

186例肝母细胞瘤新辅助化疗前后免疫浸润与预后的分析

许翔, 蒋宏, 刘钧澄, 陈华东, 钟志海, 张志崇, 余锦标, 徐哲, 谭立*

中山大学附属第一医院 肝胆胰外科中心, 广东 广州 510080

【摘要】 目的 分析肝母细胞瘤新辅助化疗对肝母细胞瘤免疫浸润的影响,为免疫治疗在肝母细胞瘤中的应用提供参考。方法 回顾性分析2010年8月至2019年12月在中山大学附属第一医院就诊并接受手术的186例原发肝母细胞瘤患儿,对患儿新辅助化疗前后的肿瘤进行免疫浸润评分(0~3分)评估,利用单因素及多因素Logistic回归分析与免疫浸润评分相关的临床因素,利用Kaplan-Meier法计算并用Log-rank法比较不同免疫浸润评分患儿的无复发生存和总生存,同时采用单因素及多因素Cox回归分析与预后相关的因素。最终采用多重免疫荧光染色分析6例患儿新辅助化疗前后的免疫浸润细胞种类及含量变化。结果 新辅助化疗前,瘤内免疫浸润评分为0分、1分、2分、3分的患儿比例分别为61.5%、33.0%、3.7%与1.8%。肿瘤边界免疫浸润评分为0分、1分、2分、3分的患儿比例分别为66.7%、28.2%、2.6%与2.6%。新辅助化疗前,无肝细胞癌样病灶($P=0.022$)、造血组织($P=0.005$)是高瘤内免疫浸润评分的影响因素。新辅助化疗前瘤内免疫浸润评分低的患儿3年无复发生存率更高($P=0.003$)。无肝细胞癌样病灶是无复发生存的独立保护因素($HR=0.26, 95\%CI 0.10\sim 0.68, P=0.006$)。新辅助化疗后,肿瘤内、交界的肿瘤免疫浸润增加的患儿占69.1%和61.5%。新辅助化疗后的肿瘤边界不规则($P=0.021$)是高肿瘤边界区免疫浸润评分的影响因素。新辅助化疗后瘤内免疫浸润评分高的患儿的3年无复发生存率更高($P=0.011$)。诊断年龄大是无复发生存的独立危险因素($HR=1.17, 95\%CI 1.02\sim 1.35, P=0.025$)。瘤内浸润的CD8⁺T细胞($P=0.020$)、B细胞($P=0.040$)、单核细胞($P=0.017$)和调节性T细胞($P=0.027$)在新辅助化疗后显著上升。结论 原发肝母细胞瘤淋巴细胞浸润较少,且新辅助化疗前免疫浸润程度高是无复发生存的危险因素,提示未化疗的肝母细胞瘤的高免疫浸润细胞或为免疫抑制细胞。新辅助化疗显著增加肿瘤淋巴细胞浸润,或增加CD8⁺T细胞计数等。化疗后免疫浸润增多的患儿3年无复发生存率更高。

【关键词】 肝母细胞瘤; 新辅助化疗; 免疫浸润评分; 临床预后

Analysis of immune infiltration before and after neoadjuvant chemotherapy and prognosis in 186 hepatoblastoma cases

Xu Xiang, Jiang Hong, Liu Juncheng, Chen Huadong, Zhong Zhihai, Zhang Zhichong, She Jinbiao, Xu Zhe, Tan Li*

Hepatopancreatobiliary Center, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

*Corresponding author: Tan Li, E-mail: tanli5@mail2.sysu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze the effects of neoadjuvant chemotherapy on immune infiltration of hepatoblastoma, and to provide reference for the application of immunotherapy in hepatoblastoma. **Method** 186 children with primary hepatoblastoma who were admitted and treated in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University from August 2010 to December 2019 were retrospectively analyzed. The immune infiltration score (0-3 points) before and after neoadjuvant chemotherapy was evaluated. Clinical factors related to immune infiltration score were analyzed by univariate and multivariate Logistic regression. The Kaplan-Meier method and the Log-rank method were used to calculate and compare the recurrence-free survival (RFS) and overall

基金项目:广州市科技计划项目(2023A04J2173)

*通信作者:谭立, E-mail: tanli5@mail2.sysu.edu.cn

survival (OS) of patients with different immune infiltration scores. Univariate and multivariate COX regression approach were chosen to analyze factors related to prognosis. Multiple immunofluorescence staining was finally used in 6 patients to evaluate the type and content change of infiltrating immune cells before and after neoadjuvant chemotherapy. **Result** Before neoadjuvant chemotherapy, the proportion of patients with intratumoral immune invasion scores of 0, 1, 2, 3 points were 61.5%, 33.0%, 3.7%, and 1.8%, respectively. The proportion of patients with tumor border immune infiltration scores of 0, 1, 2, 3 points were 66.7%, 28.2%, 2.6%, and 2.6%, respectively. Before neoadjuvant chemotherapy, no Hepatocellular carcinoma-like foci ($P=0.022$) and hematopoietic tissue ($P=0.005$) were influence factors of high intratumoral immune infiltration score. Patients with low intratumoral immune infiltration scores before neoadjuvant chemotherapy had higher 3-year RFS ($P=0.003$). No Hepatocellular carcinoma-like foci was an independent protective factor for RFS ($HR=0.26$, $95\%CI$ 0.10–0.68, $P=0.006$). After neoadjuvant chemotherapy, the proportions of patients with increased intratumoral and tumor border zone lymphocyte infiltration were 69.1% and 61.5%. Irregular tumor borders after neoadjuvant chemotherapy ($P=0.021$) was an influence factor of high tumor border zone immune infiltration score. Patients with high intratumoral immune infiltration scores after neoadjuvant chemotherapy had higher 3-year RFS ($P=0.011$). Older age at diagnosis was an independent risk factor for RFS ($HR=1.17$, $95\%CI$ 1.02–1.35, $P=0.025$). Infiltrating CD8⁺T cells ($P=0.020$), B cells ($P=0.040$), monocytes ($P=0.017$) and regulatory T cells ($P=0.027$) in the tumor were increased significantly after neoadjuvant chemotherapy. **Conclusion** Primary hepatoblastoma had less lymphocyte infiltration, and higher immune infiltration in primary hepatoblastoma before neoadjuvant chemotherapy was the risk factor of RFS, indicating the highly enriched cells in non-treated hepatoblastoma were immune suppressive cells. Lymphocyte infiltration in hepatoblastoma was significantly increased after neoadjuvant chemotherapy, which may indicate CD8⁺T cell counts increase. And patients with increased immune infiltration after chemotherapy had a higher 3-year RFS.

