

## 非小细胞肺癌中免疫检查点及免疫治疗中细胞亚群的异质性\*

杨燕<sup>1</sup> 陈丹<sup>2</sup> 朱红革<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学附属肿瘤医院肺内科, 乌鲁木齐 830011; <sup>2</sup>新疆医科大学公共卫生学院, 乌鲁木齐 830054

**[摘要]** **目的** 鉴定非小细胞肺癌 (NSCLC) 中分子失调机制、免疫检查点异常以及反应于免疫治疗的免疫细胞。**方法** 收集 GSE81089, GSE120622 和 TCGA 数据库中 NSCLC 和对照的基因表达数据并进行差异表达和富集分析。鉴定差异表达的免疫检查点对总体生存的影响。收集 2022 年 6 月—2023 年 5 月于新疆医科大学附属肿瘤医院接受新辅助治疗的 NSCLC 患者的肿瘤和癌旁对照组织以及血液样本, 利用 qRT-PCR 检测肿瘤和癌旁对照组织中免疫检查点的表达。另外, 在 GSE207422 单细胞数据集中鉴定新辅助治疗后主要病理缓解 (MPR) 和非主要病理缓解 (NMPR) 之间免疫细胞的差异, 进一步通过流式细胞术检测 MPR 和 NMPR 之间免疫细胞的丰度差异。**结果** 在 GSE81089, GSE120622 和 TCGA 中鉴定了 2 505 个差异表达基因的交集, 富集分析发现交集基因主要参与神经活性配体-受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等信号通路; 此外, 有 6 个免疫检查点在 NSCLC 中差异表达, CD40LG、CD160、VTCN1、TDO2 显著影响患者的总体生存。与癌旁对照组比较, qRT-PCR 检测证实了 CD40LG 和 CD160 在 NSCLC 中显著低表达 ( $P < 0.05$ ), 而 VTCN1 和 TDO2 显著高表达 ( $P < 0.05$ )。通过整合 GSE207422 单细胞数据, 将 32 个细胞群分为 13 种细胞亚型, 其中 CD4、CD8、B 细胞、NK 和 M2 巨噬细胞在 MPR 中明显富集, 流式细胞术检测证实了这些免疫细胞在 MPR 中的丰度明显高于 NMPR。**结论** 免疫检查点与 NSCLC 患者总体生存显著相关, 并确认了 MPR 中富集的免疫细胞。这些发现为 NSCLC 的免疫治疗提供了新的生物学见解和潜在的治疗靶点。

**[关键词]** 非小细胞肺癌; 免疫检查点; 主要病理缓解; 免疫细胞

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2024.06.003

### Study on the Heterogeneity of Cell Subpopulations in Immunotherapy and Immune Checkpoints in Non-small Cell Lung Cancer

Yang Yan<sup>1</sup>, Chen Dan<sup>2</sup>, Zhu Hongge<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pulmonary Medicine, Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830011; <sup>2</sup>School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054

\*\* Corresponding author: Zhu Hongge, email: 1056923979@qq.com

**[Abstract]** **Objective** To identify molecular dysregulation mechanisms, immune checkpoint abnormalities, and immune cells responsive to immunotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Gene expression data for NSCLC and controls from the GSE81089, GSE120622, and TCGA databases were collected and subjected to differential expression and enrichment analysis. The impact of differentially expressed immune checkpoints on overall survival was identified. Tumor tissues, adjacent control tissues, and blood samples were collected from NSCLC patients who received neoadjuvant therapy at Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University from June 2022 to May 2023, the expression of immune checkpoints in tumor and adjacent control tissues was detected using qRT-PCR. Additionally, in the GSE207422 single-cell dataset, differences in immune cells between major pathological remission (MPR) and non-major pathological remission (NMPR) after neoadjuvant therapy were identified. The abundance differences of immune cells between MPR and NMPR were further detected by flow cytometry. **Results** In the GSE81089, GSE120622, and TCGA datasets, an intersection of 2 505 differentially expressed genes was identified. Enrichment analysis revealed that these intersecting genes are primarily involved in neuroactive ligand-receptor interaction, the PI3K-Akt signaling pathway, and cytokine-cytokine receptor interaction, among other signaling pathways. Additionally, six immune checkpoints were differentially expressed in NSCLC, with CD40LG, CD160, VTCN1, and TDO2 significantly impacting overall patient survival. Compared to the control group, qRT-PCR confirmed that CD40LG and CD160 were significantly downregulated in NSCLC ( $P < 0.05$ ), while VTCN1 and TDO2 were significantly upregulated ( $P < 0.05$ ). By integrating the GSE207422 single-cell dataset, 32 cell clusters were classified into 13 cell subtypes. Comparisons revealed a significant enrichment of CD4, CD8, B cells, NK cells, and M2 macrophages in MPR. Flow cytometry confirmed

\* 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2022D01C796, 2022D01C523)

\*\* 通讯作者: 朱红革, 电子邮箱 1056923979@qq.com

that the abundance of these immune cells was higher in MPR than in NMPR. **Conclusion** Immune checkpoints were significantly associated with the overall survival of NSCLC patients, and the enrichment of immune cells in MPR was confirmed. These findings offer new biological insights and potential therapeutic targets for the immunotherapy of NSCLC.

[**Key words**] Non-small cell lung cancer; Immune checkpoint; Major pathological remission; Immune cells

