

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.009

宫颈鳞癌患者外周血和肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 及相关免疫细胞的变化特点及其临床意义

林雨虹, 周晓燕, 林伟, 王晓贤(福建医科大学附属福州市第一医院 检验科, 福建 福州 350004)

[摘要] **目的:** 探讨 PD-1/PD-L1 通路及相关免疫细胞在宫颈鳞癌(cervical squamous cell cancer, CSCC)发生、发展中的变化特点及其临床意义。**方法:** 收集2018年12月至2020年9月在福州市第一医院接受手术的CSCC患者和健康体检人员的癌组织/宫颈组织和外周血样本,分为健康对照组、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) II级组、CIN III级组和CSCC组,代表CSCC发生、发展进程各阶段,每组50例。ELISA法检测各组人员的外周血血浆中PD-1、PD-L1、叉头状转录因子P3(FOXP3)的表达水平,FCM法检测各组人员外周血PD-1⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}细胞的数量,应用多色荧光组织染色法检测肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)在CSCC组织中的分布特点。**结果:** 随着模拟的CSCC发生和发展,外周血中PD-1、PD-L1和FOXP3的表达呈上升趋势,术后则呈下降趋势。在CSCC患者抗凝全血中,CD4⁺、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}以及PD-1⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low}细胞占淋巴细胞的比例增加。在CSCC组织中可见大量CD4⁺、CD8⁺和FOXP3⁺细胞浸润,其中CD4⁺和FOXP3⁺细胞主要围绕肿瘤细胞聚集区分布、CD8⁺和PD-L1⁺细胞则呈广泛弥漫性分布。**结论:** PD-1、PD-L1、FOXP3和适应性调节性T细胞是促进CSCC发生发展的重要因素,其可作为ESCC免疫治疗的靶点和临床预后的潜在标志物。

[关键词] 宫颈鳞癌;PD-1;PD-L1;FOXP3;适应性调节性T细胞;标志物

[中图分类号] R737.33;R73-3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)04-0332-06

Characteristics and clinical significance of the changes in PD-1/PD-L1 and related immune cells in peripheral blood and tumor tissues of patients with cervical squamous cell cancer

LIN Yuhong, ZHOU Xiaoyan, LIN Wei, WANG Xiaoxian (Department of Clinical Laboratory, Fuzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350004, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the changes in PD-1/PD-L1 pathway and related immune cells in the occurrence and development of cervical squamous cell cancer (CSCC) and their clinical significance. **Methods:** Cervical tissue/cancerous tissue and peripheral blood samples were collected from CSCC patients who underwent surgery and healthy controls who had physical examination at the First Hospital of Fuzhou City from December 2018 to September 2020 and were divided into healthy control group, cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade II group, CIN grade III group, and CSCC group to represent the occurrence and development of CSCC ($n=50$ in each group). The expression levels of PD-1, PD-L1 and forkhead box transcription factor P3 (FOXP3) in the peripheral blood of each group were detected by ELISA, the numbers of PD-1⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells in the peripheral blood of each group were detected by FCM, and the distribution of tumor-invasive lymphocytes (TIL) in CSCC tissues was detected by multicolor fluorescent immunohistochemistry. **Results:** The expression of PD-1, PD-L1 and FOXP3 in peripheral blood tended to increase with the onset and progression of mock CSCC and to decrease after surgery. The proportion of CD4⁺, CD4⁺CD25⁺CD127^{low} and PD-1⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells in lymphocytes increased in the anticoagulated whole blood of CSCC patients. Massive infiltration of CD4⁺, CD8⁺ and FOXP3⁺ cells was observed in CSCC tissues, with CD4⁺ and FOXP3⁺ cells mainly distributed around tumor cells and CD8⁺ and PD-L1⁺ cells widely and diffusely distributed. **Conclusion:** PD-1, PD-L1, FOXP3 and adaptive regulatory T cells are important factors contributing to the development of CSCC, which can be used as potential immunotherapeutic targets and potential prognostic markers for CSCC.

