

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.15.010

宫颈癌淋巴结转移患者 PD-L1 与 TILs 表达水平 及其与预后的关系*

刘 堃^{1,2}, 卢善明³, 郑志坚⁴, 姚运红^{1△}, 郑少秋², 刘清华², 谢寿城²

1. 广东医科大学基础医学院病理学系, 广东东莞 523808; 2. 广东省梅州市人民医院病理科, 广东梅州 514031; 3. 广东省深圳市龙岗中心医院病理科, 广东深圳 518116; 4. 广东省梅州市人民医院盆腔放疗科, 广东梅州 514031

摘要:目的 探讨宫颈癌淋巴结转移患者程序性死亡配体-1(PD-L1)、肿瘤浸润淋巴细胞亚群(TILs)表达水平及其与患者预后的关系。方法 选取 2007 年 1 月至 2013 年 9 月在梅州市人民医院诊治并接受宫颈癌根治性切除术后发生淋巴结转移的 101 例患者作为研究对象。采用免疫组织化学法检测 PD-L1、CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、叉头翼螺旋转录因子 3(Foxp3)⁺TILs 表达水平。比较不同 PD-L1 表达水平患者临床病理特征差异;采用 Spearman 相关对 PD-L1 表达水平与 TILs 密度的相关性进行分析;采用 Kaplan-Meier 生存分析法分析 PD-L1 表达水平、TILs 密度及密度比值与累计生存率的关系;采用 Cox 比例风险模型分析患者预后的独立影响因素。结果 PD-L1 表达于肿瘤细胞的细胞质和(或)细胞膜,阳性表达率为 34.65%(35/101);CD4⁺TILs 计数为 94(45,190);CD8⁺TILs 计数为 63(31,117);FoxP3⁺TILs 计数为 6.0(2.5,13.5);FoxP3⁺TILs/CD8⁺TILs 比值为 0.109(0.036,0.193)。PD-L1 阳性表达组与 PD-L1 阴性表达组 CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、FoxP3⁺TILs 密度比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。PD-L1 表达情况与 CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、FoxP3⁺TILs 密度均呈正相关($r=0.305,0.222,0.222,P=0.002,0.026,0.026$)。生存组与死亡组 CD4⁺TILs 密度、CD8⁺TILs 密度和 PD-L1 表达情况比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。手术年龄 <50 岁、PD-L1 阳性表达、CD4⁺TILs 高密度、CD8⁺TILs 高密度、FoxP3⁺TILs/CD8⁺TILs 低比值患者累计生存率均高于手术年龄 ≥ 50 岁、PD-L1 阴性表达、CD4⁺TILs 低密度、CD8⁺TILs 低密度、FoxP3⁺TILs/CD8⁺TILs 高比值患者,差异均有统计学意义($P<0.05$)。多因素 Cox 回归分析结果显示,PD-L1 阳性表达、CD8⁺TILs 高密度是患者预后的独立保护因素($P<0.05$)。结论 PD-L1、CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、FoxP3⁺TILs/CD8⁺TILs 比值与宫颈癌淋巴结转移患者预后均有关,其中 PD-L1 阳性表达、CD8⁺TILs 高密度是宫颈癌淋巴结转移患者预后的独立保护因素。

关键词: 宫颈癌; 淋巴结转移; 程序性死亡配体-1; 叉头翼螺旋转录因子 3; 肿瘤浸润淋巴细胞; 预后
中图分类号: R737.33; R446.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2024)15-2186-07

Expression levels of PD-L1 and TILs and their relationship with prognosis in cervical cancer patients with lymph node metastasis*

LIU Kun^{1,2}, LU Shanming³, ZHENG Zhijian⁴, YAO Yunhong^{1△}, ZHENG Shaoqiu²,
LIU Qinghua², XIE Shoucheng²

1. Department of Pathology, School of Basic Medicine, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Department of Pathology, Meizhou People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514031, China; 3. Department of Pathology, Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 4. Department of Pelvic Radiotherapy, Meizhou People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514031, China

Abstract: Objective To investigate the expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) and tumor infiltrating lymphocyte subsets (TILs) in cervical cancer patients with lymph node metastasis and their relationship with prognosis. **Methods** A total of 101 patients with lymph node metastasis after radical resection of cervical cancer in Meizhou People's Hospital from January 2007 to September 2013 were selected as the research objects. The expression levels of PD-L1, CD4⁺TILs, CD8⁺TILs and forkhead wing helix transcription factor 3 (Foxp3)⁺TILs were detected by immunohistochemistry. The differences in clinicopathological characteristics of patients with different PD-L1 expression were compared. Spearman correlation was used to analyze

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2019318); 广东省梅州市科技计划项目(2022B11)。

