

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.009

· 临床研究 ·

## 结合基因表达谱探讨恶性黑色素瘤免疫微环境分型的预后预测价值

秦岚群<sup>1</sup>, 邹征云<sup>1,2</sup> (1. 南京医科大学鼓楼临床医学院 肿瘤中心; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院 肿瘤中心, 江苏 南京 210008)

**[摘要]** **目的:** 探讨恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)微环境分型对MM患者预后的评估价值。**方法:** 对2010年7月至2017年5月在南京鼓楼医院手术切除的87例原发性MM组织进行二代测序, 免疫组化法检测PD-1、PD-L1、CD3<sup>+</sup>TIL、MSH2、MSH6、PMS2和MLH1的表达。随访患者的生存时间, 分析不同免疫微环境分型对患者预后的影响及其基因表达特征。**结果:** 根据PD-L1和TIL表达水平将87例MM患者的肿瘤微环境分为4个亚型: PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型或双阳型(15/87, 17.24%)、PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>-</sup>型(15/87, 17.24%)、PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>+</sup>型(20/87, 22.99%)、PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型或双阴型(37/87, 42.53%)。双阳型患者的中位无病生存期显著长于双阴型患者( $P < 0.05$ ), 此可能与双阴型患者存在更多CDK4、MCL1、MYC、AKT2、CCND1、FGF19等预后不良基因拷贝数扩增相关; 双阳型患者PD-1表达显著高于双阴型患者( $P < 0.01$ ), 可能与PD-L1、TIL分别与PD-1呈共表达和共不表达有关。**结论:** 根据PD-L1及TIL表达将MM患者微环境分为4种亚型, 能够区分MM患者预后, 双阴型患者存在更多预后不良基因拷贝数扩增。

**[关键词]** 恶性黑色素瘤; 基因突变; 免疫微环境; 肿瘤浸润淋巴细胞; 程序性死亡-配体1

**[中图分类号]** R739.5; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)07-0709-05

## Investigation of the prognostic value of immune microenvironment typing in malignant melanoma based on gene expression profile

QIN Lanqun<sup>1</sup>, ZOU Zhengyun<sup>1,2</sup> (1. The Comprehensive Cancer Centre, Nanjing Drum Tower Hospital, Clinical College of Nanjing Medical University; 2. The Comprehensive Cancer Centre of Nanjing Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the prognostic value of microenvironmental typing in patients with malignant melanoma (MM). **Methods:** Next generation sequencing (NGS) was performed on 87 cases of primary MM tissues that had been surgically removed in Nanjing Drum Tower Hospital from July 2010 to May 2017. Immunohistochemistry was carried out to detect the expressions of PD-1, PD-L1, CD3<sup>+</sup>TIL, MSH2, MSH6, PMS2 and MLH1. The survival of these patients was followed up. Then, the effects of different immune microenvironment types on prognosis and gene expression profile of patients were analyzed. **Results:** According to the expression level of PD-L1 and TIL, MM patients were divided into 4 immune microenvironment subtypes, including PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup> group (15/87, 17.24%), PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>-</sup> group (15/87, 17.24%), PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>+</sup> group (20/87, 22.99%), and PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> group (37/87, 42.53%). The median disease free survival (DFS) time of PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup> patients was significantly longer than that of PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> patients ( $P < 0.05$ ), which might be related with more copy number amplification of poor prognosis-associated genes in PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> patients, such as CDK4, MCL1, MYC, AKT2, CCND1 and FGF19. It was found that the expression of PD-1 in PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup> patients was significantly higher than that in PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> ones ( $P < 0.01$ ), which may be related to the co-expression or un-expression of PD-L1 and PD-1 as well as TIL and PD-1. **Conclusion:** The microenvironment of MM patients can be divided into four subtypes according to the expression of PD-L1 and TIL, which can distinguish the prognosis of MM patients. The PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> patients have more copy number amplification of poor prognosis related genes.

**[Key words]** malignant melanoma (MM); gene mutation; immune microenvironment; tumor infiltrating lymphocyte (TIL); programmed death-ligand 1 (PD-L1)

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(7): 709-713. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.07.009]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81872484, No. 82073365); 江苏省社会发展面上项目(No. BE2019605)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81872484, No. 82073365), and the Social Development Project of Jiangsu Province (No. BE2019605)

**[作者简介]** 秦岚群(1994—), 女, 硕士生, 主要从事恶性黑色素瘤生物免疫治疗研究, E-mail: 1103291776@qq.com

**[通信作者]** 邹征云(ZOU Zhengyun, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事恶性肿瘤生物免疫治疗研究, E-mail: zouzhenyuan001@163.com

