

# 结直肠癌中 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润特征及其预后意义

邹齐<sup>1,2</sup> 胡邦<sup>1</sup> 禹汇川<sup>2</sup> 任东林<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>中山大学附属第六医院肛肠外科, 广州 510655; <sup>2</sup>广东省胃肠病学研究所 广东省结直肠与盆底疾病重点实验室, 广州 510655

通信作者: 任东林, Email: rendl@mail.sysu.edu.cn

**【摘要】** 目的 CD8<sup>+</sup>T 细胞作为细胞毒性 T 细胞, 可以通过释放穿孔素等方式直接杀伤肿瘤细胞, 但其浸润水平与结直肠癌预后的关系, 既往研究结果不尽相同。本研究旨在探讨 CD8<sup>+</sup>T 细胞在结直肠癌肿瘤中心和浸润边缘的分布, 并分析其与患者预后的关系。**方法** 本研究采用回顾性队列研究方法, 分析 2009—2012 年间, 中山大学附属第六医院结直肠癌病理数据库中的 221 例结直肠癌患者临床病理资料。病例纳入标准: (1) 经手术切除后病理证实为结直肠癌; (2) 有完整随访信息。排除标准: (1) 多原发癌; (2) 合并炎症性肠病、林奇综合征或家族性腺瘤性息肉病; (3) 无石蜡切片; (4) 术前接受过放疗或化疗。采用免疫组织化学染色方法计数患者石蜡切片中肿瘤中心及浸润边缘的 CD8<sup>+</sup>T 细胞。同时选取 22 例新鲜冰冻结直肠癌组织标本, 检测 CD8B 基因相对表达量, 并与 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数进行相关分析。通过最小 P 值法选取肿瘤中心和浸润边缘 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数的最佳截断值, 将患者分为高 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润和低 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润两组, 采用 Log-rank 检验比较两组患者的总体生存, 并采用 Cox 回归分析校正 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润的预后意义。**结果** 全组患者中男性 118 例, 女性 103 例。在 221 例患者的切片中, 肿瘤浸润边缘比肿瘤中心有更多的 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润 [ $M$  (范围): 37 (0~141) 个/视野比 14 (0~106) 个/视野,  $Z=-11.985$ ,  $P<0.001$ ], 两者呈正相关趋势, 差异有统计学意义 ( $r=0.610$ ,  $P<0.001$ )。肿瘤中心 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数与 CD8B 基因相对表达呈正相关趋势 ( $r=0.524$ ,  $P=0.012$ )。肿瘤中心和浸润边缘 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量的最佳截断值分别为 2.6 个/视野和 24.8 个/视野。术后中位随访 83 (1~117) 个月, 无论是肿瘤中心还是浸润边缘, 高 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润组患者的总体生存均优于低 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润组 (中位总体生存时间: 84.1 个月比 73.5 个月,  $P<0.001$ ; 84.2 个月比 75.9 个月,  $P=0.002$ )。Cox 回归分析证实, 肿瘤中心高 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润是总体生存的独立保护因素 (HR=0.369, 95% CI: 0.168~0.812,  $P=0.013$ )。**结论** 结直肠癌中 CD8<sup>+</sup>T 细胞在肿瘤中心的浸润水平低于浸润边缘, 且两者正相关。肿瘤中心 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润水平与总体生存有关, 可作为结直肠癌潜在的预后标志物。

**【关键词】** 结直肠肿瘤; CD8<sup>+</sup>T 细胞; 预后

**基金项目:** 广东省医学科学技术研究基金 (A2021171); 广州市科学技术协会科普经费项目 (K20200201044)

## Characteristics of CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in colorectal cancer and their correlation with prognosis

Zou Qi<sup>1,2</sup>, Hu Bang<sup>1</sup>, Yu Huichuan<sup>2</sup>, Ren Donglin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Colorectal and Anal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China; <sup>2</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Colorectal and Pelvic Floor Diseases, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China

Corresponding author: Ren Donglin, Email: rendl@mail.sysu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.cn441530-20210402-00144

收稿日期 2021-04-02 本文编辑 汪挺

引用本文: 邹齐, 胡邦, 禹汇川, 等. 结直肠癌中 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润特征及其预后意义 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(12): 1086-1092. DOI:10.3760/cma.j.cn441530-20210402-00144.



