

# 食管鳞状细胞癌组织中组织定居记忆 T 细胞分布浸润特征及与免疫治疗预后的关系研究

钟守平<sup>1</sup>, 胡艳正<sup>2</sup> (1. 西安市中心医院心胸外科, 西安 710003; 2. 咸阳市第一人民医院胸外科, 陕西咸阳 712000)

**摘要:** **目的** 探究食管鳞状细胞癌 (ESCC) 组织中组织定居记忆 T 细胞 (TRM) 的分布浸润特征, 进一步分析 TRM 细胞浸润与 ESCC 免疫治疗及预后的关系。 **方法** 选取 2017 年 1 月 ~ 2019 年 12 月西安市中心医院收治的术前未行新辅助治疗的 30 例 ESCC 患者癌灶组织和癌旁组织样本及外周静脉血样本; 采用免疫荧光染色和流式细胞术检测各样本中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞分布、表达浸润及免疫检查点分子 [程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 和 T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构 3 (Tim-3)] 表达情况。另选取同期术前接受新辅助免疫检查点 PD-1 抑制剂治疗的 86 例 ESCC 患者, 取术后组织标本检测 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润水平, 分析其与免疫治疗疗效及预后的关系。 **结果** 术前未行新辅助治疗的 30 例 ESCC 患者样本结果发现: ① CD103 主要定位于肿瘤浸润性 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的细胞膜; ESCC 癌灶组织中 CD103<sup>+</sup> 细胞大多共表达 CD8<sup>+</sup> 细胞, 癌旁组织中 CD103<sup>+</sup> 细胞大多数则不共表达 CD8<sup>+</sup> 细胞。② ESCC 癌灶组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞占 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例为 76.9%±4.4%, 明显高于癌旁正常组织的 65.8%±3.6%, 差异具有统计学意义 ( $t=18.107$ ,  $P<0.001$ )。③ ESCC 肿瘤浸润淋巴细胞中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润比例为 64.8%±4.3%, 明显高于癌旁浸润淋巴细胞 (34.6%±3.4%), 差异具有统计学意义 ( $t=30.175$ ,  $P<0.001$ ); 外周血淋巴细胞中几乎不表达。④ ESCC 癌灶组织 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中免疫检查点分子 PD-1 和 Tim-3 高表达。术前接受新辅助免疫检查点 PD-1 抑制剂治疗的 86 例 ESCC 患者样本结果发现: ①免疫治疗有效组 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润比例为 76.5%±7.3%, 明显高于免疫治疗无效组的 58.7%±5.8%, 差异具有统计学意义 ( $t=12.126$ ,  $P<0.001$ )。② CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞高浸润组较低浸润组具有更高的累积总生存率, 差异具有统计学意义 (Log-Rank  $\chi^2=2.635$ ,  $P<0.05$ )。 **结论** ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞表达及浸润高于癌旁组织, 其高浸润患者具有更好的免疫治疗疗效及预后生存, 可作为新的生物学指标为临床预测 ESCC 免疫治疗疗效及预后提供新的参考。

**关键词:** 食管鳞状细胞癌; 肿瘤浸润淋巴细胞; 组织定居记忆 T 细胞; 免疫治疗

**中图分类号:** R735.1; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 02-011-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.02.003

## Study on the Distribution and Infiltration Characteristics of Tissue Resident Memory T Cells in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Relationship with Immunotherapy Prognosis

ZHONG Shouping<sup>1</sup>, HU Yanzheng<sup>2</sup> (1. Department of Cardiothoracic Surgery, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China; 2. Department of Thoracic Surgery, the First People's Hospital of Xianyang City, Shaanxi Xianyang 712000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the distribution and infiltration characteristics of tissue-resident memory (TRM) cells in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and further analyze relationship between TRM cell infiltration and ESCC immunotherapy and prognosis. **Methods** From January 2017 to December 2019, 30 ESCC patients who did not receive preoperative neoadjuvant therapy in Xi'an Central Hospital were selected as focal tissue and para cancer tissue samples and peripheral venous blood samples. Immunofluorescence staining and flow cytometry were used to detect the distribution, expression infiltration of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cells and the expression of immune checkpoint molecules [Programmed death-1 (PD-1) and T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3)] in all samples. Another 86 ESCC patients who received neoadjuvant immune checkpoint PD-1 inhibitor treatment before surgery were selected during the same period, and the postoperative tissue samples were taken to detect the level of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cell infiltration, and the relationship between it and immunotherapy efficacy and prognosis was analyzed. **Results** The results of 30 ESCC patients who did not receive neoadjuvant therapy before surgery showed that: ① CD103 was mainly localized in the cell membrane of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup>T lymphocytes. Most of the CD103<sup>+</sup> cells in ESCC cancer focus tissue co-express CD8<sup>+</sup> cells, while most of the CD103<sup>+</sup>

