

· 临床研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.007

肿瘤相关巨噬细胞及 CD8⁺/CD68⁺细胞比值是影响肺腺癌患者预后的独立危险因素

张洪玉^a, 何娴^a, 沈琼^b, 刘颖婷^b, 陈陆俊^b, 郑晓^b, 王智刚^a(苏州大学附属第三医院 a.老年医学科;b.肿瘤生物诊疗中心,江苏 常州 213003)

[摘要] **目的:**探讨 CD68⁺ 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD8⁺ T细胞、Foxp3⁺ Treg细胞等在肺腺癌(LUAD)组织中浸润分布及其与患者预后的关系。**方法:**收集2004年9月至2009年4月间在苏州大学附属第三医院手术切除的93例LUAD组织及78例癌旁组织,采用组织芯片(TMA)及多重免疫荧光(mIF)技术检测其中的免疫细胞浸润与分布, Wilcoxon秩和检验比较癌与癌旁组织、癌巢与间质中浸润水平的差异, χ^2 检验分析其浸润水平及 CD8⁺/CD68⁺细胞比值与临床病理特征的关系, Kaplan-Meier法和 COX模型分析影响患者OS的潜在危险因素。**结果:**与癌旁组织比较,癌组织中 CD68⁺ TAM、CD8⁺ T细胞、Foxp3⁺ Treg细胞浸润水平均显著增加(均 $P<0.01$),间质 CD68⁺ TAM、CD8⁺ T细胞的浸润水平均显著高于癌巢(均 $P<0.01$)。总 CD68⁺ TAM、癌巢及间质 CD68⁺ TAM浸润水平与淋巴结转移呈正向关联(均 $P<0.05$),癌巢 CD68⁺ TAM浸润水平与T分期呈正向关联($P<0.05$),间质 CD68⁺ TAM浸润水平与病理分级呈正向关联($P<0.05$);癌组织中 CD8⁺/CD68⁺细胞比值与病理分级、淋巴结转移均呈负向关联(均 $P<0.05$)。Kaplan-Meier生存分析显示,LUAD组织中总 CD68⁺ TAM、癌巢及间质 CD68⁺ TAM高浸润患者OS均短于低浸润患者($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、癌组织中 CD8⁺/CD68⁺细胞比值高患者OS显著长于低比值患者($P<0.05$)。多因素COX模型分析示,LUAD患者年龄、TNM分期及癌组织中 CD8⁺/CD68⁺细胞比值是影响患者预后的独立风险因素($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**高度浸润的 CD68⁺ TAM与LUAD的进展、侵袭、转移和不良预后显著关联,而高 CD8⁺/CD68⁺细胞比值是影响LUAD患者OS的独立保护因素。

[关键词] 肺腺癌;肿瘤相关巨噬细胞;T细胞;Treg细胞;CD8⁺/CD68⁺;预后;多重免疫荧光技术

[中图分类号] R734.2;R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)12-1108-07

Tumor-associated macrophages and CD8⁺/CD68⁺ cell ratio are independent risk factors affecting the prognosis of lung adenocarcinoma patients

ZHANG Hongyu^a, HE Xian^a, SHEN Qiong^b, LIU Yingting^b, CHEN Lujun^b, ZHENG Xiao^b, WANG Zhigang^a (a. Department of Geriatrics, b. Department of Tumor Biological Diagnosis and Treatment, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the distribution of CD68⁺ tumor-associated macrophages (TAM), CD8⁺ T cells, Foxp3⁺ Treg cells, and other immune cells infiltrating lung adenocarcinoma (LUAD) tissues and their associations with patient prognosis. **Methods:** Ninety-three cases of LUAD tissues and 78 cases of paraneoplastic tissues surgically resected at the Third Affiliated Hospital of Soochow University between September 2004 and April 2009 were collected. The immune cell infiltration and distribution were detected by tissue microarray (TMA) and multiplex immunofluorescence (mIF) techniques. The Wilcoxon rank sum test was used to compare the differences in infiltration levels between cancer and paraneoplastic tissues, and between cancer nests and interstitial tissues. χ^2 test was employed to analyze the relationship between their infiltration levels, CD8⁺/CD68⁺ cell ratios and clinicopathological features. Kaplan-Meier method and COX model were used to analyze the potential risk factors affecting patients' OS. **Results:** The infiltration levels of CD68⁺ TAM, CD8⁺ T cells, and Foxp3⁺ Treg cells in cancer tissues were significantly higher than those in paraneoplastic tissues (all $P<0.01$) while the infiltration levels of CD68⁺ TAM and CD8⁺ T cells in the interstitial tissues were significantly higher than that in the cancer nests (all $P<0.01$). The levels of total CD68⁺ TAM, cancer nest and interstitial CD68⁺ TAM infiltration were positively correlated with lymph node metastasis (all $P<0.05$); the levels of CD68⁺ TAM infiltration in cancer nests were positively correlated with T stage ($P<0.05$), and the levels of interstitial CD68⁺ TAM infiltration were positively correlated with

