

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.011

· 综述 ·

肿瘤浸润免疫细胞及其量化分析方法的研究进展

Research progress of tumor infiltrating immune cells and their quantitative methods

刘芳远^{1,2}综述;冯学敏¹,苏秀兰¹审阅(1. 内蒙古医科大学附属医院 临床医学研究中心 内蒙古自治区医学细胞生物学重点实验室; 2. 内蒙古大学 生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010010)

[摘要] 近年来,随着肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)和免疫治疗的研究不断深入,TME中肿瘤浸润免疫细胞(tumor infiltrating immune cell, TIC)已成为研究人员关注的热点。对TIC进行量化分析有助于了解免疫系统在人类恶性肿瘤中的作用及其机制,并对肿瘤免疫治疗提供新的见解和帮助。在传统的肿瘤组织测序分析结果中,基因表达往往忽略了组织中的细胞组成和类型,因此肿瘤组织中低丰度细胞的基因表达情况会被掩盖。随着分析算法的不断发展,越来越多的工具被开发应用于分析肿瘤组织中免疫细胞的基因表达情况,实现对肿瘤组织中免疫细胞的成分进行计算和量化。

[关键词] 肿瘤;肿瘤浸润免疫细胞;量化分析;反卷积;肿瘤微环境;生物标志物

[中图分类号] R730.4;R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)09-0933-09

肿瘤组织不仅由肿瘤细胞组成,其成分还包括肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中的其他细胞,如成纤维细胞、血管内皮细胞、基质细胞、免疫细胞等^[1-2]。在这些细胞中,肿瘤浸润免疫细胞(tumor infiltrating immune cell, TIC)在肿瘤发生、发展和治疗过程中发挥了重要的作用。因此,对不同类型的TIC进行定量分析有助于阐明肿瘤发生、发展及治疗过程中免疫应答的机制,同时为肿瘤治疗方法的免疫原性进行评估,为患者提供合理的治疗方案^[3]。不仅如此,对肿瘤组织中免疫细胞进行量化分析还有助于寻找诊断和治疗肿瘤的新型标志物^[4]。目前,针对TIC的研究方法主要包括免疫组织化学、免疫荧光、流式细胞术等,但是由于分析通量的限制,上述技术无法实现对TME中免疫细胞的成分进行量化。二代测序技术(next generation sequencing, NGS)和单细胞转录组测序(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)技术则提供了大量描述TME的测序数据,这些高通量数据能够直观地提供TIC的细胞信息,再对测序数据的特征基因的表达情况进行进一步分析计算后,便能够得出TME中不同免疫类型细胞及其他类型细胞的组分。在本综述中,将对TME中的TIC进行概述,并重点介绍几种基于测序数据对TIC进行量化分析的方法和工具,以及这些工具在肿瘤研究领域的应用和发展前景。

1 TIC概述

在肿瘤的发生过程中,TIC能够影响免疫抑制和免疫逃避,从而调控肿瘤的生长^[5]。目前已知参与肿瘤调控的免疫细胞类型包括T淋巴细胞(T细胞)、B淋巴细胞(B细胞)、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细

胞(dendritic cell, DC)、自然杀伤(natural killer, NK)细胞以及髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)等^[2]。这些免疫细胞在TME中扮演了不同的角色,在肿瘤发生和发展的过程中,一些对肿瘤具有促进作用的TIC会占主导地位,阻碍了肿瘤抑制性TIC发挥功能(图1)。无论是促癌TIC还是抑癌TIC,都能成为肿瘤免疫治疗的靶向目标。

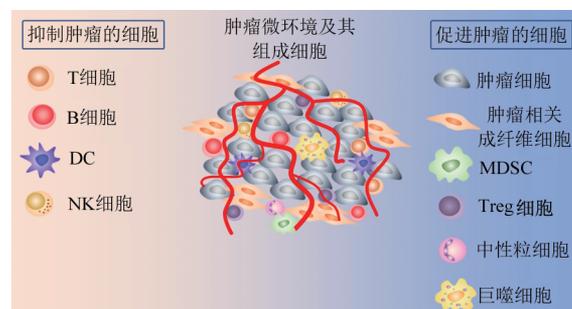


图1 浸润TME中的免疫细胞及其作用

1.1 T细胞

T细胞在抗肿瘤适应性免疫反应中扮演了核心角色。在TME中T细胞主要分为3个亚群:辅助T细胞(CD4⁺T细胞)、细胞毒性T细胞(CD8⁺T细胞)和调节性T(regulatory T, Treg)细胞。其中CD4⁺T细胞

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81960560)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81960560)

[作者简介] 刘芳远(1989—),男,硕士,主要从事肿瘤的免疫治疗研究,E-mail: liufangyuan1989@126.com

[通信作者] 苏秀兰(SU Xiulan, corresponding author),硕士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤的免疫治疗研究,E-mail: xlsu@hotmail.com

由于抗原性质和细胞因子等调控因素,还会分化为Th1、Th2、Th9、Th17和Tfh等多个亚型细胞^[6]。Th1细胞被认为是肿瘤免疫中最重要的辅助免疫细胞类型,其分泌的细胞因子,如 γ -干扰素(interferon-gamma, IFN- γ)和趋化因子(chemokine),能够增强CD8⁺T细胞的免疫反应^[7]。此外,Th1细胞还能够招募NK细胞和M1型巨噬细胞至肿瘤部位,从而引导免疫细胞对肿瘤细胞进行清除^[8]。与Th1相反,Th2细胞在TME中的作用较为复杂。传统上认为Th2细胞对肿瘤具有促进作用,在胰腺癌中Th2细胞在MyD88的诱导下能够促进胰腺细胞癌变和肿瘤细胞增殖^[9]。但DO等^[10]研究发现,在肿瘤中Th2细胞可与肿瘤浸润嗜酸性粒细胞协同作用发挥抗肿瘤作用。Th9细胞是分泌IL-9的细胞亚群,在肿瘤中Th9细胞不仅能够激活免疫应答,还可以杀伤肿瘤细胞^[11]。同Th2细胞类似,Th17细胞在肿瘤中具有双重作用,不仅可以通过促进肿瘤血管生成或抑制免疫活性从而促进肿瘤生长,还能募集CD8⁺T细胞,产生IFN- γ 介导抗肿瘤免疫反应^[12]。CD8⁺T细胞是抗肿瘤免疫反应的主要成分,经过与DC和CD4⁺T细胞相互作用,启动形成效应T细胞,再进一步识别主要组织相容性复合体I(major histocompatibility complex I, MHC I)中的肿瘤相关抗原后,最终对肿瘤细胞进行杀伤和消除^[13]。在乳腺癌、肺癌、结直肠癌等多种恶性肿瘤中,CD8⁺T细胞的浸润水平与良好预后有关联^[14]。