**【Abstract】 Objective** As cytotoxic T cells, CD8+ T lymphocytes can kill tumor cells by releasing perforin and other effector molecules, but the correlation between their infiltration level and the prognosis of colorectal cancer varies in previous studies. This study aims to explore the distribution of CD8+T cells in tumor center and invasive margin of colorectal cancer, and to analyze their correlation with the prognosis of patients. **Methods** A retrospective cohort study was used to analyze the clinicopathological features of 221 patients with colorectal cancer from the colorectal cancer pathological database of the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University between 2009 and 2012. Case inclusion criteria: (1) colorectal cancers confirmed by postoperative pathology; (2) patients with follow-up data. Exclusion criteria: (1) multiple primary cancers; (2) inflammatory bowel disease, Lynch syndrome or familial adenomatous polyposis; (3) no available paraffin slides; (4) patients receiving preoperative radiotherapy or chemotherapy. A total of 221 patients met the criteria. Immunohistochemical staining was used to count the CD8+ T cells in tumor center and invasive margin in the paraffin slides. Meanwhile the relative expression of CD8B gene in 22 fresh freeze samples of colorectal cancer was detected. Then the correlation of the expression with CD8+T cell density was examined. The patients were divided into high and low infiltration groups according to the level of CD8+T cells. Log-rank test was applied to compare the overall survival of the two groups of patients, and Cox regression analysis was used to adjust the prognostic significance of CD8+T cell infiltration. **Results** There were 118 males and 103 females. In 221 slides, CD8+T cells infiltrating in invasive margin were more than those in tumor center [median (range): 37(0-141) / field vs. 14(0-106) / field,  $Z=-11.985$ ,  $P<0.001$ ], and the number of CD8+T cell in the tumor center was positively correlated with those in invasive margin ( $r=0.610$ ,  $P<0.001$ ). The number of CD8+T cell in tumor center was positively correlated with the relative expression of CD8B gene ( $r=0.524$ ,  $P=0.012$ ). Survival analysis showed that the overall survival of the high infiltration group was better than that of the low infiltration group both in tumor center and invasive margin (median survival: 84.1 months vs. 73.5 months,  $P<0.001$ ; 84.2 months vs. 75.9 months,  $P=0.002$ ). Cox regression analysis revealed that high CD8+T cell infiltration in tumor center was an independent protective factor of overall survival (HR=0.369, 95% CI: 0.168-0.812,  $P=0.013$ ). **Conclusions** The infiltration level of CD8+T cells in tumor center is lower than that in invasive margin, and they are positively correlated. The level of CD8+T cell infiltration in tumor center is related to overall survival and can be used as a potential prognostic marker.

**【Key words】** Colorectal neoplasms; CD8+T cell; Prognosis

**Fund program:** Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province of China (A2021171); Science Popularization Fund Project of Guangzhou Association of Science and Technology (K20200201044)

相同分期的结直肠癌在不同个体呈现出较大的预后异质性,这为选择恰当的治疗方式和准确评估患者的预后提出了挑战<sup>[1]</sup>。肿瘤浸润淋巴细胞是结直肠癌肿瘤微环境的关键组成部分,其浸润水平是导致肿瘤治疗效果与预后呈现异质性的重要原因之一<sup>[2]</sup>。CD8<sup>+</sup>T细胞作为细胞毒性T细胞,可以通过释放穿孔素等方式直接杀伤肿瘤细胞,有研究证实,结直肠癌中CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润水平可能与肿瘤转移及患者预后相关<sup>[3-5]</sup>。但最近亦有研究得到了相反的结论<sup>[6]</sup>。这种结论的差异可能与CD8<sup>+</sup>T细胞在肿瘤中的分布特征相关<sup>[7-8]</sup>。为此,本研究通过观察结直肠癌中CD8<sup>+</sup>T细胞在肿瘤中心以及浸润边缘的分布情况,探讨CD8<sup>+</sup>T细胞分布对预后的因素。

