

DOI: 10.13376/j.cbls/2023157

文章编号: 1004-0374(2023)11-1442-08

## 肿瘤微环境可视化技术研究进展

张娜, 生安志, 金海振, 郭莉莉, 孙攀, 张含, 杨晓华, 田聆\*

(上海交通大学医学院附属胸科医院·上海市胸科医院中心实验室, 上海 200025)

**摘要:** 肿瘤的发生、发展与转移等生物学行为与肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 密切相关。TME 中的非癌细胞 (如成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞等) 及细胞外基质等对肿瘤细胞的生物学行为有着极其重要的影响; TME 中的生理参数 (如细胞的组成和丰度、关键基因的表达等) 与肿瘤的增殖、侵袭和转移密切相关。免疫治疗是一种很有潜力的肿瘤治疗方法, 然而, TME 的异质性可能是导致免疫耐受的原因之一。对 TME 的可视化研究, 可直观描绘 TME 中不同细胞类型的动态行为, 在时间与空间维度揭示 TME 与肿瘤生长、侵袭的协同关系, 发现更多潜在的免疫治疗靶点, 提高免疫治疗的有效性。因此, TME 研究模型与可视化技术对于 TME 的可视化研究至关重要。本文主要综述了 3D 培养系统、类器官与人源化 PDX 等 TME 可视化研究模型以及多重免疫组织化学、多重免疫荧光、成像型质谱流式和 CRISPR/Cas9 基因编辑等技术在 TME 可视化研究中的应用进展。

**关键词:** 肿瘤微环境; 肿瘤可视化研究; 基因编辑技术; 多重免疫组织化学技术; 多重免疫荧光技术; 质谱流式技术

中图分类号: R730.4 文献标志码: A

## Advances in visualization technologies for tumor microenvironment research

ZHANG Na, SHENG An-Zhi, JIN Hai-Zhen, GUO Li-Li, SUN Pan, ZHANG Han, YANG Xiao-Hua, TIAN Ling\*

(Department of Central Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China)

**Abstract:** The tumor microenvironment (TME) describes the influence on tumor behavior of non-cancerous cells, including fibroblasts, immune cells, endothelial cells, inflammatory cells, lymphocytes, *etc.*, and extracellular matrix that support the growth of cancer cells. The physiological parameters of TME, including the composition and abundance of cells and the expression of key genes, are closely related to tumor growth, invasion and metastasis. Immunotherapy is a currently promising approach to tumor treatment. However, the heterogeneity of TME may be one of the reasons for immune tolerance. Visualization of TME can directly depict the dynamic behavior of different cells in TME, reveal the synergistic relationship between TME and tumor growth and invasion in both spatial and temporal dimensions, discover more potential new molecular targets, and improve the effectiveness of immunotherapy. The research models and visualization technologies are very important for the visualization research of TME. Herein, we mainly reviewed the advances in research models, such as 3D culture system, organoids, and humanized PDX research model, *etc.*, as well as the mainstream visualization technologies for TME visualization, such as immunohistochemical techniques, multiple immunofluorescence techniques, image-type mass spectrometry flow technology, and CRISPR/Cas9 genome editing technology, *etc.*

**Key words:** tumor microenvironment; tumor visualization; genome editing; multiple immunohistochemistry; multiple immuno-fluorescence; imaging mass cytometry

收稿日期: 2023-09-13; 修回日期: 2023-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(82073203)

\*通信作者: E-mail: TL09168@hotmail.com

肿瘤的发生、发展、转移及预后等生物学行为都与肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 密切相关。TME 中除肿瘤细胞外, 还有大量的非肿瘤细胞及复杂的肿瘤间质, 主要包括基底膜、细胞外基质、血管、免疫细胞、成纤维细胞、内皮细胞等<sup>[1]</sup>。在肿瘤发展过程中, 不同分期的肿瘤 TME 中细胞的丰度和功能明显不同。值得注意的是, TME 中免疫细胞的组成和活性、免疫检查点分子的表达和相关基质的异质性是制约免疫治疗临床效果的主要因素, 强烈影响肿瘤的进展和治疗疗效<sup>[2]</sup>。研究 TME 内渗透的免疫细胞与肿瘤细胞之间的异质性, 有助于更好地了解肿瘤细胞可塑性以及免疫逃逸与肿瘤转移的分子机制, 发现更多潜在的免疫治疗新靶点, 提高免疫治疗的有效性<sup>[3-4]</sup>。与传统的 TME 研究方法相比, TME 可视化研究可直观描绘 TME 中不同的细胞类型组成和基因表达, 实现一段时间内对肿瘤微环境中免疫细胞、肿瘤细胞、间质细胞等细胞动态行为连续的、直接的观察, 在时间与空间维度揭示肿瘤微环境与肿瘤生长、侵袭的协同关系<sup>[5-6]</sup>。

