

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.002

· 基础研究 ·

结直肠癌肿瘤引流淋巴结T细胞的特征及其功能

唐景玲^a, 杨远^b, 李晓云^c, 杜航^b, 王新俊^b, 刘艳洁^a (贵州医科大学 a. 临床医学院 病理学教研室; b. 附属医院 临床医学研究中心; c. 附属医院 肛肠外科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] **目的:** 探讨结直肠癌(colorectal cancer, CRC)肿瘤引流淋巴结(tumor-draining lymph node, TDLN)中T细胞的免疫学特性及其抗肿瘤作用。**方法:** 收集2018年12月至2021年1月贵州医科大学附属医院收治的33例CRC患者的临床资料和淋巴结标本。采用染料法示踪, 配对采集CRC患者TDLN和非肿瘤引流淋巴结(non-TDLN, NTDLN)。用流式细胞术检测已制备成单细胞悬液的TDLN和NTDLN中免疫细胞亚群和功能表型差异, 酶联免疫斑点法比较TDLN和NTDLN中肿瘤反应性T细胞比例, 多色免疫荧光组织化学技术分析两种淋巴结中免疫细胞空间分布情况。体外扩增TDLN-T细胞, 检测其T细胞亚群和表型变化以及肿瘤免疫反应能力。**结果:** 与NTDLN相比, TDLN中含有更高比例肿瘤反应性T细胞($P<0.05$), 调节性T(Treg)细胞比例较高($P<0.01$), 但单核骨髓源性抑制细胞比例较低($P<0.05$), T细胞活化标志物ICOS、CD28和抑制标志物PD-1、TIGIT比例均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Treg细胞和滤泡性T细胞主要分布在淋巴结皮质区和生发中心。TDLN-T细胞扩增后, 以CD8⁺T细胞为主($P<0.01$), ICOS、CD28表达升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 肿瘤反应性T细胞比例升高($P<0.01$)。**结论:** CRC的TDLN中T细胞处于免疫激活状态, 同时高表达免疫抑制标志物; 体外培养可以增加TDLN-T细胞活化水平, 并提高抗肿瘤T细胞比例。

[关键词] 结直肠癌; 肿瘤引流淋巴结; 免疫微环境; T细胞活化; T细胞抑制

[中图分类号] R735.3; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)09-0869-08

Characteristics and function of T cells in tumor-draining lymph nodes of colorectal cancer

TANG Jingling^a, YANG Yuan^b, LI Xiaoyun^c, DU Hang^b, WANG Xinjun^b, LIU Yanjie^a (a. Department of Pathology, Clinical Medical College; b. Clinical Medical Research Center; c. Department of Anorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immunological characteristics and the anti-tumor potential of T cells in the tumor-draining lymph node (TDLN) of colorectal cancer (CRC). **Methods:** The clinical data and lymph node specimens of 33 CRC patients who were treated in the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University from December 2018 to January 2021 were retrospectively collected for this study. Paired TDLN and non-tumor-draining lymph nodes (NTDLN) were collected from CRC patients by using Dye tracer. Flow cytometry was used to examine the immune cell subsets and functional phenotypic differences in TDLN and NTDLN that prepared as single cell suspension. ELISPOT (enzyme-linked immunoSPOT) method was employed to compare the proportion of tumor-reactive T cells in TDLN and NTDLN. The spatial distribution of immune cells in the TDLN and NTDLN was evaluated by multiplexed immunohistochemistry (mIHC). The TDLN-T cells were amplified *ex vivo* to evaluate the T cell subsets and phenotypic changes as well as tumor immune response capabilities. **Results:** Compared with NTDLN, there were higher proportions of tumor-reactive T cells and regulatory T cells (Tregs), but lower proportion of monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs) in TDLN ($P<0.01$ or $P<0.05$); in addition, both the activation markers (ICOS, CD28) and suppression markers (PD-1, TIGIT) were elevated ($P<0.05$ or $P<0.01$). mIHC results showed that Tregs were mainly distributed in the cortex, and follicular helper T (Tfh) cells were located in the germinal center. After the TDLN-T cells were expanded *ex vivo*, CD8⁺T cells were the predominant phenotype ($P<0.01$), and the expression of ICOS and CD28 and the proportion of tumor-reactive T cells were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** T cells in colorectal cancer TDLN are activated and highly expresses immune suppression markers. *Ex vivo* expansion can

[基金项目] 贵州省科学技术厅资助项目[No.(2019)2788]; 国家自然科学基金贵州医科大学培育项目(No.19NSP045)。Project supported by the Department of Science and Technology of Guizhou Province (No. [2019]2788), and the National Natural Science Foundation of China, Guizhou Medical University Cultivation Project (No.19NSP045)

[作者简介] 唐景玲(1989—), 女, 硕士生, 主管技师, 主要从事肿瘤免疫治疗研究, E-mail: tangjl1989@gmc.edu.cn

[通信作者] 刘艳洁(LIU Yanjie, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤病理学研究, E-mail: 553013022@qq.com

enhance the activation of TDLN-T cells and increase the proportion of tumor-reactive T cells.