## 资料与方法

### 一、研究对象

本研究采用回顾性队列研究方法,分析2009—2012年间,中山大学附属第六医院结直肠癌病理数据库中的221例结直肠癌患者临床病理资料。病例纳入标准:(1)经手术切除后病理证实为结直肠癌;(2)有完整随访信息。排除标准:(1)多原发癌;(2)合并炎症肠病、林奇综合征或家族性腺瘤性息肉病;(3)无石蜡切片;(4)术前接受过放疗或化疗的患者。本研究通过了中山大学附属第六医院伦理委员会批准(审批号:2021ZSLYEC-366),并获得患者知情同意。

## 二、检测及判读方法

1. CD8<sup>+</sup>T 细胞计数: 采用免疫组织化学(免疫组化)染色方法, 石蜡包埋切片脱蜡后进行抗原修复, 加入 1:100 稀释的单克隆 CD8 一抗(clone C8/144B, SK201; 日本 DAKO 公司)孵育 16 h, 加入二抗(Envision+Dual Link Kit, K5007; 日本 DAKO 公司)孵育 30 min 后, DAB 显色 30 s。在 Olympus BX53 显微镜 100 倍(10 倍目镜, 10 倍物镜)视野下, 观察定位肿瘤中心及浸润边缘<sup>[9]</sup>。避开坏死区域、炎症区域、肿瘤周边淋巴细胞密集热点及切片组织质量较差区域。然后切换至 400 倍视野下进行观察, 非连续性、随机选取肿瘤中心及浸润边缘各 5 个视野进行拍照, 每个照片的面积约为 0.125 5 mm<sup>2</sup>。采用基于免疫组化染色的细胞计数方法, 借助 Image J 软件手动计数每张照片中 CD8<sup>+</sup>T 细胞的个数, 结果取 5 张照片计数结果的均值用于统计分析<sup>[10]</sup>。

2. CD8B 基因表达量测定: 选取队列中可获取新鲜冰冻组织的样本共 22 例, 用于 CD8B 基因表达量测定。CD8B 基因编码 CD8 抗原的一部分, 因此其相对表达量可以反映组织中 CD8<sup>+</sup>T 细胞的丰度<sup>[11]</sup>。取 25 mg 新鲜冰冻组织使用 Allprep DNA/RNA Mini 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)提取 RNA 后, 用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 试剂盒(FAQ-301; 日本 TOYOBO 公司)反转录得到 cDNA, 在 9700 PCR 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)中检测 CD8B 基因相对表达量。引物序列如下: CD8B-正向: AGACCCCTGCATACATAAAGGT; CD8B-反向: CGCTGTCTCAGCCAGTAGAT; GAPDH-正向: GGAGCGAGATCCCCTCCAAAT; GAPDH-反向: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG。

## 三、观察指标

主要观察结直肠癌病理切片肿瘤中心及浸润边缘的 CD8<sup>+</sup>T 细胞的浸润情况, 并分析比较不同浸润水平与患者生存预后的关系; 纳入的临床病理因素包括: 性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤分化程度、脉管及神经浸润情况、微卫星状态及 TNM 分期。

## 四、随访方法

术后 2 年每 3 个月随访 1 次, 2~5 年每半年随访 1 次, 5 年后每年随访 1 次, 直至患者死亡。采用电话随访方式, 随访内容包括患者生存状态、有无结直肠癌复发及死亡原因。末次随访时间为 2018 年 9 月 9 日。

## 五、统计学方法

采用 SPSS 22.0 和 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析及绘制统计图。相关性分析采用 Pearson  $\chi^2$  相关检验。非正态分布连续变量采用  $M$ (范围)表示, 组间比较使用 Mann-Whitney  $U$  秩和检验。使用 X-tile 软件的最小  $P$  值法选取 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数的最佳截断值, 将患者分为高 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润组和低 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润组<sup>[12]</sup>。使用 Kaplan-Meier 生存曲线进行生存描述, 采用 Log-rank 检验比较两组患者的总体生存。使用 Cox 多因素分析校正影响生存的混杂因素。 $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、CD8<sup>+</sup>T 细胞在结直肠癌中的分布特征

