

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.08.010

· 综述 ·

单细胞TCR测序在肿瘤免疫治疗中的应用

Applications of single-cell TCR sequencing in tumor immunotherapy

戴薇 综述;蒋敬庭,周游 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] T细胞受体(TCR)序列可作为分辨T细胞特异性的唯一标签,因其多样性的特征,在特定时间内个体循环系统中所有TCR构成的TCR组库可以反映个体的抗肿瘤免疫状态。单细胞TCR测序技术能够在单细胞水平上检测编码TCR双链的基因序列和表达量等信息,包括获得TCR的 α 链和 β 链的配对信息,从而在细胞水平上更为准确地探索TCR组库的异质性,还可结合其他技术将TCR序列与基因组、转录组、蛋白质组等多组学信息成套配对,精准展现细胞水平上的多角度信息。因该技术具有高通量、高分辨率的优势而被广泛应用于肿瘤免疫治疗相关研究,为探索TME中T细胞功能、发展T细胞受体工程化T细胞(TCR-T)疗法、预测免疫检查点抑制剂(ICI)疗效等提供重要依据,成为重要的筛选工具,期待该技术的发展使更多肿瘤患者受益。

[关键词] 单细胞TCR测序;文库构建;肿瘤免疫治疗;肿瘤微环境;T细胞受体工程化T细胞;免疫检查点抑制剂

[中图分类号] R730.51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)08-0821-06

T淋巴细胞遭受非己抗原刺激时启动T细胞介导的免疫应答以发挥清除抗原的作用^[1],这个过程被称为细胞免疫。其中,识别抗原是启动细胞免疫的先决条件,具体表现为T细胞受体(T cell receptor, TCR)与经抗原呈递细胞处理过的抗原肽-主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)进行识别与结合,从而推进后续的免疫应答,因此TCR在细胞免疫过程中占据主导地位。随着单细胞技术的发展,单细胞TCR测序能够以细胞分辨率检测编码TCR双链基因的序列和表达量等信息,实现单个细胞与TCR双链信息的精准配对,在免疫学研究中显示出强大的优势。基于细胞免疫理论开发的肿瘤免疫疗法在临床上成功发挥肿瘤杀伤作用,但由于免疫靶点不通用和有效性不一致,肿瘤免疫疗法不能适用所有肿瘤类型以及罹患同种肿瘤的所有患者,这是当前肿瘤免疫疗法亟需突破的瓶颈。越来越多的研究以TCR为突破点,采用单细胞TCR测序技术检测肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的TCR种类和数量以反映肿瘤浸润T细胞的免疫功能,努力探索更精准的免疫靶点和更灵敏的生物预测物。

1 TCR的多样性

TCR是位于T细胞表面的一种异二聚体蛋白,整体结构可分为可变结构域、固定结构域、穿膜结构域和胞质结构域。大约95%的TCR由一条 α 链和一条 β 链成对构成, $\alpha\beta$ TCR因高占比而成为TCR测序的主要研究对象。TCR多样性研究表明,理论上,人体TCR的种类约 2×10^{19} 种^[2],说明编码TCR双链基因的

序列变化范围广泛,为TCR分析造成极大困难。人体内编码 α 链的基因包括可变(V)和连接(J)片段,而编码 β 链的基因包括可变(V)、多样性(D)和连接(J)片段,每种基因片段的使用频率不止一次。每个T细胞在发育过程中受到V(D)J重排机制的驱使,大量基因片段经过复杂的选择、剪切、连接等工程,最终确定唯一的V(D)J片段排列顺序,使得大部分成熟的T细胞只表达一种TCR,拥有了特异的身份标签。在此过程中,所有T细胞的V(D)J片段顺序构成组合多样性,以及基因片段连接时碱基的随机增添或缺失构成连接多样性,是TCR多样性的主要原因^[3]。此外,考虑到体细胞个体产生精确的V(D)J重排的可能性很低^[4],TCR序列可作为分辨T细胞特异性的唯一标签。任意时间点某个个体循环系统中所有T细胞的TCR构成TCR组库,分析TCR组库对于了解抗肿瘤反应、调节免疫反应以及预测预后至关重要^[5-6]。即使TCR分析的主要困难在于TCR的多样性,但是TCR序列的标签特性和测序技术的发展为研究自身免疫、感染性疾病和肿瘤进展中的T细胞和TCR组库提供了强大帮助。

