

肾细胞癌 PBRM1 表达缺失抑制 CD8⁺ T 细胞浸润

谢宏俊¹, 阙滔滔¹, 魏毅¹, 范义增¹, 侯涛¹, 李磊¹, 谷孝云², 徐珊¹

(1. 西安交通大学第一附属医院, 环境和疾病相关基因教育部重点实验室肿瘤研究室, 陕西省肿瘤精准医学重点实验室, 陕西 西安 710061; 2. 陕西省卫生健康信息中心, 陕西 西安 710002)

摘要: [目的] 探讨 PBRM1 调控 CD8⁺T 在肾透明细胞癌组织中细胞浸润的分子机制。[方法] 以肾透明细胞癌患者肿瘤临床标本为研究对象, 探讨 CD8⁺T 细胞在人肾癌中的浸润及其与临床病理特征的关系, 以免疫印迹、荧光免疫、ELISA 等分子生物学方法明确 PBRM1 调控 CD8⁺T 细胞浸润的分子机制。免疫荧光检测 CD63、EZH2 及 PHK26 在细胞中的分布。免疫印迹检测 IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 不同因子处理对肾癌细胞 EZH2 的诱导表达。实验结果经 GraphPad Prism 软件, *t* 检验对两组间差异进行统计学分析。[结果] 肾透明细胞癌组织免疫组化结果显示, 在肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞浸润数量显著性下降 ($P < 0.001$), CD8⁺T 细胞浸润与患者总生存期呈正相关 ($P < 0.001$)。患者肿瘤组织 PBRM1 着色和 CD8⁺T 细胞浸润数量结果显示: PBRM1 表达与 CD8⁺T 细胞浸润数量呈正相关 ($P < 0.001$)。IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 细胞因子促进 EZH2 在细胞表达升高, 同时被外泌体包载被运输到受体细胞, 外泌体 EZH2 进入受体细胞抑制 CXCL9 和 CXCL10 细胞因子分泌。[结论] PBRM1 缺失激活 exo-EZH2/CXCL9(10) 信号轴抑制 CD8⁺T 细胞肿瘤组织浸润。

关键词: 肾细胞癌; PBRM1; 外泌体; CD8⁺T 细胞; EZH2

中图分类号: R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2022)07-0579-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.07.B009

PBRM1 Deletion Inhibits CD8⁺ T Cells Infiltration in Tumor Microenvironment of Renal Cell Carcinoma

XIE Hong-jun¹, QUE Tao-tao¹, WEI Yi¹, FAN Yi-zeng¹, HOU Tao¹, LI Lei¹, GU Xiao-yun², XU Shan¹

(1. The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Ministry of Education, Key Laboratory for Tumor Precision Medicine of Shaanxi Province, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Shaanxi Health Information Center, Health Commission of Shaanxi Province, Xi'an 710002, China)

Abstract: [Objective] To explore the molecular mechanism of PBRM1 in regulating CD8⁺T cell infiltration in clear cell renal cell carcinoma tissue. [Methods] The expression of PBRM1 in renal clear cell carcinoma were detected by tissue microarray and its relation with CD8⁺T cell infiltration in tumor microenvironment was analyzed. Western blot was also applied to detect EZH2 expression after IFN- γ , IL-6 and TNF- α treatment in renal cell carcinoma cells. Immunofluorescence was used to detect the distribution of CD63, EZH2 and PHK26 in cells. The effect of EZH2 on CXCL9/10 secretion was detected by ELISA assay. The GraphPad Prism software was used for statistical analysis. [Results] Tissue microarray results showed that the infiltration density of CD8⁺T cells in tumor tissues was lower than that in adjacent tissues ($P < 0.001$). High CD8⁺T cell infiltration was positively correlated with the overall survival of patients ($P < 0.001$), and low PBRM1 protein expression was associated with decreased infiltration of CD8⁺T cells ($P < 0.001$). IFN- γ , IL-6 and TNF- α promoted the expression of EZH2 protein, which was packaged in exosomes and entered into recipient cells to inhibit CXCL9 and CXCL10 secretion. [Conclusion] PBRM1 deletion activates the exo-EZH2/CXCL9(10) signal axis and inhibits CD8⁺T cell tumor tissue infiltration in renal cell carcinoma.

