



· 论 著 ·

# 肝细胞癌组织ICOS<sup>+</sup>T细胞的多重免疫组织化学检测及其预后价值研究

马家强<sup>1,2</sup>, 曹春梅<sup>3</sup>, Shyamal Goswami<sup>2</sup>, 陈 沁<sup>1</sup>, 高 强<sup>4</sup>, 张晓明<sup>2</sup>

1. 上海大学生命科学学院, 上海 200444 ;
2. 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031 ;
3. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032 ;
4. 复旦大学附属中山医院肝脏外科, 上海 200032

**[摘要]** 背景与目的: 诱导共刺激分子 (inducible costimulator, ICOS) 属于B7-CD28免疫球蛋白超家族成员, 表达于活化T细胞表面, 在T细胞的激活和免疫应答中发挥重要作用; 但目前对于ICOS及ICOS<sup>+</sup>T细胞在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 肿瘤组织中的表达及其意义尚不清楚。该研究旨在测定ICOS、ICOS<sup>+</sup>T细胞在HCC患者肿瘤组织中的表达情况并探讨其预后价值。方法: 应用组织芯片 (tissue microarrays, TMAs) 和多重免疫组织化学技术 (multiplex immunohistochemistry, mIHC) 检测2006—2007年在复旦大学附属中山医院接受手术治疗的358例原发性HCC患者肿瘤组织和癌旁组织中ICOS<sup>+</sup>细胞、ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>及ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润密度和ICOS<sup>+</sup>细胞占CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞的百分比。应用Kaplan-Meier法和多因素COX回归模型分析上述指标对患者预后的影响。结果: 与癌旁组织相比, ICOS<sup>+</sup>细胞和ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞在肿瘤组织中浸润数量显著增加 ( $P<0.0001$ 和 $P=0.0091$ ), 而ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞则呈相反的降低趋势 ( $P=0.033$ ); 在肿瘤中, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞的浸润程度显著高于ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞。此外, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞占各自T细胞亚群的百分比在肿瘤组织中均显著增加 ( $P$ 均 $<0.0001$ )。预后分析发现, 肿瘤组织中ICOS<sup>+</sup>细胞、ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>及ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞浸润高的患者总生存期 (overall survival, OS) 更长, 多因素分析证实上述指标是HCC的独立预后良好因素。结论: ICOS在HCC患者的肿瘤组织中高表达, 且ICOS<sup>+</sup>细胞、ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>及ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞是OS的独立预后良好因素, 提示上述指标可作为新的HCC预后免疫标志物。

**[关键词]** 肝细胞癌; 诱导共刺激分子; 多重免疫组织化学技术; 预后

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.05.005

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)05-0352-10

**Detection of ICOS<sup>+</sup>T cells by multiplex immunohistochemistry in tumor tissue and its clinical significance in hepatocellular carcinoma** MA Jiaqiang<sup>1,2</sup>, CAO Chunmei<sup>3</sup>, Shyamal Goswami<sup>2</sup>, CHEN Qin<sup>1</sup>, GAO qiang<sup>4</sup>, ZHANG Xiaoming<sup>2</sup> (1. School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China; 2. Institute Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 3. Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 4. Department of Liver Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: ZHANG Xiaoming E-mail: xmzhang@ips.ac.cn

**[Abstract]** **Background and purpose:** Inducible costimulator (ICOS) is a member of B7-CD28 immunoglobulin superfamily and expressed on the surface of activated T cells, which plays an important role in T cell activation and effector functions. However, the expression pattern and the significance of ICOS and ICOS<sup>+</sup>T cells in tumor tissue of hepatocellular carcinoma (HCC) are not defined. To this end, the current study was planned to quantitatively detect the expression of ICOS and ICOS<sup>+</sup>T cells in the tumor tissue of HCC patients and evaluate their clinical significance. **Methods:** Tissue microarrays (TMAs) and multiplex immunohistochemistry

**基金项目:** 中国科学院战略性先导科技专项 (XDB29030302); 前沿科学重点研究计划前沿科学重点项目 (QYZDB-SSW-SMC036) 和创新交叉团队项目; 国家自然科学基金 (81602488)。

通信作者: 张晓明 E-mail: xmzhang@ips.ac.cn

(mIHC) were used to detect the expression levels of ICOS<sup>+</sup> cells, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in tumor and paracancerous tissues from HCC patients who received surgical treatment in Zhongshan Hospital, Fudan University from 2006 to 2007 ( $n=358$ ). The clinical prognosis was evaluated by Kaplan-Meier analysis and COX regression analysis. **Results:** The densities of infiltrating ICOS<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were significantly higher in tumor tissue than in paracancerous tissue ( $P<0.0001$  and  $P=0.0091$ ). By contrast, the density of ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells was significantly lower in tumor tissue than in paracancerous tissue ( $P=0.033$ ). Within the tumor tissue, the density of ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells was significantly higher compared with ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells ( $P<0.0001$ ). Moreover, the frequencies of ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in tumor tissue were significantly higher compared with their counterparts in paracancerous tissue ( $P<0.0001$ ). Multivariate COX regression analysis identified that ICOS<sup>+</sup> cells, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells were independent favorable prognostic indices for overall survival (OS). **Conclusion:** Tumor infiltrating ICOS<sup>+</sup> cells are greatly elevated in the tumor tissue of HCC, and their abundance is associated with prolonged OS. Thus, ICOS<sup>+</sup> cells, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells might be used as novel prognostic immune biomarkers for HCC.

