DOI:10.16016/j.2097-0927.202401015

B 细胞在荷瘤小鼠 PD-(L)1 抗体治疗中的作用

侯俊雷[1],杨学智[1,2],董 芬[1,3],查皓然[4],杨 菲[1],朱 波[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院全军肿瘤研究所[1];130062 长春,解放军第九六四医院放射科[2];400054 重庆,重庆理工大学药学与生物工程学院[3];100088 北京,解放军火箭军特色医学中心肿瘤科[4]

[摘要] **目的** 探讨肿瘤浸润性 B 细胞对程序性死亡受体(配体)1[programmed death (ligand) 1,PD-(L)1]抑制剂治疗效果的影响,阐明 B 细胞影响免疫治疗的潜在机制。**方法** 通过使用公共数据库中的黑色素瘤患者免疫治疗队列,分析 B 细胞与无进展生存时间(progression-free survival,PFS)以及免疫治疗响应的关系;使用 TC-1 和 B16-OVA 肿瘤细胞对 6~8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠的皮下及肝脏进行荷瘤,构建肿瘤模型。比较 B 细胞清除对 PD-(L)1 抗体治疗效果的影响;对第 15 天的 TC-1 肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)进行流式细胞术检测,明确 T 细胞的数目、功能及表型变化;通过流式细胞术及实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qPCR)检测 B 细胞表面分子以及细胞因子。**结果** 基于 ICBatlas 公共数据库中的 ERP105482 数据分析,肿瘤中 CD19 高表达的黑色素瘤患者 PFS 较低表达者更长(753 d *vs* 95 d,$HR=0.3$,95%*CI*:0.13~0.65,$P=0.003$)。B 细胞在免疫治疗应答的患者中显著富集($P=0.01$)。在小鼠 TC-1 肝脏荷瘤模型中,PD-(L)1 抗体治疗后肿瘤质量明显减小($P<0.01$),而 B 细胞的清除削弱了治疗效果。B 细胞通过促进 T 细胞浸润和功能来增强 PD-(L)1 抗体治疗,且治疗后 B 细胞亚群发生变化,表现为 PD-1 低表达亚群增加($P<0.01$)。**结论** PD-(L)1 抗体治疗后,B 细胞亚群中 PD-1 表达的下降可能是 B 细胞促进 PD-(L)1 抗体治疗效果的潜在机制。

[关键词] 程序性死亡受体配体 1;程序性死亡受体 1;B 细胞;肿瘤微环境;免疫检查点抑制剂
[中图法分类号] R392.12;R730.51;R739.5 [文献标志码] A

Role of B cells in anti-PD-(L)1 therapy in tumor bearing mice

HOU Junlei[1], YANG Xuezhi[1,2], DONG Fen[1,3], ZHA Haoran[4], YANG Fei[1], ZHU Bo[1] [1]Institute of Cancer, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Department of Radiology, No. 964 Hospital of Chinese PLA, Changchun, Jilin Province, 130062; [3]School of Pharmacy & Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing, 400054; [4]Department of Oncology, PLA Rocket Force Medical Center of PLA, Beijing, 100088, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of tumor-infiltrating B cells on the therapeutic efficacy of programmed death ligand-1 [PD-(L)1] inhibitors and elucidate the potential mechanisms. **Methods** Based on immunotherapy cohorts for melanoma patients in public databases, the relationship of B cells with progression-free survival (PFS) and response to immune checkpoint inhibitors treatment was analyzed. TC-1 and B16-OVA cells were implanted subcutaneously and in the liver in 6-8-week-old female C57BL/6 mice to establish tumor xenograft models. The effect of B cell clearance on PD-(L)1 therapy was compared. Flow cytometry was performed on the 15th day of TC-1 tumor microenvironment (TME) to confirm the number, function and phenotypic changes of T cells. Flow cytometry and quantitative real-time polymerase

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82272808)
[通信作者] 朱 波,E-mail:bo.zhu@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(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/)

chain reaction (qPCR) were used to detect B cell surface molecules and cytokines. **Results** Based on ERP105482 data from the ICBatlas public database, high CD19 expression in the tumors was associated with longer PFS in melanoma patients (753 *vs* 95 d, $HR=0.3$, 95%CI: 0.13~0.65, $P=0.003$). B cells were significantly enriched in immunotherapy-responsive patients ($P=0.01$). In a mouse TC-1 liver-loaded tumor model, PD-(L)1 antibody treatment reduced tumor mass ($P<0.01$), whereas B-cell clearance attenuated the therapeutic efficacy. B cells enhanced PD-(L)1 antibody treatment by promoting T cell infiltration and function, and the treatment resulted in changes in B cell subsets, as evidenced by an increase in PD-1 low-expressing subsets ($P<0.01$). **Conclusion** After PD-(L)1 treatment, a decrease in PD-1 expression on B cell subsets might be one of the potential mechanisms by which B cells enhance the efficacy of PD-(L)1 therapy.

[**Key words**] programmed cell death ligand 1; programmed cell death 1; B cells; tumor microenvironment; immune checkpoint inhibitors

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82272808). Corresponding author: ZHU Bo, E-mail: bo.zhu@tmmu.edu.cn

免疫检查点抑制剂,特别是针对程序性死亡受体(配体)1[programmed death (ligand) 1,PD-(L)1]的抗体,已经彻底改变了肿瘤治疗的临床格局。这些疗法通过恢复肿瘤浸润性 $CD8^+$T 细胞的功能,激发强大的抗肿瘤免疫反应。然而,单药治疗的有效率仅约20%,限制其广泛应用[1]。当前研究正聚焦于肿瘤内细胞亚群的功能及其对免疫治疗反应的影响,以揭示提高疗效的关键机制[2-3]。B 细胞作为肿瘤浸润性淋巴细胞中较为丰富的细胞类型之一[4],参与肿瘤免疫中从抗原递呈到抗体产生的全部过程,在肿瘤免疫中发挥着至关重要的作用[5]。

此外,B 细胞正在成为预测免疫治疗反应的关键因素[6-9]。在 2020 年,Nature 连续发表了 3 篇关于 B 细胞与免疫治疗关系的临床研究。比如在软组织肉瘤中,无论 $CD8^+$T 细胞的数量多少,B 细胞都是与免疫治疗响应最为强烈的预后因素[6],强调了 B 细胞在免疫治疗中的重要作用。尽管 B 细胞与免疫治疗的关系逐渐受到重视,但其具体作用机制仍不清楚。此外,在其他疗法如新辅助化疗中,表达诱导型 T 细胞共刺激分子(inducible co-stimulator ligand,ICOSL)的 B 细胞能够提高乳腺癌患者对化疗的敏感性,与更长的无病生存时间相关[10]。因此,本实验旨在探究 B 细胞与 PD-(L)1 抗体治疗效果的关系及其潜在机制,为开发基于 B 细胞的免疫治疗策略提供理论依据,以提高抗肿瘤治疗效果。

1 材料与方法

1.1 临床免疫治疗队列

免疫治疗队列来源于公共数据库 ICBatlas 中的 ERP105482 数据[2]。该免疫治疗队列由接受 PD-1 抗体治疗的 41 例黑色素瘤患者组成,其中免疫治疗应答患者 19 例,免疫治疗非应答患者 22 例。