在TME中,同时还存在着具有免疫抑制作用的Treg细胞亚群,在大多数肿瘤患者外周血中,Treg细胞的比例明显升高,LIU等^[15]通过研究发现高比例的Treg细胞与肿瘤患者的不良预后密切相关。Treg细胞抑制免疫活性的途径有很多,最主要的方式是通过促进IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-35等免疫抑制因子的产生,或者通过消耗抗肿瘤因子IL-2,以此来抑制效应细胞发挥功能。也有研究^[16]证明,Treg细胞可以通过穿孔素、颗粒酶或凋亡相关因子(factor related apoptosis, FAS)的相互作用直接杀死效应细胞。Treg细胞不仅能对效应T细胞产生影响,其表达的细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4, CTLA-4)可以与CD80和CD86结合并影响DC的成熟,从而抑制DC向T细胞提呈刺激信号^[16]。

1.2 B细胞

与T细胞相似,存在于TME中的B细胞也具有多种不同的亚群,包括调节性B(regulatory B, Breg)细胞、浆细胞和记忆B细胞等。每种亚群对肿瘤的免

疫作用机制也并不相同。Breg细胞在肿瘤中的作用与Treg细胞类似,Breg细胞在黑色素瘤中分泌IL-10抑制辅助T细胞产生IFN- γ 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),从而促进黑色素瘤的发展^[17]。而在其他的研究^[18]中还发现,Breg细胞分泌的TGF- β 促进CD4⁺T细胞向Treg细胞转变,从而促进肿瘤进展。与Breg细胞不同,浆细胞和记忆B细胞在TME中主要发挥抗肿瘤作用。MAO等^[19]研究发现,表达CD27的浆细胞能够通过IL-10通路抑制IL-17的产生,从而减少血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,达到抑制肿瘤生长的目的。AMMIRANTE等^[20]在卵巢癌中发现,表达CD20的记忆B细胞会高表达MHC I,表明其可以将肿瘤抗原提呈并活化T细胞的抗肿瘤免疫反应。SHI等^[21]同样在胰腺癌中发现了多种记忆B细胞,如IgG⁺和IgA⁺记忆B细胞,这些记忆B细胞能够促进Th1细胞免疫反应,从而发挥抗肿瘤活性。

1.3 巨噬细胞

巨噬细胞是TME中免疫细胞的重要组成部分。通常巨噬细胞可极化为经典激活(M1型)巨噬细胞和替代激活(M2型)巨噬细胞,在TME中的巨噬细胞被认为更接近于M2型,其极化与所在微环境的信号影响更为密切,包括肿瘤细胞来源的因子和TME中的调节因素都能促进其向M2型巨噬细胞极化^[22]。大量研究表明,在TME中巨噬细胞的浸润程度能在不同程度上促进肿瘤发展,包括肿瘤免疫抑制形成、促进肿瘤转移和血管生成等。在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[23]和卵巢癌^[24]组织中发现,活化的巨噬细胞会产生IL-10,其诱导程序性死亡蛋白-配体1(programmed death ligand-1, PD-L1;也称B7-H1)和B7-H4两种分子的表达,从而抑制细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)发挥抗肿瘤功能。此外,巨噬细胞还能通过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)增强肿瘤的转移并促进肿瘤进展。HUANG等^[25]发现,在鼻咽癌患者体内由巨噬细胞分泌的细胞因子CCL18促进肿瘤细胞的EMT进程。不仅如此,巨噬细胞分泌的TNF- α 、VEGF和TGF- β 能够调控肿瘤血管生成,为肿瘤生长提供养分,有些甚至能够诱导肿瘤细胞或巨噬细胞进入其他部位,从而导致肿瘤的快速转移^[26]。目前,临床上针对巨噬细胞的治疗靶点主要包括CSF-1R、CD40、CD47等,但尚未在独立的临床试验中得到验证,明确巨噬细胞对肿瘤的具体作用机制仍需深入研究。

1.4 中性粒细胞和MDSC

中性粒细胞占外周血白细胞的50%以上,在人

体免疫反应过程中发挥重要的作用。在肿瘤中,中性粒细胞根据极化状态也可分为N1型和N2型两种亚型,其中N2型的功能与M2型巨噬细胞类似,对肿瘤及其血管生成具有促进作用,当极化过程中TGF- β 被阻断后,中性粒细胞便会极化为N1型中性粒细胞,抑制肿瘤的进展和转移。中性粒细胞在肿瘤中促进和限制作用并不单一,对肿瘤的发生、发展和免疫抑制均有影响^[27]。由中性粒细胞吞噬过程产生的大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS),能够诱导p53突变损伤端粒DNA,从而促进上皮细胞向肿瘤细胞转化,以促进肿瘤的发生^[28]。除了诱发肿瘤外,中性粒细胞分泌的弹性蛋白酶直接影响肿瘤细胞并降解胰岛素受体底物,从而激活肿瘤细胞内PI3K信号通路,促进肿瘤细胞的增殖^[29]。在其他研究^[30]中还发现,中性粒细胞能够通过维持肺癌细胞中Snail的表达,或分泌组织基质金属蛋白酶抑制剂1(tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1, TIMP-1)诱导肿瘤细胞的EMT进程,促进肿瘤的转移。有研究者^[30-31]发现,中性粒细胞能够分泌大量的MMP9和VEGF,促进胃癌的血管生成,加快肿瘤的生长与转移。ZHOU等^[32]发现,中性粒细胞分泌的CCL2和CCL17能够募集巨噬细胞和Treg细胞,促进肝癌细胞的增殖,并增强肿瘤细胞对索拉非尼的耐药性。在某些条件下,中性粒细胞能够抑制肿瘤的生长,TME中缺氧因素能够诱导CXCL1、CXCL2和CXCL5的表达,这三种因子能够募集N1型中性粒细胞发挥抗肿瘤作用^[33]。FINISGUERRA等^[34]的研究则发现,中性粒细胞在TNF的诱导下,细胞内met原癌基因(met proto-oncogene, MET)表达上升,从而导致MET依赖性诱导型一氧化氮合酶(induced nitrogen monoxide synthase, iNOS)的产生,这种MET依赖性的iNOS对肿瘤细胞具有明显的细胞毒性,能够杀死肿瘤细胞并抑制肿瘤生长和扩散。

