

# 3D 肿瘤球对肿瘤浸润淋巴细胞的体外激活扩增及抗肿瘤的作用

许鑫鑫<sup>1,2,3</sup>, 张艳梅<sup>4</sup>, 王子萱<sup>3</sup>, 张青<sup>4</sup>, 李杨<sup>4</sup>, 戴建莉<sup>4</sup>, 高云鹤<sup>2</sup>, 熊卓<sup>3\*</sup>, 陈凛<sup>1,2\*</sup>

1 解放军医学院, 北京 100853

2 中国人民解放军总医院第一医学中心 普通外科医学部, 北京 100853

3 清华大学机械工程系生物制造中心, 北京 100084

4 北京市科学技术研究院 新材料与先进制造研究所, 北京 100089

许鑫鑫, 张艳梅, 王子萱, 张青, 李杨, 戴建莉, 高云鹤, 熊卓, 陈凛. 3D 肿瘤球对肿瘤浸润淋巴细胞的体外激活扩增及抗肿瘤的作用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1523-1535.

XU Xinxin, ZHANG Yanmei, WANG Zixuan, ZHANG Qing, LI Yang, DAI Jianli, GAO Yunhe, XIONG Zhuo, CHEN Lin. 3D tumor spheroids promote activation, expansion, and anti-tumor effects of tumor-infiltrating lymphocytes *in vitro*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1523-1535.

**摘要:** 肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)介导的过继性免疫治疗已在多种实体瘤中取得良好疗效。然而, 传统 TILs 体外扩增方法效率低, 难以达到治疗级别的细胞数量和高肿瘤杀伤活性要求。为了研究 3D 肿瘤模型对 TILs 体外激活扩增及肿瘤杀伤活性的影响, 为 TILs 体外扩增提供新策略, 本研究从肺癌患者手术样本中获取 TILs 和原代肿瘤细胞, 对比观察 2D 及 3D 培养条件下肺癌细胞系 NCI-H1975 及原代肺癌细胞对 TILs 激活扩增及抗肿瘤作用的影响; 向 3D 培养原代肿瘤+TILs 中添加程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 抗体, 验证 PD-1 抗体对该体系中 TILs 浸润杀伤肿瘤细胞的影响。结果表明, 相比于 2D 培养, 3D 培养的 H1975 肺癌细胞系可使 TILs 在一定时间内显著扩增, 并提升 TILs 中 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞的比例(61.6%); 3D 培养的原代肿瘤球也可刺激增加 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> TILs 细胞的比例(45.5%, 54.4%), 诱导肿瘤上皮细胞的凋亡, 使其存活率降至 16.7%; 进一步研究表明, PD-1 抗体的引入促进 3D 原代肿瘤球共培养介导的 TILs 的增殖、提高 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 细胞的比例(50.9%, 57.0%), 并显著提高其抗肿瘤效力(肿瘤上皮细胞整体存活率降至 9.36%)。综上所述, 3D 肿瘤球显著增强 TILs 细胞的体外激活增殖及抗肿瘤能力, 且 PD-1 抗体进一步促进 3D 肿瘤球介导的 TILs 细胞增殖及其杀伤肿瘤的效力。

**关键词:** 3D 培养; 肿瘤模型; 肿瘤浸润淋巴细胞; T 细胞体外扩增; 程序性死亡受体 1

资助项目: 国家自然科学基金(52305298)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (52305298).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Lin, linchenbj@163.com; XIONG Zhuo, xiongzhuo@tsinghua.edu.cn

Received: 2023-12-10; Accepted: 2024-02-29; Published online: 2024-04-17

## 3D tumor spheroids promote activation, expansion, and anti-tumor effects of tumor-infiltrating lymphocytes *in vitro*

XU Xinxin<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yanmei<sup>4</sup>, WANG Zixuan<sup>3</sup>, ZHANG Qing<sup>4</sup>, LI Yang<sup>4</sup>, DAI Jianli<sup>4</sup>, GAO Yunhe<sup>2</sup>, XIONG Zhuo<sup>3\*</sup>, CHEN Lin<sup>1,2\*</sup>

1 Medical School of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China

2 Senior Department of General Surgery, the First Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

3 Biomanufacturing Center, Department of Mechanical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

4 Institute of New Materials and Advanced Manufacturing, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing 100089, China

**Abstract:** The adoptive immunotherapy mediated by tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) has shown definite efficacy against various solid tumors. However, the inefficiency of the conventional method based on *in vitro* expansion of TILs fails to achieve the cell count and high tumor-killing activity required for therapeutic purposes. This study investigated the effect of 3D tumor spheroids on the activation and expansion of TILs *in vitro*, aiming to provide a novel approach for the expansion of TILs. We procured TILs and primary tumor cells from surgical samples of lung cancer patients and then compared the impacts of lung cancer cell line NCI-H1975 and primary lung cancer cells cultured under 2D and 3D conditions on the activation, expansion, and anti-tumor activity of TILs. Furthermore, we added the programmed cell death protein 1 (PD-1) antibody into the co-culture of primary tumor cells and TILs within a 3D environment to assess the effects of the antibody on TILs. The results showed that compared with 2D cultured tumor cells, the 3D cultured H1975 cells significantly enhanced the expansion of TILs, increasing the proportion of CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in TILs to 61.6%. The 3D primary tumor model also enhanced the proportion of CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in TILs (45.5%, 54.4%), induced apoptosis of tumor epithelial cells and decreased the overall tumor cells survival rate (16.7%) after co-culture. PD-1 antibodies further improved the *in vitro* expansion capacity of TILs mediated by 3D tumor spheroids, resulting in the proportions of 50.9% and 57.0% for CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells and enhancing the antitumor activity significantly (reducing the overall tumor survival rate to 9.36%). In summary, the use of 3D tumor spheroids significantly promoted the expansion and improved the anti-tumor effect of TILs, and the use of the PD-1 antibody further promoted the expansion and tumor-killing effect of TILs.

**Keywords:** 3D culture; tumor model; tumor-infiltrating lymphocytes; T-cell expansion *in vitro*; programmed cell death protein 1

在过去 10 年中, 免疫疗法, 尤其是基于细胞的免疫疗法, 为癌症治疗提供了新策略。近期临床研究表明, 采用肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) 移植治疗肿

瘤表现出良好的疗效<sup>[1-3]</sup>。TILs 是体内产生的一类对癌细胞具有高度特异性的免疫细胞<sup>[4]</sup>。经过体外分离、筛选、扩增和活化后, 它们将被植入患者体内, 发挥特异性攻击和清除肿瘤细

胞的作用<sup>[4-5]</sup>。在传统手段中,为了获得有识别新抗原能力的 T 淋巴细胞,研究人员通常会从肿瘤中分离出 TILs,并通过 CD3 抗体、 $\gamma$  干扰素、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)等刺激 T 细胞扩增<sup>[6]</sup>。然而,由于这种扩增方法缺乏特异性,且识别新抗原的 T 细胞比例非常低,大量非特异性的 T 细胞也会得到显著扩增,导致靶向新抗原的 T 细胞被淹没在其中<sup>[7-8]</sup>。因此,探索新的 TILs 体外激活扩增有效手段具有重要临床意义。