**[Key words]** Hepatocellular carcinoma; Inducible costimulator; Multiplex immunohistochemistry; Prognosis

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝癌, 是造成肝脏恶性肿瘤患者死亡的重要病因之一。目前, 早期肝癌患者的主要治疗手段包括手术切除、肝移植和射频消融等<sup>[1-2]</sup>, 但是对于晚期患者的治疗手段仍非常有限。大量的研究表明, 局部免疫反应会影响HCC患者的肿瘤免疫应答, 如细胞毒性CD8<sup>+</sup> T细胞高浸润患者的预后良好, 而调节性T细胞 (regulatory T cell, Treg) 高浸润患者的预后不良<sup>[3]</sup>。近年来, 针对程序性死亡 [蛋白]-1 (programmed death-1, PD-1) 和溶细胞性T淋巴细胞相关抗原4 (cytolytic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4) 等免疫检查点抑制剂治疗在黑色素瘤、非小细胞肺癌和肾细胞癌等恶性肿瘤中呈现良好的治疗前景<sup>[4-5]</sup>, 然而在HCC中, 阻断PD-1/程序性死亡 [蛋白]-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 通路的免疫治疗总体有效率只有15%~20%<sup>[6]</sup>, 显然迫切需要研究HCC的局部和整体免疫应答机制, 以此来提高HCC患者的免疫治疗应答率。

诱导共刺激分子 (inducible costimulator, ICOS) 是CD28家族成员, 表达于活化的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞上<sup>[7]</sup>, 与其配体ICOSL相互作用调节适应性T细胞免疫应答。该通路的激活可以促进不同类型的T细胞分泌大量细胞因子, 包括白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-5、IL-10、IL-17和干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )<sup>[8]</sup>。如在乳腺癌中ICOS可以调节肿瘤组织中CD4<sup>+</sup> T细胞和浆细胞样树突状细胞 (plasmacytoid dendritic

cells, pDCs) 的相互作用, 从而促进Treg分泌IL-10, 增强免疫抑制功能<sup>[9]</sup>。然而, 在结直肠癌和膀胱癌患者中, ICOS可促进Th1效应T细胞分泌IFN- $\gamma$ <sup>[10]</sup>。以上研究提示ICOS在不同肿瘤中可能发挥着不同的作用, 但目前对于ICOS在HCC中的表达情况及其临床意义尚不清楚。

针对上述关键科学问题, 本研究采用多重免疫组织化学技术 (multiplex immunohistochemistry, mIHC) 检测HCC患者肿瘤组织和癌旁组织中ICOS及其在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞中的表达情况, 并探讨其临床预后价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本收集

本研究收集的358例 (男性296例, 女性62例) 样本来自2006—2007年在复旦大学附属中山医院接受手术治疗的原发性HCC患者。在358例患者的甲醛固定石蜡包埋 (formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 的肿瘤组织和癌旁组织蜡块中获取直径为1 mm的组织孔, 然后将4  $\mu\text{m}$  HCC患者组织切片放置在由3-氨基丙基三乙氧基硅烷 [(3-aminopropyl) triethoxysilane, APTES] 包被过的载玻片上, 制作成组织芯片 (tissue microarrays, TMAs)。从医学数据库中获取患者的临床和病理学信息, 肿瘤分化程度通过Edmondson分级系统进行分级<sup>[3]</sup>, 患者在手术前均未接受抗肿瘤或免疫抑制治疗。所有患者均知情同意并签署知情同意书, 本研究经复旦大学附

属中山医院伦理委员会的审查批准。

## 1.2 主要试剂设备

免疫组织化学抗体包括CD8抗体(丹麦Dako公司)、CD4抗体(美国eBioscience公司)和ICOS抗体(美国Cell Signaling Technology公司), 免疫荧光染料包括Opal-650(美国Perkin Elmer公司)、Opal-570(美国Perkin Elmer公司)和Opal-520(美国Perkin Elmer公司), 兔二抗和鼠二抗均购自美国Vector Laboratories公司。主要设备包括Vectra 3定量病理学成像系统(美国Perkin Elmer公司)。

## 1.3 mIHC检测及结果分析

本研究采取的mIHC在参考文献[11]的基础上进行适当优化。采用FFPE制备的4 μm厚的TMA通过二甲苯进行脱蜡, 之后经过100%、95%、85%、75%的梯度乙醇复水。抗原修复利用预热的表位修复试剂(1×柠檬酸钠缓冲溶液, pH=6.0, 美国PerkinElmer公司)微波炉抗原热修复10 min, 然后利用3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温温育20 min进行内源过氧化氢酶灭活, 利用10%的羊血清室温温育20 min以封闭非特异性表位, 之后一抗4℃冰箱过夜: 分别为鼠抗CD4抗体、鼠抗CD8抗体和兔抗ICOS抗体。洗膜缓冲液(Tris Buffered Saline Tween, TBST)洗5 min×3次, 滴加二抗于室温温育20 min, TBST洗5 min×3次, 滴加Opal-650、Opal-570和Opal-520对每个抗体的抗原表位进行显色。使用Perkin Elmer Vectra系统对TMA的组织孔进行扫描读片, 并使用Perkin Elmer inForm软件进行批量数据分析和R软件进行阳性细胞的鉴定和计数。

## 1.4 统计学处理

采用R、SPSS 22和Prism 6.0软件完成数据分析, 两组之间比较使用Wilcoxon matched-pairs signed rank检验。采用Spearman相关性分析免疫指标之间的相关性。ICOS及其亚群的表达与患者临床病理学特征的关系采用 $\chi^2$ 检验及Spearman相关分析, 对于生存分析, Kaplan-Meier曲线利用Log-rank检验进行评估, HCC患者根据Youden指数以获得最优的cutoff值, 并将HCC患者分为High和Low两组。单因素和多因素分析采用COX

