·综述·

免疫治疗相关生物标志物在食管癌中的研究进展

张瑞祥 康晓征 郑庆锋 王镇 陈先凯 李勇 秦建军 李印
国家癌症中心 国家肿瘤临床研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院胸外科,北京 100021
通信作者:李印,Email:liyin@cicams.ac.cn

【摘要】 食管癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率分别居第7位和第6位。近年来,以程序性死亡-1及程序性死亡配体1(PD-L1)等免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗不断进入临床实践,改变了食管癌的治疗现状。尽管免疫治疗已经为晚期食管癌患者带来长期的生存获益,并在新辅助治疗人群中显示出较高的病理缓解率,但仅有少部分患者治疗效果理想。因此亟需有效的生物标志物预测其临床疗效,以更好地识别免疫治疗获益人群。本文对近年发现的食管癌免疫治疗相关的生物标记物及其研究进展进行综述,并重点讨论这些标志物的临床应用前景。

【关键词】 食管肿瘤; 免疫治疗; 疗效预测; 生物标志物
基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2021YFC2501000)

Advances of immunotherapy-related biomarker in esophageal carcinoma

Zhang Ruixiang, Kang Xiaozheng, Zheng Qingfeng, Wang Zhen, Chen Xiankai, Li Yong, Qin Jianjun, Li Yin
Department of Thoracic Surgery, National Cancer Center, National Clinical Research Center for Cancer, Cancer Hospital of Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Corresponding author: Li Yin, Email: liyin@cicams.ac.cn

【 **Abstract** 】 Esophageal carcinoma is one of the most common malignant tumors in the world, with incidence and mortality rankings of 7th and 6th, respectively. In recent years, immunotherapy represented by immune checkpoint inhibitors of programmed death-1 and programmed death ligand 1 (PD-L1) has been introduced into clinical practice and has changed the treatment status of esophageal cancer. Although immunotherapy has provided long-term survival benefits for patients with advanced esophageal cancer and high pathological response rates in the neoadjuvant therapy, only a few of the patients have satisfactory therapeutic outcomes. Therefore, effective biomarkers for predicting immunotherapeutic effects are urgently needed to identify those patients who could benefit from immunotherapy. In this paper, we mainly discuss recent research advances of biomarkers related to the immunotherapy of esophageal cancer and the clinical application prospects of these biomarkers.

【 **Key words** 】 Esophageal neoplams; Immunotherapy; Efficacy prediction; Biomarker
Fund program: National Key R&D program 973 (2021YFC2501000)

食管癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,每年超过500 000人死于食管癌[1]。以铂类为基础的化疗是治疗食管癌的标准方法,但传统化疗效果有限。免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)作为新的治疗手段,在一些难治性肿瘤中表现出持久的应答率而在临床实践中广泛应用,并逐步改变了食管癌的治疗模式。同时,许多正在进行的临床试验也对免疫治疗相关的生物标志物进行了探索性评估,其中程序性死亡配体1(programmed cell death ligand 1, PD-L1)的表达显示出了良好的预测潜力并被应用到临床实践中,但其仍不足以准确地区分免疫治疗优

DOI:10.3760/cma.j.cn441530-20221213-00522
收稿日期 2022-12-13 **本文编辑** 朱雯洁
引用本文:张瑞祥, 康晓征, 郑庆锋, 等. 免疫治疗相关生物标志物在食管癌中的研究进展[J]. 中华胃肠外科杂志, 2023, 26(4): 396-400. DOI: 10.3760/cma.j.cn441530-20221213-00522.

