

胃癌中免疫细胞浸润模式及其临床意义\*

欧阳燕<sup>1,2</sup>, 张世超<sup>1,2</sup>, 贾 义<sup>1,2</sup>, 胡祖权<sup>1,2</sup>, 王 赞<sup>1,3</sup>, 周 静<sup>2</sup>, 刘丽娜<sup>1,2</sup>,  
唐福州<sup>1,2</sup>, 曾 柱<sup>1,2,3\*\*</sup>

(1. 贵州医科大学 生物与医学工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 生物与工程学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

[摘 要] 目的: 研究胃癌中免疫细胞的浸润模式,探究浸润的免疫细胞与肿瘤预后的关系。方法: 对 375 个非转移性胃癌患者肿瘤样本的基因表达数据进行计算分析,通过 CIBERSORT 软件计算 22 种免疫细胞类型的比例,用 Cox 回归模型评估肿瘤中浸润性免疫细胞与总生存期(OS)之间的关系。结果: 375 例胃癌患者肿瘤组织中巨噬细胞(31.9%)、未活化的 CD4 + 记忆性 T 细胞(16.5%)、CD8 T 细胞(13.5%)、调节性 T 细胞(6.8%)比较丰富,随着胃癌患者肿瘤分期的增加,γδ T 细胞和 M2 巨噬细胞的比例逐渐上升,而活化的自然杀伤细胞和 M0 巨噬细胞的比例逐渐降低;较高水平的滤泡辅助性 T 细胞与胃癌患者较长的 OS 相关,而较高比例的 M2 巨噬细胞、单核细胞和未活化的树突状细胞与较差 OS 相关。结论: 肿瘤中浸润性免疫细胞的组成在胃癌各个分期中存在较大的差异,浸润性免疫细胞可以作为肿瘤独立的预后因子。

[关键词] 胃癌; 免疫细胞; 肿瘤浸润; 预后; 免疫治疗

[中图分类号] R735. 2; R392. 12 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)11-1263-06

DOI:10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2018. 11. 005

Infiltration Patterns of Immunocyte in Gastric  
Cancer and Clinical Significance

OUYANG Yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Shichao<sup>1,2</sup>, JIA Yi<sup>1,2</sup>, HU Zuquan<sup>1,2</sup>, WANG Yun<sup>1,3</sup>,  
ZHOU Jing<sup>2</sup>, LIU Lina<sup>1,2</sup>, TANG Fuzhou<sup>1,2</sup>, ZENG Zhu<sup>1,2,3</sup>

(1. Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

3. School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the infiltration pattern of immunocyte in gastric cancer and relationship between tumor prognosis and infiltrating immunocyte. Methods: Analyses on gene expression profiles of 375 tumor samples of nonmetastatic gastric cancer patients were performed. CIBERSORT was applied to estimate the fraction of 22 immunocyte types, Cox regression model was adopted to evaluate relation between infiltrating immunocyte in tumor and overall survival (OS). Results: 375 cases of gastric cancer tissue showed results of macrophage (31.9%), non-activated CD4 + memory T cells (16.5%), CD8 T cells (13.5%), regulating T cell (6.8%) were abundant. With the increase in tumor stage of gastric cancer, the fraction of γδ T cells and M2 macrophages increased; whereas the fraction of activated natural killer cells and M0 macrophages decreased. Higher level of folliculus auxil-

\*[基金项目] 国家自然科学基金(31660258,31771014,11762006); 贵州省科技计划项目[黔科合基础(2018)1412,黔科合平台人才(2016)5676,黔科合人才团队(2015)4021]; 2011 协同创新中心[黔教合协同创新字(2015)04]; 贵州省细胞与基因工程创新群体[黔教合 KY 字(2016)031]; 贵州医科大学博士启动基金(YJ2017-10)

\*\* 通信作者 E-mail: zengzhu100@ sina. com

网络出版时间:2018-11-15 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181115.2126.011.html>

iliary T cells were related to longer OS in gastric cancer patients, while higher fractions of M2 macrophages, monocytes and resting dendritic cells were related to worse OS. **Conclusion:** The composition of tumor-infiltrating immunocyte differed greatly in different stages of gastric cancer and tumor-infiltrating immunocyte can be used as independent prognostic factors.