[Key words] colorectal cancer (CRC); tumor-draining lymph node (TDLN); immune microenvironment; T cell activation; T cell inhibition
[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(9): 869-876. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.002]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球发病率第三、病死率第二的恶性肿瘤^[1-2]。CRC的免疫学特征和免疫治疗是近年来的研究热点^[3]。以免疫评分为代表的免疫学预后评价体系被证实优于传统TNM分期方案^[4-5]；另一方面，免疫检查点抑制剂已成为具有微卫星高度不稳定(microsatellite instability-high, MSI-H)特征CRC患者的一线辅助治疗方案^[6]。肿瘤引流淋巴结(tumor-draining lymph node, TDLN)具有特殊的解剖学位置，既是发生免疫识别、启动抗肿瘤免疫的重要场所^[7]，又是肿瘤转移、免疫逃逸的通道^[8]。因此，需要对TDLN的免疫微环境进行深入研究，以解释以上的悖论。此外，TDLN中存在肿瘤特异性T细胞^[9-10]；本课题组以往的研究^[11]提示，采用TDLN来源的T(TDLN-T)细胞输注对CRC患者进行术后辅助治疗是安全、有效的，可以提高转移性CRC患者的生存率。有鉴于此，本研究采用配对设计，比较CRC患者TDLN和非肿瘤引流淋巴结(non-TDLN, NTDLN)中T细胞免疫学特性，旨在探讨TDLN免疫学特征和TDLN-T细胞的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选用2018年12月至2021年1月在贵州医科大学附属医院肛肠外科收治的33例CRC患者的临床资料和淋巴结标本，其中男性17例、女性16例，年龄(65.18±12.11)岁；肿瘤部位：升结肠15例，横结肠2例，降结肠3例，乙状结肠6例，直肠7例；肿瘤分期：I期2例，II期17例，III期11例，IV期3例；MSI状态：MSI-H 7例，MSI-L/MSS 25例，1例未检测。本研究方案由医院伦理委员会审查并批准，所有患者在采样前均告知并签署知情同意书。

1.2 主要试剂

专利蓝V示踪剂购自Sigma公司，X-VIVO/15培养基购自Lonza公司，IV型胶原酶、透明质酸酶、脱氧核糖核酸酶购自北京索莱宝科技有限公司，IL-2及OKT3购自北京同立海源生物公司，胎牛血清购自Gibco公司，抗人CD3-ECD、CD4-PC5流式抗体购自Beckman公司，抗人CD8-APC-Cy7、CD25-Pacific Blue、CD127-Alexa Fluor®647、FoxP3-FITC、ICOS-PE、CD45RA-Pacific Blue、CCR7-PE、CD14-BV421、CD15-PE-Cy7、HLA-DR-PE、CD28-PerCP-Cy5.5、PD-1-FITC和TIGIT-APC等抗体及活细胞染料均购自Biolegend公司，固定破膜试剂盒购自BD公司，免疫

组织化学抗人抗体CD3、FoxP3购自Abcam公司，CD163、CD8A、PD-1抗体购自CST公司，多标记荧光组织化学试剂盒购自北京佰诺全景生物公司，酶联免疫斑点(enzyme-linked immunospot, ELISPOT)试剂盒购自瑞典Mabtech公司。

1.3 淋巴结采集与鉴定

在肿瘤组织离体5 min内将1 ml专利蓝V染液注入肿瘤周围4个点的浆膜下层，3 min内肿瘤附近蓝染的淋巴结标记为TDLN，未染蓝的淋巴结标记为NTDLN。为了不影响临床诊断，取样淋巴结沿最长径剖开，一半用于研究，另一半进行常规组织病理学检查。对于研究用的淋巴结组织，通过H-E染色、免疫组织化学或流式细胞术检测上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)以判断淋巴结转移情况，选择TDLN作为后续研究材料。另外，取少量CRC患者的肿瘤组织和10 ml外周血作为功能学检测材料。

1.4 流式细胞术检测TDLN中免疫细胞亚群的比例

随机选择13对淋巴结用酶解消化法^[12]制备成单细胞悬液，采用流式细胞术分析TDLN与NTDLN中免疫细胞亚群的比例，包括T细胞(CD3⁺)、Th细胞(CD3⁺CD4⁺)、Tc细胞(CD3⁺CD8⁺)、调节性T(Treg)细胞(CD25⁺CD127^{-low}或CD25⁺FoxP3⁺)、幼稚T(Tnaïve)细胞CD45RA⁺CCR7⁺、中央记忆T(Tcm)细胞CD45RA⁻CCR7⁺、效应记忆T(Tem)细胞CD45RA⁻CCR7⁻、终末分化效应T(Temra)细胞CD45RA⁺CCR7⁻、单核样髓源性抑制细胞(Mo-MDSC)CD14⁺HLA-DR^{-low}及多形核样髓源性抑制细胞(PMN-MDSC)lin⁻CD11b⁺CD33⁺CD15⁺HLA-DR⁻。

同时分析TDLN与NTDLN中T细胞功能标志物(ICOS、CD28、PD-1和TIGIT)，按活细胞染料说明书排除死细胞，用FC-Blocking封闭非特异性染色，细胞与单克隆抗体在4℃下孵育30 min；对于细胞内标志物FoxP3，先固定破膜后再加入抗体，孵育后用PBS清洗细胞悬液，700×g离心3 min，再加0.5 ml PBS重悬至流式上样管。使用流式细胞仪检测，用FlowJo软件进行分析。

1.5 多色免疫荧光组化法检测TDLN中CD3、CD8A、FoxP3、PD-1和CD163的表达

随机选择5对淋巴结，4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片后进行多色免疫荧光组织化学检测。根据多标记荧光免疫组化试剂盒说明书进行操作，采用抗人CD3(1:200)、CD8A(1:300)、FoxP3(1:50)、PD-1(1:50)和CD163(1:100)抗体检测免疫细胞。载玻