作者简介: 刘堃,男,主管技师,主要从事肿瘤病理方面的研究。△ 通信作者, E-mail: YaoYunhong@gdmu.edu.cn。

the correlation between PD-L1 expression level and TILs density. Kaplan-Meier survival analysis was used to analyze the relationship between PD-L1 expression level, TILs density, density ratio and cumulative survival rate. Cox proportional hazards model was used to analyze the independent prognostic factors of patients. **Results** PD-L1 was expressed in the cytoplasm and/or cell membrane of tumor cells, and the positive expression rate was 34.65% (35/101). CD4⁺ TILs count was 94 (45,190). CD8⁺ TILs count was 63 (31,117). FoxP3⁺ TILs was 6.0 (2.5,13.5). The ratio of FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs was 0.109 (0.036,0.193). There were significant differences in the density of CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs and FoxP3⁺ TILs between the PD-L1 positive expression group and the PD-L1 negative expression group ($P < 0.05$). The expression of PD-L1 was positively correlated with the density of CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs and FoxP3⁺ TILs ($r = 0.305, 0.222, 0.222, P = 0.002, 0.026, 0.026$). There were significant differences in the density of CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs and PD-L1 expression between the survival group and the death group ($P < 0.05$). Cumulative survival rate of patients with surgical age < 50 years, PD-L1 positive expression, high density of CD4⁺ TILs, high density of CD8⁺ TILs, and low ratio of FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs are higher than that of patients with surgical age ≥ 50 years, PD-L1 negative expression, CD4⁺ TILs low density, CD8⁺ TILs low density, high FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs ratio patients, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Multivariate Cox regression analysis showed that PD-L1 positive expression and high density of CD8⁺ TILs were independent protective factors for the prognosis of patients ($P < 0.05$). **Conclusion** PD-L1, CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs and FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs are ratio associated with the prognosis of cervical cancer patients with lymph node metastasis. Positive expression of PD-L1 and high density of CD8⁺ TILs are independent protective factors for the prognosis of cervical cancer patients with lymph node metastasis.

Key words: cervical cancer; lymph node metastasis; programmed death ligand-1; forkhead wing helix transcription factor 3; tumor infiltrating lymphocytes; prognosis

宫颈癌是全球妇女最常见的恶性肿瘤之一,每年有约 60 万例宫颈癌新病例和 35 万例宫颈癌死亡病例发生^[1]。目前宫颈癌相关预后影响因素除国际妇产科联盟(FIGO)分期外,还包括患者年龄、临床分期等^[2]。肿瘤微环境中的多种因素也会影响患者预后,包括免疫细胞及免疫调节因素等。肿瘤浸润淋巴细胞亚群(TILs)是肿瘤微环境重要的组成部分,TILs的数量和功能是决定抗癌效果的关键,与患者预后密切相关^[3]。CD8⁺ TILs可直接识别并根据肿瘤抗原导致肿瘤细胞死亡,也可以间接激活死亡受体通路,诱导肿瘤细胞凋亡;CD4⁺辅助性T细胞通过分泌细胞因子在免疫应答中发挥重要作用,而CD4⁺、叉头翼螺旋转录因子3(FoxP3)⁺调节性T细胞(Treg)分泌免疫抑制细胞因子抑制免疫应答^[4]。FoxP3在外周Treg的维持中起重要作用,可认为是肿瘤细胞免疫抑制因素之一^[5]。程序性死亡配体-1(PD-L1)是重要的免疫检查点,与程序性细胞死亡受体(PD-1)结合后传导抑制信号,诱导T淋巴细胞凋亡,可参与维持机体免疫耐受,而在肿瘤细胞上的表达则导致免疫逃逸^[6]。通过免疫治疗拮抗PD-L1,可治疗多种恶性肿瘤^[7]。本研究旨在探讨淋巴结转移的宫颈癌患者肿瘤微环境中PD-L1、TILs间的关系,以及二者对淋巴结转移的宫颈癌患者预后的预测价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性选取 2007 年 1 月至 2013 年 9 月在梅州市人民医院诊治并接受宫颈癌根治性切除

术的 101 例患者作为研究对象,年龄 27~70 岁,平均(47.52±8.44)岁;淋巴结转移: < 3 枚 72 例, ≥ 3 枚 29 例;FIGO 分期: I 期 29 例, II~III 期 72 例;肿瘤最大径: < 4 cm 63 例, ≥ 4 cm 38 例;浸润深度:浅、中肌层 18 例,深肌层 83 例;组织学分化:低分化 10 例,中高分化 91 例;脉管癌栓:有脉管癌栓 32 例,无脉管癌栓 69 例。纳入标准:(1)所有患者均进行宫颈癌根治性切除术治疗,经病理学检查确诊为宫颈鳞状细胞癌;(2)有完整的临床病历资料及术后随访资料;(3)首次诊断和治疗且确诊为宫颈癌前未进行放疗;(4)患者术后均有淋巴结转移。排除标准:(1)宫颈腺癌、腺鳞癌等非鳞癌;(2)妊娠期或哺乳期女性;(3)存在肝、肾、心功能不全或有重大疾病病史;(4)合并其他原发恶性肿瘤病史者。本研究经梅州市人民医院医学伦理委员会审核批准(2019-C-51)。

1.2 方法

1.2.1 临床数据收集 所有患者一般资料均通过原始病历资料扫描档案进行资料收集;临床病理资料根据根治手术病理检查报告内容进行收集,包括患者年龄、FIGO 分期、组织学分型、淋巴结转移数、肿瘤最大径、浸润深度、组织学分化程度、脉管癌栓、手术日期及死亡日期或末次随访日期。