势人群。近年来，标志物检测技术的发展为鲁棒性生物标志物的探索提供了新的机遇。其他生物分子，如微卫星不稳定性/错配修复缺陷（microsatellite-instability-high/mismatch-repair-deficient，MSI-H/dMMR）、肿瘤突变负荷（tumor mutational burden，TMB）及一些新型生物标志物，如循环肿瘤 DNA（circulating tumor DNA，ctDNA）、免疫相关生物标志物和微生物标志物等也在进一步的探索中。但目前为止这些标志物都尚未达成临床共识。此外，免疫治疗疗效预测标志物的研究目前主要集中在晚期食管癌临床试验中，已经得到验证的生物标记物是否能运用到围手术期治疗中，将是另一个需要探索的重要问题。因此，鉴定并充分验证可靠的疗效预测标志物仍具有挑战性。本文将对近年发现的食管癌免疫治疗相关的生物标记物和研究进展进行综述，并重点讨论这些标志物的临床应用前景。

一、程序性死亡配体 1（PD-L1）

KEYNOTE 系列研究的结果表明，PD-L1 表达水平越高，免疫治疗获益越明显。旨在评估帕博利珠单抗对比化疗用于晚期或转移性食管鳞癌或腺癌二线治疗疗效的 KEYNOTE-181 研究表明，两组患者的总生存（OS）在总人群中的差异没有达到统计学意义；但是在 PD-L1 的综合阳性评分（combined positive score，CPS）≥10 分的患者中，帕博利珠单抗显著延长了患者的 OS，且其客观缓解率（objective response rate，ORR）是化疗组的 3 倍[2]。亚组分析显示，帕博利珠单抗治疗在食管鳞癌和亚洲患者中观察到最大的生存获益。KEYNOTE-590 研究对帕博利珠单抗联合化疗与单纯化疗一线治疗晚期食管癌患者（包括鳞癌、腺癌和 Siewert Ⅰ型食管胃结合部腺癌）进行了随机对照研究[3]。在 PD-L1 CPS≥10 分的 ESCC 组、ESCC 组、PD-L1 CPS≥10 组和所有随机患者中，帕博利珠单抗联合化疗均较单纯化疗组显著延长了 OS，并改善了患者的无进展生存（PFS）和 ORR。然而，同样作为 PD-1 抑制剂，纳武利由单抗大多数情况下不需要通过 PD-L1 表达来筛选优势人群。ATTRACTION-03 是一项纳武利尤单抗对比单药化疗二线治疗晚期食管癌的多中心、随机、开放三期临床研究[4]。试验结果显示，纳武利尤单抗组的中位生存期为 10.9 个月，比化疗组（8.4 个月）延长 2.5 个月，死亡风险降低 23%。无论肿瘤 PD-L1 表达水平如何，均可观察到患者的获益。

由此可见，虽然目前为止 PD-L1 表达是甄别免疫获益人群的潜在标志物，但将其应用于更广泛的患者群体依然困难重重。首先，PD-L1 在食管癌中的表达呈现高度异质性，其在食管鳞癌细胞中表达率为 15%~83%，在免疫细胞中表达率为 13%~31%[5-7]。这种异质性给准确检测 PD-L1 的表达量带来了巨大的障碍。

其次，目前 PD-L1 相关临床研究数据缺乏广泛的代表性。尽管 KEYNOTE-181 和 KEYNOTE-590 的结果显示，PD-L1 具有食管癌免疫治疗疗效预测标志物的潜力，但几项针对胃或食管胃结合部（gastric/gastroesophageal junction，G/GEJ）肿瘤的临床试验提示了其局限性。ATTRACTION-2 试验表明，PD-L1 并不是纳武利由单抗三线治疗晚期 G/GEJ 腺癌的应答预测因子[8]。同样，KEYNOTE-061 三期研究显示，在既往已接受治疗的晚期 G/GEJ 腺癌患者中，与紫杉醇相比，帕博利珠单抗并未显著改善 PD-L1 阳性（CPS≥1 分）患者的 OS 和 PFS[9]。随后帕博利珠单抗联合化疗对比化疗用于治疗晚期 PD-L1 阳性（CPS≥1 分和 CPS≥10 分）G/GEJ 腺癌患者的一线三期 KEYNOTE-062 研究结果显示，两组的 OS 和 PFS 相近，且 CPS≥1 分的患者与 CPS≥10 分的患者有相似的生存结局[10]。这与 CheckMate 649 研究[11]的初步结果相印证。与此同时，我国的 ESCORT-1st 研究[12]、ORIENT-15 研究[13]、JUPITER-06 研究[14]显示，采用免疫联合化疗策略后，PD-L1 表达情况似乎对患者最终获益影响较小。因此，上述研究结果表明，PD-L1 表达并不是免疫治疗反应强有力的预测因子，仍需考虑人种、病理类型及不同治疗方案带来的影响。此外，既往研究发现不同治疗方案会对肿瘤免疫微环境产生不同的改变，如化疗增加食管癌患者外周血 T 细胞受体多样性、降低肿瘤 PD-L1 表达，而放化疗则使肿瘤 PD-L1 表达上升[15-16]。这提示需要结合不同治疗方案、患者临床特征或其他相关标志物，才可能达到精准甄别免疫治疗获益人群的目的。