**基金项目:** 陕西省自然科学基金研究计划项目 (2020JQ-308)。

**作者简介:** 钟守平 (1974-), 男, 本科, 副主任医师, 研究方向: 心胸外科, E-mail: fit\_02213@163.com。

**通讯作者:** 胡艳正 (1986-), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 肺癌、食管癌、纵隔肿瘤、胸部外伤, E-mail: foxyanzheng@126.com。

cells in paracancer tissue did not co-express CD8<sup>+</sup> cells. ② The proportion of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cells to CD8<sup>+</sup>T cells in ESCC cancer focus tissues was 76.9% ± 4.4%, which was significantly higher than that in adjacent normal tissues 65.8% ± 3.6%, and the difference was statistically significant ( $t=18.107$ ,  $P < 0.001$ ). ③ The proportion of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cells in ESCC tumor-infiltrating lymphocytes was 64.8% ± 4.3%, which was significantly higher than that in para-carcinoma infiltrating lymphocytes 34.6% ± 3.4%, the difference was statistically significant ( $t=30.175$ ,  $P < 0.001$ ), and peripheral blood lymphocytes were almost not expressed (1.1% ± 0.2%). ④ The immune checkpoint molecules PD-1 and Tim-3 were highly expressed in CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cells of ESCC cancer foci. A sample of 86 ESCC patients treated with neoadjuvant immune checkpoint PD-1 inhibitors before surgery found that: ① The proportion of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cell infiltration in the immunotherapy effective group was 76.5% ± 7.3%, which was significantly higher than that in immunotherapy ineffective group 58.7% ± 5.8%, the difference was statistically significant ( $t=12.126$ ,  $P < 0.001$ ). ② The high infiltration group of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cells had higher OS survival than the low infiltration group, and the difference was statistically significant (Log-Rank  $\chi^2=2.635$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression and infiltration of CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM cells in ESCC tissues were higher than those in adjacent tissues, and the patients with high infiltration had better immunotherapy efficacy and survival prognosis, which could be used as a new biological indicator to provide a new reference for clinical prediction of the efficacy and prognosis of ESCC immunotherapy.

**Keywords:** esophageal squamous cell carcinoma; tumor infiltrates lymphocytes; tissue-resident memory; immunotherapy

食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 约占食管癌的 90% 以上, 尽管多学科治疗手段不断进步完善, 但其远期五年生存率仍较低<sup>[1]</sup>。近年免疫检查点抑制剂在临床多肿瘤的辅助治疗中发挥了重要作用, 免疫治疗已成为晚期食管癌一二线治疗的重要策略之一, 被证实可延长患者中位生存期, 是临床研究的热点<sup>[2]</sup>。组织定居记忆 T 细胞 (tissue-resident memory, TRM) 是一群定居于外周非淋巴组织, 表面特异性高表达 CD103 和 CD69 分子的记忆 T 细胞, 不参与外周循环, 是最新发现的肿瘤浸润淋巴细胞亚群<sup>[3]</sup>。研究报道, TRM 无需抗原提呈、细胞激活就能发生快速免疫应答, 参与肿瘤免疫调控<sup>[4]</sup>。而表达 CD103 分子的 CD8<sup>+</sup>T 细胞被认为是 TRM 的重要表型, 在人类多种肿瘤中发现 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞高度浸润与患者预后密切相关, 是良好的预后评估标志物<sup>[3,5-7]</sup>。此外, CD103 的激活可直接诱导 CD8<sup>+</sup>T 细胞释放颗粒酶 B 和穿孔素, 增强抗肿瘤免疫应答; CD103 与其配体 E-钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) 结合可使抗原特异性 T 淋巴细胞驻留于上皮组织, 增强免疫监视作用<sup>[4]</sup>。相关研究指出, 肿瘤组织中富集的 TRM 细胞过表达抑制性免疫检查点, 是针对免疫检查点治疗的主要靶点<sup>[8]</sup>。因而 TRM 在抗肿瘤免疫应答及自身免疫性疾病发生中的作用受到关注。基于此, 本研究首先分析了 ESCC 手术组织标本中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞分布浸润特征, 其次通过收集术前接受新辅助免疫抑制剂治疗的 ESCC 患者术后组织标本, 观察分析了 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润与免疫治疗疗效和预后生存的关系, 以期为 ESCC 诊治及评估预后提供更多参考。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性收集 2017 年 1 月 ~ 2019 年 12 月于西安市中心医院行手术治疗的 30 例 ESCC 患