【Key words】 Hepatoblastoma; Neoadjuvant chemotherapy; Immune infiltration score; Clinical prognosis

儿童原发性肝脏恶性肿瘤极为罕见, 平均发病率通常不足 1.5/100 万, 在所有儿童恶性肿瘤中约占 1%。其中, 肝母细胞瘤占 66.7% 以上^[1]。且发病率以每年大约 4% 的速度在不断增长^[2]。目前国际上尚无肝母细胞瘤公认的诊疗指南, 外科手术切除是肝母细胞瘤治疗中最重要的部分^[3]。但部分患儿肿瘤负荷大, 或出现肝/门静脉或者其他大血管受累, 无法直接进行手术切除。积极化疗可有效缩小肿瘤, 使患儿重获手术可能^[4-5]。对可切除的肿瘤, 在手术前应用新辅助化疗有希望提高 R0 切除率, 改善患儿预后。然而, 高剂量化疗往往会产生长期毒性, 使患儿的生活质量显著下降^[6]。且部分肿瘤出现耐药和复发, 对难治性或复发性肝母细胞瘤的治疗仍未达到令人满意的效果, 1 年无进展生存率仅为 24%^[7]。当前仍需要一种不增加毒性剂量且提高疗效的综合治疗方式, 以改善患儿对化疗的耐受性、敏感性。

免疫治疗是当前消化道肿瘤的前沿治疗手段。在儿童实体瘤中, 已有研究初步探索了神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 的肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME), 并证明了肿瘤浸润淋巴细

胞在介导抗肿瘤免疫反应以及调节 TME 中的作用^[8-9]。在肿瘤发生早期, 肿瘤内细胞毒性 CD8⁺T 细胞浸润占主导地位^[10]。然而, 随着肿瘤逐渐进展, 这些细胞被肿瘤相关的巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs)、骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) 和介导 TME 中免疫抑制的调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs) 所取代^[8-9]。免疫抑制细胞的增加可能与神经母细胞瘤等儿童实体瘤的临床预后不良有关^[11-12]。然而由于肝母细胞瘤发病率低, 病例少, 目前尚未有免疫治疗成功应用于肝母细胞瘤^[13-14], 其免疫细胞浸润情况也尚未得到详细研究。VAKKILA 等^[15]在对 27 例儿童肿瘤样本 (其中包含 4 例肝母细胞瘤) 的分析中发现, 儿童肿瘤中主要的细胞类型是 CD68⁺ 巨噬细胞, 占肿瘤相关淋巴细胞的 68%, 而 T 细胞数量很少。另一项对 53 例儿童肿瘤样本 (其中包含 7 例肝母细胞瘤) 的研究同样表明肿瘤浸润 CD8⁺T 细胞的数量很少^[16]。目前针对肝母细胞瘤的免疫细胞浸润情况还有待详细探索。既往儿童肿瘤中单用抗程序性死亡受体 1 (programmed death-1, PD-1) 治疗的客观响应率低, 而化疗可诱导肿瘤

坏死,提高肿瘤免疫原性,改变TME,联合化疗及免疫治疗或可得到显著的增强效果^[17-19]。

本研究回顾性分析了2010年8月至2019年12月在中山大学附属第一医院就诊并接受手术的186例原发肝母细胞瘤患儿,探索了新辅助化疗前后的肝母细胞瘤免疫浸润情况及相关因素分析,以发现肝母细胞瘤新辅助化疗前后免疫浸润的影响因素、微环境改变情况,和其与预后的关系,为化疗联合免疫治疗在肝母细胞瘤中的应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象 本研究回顾性纳入2010年8月至2019年12月于中山大学附属第一医院就诊的肝母细胞瘤患儿。纳入标准:①原发患儿;②术后病理证实为肝母细胞瘤;③接受完整治疗疗程。排除标准:①经穿刺病理或术后石蜡病理诊断为其他肿瘤;②非原发患儿;③未接受手术治疗;④术前有其他非化学治疗史(包括介入等);⑤合并其他恶性肿瘤。

1.2 临床病理资料 本研究同时收集符合入组标准的患儿的临床基线指标,包括诊断时年龄、诊断时血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)水平、性别、诊断时术前分期系统(pRE-treatment extent of tumor, PRETEXT)分期及相关附加VPEFR因素信息、化疗前后2个时间点的肿瘤边界是否完整(基于影像学评估)及病理学相关信息,包括组织类型、微血管侵犯、肝细胞癌样病灶和造血组织。

其中,VPEFR指若患儿在影像学检查中发现肝静脉受侵犯(V)、门静脉受侵犯(P)、肿瘤延伸至肝外腹腔(E)、多灶性肿瘤(F)、肿瘤破裂(R)任意一个为阳性,则VPEFR判定为阳性^[20]。