[基金项目] 江苏省“六个一”拔尖人才资助项目(No. LGY2020034);常州市卫生拔尖人才资助项目(No. 2016CZBJ018);常州市应用基础研究计划资助项目(No. CJ20210089);常州市国际合作资助项目(No. CZ20210035)

[作者简介] 张洪玉(1983—),女,硕士生,主治医师,主要从事肿瘤免疫治疗研究,E-mail: hongyuzhang2020@163.com

[通信作者] 王智刚,E-mail: 1410456717@qq.com

pathological grading ($P<0.05$); the CD8⁺/CD68⁺ cell ratio in cancer tissues was negatively correlated with pathological grading and lymph node metastasis (all $P<0.05$). Kaplan-Meier survival analysis showed that the OS of patients with high infiltration of total CD68⁺ TAM, cancer nests and interstitial CD68⁺ TAM in LUAD tissues was shorter than that of patients with low infiltration ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the OS of patients with high CD8⁺/CD68⁺ cell ratio in cancer tissues was significantly longer than that of patients with low ratio ($P<0.05$). Multivariate COX model analysis showed that age, TNM stage and CD8⁺/CD68⁺ cell ratio in cancer tissues were independent risk factors for the prognosis of LUAD patients ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** Highly infiltrative CD68⁺ TAM was significantly associated with the progression, invasion, metastasis and poor prognosis of LUAD, and a high CD8⁺/CD68⁺ cell ratio was an independent protective factor for the OS of patients with LUAD.

[Key words] lung adenocarcinoma (LUAD); tumor-associated macrophages (TAM); T cells; Treg cells; CD8⁺/CD68⁺; prognosis; multiplex immunofluorescence technique

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(12): 1108-1114. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.007]

肺癌是目前全球发病率第二,也是癌症死亡的主要原因^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)约占原发性肺癌的85%,主要组织学类型为腺癌和鳞状细胞癌,肺腺癌(lung adenocarcinoma, LUAD)又是最常见的肺癌形式,占有肺癌病例的30%和NSCLC的40%。近年来随着对肺癌生物学认识的提高,促进了针对驱动癌基因阳性和PD-L1高表达者的靶向和免疫治疗的发展,显著提高了患者的OS,然而由于原发或获得性耐药导致生存获益仅限于小部分患者^[2-3]。因此,亟需开发新的免疫治疗生物标志物。肿瘤微环境(TME)由肿瘤细胞、免疫细胞、细胞外基质等构成,影响着肿瘤的发生发展、转移和治疗耐受性,是肿瘤发生发展和预后的关键因素^[4]。特别是TME中浸润的免疫细胞决定着宿主的肿瘤免疫和对治疗的反应。本研究利用多重免疫荧光(multiplexed immunofluorescence, mIF)技术检测LUAD组织中CD68⁺肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞的浸润分布,评估其与患者临床病理特征及预后的关系,旨在为LUAD患者探寻预后预测指标及免疫治疗靶点提供临床分析资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料、组织标本和主要试剂

人LUAD组织芯片(tissue microarray, TMA)购自上海芯超生物科技有限公司,其含98例LUAD组织和82例癌旁组织,所有被取材的患者术前均未接受放、化疗或其他抗肿瘤辅助治疗,经病理诊断为LUAD;收集患者的性别、年龄、肿瘤大小、T分期、病理分级、淋巴结转移及按AJCC第7版标准行TNM分期等临床病理资料。患者年龄范围为20~84岁,手术时间2004年9月至2009年4月,随访时间截止至2012年7月,去除失访和组织芯点等数据不完整病例,共有93例癌组织及78例癌旁组织纳入研究。

Opal 5色荧光IHC试剂盒购自美国Perkin-Elmer公司,鼠源CK(PA125)、CD8(PA06)、Foxp3(PA48)一

抗均购自苏州百道医疗公司,HRP标记抗小鼠二抗、鼠源CD68一抗(M0876)购自Dako公司。TissueFAXS系统、StrataQuest分析软件购自奥地利TissueGnostics公司。