片与一抗孵育,然后用0.3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶,封闭后再加入HRP标记的鼠抗兔二抗(1:1 000),室温孵育30 min,最后采用DAPI染核,封片,使用Mantra系统及InForm图像分析软件分别获取和分析图像。

1.6 ELISPOT法检测TDLN中肿瘤反应性T细胞的比例

随机选择5对淋巴结。患者肿瘤组织通过加热至95 °C持续5 min后过滤制备成自体肿瘤抗原,取细胞 5×10^4 个/孔接种至已包被IFN- γ 的板条中,按比例加入自体肿瘤抗原及辐照后自体外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。根据ELISPOT检测试剂盒说明书,使用Anti-CD3作为阳性对照刺激物,条板置37 °C、5% CO₂培养箱中48 h,取出条板后洗板,加入7-B6-1-ALP二抗(1:1 000)及显色剂,检测孔干燥后用ELISPOT分析仪进行斑点分析。

1.7 TDLN中免疫细胞的体外扩增培养及检测表型和IFN- γ 分泌水平

随机选择5例TDLN,分别使用两种方法分离出单细胞悬液,用X-VIVO/15培养基重悬后培养过夜,第2

天按1:100比例加入3~5份辐照后异体PBMC混合物、3 000 IU/ml的IL-2和30 ng/ml的OKT3活化细胞。扩增培养期间,使用IL-2维持,过程中拍照、计数,至第16天检测细胞表型以及IFN- γ 分泌水平,检测方法同前。

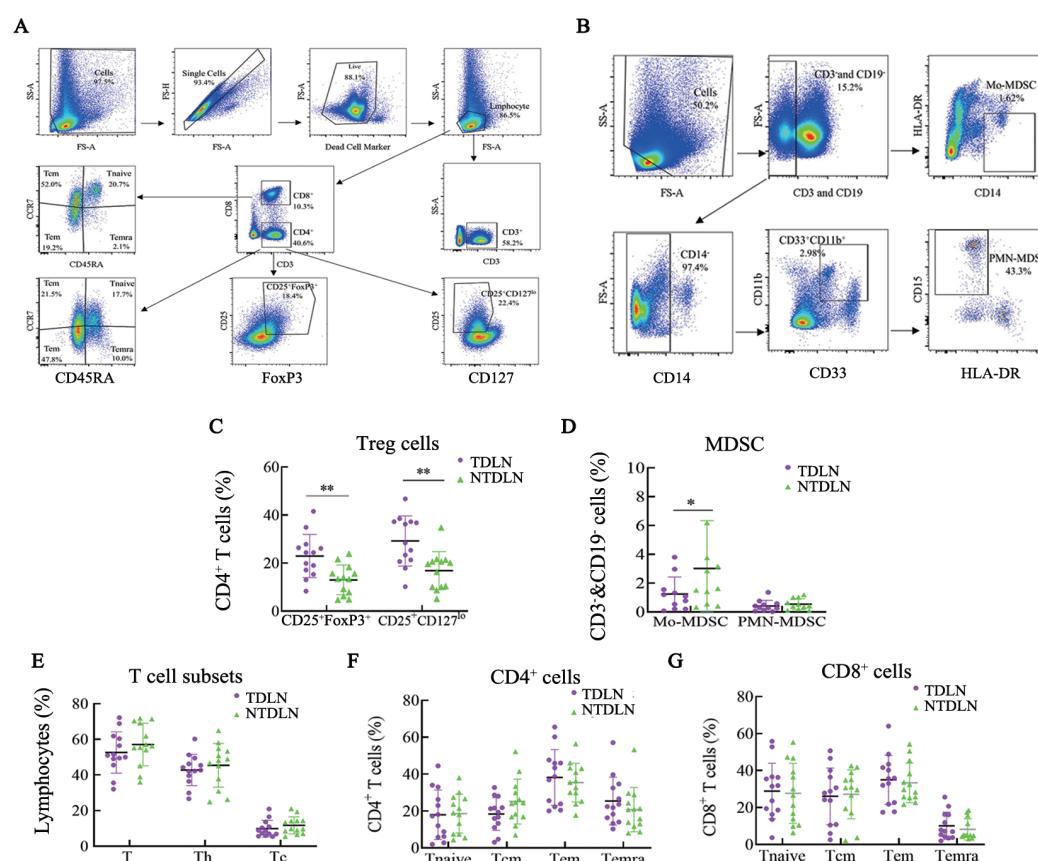
1.8 统计学处理

1.4~1.7实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 8.0.2软件对数据进行统计分析,呈正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,配对资料采用配对 t 检验,非配对资料采用非配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TDLN内CD4⁺T细胞中Treg细胞比例升高而Mo-MDSC比例降低

流式细胞术检测结果(图1)显示,根据图1A、B的画门方式,与NTDLN相比,TDLN中Treg细胞在CD4⁺T细胞中比例明显升高(均 $P < 0.01$,图1C),但Mo-MDSC比例却明显降低($P < 0.05$,图1D)。T细胞亚群及记忆T细胞亚群差异比较无统计学意义(均 $P > 0.05$,图1E~G)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: Gating strategy of T subsets, Treg and T memory cells; B: Gating strategy of MDSC; C: Treg cells (%) of CD4⁺ T cells; D: MDSC (%) of CD3⁺ T cells and CD19⁺ T cells; E: T cell subsets (%) of lymphocytes; F and G: T memory cell subsets (%) of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells

图1 TDLN与NTDLN中免疫细胞亚群的比较($n=13$)

Fig.1 Comparison of immune cell subsets between TDLN and NTDLN ($n=13$)

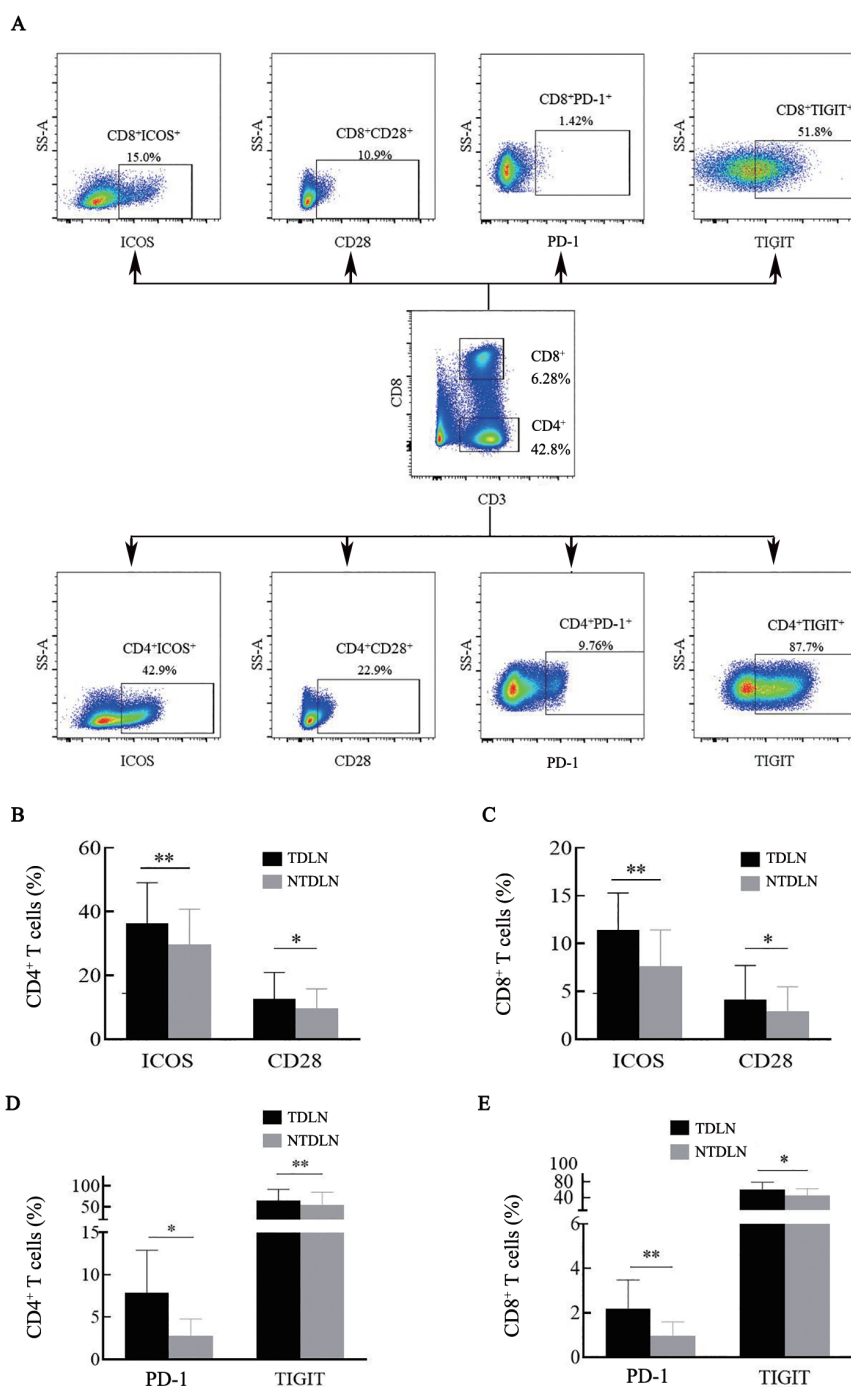
2.2 TDLN 中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的 ICOS、CD28、PD-1、TIGIT 表达升高

实验分析 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞活化标志物 ICOS、CD28 以及抑制标志物 PD-1、TIGIT 的表达, 流式细胞术检测结果(图 2)显示, 根据图 2A 画门方式, 与 NTDLN 相比, TDLN 中 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞的活化标志物 ICOS、CD28(图 2B、C)及抑制标

志物 PD-1、TIGIT(图 2D、E)表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 TDLN 中肿瘤反应性 T 细胞比例显著升高

5 例 TDLN 和 NTDLN 中 T 细胞经过自体肿瘤抗原刺激后, ELISPOT 结果(图 3)显示, TDLN 中肿瘤反应性 T 细胞比例明显高于 NTDLN [$(0.39\pm 0.12)\%$ vs $(0.34\pm 0.13)\%$, $P<0.05$]。



