

# 肿瘤间质浸润淋巴细胞与乳腺癌新辅助化疗效果的相关性

姬文莉, 陈海霞, 王翠翠, 刘艳梅, 岳娜, 张焕\*

新疆医科大学第三临床医学院(附属肿瘤医院)病理科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2023年8月19日; 录用日期: 2023年9月14日; 发布日期: 2023年9月20日

## 摘要

目的: 评估乳腺癌穿刺标本中肿瘤间质浸润淋巴细胞(stromal tumor-infiltrating lymphocytes, sTILs)与新辅助化疗效果的相关性。方法: 收集126例乳腺癌穿刺标本及其新辅助化疗后手术切除标本, 评估穿刺标本中HE切片肿瘤区域内sTILs的比例与新辅助化疗后手术标本治疗效果的相关性, 并复习相关文献。结果: 乳腺癌治疗前穿刺标本中sTILs高水平表达与新辅助化疗病理完全缓解(pathologic complete response, pCR)呈正相关, sTILs的浸润密度与ER状态、PR状态及分子亚型差异有统计学意义。结论: 乳腺癌治疗前穿刺标本中肿瘤浸润淋巴细胞中sTILs比例可作为新辅助化疗有效性的预测指标, 提示高水平sTILs的患者更容易获得pCR, 特别是在三阴或Her-2阳性的乳腺癌患者, 对患者的个体化精准治疗方案的选择提供更多的因素。

## 关键词

肿瘤间质浸润淋巴细胞, 新辅助化疗, 乳腺癌, 病理完全缓解

# The Correlation between Tumor Interstitial Infiltrating Lymphocytes and the Effect of Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer

Wenli Ji, Haixia Chen, Cuicui Wang, Yanmei Liu, Na Yue, Huan Zhang\*

Department of Pathology, Third Clinical Medical College (Affiliated Cancer Hospital), Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: Aug. 19<sup>th</sup>, 2023; accepted: Sep. 14<sup>th</sup>, 2023; published: Sep. 20<sup>th</sup>, 2023

\*通讯作者。

文章引用: 姬文莉, 陈海霞, 王翠翠, 刘艳梅, 岳娜, 张焕. 肿瘤间质浸润淋巴细胞与乳腺癌新辅助化疗效果的相关性[J]. 临床医学进展, 2023, 13(9): 14960-14966. DOI: 10.12677/acm.2023.1392093

## Abstract

**Purpose:** To evaluate the correlation between stromal tumor-infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer puncture specimens and the efficacy of neoadjuvant chemotherapy. **Methods:** 126 cases of breast cancer biopsy specimens and surgical resection specimens after neoadjuvant chemotherapy were collected. The correlation between the proportion of sTILs in the tumor area of HE section in the biopsy specimens and the therapeutic effect of surgical specimens after neoadjuvant chemotherapy was evaluated, and the relevant literature was reviewed. **Results:** The high expression of sTILs in the biopsy specimens of breast cancer before treatment was positively correlated with the pathologic complete response (pCR) of neoadjuvant chemotherapy. The infiltration density of sTILs was significantly different from ER status, PR status and molecular subtypes. **Conclusion:** The proportion of sTILs in tumor infiltrating lymphocytes in pre-treatment puncture specimens of breast cancer can be used as a predictor of the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy, suggesting that patients with high levels of sTILs are more likely to obtain pCR, especially in triple-negative or Her-2-positive breast cancer patients, providing more factors for the choice of individualized precise treatment options for patients.

## Keywords

Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Neoadjuvant Chemotherapy, Breast Cancer, Pathological Complete Response

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤，发病率有逐年上升的趋势，新辅助化疗作为乳腺癌患者的一种全身辅助治疗，有利于降低肿瘤分期，使手术顺利进行，但并不是所有患者都对新辅助化疗敏感，对于化疗无效的乳腺癌患者，术前的化疗只会增加患者的痛苦和延误手术时机，因此能找到可以预测治疗有效率的指标就显得至关重要。目前研究认为肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)对乳腺癌预后明确的预测作用，将是乳腺癌治疗的一个新进展，在所有亚型的乳腺癌中，肿瘤浸润淋巴细胞在介导对化学疗法的反应和改善临床结局方面都起着至关重要的作用，如三阴性乳腺癌(TN)最有可能具有 > 50%淋巴细胞浸润的肿瘤，被称为淋巴细胞为主的乳腺癌，每增加 10%的 TILs 可获得最大的生存获益，表明 TILs 的增加可改善患者的预后和对新辅助化疗的反应[1] [2]。本研究对新疆地区新辅助化疗乳腺癌患者穿刺标本中肿瘤间质浸润淋巴细胞与治疗效果的关系进行分析，验证 sTILs 作为治疗预测指标的有效性，为患者的个体化精准治疗提供更多的因素。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