研究表明,诱导 T 细胞的活化与增殖需要两种信号:一种是 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)/CD3 与抗原提呈细胞(antigen-presenting cells, APCs)表面特异的 MHC II 抗原肽复合物结合产生的特异性抗原刺激信号<sup>[9]</sup>;另一种是由 APCs 表面的协同刺激分子和相应的 TCR 相互作用后产生的非特异性协同刺激信号,其中 CD28/B7 是最为重要的协同刺激分子,能增加 IL-2 的产生,加速 T 细胞增殖,阻止细胞进入无反应状态或死亡<sup>[9-10]</sup>。在体外联合使用 CD3 和 CD28 的抗体刺激 T 细胞,模拟 T 细胞活化的双信号作用,是进行 T 细胞激活与扩增应用最广泛的方法<sup>[11-12]</sup>。除直接使用功能性抗体以外,目前磁珠法(CD3/CD28 抗体偶联磁珠)以及多聚体法(CD3/CD28 抗体偶联 streptamer 多聚体)也是激活扩增 T 细胞比较常见的两种方法<sup>[10]</sup>。此外,一些生物材料和载体的应用也为 TILs 的扩增提供了更为有效的工具。如,由多孔二氧化硅微棒支撑的流体脂质双层系统(APC-ms),可在体外模拟 APCs 功能,高效促进原代小鼠和人 T 细胞的多克隆扩增<sup>[10,13]</sup>。

最近研究指出,肿瘤细胞裂解物中的大量抗原促进并确保了 CD4<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的平衡激活,对于有效清除肿瘤至关重要<sup>[14]</sup>。但由于 T 细胞与肿瘤细胞的相互作用,导致共

培养存在一定难度。而类器官的出现为肿瘤免疫治疗提供了新机遇。通过患者自体肿瘤构建的类器官与外周血淋巴细胞共培养,诱导 T 细胞的特异性免疫反应,为分离评估肿瘤免疫中的 T 细胞提供了借鉴<sup>[15]</sup>。

本文提出一种利用 3D 肿瘤模型刺激 TILs 细胞并增强其肿瘤杀伤作用的方法,以特异性获得大量靶向肿瘤的 TILs;将 3D 肿瘤模型与传统 TILs 体外培养方法、2D 肿瘤细胞系共培养法进行对比,分析了 3D 肿瘤模型对 TILs 的增殖及其肿瘤杀伤作用的影响,并评估了程序性死亡受体 1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 抗体对 3D 肿瘤模型激活扩增的 TILs 抗肿瘤作用的影响,以期 TILs 的体外激活扩增提供新策略、新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、Advanced DMEM F12 培养基、各类器官因子(表 1)、1640 培养基、青霉素-链霉素双抗、PBS 缓冲液、HBSS 缓冲液、HEPES 缓冲液、TrypLE 消化酶、山羊血清、细胞筛网和 DAPI 染料购自北京拜尔迪生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Bioind 公司;胶原酶 I、胶原酶 IV 购自 wako 公司;矿物油、Span 80 和 Triton-X100 购自 Sigma-Aldrich 公司;基质胶购自康宁公司;甲基丙烯酸酐化水凝胶(gelatin methacryloyl, GelMA)、面光源购自永沁泉智能设备有限公司;CD3、CD8、CD28、E-cadherin、EpCAM 和 CD45 抗体购自 BioLegend 公司;PD-1 抗体购自百济神州(北京)生物科技有限公司;流式凋亡检测试剂盒购自赛默飞世尔科技公司;4%多聚甲醛溶液购自赛尔玛生物技术有限公司;

IL-2 购自近岸蛋白质科技股份有限公司；活死染料购自同仁化学研究所(Dojindo)。微流控注射泵购自申辰泵业有限公司；加热型磁力搅拌器购自大龙兴创实验仪器(北京)股份公司；BD FAC Symphony™ A5 SE 全光谱流式细胞分析仪购自碧迪医疗器械有限公司；FV3000 激光共聚焦显微镜购自 OLYMPUS 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分离原代肿瘤细胞及 TILs

本研究所用肿瘤标本取自 2 例在北京肿瘤医院住院接受肺癌手术的患者。本实验已获得北京肿瘤医院及清华大学伦理委员会的批准(批准号为 20220301)，并取得患者家属的知情同意。在生物安全柜中进行后续操作。首先将肺癌手术标本转移至培养皿中，使用眼科剪将其锐性分离成约 1 mm<sup>3</sup> 的碎组织，加入约 10 mL 胶原酶 I (1 mg/mL) 和胶原酶 IV (1 mg/mL) 混合液(体积比 1:1) 开始消化，37 °C 培养箱孵育 1–2 h。随后，使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化。PBS 清洗后一部分使用 100 μm 筛网过滤细胞消化液，随后转入 50 mL 离心管，1 200 r/min 离心 3 min，弃掉上清液，使用基质胶重悬后点于 6 孔板中进行原代细胞 3D 培养。另一部分使用 40 μm 筛网过滤细胞消化液，1 500 r/min 离心 3 min，弃掉上清液，使用淋巴细胞培养基培养，细胞每隔 2–3 d 进行换液处理。

### 1.2.2 细胞培养

本实验所用肺癌细胞系 NCI-H1975 (以下简称 H1975) 购自国家实验细胞资源共享平台。H1975 置于含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基中培养；原代肿瘤细胞置于添加类器官因子的 Advanced DMEM F12 培养基中培养；使用含 5% FBS、IL-2、CD3 抗体和 CD28 抗体的 1640 培养基对 TILs 进行培养，所有培养基均添加 1% 青霉素-链霉素双抗。各成分浓度见表 1。所

有细胞均置于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 浓度的标准孵箱中培养。

### 1.2.3 流式细胞术检测

首先收集待检测细胞，1 200 r/min 离心 5 min 至 15 mL 离心管底部。待测样品为 3D 肿瘤细胞则需使用 TrypLE 消化 5–10 min，冰 PBS 清洗，随后用冰封闭液(封闭液：1×HBSS，2% FBS，10 mmol/L HEPES，1% 青霉素-链霉素双抗)重悬并通过 70 μm 的细胞滤网过滤；待测样品为 2D 细胞系(例如 TILs)则无需消化，将离心后的沉淀用冰封闭液重悬并通过 70 μm 的细胞滤网过滤。收集滤后细胞并计数。随后在 400×g 的转速下离心 5 min。将离心后的细胞沉淀用冰封闭液重悬，配制成 2×10<sup>7</sup>/mL 的细胞悬液。分离多组细胞悬液并进行染色(100 μL/组)。依据分组分别加入 2 μL 抗体(抗体为：CD3-PE+CD8-APC、EpCAM-APC+E-cadherin-PE-cyc7 和