MDSC是由骨髓细胞分化而来的免疫细胞,对肿瘤免疫逃逸过程具有一定作用。在小鼠模型^[35]中发现,MDSC可以通过多种分子机制提高肿瘤的免疫抑制能力并促进肿瘤进展,由于人体内的MDSC异质性较强,使其在不同肿瘤中的具体作用机制尚不明确。根据小鼠模型中的参考数据,人体内的MDSC可以分为以CD15阳性表达为特征的粒细胞亚群(G-MDSC)和以CD14阳性表达为特征的单细胞亚群(Mo-MDSC)。YOUN等^[35]在荷瘤小鼠体内分别分析了两种MDSC的免疫抑制活性,结果发现Mo-MDSC能够产生一氧化氮抑制T细胞功能,当加入iNOS抑制剂LMMA后,Mo-MDSC的免疫抑制活性明显减弱。相比之下,在G-MDSC亚群中

则检测到高水平的ROS,使用ROS抑制剂过氧化氢酶对其进行阻断后,免疫抑制活性也降低了。有趣的是,尽管作用机制不同,两种亚群都可能抑制T细胞发挥作用,对于这种现象,YOUN等推测可能是由于ROS或一氧化氮导致亚硝酸盐含量增加引起T细胞活性降低。HOECHST等^[36]在人体肿瘤中发现,HCC内Mo-MDSC能够促进IL-10依赖性的Treg细胞增加;BRANDAU等^[37]研究发现,肺癌和膀胱癌中G-MDSC可以影响T细胞抗原受体的表达,抑制T细胞的增殖能力。

1.5 其他类型免疫细胞

除了上述几种类型的免疫细胞外,TIC还包括NK细胞和DC。NK细胞是人体内的一种杀伤型天然免疫细胞,同时其分泌的IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子参与机体免疫的调节。在肿瘤中,当NK细胞表面的激活受体(NKp30和NKp46)接收刺激信号后,自身能够发生活化,从而发挥对肿瘤细胞的杀伤作用。NK细胞对肿瘤的抑制作用主要通过3种方式进行:(1)细胞活化后释放穿孔素和颗粒酶裂解肿瘤细胞;(2)分泌TNF,诱导肿瘤靶细胞凋亡,但这一过程往往需要靶细胞表面受体发挥作用;(3)分泌IFN- γ ,抑制肿瘤细胞的增殖及其表面连接蛋白的表达,从而抑制细胞增殖和转移^[38]。然而,在TME中,由于一些诱导因子(如NKG2A、TIGIT、PGE2等)激活NK细胞表面抑制性受体,导致NK细胞无法活化,从而无法识别和杀伤肿瘤细胞^[39]。因此,由于NK细胞的固有免疫特性和杀伤效果,如何利用细胞因子对TME中的NK细胞进行启动激活,或者通过过继性手段使用体外诱导培养的NK细胞用于肿瘤治疗已经成为目前肿瘤免疫治疗的有效手段之一。

DC是一种抗原提呈细胞,其表面可以表达MHC分子及T细胞活化所需的刺激因子等,在诱导和调控机体内的适应性免疫反应中发挥重要的作用。在肿瘤中未成熟DC能够识别并捕获来自凋亡肿瘤细胞的相关抗原,分化为成熟DC,此时DC在形态上会出现明显的树突状结构。成熟的DC将抗原进一步加工为免疫原肽,并将其加载到MHC I类分子上,提呈给抗原特异性T细胞以供识别,从而启动T细胞介导的肿瘤免疫反应^[40]。然而,肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子(如VEGF、TGF- β 和IL-10等)会引起DC分化异常和成熟障碍,从而无法有效识别抗原并提呈给T细胞进行免疫反应,造成肿瘤免疫逃逸的发生^[41]。目前基于DC的研究主要以排除肿瘤中影响DC分化和成熟的诱导因素,或者研发DC疫苗激活T细胞免疫反应。其中DC疫苗已经广泛应用于包括卵巢癌、前列腺癌、胶质瘤、乳腺癌等多种类型肿瘤的治疗中。

2 基于测序数据的免疫细胞量化分析方法

NGS的发展及测序成本的降低使人们可以更轻松地获得TME的测序数据。利用不同的算法对这些高通量测序数据分析后,计算出TME中免疫细胞及

其他非肿瘤细胞的组分和比例。和其他方法相比,基于测序数据的量化分析方法不仅在分析通量方面实现了提升,在细胞亚群识别的准确性方面也进一步提高(表1)。

表1 常见TIC分析方法比较

方法	通量	原理	准确性	分析细胞类型/次	成本	特点
免疫组织化学分析	低	使用带有染料标记的特异性抗体通过抗原抗体反应进行呈色	高	较少	较高	可识别1~2种细胞亚群,并观察细胞的形态及空间分布
免疫荧光分析	低	使用带有荧光标记的抗体,通过抗原抗体定位反应进行呈色	高	较少	较高	可识别1~2种细胞亚群,并观察细胞的形态及空间分布
流式细胞荧光分选术	一般	使用特异性荧光标记的抗体对细胞进行染色	高	较少	较高	可同时识别4~5种类型细胞亚群
NGS数据分析	高	使用标记基因或反卷积算法对测序数据进行分析	一般	较多	一般	可同时对多种细胞进行定性和定量分析,受算法和测序噪声干扰,准确性有待提高
scRNA-seq数据分析	高	基于单细胞测序数据,对细胞进行定性及定量分析	较高	较多	较高	同时对多种细胞进行定性和定量分析,由于测序样本前期处理方式的差异,测序准确性较NGS有所提升