2 TCR测序的文库构建方法

TCR测序的整个过程包括DNA/RNA提取、文库

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 31701111);江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(No. 23KJB310024);常州市卫生健康委员会重大科技项目(No. ZD202203)

[作者简介] 戴薇(1999—),女,硕士生,主要从事肿瘤免疫相关研究。E-mail: daiwei_wxrah@163.com

[通信作者] 周游, E-mail: zhouyounew@163.com

构建、高通量测序和数据分析,从而识别和量化 TCR 的多样性、克隆型分布以及与免疫应答相关的信息。基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 和 RNA 均可用作 TCR 测序的起始材料, gDNA 提取用于分析 TCR 的基因组序列, 而 RNA 提取则用于分析 TCR 的转录本序列。目前的主流建库方法包括多重 PCR (multiplex polymerase chain reaction, mPCR)^[7-8] 和 5' cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 加巢式 PCR^[9-10], 研究者可根据不同的研究目的选择不同的研究素材和建库方法。

gDNA 可直接作为 mPCR 的模板, RNA 反转录为 cDNA 后也可进行 mPCR。与常规 PCR 不同, mPCR 体系需要两对及以上的引物, 利用 DNA 的半保留复制和在不同温度下双链和单链可以互相转变的性质, 快速扩增目标片段, 扩增区域可以覆盖整个 CDR3 区域。然而, 由于 PCR 的多轮循环以及与引物更相似的受体序列更易扩增的偏好性问题, mPCR 可能导致产物序列错误和相对丰度差异大^[11-13], 调整引物浓度或使用分子标签等技术可以在一定程度上纠正误差。

RNA 样本倾向于采用 5' RACE 加巢式 PCR 法。5' RACE 法依赖具有末端转移酶活性的反转录酶和 PCR 技术, 合成含有 mRNA 完整 5' 端的 cDNA。由于 V(D)J 区域靠近 mRNA 的 5' 端, 5' RACE 法可以保留完整的 TCR 和 V 基因序列。在这个过程中, 巢式 PCR 的加入可提高特异性。在引入第一对引物进行 PCR 扩增并得到 cDNA 产物之后, 再引入第二对引物, 称为巢式引物, 其结合在第一次 PCR 产物内部, 使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次扩增片段。这意味着如果第一次扩增产生了错误片段, 则第二次在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低, 从而减少非特异性扩增。

3 单细胞 TCR 测序的优势

早期 TCR 分析技术已经能根据 TCR 的结构定位更精准的检测靶序列。TCR 与抗原肽-MHC 直接接触的部位为互补决定区 (complementarity determining region, CDR), 位于可变结构域, 分别为 CDR1、CDR2 和 CDR3。CDR1 和 CDR2 由种系 DNA 编码, 而 CDR3 由 V(D)J 编码, 所以一种 CDR3 序列代表一种 TCR。研究者采用 CDR3 谱图分型首次估计了人类和小鼠的 TCR 多样性^[14-15]; 此外, 采用流式细胞术检测编码 TCR β 链中 V 基因片段的使用频率, 揭示了 TCR 组库的多样性^[16]。基因组测序技术的出现解决了无法获取 CDR3 全部序列的难题^[17], 对 TCR 组库的分析更加全面。

早期 TCR 分析技术的单次检测样本量较小, 随着高通量测序技术的普及, TCR 测序可以一次性检测大量细胞, 加快了研究进程。根据分析水平的不同可将 TCR 测序分为批量测序和单细胞测序两种类型。批量 TCR 测序将样本中所有 T 细胞默认为均质材料^[18], 针对 TCR 单链进行检测, 结果反映的是样本中的平均水平, 适用于 T 细胞群的分析, 例如将批量 TCR 测序应用于正常组织和肿瘤组织的 T 细胞群比较分析^[19-20]。与批量 TCR 测序相比, 单细胞 TCR 测序最突出的优势是能获得 TCR 的 α 链和 β 链的配对信息。成对的 α 、 β 链决定了 T 细胞的特异性, 因此单细胞 TCR 测序能在细胞水平上探索 TCR 组库的异质性。单细胞 TCR 测序不受样本量的限制, 基于 T 细胞表型特征, 通过流式细胞分选技术分离单个 T 细胞, 捕获 TCR 双链进行测序, 实现 TCR 序列与表型的配对分析^[21], 在此基础上还可以结合其他技术将 TCR 序列与基因组、转录组、蛋白质组等多组学信息成套配对, 精准展现细胞水平上的多角度信息。

