

· 综述 ·

肿瘤患者外周血免疫细胞在疗效预测及预后价值中的研究进展

郭亮 吴灵

【摘要】 肿瘤浸润淋巴细胞具有重要的疗效预测及预后价值。越来越多的研究证实,外周血中的免疫细胞同肿瘤浸润的免疫细胞一样,也具有非常重要的作用。高通量流式细胞技术的迅速发展,为肿瘤患者外周血免疫细胞的研究提供了重要保证。肿瘤患者外周血免疫细胞不仅数量及功能发生了很大的改变,而且这种改变对疗效预测以及预后判断具有重要的价值。笔者对外周血免疫细胞的检测手段、数量和功能变化,以及疗效预测和预后价值进行综述。

【关键词】 免疫; 细胞; 肿瘤; 预后

【中图分类号】 R737.9 【文献标志码】 A

寻找有助于肿瘤患者治疗疗效和预后判断的生物学标志物非常重要,它可以帮助医疗决策者筛选出能从所选治疗中获益的人群,帮助患者实现个体化治疗。免疫系统在肿瘤的发生、发展中具有重要作用^[1-2]。既往关于肿瘤患者免疫细胞疗效预测及预后价值的研究主要集中在肿瘤本身,例如在乳腺癌组织中,肿瘤浸润淋巴细胞可以预测新辅助化疗的疗效^[3-4]。现在越来越多的研究发现^[5-7],肿瘤患者外周血中的免疫细胞对治疗的疗效预测以及预后判断也具有重要作用。为了全面了解肿瘤患者外周血免疫细胞的生理功能,研究其在肿瘤诊断治疗中的临床价值,笔者对肿瘤患者外周血免疫细胞的检测手段、数量和功能变化,以及疗效预测和预后价值进行综述,希望对寻找肿瘤患者新的生物学标志物和开展肿瘤个体化治疗研究提供一定的帮助。

一、外周血免疫细胞的检测方法

过去的几十年流式细胞技术有了一系列关键进展,可以用更多的激光进行经典染色设计的延伸。但是,这种多色的流式细胞技术也存在一定缺陷,例如自发荧光和荧光补偿问题。质谱流式细胞技术 CyTOF(cytometry by time-of-flight)是另一种高通量检测技术^[8]。它避免了传统荧光标记的补偿问题,理论上可以同时检测到 100 个参数^[8]。除此之外,这一领域常用的测量仪器还有光谱流式细胞仪、成像流式细胞仪等。总之,流式细胞技术等高科技手段为现在复杂的免疫学研究提供了保障,在提高早期诊断率、增加免疫和造血系统临床试验患者的密切随访方面也具有巨大的潜能。

二、肿瘤患者外周血免疫细胞数量及功能变化

肿瘤患者外周血免疫细胞亚型在数量上和健康人群相比有所不同。很多研究已证实肿瘤患者外周血调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg 细胞)数量与健康对照相比明显升高^[9-13]。Treg 细胞在自身免疫性疾病中可以抑制活化的 T 细胞,在肿瘤中同样可以抑制其他免疫细胞对肿瘤的应答。

不仅是 Treg 细胞,其他免疫细胞亚型的水平与健康对照相比数量上也有很大的不同,例如骨髓来源的抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)、中性粒细胞/淋巴细胞比值(neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)等。与健康人群相比,黑色素瘤患者外周血具有较高水平的 MDSC^[14]。42% 恶性间皮瘤患者在治疗前基线状态有 NLR 升高^[15]。MDSC 和中性粒细胞对其他免疫活性细胞具有广泛抑制作用,推测机体可能是通过提高 MDSC 和中性粒细胞的数量实现免疫逃避,从而促进肿瘤的发生。

肿瘤患者与健康人群外周血免疫细胞的差异不仅体现在数量上,还体现在功能上。一项乳腺癌外周血免疫研究发现,与健康对照相比,乳腺癌患者外周血免疫细胞的功能发生变化,主要表现在树突细胞、T 细胞亚型等免疫细胞的多种细胞因子分泌降低,并且在疾病进展时这种趋势更加明显^[16]。这些免疫细胞的功能变化说明,当肿瘤在人体内发生、发展过程中,机体的固有免疫细胞和适应性免疫细胞受到多种因素诱导,处于明显的功能抑制状态。