2.1 基于标记基因的分析方法

目前,基于测序数据分析TIC的方法主要以标记基因和反卷积算法为主^[42],基于标记基因方法分析主要使用单样本基因集富集分析(single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)进行标记基因的筛选,得到不同类型免疫细胞的标记基因后,对样本的表达谱进行统计分析,最终得到样本中免疫细胞的组成和浸润水平。

ARAN等^[43]基于ssGSEA开发了细胞定量分析工具xCell,能够计算64种类型免疫细胞的富集分数。来自中国的科研团队^[44]基于ssGSEA算法开发了另一种分析T细胞浸润丰度工具ImmuCellAI,与xCell相比,ImmuCellAI尽管只能预测24种免疫细胞的丰度,但通过引入一个补偿矩阵对标记基因表达进行加权和重估,从而降低了噪声干扰并提高了预测结果的准确性。此外,在ImmuCellAI所预测的24种免疫细胞类型中包含18种T细胞亚群,使其在T细胞的分析类型和预测精度方面表现出优势^[44]。

2.2 反卷积量化分析方法

与基于标记基因的分析方法不同,反卷积算法直接对样本中细胞类型进行量化并计算比例。其原理是将特征基因表达矩阵 m 以线性方程的形式 $m=Sf$ 体现出来,其中方程中 S 代表参考细胞的特征基因表达矩阵, f 则是每种细胞组成的向量,事先将 S 定义完成后,通过特征基因表达矩阵 m 对 f 进行反推运算(图2)。

目前几种常用的TIC量化分析工具都以反卷积算法为基础,如CIBERSORT^[45]、TIMER2.0^[46]、EPIC^[47]、ABIS-seq^[48]等,但在执行反卷积运算时存在差异。CIBERSORT以微阵列方式构建了特征表达矩阵(LM22)来定义免疫细胞,然后使用Nu-支持向量回归方法(v-SVR)对 f 进行反卷积运算,最后将计算得到的细胞类型向量转化为丰度分数。通过验证后发现,v-SVR在反卷积运算过程中对测序数据中的噪声具有更强的抗变性(鲁棒性)^[45]。TIMER2.0使用了线性最小二乘回归法进行反卷积求解^[46],研发人员从IRIS数据库和HPCA数据库中获取免疫基因作为特征矩阵,计算了32种恶性肿瘤中6种免疫细胞的浸润情况。由于TIMER2.0未对免疫细胞丰度进行转换,只计算了基因表达与免疫细胞浸润的相关性,所以不能以分数的形式直观表现TIC的浸润程度^[46]。RACLE等^[47]使用约束性最小二乘回归将非负性约束条件引入反卷积运算,开发出能够分析免疫细胞和其他非肿瘤细胞比例的工具EPIC。EPIC将来自免疫细胞和其他非肿瘤细胞的特征基因整合后建立了特征矩阵,因此,EPIC能够对不同的细胞类型进行量化分析,在分析非免疫类型细胞方面实现了突破,算法也在黑色素瘤患者的淋巴结样本分析中得到了验证。

2.3 同时反卷积细胞组分和表达基因的分析方法

与CIBERSORT、TIMER2.0等只针对细胞组分

进行反卷积运算的方法不同,ZHONG等^[49]开发了一种“完全”反卷积算法——数字排序算法(digital sorting algorithm, DSA),这种算法能够对样本中的细胞组分和标记基因同时进行反卷积求解。为了验证算法的有效性,研究者使用来自小鼠肝、脑和肺3个部位细胞定量混合样本进行了测试,结果如实地体现了细胞组分和基因表达的情况。另一种“完全”反

卷积算法——微阵列显微切割差异分析(microarray microdissection with analysis of differences, MMAD)也通过了由4种血液癌细胞系混合的样本进行的验证^[50]。与传统反卷积算法相比,“完全”反卷积算法不需要事先定义特征基因矩阵,直接实现对基因表达和细胞组分的同时定量分析,当样本中的细胞类型无法确定时,“完全”反卷积算法将更具优势。