4 单细胞 TCR 测序的应用

单细胞 TCR 测序技术在肿瘤免疫中的应用展现出巨大潜力, 通过对单个 T 细胞的 TCR 序列进行高通量测序, 可以深入了解 T 细胞的免疫功能和调控机制。随着技术的不断进步和应用范围的扩大, 单细胞 TCR 测序在探索 TME 中 T 细胞功能、发展 T 细胞受体工程化 T 细胞 (T-cell receptor-engineered T cell, TCR-T) 疗法、预测免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 疗效中的应用将为肿瘤免疫治疗提供重要依据。

4.1 单细胞 TCR 测序在探索 TME 中 T 细胞功能中的应用

TME 的构成十分复杂, 包括细胞组分和非细胞组分^[22], 各组分相互作用协调成一个既促进肿瘤又抑制肿瘤的整体, 影响肿瘤发生、进展、侵袭、转移等破坏性生物学行为。因此, 分辨各组分的功能对于深刻理解 TME 的构成和掌握肿瘤动态变化非常重要。随着单细胞 TCR 测序的应用和肿瘤免疫相关研究的推进, 肿瘤浸润 T 细胞的功能得到了细致的区分, 例如与肿瘤进展是否相关、发挥促进作用还是抑制作用以及通过何种方式发挥作用等。

4.1.1 旁观者 CD8⁺ T 细胞

CD8⁺ T 细胞和自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞是抗肿瘤效应的主力军, CD8⁺ T 细胞负责识别肿瘤细胞表面抗原并释放穿孔素和颗粒酶 B 等细胞毒性分子杀伤肿瘤细胞, NK 细胞则无需抗原呈递即可直接清除肿瘤细胞^[23]。需要注意的是, 前文所述 CD8⁺ T

细胞属于细胞毒性 T 细胞, 还有一部分 CD8⁺ T 细胞则作为旁观者存在于 TME 中。旁观者 CD8⁺ T 细胞不具备肿瘤抗原特异性, 而是负责识别与肿瘤无关的表位^[24], 但是有证据表明它们在 TME 中能够协助抗肿瘤免疫反应的发生。采用单细胞 TCR 测序进行肺癌和结直肠癌肿瘤浸润 T 细胞的抗原特异性研究, 结果发现旁观者 CD8⁺ T 细胞数量丰富, 并且被鉴定出与肿瘤抗原特异性 T (tumor antigen-specific T, Tas) 细胞重叠的多种表型, 但是缺乏 CD39 表达, 所以 CD39 阴性表型可能成为鉴定旁观者 CD8⁺ T 细胞的标志物^[25]。在另一项黑色素瘤浸润 T 细胞的研究中, 旁观者 CD8⁺ T 细胞表现出比抗原特异性 T 细胞更强的细胞毒性^[26], 所以旁观者 CD8⁺ T 细胞具有清除肿瘤的潜力^[27]。

4.1.2 耗竭 CD8⁺ T 细胞

肿瘤浸润 T 细胞持续暴露于肿瘤抗原, 导致 T 细胞的绝对数量和效应功能逐渐下降直至消失, 记忆 T 细胞的特征也开始缺失, 发生 T 细胞耗竭现象。研究^[28-29]表明, 耗竭 CD8⁺ T 细胞的内部和外部都发生了颠覆性的变化, 内在的染色质重塑外化为不同于先前的表观遗传和代谢方式, 从而呈现出失能状态。黑色素瘤患者的肿瘤浸润免疫细胞转录状态的模型推断研究采用了单细胞 RNA 测序联合单细胞 TCR 测序, 提出耗竭 CD8⁺ T 细胞的普遍分化特征, 即从过渡状态到早期功能失调, 逐渐到达高度功能失调^[30]。

