· 论著 ·

利用 CRISPR-Cas9 文库筛选识别膀胱癌中潜在的三级淋巴结构形成调节因子

王永存[1,2*],宋泓辰[1,2*],杜依青[2△],徐 涛[2△]
(1. 河北医科大学外科学教研室,石家庄 050011;2. 北京大学人民医院泌尿外科,北京 100044)

[摘 要] **目的**:通过 CRISPR-Cas9 文库筛选影响三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure,TLS)形成的调节因子,鉴定潜在的关键调控分子,为提升膀胱癌免疫治疗疗效提供新靶点。**方法**:基于小鼠全基因组文库,筛选 44 个趋化因子相关基因,设计并构建靶向这些基因的单向导 RNA(single-guide RNA,sgRNA)文库,每个基因配置 3 条 sgRNA。利用慢病毒包装系统将文库质粒感染 HEK293T 细胞,获得慢病毒文库并感染小鼠膀胱癌细胞系 MB49。通过嘌呤霉素筛选获得稳定过表达趋化因子的 MB49-mCherry 细胞株。将细胞接种于 C57BL/6 小鼠腹腔,建立膀胱癌移植瘤模型,观察肿瘤生长情况。3 周后剥离肿瘤组织,提取基因组 DNA 进行高通量测序,分析 sgRNA 富集情况,筛选差异表达的趋化因子基因。同时,通过免疫组织化学染色检测 TLS 标志物 CD20 和 CD3,评估 TLS 数量、分布及成熟度。对筛选出的候选基因进行单独体内验证,进一步确认其对 TLS 形成的影响。**结果**:成功构建了包含 132 条 sgRNA 的细胞因子基因文库,覆盖 44 个趋化因子基因。慢病毒感染后获得稳定表达文库的 MB49-mCherry 细胞株,流式分选获得失活的 Cas9 阳性单克隆细胞株,确保后续实验的均一性和可重复性。小鼠腹腔肿瘤实验显示,实验组肿瘤组织中 TLS 数量较对照组明显增多,主要分布于肿瘤边缘。高通量测序结果显示,与对照组相比,实验组中 *Cxcl16* sgDNA 显著富集,*Ccl20* 和 *Cx3cl1* sgDNA 则较初始有所下降($P<0.05$)。进一步通过腹腔注射分别验证各趋化因子的作用,发现给予 CX3CL1 组肿瘤中 TLS 数量减少,提示 CX3CL1 可能负向调控 TLS 形成。免疫组织化学结果显示,CX3CL1 处理组肿瘤组织中 CD20 阳性 B 细胞和 CD3 阳性 T 细胞聚集减少,TLS 结构不完整。**结论**:通过 CRISPR-Cas9 文库筛选结合体内验证,初步鉴定出 CX3CL1 可能为调控膀胱癌 TLS 形成的负向调节因子。CX3CL1 高表达与 TLS 数量减少相关,提示其在膀胱癌免疫微环境中可能发挥抑制作用,这为深入理解膀胱癌中 TLS 形成的分子机制提供了新的线索和研究方向,但 CX3CL1 是否可作为免疫治疗靶点,仍需后续结合临床样本、多维度分子机制解析及免疫治疗响应相关性研究进行进一步验证。

[关键词] 膀胱肿瘤;CRISPR-Cas 系统;三级淋巴结构;基因文库;炎症趋化因子
[中图分类号] R737.14 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2026)04-0707-09
doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2026.04.005

CRISPR-Cas9 activation screening identifies candidate chemokine regulators of tertiary lymphoid structure formation in bladder cancer

WANG Yongcun[1,2*], SONG Hongchen[1,2*], DU Yiqing[2△], XU Tao[2△]
(1. Department of Surgery, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Department of Urology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

ABSTRACT **Objective**: To identify the cytokine genes influencing the formation of tertiary lymphoid structures (TLS) through CRISPR-Cas9 library screening, and to discover potential key regulatory molecules, providing new targets for enhancing the efficacy of bladder cancer immunotherapy. **Methods**: Based on a mouse whole-genome library, 44 chemokine-related genes were identified, and an single-guide RNA (sgRNA) library targeting these genes was designed and constructed, with three sgRNAs assigned to each gene. Using a lentiviral packaging system, the library plasmids were used to transfect HEK293T cells to generate a lentiviral library, which was then used to infect the mouse bladder cancer cell line MB49. Purinomycin selection was performed to obtain the MB49-mCherry cell line stably overexpressing chemokines. The cells were inoculated into the peritoneal cavity of C57BL/6 mice to establish a bladder cancer xenograft model, and tumor growth was monitored. Three weeks later, tumor tissue was

基金项目:科技创新 2030-"癌症、心脑血管、呼吸和代谢性疾病防治研究"国家科技重大专项(2024ZD0525700)、国家自然科学基金(82471866、82472912)、北京市自然科学基金(L252190) Supported by the Noncommunicable Chronic Diseases-National Science and Technology Major Project (2024ZD0525700), the National Natural Science Foundation of China (82471866, 82472912) and the Beijing Natural Science Foundation (L252190)

△ Corresponding author's e-mail, duyiqing@bjmu.edu.cn, xutao@pkuph.edu.cn
* These authors contributed equally to this work

网络出版时间:2026-06-30 14:21:09 **网络出版地址**:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20260630.1121.001.html

