

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.008

· 临床研究 ·

外周血细胞免疫功能检测对晚期黏膜黑色素瘤疗效及预后的预测价值

赵莲君^{1,2}, 张王玲^{1,2}, 费一鸣^{1,2}, 任宇^{1,2}, 禹丽霞^{1,2}, 王富锋³, 邹征云^{1,2} (1. 南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心, 江苏 南京 210008; 2. 南京大学临床肿瘤学研究所, 江苏 南京 210008; 3. 南京世和基因生物技术股份有限公司, 江苏 南京 210000)

[摘要] **目的:** 探究晚期黏膜黑色素瘤患者免疫联合抗血管生成治疗前后外周血淋巴细胞免疫分型、细胞因子水平与治疗效果及患者预后的相关性。**方法:** 纳入分析2019年4月至2022年6月在南京大学医学院附属鼓楼医院收治的28例晚期黏膜黑色素瘤患者, 所有患者均接受卡瑞利珠单抗(PD-1抑制剂)及甲磺酸阿帕替尼(抗血管生成药物)的联合治疗, 采集治疗前和2周期治疗后患者外周血, 进行淋巴细胞免疫分型、细胞因子水平检测, 评估其与治疗效果及患者预后的相关性。**结果:** 黏膜黑色素瘤患者接受卡瑞利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼治疗2周期后, 外周血PD-1阳性细胞毒性T淋巴细胞(CD3⁺CD8⁺CD279⁺细胞)比例显著降低($P < 0.001$), 治疗响应的患者NK细胞(CD3⁺CD16⁺CD56⁺细胞)比例明显升高($P = 0.0054$)。治疗前外周血IFN- γ 水平与总生存期(OS)相关($P = 0.013$), IFN- γ 低水平的患者中位OS为329天, 高水平的患者中位OS未达到。基线IFN- γ 水平越高, PFS倾向获益越大。**结论:** 外周血PD-1阳性T淋巴细胞、NK细胞比例、IFN- γ 水平对接受免疫联合抗血管生成治疗的晚期黏膜黑色素瘤患者的疗效及预后可能有预测价值, 未来仍需要大样本研究以更好地表征临床应用潜力。

[关键词] 黏膜黑色素瘤; 淋巴细胞免疫分型; 细胞因子; 免疫联合抗血管生成治疗; 疗效预测; 预后预测

[中图分类号] R739.5; R730.5; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024) 12-1227-09

Predictive value of peripheral blood immune function testing for efficacy and prognosis in advanced mucosal melanoma

ZHAO Lianjun^{1,2}, ZHANG Wangling^{1,2}, FEI Yiming^{1,2}, REN Yu^{1,2}, YU Lixia^{1,2}, WANG Fufeng³, ZOU Zhengyun^{1,2} (1. Comprehensive Cancer Center, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China; 2. Clinical Cancer Institute of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China; 3. Nanjing Geneseeq Technology Inc., Nanjing 210000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between peripheral blood lymphocyte immunophenotyping, cytokine levels before and after immune and anti-angiogenesis combined therapy, and treatment efficacy as well as prognosis in patients with advanced mucosal melanoma. **Methods:** A total of 28 patients with advanced mucosal melanoma admitted to the Drum Tower Hospital of Nanjing University School of Medicine from April 2019 to June 2022 were included in this analysis. All patients received combined treatment of camrelizumab (PD-1 inhibitor) and apatinib (anti-angiogenic drug). Peripheral blood samples were collected before treatment and after two cycles of treatment for lymphocyte immunophenotyping and cytokine level testing. The correlation between these immune markers and treatment efficacy as well as patient prognosis was evaluated. **Results:** After two cycles of treatment with camrelizumab and apatinib in patients with mucosal melanoma, the proportion of PD-1 positive cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺CD279⁺ cells) in peripheral blood was significantly reduced ($P < 0.001$), while the proportion of NK cells (CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells) was significantly increased ($P = 0.0054$). Pre-treatment peripheral blood IFN- γ levels were found to be associated with overall survival (OS) ($P = 0.013$). Patients with low IFN- γ levels had a median OS of 329 days, while the median OS for patients with high IFN- γ levels was not reached. Higher baseline IFN- γ levels were associated with a greater benefit in progression-free survival (PFS). **Conclusion:** The proportion of PD-1-positive T lymphocytes, NK cells and IFN- γ levels in peripheral blood may have predictive value for the efficacy and prognosis of advanced mucosal melanoma patients undergoing immunotherapy and anti-angiogenesis combined therapy. Future large-sample studies are needed to better characterize the clinical potential of these markers.