CD8<sup>+</sup>T 细胞在肿瘤微环境中的分布大致可分为肿瘤中心与肿瘤浸润边缘两个位置, 见图 1。肿瘤浸润边缘比肿瘤中心有更多的 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润 [ $M$ (范围): 37(0~141)个/视野比 14(0~106)个/视野,  $Z = -11.985$ ,  $P < 0.001$ ]; 且肿瘤中心的 CD8<sup>+</sup>T 细胞呈现出较明显的正偏态分布; 见图 2A。肿瘤中心与浸润边缘的 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量呈正相关趋势( $r = 0.610$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 2B。

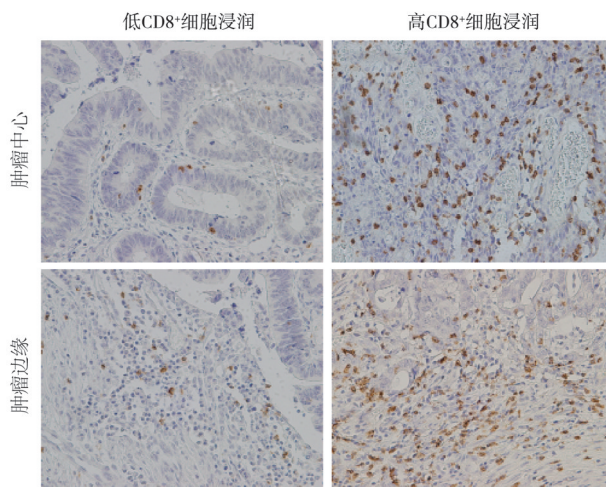


图1 结直肠癌肿瘤中心及浸润边缘 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润情况(免疫组织化学染色,  $\times 100$ )

### 二、CD8B 基因表达量与 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量的相关性

CD8B 基因相对表达量并评估其与 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量的相关性分析结果显示, 肿瘤中心 CD8B 基因相对表达量与 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数呈正相关趋势, 差异有统计学意义( $r = 0.524$ ,  $P = 0.012$ ); 两者在浸



润边缘中显示出正相关的趋势,但差异并未达到统计学意义( $r=0.396, P=0.068$ );见图3。

### 三、CD8<sup>+</sup>T细胞不同浸润水平的结直肠癌患者临床资料比较

肿瘤中心和浸润边缘的CD8<sup>+</sup>T细胞数量的最佳截断值分别为2.6个/视野和24.8个/视野,据此分为高CD8<sup>+</sup>T细胞浸润组(肿瘤中心: $\geq 2.6$ 个/视野;浸润边缘: $\geq 24.8$ 个/视野)和低CD8<sup>+</sup>T细胞浸润组(肿瘤中心: $< 2.6$ 个/视野;浸润边缘: $< 24.8$ 个/视野)。在肿瘤中心组织中,除TNM分期外( $P=0.021$ ),CD8<sup>+</sup>T细胞低浸润组与高浸润组患者其余临床病理资料比较,差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。在肿瘤浸润边缘组织中,CD8<sup>+</sup>T细胞低浸润组与高浸润组患者的肿瘤位置、神经浸润、TNM分期比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$ )。见表1。

### 四、CD8<sup>+</sup>T细胞浸润水平与结直肠癌预后的相关性

术后中位随访时间83(1~117)个月,生存分析结果显示,无论是肿瘤中心还是浸润边缘,CD8<sup>+</sup>T细胞高浸润组患者总体生存均优于CD8<sup>+</sup>T细胞低浸润组(中位总体生存时间:84.1个月比73.5个月,

$P<0.001$ ;84.2个月比75.9个月, $P=0.002$ ),见图4。Cox回归分析结果显示,年龄 $<60$ 岁( $P<0.001$ )和肿瘤中心高CD8<sup>+</sup>T细胞浸润( $P=0.013$ )是影响总体生存的独立保护因素;而浸润边缘的CD8<sup>+</sup>T细胞数量并不是影响生存的独立因素( $P=0.521$ ),见表2。