1.2 实验动物和 B 细胞体内清除治疗和 PD-(L)1 抗体治疗策略

使用的 6~8 周龄 C57BL/6 雌鼠购自北京华阜康公司。为确保实验结果的随机性和公正性,对所有小鼠进行编号,并根据实验需求采用随机数字表法进行分组。①肿瘤生长曲线测定实验:对照组(仅 PBS 治疗)、PD-(L)1 抗体治疗组(仅免疫治疗,不清除 B 细胞)、B 细胞清除组(仅清除 B 细胞,不免疫治疗)和 B 细胞清除+PD-(L)1 抗体治疗组(同时进行免疫治疗和 B 细胞清除),每组 7 只小鼠。②组织中 B 细胞数目实验:分为皮下荷瘤组和肝脏荷瘤组,均清除 B 细胞。分别为 4 只(TC-1 荷瘤)或 8 只(B18-OVA 荷瘤)小鼠。③测定 T 细胞数目和功能实验:分组与肿瘤生长曲线测定实验相同,对照组、B 细胞清除组和 PD-(L)1 抗体治疗组,每组 7 只小鼠,B 细胞清除+PD-(L)1 抗体治疗组 8 只小鼠。④测定 T 细胞耗竭表型实验:分组与肿瘤生长曲线测定实验相同,B 细胞清除组 7 只小鼠,其余 3 组 9 只小鼠。⑤实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qPCR)实验:分为对照组(仅 PBS 治疗)和 PD-(L)1 抗体治疗组(仅免疫治疗),每组 6 只小鼠。

其中,清除 B 细胞采用第 4、8、12 天腹腔注射抗 B220 抗体[200 μg,Clone RA3.3A1/6.1(TIB-146),Bio X Cell]和抗 CD19 抗体(100 μg,Clone 1D3,Bio X Cell)。PD-(L)1 抗体免疫治疗分别在第 6、9、12 天腹腔注射 PD-(L)1 抗体(200 μg,Clone 10F.9G2,Bio X Cell)。

所有实验小鼠在特定的无病原体条件下饲养。小鼠的饲养和治疗遵循陆军军医大学动物护理和使用委员会的指导原则。本文涉及的动物实验获得了陆军军

医大学动物保护与使用委员会审批(AMUWE2019319)。

1.3 细胞系以及培养条件

TC-1 以及 B16-OVA 肿瘤细胞在包含 10%灭活胎牛血清(FBS,Gibco,澳大利亚)以及青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)的 Dulbecco's Modified Eagle 培养基(DMEM,Gibco,澳大利亚)中培养。并在 37 ℃、5% CO_2 条件下进行孵育培养。

1.4 荷瘤实验

小鼠皮下荷瘤模型:将 5×10^5 TC-1 肿瘤以及 B16-OVA 肿瘤细胞重悬在 100 μL 的 PBS 缓冲液中,在第 1 天通过胰岛素针将细胞悬液注射到小鼠右背侧皮下以建立肿瘤。小鼠肝脏原位肿瘤模型:将 5×10^5 TC-1 或 B16-OVA 肿瘤细胞重悬在 25 μL 的含有 60%基质胶的 PBS 缓冲液中,在第 1 天麻醉小鼠后,暴露其左侧肝叶并用胰岛素针注射细胞悬液以形成肿瘤。实验过程中,在指定时间点对小鼠进行安乐死处理。

1.5 单细胞悬液的制备

使用剪刀将肿瘤组织剪碎,将组织浸泡在含有 RMPI 1640、2% FBS(天津 TBD)和 1 mg/mL 的Ⅰ型胶原酶(Sigma)的消化液中,并在 37 ℃,148 r/min 的摇床中消化 30 min。通过 70 μm 滤网研磨过滤,制备成单细胞悬液。

1.6 流式细胞术检测和相关抗体

首先使用 Fixable Viability Dye eFluor 780(eBioscience)抗体来确定活细胞。实验使用的抗体包括:抗 CD45(Clone 30-F11,Biolegend)、抗 CD3(Clone 17A2,Biolegend)、抗 CD8a(Clone 53-6.7,Biolegend)、抗 CD4 (Clone RM4-5,Biolegend)、抗 Foxp3(Clone MF-14,Biolegend)、抗 CD19(Clone 6D5,Biolegend)、抗 CD11b(Clone M1170,Biolegend)、抗 IFN-γ(Clone XMG1.2,Biolegend)、抗 TNF-α(Clone MP6-XT22,Biolegend)、抗 PD-1(Clone 29F.1A12,Biolegend)、抗 TIM-3(Clone FAB1529P,R&D)抗体。表面抗体由 4 ℃包含 2% FBS 的 PBS 稀释,并避光,染色 30 min。对于胞内因子染色,首先使用佛波酯(50 ng/mL,Sigma-Aldrich)加上离子霉素(500 ng/mL,Abcam)和包含布雷非德菌素 a 的蛋白转运抑制剂(BD Biosciences)。5 h 后对细胞进行死细胞和表面标志物染色,固定细胞,并按照生产商的说明使用固定/通透液(BD Biosciences)进行处理。然后用细胞因子抗体对细胞进行染色。使用 Gallios 流式细胞仪(Beckman Coulter)收集流式数据,并使用 FlowJo 软件(BD Biosciences)进行分析。

1.7 流式细胞分选(fluorescence-activated cell sorting,FACS)

使用 Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience)流式抗体,抗 CD45(Clone 30-F11, Biolegend)、抗 CD19(Clone 6D5, Biolegend)、抗 CD11b(Clone M1170, Biolegend)流式抗体对制备成的单细胞悬液进行染色。然后使用 FACS Aria Ⅱ细胞分选仪(BD Biosciences)对 $CD45^+CD11b^-CD19^+$B 细胞进行分选。

1.8 qPCR 实验

根据使用说明书,将流式细胞仪分选出的 $CD45^+CD11b^-CD19^+$B 细胞用 100 μL lysis 缓冲液重悬。随后,使用 Dynabeads™ mRNA DIRECT™ 微量纯化试剂盒提取 B 细胞中的 mRNA。提取得到 mRNA 使用 LightCycler(Roche Diagnostics)进行反转录。qPCR 分析所需的引物见表 1。

1.9 统计学分析

实验均重复 2~3 次以确保结果的可靠性。实验数据使用 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software)进行分析。对于肿瘤生长曲线采用双因素方差分析。对于符合正态分布的数据,两组间比较采用双尾学生 t 检验;对于多组间比较,使用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

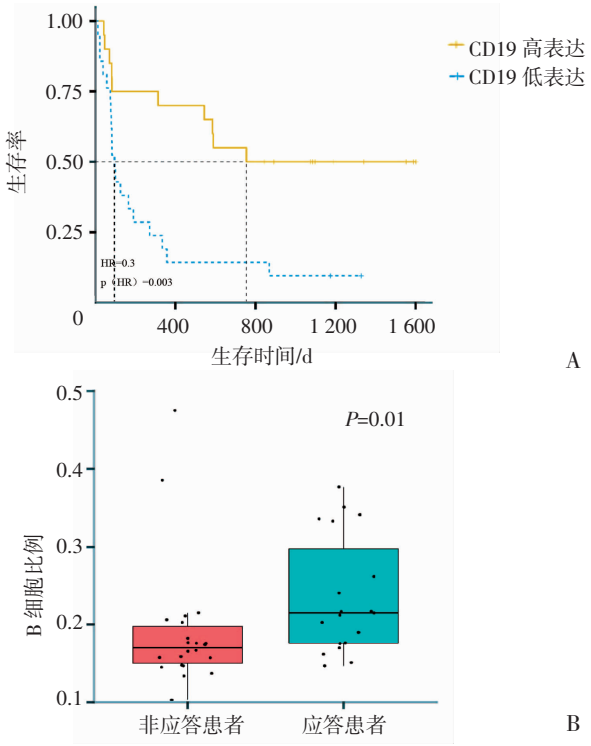
表 1 qPCR 引物序列

基因名称	正向引物序列(5′-3′)	反向引物序列(5′-3′)
ICOSL	TAAAGTGTCCCTGTTTTGTGTCC	ATTGCACCGACTTCAGTCTCT
CR2	AACACATGGTTACCAGGTGTACC	CGTGCCTCTCCAGCCATAAG
CD86	TGTTTCCGTGGAGACGCAAG	TTGAGCCTTTGTAAATGGGCA
H2-Eb1	GCGGAGAGTTGAGCCTACG	CCAGGAGGTTGTGGTGTTCC
PD1	ACCCTGGTCATTCACTTGGG	CATTTGCTCCCTCTGACACTG
PDL1	GCTCCAAAGGACTTGTACGTG	TGATCTGAAGGGCAGCATTTC
IL-10	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
TGF-β	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
β-actin	CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC	AGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT

2 结果

2.1 B 细胞与黑色素瘤患者中更好的免疫治疗预后相关

通过对公共数据库 ICBatlas 中的免疫治疗队列分析,发现在接受 PD-1 抗体治疗的 41 例黑色素瘤患者中(ERP105482),治疗前肿瘤组织中 $CD19^+$ B 细胞数目较多(CD19 高表达)的患者无进展生存时间(progression-free survival,PFS)较 CD19 低表达的更长(753 d *vs* 95 d,$P=0.003$,$HR=0.3$,95%CI:0.13~0.65,图 1A)。同时,免疫治疗应答患者肿瘤组织中的 B 细胞的比例为 0.22%,显著高于非应答患者中的比例(0.17%,$P=0.01$,图 1B)。这些结果说明在黑色素瘤患者中,较高的 B 细胞数目与更好的免疫治疗预后相关。



A:在接受免疫治疗的黑色素瘤患者($n=41$)中 CD19 高、低表达的无进展生存曲线;B:免疫治疗应答患者($n=19$)和非应答患者($n=22$)中 B 细胞的比例

图 1 B 细胞数目与黑色素瘤患者免疫治疗预后的关系

2.2 B 细胞不影响皮下荷瘤小鼠 PD-(L)1 抗体治疗的效果

为了验证临床中观察到的 B 细胞对 PD-(L)1 抗体治疗的影响,采用 TC-1 皮下荷瘤小鼠模型,联合使用抗 B220 和抗 CD19 抗体清除体内 B 细胞,观察 B 细胞是否影响 PD-(L)1 抗体治疗的效果。结果显示,TC-1 肿瘤细胞对 PD-(L)1 抗体治疗具有抵抗性($P>0.05$),但清除 B 细胞不影响免疫治疗的效果(图 2)。结果提示,在小鼠皮下荷瘤模型中 B 细胞清除不影响免疫治疗的效果。

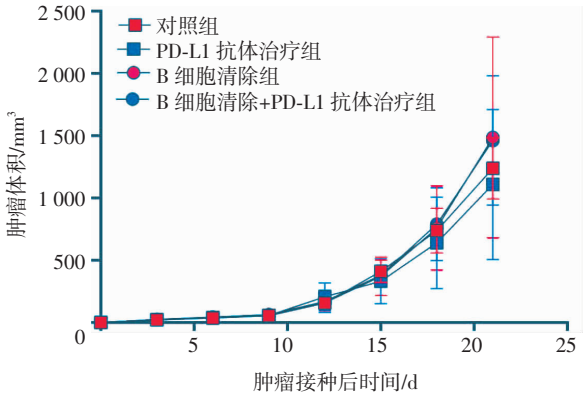


图 2 C57BL/6 小鼠皮下荷瘤 TC-1 肿瘤生长曲线

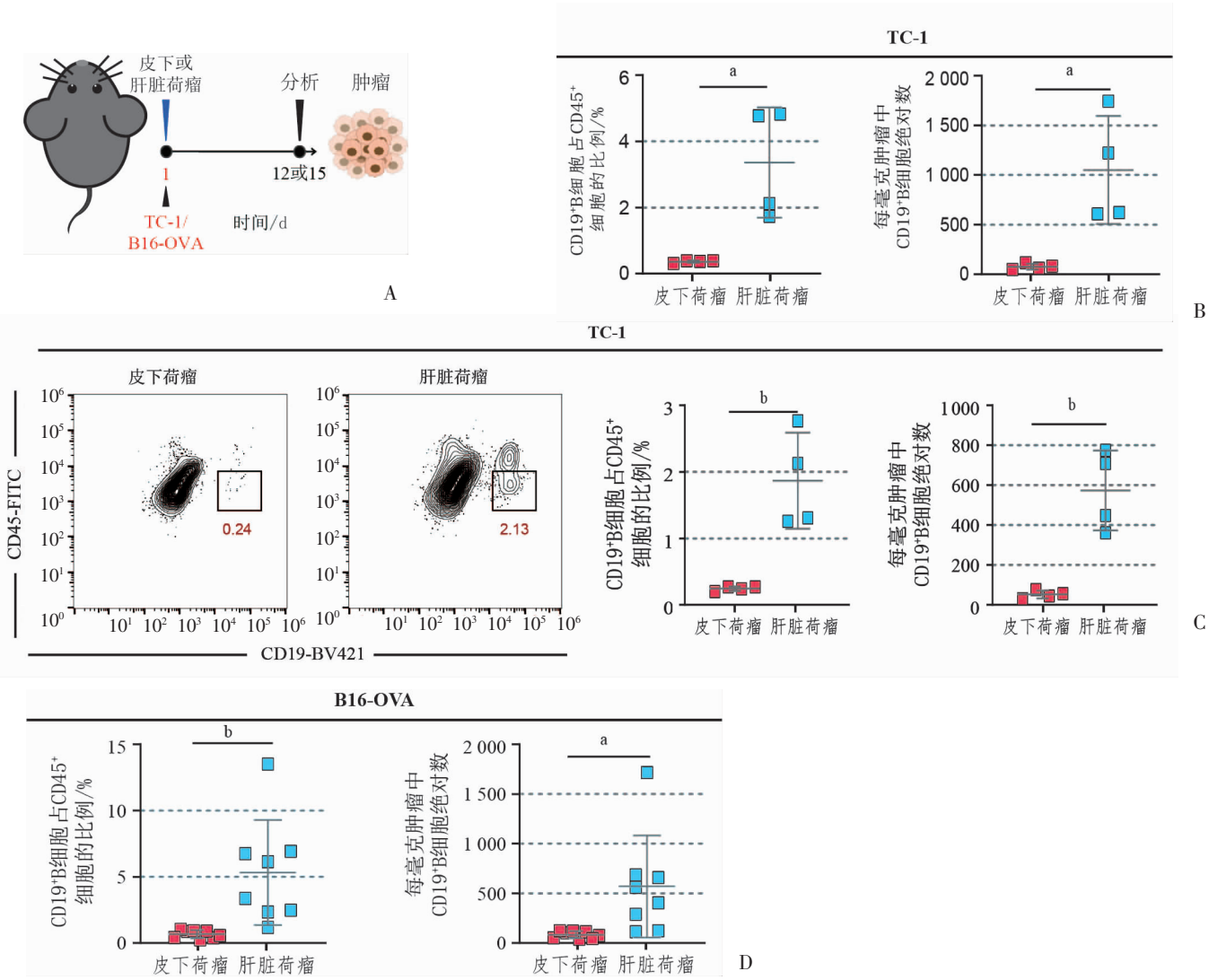
($n=7$,$\bar{x}\pm s$)