1.2.2 PD-L1 蛋白检测 所有宫颈癌组织标本均经 10% 甲醛充分固定、脱水、石蜡包埋,4 μ m 厚度连续切片,苏木精-伊红染色,观察其形态学特征并定位采样区域。以手动组织芯片制备仪在肿瘤浸润前沿瘤

芽较丰富区内随机取样制备组织芯片,柱芯直径 2 mm。宫颈癌组织芯片均以 4 μm 厚度连续切片,按常规方法脱蜡水化并用热修复抗原。采用罗氏全自动免疫组织化学机 Envision 二步法,使用 Ventana BenchMarkXT 染色机进行免疫组织化学染色,一抗购于罗氏公司,使用单克隆 PD-L1,为即用型原液,克隆号 SP263,二抗购于福州迈新生物技术开发有限公司。采用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,已知阳性切片作为阳性对照。PD-L1 蛋白主要表达于肿瘤细胞的细胞膜和(或)细胞质,以棕黄色至棕褐色为阳性表达,以肿瘤细胞阳性比例分数(TPS)≥ 1%定义为 PD-L1 表达阳性^[8]。评估由 2 名病理科职称为副主任医师及以上人员采用双盲法判断结果并计数,阳性结果不同时重新协商评估。

1.2.3 TILs 检测 宫颈癌组织芯片均以 4 μm 厚度连续切片,按常规方法脱蜡水化并热修复抗原。CD4、CD8 一抗购于福州迈新生物技术开发有限公司,为即用型原液;FoxP3 一抗购于英国 Abcam 公司,浓缩型原液按 1:8 配比稀释为工作液浓度。二抗购于福州迈新生物技术开发有限公司。免疫组织化学染色采用 Envision 二步法,步骤如下:二甲苯脱蜡、水化、PBS 浸洗,高温修复 20 min,冷却至室温后水洗,PBS 浸洗,3%过氧化氢处理 10 min,抑制内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗,加抗体 37℃湿盒孵育 30 min。PBS 洗涤后,用辣根过氧化物酶标记的广谱二抗孵育 30 min,然后用 3,3'-二氨基联苯胺处理 1 min,切片用苏木素复染,梯度乙醇脱水,中性树胶封片。采用 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知阳性切片作为阳性对照。CD4、CD8 染色主要定位于 TILs 细胞膜, FoxP3 染色定位于 TILs 细胞核,以棕黄色至棕褐色为阳性表达,CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、FoxP3⁺TILs 随机 5 个视场数为 22 的高倍镜视野计数并取平均值,取 5 个视野计数平均值中位数作为最佳截断值划分为高、低密度。评估由 2 名病理科职称为副主任医师

及以上人员采用双盲法判断结果计数,结果差异为 10%则重新协商评估。

1.2.4 随访 通过电话或门诊进行随访,随访截止时间为 2019 年 5 月 11 日,生存期为手术日到死亡日或末次随访当日。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数表示,组间比较采用 χ^2 检验;例数不足 5 例则采用 Fisher 确切概率法,无 χ^2 值。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验;采用 Spearman 相关对 PD-L1 与 CD4、CD8、FoxP3⁺TILs 的相关性进行分析;单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 法(Log-rank 检验),多因素生存分析采用 Cox 比例风险回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PD-L1、CD4、CD8 及 FoxP3 表达情况 PD-L1 表达于肿瘤细胞的细胞质和(或)细胞膜,阳性表达率为 34.65%(35/101)。根据 PD-L1 表达情况将 101 例患者分为 PD-L1 阳性表达组和 PD-L1 阴性表达组。CD4⁺TILs 计数为 94(45,190),以中位数为最佳截断值分为高密度(含最佳截断值)和低密度;CD8⁺TILs 计数为 63(31,117),以中位数为最佳截断值分为高密度(含最佳截断值)和低密度;FoxP3⁺TILs 计数为 6.0(2.5,13.5),以中位数为最佳截断值分为高密度(含最佳截断值)和低密度;FoxP3⁺TILs/CD8⁺TILs 比值为 0.109(0.036,0.193),以中位数为最佳截断值分为高比值(含最佳截断值)和低比值。见图 1。