恶性黑色素瘤(malignant melanoma, MM)是侵袭性极强的皮肤恶性肿瘤。随着靶向及免疫治疗药物的相继上市, MM患者的总生存期(overall survival, OS)得到极大提升<sup>[1-2]</sup>。近年来, 随着肿瘤免疫微环境研究的深入开展, 在MM的研究<sup>[3]</sup>中根据程序性死亡-配体1(programmed death-ligand 1, PD-L1)及肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)的水平进行肿瘤微环境免疫分型(tumor microenvironment immune type, TMIT), 以此评估肿瘤患者的预后具有一定的价值, 此后逐渐被应用于肺癌、胆囊癌、皮肤附件癌等多种肿瘤<sup>[4-6]</sup>。同时随着二代测序(next generation sequencing, NGS)技术的发展, 根据肿瘤患者的特异性基因制定个体化治疗方案已成为主流的肿瘤治疗策略。因此综合评估免疫微环境指标和基因突变特征, 从而选择最佳的治疗方案尤为重要<sup>[7]</sup>。本课题回顾性分析2010年7月至2017年5月在南京鼓楼医院行肿瘤根治术或肿瘤穿刺活检术的MM患者的临床、病理及基因检测资料, 旨在探讨TMIT对MM患者预后的评估价值、基因组图谱与免疫微环境指标之间的相关性。

### 1 资料与方法

#### 1.1 临床标本的来源及NGS检测

选取2010年7月至2017年5月在南京鼓楼医院行肿瘤根治术或肿瘤穿刺活检术的I~III期MM患者的石蜡组织标本, 常规行PD-1、PD-L1、CD3<sup>+</sup>TIL、MSH2、MSH6、PMS2和MLH1等免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色, 病理结果由两位高年资病理学专家采用双盲法判读。所有患者术前均未接受治疗, 术后接

受化疗、生物治疗和定期随访等。

用QIAamp DNA FFPE组织试剂盒(Qiagen)提取组织标本中DNA, 送往临床集中检测中心(南京Geneseeq科技有限公司)进行NGS检测, 用R语言软件绘制基因组图谱。

#### 1.2 病例随访

随访以电话方式进行。末次随访时间为2019年12月, 中位随访时间35个月, 随访率为90%, 共有87例样本纳入本研究分析。

#### 1.3 统计学处理

采用SPSS25.0统计学软件对实验数据进行统计学分析, 用GraphPad Prism软件绘制生存曲线。采用Log-rank法行生存曲线显著性检验, 计数资料采用卡方检验, Spearman相关系数行肿瘤免疫微环境指标相关性分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MM患者TMIT及其与预后的关系

以PD-L1及TIL表达状态(cutoff值为0.05)将87例MM患者的肿瘤微环境分为4个亚型: PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型或双阳型(15例, 17.24%)、PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>-</sup>型(15例, 17.24%)、PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>+</sup>型(20例, 22.99%)和PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型或双阴型(37例, 42.53%)。

Log-rank法分析结果(图1)显示, PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型患者的中位无病生存期(disease free survival, DFS)及OS均较长, 而PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型患者的DFS和OS较短; 虽然4型患者中DFS及OS差异比较均无统计学意义(均 $P>0.05$ ), 但PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型患者较PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型患者的DFS差异比较有统计学意义( $P<0.05$ ), OS有延长的趋势。

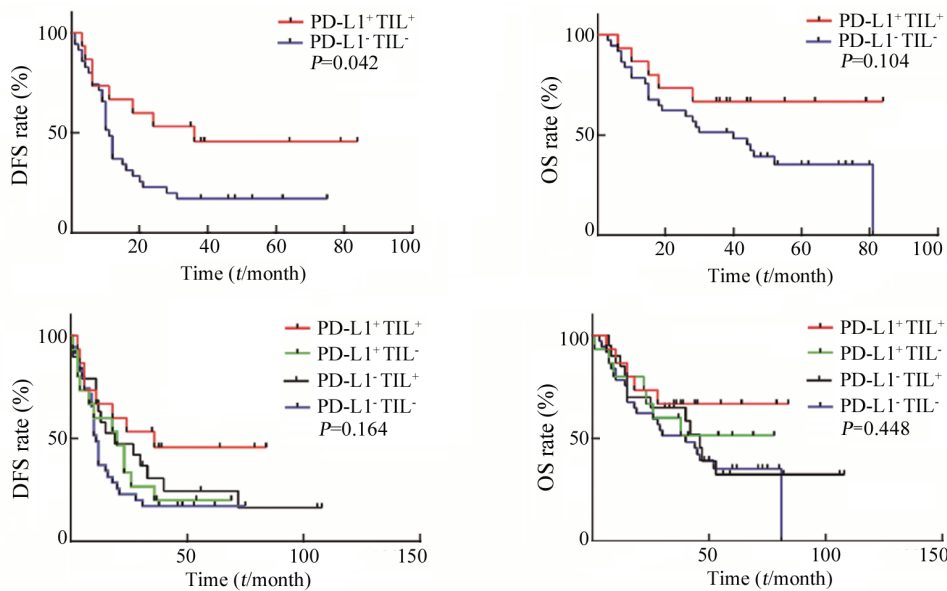


图1 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型和PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型MM患者的生存曲线