1.3 随访 本研究通过电话及门诊收集记录了患儿的复发、死亡等随访信息。复发指经过治疗后患儿完全缓解,而影像学检查确认再次出现新生病灶。失访指患儿结束治疗后未再在本院门诊或住院治疗,和/或因电话停机、电话号码错误等未能电话随访。若出现复发或死亡,则根据影像学检查时间、住院资料、电话随访信息等确认复发或死亡的具体时间。研究终点为无复发生存(recurrence free survival, RFS)和总体生存(overall survival, OS),其中RFS定义为从明确临床诊断到首次复发或任何原因导致的死亡(以先发生者为准)的时间,

OS定义为从明确诊断到任何原因导致死亡的时间。末次随访时间为2020年12月14日,失访患儿3例。

1.4 肿瘤免疫浸润(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)评分 本研究获取了患儿新辅助化疗前、后的病理苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE染色)样本,通过以下方式判断免疫浸润。①确定TIL评估区域:仅评估浸润性肿瘤边界(肿瘤与正常肝组织间的较厚的纤维增生区域)内的TIL以及浸润性边缘的TIL^[21];肿瘤边界以外的淋巴细胞浸润(例如邻近的正常组织)不纳入统计;大面积的坏死及纤维化的区域不纳入统计。②分辨肿瘤内区域以及肿瘤边界,关注肿瘤边界及肿瘤内的TIL。③辨认需要观察的免疫浸润细胞类型:仅包括单核细胞浸润(淋巴细胞和浆细胞),不包括粒细胞浸润。④在低倍镜及高倍镜下评估单核细胞的面积占肿瘤面积的百分比,并按照不同的百分比水平进行评分,0分为<5%;1分为5%~20%;2分为20%~40%;3分为>40%。

1.5 多重免疫荧光染色 本研究获取了入组患儿中的6例具有化疗前穿刺及化疗后手术切除匹配的大体石蜡包埋组织,按标准步骤使用CD20、CD4、CD8、Foxp3、CD11c、PD-1的抗体,进行多重免疫荧光染色。

1.6 伦理声明 本研究已得到中山大学附属第一医院临床伦理委员会的伦理审批(伦审[2020]357号),研究的全过程遵循了1964年《赫尔辛基宣言》及其后来修正案中提出的伦理声明。

1.7 统计方法 采用Stata/MP 14.0对数据进行统计分析。连续性变量先进行正态性检验,若符合正态分布,采用均值±标准差来表示,组间差异比较采用 t 检验或方差分析;若不符合正态分布,则采用中位数(四分位间距)表示,组间差异比较采用Wilcoxon秩和检验或Kruskal-Wallis检验。分类变量采用频数(百分比)形式描述,组间差异比较采用卡方检验或Fisher确切概率法。免疫浸润评分的相关因素分析采用单因素及多因素Logistic回归分析,变量赋值情况与Cox比例风险回归分析相同。对患儿的RFS及OS采用Kaplan-Meier方法进行生存曲线分析,采用Cox比例风险回归模型对影响预后的因素进行单因素及多因素分析,并计算风险比(hazard ratios, HR)及其95%CI,HR>1表示相对于参照变量而言,结局事件发生风

险较高。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 肝母细胞瘤新辅助化疗前的免疫浸润情况分析 经筛选,186例入组患儿中,共110例患儿有化疗前的穿刺或手术活检样本可评估免疫浸润情况,其中含有肿瘤组织的109例,有交界组织的39例。化疗前瘤内免疫浸润评分为0分、1分、2分、3分的患儿比例分别为61.5%、33.0%、3.7%与1.8%。肿瘤边界免疫浸润评分为0分、1分、2分、3分的患儿比例分别为66.7%、28.2%、2.6%与2.6%。109例有肿瘤内组织患儿的中位诊断年龄为1.7(0.8,2.8)岁,男性占57.8%(63/109);其中,与免疫浸润评分为0分的患儿比较,免疫浸润评分为1~3分的患儿合并微血管浸润(12.5%比1.5%, $P=0.027$)或造血组织(79.5%比45.3%, $P=0.001$)的比例更高,无肝细胞癌样病灶的比例也更高(23.1%比7.5%, $P=0.035$)。39例有交界组织患儿的中位诊断年龄为1.8(1.2,3.3)岁。两组基线资料经比较,差异无统计学意义。

在单因素 Logistic 回归分析中(Logistic 回归分析各变量赋值情况与 Cox 比例风险回归分析相同),存在微血管侵犯($OR=9.43,95\%CI 1.06\sim 83.89,P=0.044$)、造血组织($OR=4.68,95\%CI 1.86\sim 11.73,P=0.001$)是瘤内免疫浸润评分高的危险因素,无肝细胞癌样病灶($OR=0.27,95\%CI 0.08\sim 0.87,P=0.029$)为保护因素。在多因素 Logistic 回归分析中,存在造血组织($OR=1.55,95\%CI 1.55\sim 11.24,P=0.005$)为瘤内免疫浸润评分高的独立危险因素,无肝细胞癌样病灶($OR=0.22,95\%CI 0.06\sim 0.80,$

$P=0.022$)为独立保护因素。

在分析新辅助化疗前免疫浸润评分与预后的关系时,排除3例失访患儿,一共107例患儿可纳入生存分析,其中有瘤内样本的为106例,有肿瘤边界样本的为37例。如图1所示,在化疗前,瘤内无淋巴细胞浸润的患儿的3年RFS率更高(0分比1~3分:87.1%比53.8%, $P=0.003$)。不同瘤内免疫浸润评分的患儿的3年OS率差异没有统计学意义(0分比1~3分:90.5%比85.8%, $P=0.647$)。