1.2 mIF技术检测LUAD组织及癌旁组织中CD8⁺、CD68⁺、Foxp3⁺细胞的分布

用Opal 5色荧光IHC试剂盒,结合荧光自动定量分析仪进行mIF,评估CD8⁺、CD68⁺、Foxp3⁺细胞在LUAD组织中的分布。用细胞角蛋白(cytokeratin, CK)抗体标记上皮性肿瘤细胞,4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)标记细胞核。TMA依次在二甲苯和梯度乙醇中脱蜡和水化,柠檬酸溶液(pH=6.0)中抗原修复后在一抗中室温下处理2 h[鼠源CK(稀释比例1:4)、CD8(即用型)、Foxp3(稀释比例1:1)、CD68(稀释比例1:500)],HRP标记抗小鼠二抗室温下处理1 h,把上述处理好的TMA置于Opal工作液中处理10 min,滴加DAPI工作液处理10 min,抗荧光淬灭封片剂封片。

1.3 mIF图像采集和定量分析免疫细胞的浸润分布

使用TissueFAXS系统对mIF染色的LUAD TMA进行全景组织细胞多光谱扫描获取多光谱图像,StrataQuest软件对采集的图像进行分析处理,其中每种荧光被光谱分解成单独的通道,以获得精准的阳性染色细胞的定量分析。CD8⁺T细胞浸润数量的截点值以中位值表示,其余指标的截点值由R survminer软件包分析算出,然后将患者分为高和低浸润两组。