表 1 培养基中各成分的浓度

Table 1 The concentration of each component in the medium

Reagents for cell culture	Final concentration
GlutaMAX	1% (V/V)
B-27 supplement (50×)	1×
N2 supplement (100×)	1×
EGF	40 ng/mL
Human FGF-basic	200 ng/mL
Wnt3A	50 ng/mL
Recombinant human noggin	50 ng/mL
Recombinant human R-spondin1	500 ng/mL
Y-27632	10 μmol/L
A83-01	2 μmol/L
SB202190	3 μmol/L
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B, sterile solution	1% (V/V)
IL-2	2 500 IU/mL
CD3 antibody	30 ng/mL
CD28 antibody	20 ng/mL

DAPI+Annexin V-FITC)并在 4 °C冷室中缓慢摇动避光孵育 15 min。随后以 400×g 的转速在 4 °C 离心 5 min。用 300 μL 冰封闭液重悬并加入 1 μL 0.5 mg/mL 7-ADD 溶液, 避光孵育 10–20 min, 上机测试。

#### 1.2.4 PD-1 抗体药物处理实验

在低吸附 96 孔板中将 3D 原代肿瘤球和 TILs 以 10:1 的细胞数目比共培养。将 PD-1 抗体加入细胞培养孔中, 终浓度是 10 μg/mL。4 d 后, 使用流式细胞术检测 TILs 的数目、CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞的比例; 活死染色及免疫荧光染色观察肿瘤细胞的存活情况, 并对原代肿瘤细胞的活力进行流式细胞学分析。

#### 1.2.5 活死染色

使用 PBS 溶液配制活死染液。随后将 3D 肿瘤球转移至活死染液中, 37 °C 条件下孵育 20 min。使用 PBS 洗涤细胞 2 次。最后使用激发波长为 488、594 nm 的荧光观察细胞并拍照。

#### 1.2.6 免疫荧光染色

将 3D 肿瘤球取出置于 4%多聚甲醛中室温固定 30 min。PBS 清洗 3 次, 随后用 0.1% Triton-X100 处理 30 min 进行通透处理。PBS 清洗 3 次。之后用 10%山羊血清室温封闭 1 h。封闭结束后加 EpCAM、CD45 一抗, 4 °C 冰箱过夜。PBS 清洗 3 次。加二抗 4 °C 过夜。PBS 清洗 3 次。使用荧光显微镜观察细胞并拍照。

#### 1.2.7 统计学分析

利用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计学分析及处理, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 两组以上样本均数的比较采用方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 3D 肿瘤球的制备

首先探究了 3D 肿瘤球的制备, 将肺癌细胞

系 H1975 与 GelMA 水凝胶混合均匀, 随后使用液滴微流控技术通过油相将生物墨水剪切成型, 依次通过温度交联及光交联, 构建 3D 培养的肿瘤球(图 1A、1B)。后续对 3D 肿瘤球进行了活死染色, 结果证实 3D 肿瘤球具有良好的细胞活力(图 1C)。

### 2.2 3D 肿瘤球和 2D 肿瘤细胞系刺激对 TILs 扩增的对比

3D 肿瘤球制备成功后, 探究了 2D、3D 培养肿瘤细胞系对 TILs 扩增能力的影响。使用肺癌细胞系 H1975 及 1 号患者的 TILs 进行实验。3 组起始 TILs 细胞数为 0.5×10<sup>5</sup> 个, 培养 3 d 后, 3 组 TILs 均有不同程度扩增。与传统体外扩增方式相比, 添加 2D、3D 肿瘤刺激后 TILs 扩增能力有明显增加(P<0.001) (图 2)。共培养 3 d, 传统培养方式下 TILs 细胞总数可扩增 4 倍左右, 2D 肿瘤细胞系刺激可扩增 5 倍以上, 而添加 3D 肿瘤球刺激后 TILs 扩增能力增加最显著, 可扩增 9 倍以上。

### 2.3 3D 肿瘤球和 2D 肿瘤细胞系刺激对 TILs 中 T 细胞亚群的影响

在上述结果基础上, 进一步探究扩增后的 TILs 中 CD3 及 CD8 均阳性的细胞比例。流式细胞术检测结果发现, 相较于传统体外扩增(CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞 46.4%), 添加 2D、3D 肿瘤刺激后 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞的比例均进一步增加(2D-H1975: 48.9%; 3D-H1975: 61.6%), 证实添加 3D 肿瘤球具有更强的诱导 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞产生的能力(图 3A)。对 CD3 及 CD8 均阳性的细胞总数计数结果进一步证实 3D 肿瘤球刺激后形成的 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞数量最多(图 3B)。

### 2.4 GelMA 水凝胶材料对 TILs 扩增能力的检测

为了进一步验证 3D 肿瘤球中发挥关键刺激作用的因素, 排除材料本身对 TILs 的刺激作用, 将 GelMA 空球与 1 号患者的 TILs 进行了共培养

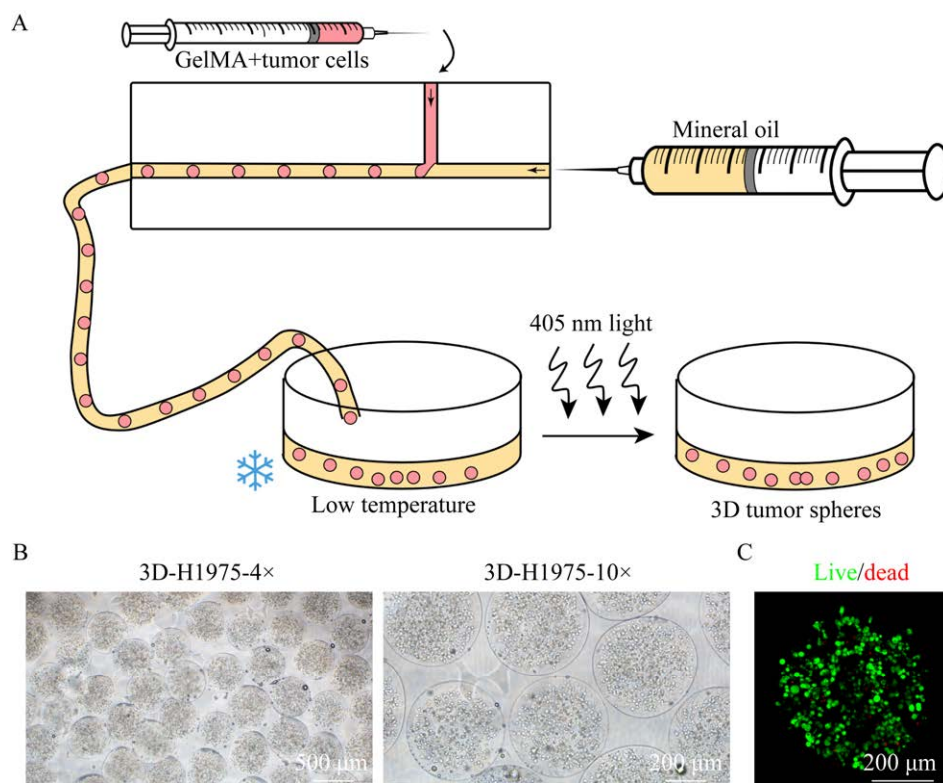


图1 3D肿瘤球的制备及活死染色图 A: 3D肿瘤球的制备过程. B: 3D-H1975肿瘤球的明场图. C: 3D-H1975肿瘤球的活死染色图

Figure 1 The fabrication process and live/dead staining images of 3D tumor spheres. A: The fabrication process of 3D tumor spheres. B: Bright field images of 3D-H1975 tumor spheres. C: Live/dead staining images of 3D-H1975 tumor spheres.