2.3 肿瘤浸润性 B 细胞在肝脏肿瘤中富集

小鼠皮下黑色素瘤中 B 细胞的浸润较少,可能影响免疫治疗效果。为了验证这一猜想,在小鼠皮下和肝脏分别注射 TC-1 肿瘤,并于第 12 天对肿瘤中的 B 细胞进行流式细胞术检测(图 3A)。结果显示,肝脏肿瘤中 B 细胞的数目和比例是皮下荷瘤模型的 10 倍(图 3B)。为排除外周血中 B 细胞的干扰,通过尾静脉注射 CD45-FITC 抗体标记外周血中的 B 细胞,结果一致(图 3C)。第 15 天,在 B16-OVA 肿瘤模型中也得到了相同的结果(图 3D)。这些结果说明,B 细胞在肝脏中更为富集,而在皮下荷瘤模型中相对较少。

2.4 清除 B 细胞抑制肝脏荷瘤小鼠 PD-(L)1 抗体治疗的效果

为了探究 B 细胞在肝脏中对 PD-(L)1 抗体治疗效果的具体影响,在肿瘤接种后的第 4、8、12 天使用 B 细胞体内清除抗体来清除 B 细胞,并在第 6、9、12 天进行 PD-(L)1 抗体治疗(图 4A),随后验证 B 细胞的清除效果。结果显示:无论在肿瘤微环境中(tumor microenvironment,TME)还是外周血中,联合使用抗 B220 和抗 CD19 抗体有效清除了 B 细胞(图 4B、C)。实验结果表明:使用 PD-(L)1 抗体单药治疗可有效减轻肝脏的肿瘤负荷。但是,在清除 B 细胞后,PD-(L)1 抗体治疗的效果被抑制(图 4D、E)。提示 B 细胞浸润数目的差异可能是导致皮下和肝脏肿瘤模型中 B 细胞对免疫治疗产生不同影响的原因。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:实验流程;B:TC-1 皮下荷瘤以及肝脏荷瘤中 B 细胞的比例和绝对数比较($n=4$);C:TC-1 皮下及肝脏荷瘤中肿瘤浸润性 B 细胞的流式细胞术检测结果、比例和绝对数比较($n=4$);D:B16-OVA 皮下及肝脏荷瘤中 B 细胞的比例和绝对数比较($n=8$)

图 3 小鼠荷瘤实验及皮下肿瘤和肝脏肿瘤中 B 细胞数目 ($\bar{x}\pm s$)

2.5 B 细胞清除导致 PD-(L)1 抗体治疗无法促进 T 细胞浸润

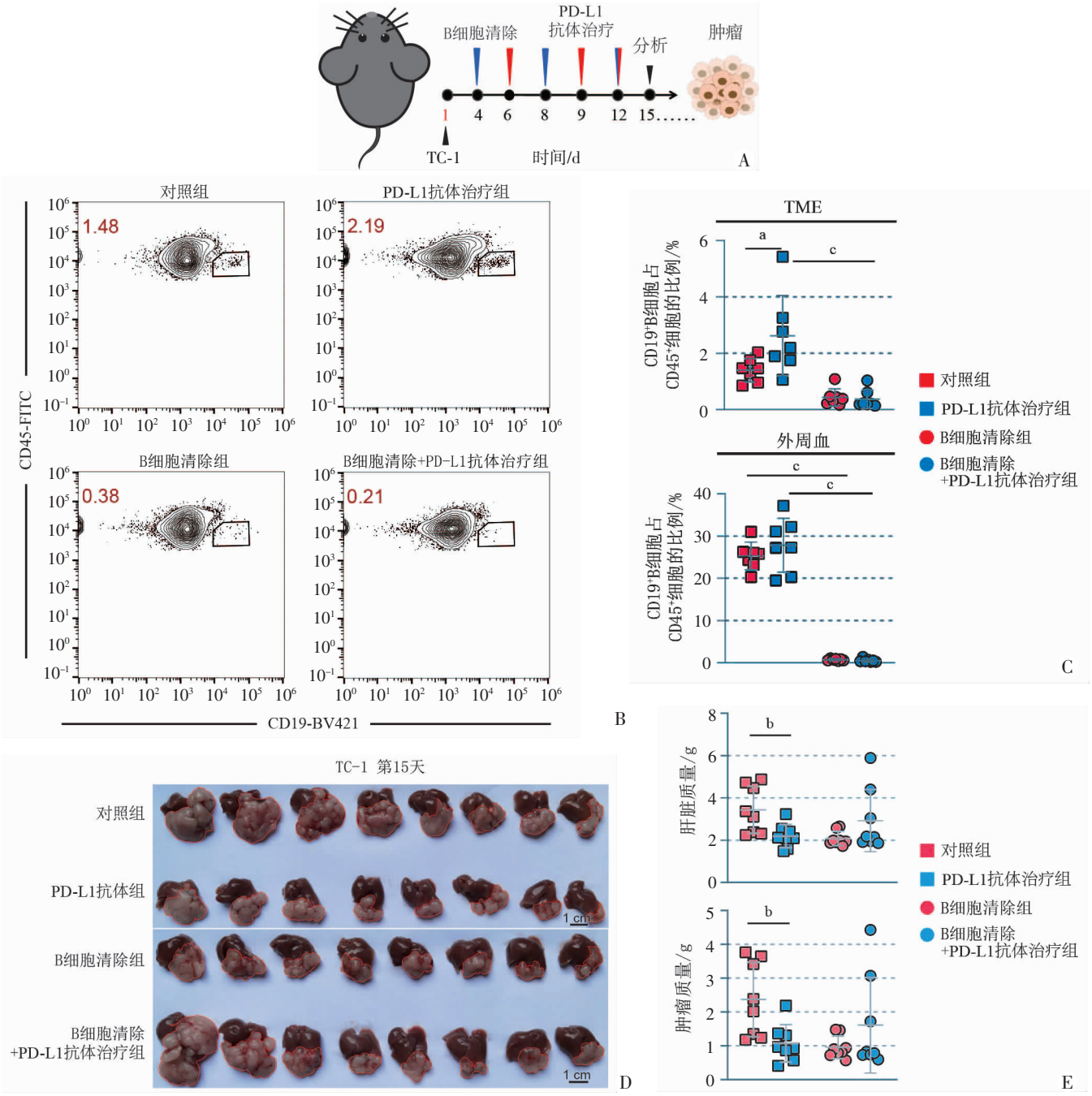
T 细胞数量在免疫治疗中起着关键作用。为了探究其影响,对 TME 中的 T 细胞浸润进行检测,结果显示,PD-(L)1 治疗导致肿瘤质量减小与 $CD3^+$T 细胞数目的增加相关,尽管未达到统计学差异,然而,当 B 细胞被清除时,PD-(L)1 抗体治疗无法有效地促进 T 细胞的浸润增加(图 5A)。此外,类似的现象也在 $CD8^+$ T 细胞和 $CD4^+$T 细胞中观察到(图 5B、C)。值得注意的是,B 细胞的清除并未对调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)的比例产生影响(图 5D)。通过流式细胞术检测 T 细胞数量,发现 B 细胞的存在能够有效促进 PD-(L)1 抗体治疗导致的 T 细胞浸润增加。

2.6 B 细胞清除导致 PD-(L)1 抗体治疗无法激活 T 细胞功能

T 细胞分泌细胞因子的能力对 PD-(L)1 抗体治疗的效果十分重要,如 γ-干扰素(interferon-γ,INF-γ)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)。对 T 细胞功能的检测结果显示,在接受 PD-(L)1 抗体治疗后,无论 $CD8^+$ T 细胞还是 $CD4^+$ T 细胞,分泌 INF-γ 的能力均明显增加(图 6)。然而,当 B 细胞被清除后,PD-(L)1 抗体治疗促进 T 细胞分泌 INF-γ 的能力受到抑制。但是无论是否清除 B 细胞,都不影响 T 细胞分泌 TNF-α 的能力(图 6)。提示 B 细胞清除后,PD-(L)1 抗体治疗无法有效地促进 T 细胞分泌细胞因子。