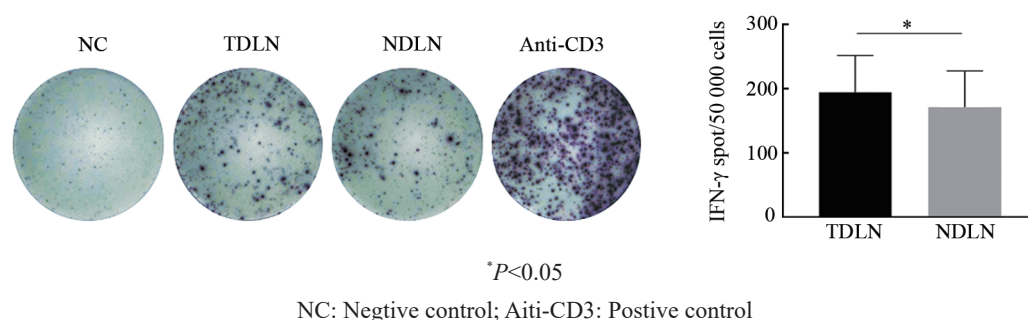
* $P<0.05$, ** $P<0.01$

A: Gating strategy of immunofunctional phenotypes; B and C: Activation phenotypes in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells;

D and E: Suppression phenotypes in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells

图 2 TDLN 与 NTDLN 中 T 细胞功能表型的比较($n=13$)

Fig.2 Immunofunctional phenotypes of T cells in TDLN and NTDLN ($n=13$)

图3 TDLN与NTDLN中肿瘤反应性T细胞比例的比较($n=5$)Fig.3 Proportion of tumor reactive T cells in TDLN and NTDLN ($n=5$)

2.4 TDLN与NTDLN中免疫细胞空间分布的比较

多色免疫荧光组化检测结果(图4)显示,淋巴结中的T细胞($CD3^+$)、Tc细胞($CD3^+CD8A^+$)、Th细胞($CD3^+CD8A^-$)分别分布于皮质区、副皮质区和生发中心,Treg细胞($CD3^+CD8A^-FoxP3^+$)和滤泡辅助T细胞(Tfh, $CD3^+CD8A^-PD-1^+FoxP3^+$)^[13]细胞分布于皮质区和生发中心,M2巨噬细胞($CD3^+CD163^+$)在TDLN的包膜下窦区更为聚集(图4A)。TDLN中Treg细胞和Tfh细胞数量明显多于NTDLN(均 $P<0.05$),而其余细胞亚群在两类淋巴结之间差异比较无统计学意义(均 $P>0.05$,图4B)。

2.5 TDLN-T细胞培养前后T细胞亚群及表型的变化

TDLN-T细胞经过体外扩增培养至第16天,形成明显集落(图5A)。培养后细胞表型以 $CD8^+$ T细胞为主($P<0.01$,图5B),Treg细胞比例明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图5C)。TDLN-T细胞培养后, $CD4^+$ T细胞和 $CD8^+$ T细胞活化标志物ICOS、CD28均明显高于培养前($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图5D),而抑制标志物PD-1、TIGIT的表达差异比较无统计学意义(均 $P>0.05$,图5E)。

2.6 TDLN-T细胞培养前后抗肿瘤反应性T细胞比例的变化

ELISPOT检测结果(图6)显示,经过自体肿瘤抗原刺激后,TDLN-T细胞扩增后反应性T细胞的比例[(1.18 ± 0.11)% vs (0.39 ± 0.12)%]和数量[($138.39\times 10^6\pm 32.64$) vs ($0.06\times 10^6\pm 0.04$)个]均明显增加(均 $P<0.01$)。