excised, genomic DNA was extracted for high-throughput sequencing, and sgRNA enrichment was analyzed to screen for differentially expressed cytokine genes. Concurrently, immunohistochemical staining was performed to detect TLS markers CD20 and CD3, and the number, distribution, and maturity of TLS were assessed. The selected candidate genes were validated individually *in vivo* to further confirm their impact on TLS formation. **Results**: We successfully constructed a cytokine gene library containing 132 sgRNAs, covering 44 chemokine genes. Following lentiviral infection, we obtained the MB49-mCherry cell line, which stably expressed the library, and isolated dead Cas9-positive monoclonal cell lines *via* flow cytometry to ensure the homogeneity and reproducibility of subsequent experiments. Intratumoral tumor experiments in mice revealed that the number of TLS cells in the experimental group was significantly higher than in the control group, primarily distributed at the tumor margins. High-throughput sequencing results showed that, compared with the control group, in the experimental group, *Cxcl16* sgDNA was significantly enriched, while *Ccl20* and *Cx3lc1* sgDNA levels decreased compared with baseline ($P<0.05$). Further validation of the individual roles of each factor *via* intraperitoneal injection revealed that the number of TLSs in tumors decreased in the group treated with the CX3CL1 chemokine, suggesting that CX3CL1 might negatively regulate TLS formation. Immunohistochemical results showed that in the CX3CL1-treated group, the aggregation of CD20-positive B cells and CD3-positive T cells in the tumor tissue was reduced, and the TLS structure was incomplete. **Conclusion**: Through CRISPR-Cas9 library screening combined with *in vivo* validation, this study successfully identified CX3CL1 as a potential negative regulator of TLS formation in bladder cancer. High CX3CL1 expression was associated with a reduction in TLS numbers, suggesting that it might exert an inhibitory role in the immune microenvironment of bladder cancer. This finding provides new clues and research directions for understanding the molecular mechanisms of TLS formation in bladder cancer. However, whether CX3CL1 can serve as an immunotherapeutic target remains to be further validated through clinical specimen analysis, multidimensional mechanistic investigation, and immunotherapy response correlation studies.

KEY WORDS Urinary bladder neoplasms; CRISPR-Cas systems; Tertiary lymphoid structures; Gene library; Chemokines

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。据国际癌症研究机构统计,2022 年全球新发病例约为 61 万余例,位居全球恶性肿瘤发病谱第九位[1]。尽管多数膀胱癌在初诊时仍局限于非肌层浸润阶段(约占 70%),但疾病进展风险不容忽视——约 45% 的非肌层浸润性膀胱癌可最终演变为肌层浸润性膀胱癌,后者与较差的临床预后密切相关[2-3]。目前,针对以肌层浸润性膀胱癌为代表的进展期膀胱癌,标准治疗策略主要包括根治性膀胱切除术及新辅助化疗,然而此类干预措施不仅伴随较高的治疗风险,亦显著损害患者的远期生活质量[4]。免疫治疗作为一类通过重激活宿主免疫系统以识别并清除肿瘤细胞的新型治疗模式,已为膀胱癌的临床管理带来深刻变革[5]。然而在实际应用中,患者对以免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors, ICI)为代表的免疫疗法应答呈现高度异质性,仅少数个体能够持续临床获益[6]。肿瘤免疫微环境作为决定抗肿瘤免疫应答效能的核心调控因素,其状态与特征对提升膀胱癌免疫治疗整体疗效具有至关重要的意义。

三级淋巴结构(tertiary lymphoid structure, TLS)作为肿瘤微环境中一类具有重要免疫调节功能的异位淋巴样聚集体,在膀胱癌中已被证实与良好预后及治疗反应密切相关,其存在有助于促进免疫效应细胞的局部募集并增强对 ICI 的应答[7-8]。已有研究表明,膀胱癌微环境中特定的 B 细胞亚群,如免疫球蛋白 λ 样多肽 5(immunoglobulin lambda like polypeptide 5, IGLL5)阳性 B 细胞,可通过破坏 TLS 的结构完整性,削弱机体抗肿瘤免疫应答并降低免疫治疗获益[7]。与之相反,包含功能性生发中心的成熟 TLS 则与细胞毒性 T 细胞浸润程度的升高显著关联,从而与更优的临床结局相关[9]。TLS 通常于慢性炎症背景(如肿瘤微环境)下原位形成,其有序发育及功能成熟高度依赖于由促炎性细胞因子与趋化因子构成的精密信号网络。上述分子协同介导了淋巴细胞向炎症区域的定向趋化、局部滞留及后续的空间组织化装配。例如,白细胞介素 33(interleukin 33, IL-33)可通过激活淋巴毒素(lymphotoxin, LT)-淋巴毒素 β 受体(LT beta receptor, LTβR)信号轴,驱动 TLS 在肿瘤组织内的新生与维持[10]。此外,趋化因子 CXCL16、CCL19 及 CCL21 等则通过介导淋巴细胞与树突状细胞向炎症病灶的迁移,精确调控 TLS 内部 B 细胞区与 T 细胞区的空间区室化构建[8, 11]。由此可见,在膀胱癌中,TLS 的形成与功能发挥受特定细胞因子网络的严谨调控,该调控机制深刻影响着免疫微环境的抗肿瘤效能及 ICI 治疗的临床响应特性。

CRISPR 筛选是一种基于 CRISPR-Cas 系统的高通量基因功能研究策略,通过在全基因组或特定基因集合范围内系统性地引入基因扰动(包括基因

敲除、转录激活或转录抑制),从而实现基因型与表型之间关联的规模化解析。该技术依赖 Cas9 或失活的 Cas9(dead Cas9,dCas9)与可编程单向导 RNA(single-guide RNA,sgRNA)的特异性结合,实现对靶基因的精准调控[12-13]。基于不同类型的文库设计(如全基因组文库或通路特异性文库),CRISPR 筛选可系统地鉴定调控细胞存活、增殖、药物敏感性,以及合成致死相互作用的关键基因[14]。在肿瘤研究领域,CRISPR 筛选已被广泛应用于解析肿瘤发生、发展的分子机制,并用于鉴定参与免疫逃逸及药物耐受的关键驱动基因及潜在治疗靶点[14-15]。

本研究基于小鼠全基因组文库,构建了涵盖 44 种趋化因子的 CRISPR 激活(CRISPR activation,CRISPRa)文库。依托 CRISPR-Cas9 系统,在膀胱癌细胞中建立了趋化因子稳定激活的细胞模型。进一步采用正向筛选策略,系统性鉴定参与 TLS 调控的关键基因,旨在阐明 TLS 在膀胱癌免疫治疗反应中的调控机制。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