[Keywords] mucosal melanoma; lymphocyte immunophenotyping; cytokines; immunotherapy combined with anti-angiogenic therapy; efficacy prediction; prognosis prediction

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(12): 1227-1234. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.12.008]

[基金项目] 国家自然科学基金(No.82073365, No.81872484); 江苏省社会发展基金(No.BE2019605)

[作者简介] 赵莲君(1990—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事恶性黑色素瘤的个体化治疗, E-mail: zhaolianjunzz@126.com

[通信作者] 邹征云, E-mail: zouzhengyun001@163.com

黏膜黑色素瘤是中国特色黑色素瘤亚型,具有恶性程度高、转移早、预后差等特点^[1-2]。据报道^[3],黏膜黑色素瘤的中位生存时间为3.58年,5年总生存率仅为16%。近年来,帕博利珠、纳武利尤、特瑞普利单抗等为代表的PD-1抗体在晚期黑色素瘤治疗中取得较好的疗效^[4-8]。然而,对于黏膜黑色素瘤这一亚型,Keynote-151研究^[9-10]和CT4/POLARIS-01研究^[8]结果表明,PD-1单抗在中国晚期黏膜黑色素瘤患者中单药客观缓解率仅为0.0%~13.3%,明显劣于其他亚型黑色素瘤。因此,对于晚期黏膜黑色素瘤,以PD-1为基础的联合治疗成为了目前的研究方向。CT13研究及ML-41186研究均显示PD-1/PD-L1抗体联合抗血管生成治疗在晚期黏膜型恶性黑色素瘤患者中的达到突破性的疗效^[11-13]。南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心发起的一项卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼治疗晚期黏膜黑色素瘤的疗效及安全性研究在2021年中国临床肿瘤学(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)大会及2022年美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)年会上做壁报交流,并被《癌症免疫治疗杂志》接收。因此,探索能够预测PD-1抗体联合抗血管生成治疗疗效的生物标志物,筛选出适接受这种联合疗法的人群显得越趋重要。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集2019年4月至2022年6月在南京大学医学院附属鼓楼医院收治的28例晚期黏膜黑色素瘤患者的资料,所有患者均接受卡瑞利珠单抗(抗PD-1抗体)及抗血管生成药物甲磺酸阿帕替尼的联合治疗。主要的入选标准包括:病理学确诊晚期黏膜黑色素瘤,至少有一个未经局部治疗的可测量病灶,ECOG评分:0~1,预期生存期 ≥ 12 周;主要排除标准:活动性自身免疫性疾病,明显的凝血功能障碍,既往接受过抗PD-1、PD-L1、PD-L2抗体治疗。

1.2 治疗方案

入组后接受重组人源化抗PD-1单克隆抗体(卡瑞利珠单抗)注射液200 mg静脉滴注,每两周1次;甲磺酸阿帕替尼片500 mg口服,每日1次,4周为1个周期,至疾病进展或不良反应不能耐受,前12个治疗周期每2周期进行一次影像学评估,12周期后每3周期进行1次影像学评估(RECIST 1.1标准),不良反应按NCI-CTC AE 4.03分级。

1.3 疗效评估

疗效评估采用实体瘤疗效评价标准1.1(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors,

RECIST 1.1),客观有效率(objective response rate, ORR)为完全缓解(complete response, CR)+部分缓解(partial response, PR)病例占可评价病例的百分数,疾病控制率(disease control rate, DCR)为CR+PR+疾病稳定(stable disease, SD)病例占可评价病例的百分数。响应组定义为CR及PR患者,无响应组定义为SD及疾病进展(progressive disease, PD)患者。无进展生存期(progression-free survival, PFS)定义为治疗开始到出现进展的时间。总生存期(overall survival, OS)为接受治疗开始到死亡的时间。生存期以天计。

1.4 实验方法

1.4.1 流式细胞术检测治疗前后患者外周血淋巴细胞免疫分型

患者在治疗前7 d内及治疗2个周期后抽取外周静脉血2 mL,加入乙二胺四乙酸抗凝管,标记好流式管,每管加入外周血100 μ L;各检测管中分别加入相应流式抗体;涡旋震荡后避光处理30 min;每管加入2 mL红细胞裂解液($1\times$),常温裂解10~15 min;每管加入1 mL生理盐水或PBS终止裂解红细胞;200 $\times g$,离心4 min;弃上清液,每管加入2 mL生理盐水或PBS,重悬细胞;200 $\times g$,离心4 min;重复洗涤1次,用300 μ L生理盐水或PBS重悬细胞,最后用BD AccuriC6流式细胞仪进行数据分析,获取CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD16⁺CD56⁺、CD3⁺CD8⁺CD279⁺、CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺、CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁺细胞的比例。

1.4.2 流式微球分析法检测治疗前后患者外周血细胞因子水平

用BD CBA Flex Set试剂盒检测Th1/Th2细胞因子(包括IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α)。首先制备不同浓度细胞因子的标准品,每种捕获微球需充分旋转5~15 s,按照1.5 μ L/样本吸取适量的捕获微球,充分旋转混匀,将捕获好的微球室温下以200 $\times g$ 离心5 min,小心吸取上清液,加入与混合微球相同体积的血清增强液,旋转混匀,室温下避光处理30 min,最后将混合微球与样本共处理,将待检测标本上清液移至实验管中备用,充分旋转重悬好的混合微球,每个实验管中加入8 μ L,标准品管中加入25 μ L梯度稀释的标准品,样本管中加入25 μ L待测样本,所有实验管中加入8 μ L PE标记的细胞因子抗体,室温避光处理3 h,每管中加入1 mL洗液清洗样本,200 $\times g$ 离心5 min,小心吸去上清液,每管中加入50 μ L洗液重悬细胞后尽快上流式细胞仪进行检测。用CBA专用分析软件FCAP Array v3.0进行标准曲线绘制及数据分析。