2.7　B 细胞清除不影响 $CD8^+$T 细胞的耗竭

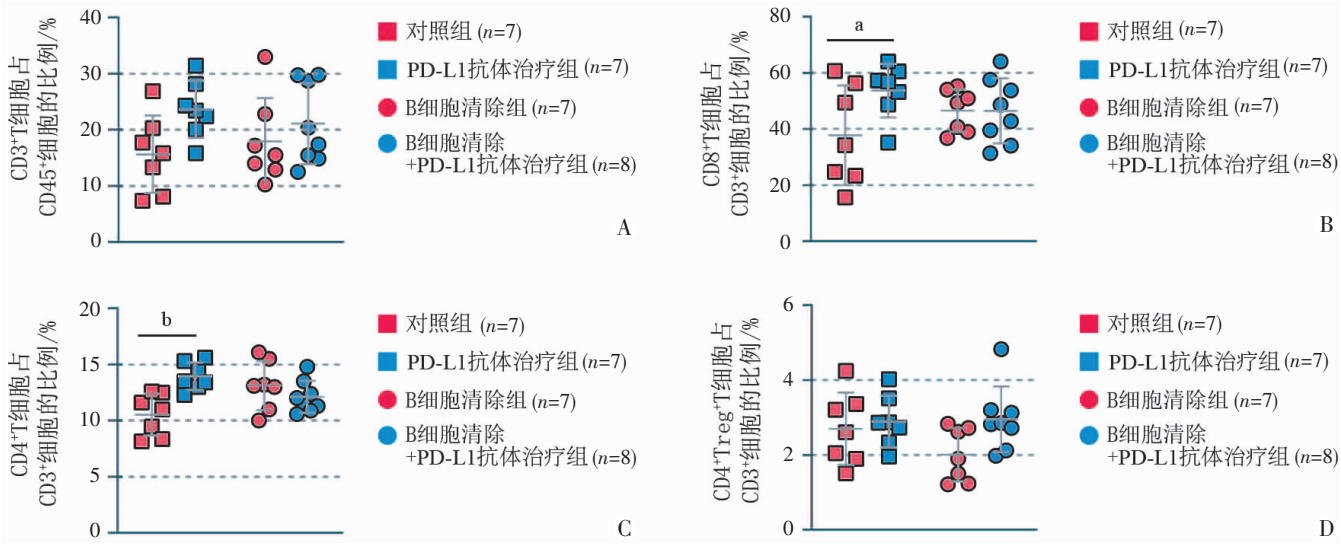
T 细胞耗竭(T cell exhaustion,Tex)其特征是表达多种免疫检测点抑制分子、细胞增殖能力下降以及细胞毒性下降。耗竭 T 细胞的数量影响 PD-(L)1 治疗的效果。通常使用 PD-1 和 T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白 3(T cell immunoglobulin and mucin-containing molecule 3,TIM3)检查点分子来识别肿瘤 Tex。实验结果表明,B 细胞的清除不影响 $CD8^+$Tex 的比例以及绝对数(图 7)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

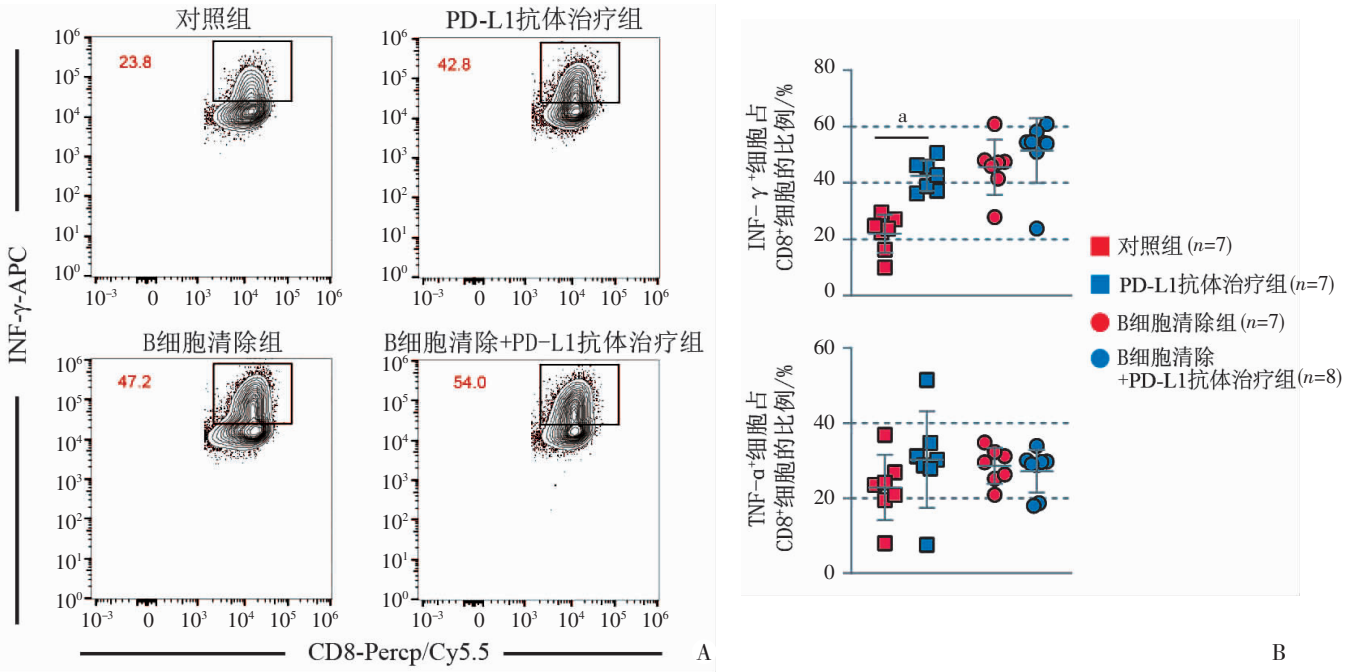
A:实验流程;B:流式细胞术检测 B 细胞清除效果;C:B 细胞在肿瘤微环境和外周血中的清除效果($n=7$);D:第 15 天各组小鼠肝脏肿瘤大体图像;E:TC-1 肝脏荷瘤第 15 天手术切除后肝脏质量和肿瘤质量($n=8$)

图 4　B 细胞对肝脏荷瘤小鼠 PD-(L)1 抗体治疗效果的影响　($\bar{x}\pm s$)



A:各组 $CD3^+T$ 细胞占 $CD45^+$ 免疫细胞中的比例;B:各组 $CD8^+T$ 细胞占 $CD3^+T$ 细胞中的比例 a:$P<0.05$;C:各组 $CD4^+T$ 细胞占 $CD3^+T$ 细胞中的比例;D:各组 $CD4^+Treg^+T$ 细胞占 $CD3^+T$ 细胞中的比例 b:$P<0.01$