4.1.3 细胞毒性 CD4⁺ T 细胞

CD4⁺ T 细胞, 也被称为辅助 T 细胞, 在 TME 中负责分泌促炎细胞因子和趋化因子, 行使辅助 CD8⁺ T 细胞、间接杀伤肿瘤细胞和调节免疫应答的功能。然而在某些肿瘤中, 研究结果证明了细胞毒性 CD4⁺ T 细胞的存在, 其通过 MHC-II 类依赖性方式直接清除肿瘤^[31]。

事实上, TME 中的 T 细胞群呈高度异质性并且持续处于动态变化中。单细胞 TCR 测序有利于清晰地分辨 T 细胞的功能类型、发挥功能的机制和功能状态的变化, 丰富了肿瘤免疫相关理论依据, 为进一步开发和拓展有效免疫疗法奠定基础。

4.2 单细胞 TCR 测序在发展 TCR-T 疗法中的应用

TCR-T 疗法因精准靶向肿瘤抗原使正常组织免于损伤的优势而备受关注^[32-33]。该疗法通过提取 Tas 细胞中编码 TCR 的基因, 利用基因工程技术导入成熟 T 细胞, 经体外增殖后回输到患者体内, 使受者 T 细胞表达抗原特异性 TCR, 发挥效应 T 细胞功能。实施 TCR-T 疗法的首要条件是确定肿瘤抗原特异性 TCR, 但是过程中存在难题。

4.2.1 Tas 细胞难以获取

由于给定抗原的特异性 T 细胞在外周血细胞中比例低, 导致特异性反应被大多数无关细胞掩盖^[34], 不利于被检测。一些研究尝试分离并扩增实体肿瘤浸润 T 细胞以探寻 Tas 细胞并作为确定抗原特异性 TCR 的限定范围^[35-36], 然而抑制性 TME 通常导致肿瘤浸润 T 细胞的数量很少, 除了具有高水平克隆扩增的样本以外, 很难从肿瘤组织中获取并成功扩增出大量 Tas 细胞, 无法采用批量测序法满足科研需求。

4.2.2 TCR 的多特异性识别

TCR 与抗原肽-MHC 的相互作用表现为多特异性^[37], 也被称为交叉反应性, 原因在于 TCR 响应的是紧密结合在 MHC 上的肽段而不是整个抗原, 达成最小序列相似性的肽段可被某种特定的 TCR 识别, 所以 TCR 与抗原的对应识别不是一对一的关系。理论上, 多特异性可能会导致在限定范围内没有出现抗原特异性 TCR 或存在几种抗原特异性 TCR 但无法确定哪一种特异性最强。自身免疫性疾病相关研究指出, 针对特定抗原肽-MHC 的理论最佳匹配 TCR 不是实际上响应的 TCR^[38]。人体内没有预先准备好的针对所有抗原刺激的完备 TCR 库, TCR 识别抗原的多特异性填补了免疫覆盖率不全的漏洞, 一定程度上保证免疫反应不脱节, 但是也对鉴定抗原特异性 TCR 造成困难。

单细胞 TCR 测序的应用为解决这些难题提供了新方向。在建立 TCR-T 疗法的研究中, 研究者联合单细胞 mRNA 测序、单细胞 TCR 测序和体外新抗原刺激对肿瘤及邻近组织的 T 细胞进行表征, 发现 CXCL13 是 CD4⁺ 和 CD8⁺ Tas 细胞的独特标志物, 将由此鉴定的 Tas 细胞的 TCR 用于建立 TCR-T, 结果显示对自体患者来源的异种移植肿瘤有显著疗效^[39]。单细胞 TCR 测序在 TCR-T 疗法中的应用有利于开发个性化免疫治疗药物, 而且与其他治疗手段联合可以更好地发挥疗效, 减少在治疗实体瘤过程中的障碍^[40], 具有广泛的应用前景。