者病灶组织及癌旁组织 (距病灶边缘 3 ~ 5cm 处) 标本和外周静脉血保存, 经病理学诊断确诊为 ESCC, 术前未接受任何新辅助干预治疗, 未并发其他恶性肿瘤。另选取同期术前接受新辅助免疫检查点抑制剂治疗的 ESCC 患者术后病灶组织标本, 经病理学证实为 ESCC, 接受免疫检查点 PD-1 抑制剂单药治疗且至少完成 2 个周期药物治疗, 后接受手术切除治疗; 至少有一个可测量的符合实体瘤疗效评价标准的可供评价病灶; 未并发其他原发肿瘤或重要脏器功能不全, 既往无自身免疫紊乱性疾病, 无长期使用激素或造血因子的患者, 临床资料完整。最终收集符合研究纳排标准的 86 例术前接受新辅助免疫治疗的 ESCC 患者, 男性 59 例, 女性 27 例, 平均年龄 61.42 ± 8.73 岁; TNM 分期 II 期 11 例, III 期 29 例, IV a 期 46 例。本研究符合伦理学标准并通过医院伦理委员会审批 (批号: 20270102), 患者及家属均知情签署同意书。

1.2 仪器和试剂 鼠抗人 CD8 单克隆抗体 (批号 20041578), 兔抗人 CD103 单克隆抗体 (批号 GR254807-12) [Abcam (上海) 公司]; 流式细胞仪 (美国 BD 公司); PerCP/Cy5.5 标记的抗人 CD8 抗体和 APC 标记的抗人 CD103 抗体 (美国 Biolegend 公司); DAPI 染液 (Beyotime 公司); 淋巴细胞分离液 (美国 GE 公司); 红细胞裂解液 (美国 Sigma-aldrich 公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 样本量计算: 以 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润作为观测指标, 采用两样本均数样本量估算公式  $n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times 2\sigma^2 / \delta^2$ , 要求双侧检验,  $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.1$ , 经查表  $Z_{\alpha} = 1.96$ ,  $Z_{\beta} = 1.28$ ,  $\sigma$  代表标准差为 4.3,  $\delta$  代表对照组和观察组平均值的差值为 4.15, 样本量对照组 ( $n_1$ ): 观察组 ( $n_2$ ) 为 1 : 3。代入公式计算得  $n_1 \approx 22$ ,  $n_2 \approx 66$ , 考虑 20% 的失访, 即两组共计样本量应不少于 107 例。本研究最终共计纳入 126 例,

满足研究样本量需求。

1.3.2 治疗方法: 免疫检查点 PD-1 抑制剂采用帕博利珠单抗(国药准字 S20180019, 默沙东制药有限公司) 200mg, 静脉滴注, 21 天/周期, 治疗 2 个周期。新辅助免疫治疗后 4~6 周行根治性食管癌切除术, 手术具体参考中国食管癌治疗专家共识<sup>[9]</sup>。免疫治疗完成后行超声及 CT 等影像学检查, 参考 RECIST 1.1 版实体肿瘤疗效评价标准<sup>[10]</sup>评价免疫治疗疗效, 分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)。免疫治疗有效定义为完全/部分缓解+疾病稳定 $\geq 1$ 个月, 否则定义为免疫治疗无效。

1.3.3 免疫荧光染色检测 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞分布: 取术前未行新辅助免疫治疗的 ESCC 患者组织及癌旁组织制成石蜡标本, 切片, 二甲苯脱蜡, 梯度无水乙醇水化后加入枸橼酸缓冲液进行高温抗原修复, 待冷却至室温时, 滴加 3g/dl 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液封闭内源性过氧化物酶, 室温孵育 30 min, 加入牛血清清蛋白封闭, 37℃孵育 2h; 加入鼠抗人 CD8 抗体和兔抗人 CD103 抗体, 4℃孵育过夜; 次日避光加入二抗, 室温孵育 10min, 滴加多色标记 Opal 染液(1:100), 孵育 10 min, 磷酸盐缓冲液清洗 3 次, 加入 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色液, 避光孵育 10 min, 用抗荧光淬灭封片液封片, 镜下观察。由两位资深病理医师双盲条件下进行阅片, 以细胞核呈蓝色、细胞膜有红色膜为 CD8 单阳染色; 以细胞核呈蓝色、细胞膜有绿色膜为 CD103 单阳染色; 以细胞核呈蓝色、细胞膜有黄色/粉红色膜为 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 双阳染色。

1.3.4 流式细胞术检测 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞表达及浸润情况: ① CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞表达检测: 取术前未行新辅助免疫治疗的 ESCC 患者组织及癌旁组织, 将其制成细胞悬液, 加入 PerCP/Cy5.5 标记的抗人 CD8 抗体和 APC 标记的抗人 CD103 抗体, 混匀, 4℃避光反应 20 min, PBS 洗涤后上机, 流式细胞术检测癌灶组织和癌旁组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞占 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例, 严格按照检测说明书进行。

② CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润检测: 取入组两部分所有 ESCC 患者癌灶组织及癌旁组织标本, 剪碎加入胰酶消化, 吹打混匀, 用 40 $\mu$ m 孔径细胞筛过滤, 收集单细胞悬液, 1 500r/min 离心 10min, 取上清至另一试管, 再次离心, 弃上清, 加入胰酶重悬沉淀; 加入密度梯度离心液, 离心 20min, 收集云雾层细胞, 胰酶消化重悬, 加入红细胞裂解液, 处理 5min, 终止孵育, 离心弃上清, 得到肿瘤/癌旁浸润淋巴细胞。取患者外周静脉血标本约 3ml, 置于无菌试管, 加入适量 PBS 吹打混匀, 用移液枪将稀释过的外周血滴加到含有淋巴细胞分离液的试管中, 叠加在淋

巴细胞分离液面上, 3 000r/min 离心 10 min, 吸取中间白色层, 加入适量 PBS, 离心, 弃上清, 分离外周血淋巴细胞。利用流式细胞仪检测外周血淋巴细胞及癌灶组织来源肿瘤浸润淋巴细胞和癌旁组织来源肿瘤浸润淋巴细胞中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润比例, 检测严格按照说明书步骤进行。

1.3.5 随访: 对入组接受免疫治疗的患者术后进行随访观察, 随访截止 2022 年 12 月底, 统计随访期间死亡情况, 观察术后总生存期(overall survival, OS), OS 定义为自初始治疗至末次随访结束或任何原因死亡的时间。

1.4 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5 软件和 SPSS 20.0 软件进行分析, Shapiro-Wilk 法检验计量资料服从正态分布, 故采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 癌组织及癌旁组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 表达浸润比例及 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中免疫检查点程序性死亡蛋白 1(programmed death-1, PD-1)、T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白结构 3(T cell immunoglobulin and mucin domain 3, Tim-3) 表达差异比较, 采用配对 *t* 检验; CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润与免疫治疗疗效的关系采用独立样本 *t* 检验; 采用受试者工作特征(ROC)曲线确定 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润的截断值(cut off)并分组为高、低浸润组, Kaplan-Meier 生存曲线分析 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润与 ESCC 免疫预后的关系。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞分布情况 见图 1。免疫荧光染色检测结果显示, CD103 主要定位于肿瘤浸润性 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的细胞膜, 30 例 ESCC 组织及癌旁正常组织中均可检测到 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞; ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>细胞大多共表达 CD8<sup>+</sup>, 表现为 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞表型, 癌旁组织中 CD103<sup>+</sup>细胞大多数则不共表达 CD8<sup>+</sup>。

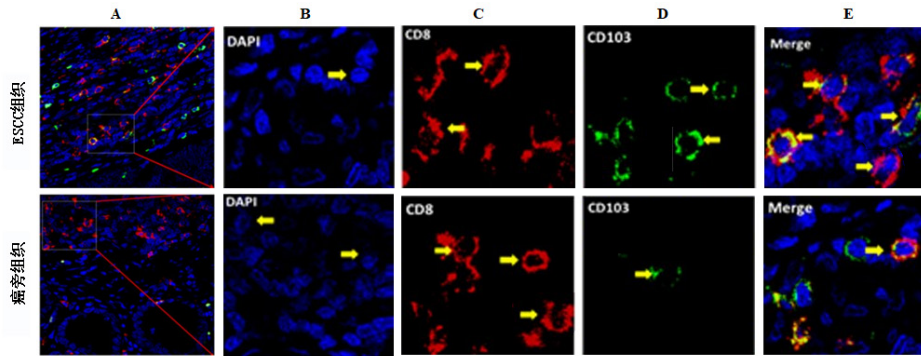
2.2 ESCC 中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞表达及浸润情况 流式细胞术检测显示, 30 例 ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞占 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例为 76.9% $\pm$ 4.4%, 明显高于对应癌旁正常组织的 65.8% $\pm$ 3.6%, 差异具有统计学意义(*t*=18.107, *P*<0.001)。进一步检测浸润情况, 发现肿瘤浸润淋巴细胞、癌旁浸润淋巴细胞、外周血淋巴细胞中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞比例分别为 64.8% $\pm$ 4.3%, 34.6% $\pm$ 3.4% 和 1.1% $\pm$ 0.2%, ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润显著高于癌旁组织, 差异具有统计学意义(*t*=30.175, *P*<0.001), 外周血中几乎无 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞表达。