肺癌是人类癌症死亡的主要原因之一, 据估计每年约 180 万人因肺癌死亡, 造成巨大的社会负担和经济损失<sup>[1]</sup>。非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的肺癌亚型, 约占肺癌病例的 85%<sup>[2]</sup>。对于 NSCLC 早期患者, 手术是治疗的最佳选择, 部分患者通过手术可以实现治愈, 但仍有高达 30% 的患者术后复发<sup>[3]</sup>。20 世纪 80 年代至今, NSCLC 的诊断和治疗领域得到快速发展, 但患者总体五年生存率仍然很低, 主要归因于大多数患者诊断时已经处于疾病晚期, 限制了治疗选择和总体生存率<sup>[4]</sup>。因此, 针对 NSCLC 疾病特征探索新型治疗策略和临床用药方案对于改善患者预后至关重要。近年来, 随着对肿瘤微环境和宿主免疫应答的认识不断深入, 免疫疗法已经成为癌症治疗中最引人关注的前沿领域, 特别是免疫检查点抑制剂, 如程序性死亡 1 (Programmed cell death protein 1, PD-1) 或程序性死亡配体 1 (Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 抑制剂, 已经在多种实体瘤中显示出显著的抗肿瘤活性, 包括 NSCLC<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞过度表达 PD-L1, 与 PD-1 结合并诱导免疫抑制性肿瘤微环境, 帮助癌细胞免疫逃逸<sup>[6]</sup>。免疫检查点抑制剂的出现为 NSCLC 治疗提供了新的希望。对于早期疾病, 新近研究证实靶向治疗和免疫治疗结合可降低复发率<sup>[7]</sup>。另有初步临床试验结果显示, 与传统化疗相比, 部分患者接受免疫检查点抑制剂治疗可以实现更长的总生存期, 而其他患者并未产生持久的反应, 可能不会受益于此, 甚至可能出现严重的副作用<sup>[8-9]</sup>。提高免疫检查点治疗的反应效率和鉴定有效的生物标记已成为当前免疫疗法的主要挑战。因此, 深入了解 NSCLC 中的免疫细胞与免疫检查点之间的相互作用, 以及这种相互作用如何影响治疗反应, 对于优化免疫疗法、实施个体化治疗策略至关重要。本研究拟探讨 NSCLC 中影响患者预后的免疫检查点, 探索免疫细胞在免疫治疗中的异质性特征, 以期更好地理解 NSCLC 患者免疫检查点异常的临床意义和应对策略, 提升免疫治疗效果。

## 1 对象与方法

### 1.1 网络研究

**1.1.1 基因表达数据集** 从基因表达综合数据库 (Gene expression omnibus, GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载 GSE81089、GSE120622 和 GSE207422 数据集。GSE81089 中包括 199 例诊断为 NSCLC 的患者肿瘤组织和 19 例正常对照肺组织的高通量测序基因表达谱。GSE120622 中包括 81 例

NSCLC 组织和 19 例癌旁对照肺组织的高通量测序基因表达谱。癌症基因组图谱计划 (The cancer genome atlas, TCGA) 数据中包含 1 017 例 NSCLC 组织和 110 例癌旁对照肺组织的高通量测序基因表达谱。

**1.1.2 数据分析** 使用 DEseq2 软件包对 NSCLC 和对照进行差异表达分析,  $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$  且  $P \leq 0.05$  作为筛选条件获得显著的差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs)。对 3 套数据的 DEGs 进行交集分析。通过 clusterprofiler 软件包对交集 DEGs 进行富集分析, 包括基因本体 (Gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路。GO 分析包括生物过程 (Biological process, BP)、分子功能 (Molecular function, MF) 和细胞组分 (Cellular component, CC)。另外, 从公开文献和数据库中收集已知的免疫检查点基因, 在交集 DEGs 中鉴定差异表达的免疫检查点。进一步绘制 Kaplan-Meier (K-M) 生存曲线分析免疫检查点的表达与患者总体生存之间的关系。

**1.1.3 单细胞数据收集及处理** GSE207422 数据集包含 12 例 NSCLC 患者新辅助治疗 (PD-1 抗体 + 以铂类为基础的化疗) 后切除的肺组织单细胞 RNA 测序 (Single cell RNA sequencing, scRNA-seq) 数据。NSCLC 患者分为主要病理缓解 (Major pathological remission, MPR) 4 例和非主要病理缓解 (Non-major pathological remission, NMPR) 8 例。MPR 被定义为 PD-1 阻断联合化疗治疗后常规苏木素-伊红染色显示残留的存活肿瘤细胞不超过 10%。通过 Seurat 软件包分析每个样品中每个基因的读数矩阵。使用质量控制排除低质量读数: ① < 500 个表达基因; ② > 20% 的线粒体基因; ③ > 50% 的核糖体基因。使用一致流形逼近和投影 (Uniform manifold approximation and projection, UMAP) 方法对数据进行降维, 以进行二维可视化, 进一步使用 Leiden 算法进行细胞聚类。使用 FindAllMarkers 软件包对每个细胞群进行细胞类型注释。

## 1.2 临床研究

**1.2.1 患者和组织样本** 本研究选取了 20 例于 2022 年 6 月—2023 年 5 月在新疆医科大学附属肿瘤医院接受新辅助治疗的 NSCLC 患者, 包含 10 例 MPR 和 10 例 NMPR, 所有患者均具有明确的 NSCLC 病理诊断。收集患者的 NSCLC 组织和癌旁对照 (Normal control, NC) 组织, 以及外周血样本。NC 组织样本取自肿瘤切除边缘至少 2 cm 的正常肺组织。本研究由新疆医科大学附属肿瘤医院研究伦理委员会批准 (k-2022016)。患者及其家属

同意并签署知情同意书。纳入标准：①年龄 ≥ 60 岁；②接受肿瘤切除手术治疗。排除标准：①合并其他癌症的病史；②在其他医院接受过新辅助治疗或其他癌症治疗；③存在严重的心、肝、肾等器官功能不全。

**1.2.2 qRT-PCR 检测** 在液氮中加入 Trizol 并研磨组织样本，提取总 RNA。使用 Nanodrop 测定 RNA 的浓度和纯度。混合总 RNA、随机引物、逆转录缓冲液、dNTP、RNase 抑制剂和逆转录酶进行逆转录反应。反应条件：42 °C 30 min，85 °C 5 min。随后将 cDNA、特异性引物、SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher, 型号 K0221) 混合，进行 qRT-PCR 反应。反应条件：95 °C 10 min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 30 s，40 个循环；72 °C 10 min。以 GAPDH 为内参基因，用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算基因相对表达水平。特异性引物序列：TDO2 (5'-GGA-TGCACCGAGTGTCACTGATC-3', 5'-GAAGTCCAAGG-CTGTCATCGTCTC-3')；VTCN1 (5'-TGACCA-GG-GAGCCAACTTCTCG-3', 5'-AGAGCACAGACAA-CCTTCATGG-3')；CD160 (5'-TGTTGTGCCAGAA-GCCAGAAGTC-3', 5'-CAATCCCCTCACTGTGTAGT-TCCC-3')；CD40LG (5'-AATACCCACAGTTCGCCA-AACC-3', 5'-CATTGACAAACACCGAAGCACCTG-3')；GAPDH (5'-GTGTTCTACCCCAATGTGT-3', 5'-ATTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3')。

