

# 肝细胞癌相关三级淋巴样结构免疫细胞组成

史婉婉<sup>1</sup>, 周子珍<sup>1</sup>, 谭康安<sup>1</sup>, 邵晨<sup>2</sup>, 洪源<sup>1</sup> (1.北京大学第一医院 感染疾病科, 北京 100034; 2.首都医科大学附属北京佑安医院 病理科, 北京 100069)

**摘要:** 目的 探讨肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 相关三级淋巴样结构 (tertiary lymphoid structure, TLS) 的免疫细胞组成。方法 以2016年4月至2019年10月北京大学第一医院收治的112例原发性HCC患者为研究对象, 收集其手术切除及HCC穿刺活检样本。对所有患者的肿瘤标本进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。采用免疫组织化学法对TLS阳性的标本进行CD3、CD20、PD1、CD45RO、CD21和CD68染色。采用IPP (Image Pro Plus) 软件计算TLS中阳性细胞占TLS的面积百分比, 比较其在不同HCC分期患者及不同部位 (瘤内、瘤旁) 的差异。结果 112例HCC患者中共21例患者标本TLS阳性。TLS阳性组和TLS阴性组中早期HCC患者 (CNLC I ~ II期) 比例分别为76.2% (16/21) 和49.5% (45/91), 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.919$ ,  $P = 0.027$ )。TLS阳性早期HCC患者, 瘤内TLS的CD3<sup>+</sup> [(69.19 ± 16.43) % vs (53.25 ± 14.48) %]、CD20<sup>+</sup> [(63.63 ± 17.72) % vs (44.44 ± 16.63) %]和CD21<sup>+</sup> [(68.48 ± 12.78) % vs (11.75 ± 7.20) %]比例显著高于瘤旁TLS, 而PD1<sup>+</sup>比例 [(6.94 ± 3.64) % vs (20.56 ± 8.47) %]显著低于瘤旁, 差异有统计学意义 ( $P$ 均 < 0.05), CD45RO<sup>+</sup> [(44.56 ± 19.67) % vs (41.00 ± 16.07) %]和CD68<sup>+</sup> [(10.25 ± 6.13) % vs (8.13 ± 5.78) %]比例差异无统计学意义 ( $P$ 均 > 0.05)。16例早期HCC患者 (CNLC I ~ II期) 中, 与自身瘤旁TLS相比, 瘤内TLS CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>和CD21<sup>+</sup>比例升高例数分别为11例、15例和16例, PD1<sup>+</sup>比例下降14例, CD45RO<sup>+</sup> (升高8例, 下降8例) 和CD68<sup>+</sup>比例 (升高7例, 下降9例) 升高与下降例数相似。TLS阳性早期HCC患者瘤内TLS的CD3<sup>+</sup> [(69.19 ± 16.43) % vs (35.60 ± 15.21) %]、CD20<sup>+</sup> [(63.63 ± 17.72) % vs (32.80 ± 13.85) %]和CD21<sup>+</sup> [(68.48 ± 12.78) % vs (10.00 ± 6.71) %]比例显著高于晚期HCC患者 ( $P$ 均 < 0.05), PD1<sup>+</sup> [(6.94 ± 3.64) % vs (9.60 ± 3.78) %]、CD45RO<sup>+</sup> [(44.56 ± 19.67) % vs (48.20 ± 13.94) %]和CD68<sup>+</sup> [(10.25 ± 6.13) % vs (7.40 ± 3.65) %]比例差异无统计学意义 ( $P$ 均 > 0.05)。TLS阳性早期HCC患者瘤旁TLS的CD3<sup>+</sup> [(53.25 ± 14.48) % vs (19.80 ± 5.07) %]和CD20<sup>+</sup> [(44.44 ± 14.63) % vs (21.60 ± 5.46) %]比例显著高于晚期HCC患者 ( $P$ 均 < 0.05), CD21<sup>+</sup> [(11.75 ± 7.20) % vs (11.80 ± 3.90) %]、PD1<sup>+</sup> [(20.56 ± 8.47) % vs (22.00 ± 9.49) %]、CD45RO<sup>+</sup> [(41.00 ± 16.07) % vs (38.60 ± 9.99) %]和CD68<sup>+</sup> [(8.13 ± 5.78) % vs (6.80 ± 4.15) %]比例差异无统计学意义 ( $P$ 均 > 0.05)。结论 早期HCC患者瘤内T细胞、B细胞和树突状细胞比例高于瘤旁TLS, 也高于晚期HCC患者瘤内TLS, 且其中耗竭型淋巴细胞减少, 记忆型淋巴细胞和巨噬细胞比例无变化。提示早期HCC患者瘤内TLS含有更多的活化淋巴细胞和树突状细胞, 可能是其发挥抗肿瘤免疫应答作用、延缓疾病进展和延长患者生存期的原因。

