi})细胞比例增加,与ICI治疗黑色素瘤患者的应答和PFS相关	[8]
	CD8 _G /CD8 _B 比例>1, TCF7 ⁺ CD8 ⁺ T细胞预示黑色素瘤患者ICI治疗应答	[9]
	治疗前表达原位冷TME特征的免疫抵抗性程序能用来预测黑色素瘤患者对ICI治疗的效果	[10]
外周血CD8 ⁺ T细胞	CD8 ⁺ CD39 ⁺ T细胞可预测基底细胞癌或鳞状细胞癌患者免疫治疗的效果	[11]
	黑色素瘤和NSCLC患者Ki67 ⁺ PD-1 ⁺ CD8 ⁺ T细胞提示患者有较好的临床疗效	[12-13]
	NSCLC患者PD-1 ⁺ CD8 ⁺ TCR多样性高的患者具有更好的应答和PFS	[14]
CD4 ⁺ T细胞	CD4 ⁺ T细胞的受体库多样性增加,在获得完全缓解的cHL患者中尤为显著	[15]
	NSCLC患者随着疾病进展,效应T细胞中的肿瘤相关CD4 ⁺ T细胞比例降低	[16]
B细胞	4PD-1 ^{hi} 细胞亚群是黑色素瘤患者ICI治疗的不良预后因素	[17]
	新辅助ICI治疗黑色素瘤,B细胞信号在对治疗有应答的患者中富集	[19-20]
	转移性黑色素瘤患者OS率的提高与CD8 ⁺ T细胞和CD20 ⁺ B细胞的同时存在有关	[21]
髓系细胞	五种肉瘤免疫表型和B细胞可以预测STS患者的OS	[22]
	接受伊匹单抗治疗前黑色素瘤患者外周血中低水平M-MDSC预示较长的OS	[23]
	H3.3K27M特异性肿瘤疫苗治疗后的DMG患者外周血中低水平MDSC预示较长的OS	[24]
	接受抗PD-1治疗NSCLC患者外周血中较高水平Treg细胞和较低水平PMN-MDSC或M-MDSC预示较长的OS	[25]
	Lox-1 ⁺ PMN-MDSC是NSCLC患者中免疫抑制MDSC,是预测治疗无应答的潜在标志物	[26]
	高表达CD73 ^{hi} 髓系细胞信号特征的胶质母细胞患者具有较短的OS	[27]
	表达高水平IL-8的髓系细胞,预示ICI治疗转移性尿路上皮癌和转移性肾细胞癌患者无应答	[28]

推进CAR-T细胞疗法进展的一个重要目标是确定临床疗效的预测指标。目前,CAR-T细胞是用患者自身的T细胞产生的“个性化”产品,质量不统一且可变性大。对NHL患者输注前的CD19-CAR-T细胞产品进行功能及scRNA-seq分析^[31],细胞产品的多功能性由两个方面来评估:酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞因子的分泌;包括稳态/增殖、炎症、趋化、调节和免疫效应5个方面的32个关键免疫相关分子的

表达情况构成的多功能强度指数。发现多功能强度指数与患者的临床应答显著相关。另一项基于CD19-CAR-T细胞应用于复发/难治性CD19⁺白血病的I期临床试验(NCT02028455)的研究^[32]发现,输注前外周血LAG-3⁺/TNF- α ^{low}CD8⁺T细胞频率增加以及耗竭标志物的表达与初始治疗失败相关。

scRNA-seq分析一组接受CD19-CAR-T细胞治疗的大B细胞淋巴瘤患者的输注制品^[33]。在完全应答者

中观察到CD8⁺中央记忆T细胞的特征,而在部分应答者中观察到CD8⁺T细胞功能障碍特征,并富含耗竭和激活标记以及编码MHC II类蛋白的基因,表达CCR7⁺CD27⁺CD8⁺T细胞的富集与完全应答者相关,揭示了特定T细胞亚群与不同的临床结果相关。CD19-CAR-T治疗引起免疫效应细胞相关神经毒性综合征(immediate effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS),患者最初出现震颤、书写困难、轻度表达性失语、失用和注意力受损的这种不良反应与ICANS相关细胞密切相关。因此,在输注制品中检测ICANS相关细胞可以预测患者是否处于神经毒性的高危状态,并使用针对髓系细胞功能的药物(如IL-1受体拮抗剂)进行预防性治疗。此外,通过从应答和无应答白血病患者提取的CAR-T细胞进行scRNA-seq检测^[34],发现肿瘤细胞中受损的死亡受体信号转导途径导致CD19-CAR-T细胞的细胞毒杀伤功能失效并驱动CD19-CAR-T细胞功能障碍,提示了一种与抗原无关的CAR-T细胞治疗耐药的新机制。因此,利用单细胞测序技术识别CAR-T细胞在治疗过程中的转录组特征,可发现预测临床应答的标志物,在个性化免疫治疗中发挥作用。