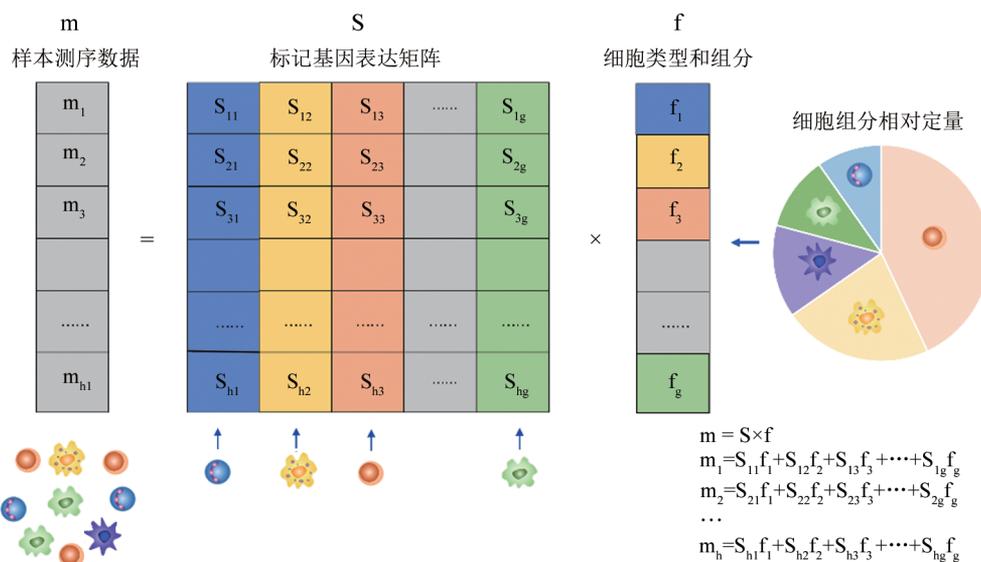


图2 反卷积算法量化细胞组分的原理

2.4 其他分析肿瘤免疫的工具和算法

除了上述量化分析方法外,还有几种使用其他方法对TIC进行评估的工具。TIminer是一种对肿瘤样本中免疫基因组进行整合分析的工具,其中包括了利用GSEA进行TIC量化分析的模块^[51]。此外,TIminer还能够在测序数据中对人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)进行分型,通过突变数据和HLA分型结果预测新的肿瘤抗原^[51]。ESTIMATE算法通过分析肿瘤中免疫细胞和基质细胞的比例计算肿瘤纯度^[52],通过ssGSEA得到基质细胞和免疫细胞的标记基因后,然后利用标记基因对样本进行免疫评分和基质评分,再将两种分数加权整合为“ESTIMATE”评分用于评估肿瘤纯度。从ESTIMATE算法分析得到的免疫评分和基质评分,已经被广泛应用于多种癌症中免疫相关预后标志物的筛选和研究^[4,53]。

3 量化TIC分析方法在肿瘤研究中的应用

3.1 鉴定肿瘤预后标志物

TIC与肿瘤细胞的相互作用对肿瘤的分类、复发、耐药性及预后具有重要的影响。通过对TIC进行量化分析,能够帮助研究人员筛选肿瘤中与免疫微

环境有关的基因及作用机制,改善肿瘤患者的预后情况。JIA等^[54]利用ESTIMATE算法对脑胶质瘤中免疫相关基因进行筛选,并进一步分析了其预后价值,通过来自TCGA和CGGA两个数据库中样本数据的验证,筛选出了21个尚未报道过的脑胶质瘤预后标志物。TGF β 2是调节免疫细胞功能的重要因子,XIAO等^[55]通过TIMER2.0分析发现,TGF β 2与胃癌中巨噬细胞的浸润程度具有显著相关性,预后分析的结果表明高表达的TGF β 2和巨噬细胞的标记基因(如CD163、PTGS2、VSIG4)都能导致胃癌患者的不良预后,推测TGF β 2可能是通过胃癌中浸润的巨噬细胞促进肿瘤发展,并能够作为胃癌的潜在预后标志物。此外,一些免疫相关的基因,如TNFSF13B^[56]、LPAR1^[57]、Fibulin-1^[58]等均被证明在不同肿瘤内能够影响TIC的浸润程度,并具有成为恶性肿瘤预后标志物的潜力。

3.2 构建肿瘤风险评估模型

与单基因评估预后的方式相比,基于多基因的风险评估模型在稳定性和准确性方面更具优势。通过使用TIC量化分析工具筛选与免疫细胞浸润相关的候选基因,并构建基于多基因的预后评估模型是目前TIC量化分析的主要用途之一。TIAN等^[59]通过

CIBERSORT 分析后发现,巨噬细胞的高水平浸润与脑胶质瘤的不良预后具有高度的相关性,通过GSEA对高/低巨噬细胞浸润亚组进行富集分析后筛选出了5个脑胶质瘤预后不良的基因用于预后风险评估建模,ROC曲线验证分析结果表明评估模型具有优异的风险评估能力(AUC=0.748)。SUN等^[60]利用ESTIMATE算法分析计算了1774例胰腺癌患者的免疫评分,再通过对高/低免疫评分组进行差异分析后,使用加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)筛选出4个免疫相关的核心基因进行风险评估,利用ImmuCellAI对预后较差的高风险组免疫细胞浸润水平分析后发现,在高风险组中Treg细胞浸润水平较高,其他对肿瘤具有促进作用的免疫细胞(如巨噬细胞、中性粒细胞)也呈现出高水平浸润状态。WANG等^[61]利用WGCNA和TIMER2.0对来自3个数据集验证得出的276个共同差异基因进行鉴定,最终筛选了4个免疫基因进行建模预测HCC的预后情况,通过其他数据集验证后发现模型具有较高的预后评估准确性。相对于传统方法主观性较强的特点,基于TIC量化分析筛选标记基因具有更好的可靠性,利用标记基因建模的方法已经广泛应用于不同肿瘤的预后风险评估中,为临床上制定患者预后方案提供了重要的参考依据。

3.3 筛选肿瘤免疫治疗靶点

除了用于鉴定预后标志物和构建预后风险模型外,TIC量化分析还被应用于肿瘤免疫治疗靶点的研究。CXCL5对免疫细胞具有重要的调控作用,可以促进多种肿瘤的发生和发展。ZHANG等^[62]利用TIMER2.0分析了胰腺癌中CXCL5与免疫细胞浸润的相关性,结果发现CXCL5表达增加会上调中性粒细胞和巨噬细胞的浸润水平,并且与胰腺癌患者的不良预后显著相关,表明CXCL5可以作为胰腺癌免疫治疗的潜在靶点。SANG等^[63]从HCC综合分子数据库中筛选出了7个肝癌干细胞的标记基因,并分析7个基因在HCC中的表达与免疫细胞浸润水平的相关性,发现SOX12的表达上调不仅与HCC患者的不良预后显著相关,在HCC中SOX12还与肿瘤促进型免疫细胞的浸润水平成正相关,表明SOX12能够作为HCC患者预后和治疗的潜在靶基因。10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)在子宫内膜癌中突变率高达65%。TAO等^[64]分析了子宫内膜癌中PTEN突变对患者总生存时间和免疫细胞浸润的影响,发现与PTEN突变组相比,非突变组预后较差,且肿瘤中

Treg细胞和巨噬细胞的浸润水平明显升高,说明通过干预手段影响PTEN的突变可以作为子宫内膜癌免疫治疗和预后改善的靶点。已有的研究表明,利用TIC量化分析已经成为寻找免疫治疗靶点的可能途径之一,但是使用该方法获得靶点的准确性和有效性还需要进一步验证。