## 1 TME可视化是研究TME基础生物学问题的重要途径

TME 是一个复杂且不断演化的环境, 被认为是研究肿瘤进展和肿瘤治疗耐药的关键因素<sup>[7]</sup>。TME 中的免疫细胞能够监测消除肿瘤细胞, 防止肿瘤发展和维持正常的细胞动态平衡<sup>[8-9]</sup>。近年来, 针对 TME 中免疫细胞与肿瘤细胞特异性基因的靶向治疗, 包括 PD-1/PD-L1 和 CTLA-4 的治疗性单抗, 已在临床中广泛应用, 被认为是突破性的肿瘤疗法<sup>[10]</sup>。然而, TME 的异质性强烈影响肿瘤进展和免疫治疗的疗效。大量研究表明, 在基因靶向药物的治疗下, TME 中的免疫细胞、肿瘤细胞等会通过基因突变、抗原缺失与调变等多种机制逃脱免疫监视, 甚至抑制抗肿瘤免疫细胞的细胞毒性功能, 进而产生耐药性, 限制免疫反应和免疫治疗疗效<sup>[11]</sup>。

当前, 诸如液体活检、单细胞测序、空间转录测序和空间基因组测序等技术已成功应用于评估和探索 TME 的异质性<sup>[12-15]</sup>。尽管这些技术促进了对 TME 异质性的认识, 但仍不可避免地忽略了 TME 中的组织结构和特定的细胞-细胞相互作用, 仍然无法在时间与空间维度解读 TME 与肿瘤生长、侵袭的协同关系。通过建立可视化的 TME 体内外研究模型, 可视化标记肿瘤进展的生物学过程<sup>[5-6, 16]</sup>,

跟踪 TME 中肿瘤细胞与免疫细胞的动态变化、锚定 TME 中特异性基因的表达, 这使得在时间与空间维度上解析 TME 及其异质性成为可能, 极大地促进了对肿瘤生物学复杂机制的理解。

## 2 可视化的TME研究模型

TME 模型对于 TME 异质性的可视化研究至关重要。目前, 细胞三维培养 (three-dimensional cell culture, 3D) 系统、患者来源的肿瘤类器官 (patient-derived organoid, PDO) 与患者来源的异种移植模型 (patient-derived tumor xenograft, PDX) 是广泛使用的 TME 可视化模型, 这些模型最大程度上模拟或保持了原始肿瘤组织的独特基因组和功能异质性。其中, 3D 培养系统与类器官是模拟 TME 的体外模型, 可在体外再现原始肿瘤, 反映 TME 异质性, 实现体外对 TME 中肿瘤细胞-免疫细胞异质性作用的可视化研究<sup>[17]</sup>。PDX 模型是通过移植肿瘤组织来建立的具有高度的肿瘤异质性, 维持了肿瘤间质、基因表达模式以及肿瘤组织突变的体内模型, 可呈现亲代 TME 结构, 是研究 TME 异质性的理想工具<sup>[18]</sup>。在 TME 可视化研究中, 这 3 种研究模型常互为交叉、补充。

### 2.1 3D细胞培养

基于细胞系的传统 2D 细胞培养模型已被广泛应用于研究肿瘤细胞的增殖、迁移和药物反应。然而, 2D 培养中的细胞以单分子层的形式生长, 并不能很好地模拟原始肿瘤复杂的 TME。而 3D 培养系统则可弥补 2D 培养之不足, 能较好地模拟肿瘤细胞的原生环境, 如黑色素瘤来源的 3D 培养球体, 表现出比 2D 培养更好的免疫调节、增殖和激活能力, 有助于解析和观察细胞-细胞和细胞-基质相互作用, 已广泛用于 TME 研究<sup>[19-20]</sup>。2022 年, Li 等<sup>[21]</sup> 发展了一种由肿瘤细胞、肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 和 CAR-T 细胞等组成的离体 3D TME 模型, 并应用该模型研究 TAM 对以 T 细胞为基础的肿瘤免疫治疗的调控作用, 用于评估包括 CCL2/CCR2 抑制、CSF1/CSF1R 阻断、CD40 激动剂、HDAC 抑制剂和 PI3K $\gamma$  抑制剂等在内的针对 TAM 的免疫疗法的疗效。

Xue 等<sup>[22]</sup> 建立了一种基于水凝胶的 3D 体外研究肿瘤模型组 (hydrogel-based 3D *in vitro* tumor panel), 它包含了 30 个彼此独立的 PDX 模型, 涵盖了一系列肿瘤组织型和分子亚型, 并与成纤维细胞和外周血单核细胞在细胞外基质水凝胶中共培养, 可监测

TME 中肿瘤细胞、基质和免疫细胞等三组分间的相关作用。该 3D 模型组可应用高内涵成像技术 (high-content imaging, HCI) 分析检测治疗后的肿瘤大小、肿瘤杀伤率和 T 细胞浸润等, 可以更便捷地在肿瘤临床治疗中快速筛选化疗药物、肿瘤免疫治疗药物及其组合药物等。然而, 3D 细胞培养也存在一定的局限性, 其 3D 球体中细胞不可控排列导致其在测试免疫治疗策略方面的应用受限<sup>[23]</sup>。此外, 目前大多数的 3D 细胞模型仅阐明部分免疫细胞在 TME 中的调节作用, 3D 培养系统难以再现 TME 内多种免疫细胞引起的细胞间复杂相互作用, 致使一些基于 3D 球体模型细胞的免疫疗法的验证可能会与体内结果不一致<sup>[21]</sup>。