1.5 统计学处理

所有统计分析均使用R 3.5.0版本进行。Kaplan-Meier 曲线进行生存分析,并用Cox比例风险模型计算具有95% CI的HR。用反向Kaplan-Meier法计算中位随访时间。根据需要使用Fisher精确检验进行组间比较,并用双尾检验计算P值。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

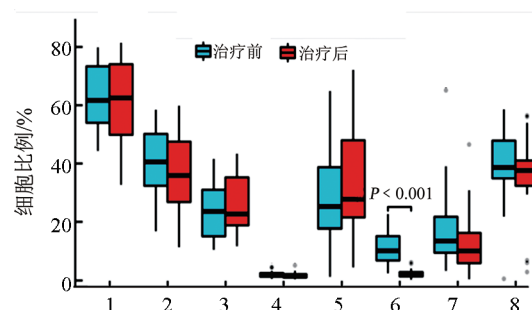
2.1 联合治疗后患者外周血PD-1阳性细胞毒性淋巴细胞比例明显降低

流式细胞术检测结果(图1)显示,与治疗前比较,接受2周期卡瑞利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼治疗后,外周血PD-1阳性细胞毒性T淋巴细胞($CD3^+CD8^+CD279^+$ 细胞)比例显著降低($P < 0.001$),其他亚型的比例在治疗前后未见明显改变。

2.2 联合治疗后有响应患者外周NK细胞比例明显升高

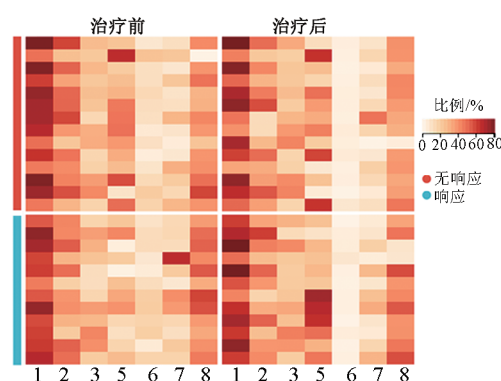
用Wilcoxon秩和检验比较患者接受2周期卡瑞

利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼治疗后外周血淋巴细胞免疫分型比例的变化与疗效的相关性,结果(图2)显示,与无响应患者比较,治疗响应患者外周血NK细胞($CD3^+CD16^+CD56^+$)比例明显升高($P = 0.0054$),其他淋巴细胞分型在响应组和无响应组均无明显差异。



1: $CD3^+$ T细胞; 2: $CD3^+CD4^+$ T细胞; 3: $CD3^+CD8^+$ T细胞;
4: $CD4/CD8$ T细胞; 5: $CD3^+CD16^+CD56^+$ T细胞;
6: $CD3^+CD8^+CD279^+$ T细胞; 7: $CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^+$ T细胞;
8: $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD62L^+$ T细胞。

图1 治疗前后外周血淋巴细胞分型变化



1: $CD3^+$ T细胞; 2: $CD3^+CD4^+$ T细胞; 3: $CD3^+CD8^+$ T细胞; 4: $CD4/CD8$ T细胞; 5: $CD3^+CD16^+CD56^+$ T细胞;
6: $CD3^+CD8^+CD279^+$ T细胞; 7: $CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^+$ T细胞; 8: $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD62L^+$ T细胞。

图2 响应组与无响应组外周血淋巴细胞免疫分型比例的变化

2.3 治疗前外周血淋巴细胞免疫分型比例与患者预后无明显相关性

用COX回归分析比较患者接受卡瑞利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼治疗前外周血 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^+CD8^+$ 、 $CD4/CD8$ 、 $CD3^+CD16^+CD56^+$ 、 $CD3^+CD8^+CD279^+$ 、 $CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^+$ 、 $CD3^+CD4^+CD45RO^+CD62L^+$ 细胞比例与PFS及OS均无显著相关性(图3)。

2.4 治疗前后患者外周血细胞因子水平无明显变化且与ORR无明显相关

用配对样本秩和检验分析患者接受2周期卡瑞利珠单抗联合阿帕替尼治疗前后外周血IL-2、IL-4、

IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 水平未见明显变化,各细胞因子水平与ORR无明显相关性(图4)。

2.5 治疗前后外周IFN- γ 水平与患者OS明显相关

采用COX回归分析比较患者接受卡瑞利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼治疗前外周血IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IFN- γ 、TNF- α 水平与PFS及OS的相关性,结果(图5-6)显示,IFN- γ 水平与OS相关($HR = 0.28$, $P = 0.0133$),其他细胞因子与OS无显著相关性。以中值为界,IFN- γ 低水平的患者中位OS为329 d,高水平的患者中位OS未达到。各细胞因子水平与PFS无显著相关性,但基线期IFN- γ 水平越高, PFS倾向获益越大($HR = 0.44$, $P = 0.086$)。