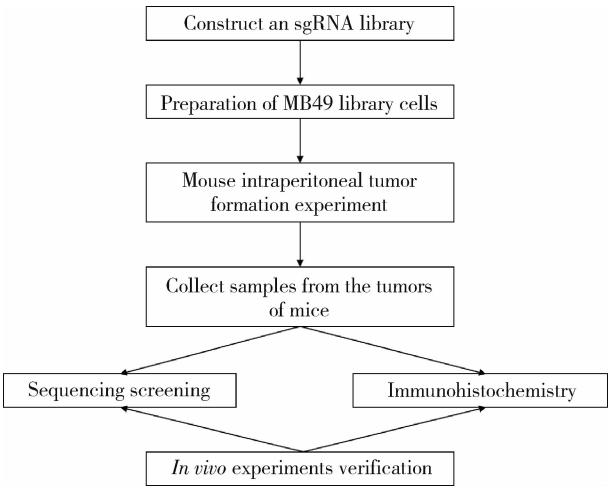
人胚肾细胞 HEK293T 和小鼠膀胱癌细胞 MB49 均购自杭州美森细胞生物公司,胎牛血清购自 Excell 生物公司,高糖 DMEM 培养基、胰酶、双抗、磷酸盐缓冲液、Opti-MEM 培养基均购自美国 Gibco 公司,嘌呤霉素购自美国 MCE 公司,杀稻瘟菌素(blasticidin)购自美国赛默飞公司,潮霉素 B(hygromycin B)购自酷来博科技公司,线性聚乙烯亚胺(polyethylenimine linear,PEI)购自源叶生物公司,实验所需质粒均来自淼灵生物公司,大肠杆菌 DH5α 感受态细胞购自擎科生物公司,大肠杆菌 Endura 购自英国 LGC 公司。

1.2　细胞培养

HEK293T 和 MB49 细胞均用含 10%(体积分数)胎牛血清和 1%(体积分数)青霉素-链霉素(100×)的高糖 DMEM 培养基,在 37 ℃、5%(体积分数)CO_2 条件下培养。HEK293T 细胞用于慢病毒包装体系包装病毒。用 10 cm 直径的培养皿培养小鼠膀胱癌细胞系 MB49,给 MB49 加上 mCherry 标签,使 MB49 稳定过表达 mCherry,便于后续进行活体成像等一系列实验。

1.3　文库质粒构建

44 个小鼠趋化因子基因由北京大学定量医学中心实验室筛选,基于张锋教授构建的小鼠全基因组激活文库 CRISPR-Cas9 的协同激活介导复合体(synergistic activation mediator,SAM)系统以及 CRISPRa-v2 文库,通过数据库查询、基因注释和文献挖掘,筛选出小鼠的细胞因子基因,sgRNA 引物序列由苏州硅基生物公司设计并完成质粒文库的构建。实验设计流程见图 1。



sgRNA, single-guide RNA.

图 1　sgRNA 筛选实验流程图

Figure 1　Flowchart of sgRNA screening experiment

1.4　大肠杆菌质粒转化

1.4.1　电穿孔转化　将大肠杆菌 Endura 感受态细胞悬液置于冰上 10 min,加入约 100 ng 待转化的文库质粒(氨苄抗性),在预冷的电转杯中轻柔混匀。电转仪设置参数为:电压 1.8 kV,电容 10 μF,电阻 200 Ω。电击后立即加入预热的培养基,将细胞转移至无菌摇菌管,于 37 ℃复苏 60 min。取部分复苏菌液涂布于含相应抗生素的 LB 琼脂平板,将剩余菌液加入含大量抗生素的 LB 液体培养基中,37 ℃震荡培养 12~16 h,用于质粒文库的扩增与收集。

1.4.2　热激转化　将大肠杆菌 DH5α 感受态细胞悬液置于冰上,加入 1~10 ng 质粒 DNA,轻柔混匀,冰上静置 30 min。将离心管置于 42 ℃水浴中,精确热激 45 s,立即放回冰上,静置 2~5 min。再向管中加入 800 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基,振荡培养 12~16 h。

1.5　质粒提取

取出并观察 LB 固体培养基表面是否有菌落生成。由于文库质粒是一个混合质粒库,因此,需要收集每一个单克隆菌落。向长满单克隆菌落的 LB 固体培养基中加入 5 mL 的 LB 液体培养基,用涂布器将单克隆菌落刮下并转移至新的无菌 50 mL 离心管中,经反复多次冲刮,至 LB 液体培养基接近透明为止。将菌液离心,收集细菌沉淀,按照质粒提取试剂

盒说明书进行提取,并对提取的质粒进行浓度测定。

1.6 慢病毒包装

HEK293T 细胞利用慢病毒包装体系产生病毒。使用 10 cm 直径细胞培养皿,将 15 μg 文库质粒、13 μg psPAX2 质粒、2 μg pMD2. D 质粒与 opti-MEM 混合,涡旋混匀,加入 90 μL PEI,再次涡旋混匀。将混合物加至 HEK293T 细胞上清中,记录转染时间,再将 HEK293T 细胞放置在细胞培养箱中,8 h 后换液并加入新鲜培养基 20 mL。一般在转染 48 h 时收集第一批含有病毒的培养基,转染 72 h 时收集第二批含有病毒的培养基,两次共收集含病毒培养基约 40 mL,使用 40%(体积分数)的聚乙二醇 8000(polyethylene glycol 8000,PEG-8000)将收集到的含有病毒的培养基浓缩至原体积的 1/10 或 1/20,将浓缩后的病毒悬液冻存于 -80 ℃冰箱。

1.7 细胞病毒感染

待 MB49-mCherry 细胞贴壁且密度达到 60% ~ 80%时,进行慢病毒感染。为后续筛选,需严格控制感染复数(multiplicity of infection,MOI)不超过 0.3(此时细胞感染率约为 30%)。所需病毒量按公式计算:病毒体积 =(MOI × 细胞数)/病毒滴度。加入对应量病毒后,按 1 ∶ 1 000 的比例加入聚凝胺。感染 72 h 更换培养基,使用嘌呤霉素筛选 72 h,保留下来存活的贴壁细胞即为稳定激活小鼠趋化因子基因的膀胱癌细胞系。

1.8 全基因组 DNA 提取

将 10^6 个细胞放至 EP 管中,加入核糖核酸酶溶液和蛋白酶 K 室温静置 30 min(或在 1 ~ 20 mg 剪碎的小鼠组织中加入蛋白酶 K,55 ℃水浴酶解)。将单向导 DNA(single-guide DNA,sgDNA)吸附柱置于收集管中,将细胞(或组织)悬液过柱纯化,按照 DNA 提取试剂盒进行 sgDNA 提取,提取的 sgDNA 长期保存于 -20 ℃中。