[**Key words**] gastric cancer; immunocyte; tumor infiltrating; prognosis; immunotherapy

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,是目前死亡率第二的癌症,全球每年有超过 95 万的新发病例<sup>[1-2]</sup>。尽管在胃癌诊断、筛查、手术切除和新辅助治疗方面取得了进展,但其临床结果仍不理想。胃癌是一种公认的异质性疾病,目前仍缺乏有助于选择个性化治疗方案的生物标志物,尤其免疫疗法<sup>[3-4]</sup>。肿瘤中免疫细胞的浸润与临床结果密切相关,肿瘤中浸润的免疫细胞最有可能作为药物靶标来提高患者的生存率。免疫检查点疗法是一类通过共抑制或共刺激等信号调节 T 细胞活性来提高抗肿瘤免疫反应的治疗方法,而免疫检查点疗法表现出显著的临床效果<sup>[5-8]</sup>。随着免疫检查点疗法的发展,肿瘤中浸润的免疫细胞的分布成为研究的焦点,以前的研究大多通过流式细胞术或免疫组织化学来评估肿瘤中浸润的免疫细胞的组成,但 these 方法都有其局限性。研究人员近期开发了一种新的生物信息学工具——CIBERSORT<sup>[9]</sup>,是由 Bindea G 等<sup>[10]</sup>开发的反卷积算法,可以基于标准化的基因表达数据来估算复杂组织的细胞组成,该方法量化特定细胞类型的丰度,并且已通过流式细胞分选术很好地验证<sup>[10]</sup>,并成功地评估了乳腺癌及肝癌组织中免疫细胞的组成<sup>[11-12]</sup>。本研究对 375 个非转移性胃癌患者肿瘤样本的基因表达数据进行了分析,应用 CIBERSORT 评估这些肿瘤样本中 22 种免疫细胞类型的比例,量化了肿瘤中参与免疫应答的细胞组成,并分析了它们与肿瘤分期及总生存期(overall survival, OS)的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据的采集

本研究从公共数据库癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA, <https://cancer-genome.nih.gov/>)中下载了其提供的所有胃癌组织样本基因表达数据和相应的临床数据,共计 375 例,没有采用特殊的排除标准。所有的数据都是通过 R 包“TCGA-Assembler”<sup>[13]</sup>下载,每一个肿瘤组织病例对应一个胃癌患者。以 RSEM 格式获得基

因表达数据,并将其转化为 TPM(transcripts per million),收集的临床数据包括年龄、性别、T 分期、临床分期、生存状态和存活时间等。

### 1.2 评估肿瘤中浸润的免疫细胞组成

本研究用 CIBERSORT(<http://cibersort.stanford.edu/>)来评估每个肿瘤组织中 22 种浸润性免疫细胞类型的相对比例,使用 LM22 特征矩阵以 1 000 个排列运行。这些肿瘤浸润的免疫细胞包括:M1 巨噬细胞(M1 macrophages)、M2 巨噬细胞(M2 macrophages)、M0 巨噬细胞(M0 macrophages)、滤泡辅助性 T 细胞(T follicular helper cells)、未活化的 CD4 + 记忆性 T 细胞(resting memory CD4 T cells)、活化的 CD4 记忆性 T 细胞(activated memory CD4 T cells)、 $\gamma\delta$  T 细胞( $\gamma\delta$  T cells)、CD8 T 细胞(CD8 T cells)、调节性 T 细胞(regulatory T cells)、幼稚 CD4 T 细胞( naïve CD4 T cells)、未活化的自然杀伤细胞(resting NK cells)、活化的自然杀伤细胞(activated NK cells)、未活化的肥大细胞(resting mast cells)、活化的肥大细胞(activated mast cells)、记忆性 B 细胞(memory B cells)、静息态树突状细胞(resting dendritic cells)、活化的树突状细胞(activated dendritic cells)、幼稚 B 细胞( naïve B cells)、单核细胞(monocytes)、中性粒细胞(neutrophils)、嗜酸性粒细胞(eosinophils)和浆细胞(plasma cells)。对于每个肿瘤样品,所有评估的免疫细胞类型分数的总和等于 1。