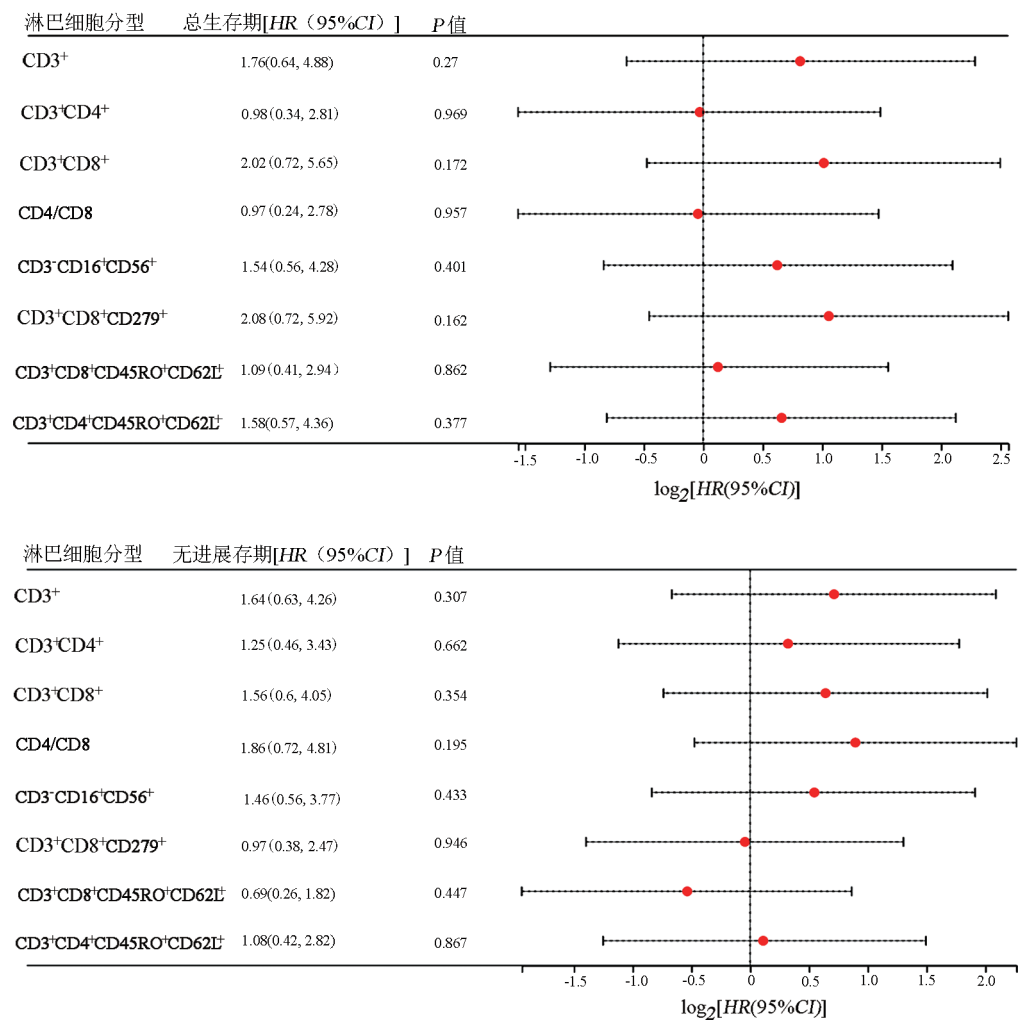


图3 外周血淋巴细胞免疫分型比例与患者预后的相关性分析

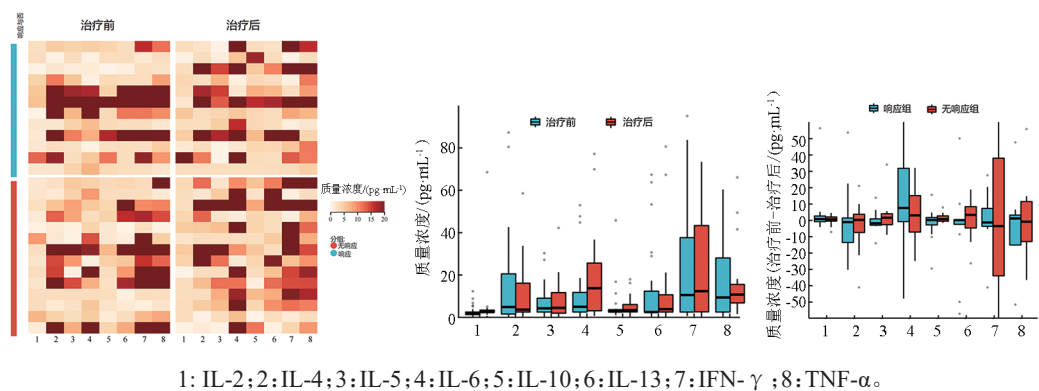


图4 外周血细胞因子水平与疗效的相关性分析

3 讨论

黏膜黑色素瘤是恶性度高、预后差的黑色素瘤亚型。由于其发病率低,过去数十年来一直沿用皮肤型黑色素瘤的治疗方案,然而疗效差强人意^[2]。近年来,由于免疫及靶向药物的广泛应用,越来越多的