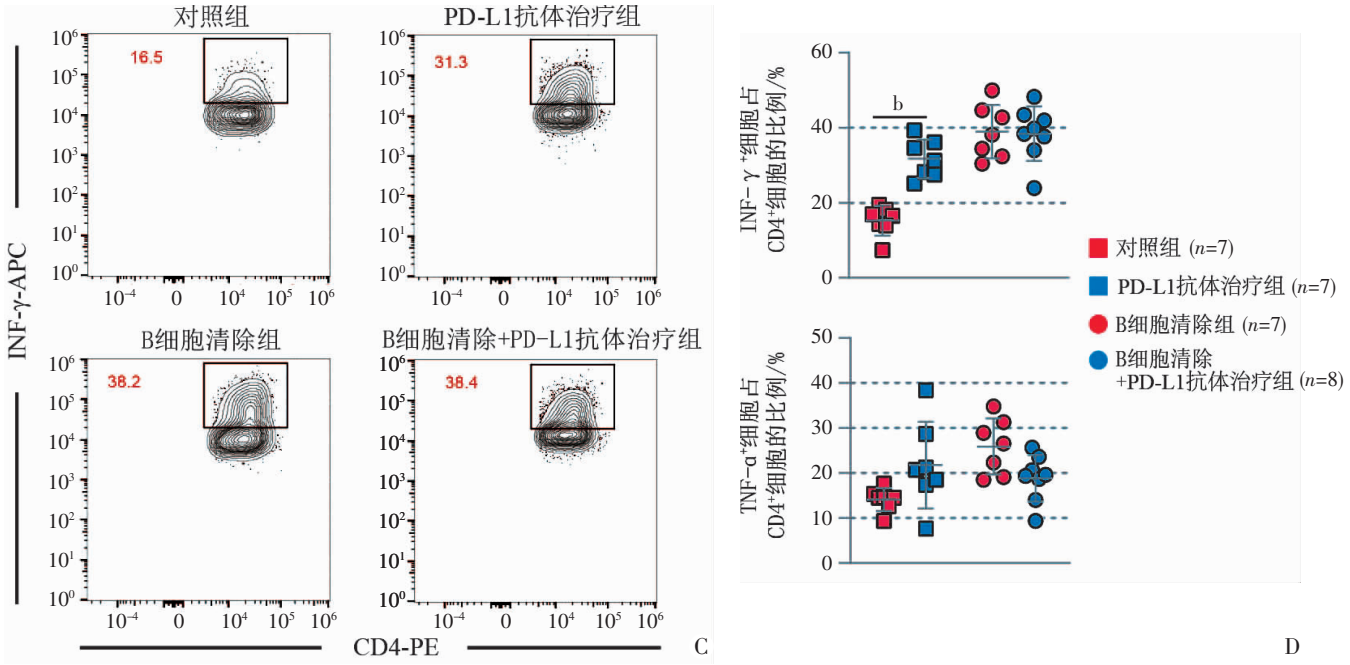
图 5 B 细胞清除对肿瘤微环境中 T 细胞数量的影响 ($\bar{x}\pm s$)



A:流式细胞术检测 INF-γ 在 $CD8^+T$ 细胞中的表达;B:TNF-α 细胞占 $CD8^+T$ 细胞的比例 a:$P<0.05$

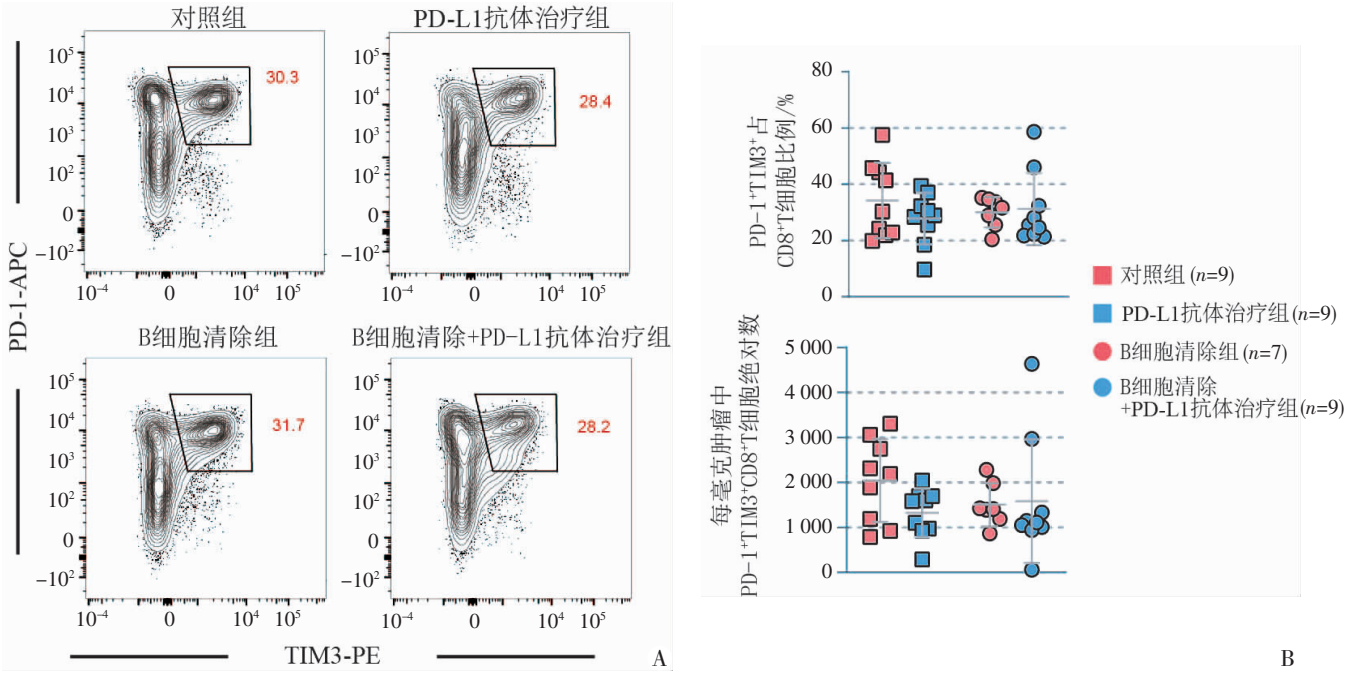
图 6 B 细胞清除对肿瘤微环境中 T 细胞功能的影响 ($\bar{x}\pm s$)

(图 6C、D 续下页)



C:流式细胞术检测 INF-γ 在 $CD4^+$T 细胞中的表达;D:TNF-α 细胞占 $CD4^+$T 细胞中的比例　b:$P<0.01$

续图 6　B 细胞清除对肿瘤微环境中 T 细胞功能的影响　($\bar{x}\pm s$)