## 2.2 PDO类器官模型

类器官是源于原生组织的自组织三维结构。类器官模型可通过保留组织结构以及包括各种免疫细胞在内的内源性基质成分, 或通过添加外源性免疫细胞、血管系统和其他成分, 来适当地模拟肿瘤(免疫)微环境<sup>[24]</sup>。目前, PDO 已成为研究肿瘤(免疫)微环境的良好模型。与已有的肿瘤模型相比, PDO 更好地保持了其亲代肿瘤的关键遗传和表型特征, 可较一致地反映体内肿瘤的基因类型、表型和组织病理学异质性, 广泛用于 TME 异质性研究以及新疗法的药物筛选<sup>[25]</sup>。

Koh 等<sup>[26]</sup>建立了一种自体肿瘤 PDO/免疫细胞共培养系统, 用于研究胃癌 TME 中髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cell, MDSC) 的免疫抑制功能, 以及 mTOR 信号通路介导的神经胶质瘤致病因子 (glioma-associated oncogene homolog, GLI) 对胃癌 PD-L1 表达的诱导作用, 有效阐明了 TME 中免疫检查点抑制效应与肿瘤免疫学相关分子机制。Neal 等<sup>[27]</sup>采用气液界面 (air-liquid interface, ALI) 法, 在具有天然免疫细胞 (T 细胞、B 细胞、NK 细胞、

巨噬细胞) 的同源免疫宿主中建立了来自 >100 例人类活组织或小鼠肿瘤的 PDO, 并应用于 TME 研究。Xue 等<sup>[28]</sup>利用 PDO 检测了晚期肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群占总 CD3<sup>+</sup>T 细胞的比例、CD69<sup>+</sup>T 细胞亚群占总 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例, 并进行了免疫治疗疗效的评价。然而, 尽管补充了 IL-2, ALI PDO 的免疫成分仍会随着时间的推移而下降, 不能长时间维持免疫细胞和基质细胞的增殖。另外, 缺乏血管形成和复杂的 TME、构模耗时、不同肿瘤成功率差异大等, 也是目前 PDO 面临的主要挑战<sup>[10]</sup>。

## 2.3 PDX模型

PDX 模型直接将肿瘤患者中的癌组织植入免疫缺陷小鼠体内, 保留了 TME 中细胞的复杂性、细胞遗传学特征和间质结构<sup>[29-30]</sup>。但传统的 PDX 模型只能建立在免疫缺陷小鼠中, 并不适合筛选通过激活宿主免疫系统发挥作用的免疫调节剂, 如疫苗和检查点阻断抗体<sup>[31]</sup>。因此, 人源化 PDX 模型, 包括基因工程人源化小鼠 (用等同的人类转基因取代小鼠基因) 和免疫人源化小鼠 (植入人类免疫细胞) 的开发, 为研究免疫渗透和 TME 异质性以及测试免疫疗法提供了可能性<sup>[32-33]</sup>。

Scherer 等<sup>[32]</sup>用 CD34<sup>+</sup>造血干细胞免疫人源化 NSG-SGM3 小鼠, 然后植入人雌激素受体阳性 (ER<sup>+</sup>) 转移性乳腺癌 (metastatic breast cancer, MBC) 肿瘤组织, 建立了一种内分泌治疗耐药的 ER<sup>+</sup>MBC 免疫人源化 PDX 模型, 研究 ER<sup>+</sup>MBC 的 TME 中免疫系统的功能。Chiorazzi 等<sup>[34]</sup>将患者来源的骨髓造血干细胞和祖细胞植入 MISTRG6 小鼠体内, 然后移植 PDX 组织, 提供了一个完全基因匹配的模型来模拟个人的 TME, 前瞻性地研究实体瘤患者的肿瘤-免疫相互作用, 为临床前药物测试提供平台。Küçükköse 等<sup>[35]</sup>把 PDO 移植到人源化小鼠

表1 几种主要的TME可视化研究模型

可视化模型	优点	缺点	应用	参考文献
3D细胞培养	体外模拟TME, 建立组织模型; 使用细胞数量少, 生长速度快, 成本低	3D培养支架对细胞分化和增殖影响大; 3D球体中细胞排列不可控; 免疫疗法验证可能与体内结果不一致	评估针对TME的免疫疗法的治疗效果; 筛选化疗药物与免疫治疗药物	[21-23]
PDO	耗时短、成功率高; 基因表达谱稳定; 可以冷冻、保存、扩增	不能长时间维持免疫细胞和基质细胞的增殖; 缺乏血管形成	TME异质性研究; 免疫新疗法的药物筛选	[10, 24-28]
人源化PDX	具有人免疫系统, 可用于免疫治疗研究	模型的成瘤时间差异性比较大; 完全免疫兼容性尚未解决	药物筛选; 发现新的抗肿瘤免疫分子; 评估免疫疗效	[29-36]

的盲肠内, 建立了一种新的高频微卫星不稳定性 (high-frequency microsatellite instability, MSI-H) 结直肠癌自发性多器官转移模型, 用于分析 PD-1 和 CTLA-4 免疫治疗效果与原发肿瘤、肝转移和腹膜转移的免疫环境的关系, 并发现抗 CTLA-4 治疗后 B 细胞产生了位点依赖性抗肿瘤免疫作用。尽管利用人源化 PDX 模型研究体内 TME 中肿瘤 - 免疫相互作用取得了一定的进展, 但在这些模型模拟的 TME 中, 不同细胞和细胞外基质成分间的复杂串扰并没有完全和充分地重建, 其在成本、时间、吞吐量 and 完全免疫兼容性上仍面临挑战<sup>[36]</sup>。