2.3 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中免疫检查点 PD-1 和



Tim-3 表达分析 流式细胞术检测发现, 30 例 ESCC 组织 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中 PD-1<sup>+</sup>, Tim-3<sup>+</sup> 及 PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> 共表达比例依次为 49.5%±4.6%, 30.3%±4.0% 和 38.6%±4.5%, 明显高于对应癌旁正常组织 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞的 16.8%±3.4%, 5.7%±1.2%, 7.8%±2.2%, 差异具有统计学意义 ( $t=53.014, 54.628, 57.023$ , 均  $P < 0.001$ )。此外分

析发现, CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中 PD-1<sup>+</sup>, Tim-3<sup>+</sup> 及 PD-1<sup>+</sup>Tim-3<sup>+</sup> 共表达比例依次为 48.6%±3.9%, 31.7%±4.3%, 39.5%±4.8%, 亦明显高于 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞的 15.7%±1.6%, 3.9%±0.8%, 6.7%±1.6%, 差异具有统计学意义 ( $t=72.377, 60.298, 60.117$ , 均  $P < 0.001$ ), 由此可见 ESCC 组织的 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中免疫检查点 PD-1 和 Tim-3 高表达。



A 为免疫荧光染色图; B-E 为 A 的局部放大图; CD8<sup>+</sup>T 细胞 (红色), CD103<sup>+</sup>T 细胞 (绿色), CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞 (黄色/粉红色); DAPI (蓝色)。

图 1 免疫荧光染色检测 ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞分布浸润 ( $\times 400$ )

2.4 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润与 ESCC 免疫治疗的关系 86 例术前接受新辅助免疫治疗的患者术后癌灶组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润比例为 69.0%±6.4%, 其中免疫治疗有效者 50 例、无效者 36 例。检测分析发现, 免疫治疗有效组 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润比例为 76.5%±7.3%, 明显高于免疫治疗无效组的 58.7%±5.8%, 差异具有统计学意义 ( $t=12.126, P < 0.001$ )。

2.5 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润与 ESCC 患者免疫预后的关系 见图 2。采用 ROC 曲线分析得出 86 例接受免疫治疗 ESCC 患者组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润 cut off 值为 69.1%, 定义  $\geq 69.1\%$  为高浸润组 ( $n=53$ ),  $< 69.1\%$  为低浸润组 ( $n=33$ )。至术后随访截止, 平均随访 23.6 个月, Kaplan-Meier 生存曲线分析显示, CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 高浸润组较低浸润组具有更高的 OS 生存率, 差异具有统计学意义 (Log-Rank  $\chi^2=2.635, P=0.039$ )。

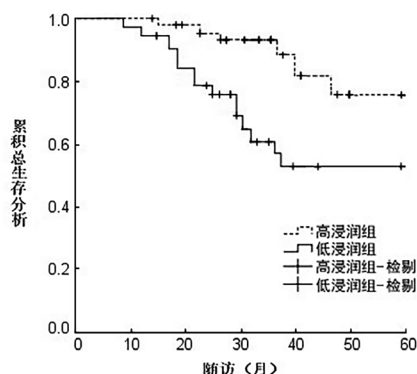


图 2 接受免疫治疗 ESCC 患者预后生存曲线

### 3 讨论

近年研究发现, 机体免疫参与肿瘤的发生发展, 其不仅发挥免疫监视和抗肿瘤免疫作用, 抑制肿瘤的发生, 也可诱导肿瘤细胞免疫逃逸或耐受, 促进肿瘤恶性进展<sup>[1]</sup>。肿瘤微环境中多种免疫细胞共同浸润组成了免疫微环境, 其中 T 细胞的浸润及功能决定了肿瘤免疫应答结果, 而记忆性 T 细胞在肿瘤免疫应答中发挥主导作用<sup>[12]</sup>。因此探寻肿瘤浸润关键免疫细胞, 阐明其与抗肿瘤免疫及疾病进展的关系, 对了解 ESCC 发病及指导免疫治疗和预后具有重要意义。

记忆性 T 细胞根据其表型和功能不同分为中央型记忆 T 细胞 (central memory T cell, TCM)、效应记忆型 T 细胞 (effector memory T cells, TEM) 和 TRM 亚群, 其中 TCM 主要分布于外周免疫淋巴结和器官, TEM 则主要存在于非淋巴组织和器官, 两者均参与体循环, 是机体监视、预防和及时清除病原微生物再感染的关键<sup>[13]</sup>。TRM 不参与体循环, 长期定居于特定组织中, 是特殊的肿瘤浸润淋巴细胞亚群, 被认为是组织免疫应答的第一道防线<sup>[6,14]</sup>。现有研究报道, TRM 与多种炎症疾病、病毒感染疾病及肿瘤的发病有关, 在维持组织局部免疫稳态中发挥重要作用<sup>[2,7,15-16]</sup>。通常 TRM 高表达 CD103 和 (或) CD69 特异性标志分子, 而表达 CD103 分子的 CD8<sup>+</sup>T 细胞被确认为是 TRM 重要表型, 在抗肿瘤免疫反应中作为重要的 T 细胞亚群发挥作用<sup>[3]</sup>。多种人类肿瘤中也发现, CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润增加常预示着更早的临床分期及患者预后生存延长, 如晚期胃癌肿瘤组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润数目较早期患者显著下降<sup>[7]</sup>; 非小细胞