回归模型。所有检验均为双侧检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 HCC患者的基本信息

358例患者的临床信息和病理学特征见表1。患者年龄为18~78岁, 平均(52.4±10.8)岁; 其中男性为主要人群(82.7%)。所有患者中, 330例(92.2%)为乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性患者。221例(61.7%)患者甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)高于20 ng/mL。132例(36.9%)患者肿瘤大于5 cm。利用Kaplan-Meier的分析方法, HCC患者1、3和5年的总生存率(overall survival, OS)分别为93%、64%和40%, 1、3和5年的无复发生存率(relapse-free survival, RFS)分别为85%、63%和51%。

表1 HCC患者临床数据

Tab. 1 Clinical characteristics of HCC patients	
Characteristics	Number
Gender (male vs female)	296/62
HBsAg (negative vs positive)	28/330
Liver cirrhosis (no vs yes)	58/300
Tumor differentiation (I + II vs III + IV)	257/101
Microvascular invasion (no vs yes)	241/117
TNM (I / II / III)	207/116/35
BCLC (0/A/B/C)	49/110/82/117
Tumor number (single vs multiple)	302/56
Tumor size D/cm (≤5 vs >5)	226/132
Serum AFP ρ <sub>B</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> ) (≤20 vs >20)	137/221
Recurrence (no vs yes)	207/151
Death (no vs yes)	175/183

BCLC: Barcelona clinic liver cancer

### 2.2 ICOS及其在CD4和CD8细胞上的表达测定

我们首先建立了基于mIHC的, 在肝脏石蜡组织芯片上同时检测CD4、CD8和ICOS的实验方案, 可在肿瘤组织和癌旁组织中清晰地检测到ICOS<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞, 并且与参考文献[7]相符, ICOS局限表达于CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞中(图1A)。随后我们对HCC患者肿瘤及癌旁的ICOS表达情况进行分析, 与癌旁组织比较, 肿瘤组织中浸润的ICOS<sup>+</sup>细胞密度显著升高[癌旁: 中位数=152/mm<sup>2</sup>(四分位数间

距: 63.5~383.0) /mm<sup>2</sup> vs 肿瘤: 中位数=229.75/mm<sup>2</sup> (四分位数间距: 79.5~646.5) /mm<sup>2</sup>,  $P<0.0001$ ] (图1B)。Spearman相关性分析结果显示, HCC患者肿瘤组织中浸润的ICOS<sup>+</sup>细胞密度与CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞密度呈显著正相关 ( $r=0.6687$ ,  $P<0.0001$ ;  $r=0.8128$ ,  $P<0.0001$ ) (图1C), 与ICOS表达于T细胞的特点相符。我们随后测定了ICOS在CD4<sup>+</sup> T细胞和CD8<sup>+</sup> T细胞上的表达情况, 结果发现, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T细胞在肿瘤组织中的浸润密度显著升高 [癌旁: 中位数=136.5/mm<sup>2</sup> (四分位数间距: 50.25~354.50) /mm<sup>2</sup> vs 肿瘤: 中位数=162.5/mm<sup>2</sup> (四分位数间距: 53.00~583.00) /mm<sup>2</sup>,  $P=0.0091$ ]; 而ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞则相反, 在肿瘤组织中的浸润密度显著降低 [癌旁: 中位数=108/mm<sup>2</sup> (四分位数间距: 37.50~278.00) /mm<sup>2</sup> vs 肿瘤: 中位数

=55/mm<sup>2</sup> (四分位数间距: 14.00~245.38) /mm<sup>2</sup>,  $P=0.033$ ] (图1D)。在肿瘤组织中, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T细胞的浸润密度显著高于ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞的浸润密度 ( $P<0.0001$ )。

我们进一步比较了肿瘤组织和癌旁组织中ICOS表达在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的百分比指标。ICOS<sup>+</sup>%CD4<sup>+</sup> T细胞的百分比在肿瘤组织中显著升高 [癌旁: 中位数=9.68% (四分位数间距: 4.61~21.70) % vs 肿瘤: 中位数=15.66% (四分位数间距: 6.44~30.90) %,  $P<0.0001$ ]; 与此类似, ICOS<sup>+</sup>%CD8<sup>+</sup> T细胞的百分比也在肿瘤组织中显著升高 [癌旁: 中位数=29.37% (四分位数间距: 16.68~51.67) % vs 肿瘤: 中位数=39.1% (四分位数间距: 22.16~64.79) %,  $P<0.0001$ ] (图1E)。