### 3 可视化TME研究的主要技术

TME 异质性在很大程度上调控着肿瘤的进展和药物反应, 可视化和量化 TME 中不同细胞类型的空间排列及基因表达情况, 可为深入了解肿瘤发生发展机制提供参考, 这反过来又促进了 TME 可视化研究技术的发展。目前, 多重免疫组织化学 (multiplex immunohistochemistry, mIHC)/ 多重免疫荧光 (multiplex immunofluorescence, mIF)、成像质谱流式 (imaging mass cytometry, IMC) 和 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease 9) 基因编辑等技术在 TME 可视化研究中被广泛使用。其中, mIHC/mIF 是基于抗体的成像技术, 可在活组织生理学背景下对细胞行为进行成像<sup>[37]</sup>; IMC 是传统流式细胞术的升级版, 可同时对 TME 中多种蛋白质标志物进行成像, 提供综合空间组织分析<sup>[38]</sup>; 以 CRISPR/Cas9 为代表的可视化基因编辑技术更是建立不同嵌套形状和颜色变化的细胞和动物实验模型的利器, 可通过可视化系统地研究 TME 中不同

基因的表达对细胞生物学行为的影响<sup>[39-40]</sup>。当然, 在 TME 可视化研究中, 这几种主要的技术各有利弊, 常常需要综合运用 (表 2)。

#### 3.1 mIHC/mIF技术

传统的免疫组化方法不能准确捕捉 TME 标志物表达的空间信息。mIHC/mIF 分析是一种新兴的技术, 通过在单个组织切片中显示 TME 中的多个细胞和关键免疫调节分子, 区分表达相同蛋白的不同细胞类型, 对 TME 内各种细胞标志物、关键免疫调节分子的原位表达、特定细胞的密度和空间分布进行表征, 并提供标志物表达的半定量评估, 有助于量化免疫细胞亚群并研究它们在 TME 中的空间排列与功能状态<sup>[41]</sup>。

mIHC/mIF 分析可同时显示多个蛋白质标志物以及不同标志物的共定位, 从而准确地提供 TME 内的空间信息和共表达信息。Jia 等<sup>[42]</sup>开展了一项名为胃癌多重免疫组织化学图谱的项目, 利用 mIHC 染色, 使用 15 个标志物, 检测了 5 000 多万细胞的功能状态和空间位置, 构建了胃癌多维免疫组织化学图谱, 可用于提示 PD-1/PD-L1 阻断疗效。Wang 等<sup>[43]</sup>利用 mIHC 技术探讨鸟苷结合蛋白 2 (guanylate binding protein 2, GBP2) 与免疫微环境的相关性, 提出 GBP2 有望成为 ICB 联合治疗的靶点。Zeng 等<sup>[44]</sup>通过 mIHC 与 mIF 分析发现了甲基转移酶 1 (methyltransferase 1, METTL1) 在调节免疫抑制微环境中的关键作用。Wu 等<sup>[45]</sup>利用 mIF 法检测肿瘤免疫微环境标志物在不同肿瘤之间的组合表达水平, 以研究 PD-1 阻断联合化疗的反应特征; 结果发现, CD8/PD-L1 或 CD68/PD-L1 共同表达与 PD-1 阻断联合化疗的疗效有关。然而, mIHC/mIF 等成像技术仅限于少数可同时可视化的生物标志

表2 几种主要的TME可视化研究技术

可视化技术	优点	缺点	应用	参考文献
多重免疫组织化学/ 多重免疫荧光技术 (mIHC/mIF)	特异性强、敏感度高、快速、广泛; 靶点多样、可定位; 操作简单、安全; 结果直观、灵敏度高	非特异性染色; 交叉反应; 固有背景荧光干扰; 荧光染料可能有毒性, 体内实验可能会导致免疫毒性	TME中免疫细胞与肿瘤细胞分子表型标志物鉴定	[41-45]
成像质谱流式技术 (IMC)	操作简单; 空间分辨率高, 可实现单个细胞的检测	缺乏信号放大, 分辨率低; 耗时长、成本高	分析TME中免疫细胞亚群和空间分布; 识别免疫疗法生物标志物	[38, 46-50]
CRISPR/Cas9基因编辑技术	低成本、便捷、高效; 操作简单, 可同时调控或标记多个靶基因位点; 避免了标记抗原-抗体与表位染色	易脱靶; 体内体系递送障碍; 体内实验可能会产生免疫学反应	研究TME中基因对肿瘤的影响; 发现新的抗肿瘤免疫分子	[51-59]

物, 存在固有背景自身荧光与交叉反应、多路传输显色相对困难等问题, 这些局限阻碍了对肿瘤浸润性免疫细胞时空动力学的研究<sup>[41]</sup>。

### 3.2 成像质谱流式技术

IMC 技术能在组织或细胞水平上同时对多种蛋白质标志物进行成像, 可用于高维细胞分析。通过 IMC 分析石蜡包埋的组织样本可全面概述肿瘤免疫微环境, 检测微环境中各功能性免疫细胞标志物、肿瘤细胞的增殖与凋亡和结构(如上皮、间质、血管)标志物的替代物, 研究 TME 中肿瘤细胞与免疫细胞、基质细胞的相互作用, IMC 产生的高度多路复用图像可为 TME 异质性研究提供关键信息<sup>[46]</sup>。