**1.2.3 流式细胞术** 荧光标记方案：PC5.5-CD3

和 FITC-CD4 抗体标记 CD4<sup>+</sup>T 细胞；PC5.5-CD3 和 PE-CD8 抗体标记 CD8<sup>+</sup>T 细胞；FITC-CD19 抗体标记 B 细胞；PE-CD56 抗体标记 NK 细胞；APC-CD14 和 PC5.5-CD206 抗体标记 M2 巨噬细胞。使用红细胞裂解液去除血液样本中的红细胞，得到白细胞悬液。使用细胞计数器计算细胞浓度，并调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  细胞/mL。将荧光标记的抗体加入到细胞悬液中，于 4 °C 中孵育 30 min。使用磷酸盐缓冲液洗涤细胞，去除未结合的抗体。将染色后的细胞样本在流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号 FACS Aria II) 中进行数据采集。使用 FlowJo 进行数据分析。

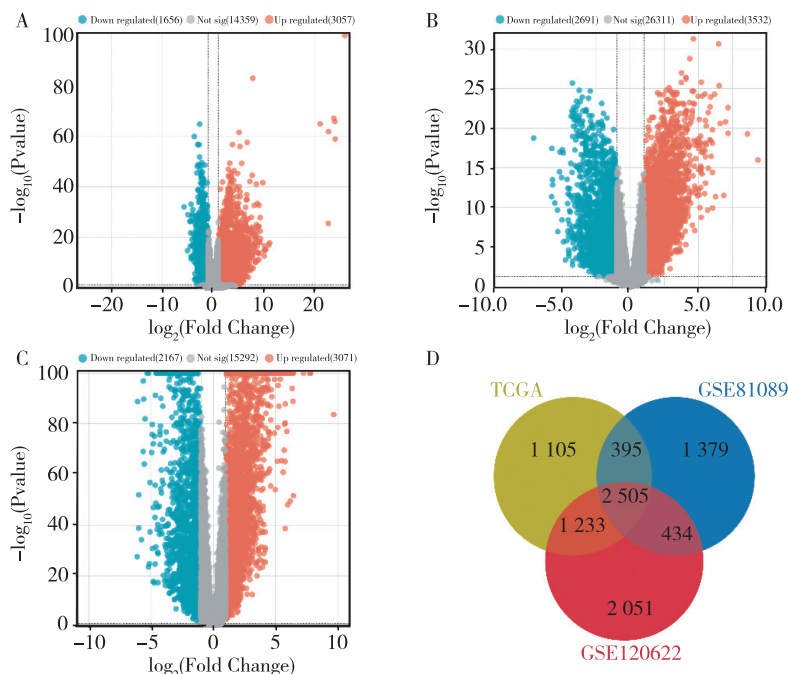
**1.3 统计学方法**

采用 GraphPad Prism 9.3.0 进行统计学分析，所有实验至少重复 3 次。正态分布及方差齐性的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 *t* 检验；非正态分布或方差不齐的定量资料以  $M (P_1, P_3)$  表示，采用 Mann Whitney *U* 检验； $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 网络研究结果**

**2.1.1 NSCLC 的差异表达基因** 在 NSCLC 和对照组间的差异表达分析结果中，GSE81089 中鉴定了 4 713 个 DEGs (图 1A)，GSE120622 中鉴定了 6 223 个 DEGs (图 1B)，TCGA 中鉴定了 5 238 个 DEGs (图 1C)。通过交集分析鉴定出了 2 505 个交集 DEGs (图 1D)。



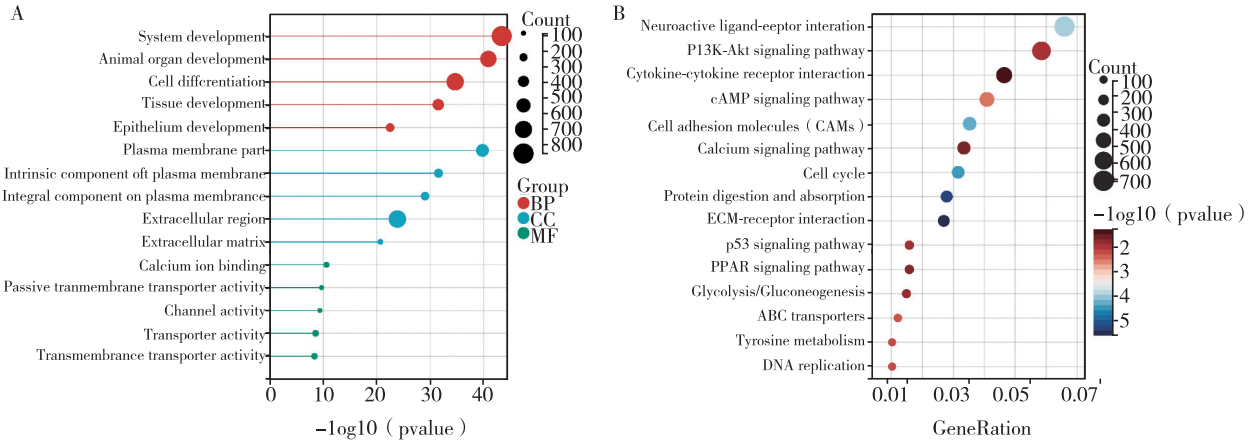
注：A 为 GSE81089 中差异表达基因的火山图，B 为 GSE120622 中差异表达基因的火山图，C 为 TCGA 中差异表达基因的火山图，D 为三组差异表达基因的交集

图 1 鉴定 NSCLC 和对照之间的差异表达基因

Fig. 1 Identification of differentially expressed genes between NSCLC and controls