[Key words] cervical squamous cell cancer (CSCC); PD-1; PD-L1; forkhead box transcription factor P3 (FOXP3); adaptive regulatory T cell; marker

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(4): 332-337. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.04.009]

[基金项目] 福建省卫生健康青年科研课题资助项目(No.2019-1-81);福建医科大学启航基金资助项目(No.2018QH1241)

[作者简介] 林雨虹(1990—),女,硕士,主管检验技师,主要从事肿瘤免疫治疗研究工作,E-mail: 1158660294@qq.com

[通信作者] 王晓贤,E-mail: hongzai1226@foxmail.com

2018年5月,WHO呼吁采取全球行动,消除宫颈癌。然而,中国作为全球宫颈癌负担最大的国家之一,距消除它还有很长的路要走^[1]。据报道,2015年中国有近3万人死于宫颈癌,近10万新发病例^[2]。目前,已经明确宫颈鳞癌(cervical squamous cell cancer, CESC)的发生与人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的持续性感染导致宫颈上皮内癌变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)密切相关,尤其是HPV16和HPV18型感染^[3]。早期宫颈癌的治疗一般使用手术和放射治疗,而复发和转移性的宫颈癌患者预后较差,5年生存率仅为17%,治疗选择比较有限,通常采用铂基联合疗法的姑息性手段^[4-5],近年研究发现,免疫检查点抑制剂在治疗晚期宫颈癌中的应用取得了较好的效果^[1,6-7]。PD-1或PD-L1抑制剂的疗效与患者自身肿瘤细胞表达的PD-1和PD-L1的水平相关^[12]。据统计,约35%的CESC表达PD-L1,而提高肿瘤浸润性淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的数量可以补充PD-L1在肿瘤中的表达水平的不足^[5,8-11]。因此,了解PD-1、PD-L1及该通路相关细胞因子在CESC中的表达水平及分布情况,有助于阐明PD-1/PD-L1通路在CESC发生、发展中所发挥的免疫调控机制,同时为PD-1或PD-L1抑制剂在晚期CESC中的使用提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究对象入选标准如下。(1)健康对照组(normal control, NC):①经宫颈及颈管活体组织检查未发现异常;②经其他健康查体项目检查未发现明显的重大临床疾病;③临床及病理资料完整。(2)CIN组:经宫颈及颈管活体组织检查确诊为宫颈CIN,且为Ⅱ级或Ⅲ级。(3)CESC组:经宫颈及颈管活体组织检查确诊为CESC,而且未经放化疗的患者。本实验分组模拟CESC的发生、发展,每组50人。样本均来自2018年12月至2020年9月于福州市第一医院住院或门诊就诊的患者或健康体检人员,研究方案取得受试者或其家属的知情同意并签署知情同意书,且经过福州市第一医院伦理委员会批准(201901001)。

1.2 主要试剂

检测外周血浆PD-1、PD-L1、FOXP3的ELISA试剂盒购自上海酶联生物科技公司,CD4-FITC(RPA-T4)、CD25-APC(BC96)、CD127-PE(A019D5)购自美国BioLegend公司,PD-1-BB700(EH12.1)购自美国BD Horizon公司,多色荧光组织染色试剂盒(NEL811001KT)购自美国Perkin Elmer公司,抗CD4(MAB-0251)、CD8(RWA-0514)的鼠单克隆抗体均购自福州迈新公司,抗PD-1(86163)、PD-L1(13684)、FOXP3(98377)的鼠单克

隆抗体均购自德国CST公司,抗CD25的鼠单克隆抗体(NB600-564SS)购自美国Novus公司。

1.3 ELISA法检测外周血浆中PD-1、PD-L1和FOXP3的水平

ELISA试剂盒检测人血浆中PD-1、PD-L1、FOXP3浓度。将EDTA抗凝的血液标本在室温下放置2 h或4℃放置过夜,1 000×g离心20 min,收集上清液。将样品、标准样品和HRP标记的抗体加入预包被抗体的微孔中,孵育并彻底清洗。酶标检测仪(购自Bio-Rad公司)测量450 nm波长处各孔的光密度(D)值。