三、外周血免疫细胞与肿瘤患者治疗疗效及预后的关系
免疫系统和肿瘤关系密切,大多数研究都集中在肿瘤浸润免疫细胞,笔者将重点阐述外周血免疫细胞、细胞因子与患者治疗疗效及预后的相关性。

(一) 免疫细胞及其亚型

1. NLR

NLR 在临床上具有非常重要的疗效预测和预后价值。一项有关乳腺癌的回顾性研究发现,治疗前 NLR 较低者对新辅助化疗更加敏感^[17]。2014 年 Templeton 等^[18]对实体肿瘤患者外周血 NLR 的预后价值进行了 Meta 分析,这项分析包含了 100 多项研究的 40 559 例实体肿瘤患者,分析表明,高 NLR 与 OS 负相关($HR = 1.81, 95\% CI: 1.67 \sim 1.97, P < 0.001$)。NLR 已经被作为肿瘤预后的一个标志物^[19],然而高 NLR 与肿瘤患者较差预后具有相关性的潜在机制仍不明确,还需要进一步研究为临床提供依据。

2. 辅助及细胞毒性 T 细胞

研究发现接受细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA4)抗体药物

易普利姆玛(ipilimumab)治疗的黑色素瘤患者,外周血淋巴细胞绝对数量的增加,以及延迟的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞的增加,与临床应答率正相关^[7]。在这 3 项指标均增加的患者中,有 71% 患者完全缓解或部分缓解,而在 3 项指标至少一项下降的患者中这一比例仅有 8%^[7]。Farren 等^[20]发现,基线状态外周血较高比例的记忆性 T 细胞与转移性胰腺导管腺癌患者较长的 OS 相关(CD4: $HR = 0.36, P = 0.032$; CD8: $HR = 0.61, P = 0.036$)。CD4⁺T 细胞在肿瘤免疫应答中辅助其他免疫活性细胞,CD8⁺T 细胞则具有直接的肿瘤杀伤作用。记忆性 T 细胞代表肿瘤反应性 T 细胞,因而能影响治疗效果及患者的生存。

3. 调节性 T 细胞

Yao 等^[21]通过 5 项临床试验证实,接受过继免疫疗法有应答的转移性黑色素瘤患者,外周血 Treg 细胞无论在相对比例还是绝对数量上,比无应答的患者明显降低。同时,一项关于乳腺癌浸润 Treg 细胞的研究还证实,Treg 细胞数量与 OS 负相关^[22]。然而 Treg 细胞的数量与肿瘤患者预后及疗效的关系在不同肿瘤的不同研究中,存在着矛盾的现象。比如有关黑色素瘤的研究发现,接受 ipilimumab 治疗的进展期黑色素瘤患者其基线状态 Treg 细胞数量与患者的预后正相关^[5]。因此,外周血 Treg 细胞水平和肿瘤患者预后的关系尚需进一步验证。

4. 骨髓来源的抑制细胞

MDSC 代表一群异质细胞,包括髓样前体细胞和未成熟的髓样细胞,缺乏特异性的细胞标志物,但是 MDSC 细胞有着共同的特点,即对其他免疫活性细胞具有多重抑制作用^[23]。肿瘤患者外周血中 MDSC 的数量与治疗疗效及预后具有相关性。Martens 等^[5]的研究发现,接受 ipilimumab 治疗的进展期黑色素瘤患者,基线状态时外周血乳酸脱氢酶水平、绝对单核细胞数量、MDSC 比例与预后均呈负相关,而嗜酸粒细胞绝对数量、淋巴细胞比例与预后呈正相关。另一项研究也有相似发现,在接受 ipilimumab 治疗的进展期黑色素瘤患者中,基线状态时 MDSC 数量与客观临床应答率及生存期负相关^[14]。这可能是因为 MDSC 同 Treg 细胞一样,可以抑制 T 细胞的功能,削弱了 ipilimumab 的治疗效果。