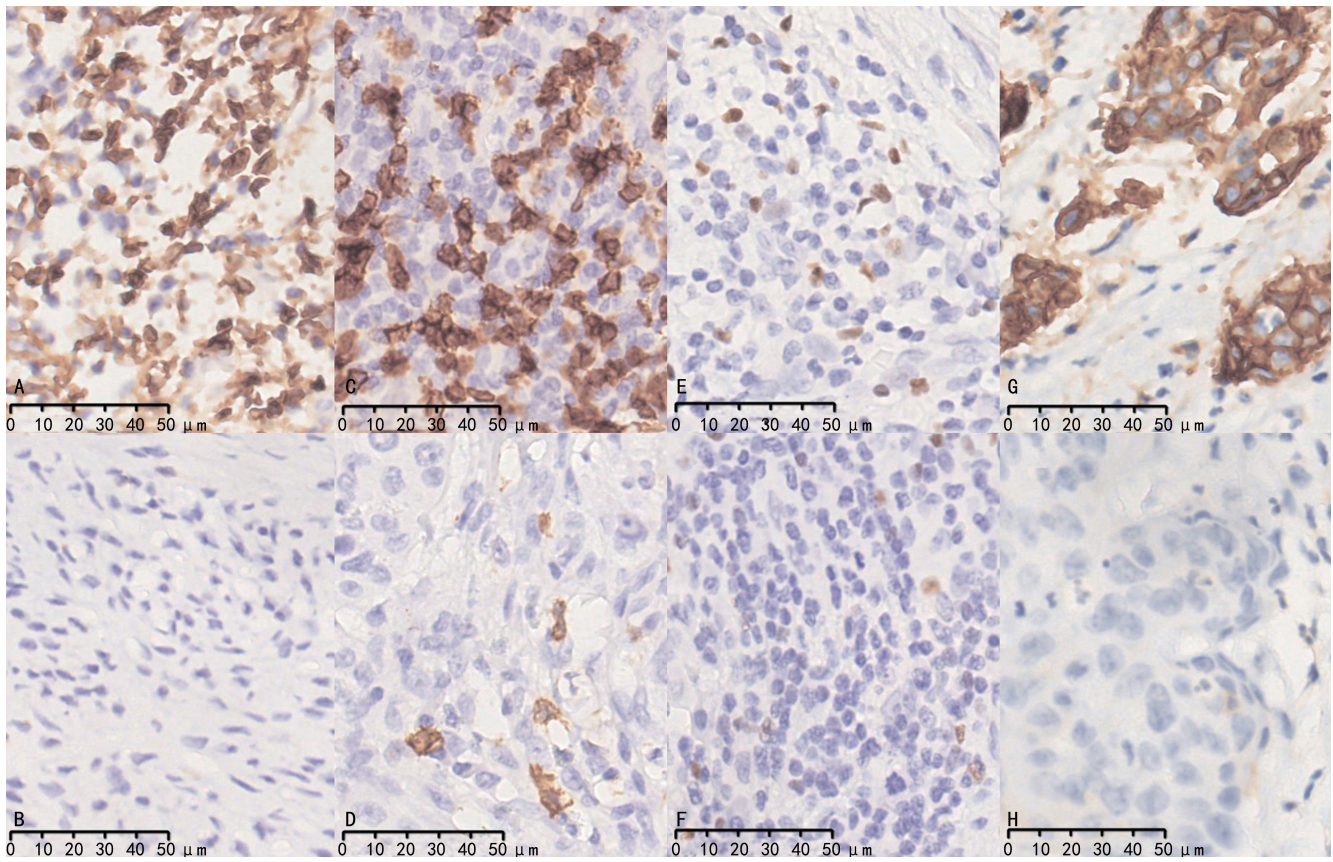
2.2 PD-L1 阳性表达组与 PD-L1 阴性表达组临床病理特征比较 PD-L1 阳性表达组与 PD-L1 阴性表达组手术年龄、FIGO 分期、分化程度、淋巴结转移数、浸润深度、脉管癌栓、肿瘤最大径比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。PD-L1 阳性表达组与 PD-L1 阴性表达组 CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、FoxP3⁺TILs 表达情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 PD-L1 阳性表达组与 PD-L1 阴性表达组临床病理特征比较(n)

组别	n	手术年龄(岁)		FIGO 分期		分化程度		淋巴结转移数(枚)		浸润深度	
		<50	≥50	I 期	II~III 期	高中	低	<3	≥3	浅、中肌层	深肌层
PD-L1 阴性表达组	66	43	23	17	49	59	7	46	20	12	54
PD-L1 阳性表达组	35	23	12	12	23	32	3	26	9	6	29
χ^2		0.003		0.813		—		0.235		0.017	
P		0.955		0.393		1.000		0.628		0.897	

组别	n	脉管癌栓		肿瘤最大径(cm)		CD4 ⁺ TILs		CD8 ⁺ TILs		FoxP3 ⁺ TILs	
		无	有	<4	≥4	低密度	高密度	低密度	高密度	低密度	高密度
PD-L1 阴性表达组	66	49	17	39	27	40	26	38	28	38	28
PD-L1 阳性表达组	35	20	15	24	11	10	25	12	23	12	23
χ^2		3.090		0.876		9.389		4.963		4.963	
P		0.079		0.349		0.002		0.026		0.026	

注:—表示无数据。



注:A为CD4⁺TILs高密度表达,B为CD4⁺TILs低密度表达;C为CD8⁺TILs高密度表达,D为CD8⁺TILs低密度表达;E为FoxP3⁺TILs高密度表达,F为FoxP3⁺TILs低密度表达;G为PD-L1阳性表达,H为PD-L1阴性表达。

图1 PD-L1、CD4⁺、CD8⁺及FoxP3表达情况(×400)

2.3 PD-L1与CD4⁺、CD8⁺、FoxP3⁺TILs的相关性

PD-L1表达情况与CD4⁺TILs、CD8⁺TILs、FoxP3⁺TILs密度均呈正相关($r = 0.305, 0.222, 0.222, P = 0.002, 0.026, 0.026$)。