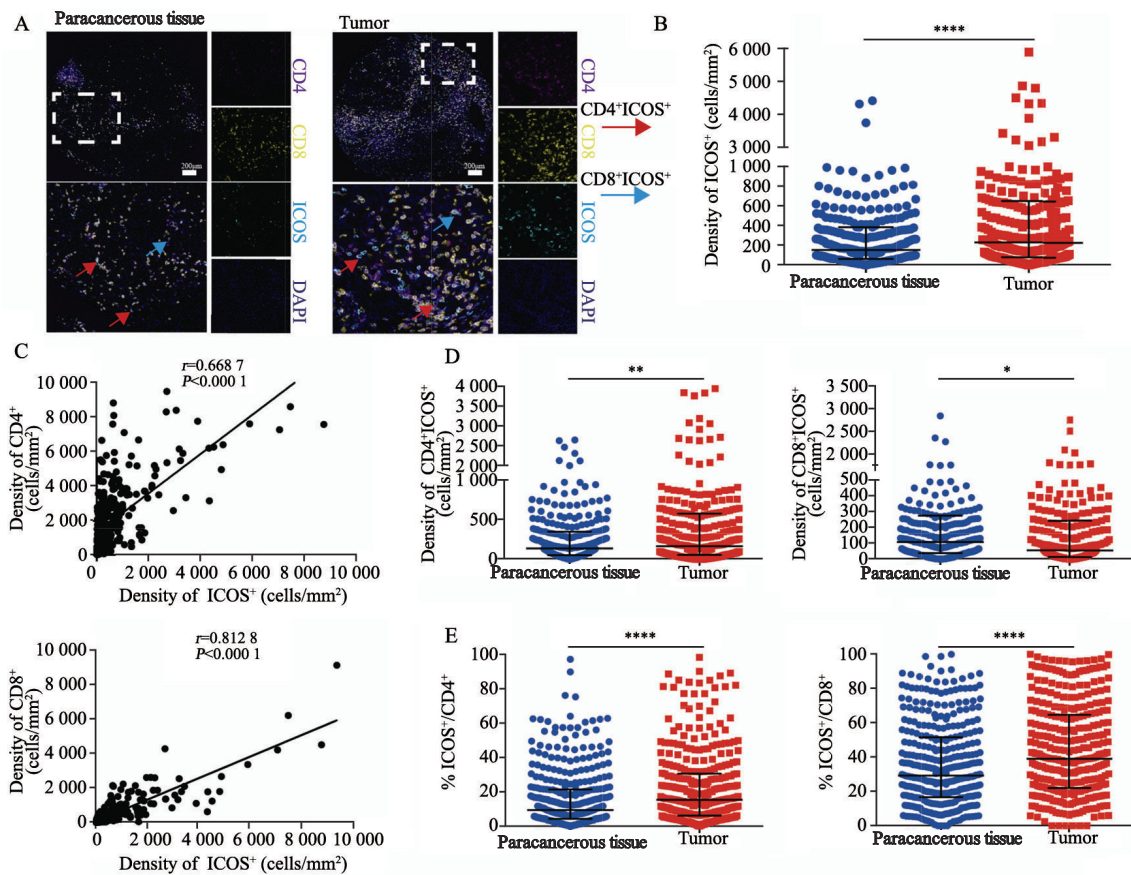


图 1 ICOS及其在CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞中的表达情况

Fig. 1 The expression of ICOS on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in HCC patients

A: Representative multiplex immunofluorescence images show the staining of the subsets of ICOS<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocytes: the red arrows (CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>), the purple arrow (CD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>); B: Comparison of the density of ICOS<sup>+</sup> cells between tumor and paracancerous tissues of HCC; C: Correlation analysis between the density of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and ICOS<sup>+</sup> cells in HCC tumor tissues; D, E: Comparison of the density and frequency of ICOS<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells and ICOS<sup>+</sup> among CD8<sup>+</sup> T cells between tumor and paracancerous tissues of HCC. Significance was assessed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test (B, D, E). \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$

以上研究结果表明, 与癌旁组织相比, HCC 肿瘤组织中的ICOS<sup>+</sup>细胞密度显著升高, 并且ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T细胞占据了ICOS<sup>+</sup>细胞的主体。而从ICOS<sup>+</sup>的细胞百分比看, 肿瘤组织中的ICOS<sup>+</sup>细胞占CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞的百分比显著高于癌旁组织。上述结果提示, 肿瘤微环境可能促进了CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞表达ICOS。

### 2.3 ICOS<sup>+</sup>细胞及其亚群的预后意义

在肿瘤中, ICOS<sup>+</sup>、ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T细胞和

ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞浸润密度越高, 患者的OS越高 ( $P=0.015$ 、 $0.003$ 和 $0.001$ , 图2A)。RFS和OS趋势类似, 但差异无统计学意义 ( $P=0.281$ 、 $0.248$ 和 $0.129$ , 图2B)。ICOS<sup>+</sup>%CD4<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>%CD8<sup>+</sup>百分比高的患者, 其OS和RFS均明显优于百分比低的患者, 差异有统计学意义 (OS:  $P=0.002$ 和 $P=0.035$ ; RFS:  $P=0.022$ 和 $P=0.110$ , 图3)。