**关键词:** 肝细胞癌; 三级淋巴样结构; 免疫组织化学技术; CNLC分期

## The immune cell components of hepatocellular carcinoma-related tertiary lymphoid structure

Shi Wanwan<sup>1</sup>, Zhou Zizhen<sup>1</sup>, Tan Kang'an<sup>1</sup>, Shao Chen<sup>2</sup>, Hong Yuan<sup>1</sup> (1. Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. Department of Pathology, Beijing YouAn Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract: Objective** To investigate the composition of tertiary lymphoid structure (TLS) of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** A total of 112 patients with primary HCC admitted to Peking University First Hospital from April 2016 to October 2019 were selected as subjects. Surgical resection and liver cancer biopsy samples were collected. Tumor specimens of all patients were stained by hematoxylin-eosin (HE). The TLS positive specimens were stained with CD3, CD20, PD1, CD45RO, CD21 and CD68 by

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2021.01.007

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7162190); 国家自然科学基金面上项目 (81572808、81773252)

通讯作者: 洪源 Email: hongyuan@bjmu.edu.cn

immunohistochemistry. IPP (Image Pro Plus) software was used to calculate the area percentage of positive cells in TLS, and the differences among patients with different HCC stages and different sites (intratumoral and paratumoral) were compared. **Results** There were 21 patients out of 112 HCC patients whose TLS were positive. The ratio of patients with early stage HCC (CNLC I ~ II stage) in TLS positive group and TLS negative group were 76.2% (16/21) and 49.5% (45/91), respectively, the difference was statistically significant ( $\chi^2 = 4.919$ ,  $P = 0.027$ ). For HCC patients in early stage with TLS positive, the percentages of CD3<sup>+</sup> [(69.19 ± 16.43)% vs (53.25 ± 14.48)%], CD20<sup>+</sup> [(63.63 ± 17.72)% vs (44.44 ± 16.63)%] and CD21<sup>+</sup> [(68.48 ± 12.78)% vs (11.75 ± 7.20)%] of intratumoral TLS were significantly higher than those of paratumoral TLS, the proportion of PD1<sup>+</sup> [(6.94 ± 3.64)% vs (20.56 ± 8.47)%] was lower than that of paratumoral TLS, the differences were statistically significant (all  $P < 0.05$ ). There were no statistically significant differences in the percentages of CD45RO<sup>+</sup> [(44.56 ± 19.67)% vs (41.00 ± 16.07)%] and CD68<sup>+</sup> [(10.25 ± 6.13)% vs (8.13 ± 5.78)%] (all  $P > 0.05$ ). For the 16 patients with early HCC (CNLC I ~ II), compared with paraneoplastic TLS of themselves, the number of patients whose percentages of CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> and CD21<sup>+</sup> of intratumoral TLS increased were 11 cases, 15 cases and 16 cases, respectively, the number of patients whose CD45RO<sup>+</sup> (increased: 8 cases, decreased: 8 cases) and CD68<sup>+</sup> (increased: 7 cases, decreased: 9 cases) ratio increased is similar to those CD45RO<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> ratio decreased. The percentages of CD3<sup>+</sup> [(69.19 ± 16.43)% vs (35.60 ± 15.21)%], CD20<sup>+</sup> [(63.63 ± 17.72)% vs (32.80 ± 13.85)%] and CD21<sup>+</sup> [(68.48 ± 12.78)% vs (10.00 ± 6.71)%] of early stage HCC patients with TLS positive were significantly higher than those of advanced HCC patients with TLS positive (all  $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the percentages of PD1<sup>+</sup> [(6.94 ± 3.64)% vs (9.60 ± 3.78)%], CD45RO<sup>+</sup> [(44.56 ± 19.67)% vs (48.20 ± 13.94)%] and CD68<sup>+</sup> [(10.25 ± 6.13)% vs (7.40 ± 3.65)%] (all  $P > 0.05$ ). The percentages of CD3<sup>+</sup> [(53.25 ± 14.48)% vs (19.80 ± 5.07)%] and CD20<sup>+</sup> [(44.44 ± 16.63)% vs (21.60 ± 5.46)%] in paratumoral TLS of HCC patients in early stage with TLS positive were significantly higher than those of advanced HCC patients with TLS positive (all  $P < 0.05$ ). There were no significant differences in the percentages of CD21<sup>+</sup> [(11.75 ± 7.20)% vs (11.80 ± 3.90)%], PD1<sup>+</sup> [(20.56 ± 8.47)% vs (22.00 ± 9.49)%], CD45RO<sup>+</sup> [(41.00 ± 16.07)% vs (38.60 ± 9.99)%] and CD68<sup>+</sup> [(8.13 ± 5.78)% vs (6.80 ± 4.15)%] (all  $P > 0.05$ ). **Conclusions** The proportion of T cells, B cells and dendritic cells of intratumoral TLS of patients with early stage HCC were higher than those of paratumoral TLS, and also higher than those of intratumoral TLS of patients with advanced HCC, and the proportion of depletion lymphocytes decreased, while the proportion of memory lymphocytes and macrophages didn't change. It is suggested that TLS in HCC patients in early stage contains more activated lymphocytes and dendritic cells, which may be the reason for its anti-tumor immune response, delaying the progression of the disease and prolonging the survival of patients.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma; Tertiary lymphoid structure; Immunohistochemistry technique; CNLC stage