## 讨论

近年来,以程序性死亡受体1及其配体(programmed death 1 / programmed death-ligand 1, PD-1/PD-L1单抗)等免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗药物逐渐引起重视,而免疫治疗的效果依赖于肿瘤浸润淋巴细胞尤其是CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润特征<sup>[13-14]</sup>。本研究通过对221例结直肠癌中CD8<sup>+</sup>T细胞在肿瘤中心和浸润边缘分布情况的分析,发现肿瘤中心CD8<sup>+</sup>T细胞浸润水平与患者总体生存密切相关。

结直肠癌的肿瘤环境存在异质性,可分为肿瘤中心和浸润边缘<sup>[15]</sup>。本研究发现,肿瘤浸润边缘的CD8<sup>+</sup>T细胞显著多于肿瘤中心,这与在胰腺癌中的研究结论是一致的<sup>[7]</sup>。同时,本研究发现肿瘤中心与浸润边缘的CD8<sup>+</sup>T细胞数量呈正相关趋势,这说明,尽管结直肠癌肿瘤的不同位置存在异质性,但

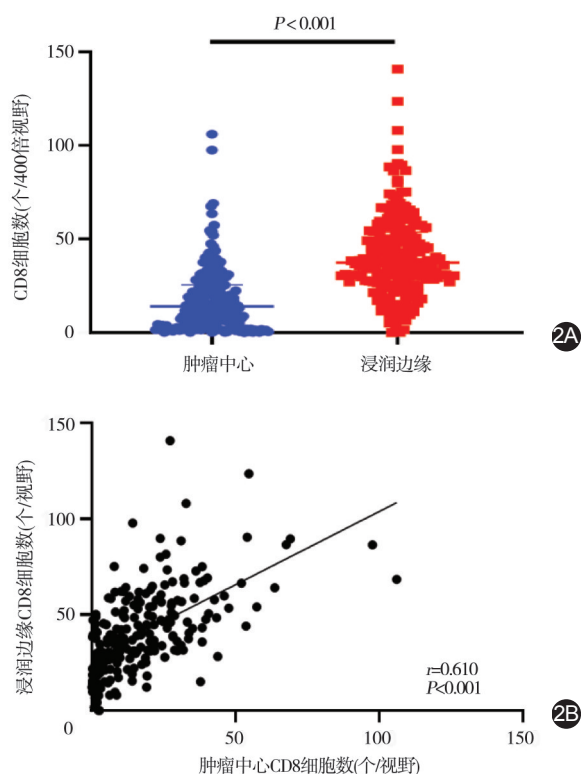


图2 本组221份结直肠癌石蜡标本肿瘤中心与浸润边缘CD8<sup>+</sup>T细胞数量及两者相关性 2A.两个区域CD8<sup>+</sup>T细胞浸润数量的比较; 2B.两个区域CD8<sup>+</sup>T细胞浸润水平的相关性