Alnajjar 等<sup>[47]</sup>在肉瘤样尿路上皮癌(sarcomatoid urothelial carcinoma, SUC)中进行了首次 IMC 分析, 调查研究转移性 SUC 患者的免疫细胞谱系和 PD-L1 的表达。Graziano 等<sup>[48]</sup>利用 IMC 技术分析肿瘤浸润性免疫细胞亚群和空间分布, 确定了细胞外腺苷的空间分布对胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)免疫环境的调控作用。Liu 等<sup>[49]</sup>利用 IMC 和 mIF 等方法鉴定与 PDAC 免疫活性低下相关的癌前蛋白, 并揭示了富含半胱氨酸的肠蛋白 1 (CRIP1)/NF- $\kappa$ B/CxCL 轴在触发免疫逃避和形成肿瘤免疫微环境中的关键作用。然而, IMC 缺乏信号放大, 其亚细胞分辨率低于荧光成像, 仍需最大限度地提高特定的信噪比和优化低表达标志物的检测<sup>[38]</sup>。同时, IMC 耗时长、成本高, 不太适合大量组织样本分析<sup>[50]</sup>。

### 3.3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术, 是继锌指核酸内切酶(zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)之外出现的第 3 代基因编辑技术, 可特异性地识别、切割、修复任何突变的基因组序列, 在 TME 可视化研究中得到越来越多的应用。CRISPR/Cas9 基因编辑技术可通过将肿瘤细胞基因改变的任何组合引入类器官, 从而模拟 TME<sup>[51-52]</sup>。将基于 CRISPR/Cas9 的类器官筛选与原位移植相结合, 可能是追踪、验证不同疾病进展阶段 TME 中基因改变对肿瘤生长、侵袭影响的有效方法<sup>[53]</sup>。Khalil 等<sup>[54]</sup>利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 PDX 与 3D 模型中发现了一种核受体 NR2F1 激动剂, 可特异性地激活头颈鳞癌(HNSCC)中恶性肿瘤细胞的休眠程序, 导致人 HNSCC 细胞系以及 PDX 和 PDO 中

的肿瘤细胞生长停滞。Stein 等<sup>[55]</sup>利用 CRISPR/Cas9 和慢病毒转导建立了 5 个表达 PD-L1 变体的不同细胞模型, 并应用这些模型检测 PD-L1 基因突变肿瘤细胞介导的化疗抵抗作用及对 T 细胞介导的靶向杀伤的抵抗力, 用于评估肿瘤细胞 PD-L1 基因突变对肿瘤细胞功能的影响。Lin 等<sup>[56]</sup>利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在 1 218 个染色质调节因子的表观遗传学筛查中发现 TRIM28 可以抑制 PD-L1 的表达, 同时 SETDB1-TRIM28 复合物缺失将激活 cGAS-STING 天然免疫信号通路, 以增强免疫检查点阻断的抗肿瘤效应。

然而, CRISPR/Cas9 系统的特异性和高效性运输可能面临多种挑战。TME 响应型纳米颗粒具有可控释放和模块化灵活的优点, 可安全有效地将 CRISPR/Cas9 系统组件靶向输送到靶部位, 增强抗肿瘤免疫反应, 并使肿瘤对免疫治疗增敏<sup>[57]</sup>。Yang 等<sup>[58]</sup>开发了一种针对 PD-L1 和 PTPN2 的可编程解锁纳米 matryoshka-CRISPR 系统(PUN@Cas-PT), 可精确有效地控制 CRISPR/Cas9 系统的激活, 仅在金属蛋白酶(MMP)、透明质酸酶(HAase)过表达和内源性活性氧簇浓度较高的肿瘤部位释放 CRISPR/Cas9; 释放的 CRISPR/Cas9 可快速定位于细胞核内, 并同时下调 PD-L1 和 PTPN2, 有效地阻断 PD1/PD-L1 免疫检查点, 增强抗肿瘤免疫应答。另外, CRISPR/Cas9 系统在体内使用之前必须有效控制脱靶效应, 并关注宿主对该系统的免疫反应<sup>[59]</sup>。

### 3.4 组合的可视化研究技术

CRISPR/Cas9 基因编辑技术结合药物筛选可研究基因与药物的相互作用, 发现关键的抗癌基因与抗癌新机制, 推进精确肿瘤学和药物筛选研究<sup>[60]</sup>。mIF 与 IMC 技术可通过多路成像准确提供 TME 内多个蛋白质标志物的空间信息和共表达信息。在 TME 可视化研究中, CRISPR/Cas9 基因编辑技术与 mIF、IMC 技术结合可揭示参与肿瘤侵袭的关键基因以及肿瘤细胞与 TME 的协同进化信息。Yahata 等<sup>[61]</sup>通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 PD-L1 基因, 并利用双色免疫荧光分析研究 PD-L1 敲除是否影响肿瘤组织中的巨噬细胞亚群, 评估 PD-L1 在 TME 中的病理生理学 and 免疫学作用。Wroblewska 等<sup>[62]</sup>开发了一种在蛋白质水平上运行的条形码系统, 并利用 IMC 技术对所有 Pro-Code/CRISPR 载体进行高维度表型分析, 筛选影响乳腺癌敏感性和抵抗抗原特异性 T 细胞杀伤的基因, 发现了免疫蛋白酶体成分 Psmb8 和分子伴侣 Rtp4 对肿瘤细胞中