然而，目前市面上 PD-L1 表达的检测与判读仍然未有统一的标准化方法。目前主要的 4 种 PD-L1 免疫组化检测试剂可在两个免疫组化平台（DAKO 和 Ventana）进行检测，且每种抗体的染色水平和评估阈值有所不同。更为复杂的是，随着越来越多的研究明确了肿瘤微环境与其他免疫细胞在免疫疗法中的作用，PD-L1 表达水平的评估亦相应地被延伸至免疫细胞中，其评估不仅需要评价肿瘤细胞，还要评价免疫细胞。为此，由国际肺癌研究学会牵头，5 家药企和 2 家诊断试剂公司共同参与完成蓝印计划，就不同免疫组化抗体检测肺癌肿瘤细胞 PD-L1 表达的一致性进行了研究。研究使用手术切除标本、穿刺和细胞学样本对 4 个抗体进行了测评，发现 28-8、22C3 和 SP263 具有较高的一致性；而 SP142 的敏感性较低，与其他 3 种抗体的一致性较差，且不同样本类型间结果有一致性[17-18]。目前尚缺乏足够的前瞻性临床研究证据支持抗体间检测结果互用的可行性。此外，PD-L1 表达的 CPS 判读存在很多主观性，如何判读及确定筛选阈值还需进一步探索。

二、微卫星不稳定性/错配修复缺陷（MSI-H/dMMR）

近年来，另一个肿瘤免疫生物标志物的研究重点是微卫星不稳定性（microsatellite instability，MSI）。MSI 指基因组中短串联重复序列次数的增加或者减少，反映了由于错配修复基因（MMR）异常导致的 DNA 复制错误。MSI 广泛存在于多种恶性肿瘤中，在结直肠癌中的研究尤为深入[19-20]。FDA 于 2017 年 5 月批准了帕博利珠单抗用于不可切除或转移性 dMMR/MSI-H 实体瘤患者的治疗。由此，MSI-H/dMMR 也正式进入到免疫疗法伴随诊断生物标志物中。与食管鳞癌和腺癌相比，胃癌中 MSI-H 更为普遍。具体来说，MSI-H 在胃癌中的发生率为 7%，食管胃结合部腺

癌为4%，食管腺癌为0.4%，食管鳞癌为0%[5]。二期篮式临床试验KEYNOTE-158对多种非结直肠dMMR/MSI-H实体肿瘤患者的帕博利珠单抗的治疗效果进行了评估。该试验纳入了27种肿瘤类型共233例患者，其中包括24例胃癌患者，ORR为45.8%，mPFS为11个月[21]。此外，NCI-MATCH二期临床试验纳入了4 902例不同类型的复发或难治型肿瘤患者，并根据分子检测结果进行靶向治疗[22]。该试验的ARM Z1D队列分析42例接受纳武利由单抗治疗的dMMR/MSI-H非结直肠癌患者发现，人群总体ORR为36%，食管腺癌或食管胃结合部腺癌患者ORR为66%，与PD-1抑制剂在其他亚群中的阳性结果一致。由于MSI-H/dMMR在食管癌中的发生率低，尚未有针对其设计的大型临床试验。