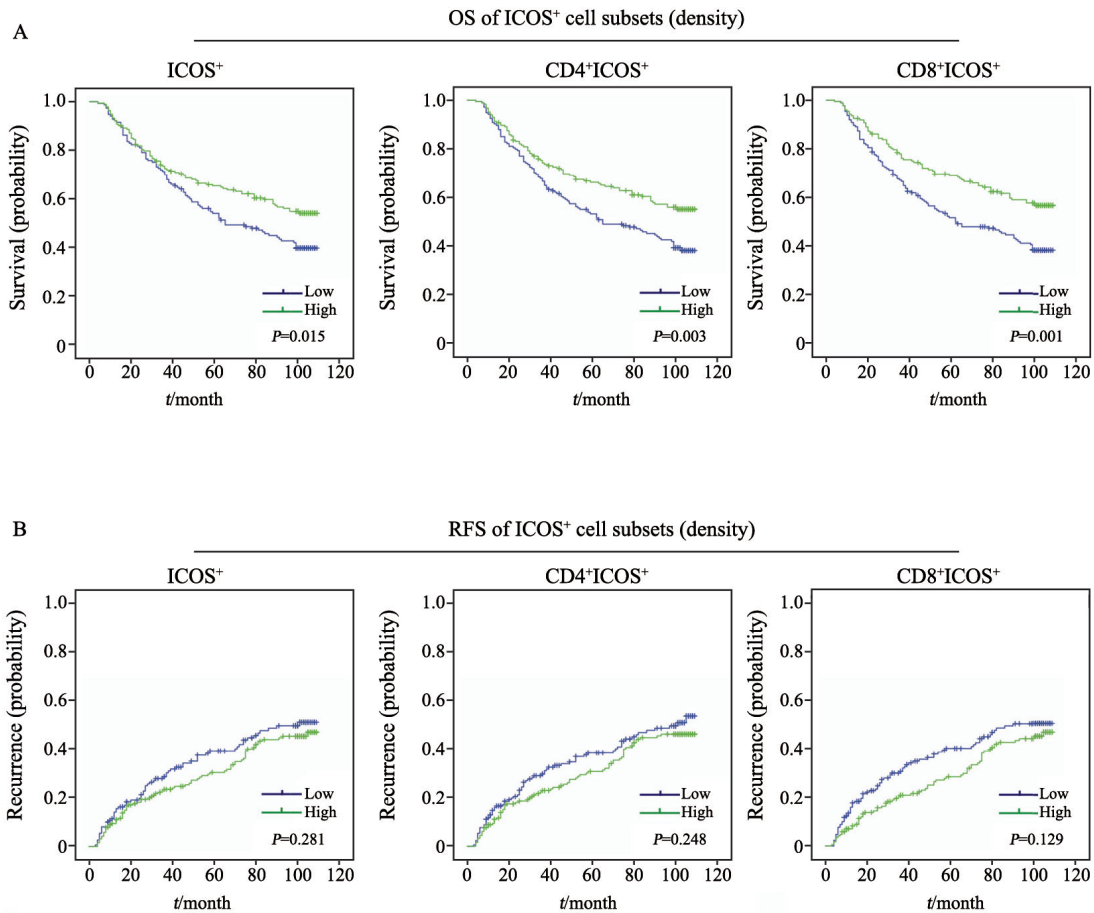


图2 ICOS<sup>+</sup>细胞浸润程度对HCC患者预后的影响

Fig. 2 Prognostic study of the density of ICOS<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocyte subsets in HCC tumor tissues

A, B: Kaplan-Meier analysis of OS and RFS for the density of ICOS<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> T cells in tumor of HCC patients

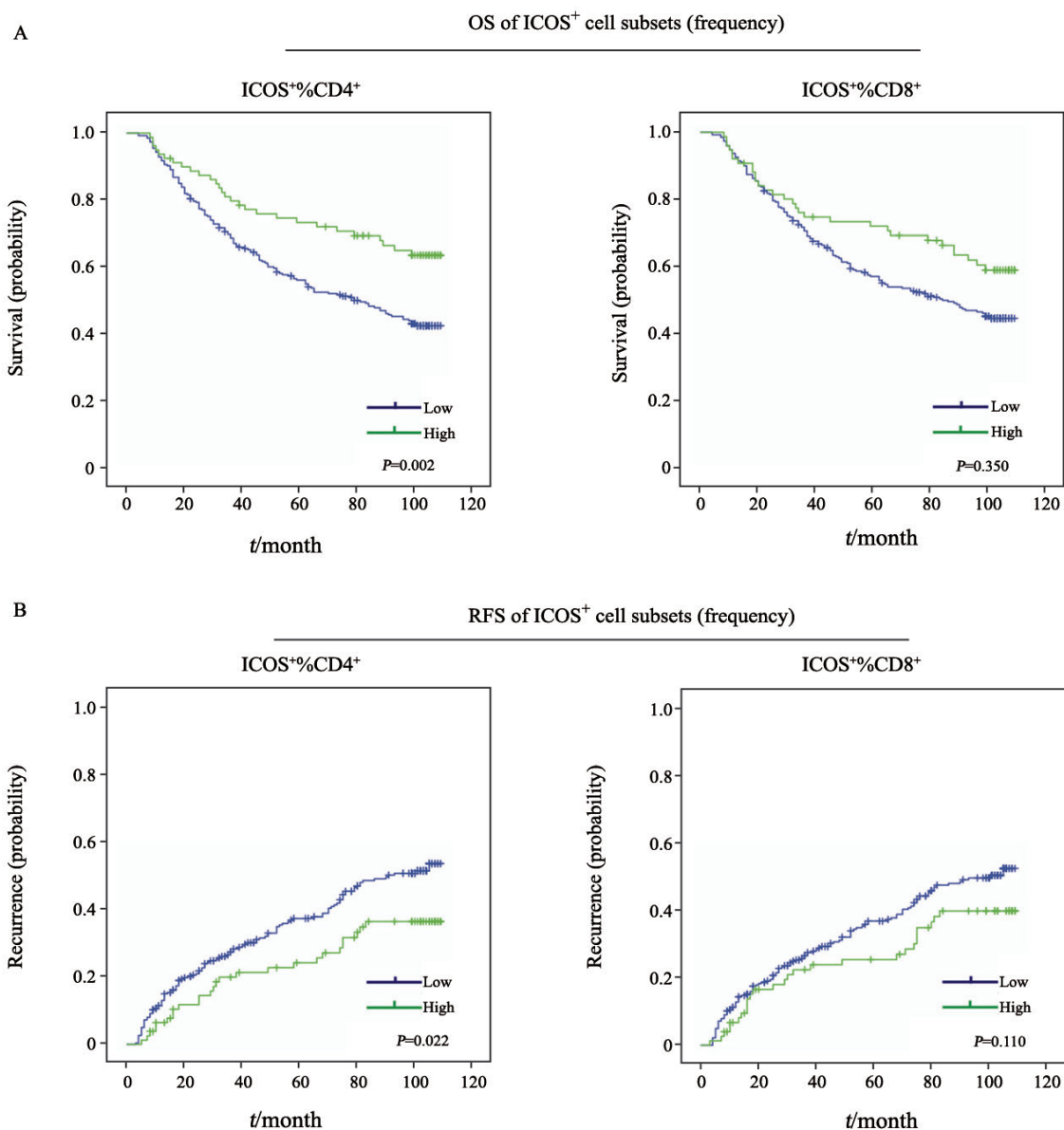


图3 ICOS<sup>+</sup>浸润T细胞百分比对HCC患者预后的影响

Fig. 3 Prognostic study of the frequency of ICOS<sup>+</sup> tumor infiltrating lymphocyte subsets in HCC tumor tissues