富集分析显示, 交集 DEGs 主要富集于系统开发、细胞分化、钙离子结合等 GO 功能 (图 2A), 以及神经活性配体-受体相互作用、PI3K-Akt 信号

通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等 KEGG 信号通路 (图 2B)。



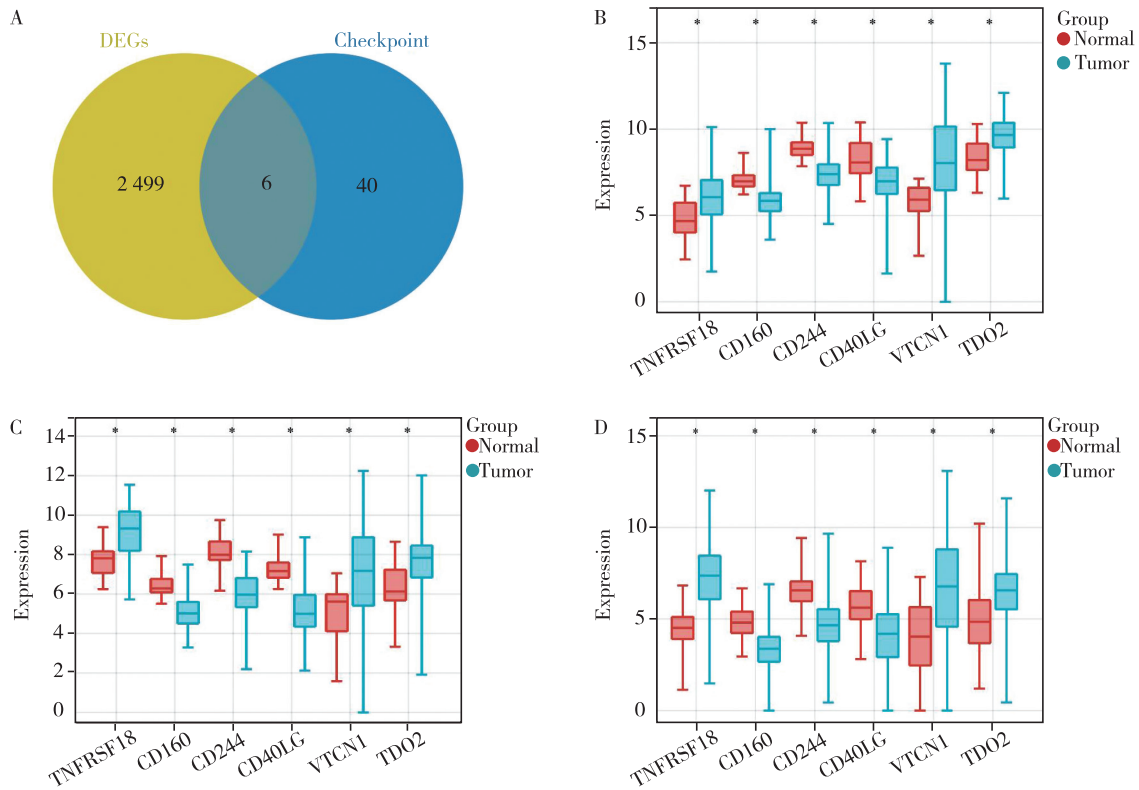
注: A 为交集 DEGs 参与的主要 GO 功能, 包括 BP、MF 和 CC; B 为交集 DEGs 参与的主要 KEGG 信号通路

图 2 交集 DEGs 的富集分析

Fig. 2 Enrichment analysis of intersecting DEGs

2.1.2 免疫检查点的差异表达 在 NSCLC 的交集 DEGs 中发现了 6 个免疫检查点表达差异显著 (图 3A)。在 GSE81089 (图 3B)、GSE120622 (图 3C)

和 TCGA (图 3D) 中 TNFRSF18、VTCN1 和 TDO2 在 NSCLC 中的表达高于对照组, CD160、CD244 和 CD40LG 的表达则低于对照组 ( $P < 0.05$ )。



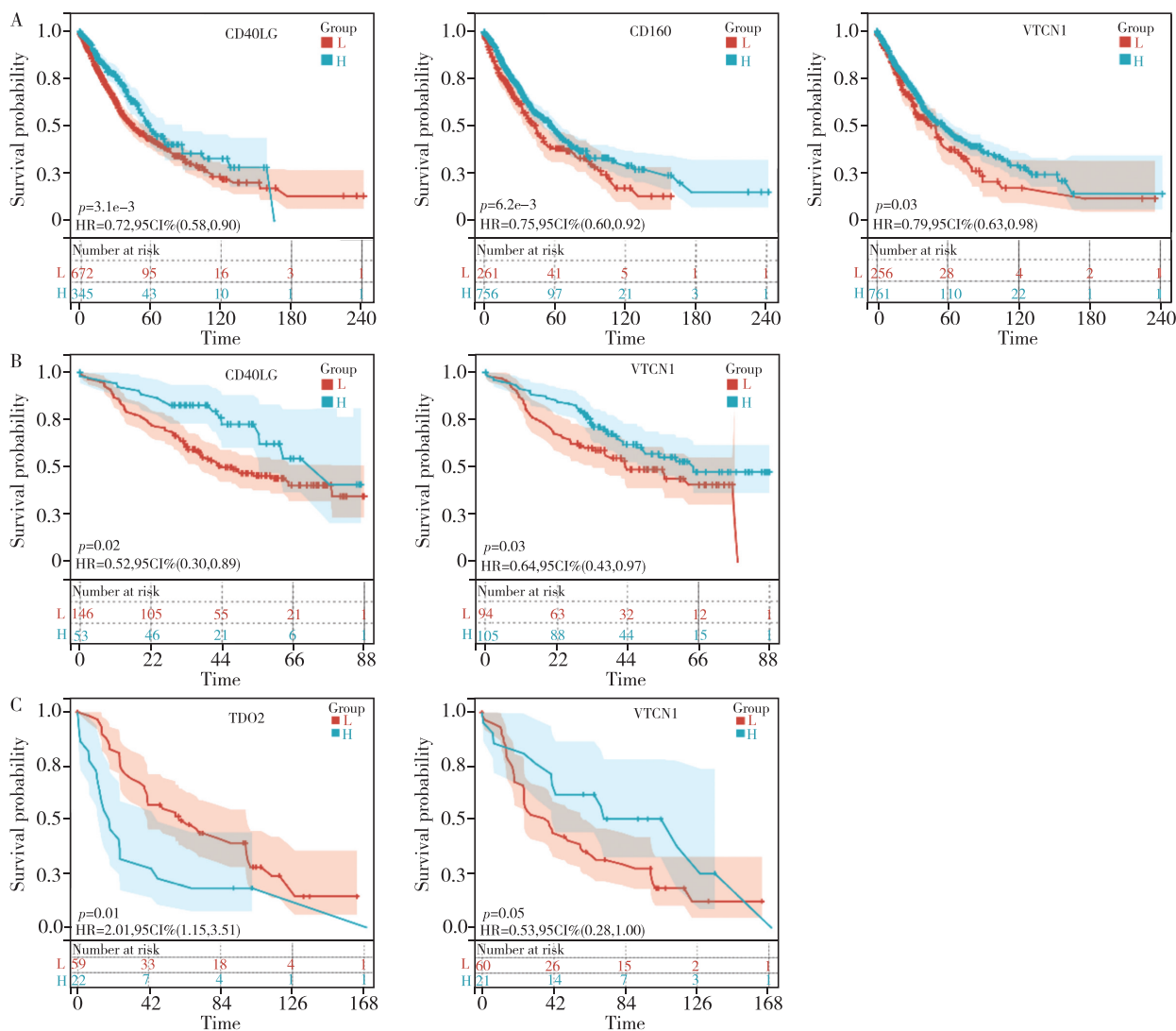
注: A 为交集 DEGs 与免疫检查点的韦恩图, B 为免疫检查点在 GSE81089 中的差异表达, C 为免疫检查点在 GSE120622 中的差异表达, D 为免疫检查点在 TCGA 中的差异表达; 两组比较 \*  $P < 0.05$