影响RFS的单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析结果见表1。单因素分析提示诊断年龄大($HR=1.19,95\%CI 1.04\sim 1.36,P=0.012$)、瘤内免疫浸润评分高($HR=3.43,95\%CI 1.43\sim 8.24,P=0.006$)是预后的危险因素,无肝细胞癌样病灶($HR=0.18,95\%CI 0.08\sim 0.45,P<0.001$)是预后的保护因素。在多因素分析中,无肝细胞癌样病灶是RFS的独立保护因素($HR=0.26,95\%CI 0.10\sim 0.68,P=0.006$)。

2.2 肝母细胞瘤新辅助化疗后的免疫浸润情况分析 186例入组患儿中,共162例患儿有化疗后的组织样本可评估免疫浸润情况,其中含有肿瘤组织的样本160例,而含有肿瘤边界组织的162例。新辅助化疗后瘤内免疫浸润评分为0分、1分、2分、3分的患儿比例分别为18.8%、56.3%、18.1%与6.9%。肿瘤边界免疫浸润评分为0分、1分、2分、3分的患儿比例分别为35.2%、54.3%、7.4%与3.1%。经分析,在160例有肿瘤组织样本的患儿中,暂无与免疫浸润评分显著相关的临床基线特征。在影响肿瘤边界免疫浸润评分的单因素 Logistic 回归分析中,化疗后肿瘤边界不规则($OR=3.86,95\%CI 1.22\sim 12.18,P=0.021$)是肿瘤边界免疫浸润评

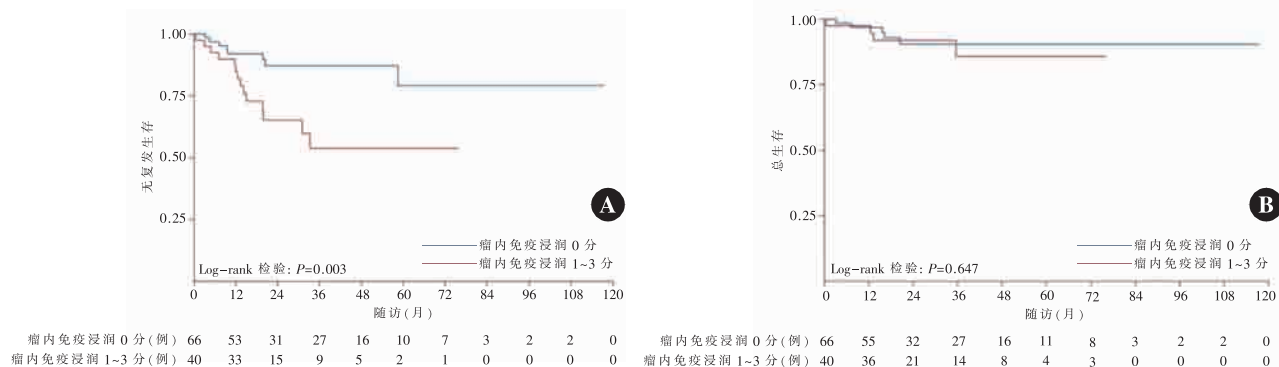


图1 新辅助化疗前不同瘤内免疫浸润评分的患儿的生存曲线

注:A,新辅助化疗前不同瘤内免疫浸润评分的患儿的无复发生存曲线;B,新辅助化疗前不同瘤内免疫浸润评分的患儿的总生存曲线。

表1 新辅助化疗前无复发生存的单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析

项目	赋值	单因素分析			多因素分析		
		HR	95%CI	P值	HR	95%CI	P值
诊断年龄	连续变量	1.19	1.04~1.36	0.012	1.15	0.99~1.33	0.063
性别							
男	1	1.00					
女	2	1.13	0.50~2.57	0.765			
边界							
光滑	1	1.00					
分叶	2	1.70	0.31~9.32	0.539			
不规则	3	4.40	0.73~26.53	0.106			
浸润	4	5.16	0.94~28.26	0.059			
VPEFR							
阴性	0	1.00					
任一阳性	1	0.95	0.25~3.45	0.912			
PRETEXT 分期							
I~II期	1	1.00					
III~IV期	2	1.82	0.74~4.46	0.193			
组织类型							
上皮型	1	1.00					
上皮与间叶混合型	2	0.68	0.20~2.29	0.533			
微血管侵犯							
无	0	1.00					
有	1	0.93	0.12~6.93	0.943			
肝细胞癌样病灶							
无	0	0.18	0.08~0.45	<0.001	0.26	0.10~0.68	0.006
有	1	1.00			1.00		
造血组织							
无	0	1.00					
有	1	1.26	0.53~3.00	0.603			
瘤内免疫浸润评分							
0分	0	1.00			1.00		
1~3分	1	3.43	1.43~8.24	0.006	2.32	0.89~6.04	0.086
肿瘤边界免疫浸润评分							
0分	0	1.00					
1~3分	1	1.28	0.29~5.78	0.744			

注: PRETEXT 分期, 术前分期系统分期; VPEFR, 指影像学检查中发现肝静脉受侵犯(V), 门静脉受侵犯(P), 肿瘤延伸至肝外腹腔(E), 多灶性肿瘤(F), 肿瘤破裂(R)。

分高的危险因素。

排除3例失访患儿, 一共159例患儿纳入生存分析, 其中有肿瘤组织的共157例, 有肿瘤边界组织的共159例。如图2所示, 在新辅助化疗后, 瘤内有淋巴细胞浸润的患儿的3年RFS率更高(0分比1~3分: 44.2%比76.5%, $P=0.011$)。不同瘤内免疫浸润评分的患儿的3年OS率差异无统计学意义(0分比1~3分: 79.1%比86.3%, $P=0.480$)。

影响RFS的单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析结果见表2。单因素分析提示化疗后肿瘤边界不规则或为浸润型(不规则: $HR=5.19$, 95% CI 1.08~25.07, $P=0.040$ 。浸润型: $HR=6.22$, 95%