### 1.3 统计学方法

使用 R(3.3.2 版本)和 Bioconductor(<https://www.bioconductor.org/>)进行统计学分析。每个数据集都通过加权平均法进行处理,以比较不同分期的胃癌患者肿瘤浸润相关免疫细胞组成的差异;OS 定义为从诊断日期到死亡日期的时间间隔。采用 Cox 回归分析评估免疫细胞类型与 OS 之间的关联,其中年龄和性别作为协变量;用列表删除的方法处理丢失的数据,如果缺少任何单个值,则从分析中排除整个样本。用  $t$  检验分析不同分期胃癌患者肿瘤浸润相关免疫细胞组成的差异。对于所有统计分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 375 例胃癌病例临床病理信息

375 例胃癌样本临床病理特征,包括年龄、种族、性别、临床分期、分期等见表 1。

表 1 胃癌肿瘤样本的病理特征

Tab. 1 Characteristics of gastric cancer samples			
变量	<i>n</i>	百分比(%)	有效百分比(%)
患病年龄			
≤50	26	6.9	7.1
>50	341	90.9	92.9
未知	8	2.1	
肿瘤分期			
I	53	14.1	15.1
II	111	29.6	31.5
III	150	40.0	42.6
IV	38	10.1	10.8
未知	23	6.1	
人种			
黑种人	11	2.9	3.4
白种人	238	63.5	73.7
亚洲人	74	19.7	22.9
未知	52	13.9	
性别			
男性	241	64.3	64.3
女性	134	35.7	35.7
未知	0	0.0	
淋巴结转移			
是	156	41.6	45.2
否	189	50.4	54.8
未知	30	8.0	

2.2 肿瘤中浸润的免疫细胞的组成

用 CIBERSORT 评估了 375 例胃癌患者肿瘤组织中免疫细胞的分布情况,其中巨噬细胞(31.9%)、未活化的 CD4 + 记忆性 T 细胞(16.5%)、CD8 T 细胞(13.5%)及调节性 T 细胞(6.8%)比较丰富,而浆细胞(1.3%)、记忆性 B 细胞(1.1%)、单核细胞(0.8%)、嗜酸性粒细胞(0.4%)及  $\gamma\delta$  T 细胞(0.3%)较为稀少,见图 1。不同分期胃癌患者肿瘤中免疫细胞的组成存在很大的差异,随着患者肿瘤分期的升高, $\gamma\delta$  T 细胞和 M2 巨噬细胞的比例逐渐上升,而活化的自然杀伤细胞和 M0 巨噬细胞的比例逐渐降低,见图 2。