4.3 单细胞 TCR 测序在预测 ICI 疗效中的应用

ICI 是针对免疫检查点分子的单抗类药物, 通过重新激活耗竭 T 细胞、解除免疫抑制以恢复 T 细胞的抗肿瘤效应, 包括抗程序性细胞死亡蛋白-1 (programmed cell death protein-1, PD-1)、抗程序性细胞死亡蛋白-1 配体 (programmed cell death protein ligand-1, PD-L1)、抗细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4) 以及抗淋巴细胞活化基因-3 (lymphocyte activation gene-3, LAG-3) 等单克隆抗体, 已在多种肿瘤治疗中取得显著疗效。然而, ICI 治疗存在难以避免的不良反应, 且有无法适用所有肿瘤的弊端, 可能会引起严

重的免疫相关不良事件^[41]。因此,不断有研究者试图寻找生物标志物预测ICI对肿瘤患者的适用性和预后以指导治疗方案的选择。

临床上采用PD-L1免疫组织化学、微卫星高不稳定性(microsatellite instability-high, MSI-H)和错配修复缺陷(mismatch repair deficiency, dMMR)作为预测ICI反应的标志物,但是灵敏度和特异性均不佳。在此之后,肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)成为生物标志物的新尝试,但是由于没有与患者预后展现出强烈相关性而在预测价值上有限^[42-43]。

4.3.1 CXCL13

Tas细胞的数量决定了抗肿瘤效应的强度,单细胞TCR测序技术与基因组、转录组、蛋白质组等信息的联合可以深度挖掘Tas细胞的多组学特征,便于发现Tas细胞的代表性标志物,为寻找ICI反应的预测物提供了新视野。CXCL13不仅对建立TCR-T有指导意义,而且表达CXCL13的Tas细胞的水平能够精准预测ICI治疗反应^[39],已证明CXCL13的表达水平与接受ICI治疗的晚期膀胱癌患者的生存率相关^[44],所以CXCL13可以作为ICI治疗的生物预测物。

4.3.2 TCR收敛

TCR组库多样性指标也是肿瘤患者对ICI反应的有效指示,常用指标包括克隆性、均匀度、香农指数(Shannon index)、基尼系数(Gini coefficient)等。研究^[45]表明,治疗前TCR组库可作为单独接受抗PD-1治疗或化疗的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者的预测性生物标志物。人类密码子的简并性允许多个密码子编码同一种氨基酸,与此类似的是,多种V(D)J排列顺序经转录和翻译能产生相同的TCR蛋白,这种现象称为TCR收敛。TCR收敛也属于衡量TCR多样性的指标,研究^[46]表明,TCR收敛在预测肿瘤患者对ICI治疗的反应时表现优秀。表达收敛TCR的T细胞核苷酸序列不同,但具有相同的肿瘤抗原特异性,收敛性T细胞被证明表现出CD8细胞毒性基因特征。TCR β 链测序数据表明,TCR收敛频率可用于检测T细胞对肿瘤新抗原的反应,而不是由非同义突变引起的反应,是一种高灵敏度的抗原特异性指标^[47]。晚期NSCLC患者接受抗PD-L1治疗后的外周血TCR β 链库评估结果说明,TCR收敛性下降的患者的总生存期(overall survival, OS)有增加的趋势^[48]。两组黑色素瘤患者分别接受抗PD-1和抗CTLA-4免疫治疗,对收集到的外周血单核细胞样本进行TCR β 链测序,结果显示TCR收敛性越高,OS和无进展生存期(PFS)均显著改善,因此TCR收敛性是接受ICI治疗的患者的独立预后预测因子^[46],具有极高的准确性。

5 展 望

单细胞TCR测序在肿瘤免疫中的应用日益广泛,在解读T细胞功能、鉴定Tas细胞、预测免疫治疗及预后等方面意义重大,具有不可替代的科研价值。将单细胞TCR测序与其他技术联合使用是在现有技术的基础上拓展可用性的有效方法。例如,结合空间转录组分析和单细胞TCR测序以研究人脑转移瘤,发现不同的CD8⁺T细胞亚群穿透血-脑脊液屏障,在脑转移瘤微环境中密集浸润,并且确定了CD8⁺T细胞及其周围环境中的信号通路,CD8⁺T细胞的浸润和信号通路的存在可为实施免疫疗法提供合理的靶点^[49]。开发新的免疫治疗靶点和预测标志物是未来肿瘤免疫疗法提升临床价值的重要方向,期待肿瘤免疫疗法使更多患者受益。