收集 126 例新疆医科大学附属肿瘤医院 2016~2017 年具有完整病历资料的新辅助化疗的浸润性乳腺癌(非特殊型)，调取患者化疗前穿刺标本和化疗后根治标本的所有病历资料，均为女性，年龄 25~69 岁，中位年龄 49 岁；107 例患者新辅助化疗采用常用的紫杉类、双阻滞治疗；33 例患者病理检查确诊为 pCR，

pCR 检出率为 26.2% (33/126)。

## 2.2. 方法

乳腺癌标本均用 10%中性缓冲福尔马林固定，石蜡包埋，3~4  $\mu\text{m}$  切片，分别做常规 HE 染色，光学显微镜观察。免疫组化染色采用 EnVision 两步法，检测 ER、PR、Her-2、Ki-67 基本生物标记物的表达，抗体及试剂盒均购自北京中杉金桥公司。

## 2.3. 结果判读

HE 切片中 sTILs 的评估基于国际 TIL 工作组的建议，sTILs 是在高倍视野( $\times 200$ )下观察肿瘤边界内单核细胞(包括淋巴细胞和浆细胞)占据的间质面积占总肿瘤内间质面积的百分比(不是间质中淋巴细胞的百分比)，取整个切片区域的平均值；排除肿瘤区域内原位癌、正常小叶周围、人为挤压、坏死及玻璃样变的 sTILs，大致分为三组：低密度组( $< 10\%$ )、中密度组(10%至 39%)和高密度组( $\geq 40\%$ ) [1] [3]。ER、PR 的判定标准为：肿瘤细胞核着色  $\geq 1\%$  定义为阳性。Her-23+或 Her-22+且 FISH 检测有扩增为 HER-2 阳性型。新辅助化疗采用 Miller-Payne 分级系统评估，pCR 指乳腺原发灶无浸润性癌(可存在导管原位癌)且区域淋巴结阴性，即原发灶 MP5 级且淋巴结阴性[4]。研究中 33 例 MP5 级患者均淋巴结阴性归入 pCR。所有病例均由两位经验丰富的高级职称病理医师进行综合评估。

## 2.4. 统计学方法

所有研究数据采用 SPSS 23.0 进行处理，采用  $\chi^2$  检验或 Fisher's 精确检验对各相关参数进行组间比较， $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. sTILs 与临床病理因素的关系

观察术前穿刺组织整个肿瘤区域中 sTILs 的水平，sTILs 的平均值为 20% (范围 1~64.5)，中位数为 14%。低密度组、中密度组和高密度组分别为 25.4% ( $n = 32$ )、57.9% ( $n = 73$ )和 16.7% ( $n = 21$ )。sTILs 的浸润密度与 ER 状态、PR 状态及分子亚型差异有统计学意义，表明 ER 阴性、PR 阴性及 Her-2 阳性与三阴性乳腺癌中 sTILs 高水平表达，而与患者年龄、民族、肿瘤大小、组织学分级、淋巴结转移、Her-2 及 Ki-67 状态无相关性(表 1，图 1)。

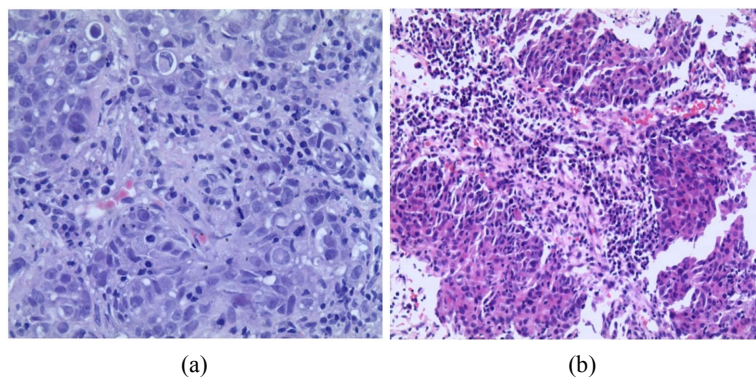
**Table 1.** The relationship between sTILs and clinicopathological factors

**表 1.** sTILs 与临床病理因素的关系

特征	sTILs 浸润密度(%)			P 值
	低密度组	中密度组	高密度组	
<b>年龄(岁)</b>				0.581
<49	16	43	10	
$\geq 49$	16	30	11	
<b>民族</b>				0.794
汉族	21	44	12	
其他	11	29	9	
<b>肿瘤直径(cm)</b>				0.424
$\leq 2$	3	11	5	