肺癌组织中 CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润是影响局部晚期患者预后的独立风险因素<sup>[17]</sup>；胰腺癌肿瘤组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞高度浸润，且与 PD-L1 表达呈正相关<sup>[18]</sup>，提示可能是肿瘤重要的预后标志物及治疗靶点。此外，研究发现 CD103 与上皮细胞中 E-钙黏蛋白相互作用能够介导淋巴细胞归巢及细胞黏附、迁移<sup>[19]</sup>。上皮性癌中 CD103 和 E-钙黏蛋白相互作用对识别和杀伤肿瘤细胞至关重要<sup>[20]</sup>。而本研究发现，ESCC 癌组织中 CD103<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 浸润多共表达，癌旁组织中两者大多不共表达，提示 CD103<sup>+</sup> 可能是肿瘤组织中 TRM 细胞的来源。同时发现，ESCC 组织中 TRM 表达浸润明显高于癌旁组织，外周血中几乎不表达，符合 TRM 细胞特点。

最新临床试验显示，免疫检查点分子的异常表达会导致肿瘤微环境中 T 细胞功能障碍，引起肿瘤免疫逃逸<sup>[21]</sup>。PD-1 和 Tim-3 是常见的免疫检查点分子之一，表达 PD-1 和 Tim-3 的 CD8<sup>+</sup>T 细胞被认为是肿瘤特异性 T 细胞，也是目前研究的重要免疫治疗靶点<sup>[22]</sup>。肿瘤微环境中 PD-1 与其配体 PD-L1 结合可通过多种途径抑制 T 细胞的活化及功能，下调机体免疫应答<sup>[23]</sup>。靶向 PD-1/PD-L1 免疫检查点现已在晚期食管癌的治疗中逐渐推进到一、二线乃至围手术期，显示出良好的疗效<sup>[2]</sup>。研究报道，Tim-3 与其配体结合可通过调控多个通路抑制细胞毒性 T 细胞分化，促进肿瘤免疫逃逸发生<sup>[24]</sup>。SALMON 等<sup>[25]</sup>报道，动物黑色素瘤模型中 CD103<sup>+</sup> 树突状细胞能够增强 BRAF 和 PD-L1 靶向治疗的免疫应答。人类实体肿瘤研究中也发现，肿瘤浸润性 TRM 细胞高表达 PD-1 和 Tim-3 等多种免疫检查点分子<sup>[26-27]</sup>。本研究也证实 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中 PD-1 和 Tim-3 免疫检查点高表达。另一方面，TRM 与肺癌免疫治疗的关系研究发现，在接受 PD-1/PD-L1 治疗的非小细胞肺癌患者中，治疗有反应患者其肿瘤微环境中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞亚群增加，无反应患者 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞亚群无明显增加<sup>[28]</sup>；肿瘤组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 高度浸润的肺癌患者接受免疫检测点抑制剂治疗具有良好的临床反应<sup>[29]</sup>，表明 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 与免疫治疗密切相关。本研究发现 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞浸润越高，ESCC 新辅助免疫治疗疗效越显著，患者预后生存期更长，与 BANCHEREAU 等<sup>[29-30]</sup>报道相一致，表明其可作为评估 ESCC 免疫治疗及预后的生物指标。分析 TRM 表达整合素 CD103 可诱导细胞毒颗粒极化，分泌穿孔素、颗粒酶 B 及 IFN- $\gamma$ ，IL-17 等因子，吸引其他免疫细胞或细胞毒介质消除肿瘤细胞；CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞中高表达 PD-1 和 Tim-3，在接受免疫检查点抑制剂治疗时其能增强 CD103 依赖

的 TCR 介导的对自体肿瘤细胞的细胞毒作用，打破 PD-1 信号诱导的免疫抑制状态，因而提高免疫治疗效果，改善患者预后。研究 TRM 在 ESCC 中的作用机制及生物学特征，可为理解 and 改善免疫检查点阻滞的临床反应至关重要。相信随着肿瘤免疫治疗研究的发展，TRM 细胞或将成为免疫检查点阻断疗法的主要靶点，探究如何上调 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面 CD103 表达，增加肿瘤相关 TRM 细胞数量，提高免疫治疗疗效，是抗肿瘤研究的重要方向。