图 3 NSCLC 中差异表达的免疫检查点

Fig. 3 Differential expression of immune checkpoints in NSCLC

**2.1.3 免疫检查点影响 NSCLC 患者预后** K-M 曲线分析显示, 在 TCGA 中 CD40LG、CD160 和 VTCN1 的高表达与患者的预后良好有关 (图 4A), GSE81089 中 CD40LG 和 VTCN1 的高表达与患者的预后良好有关 (图 4B), GSE120622 中 TDO2 的高

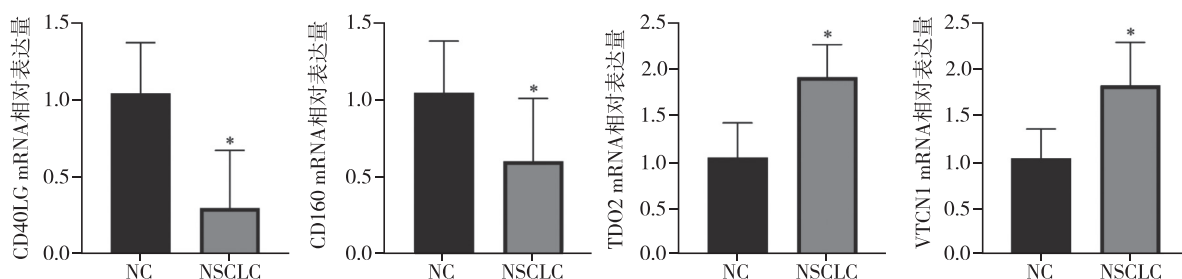
表达与预后不良有关, VTCN1 的高表达与患者的预后良好显著相关 (图 4C)。通过 qRT-PCR 实验检测发现, 与 NC 相比, CD40LG 和 CD160 在 NSCLC 中低表达 ( $P < 0.05$ ), 而 TDO2 和 VTCN1 则高表达 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。



注: A 为 TCGA 的数据, B 为 GSE81089 的数据, C 为 GSE120622 的数据

图 4 免疫检查点对 NSCLC 患者预后的影响

Fig. 4 The impact of immune checkpoints on the prognosis of NSCLC patients



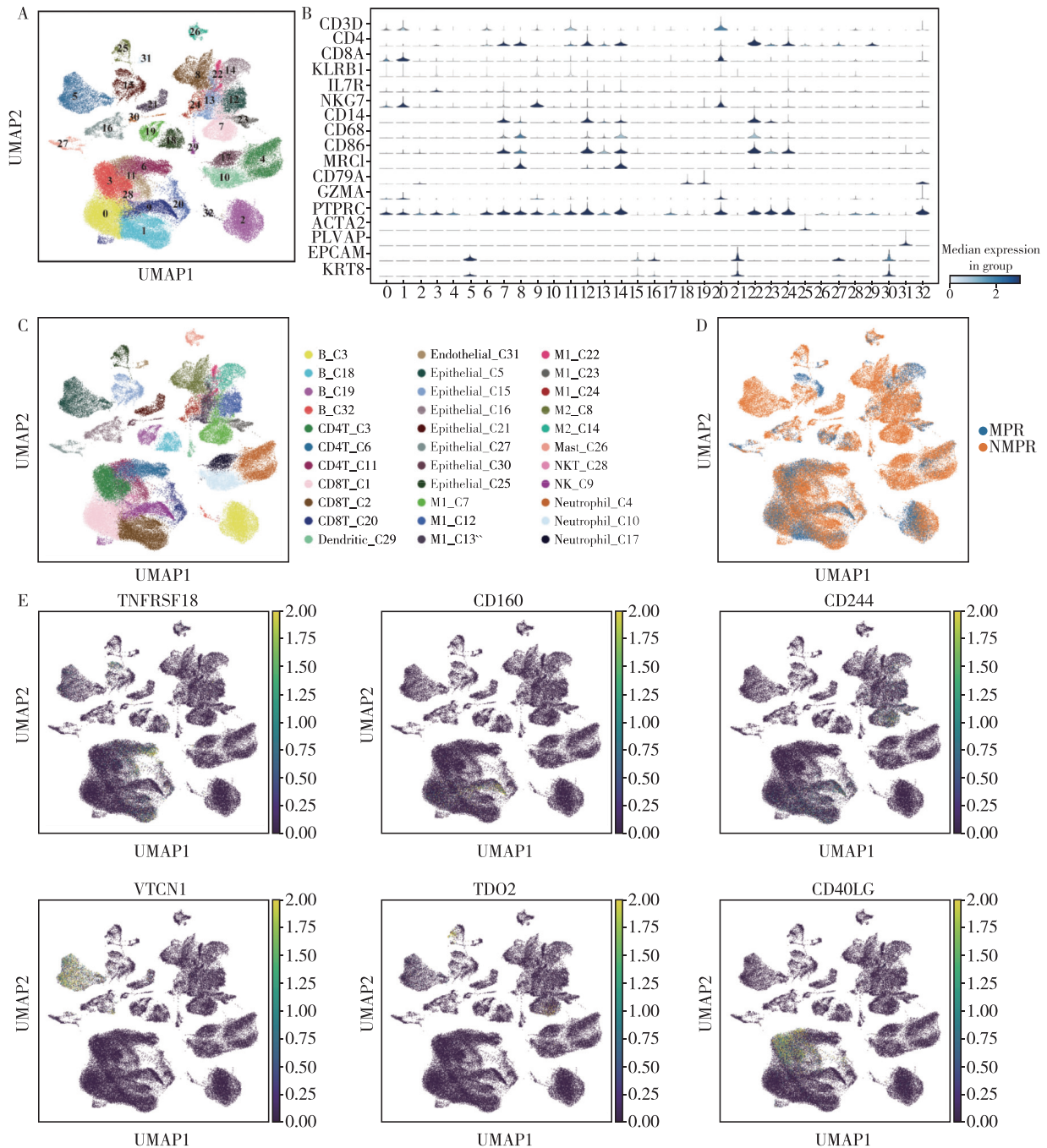
注: 与 NC 比较 \*  $P < 0.05$

图 5 qRT-PCR 检测免疫检查点在 NSCLC 患者的肿瘤和癌旁组织样本中的表达

Fig. 5 The expression of immune checkpoints in tumor and adjacent samples of NSCLC patients was detected by qRT-PCR