(二) 与免疫检查点及免疫细胞活化相关的功能分子

抗肿瘤免疫过程中,T 细胞作为核心的执行者,首先被 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)介导的抗原识别信号激活,同时众多的共刺激信号和共抑制信号精细调节 T 细胞反应的强度和质量。这些抑制信号即为免疫检查点(immune checkpoints),包括程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death 1, PD-1)及程序性死亡配体 1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)、CTLA-4、T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3(T cell immunoglobulin mucin domain containing molecules 3, TIM3)、人淋巴细胞活化基因 3 等位点。而共刺激信号包含诱导共刺激分子(inducible costimulator, ICOS)等。这些活性分子和肿瘤的疗效及预后也有极强的相关性。

1. PD-L1

Jacquelot 等^[6]对 39 例 3 期黑色素瘤患者的组织和外周血中 252 个免疫参数进行分析,发现外周血中的免疫细胞与肿瘤浸润的免疫细胞一样,也具有非常重要的作用,并且,与其他免疫参数相比,淋巴细胞耗竭以及免疫抑制相关分子具

有更重要的临床意义,比如循环 T 细胞表面 PD-L1 低表达的患者具有更长的 OS。

2. PD-1

研究发现,非小细胞肺癌患者外周血中 CD4⁺T 细胞表面 PD-1 的表达具有预后价值,PD-1 的高表达与患者较短的无进展生存期和 OS 相关^[24]。CD4⁺T 细胞表面 PD-1 的表达不仅与肿瘤患者预后相关,还与治疗疗效有关。在接受抗 PD-L1 治疗的非小细胞肺癌患者中,CD4⁺T 细胞表面高表达 PD-1 的患者临床应答较差^[24],说明 CD4⁺T 细胞 PD-1 表达阳性具有潜在的疗效预测和预后价值。

3. CTLA-4 和 TIM3

Farren 等^[20]发现,胰腺癌患者外周血 CD8⁺T 细胞免疫检查点分子 CTLA-4 高表达与显著降低的 OS 相关($HR = 1.53, P = 0.020$),而另一个免疫检查点分子 TIM3 在 CD4⁺T 细胞的表达却与 OS 正相关($HR = 0.62, P = 0.046$)。

4. ICOS

ICOS 属于 CD28/CTLA-4 家族 T 细胞特异性分子,在 T 细胞激活以后表达^[25]。研究发现,在接受 ipilimumab 治疗的膀胱癌和恶性间皮瘤患者外周血中,CD4⁺T 细胞表面的 ICOS 表达增加,并且 ICOS 表达持续增加的患者与表达未持续增加的患者相比,临床获益率明显增加^[26-27]。外周血免疫细胞 ICOS 表达变化与 PD-1 阻断抗体治疗疗效之间关系的数据目前还比较少。

免疫检查点及其共刺激信号分子是免疫系统功能的重要调节者,其在肿瘤免疫治疗中具有重要地位,目前靶向 PD-L1/PD-1、CTLA-4、TIM3 等分子的临床试验和治疗也越来越多。从免疫检查点和共刺激信号分子在肿瘤疗效和预后中发挥作用的机制似乎不难理解,较高水平的免疫检查点分子以及较低共刺激信号分子的表达与较弱的免疫细胞活性相关,这降低了免疫细胞对肿瘤的杀伤活性。但这不是绝对的,上述 CD4⁺T 细胞 TIM3 的表达水平与胰腺癌患者的预后正相关,这可能是因为外周血 CD4⁺T 细胞 TIM3 的表达,在一定程度上反映了肿瘤内部对机体有益的免疫细胞活性。在机体组织的微环境和外周血中,某一种免疫分子的表达水平会有差异,功能状态也可能截然相反,而且可以随着肿瘤的进展以及对治疗的应答而产生变化,因此需要在后续的研究中深入挖掘其发挥作用的具体机制。

四、结语

传统的肿瘤活组织检查(简称活检)需要基于手术或者穿刺,而有创的操作给患者带来很大痛苦,且取材不均容易产生偏倚。肿瘤的液体活检则克服了传统活检的障碍,在临床研究中具有重要价值。既往肿瘤液体活检更多关注循环肿瘤细胞(circulating tumor cell)、循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA)等源于肿瘤的标志物^[28-29]。外周血中存在丰富的免疫细胞,免疫细胞及其细胞因子水平的变化体现了机体对于恶性肿瘤的应答,以及抗肿瘤治疗后宿主与肿瘤之间的相互影响。筛选外周血中具有疗效预测及预后价值的免疫标志物将极大地推动肿瘤患者的个体化治疗。目前这方面的研究还存在一些问题,如外周血中免疫细胞的水平和功能受影响因素较多,如机体的状态以及非肿瘤疾病等,能否排除这些非肿瘤相关的改变将直接影响研究的质量,未来的研究应设立严格的患者入组和排除标准,对可能影响外周血免