Fig.1 Survival curves of PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup> and PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> MM patients

2.2 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型和PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型MM患者的免疫微环境指标与临床资料比较

PD-1、MSH2、MSH6、PMS2、MLH1的cutoff值为0.05,MSH2、MSH6、PMS2、MLH1均为阳性判定为微卫星稳定型(microsatellite stability, MSS),任意一项及以上为阴性判定为微卫星不稳定型(microsatellite instability, MSI)。肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)的cutoff值为10。分析结果显示,PD-1

阳性表达在PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>与PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型间比较差异有统计学意义( $P<0.01$ ),双阳型患者PD-1阳性率高达53.3%,而双阴型患者PD-1表达率仅8.1%(表1)。在87例MM患者中,对免疫微环境指标分析结果(表2)显示,PD-1与PD-L1、PD-1与TIL分别呈共表达和共不表达,且在PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型与PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型组中同样符合。

表1 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型和PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型MM患者的临床病理特征比较(n)

Tab.1 Comparison of clinicopathological features of PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup> and PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup> MM patients (n)

Clinicopathological feature	N	PD-L1 <sup>+</sup> TIL <sup>+</sup>	PD-L1 <sup>-</sup> TIL <sup>-</sup>	$\chi^2$	P
Age (t/a)					
≥60	32	10	22	0.234	0.628
<60	20	5	15		
Gender					
Male	17	4	13	0.348	0.555
Female	35	11	24		
Subtype					
Acral	29	9	20	1.238	0.538
Cutaneous	11	4	7		
Mucosal	12	2	10		
Lymphatic metastasis					
Yes	16	3	13	1.148	0.284
No	36	12	24		
PD-1 status					
Positive	11	8	3	13.09	0.001
Negative	41	7	34		
MSI/MSS status					
MSI	12	3	9	0.112	0.737
MSS	40	12	28		
TMB status					
High	16	4	12	0.167	0.683
Low	36	11	25		

表2 免疫微环境IHC指标相关性分析

Tab.2 Correlation analysis of IHC indices in immune microenvironment

Variable	P	Correlation index	P	Correlation index
	(All samples)		(Selected samples)	
PD-1 and PD-L1	0.043	0.217	0.000	0.502
PD-1 and TIL	0.001	0.337	0.000	0.502
PD-1 and MSI	0.114		0.215	
PD-L1 and TIL	0.143		-	
PD-L1 and MSI	0.908		0.737	
TIL and MSI	0.503		0.737	

2.3 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型和PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型MM患者的基因突变图谱

通过使用R语言软件绘制基因组图谱,比较

PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>和PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>两型MM患者之间基因特征, TOP18体细胞基因突变对比结果(图2)显示, PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>患者存在更多CDK4、MCL1、MYC、

AKT2、CCND1 和 FGF19 等基因的拷贝数扩增, 无论是 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>-</sup>型还是 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型 MM 患者, BRAF