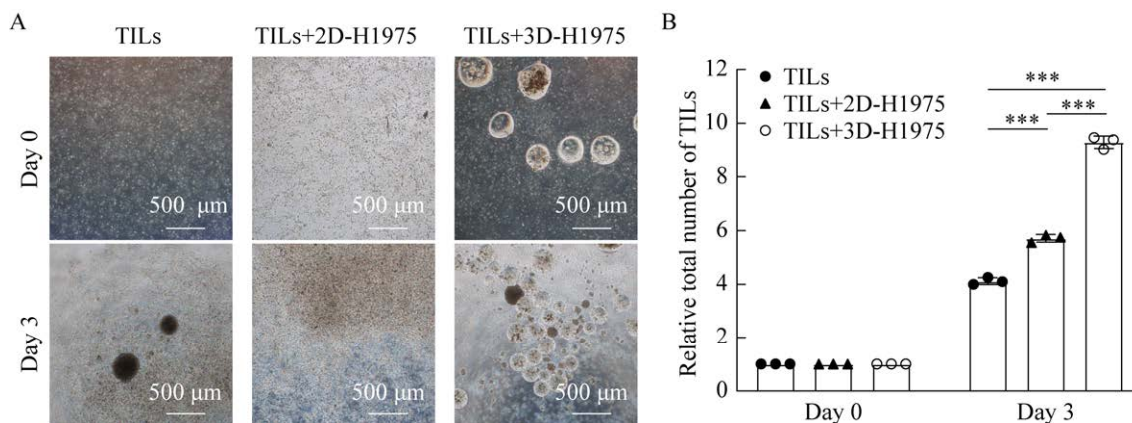


图2 三种方法对TILs扩增能力影响的对比 A: 3种方法对TILs扩增能力影响对比的明场图. B: 3种方法对TILs扩增能力影响对比的统计图(\*\*\*:  $P < 0.001$ , 方差分析)

Figure 2 Comparison of the effect of three methods on the expansion ability of TILs. A: Bright field images of comparing the effects of three methods on the expansion ability of TILs. B: Statistical diagram of the comparison of the effects of three methods on the expansion ability of TILs (\*\*\*:  $P < 0.001$ , one-way ANOVA).

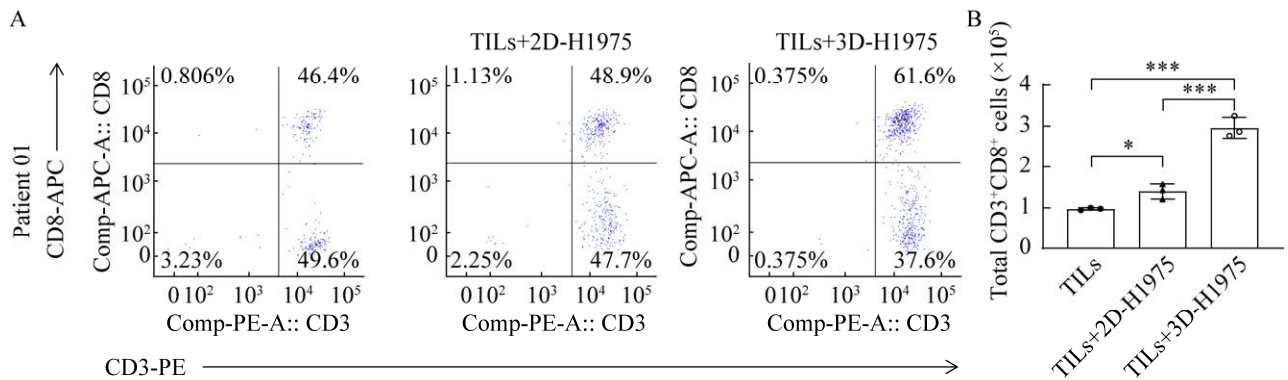


(图 4A)。结果证实, GelMA 材料本身对 TILs 的扩增无明显影响( $P>0.05$ ) (图 4B)。

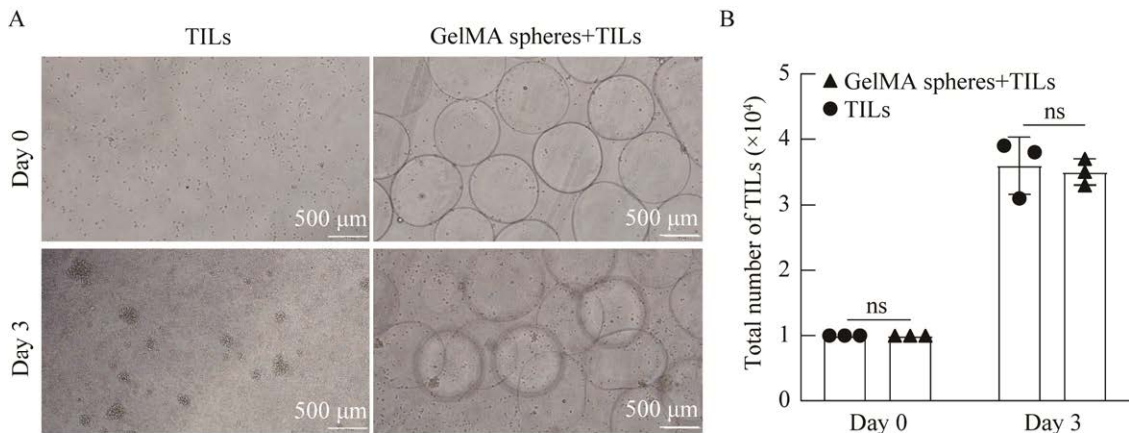
### 2.5 添加 3D 原代肿瘤球及 PD-1 抗体对 TILs 扩增及其中 T 细胞亚群的影响

以上研究已经在肺癌细胞系中得出结论: 添加 3D 培养的细胞系可以显著增加  $CD3^+/CD8^+$

细胞的比例。而在对应的原代肿瘤样本中有无相似结论尚不清楚。因此, 将 2 例 3D 培养的原代肿瘤细胞球与其相应的 TILs 细胞进行了共培养。3 组起始 TILs 细胞数均为  $0.5 \times 10^5$  个。共培养 4 d 后, 3D 原代肿瘤球同样可以显著扩增 TILs ( $P<0.001$ ) (图 5A–5D), 并提高  $CD3^+/CD8^+$  细胞的比例(1 号



**图 3 三种方法对 TILs 中 T 细胞亚群影响的对比** A: 流式细胞术检测 3 种方法对  $CD3^+/CD8^+$  细胞的比例影响的对比. B: 3 种方法对  $CD3^+/CD8^+$  细胞增殖影响的统计图(\*:  $P<0.05$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ,  $t$ -检验)  
 Figure 3 Comparison of the effect of three methods on T cell subsets in TILs. A: The effect of three methods on the proportion of  $CD3^+/CD8^+$  cells detected by flow cytometry. B: Statistical diagram of the effects of three methods on the proliferation of  $CD3^+/CD8^+$  cells (\*:  $P<0.05$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ ,  $t$ -test).