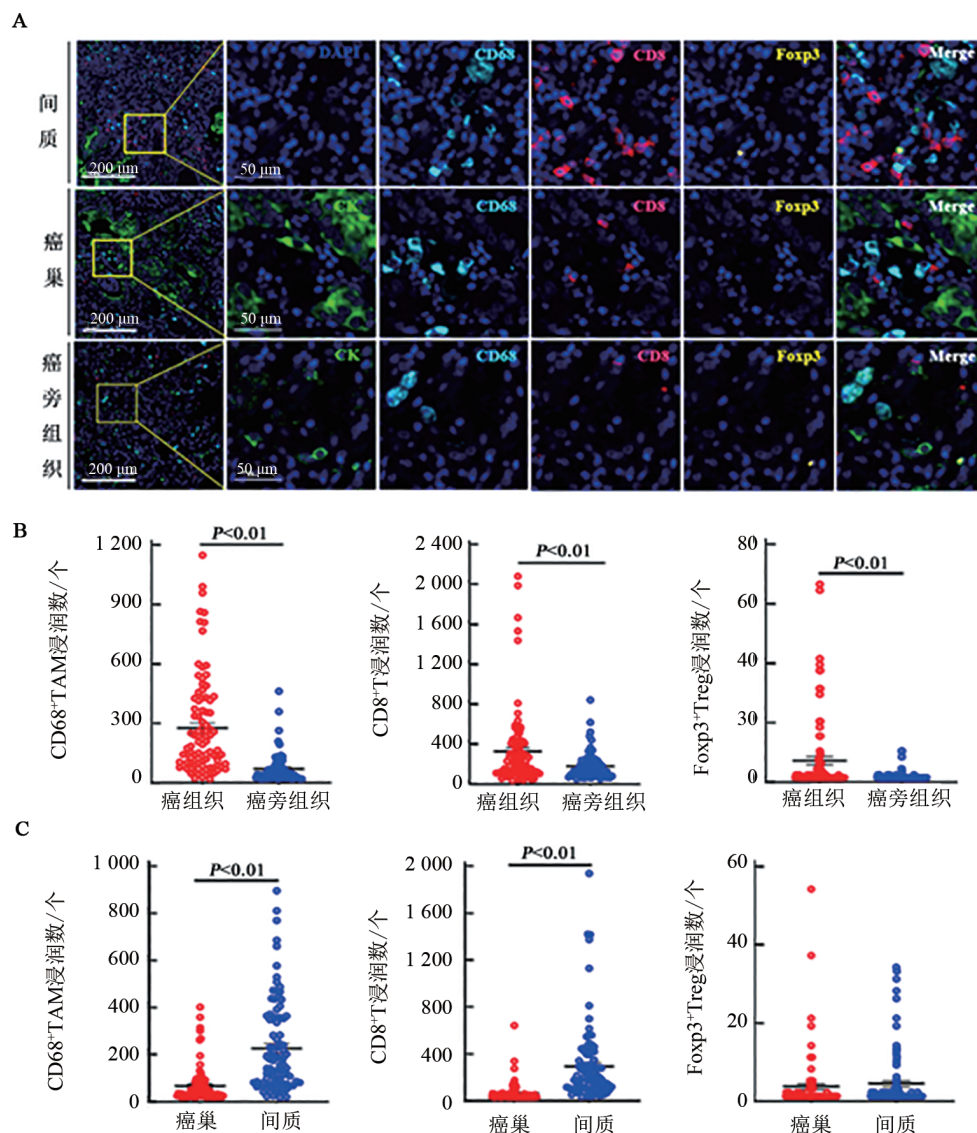
1.4 统计学处理

采用R软件(3.6.1版本)对实验数据进行统计分析,用GraphPad Prism 9.0软件绘图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间差异比较采用独立样本 t 检验;非正态分布的计量资料用 $M(Q)$ 表示,采用Wilcoxon秩和检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验;使用Kaplan-Meier法及Log-Rank检验进行生存分析,COX比例风险回归模型进行多因素的危险因素分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫细胞在LUAD组织及癌旁组织中的浸润分布
mIF 染色分析结果(图1A)显示,CD68和CD8染色主要位于细胞质和细胞膜,Foxp3染色位于细胞核。癌组织中CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞浸润水平均

显著高于癌旁组织(图1B,均 $P<0.01$);Foxp3⁺Treg细胞的总体浸润水平较低且分散,但癌组织浸润水平仍显著高于癌旁组织(图1B, $P<0.01$)。CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞在间质浸润均显著高于癌巢(图1C,均 $P<0.01$);癌巢和间质内Foxp3⁺Treg细胞的浸润水平差异比较无统计学意义(图1C)。



A:LUAD组织的mIF染色图像,左侧第一行为组织芯点的多光谱图像,向右依次显示黄色框放大后光谱拆分的单个标记及合并(merge)图像,各染色目标的显色:DAPI为深蓝色、CK为绿色、CD68为浅蓝色、CD8为红色、Foxp3为黄色,CK⁺区域定义为间质、CK⁻区域定义为癌巢;B:CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞在癌组织和癌旁组织的浸润数据统计图;C:CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞在癌巢和间质中的浸润数据统计图

图1 mIF技术检测LUAD组织和癌旁组织中CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞的浸润情况

2.2 LUAD组织中免疫细胞浸润数量与患者临床病理特征的关系

免疫细胞与临床病理特征关系的分析结果显示,癌巢、间质及总CD68⁺TAM的浸润水平均与淋巴结转移呈正向关联(均 $P<0.05$),癌巢中CD68⁺TAM浸润水平与T分期呈正向关联($P<0.05$),间质中

CD68⁺TAM浸润水平与病理分级呈正向关联($P<0.05$)(表1);CD8⁺T细胞和Foxp3⁺Treg细胞的浸润水平与临床病理特征无显著关联。另外,LUAD组织中CD8⁺/CD68⁺细胞比值与病理分级($P<0.05$)、淋巴结转移($P<0.05$)呈负向关联(表2)。

表1 CD68⁺TAM浸润数量与患者临床病理特征的关系(n)