三、肿瘤突变负荷（TMB）

越来越多的研究表明，肿瘤的变异越多，免疫疗法的疗效越好。因此，肿瘤突变负荷（tumor mutational burden，TMB）是近几年来有前景的免疫治疗疗效预测指标。KENOTE158研究通过对1 073例不同肿瘤类型患者TMB的评估显示，TMB-H患者的ORR为29%，而非TMB-H患者的ORR为6%[21]；基于上述结果，2020年帕博利珠单抗被FDA批准用于成人和儿童TMB-H肿瘤。但值得注意的是，该生物标志物分析报告中并没有食管癌患者。食管癌基因突变中位数排在所有癌种的第6位[23]；在8%的胃癌、3%的食管胃结合部腺癌、2%的食管腺癌和3%的食管鳞癌观察到TMB-H的发生[5]。de Klerk等[24]在一项帕博利珠单抗治疗难治性食管癌的二期研究中纳入了39例食管腺癌和10例食管鳞癌患者，在27例可估TMB的患者中，7例TMB≥10 mut/Mb，且TMB为10 mut/Mb或更高时，OS有改善的趋势（P=0.086）。总体看来，TMB似乎可成为食管癌免疫治疗疗效的预测因子，但是由于没有大型的三期临床研究证实这一结论，TMB在食管癌免疫治疗中的疗效预测地位始终未得到肯定。值得注意的是，TMB的检测结果在不同平台和不同肿瘤间存在差异，且阈值尚缺乏共识，因此当前TMB作为生物标志物仍存在挑战。

四、新型疗效预测分子标志物

除了上述常见的生物标志物，仍然有很多的潜在标志物有探索的空间，循环肿瘤DNA（circulating tumor DNA，ctDNA）、免疫相关生物标志物和微生物标志物等都是研究热点，但都需要前瞻性研究进一步验证。

1.ctDNA：随着组学研究的发展以及高通量测序和液体活检等技术的不断开发，肿瘤标志物的检测已从静态检测扩展至动态监测，研究内容也逐步丰富。ctDNA作为标志物在诊断、疗效预测、预后及肿瘤动态监测中表现出极大的潜力。Bratman等[25]进行了一项前瞻性二期临床试验（INSPIRE研究，NCT02644369）用于探索不同瘤种的患者接受帕博利珠单抗治疗后ctDNA水平变化与免疫疗效的相关性。该研究发现，若监测期间ctDNA水平较基线上升，则无论上升多少，均与患者的疾病进展与较差的生存期相关；若监测期间ctDNA水平较基线下降，但未完全清除，这个组群也表现出较优的生存期；但若ctDNA完全清除，患者OS可高达100%（随访时间为25.4个月）。此外，ctDNA的清除较传统影像学变化先显现出来，因此，ctDNA作为监测免疫治疗疗效的标记物更具优势。此外，Fujisawa等[26]探索了用数字PCR检测早期ctDNA的变化是否可以预测晚期食管鳞癌患者对化疗的反应，研究发现，基于42例患者初始化疗周期前后ctDNA中变异等位基因频率的模型受试者工作特征曲线下面积为0.88，表明食管鳞癌患者初始化疗周期后早期ctDNA的改变可以精确地预测治疗反应。

2.肿瘤微环境：免疫细胞与肿瘤微环境之间的相互作用是近年来研究的热点。已有研究表明，中性粒细胞与淋巴细胞比率（neutrophil-to-lymphocyte ratio，NLR）和疗效相关。ORIENT-2研究是一项比较信迪利单抗与化疗在经一线治疗失败的晚期或转移性食管鳞癌患者中的疗效和安全性的二期对照临床研究。该研究同时探索了NLR与疗效之间的关系，结果显示治疗6周后，NLR<3的患者OS和PFS明显长于NLR≥3者，同时NLR反映了癌症发生和发展过程中免疫状态的差异[27]。然而免疫细胞与肿瘤微环境之间存在着极其复杂的相互作用。单一的生物标记物，难以全面反映肿瘤微环境中的状况。因此，为了从多维度精准评估食管癌的免疫微环境并更好地预测治疗疗效，有团队开发了反应肿瘤微环境的肿瘤炎性表达谱或免疫评分用于评估免疫治疗的效果[28]。Zhang等[29]对接受了新辅助放化疗的食管鳞癌患者的治疗前活检样本的免疫相关基因进行了整合分析，构建了基于4个免疫相关基因（*SERPINE1*、*MMP12*、*PLAUR*和*EPS8*）的预测模型。该模型为第一个用于预测食管鳞癌患者的病理完全缓解和预后的个性化免疫标记，曲线下面积为0.970。随后，研究团队将该模型在内部验证队列和外部验证队列中进行验证，两者曲线下面积分别为0.890和0.859。多变量分析显示该标记是病理完全缓解的唯一独立预测因子。Lu等[30]对96例接受ICI治疗的转移性胃肠道癌患者的肿瘤样本进行了395-plex免疫肿瘤（IO）相关基因靶基因测序，并构建了一个24个基因的免疫评分系统，以识别可能受益于ICI的患者。在此评分系统的筛选下，IO评分高的患者的持久临床获益率高于评分低的患者。IO评分在发现队列和验证队列中的曲线下面积分别为0.97和0.74，高于PD-L1（0.52）、TMB（0.69）和MSI（0.59）的曲线下面积，提示IO评分可能具有更高的预测价值。