肝癌在全球恶性肿瘤中发病率居第6位,病死率居第4位,其中75%~85%为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)<sup>[1-3]</sup>。2014年我国男性肝癌新发病例为23.3万人,女性为8.5万人,占全球新发肝癌患者的50%以上。随着乙肝疫苗的接种和其他预防措施的应用,我国2000年至2014年肝癌每年发病率和病死率分别下降2.3%和2.6%,但其他因素如肥胖、酗酒、吸烟、高脂血症及糖尿病等也日益成为HCC的病因,预计HCC的发病率在未来仍将居高不下<sup>[4,5]</sup>。HCC的治疗方法十分有限,手术切除仅适用于早期患者<sup>[6]</sup>,中晚期患者虽可采用局部消融、介入治疗或化疗,但效果不理想,中位生存期低于1年<sup>[7]</sup>。此外,因术后缺乏其他治疗手段,肿瘤5年复发率高达70%<sup>[8]</sup>。21世纪初在我国开展的全死因回顾性调查表明,HCC病死率已由20世纪70年代的第3位上升到21世纪初的第2位<sup>[9]</sup>。

由于传统治疗方法效果不佳,近年来快速发展的免疫治疗手段逐渐成为攻克HCC的新希望,其中免疫检查点抑制剂和血管内皮生长因子抗体均已取得较好的治疗效果<sup>[10]</sup>,但作为肿瘤免疫治疗的另一个重要组成部分——肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)<sup>[11]</sup>在治疗HCC方面的报道却十分有限。其原因可能是HCC中的TIL数量,尤其是肿瘤特异性T细胞的数量较少以及HCC细胞的体细胞突变较少<sup>[12,13]</sup>。三级淋巴样结构(tertiary lymphoid structure, TLS)是一种存在于部分肿瘤内及肿瘤周围的异位淋巴组织<sup>[14]</sup>。大量研究表明,TLS是直接产生抗肿瘤细胞和体液免疫反应的结构,与肿瘤患者的生存期延长相关<sup>[15,16]</sup>。近期在对HCC的研究中也发现了该结构,并证明肿瘤早期(TNM I ~ II)而非晚期(TNM III ~ IV),瘤内而非瘤旁的TLS是抗

肿瘤免疫应答启动的直接部位,与患者的早期复发率降低和生存期延长有关<sup>[17]</sup>,但其原因尚未明确。为进一步研究其机制,本研究选择了T细胞表面标志CD3、B细胞表面标志CD20、树突状细胞(dendritic cell, DC)表面标志CD21、巨噬细胞表面标志CD68、记忆型淋巴细胞表面标志CD45RO和耗竭型淋巴细胞表面标志PD1的抗体<sup>[18]</sup>,通过免疫组织化学染色法检测早期和晚期HCC患者瘤内和瘤旁TLS的免疫细胞组成,并比较其差异。

## 1 资料和方法

**1.1 研究对象** 以2016年4月至2019年10月北京大学第一医院收治的112例原发性HCC患者为研究对象。纳入标准:符合《原发性肝癌诊疗规范(2019年版)》中HCC的诊断标准<sup>[19]</sup>,手术前或肝组织穿刺前未接受免疫抑制治疗或抗肿瘤的靶向治疗。排除标准:合并胆管细胞癌或其他恶性肿瘤;合并感染;肿瘤组织内有严重出血坏死;病历资料不完整。本研究方案经北京大学生物医学伦理委员会审查批准(批件号:IRB00001052-19042)。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 数据收集** 通过查阅患者住院病例,记录患者年龄、性别、既往病史中是否为复发、乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)、HBV DNA、HCV RNA、甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)、超声肝弹性检测结果(判断是否存在肝硬化和腹水)及病理分级。根据影像学检查结果确定肿瘤数目。HCC临床分期参照CNLC分期标准<sup>[19]</sup>, I~II期为早期HCC, III~IV期为晚期HCC。HCC病理分级参照Edmondson-Steiner标准<sup>[20]</sup>。

**1.2.2 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色** HCC患者手术切除后及穿刺活检的石蜡包埋样本切片脱蜡后,应用苏木精染色5 min, 1%盐酸乙醇分化5 s, 1%氨水返蓝2 min, 水洗后伊红染色1 min, 切片经二甲苯透明, 中性树胶封固, 于普通光学显微镜下观察HE染色结果。有淋巴细胞聚集簇结构的定义为TLS阳性, 反之定义为阴性。