4 基于测序数据量化TIC方法的前景与挑战

尽管基于测序数据量化TIC的分析方法已经应用于许多研究中,但由于肿瘤组织的复杂性和未知性容易产生噪声对算法的准确性,所以无论是基于标记基因的分析方法,还是反卷积算法仍然有待改进。

首先,是标记基因及其特征基因矩阵的适用性。常见的分析工具都基于不同参考基因组设计标记基因或特征基因矩阵,这些参考基因组和矩阵在不同肿瘤样本中的通用性还需要进一步验证。除此之外,由于肿瘤类型之间的差异,不同类型的基质细胞和免疫细胞对肿瘤免疫的必需性也应该考虑在内,这样有利于排除非参与性细胞对运算结果的影响。考虑到这种情况,ImmuCellAI在针对T细胞预测的准确性方面进行较大的提升,这种针对某一类型细胞进行分析有可能是TIC量化分析方法后续的发展方向^[44]。

其次,是算法对噪声影响的鲁棒性。当处理较大的肿瘤组织样本时,未知类型的细胞在组织中常常占据较大的比例。在运算过程中,未知细胞的基因表达会干扰定量分析结果,有时甚至会掩盖低丰度细胞中相同基因的表达,从而导致信号稀释现象^[65]。为了降低这种影响,CIBERSORT使用v-SVR在反卷积运算中求解 f ,极大程度地改善了噪声的鲁棒性^[45],以非负最小二乘法进行反卷积的EPIC和quanTIseq也取得了类似的效果^[47,54]。

最后,需要独立的方法验证这些工具量化分析的结果。现有分析工具大多使用了流式细胞分选技术,或者使用一定比例混合的细胞样本进行测试。自动图像分析技术在近些年不断应用在医学研究领域,使用该方法对免疫组化切片中的标记细胞进行定性和定量分析,不仅有助于样本中细胞组分的鉴定,将多维切片整合后,还能帮助研究者获得组织中细胞的空间信息^[66]。scRNA-seq及分析技术在近些年来发展迅速,利用该技术能够对肿瘤组织中免疫细胞或其他细胞类型进行更精确的分析,从而了解TME中不同类型细胞的功能和细胞之间的相互作用。随着scRNA-seq及分析技术的不断改进,相信这项技术能够在肿瘤大块组织研究或临床分析中发挥更大的作用^[47,67]。

5 结 语

TIC在肿瘤组织对肿瘤细胞的调控和治疗发挥了关键的作用,进一步了解TIC在肿瘤组织中的作用机制能为肿瘤治疗提供十分重要的参考和帮助。基于测序数据的分析方法是目前研究TIC最主要的手段之一,本文介绍近年来几种著名的量化分析TIC的工具和算法,这些方法将有助于对肿瘤甚至其他病变组织的异质性研究,从而为肿瘤治疗提供新的思路。由于测序成本的不断降低,这使得基于测序数据的分析方法与其他技术相比,具有更高的普及度和更简便的操作性。不仅如此,由于测序技术的自身特点,使用测序数据进行量化分析在通量和精确性方面也有优势。但由于这种方法对数据的依赖性较高,所以在预测功能和状态方面会显得无能为力,与传统技术联合使用会很大程度上解决这一问题,并且能够提供更可靠的证据。同时,笔者也相信基于测序数据的量化分析细胞组分方法在今后得到不断的改进,会有更精准、更强大的分析工具陆续问世。

[参 考 文 献]

- [1] PARKER T M, GUPTA K, PALMA A M, et al. Cell competition in intratumoral and tumor microenvironment interactions[J]. *EMBO J*, 2021, 40(17): e107271. DOI: 10.15252/embj.2020107271.
- [2] GAO S Y, HSU T W, LI M O. Immunity beyond cancer cells: perspective from tumor tissue[J]. *Trends Cancer*, 2021, S2405-8033 (21): 00139-4. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.06.007.
- [3] 顾炎,曹雪涛. 肿瘤免疫与免疫治疗: 机遇与挑战 [J/OL]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(1): 1-10. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.01.001.
- [4] LI F P, GUO H, WANG Y S, et al. Profiles of tumor-infiltrating immune cells and prognostic genes associated with the microenvironment of bladder cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106641. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106641.
- [5] GALLI F, AGUILERA J V, PALERMO B, et al. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 89 [2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7236372/>. DOI:10.1186/s13046-020-01586-y.
- [6] LI T, WU B W, YANG T, et al. The outstanding antitumor capacity of CD4⁺ T helper lymphocytes[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188439[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4416069/>. DOI:10.1016/j.bbcan.2020.188439.
- [7] KIM H J, CANTOR H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(2): 91-98. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-13-0216.
- [8] LACASSE C J, JANIKASHVILI N, LARMONIER C B, et al. Th-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an IFN- γ -dependent mechanism[J/OL]. *J Immunol*, 2011, 187(12): 6310-6317 [2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297475/>. DOI:10.4049/jimmunol.1101812.
- [9] OCHI A, NGUYEN A H, BEDROSIAN A S, et al. MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells[J/OL]. *J Exp Med*, 2012, 209(9): 1671-1687[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3428946/>. DOI:10.1084/jem.20111706.
- [10] DO H T T, LEE C H, CHO J. Chemokines and their receptors: multifaceted roles in cancer progression and potential value as cancer prognostic markers[J/OL]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): E287[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7072521/>. DOI:10.3390/cancers12020287.
- [11] RIVERA VARGAS T, HUMBLIN E, VÉGRAN F, et al. TH9 cells in anti-tumor immunity[J/OL]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(1): 39-46[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5222918/>. DOI:10.1007/s00281-016-0599-4.
- [12] ASADZADEH Z, MOHAMMADI H, SAFARZADEH E, et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity[J]. *Cell Immunol*, 2017, 322: 15-25. DOI:10.1016/j.cellimm.2017.10.015.
- [13] FU C M, JIANG A M. Dendritic cells and CD8 T cell immunity in tumor microenvironment[J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3059[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6306491/>. DOI:10.3389/fimmu.2018.03059.
- [14] XIE Q, Ding J, CHEN Y. Role of CD8⁺ T lymphocyte cells: Interplay with stromal cells in tumor microenvironment[J/OL]. *Acta Pharm Sin B*, 2021: 11(6): 1365-1378[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8245853/>. DOI:10.1016/j.apsb.2021.03.027.
- [15] LIU Y, CAO X T. Immunosuppressive cells in tumor immune escape and metastasis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(5): 509-522. DOI:10.1007/s00109-015-1376-x.
- [16] OHUE Y, NISHIKAWA H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target?[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(7): 2080-2089. DOI:10.1111/cas.14069.
- [17] KOBAYASHI T, OISHI K, OKAMURA A, et al. Regulatory B1a cells suppress melanoma tumor immunity via IL-10 production and inhibiting T helper type 1 cytokine production in tumor-infiltrating CD8⁺ T cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139(7): 1535-1544. e1. DOI:10.1016/j.jid.2019.02.016.
- [18] OLKHANUD P B, DAMDINSUREN B, BODOGAI M, et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells[J/OL]. *Cancer Res*, 2011, 71(10): 3505-3515[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3096701/>. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4316.
- [19] MAO H, PAN F, WU Z Y, et al. CD19^{lo}CD27^{hi} plasmablasts suppress harmful Th17 inflammation through interleukin 10 pathway in colorectal cancer[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(10): 870-877. DOI:10.1089/dna.2017.3814.
- [20] AMMIRANTE M, LUO J L, GRIVENNIKOV S, et al. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer[J/OL]. *Nature*, 2010, 464(7286): 302-305[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866639/>. DOI:10.1038/nature08782.
- [21] SHI J Y, GAO Q, WANG Z C, et al. Margin-infiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (21): 5994-6005. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-3497.
- [22] PETTY A J, LI A, WANG X Y, et al. Hedgehog signaling promotes