6 结 语

综上所述,机体的免疫系统处于动态平衡状态,而肿瘤具有异质性,单一和通用的预测标记可能不现实。CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、B细胞和髓系细胞等免疫细胞有望作为免疫治疗疗效预测标志物之一,但仍需结合其他分子标志物以及临床预后因素建立一个综合预测模型,进而可能为合理构建和评估基于抗PD-1和/或PD-L1的组合治疗方案提供更精准的提示。虽然近年来测序成本持续下降,单细胞技术呈飞跃式发展,但如果要广泛应用于肿瘤患者的个体化免疫治疗中,仍存在以下缺点:(1)样本采集有难度,外周血样本是最容易获取的,但如果需要更具代表性的肿瘤组织作为样本,是否能获取到足够数量及质量的细胞,仍然具有不确定因素;(2)工作流程耗时长,因为使用的样本材料数量很少,但分析仍然需要足够的细胞数量以确保所有细胞类型都能得到标示,且需要创建简化和优化的工作流程以缩短完成测序所需的时间;(3)数据分析复杂,很多由学者研发的分析数据软件大部分都是开源的,但只有小部分既掌握先进生物信息学和统计技能,同时具备生物学系统知识的研究人员才能获取权威结果,且目前关于如何定义质控标准、去除技术伪像和解释结果的指导方针有限;(4)费用昂贵,成本较高及所需的大多数仪器和试剂都很昂贵,导

致患者家庭经济压力较大。相信随着单细胞多组学研究的不断深入、基因测序成本的进一步降低,基于单细胞水平的测序、蛋白分析极具发展潜力,将为人们认识疾病、理解其免疫机制及新药物研发提供新的视角与方案。

[参 考 文 献]

- [1] SIU L L, IVY S P, DIXON E L, *et al.* Challenges and opportunities in adapting clinical trial design for immunotherapies[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(17): 4950-4958[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5669041/>. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3079.
- [2] 余滢滢. PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗肝癌细胞瘤的临床试验研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(10): 1029-1036. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.10.011.
- [3] HAN D L, XU Z H, ZHUANG Y, *et al.* Current progress in CAR-T cell therapy for hematological malignancies[J/OL]. *J Cancer*, 2021, 12(2): 326-334[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7738987/>. DOI:10.7150/jca.48976.
- [4] 陈锦, 张彩. 嵌合抗原受体修饰的免疫细胞及其在肿瘤免疫治疗中的应用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(6): 549-557. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.06.001.
- [5] CRISTESCU R, MOGG R, AYERS M, *et al.* Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy [J/OL]. *Science*, 2018, 362(6411): eaar3593[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6718162/>. DOI:10.1126/science.aar3593.
- [6] GOPALAKRISHNAN V, SPENCER C N, NEZI L, *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J/OL]. *Science*, 2018, 359(6371): 97-103[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5827966/>. DOI:10.1126/science.aan4236.
- [7] HIAM-GALVEZ K J, ALLEN B M, SPITZER M H. Systemic immunity in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(6): 345-359. DOI: 10.1038/s41568-021-00347-z.
- [8] DAUD A I, LOO K, PAULI M L, *et al.* Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma[J/OL]. *J Clin Invest*, 2016, 126(9): 3447-3452[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004965/>. DOI:10.1172/JCI87324.
- [9] SADE-FELDMAN M, YIZHAK K, BJORGAARD S L, *et al.* Defining T cell states associated with response to checkpoint immunotherapy in melanoma[J/OL]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 404[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6647017/>. DOI: 10.1016/j.cell.2018.12.034.
- [10] JERBY-ARNON L, SHAH P, CUOCO M S, *et al.* A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade[J/OL]. *Cell*, 2018, 175(4): 984-997. e24[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410377/>. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.006.
- [11] YOST K E, SATPATHY A T, WELLS D K, *et al.* Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade[J/OL]. *Nat Med*, 2019, 25(8): 1251-1259[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689255/>. DOI:10.1038/s41591-019-0522-3.
- [12] HUANG A C, POSTOW M A, ORLOWSKI R J, *et al.* T-cell

- invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response[J/OL]. *Nature*, 2017, 545(7652): 60-65[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554367/>. DOI:10.1038/nature22079.
- [13] KAMPHORST A O, PILLAI R N, YANG S, *et al.* Proliferation of PD-1⁺ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(19): 4993-4998[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5441721/>. DOI:10.1073/pnas.1705327114.
- [14] HAN J F, DUAN J C, BAI H, *et al.* TCR repertoire diversity of peripheral PD-1⁺CD8⁺ T cells predicts clinical outcomes after immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(1): 146-154. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0398.
- [15] CADER F Z, HU X H, GOH W L, *et al.* A peripheral immune signature of responsiveness to PD-1 blockade in patients with classical Hodgkin lymphoma[J]. *Nat Med*, 2020, 26(9): 1468-1479. DOI:10.1038/s41591-020-1006-1.
- [16] ZHANG F, BAI H, GAO R R, *et al.* Dynamics of peripheral T cell clones during PD-1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(12): 2599-2611. DOI: 10.1007/s00262-020-02642-4.
- [17] ZAPPASODI R, BUDHU S, HELLMANN M D, *et al.* Non-conventional inhibitory CD4⁺Foxp3⁺PD-1^{hi} T cells as a biomarker of immune checkpoint blockade activity[J/OL]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 691[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6656529/>. DOI:10.1016/j.ccell.2018.09.007.
- [18] LIU J, BLAKE S J, YONG M C, *et al.* Improved efficacy of neoadjuvant compared to adjuvant immunotherapy to eradicate metastatic disease[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(12): 1382-1399. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0577.
- [19] AMARIA R N, REDDY S M, TAWBI H A, *et al.* Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma [J/OL]. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1649-1654[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6481682/>. DOI: 10.1038/s41591-018-0197-1.
- [20] HELMINK B A, REDDY S M, GAO J J, *et al.* B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response[J/OL]. *Nature*, 2020, 577(7791): 549-555[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8762581/>. DOI:10.1038/s41586-019-1922-8.
- [21] CABRITA R, LAUSS M, SANNA A, *et al.* Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 561-565. DOI:10.1038/s41586-019-1914-8.
- [22] PETITPREZ F, DE REYNIÈS A, KEUNG E Z, *et al.* B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma[J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 556-560. DOI:10.1038/s41586-019-1906-8.
- [23] KITANO S, POSTOW M A, ZIEGLER C G, *et al.* Computational algorithm-driven evaluation of monocytic myeloid-derived suppressor cell frequency for prediction of clinical outcomes[J/OL]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(8): 812-821[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4125466/>. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0013.
- [24] MUELLER S, TAITT J M, VILLANUEVA-MEYER J E, *et al.* Mass cytometry detects H3.3K27M-specific vaccine responses in diffuse midline glioma[J/OL]. *J Clin Invest*, 2020, 130(12): 6325-6337[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7685729/>. DOI:10.1172/JCI140378.
- [25] KOH J, HUR J Y, LEE K Y, *et al.* Regulatory (FoxP3⁺) T cells and TGF- β predict the response to anti-PD-1 immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J/OL]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18994 [2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7642363/>. DOI:10.1038/s41598-020-76130-1.
- [26] KIM H R, PARK S M, SEO S U, *et al.* The ratio of peripheral regulatory T cells to lox-1⁺ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells predicts the early response to anti-PD-1 therapy in patients with non-small cell lung cancer[J/OL]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199(2): 243-246[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6835091/>. DOI:10.1164/rccm.201808-1502LE.
- [27] GOSWAMI S, WALLE T, CORNISH A E, *et al.* Immune profiling of human tumors identifies CD73 as a combinatorial target in glioblastoma[J/OL]. *Nat Med*, 2020, 26(1): 39-46[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7182038/>. DOI: 10.1038/s41591-019-0694-x.
- [28] SANMAMED M F, PEREZ-GRACIA J L, SCHALPER K A, *et al.* Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(8): 1988-1995. DOI: 10.1093/annonc/mdx190.
- [29] YUEN K C, LIU L F, GUPTA V, *et al.* High systemic and tumor-associated IL-8 correlates with reduced clinical benefit of PD-L1 blockade[J/OL]. *Nat Med*, 2020, 26(5): 693-698[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8286544/>. DOI:10.1038/s41591-020-0860-1.
- [30] SHEIH A, VOILLET V, HANAFI L A, *et al.* Clonal kinetics and single-cell transcriptional profiling of CAR-T cells in patients undergoing CD19 CAR-T immunotherapy[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 219[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6954177/>. DOI:10.1038/s41467-019-13880-1.
- [31] ROSSI J, PACZKOWSKI P, SHEN Y W, *et al.* Preinfusion polyfunctional anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with clinical outcomes in NHL[J/OL]. *Blood*, 2018, 132(8): 804-814[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6107882/>. DOI:10.1182/blood-2018-01-828343.
- [32] FINNEY O C, BRAKKE H M, RAWLINGS-RHEA S, *et al.* CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability[J/OL]. *J Clin Invest*, 2019, 129(5): 2123-2132[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6486329/>. DOI: 10.1172/JCI125423.
- [33] DENG Q, HAN G C, PUEBLA-OSORIO N, *et al.* Characteristics of anti-CD19 CAR T cell infusion products associated with efficacy and toxicity in patients with large B cell lymphomas[J/OL]. *Nat Med*, 2020, 26(12): 1878-1887[2021-09-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8446909/>. DOI:10.1038/s41591-020-1061-7.
- [34] SINGH N, LEE Y G, SHESTOVA O, *et al.* Impaired death receptor signaling in leukemia causes antigen-independent resistance by inducing CAR T-cell dysfunction[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(4): 552-567. DOI:10.1158/2159-8290.CD-19-0813.

[收稿日期] 2021-09-25

[修回日期] 2022-02-16

[本文编辑] 党瑞山