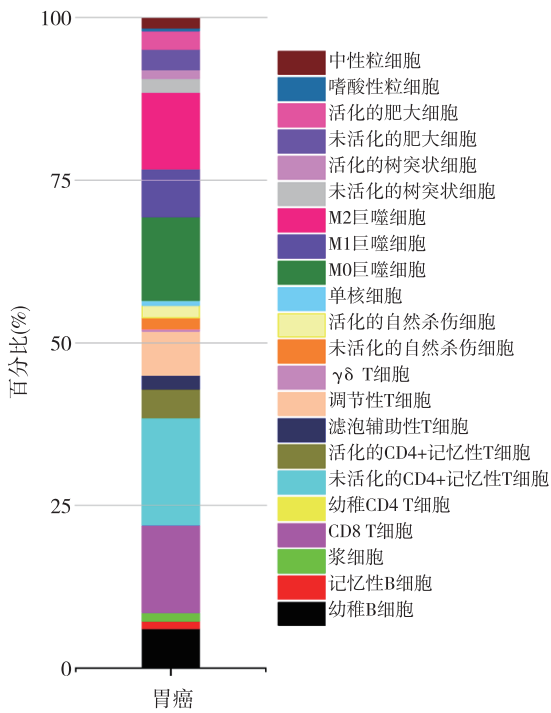


图 1 胃癌中免疫细胞类型的分布  
Fig. 1 The distribution of immunocyte fractions in gastric cancer

2.3 胃癌中免疫细胞类型与预后的关系

通过 Cox 回归分析评估免疫细胞类型与 OS 之间的关联。在所有的胃癌患者中,高水平的滤泡辅助性 T 细胞与较长的 OS 相关( $P = 0.038$ ,  $HR = 0.61$ , 95%  $CI$  为  $0.42 \sim 0.90$ ),高水平的 M2 巨噬细胞与较短的 OS 相关( $P = 0.00$ ,  $HR = 2.81$ , 95%  $CI$  为  $1.85 \sim 4.28$ ),高水平的单核细胞与较短的 OS 相关( $P = 0.026$ ,  $HR = 1.69$ , 95%  $CI$  为  $1.15 \sim 2.51$ ),高水平的静息态树突状细胞与较短的 OS 相关( $P = 0.046$ ,  $HR = 1.54$ , 95%  $CI$  为  $1.05 \sim 2.27$ );在 II 期的胃癌患者中,高水平的 M0 巨噬细胞与较短的 OS 相关( $P = 0.045$ ,  $HR = 2.04$ , 95%  $CI$  为  $1.03 \sim 4.03$ )。在 III 期的胃癌患者中,高水平的 M2 巨噬细胞与较短的 OS 相关( $P = 0.003$ ,  $HR = 3.16$ , 95%  $CI$  为  $1.66 \sim 6.04$ )。见图 3。

3 讨论

本研究基于 TCGA 队列中的基因表达数据,描述了肿瘤浸润的免疫细胞在胃癌中的分布情况。发现在胃癌不同分期时,免疫细胞的浸润模式存在较大的差异。此外,还研究了肿瘤中浸润的免疫细