临床试验证实,免疫联合抗血管生成治疗可以提高黏膜型黑色素瘤的治疗效果,改善患者预后^[11-13]。因此,探索PD-1抗体联合抗血管生成治疗疗效的外周血生物标志物,筛选受益人群,实现疗效的实时动态监测显得越趋重要。

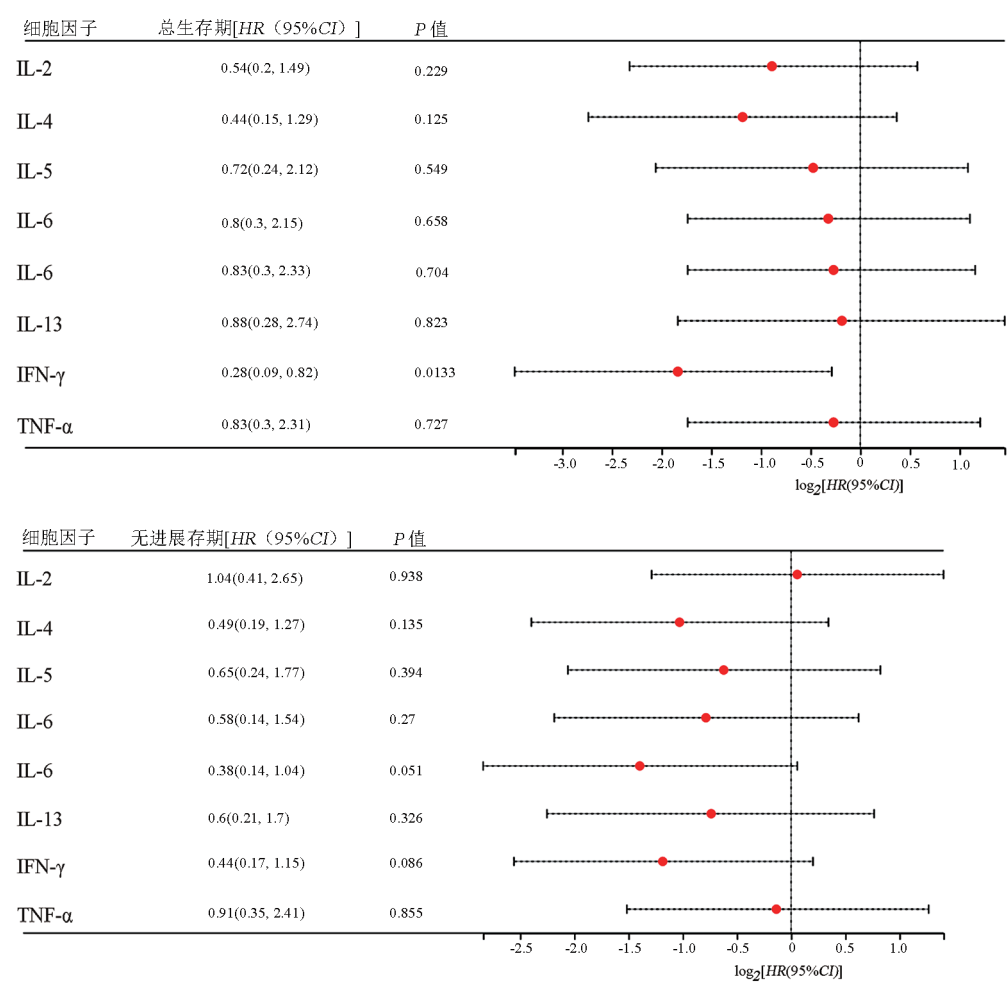


图5 外周血细胞因子水平与患者预后的相关性分析

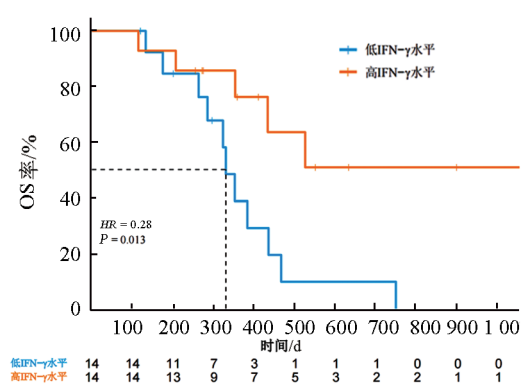


图6 外周血IFN- γ 水平与患者生产率的关系

癌症是一种全身性疾病,可引起整个免疫系统的诸多结构和功能的变化。肿瘤微环境(TME)的局部细胞免疫,以及基于脾脏、淋巴结和血循环的外周细胞免疫的功能状态与肿瘤发生发展和治疗转归密切相关^[14]。外周血细胞免疫功能检测在兼顾便捷性及实时动态监测可行性的同时,可在实体肿瘤免疫治疗受益人群筛选、免疫相关不良反应监测、肿瘤疗效及预后评估等方面发挥重要作用。为了给实体肿

瘤患者的精准治疗提供帮助,中华检验医学杂志发布了《实体肿瘤外周血细胞免疫功能实验室检测专家共识》,提出了从T淋巴细胞亚群精细分型,髓源性抑制细胞(MDSC)亚群分析和细胞因子水平监测三个方面进行外周血细胞免疫功能检测^[15]。