**图 4 GelMA 材料体系对 TILs 扩增的影响** A: 添加 GelMA 空球前后 TILs 增殖变化的明场图. B: 添加 GelMA 空球前后对 TILs 增殖影响的统计图(ns:  $P>0.05$ ,  $t$ -检验)  
 Figure 4 Effect of GelMA material on TILs' expansion. A: The change of TILs proliferation before and after GelMA empty spheres were added. B: Statistical graph of TILs proliferation before and after adding GelMA empty spheres (ns:  $P>0.05$ ,  $t$ -test).

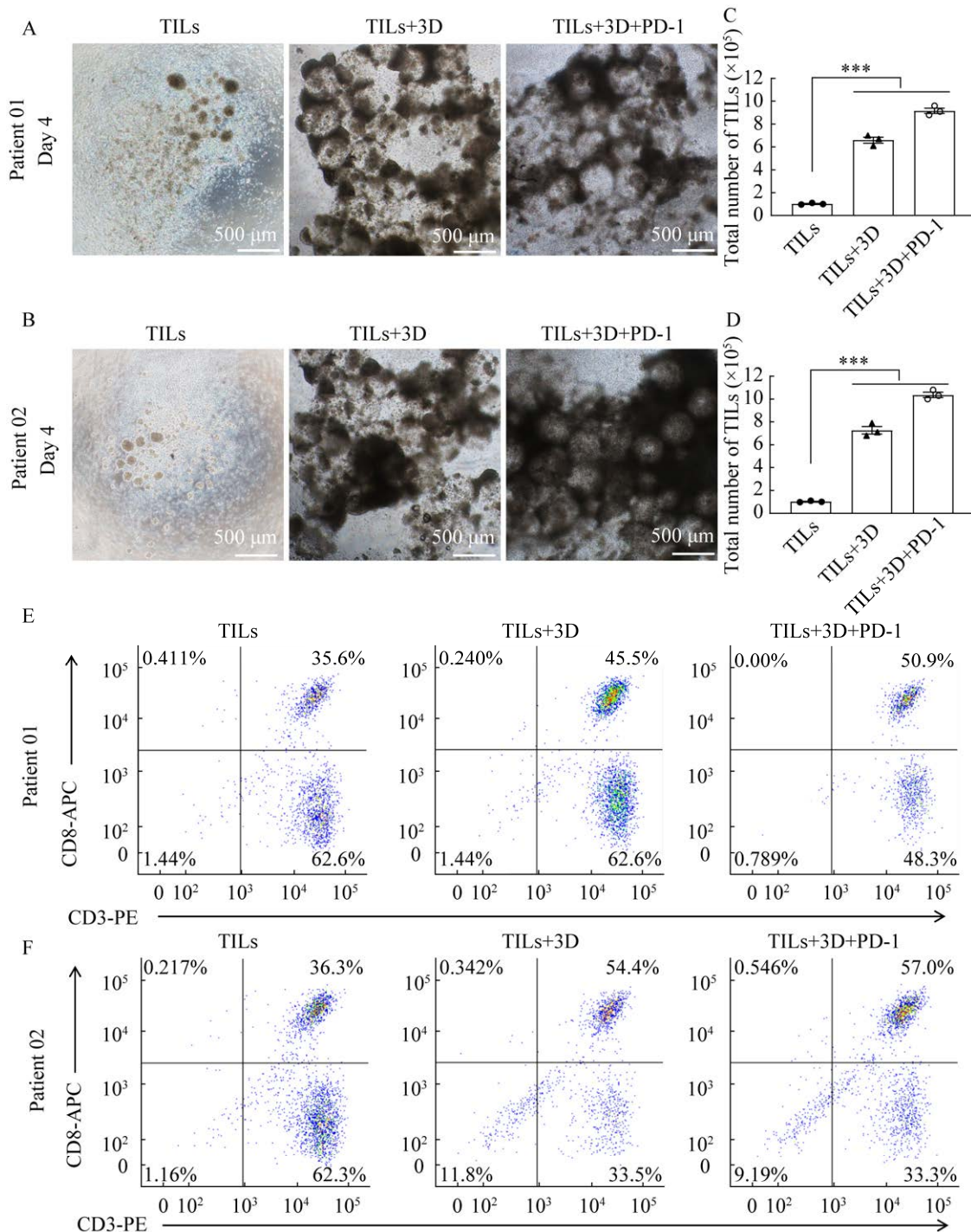


图 5 添加 3D 原代肿瘤球及 PD-1 抗体对 TILs 细胞扩增及其中 T 细胞亚群的影响 A、B: 添加 3D 原代肿瘤球及 PD-1 抗体前后 TILs 扩增的明场图。C、D: 添加 3D 原代肿瘤球及 PD-1 抗体前后 TILs 扩增变化的统计图。E、F: 添加 3D 原代肿瘤球及 PD-1 抗体前后 TILs 的流式检测结果(\*\*\*:  $P < 0.001$ ,  $t$ -检验)

Figure 5 Effects of addition of 3D primary tumor spheres and PD-1 antibody on the expansion and T cell subsets of TILs. A, B: Bright field images of TILs expansion after adding 3D primary tumor spheres and PD-1 antibody. C, D: Statistical diagram of TILs changes after adding 3D primary tumor spheres and PD-1 antibody. E, F: Flow cytometry results of TILs activation after adding 3D primary tumor spheres and PD-1 antibody (\*\*\*:  $P < 0.001$ ,  $t$ -test).