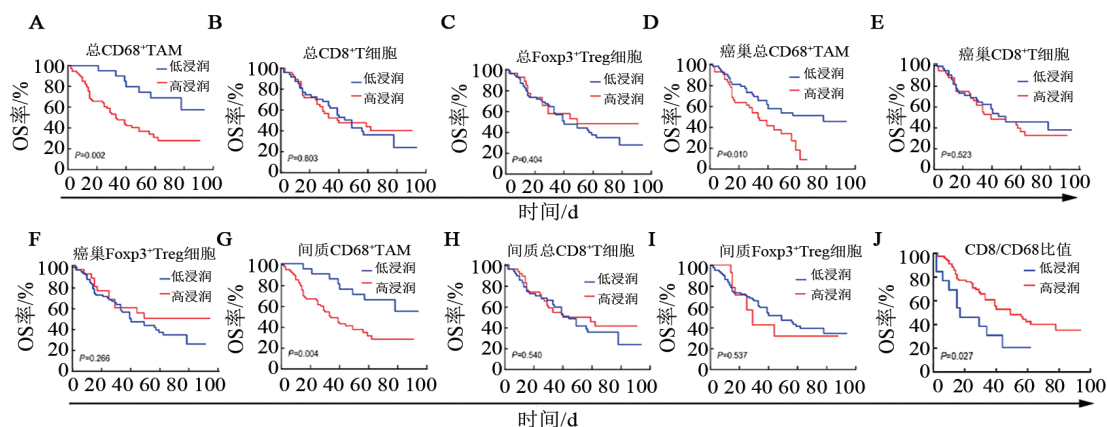
临床病理特征	例数 (N)	总CD68 ⁺ TAM				癌巢CD68 ⁺ TAM				间质CD68 ⁺ TAM			
		低	高	χ^2	P	低	高	χ^2	P	低	高	χ^2	P
性别													
男	56	12	44	0.0005	0.982	32	24	0.086	0.769	13	43	0.032	0.857
女	37	8	29			20	17			8	29		
年龄/岁													
≤71	77	17	60	0.002	0.969	44	33	0.274	0.601	18	59	0.006	0.941
>71	16	3	13			8	8			3	13		
肿瘤直径/cm													
≤6.0	81	18	63	0.004	0.952	46	35	0.196	0.659	18	63	0.024	0.877
>6.0	12	2	10			6	6			3	9		
TNM分期													
I~II	52	14	38	2.051	0.152	32	20	1.514	0.219	14	38	1.272	0.259
III~IV	41	6	35			20	21			7	34		
T分期													
I~II	70	18	52	2.048	0.152	44	26	5.535	0.019	19	51	3.370	0.066
III~IV	23	2	21			8	15			2	21		
病理分级													
I~II	57	13	44	0.148	0.701	35	22	1.800	0.180	40	17	4.903	0.027
III	36	7	29			17	19			9	12		
淋巴结转移													
否	56	17	39	5.282	0.022	36	20	4.002	0.045	17	39	4.869	0.027
是	37	3	34			16	21			4	33		

表2 CD8⁺/CD68⁺细胞比值与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	例数 (N)	CD8 ⁺ /CD68 ⁺ 细胞比值			
		低	高	χ^2	P
性别					
男	56	8	48	0.011	0.916
女	37	5	32		
年龄/岁					
≤71	77	12	65	0.341	0.600
>71	16	1	15		
肿瘤直径/cm					
≤6.0	81	11	70	0.025	0.874
>6.0	12	2	10		
TNM分期					
I~II	52	5	47	1.867	0.172
III~IV	41	8	33		
T分期					
T1~T2	70	7	63	2.508	0.113
T3~T4	23	6	17		
病理分级					
I~II	57	4	53	5.934	0.015
III	36	9	27		
淋巴结转移					
否	56	4	52	5.470	0.019
是	37	9	28		

2.3 免疫细胞浸润水平对LUAD患者预后的影响

Kaplan-Meier生存分析显示,LUAD组织中总CD68⁺TAM高浸润患者的OS显著短于低浸润患者(截点值=62, $P<0.01$;图2A),总CD8⁺T细胞、总Foxp3⁺Treg细胞高浸润患者与低浸润患者OS无显著差异(图2B、C)。癌巢CD68⁺TAM高浸润患者OS显著短于低浸润患者(截点值=29, $P<0.05$;图2D),癌巢CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞高浸润患者与低浸润患者OS无显著差异(图2E、F)。间质CD68⁺TAM高浸润患者OS显著短于低浸润患者(截点值=53, $P<0.01$;图2G),间质CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞高浸润患者与低浸润患者OS无显著差异(图2H、I)。LUAD癌组织中CD8⁺/CD68⁺细胞比值高的患者OS显著长于低比值患者(截点值=0.23, $P<0.05$;图2J)。单因素COX模型分析显示,LUAD患者年龄($P<0.05$)、肿瘤大小($P<0.01$)、TNM分期($P<0.01$)、T分期($P<0.05$)、淋巴结转移($P<0.01$)均与患者较差的OS相关联(表3);多因素COX模型分析显示,LUAD患者的年龄($P<0.05$)、TNM分期($P<0.01$),以及癌组织中CD8⁺/CD68⁺细胞比值($P<0.05$)(表3)是影响患者预后的危险因素,因而成为患者预后评估的独立指标,而浸润性免疫细胞不具有独立预测因子的价值。



A~C: 癌组织中总的CD68⁺TAM(A)、CD8⁺T细胞(B)、Foxp3⁺Treg细胞(C)浸润程度与患者OS的关系; D~F: 癌巢中CD68⁺TAM(D)、CD8⁺T细胞(E)、Foxp3⁺Treg细胞(F)浸润程度与患者OS的关系; G~I: 间质CD68⁺TAM(G)、CD8⁺T细胞(H)、Foxp3⁺Treg细胞(I)浸润程度与患者OS的关系; J: 癌组织中CD8⁺/CD68⁺细胞比值与患者OS的关系