淋巴细胞一般分为T淋巴细胞(CD3⁺细胞),B淋巴细胞(CD19⁺细胞),NK细胞(CD3⁺CD56⁺CD16⁺细胞)。根据表面CD分子表达,T淋巴细胞可分为CD3⁺CD4⁺的辅助性T细胞(helper T cell, Th细胞)和CD3⁺CD8⁺的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cell, CTL细胞)^[16]。CTL细胞是杀伤肿瘤最主要的效应细胞,Th细胞可辅助CTL细胞的活化、增殖和效应功能。CD4/CD8比例的恒定维持着细胞免疫反应的平衡。在肺癌、乳腺癌及结直肠癌等多种实体瘤患者中,CD3⁺CD4⁺细胞、CD3⁺CD8⁺细胞、CD4/CD8与患者预后有一定的相关性^[17-19]。然而,本研究中,尚未发现外周血CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD4/CD8与晚期黏膜黑色素瘤患者的疗效及预后有相关性,这可能是由于样本量较小,且患者既往是否接收过抗肿瘤治疗史不同。

NK细胞(CD3⁺CD56⁺CD16⁺细胞)是天然免疫系统中的主要效应细胞,是抗肿瘤免疫的第一道防线^[20]。NK细胞的活性受其表面表达活化性受体和抑制性受体调控,对恶性肿瘤细胞进行免疫监视,维持机体的稳定^[21]。肿瘤微环境中的趋化因子和黏附因子等,通过募集NK细胞,促使肿瘤组织中NK浸润程度增加,继而使得NK细胞表面活化性受体识别肿瘤细胞表面相应配体,释放穿孔素等杀伤介质,发挥抗肿瘤的细胞毒性作用^[22-23]。本研究结果提示,治疗响应的患者外周血NK细胞比例明显升高,说明治疗后,天然免疫系统迅速反应、NK细胞比例短期内提升明显的患者,更容易从免疫治疗联合抗血管生成治疗中获益。

PD-1与PD-L1的结合是肿瘤免疫逃逸的重要机制之一,在肿瘤的发生发展中起着举足轻重的作用。PD-1抗体可直接阻断PD-1与PD-L1的结合,解除免疫“刹车”,增强淋巴细胞的活性,实现抗肿瘤作用^[24-25]。卡瑞利珠单抗是重组人源化抗PD-1单克隆抗体注射液,在黑色素瘤中的抗肿瘤作用已被多项临床研究^[26-28]证实。本研究发现,黏膜黑色素瘤患者接受卡瑞利珠单抗联合甲磺酸阿帕替尼治疗2周期后,外周血PD-1阳性CTL细胞(CD3⁺CD8⁺CD279⁺淋巴细胞)比例显著降低, $P < 0.001$,说明这一疗法可以有有效的抑制外周血PD-1阳性T细胞的表达,防止肿瘤细胞通过PD-1/PD-L1通路逃避活化T细胞的免疫监控,恢复免疫系统的抗肿瘤作用。

中央记忆T细胞(central memory T cell, TCM细胞)是幼稚T细胞经过抗原激活后,产生的具有长期记忆性的、并能够归巢到淋巴结接受抗原再刺激的T细胞^[29]。YAMAGUCHI等^[30]发现,与健康人相比,恶性黑色素瘤患者基线具有PD-1阳性亚群CD4⁺TCM细胞比例的增加。单疗程PD-1抗体治疗后,恶性黑色素瘤患者外周血CD4⁺和CD8⁺TCM细胞亚群增加。TAKEUCHI等^[31]证明,外周血中CD4⁺TCM亚群的增加可作为恶性黑色素瘤患者PD-1抑制剂治疗疗效的预测指标,在长期生存患者中,具有CD27⁺Fas-CD45RA-CCR7⁺特定表型的CD4⁺TCM细胞增加。然而,受限于样本量大小,本研究尚未发现CD4⁺TCM细胞(CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁺)、CD8⁺TCM细胞(CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺CD62L⁺)亚群比例与PFS及OS存在显著相关性。

Th1/Th2细胞动态平衡对维持机体的免疫功能至关重要^[32],Th1细胞因子包括IL-2、IFN- γ 、TNF- α 等,这些细胞因子可促进T细胞介导的免疫应答,释放引起炎症作用的细胞因子,表现为免疫杀伤;Th2细胞因子包括IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等,与B

细胞增殖、成熟及抗体生成有关,主要介导体液免疫应答。IFN- γ 是由活化的T细胞、NK细胞、NKT细胞等分泌的一种促炎细胞因子,其通过免疫和非免疫两种途径表现出抗肿瘤活性^[33]。IFN- γ 的非免疫途径抗肿瘤作用表现在直接抑制肿瘤细胞增殖和抗肿瘤血管生成^[34-35]。IFN- γ 的免疫途径抗肿瘤表现在多方面,首先IFN- γ 可以增强淋巴细胞的细胞毒活性,起到杀伤肿瘤细胞的作用;IFN- γ 作用于抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC),上调T细胞活化所需的共刺激分子和细胞因子的表达,间接促进CD4⁺和CD8⁺T细胞反应,并诱导T细胞在TME中的浸润,促进TME的抗肿瘤反应^[36];IFN- γ 还可以通过抑制免疫抑制信号来放大抗肿瘤反应^[35]。本研究发现,治疗前外周血IFN- γ 水平与OS相关,IFN- γ 低水平的患者中位OS为329天,高水平的患者中位OS未达到;治疗前IFN- γ 水平越高,PFS倾向获益越大。可见基线外周血IFN- γ 水平与患者的预后相关,IFN- γ 水平高的患者,有从免疫联合抗血管生存治疗中获益的趋势。