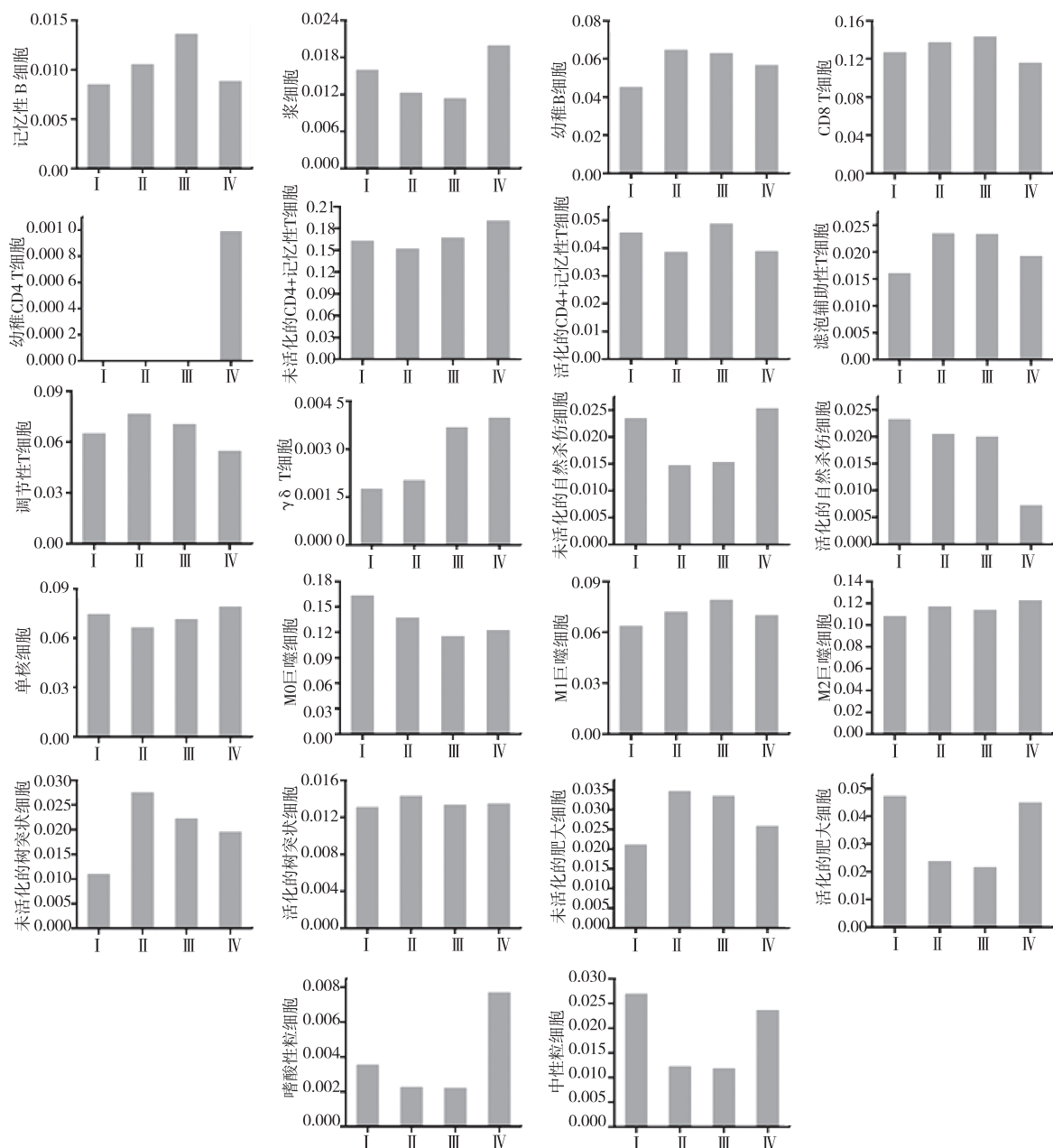


图2 不同分期胃癌患者中免疫细胞类型所占比例

Fig.2 Distribution of the fraction of the immunocyte-type proportion in the different stages of gastric cancer