1.4 FCM法检测外周血适应性调节性T细胞比例

取外周血100 μL,分别加入CD4-FITC、CD25-APC、CD127-PE、PD-1-BB700抗体溶液各0.5 μL,震荡混匀后处理30 min, PBS洗涤2次,再用200 μL PBS重悬, FCM检测CD4⁺、CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}和CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}PD-1⁺细胞比例,数据采用FlowJo软件分析。

1.5 多色免疫荧光组织染色法检测适应性调节性T细胞在肿瘤组织中的分布

多色免疫荧光组织染色的主要步骤:(1)切片处理,包括组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片、烤片、脱蜡;(2)采用电陶炉加热对切片进行抗原修复15 min;(3)3%的过氧化氢室温处理15 min, PBS冲洗3次;(4)血清封闭后加一抗,4℃湿盒处理过夜(15 h);(5)加酶标二抗37℃处理30 min, PBS冲洗3次;(6)滴加100 μL 1:100稀释的酪酰胺信号放大(tyramine signal amplification, TSA)反应液室温避光反应10 min, PBS冲洗3次;(7)微波修复去除一抗、二抗;(8)循环重复(4)~(7)步骤,直到所有一抗全部加完;(9)滴加DAPI避光染色5 min,对标本进行染核;(10)镜检拍照,将切片在PE Vectra自动化多光谱组织病理定量分析系统上进行图像采集与结果分析。多色荧光免疫染色一抗稀释比例及所标记荧光详见表1。

表1 多色免疫荧光染色的一抗稀释比例及所标记荧光染料

抗体	稀释比	荧光染料
CD4	1:5	Opal 520
PD-L1	1:300	Opal 540
FOXP3	1:500	Opal 570
PD-1	1:500	Opal 620
CD8	1:200	Opal 650
CD25	1:500	Opal 690

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 6.01统计学软件分析,统计学

方法为正态分布检验(D'Agostino-Pearson test), $P>0.10$ 表示数据呈正态分布。采用成组 t 检验、配对 t 检验、单因素参数检验(One-Way ANOVA)、多重比较的参数检验(Tukey's multiple comparisons test)、单因素非参数检验(Kruskal-Wallis test)和多重比较的非参数检验(Dunn's multiple comparisons test)分别对各数据进行统计学处理。 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

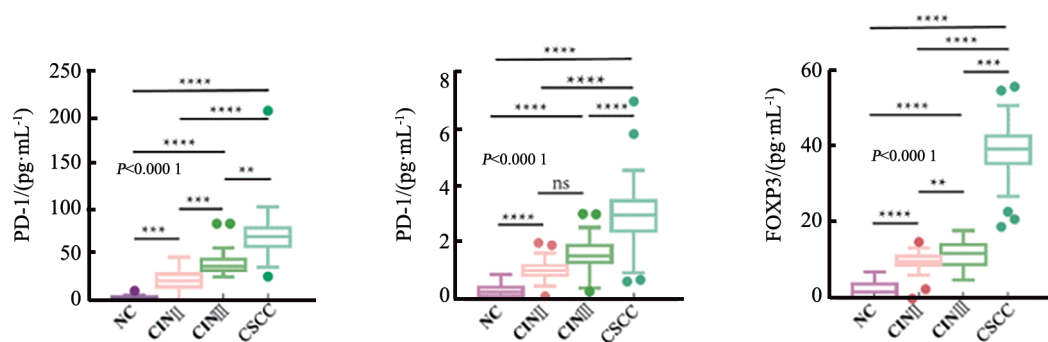
2.1 在模拟CSCC发展进程中患者外周血浆中PD-1、PD-L1及FOXP3蛋白表达增加