2.4 生存组与死亡组临床病理特征比较 101例患者平均随访(70.51±37.57)个月,其中死亡病例37例纳入死亡组,生存病例64例纳入生存组。生存组

与死亡组手术年龄、FIGO分期、分化程度、淋巴结转移数、浸润深度、脉管癌栓、肿瘤最大径、FoxP3⁺TILs表达情况比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。生存组与死亡组CD4⁺TILs、CD8⁺TILs密度和PD-L1表达情况比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 生存组与死亡组临床病理特征比较(n)

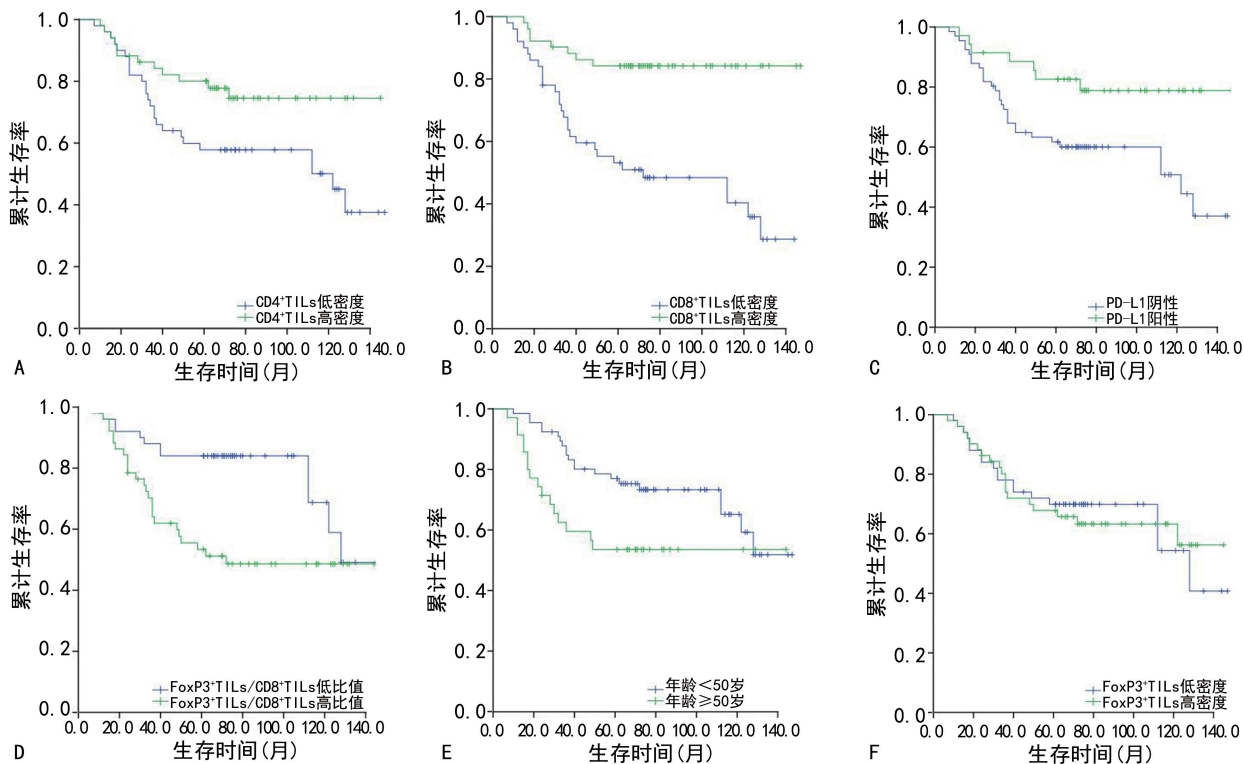
组别	n	手术年龄(岁)		FIGO分期		分化程度		淋巴结转移数(枚)		浸润深度		脉管癌栓	
		<50	≥50	I期	II~III期	高中	低	<3	≥3	浅、中肌层	深肌层	无	有
生存组	64	45	19	19	45	57	7	47	17	12	52	40	24
死亡组	37	21	16	10	27	34	3	25	12	6	31	29	8
χ ²		1.903		0.081		—		0.395		0.103		2.731	
P		0.168		0.776		0.742		0.530		0.749		0.098	

组别	n	肿瘤最大径(cm)		CD4 ⁺ TILs		CD8 ⁺ TILs		FoxP3 ⁺ TILs		PD-L1	
		<4	≥4	低密度	高密度	低密度	高密度	低密度	高密度	阴性	阳性
生存组	64	39	25	25	39	21	43	32	32	36	28
死亡组	37	24	13	25	12	29	8	18	19	30	7
χ ²		0.154		7.621		19.473		0.017		6.384	
P		0.695		0.006		<0.001		0.896		0.012	

注:—表示无数据。

2.5 生存分析 手术年龄<50 岁、PD-L1 阳性表达、CD4⁺ TILs 高密度、CD8⁺ TILs 高密度患者累计生存率均高于手术年龄≥50 岁、PD-L1 阴性表达、CD4⁺ TILs 低密度、CD8⁺ TILs 低密度患者,差异均有统计学意义($\chi^2=4.578, 5.945, 4.750, 16.086, P=0.032, 0.015, 0.029, <0.001$);FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 高