**2.1.4 单细胞数据的整合分析** 利用 GSE207422 单细胞数据集对新辅助治疗 NSCLC 中的细胞异质性进行了深入研究。通过 UMAP 聚类分析, 细胞被分为 32 个不同的细胞群 (图 6A), 进一步根据细胞标志物的表达鉴定为 13 种细胞亚型 (图 6B

和图 6C)。在对 MPR 和 NMPR 患者进行比较时, 研究发现 CD4、CD8、B 细胞、NK 细胞和 M2 巨噬细胞在 MPR 中明显富集 (图 6D)。此外, 在 MPR 中显示出 CD160 和 CD40LG 的富集 (图 6E)。



注: A 为通过 UMAP 可视化 GSE207422 单细胞数据的单细胞 RNA 测序数据, B 为细胞标志基因在每个细胞群中的表达, C 为细胞群的注释, D 为 MPR 和 NMPR 样本中细胞群的分布, E 为细胞中 TNFRSF18、CD160、CD244、VTCN1、TDO2 和 CD40LG 的表达

图 6 单细胞 RNA 测序分析 NSCLC 的微环境

Fig. 6 Single-cell RNA sequencing of the microenvironment of NSCLC

**2.2 临床研究的流式细胞术验证**

为了验证单细胞数据的结果, 本研究使用流式细胞术对 MPR 和 NMPR 患者中的免疫细胞进行

了分析。结果证实了 CD4、CD8、B 细胞、NK 细胞和 M2 巨噬细胞在 MPR 患者中的丰度明显高于 NMPR 患者, 见图 7。

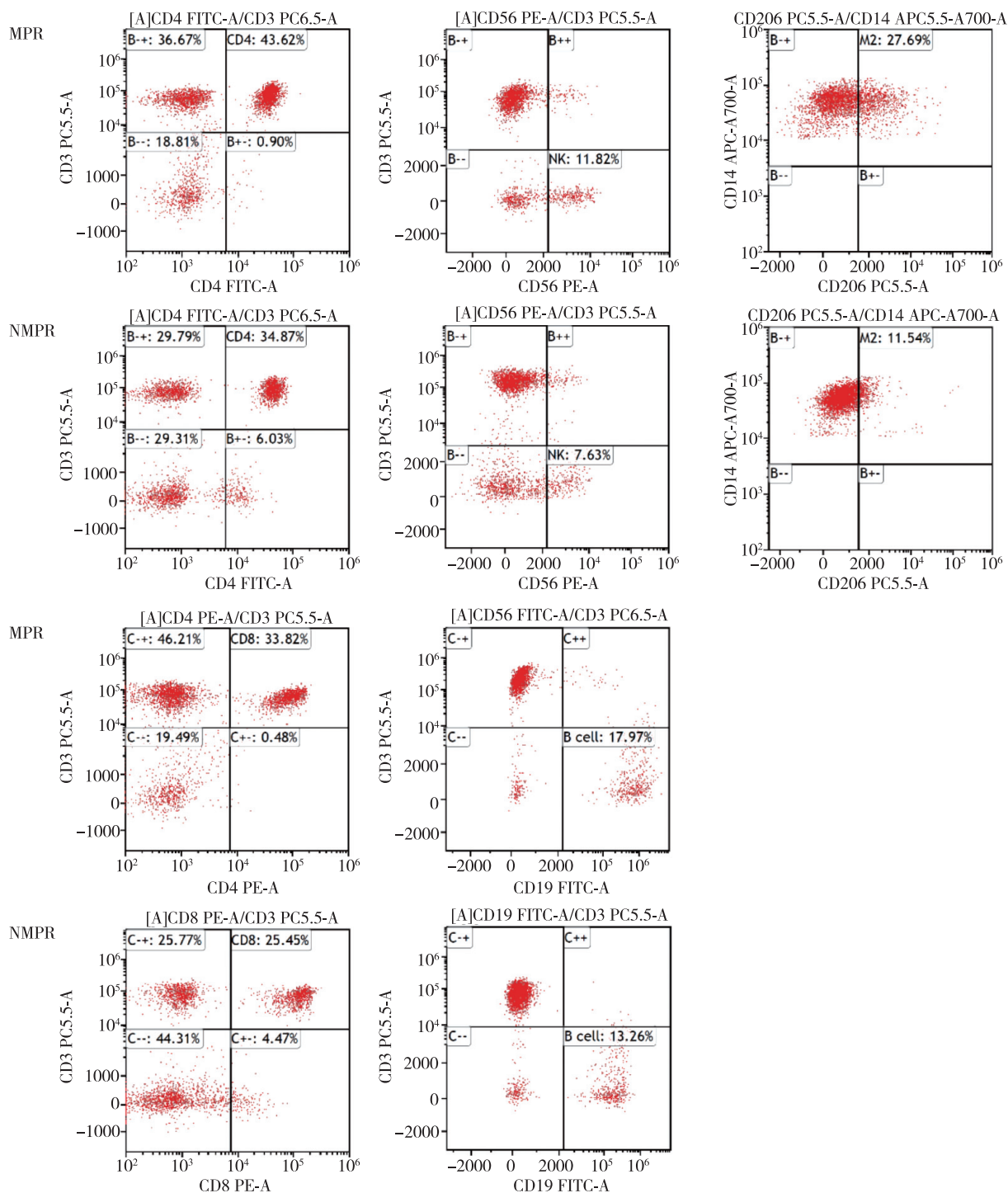


图 7 流式细胞术检测 MPR 和 NMPR 患者中的免疫细胞丰度  
 Fig. 7 The abundance of immune cells in MPR and NMPR patients was detected by flow cytometry

### 3 讨论

免疫检查点抑制剂在治疗黑色素瘤和白血病方面成效显著,但对常见实体瘤的疗效尚不理想<sup>[10]</sup>。尽管免疫检查点阻断疗法用于晚期 NSCLC 临床实践多年,但对部分患者的疗效并不显著<sup>[11]</sup>。本研究利用 GSE81089、GSE120622 和 TCGA 数据集对 NSCLC 进行了深入基因表达分析,揭示 NSCLC 相关生物学过程,筛选出差异表达的免疫