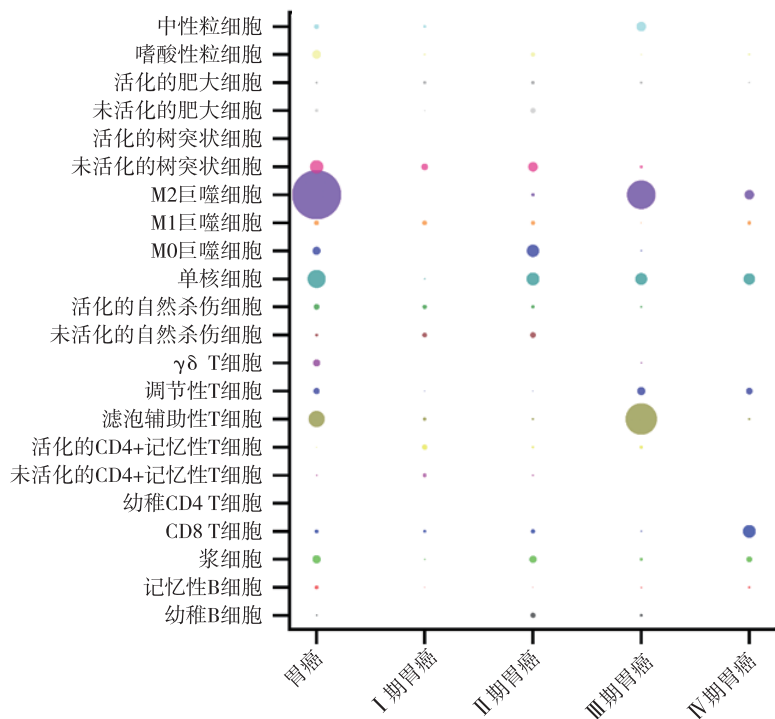
胞与临床结果的复杂关联,揭示了其在胃癌中的预后价值。

巨噬细胞可根据其功能分为经典的 M1 和替代型 M2 巨噬细胞<sup>[14]</sup>,M1 巨噬细胞参与炎症反应和抗肿瘤免疫,而 M2 巨噬细胞则具有促进肿瘤发展的特性<sup>[15-16]</sup>。M0 巨噬细胞由单核细胞形成,在肿瘤中尚未向 M1 或 M2 巨噬细胞亚型极化<sup>[17]</sup>。本研究发现,在 II 期的胃癌患者中,高水平的 M0 巨噬细胞与较差的 OS 相关;在 III 期的胃癌患者

中,高水平的 M2 巨噬细胞与较差的 OS 相关;并且随着患者肿瘤分期的升高,M2 巨噬细胞的比例逐渐上升。这暗示在肿瘤进展期间,巨噬细胞将被逐渐募集到肿瘤组织中,改变肿瘤微环境以调节肿瘤进展。

本研究结果显示,高水平的滤泡辅助性 T 细胞与胃癌患者较好的 OS 相关。滤泡辅助性 T 细胞可以引发 B 细胞启动滤泡外和生发中心的抗体反应。以前研究表明,浸润性的滤泡辅助性 T 细胞





注:圆的大小代表统计的显著性水平

图3  肿瘤中浸润的免疫细胞与胃癌 OS 的相关性

Fig. 3  Relevance of tumor-infiltrating immunocyte and gastric cancer OS

在结直肠癌和乳腺癌中具有保护作用<sup>[18]</sup>,与患者的存活率呈正相关。本研究表明,滤泡辅助性 T 细胞可以提高胃癌患者生存率并且减少免疫抑制。

$\gamma\delta$  T 细胞在特定的初级免疫反应、肿瘤监测和免疫调节中发挥关键作用<sup>[19]</sup>。它能产生抗肿瘤细胞因子——干扰素  $\gamma$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$ ,并在体外和体内显示出抗肿瘤的特性, $\gamma\delta$  T 细胞是许多恶性肿瘤中有利于预后的免疫细胞群<sup>[20-21]</sup>。本研究发现, $\gamma\delta$  T 细胞的比例随着肿瘤分期的升高而升高。这暗示了  $\gamma\delta$  T 细胞在调节胃癌发展过程中,有着重要的作用。

循环中的单核细胞能够被招募到肿瘤组织,受肿瘤微环境影响后,分化为肿瘤相关的巨噬细胞,从而促进肿瘤的生长和转移<sup>[22]</sup>。有证据表明浸润的单核细胞与肺癌患者较短的存活期相关。本研究表明,高比例的单核细胞与胃癌患者较差的预后相关,这进一步证明了单核细胞在促进肿瘤发展中的作用。

综上所述,本研究确定了浸润性免疫细胞与胃癌进展之间的关系,并发现了浸润性免疫细胞在胃癌中的预测作用。浸润性免疫细胞组成的变化表

明免疫系统在胃癌中起着复杂的作用,与临床结果密切相关。有初步证据表明,免疫疗法可以有效治愈胃癌,而为每位患者选择个性化治疗方案至关重要,本研究结果将有助于推动该领域的进展。

4 参考文献

[1] BUI Q L, GRAZZIOTIN-SOARES D, HASINIATSY R E, et al. Metastatic stomach cancer: Clinical trials in Asia and in Occident[J]. Bull Cancer, 2018, 18:30233 – 30239.