比值患者累计生存率低于 FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 低比值患者,差异有统计学意义($\chi^2=7.336, P=0.007$);不同 FoxP3⁺ TILs 密度患者累计生存率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.01, P=0.983$)。见图 2。



注:A 为 CD4⁺ TILs 的 Kaplan-Meier 生存曲线;B 为 CD8⁺ TILs 的 Kaplan-Meier 生存曲线;C 为 PD-L1 的 Kaplan-Meier 生存曲线;D 为 FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 的 Kaplan-Meier 生存曲线;E 为年龄的 Kaplan-Meier 生存曲线;F 为 FoxP3⁺ TILs 的 Kaplan-Meier 生存曲线。

图 2 CD4⁺ TILs、CD8⁺ TILs、PD-L1、FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs、年龄、FoxP3⁺ TILs 的 Kaplan-Meier 生存曲线

2.6 多因素 Cox 回归分析 选择单因素分析差异有统计学意义的变量,并选取 Kaplan-Meier 曲线未交叉数据排除混杂影响,以预后状态(生存=0,死亡=1)作为因变量,以 CD8⁺ TILs(高密度=0,低密度=1)、PD-L1 表达(阳性=0,阴性=1)作为自变量,进行多因素 Cox 回归分析,结果显示,PD-L1 阳性表达、CD8⁺ TILs 高密度是宫颈癌患者预后的独立保护因素($P<0.05$)。见表 3。

表 3 宫颈癌患者预后的多因素 Cox 回归分析

自变量	β	SE	Wald χ^2	P	HR(95%CI)
CD8 ⁺ TILs	-1.242	0.385	10.406	0.001	0.289(0.136~0.614)
PD-L1	-0.855	0.422	4.115	0.043	0.425(0.186~0.971)

3 讨论

目前用于宫颈癌患者分层管理与指导治疗的预后评价方式很多,但均未能揭示肿瘤中心及其所处微环境的免疫学状态。宫颈癌根治术后淋巴结转移患者 PD-L1 和 CD4⁺、CD8⁺、FoxP3⁺ TILs 与患者预后的关系少有学者进行研究。

肿瘤浸润淋巴细胞作为抗肿瘤效应的重要组成部分,在多种肿瘤中都发现它的数量和功能对患者预后起重要作用。在实体肿瘤浸润前沿中 CD8⁺ TILs 介导了抗肿瘤效应,它的密度在很大程度上影响预后,FoxP3⁺ Terg 可以通过分泌细胞因子增强抗肿瘤效应,还能介导相应的免疫耐受,且 FoxP3⁺ 在外周 Terg 的维持中起重要作用,可以抑制 CD8⁺ T 淋巴细胞免疫功能,FoxP3⁺ Terg 比例增加为预后不良的危险因素^[5,9]。由于 FoxP3⁺ TILs 对 CD8⁺ TILs 的功能产生抑制,导致抗肿瘤免疫减弱。NI 等^[10]研究发现,宫颈癌中 FoxP3⁺ TILs 升高及 CD8⁺ TILs 下降导致预后更差。本研究 FoxP3⁺ TILs 密度与宫颈癌患者累计生存率无关,可能与 FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 的比例有关,当 CD8⁺ TILs 密度升高时,FoxP3⁺ TILs 同等数量增加时的抑制作用较 CD8⁺ TILs 密度降低时弱。有研究报道表明,FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 较 FoxP3⁺ TILs 与肿瘤预后的相关性更密切,对患者总生存期有明显预测作用^[11]。CD4⁺ TILs、CD8⁺ TILs、FoxP3⁺ TILs 在肿瘤微环境中发挥抗肿瘤效应、免疫

耐受等重要调节作用,与肿瘤进展及患者预后密切相关。有研究指出,随着患者年龄增长,免疫系统抵抗新抗原的潜在能力下降,年轻患者活化 CD8⁺ T 淋巴细胞迅速产生并明显增加,而老年患者 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞数量明显减少^[12],可能导致年轻患者进行手术治疗后,机体能产生更好的免疫能力。本研究中年龄<50 岁的患者较年龄≥50 岁患者有更高的累计生存率。DIMITROVA 等^[13]研究指出,宫颈癌肿瘤组织中 CD8⁺ TILs 浸润患者总生存期明显高于无 CD8⁺ TILs 浸润患者。GULTEKIN 等^[14]研究表明,CD4⁺ TILs 减少是预后不良的危险因素。当 CD4⁺ TILs、CD8⁺ TILs 密度升高时,提示机体有更好的抗肿瘤免疫反应,可能预示更好的预后。本研究结果显示,CD4⁺ TILs 和 CD8⁺ TILs 呈高密度时患者有更高的累计生存率,且 CD8⁺ TILs 呈高密度时是预后的独立保护因素。FoxP3 的作用是通过维持对细胞免疫的抑制,引起免疫耐受,从而导致肿瘤免疫逃逸^[15]。FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 升高提示患者预后不良,可能与高比例的 FoxP3⁺ TILs 对 CD8⁺ TILs 效应细胞免疫功能抑制有关,本研究单因素生存分析结果显示,FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 比值升高时,早期将带来更低的累计生存率。