综上所述，ESCC 组织中 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TRM 细胞表达及浸润高于癌旁组织，其高浸润患者具有更好的免疫治疗疗效及预后生存，可作为新的生物学指标为临床预测 ESCC 免疫治疗疗效及预后提供新的参考。

#### 参考文献：

- [1] UHLENHOPP D J, THEN E O, SUNKARA T, et al. Epidemiology of esophageal cancer: update in global trends, etiology and risk factors[J]. Clinical Journal of Gastroenterology, 2020, 13(6): 1010-1021.
- [2] 黄玉斌, 刘霄, 徐翠香, 等. 中晚期恶性肿瘤患者应用 PD-1 抑制剂多周期治疗对外周血淋巴细胞亚群影响的动态变化研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(2): 23-27. HUANG Yubin, LIU Xiao, XU Cuixiang, et al. Study on the dynamic changes of the effect of PD-1 inhibitor multi-cycle therapy on peripheral blood lymphocyte subsets in patients with advanced malignant tumors[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(2): 23-27.
- [3] 彭鳞钰, 韩丽萍. TRM 的生物学特征及其在肿瘤中的研究进展 [J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(8): 769-773. PENG Linyu, HAN Liping. Advances in biological studies of TRM and its role in tumors[J]. Journal of Cancer Control and Treatment, 2021, 34(8): 769-773.
- [4] DAMEI I, TRICKOVIC T, MAMI-CHOUAIB F, et al. Tumor-resident memory T cells as a biomarker of the response to cancer immunotherapy[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1205984.
- [5] 谈思含, 田攀文. 组织驻留记忆 T 细胞在肺癌中的研究进展 [J]. 中国肺癌杂志, 2022, 25(12): 862-869. TAN Sihan, TIAN Panwen. Advances in the study of tissue-resident memory T cells in lung cancer[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2022, 25(12): 862-869.
- [6] VIRASSAMY B, CARAMIA F, SAVAS P, et al. Intratumoral CD8<sup>+</sup>T cells with a tissue-resident memory phenotype mediate local immunity and immune checkpoint responses in breast cancer[J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 585-601.
- [7] 沈洋, 彭六生, 邱远, 等. CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>Trm 细胞在胃癌中的分布、表型及其功能下降的机制研究 [J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(12): 1146-1152. SHEN Yang, PENG Liusheng, QIU Yuan, et al. Distribution, phenotype and dysfunctional mechanism of CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells in gastric cancer patients [J]. Journal of Third Military Medical University, 2021, 43(12): 1146-1152.
- [8] BUGGERT M, PRICE D A, MACKAY L K, et al. Human circulating and tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells [J]. Nature Immunology, 2023, 24(7): 1076-1086.
- [9] 李印, 秦建军. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 食管癌诊