Continued

>2, ≤5	23	55	13
>5	6	7	3
<b>组织学分级</b>			0.659
2 级	16	33	8
3 级	16	40	13
<b>淋巴结转移</b>			0.173
有	13	37	6
无	19	36	15
<b>ER 状态</b>			0.000
阳性	24	38	2
阴性	8	35	19
<b>PR 状态</b>			0.013
阳性	19	35	4
阴性	13	38	17
<b>Her-2 状态</b>			0.330
阳性	8	28	9
阴性	24	45	12
<b>Ki-67 状态</b>			0.608
<50%	15	28	7
≥50%	17	45	14
<b>分子亚型</b>			0.002
Her-2 阳性(HR 阴性)	3	17	8
Her-2 阳性(HR 阳性)	5	11	1
三阴性	5	18	11
Luminal A	15	20	1
Luminal B	4	7	0



**Figure 1.** The expression level of sTILs in breast cancer biopsy specimens. (a) 5% of sTILs low density group (HE staining); (b) 60% of sTILs high density group (HE staining)

**图 1.** 乳腺癌穿刺标本中 sTILs 的表达水平。(a) sTILs 低密度组 5% (HE 染色); (b) sTILs 高密度组 60% (HE 染色)

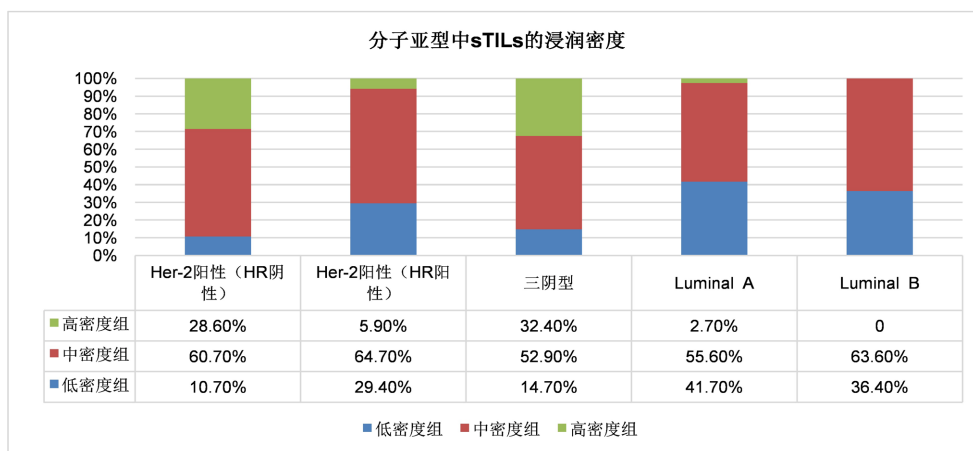
### 3.2. sTILs 与新辅助化疗效果的关系

新辅助化疗 MP 分级、pCR 反应率均与 sTILs 的浸润密度差异有统计学意义，中高密度组与低密度组相比有好的治疗反应率，sTILs 高水平的 Her-2 阳性(HR 阴性)与三阴性乳腺癌中新辅助治疗 pCR 反应率更有效(表 2，图 2)。

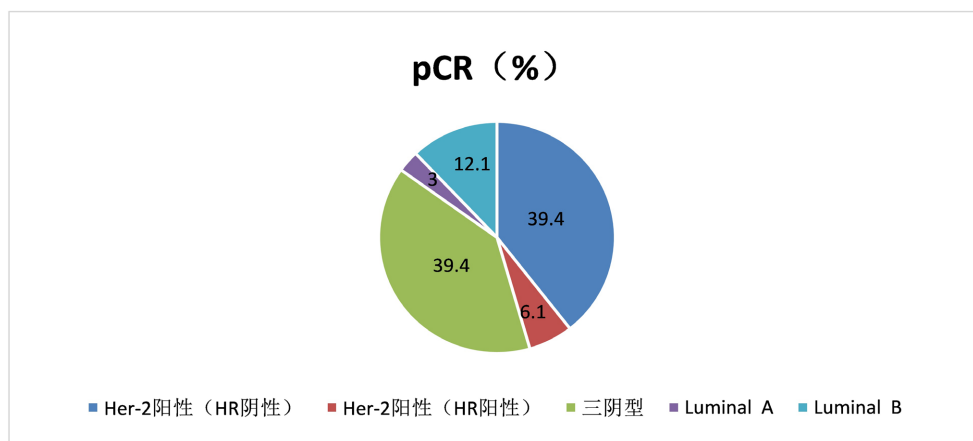
**Table 2.** The relationship between sTILs and the effect of neoadjuvant chemotherapy