PD-L1/PD-1 通路通过抑制免疫细胞的过度活化抑制免疫功能,可作为过强免疫反应的负反馈预防自身免疫性疾病,当肿瘤细胞 PD-L1 过表达时也可以导致 T 淋巴细胞免疫功能受限,从而使肿瘤细胞更容易发生免疫逃逸^[6,16]。PD-L1 高表达由不同原因引起,有细胞自身基因表达上调导致的 PD-L1 表达上调,也有通过 T 淋巴细胞的存在或过强免疫反应诱导 PD-L1 表达上调等^[17],正因为其表达形式的多样性,在不同免疫微环境中可能体现出多种意义。不同的肿瘤类型、临床亚组及 PD-L1 阳性判读标准也可能对 PD-L1 与预后的相关性产生影响。从免疫方面,PD-L1 可抑制 T 淋巴细胞免疫反应等,导致机体抗肿瘤免疫功能抑制,引起肿瘤细胞免疫逃逸。从治疗方面,JIANG 等^[18]研究发现,在鼻咽癌患者中 PD-L1 阳性表达患者预后更好,且放疗后更容易得到完全缓解;MARTINS 等^[19]研究发现,在宫颈癌放、化疗有效的患者中,PD-L1 表达上调;FENG 等^[20]研究发现,PD-L1 具有化疗诱导细胞凋亡调节的潜在作用,当 PD-L1 呈低表达时会抑制化疗敏感性,继而抑制肿瘤细胞凋亡;DENG 等^[21]的回顾性分析也发现,在乳腺癌、肺癌、头颈鳞癌中,PD-L1 低表达会引起化疗耐药的情况。PD-L1 表达可能通过肿瘤细胞内在的某些非免疫功能影响患者放、化疗等治疗效果,对抗肿瘤治疗效果产生影响,从而影响患者预后。从转录调控方面,PD-L1 受 TILs 分泌的干扰素- α 、干扰素- γ 、白细胞介素-6 等多种细胞因子影响,这些细胞因子分泌增多会引起 PD-L1 表达反应性上调^[6]。有证据表明,

PD-L1 与 Treg 结合可导致 FoxP3 的持续表达和 Treg 增殖^[22]。本研究数据分析中 PD-L1 与 CD4⁺、CD8⁺ 及 FoxP3⁺ TILs 均呈正相关,可能是由于它们在微环境中互相影响的结果。

在肿瘤微环境中,抗肿瘤免疫受多种因素的共同影响。TANG 等^[4]研究认为,PD-L1 影响 CD8⁺ T 淋巴细胞等效应 T 淋巴细胞功能,FoxP3 则维持 Treg 功能抑制 CD8⁺ T 淋巴细胞等效应 T 淋巴细胞功能,PD-L1 轴和 FoxP3 可能通过不重叠的途径共同维持外周免疫耐受性。CD8⁺ T 淋巴细胞作为主要的效应 T 淋巴细胞对肿瘤起直接杀伤作用,抑制其功能将造成抗肿瘤免疫能力下降。PD-L1、CD8⁺ TILs 密度、FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 都可能通过影响免疫功能从而影响预后。本研究结果显示,PD-L1 阳性表达是宫颈癌患者预后的独立保护因素,原因可能有以下几点:(1)本研究中患者选取淋巴结转移病例,不同亚组类别 PD-L1 表达可能有不同预后意义;(2)PD-L1 阳性表达是 T 淋巴细胞升高、机体积极抗癌免疫反应的负反馈,而 CD8⁺ TILs 等 T 淋巴细胞数量增加在抗癌免疫中有积极作用;(3)PD-L1 阳性表达对患者术后的放、化疗及免疫治疗等都可能产生积极作用,有利于辅助治疗对肿瘤细胞的抑制作用。由于 PD-L1 与患者预后关系的机制过于复杂,仍需要更多系统性、前瞻性研究加以支持。

综上所述,在宫颈癌根治性切除术后淋巴结转移患者中,手术年龄、CD4⁺ TILs 密度、CD8⁺ TILs 密度、FoxP3⁺ TILs/CD8⁺ TILs 比值、PD-L1 表达均与预后有关,其中 PD-L1 阳性表达、CD8⁺ TILs 呈高密度是患者预后的独立保护因素,PD-L1、CD8⁺ TILs 有望成为预测此类型患者预后的生物学标志物。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] MENG Y F, CHU T, LIN S T, et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of cervical cancer with different histological types: a population-based cohort study [J]. Gynecol Oncol, 2021, 163(3): 545-551.
- [3] KAZEMI M H, SADRI M, NAJAFI A, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes for treatment of solid tumors: it takes two to tango? [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1018962.
- [4] TANG Y, ZHANG A X J, CHEN G Y, et al. Prognostic and therapeutic TILs of cervical cancer-current advances and future perspectives[J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, 22: 410-430.
- [5] GEORGIEV P, CHARBONNIER L M, CHATILA T A. Regulatory T cells: the many faces of Foxp3 [J]. J Clin Immunol, 2019, 39(7): 623-640.