A, B: Kaplan-Meier analysis of OS and RFS for the frequency of ICOS<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells or CD8<sup>+</sup> T cells in tumor of HCC patients

### 2.4 ICOS<sup>+</sup>细胞的单因素和多因素检验分析

单因素分析发现，有7个临床指标对于OS有意义，分别为肝硬化、丙氨酸转氨酶（alanine transaminase, ALT）、γ-谷氨酰转肽酶（γ-glutamyl transpeptidase, γ-GT）、肿瘤大小、肿瘤数量、血管浸润和TNM分期（表

2）。把上述指标纳入多因素分析后发现，ICOS<sup>+</sup>、ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>细胞密度是OS的独立预后良好因素，同时百分比ICOS+%CD4<sup>+</sup>和ICOS+%CD8<sup>+</sup>也是OS的独立预后良好因素（表3）。

表2 OS的单因素分析

Tab. 2 Univariate analysis for OS

Variable	Univariate analysis	A		B		C		D		E	
	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value
Hepatic cirrhosis (yes vs no)	0.030	1.610 (1.013-2.557)	0.044	1.573 (0.990-2.500)	0.055	1.596 (1.004-2.535)	0.048	1.590 (0.999-2.531)	0.051	1.519 (0.953-2.419)	0.079
Serum ALT $\bar{x}_B$ (U·L <sup>-1</sup> ) (>40 vs ≤40)	0.001	1.344 (0.988-1.829)	0.059	1.363 (1.002-1.855)	0.049	1.322 (0.975-1.791)	0.072	1.472 (1.087-1.994)	0.013	1.388 (1.023-1.883)	0.350
$\gamma$ -GT $\bar{x}_B$ (U·L <sup>-1</sup> ) (>75 vs ≤75)	0.023	1.390 (0.948-2.037)	0.092	1.442 (0.981-2.118)	0.062	1.383 (0.951-2.011)	0.090	1.351 (0.923-1.979)	0.122	1.414 (0.965-2.072)	0.075
Tumor size <i>D</i> /cm (>5 vs ≤5)	<0.000 1	1.792 (1.319-2.434)	<0.000 1	1.747 (1.285-2.375)	<0.000 1	1.804 (1.333-2.442)	<0.000 1	1.809 (1.329-2.461)	<0.000 1	1.757 (1.292-2.389)	<0.000 1
Tumor number (multiple vs single)	0.001	1.736 (1.200-2.513)	0.003	1.761 (1.217-2.548)	0.003	1.579 (1.099-2.267)	0.013	1.668 (1.149-2.421)	0.007	1.751 (1.210-2.533)	0.003
Vascular invasion (yes vs no)	<0.000 1	1.780 (1.302-2.433)	<0.000 1	1.753 (1.284-2.394)	<0.000 1	1.685 (1.240-2.289)	0.001	1.700 (1.245-2.322)	0.001	1.717 (1.260-2.314)	0.001
TNM stage (I vs II-III)	<0.000 1	0.940 (0.451-1.958)	0.869	0.855 (0.411-1.780)	0.676	1.066 (0.522-2.178)	0.861	1.015 (0.482-2.138)	0.969	0.989 (0.474-2.060)	0.976

表3 OS的多因素分析

Tab. 3 Multivariate analysis for OS

Variable	Multivariate analysis	A		B		C		D		E	
	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value
ICOS <sup>+</sup> cell (high vs low)	0.016	0.635 (0.468-0.861)	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-
ICOS <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T cell (high vs low)	0.001	-	-	0.555 (0.408-0.755)	<0.000 1	-	-	-	-	-	-
ICOS <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (high vs low)	0.003	-	-	-	-	0.630 (0.466-0.851)	0.003	-	-	-	-
ICOS <sup>+</sup> %CD8 <sup>+</sup> (high vs low)	0.037	-	-	-	-	-	-	0.626 (0.420-0.933)	0.021	-	-
ICOS <sup>+</sup> %CD4 <sup>+</sup> (high vs low)	0.003	-	-	-	-	-	-	-	-	0.510 (0.338-0.770)	0.001

## 2.5 HCC组织中ICOS<sup>+</sup>细胞及其亚群的分布与患者临床病理学特征的关系

在肿瘤浸润的ICOS<sup>+</sup>细胞及其亚群的分布均与AFP大于20 ng/mL有关 (ICOS<sup>+</sup>,  $P=0.001$ ; ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>,  $P=0.001$ ; ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>,  $P=0.007$ ; ICOS<sup>+</sup>%CD4<sup>+</sup>,  $P=0.023$ ; ICOS<sup>+</sup>%CD8<sup>+</sup>,

$P=0.030$ )。同时, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>、ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>%CD4<sup>+</sup>的表达与肿瘤低分化程度相关 ( $P<0.05$ ), 但与患者年龄、性别、HBsAg阳性、肝硬化、ALT、血管浸润和TNM分期均无关 ( $P>0.05$ , 表4)。

表 4 肿瘤浸润ICOS<sup>+</sup>细胞与临床特征的关联性

Tab. 4 Association between tumor-infiltrating ICOS<sup>+</sup> cells and clinicopathological features