利益冲突声明:所有作者均不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] JOYCE S, TERNETTE N. Know thy immune self and non-self: Proteomics informs on the expanse of self and non-self, and how and where they arise[J/OL]. *Proteomics*, 2021, 21(23/24): e2000143 [2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34310018/>. DOI: 10.1002/pmic.202000143.
- [2] PAI J A, SATPATHY A T. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies[J]. *Nat Methods*, 2021, 18(8): 881-892. DOI: 10.1038/s41592-021-01201-8.
- [3] SCHATZ D G. V(D)J recombination[J]. *Immunol Rev*, 2004, 200: 5-11. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00173.x.
- [4] BRADLEY P, THOMAS P G. Using T cell receptor repertoires to understand the principles of adaptive immune recognition[J]. *Annu Rev Immunol*, 2019, 37: 547-570. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041757.
- [5] ARAN A, GARRIGÓS L, CURIGLIANO G, *et al.* Evaluation of the TCR repertoire as a predictive and prognostic biomarker in cancer: diversity or clonality?[J/OL]. *Cancers*, 2022, 14(7): 1771 [2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8996954/>. DOI: 10.3390/cancers14071771.
- [6] HUANG A L, HE Y Z, YANG Y, *et al.* Exploring the potential of the TCR repertoire as a tumor biomarker (Review)[J/OL]. *Oncol Lett*, 2024, 28(3): 413 [2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11234811/>. DOI: 10.3892/ol.2024.14546.
- [7] ROBINS H S, CAMPREGHER P V, SRIVASTAVA S K, *et al.* Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells[J]. *Blood*, 2009, 114(19): 4099-4107. DOI: 10.1182/blood-2009-04-217604.
- [8] WANG C L, SANDERS C M, YANG Q Y, *et al.* High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(4): 1518-1523. DOI: 10.1073/pnas.0913939107.
- [9] MAMEDOV I Z, BRITANOVA O V, ZVYAGIN I V, *et al.* Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for