Subject words: renal cell carcinoma; PBRM1; exosome; CD8⁺T cell; EZH2

基金项目: 国家自然科学基金(82072829), 陕西省自然科学基金基础研究计划-面上项目(2021JM-265)

通信作者: 徐珊, E-mail: shanhu1109@xjtu.edu.cn

收稿日期: 2022-02-21; **修回日期:** 2022-05-20

肾细胞癌发病率逐年提高^[1]。免疫治疗为转移性肾癌患者带来了新的希望,但仍有 70% 肾癌患者对免疫抑制剂无响应^[2-4]。进一步探讨免疫治疗响应机制,提高免疫治疗疗效,对于促进人类健康具有重要意义。研究表明 CD8⁺T 细胞的数量与多种肿瘤患者的预后密切相关^[5]。在肾癌中,CD8⁺T 细胞浸润是肿瘤免疫治疗的前提,而 CD8⁺T 细胞浸润减少会导致免疫治疗失败^[6]。

EZH2 是多梳抑制复合物 2 (PRC2) 的催化亚基,利用其组蛋白甲基转移酶活性将组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3),从而抑制靶基因转录,参与细胞周期、细胞免疫、细胞分化等过程^[7]。EZH2 在前列腺癌、乳腺癌、肾癌及黑色素瘤等多种恶性肿瘤中均高表达,与肿瘤恶性进程、侵袭、转移及临床治疗密切相关^[7-12]。在多种肿瘤中研究发现 EZH2 高表达,伴随 CD8⁺T 细胞浸润减少,对 PD-1/PD-L1 抑制剂临床治疗无响应^[11]。进一步研究证实,EZH2 主要通过下调趋化因子(CCL28、CCL3L1、CXCL16、CXCL9、CXCL10)分泌抑制 CD8⁺T 细胞浸润,导致 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗失败^[11,13]。研究报道表明,PBRM1 突变会导致肾癌细胞中 EZH2 高表达;并且 EZH2 抑制剂可以抑制 PBRM1 突变肾癌细胞生长和肿瘤生长^[14-15],但 EZH2 和 PBRM1 之间的调控机制目前较少报道。研究报道 PBRM1 突变或者丢失后会激活炎症信号通路,影响免疫治疗响应^[16]。我们利用 CD8⁺T 细胞特异性标记蛋白 CD8 的免疫组织化学染色,比较 CD8⁺T 细胞在肾癌组织及癌旁组织中的浸润数量,并联合 PBRM1 免疫组织化学染色,分析 CD8⁺T 细胞浸润与 PBRM1 表达的相关性,并分析 CD8⁺T 细胞与临床病理特征之间的关系,初步探讨 PBRM1 影响肿瘤微环境 CD8⁺T 细胞数量的调控机制。

1 资料与方法

1.1 材料

细胞系:人肾癌 769-P、786-O 和 ACHN 细胞系购自美国典型培养物保藏中心。

组织芯片:肾癌肿瘤组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司,180 点肾透明细胞癌组织芯片点布局为:30 例癌旁组织和 150 例肾癌肿瘤组织。

主要试剂:DAB 染色液和非特异性阻断剂购自基因科技(上海)股份有限公司;兔抗人 CD8 单克隆抗体、CD63 多克隆抗体和 PBRM1 单克隆抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司 Abcam 中国代理;EZH2 单克隆抗体和 CD9 单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 单克隆抗体购自爱必信上海生物科技有限公司;外泌体提取试剂盒、多泌体快速提取试剂盒购自 Qiagen 生物公司。RNA 提取试剂盒购自中杉生物公司,外泌体染色 PHK26 购自 Sigma 公司。ScriptTM RT Master Mix 试剂盒、SYBR II Primix Ex TaqTM II 试剂盒购自上海 Takara 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞系培养

786-O、ACHN 和 769-P 使用 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养基培养,细胞置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 免疫组织化学染色及结果判定和分析

免疫组化实验步骤见文献^[17]。本研究中 PBRM1 免疫组化评分由赛维尔生物公司使用 3D 扫描仪配套的分析软件 Quant center 对阳性深浅和数量进行评析。组织化学 H-SCORE 评分分值在 0~300 分。数值越大阳性越强。

$H-SCORE = (\text{弱阳性占比} \times 1) + (\text{中阳性占比} \times 2) + (\text{强阳性占比} \times 3)$

1.2.3 CD8⁺T 细胞浸润分析

CD8⁺T 细胞浸润数量执行标准:随机选取 5 个视野 (1 mm×1 mm),5 个视野 CD8⁺T 细胞浸润数量总和取平均值即为该患者 CD8⁺T 细胞肿瘤组织浸润数目。

1.2.4 细胞转染

制备 X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent: siRNA 复合物制备,轻柔混合,室温,静置 20 min。弃去细胞培养基,加入 2 mL 无血清 RPMI 1640 培养基。将转染复合物逐滴加入 6 孔板内,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱内培养。6 h 后,弃去培养基,添加 2 mL RPMI 1640 培养基继续培养。培养 48 h 后,提取 RNA 和蛋白,转染效率鉴定。