**表 2.** sTILs 与新辅助化疗效果的关系

sTILs	MP 分级				P 值	pCR		P 值
	5 级	4 级	3 级	1~2 级		pCR	Non-pCR	
低密度组	3	11	16	2	0.001	3	29	0.003
中密度组	19	20	20	14		19	54	
高密度组	11	5	1	4		11	10	



(a)



(b)

**Figure 2.** Distribution of sTILs and pCR in molecular subtypes of breast cancer. (a) High expression of sTILs in Her-2 positive (HR negative) and triple negative breast cancer; (b) the efficacy of neoadjuvant therapy for pCR in Her-2 positive (HR negative) and triple negative breast cancer, the difference between Luminal A and Luminal B suggests the role of PR status in pCR

**图 2.** 乳腺癌分子亚型中 sTILs 与 pCR 分布情况。(a) Her-2 阳性(HR 阴性)与三阴性乳腺癌中 sTILs 高水平表达; (b) Her-2 阳性(HR 阴性)与三阴性乳腺癌中新辅助治疗 pCR 的有效性, Luminal A 与 Luminal B 的差异对比更提示了 PR 状态在 pCR 中的作用

## 4. 讨论

乳腺癌是一种高度异质性肿瘤, 基于对治疗药物的敏感性和临床疗效的差异, 实施个性化治疗是提高乳腺癌预后的有效措施。治疗最重要的目标之一是确定可靠的预后和预测标志物。因此, 在使用疗效不明的药物之前, 从活检标本中找到预测新辅助化疗 pCR 的指标尤为重要。研究表明肿瘤微环境在肿瘤的形成、生长、侵袭和转移中起着重要作用, 肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)的存在及其组成与预后和对癌症治疗的反应显著相关, Gao 等[5]人对 18,170 名不同分子亚型的乳腺癌患者进行分析, 证实了三阴性和 HER2 阳性的分子亚型中, TILs 高表达与新辅助化疗后病理完全反应(pCR)率增加及 OS 改善显著相关, 而在 luminal 分子亚型中, TILs 的高表达与新辅助化疗后的高 pCR 率无显著相关性, 高 TILs 与低的 OS 有显著相关性, 证实了高 TILs 和有利的生存率相关, 并预测了具有三阴性和 HER2 阳性分子亚型的患者的 pCR 反应率。TILs 为离开血液并进入肿瘤的单核免疫细胞, 包括细胞毒性 T 细胞和辅助 T 细胞的混合物的细胞群, 以及 B 细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞, 它们是肿瘤微环境(TME)的重要组成部分[6]。除了 TILs 的密度外, TILs 的亚型和位置也被视为 TILs 预测价值的重要因素[7], 特别是高水平的 CD8+细胞和高 CD8/CD4 比率与 pCR 反应率相关[8]。也有研究表明高 TILs 的水平与 PD-L1 阳性表达相关, 数据显示 TILs  $\geq 20\%$ 的病例几乎都是 PD-L1 阳性[9] [10]。尽管对 TILs 与乳腺癌预后之间的关联进行了广泛研究, 但其预后价值仍然复杂且有争议, 淋巴细胞亚群的影响仍不清楚[11] [12]。TILs 是宿主免疫系统对肿瘤抗原存在免疫反应的标志, 反映了肿瘤床内免疫反应的强度。根据浸润部位, TILs 可分为瘤内(iTILs)和基质(sTILs), 虽然两者都与结果相关, 但 sTILs 更普遍, 评估结果更具重复性[1] [13]。本研究继续验证 sTILs 作为治疗预测指标的有效性, 为患者的个体化精准治疗提供更多的因素。