CI 1.34~28.81, $P=0.019$)、微血管侵犯($HR=3.15$, 95% CI 1.51~6.58, $P=0.002$)是预后的危险因素, 瘤内免疫浸润评分高($HR=0.38$, 95% CI 0.18~0.82, $P=0.014$)是预后的保护因素。在多因素分析中, 诊断年龄大($HR=1.27$, 95% CI 1.10~1.46, $P=0.001$)、肿瘤边界不规则或为浸润型(不规则: $HR=5.30$, 95% CI 1.05~26.84, $P=0.044$ 。浸润型: $HR=5.40$, 95% CI 1.10~26.63, $P=0.038$)是RFS的独立危险因素。

2.3 新辅助化疗对肝母细胞瘤免疫浸润的影响 186例入组患儿中, 有化疗前后对应的病理切片的患儿为83例。瘤内淋巴细胞浸润减少、不变和增多的比例分别为3.7%、27.2%和69.1%。肿瘤边界淋

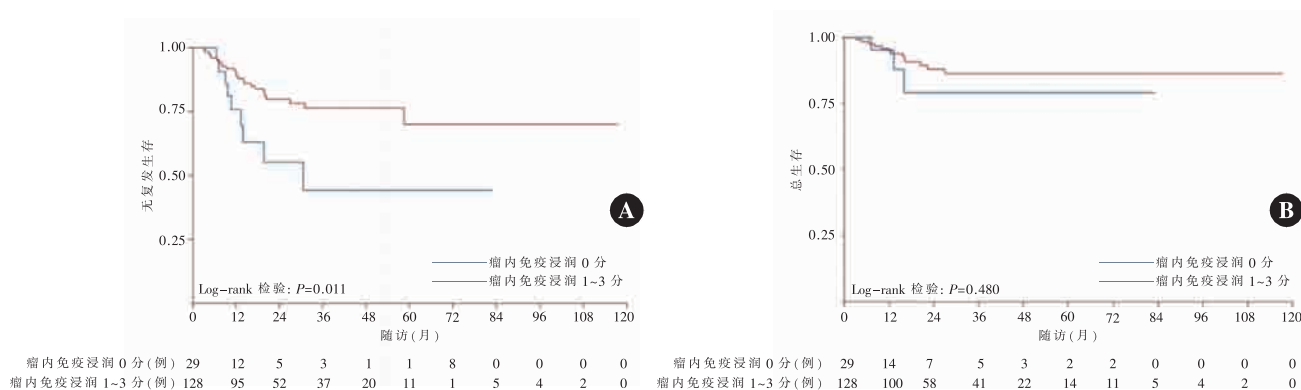


表 2 新辅助化疗后无复发生存的单因素及多因素 Cox 比例风险回归模型分析

项目	赋值	单因素分析			多因素分析		
		HR	95%CI	P 值	HR	95%CI	P 值
诊断年龄	连续变量	1.25	0.25~1.07	<0.001	1.27	1.10~1.46	0.001
性别							
男	1	1.00					
女	2	0.10	0.48~1.91	0.895			
边界							
光滑	1	1.00					
分叶	2	2.34	0.47~11.62	0.297			
不规则	3	5.19	1.08~25.07	0.040	5.30	1.05~26.84	0.044
浸润	4	6.22	1.34~28.81	0.019	5.40	1.10~26.63	0.038
组织类型							
上皮型	1	1.00					
上皮与间叶混合型	2	0.52	0.25~1.07	0.076			
微血管侵犯							
无	0	1.00			1.00		
有	1	3.15	1.51~6.58	0.002	1.64	0.56~4.84	0.370
肝细胞癌样病灶							
无	0	0.65	0.15~2.71	0.552			
有	1	1.00					
造血组织							
无	0	1.00					
有	1	0.98	0.23~4.10	0.973			
化疗后瘤内免疫浸润评分							
0分	0	1.00			1.00		
1~3分	1	0.38	0.18~0.82	0.014	0.72	0.20~2.60	0.615
化疗后肿瘤边界免疫浸润评分							
0分	0	1.00					
1~3分	1	1.89	0.82~4.35	0.135			

巴细胞浸润减少、不变和增多的比例分别为15.4%、23.1%和 61.5%。在单因素 Logistic 回归分析中(Logistic 回归分析各变量赋值情况与 Cox 比例风险回归分析相同), 化疗前有肝细胞癌样病灶($OR=3.73, 95\%CI 1.16\sim12.00, P=0.027$)是化疗后淋巴细胞浸润增多的危险因素, 而化疗后肝细胞癌样病灶

出现($OR=0.24, 95\%CI 0.07\sim0.82, P=0.022$)是化疗后淋巴细胞浸润增多的保护因素。

在分析新辅助化疗后淋巴细胞浸润改变与预后的关系时, 排除 1 例失访患儿, 一共 82 例患儿可纳入生存分析, 其中有瘤内组织样本的 80 例, 有肿瘤边界组织样本的 13 例。如图 3 所示, 新辅

助化疗后,瘤内免疫浸润评分增强、降低或不变的患儿的3年RFS率分别为77.9%和55.6%($P=0.082$)。瘤内免疫浸润评分不同变化的患儿的3年OS率差异无统计学意义(降低或不变比增强;80.4%

比86.9%, $P=0.432$)。

新辅助化疗后淋巴细胞浸润变化的患儿RFS的单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析见表3。单因素分析提示诊断年龄大($HR=1.21, 95\%CI 1.06\sim$