3.微生物标志物：2015年，两篇发表在*Science*的论文首次阐明了肠道菌群和免疫治疗关系[31-32]。多项研究证实了肠道菌群的存在、组成和多样性水平直接影响患者的肿瘤免疫治疗效果[33-35]。微生物逐渐成为预测免疫治疗疗效的潜在生物标志物。McCulloch等[36]分析了患者治疗前的肠道微生物群组成与接受抗PD-1抑制剂治疗后临床结局和免疫相关不良反应的相关性。结果表明，在治疗开始约1年后，肠道微生物群成为治疗反应的主导因素，并且阻碍治疗的微生物发挥的作用似乎大过起到增强治疗作用的微

生物。Xu 等[37]在食管鳞癌中探索了肠道菌群和新辅助化疗疗效的相关性。研究纳入了接受卡瑞利珠单抗联合卡铂和白蛋白紫杉醇 2 个周期治疗的局部晚期胸段食管鳞癌患者。研究对新辅助治疗前、新辅助治疗两个周期后、手术后 3 个时间点采集粪便样本进行 16S 核糖体核糖核酸（rRNA）V3-V4 基因扩增子测序，进行细菌多样性和差异丰度分析。数据表明，与未达到临床病理完全缓解的患者相比，临床病理完全缓解的患者治疗前肠道菌群类型和组成不同，提示肠道微生物组的分类特征是预测病理反应的潜在生物标志物。尽管目前已有研究表明，肠道微生物组与临床预测因子生物学因素之间存在复杂相互作用，但有必要在更高维度上进行宏基因组研究，改善不同群体的代表性，同时控制临床协变量，并确保以相同的方式、使用相同的技术收集和处理样本，以进一步了解肠道微生物影响免疫治疗的机制并找出哪些特征更有可能直接影响免疫疗法的积极响应，从而制定个体化疗法[38]。

五、结语

癌症生物标志物是临床实践中的关键要素之一，也是发现和开发个性化癌症疗法的重点。免疫治疗可以通过诱导完全病理缓解而影响生存，那么潜在的优势人群应该在治疗开始之前被准确识别。然而，大部分标志物的研究均是在数量有限的队列中进行的，缺乏前瞻性研究而没得到充分的验证；此外，研究平台和技术的不统一造成结果一致性较差，而先进的设备、昂贵的耗材和试剂以及复杂的统计分析，进一步阻碍了研究结果向临床实践的推广。因此，目前尚无一可靠、经济有效的生物标志物预测患者对免疫治疗的反应。

尽管 PD-L1 表达被成功用于免疫治疗的指导用药，但其只在有限的条件下表现出预测价值且缺乏稳健性。免疫治疗疗效预测标志物的研究目前主要来源于晚期食管癌的临床试验，已经得到验证的生物标记物的预测性能否运用到围手术期治疗中，将是需要探索的另一个重要问题。此外，食管癌由于高度异质性及特殊的分子特征使标志物的探索更具挑战性。目前很多潜在标志物都具有可探索的空间，从多个维度对更大的队列进行多种标记物的前瞻性、个性化探索，可能已成为未来解决标志物研究趋势和方向。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参　考　文　献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.