3 讨论

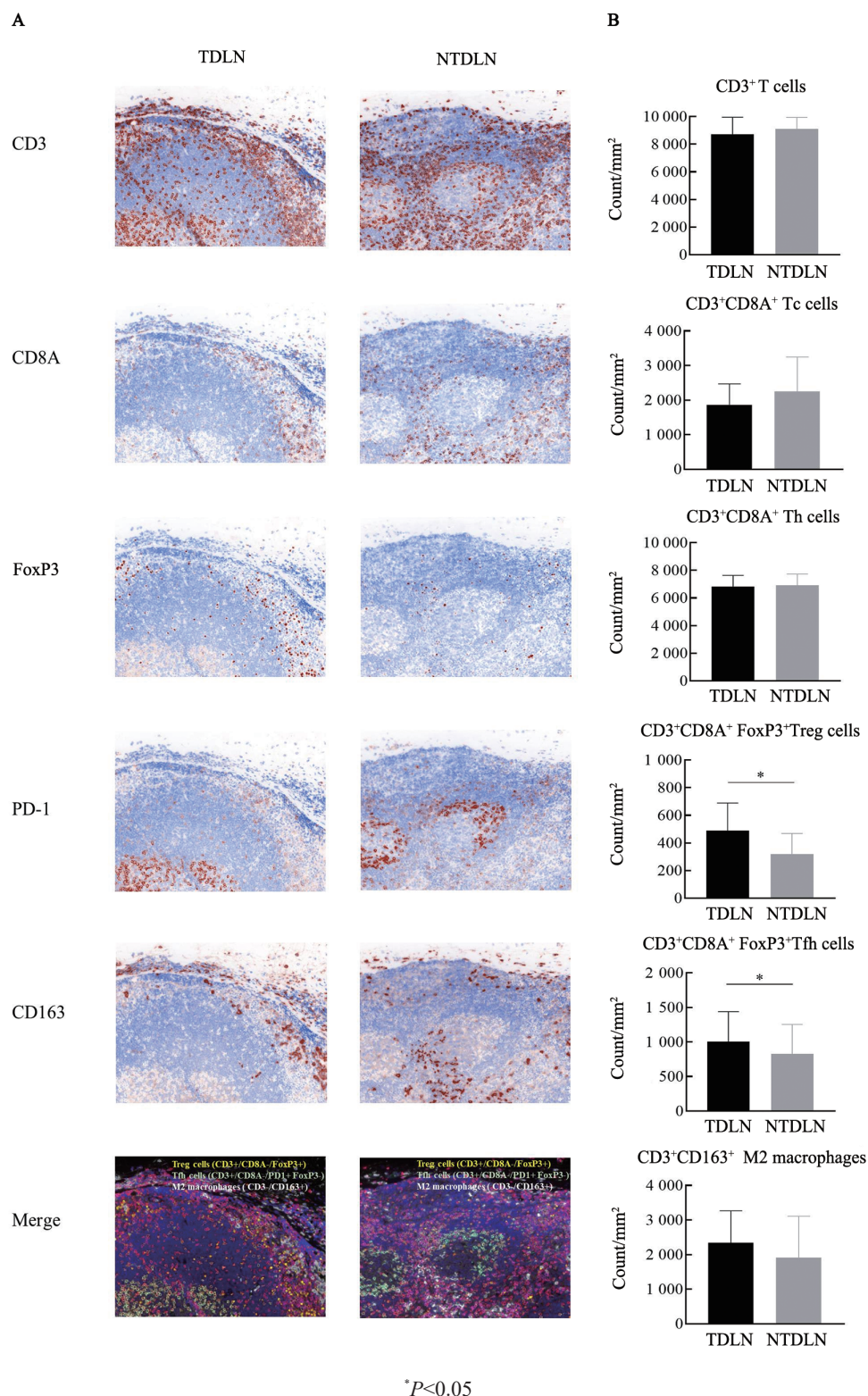
TDLN是肿瘤转移的主要途径之一,甚至在肿瘤转移前,TDLN中的免疫微环境已经发生改变,为肿瘤细胞的定植和扩增准备好了合适的“土壤”^[14]。在黑色素瘤中,TDLN中Treg细胞比例升高,但 $CD11c^+$ DC和 $CD86^+$ DC比例也升高^[15]。乳腺癌中的研究也发现,TDLN中MDSC、Treg细胞、“耗竭”的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞比例显著增加,提示TDLN具有典型的免疫抑制微环境,而且当转移灶存在时,免疫抑制特

点更加明显^[16]。通过对比研究,本研究发现CRC中TDLN与NTDLN中存在免疫细胞亚群的差异。TDLN中Treg细胞亚群的比例明显高于NTDLN,TDLN中Mo-MDSC的比例下降。MDSC来源于骨髓,肿瘤进展会上调MDSC的比例,抑制T细胞功能^[17]。动物实验^[18]也提示Mo-MDSC在TDLN中是占主导地位的MDSC亚群,对T细胞具有高度的抑制作用,肿瘤通过CCR2/CCL2通路增强了Mo-MDSC向TDLN的聚集。本研究中72.3%(8/11)的配对样本中观察到TDLN中Mo-MDSC相较NTDLN比例低,类似的情况也出现在mIHC的实验结果中。TDLN中聚集较多的Tfh细胞,可能与抗肿瘤反应有关^[19];但在主要发生肿瘤免疫识别的包膜下窦区,TDLN聚集了更多与免疫抑制相关的M2型巨噬细胞^[20]。同样,在功能性免疫标志物表达方面,本研究发现,与NTDLN相比,TDLN高表达免疫活化标志物ICOS和CD28,同时也高表达免疫抑制标志物PD-1和TIGIT。因此,笔者认为TDLN的免疫微环境是复杂的,并不能简单归为绝对的抑制或者活化,可能存在免疫抑制与免疫活化共存的情况。

以嵌合抗原受体T细胞治疗(chimeric antigen receptor T-cell immunotherapy, CAR-T)为代表的过继性免疫细胞疗法(adoptive cellular therapy, ACT)是肿瘤免疫治疗的重要组成部分,在血液系统肿瘤中取得了令人瞩目的治疗效果,但目前仍未在实体瘤中取得进展^[21]。肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltration lymphocyte, TIL)治疗^[22-23]以及以TIL为基础的新生抗原特异性T细胞治疗^[24-25],为ACT在实体瘤中的应用提供了可能。然而,CRC的组织特点限制了TIL疗法的应用^[9,26]。此外,也有研究^[27-28]表明,TIL可能并不是主要的抗肿瘤淋巴细胞。考虑到TDLN是肿瘤免疫识别的最主要组织部位,推测TDLN中可能存在大量抗肿瘤T细胞。本研究的数据也证明,TDLN中有更多的肿瘤反应性T细胞[(0.39 ± 0.12)% vs (0.34 ± 0.13)%],并且体外扩增培养能进一步促进TDLN-T细胞的活化,表现为ICOS和CD28的表达增加,但并

没有增加抑制性标志物的表达。相较于本研究组之前的培养方案,此次研究采用类似TIL的扩增方法,简化了扩增工艺,且能获得更多的细胞,支持多次治疗。体外扩增培养能提高肿瘤抗原反应性T细胞的比例 $[(1.18\pm0.11)\% \text{ vs } (0.39\pm0.12)\%]$ 和数量