ELISA法检测结果(图1)显示,在CSCC发展进程中,3组患者外周血浆中PD-1、PD-L1和FOXP3蛋白表达水平的逐渐增加。首先通过单因素非参数检

验进行变异数分析,结果 $P<0.0001$,说明4组的差异具有统计学意义;同时,采用多重比较的非参数检验进行两两比较,结果显示,除CIN II与CIN III组间PD-L1表达无显著差异($P>0.05$),其他各组比较均具有统计学差异;表明随着疾病的发展,外周血浆中可溶性PD-1、PD-L1和FOXP3蛋白的表达不断上升,尤其是CSCC组中表达量增加最明显。

2.2 手术后CSCC患者外周血浆中PD-1、PD-L1和FOXP3蛋白水平明显下降

随访50名CSCC患者(表2),从治疗前到治疗后的半年时间内,定时监测,收集患者血液样本,通过ELISA法检测外周血浆中可溶性PD-1、PD-L1和FOXP3蛋白水平的变化(图2),结果显示,在治疗后血浆中这些蛋白分子均明显下降,并趋于平缓。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; ns: $P>0.05$

图1 在CSCC发生和发展过程中患者外周血浆中PD-1、PD-L1及FOXP3的表达水平

表2 CSCC随访患者样本信息(N=50)

相关因素	样本 例数 (n)	相关因素	样本 例数 (n)
年龄/岁		KPS评分	
≥55	35	≤70	6
<55	15	>70	44
家族史		性病史	
无	41	无	27
有	9	有	23
病理类型		多性伴侣	
外源型或内生型	28	无	16
溃疡型或颈部型	22	有	34
分化程度		初次性生活年龄<16岁	
低分化	5	否	35
中、高分化	45	是	15
肿瘤直径/cm		初产年龄<18岁	
≥4	33	否	45
<4	17	是	5
FIGO分期		多胎妊娠或多胎分娩	
I~II	26	否	28
III	24	是	22

2.3 在模拟CSCC发展进程中适应性调节性T细胞在患者外周血中的数量增加

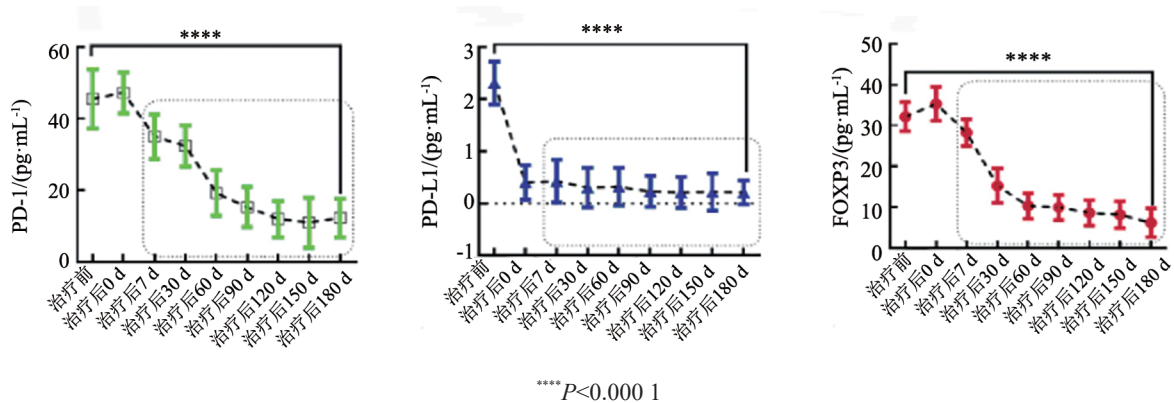
流式检测数据的分析与ELISA结果数据相同。单因素方差统计分析显示,NC、CIN II、CIN III和CSCC组的 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 及 $PD-1^+/(CD4^+CD25^+CD127^{low})$ 细胞比例的组间总体差异均具有统计学意义(均 $P<0.0001$)。同时,在两两比较中(图3),除CIN II组与NC组间 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 细胞比例无显著差异($P>0.05$)外,其余各组间 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 细胞比例均有显著差异($P<0.01$ 或 $P<0.0001$)。FCM分析结果显示,CSCC组的 $CD4^+$ 、 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 及 $PD-1^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 细胞占淋巴细胞比例显著高于其他组。