**1.2.3 免疫组织化学染色** 对TLS阳性的石蜡切片进行CD3、CD20、PD1、CD45RO、CD68和CD21抗体(英国Abcam公司)的免疫组织化学染色。石蜡标本切片脱蜡至水, 抗原修复液高温高压修复2.5 min, 待切片冷却后浸入3%过氧化氢溶液, 室温孵育10 min, 磷酸盐缓冲液洗3次, 以1:100稀释度加入上述抗体, 4℃孵育过夜, 加入兔、鼠通用型二抗(丹麦Dako公司), 37℃孵育1 h, 应用DAB显色, 苏木精对比染色, 然后以二甲苯透明, 中性树胶封固, 于

普通光学显微镜下观察。应用图像系统对TLS结构区域进行拍摄, 采用IPP(Image Pro Plus)软件对染色面积与TLS面积的比例进行分析。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析。年龄、CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、PD1<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>、CD68<sup>+</sup>和CD21<sup>+</sup>占TLS面积比为计量资料, 符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 $t$ 检验; 性别、HBsAg、HBV DNA、HCV RNA和AFP检出情况, CNLC分期, 肝硬化及肿瘤病理分级为计数资料, 以例数表示, 两组间比较采用Pearson  $\chi^2$  检验或Fisher确切概率法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般资料** 112例HCC患者中共21例患者标本TLS阳性。病理图见图1。TLS阳性组和TLS阴性组患者的年龄, 性别, HBsAg、HBV DNA、HCV RNA和AFP检出情况, CNLC分期, 慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎和酒精性脂肪性肝病例数, 肝硬化及病理分级差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。TLS阳性组和TLS阴性组中早期HCC患者(CNLC I~II期)比例分别为76.2%(16/21)和49.5%(45/91), 差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.919$ ,  $P = 0.027$ ), 提示TLS阳性多见于早期HCC患者。见表1。TLS阳性早期和晚期HCC患者的一般资料见表2, 除CNLC分期外, 其他指标差异均无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ )。

**2.2 早期HCC患者瘤内与瘤旁TLS的免疫细胞组成** TLS阳性早期HCC患者, 瘤内TLS的CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>和CD21<sup>+</sup>比例显著高于瘤旁TLS, PD1<sup>+</sup>比例显著低于瘤旁TLS, 差异有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ), CD45RO<sup>+</sup>和CD68<sup>+</sup>比例差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ ), 见表3。16例早期HCC患者(CNLC I~II期)中, 与自身瘤旁TLS相比, 瘤内TLS CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>和CD21<sup>+</sup>比例升高例数分别为11例、15例和16例, PD1<sup>+</sup>比例下降14例, CD45RO<sup>+</sup>(升高8例, 下降8例)和CD68<sup>+</sup>比例(升高7例, 下降9例)升高与下降例数相似, 见图2。

**2.3 TLS阳性早期与晚期HCC患者TLS的免疫细胞组成** TLS阳性早期HCC患者瘤内TLS的CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>和CD21<sup>+</sup>比例显著高于晚期HCC患者( $P$ 均 $< 0.05$ ), PD1<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>和CD68<sup>+</sup>比例差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ ), 见表4。TLS阳性早期HCC患者瘤旁TLS的CD3<sup>+</sup>和CD20<sup>+</sup>比例显著高于晚期HCC患者( $P$ 均 $< 0.05$ ), CD21<sup>+</sup>、PD1<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>和CD68<sup>+</sup>比例差异无统计学意义( $P$ 均 $> 0.05$ ), 见表5。免疫组织化学染色见图3、图4。

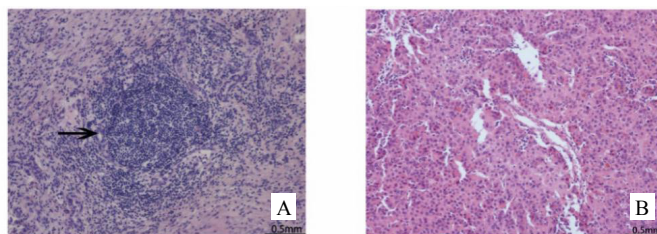


图1 TLS 阳性和 TLS 阴性 HCC 病理图(HE 染色)

注: A 可见淋巴细胞聚集成团状结构(箭头处), 即为 TLS 阳性; B 未见淋巴细胞聚集成团状, 即为 TLS 阴性

表1 TLS 阳性和 TLS 阴性 HCC 患者的一般资料

变量	TLS阳性组 (21例)	TLS阴性组 (91例)	统计量值	P值
年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	57.90 $\pm$ 8.831	57.86 $\pm$ 11.500	$t = 0.018$	0.986
男/女 (例)	18/3	75/16	$\chi^2 = 0.002$	0.968
HBsAg (+/-, 例)	18/3	83/8	$\chi^2 = 0.127$	0.722
HBV DNA ( $\leq 1000$ IU/ml / $> 1000$ IU/ml, 例)	14/7	77/14	$\chi^2 = 2.526$	0.112
HCV RNA (+/-, 例)	1/20	4/87	-	0.942
血清AFP ( $\leq 400$ $\mu$ g/L / $> 400$ $\mu$ g/L, 例)	15/6	75/16	$\chi^2 = 0.702$	0.402
CNLC分期 (IIIa / I ~ II, 例)	5/16	46/45	$\chi^2 = 4.919$	0.027
慢性乙型肝炎 (例)	18/3	83/8	-	0.429
慢性丙型肝炎 (例)	1/20	3/86	-	0.570
酒精性脂肪性肝病 (例)	2/19	5/88	-	0.614
肝硬化 (有/无, 例)	19/2	88/3	-	0.235
病理分级 (I ~ II / III ~ IV, 例)	10/11	33/58	$\chi^2 = 0.930$	0.335