1.2.5 细胞 RNA 提取

细胞转染 48 h 后,弃去培养基,加入 PBS 缓冲液清洗,弃去 PBS 缓冲液。加入 Fast 200 试剂盒中的裂解液 500 μ L,将裂解物加入到内套管中,13 000 r/min

离心 1 min。弃去外套管内液体, 向内套管中加入 500 μ L 洗液, 13 000 r/min 离心 1 min。弃去外套管内液体, 13 000 r/min 离心 1 min。取出内套管装入 1.5 mL EP 管中, 向内套管膜中央加入 30 μ L 溶解缓冲液, 室温静置 1 min。13 000 r/min 离心获得细胞总 RNA。BioTeK 微孔板分光光度计检测 RNA 浓度。

1.2.6 逆转录实验

按照试剂盒操作, 配制 20 μ L 反转体系, 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 5 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。BioTeK 微孔板分光光度计检测 cDNA 浓度。

1.2.7 实时定量 PCR

按照试剂盒操作, 配制 25 μ L 反应体系。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s; 60 $^{\circ}$ C 30 s, 循环数 40; 50 $^{\circ}$ C 5 s。

1.2.8 免疫印迹

RIPA 裂解液裂解细胞获取总蛋白^[17], 30 μ g/孔进行上样, 12.5% SDS-PAGE 90-120V 电泳、110 V 电压转膜, 2%脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 PBRM1 单克隆抗体(1:1 000)、PD-L1 单克隆抗体(1:1 000)、 β -actin 单克隆抗体(1:1 000)、CD9 单克隆抗体(1:1 000)、CD63 多克隆抗体(1:1 000)孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 漂洗 10 min, 共 3 次。二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(1:1 000)和羊抗鼠(1:1 000), 室温孵育 1 h。TBST 漂洗 10 min, 共 3 次, 配制赛默飞显色工作液。使用高灵敏度化学发光仪 ChemiDoc XRS 显色系统扫描显色。

1.2.9 外泌体提取和鉴定

研究使用外泌体快速提取试剂盒, 简要实验步骤: 收集细胞培养基, 去除上清大于 0.8 μ m 囊泡。体积比 1:1 添加 XBP 缓冲液到样品中。混合液加到 exoEasy 内置柱上, 离心。弃废液, 加入 10 mL XWP 缓冲液, 离心, 弃废液。膜上加入 400 μ L XE 缓冲液, 孵育, 离心获取洗脱液, 重复洗脱, 获取洗脱液。Zeta view 仪器对外泌体浓度、大小以及粒径分布进行检测。

1.2.10 外泌体 PHK26 染色和受体细胞融合

PHK26 是一种红色荧光染料, 可用于体外细胞膜标记、体外增殖研究和长期的体内细胞示踪实验。实验步骤: 使用超滤管外泌体 15 000 g 离心 10 min, 100 μ L 缓冲液 C 稀释外泌体。加入 0.5 μ L PHK26 染料, 室温, 避光, 孵育 5 min。继续加入 100 μ L 1%FBS (无外泌体) 培养基, 在室温下孵育 1 min。用超滤管

再次离心外泌体, 15 000 r/min, 离心 10 min, 100 μ L PBS 稀释外泌体。向受体细胞中加入 50 μ L, 在培养箱中孵育 24 h, 显微镜下观察并拍照。

1.2.11 免疫荧光染色

肾癌细胞经过细胞因子处理后, 用 4%多聚甲醛固定细胞, 室温 20 min, 0.4% Triton X-100 细胞膜打孔。PBS 洗涤。用封闭缓冲液封闭样品 1.5 h。一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(EZH2:1:200; CD63:1:100)。PBS 洗涤。二抗室温封闭 2 h(抗小鼠 Alexa Fluor 488:1:500; 抗兔 Alexa Fluor 594:1:500)。PBS 洗涤, 显微镜观察并拍照。

1.3 统计学处理

实验结果经 GraphPad Prism 软件, 两组间差异比较采用 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD8⁺T 细胞在肾癌肿瘤组织浸润数量低于癌旁组织