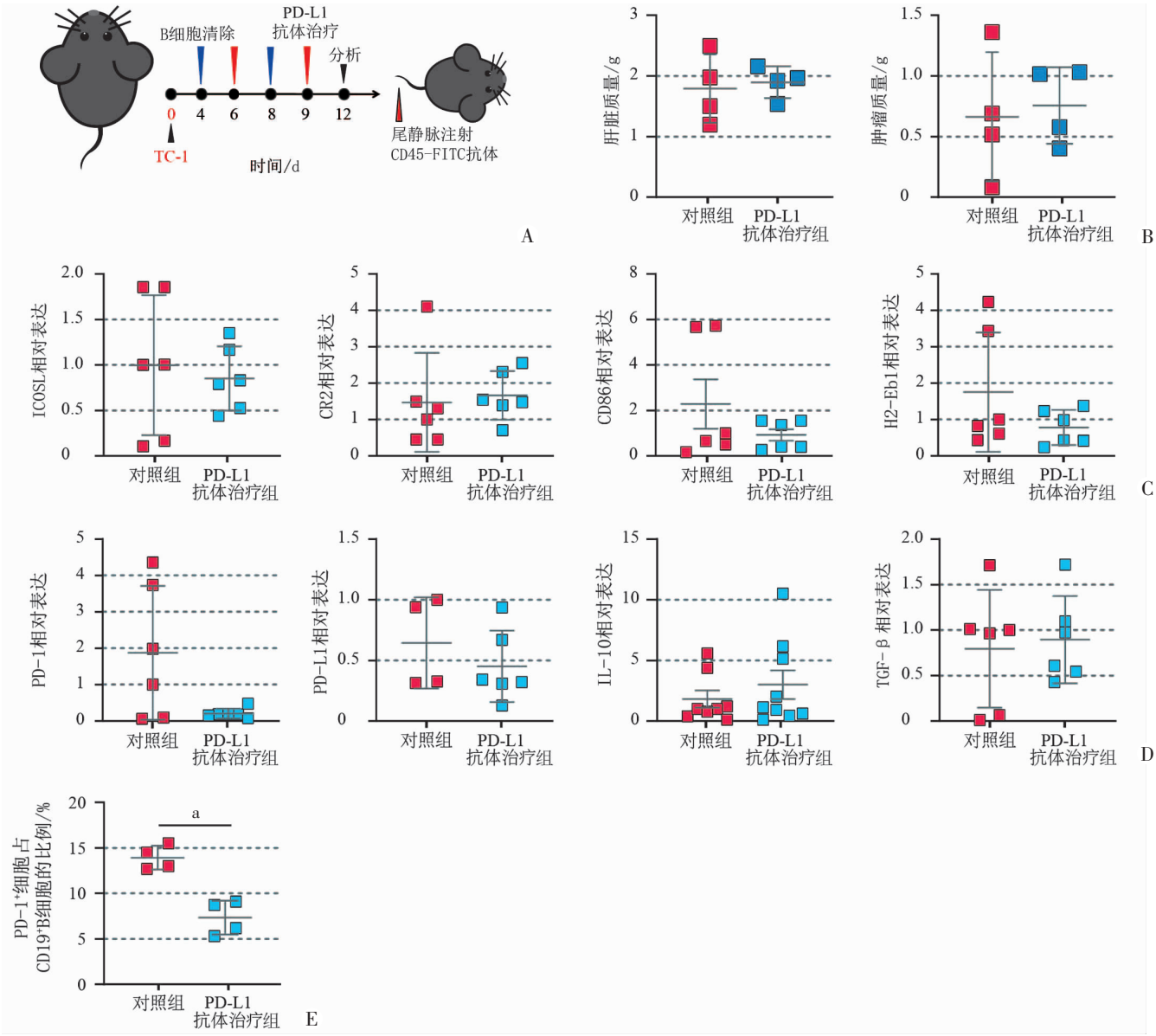


A:$PD\text{-}1^+TIM3^+$ 细胞在 $CD8^+$T 细胞中表达的代表性流式图;B:$PD\text{-}1^+TIM3^+$ 细胞占 $CD8^+$T 细胞中的比例和绝对数($\bar{x}\pm s$)

图 7　B 细胞清除对肿瘤微环境中耗竭 $CD8^+$T 细胞的影响

2.8　PD-(L)1 抗体治疗促进 B 细胞亚群的改变

为了深入探究免疫治疗对 B 细胞亚群的影响,并排除肿瘤大小对 B 细胞亚群的潜在影响,在肿瘤大小相同的情况下,对接受 PD-(L)1 抗体治疗的肿瘤浸润性 B 细胞表面相关分子进行了 qPCR 检测(图 8A、B)。首先,检测了与 B 细胞表面相关的效应分子,包括 ICOSL、Ⅱ补体受体(complement receptor 2,CR2)、CD86 和组织相容性 2,Ⅱ类抗原 Eβ(histocompatibility 2, class Ⅱ antigen E beta,H2-Eb1)。结果显示,在接受 PD-(L)1 抗体治疗后,这些分子的表达没有发生明显变化(图 8C)。接着,对 B 细胞表面相关的抑制性分子和细胞因子进行了检测。尽管 PD-(L)1、IL-10 和转化生长因子 β(transforming growth factor-β,TGF-β)相对表达量在接受 PD-(L)1 抗体治疗后并未发生显著变化(图 8D),但 B 细胞表面相关免疫检查点分子 PD-1 的表达在治疗后出现了下降($P=0.051$,图 8D)。这一发现也得到了流式细胞术检测结果的进一步验证(图 8E)。结果表明,免疫治疗会导致 $PD\text{-}1^+$B 细胞亚群向 $PD\text{-}1^-$B 细胞亚群转变,这可能是 B 细胞影响 PD-(L)1 抗体治疗效果的潜在机制。



A:实验方案流程;B:TC-1 肝脏荷瘤第 12 天手术切除后肝脏质量和肿瘤质量变化($n=4$);C:qPCR 检测 B 细胞表面相关效应分子相对表达量($n=6$);D:qPCR 检测 B 细胞表面相关抑制分子及其抑制性细胞因子相对表达量($n=6$);E:$PD\text{-}1^+$细胞占 $CD19^+$ B 细胞的比例($n=4$)　a:$P<0.01$

图 8　PD-(L)1 抗体治疗促进 $PD\text{-}1^-$B 细胞亚群增加　($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

尽管免疫治疗为肿瘤患者带来了新的希望,但是以 PD-(L)1 为代表的免疫检测点抑制剂仍然面临着效率低等挑战[1]。随着对肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte,TIL)研究的深入,在免疫治疗中,B 细胞的重要性逐渐被认识,而不再局限于以 T 细胞为核心的观点[2]。事实上,越来越多的研究已经证明 B 细胞与免疫治疗效果之间的紧密联系[6-9]。例如,在软组织肉瘤中,肿瘤内 B 细胞较多的患者与更好的免疫治疗客观反应率以及更长的 PFS 相关[6]。类似的结果也在黑色素瘤和肾癌中得到验证[7]。本实验的数据进一步支持了上述观点。在接受 PD-1 抗体治疗的黑色素瘤患者中,较多的 B 细胞数目与更长的 PFS 相关并且 B 细胞在免疫治疗响应患者中富集。

本研究聚焦于 B 细胞与免疫治疗的关系以及潜在的影响机制。为了在小鼠荷瘤模型中验证临床观察到的现象,首先采用最常见的小鼠皮下荷瘤模型进行验证,与之前的研究[11-12]相一致,TC-1 在皮下瘤模型中对免疫治疗表现出耐受性。值得注意的是,在此模型中,B 细胞的清除并未对免疫治疗的效果产生影响。这一结果与 DAMSKY 等[13]的研究结果一致。造成这种差异的主要原因是黑色素瘤患者肿瘤中具有较多的 B 细胞,而小鼠皮下瘤模型中较少[9,14]。为了深入理解这一差异,比较了不同模型中 B 细胞的数目。结果显示,肝脏肿瘤中 B 细胞的比例和数目是皮下肿瘤的 10 倍。这一发现提示,B 细胞的数目可能在免疫治疗中起到关键作用。本研究采用 TC-1 肝脏荷瘤模型显示,B 细胞清除会抑制 PD-(L)1 抗体治疗的效果,与临床中观察到的现象是一致的。此外,B 细胞的清除严重影响免疫治疗促进 T 细胞的浸润以及功能。综上所述,无论是临床数据还是动物模型的结果,都表明 B 细胞的存在可以促进免疫治疗的效果。