Characteristic	ICOS <sup>+</sup>			ICOS <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>			ICOS <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>			ICOS <sup>+</sup> %CD4 <sup>+</sup>			ICOS <sup>+</sup> %CD8 <sup>+</sup>		
	Low	High	P value	Low	High	P value	Low	High	P value	Low	High	P value	Low	High	P value
Age/year			0.366			0.452			0.792			0.151			0.073
≤51	62	88		67	83		74	76		121	29		124	26	
>51	91	106		96	101		100	97		146	51		147	50	
Gender			0.149			0.055			0.460			0.001			0.079
Female	21	38		21	38		27	32		36	23		41	18	
Male	132	156		142	146		147	141		231	57		230	58	
HBsAg			0.795			0.738			0.440			0.496			0.589
Negative	13	15		14	14		16	12		23	5		23	5	
Positive	140	179		149	170		158	161		244	75		248	71	
Liver cirrhosis			0.106			0.072			0.549			0.114			0.135
No	20	38		21	37		27	31		40	18		41	17	
Yes	133	156		142	147		147	142		227	62		230	59	
Serum AFP ρ <sub>B</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )			0.001			0.001			0.007			0.023			0.030
≤20	73	60		78	55		79	54		111	22		112	21	
>20	80	134		85	129		95	119		156	58		159	55	
Serum ALT z <sub>B</sub> /(U·L <sup>-1</sup> )			0.355			0.359			0.872			0.590			0.817
≤40	72	101		77	96		86	87		131	42		136	37	
>40	81	93		86	88		88	86		136	38		135	39	
Tumor differentiation			0.067			0.024			0.040			0.004			0.215
I + II	117	131		126	122		133	115		201	47		198	50	
III+IV	36	63		37	62		41	58		66	33		73	26	
Microvascular invasion			0.311			0.711			0.620			0.553			0.335
No	108	127		112	123		120	115		183	52		187	48	
Yes	45	67		51	61		54	58		84	28		84	28	
TNM stage			0.106			0.435			0.485			0.262			0.113
I	96	105		98	103		104	97		159	42		163	38	
II - III	57	89		65	81		70	76		108	38		108	38	

### 3 讨 论

ICOS是适应性免疫T细胞增殖、存活及活化的二级共刺激信号，参与众多免疫应答，包括诱导和调节Th1、Th2、Th17免疫，以及调节效应T细胞分化，同时还参与胸腺依赖的抗体应答和

生发中心（germinal center, GC）反应。因此，ICOS在适应性免疫过程中发挥了重要作用<sup>[12]</sup>，但其在人类实体肿瘤中的研究仅有少数报道，且其预后价值存在争议。例如，ICOS是乳腺癌预后不良因素，主要通过pDCs相互作用增强CD4<sup>+</sup> T细胞的免疫抑制功能<sup>[9]</sup>。然而，近期研



研究表明, ICOS在结直肠癌和鼻咽癌患者中是独立预后良好因素<sup>[10, 13]</sup>。

本研究应用mIHC测定了HCC患者肿瘤组织及癌旁组织的ICOS及ICOS<sup>+</sup>T细胞。mIHC是新近发展的一种组织多标技术, 克服了传统免疫组织化学方法的不足, 包括指标单一、结果阅读完全依赖读片者主观经验等<sup>[10]</sup>。本研究通过将多个免疫指标同时标记在同一组织上, 进一步检测和识别ICOS及其ICOS<sup>+</sup>T细胞亚群在肿瘤和癌旁组织中的表达及分布情况, 并结合先进准确的定量方式评估其在肿瘤和癌旁组织浸润的密度和百分比, 进而全面地研究ICOS和ICOS<sup>+</sup>T细胞亚群在HCC中的表达、分布及其与临床预后的关系。

本研究发现, ICOS<sup>+</sup>细胞及ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞亚群是HCC患者生存的有利预后指标; 同时, HCC患者肿瘤组织中ICOS的表达水平与CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>呈显著正相关, 表明ICOS的表达水平和肿瘤组织浸润的T细胞相关, 并可能在调节肿瘤浸润T细胞的活化和肿瘤的杀伤中起到重要作用。既往研究发现, ICOS在调节效应T细胞活化和促进细胞因子分泌中起着重要作用, 尤其是通过调节Th1的免疫应答, 并促进大量IFN- $\gamma$ 的分泌<sup>[14]</sup>。随后, Th1细胞可通过与肿瘤相关的髓样细胞[包括肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)和骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)]相互作用来抑制肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[15]</sup>。另一方面, ICOS在滤泡辅助T细胞(follicular helper T cells, Tfh)分化和发育的过程中起到重要作用<sup>[16]</sup>, 而Tfh可以通过分泌IL-21促进B细胞介导的体液免疫应答。同样, 在人体中ICOS基因缺陷与Tfh和GC的缺陷产生密切相关<sup>[17]</sup>。综上所述, ICOS的表达可能在HCC的抗肿瘤免疫中发挥重要的保护性作用。

炎症肿瘤微环境与患者生存率相关, 并且HCC对化疗具有高度耐药性, 因此免疫疗法对于HCC患者是一种潜在的治疗手段<sup>[3, 18]</sup>。但是, 临床研究数据显示, 只有15%~20%的HCC患者对PD-1阻断治疗有应答<sup>[6]</sup>, 表明阻断单一免疫