疫指标的患者年龄、生活习惯以及有无感染性和自身免疫性疾病等因素进行严格的控制。而且,肿瘤是一种复杂的疾病,人群差异也非常大,同样的生物学标志物在不同肿瘤甚至相同肿瘤的不同患者中的作用也可能不同。除此之外,研究技术上也需进一步改进,多色流式细胞技术的测定存在复杂荧光补偿问题,对专业技术人员的要求较高,不利于普及。同时,对外周血免疫细胞的研究不应仅仅局限在其疗效预测及预后价值上,其发挥作用的机制也需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2015, 522 (7556): 345-348.
- [2] Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15 (2): 73-86.
- [3] Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28 (1): 105-113.
- [4] Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(9): 983-991.
- [5] Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (12): 2908-2918.
- [6] Jacquilot N, Roberti MP, Enot DP, et al. Immunophenotyping of stage III melanoma reveals parameters associated with patient prognosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136 (5): 994-1001.
- [7] Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Yuan J, et al. Increases in absolute lymphocytes and circulating CD4+ and CD8+ T cells are associated with positive clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (19): 4848-4858.
- [8] Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, et al. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2009, 81 (16): 6813-6822.
- [9] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma [J]. *J Immunol*, 2002, 169(5): 2756-2761.
- [10] Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 606-612.
- [11] Ichihara F, Kono K, Takahashi A, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (12): 4404-4408.
- [12] Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (6): 2457-2464.
- [13] Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, et al. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients [J]. *J Immunol*, 2006, 177 (10): 7398-7405.
- [14] Sade-Feldman M, Kanterman J, Klieger Y, et al. Clinical significance of circulating CD33+CD11b+HLA-DR- myeloid cells in patients with stage IV melanoma treated with ipilimumab [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (23): 5661-5672.
- [15] Kao SC, Pavlakis N, Harvie R, et al. High blood neutrophil-to-lymphocyte ratio is an indicator of poor prognosis in malignant mesothelioma patients undergoing systemic therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (23): 5805-5813.
- [16] Verronese E, Delgado A, Valladeau-Guilemond J, et al. Immune cell dysfunctions in breast cancer patients detected through whole blood multi-parametric flow cytometry assay [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(3): e1100791.
- [17] Chen Y, Chen K, Xiao X, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio is correlated with response to neoadjuvant chemotherapy as an independent prognostic indicator in breast cancer patients: a retrospective study [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16 (5): 320-326.
- [18] Templeton AJ, Mcnamara MG, Seruga B, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106 (6): 124-132.
- [19] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144 (5): 646-674.
- [20] Farren MR, Mace TA, Geyer S, et al. Systemic immune activity predicts overall survival in treatment-naïve patients with metastatic pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22 (10): 2565-2574.
- [21] Yao X, Ahmadzadeh M, Lu YC, et al. Levels of peripheral CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer [J]. *Blood*, 2012, 119 (24): 5688-5696.
- [22] Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27 (11): 1746-1752.
- [23] Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2010, 59 (10): 1593-1600.
- [24] Zheng H, Liu X, Zhang J, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (35): 56 233-56 240.
- [25] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28 [J]. *Nature*, 1999, 397 (6716): 263-266.
- [26] Liakou CI, Kamat A, Tang DN, et al. CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (39): 14 987-14 992.
- [27] Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, et al. Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (10): 2861-2871.
- [28] 姜玲博, 袁洋, 刘毅, 等. 循环肿瘤细胞预测乳腺癌骨转移进展一例 [J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2011, 5 (5): 640-642.
- [29] 崇梅红, 肇毅, 王水, 等. 可手术乳腺癌循环肿瘤细胞与原发肿瘤临床病理特征的关系 [J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2013, 7(2): 80-85.

(收稿日期: 2016-11-29)

郭亮, 吴灵. 肿瘤患者外周血免疫细胞在疗效预测及预后价值中的研究进展 [J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2018, 12(5): 299-301.