抗原依赖的免疫编辑的重要性。

以上几种常用的技术能够在细胞和分子水平上可视化研究 TME 中肿瘤细胞和免疫细胞的相互作用,揭示 TME 与肿瘤生长、侵袭的协同关系。除此之外,正电子计算机断层扫描 (positron emission computed tomography/computed tomography, PET/CT)、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 等分子影像技术,通过利用放射性核素或 MRI 探针等,也可在组织与细胞水平上可视化分析 TME 中肿瘤生物学特性相关定量特征,并用于临床评估各种肿瘤的预后及免疫治疗疗效<sup>[63-64]</sup>,只是较少单独应用于 TME 分子机制研究。

#### 4 问题及展望

目前,免疫治疗是一种很有潜力的肿瘤治疗方法,然而,TME 的异质性是影响免疫治疗临床效果的重要因素。TME 异质性的可视化研究可动态重塑肿瘤侵袭过程,有助于开发针对肿瘤细胞的药物新靶点。TME 模型对于 TME 异质性研究至关重要。3D 培养、PDO/免疫细胞共培养模型、基于 ALI 系统的 PDO 模型及人源化 PDX 模型等,是目前常用的 TME 可视化研究模型,它们相辅相成、互为补充,共同贯穿于 TME 可视化研究的整个过程。目前,基于 3D 球体、类器官、PDX 等体内外模型的 CRISPR 筛查可被用于识别可能作为癌症预后、诊断或潜在药物靶点的免疫调节基因,为鉴定肿瘤细胞的固有免疫逃避、免疫治疗反应和治疗耐药相关的基因提供平台。然而,3D 球体或类器官只能在一定程度上模拟体内 TME,重复性仍较低,不能完全重现 TME 的复杂性。相比之下,直接或间接进行体内筛查的 PDX 更接近功能性 TME<sup>[65]</sup>。

mIHC/mIF 是目前 TME 可视化研究广泛使用的技术,但仅限于少数可同时可视化的生物标志物,并存在固有背景自身荧光与交叉反应等问题。IMC 是近几年发展起来的一种提供综合空间组织分析的技术,其亚细胞分辨率低于荧光成像,但超越了目前荧光多路成像的限制,可同时可视化多达 40 个生物标志物。在 TME 可视化研究中,这几种主要的技术常与 CRISPR/Cas9 基因编辑技术组合应用,研究筛选 TME 中控制肿瘤发展与转移的新基因、关键基因与复合抗癌新机制以及进行新疗法的药物筛选。近几年来,纳米材料及其复合物在改善 TME 和肿瘤免疫治疗疗效方面发挥了重要作用。纳米颗粒较好地解决了 CRISPR/Cas9 系统靶向输送的难

题,同时,通过重塑免疫环境、协同增强免疫反应和逆转免疫抑制,促进了肿瘤细胞的凋亡和免疫原性死亡,具有增强免疫治疗疗效的潜在价值<sup>[66-68]</sup>。

因此,可视化研究模型和研究技术是研究 TME 潜在靶点和免疫治疗的利器。然而,这些模型与技术各自存在一定的局限性。在 TME 可视化研究中,应该权衡利弊,综合比较、运用多种可视化模型与技术,利用多重和多模式生物标志物,筛选出更多新的免疫治疗候选基因,提高肿瘤免疫治疗的有效性。

#### [参 考 文 献]

- [1] Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Curr Biol*, 2020, 30: R921-5
- [2] Mao X, Xu J, Wang W, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer*, 2021, 20: 131
- [3] Lv B, Wang Y, Ma D, et al. Immunotherapy: reshape the tumor immune microenvironment. *Front Immunol*, 2022, 13: 844142
- [4] Fu T, Dai LJ, Wu SY, et al. Spatial architecture of the immune microenvironment orchestrates tumor immunity and therapeutic response. *J Hematol Oncol*, 2021, 14: 98
- [5] Matsumoto KI, Mitchell JB, Krishna MC. Multimodal functional imaging for cancer/tumor microenvironments based on MRI, EPRI, and PET. *Molecules*, 2021, 26: 1614
- [6] Li X, Wang R, Zhang Y, et al. Molecular imaging of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy. *Ther Adv Med Oncol*, 2022, 14: 17588359221076194
- [7] Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 3855-64
- [8] Kim EE, Youn H, Kang KW. Imaging in tumor immunology. *Nucl Med Mol Imaging*, 2021, 55: 225-36
- [9] Liu R, Hu Y, Liu T, et al. Profiles of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of osteosarcoma cancer. *BMC Cancer*, 2021, 21: 1345
- [10] Yuki K, Cheng N, Nakano M, et al. Organoid models of tumor immunology. *Trends Immunol*, 2020, 41: 652-64
- [11] Li T, Fu J, Zeng Z, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48: W509-14
- [12] Li Y, Hu X, Lin R, et al. Single-cell landscape reveals active cell subtypes and their interaction in the tumor microenvironment of gastric cancer. *Theranostics*, 2022, 12: 3818-33
- [13] Davis-Marcisak EF, Deshpande A, Stein-O'Brien GL, et al. From bench to bedside: single-cell analysis for cancer immunotherapy. *Cancer Cell*, 2021, 39: 1062-80
- [14] Seeneevassen L, Bessede E, Megraud F, et al. Gastric cancer: advances in carcinogenesis research and new therapeutic strategies. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 3418