图2 癌组织不同区域免疫细胞的浸润水平对LUAD患者OS的影响

表3 COX模型多因素分析影响患者预后的危险因素

临床病理特征	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
性别(男 vs 女)	1.072(0.622~1.849)	0.801	1.315(0.710~2.437)	0.384
年龄(>71岁 vs ≤71岁)	1.886(1.023~3.475)	0.042	2.091(1.086~4.386)	0.035
肿瘤直径(>6.0 cm vs ≤6.0 cm)	2.797(1.399~5.588)	0.004	1.923(0.828~4.470)	0.129
TNM分期(III~IV vs I~II)	4.497(2.507~8.069)	<0.001	4.066(2.018~8.193)	<0.001
T分期(T3~T4 vs T1~T2)	2.118(1.185~3.786)	0.011	0.758(0.355~1.620)	0.475
病理分级(III vs I+II)	1.086(0.630~1.873)	0.767	0.979(0.515~1.860)	0.948
淋巴结转移(是 vs 否)	2.742(1.599~4.703)	<0.001	1.231(0.630~2.404)	0.543
CD8 ⁺ /CD68 ⁺ 细胞比值(高 vs 低)	0.475(0.193~1.168)	0.027	0.454(0.212~0.972)	0.042

3 讨论

肺癌病死率高是由于大多数患者在确诊时已出现转移,失去最佳的手术时机所造成。虽然放化疗技术有所进步,但5年OS率仍然很低。针对NSCLC特别是LUAD的EGFR、ALK和ROS1等驱动基因敏感突变患者的靶向治疗,明显延长了患者的OS,但由于新的突变导致耐药从而使疗效降低^[5]。目前NSCLC的治疗已进入以ICI为代表的新型免疫治疗时代,主要分为PD-1/PD-L1和CTLA-4抑制剂,它们通过激活免疫系统、恢复CTL对肿瘤细胞的杀伤功能而获得良好疗效^[6]。PD-1/PD-L1抑制剂纳武利尤单抗、派姆单抗和阿替利珠单抗已用于晚期NSCLC的二线治疗,且ORR已达14%~20%^[2]。派姆单抗还被批准用于PD-L1高表达(肿瘤细胞阳性比例评分TPS≥50%)的晚期NSCLC一线治疗,这部分高度选择的患者群占晚期NSCLC的约30%^[7];无论作为单药治疗,还是联合治疗都能显著改善晚期NSCLC患者的生存质量^[8-9]。因此,寻找有效的预测生物标志物,对筛选免疫治疗优势人群具有重要意义。除了

PD-L1表达水平、肿瘤突变负荷外,T细胞炎症基因表达谱、错配修复基因、体细胞突变状态、肠道微生物等都具有一定的预测作用,但也存在一定的局限性^[10]。

TME影响肿瘤的发生发展,其相关指标可作为肺癌预后及预测标志物^[11]。由Treg细胞、髓源性抑制细胞、M2巨噬细胞等免疫细胞构成免疫抑制性TME,以及由癌细胞和癌症相关成纤维细胞表达的腺苷受体、CD73进一步抑制TIL和促进Treg细胞的功能,导致肿瘤细胞免疫逃逸,同时也是介导免疫治疗耐药的细胞分子机制,与患者不良预后相关;活化效应免疫细胞如TIL、DC和NK细胞及三级淋巴结构构成的免疫原性TME,可增强免疫治疗的敏感性^[3]。

本课题利用TMA和mIF技术,定量分析了LUAD组织中主要免疫细胞浸润水平来评估LUAD TME的免疫状态,发现癌组织中CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞、Foxp3⁺Treg细胞浸润水平均显著高于癌旁组织,间质CD68⁺TAM、CD8⁺T细胞的浸润水平显著高于癌巢。