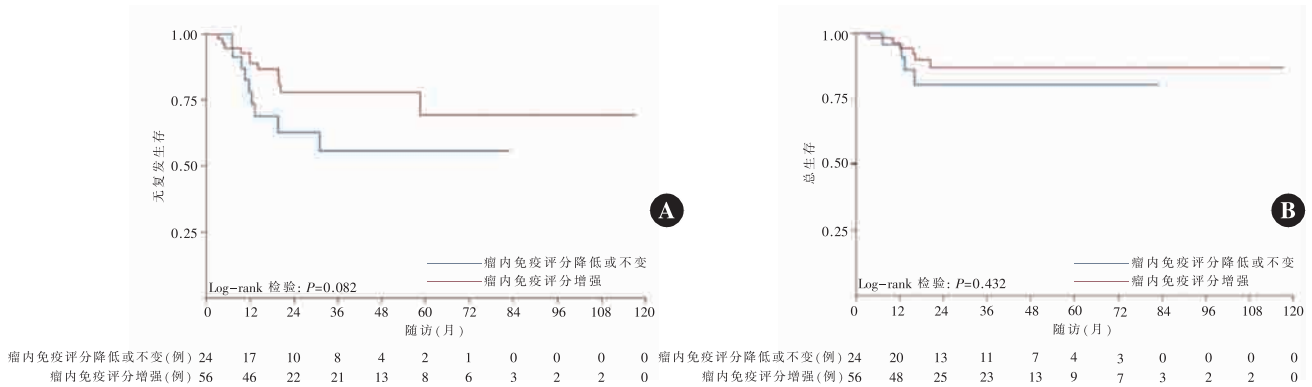


图3 新辅助化疗后瘤内淋巴细胞浸润变化的患儿的生存曲线

注:A,新辅助化疗后瘤内淋巴细胞浸润变化的患儿的无复发生存曲线;B,新辅助化疗后瘤内淋巴细胞浸润变化的患儿的总生存曲线。

表3 淋巴细胞浸润变化的患儿的无复发生存的单因素及多因素Cox比例风险回归模型分析

项目	赋值	单因素分析			多因素分析		
		HR	95%CI	P值	HR	95%CI	P值
诊断年龄	连续变量	1.21	1.06~1.38	0.003	1.17	1.02~1.35	0.025
性别							
男	1	1.00					
女	2	1.15	0.49~2.71	0.750			
VPEFR							
阴性	0	1.00					
任一阳性	1	0.88	0.24~3.26	0.847			
PRETEXT分期							
I~II期	1	1.00					
III~IV期	2	2.21	0.78~6.24	0.133			
化疗后边界							
光滑或分叶	1	1.00					
不规则或浸润	2	5.91	1.90~18.37	0.002	7.00	1.81~27.07	0.005
化疗后组织类型							
上皮型	1	1.00					
上皮与间叶混合型	2	0.40	0.15~1.04	0.060			
化疗后微血管侵犯							
无	0	1.00					
有	1	2.71	1.08~6.82	0.034	1.21	0.24~6.14	0.819
化疗后肝细胞癌样病灶							
无	0	0.39	0.09~1.68	0.206			
有	1	1.00					
化疗后造血组织							
无	0	1.00					
有	1	0.41	0.09~1.80	0.238			
瘤内淋巴细胞浸润变化							
减少或不变	1	1.00					
增多	2	0.46	0.19~1.12	0.089			
肿瘤边界淋巴细胞浸润变化							
减少或不变	1	1.00					
增多	2	0.97	0.16~5.83	0.973			

注:PRETEXT分期,术前分期系统分期;VPEFR,指影像学检查中发现肝静脉受侵犯(V),门静脉受侵犯(P),肿瘤延伸至肝外腹腔(E),多灶性肿瘤(F),肿瘤破裂(R)。

1.38, $P=0.003$)、不规则或浸润的肿瘤边界 ($HR=5.91$, $95\%CI$ 1.90~18.37, $P=0.002$)以及化疗后微血管侵犯 ($HR=2.71$, $95\%CI$ 1.08~6.82, $P=0.034$)是RFS的危险因素。多因素分析中,诊断年龄大 ($HR=1.71$, $95\%CI$ 1.02~1.35, $P=0.025$)、不规则或浸润的肿瘤边界 ($HR=7.00$, $95\%CI$ 1.81~27.07, $P=0.005$)是RFS的独立危险因素。

2.4 肝母细胞瘤新辅助化疗后改变的免疫细胞类型分析 为了明确新辅助化疗前后肝母细胞瘤免疫浸润细胞的情况,本研究选取了6例化疗前免疫浸润评分为1分,且化疗后免疫浸润评分显著提高的患儿的组织,检测了肿瘤内CD20、CD4、CD8、Foxp3、CD11c、PD-1的表达。结果提示(图4、5),CD8⁺T细胞(化疗前比化疗后:30.8个/mm²比609.2个/mm², $P=0.020$)、B细胞(化疗前比化疗后:14.1个/mm²比144.7个/mm², $P=0.040$)、Tregs(化疗前比化疗后:2.8个/mm²比180.8个/mm², $P=0.027$)以及单核细胞(化疗前比化疗后:34.1个/mm²比420.3个/mm², $P=0.017$)的浸润在化疗后均显著上升。

3 讨论

肝母细胞瘤是儿童原发性肝脏恶性肿瘤中的第一大常见肿瘤。在过去的40年中,由于化疗方案及外科手术技术的进步,肝母细胞瘤预后已经有了显著提升,5年OS率已从30%增加到70%~80%^[4]。但仍有部分难治性复发性的患儿对化疗耐药,预后较差;对化疗敏感的患儿也会因化疗引起的各种并发症而生活质量极低。因此,寻找新的治疗方式以改善化疗的敏感性、提高患儿的生活质量十分重要。免疫治疗已经在多种成人恶性肿瘤中被证实安全有效,但在儿童肿瘤中尚缺乏应用的临床证据。已有研究发现化疗可以起到调节肿瘤免疫微环境的作用,化疗联合免疫治疗已在多个癌种中应用,取得了不错的疗效^[22]。然而目前专门探索肝母细胞瘤免疫微环境的研究尚为空白,化疗对肝母细胞瘤免疫微环境的影响尚不清楚。因此在本研究中,我们初步探索了新辅助化疗前后肝母细胞瘤的肿瘤免疫微环境情况,以及免疫浸润与预后的关系,并分析了与免疫浸润评分相关的临床病理因素。