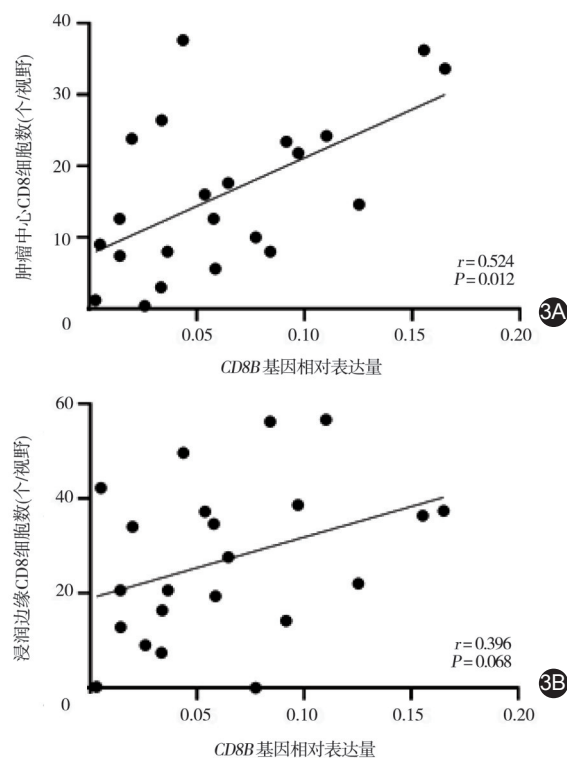
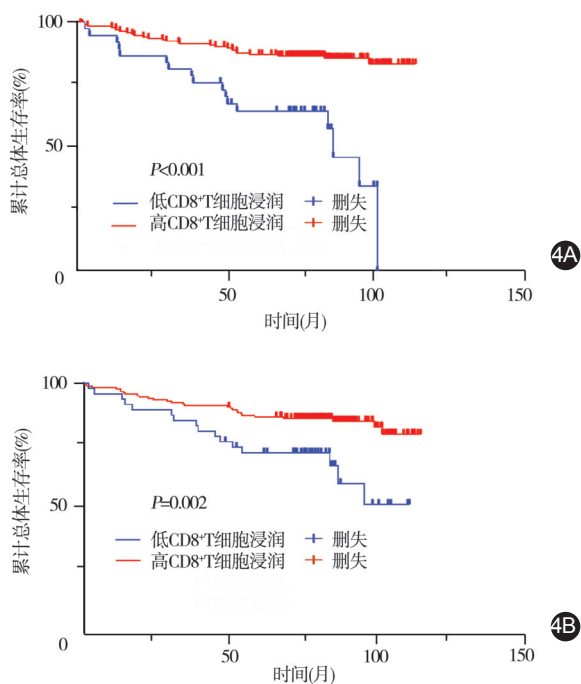


图3 本组22份新鲜结直肠癌组织标本CD8B基因相对表达量与CD8<sup>+</sup>T细胞数量的相关性分析 3A.肿瘤中心;3B.肿瘤浸润边缘

表 1 肿瘤中心及浸润边缘 CD8<sup>+</sup>T 细胞不同浸润水平的结直肠癌患者临床病理资料比较[例(%)]

基线资料	例数	肿瘤中心 CD8 <sup>+</sup> T 细胞计数(个/视野)				浸润边缘 CD8 <sup>+</sup> T 细胞计数(个/视野)			
		<2.6(37 例)	≥2.6(184 例)	χ <sup>2</sup> 值	P 值	<24.8(46 例)	≥24.8(175 例)	χ <sup>2</sup> 值	P 值
性别				3.588	0.058			2.174	0.140
女	103	12(32.4)	91(49.5)			17(37.0)	86(49.1)		
男	118	25(67.6)	93(50.5)			29(63.0)	89(50.9)		
年龄(岁)				0.152	0.697			0.455	0.500
<60	96	15(40.5)	81(44.0)			22(47.8)	74(42.3)		
≥60	125	22(59.5)	103(56.0)			24(52.2)	101(57.7)		
肿瘤位置				0.873	0.350			7.688	0.006
结肠	117	17(45.9)	100(54.3)			16(34.8)	101(57.7)		
直肠	104	20(54.1)	84(45.7)			30(65.2)	74(42.3)		
肿瘤分化程度 <sup>a</sup>				0.095	0.758			0.010	0.922
低分化	12	1(3.3)	11(6.8)			2(5.9)	10(6.3)		
中高分化	180	29(96.7)	151(93.2)			32(94.1)	148(93.7)		
脉管浸润 <sup>a</sup>				0.305	0.581			0.607	0.436
否	203	33(89.2)	170(93.4)			40(88.9)	163(93.7)		
是	16	4(10.8)	12(6.6)			5(11.1)	11(6.3)		
神经浸润 <sup>a</sup>				0.207	0.649			4.565	0.033
否	200	35(94.6)	165(90.7)			37(82.2)	163(93.7)		
是	19	2(5.4)	17(9.3)			8(17.7)	11(6.3)		
微卫星状态 <sup>a</sup>				0.610	0.435			0.322	0.571
稳定	123	21(75.0)	102(67.5)			24(64.9)	99(69.7)		
不稳定	56	7(25.0)	49(32.5)			13(35.1)	43(30.3)		
肿瘤 TNM 分期				5.320	0.021			6.763	0.009
I~II	133	16(43.2)	117(63.6)			20(43.5)	113(64.6)		
III~IV	88	21(56.8)	67(36.4)			26(56.5)	62(35.4)		