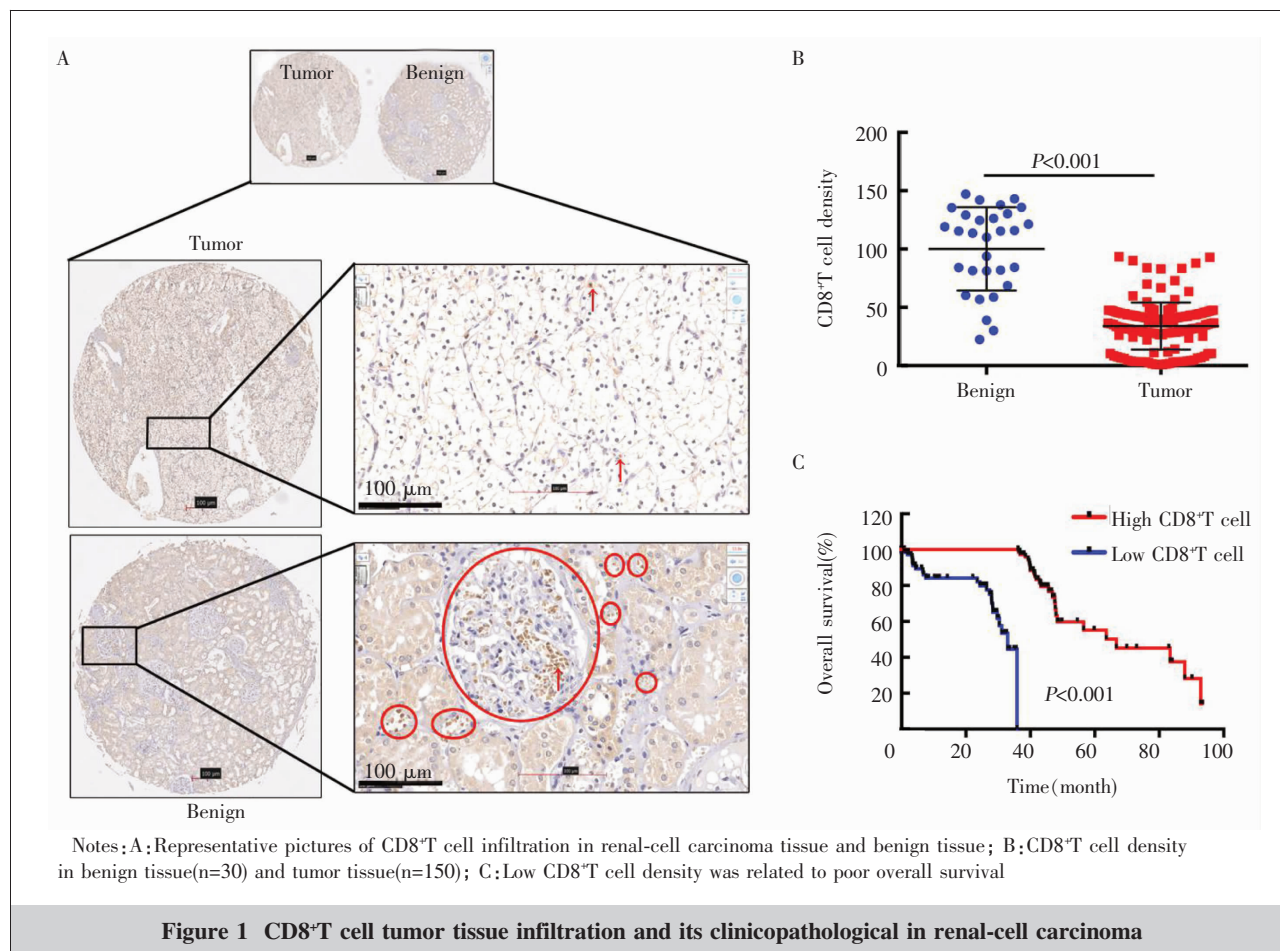
免疫组化结果显示: CD8⁺T 细胞在癌旁组织中浸润数量多, 而在肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞浸润数量显著性下降(Figure 1A~1B)(P<0.001)。根据 150 例患者 CD8⁺T 细胞浸润数量平均值, 将 150 例患者分为 CD8⁺T 细胞高浸润组和 CD8⁺T 细胞低浸润组, 生存分析结果显示: CD8⁺T 细胞浸润数量与总生存期呈正相关(Figure 1C)(P<0.001)。

2.2 CD8⁺T 细胞浸润数量与 PBRM1 表达正相关

PBRM1 在肾癌肿瘤组织中高表达, 胞核着色为深棕色。CD8⁺T 细胞比肾癌细胞直径小, 出现在肿瘤细胞间隙, 染色为深棕色。对 150 例肿瘤组织 PBRM1 着色和 CD8⁺T 细胞浸润数量分析, PBRM1 表达与肿瘤组织 CD8⁺T 细胞浸润数量呈正相关。

2.3 TNF- α 诱导肾癌细胞质和外泌体中 EZH2 含量上升

IFN- γ 、IL-6 和 TNF- α 可以诱导 EZH2 细胞内表达水平(Figure 2A)。同时, 在外泌体蛋白检测中, 也检测到 EZH2 含量上升, 其中 TNF- α 诱导 EZH2 在外泌体中的包载最多(Figure 2A)。TNF- α 处理细胞后分离细胞质和细胞核蛋白, 发现 786-O 细胞 EZH2 的蛋白含量总体升高, 其中细胞质中 EZH2 含量相对升高, 但细胞核中 EZH2 含量降低(Figure 2B)。利用荧光免疫标记 EZH2 在细胞中的表达定位