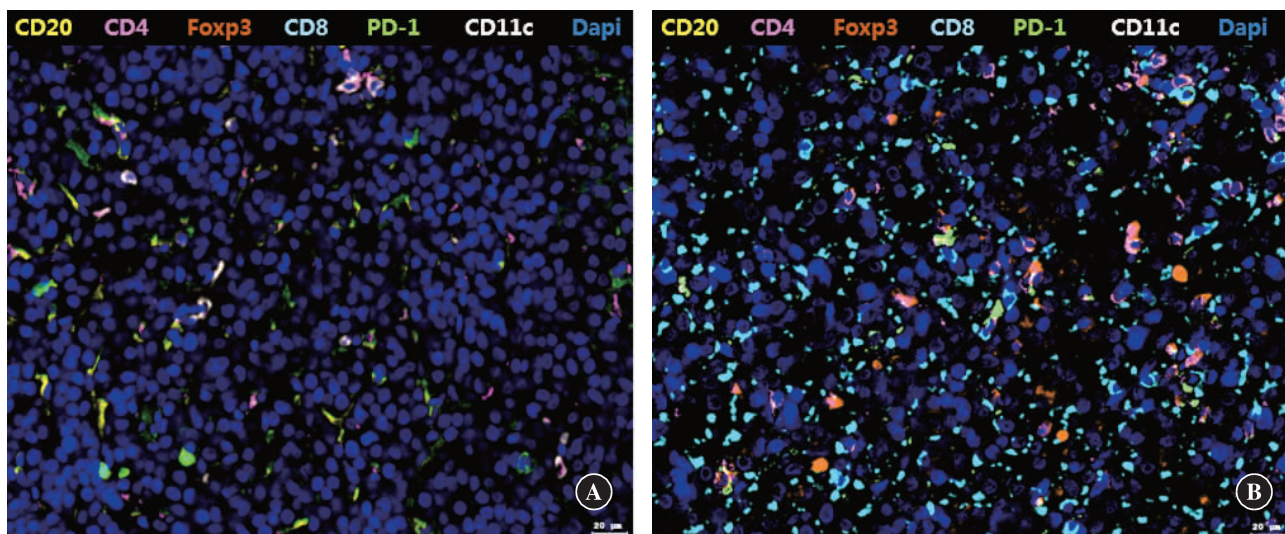


图4 化疗前(A)与化疗后(B)的多重免疫荧光染色组织学图像

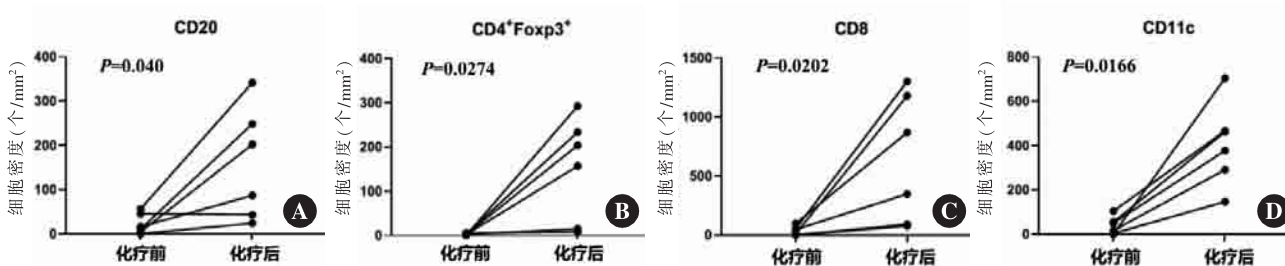


图5 化疗前后的肿瘤组织内不同类型细胞的表达量

在本研究中,61.5%和66.7%肝母细胞瘤在化疗前的瘤内和肿瘤边界中淋巴细胞浸润占比5%,同时,我们的生存分析也表明化疗前瘤内免疫浸润评分越高的患儿预后越差,提示原发肝母细胞瘤患儿化疗前瘤内浸润的多为抑制性免疫细胞,这一结果和其他文献报道的儿童肿瘤处于免疫抑制状态的结论一致^[15,23-25]。同时,我们发现化疗前无肝细胞癌样病灶是瘤内免疫浸润评分高的保护因素。肝细胞癌样病灶的组织病理学特征更倾向于肝细胞癌,常出现在>5岁的患儿中,是一种更具侵略性的肝母细胞瘤成分^[26],本研究提示了其恶性程度高或与其免疫抑制环境相关。

另外,本研究发现在新辅助化疗后,瘤内免疫浸润评分高的患儿预后更好。虽然同样都是高免疫浸润,但这可能与化疗逆转了肝母细胞瘤的免疫抑制性微环境有关。我们进一步通过染色发现,新辅助化疗可以增加CD8⁺T细胞、B细胞、单核细胞的浸润,增加抗肿瘤免疫,提示其对患者预后的改善作用,同时也为化疗联合免疫治疗的临床应用提供了可能性。然而并非所有患者都可以在化疗之后得到淋巴细胞浸润的增加,如何通过其他指标对这部分患者进行预测,对于临床上指导患者治疗十分重要。我们进一步行单因素Logistic回归分析发现,化疗前有肝细胞癌样病灶是化疗后瘤内淋巴细胞浸润增多的危险因素。已经有文献证明肝细胞癌样病灶表现出显著增加的基因突变数量,而这种基因突变可能表现出免疫原性作用^[26-27]。因此,含肝细胞癌样病灶的肝母细胞瘤患儿可能因高基因突变率而导致淋巴细胞浸润更强。