2.4 PD-1、PD-L1及TIL在CSCC组织中的表达及分布特点

多色免疫荧光组织化学染色结果(图4)显示,PD-1主要表达在TIL表面,而PD-L1则弥漫分布于肿瘤组织中。取每份样本的癌周组织作为对照,分别计算 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+PD-1$ 、 $CD8^+PD-1$ 、 $FOXP3^+PD-1$ 、 $FOXP3^+PD-L1$ 、 $PD-1$ 、 $PD-L1$ 、 $FOXP3^+$

和CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺的细胞数,结果显示,癌组织中的调节性T淋巴细胞(CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺)比例明显高于癌周组织($P<0.0001$);FOXP3阳性的细胞不仅

可表达PD-1还可表达PD-L1;同时发现PD-1在CD8⁺细胞上的表达量明显高于CD4⁺细胞($P<0.0001$)。



随访50位经过手术治疗的宫颈癌患者,分别检测手术前及手术当天,手术后7、30、60、90、120、150、180 d时,外周血浆中PD-1、PD-L1和FOXP3的表达水平;以手术后180 d的检测结果作为节点与术前数据进行配对 t 检验分析

图2 CSCC患者治疗前后血浆中PD-1、PD-L1、FOXP3蛋白水平的变化

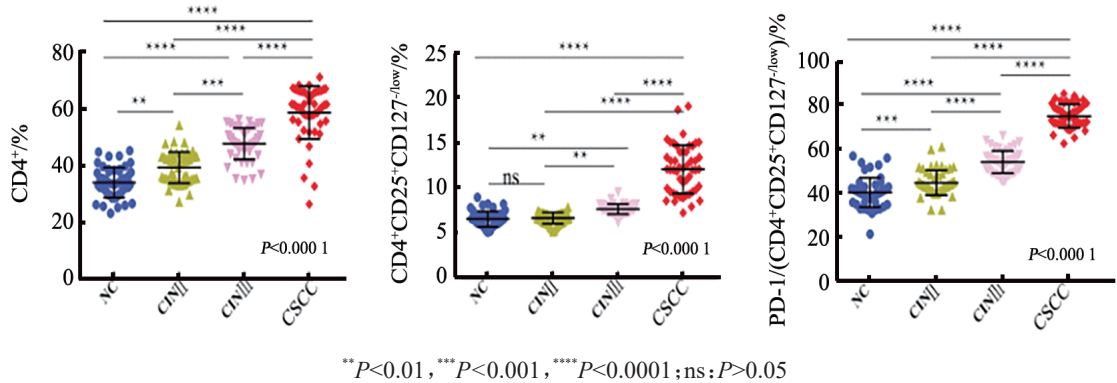
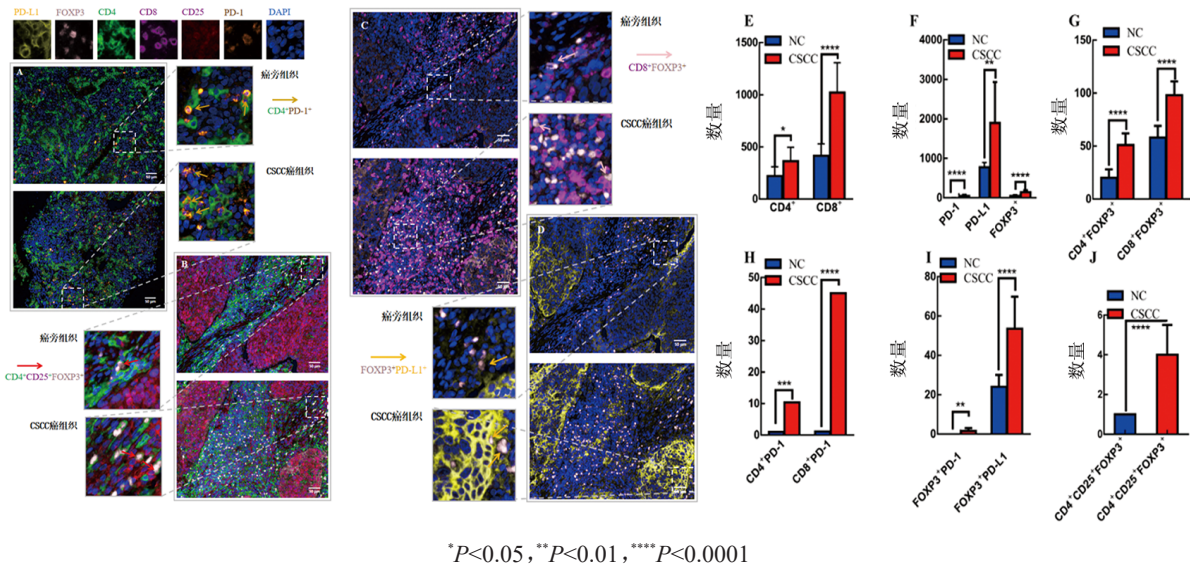