(红色),主要还是定位于细胞核(Figure 2C)。但是,分布于细胞质中的 EZH2 与外泌体检测标志物蛋白 CD63 共定位(CD63 染色为绿色)(Figure 2D)。由此可见,激活炎症信号通路可以诱导 EZH2 表达升高,并被包载与外泌体分泌到肿瘤细胞外。

2.4 外泌体 EZH2 增加受体细胞 EZH2 的含量

肿瘤细胞通过分泌外泌体影响肿瘤微环境。被标记为红色的外泌体可与受体细胞 769-P 膜融合。检测受体细胞 769-P 总蛋白,发现外泌体 EZH2 处理 769-P 后,EZH2 总蛋白含量升高(Figure 3)。

2.5 外泌体 EZH2 抑制受体细胞 CXCL9 和 CXCL10 分泌

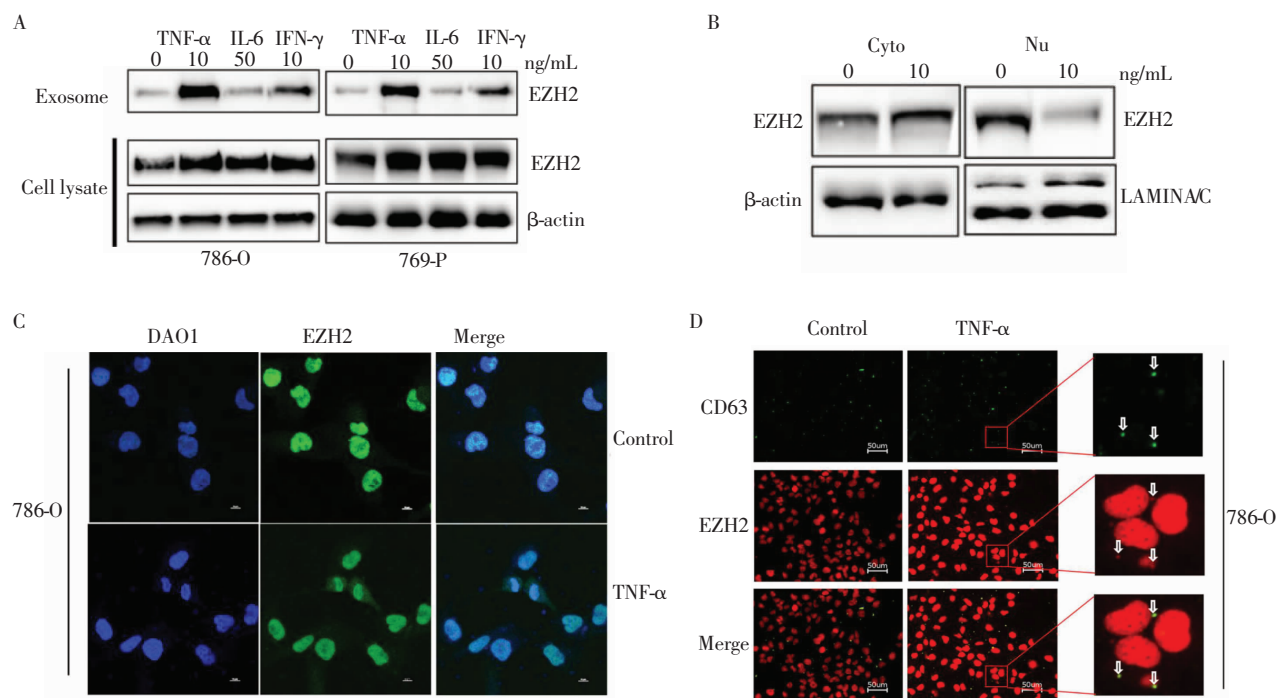
在 786-O 和 ACHN 细胞中沉默 EZH2 表达(Figure 4A),RT-PCR 检测结果显示 CXCL9 和 CXCL10 mRNA 表达升高 (Figure 4B)。研究结果证实敲低 EZH2 促进肾癌细胞 CXCL9 和 CXCL10 mRNA 表达。