- [15] Ospina OE, Wilson CM, Soupir AC, et al. SpatialGE: quantification and visualization of the tumor microenvironment heterogeneity using spatial transcriptomics. *Bioinformatics*, 2022, 38: 2645-7
- [16] Moon JB, Yoo SW, Lee C, et al. Multimodal imaging-based potential visualization of the tumor microenvironment in bone metastasis. *Cells*, 2021, 10: 2877
- [17] Pamarthy S, Sabaawy HE. Patient derived organoids in prostate cancer: improving therapeutic efficacy in precision medicine. *Mol Cancer*, 2021, 20: 125
- [18] Abdolahi S, Ghazvinian Z, Muhammadnejad S, et al. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J Transl Med*, 2022, 20: 206
- [19] Boucherit N, Gorvel L, Olive D. 3D tumor models and their use for the testing of immunotherapies. *Front Immunol*, 2020, 11: 603640
- [20] Xu R, Zhou X, Wang S, et al. Tumor organoid models in precision medicine and investigating cancer-stromal interactions. *Pharmacol Ther*, 2021, 218: 107668
- [21] Li YR, Yu Y, Kramer A, et al. An *ex vivo* 3D tumor microenvironment-mimicry culture to study TAM modulation of cancer immunotherapy. *Cells*, 2022, 11: 1583
- [22] Xue B, Schüler J, Harrod CM, et al. A novel hydrogel-based 3D *in vitro* tumor panel of 30 PDX models incorporates tumor, stromal and immune cell compartments of the TME for the screening of oncology and immuno-therapies. *Cells*, 2023, 12: 1145
- [23] Kayser C, Brauer A, Susanne S, et al. The challenge of making the right choice: patient avatars in the era of cancer immunotherapies. *Front Immunol*, 2023, 14: 1237565
- [24] Sun CP, Lan HR, Fang XL, et al. Organoid models for precision cancer immunotherapy. *Front Immunol*, 2022, 13: 770465
- [25] Dao V, Yuki K, Lo YH, et al. Immune organoids: from tumor modeling to precision oncology. *Trends Cancer*, 2022, 8: 870-80
- [26] Koh V, Chakrabarti J, Torvund M, et al. Hedgehog transcriptional effector GLI mediates mTOR-induced PD-L1 expression in gastric cancer organoids. *Cancer Lett*, 2021, 518: 59-71
- [27] Neal JT, Li X, Zhu J, et al. Organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell*, 2018, 175: 1972-88.e16
- [28] Xue Y, Wang B, Tao Y, et al. Patient-derived organoids potentiate precision medicine in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Precis Clin Med*, 2022, 5: pbac028
- [29] Jiang W, Xie S, Liu Y, et al. The application of patient-derived xenograft models in gynecologic cancers. *J Cancer*, 2020, 11: 5478-89
- [30] Kleinmanns K, Bischof K, Anandan S, et al. CD24-targeted fluorescence imaging in patient-derived xenograft models of high-grade serous ovarian carcinoma. *EBioMedicine*, 2020, 56: 102782
- [31] Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol*, 2020, 13: 4
- [32] Scherer SD, Riggio AI, Haroun F, et al. An immunohumanized patient-derived xenograft model of estrogen-independent, hormone receptor positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2021, 23: 100
- [33] Hakuno SK, Michiels E, Kuhlemajjer EB, et al. Multicellular modelling of difficult-to-treat gastrointestinal cancers: current possibilities and challenges. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 3147
- [34] Chiorazzi M, Martinek J, Krasnick B, et al. Autologous humanized PDX modeling for immuno-oncology recapitulates features of the human tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 2023, 11: e006921
- [35] Küçükköse E, Heesters BA, Villaudy J, et al. Modeling resistance of colorectal peritoneal metastases to immune checkpoint blockade in humanized mice. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e005345
- [36] Poggi A, Villa F, Fernandez JLC, et al. Three-dimensional culture models to study innate anti-tumor immune response: advantages and disadvantages. *Cancers*, 2021, 13: 3417
- [37] Flores Molina M, Fabre T, Cleret-Buhot A, et al. Visualization, quantification, and mapping of immune cell populations in the tumor microenvironment. *J Vis Exp*, 2020, doi: 10.3791/60740
- [38] Elaldi R, Hemon P, Petti L, et al. High dimensional imaging mass cytometry panel to visualize the tumor immune microenvironment contexture. *Front Immunol*, 2021, 12: 666233
- [39] Chen M, Mao A, Xu M, et al. CRISPR-Cas9 for cancer therapy: opportunities and challenges. *Cancer Lett*, 2019, 447: 48-55
- [40] Cheng H, Zhang F, Ding Y. CRISPR/Cas9 delivery system engineering for genome editing in therapeutic applications. *Pharmaceutics*, 2021, 13: 1649
- [41] Taube JM, Akturk G, Angelo M, et al. The society for immunotherapy of cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. *J Immunother Cancer*, 2020, 8: e000155
- [42] Jia K, Chen Y, Xie Y, et al. Multidimensional immune profiling in gastric cancer multiplex immunohistochemistry atlas from Peking University Cancer Hospital project informs PD-1/PD-L1 blockade efficacy. *Eur J Cancer*, 2023, 189: 112931
- [43] Wang H, Zhou Y, Zhang Y, et al. Subtyping of microsatellite stability colorectal cancer reveals guanylate binding protein 2 (GBP2) as a potential immunotherapeutic target. *J Immunother Cancer*, 2022, 10: e004302
- [44] Zeng X, Liao G, Li S, et al. Eliminating METTL1-mediated accumulation of PMN-MDSCs prevents hepatocellular carcinoma recurrence after radiofrequency ablation. *Hepatology*, 2023, 77: 1122-38
- [45] Wu F, Jiang T, Chen G, et al. Multiplexed imaging of tumor immune microenvironmental markers in locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer characterizes the features of response to PD-1 blockade