患者: 45.5%, 2号患者: 54.4%) (图 5E、5F)。添加 PD-1 抗体后这一刺激作用部分加强(TILs 扩增 16 倍以上; CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞 1号患者: 50.9%, 2号患者: 57.0%), 提示 PD-1 抗体可进一步刺激并诱导 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞产生(图 5)。

## 2.6 添加 PD-1 抗体对 TILs 浸润 3D 肿瘤球的影响

为了进一步验证上述 PD-1 抗体刺激的 TILs 能否发挥杀伤肿瘤细胞的作用, 将 PD-1 抗体处理前后 1号患者的 3D 原代肿瘤球进行了活死染色、免疫荧光染色和流式细胞术检测。结果显示, 3D 肿瘤细胞球刺激后的 TILs 对肿瘤细胞具有明显的杀伤作用, 添加 PD-1 抗体后这一杀伤作用进一步加强(图 6A、6B)。免疫荧光染色结果同样证实, 添加 PD-1 抗体后, TILs 细胞能够更好地浸润 3D 肿瘤球(图 6C)。随后的流式细胞术检测结果证实, 添加 3D 肿瘤球刺激后, TILs 细胞能够很好地杀伤肿瘤细胞(肿瘤上皮细胞比率为 9.31%) (图 6D), 并促使其凋亡(肿瘤上皮细胞整体存活率为 16.7%) (图 6E、6F)。同样地, 添加 PD-1 抗体后, 杀伤作用进一步增加(肿瘤上皮细胞比率为 9.27%, 肿瘤上皮细胞整体存活率为 9.36%) (图 6)。

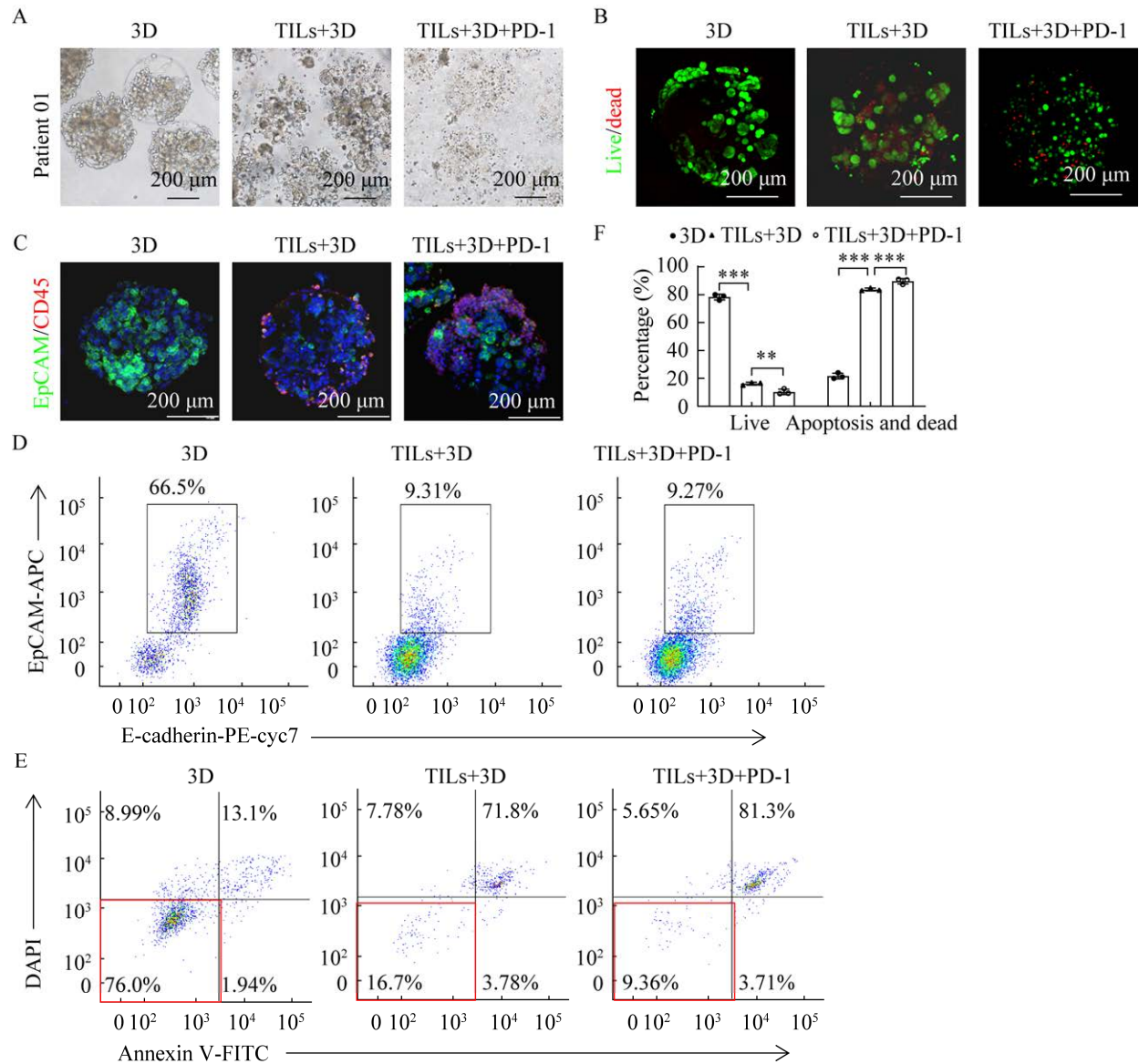
## 3 讨论与结论

尽管 TILs 免疫疗法取得了显著成就, 但仍然面临一些挑战, 包括 TILs 体外激活扩增的效率以及抗肿瘤效果的持久性<sup>[16-23]</sup>。目前常用的 TILs 体外扩增方法是利用细胞培养技术, 同时添加必要的细胞生长因子(如 IL-2、CD3 等), 但扩增效率仍不理想<sup>[24]</sup>。本文提出一种利用肿瘤 3D 培养来介导 TILs 体外激活扩增的方法。研究发现, 相较于传统 TILs 体外培养方法和 2D 肿瘤细胞系共培养法, 3D 肿瘤球显著诱导 TILs 体外扩增, 增加 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞的比例, 并增

加其抗肿瘤能力。此外, PD-1 抗体可进一步促进 3D 肿瘤球介导的 TILs 细胞的扩增和肿瘤杀伤能力。

Dijkstra 等<sup>[15]</sup>研究表明, 肿瘤类器官可诱导外周血淋巴 T 细胞的特异性免疫反应。本研究进一步发现 3D 培养的肿瘤球促进 TILs 体外增殖。实验结果表明, 与传统体外扩增方式和 2D 肿瘤细胞系刺激相比, 3D 培养的肿瘤细胞系刺激 3 d 后, TILs 总数可扩增 9 倍以上, 且 CD3 及 CD8 均阳性的细胞比例增加(61.6%) (图 2B、3A)。同样地, 3D 培养的原代肿瘤细胞刺激后, TILs 扩增总数可扩增 12 倍以上, CD3 及 CD8 均阳性的细胞比例增加(图 5E)。为排除 3D 培养材料 GelMA 对 TILs 细胞扩增的影响, 将 GelMA 空球与 TILs 细胞进行共培养, 发现 TILs 扩增激活的程度无显著改变。观察发现, TILs 在 3D 肿瘤球周围有明显的聚集现象, 可能是因为肿瘤抗原在 GelMA 材料中形成了浓度梯度, 而 GelMA 为 TILs 提供了可附着位点, 增加了 TILs 与 3D 肿瘤球之间的信息交互。此外, 在 3D 培养条件下, 肿瘤细胞受限在 GelMA 球的范围内, 一定程度上避免了与 TILs 的直接接触和混合, 减少了后期 TILs 分离纯化的难度。