注: <sup>a</sup>部分数据缺失图 4 根据肿瘤中心与浸润边缘 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润水平高低分组后两组生存曲线比较 4A.肿瘤中心;4B.肿瘤浸润边缘

CD8<sup>+</sup>T 细胞在肿瘤中心和边缘的浸润特征是类似的,与既往研究一致<sup>[16]</sup>。本研究对 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数的方法基于免疫组织化学染色,是目前临床上评估肿瘤组织中 CD8<sup>+</sup>T 细胞的常用方法。肿瘤中心 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量与 *CD8B* 基因相对表达量显著相关,进一步确认了基于免疫组化染色 CD8<sup>+</sup>T 细胞计数方法的可靠性。*CD8B* 基因表达量与浸润边缘 CD8<sup>+</sup>T 细胞数量存在正相关的趋势( $P=0.068$ ),但差异未达到统计学意义。猜测这是由于本研究用于提取 RNA 的组织为肿瘤的癌巢,即主要为肿瘤中心而非浸润边缘;其次,较少的样本量也可能是结果呈现边缘性的原因。

既往研究在探索 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润与生存预后的关系时,表现出不一致的结论<sup>[16-17]</sup>。本研究表明,尽管浸润边缘有更多 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润,但肿瘤中心的 CD8<sup>+</sup>T 细胞水平对患者的总体生存有更强的预测能力,这可能是因为浸润至肿瘤上皮内

表2 影响本组 221 例结直肠癌患者预后的单因素和多因素分析

变量	例数	单因素分析		多因素分析	
		HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
性别			0.979		
女	103	1.000			
男	118	1.008(0.557~1.825)			
年龄(岁)			0.001		<0.001
<60	96	1.000		1.000	
≥60	125	3.265(1.569~6.794)		3.829(1.738~8.435)	
肿瘤位置			0.751		
结肠	117	1.000			
直肠	104	1.100(0.609~1.988)			
肿瘤分化程度 <sup>a</sup>			0.016		0.098
低分化	12	1.000		1.000	
中高分化	180	0.332(0.130~0.850)		0.412(0.144~1.177)	
脉管浸润 <sup>a</sup>			0.002		0.062
否	203	1.000		1.000	
是	16	3.368(1.499~7.568)		2.533(0.953~6.732)	
神经浸润 <sup>a</sup>			0.413		
否	200	1.000			
是	19	1.472(0.579~3.741)			
微卫星状态 <sup>a</sup>			0.082		
稳定	123	1.000			
不稳定	56	1.798(0.919~3.515)			
肿瘤TNM分期			0.006		0.106
I~II	133	1.000		1.000	
III~IV	88	2.279(1.249~4.160)		1.757(0.888~3.479)	
肿瘤中心CD8 <sup>+</sup> T细胞(个/视野)			0.001		0.013
<2.6	37	1.000		1.000	
≥2.6	184	0.250(0.135~0.461)		0.369(0.168~0.812)	
浸润边缘CD8 <sup>+</sup> T细胞(个/视野)			0.002		0.521
<24.8	46	1.000		1.000	
≥24.8	175	0.392(0.212~0.726)		0.764(0.336~1.738)	

注:<sup>a</sup>部分数据缺失

的淋巴细胞更直接接触癌细胞,从而发挥更强大的杀伤作用。需要指出,浸润边缘的高CD8<sup>+</sup>T细胞浸润水平可能同样是保护因素,尽管这一结果在多因素分析中未能被证实,需要更大样本量的深入研究。

目前临床上用于评估结直肠癌免疫水平的方法如免疫评分法等,将肿瘤中心和浸润边缘的CD8<sup>+</sup>T细胞水平均包含在内,但并未考虑两者的权重<sup>[18]</sup>。而本研究认为,CD8<sup>+</sup>T细胞在肿瘤内的分布存在异质性,且不同的浸润位置与预后的关系也不完全一致。因此,需要进一步研究,通过大样本数据构建合理的模型,将肿瘤不同位置的免疫细胞丰度得分以及不同免疫细胞类型得分进行加权,更加准确地

评估结直肠癌的免疫水平,为免疫治疗应答效果的预测提供更加可靠的参考<sup>[19]</sup>。

综上,结直肠癌中CD8<sup>+</sup>T细胞在肿瘤中心的浸润水平低于浸润边缘,且两者成正相关。肿瘤中心的CD8<sup>+</sup>T细胞浸润水平与总体生存有关,可考虑作为结直肠癌的潜在预后标志物。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Punt CJ, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14 (4) : 235 - 246. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.171.