TME中免疫细胞浸润数量和功能状态与疾病的

预后密切相关。TAM可促进血管生成、侵袭转移、免疫抑制,与多种类型癌症不良预后相关^[12-13]。研究^[14]表明,CD68⁺TAM在不同肿瘤或同一肿瘤不同区域功能不尽相同。本研究显示,癌巢中CD68⁺TAM浸润程度与T分期呈正相关,间质CD68⁺TAM浸润程度与病理分级呈正相关,且癌巢、间质中CD68⁺TAM的高度浸润均与LUAD患者的淋巴结转移及较短的OS显著相关,表明其促进LUAD发生发展、侵袭和转移的作用。一项荟萃分析^[15]显示,间质CD68⁺TAM和M2巨噬细胞高度浸润与肺癌患者较短的OS相关,而癌巢中CD68⁺TAM和M1巨噬细胞高度浸润与肺癌患者较长的OS相关,表明TAM的瘤内分布和亚群是影响预后的重要因素。本研究中CD68为泛巨噬细胞标志物,M1和M2巨噬细胞之间的平衡值得进一步研究。值得注意的是,最近LIU等^[16]研究发现,NSCLC组织中表达PD-L1的主要免疫细胞类型是CD68⁺TAM,且表达水平与接受抗PD-1轴治疗患者较长OS相关。因此未来需要更多的临床研究评估高度浸润的CD68⁺TAM及其PD-L1表达水平对预测ICI疗效的价值。

肿瘤浸润CD8⁺T细胞一般与癌症患者较好预后相关^[17],但也有报道CD8⁺T细胞与肾癌患者较短OS相关^[4]。本研究证实了NSCLC患者OS与CD8⁺T细胞浸润数量无关,而与CD8⁺T细胞的功能表型相关^[18]。虽然CD8⁺T细胞数量不能预测LUAD患者的OS,但癌组织中高CD8⁺/CD68⁺细胞比值与较好的病理分级和较少的淋巴结转移相关,且较高比值患者具有更长的OS,并可能是影响预后的独立因素,符合CD8⁺T细胞联合CD68⁺TAM预测食管癌和肝癌患者术后预后的作用^[19-20],提示巨噬细胞在抑制T细胞活性方面发挥作用。这也反映了在多种类型癌症中免疫标志物的组合^[18,21]以及基于原位浸润免疫细胞的新型免疫评分系统^[22-23],能更好地评估TME的免疫功能状态、癌症患者预后及治疗反应。目前类似的免疫评分已在结肠癌患者中得到证实,并补充和完善了TNM分期的作用^[24-25]。因此,CD8⁺/CD68⁺细胞比值测定将可能有助于LUAD预后评估及免疫治疗决策。

Treg细胞在维持组织稳态及自身耐受中发挥重要作用,而TME中的Treg细胞通过多种抑制方式促进肿瘤免疫逃逸,与多种癌症的不良预后有关,包括NSCLC,但结肠癌例外^[26]。据统计分析,用整体组织切片研究表明,Treg细胞与较低OS显著相关,而使用TMA的分析显示Treg细胞与OS无显著相关性^[27]。本研究中Treg细胞与LUAD的临床病理参数及OS均无相关性,癌组织Treg细胞浸润水平较低,但仍显著高于癌旁组织,提示Treg细胞在LUAD发

生发展中具有一定的作用,值得进一步探究。

总之,本研究发现CD68⁺TAM与CD8⁺T细胞是LUAD患者预后的免疫决定因素。高度浸润的CD68⁺TAM与LUAD较短OS相关,而高CD8⁺/CD68⁺细胞比值患者较低比值患者具有更长的OS,且可作为LUAD患者预后的独立保护因素,从而可能为LUAD患者的预后提供潜在的标志物。但今后需要进一步探索如何利用TME的相关数据使用于LUAD患者术后个体化治疗,特别是免疫治疗的精准决策。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] HERBST R S, MORGENZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454. DOI:10.1038/nature25183.
- [3] HORVATH L, THIENPONT B, ZHAO L Y, *et al.* Overcoming immunotherapy resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC) - novel approaches and future outlook[J/OL]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 141[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32917214/>. DOI:10.1186/s12943-020-01260-z.
- [4] GIRALDO N A, SANCHEZ-SALAS R, PESKE J D, *et al.* The clinical role of the TME in solid cancer[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 45-53. DOI:10.1038/s41416-018-0327-z.
- [5] ROTOW J, BIVONA T G. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(11): 637-658. DOI:10.1038/nrc.2017.84.
- [6] BREIMER L H, NOUSIOS P, OLSSON L, *et al.* Immune checkpoint inhibitors of the PD-1/PD-L1-axis in non-small cell lung cancer: promise, controversies and ambiguities in the novel treatment paradigm[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2020, 80(5): 360-369. DOI:10.1080/00365513.2020.1742369.
- [7] RECK M, RODRÍGUEZ-ABREU D, ROBINSON A G, *et al.* Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1823-1833. DOI:10.1056/NEJMoa1606774.
- [8] ANTONIA S J, VILLEGAS A, DANIEL D, *et al.* Overall survival with durvalumab after chemoradiotherapy in stage III NSCLC[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(24): 2342-2350. DOI:10.1056/NEJMoa1809697.
- [9] HELLMANN M D, PAZ-ARES L, CARO R B, *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(21): 2020-2031. DOI:10.1056/NEJMoa1910231. Moa1910231
- [10] 张静涛,徐飞. 评估免疫检查点抑制剂治疗非小细胞肺癌预后的生物标志物[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(5): 489-496. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.05.015.
- [11] ALTORKI N K, MARKOVITZ G J, GAO D, *et al.* The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19(1): 9-31. DOI: 10.1038/s41568-018-0081-9.