- the deep next generation sequencing profiling[J/OL]. *Front Immunol*, 2013, 4: 456[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870325/>. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00456.
- [10] PICELLI S, FARIDANI O R, BJÖRKLUND A K, *et al.* Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2[J]. *Nat Protoc*, 2014, 9 (1): 171-181. DOI: 10.1038/nprot.2014.006.
- [11] NGUYEN P, MA J, PEI D Q, *et al.* Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire[J/OL]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 106[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21310087/>. DOI: 10.1186/1471-2164-12-106.
- [12] SHUGAY M, BRITANOVA O V, MERZLYAK E M, *et al.* Towards error-free profiling of immune repertoires[J]. *Nat Methods*, 2014, 11 (6): 653-655. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
- [13] LIU X, ZHANG W, ZENG X J, *et al.* Systematic comparative evaluation of methods for investigating the TCR β repertoire[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152464[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019362/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0152464.
- [14] ARSTILA T P, CASROUGE A, BARON V, *et al.* A direct estimate of the human alpha beta T cell receptor diversity[J]. *Science*, 1999, 286(5441): 958-961. DOI: 10.1126/science.286.5441.958.
- [15] CASROUGE A, BEAUDOING E, DALLE S, *et al.* Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes[J]. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5782-5787. DOI: 10.4049/jimmunol.164.11.5782.
- [16] DIU A, ROMAGNÉ F, GENEVÉE C, *et al.* Fine specificity of monoclonal antibodies directed at human T cell receptor variable regions: comparison with oligonucleotide-driven amplification for evaluation of V beta expression[J]. *Eur J Immunol*, 1993, 23(7): 1422-1429. DOI: 10.1002/eji.1830230703.
- [17] BURIAN A N, ZHAO W F, LO T W, *et al.* Genome sequencing guide: an introductory toolbox to whole-genome analysis methods [J]. *Biochem Mol Biol Educ*, 2021, 49(5): 815-825. DOI: 10.1002/bmb.21561.
- [18] KARCZEWSKI K J, SNYDER M P. Integrative omics for health and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19(5): 299-310. DOI: 10.1038/nrg.2018.4.
- [19] LI Y J, MA L, WU D J, *et al.* Advances in bulk and single-cell multi-omics approaches for systems biology and precision medicine [J/OL]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(5): bbab024[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33778867/>. DOI: 10.1093/bib/bbab024.
- [20] LIM J, PARK C, KIM M, *et al.* Advances in single-cell omics and multiomics for high-resolution molecular profiling[J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(3): 515-526. DOI: 10.1038/s12276-024-01186-2.
- [21] PASETTO A, BUGGERT M. T-cell repertoire characterization[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2574: 209-219. DOI: 10.1007/978-1-0716-2712-9_9.
- [22] ELHANANI O, BEN-URI R, KEREN L. Spatial profiling technologies illuminate the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(3): 404-420. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.01.010.
- [23] KYRYSYUK O, WUCHERPFENNIG K W. Designing cancer immunotherapies that engage T cells and NK cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 17-38. DOI: 10.1146/annurev-immunol-101921-044122.
- [24] MEIER S L, SATPATHY A T, WELLS D K. Bystander T cells in cancer immunology and therapy[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(2): 143-155. DOI: 10.1038/s43018-022-00335-8.
- [25] SIMONI Y, BECHT E, FEHLINGS M, *et al.* Bystander CD8⁺ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates[J]. *Nature*, 2018, 557(7706): 575-579. DOI: 10.1038/s41586-018-0130-2.
- [26] OLIVEIRA G, STROMHAUG K, KLAEGER S, *et al.* Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8⁺ T cells in melanoma[J]. *Nature*, 2021, 596(7870): 119-125. DOI: 10.1038/s41586-021-03704-y.
- [27] MAURICE N J, TABER A K, PRLIC M. The ugly duckling turned to swan: a change in perception of bystander-activated memory CD8 T cells[J]. *J Immunol*, 2021, 206(3): 455-462. DOI: 10.4049/jimmunol.2000937.
- [28] YATES K B, TONNERRE P, MARTIN G E, *et al.* Epigenetic scars of CD8⁺ T cell exhaustion persist after cure of chronic infection in humans[J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(8): 1020-1029. DOI: 10.1038/s41590-021-00979-1.
- [29] BAXTER A E, HUANG H, GILES J R, *et al.* The SWI/SNF chromatin remodeling complexes BAF and PBAF differentially regulate epigenetic transitions in exhausted CD8⁺ T cells[J]. *Immunity*, 2023, 56 (6): 1320-1340. DOI: 10.1016/j.immuni.2023.05.008.
- [30] LI H J, VAN DER LEUN A M, YOFE I, *et al.* Dysfunctional CD8T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma[J/OL]. *Cell*, 2020, 181(3): 747[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32359441/>. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.017.
- [31] OH D Y, FONG L, NEWELL E W, *et al.* Toward a better understanding of T cells in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(12): 1549-1552. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.11.010.
- [32] BAULU E, GARDET C, CHUVIN N, *et al.* TCR-engineered T cell therapy in solid tumors: State of the art and perspectives[J/OL]. *Sci Adv*, 2023, 9(7): eadf3700[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9931212/>. DOI: 10.1126/sciadv.adf3700.
- [33] MITRA A, KUMAR A, AMDARE N P, *et al.* Current landscape of cancer immunotherapy: harnessing the immune arsenal to overcome immune evasion[J/OL]. *Biology*, 2024, 13(5): 307[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1118874/>. DOI: 10.3390/biology13050307.
- [34] HONDOWICZ B D, SCHWEDHELM K V, KAS A, *et al.* Discovery of T cell antigens by high-throughput screening of synthetic minigene libraries[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29949 [2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22253836/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0029949.
- [35] LOWERY F J, KRISHNA S, YOSSEF R, *et al.* Molecular signatures of antitumor neoantigen-reactive T cells from metastatic human cancers[J]. *Science*, 2022, 375(6583): 877-884. DOI: 10.1126/science.abl5447.
- [36] LEVIN N, KIM S P, MARQUARDT C A, *et al.* Neoantigen-specific stimulation of tumor-infiltrating lymphocytes enables effective TCR isolation and expansion while preserving stem-like memory phenotypes[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(5): e008645[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1141192/>. DOI: 10.1136/jitc-2023-008645.
- [37] WOOLDRIDGE L, EKERUCHE-MAKINDE J, VAN DEN BERG H A, *et al.* A single autoimmune T cell receptor recognizes more