图3 CD4⁺、CD4⁺CD25⁺CD127^{low}及PD-1/(CD4⁺CD25⁺CD127^{low})细胞比例在模拟CSCC发展过程中的变化



A~D:展示部分多色组化染色结果典型样张,使用ImageJ和PE Vectra定量分析系统分别进行图像合并和计数分析;
E~J:细胞亚群组间的成组 t 检验分析结果

图4 PD-1、PD-L1及TIL在CSCC组织中的共表达和分布

3 讨论

PD-1 是免疫负调控分子,可在活化的 T 细胞上表达,通过与其配体(PD-L1/PD-L2)结合来对抗 TCR 和 CD28 的阳性信号,在平衡保护性免疫、免疫病理、稳态和耐受性方面起着至关重要的作用^[7,13]。据报道^[14-15],PD-1 和 PD-L1 在宫颈 T 细胞和树突状细胞上的表达与高危型 HPV 感染有关,并且其表达水平随着宫颈 CIN 分级的增加而增加。阻断 PD-1/PD-L1 通路可以改善 T 细胞功能,减少病毒载量和肿瘤负担^[16]。近年来,免疫治疗的局限性在临床试验中被陆续发现,部分患者在治疗后期出现免疫耐受等情况^[17]。因此,如何筛选适合 PD-1/PD-L1 免疫治疗的肿瘤患者,以及预测在免疫治疗的基础上联合其他靶向治疗的手段是否能起到更好的治疗效果,如已报道的 PD-1 联合 CTLA-4 抑制剂^[18-19],这些都是值得进一步研究和讨论的方向。本研究旨在寻找 PD-1/PD-L1 通路相关细胞因子及其在肿瘤患者中的表达水平。

本研究发现,多色免疫荧光组织染色结果显示 CSCC 组织中存在大量淋巴细胞浸润,如 CD4⁺、CD8⁺ 细胞,同时,可见 FOXP3 阳性细胞,包括 CD4⁺FOXP3⁺、CD8⁺FOXP3⁺ 的调节性 T 淋巴细胞浸润,PD-1、PD-L1 等在癌组织中亦有丰富的表达。其所呈现的细胞分布规律:(1)PD-1 主要表达在浸润的淋巴细胞上;(2)PD-L1 和 CD8⁺ 细胞均为弥散性分布于整个视野,可浸润在肿瘤细胞群中;(3)CD4⁺ 和 FOXP3⁺ 细胞围绕着肿瘤细胞群,只有少量零星分布于肿瘤细胞聚集区域中。在细胞数量上所呈现的特点:(1)CD8⁺PD-1⁺ 细胞比例远高于 CD4⁺PD-1⁺ 细胞,说明 PD-1 在 CSCC 组织中主要表达于 CD8⁺ 细胞;(2)CD8⁺ 细胞比例高于 CD4⁺ 细胞,说明肿瘤浸润性 T 细胞以 CD8⁺ 为主;(3)在本次实验中发现 FOXP3⁺ 细胞可表达 PD-L1,同时,PD-L1⁺FOXP3⁺ 细胞数远高于 PD-1⁺FOXP3⁺ 细胞,推测可能是肿瘤抗原诱导浸润的调节性 T 细胞表达 PD-L1。