检查点。此外,本研究还对 NSCLC 中检查点阻断疗法的免疫细胞异质性进行详细研究,为 NSCLC 免疫治疗提供了新见解。

本研究通过差异分析在 3 个数据集中鉴定出了 2 505 个交集 DEGs,这些基因可能在 NSCLC 发病过程中起到关键作用。富集分析发现交集 DEGs 主要富集于系统开发、细胞分化和钙离子结合等 GO 功能。上述功能与细胞增殖、迁移和侵袭等肿瘤

相关过程密切相关,提示交集 DEGs 可能是 NSCLC 发病机制的关键环节<sup>[12-14]</sup>。此外,KEGG 富集分析还揭示了这些基因主要参与的信号通路,如神经活性配体-受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路和细胞因子-细胞因子受体相互作用等。既往研究显示,神经活性配体-受体相互作用参与 NSCLC 的发生和发展<sup>[15-16]</sup>。PI3K-Akt 信号通路最近被认为是 NSCLC 恶性肿瘤中改变最大的分子通路之一。NSCLC 中 PI3K-Akt 轴激活与肿瘤发生和疾病进展密切相关<sup>[17]</sup>。PI3K-Akt 途径调节肺癌中多种细胞过程,如存活、增殖、迁移、转移、血管生成、细胞代谢、细胞衰老、基因组完整性和干细胞自我更新<sup>[18]</sup>。新近发现免疫检查点 (PD-L1/PD-1) 阻断了癌症中抗体和细胞因子产生,从而削弱了免疫细胞的激活能力,降低了对肿瘤细胞的免疫应答<sup>[19]</sup>。结合本研究的结果,提示交集 DEGs 可能通过多层次信号通路在 NSCLC 中发挥调控作用。

此外,本研究发现了 6 个在 NSCLC 中差异表达的免疫检查点。其中,CD40LG 和 CD160 的低表达以及 TDO2 和 VTCN1 的高表达可能与 NSCLC 患者不良预后有关。提示他们可能在 NSCLC 的免疫逃逸和免疫治疗反应中起关键作用。CD40LG 是肿瘤坏死因子超家族成员之一,其在 T 细胞依赖性 B 细胞分化和活化中起关键作用,并在介导 T 细胞和巨噬细胞之间的双向互作中起关键作用<sup>[20]</sup>。CD40/CD40LG 信号可以将 M2 表型巨噬细胞再分化为 M1,靶向 CD40/CD40LG 是癌症免疫治疗中的常见策略<sup>[21]</sup>。升高的 CD160 反映了更高丰度的循环 NK 细胞和 CD8<sup>+</sup> - 幼稚 T 细胞,表明更活跃的宿主免疫,也与肺腺癌患者的良好预后相关<sup>[22]</sup>。CD4<sup>+</sup> T 细胞的抑制性受体 (CD160 和 PD-1) 表达的增加导致 T 细胞效应自活性的快速下降<sup>[23]</sup>。顺铂耐药的 NSCLC 细胞利用 TDO2 酶存活,并介导犬尿酸代谢而逃避免疫监测<sup>[24]</sup>。抑制 TDO2 减弱 T 细胞的抑制状态,恢复 T 细胞抗肿瘤反应,防止肿瘤恶化<sup>[25]</sup>。VTCN1 与其他共抑制分子在炎症小体的风险评估系统中上调共同形成免疫抑制表型,影响免疫检查点抑制剂的疗效<sup>[26]</sup>。VTCN1 被鉴定为 T 细胞活化和细胞因子产生的负调节因子,肺癌中 VTCN1 表达的上调与淋巴结转移和 TNM 分期密切相关,促进肿瘤细胞的生长和增殖<sup>[27]</sup>。本研究还发现 CD160 和 CD40LG 在 MPR 中的富集,进一步证实了上述差异表达的免疫检查点对 NSCLC 免疫治疗具有重要意义。

通过单细胞数据分析,本研究对 NSCLC 中的细胞异质性有了更深入的了解。CD4、CD8、B 细胞、NK 细胞和 M2 巨噬细胞在 MPR 的患者中明显富集,提示这些免疫细胞的富集在成功的抗癌免疫反应中的重要性。PD-1 免疫检查点治疗通过 PD-L1/PD-1 途径破坏肿瘤细胞并重新激活效应 T 细胞,延长长期总体生存,是肺癌治疗的一个重

要里程碑<sup>[28]</sup>。抗 PD-1 单一疗法可减少 T 细胞凋亡并改善中性粒细胞和单核细胞功能<sup>[29]</sup>。CD20<sup>+</sup> B 细胞浸润在 NSCLC 中有积极的预后作用<sup>[30]</sup>。在富含 B 细胞肿瘤的 NSCLC 患者表现出显著的生存改善<sup>[31]</sup>。PD-1/PD-L1 抑制剂可以在很大程度上改善和恢复衰竭 T 细胞的功能,增强 NK 细胞和巨噬细胞的抗肿瘤效果<sup>[32]</sup>。在 NSCLC 中,NK 细胞的频率和功能受损;因此,恢复 NK 细胞的助力免疫应答是理想的治疗方案<sup>[33]</sup>。M2 巨噬细胞在 NSCLC 间质中积聚,促进肿瘤附近的血管生成和淋巴管生成,与预后不良相关<sup>[34]</sup>。然而,本研究发现 M2 巨噬细胞在 MPR 患者中明显富集,这与既往其他研究组的结论不一致;鉴于 NSCLC 患者群体的异质性特征,本课题组认为 M2 巨噬细胞在 MPR 患者中富集可能与 M2 巨噬细胞在 NSCLC 的免疫微环境中其他未知功能相关,其潜在机制仍待进一步研究证实。