[2] Kojima T, Shah MA, Muro K, et al. Randomized Phase III KEYNOTE-181 Study of Pembrolizumab Versus Chemotherapy in Advanced Esophageal Cancer[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(35):4138-4148. DOI: 10.1200/JCO.20.01888.

[3] Sun JM, Shen L, Shah MA, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for first-line treatment of advanced oesophageal cancer (KEYNOTE-590): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study[J]. Lancet, 2021, 398(10302):759-771. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01234-4.

[4] Kato K, Cho BC, Takahashi M, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(11): 1506-1517. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30626-6.

[5] Salem ME, Puccini A, Xiu J, et al. Comparative molecular analyses of esophageal squamous cell carcinoma, esophageal adenocarcinoma, and gastric adenocarcinoma [J]. Oncologist, 2018, 23(11): 1319-1327. DOI: 10.1634/theoncologist.2018-0143.

[6] Guo W, Wang P, Li N, et al. Prognostic value of PD-L1 in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis[J]. Oncotarget, 2018, 9(17): 13920-13933. DOI: 10.18632/oncotarget.23810.

[7] Jiang Y, Lo A, Wong A, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating immune cells and PD-L1 expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(18): 30175-30189. DOI: 10.18632/oncotarget.15621.

[8] Kang YK, Boku N, Satoh T, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2017, 390(10111): 2461-2471. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31827-5.

[9] Fuchs CS, Özgüroğlu M, Bang YJ, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated patients with PD-L1 – positive advanced gastric or gastroesophageal junction cancer (GC): Update from the phase III KEYNOTE-061 trial[J]. J Clin Oncol, 2020, 38: 4503. DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.4503.

[10] Shitara K, Van Cutsem E, Bang YJ, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab or pembrolizumab plus chemotherapy vs. chemotherapy alone for patients with first-line, advanced gastric cancer: the KEYNOTE-062 phase 3 randomized clinical trial[J]. JAMA Oncol, 2020, 6(10): 1571-1580. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.3370.

[11] Moehler M, Shitara K, Garrido M, et al. LBA6_PR Nivolumab (nivo) plus chemotherapy (chemo) versus chemo as first-line (1L) treatment for advanced gastric cancer/gastroesophageal junction cancer (GC/GEJC)/esophageal adenocarcinoma (EAC): first results of the CheckMate 649 study[J]. Ann Oncol, 2020, 31: S1191. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2296.

[12] Luo H, Lu J, Bai Y, et al. Effect of Camrelizumab vs Placebo Added to Chemotherapy on Survival and Progression-Free Survival in Patients With Advanced or Metastatic Esophageal Squamous Cell Carcinoma: The ESCORT-1st Randomized Clinical Trial[J]. JAMA, 2021, 326(10): 916-925. DOI: 10.1001/jama.2021.12836.

[13] Lu Z, Wang J, Shu Y, et al. Sintilimab versus placebo in combination with chemotherapy as first line treatment for locally advanced or metastatic oesophageal squamous cell carcinoma (ORIENT-15): multicentre, randomised,

double blind, phase 3 trial[J]. BMJ, 2022, 377: e068714. DOI: 10.1136/bmj-2021-068714.

[14] Wang ZX, Cui C, Yao J, et al. Toripalimab plus chemotherapy in treatment-naïve, advanced esophageal squamous cell carcinoma (JUPITER-06): a multi-center phase 3 trial[J]. Cancer Cell, 2022, 40(3):277-288.e3. DOI: 10.1016/j.ccell.2022.02.007.

[15] Lim SH, Hong M, Ahn S, et al. Changes in tumour expression of programmed death-ligand 1 after neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy in patients with squamous oesophageal cancer[J]. Eur J Cancer, 2016, 52:1-9. DOI: 10.1016/j.ejca.2015.09.019.

[16] Zhang C, Palashati H, Tan Q, et al. Immediate and substantial evolution of T-cell repertoire in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with esophageal squamous cell carcinoma treated with preoperative chemotherapy[J]. Carcinogenesis, 2018, 39(11):1389-1398. DOI: 10.1093/carcin/bgy116.