- than a million different peptides[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(2): 1168-1177. DOI: 10.1074/jbc.M111.289488.
- [38] JIANG N, MALONE M, CHIZARI S. Antigen-specific and cross-reactive T cells in protection and disease[J]. *Immunol Rev*, 2023, 316(1): 120-135. DOI: 10.1111/imr.13217.
- [39] HE J J, XIONG X X, YANG H, *et al.* Defined tumor antigen-specific T cells potentiate personalized TCR-T cell therapy and prediction of immunotherapy response[J]. *Cell Res*, 2022, 32(6): 530-542. DOI: 10.1038/s41422-022-00627-9.
- [40] SPIGA M, MARTINI E, MAFFIA M C, *et al.* Harnessing the tumor microenvironment to boost adoptive T cell therapy with engineered lymphocytes for solid tumors[J/OL]. *Semin Immunopathol*, 2024, 46(3/4): 8[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39060547/>. DOI: 10.1007/s00281-024-01011-y.
- [41] MORAD G, HELMINK B A, SHARMA P, *et al.* Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade[J/OL]. *Cell*, 2022, 185(3): 576[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35120665/>. DOI: 10.1016/j.cell.2022.01.008.
- [42] AGGARWAL C, BEN-SHACHAR R, GAO Y J, *et al.* Assessment of tumor mutational burden and outcomes in patients with diverse advanced cancers treated with immunotherapy[J/OL]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(5): e2311181[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10155064/>. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2023.11181.
- [43] GORLOV I P, GORLOVA O Y, TSAVACHIDIS S, *et al.* Strength of selection in lung tumors correlates with clinical features better than tumor mutation burden[J/OL]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 12732[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11148192/>. DOI: 10.1038/s41598-024-63468-z.
- [44] GROENEVELD C S, FONTUGNE J, CABEL L, *et al.* Tertiary lymphoid structures marker CXCL13 is associated with better survival for patients with advanced-stage bladder cancer treated with immunotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2021, 148: 181-189. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.01.036.
- [45] ABED A, BEASLEY A B, REID A L, *et al.* Circulating pre-treatment T-cell receptor repertoire as a predictive biomarker in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer patients treated with pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy[J/OL]. *ESMO Open*, 2023, 8(6): 102066[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10774950/>. DOI: 10.1016/j.esmoop.2023.102066.
- [46] PAN M Y, LI B. T cell receptor convergence is an indicator of antigen-specific T cell response in cancer immunotherapies[J/OL]. *Elife*, 2022, 11: e81952[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9683788/>. DOI: 10.7554/eLife.81952.
- [47] LOONEY T J, TOPACIO-HALL D, LOWMAN G, *et al.* TCR convergence in individuals treated with immune checkpoint inhibition for cancer[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2985[2024-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31993050/>. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02985.
- [48] NAIDUS E, BOUQUET J, OH D Y, *et al.* Early changes in the circulating T cells are associated with clinical outcomes after PD-L1 blockade by durvalumab in advanced NSCLC patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(7): 2095-2102. DOI: 10.1007/s00262-020-02833-z.
- [49] SUDMEIER L J, HOANG K B, NDUOM E K, *et al.* Distinct phenotypic states and spatial distribution of CD8⁺ T cell clonotypes in human brain metastases[J/OL]. *Cell Rep Med*, 2022, 3(5): 100620[2024-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9133402/>. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100620.

[收稿日期] 2024-03-26

[修回日期] 2024-08-12

[本文编辑] 黄静怡