- [6] YI M, NIU M K, XU L P, et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 10.
- [7] HU T, WAN X, WU H, et al. Predictive values of PDL1 expression for survival outcomes in patients with cervical cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ginekol Pol*, 2022, 93(10): 767-774.
- [8] 彭巧华, 吕卫国. 2022 年第 1 版《NCCN 子宫颈癌临床实践指南》解读[J]. *实用肿瘤杂志*, 2022, 37(3): 205-214.
- [9] LITWIN T R, IRVIN S R, CHORNOCK R L, et al. Infiltrating T-cell markers in cervical carcinogenesis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(4): 831-841.
- [10] NI H H, ZHANG H L, LI L, et al. T cell-intrinsic sting signaling promotes regulatory T cell induction and immunosuppression by upregulating FOXP3 transcription in cervical cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(9): e005151.
- [11] TAVARES M C, SAMPAIO C D, LIMA G E, et al. A high CD8 to FOXP3 ratio in the tumor stroma and expression of PTEN in tumor cells are associated with improved survival in non-metastatic triple-negative breast carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 901.
- [12] SONG C L, PAN W J, BROWN B, et al. Immune repertoire analysis of normal Chinese donors at different ages[J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(11): e13311.
- [13] DIMITROVA P, VASILEVA -SLAVEVA M, SHIVAROV V, et al. Infiltration by intratumor and stromal CD8 and CD68 in cervical cancer[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2023, 59(4): 728.
- [14] GULTEKIN M, BEDUK ESEN C S, ATES OZDEMIR D A, et al. Stromal or intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes; which one has more prognostic significance in cervical cancer? [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2023, 307(3): 969-980.
- [15] DIKIY S, LI J, BAI L, et al. A distal Foxp3 enhancer enables interleukin-2 dependent thymic Treg cell lineage commitment for robust immune tolerance[J]. *Immunity*, 2021, 54(5): 931-946.
- [16] DOROSHOW D B, BHALLA S, BEASLEY M B, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(6): 345-362.
- [17] RIBAS A, HU-LIESKOVAN S. What does PD-L1 positive or negative mean? [J]. *J Exp Med*, 2016, 213(13): 2835-2840.
- [18] JIANG S, LI X, HUANG L, et al. Prognostic value of PD-1, PD-L1 and PD-L2 deserves attention in head and neck cancer[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 988416.
- [19] MARTINS P R, MACHADO C M T, COXIR S A, et al. Cervical cancer patients that respond to chemoradiation therapy display an intense tumor infiltrating immune profile before treatment[J]. *Exp Mol Pathol*, 2019, 111: 104314.
- [20] FENG D F, CHEN Z Y, HE X H, et al. Loss of tumor intrinsic PD-L1 confers resistance to drug-induced apoptosis in human colon cancer[J]. *Neoplasma*, 2021, 68(1): 144-153.
- [21] DENG J, JIANG W, LIU L, et al. Research progress on the intrinsic non-immune function of PD-L1 in tumors (review)[J]. *Oncol Lett*, 2023, 25(1): 10.
- [22] PIAO W J, LI L S, SAXENA V, et al. PD-L1 signaling selectively regulates T cell lymphatic transendothelial migration[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2176.

(收稿日期: 2023-09-18 修回日期: 2024-03-05)

(上接第 2185 页)

- [11] QAZI S, RAZA K. Phytochemicals from Ayurvedic plants as potential medicaments for ovarian cancer; an in silico analysis[J]. *J Mol Mode*, 2021, 27(4): 114-127.
- [12] WHITEHURST A W. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2014, 54: 251-272.
- [13] KRANZ L M, DIKEN M, HAAS H, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy[J]. *Nature*, 2016, 534(7607): 396-401.
- [14] XIE K, FU C, WANG S, et al. Cancer-testis antigens in ovarian cancer; implication for biomarkers and therapeutic targets[J]. *J Ovarian Res*, 2019, 12(1): 1-13.
- [15] YANG P, HUO Z, LIAO H, et al. Cancer/testis antigens trigger epithelial-mesenchymal transition and genesis of cancer stem-like cells[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(10): 1292-1300.
- [16] COSCIA F, LENGYEL E, DURAISWAMY J, et al. Multi-level proteomics identifies CT45 as a chemosensitivity mediator and immunotherapy target in ovarian cancer[J]. *Cell*, 2018, 175(1): 159-170.
- [17] SHUVALOV O, KIZENKO A, PETUKHOV A, et al. Emerging roles of cancer-testis antigens, semenogelin 1 and 2, in neoplastic cells[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 97-106.
- [18] SOWAMBER R, NELSON O, DODDS L, et al. Integrative transcriptome analyses of the human fallopian tube: fimbria and ampulla-site of origin of serous carcinoma of the ovary[J]. *Cancers*, 2020, 12(5): 1090-1105.
- [19] SCHOSSIG P, COSKUN E, ARSENIC R, et al. Target selection for T-cell therapy in epithelial ovarian cancer: systematic prioritization of self-antigens [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2292-2313.

(收稿日期: 2023-10-14 修回日期: 2024-04-10)