- 治指南 2020 版外科领域更新要点解读 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2020, 27(8): 857-859.
- LI Yin, QIN Jianjun. Interpretation of surgical update points of the 2020 edition of the guidelines for diagnosis and treatment of esophageal cancer of the Chinese society of clinical oncology(CSCO)[J]. Chinese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2020, 27(8): 857-859.
- [10] EISENHAUER E A, THERASSE P, BOGAERTS J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. European Journal of Cancer, 2009, 45(2): 228-247.
- [11] 张祎稀, 吴建春, 骆莹滨, 等. 脂代谢重编程调控免疫微环境抗肿瘤的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(20): 2538-2542.
- ZHANG Yixi, WU Jianchun, LUO Yingbin, et al. Research progress of lipid metabolism reprogramming in regulating immune microenvironment [J]. Chinese Journal of Immunology, 2022, 38(20): 2538-2542.
- [12] BUGGERT M, PRICE D A, MACKAY L K, et al. Human circulating and tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells [J]. Nature Immunology, 2023, 24(7): 1076-1086.
- [13] JIN Kaifeng, YU Yanze, ZENG Han, et al. CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>tissue-resident memory T cell infiltration predicts clinical outcome and adjuvant therapeutic benefit in muscle-invasive bladder cancer[J]. British Journal of Cancer, 2022, 126(11): 1581-1588.
- [14] OKLA K, FARBER D L, ZOU Wei-ping. Tissue-resident memory T cells in tumor immunity and immunotherapy[J]. Journal of Experimental Medicine, 2021, 218(4): e20201605.
- [15] 吴琼丽, 康双朋, 吴长有. 组织驻留记忆 T 细胞与肿瘤研究进展 [J]. 中国科学 ( 生命科学 ), 2020, 50(10): 1032-1041.
- WU Qiongli, KANG Shuangpeng, WU Changyou. The progress of tissue resident memory T-cells against tumors [J]. Scientia Sinica(Vitae), 2020, 50(10): 1032-1041.
- [16] 程会贤, 陈名园, 陈婷婷, 等. CD103 阳性肿瘤浸润淋巴细胞与卵巢高级别浆液性癌患者预后关系的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2022, 49(14): 716-720.
- CHENG Huixian, CHEN Mingyuan, CHEN Tingting, et al. Analysis of the relationship between CD103-positive tumor-infiltrating lymphocyte and prognosis of patients with high-grade serous ovarian cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2022, 49(14): 716-720.
- [17] 杨丽颖, 薛洪范, 张薇, 等. CD8<sup>+</sup>Trm 与肿瘤细胞空间分布特征对局部晚期非小细胞肺癌复发的预测价值 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2023, 30(5): 287-294.
- YANG Liying, XUE Hongfan, ZHANG Wei, et al. Value of spatial distribution characteristics of CD8<sup>+</sup>Trm and tumor cells in locally advanced non-small cell lung cancer in predicting recurrence[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2023, 30(5): 287-294.
- [18] 陈俊俊, 黄浩, 刘颖婷, 等. 胰腺癌免疫微环境组织驻留 CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润分布及其临床意义 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2022, 29(23): 1659-1667.
- CHEN Junjun, HUANG Hao, LIU Yingting, et al. Infiltration of tissue-resident CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells in the tumor microenvironment of pancreatic cancer and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2022, 29(23): 1659-1667.
- [19] HOFFMANN J C, SCHÖN M P. Integrin  $\alpha$  E(CD103)  $\beta$  7 in epithelial cancer[J]. Cancers, 2021, 13(24): 6211.
- [20] CROWL J T, HEEG M, FERRY A, et al. Tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells possess unique transcriptional, epigenetic and functional adaptations to different tissue environments[J]. Nature Immunology, 2022, 23(7): 1121-1131.
- [21] PAIJENS S T, VLEDDER A, DE BRUYN M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2021, 18(4): 842-859.
- [22] 代鹏飞. 靶向免疫检查点 PD-1/PD-L1 小分子 PET 探针的研究进展 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(2): 337-341.
- DAI Pengfei. Research progress of small molecule PET probes targeting immune checkpoint PD-1/PD-L1[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2023, 58(2): 337-341.
- [23] 乌日罕, 呼群, 马强, 等. PD-1 和 PD-L1 在肿瘤免疫逃逸中的作用机制及临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(9): 1635-1638.
- WU Rihan, HU Qun, MA Qiang, et al. Clinical significance and mechanism of PD-1 and PD-L1 in cancer immune escape[J]. Journal of Modern Oncology, 2019, 27(9): 1635-1638.
- [24] 苏廉. Tim-3 及其配体 Galectin-9 在鼻咽癌免疫逃逸的研究进展 [J]. 重庆医学, 2022, 51(23): 4084-4088.
- SU Geng. Research progress of Tim-3 and its ligand Galectin-9 in immune escape of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chongqing Medicine, 2022, 51(23): 4084-4088.
- [25] SALMON H, IDOYAGA J, RAHMAN A, et al. Expansion and activation of CD103(+) dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition[J]. Immunity, 2016, 44(4): 924-938.
- [26] 乔嘉华, 郝子琪, 黄也, 等. PD-1, PD-L1, 肿瘤浸润淋巴细胞在神经母细胞瘤组织中的表达 [J]. 中国临床研究, 2024, 37(2): 261-265, 270.
- QIAO Jiahua, HAO Ziqi, HUANG Ye, et al. Expression of PD-1, PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes in neuroblastoma[J]. Chinese Journal of Clinical Research, 2024, 37(2): 261-265, 270.
- [27] 刘凯, 刘燕, 黄莉. PD-1/PD-L1, TIM-3 表达与食管癌临床病理特征及预后的关系 [J]. 重庆医学, 2022, 51(1): 65-69.
- LIU Kai, LIU Yan, HUANG Li. Relationship between PD-1/PD-L1 and TIM-3 expressions with clinicopathological characteristics and prognosis of esophageal cancer[J]. Chongqing Medicine, 2022, 51(1): 65-69.
- [28] CORGNAC S, MALENICA I, MEZQUITA L, et al. CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TRM cells accumulate in tumors of anti-PD-1-responder lung cancer patients and are tumor-reactive lymphocytes enriched with Tc17[J]. Cell Reports Medicine, 2020, 1(7): 100127.
- [29] ZHANG Chao, YIN Kai, LIU Siyang, et al. Multiomics analysis reveals a distinct response mechanism in multiple primary lung adenocarcinoma after neoadjuvant immunotherapy[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2021, 9(4): e002312.
- [30] BANCHEREAU R, CHITRE A S, SCHERL A, et al. Intratumoral CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells predict response to PD-L1 blockade[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2021, 9(4): e002231.

收稿日期: 2023-09-20

修回日期: 2024-06-18