本研究虽是一项前瞻性研究,然而病例数有限,无法较好地排除既往有无抗肿瘤治疗史等因素的干扰。尽管如此,本研究观察到外周血细胞免疫功能检测对晚期黏膜黑色素瘤患者疗效及预后预测具有潜在的价值,期待未来能扩大样本量进行进一步的研究探索。

[参考文献]

- [1] MA Y N, XIA R H, MA X H, *et al.* Mucosal melanoma: pathological evolution, pathway dependency and targeted therapy[J/OL]. *Front Oncol*, 2021, 11: 702287[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8327265/>. DOI: 10.3389/fonc.2021.702287.
- [2] SERGI M C, FILONI E, TRIGGIANO G, *et al.* Mucosal melanoma: epidemiology, clinical features, and treatment[J/OL]. *Curr Oncol Rep*, 2023, 25(11): 1247-1258[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10640506/>. DOI: 10.1007/s11912-023-01453-x.
- [3] CHI Z H, LI S M, SHENG X N, *et al.* Clinical presentation, histology, and prognoses of malignant melanoma in ethnic Chinese: a study of 522 consecutive cases[J/OL]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 85[2024-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056833/>. DOI: 10.1186/1471-2407-11-85.
- [4] RIZZETTO G, SIMONI E D, MOLINELLI E, *et al.* Efficacy of pembrolizumab in advanced melanoma: a narrative review[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12383[2024-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10419154/>. DOI: 10.3390/ijms241512383.
- [5] YDE S S, SJOEGREN P, HEJE M, *et al.* Mucosal melanoma: a literature review[J]. *Curr Oncol Rep*, 2018, 20(3): 28. DOI: 10.1007/s11912-018-0675-0.

- [6] HAMID O, ROBERT C, DAUD A, *et al.* Long-term outcomes in patients with advanced melanoma who had initial stable disease with pembrolizumab in KEYNOTE-001 and KEYNOTE-006[J/OL]. *Eur J Cancer*, 2021, 157: 391-402[2024-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9350885/>. DOI: 10.1016/j.ejca.2021.08.013.
- [7] WOLCHOK J D, CHIARION-SILENI V, GONZALEZ R, *et al.* Long-term outcomes with nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone *versus* ipilimumab in patients with advanced melanoma[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(2): 127-137[2024-04-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8718224/>. DOI: 10.1200/JCO.21.02229.
- [8] TANG B X, CHI Z H, CHEN Y B, *et al.* Safety, efficacy, and biomarker analysis of toripalimab in previously treated advanced melanoma: results of the POLARIS-01 multicenter phase II trial[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(16): 4250-4259. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3922.
- [9] SI L, ZHANG X S, SHU Y Q, *et al.* A phase Ib study of pembrolizumab as second-line therapy for Chinese patients with advanced or metastatic melanoma (KEYNOTE-151)[J/OL]. *Transl Oncol*, 2019, 12(6): 828-835[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458446/>. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.02.007.
- [10] SI L, ZHANG X S, SHU Y Q, *et al.* Pembrolizumab in Chinese patients with advanced melanoma: 3-year follow-up of the KEYNOTE-151 study[J/OL]. *Front Immunol*, 2022, 13: 882471[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9593700/>. DOI: 10.3389/fimmu.2022.882471.
- [11] LI S M, WU X W, YAN X Q, *et al.* Toripalimab plus axitinib in patients with metastatic mucosal melanoma: 3-year survival update and biomarker analysis[J/OL]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(2): e004036[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9066368/>. DOI: 10.1136/jitc-2021-004036.
- [12] SHENG X N, YAN X Q, CHI Z H, *et al.* Axitinib in combination with toripalimab, a humanized immunoglobulin G4 monoclonal antibody against programmed cell death-1, in patients with metastatic mucosal melanoma: an open-label phase IB trial[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(32): 2987-2999[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6839911/>. DOI: 10.1200/JCO.19.00210.
- [13] MAO L L, FANG M Y, CHEN Y, *et al.* Atezolizumab plus Bevacizumab in Patients with Unresectable or Metastatic Mucosal Melanoma: a Multicenter, Open-Label, Single-Arm Phase II Study [J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(21): 4642-4648. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1528.
- [14] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. *Nat Med*, 2018, 24(5): 541-550. DOI: 10.1038/s41591-018-0014-x.
- [15] 中国医师协会检验医师分会, 北京医师协会医学检验专科医师(技师)分会, 国家癌症中心, 等. 实体肿瘤外周血细胞免疫功能实验室检测专家共识[J]. *中华检验医学杂志*, 2023, 46(12): 1235-1248. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20230719-00016.
- [16] MIZRAHY S, HAZAN-HALEVY I, DAMMES N, *et al.* Current progress in non-viral RNAi-based delivery strategies to lymphocytes[J/OL]. *Mol Ther*, 2017, 25(7): 1491-1500[2024-8-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498814/>. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.001.
- [17] XIA Y, LI W T, LI Y M, *et al.* The clinical value of the changes of peripheral lymphocyte subsets absolute counts in patients with non-small cell lung cancer[J/OL]. *Transl Oncol*, 2020, 13(12): 100849[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7475266/>. DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100849.
- [18] LIU A Q, XIA Y, LI W T, *et al.* The predictive value of changes in the absolute counts of peripheral lymphocyte subsets for progression and prognosis in breast cancer patients[J/OL]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2022, 2022: 3444360[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9410830/>. DOI: 10.1155/2022/3444360.
- [19] ZHANG L Y, CHEN X Y, ZU S J, *et al.* Characteristics of circulating adaptive immune cells in patients with colorectal cancer [J/OL]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 18166[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9616942/>. DOI: 10.1038/s41598-022-23190-0.
- [20] VINERETSKY K A, KARAGAS M R, CHRISTENSEN B C, *et al.* Skin cancer risk is modified by KIR/HLA interactions that influence the activation of natural killer immune cells[J/OL]. *Cancer Res*, 2016, 76(2): 370-376[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4715977/>. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0547.
- [21] SHIMASAKI N, JAIN A, CAMPANA D. NK cells for cancer immunotherapy[J/OL]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(3): 200-218[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/2834435/>. DOI: 10.1038/s41573-019-0052-1.
- [22] LIU S Z, GALAT V, GALAT Y, *et al.* NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development[J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 7[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7788999/>. DOI: 10.1186/s13045-020-01014-w.
- [23] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2): 85-100. DOI: 10.1038/s41571-020-0426-7.
- [24] ALSAAB H O, SAU S, ALZHRANI R, *et al.* PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 561[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572324/>. DOI: 10.3389/fphar.2017.00561.
- [25] TUMEH P C, HARVIEW C L, YEARLEY J H, *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 568-571. DOI: 10.1038/nature13954.
- [26] MAO L L, LIAN B, LI C L, *et al.* Camrelizumab plus apatinib and temozolomide as first-line treatment in patients with advanced acral melanoma: the CAP 03 phase 2 nonrandomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2023, 9(8): 1099-1107. DOI: 10.1001/jamaoncol.2023.1363.
- [27] WANG X, WU X W, YANG Y, *et al.* Apatinib combined with camrelizumab in advanced acral melanoma patients: an open-label, single-arm phase 2 trial[J]. *Eur J Cancer*, 2023, 182: 57-65. DOI: 10.1016/j.ejca.2022.12.027.
- [28] ZHOU L, WU X W, CHI Z H, *et al.* Safety, activity, and