1.9 琼脂糖凝胶电泳

将提取的 sgDNA 经过高保真 DNA 聚合酶试剂盒进行扩增,经过初始变性,彻底打开基因组,后经 35 个循环扩增得到产物。配制浓度为 10 ~ 20 g/L 并含有核酸染料的琼脂糖凝胶,取 20 μL PCR 产物与上样缓冲液混合后点样。使用 DNA 分子量标准(DNA marker)作为参照,在 150 V 电压下电泳 15 min。在紫外凝胶成像仪下观察条带,目标条带大小正确、单一明亮。将目标条带进行切胶,DNA 纯化,送至诺禾致源生物信息科技有限公司进行测序。

1.10 实时荧光定量逆转录 PCR

将细胞置于冰上提取 RNA。吸去培养液,每孔加入 1 mL Trizol 裂解液,用移液枪反复吹打混匀,使 Trizol 裂解液与细胞混匀,细胞充分裂解。将混悬液移至 EP 管中待用,用 RNA 提取试剂盒提取 RNA 并进行浓度测定,使用逆转录试剂盒进行逆转录得到 cDNA,按照实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qPCR)反应体系配置反应混合物。

1.11 小鼠腹腔肿瘤造模

本实验选用 6 ~ 8 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠,随机分为对照组和实验组。接种前,用左手抓取并固定小鼠,使其头部稍向下倾斜,腹部向上。在小鼠右下腹腹中线外侧 45°进针刺入腹腔,以恒定速率缓慢注入细胞悬液(细胞数为 5×10^6,注射量通常为 0.1 ~ 0.2 mL)。3 周后将小鼠处死,开腹收集腹腔肿瘤,取其中一部分进行 sgDNA 的提取测序,其余组织泡在 40 g/L 的多聚甲醛中进行固定,免疫组织化学染色后观察 TLS 的结构。

1.12 统计学方法

利用 GraphPad Prism 10.0 软件对实验数据进行统计分析,所有数据结果均为至少 3 次独立结果的均值 ± 标准差,采用配对 t 检验或 Mann-Whitney 非参数检验,$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 CRISPR-Cas9 sgRNA 文库

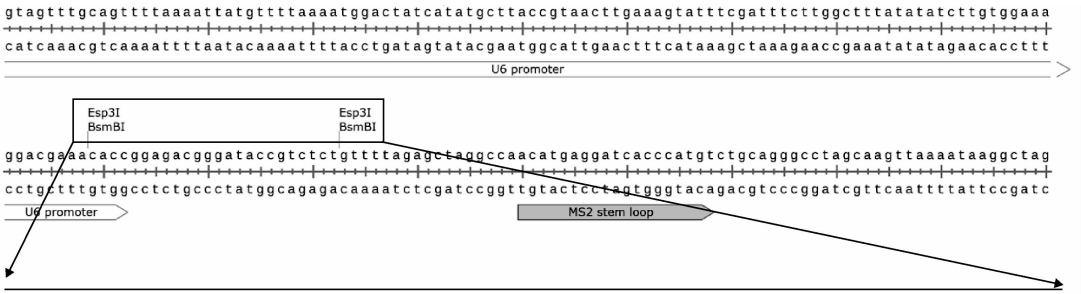
本研究基于小鼠全基因组文库,设计并构建了靶向小鼠趋化因子编码基因的 sgRNA 文库。为提高文库覆盖度及靶向效率并尽可能降低脱靶效应,每个目标基因设计 3 条 sgRNA,最终获得包含 44 个趋化因子相关基因、共 132 条 sgRNA 的文库(图 2)。对载体质粒进行测序并与参考序列比对,以验证其序列准确性与完整性。随后,将 sgRNA 序列克隆至载体质粒中,插入位点位于 U6 启动子下游约 20 bp 处(图 2)。构建完成的 sgRNA 质粒文库经电转化扩增后,在 HEK293T 细胞中进行慢病毒包装,获得慢病毒文库,并用于感染小鼠膀胱癌细胞系 MB49-mCherry,以开展后续功能筛选实验。

2.2 CRISPR-Cas9 文库感染膀胱癌细胞

采用 PCR 方法对本研究所用 MB49 细胞进行支原体污染检测,结果显示,在培养基上清中未扩增出特异性的支原体基因片段,提示该细胞系未受支原体污染,可用于后续实验(图 3)。随后,对辅助质粒 dCas9 进行扩增并包装为慢病毒,用于感染 MB49-mCherry 细胞。经抗生素筛选去除未成功感染的细胞,并通过实时荧光定量逆转录 PCR 实验评估病毒转染及转录激活效率,转染 dCas9 病毒组的

细胞转染效率大概为对照组(未转染 dCAS 病毒,初始值接近于 0)的 400 倍(图 4A)。进一步地,利用流式细胞分选技术将 MB49-mCherry 细胞进行单细胞分选至 96 孔板中,确保每孔仅含单个细胞,并进行克隆扩增。扩增完成后,采用 PCR 方法筛选获得稳定表达辅助病毒的阳性单克隆细胞株,用于后续实验(图 4B)。

为保证每个细胞仅整合单一 sgRNA,从而实现单基因过表达并维持约 500 倍的文库覆盖度,在慢病毒感染过程中严格控制 MOI 不超过 0.3。感染持续 72 h 后,利用载体质粒所携带的嘌呤霉素抗性基因进行药物筛选,去除未被有效转导的细胞。经过约 2 周筛选,获得稳定表达且具有嘌呤霉素抗性的膀胱癌细胞系 MB49-mCherry。



Genes of the sgRNA

Cxcl1	*Cxcl2*	*Cxcl3*	*Cxcl4*	*Cxcl5*	*Cxcl6*	*Cxcl7*	*Cxcl9*	*Cxcl10*	*Cxcl11*	*Cxcl12*
Cxcl13	*Cxcl14*	*Cxcl15*	*Cxcl16*	*Cxcl17*	*Ccl1*	*Ccl2*	*Ccl3*	*Ccl4*	*Ccl5*	*Ccl6*
Ccl7	*Ccl8*	*Ccl9*	*Ccl11*	*Ccl12*	*Ccl17*	*Ccl19*	*Ccl20*	*Ccl21*	*Ccl22*	*Ccl24*
Ccl25	*Ccl27*	*Ccl28*	*Xcl1*	*Xcl2*	*Cx3cl1*	*Tafa1*	*Tafa2*	*Tafa3*	*Tafa4*	*Tafa5*

sgRNA, single-guide RNA.