- plus chemotherapy. *Cancer Commun (Lond)*, 2022, 42: 1331-46
- [46] Ijsselsteijn ME, van der Breggen R, Farina Sarasqueta A, et al. A 40-marker panel for high dimensional characterization of cancer immune microenvironments by imaging mass cytometry. *Front Immunol*, 2019, 10: 2534
- [47] Alnajjar H, Ravichandran H, Figueiredo Rendeiro A, et al. Tumor-immune microenvironment revealed by imaging mass cytometry in a metastatic sarcomatoid urothelial carcinoma with a prolonged response to pembrolizumab. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2022, 8: a006151
- [48] Graziano V, Dannhorn A, Hulme H, et al. Defining the spatial distribution of extracellular adenosine revealed a myeloid-dependent immunosuppressive microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Immunother Cancer*, 2023, 11: e006457
- [49] Liu X, Tang R, Xu J, et al. CRIP1 fosters MDSC trafficking and resets tumour microenvironment via facilitating NF- $\kappa$ B/p65 nuclear translocation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut*, 2023, 72: 2329-43
- [50] Le Rochais M, Hemon P, Pers JO, et al. Application of high-throughput imaging mass cytometry hyperion in cancer research. *Front Immunol*, 2022, 13: 859414
- [51] David Tuveson HC. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*, 2019, 364: 952-5
- [52] Zhang C, Quan R, Wang J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Hum Mol Genet*, 2018, 27: R79-88
- [53] Wang SW, Gao C, Zheng YM, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Mol Cancer*, 2022, 21: 57
- [54] Khalil BD, Sanchez R, Rahman T, et al. An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy. *J Exp Med*, 2022, 219: e20210836
- [55] Stein A, Simnica D, Schultheiss C, et al. PD-L1 targeting and subclonal immune escape mediated by PD-L1 mutations in metastatic colorectal cancer. *J Immunother Cancer*, 2021, 9: e002844
- [56] Lin J, Guo D, Liu H, et al. The SETDB1-TRIM28 complex suppresses antitumor immunity. *Cancer Immunol Res*, 2021, 9: 1413-24
- [57] Xu X, Liu C, Wang Y, et al. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, 176: 113891
- [58] Yang J, Li Z, Shen M, et al. Programmable unlocking Nano-Matryoshka-CRISPR precisely reverses immunosuppression to unleash cascade amplified adaptive immune response. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8: 2100292
- [59] Parashar D, Singh A, Gupta S, et al. Emerging roles and potential applications of non-coding RNAs in cervical cancer. *Genes (Basel)*, 2022, 13: 1254
- [60] Hirt CK, Booi TH, Grob L, et al. Drug screening and genome editing in human pancreatic cancer organoids identifies drug-gene interactions and candidates for off-label therapy. *Cell Genom*, 2022, 2: 100095
- [61] Yahata T, Mizoguchi M, Kimura A, et al. Programmed cell death ligand 1 disruption by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression. *Cancer Sci*, 2019, 110: 1279-92
- [62] Wroblewska A, Dhainaut M, Ben-Zvi B, et al. Protein barcodes enable high-dimensional single-cell CRISPR screens. *Cell*, 2018, 175: 1141-55.e16
- [63] Zhang Y, Hu HH, Zhou SH, et al. PET-based radiomics visualizes tumor-infiltrating CD8 T cell exhaustion to optimize radiotherapy/immunotherapy combination in mouse models of lung cancer. *Biomark Res*, 2023, 11: 10
- [64] Su GH, Xiao Y, You C, et al. Radiogenomic-based multiomic analysis reveals imaging intratumor heterogeneity phenotypes and therapeutic targets. *Sci Adv*, 2023, 9: eadf0837
- [65] Dervovic D, Malik AA, Chen ELY, et al. *In vivo* CRISPR screens reveal Serpinb9 and Adam2 as regulators of immune therapy response in lung cancer. *Nat Commun*, 2023, 14: 3150
- [66] Yang L, Sun J, Liu Q, et al. Synergetic functional nanocomposites enhance immunotherapy in solid tumors by remodeling the immunoenvironment. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6: 1802012
- [67] Yang L, Li F, Cao Y, et al. Multifunctional silica nanocomposites prime tumoricidal immunity for efficient cancer immunotherapy. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19: 328
- [68] Jing G, Yang L, Wang H, et al. Blocked autophagy is involved in layered double hydroxide-induced repolarization and immune activation in tumor-associated macrophages. *Adv Healthc Mater*, 2023, doi: 10.1002/adhm.202301471