为了验证受体细胞趋化因子 CXCL9 和 CXCL10

受到外泌体 EZH2 调控,使用 TNF- α 处理 786-O 细胞,48 h 后获取 786-O 对照组和 TNF- α 处理组外泌体(exo-Con 和 exo-EZH2)。exo-Con 和 exo-EZH2 分别加入到受体细胞(786-O 和 ACHN)中,使用 ELISA CXCL9 和 CXCL10 试剂盒对受体细胞上清培养基中 CXCL9 和 CXCL10 的分泌含量进行检测。相比较 exo-Con 组,exo-EZH2 组 CXCL9 在培养基中的分泌含量下降(786-O: $P=0.09$; ACHN: $P=0.03$);相比较 exo-Con 组,exo-EZH2 组 CXCL10 在培养基中的分泌含量也显著性下降(786-O: $P=0.07$; ACHN: $P=0.04$)(Figure 4)。

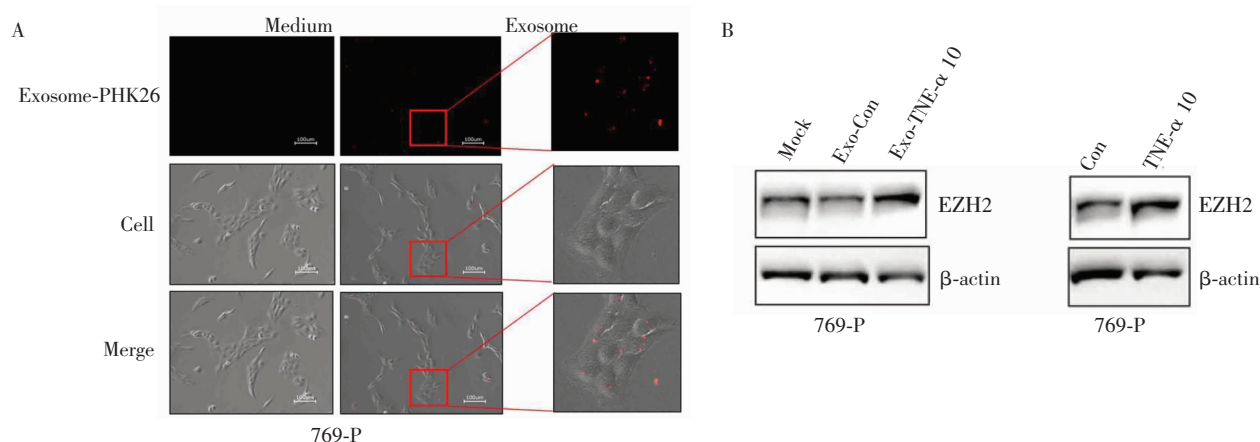
3 讨论

肾癌肿瘤免疫微环境与 *PBRM1* 突变紧密相关,而与 *VHL* 突变无关^[18]。Miao 等 2018 年在 *Science* 发表研究结果,证实免疫相关因子如 IFN- γ 、CD8 α 、CD47 和 IL-10 等表达与 *PBRM1* 突变相关,但与