- [2] Riaz N, Havel JJ, Makarov V, et al. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with Nivolumab[J]. *Cell*, 2017,171(4):934-949.e16. DOI:10.1016/j.cell.2017.09.028.
- [3] Governa V, Trella E, Mele V, et al. The interplay between neutrophils and CD8 + T cells improves survival in human colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2017,23(14):3847-3858. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-2047.
- [4] Kong JC, Guerra GR, Pham T, et al. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in primary and metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Dis Colon Rectum*, 2019, 62(4): 498-508. DOI: 10.1097/DCR.0000000000001332.
- [5] 邹一丰,蔡泽荣,陈钰锋,等. 结直肠癌肝转移与肿瘤局部免疫微环境的关系[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2013, 16(6): 547-551. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2013.06.013.
- [6] Millen R, Hendry S, Narasimhan V, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes within the primary tumor of patients with synchronous de novo metastatic colorectal carcinoma do not track with survival[J]. *Clin Transl Immunology*, 2020, 9(7): e1155. DOI:10.1002/cti2.1155.
- [7] Masugi Y, Abe T, Ueno A, et al. Characterization of spatial distribution of tumor - infiltrating CD8 + T cells refines their prognostic utility for pancreatic cancer survival[J]. *Mod Pathol*, 2019, 32(10):1495-1507. DOI:10.1038/s41379-019-0291-z.
- [8] Obeid JM, Wages NA, Hu Y, et al. Heterogeneity of CD8 + tumor - infiltrating lymphocytes in non - small - cell lung cancer: impact on patient prognostic assessments and comparison of quantification by different sampling strategies [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017,66(1):33-43. DOI:10.1007/s00262-016-1908-4.
- [9] Wang Y, Sun XQ, Lin HC, et al. Correlation between immune signature and high-density lipoprotein cholesterol level in stage II/III colorectal cancer[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(3): 1209-1217. DOI:10.1002/cam4.1987.
- [10] Fortis SP, Sofopoulos M, Sotiriadou NN, et al. Erratum to: Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer[J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5:48. DOI:10.1186/s40425-017-0248-z.
- [11] Sun R, Limkin EJ, Vakalopoulou M, et al. A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(9): 1180-1191. DOI:10.1016/S1470-2045(18)30413-3.
- [12] Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21):7252-7259. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-04-0713.
- [13] Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR - proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers[J]. *Nat Med*, 2020, 26(4):566-576. DOI:10.1038/s41591-020-0805-8.
- [14] Maby P, Tougeron D, Hamieh M, et al. Correlation between density of CD8 + T - cell infiltrate in microsatellite unstable colorectal cancers and frameshift mutations: a rationale for personalized immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(17): 3446-3455. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-14-3051.
- [15] Lee JA, Yoo SY, Oh HJ, et al. Differential immune microenvironmental features of microsatellite-unstable colorectal cancers according to fusobacterium nucleatum status[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, 70(1):47-59. DOI:10.1007/s00262-020-02657-x.
- [16] Ling A, Edin S, Wikberg ML, et al. The intratumoural subsite and relation of CD8 ( + ) and FOXP3 ( + ) T lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(10):2551-2559. DOI:10.1038/bjc.2014.161.
- [17] Matsutani S, Shibutani M, Maeda K, et al. Verification of the methodology for evaluating tumor - infiltrating lymphocytes in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(20): 15180-15197. DOI:10.18632/oncotarget.24612.
- [18] Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study[J]. *Lancet*, 2018, 391(10135): 2128-2139. DOI:10.1016/S0140-6736(18)30789-X.
- [19] Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20(11):662-680. DOI:10.1038/s41568-020-0285-7.