检查点是不够的。之后的研究也证实, 同时阻断PD-1和其他共抑制性分子, 尤其是CTLA4的联合治疗可以更显著地恢复T细胞功能<sup>[19-20]</sup>。但是目前仍然缺少对于免疫治疗药物应答的有效生物标志物。近期研究指出, 乳腺癌、膀胱癌和黑色素瘤患者接受ipilimumab(CTLA4抗体)治疗之后, CD4<sup>+</sup>T细胞上ICOS的表达增加<sup>[21-23]</sup>。与此类似, 膀胱癌患者术后接受ipilimumab的辅助治疗, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞比例持续高的患者存活率显著提高<sup>[24]</sup>。本研究发现, ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞是独立预后良好指标, 且与AFP大于20 ng/mL和肿瘤低分化具有相关性, 提示检测表达ICOS<sup>+</sup>T细胞可能是监测HCC免疫治疗效果的一个有效生物标志物。

综上所述, 本研究揭示了ICOS在HCC肿瘤组织中的表达规律及其预后价值, 发现ICOS<sup>+</sup>细胞、ICOS<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>和ICOS<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞均是独立预后良好因素。在今后的研究中, 我们将进一步扩大样本量验证ICOS和ICOS<sup>+</sup>T细胞在HCC肿瘤组织中表达的意义, 同时也希望为HCC新型治疗手段的疗效监测提供新的指标。

#### [参 考 文 献]

- [1] ZHENG C, ZHENG L, YOO J K, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1342-1356.
- [2] EL-SERAG H B, MARRERO J A, RUDOLPH L, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1752-1763.
- [3] GAO Q, QIU S J, FAN J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(18): 2586-2593.
- [4] BRAHMER J R, TYKODI S S, CHOW L Q, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2455-2465.
- [5] WOLCHOK J D, KLUGER H, CALLAHAN M K, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(2): 122-133.
- [6] EL-KHOUEIRY A B, SANGRO B, YAU T, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial [J]. *Lancet*, 2017, 389(10088): 2492-2502.

- [ 7 ] WATANABE M, HARA Y, TANABE K, et al. A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets [ J ] . *Int Immunol*, 2005, 17(3): 269-278.
- [ 8 ] SHARPE A H, FREEMAN G J. The B7-CD28 superfamily [ J ] . *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(2): 116-126.
- [ 9 ] FAGET J, SISIRAK V, BLAY J Y, et al. ICOS is associated with poor prognosis in breast cancer as it promotes the amplification of immunosuppressive CD4<sup>+</sup> T cells by plasmacytoid dendritic cells [ J ] . *Oncoimmunology*, 2013, 2(3): e23185.
- [ 10 ] ZHANG Y, LUO Y, QIN S L, et al. The clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients [ J ] . *Oncoimmunology*, 2016, 5(5): e1141857.
- [ 11 ] FENG Z, BETHMANN D, KAPPLER M, et al. Multiparametric immune profiling in HPV-oral squamous cell cancer [ J ] . *JCI Insight*, 2017, 2(14): 93652.
- [ 12 ] WIKENHEISER D J, STUMHOFER J S. ICOS co-stimulation: friend or foe? [ J ] . *Front Immunol*, 2016, 7: 304.
- [ 13 ] ZHANG G, XU Y, ZHOU H. The infiltration of ICOS<sup>+</sup> cells in nasopharyngeal carcinoma is beneficial for improved prognosis [ J ] . *Pathol Oncol Res*, 2018. [Epub ahead of print]
- [ 14 ] MCADAM A J, CHANG T T, LUMELSKY A E, et al. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells [ J ] . *J Immunol*, 2000, 165(9): 5035-5040.
- [ 15 ] YAN Z, DANDAN L, HA-JEONG K, et al. A novel role of hematopoietic CCL5 in promoting triple-negative mammary tumor progression by regulating generation of myeloid-derived suppressor cells [ J ] . *Cell Res*, 2013, 23(3): 394-408.
- [ 16 ] LEAVENWORTH J W, VERBINNEN B, YIN J, et al. A p85  $\alpha$  - osteopontin axis couples the receptor ICOS to sustained Bel-6 expression by follicular helper and regulatory T cells [ J ] . *Nat Immunol*, 2015, 16(1): 96-106.
- [ 17 ] BOSSALLER L, BURGER J R, GRIMBACHER B, et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5<sup>+</sup>CD4 germinal center Th cells [ J ] . *J Immunol*, 2006, 177(7): 4927-4932.
- [ 18 ] VALERIE C, CHARLENE T, MARISSA T, et al. Inflammatory tumour microenvironment is associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients [ J ] . *J Hepatol*, 2010, 52(3): 370-379.
- [ 19 ] ZHOU G, SPRENGERS D, BOOR P P C, et al. Antibodies against immune checkpoint molecules restore functions of tumor-infiltrating T cells in hepatocellular carcinomas [ J ] . *Gastroenterology*, 2017, 153(4): 1107-1119.
- [ 20 ] KIM H D, SONG G W, PARK S, et al. Association between expression level of PD1 by tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and features of hepatocellular carcinoma [ J ] . *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 1936-1950.
- [ 21 ] VONDERHEIDE R H, LORUSSO P M, KHALIL M, et al. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells [ J ] . *Clin Cancer Res*, 2010, 16(13): 3485-3494.
- [ 22 ] LIAKOU C I, KAMAT A, TANG D N, et al. CTLA-4 blockade increases IFN $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup> 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): 14987-14992.
- [ 23 ] None. Correction: increased frequency of ICOS<sup>+</sup>CD4 T cells as a pharmacodynamic biomarker for anti-CTLA-4 therapy [ J ] . *Cancer Immunol Res*, 2017, 1(4): 229-234.
- [ 24 ] SLOVIN S F. The need for immune biomarkers for treatment prognosis and response in genitourinary malignancies [ J ] . *Biomark Med*, 2017, 11(12): 1149-1159.

(收稿日期: 2019-01-08 修回日期: 2019-03-22)