注: “-”为采用 Fisher 确切概率法, 无具体统计量值。

表2 TLS 阳性早期和晚期 HCC 患者的一般资料

变量	早期HCC (16例)	晚期HCC (5例)	统计量值	P值
男/女 (例)	15/1	3/2	-	0.128
年龄 ( $\bar{x} \pm s$ , 岁)	59.75 $\pm$ 8.58	52.00 $\pm$ 7.52	$t = 0.087$	0.087
慢性乙型肝炎 (有/无, 例)	13/3	5/0	-	0.549
慢性丙型肝炎 (有/无, 例)	1/15	0/5	-	1.000
酒精性脂肪性肝病 (有/无, 例)	2/14	0/5	-	1.000
肝硬化 (有/无, 例)	14/2	5/0	-	1.000
复发 (有/无, 例)	13/3	5/0	-	0.549
血清AFP ( $\leq 400$ $\mu$ g/L / $> 400$ $\mu$ g/L, 例)	14/2	2/3	-	0.063
CNLC分期 (IIIa / I ~ II, 例)	2/14	4/1	-	0.011
肿瘤数目 ( $< 2$ 个 / $\geq 3$ 个, 例)	14/4	5/0	-	0.532
病理分级 (I ~ II / III ~ IV, 例)	8/8	2/3	-	1.000

注: “-”为采用 Fisher 确切概率法, 无具体统计量值。

表3 16例早期 HCC 患者瘤内及瘤旁 CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD21<sup>+</sup>、PD1<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>和 CD68<sup>+</sup>占 TLS 的面积 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

部位	CD3 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD21 <sup>+</sup>	PD1 <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>
瘤内	69.19 $\pm$ 16.43	63.63 $\pm$ 17.72	68.48 $\pm$ 12.78	6.94 $\pm$ 3.64	44.56 $\pm$ 19.67	10.25 $\pm$ 6.13
瘤旁	53.25 $\pm$ 14.48	44.44 $\pm$ 14.63	11.75 $\pm$ 7.20	20.56 $\pm$ 8.47	41.00 $\pm$ 16.07	8.13 $\pm$ 5.78
t值	2.911	3.340	15.460	5.912	0.561	1.009
P值	0.007	0.002	$< 0.001$	$< 0.001$	0.579	0.321