突变均位于首位, 都有多例发生 RB1 基因的拷贝数缺失。

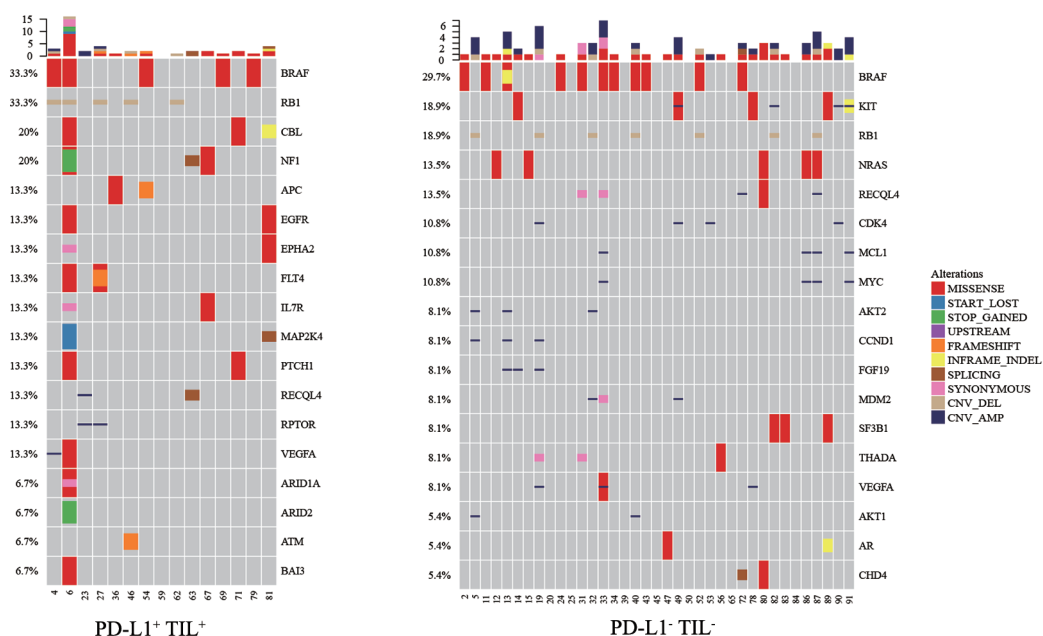


图2 MM患者TOP18体细胞基因突变比较

Fig.2 Comparison of TOP18 somatic gene mutations in MM patients

### 3 讨论

随着免疫治疗的发展,对肿瘤微环境的研究逐步深入。在结肠癌中,基于对肿瘤中心和浸润边缘的 CD3<sup>+</sup>TIL 和 CD8<sup>+</sup>TIL 亚群的量化结果,以免疫评分范围 I0~I4 对肿瘤微环境进行分型,不同分型可预测结肠癌患者的 OS<sup>[8]</sup>;也有研究<sup>[9]</sup>根据肿瘤内免疫细胞的密度和分布情况将肿瘤微环境分为“冷”、“热”、“免疫抑制型”和“免疫排除型”等 4 型,不同类型微环境的肿瘤适合不同的治疗模式。以 TIL 和 PD-L1 表达水平对肿瘤进行 TMIT 是由 TENG 等<sup>[10]</sup>提出,现已广泛应用于 MM、肺癌、胆囊癌、皮肤附件肿瘤等多种类型肿瘤中<sup>[4-6]</sup>。本研究即采用 TMIT 模式,对比不同免疫微环境分型 MM 患者的 OS 发现,PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>(双阳型)患者的预后最好,PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>(双阴型)患者预后最差。既往 TMIT 方式通常被用于判断行免疫治疗患者的预后,BENCE 等<sup>[11]</sup>对原发性 MM 组织标本的分析结果显示,双阳型是免疫检查点抑制剂(immun checkpoint inhibitor, ICI)治疗患者的良好预后因素,且与未使用 ICI 患者的不良预后显著相关。此项研究表明,TMIT 模式对未行免疫治疗患者同样适用,亦能够区分双阳型及双阴型患者的预后。

对比双阳型及双阴型 MM 患者的临床基本资料和免疫微环境的特征,发现两组间 PD-1 表达率存在显著差异,双阳型 MM 患者 PD-1 阳性率高达 53.3%,

而双阴型 MM 患者 PD-1 表达率仅 8.1%。通过免疫微环境各指标相关性分析,提示这可能与 PD-L1、TIL 分别与 PD-1 呈共表达和共不表达有关<sup>[12]</sup>。

在 MM 中,通常按不同亚型对患者基因组信息进行分析比较,以 TMIT 进行免疫学分型后,再对不同免疫学分型患者的基因组信息进行比较的研究尚鲜见。本研究通过绘制 PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>及 PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型 MM 患者的基因组图谱,发现双阴型 MM 患者存在更多 MYC、MCL1、AKT2、CCND1、FGF19、MDM2 等基因拷贝数的扩增。查阅相关文献<sup>[13]</sup>后发现,MCL1 是 BCL2 家族的抗凋亡蛋白;MYC 是常见的原癌基因,在多种人类癌症中经常扩增<sup>[14]</sup>;AKT2 作为假定癌基因,可活化 PI3K/AKT 通路<sup>[15]</sup>;CCND1、FGF19、MDM2 等是 p16<sup>INK4A</sup>-CDK4/6-RB 细胞周期通路的关键基因,此通路的活化可加速肿瘤细胞 G1 期进展及增殖<sup>[16]</sup>。上述基因的扩增可促进肿瘤细胞增殖并抑制细胞凋亡,提示不良预后。因此从基因层面上看,双阴型患者,不论后续治疗如何,是否进行免疫治疗,因其存在更多的预后不良基因拷贝数扩增,预后始终差于双阳型患者。