[2] ARNOLD M, MOORE S P, HASSLER S, et al. The burden of stomach cancer in indigenous populations: a systematic review and global assessment[J]. Gut, 2014,63 (1):64 – 71.

[3] NOTO J M, PEEK RM, J R. The gastric microbiome, its interaction with Helicobacter pylori, and its potential role in the progression to stomach cancer[J]. PLoS Pathog, 2017,13(10):e1006573.

[4] YOSHIZAWA N, YAMAGUCHI H, KAMINISHI M. Differential diagnosis of solitary gastric Peutz-Jeghers-type polyp with stomach cancer: a case report[J]. Int J Surg

Case Rep, 2018, 51:261 – 264.

- [5] SCHADENDORF D, HODI F S, ROBERT C, et al. Pooled Analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(17):1889 – 1894.
- [6] LOTE H, CAFFERKEY C, CHAU I. PD-1 and PD-L1 blockade in gastrointestinal malignancies [J]. Cancer Treat Rev, 2015,41(10):893 – 903.
- [7] DAVIDSON M, OKINES A F, STARLING N. Current and future therapies for advanced gastric cancer[J]. Clin Colorectal Cancer, 2015,14(4):239 – 250.
- [8] NEWMAN A M, LIU C L, GREEN M R, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles [J]. Nat Methods, 2015,12(5):453 – 457.
- [9] CHAROENTONG P, FINOTELLO F, ANGELOVA M, et al. Pan-cancer immunogenomic analyses reveal genotype-immunophenotype relationships and predictors of response to checkpoint blockade[J]. Cell Rep, 2017,18(1):248 – 262.
- [10] BINDEA G, MLECNIK B, TOSOLINI M, et al. Spatio-temporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer [J]. Immunity, 2013,39(4):782 – 795.
- [11] ALI H R, CHLON L, PHAROAH P D, et al. Patterns of immune infiltration in breast cancer and their clinical implications; A gene-expression-based retrospective study [J]. PLoS Med, 2016, 13(12):e1002194.
- [12] ROHR-UDILOVA N, KLINGLMULLER F, SCHULTE-HERMANN R, et al. Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma [J]. Sci Rep, 2018,8(1):6220.
- [13] ZHU Y, QIU P, JI Y. TCGA-assembler: open-source software for retrieving and processing TCGA data[J]. Nat Methods, 2014,11(6):599 – 600.
- [14] CHANMEE T, ONTONG P, KONNO K, et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment[J]. Cancers (Basel), 2014,6(3):1670 – 1690.
- [15] RHEE I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment[J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(11):1588 – 1596.
- [16] LIU X, WU S, YANG Y, et al. The prognostic landscape of tumor-infiltrating immune cell and immunomodulators in lung cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95:55 – 61.
- [17] BENISE R D, SOTIRIOU C, PICCART-GEHBART M J, et al. Relevance of tumor-infiltrating immune Cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2017,109(1): djw192.
- [18] ZHANG R, QI CF, HU Y, et al. T follicular helper cells restricted by IRF8 contribute to T cell-mediated inflammation[J]. Journal of autoimmunity, 2018, 18: 30287 – 30287.
- [19] PENNINGTON D J, SILVA-SANTOS B, HAYDAY A C. Gammadelta T cell development--having the strength to get there[J]. Curr Opin Immunol, 2005, 17(2):108 – 115.
- [20] GENTLES A J, NEWMAN A M, LIU C L, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers [J]. Nat Med, 2015, 21(8):938 – 945.
- [21] LO PRESTI E, PIZZOLATO G, GULOTTA E, et al. Current advances in gammadelta T cell-based tumor immunotherapy[J]. Front Immunol, 2017,8:1401.
- [22] LI C, LUO X, LIN Y, et al. A Higher frequency of CD14 + CD169 + monocytes/macrophages in patients with colorectal cancer[J]. PLoS One, 2015,10(10): e0141817.

(2018-08-25 收稿,2018-10-28 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