综上所述,可以得出结论:(1)CSCC 的发生、发展和 PD-1、PD-L1 以及调节性 T 淋巴细胞的表达有关联;(2)PD-1、PD-L1 以及 FOXP3 可作为治疗 CSCC 潜在的免疫治疗靶点,也可作为诊断和预测术后疗效的潜在标志物。除此之外,已知 CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} 细胞是自然调节的 T 细胞,在流式实验中虽然发现其在 CSCC 组中所占的比例高于 NC 和 CIN 组,但细胞总数不高,这一现象同样出现在 CSCC 组化实验中(CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ 细胞数较少)。故可提出假设:(1)随着 CSCC 的发展可诱导机体产

生更多适应性调节性 T 细胞,如 Tr1 (type 1 regulatory T cell)、Th3 (CD4⁺CD25^{low} regulatory T cell) 细胞,Tr1 细胞分泌 IL-10,可进一步促进 CD8⁺ 调节性 T 细胞增殖,同时分泌 IL-6、IL-10、INF- γ ,又会抑制 CD8⁺ 细胞的免疫功能^[20-22];(2)CD4⁺、CD8⁺ 的 T 细胞均可表达在肿瘤微环境中,以 CD8⁺ 为主的细胞毒性 T 细胞具有直接杀伤肿瘤的能力,但是受到 PD-1 通路的调节使其功能被抑制。TIL 在肿瘤免疫中发挥着重要作用,据报道^[23-24],肿瘤浸润性 CD8⁺ T 细胞被认为是对抗肿瘤的前沿细胞,在肿瘤微环境中,PD-L1 表达阳性和高密度的 CD4⁺、CD8⁺、FOXP3⁺ 的 TIL 相关,FOXP3⁺ T 细胞可抑制 CD8⁺ T 细胞的增殖和激活。本研究结果与之呼应,上述假设将作为本课题组进一步研究的方向。

[参考文献]

- [1] ZHAO F, QIAO Y. Cervical cancer prevention in China: a key to cancer control[J]. *Lancet (Lond)*, 2019, 393(10175):969-970. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)32849-6.
- [2] FENG R, ZONG Y, CAO S, *et al*. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 22. DOI: 10.1186/s40880-019-0368-6.
- [3] HAN S, SHI X, LIU L, *et al*. Roles of B7-H3 in cervical cancer and its prognostic value[J]. *J Cancer*, 2018, 9(15): 2612-2624. DOI: 10.7150/jca.24959.
- [4] HILL E K. Updates in cervical cancer treatment[J]. *Clin Obstet Gynecol*, 2020, 63(1): 3-11. DOI:10.1097/grf.0000000000000507.
- [5] SAGLAM O, CONEJO-GARCIA J. PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in advanced cervical cancer[J]. *Integr Cancer Sci Ther*, 2018, 5(2): 10.15761/ICST.1000272. DOI:10.15761/icst.1000272.
- [6] XIA C, HU S, XU X, *et al*. Projections up to 2100 and a budget optimisation strategy towards cervical cancer elimination in China: a modelling study[J]. *Lancet Public Health*, 2019, 4(9): e462-e72. DOI:10.1016/s2468-2667(19)30162-8.
- [7] MEHDIZADEH S, BAYATIPOOR H, PASHANGZADEH S, *et al*. Immune checkpoints and cancer development: therapeutic implications and future directions[J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 223: 153485. DOI: 10.1016/j.prp.2021.153485.
- [8] YANG W, LU Y P, YANG Y Z, *et al*. Expressions of programmed death (PD)-1 and PD-1 ligand (PD-L1) in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinomas are of prognostic value and associated with human papillomavirus status[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2017, 43(10):1602-1612. DOI:10.1111/jog.13411.
- [9] MENG Y, LIANG H, HU J, *et al*. PD-L1 expression correlates with tumor infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer[J]. *J Cancer*, 2018, 9(16): 2938-2945. doi:10.7150/jca.22532.
- [10] LIU J, CHEN Z, LI Y, *et al*. PD-1/PD-L1 checkpoint inhibitors in tumor immunotherapy[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:731798. DOI: 10.3389/fphar.2021.731798.
- [11] HE J, HUO L, MA J, *et al*. Expression of programmed death ligand 1