近期研究揭示了 B 细胞亚群在癌症免疫治疗中的重要作用。特别是在乳腺癌中,新辅助化疗后出现的 $ICOSL^+$B 细胞亚群被发现能够促进 T 细胞的抗肿瘤免疫[10]。黑色素瘤患者和结肠癌患者的单细胞测序数据也显示免疫治疗会导致 $TIM1^+$B 细胞比例下降[15]。进一步强调 B 细胞亚群对免疫治疗的关键作用,并且这些亚群可能会受到免疫治疗的影响。为了更深入的探究免疫治疗对 B 细胞的具体影响,采用 qPCR 对 B 细胞表面分子进行检测。这些分子包括与效应功能相关的 ICOSL[10,16]、抗原递呈相关分子 H2-EB1[17]、CD86[18]、活化相关分子 CR2[19-\20]。此外,检测了检查点分子 PD-(L)1[21]和抑制型细胞因子 IL-10[22]、TGF-β[23]。尽管这些分子在免疫治疗后并未发生显著变化,但 $PD\text{-}1^+$B 细胞的比例在治疗后下降。$PD\text{-}1^+$B 细胞在肝癌组织中被认为是具有促癌作用的调节性 B 细胞亚群[24]。B 细胞中特异性敲除 PD-1 会导致小鼠肿瘤负荷的减少[15]。因此,免疫治疗可能通过促进 B 细胞中 PD-1 表达的下降,从而增强了免疫治疗的效果。

尽管本研究揭示了 B 细胞在肿瘤免疫治疗中的重要角色,并初步探讨了其潜在机制,但实验设计仍存在一定的局限性。本实验中的临床队列仅限于黑色素瘤患者。尽管这一群体提供了宝贵的数据和见解,但为了更全面地理解 B 细胞与免疫治疗的关系,未来需要在多种肿瘤类型中进行类似的研究。这将有助于确认本实验的发现是否普遍适用于不同类型的癌症。其次,虽然在 TC-1 肿瘤模型中证明了 B 细胞对肿瘤免疫治疗的重要作用,但使用其他肿瘤模型和小鼠种系进行类似的研究仍然是必要的。这将有助于确认本实验的结果是否在不同背景下具有一致性和可靠性。

综上所述,本研究揭示了肿瘤免疫治疗深刻的重塑了肿瘤中的 B 细胞表型,并且 B 细胞在肿瘤免疫治疗中的重要作用,从而为开发基于 B 细胞的治疗策略提供新的思路和方向。

致谢 感谢陆军军医大学第二附属医院全军肿瘤研究所科研助理谢双龙、陆军军医大学 2021 级硕士研究生朱恩健以及 2018 级八年制学员童单在实验中给予的帮助。

参考文献:

[1] ANTONIA S, GOLDBERGS B, BALMANOUKIAN A, *et al*. Safety and antitumour activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study[J]. Lancet Oncol, 2016, 17(3): 299-308. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00544-6.

[2] GIDET N, QUEK C, MENZIES A M, *et al*. Distinct immune cell populations define response to anti-PD-1 monotherapy and anti-PD-1/anti-CTLA-4 combined therapy[J]. Cancer Cell, 2019, 35(2): 238-255. e6. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.01.003.

[3] NAKAMURA T, SATO T, ENDO R, *et al*. STING agonist loaded lipid nanoparticles overcome anti-PD-1 resistance in melanoma lung metastasis via NK cell activation[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(7): e002852. DOI: 10.1136/jitc-2021-002852.

[4] THORSSON V, GIBBSD L, BROWN S D, *et al*. The immune landscape of cancer[J]. Immunity, 2018, 48(4): 812-830. e14. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.023.

[5] LAUMONTC M, BANVILLE A C, GILARDI M, *et al*. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms,

clinical impact and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2022, 22(7): 414-430. DOI: 10.1038/s41568-022-00466-1.

[6] 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.

[7] HELMINKB A, REDDY S M, GAO J J, *et al*. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response [J]. Nature, 2020, 577(7791): 549-555. DOI: 10.1038/s41586-019-1922-8.

[8] 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.

[9] GRISS J, BAUER W, WAGNER C, *et al*. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4186. DOI: 10.1038/s41467-019-12160-2.

[10] LU Y W, ZHAO Q Y, LIAO J Y, *et al*. Complement signals determine opposite effects of B cells in chemotherapy-induced immunity[J]. Cell, 2020, 180(6): 1081-1097. e24. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.015.

[11] KANSAL V, BURNHAMA J, KINNEY B L C, *et al*. Statin drugs enhance responses to immune checkpoint blockade in head and neck cancer models[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(1): e005940. DOI: 10.1136/jitc-2022-005940.

[12] ZHU J J, NAULAERTS S, BOUDHAN L, *et al*. Tumour immune rejection triggered by activation of α2-adrenergic receptors[J]. Nature, 2023, 618(7965): 607-615. DOI: 10.1038/s41586-023-06110-8.

[13] DAMSKY W, JILAVEANU L, TURNER N, *et al*. B cell depletion or absence does not impede anti-tumor activity of PD-1 inhibitors[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 153. DOI: 10.1186/s40425-019-0613-1.

[14] LADÁNYI A, KISS J, MOHOS A, *et al*. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(12): 1729-1738. DOI: 10.1007/s00262-011-1071-x.

[15] BOD L, KYEY C, SHI J W, *et al*. B-cell-specific checkpoint molecules that regulate anti-tumour immunity [J]. Nature, 2023, 619(7969): 348-356. DOI: 10.1038/s41586-023-06231-0.

[16] NAYAR S, PONTARINI E, CAMPOS J, *et al*. Immunofibroblasts regulate LTα3 expression in tertiary lymphoid structures in a pathway dependent on ICOS/ICOSL interaction[J]. Commun Biol, 2022, 5(1): 413. DOI: 10.1038/s42003-022-03344-6.

[17] HONG S, ZHANG Z M, LIU H T, *et al*. B cells are the dominant antigen-presenting cells that activate naive $CD4^+$ T cells upon immunization with a virus-derived nanoparticle antigen[J]. Immunity, 2018, 49(4): 695-708. e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.08.012.

[18] WENNHOLD K, THELEN M, LEHMANN J, *et al*. $CD86^+$ antigen-presenting B cells are increased in cancer, localize in tertiary lymphoid structures, and induce specific T-cell responses[J]. Cancer Immunol Res, 2021, 9(9): 1098-1108. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0949.

[19] RICKLIN D, HAJISHENGALLIS G, YANG K, *et al*. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis[J]. Nat Immunol, 2010, 11(9): 785-797. DOI: 10.1038/ni.1923.

[20] CARROLLM C, ISENMAN D E. Regulation of humoral immunity by complement[J]. Immunity, 2012, 37(2): 199-207. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.08.002.

[21] WU H, XIA L M, JIA D D, *et al*. PD-(L)1^+ regulatory B cells act as a T cell suppressor in a PD-(L)1-dependent manner in melanoma patients with bone metastasis[J]. Mol Immunol, 2020, 119: 83-91. DOI: 10.1016/j.molimm.2020.01.008.

[22] SHALAPOUR S, FONT-BURGADA J, DI CARO G, *et al*. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy [J]. Nature, 2015, 521(7550): 94-98. DOI: 10.1038/nature14395.

[23] HARRISR J, WILLSMORE Z, LADDACH R, *et al*. Enriched circulating and tumor-resident TGF-β^+ regulatory B cells in patients with melanoma promote $FOXP3^+$ Tregs[J]. Oncoimmunology, 2022, 11(1): 2104426. DOI: 10.1080/2162402X.2022.2104426.

[24] XIAO X, LAOX M, CHEN M M, *et al*. PD-1hi identifies a novel regulatory B-cell population in human hepatoma that promotes disease progression[J]. Cancer Discov, 2016, 6(5): 546-559. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1408.

(收稿:2024-01-04;修回:2024-03-04)

(编辑 汪勤俭)