[17] Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project[J]. J Thorac Oncol, 2017, 12(2): 208-222. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.11.2228.

[18] Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 immunohistochemistry comparability study in real-life clinical samples: results of blueprint phase 2 project[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(9): 1302-1311. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.05.013.

[19] Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, et al. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types[J].Nat Med,2016,22(11): 1342-1350.DOI: 10.1038/nm.4191.

[20] Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade[J]. Science, 2017, 357(6349): 409-413. DOI: 10.1126/science.aan6733.

[21] Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 study [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(1): 1-10. DOI: 10.1200/JCO.19.02105.

[22] Azad NS, Gray RJ, Overman MJ, et al. Nivolumab is effective in mismatch repair-deficient noncolorectal cancers: results from arm Z1D-A subprotocol of the NCI-MATCH (EAY131) study[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(3): 214-222. DOI: 10.1200/JCO.19.00818.

[23] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer[J]. Nature, 2013, 500(7463):415-421. DOI: 10.1038/nature12477.

[24] de Klerk LK, Patel AK, Derks S, et al. Phase II study of pembrolizumab in refractory esophageal cancer with correlates of response and survival[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(9). DOI: 10.1136/jitc-2021-002472.

[25] Bratman SV, Yang S, Iafolla M, et al. Personalized circulating tumor DNA analysis as a predictive biomarker in solid tumor patients treated with pembrolizumab[J]. Nat Cancer, 2020, 1(9): 873-881. DOI: 10.1038/s43018-020-0096-5.

[26] Fujisawa R, Iwaya T, Endo F, et al. Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer[J]. Carcinogenesis, 2021, 42(10):1239-1249. DOI: 10.1093/carcin/bgab088.

[27] Xu J, Li Y, Fan Q, et al. Clinical and biomarker analyses of sintilimab versus chemotherapy as second-line therapy for advanced or metastatic esophageal squamous cell carcinoma: a randomized, open-label phase 2 study (ORIENT-2) [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 857. DOI: 10.1038/s41467-022-28408-3.

[28] Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, et al. IFN-γ-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade [J]. J Clin Invest, 2017, 127(8): 2930-2940. DOI: 10.1172/JCI91190.

[29] Zhang C, Zhang G, Sun N, et al. An individualized immune signature of pretreatment biopsies predicts pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy and outcomes in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 182. DOI: 10.1038/s41392-020-00221-8.

[30] Lu Z, Chen H, Jiao X, et al. Prediction of immune checkpoint inhibition with immune oncology-related gene expression in gastrointestinal cancer using a machine learning classifier[J]. J Immunother Cancer, 2020, 8(2). DOI: 10.1136/jitc-2020-000631.

[31] Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota[J]. Science, 2015, 350(6264):1079-1084. DOI: 10.1126/science.aad1329.

[32] Sivan A, Corrales L, Hubert N, et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy[J]. Science, 2015, 350(6264):1084-1089. DOI: 10.1126/science.aac4255.

[33] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors[J]. Science, 2018, 359(6371): 91-97. DOI: 10.1126/science.aan3706.

[34] Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients[J]. Science, 2018, 359(6371):97-103. DOI: 10.1126/science.aan4236.

[35] Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients[J]. Science, 2018, 359(6371):104-108. DOI: 10.1126/science.aao3290.

[36] McCulloch JA, Davar D, Rodrigues RR, et al. Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1[J]. Nat Med, 2022, 28(3): 545-556. DOI: 10.1038/s41591-022-01698-2.

[37] Xu L, Qi Y, Jiang Y, et al. Crosstalk between the gut microbiome and clinical response in locally advanced thoracic esophageal squamous cell carcinoma during neoadjuvant camrelizumab and chemotherapy[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(6):325. DOI: 10.21037/atm-22-1165.

[38] Lee KA, Thomas AM, Bolte LA, et al. Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma[J]. Nat Med, 2022, 28(3):535-544. DOI: 10.1038/s41591-022-01695-5.