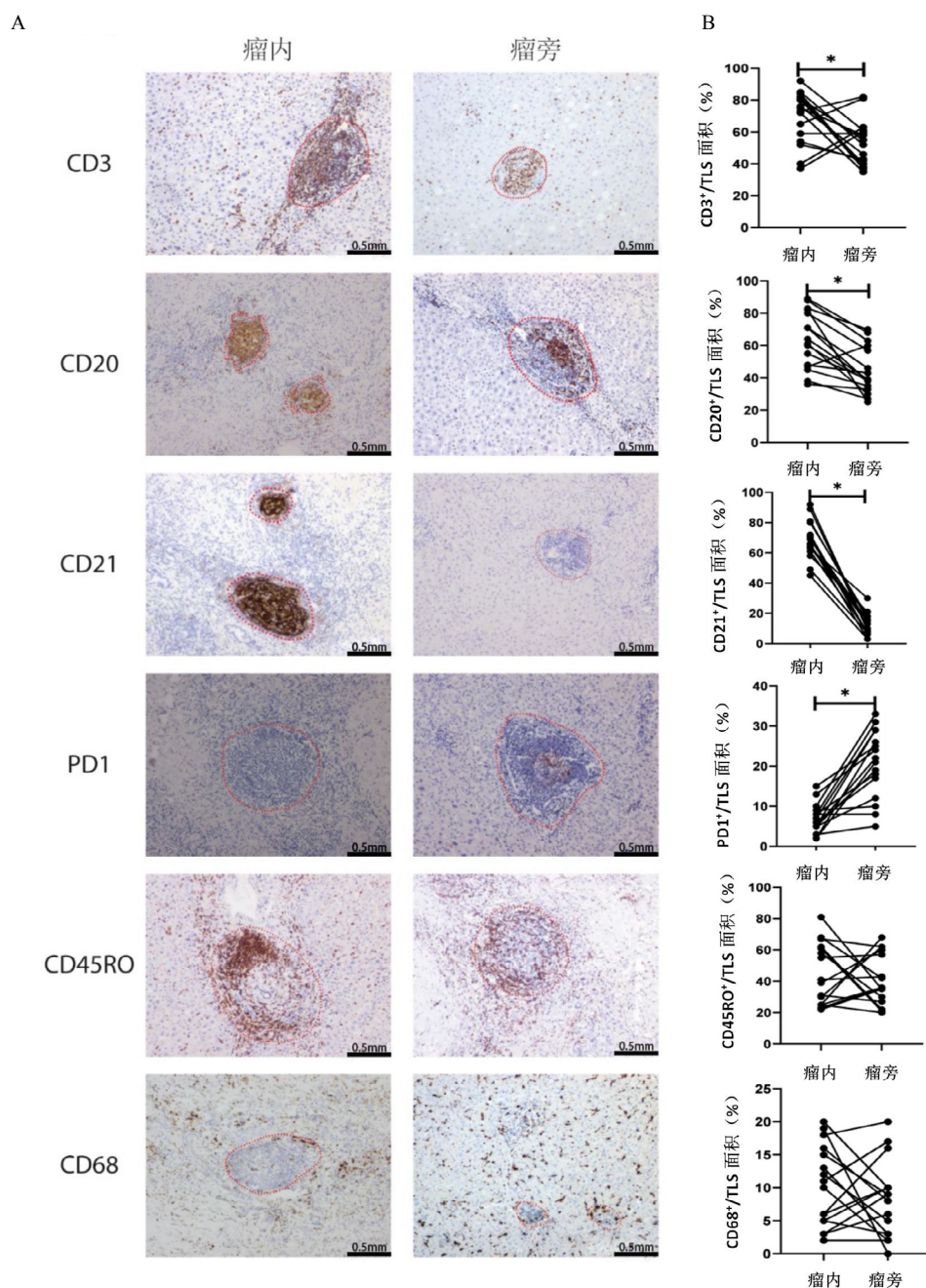


图2 早期HCC患者瘤内及瘤旁CD3、CD20、CD21、PD1、CD45RO和CD68免疫组织化学染色(DAB显色,苏木精对比染色)及与TLS面积比总结图

注: A为同一例早期HCC患者瘤内及瘤旁CD3、CD20、CD21、PD1、CD45RO和CD68的免疫组织化学染色图, B为16例早期HCC患者各阳性细胞与TLS面积比总结图, \* $P < 0.05$

表4 TLS阳性早期与晚期HCC患者瘤内CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD21<sup>+</sup>、PD1<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>和CD68<sup>+</sup>占TLS的面积比例( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	例数	CD3 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD21 <sup>+</sup>	PD1 <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>
早期HCC	16	69.19 ± 16.43	63.63 ± 17.72	68.48 ± 12.78	6.94 ± 3.64	44.56 ± 19.67	10.25 ± 6.13
晚期HCC	5	35.60 ± 15.21	32.80 ± 13.85	10.00 ± 6.71	9.60 ± 3.78	48.20 ± 13.94	7.40 ± 3.65
<i>t</i> 值		4.052	3.544	9.695	-1.415	0.381	0.977
<i>P</i> 值		0.001	0.002	< 0.001	0.173	0.707	0.341



表 5 TLS 阳性早期与晚期 HCC 患者瘤旁 CD3<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD21<sup>+</sup>、PD1<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup> 和 CD68<sup>+</sup> 占 TLS 的面积比例 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	例数	CD3 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD21 <sup>+</sup>	PD1 <sup>+</sup>	CD45RO <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>
早期HCC	16	53.25 ± 14.48	44.44 ± 14.63	11.75 ± 7.20	20.56 ± 8.47	41.00 ± 16.07	8.13 ± 5.78
晚期HCC	5	19.80 ± 5.07	21.60 ± 5.46	11.80 ± 3.90	22.00 ± 9.49	38.60 ± 9.99	6.80 ± 4.15
t值		4.992	5.194	-0.015	-0.323	0.312	0.472
P值		< 0.001	< 0.001	0.988	0.750	0.758	0.642

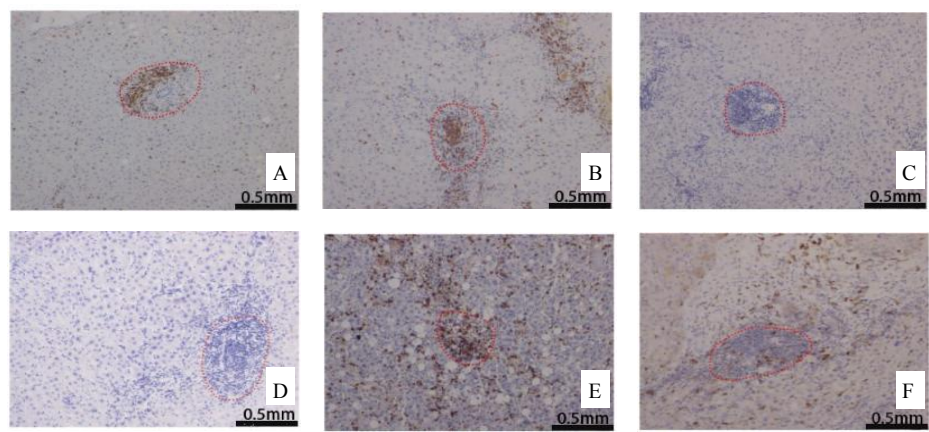


图 3 晚期 HCC 患者瘤内 CD3、CD20、CD21、PD1、CD45RO 和 CD68 免疫组织化学染色图 (DAB 显色, 苏木精对比染色)  
注: A ~ F 分别为 CD3、CD20、CD21、PD1、CD45RO 和 CD68