- pharmacokinetics of camrelizumab in advanced Asian melanoma patients: a phase I study[J/OL]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 565 [2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9123656/>. DOI: 10.1186/s12885-022-09663-5.
- [29] 林美西, 臧丹, 陈骏. 中央记忆型T细胞与肿瘤免疫治疗的相关性研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2023, 50(20): 1063-1067. DOI: 10.12354/j.issn.1000-8179.2023.20230627.
- [30] YAMAGUCHI K, MISHIMA K, OHMURA H, *et al.* Activation of central/effector memory T cells and T-helper 1 polarization in malignant melanoma patients treated with anti-programmed death-1 antibody[J/OL]. Cancer Sci, 2018, 109(10): 3032-3042[2024-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6172076/>. DOI: 10.1111/cas.13758.
- [31] TAKEUCHI Y, TANEMURA A, TADA Y, *et al.* Clinical response to PD-1 blockade correlates with a sub-fraction of peripheral central memory CD4⁺ T cells in patients with malignant melanoma[J]. Int Immunol, 2018, 30(1): 13-22. DOI: 10.1093/intimm/dxx073.
- [32] SHANG Q H, YU X Y, SUN Q, *et al.* Polysaccharides regulate Th1/Th2 balance: a new strategy for tumor immunotherapy[J/OL]. Biomedecine Pharmacother, 2024, 170: 115976[2024-8-18]. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115976.
- [33] KURSUNEL M A, ESENDAGLI G. The untold story of IFN- γ in cancer biology[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2016, 31: 73-81. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.005.
- [34] EXLEY M A, FRIEDLANDER P, ALATRAKCHI N, *et al.* Adoptive transfer of invariant NKT cells as immunotherapy for advanced melanoma: a phase I clinical trial[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(14): 3510-3519. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0600.
- [35] SALVAGNO C, CIAMPRICOTTI M, TUIT S, *et al.* Therapeutic targeting of macrophages enhances chemotherapy efficacy by unleashing type I interferon response[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(4): 511-521. DOI: 10.1038/s41556-019-0298-1.
- [36] DANGAJ D, BRUAND M, GRIMM A J, *et al.* Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors[J]. Cancer Cell, 2019, 35(6): 885-900. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.05.004.
- [收稿日期] 2024-08-25 [修回日期] 2024-10-20
[本文编辑] 向正华