- (PD-L1) in posttreatment primary inflammatory breast cancers and clinical implications[J]. *Am J Clin Pathol*, 2018, 149(3): 253-61. DOI:10.1093/ajcp/axx162.
- [12] LIN H, WEI S, HURT E M, *et al*. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1708. DOI: 10.1172/jci120803.
- [13] SHARPE A H, PAUKEN K E. The diverse functions of the PD-1 inhibitory pathway[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(3): 153-167. DOI:10.1038/nri.2017.108.
- [14] ODIASE O, NOAH-VERMILLION L, SIMONE B A, *et al*. The incorporation of immunotherapy and targeted therapy into chemoradiation for cervical cancer: a focused review[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:663749. DOI:10.3389/fonc.2021.663749.
- [15] SANCAKLI USTA C, ALTUN E, AFSAR S, *et al*. Overexpression of programmed cell death ligand 1 in patients with CIN and its correlation with human papillomavirus infection and CIN persistence[J]. *Infect Agent Cancer*, 2020, 15: 47. DOI: 10.1186/s13027-020-00312-9.
- [16] MARRET G, BORCOMAN E, LE TOURNEAU C. Pembrolizumab for the treatment of cervical cancer[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(9): 871-877. DOI:10.1080/14712598.2019.1646721.
- [17] CHEN J, GU P, WU H. Uncovering PD-L1 and CD8(+) TILS expression and clinical implication in cervical squamous cell carcinoma[J]. *Bio Med Res Int*, 2020, 2020: 8164365. DOI:10.1155/2020/8164365.
- [18] CHEN D, MENON H, VERMA V, *et al*. Response and outcomes after anti-CTLA4 versus anti-PD-1 combined with stereotactic body radiation therapy for metastatic non-small cell lung cancer: retrospective analysis of two single-institution prospective trials[J]. *J Immunol Cancer*, 2020, 8(1): e000492. DOI: 10.1136/jitc-2019-000492.
- [19] KALBASI A, RIBAS A. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(1): 25-39. DOI:10.1038/s41577-019-0218-4.
- [20] ZHOU F, CHEN H, LI M, *et al*. The prognostic values of HPV genotypes and tumor PD-L1 expression in patients with HPV-associated endocervical adenocarcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2022, 46(3): 300-308. DOI:10.1097/pas.0000000000001800.
- [21] YADAVA K, MEDINA CO, ISHAK H, *et al*. Natural Tr1-like cells do not confer long-term tolerogenic memory[J]. *eLife*, 2019, 8: e44821 DOI:10.7554/eLife.44821.
- [22] RONCAROLO MG, GREGORI S, BACCHETTA R, *et al*. The biology of T regulatory type 1 cells and their therapeutic application in immune-mediated diseases[J]. *Immunity*, 2018, 49(6): 1004-1019. DOI:10.1016/j.immuni.2018.12.001.
- [23] POLANCZYK MJ, WALKER E, HALEY D, *et al*. Blockade of TGF- β signaling to enhance the antitumor response is accompanied by dysregulation of the functional activity of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) and CD4(+)CD25(-)Foxp3(+) T cells[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 219. DOI:10.1186/s12967-019-1967-3.
- [24] LIANG Y., LU W., ZHANG X, *et al*. Tumor-infiltrating CD8⁺ and FOXP3⁺ lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13(1): 93. DOI:10.1186/s13000-018-0770-4.
- [收稿日期] 2021-12-27 [修回日期] 2022-02-24
[本文编辑] 向正华, 沈志超