图 2　sgRNAs 插入位点及所插入趋化因子名称

Figure 2　The insertion sites of sgRNAs and the names of the inserted chemokines

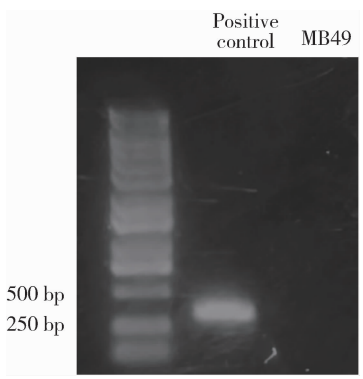
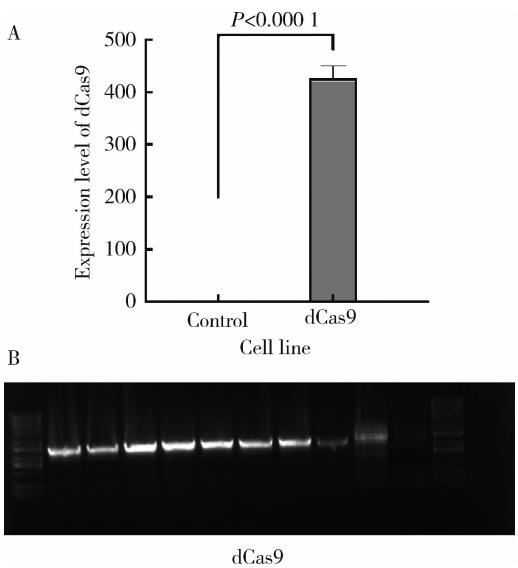


图 3　MB49 细胞支原体检测结果

Figure 3　MB49 cell mycoplasma detection results

2.3　小鼠体内筛选

将转染含 132 条 sgRNA 慢病毒文库且文库覆盖度≥500 倍的 MB49-mCherry 细胞作为实验组,同时设置对照组(未转染 sgRNA 文库,仅感染空载体病毒),分别进行体外扩增。随后,将各组细胞接种于小鼠体内,每只小鼠接种 5×10^6 个细胞,每组有 4 只小鼠,建立腹腔肿瘤模型以开展体内 CRISPR 筛选。接种 3 周后处死小鼠,剥离并收集肿瘤组织(图 5)。



A, reverse transcription quantitative real-time PCR detection of dCas9 virus transfection efficiency; B, expression of dCas9 virus in monoclonal cell lines. dCas9, dead Cas9.

图 4　dCas9 病毒转染效果及表达情况

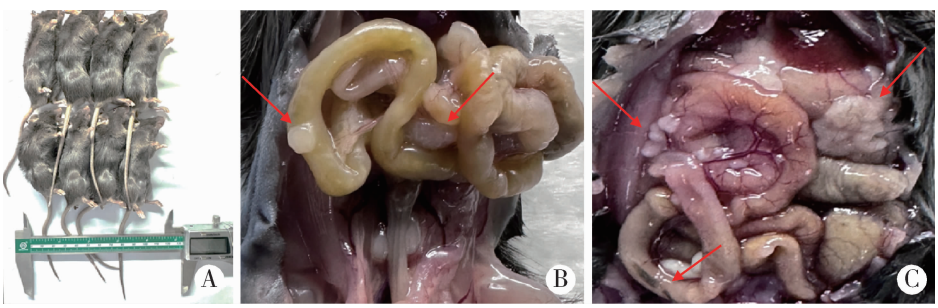
Figure 4　The transfection effect and expression status of dCas9 virus

对实验组每个肿瘤样本取部分组织用于 sgDNA 提取,其余肿瘤组织(包括实验组与对照组)置于

40 g/L 多聚甲醛中固定,进行石蜡包埋和免疫组织化学染色,通过检测 B 细胞标志物 CD20 和 T 细胞标志物 CD3,每组每张切片随机选取 3 个视野进行统计,然后取平均值,比较两组间 TLS 的不同,如数量、空间分布等特征(图 6 ~ 8)。对提取的 sgDNA 进行浓度测定后,采用高保真 PCR 体系进行扩增,并通过琼脂糖凝胶电泳验证目的条带的特异性。随后对目的条带进行切胶回收与纯化,并开展高通量测序分析,以鉴定筛选富集或耗竭的候选基因(图 9)。

免疫组织化学结果显示,实验组与对照组的 TLS 均主要分布于肿瘤边缘区域,其空间定位未见显著差异。鉴于 TLS 成熟度的评估通常依赖 CD23 等滤泡树突状细胞相关标志物的染色结果作为重要判定依据,而本研究尚未进行 CD23 染色,因此,目前无法对两组间 TLS 成熟程度的差异作出明确判断。值得注意的是,实验组中 TLS 的数量较对照组呈增加趋势(图 8)。

对高通量测序数据进行分析后,筛选出在肿瘤组织中 sgDNA 丰度有变化的趋化因子。结果显示,与初始文库相比,*Cx3cl1* 和 *Ccl20* 对应 sgDNA 的丰度降低,而 *Cxcl16* 的 sgDNA 丰度显著升高($P < 0.05$,图 8)。需要指出的是,本研究采用的是包含 44 种趋化因子的混合文库筛选策略,因此上述候选分子在 TLS 形成中的具体功能仍需通过单基因层面的独立验证进一步加以确认,以明确其在 TLS 发生和发展中的作用。



A, gross view of mice and tumor measurement; B, gross anatomy of the peritoneal cavity in the control group (arrow indicates tumor location); C, gross anatomy of the peritoneal cavity in the experimental group (arrows indicate tumor locations).