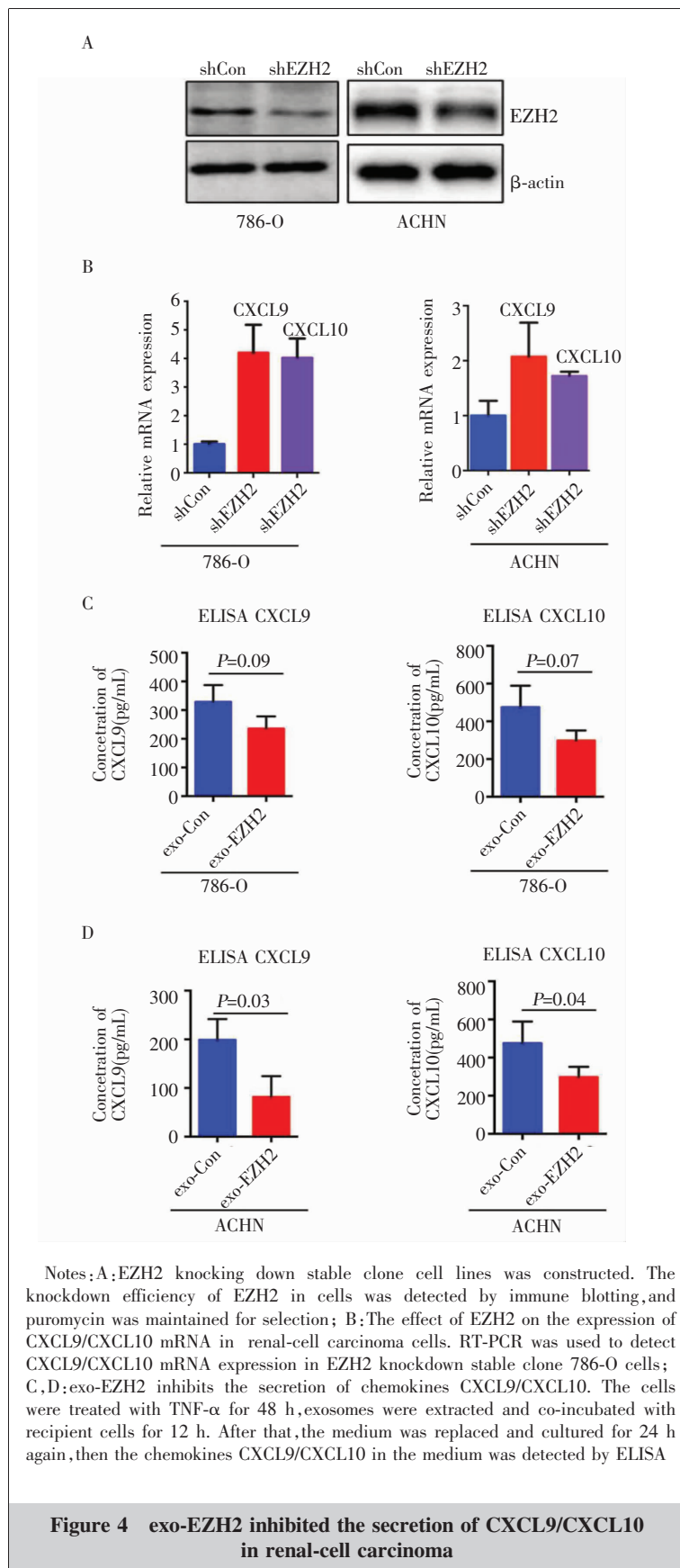
Notes; A: EZH2 expression in 786-O and 769-P cell exosomes and total cell protein. The total protein was extracted from exosomes and whole cell lysis. Western blot was applied to detect EZH2 protein in 786-O and 769-P cells after IFN- γ , IL-6 and TNF- α treatment; B: The distribution of EZH2 in cell cytoplasm and nucleus was detected by Western blot in 786-O cells. Cytoplasmic and nuclear proteins were separated after 786-O cells were treated with TNF- α for 48 h, then EZH2 content was detected; C: The distribution of EZH2 in 786-O cells was detected using immunofluorescence assay. Cells treated with TNF- α for 48 h, DAPI (blue) was represented the nucleus, green was represented EZH2; D: Co-localization of EZH2 and CD63 were detected by immunofluorescence assay. 786-O cells were treated with TNF- α for 48 h, green was represented CD63 and red was represented EZH2

Figure 2 TNF- α induced EZH2 packed into exosomes of renal-cell carcinoma



Notes; A: The fusion of exosomes in recipient cells. The exosomes were extracted, labeled with membrane stain PHK26, and added to the recipient cell 786-O medium. The fusion of exosomes in 786-O cells was observed using a microscope; B: Detection of EZH2 amount in 769-P cells. 769-P cells were treated with exo-EZH2 and exo-Con, respectively, and then the amount of EZH2 in 769-P cells were detected

Figure 3 Validation of exo-EZH2 content in recipient tumor cell



VHL 突变状态无关; Pan 等^[19]发现 *PBRM1* 缺失会增加肿瘤免疫微环境中 M2 巨噬细胞和树突状细胞的数量。研究提示 *PBRM1* 可能通过调节免疫细胞浸润促进肿瘤进展。

已发表的研究证实, *PBRM1* 突变与肾癌患者的不良生存结果相关, 肾癌 *PBRM1* 低表达者的总生存期较 *PBRM1* 高表达者差, 而且在 22 种免疫细胞亚群中, *PBRM1* 突变肾癌患者 CD8⁺T 细胞浸润数量显著性减少^[17]。CD8⁺T 细胞是 PD-L1 免疫治疗发挥杀死肿瘤细胞的直接效应细胞。由 Miao 等^[18]实验数据显示, 在 63 例肾癌患者中, *PBRM1* 突变患者 PD-L1 免疫治疗显示效果良好, 而 *PBRM1* 野生型患者对 PD-L1 临床免疫治疗无响应。*PBRM1* 突变后引起 IL-6-JAK-STAT3、TNF- α 和 IFN- γ 途径被激活, IFN- γ 信号通路的激活增加 PD-L1 的表面表达, 是提高 *PBRM1* 突变肾癌患者对 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂的临床响应的机制^[18]。但是, Liu 等^[20]2020 年在 *Nature Communications* 发表研究结果指出, *PBRM1* 突变肾透明细胞癌患者对 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂的临床效果更差, 原因在于 CD8⁺T 细胞浸润数量减少。*PBRM1* 突变与 CD8⁺T 细胞浸润减少可能存在调控关系。