总之,根据 PD-L1 及 TIL 的表达水平对 MM 患者进行预后分层是可行的,不仅适用于免疫治疗人群,还适用于未行免疫治疗的人群,且这种生存差异与 PD-1 表达有关。从基因层面上,PD-L1<sup>-</sup>TIL<sup>-</sup>型 MM 患者存在更多预后不良基因拷贝数扩增,故预后



始终差于PD-L1<sup>+</sup>TIL<sup>+</sup>型MM患者,基因可能通过影响肿瘤免疫微环境进而影响患者预后。通过综合评估患者免疫微环境及基因突变信息,能更好地指导临床医生为患者设计适合的治疗方案,预测免疫治疗的疗效。本研究不足之处是一个单中心的回顾性研究,样本量相对较小。由于是回顾性设计,未考虑术后治疗,这些治疗情况可能会影响患者预后数据。本研究仅检测CD3<sup>+</sup>TIL,后续还可加做CD8<sup>+</sup>TIL、Foxp3<sup>+</sup>TIL等指标,以进一步探讨肿瘤免疫微环境的相关特征。

### [参考文献]

- [1] ROBERT C, RIBAS A, SCHACHTER J, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study[J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(9): 1239-1251. DOI:10.1016/S1470-2045(19)30388-2.
- [2] RIBAS A, DAUD A, PAVLICK A C, et al. Extended 5-year follow-up results of a phase I b study (BRIM7) of vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutant melanoma[J/OL]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(1): 46-53[2021-01-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6942621/>. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-4180.
- [3] TAUBE J M, ANDERS R A, YOUNG G D, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(127): 127ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003689.
- [4] CUI S, DONG L, QIAN J, et al. Classifying non-small cell lung cancer by status of programmed cell death ligand 1 and tumor-infiltrating lymphocytes on tumor cells[J]. *J Cancer*, 2018, 9(1): 129-134. DOI:10.7150/jca.21842.
- [5] LIN J Z, LONG J Y, WAN X S, et al. Classification of gallbladder cancer by assessment of CD8<sup>+</sup> TIL and PD-L1 expression[J/OL]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 766[2021-01-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6064069/>. DOI:10.1186/s12885-018-4651-8.
- [6] DUVERGER L, OSIO A, CRIBIER B, et al. Heterogeneity of PD-L1 expression and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes among subtypes of cutaneous adnexal carcinomas[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68(6): 951-960. DOI:10.1007/s00262-019-02334-8.
- [7] 张佳冉, 齐忠慧, 斯璐. 精准医疗背景下晚期恶性黑色素瘤治疗的现状与进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(4): 317-324. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2021.04.001.
- [8] PAGÈS F, KIRILOVSKY A, MLECNIK B, et al. *In situ* cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(35): 5944-5951. DOI: 10.1200/jco.2008.19.6147.
- [9] GALON J, BRUNI D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(3): 197-218. DOI:10.1038/s41573-018-0007-y.
- [10] TENG M W, NGIOW S F, RIBAS A, et al. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2139-2145. DOI:10.1158/0008-5472.can-15-0255.
- [11] BENICE C, HOFMAN V, CHAMOREY E, et al. Association of combined PD-L1 expression and tumour-infiltrating lymphocyte features with survival and treatment outcomes in patients with metastatic melanoma[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020, 34(5): 984-994. DOI:10.1111/jdv.16016.
- [12] REN Y, LV Q, YUE W H, et al. The programmed cell death protein-1/programmed cell death ligand 1 expression, CD3<sup>+</sup> T cell infiltration, NY-ESO-1 expression, and microsatellite instability phenotype in primary cutaneous melanoma and mucosal melanoma and their clinical significance and prognostic value: a study of 89 consecutive cases[J]. *Melanoma Res*, 2020, 30(1): 85-101. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000620.
- [13] NEGI A, MURPHY P V. Development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 210: 113038. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113038.
- [14] DEJURE F R, EILERS M. MYC and tumor metabolism: chicken and egg[J/OL]. *EMBO J*, 2017, 36(23): 3409-3420[2021-01-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5709748/>. DOI: 10.15252/embj.201796438.
- [15] IIDA M, HARARI P M, WHEELER D L, et al. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors[J]. *Mutat Res*, 2020, 819/820: 111690. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2020.111690.
- [16] HAMILTON E, INFANTE J R. Targeting CDK4/6 in patients with cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 45: 129-138. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.03.002.

[收稿日期] 2021-01-08

[修回日期] 2021-05-10

[本文编辑] 党瑞山