本研究仍有一些局限性:①本研究仅纳入单中心来源患者,相关统计结论仍需多中心大样本验证。②尚未对肝母细胞瘤免疫微环境进行更详细的探索,且术前穿刺样本的病理评估或存在偏移,后续应结合单细胞测序等技术更好地明确肝母细胞瘤在化疗前后的免疫浸润情况。③由于新辅助化疗方案的多样性以及纳入人数的限制,未能针对化疗方案进行亚组分析,无法确定具体的化疗药物对肝母细胞瘤免疫浸润的影响,也无法排除不同化疗药物对免疫浸润的不同影响。

参考文献

[1] SPECTOR LG, BIRCH J. The epidemiology of hepatoblastoma

[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012,59(5):776-779.

[2] LINABERY AM, ROSS JA. Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992-2004)[J]. *Cancer*, 2008,112(2):416-432.

[3] YANG T, WHITLOCK RS, VASUDEVAN SA. Surgical Management of Hepatoblastoma and Recent Advances [J]. *Cancers (Basel)*, 2019,11(12).

[4] CZAUDERNA P, LOPEZ -TERRADA D, HIYAMA E, et al. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2014,26(1):19-28.

[5] MEYERS RL, TIAO G, DE VILLE DGJ, et al. Hepatoblastoma state of the art: pre-treatment extent of disease, surgical resection guidelines and the role of liver transplantation [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2014,26(1):29-36.

[6] ZSÍROS J, MAIBACH R, SHAFFORD E, et al. Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study [J]. *J Clin Oncol*, 2010,28(15):2584-2590.

[7] ZSÍROS J, BRUGIÈRES L, BROCK P, et al. Efficacy of irinotecan single drug treatment in children with refractory or recurrent hepatoblastoma --a phase II trial of the childhood liver tumour strategy group (SIOPEL)[J]. *Eur J Cancer*, 2012,48(18):3456-3464.

[8] LAUDER I, AHERNE W. The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma [J]. *Br J Cancer*, 1972,26(4):321-330.

[9] CARLSON LM, KOGNER P. Neuroblastoma-related inflammation: May small doses of aspirin be suitable for small cancer patients? [J]. *Oncoimmunology*, 2013,2(7):e24658.

[10] MINA M, BOLDRINI R, CITTI A, et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma [J]. *Oncoimmunology*, 2015,4(9):e1019981.

[11] ASGHARZADEH S, SALO JA, JI L, et al. Clinical significance of tumor-associated inflammatory cells in metastatic neuroblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2012,30(28):3525-3532.

[12] MAO Y, EISSLER N, BLANC KL, et al. Targeting Suppressive Myeloid Cells Potentiates Checkpoint Inhibitors to Control Spontaneous Neuroblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2016,22(15):3849-3859.

[13] PARK J, CHEUNG N. Limitations and opportunities for immune checkpoint inhibitors in pediatric malignancies [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017,58:22-33.

[14] HUTZEN B, GHONIME M, LEE J, et al. Immunotherapeutic Challenges for Pediatric Cancers [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2019,15:38-48.

[15] VAKKILA J, JAFFE R, MICHELOW M, et al. Pediatric cancers are infiltrated predominantly by macrophages and contain a paucity of dendritic cells: a major nosologic difference with adult tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2006,12(7 Pt 1):2049-2054.

[16] AOKI T, HINO M, KOH K, et al. Low Frequency of Programmed

- Death Ligand 1 Expression in Pediatric Cancers[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2016,63(8):1461-1464.
- [17] TAWBI HA, BURGESS M, BOLEJACK V, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017,18(11):1493-1501.
- [18] BRACCI L, SCHIAVONI G, SISTIGU A, et al. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2014,21(1):15-25.
- [19] APETOH L, GHIRINGHELLI F, TESNIERE A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy[J]. *Nat Med*, 2007,13(9):1050-1059.
- [20] MEYERS R L, MAIBACH R, HIYAMA E, et al. Risk-stratified staging in paediatric hepatoblastoma: a unified analysis from the Children's Hepatic tumors International Collaboration[J]. *Lancet Oncol*, 2017,18(1):122-131.
- [21] SALGADO R, DENKERT C, DEMARIA S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014 [J]. *Ann Oncol*, 2015,26(2):259-271.
- [22] SWART M, VERBRUGGE I, BELTMAN JB. Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy [J]. *Front Oncol*, 2016,6:233.
- [23] JOSHI S. Targeting the Tumor Microenvironment in Neuroblastoma: Recent Advances and Future Directions [J]. *Cancers (Basel)*, 2020,12(8).
- [24] PÅHLMAN S, MOHLIN S. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in neuroblastoma [J]. *Cell Tissue Res*, 2018,372(2):269-275.
- [25] CROCE M, CORRIAS MV, ORENGO AM, et al. Transient depletion of CD4(+) T cells augments IL-21-based immunotherapy of disseminated neuroblastoma in syngeneic mice[J]. *Int J Cancer*, 2010,127(5):1141-1150.
- [26] EICHENMÜLLER M, TRIPPEL F, KREUDER M, et al. The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features[J]. *J Hepatol*, 2014,61(6):1312-1320.
- [27] BITON J, MANSUET-LUPO A, PÉCUCHE N, et al. TP53, STK11, and EGFR Mutations Predict Tumor Immune Profile and the Response to Anti-PD-1 in Lung Adenocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2018,24(22):5710-5723.