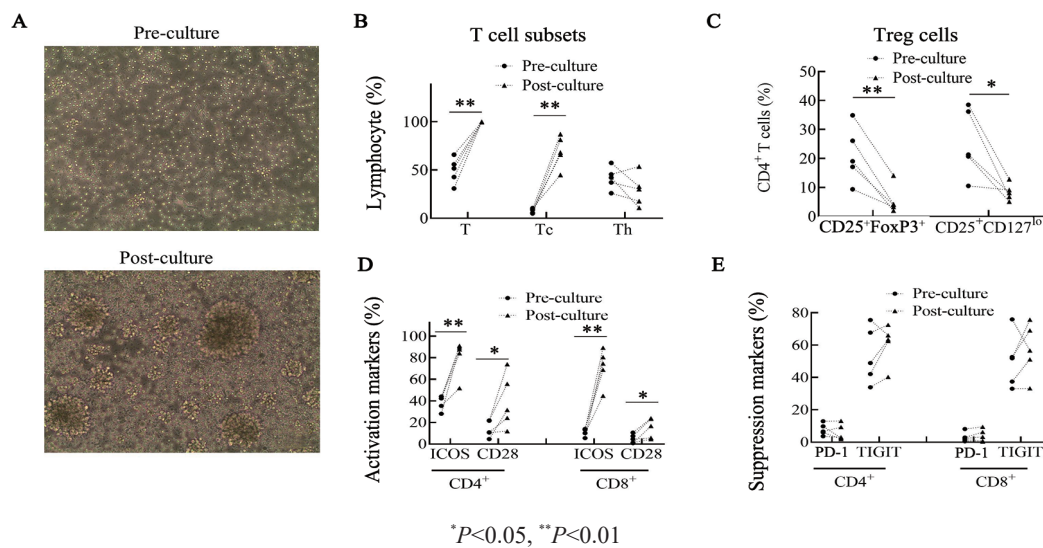
$[(138.39\times10^6\pm32.64) \text{ vs } (0.06\times10^6\pm0.04) \text{ 个}]$,增加IFN- γ 的分泌。考虑到IFN- γ 是抗肿瘤免疫反应的核心细胞因子^[29],笔者认为通过体外培养可以增强TDLN-T细胞的抗肿瘤免疫功能。



A: T cell subset distribution in TDLN and NTDLN; B: The immune cell subsets

图4 TDLN与NTDLN中免疫细胞空间分布及亚型表达的比较($\times 200$, $n=5$)

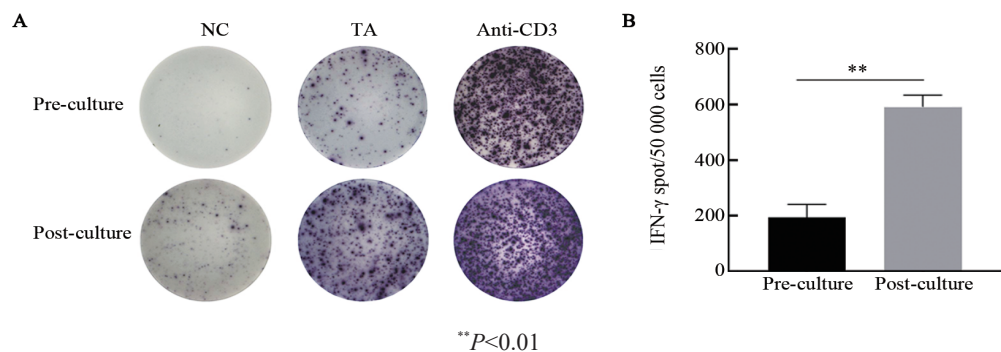
Fig.4 Comparison of spatial distribution and subtype expression of immune cells between TDLN and NTDLN ($\times 200$, $n=5$)



A: Cell culture ($\times 100$); B: Cell proliferation curve; C: Change of immune cell subsets;
D and E: Change of T cell activation and suppression markers

图5 TDLN-T细胞培养前后T细胞的亚群及表型变化($n=5$)

Fig.5 The changes in T cell subsets and phenotypes after culture ($n=5$)



NC: Negative control; TA: Tumor-specific response; Aiti-CD3: Postive control

A: ELISSPOT assay was performed to detect IFN- γ secretion stimulated by tumor-reactive antigen from one representative sample;

B: The change of tumor reactive T cells after culture

图6 TDLN-T细胞培养前后抗肿瘤反应性T细胞数量的变化($n=5$)

Fig.6 The change in the number of anti-tumor reactive T cells after culture ($n=5$)

综上所述,本研究观察了CRC患者TDLN中的免疫学特征,发现TDLN具有免疫抑制微环境,但其中的T细胞同时处于免疫激活状态。体外培养TDLN-T细胞可增强其抗肿瘤免疫功能。研究结果提示,CRC患者TDLN来源的T细胞可作为ACT治疗的良好材料。

[参 考 文 献]

[1] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480. DOI:10.1016/s0140-6736(19) 32319-0.
[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.