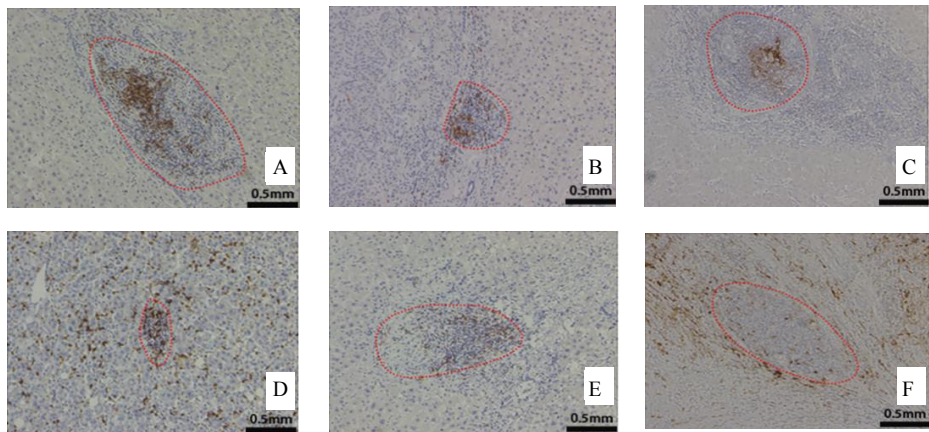


图 4 晚期 HCC 患者瘤旁 CD3、CD20、CD21、PD1、CD45RO 和 CD68 免疫组织化学染色图 (DAB 显色, 苏木精对比染色)  
注: A ~ F 分别为 CD3、CD20、CD21、PD1、CD45RO 和 CD68

3 讨论

TLS是免疫细胞在肿瘤微环境作用下形成的特殊淋巴样结构, 多数研究表明, 其与肿瘤患者的生存期及对治疗的应答呈正相关<sup>[15,16]</sup>。HCC中TLS阳性的比例为20%~25%<sup>[21]</sup>, 但对瘤旁TLS的首次研究报道却提示, TLS是肿瘤干细胞的生发中心, 与肿瘤患者的预后呈负相关<sup>[22]</sup>。最近的一项研究对这一看似矛盾的结论进行了补充: 尽管瘤旁TLS具有促进肿瘤生长的作用, 但HCC瘤内的TLS却是抗肿瘤免疫反应的重要“据点”, 由其产生的T细胞和B细胞通过发挥抗肿瘤作用可降低早期复发率, 延

长患者生存期<sup>[21]</sup>。此外, 该研究还表明, 只有早期而非晚期HCC患者中的TLS具有抗肿瘤效应。本研究表明18.8% (21/112) 的标本TLS阳性, TLS主要分布于早期HCC患者中, 与之前的报道<sup>[17,21]</sup>相符。

不同肿瘤部位和分期的TLS具有完全不同的功能和临床意义。TLS作为异位淋巴组织, 其免疫细胞组成与二级淋巴组织类似, 但由于所在器官和免疫微环境的多样性, 其细胞组成的异质性大大增加。根据细胞类型的普遍性可将其分为3类: 普遍成分、可能成分和其他成分。其中普遍成分在所有类型的TLS中均存在, 包括DC、B细胞、T细胞和高内皮微静脉

细胞<sup>[23,24]</sup>。本研究选取了其中的免疫细胞(B细胞、T细胞和DC)进行检测。结果表明,与瘤旁TLS及晚期HCC患者瘤内TLS相比,不论是作为抗原提呈细胞的B细胞和DC,还是作为免疫效应细胞的T细胞和B细胞,在早期HCC患者瘤内TLS中的比例均增加,同时反映免疫细胞耗竭的标志物PD1比例降低,这说明TLS在早期HCC瘤内发挥了较强的免疫效应<sup>[25]</sup>。这一效应可能是其发挥抗肿瘤作用使患者早期复发率降低和生存期延长的原因。本研究还表明,早期HCC患者瘤旁TLS的T细胞和B细胞数量高于晚期患者,其生物学意义有待进一步研究。对记忆型淋巴细胞的标记物CD45RO进行检测后发现,记忆型淋巴细胞标志物CD45RO在早期HCC瘤内及瘤旁TLS、晚期HCC瘤内及瘤旁TLS中均无差异,这与之前报道的绝大多数TIL是记忆型淋巴细胞相符<sup>[24]</sup>。巨噬细胞被认为在TIL中主要发挥免疫抑制作用<sup>[26]</sup>,有研究表明,TLS的可能组成成分—巨噬细胞<sup>[27]</sup>在这4组TLS中的数量无显著差异,提示这一因素对早期HCC患者瘤内TLS的免疫效应无特有的抑制作用。