- tumor-associated macrophage polarization to suppress intratumoral CD8⁺ T cell recruitment[J/OL]. *J Clin Invest*, 2019, 129(12): 5151-5162[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6877305/>. DOI:10.1172/JCI128644.
- [23] KUANG D M, ZHAO Q Y, PENG C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1[J/OL]. *J Exp Med*, 2009, 206(6): 1327-1337[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715058/>. DOI:10.1084/jem.20082173.
- [24] KRYCZEK I, ZOU L H, RODRIGUEZ P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma[J/OL]. *J Exp Med*, 2006, 203(4): 871-881[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118300/>. DOI:10.1084/jem.20050930.
- [25] HUANG D, SONG S J, WU Z Z, et al. Epstein-Barr virus-induced VEGF and GM-CSF drive nasopharyngeal carcinoma metastasis via recruitment and activation of macrophages[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 3591-3604. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-2706.
- [26] WANG M, ZHANG Y, et al. Tumor-associated macrophages: A potential target for cancer therapy[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 693517[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8222665/>. DOI:10.3389/fonc.2021.693517.
- [27] COFFELT S B, WELLENSTEIN M D, DE VISSER K E. Neutrophils in cancer: neutral no more[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(7): 431-446. DOI:10.1038/nrc.2016.52.
- [28] SHRIHARI T G. Dual role of inflammatory mediators in cancer[J/OL]. *Ecanermedicalscience*, 2017, 11: 721[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5336391/>. DOI: 10.3332/ecancer.2017.721.
- [29] HOUGHTON A M, RZYMKIEWICZ D M, JI H B, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth[J/OL]. *Nat Med*, 2010, 16(2): 219-223[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821801/>. DOI: 10.1038/nm.2084.
- [30] FAGET J, GROENEVELD S, BOIVIN G, et al. Neutrophils and snail orchestrate the establishment of a pro-tumor microenvironment in lung cancer[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(11): 3190-3204. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.052.
- [31] LI T J, JIANG Y M, HU Y F, et al. Interleukin-17-producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(6): 1575-1585. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-0617.
- [32] ZHOU S L, ZHOU Z J, HU Z Q, et al. Tumor-associated neutrophils recruit macrophages and Treg cells to facilitate hepatocellular carcinoma progression and resistance to sorafenib[J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(7): 1646-1658. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.02.040.
- [33] BLAISDELL A, CREQUER A, COLUMBUS D, et al. Neutrophils oppose uterine epithelial carcinogenesis via debridement of hypoxic tumor cells[J/OL]. *Cancer Cell*, 2015, 28(6): 785-799[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698345/>. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.11.005.
- [34] FINISGUERRA V, DI CONZA G, DI MATTEO M, et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils[J/OL]. *Nature*, 2015, 522(7556): 349-353[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594765/>. DOI:10.1038/nature14407.
- [35] YOUN J I, NAGARAJ S, COLLAZO M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice[J/OL]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5791-5802[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2575748/>. DOI:10.4049/jimmunol.181.8.5791.
- [36] HOECHST B, ORMANDY L A, BALLMAIER M, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells[J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(1): 234-243. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.020.
- [37] BRANDAU S, TRELAKIS S, BRUDEREK K, et al. Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(2): 311-317. DOI: 10.1189/jlb.0310162.
- [38] GLASNER A, LEVI A, ENK J, et al. NKp46 receptor-mediated interferon- γ production by natural killer cells increases fibronectin 1 to alter tumor architecture and control metastasis[J/OL]. *Immunity*, 2018, 48(2): 396-398[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5823842/>. DOI:10.1016/j.immuni.2018.01.010.
- [39] COZAR B, GREPPI M, CARPENTIER S, et al. Tumor-infiltrating natural killer cells[J/OL]. *Cancer Discov*, 2021, 11(1): 34-44[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7611243/>. DOI:10.1158/2159-8290.CD-20-0655.
- [40] STEINMAN R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 1-22. DOI: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- [41] LEE Y S, RADFORD K J. The role of dendritic cells in cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 348: 123-178. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.006.
- [42] FINOTELLO F, TRAJANOSKI Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data[J/OL]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(7): 1031-1040[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6006237/>. DOI:10.1007/s00262-018-2150-z.
- [43] ARAN D, HU Z C, BUTTE A J. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape[J/OL]. *Genome Biol*, 2017, 18(1): 220[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688663/>. DOI:10.1186/s13059-017-1349-1.
- [44] MIAO Y R, ZHANG Q, LEI Q, et al. ImmuCellAI: a unique method for comprehensive T-cell subsets abundance prediction and its application in cancer immunotherapy[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(7): 1902880[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7141005/>. DOI:10.1002/adv.201902880.
- [45] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles[J/OL]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 453-457[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4739640/>. DOI:10.1038/nmeth.3337.
- [46] LI T W, FU J X, ZENG Z X, et al. TIMER2.0 for analysis of tumor-infiltrating immune cells[J/OL]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(W1): W509-W514[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7319575/>. DOI: 10.1093/nar/gkaa407.
- [47] RACLE J, DE JONGE K, BAUMGAERTNER P, et al. Simultaneous enumeration of cancer and immune cell types from bulk tumor gene expression data[J/OL]. *Elife*, 2017, 6: e26476[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5718706/>. DOI: 10.7554/