- [12] ZHU S, YI M, WU Y, *et al.* Roles of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications on therapeutic strategies[J/OL]. *Exp Hematol Oncol*, 2021, 10(1): 60[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34965886/>. DOI:10.1186/s40164-021-00252-z.
- [13] 徐斌, 陈陆俊, 邓海峰, 等. CD57⁺自然杀伤细胞及CD68⁺巨噬细胞浸润密度对食管癌患者预后的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(4): 1117-1121. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.04.076.
- [14] YANG M, MCKAY D, POLLARD J W, *et al.* Diverse functions of macrophages in different tumor microenvironments[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(19): 5492-5503. DOI:10.1158/0008-5472.Can-18-1367.
- [15] WU P, WU D, ZHAO L, *et al.* Inverse role of distinct subsets and distribution of macrophage in lung cancer prognosis: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40451-40460. DOI: 10.18632/oncotarget.9625.
- [16] LIU J Y, ZUGAZAGOITIA J, AHMED F S, *et al.* Immune cell PD-L1 colocalizes with macrophages and is associated with outcome in PD-1 pathway blockade therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(4): 970-977. DOI:10.1158/1078-0432.Ccr-19-1040.
- [17] HAN J, KHATWANI N, SEARLES T G, *et al.* Memory CD8⁺ T cell responses to cancer[J/OL]. *Semin Immunol*, 2020, 49: 101435 [2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33272898/>. DOI: 10.1016/j.smim.2020.101435.
- [18] FEDERICO L, MCGRIL D J, BENTEBIBEL S E, *et al.* Distinct tumor-infiltrating lymphocyte landscapes are associated with clinical outcomes in localized non-small-cell lung cancer[J]. *Ann Oncol*, 2022, 33(1): 42-56. DOI:10.1016/j.annonc.2021.09.021.
- [19] ZHU Y, LI M, BO C, *et al.* Prognostic significance of the lymphocyte-to-monocyte ratio and the tumor-infiltrating lymphocyte to tumor-associated macrophage ratio in patients with stage T3N0M0 esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(3): 343-354. DOI:10.1007/s00262-016-1931-5.
- [20] XIN H, LIANG D, ZHANG M, *et al.* The CD68⁺ macrophages to CD8⁺ T-cell ratio is associated with clinical outcomes in hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma[J]. *HPB (Oxford)*, 2021, 23(7): 1061-1071. DOI:10.1016/j.hpb.2020.11.002.
- [21] INO Y, YAMAZAKI-ITOH R, SHIMADA K, *et al.* Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(4): 914-923. DOI: 10.1038/bjc.2013.32.
- [22] GAO J, REN Y, GUO H, *et al.* A new method for predicting survival in stage I non-small cell lung cancer patients: nomogram based on macrophage immunoscore, TNM stage and lymphocyte-to-monocyte ratio[J/OL]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(7): 470[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32395514/>. DOI: 10.21037/atm.2020.03.113.
- [23] CHEN Y P, WANG Y Q, LV J W, *et al.* Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 68-75. DOI: 10.1093/annonc/mdy470.
- [24] PAGES F, MLECNIK B, MARLIOT F, *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study[J]. *Lancet*, 2018, 391(10135): 2128-2139. DOI:10.1016/s0140-6736(18)30789-x.
- [25] PAGES F, ANDRE T, TAIEB J, *et al.* Prognostic and predictive value of the immunoscore in stage III colon cancer patients treated with oxaliplatin in the prospective IDEA France PRODIGE-GERCOR cohort study[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(7): 921-929. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.03.310.
- [26] GLASNER A, PLITAS G. Tumor resident regulatory T cells[J/OL]. *Semin Immunol*, 2021, 52: 101476[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33906820/>. DOI:10.1016/j.smim.2021.101476.
- [27] SHANG B, LIU Y, JIANG S J, *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15179[2022-09-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462617/>. DOI: 10.1038/srep15179.

[收稿日期] 2022-08-16

[修回日期] 2022-11-06

[本文编辑] 向正华, 沈志超