综上,早期HCC患者瘤内TLS含有更多活化型T细胞、B细胞和DC,这为其强大的抗肿瘤免疫效应提供了一个合理的解释,也为将来新的免疫治疗手段的研发提供了理论基础。

#### 参考文献

- [1] 刘秀红, 赵一鸣, 赵晓飞. 肝细胞癌诊断与治疗研究进展[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2017, 9(2): 20-25.
- [2] 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.
- [3] SINGAL A G, LAMPERTICO P, NAHON P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends[J]. J Hepatol, 2020, 72(2): 250-261.
- [4] 孙宁宁, 孙凤霞, 李晓玲. 原发性肝癌基础肝病治疗的意义[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018, 10(1): 6-9.
- [5] ZHENG R, QU C, ZHANG S, et al. Liver cancer incidence and mortality in China: temporal trends and projections to 2030[J]. Chin J Cancer Res, 2018, 30(6): 571-579.
- [6] 钟坤雨, 鞠蔚华, 刘江伟. 巨大肝癌的外科治疗策略 [J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2019, 11(1): 1-5.
- [7] 吴海滨, 谢辉. Glasgow预后评分对肝细胞癌肝切除术后远期预后的评估[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2018, 10(1): 59-63.
- [8] KAO W Y, SU C W, CHAU G Y, et al. A comparison of prognosis between patients with hepatitis B and C virus-related hepatocellular carcinoma undergoing resection surgery[J]. World J Surg, 2011, 35(4): 858-867.
- [9] CHEN J G, ZHANG S W. Liver cancer epidemic in China: past, present and future[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1): 59-69.
- [10] PINATO D J, FESSAS P, SAPISOCHIN G, et al. Perspectives on the neoadjuvant use of immunotherapy in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2020.
- [11] ZACHARAKIS N, CHINNASAMY H, BLACK M, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer[J]. Nat Med, 2018, 24(6): 724-730.
- [12] ZHANG L, DING J, LI H Y, et al. Immunotherapy for advanced hepatocellular carcinoma, where are we?[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(2): 188441.
- [13] ZHANG Q, HE Y, LUO N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma[J]. Cell, 2019, 179(4): 829-845.e820.
- [14] CABRITA R, LAUSS M, SANNA A, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma[J]. Nature, 2020, 577(7791): 561-565.
- [15] ENGELHARD V H, RODRIGUEZ A B, MAULDIN I S, et al. Immune cell infiltration and tertiary lymphoid structures as determinants of antitumor immunity[J]. J Immunol, 2018, 200(2): 432-442.
- [16] HELMINK B A, REDDY S M, GAO J, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response[J]. Nature, 2020, 577(7791): 549-555.
- [17] LI H, WANG J, LIU H, et al. Existence of intratumoral tertiary lymphoid structures is associated with immune cells infiltration and predicts better prognosis in early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(4): 3451-3472.
- [18] KUREBAYASHI Y, OJIMA H, TSUJIKAWA H, et al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification[J]. Hepatology, 2018, 68(3): 1025-1041.
- [19] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 中华消化外科杂志, 2020, 19(1): 1-20.
- [20] 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.
- [21] CALDERARO J, PETITPREZ F, BECHT E, et al. Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2019, 70(1): 58-65.
- [22] FINKIN S, YUAN D, STEIN I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Immunol, 2015, 16(12): 1235-1244.
- [23] MUNOZ-ERAZO L, RHODES J L, MARION V C, et al. Tertiary lymphoid structures in cancer - considerations for patient prognosis[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(6): 570-575.
- [24] SAUTÈS-FRIDMAN C, PETITPREZ F, CALDERARO J, et al. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(6): 307-325.
- [25] RODRIGUEZ A B, ENGELHARD V H. Insights into tumor-associated tertiary lymphoid structures: novel targets for antitumor immunity and cancer immunotherapy[J]. Cancer Immunol Res, 2020, 8(11): 1338-1345.
- [26] DIEU-NOSJEAN M C, GOC J, GIRALDO N A, et al. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond[J]. Trends Immunol, 2014, 35(11): 571-580.
- [27] SILİNA K, SOLTERMANN A, ATTAR F M, et al. Germinal centers determine the prognostic relevance of tertiary lymphoid structures and are impaired by corticosteroids in lung squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2018, 78(5): 1308-1320.

收稿日期: 2020-12-20

史婉婉, 周子珍, 谭康安, 等. 肝细胞癌相关三级淋巴样结构免疫细胞组成研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2021, 13(1): 39-45.