- eLife.26476.
- [48] MONACO G, LEE B, XU W L, et al. RNA-seq signatures normalized by mRNA abundance allow absolute deconvolution of human immune cell types[J/OL]. *Cell Rep*, 2019, 26(6): 1627-1640.e7[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6367568/>. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.041.
- [49] ZHONG Y, WAN Y W, PANG K F, et al. Digital sorting of complex tissues for cell type-specific gene expression profiles[J/OL]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 89[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626856/>. DOI:10.1186/1471-2105-14-89.
- [50] LIEBNER D A, HUANG K, PARVIN J D. MMD: microarray microdissection with analysis of differences is a computational tool for deconvoluting cell type-specific contributions from tissue samples[J/OL]. *Bioinformatics*, 2014, 30(5): 682-689[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3933869/>. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt566.
- [51] TAPPEINER E, FINOTELLO F, CHAROENTONG P, et al. TIminer: NGS data mining pipeline for cancer immunology and immunotherapy [J/OL]. *Bioinformatics*, 2017, 33(19): 3140-3141[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5870678/>. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx377.
- [52] YOSHIHARA K, SHAHMORADGOLI M, MARTÍNEZ E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data[J/OL]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2612[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826632/>. DOI:10.1038/ncomms3612.
- [53] ZHANG Z, LI Z Y, LIU Z, et al. Identification of microenvironment-related genes with prognostic value in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(7): 3606-3615. DOI:10.1002/jcb.29654.
- [54] JIA D, LI S, LI D, et al. Mining TCGA database for genes of prognostic value in glioblastoma microenvironment[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(4): 592-605. DOI:10.18632/aging.101415.
- [55] XIAO Z Q, HU L J, YANG L, et al. TGFβ2 is a prognostic-related biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer [J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7151-7162[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339175/>. DOI: 10.1111/jcmm.15164.
- [56] JIANG M Z, LIN J X, XING H T, et al. Microenvironment-related gene TNFSF13B predicts poor prognosis in kidney renal clear cell carcinoma [J/OL]. *PeerJ*, 2020, 8: e9453[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7333652/>. DOI:10.7717/peerj.9453.
- [57] SHI J Q, JIANG D B, YANG S Y, et al. LPAR1, correlated with immune infiltrates, is a potential prognostic biomarker in prostate cancer[J/OL]. *Front Oncol*, 2020, 10: 846[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7325998/>. DOI: 10.3389/fonc.2020.00846.
- [58] GONG J, JIE Y S, XIAO C C, et al. Increased expression of fibulin-1 is associated with hepatocellular carcinoma progression by regulating the notch signaling pathway[J/OL]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 478 [2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7308487/>. DOI:10.3389/fcell.2020.00478.
- [59] TIAN Y X, KE Y Q, MA Y X. High expression of stromal signatures correlated with macrophage infiltration, angiogenesis and poor prognosis in glioma microenvironment[J/OL]. *PeerJ*, 2020, 8: e9038[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7245335/>. DOI:10.7717/peerj.9038.
- [60] SUN S J, GUO W, WANG Z, et al. Development and validation of an immune-related prognostic signature in lung adenocarcinoma [J/OL]. *Cancer Med*, 2020, 9(16): 5960-5975[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7433810/>. DOI: 10.1002/cam4.3240.
- [61] WANG D C, LIU J, LIU S S, et al. Identification of crucial genes associated with immune cell infiltration in hepatocellular carcinoma by weighted gene co-expression network analysis[J/OL]. *Front Genet*, 2020, 11: 342[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7193721/>. DOI:10.3389/fgene.2020.00342.
- [62] ZHANG R H, LIU Q F, PENG J Y, et al. CXCL5 overexpression predicts a poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma and is correlated with immune cell infiltration[J/OL]. *J Cancer*, 2020, 11(9): 2371-2381[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7065995/>. DOI:10.7150/jca.40517.
- [63] SANG X P, WU F F, WU D, et al. Human hepatic cancer stem cells (HCSCs) markers correlated with immune infiltrates reveal prognostic significance of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Front Genet*, 2020, 11: 112[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7058667/>. DOI:10.3389/fgene.2020.00112.
- [64] TAO Y, LIANG B. PTEN mutation: a potential prognostic factor associated with immune infiltration in endometrial carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(6): 152943. DOI:10.1016/j.prp.2020.152943.
- [65] SHEN-ORR S S, GAUJOUX R. Computational deconvolution: extracting cell type-specific information from heterogeneous samples [J/OL]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(5): 571-578[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874291/>. DOI:10.1016/j.coi.2013.09.015.
- [66] LIU C C, STEEN C B, NEWMAN A M. Computational approaches for characterizing the tumor immune microenvironment[J/OL]. *Immunology*, 2019, 158(2): 70-84[2021-07-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6742767/>. DOI:10.1111/imm.13101.
- [67] ZHAO J, GUO C, XIONG F, et al. Single cell RNA-seq reveals the landscape of tumor and infiltrating immune cells in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2020, 477: 131-143. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.010.

[收稿日期] 2021-07-08

[修回日期] 2021-09-03

[本文编辑] 党瑞山