综上所述,本研究揭示了 NSCLC 中的关键差异表达基因和相关的生物学过程,为 NSCLC 免疫治疗提供了新的见解。正确识别这些分子改变对于探索重置癌症免疫微环境新策略至关重要。本研究的发现有助于为 NSCLC 治疗提供新的靶点和潜在策略。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Boch T, Köhler J, Janning M, et al. Targeting the EGF receptor family in non-small cell lung cancer-increased complexity and future perspectives [J]. *Cancer Biol Med*, 2022, 19 (11): 1543–1564.
- [3] Parker A L, Bowman E, Zingone A, et al. Extracellular matrix profiles determine risk and prognosis of the squamous cell carcinoma subtype of non-small cell lung carcinoma [J]. *Genome Med*, 2022, 14 (1): 126.
- [4] Lahiri A, Maji A, Potdar P D, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises [J]. *Mol Cancer*, 2023, 22 (1): 40.
- [5] Guo H, Zhang J, Qin C, et al. Biomarker-targeted therapies in non-small cell lung cancer: current status and perspectives [J]. *Cells*, 2022, 11 (20): 3200.
- [6] Mortezaee K, Majidpoor J. Anti-PD- (L) 1 therapy of non-small cell lung cancer-A summary of clinical trials and current progresses [J]. *Heliyon*, 2023, 9 (3): e14566.
- [7] Li M, Mok K, Mok T. Developments in targeted therapy & immunotherapy-how non-small cell lung cancer management will change in the next decade: a narrative review [J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11 (10): 358.
- [8] Johnson M L, Cho B C, Luft A, et al. Durvalumab with or without tremelimumab in combination with chemother-

- apy as first-line therapy for metastatic non-small-cell lung cancer: the phase III POSEIDON study [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41 (6): 1213–1227.
- [9] Capaccione K M, Valiplackal J P, Huang A, et al. Checkpoint inhibitor immune-related adverse events: a multimodality pictorial review [J]. *Acad Radiol*, 2022, 29 (12): 1869–1884.
- [10] Chen J, Tan Y, Sun F, et al. Single-cell transcriptome and antigen-immunoglobulin analysis reveals the diversity of B cells in non-small cell lung cancer [J]. *Genome Biol*, 2020, 21 (1): 152.
- [11] Hu J, Zhang L, Xia H, et al. Tumor microenvironment remodeling after neoadjuvant immunotherapy in non-small cell lung cancer revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *Genome Med*, 2023, 15 (1): 14.
- [12] Padinharayil H, Varghese J, John M C, et al. Non-small cell lung carcinoma (NSCLC): implications on molecular pathology and advances in early diagnostics and therapeutics [J]. *Genes Dis*, 2023, 10 (3): 960–989.
- [13] Smok-Kalwat J, Mertowska P, Mertowski S, et al. The importance of the immune system and molecular cell signaling pathways in the pathogenesis and progression of lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (2): 1506.
- [14] Xu X, Zhang Y, Qu D, et al. Osthole induces G2/M arrest and apoptosis in lung cancer A549 cells by modulating PI3K/Akt pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30 (1): 33.
- [15] Tang M, Sun J, Cai Z. PCK2 inhibits lung adenocarcinoma tumor cell immune escape through oxidative stress-induced senescence as a potential therapeutic target [J]. *J Thorac Dis*, 2023, 15 (5): 2601–2615.
- [16] Liu X, Zhao D, Shan Y, et al. Development and validation of a novel immune-related prognostic signature in lung squamous cell carcinoma patients [J]. *Sci Rep*, 2022, 12 (1): 20737.
- [17] Sanaei M J, Razi S, Pourbagheri-Sigaroodi A, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles [J]. *Transl Oncol*, 2022, 18: 101364.
- [18] Losuwanarak N, Maiuthed A, Kitkumthorn N, et al. Gigantol targets cancer stem cells and destabilizes tumors via the suppression of the PI3K/AKT and JAK/STAT pathways in ectopic lung cancer xenografts [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11 (12): 2032.
- [19] Huang Y, Xia L, Tan X, et al. Molecular mechanism of lncRNA SNHG12 in immune escape of non-small cell lung cancer through the HuR/PD-L1/USP8 axis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27 (1): 43.
- [20] Tang T, Cheng X, Truong B, et al. Molecular basis and therapeutic implications of CD40/CD40L immune checkpoint [J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 219: 107709.
- [21] Sedighzadeh S S, Khoshbin A P, Razi S, et al. A narrative review of tumor-associated macrophages in lung cancer; regulation of macrophage polarization and therapeutic implications [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2021, 10 (4): 1889–1916.
- [22] Liao J, Lai H, Liu C, et al. Plasma extracellular vesicle transcriptomics identifies CD160 for predicting immunotherapy efficacy in lung cancer [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114 (7): 2774–2786.
- [23] Wu Y, Yuan M, Wang C, et al. T lymphocyte cell: a pivotal player in lung cancer [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1102778.
- [24] Wu C, Spector S A, Theodoropoulos G, et al. Dual inhibition of IDO1/TDO2 enhances anti-tumor immunity in platinum-resistant non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Metab*, 2023, 11 (1): 7.
- [25] Hu S, Lu H, Xie W, et al. TDO2<sup>+</sup> myofibroblasts mediate immune suppression in malignant transformation of squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132 (19): e157649.
- [26] Tsao C C, Wu H H, Wang Y F, et al. Novel inflammation-based risk score for predicting survival and efficacy to immunotherapy in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Biomedicines*, 2022, 10 (7): 1539.
- [27] Tang X Y, Shi A P, Xiong Y L, et al. Clinical research on the mechanisms underlying immune checkpoints and tumor metastasis [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 693321.
- [28] Liu S M, Zheng M M, Pan Y, et al. Emerging evidence and treatment paradigm of non-small cell lung cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16 (1): 40.
- [29] Zhang C L, Gao M Q, Jiang X C, et al. Research progress and value of albumin-related inflammatory markers in the prognosis of non-small cell lung cancer: a review of clinical evidence [J]. *Ann Med*, 2023, 55 (1): 1294–1307.
- [30] Patel A J, Richter A, Drayson M T, et al. The role of B lymphocytes in the immuno-biology of non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69 (3): 325–342.
- [31] Salcher S, Sturm G, Horvath L, et al. High-resolution single-cell atlas reveals diversity and plasticity of tissue-resident neutrophils in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Cell*, 2022, 40 (12): 1503–1520. e8.
- [32] Qu J, Mei Q, Liu L, et al. The progress and challenge of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in treating non-small cell lung cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2021, 13: 1758835921992968.
- [33] Russell É, Conroy M J, Barr M P. Harnessing natural killer cells in non-small cell lung cancer [J]. *Cells*, 2022, 11 (4): 605.
- [34] Balážová K, Clevers H, Dost A. The role of macrophages in non-small cell lung cancer and advancements in 3D co-cultures [J]. *Elife*, 2023, 12: e82998.