图 5 CRISPR 筛选小鼠腹腔肿瘤结果

Figure 5 Results of CRISPR screening for peritoneal tumors in mice

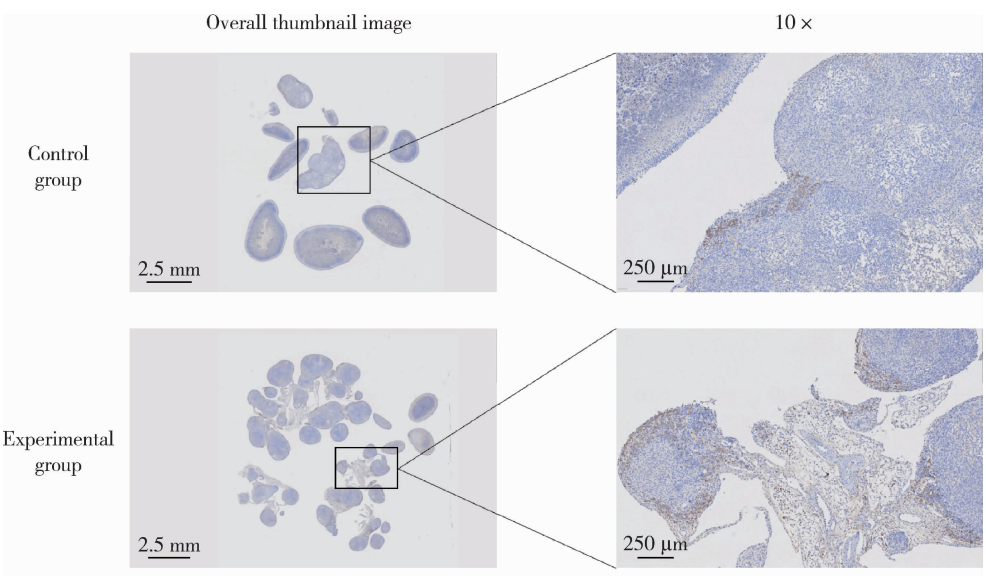


图 6 对照组与实验组 CD20 染色结果

Figure 6 CD20 staining results between the control group and the experimental group

2.4 筛选出影响 TLS 形成的趋化因子

对 CRISPR 筛选获得的候选趋化因子在小鼠体内进行单独功能验证。采用腹腔注射方式,分别给予各实验组小鼠趋化因子 CX3CL1、CCL20 和 CXCL16 处理。处理 3 周后处死小鼠,剥离肿瘤组织并进行固定,随后开展 CD20 和 CD3 的免疫组织化

学染色,以评估 TLS 的形成情况。结果显示,在所验证的候选分子中,CX3CL1 对膀胱癌组织中 TLS 具有显著调控作用(图 10)。与对照相比,CX3CL1 处理组肿瘤组织中 CD20$^+$ B 细胞及 CD3$^+$ T 细胞的聚集程度明显降低,且 TLS 结构完整性受损,提示 CX3CL1 可能在 TLS 的形成或维持过程中发挥抑制作用。

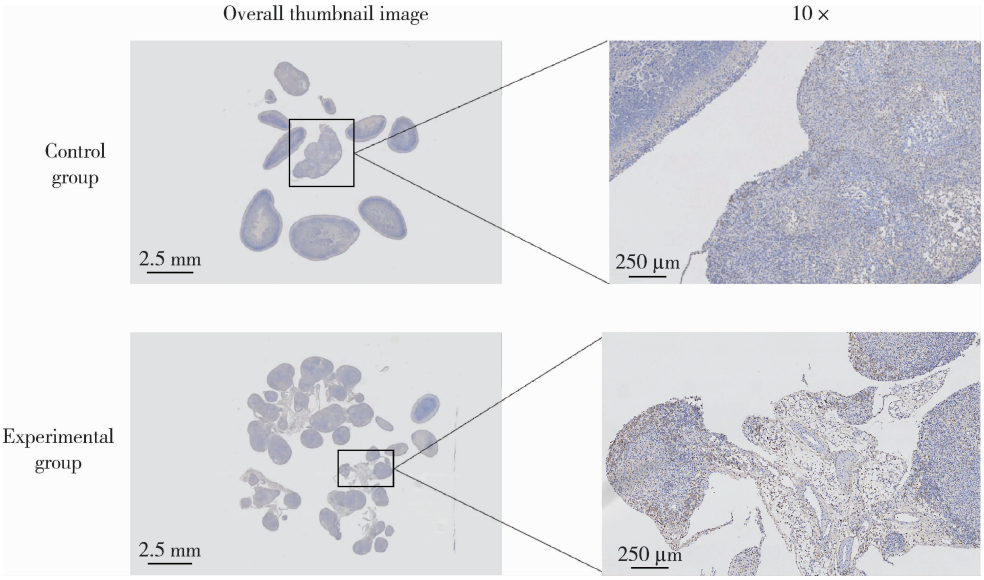
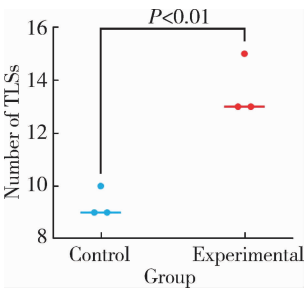


图 7　对照组与实验组 CD3 染色结果

Figure 7　CD3 staining results between the control group and the experimental group



TLS, tertiary lymphoid structure.

图 8　对照组与实验组 TLS 形成数量对比

Figure 8　Comparison of the number of TLS formed between the control group and the experimental group

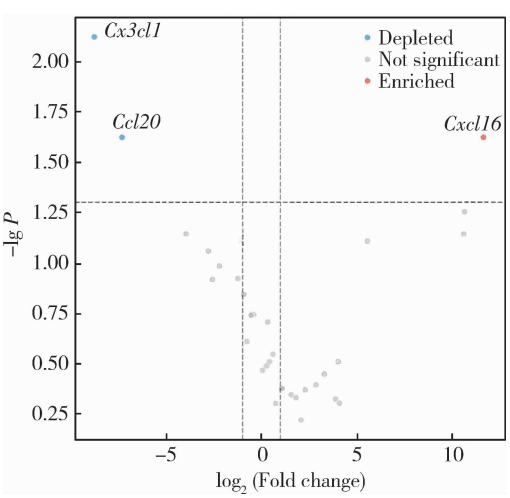


图 9　CRISPR 筛选结果火山图

Figure 9　Volcano plot of CRISPR screening results

3　讨论

小鼠全基因组基因筛选成本高昂,且基因覆盖率和均一性难以完全保证,容易导致筛选失败或数据偏差。本文对筛选文库进行了优化,选用了细胞因子这一小子库进行筛选,每个基因设计 3 条 sgRNA,可在一定程度上控制脱靶效应,提高筛选结果的可信度与可重复性[16]。同时,这一策略也有助于缩短实验周期,简化后续数据分析,并在一定程度上降低实验成本。CRISPR 筛选作为一种适用于表型研究的高通量手段,在肿瘤驱动基因、抑癌基因及免疫治疗耐药相关分子的发现中具有重要价值。基于此,本文利用 CRISPR-Cas9 系统对可能调控膀胱癌中 TLS 形成的相关细胞因子进行了筛选,并对筛选得到的差异趋化因子逐一开展动物实验验证。结果显示,*Cx3cl1* 处理后小鼠肿瘤组织中 CD20$^+$ B 细胞和 CD3$^+$ T 细胞聚集减少,提示 CX3CL1 可能参与膀胱癌中 TLS 相关结构的调控。这一现象提示,CX3CL1 在膀胱癌免疫微环境中的作用可能并非单纯促进免疫细胞募集,而更可能参与 TLS 形成、维持及空间组织化过程的调节。