自 2014 年首款 PD-1 肿瘤免疫疗法获批至今, 已发现其在多种癌症中具有治疗潜力。研究显示, 纳武单抗(nivolumab)将晚期非小细胞肺癌患者的 4 年生存率提高至 14%<sup>[25-26]</sup>; 派姆单抗(pembrolizumab)将晚期恶性黑色素瘤患者的 5 年生存率从 17%提高至 34%<sup>[27]</sup>。作为免疫激活剂, PD-1 抗体增强体内免疫细胞 T 细胞对肿瘤细胞的识别, 从而实现肿瘤杀伤。截至 2021 年底, PD-1 抗体联合 TILs 疗法已在晚期宫颈癌、转移性黑色素瘤、头颈鳞状细胞癌和非小细胞肺癌取得了较好的临床数据<sup>[28-29]</sup>。本研究发现, PD-1 抗体进一步促进 3D 培养的原代肺



**图 6 PD-1 抗体处理前后 TILs 对 3D 原代肿瘤球作用的影响** A: PD-1 抗体处理前后 TILs 对 3D 原代肿瘤球作用变化的明场图. B: PD-1 抗体处理前后 TILs 对 3D 原代肿瘤球作用变化的活死染色图. C: PD-1 抗体处理前后 TILs 对 3D 原代肿瘤球浸润的免疫荧光图. D: 添加 TILs、PD-1 抗体对 3D 肿瘤球上皮存活情况影响的流式检测结果. E: 添加 TILs、PD-1 抗体对 3D 肿瘤球细胞凋亡影响的流式检测结果. F: 添加 TILs、PD-1 抗体对 3D 肿瘤球细胞凋亡影响的流式检测结果统计图(\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ,  $t$ -检验)

**Figure 6 Effect of activated TILs on 3D primary tumor spheres before and after PD-1 antibody treatment.** A: Bright field images of the change of activated TILs on 3D primary tumor spheres before and after PD-1 antibody treatment. B: Live and dead staining of the effect of activated TILs on 3D primary tumor spheres before and after PD-1 antibody treatment. C: Immunofluorescence images of activated TILs' infiltration on 3D primary tumor spheres before and after PD-1 antibody treatment. D: Flow cytometry results of the effects of adding TILs and PD-1 antibodies on the survival of 3D tumor spheres. E: Flow cytometry results of the effects of addition of TILs and PD-1 antibody on apoptosis of 3D tumor spheres. F: Statistical diagram of flow detection results of the effects of addition of TILs and PD-1 antibody on apoptosis of 3D tumor spheres (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ,  $t$ -test).

癌细胞所介导的 TILs 增殖, 且与未添加组相比, 添加 PD-1 抗体组的 TILs 能更好地浸润 3D 肿瘤球并杀伤肿瘤细胞(图 6B、6C)。证实 3D 肿瘤球/TILs 与 PD-1 抗体联合作用能进一步促进 TILs 增殖, 并增强其肿瘤杀伤作用。

综上所述, 本研究通过对比细胞系/原来来源的 3D 肿瘤球共培养法与传统 TILs 体外扩增方法、2D 细胞系共培养法的效果, 发现 3D 肿瘤球刺激后, TILs 拥有较高的扩增总数、CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比例和肿瘤杀伤活性。进一步实验发现, PD-1 抗体提升了 3D 肿瘤球对 TILs 的扩增作用, 增加了其 CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比例以及肿瘤杀伤能力, 证实 3D 肿瘤球所激活扩增的, TILs 与 PD-1 抗体联用可进一步杀伤肿瘤。本研究初步证实了 3D 肿瘤球对 TILs 扩增激活的积极作用, 还需在更多的原代样本和体内实验验证, 并进一步探索其潜在机制。总之, 3D 肿瘤球能明显提高人 TILs CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比例, 促进 TILs 扩增, 为 TILs 的体外激活扩增提供了新思路。

## REFERENCES

[1] van den BERG JH, HEEMSKERK B, van ROOIJ N, GOMEZ-EERLAND R, MICHELS S, van ZON M, de BOER R, BAKKER NAM, JORRITSMA-SMIT A, van BUUREN MM, KVISTBORG P, SPITS H, SCHOTTE R, MALLO H, KARGER M, van der HAGE JA, WOUTERS MWJM, PRONK LM, GEUKES FOPPEN MH, BLANK CU, et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) therapy in metastatic melanoma: boosting of neoantigen-specific T cell reactivity and long-term follow-up[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2020, 8(2): e000848.

[2] STEVANOVIĆ S, HELMAN SR, WUNDERLICH JR, LANGHAN MM, DORAN SL, KWONG MLM, SOMERVILLE RPT, KLEBANOFF CA, KAMMULA US, SHERRY RM, YANG JC, ROSENBERG SA, HINRICHS CS. A phase II study of tumor-infiltrating lymphocyte therapy for human papillomavirus-associated epithelial cancers[J]. *Clinical Cancer Research: an*

*Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2019, 25(5): 1486-1493.

- [3] CREELAN BC, WANG C, TEER JK, TOLOZA EM, YAO JQ, KIM S, LANDIN AM, MULLINAX JE, SALLER JJ, SALTOS AN, NOYES DR, MONTOYA LB, CURRY W, PILON-THOMAS SA, CHIAPPORI AA, TANVETYANON T, KAYE FJ, THOMPSON ZJ, YODER SJ, FANG B, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1-resistant metastatic lung cancer: a phase 1 trial[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27: 1410-1418.
- [4] LIN BS, DU LK, LI HM, ZHU X, CUI L, LI XS. Tumor-infiltrating lymphocytes: warriors fight against tumors powerfully[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 132: 110873.
- [5] KUMAR A, WATKINS R, VILGELM AE. Cell therapy with TILs: training and taming T cells to fight cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 690499.
- [6] 刘佳梦, 毛朝明, 叶飞, 袁啸. 恶性胸/腹水肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)体外选择性 CD8<sup>+</sup>T 细胞扩增的培养体系建立及功能表型分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2023, 39(4): 311-317.
- [7] POSCHKE IC, HASSEL JC, RODRIGUEZ-EHRENFRIED A, LINDNER KAM, HERAS-MURILLO I, APPEL LM, LEHMANN J, LÖVGREN T, WICKSTRÖM SL, LAUENSTEIN C, ROTH J, KÖNIG AK, HAANEN JBAG, van den BERG J, KIESSLING R, BERGMANN F, FLOSSDORF M, STROBEL O, OFFRINGA R. The outcome of *ex vivo* TIL expansion is highly influenced by spatial heterogeneity of the tumor T-cell repertoire and differences in intrinsic *in vitro* growth capacity between T-cell clones[J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2020, 26(16): 4289-4301.
- [8] OLIVEIRA G, WU CJ. Dynamics and specificities of T cells in cancer immunotherapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2023, 23: 295-316.
- [9] DADWAL N, MIX C, REINHOLD A, WITTE A, FREUND C, SCHRAVEN B, KLICHE S. The multiple roles of the cytosolic adapter proteins ADAP, SKAP1 and SKAP2 for TCR/CD3-mediated signaling events[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 703534.
- [10] CHEUNG AS, ZHANG DKY, KOSHY ST, MOONEY DJ. Scaffolds that mimic antigen-presenting cells enable *ex vivo* expansion of primary T cells[J]. *Nature*