我们对肾肿瘤组织中 *PBRM1* 表达和 CD8⁺T 细胞肿瘤组织浸润的相关性进行了验证, 结果显示, *PBRM1* 表达和 CD8⁺T 细胞肿瘤组织浸润数量呈正相关性。EZH2 在肾癌组织中阳性表达率高达 80%, 转移性肾癌比局限性肾癌 EZH2 表达水平更高, 且 EZH2 与肾癌分期、分级以及淋巴结转移正相关, 与预后呈负相关^[12]。我们采用低浓度 TNF- α 处理肾癌细胞后, EZH2 表达上升, 同时诱导外泌体包载 EZH2 被分泌出肿瘤细胞。外泌体携带 EZH2 进入受体细胞, 释放 EZH2。在受体细胞培养基中, 本研究检测到 CXCL9 和 CXCL10 含量降低。因此, 我们认为

PBRM1 可以通过 exo-EZH2/CXCL9(10)信号轴抑制 CD8⁺T 细胞肿瘤组织浸润。进一步研究 PBRM1 如何调控 EZH2 表达, 及外泌体包载 EZH2 并运输到细胞外的分子机制, 对于解答 PBRM1 影响免疫治疗响应至关重要, 还亟待深入研究。

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7–33.
- [2] Considine B, Hurwitz ME. Current status and future directions of immunotherapy in renal cell carcinoma [J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(4): 34.
- [3] Rodallec A, Sicard G, Fanciullino R, et al. Turning cold tumors into hot tumors: harnessing the potential of tumor immunity using nanoparticles[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2018, 14(11): 1139–1147.
- [4] Duan Q, Zhang H, Zheng J, et al. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment[J]. Trends Cancer, 2020, 6(7): 605–618.
- [5] Jansen CS, Prokhnevska N, Master VA, et al. An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells[J]. Nature, 2019, 576(7787): 465–470.
- [6] Krishna C, DiNatale RG, Kuo F, et al. Single-cell sequencing links multiregional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy[J]. Cancer Cell, 2021, 39(5): 662–677, e6.
- [7] Genta S, Piroso MC, Stathis A. BET and EZH2 inhibitors: novel approaches for targeting cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2019, 21(2): 13.
- [8] Yamagishi M, Uchimaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy[J]. Curr Opin Oncol, 2017, 29(5): 375–381.
- [9] Shan J, Al-Muftah MA, Al-Kowari MK, et al. Targeting Wnt/EZH2/microRNA-708 signaling pathway inhibits neuroendocrine differentiation in prostate cancer [J]. Cell Death Discov, 2019, 5: 139.
- [10] Hirukawa A, Smith HW, Zuo D, et al. Targeting EZH2 reactivates a breast cancer subtype-specific anti-metastatic transcriptional program[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2547.
- [11] Emran AA, Chatterjee A, Rodger EJ, et al. Targeting DNA methylation and EZH2 activity to overcome melanoma resistance to immunotherapy[J]. Trends Immunol, 2019, 40(4): 328–344.
- [12] Wagener N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M, et al. Enhancer of zeste homolog 2(EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 524.
- [13] Nagarsheth N, Peng D, Kryczek I, et al. PRC2 epigenetically silences Th1-type chemokines to suppress effector T-cell trafficking in colon cancer[J]. Cancer Res, 2016, 76(2): 275–282.
- [14] Michel BC, D'Avino AR, Cassel SH, et al. A non-canonical SWI/SNF complex is a synthetic lethal target in cancers driven by BAF complex perturbation [J]. Nature Cell Biology, 2018, 20(12): 1410–1420.
- [15] Wang D, Quiros J, Mahuron K, et al. Targeting EZH2 reprograms intratumoral regulatory T cells to enhance cancer immunity[J]. Cell Rep, 2018, 23(11): 3262–3274.
- [16] Li MO, Wolf N, Raulet DH, et al. Innate immune cells in the tumor microenvironment [J]. Cancer Cell, 2021, 39(6): 725–729.
- [17] Liu TJ, Xia Q, Zhang HB, et al. CCL5-dependent mast cell infiltration into the tumor microenvironment in clear cell renal cell carcinoma patients [J]. Aging-US, 2020, 12(21): 21809–21836.
- [18] Miao D, Margolis CA, Gao W, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma[J]. Science, 2018, 359(6377): 801–806.
- [19] Pan D, Kobayashi A, Jiang P, et al. A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing[J]. Science, 2018, 359(6377): 770–775.
- [20] Liu XD, Kong W, Peterson CB, et al. PBRM1 loss defines a nonimmunogenic tumor phenotype associated with checkpoint inhibitor resistance in renal carcinoma [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2135.