CX3CL1 作为一种多效性趋化因子,通过与其特异性受体 CX3CR1 结合,在肿瘤免疫微环境中发挥了复杂的调控作用。CX3CL1-CX3CR1 轴具有显

著的“双刃剑”特征。在促肿瘤方面，CX3CL1-CX3CR1 轴在胶质母细胞瘤中可招募肿瘤相关巨噬细胞并诱导其向 M2 样免疫抑制表型极化，进而促进免疫逃逸与血管生成[17]。此外，其高表达也与高分级浆液性卵巢癌患者生存率下降[18]，以及口腔鳞状细胞癌转移风险升高和总生存率降低密切相关[19]。然而，在抗肿瘤方面，乳腺癌模型中的 CX3CL1 过表达能够有效趋化自然杀伤细胞等抗肿瘤效应淋巴细胞，显著抑制肿瘤生长与肺转移，并可与曲妥珠单抗协同增强细胞毒性，克服人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor 2，HER2)低表达肿瘤的耐药性[20]。这种双重作用使其成为预后评估和联合免疫治疗[如与程序性死亡受体-1(programmed cell death protein 1，PD-1)抑制剂联用]的重要潜在靶标。在尿路上皮癌中，既往研究揭示 *CX3CL1* 基因的功能缺失性改变伴随免疫炎症通路的下调，并与 ICI 治疗应答不佳及生存期缩短显著相关[21]。目前关于 CX3CL1-CX3CR1 轴在 TLS 形成与功能调控中的研究仍十分有限。现有证据表明，CX3CL1 可通过稳定原发性干燥综合征患者唾液腺内滤泡树突状细胞与 B 细胞的相互作用，增强生发中心反应并促进原位自身抗体的产生[22]。然而，CX3CL1-CX3CR1 轴在膀胱癌免疫微环境中的具体作用尚不明确，特别是其对膀胱癌组织中 TLS 形成及功能的影响迄今未见报道。鉴于该轴在多种病理条件下所展现的“双刃剑”效应，其在膀胱癌中的确切角色仍有待进一步阐明与分析。

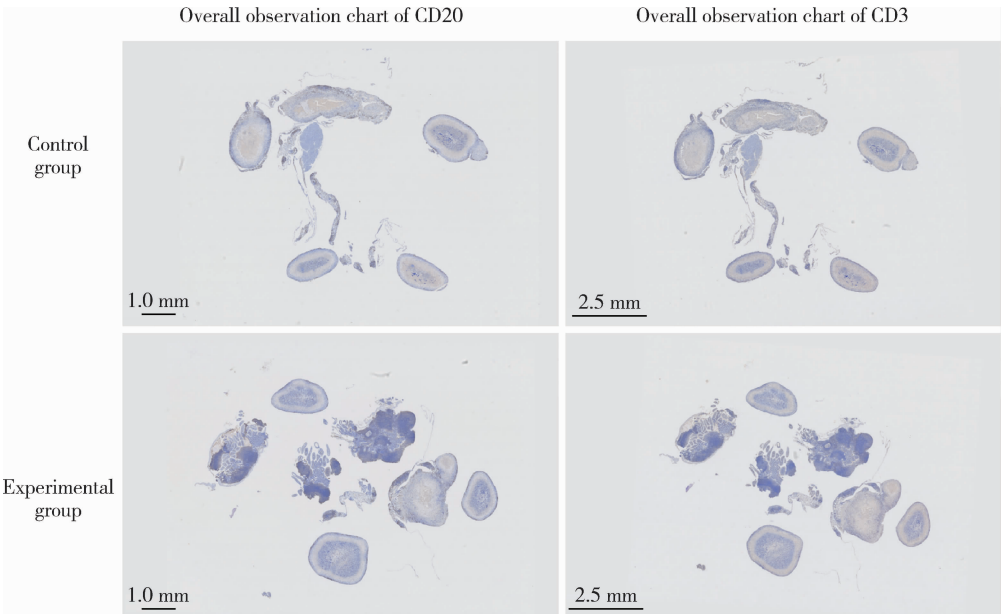


图 10 CX3CL1 处理后免疫组织化学结果

Figure 10 Immunohistochemical results following CX3CL1 treatment

此外，本研究还存在若干不足。首先，本研究尚未对 CX3CL1 在膀胱癌组织中的表达情况及其具体来源细胞进行系统性分析。既往研究表明，CX3CL1 在生理及炎症条件下主要由血管内皮细胞表达，并在免疫细胞募集与黏附过程中发挥重要作用[23]。因此，本研究基于 CRISPR 筛选体系在肿瘤细胞中获得的 CX3CL1 相关结果，可能与其在真实肿瘤微环境中的表达模式存在差异，尤其是在本研究所采用的 CRISPR 激活模型中，趋化因子主要来源于肿瘤细胞，这一人为干预状态在一定程度上偏离了体内生理条件，可能影响结果的外推性。其次，本研究对 TLS 的界定尚不够严格，主要依据 CD20 和 CD3 免疫组织化学染色观察淋巴细胞聚集情况，若要进一步评估 TLS 的成熟度及功能状态，则需引入额外标志物——如滤泡树突状细胞标志物 CD21、生发中心标志物 CD23 等，以提供与成熟度和功能相关的关键细节。这亦是本研究的重要局限之一。再次，本研究采用腹腔肿瘤模型进行验证，虽然能够在体内环境下观察肿瘤与免疫微环境的相互作用，但与膀胱癌原位肿瘤微环境之间仍存在一定差异，这可能对部分结论的适用范围产生一定影响。然而，就现阶段的技术手段而言，小鼠膀胱癌原位模型主要通过膀胱灌注或开腹膀胱壁注射两种方法构建，但这两种方式均存在成瘤率低、重复性差的突出问题，且目前尚无可供广泛推广的稳定原位造模方案。正是基于这一技术瓶颈，本研究在权衡可行性与生理