[3] 顾炎, 曹雪涛. 肿瘤免疫与免疫治疗: 机遇与挑战[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(1): 1-10. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021. 01.001.
[4] MLECNIK B, TOSOLINI M, KIRILOVSKY A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(6): 610-618. DOI:10.1200/JCO.2010.30.5425.
[5] PAGÈS F, ANDRÉ T, TAIEB J, et al. Prognostic and predictive value of the Immunoscore in stage III colon cancer patients treated with oxaliplatin in the prospective IDEA France PRODIGE-GERCOR cohort study[J]. Ann Oncol, 2020, 31(7): 921-929. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.310.
[6] ANDRÉ T, SHIU K K, KIM T W, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 383(23): 2207-2218. DOI:10.1056/NEJMoa2017699.
[7] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle[J]. Immunity, 2013, 39(1): 1-10. DOI:

- 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- [8] CHEUNG K J, EWALD A J. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters[J/OL]. *Science*, 2016, 352(6282): 167-169[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8183671/>. DOI:10.1126/science.aaf6546.
 - [9] WU X, ZHANG H, XING Q, et al. PD-1(+) CD8(+) T cells are exhausted in tumours and functional in draining lymph nodes of colorectal cancer patients[J/OL]. *Br J Cancer*, 2014, 111(7): 1391-1399[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4183848/>. DOI:10.1038/bjc.2014.416.
 - [10] DAHL K, KARLSSON M, MARITS P, et al. Metinell node--the first lymph node draining a metastasis--contains tumor-reactive lymphocytes[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(5): 1454-1463. DOI: 10.1245/s10434-007-9788-7.
 - [11] ZHEN Y H, LIU X H, YANG Y, et al. Phase I/II study of adjuvant immunotherapy with sentinel lymph node T lymphocytes in patients with colorectal cancer[J/OL]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(9): 1083-1093[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540776/>. DOI:10.1007/s00262-015-1715-3.
 - [12] BROGGI M A, SCHMALER M, LAGARDE N, et al. Isolation of murine lymph node stromal cells[J/OL]. *J Vis Exp*, 2014, (90): e51803[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4827973/>. DOI:10.3791/51803.
 - [13] GEORGIEV H, RAVENS I, PAPADOGIANNI G, et al. Shared and unique features distinguishing follicular T helper and regulatory cells of peripheral lymph node and Peyer's patches[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 714[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900012/>. DOI:10.3389/fimmu.2018.00714.
 - [14] PEREIRA E R, JONES D, JUNG K, et al. The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer[J/OL]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 38: 98-105[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397158/>. DOI: 10.1016/j.semedb.2015.01.008.
 - [15] MA M W, MEDICHERLA R C, QIAN M, et al. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node[J/OL]. *Mod Pathol*, 2012, 25 (7): 1000-1010[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3882943/>. DOI:10.1038/modpathol.2012.43.
 - [16] VAN PUL K M, VUYLSTEKE R J C L M, VAN DE VEN R, et al. Selectively hampered activation of lymph node-resident dendritic cells precedes profound T cell suppression and metastatic spread in the breast cancer sentinel lymph node[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 133[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6530094/>. DOI:10.1186/s40425-019-0605-1.
 - [17] PAWELEC G, VERSCHOOR C P, OSTRAND-ROSENBERG S. Myeloid-derived suppressor cells: not only in tumor immunity[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1099. DOI:10.3389/fimmu.2019.01099.
 - [18] LAHMAR Q, SCHOUPPE E, MORIAS Y, et al. Monocytic myeloid-derived suppressor cells home to tumor-draining lymph nodes via CCR2 and locally modulate the immune response[J]. *Cell Immunol*, 2021, 362: 104296. DOI:10.1016/j.cellimm.2021.104296.
 - [19] POULTSIDIS A, DIMOPOULOS Y, HE T F, et al. Lymph node cellular dynamics in cancer and HIV: what can we learn for the follicular CD4 (Tfh) cells?[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2233[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6170630/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02233.
 - [20] LOUIE D A P, LIAO S. Lymph node subcapsular sinus macrophages as the frontline of lymphatic immune defense[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 347[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6413714/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.00347.
 - [21] WAGNER J, WICKMAN E, DERENZO C, et al. CAR T cell therapy for solid tumors: bright future or dark reality?[J/OL]. *Mol Ther*, 2020, 28(11): 2320-2339[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7647674/>. DOI:10.1016/j.ymthe.2020.09.015.
 - [22] BEN-AVI R, FARHI R, BEN-NUN A, et al. Establishment of adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes for non-small cell lung cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(8): 1221-1230. DOI:10.1007/s00262-018-2174-4.
 - [23] PEDERSEN M, WESTERGAARD M C W, MILNE K, et al. Adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic ovarian cancer: a pilot study[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(12): e1502905[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6279323/>. DOI:10.1080/2162402X.2018.1502905.
 - [24] TRAN E, ROBBINS P F, LU Y C, et al. T-cell transfer therapy targeting mutant KRAS in cancer[J/OL]. *N Engl J Med*, 2016, 375 (23): 2255-2262[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5178827/>. DOI:10.1056/NEJMoa1609279.
 - [25] VAN DEN BERG J H, HEEMSKERK B, VAN ROOIJ N, et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000848[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7406109/>. DOI:10.1136/jitc-2020-000848.
 - [26] FAN J Q, SHANG D, HAN B, et al. Adoptive cell transfer: is it a promising immunotherapy for colorectal cancer?[J/OL]. *Theranostics*, 2018, 8(20): 5784-5800[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6276301/>. DOI:10.7150/thno.29035.
 - [27] 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[2021-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689255/>. DOI:10.1038/s41591-019-0522-3.
 - [28] 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.
 - [29] CASTRO F, CARDOSO A P, GONÇALVES R M, et al. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 847. DOI:10.3389/fimmu.2018.00847.

[收稿日期] 2021-05-09

[修回日期] 2021-08-25

[本文编辑] 党瑞山