- Biotechnology, 2018, 36: 160-169.
- [11] WALSH AJ, MUELLER KP, TWEED K, JONES I, WALSH CM, PISCOPO NJ, NIEMI NM, PAGLIARINI DJ, SAHA K, SKALA MC. Classification of T-cell activation via autofluorescence lifetime imaging[J]. Nature Biomedical Engineering, 2021, 5: 77-88.
- [12] QUITT O, LUO SS, MEYER M, XIE Z, GOLSABZ-SHIRAZI F, LOFFREDO-VERDE E, FESTAG J, BOCKMANN JH, ZHAO LL, STADLER D, CHOU WM, TEDJOKUSUMO R, WETTENGEL JM, KO C, NOEBNER E, BULBUC N, SHOKRI F, LÜTTGAU S, HEIKENWÄLDER M, BOHNE F, et al. T-cell engager antibodies enable T cells to control HBV infection and to target HBsAg-positive hepatoma in mice[J]. Journal of Hepatology, 2021, 75(5): 1058-1071.
- [13] AGARWALLA P, OGUNNAIKE EA, AHN S, FROEHLICH KA, JANSSON A, LIGLER FS, DOTTI G, BRUDNO Y. Bioinstructive implantable scaffolds for rapid *in vivo* manufacture and release of CAR-T cells[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40: 1250-1258.
- [14] HARARI A, GRACIOTTI M, BASSANI-STERNBERG M, KANDALAFT LE. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2020, 19: 635-652.
- [15] DIJKSTRA KK, CATTANEO CM, WEEBER F, CHALABI M, van de HAAR J, FANCHI LF, SLAGTER M, van der VELDEN DL, KAING S, KELDERMAN S, van ROOIJ N, van LEERDAM ME, DEPLA A, SMIT EF, HARTEMINK KJ, de GROOT R, WOLKERS MC, SACHS N, SNAEBJORNSSON P, MONKHORST K, et al. Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids[J]. Cell, 2018, 174(6): 1586-1598.e12.
- [16] WARNER AB, CORRIE PG, HAMID O. Tumor-infiltrating lymphocyte therapy in melanoma: facts to the future[J]. Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2023, 29(10): 1835-1854.
- [17] HALL M, LIU H, MALAFA M, CENTENO B, HODUL PJ, PIMIENTO J, PILON-THOMAS S, SARNAIK AA. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2016, 4: 61.
- [18] MITCH L. TILs outperform ipilimumab in melanoma[J]. Cancer Discovery, 2023, 13(2): OF1.
- [19] MORENO V, SALAZAR R, GRUBER SB. The prognostic value of TILs in stage III colon cancer must consider sidedness[J]. Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology, 2022, 33(11): 1094-1096.
- [20] SIDAWAY P. Efficacy of TILs confirmed[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2023, 20: 64.
- [21] SIDAWAY P. TILs show early efficacy[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2021, 18: 603.
- [22] WANG ZJ, AHMED S, LABIB M, WANG HS, HU XY, WEI JR, YAO YX, MOFFAT J, SARGENT EH, KELLEY SO. Efficient recovery of potent tumour-infiltrating lymphocytes through quantitative immunomagnetic cell sorting[J]. Nature Biomedical Engineering, 2022, 6: 108-117.
- [23] ZHAO YS, DENG J, RAO SF, GUO SP, SHEN J, DU FK, WU X, CHEN Y, LI MX, CHEN MJ, LI XB, LI WP, GU L, SUN YH, ZHANG Z, WEN QL, XIAO ZG, LI J. Tumor infiltrating lymphocyte (TIL) therapy for solid tumor treatment: progressions and challenges[J]. Cancers, 2022, 14(17): 4160.
- [24] GRAU-VORSTER M, LÓPEZ-MONTAÑÉS M, CANTÓ E, VIVES J, OLIVER-VILA I, BARBA P, QUEROL S, RUDILLA F. Characterization of a cytomegalovirus-specific T lymphocyte product obtained through a rapid and scalable production process for use in adoptive immunotherapy[J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 271.
- [25] BRAHMER J, RECKAMP KL, BAAS P, CRINÒ L, EBERHARDT WEE, PODDUBSKAYA E, ANTONIA S, PLUZANSKI A, VOKES EE, HOLGADO E, WATERHOUSE D, READY N, GAINOR J, FRONTERA OA, HAVEL L, STEINS M, GARASSINO MC, AERTS JG, DOMINE M, PAZ-ARES L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373(2): 123-135.
- [26] ANTONIA SJ, BORGHAEI H, RAMALINGAM SS, HORN L, de CASTRO CARPEÑO J, PLUZANSKI A,

- BURGIO MA, GARASSINO M, CHOW LQM, GETTINGER S, CRINÒ L, PLANCHARD D, BUTTS C, DRILON A, WOJCIK-TOMASZEWSKA J, OTTERSON GA, AGRAWAL S, LI A, PENROD JR, BRAHMER J. Four-year survival with nivolumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis[J]. *The Lancet Oncology*, 2019, 20(10): 1395-1408.
- [27] HAMID O, ROBERT C, DAUD A, HODI FS, HWU WJ, KEFFORD R, WOLCHOK JD, HERSEY P, JOSEPH R, WEBER JS, DRONCA R, MITCHELL TC, PATNAIK A, ZAROOR HM, JOSHUA AM, ZHAO Q, JENSEN E, AHSAN S, IBRAHIM N, RIBAS A. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001[J]. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 2019, 30(4): 582-588.
- [28] O'MALLEY D, LEE S, PSYRRI A, SUKARI A, THOMAS S, WENHAM R, GOGAS H, JAZAERI A, MONK B, ROSE P, REUDA A, FINCKENSTEIN FG, JAGASIA M, FIAZ R, GARELIK B, SHI W, DESAI A, SULUR G, CHEN G, WU X, et al. 492 phase 2 efficacy and safety of autologous tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) cell therapy in combination with pembrolizumab in immune checkpoint inhibitor-naïve patients with advanced cancers[J]. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2021, 9(suppl 2): A523-A524.
- [29] CAUSHI JX, ZHANG JJ, JI ZC, VAGHASIA A, ZHANG BY, HSIUE EHC, MOG BJ, HOU WP, JUSTESEN S, BLOSSER R, TAM A, ANAGNOSTOU V, COTTRELL TR, GUO HD, CHAN HY, SINGH D, THAPA S, DYKEMA AG, BURMAN P, CHOUDHURY B, et al. Transcriptional programs of neoantigen-specific TIL in anti-PD-1-treated lung cancers[J]. *Nature*, 2021, 596: 126-132.

(本文责编 陈宏宇)