相关性后,选择了更为成熟且可重复的腹腔模型作为替代性体内验证手段。此外,本文主要针对单个候选基因进行初步验证,尚未系统阐明 CX3CL1 影响 TLS 相关结构变化的具体分子机制。最后,研究结论尚缺乏大样本临床队列的双向验证,筛选结果与真实世界临床特征之间的一致性仍需谨慎评估。

综上,本研究初步提示 CX3CL1 可能参与膀胱癌 TLS 相关免疫结构的调控,为理解膀胱癌肿瘤免疫微环境提供了新的线索。然而,CX3CL1 在膀胱癌中的表达特征、作用方向及其分子机制,尤其是其与成熟 TLS 形成之间的关系,仍有待进一步阐明。未来研究应结合临床组织样本,并采用多重免疫组织化学、单细胞测序、空间转录组学及功能干预实验,对 TLS 的组成、成熟度和空间分布进行更严格的界定,从而为膀胱癌免疫治疗潜在靶点的发现和精准干预策略的建立提供更可靠的实验依据。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明　杜依青:提出研究思路;王永存:设计研究方案,撰写论文;宋泓辰:收集、分析、整理数据;徐涛:总体把关和审定论文。所有作者均参与论文修改,并对最终文稿进行审读和确认。

参考文献

[1] Filho AM, Briganti A, Jemal A, et al. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends[J]. Eur Urol, 2026, 89(5): 426 – 436.

[2] Olislagers M, de Jong FC, Rutten VC, et al. Molecular biomarkers of progression in non-muscle-invasive bladder cancer: Beyond conventional risk stratification[J]. Nat Rev Urol, 2025, 22(2): 75 – 91.

[3] Jain P, Kathuria H, Momin M. Clinical therapies and nano drug delivery systems for urinary bladder cancer[J]. Pharmacol Ther, 2021, 226: 107871.

[4] Wang Y, He M, Li J, et al. Immunotherapeutic strategies for invasive bladder cancer: A comprehensive review[J]. Front Immunol, 2025, 16: 1591379.

[5] Michaud é, Mansure JJ, Kassouf W. Integrating novel immunotherapeutic approaches in organ-preserving therapies for bladder cancer[J]. Br J Pharmacol, 2026, 183(6): 1215 – 1232.

[6] Fan Z, Deng J, Wang Y, et al. Bladder cancer: Immunotherapy and pelvic lymph node dissection[J]. Vaccines, 2024, 12(2): 150.

[7] Chen C, An M, Zheng H, et al. B cells disrupt tertiary lymphoid structure formation and suppress anti-tumor immunity[J]. Cancer Cell, 2026, 44(3): 551 – 566. e17.

[8] Lin J, Jiang S, Chen B, et al. Tertiary lymphoid structures are linked to enhanced antitumor immunity and better prognosis in muscle-invasive bladder cancer[J]. Adv Sci, 2025, 12(7): 2410998.

[9] Bao X, Lin X, Xie M, et al. Mature tertiary lymphoid structures: Important contributors to anti-tumor immune efficacy[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1413067.

[10] Amisaki M, Zebboudj A, Yano H, et al. IL-33-activated ILC2s induce tertiary lymphoid structures in pancreatic cancer[J]. Nature, 2025, 638(8052): 1076 – 1084.

[11] Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, et al. Tertiary lymphoid structures in cancers: Prognostic value, regulation, and manipulation for therapeutic intervention[J]. Front Immunol, 2016, 7: 407.

[12] Shu WJ, Ma Z, Jia L, et al. miR-ON-CRISPR: A microRNA-activated CRISPR-dCas9 system for precise gene therapy in living cells and mouse models of sepsis[J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(19): gkaf1037.

[13] Razavi Z, Soltani M, Souri M, et al. CRISPR innovations in tissue engineering and gene editing[J]. Life Sci, 2024, 358: 123120.

[14] Awwad SW, Serrano-Benitez A, Thomas JC, et al. Revolutionizing DNA repair research and cancer therapy with CRISPR-Cas screens[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(7): 477 – 494.

[15] Wu Y, Wang Y, Wang Y, et al. Exploring synthetic lethality in cancer therapy: CRISPR-Cas9 technology offers new hope[J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 2025, 1880(4): 189370.

[16] Santinha AJ, Strano A, Platt RJ. Methods and applications of in vivo CRISPR screening[J]. Nat Rev Genet, 2025, 26(10): 702 – 718.

[17] Chen J, Wu Q, Berglund AE, et al. Tumor-associated macrophages in glioblastoma: Mechanisms of tumor progression and therapeutic strategies[J]. Cells, 2025, 14(18): 1458.

[18] Seitz S, Dreyer TF, Stange C, et al. The chemokine CX3CL1 promotes intraperitoneal tumour growth despite enhanced T-cell recruitment in ovarian cancer[J]. Neoplasia, 2025, 60: 101130.

[19] Eain HS, Kawai H, Nakayama M, et al. Double-faced CX3CL1 enhances lymphangiogenesis-dependent metastasis in an aggressive subclone of oral squamous cell carcinoma[J]. JCI Insight, 2024, 9(10): e174618.

[20] Dreyer TF, Kuhn S, Stange C, et al. The chemokine CX3CL1 improves trastuzumab efficacy in HER2 low-expressing cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Immunol Res, 2021, 9(7): 779 – 789.

[21] Adib E, Nassar AH, Akl EW, et al. CDKN2A alterations and response to immunotherapy in solid tumors[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(14): 4025 – 4035.

[22] Astorri E, Scrivo R, Bombardieri M, et al. CX3CL1 and CX3CR1 expression in tertiary lymphoid structures in salivary gland infiltrates: Fractalkine contribution to lymphoid neogenesis in Sjogren's syndrome[J]. Rheumatology (Oxford), 2014, 53(4): 611 – 620.

[23] Babendreyer A, Molls L, Dreymueller D, et al. Shear stress counteracts endothelial CX3CL1 induction and monocytic cell adhesion[J]. Mediat Inflamm, 2017, 2017: 1515389.

(2026-03-02 收稿)
(本文编辑:赵　波)