研究表明 sTILs 与乳腺癌新辅助治疗 pCR 密切相关, 但肿瘤细胞与免疫系统之间的相互作用复杂, 肿瘤的微环境受多种因素的影响, 不同的乳腺癌亚型 sTILs 的水平有差异表达, 在 HER-2 阳性和三阴性乳腺癌中表现得尤为明显[5] [14]。本研究中 sTILs 的浸润密度与低的 ER、PR 状态及分子亚型多种临床病理因素相关, 显示了在 Her-2 阳性(HR 阴性)与三阴性乳腺癌中 sTILs 高水平表达; 疗效分析中 sTILs 的浸润密度与新辅助化疗 MP 分级及 pCR 密切相关, 中高密度组与低密度组相比有好的 pCR 反应率, 与以往研究相一致。Li 等[15]人的研究不仅表明了 TILs 水平的增加与新辅助化疗反应率的增加以及三阴性和 HER2 阳性乳腺癌分子亚型的预后改善有关, 而且发现 20%的 TILs 阈值是 pCR 最有力的预后指标。本研究按照 TILs 工作组的三级分类标准, sTILs 以 10%为界的低密度组与中或高密度组的 pCR 反应率有显著差异。与 Foldi 等[16]人的方法相一致, Foldi 研究显示 TILs 高病例的 pCR 率为 57%, 中等病例为 60%, 低病例为 29%有统计学差异。不同研究中 sTILs 高与低的截止值各有不同, 多集中在 10%、20%、40% 及 50%, 类似与 Li 等人的 sTILs 最佳阈值有待进一步研究[17]。

本研究结果表明, 在 HER-2 阳性和三阴性乳腺癌中 sTILs 高水平表达可作为患者新辅助治疗 pCR 反应率的预测指标, 验证了 sTILs 作为治疗预测指标的有效性。研究中我们发现 Her-2 阳性(HR 阴性)与三阴性乳腺癌中新辅助治疗 pCR 的有效性, 以及 Luminal A 与 Luminal B 的差异对比更提示了 PR 状态在 pCR 中的作用, 表明 PR 阴性患者有好的新辅助治疗效果, 本组将进一步深入多因素研究, 与单一生物标志物相比, 验证联合指标评估在预测 pCR 方面是否更加准确。

## 基金项目

新疆医科大学科研创新基金项目(XYDCX201658); 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2021D01C398)。

## 参考文献

- [1] Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., *et al.* (2015) The Evaluation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) in

- Breast Cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of Oncology*, **26**, 259-271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
- [2] Stanton, S.E. and Disis, M.L. (2016) Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, **4**, Article 59. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>
- [3] Kos, Z., Roblin, E., Kim, R.S., et al. (2020) Pitfalls in Assessing Stromal Tumor Infiltrating Lymphocytes (sTILs) in Breast Cancer. *npj Breast Cancer*, **6**, Article No. 17.
- [4] 《乳腺癌新辅助治疗的病理诊断专家共识(2020 版)》编写组. 乳腺癌新辅助治疗的病理诊断专家共识(2020 版)[J]. 中华病理学杂志, 2020, 49(4): 296-304.
- [5] Gao, Z.H., Li, C.X., Liu, M. and Jiang, J.Y. (2020) Predictive and Prognostic Role of Tumour-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Patients with Different Molecular Subtypes: A Meta-Analysis. *BMC Cancer*, **20**, Article No. 1150. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07654-y>
- [6] Zhou, Y., Tian, Q., Wang, B.Y., Yang, J., Zhao, S.D. and Yang, J. (2021) The Prognostic Significance of TILs as a Biomarker in Triple-Negative Breast Cancer: What Is the Role of TILs in TME of TNBC? *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **25**, 2885-2897.
- [7] Hammerl, D., Martens, J.W., Timmermans, M., Smid, M., Trapman-Jansen, A.M., Foekens, R., Isaeva, O.I., Voorwerk, L., Balcioglu, H.E., Wijers, R., et al. (2021) Spatial Immunophenotypes Predict Response to Anti-PD1 Treatment and Capture Distinct Paths of T Cell Evasion in Triple Negative Breast Cancer. *Nature Communications*, **12**, Article No. 5668. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25962-0>
- [8] Ademuyiwa, F.O., Chen, I., Luo, J., Rimawi, M.F., Hagemann, I.S., Fisk, B., Jeffers, G., Skidmore, Z.L., Basu, A., Richters, M., et al. (2021) Immunogenomic Profiling and Pathological Response Results from a Clinical Trial of Docetaxel and Carboplatin in Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **189**, 187-202. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06307-3>
- [9] Gonzalez-Ericsson, P.I., Stovgaard, E.S., Sua, L.F., Reisenbichler, E., Kos, Z., Carter, J.M., Michiels, S., Le Quesne, J., Nielsen, T.O., Laenkholm, A.V., Fox, S.B., Adam, J., Bartlett, J.M., Rimm, D.L., Quinn, C., Peeters, D., Dieci, M.V., Vincent-Salomon, A., Cree, I., Hida, A.I., Balko, J.M., Haynes, H.R., Frahm, I., Acosta-Haab, G., Balancin, M., Bellochio, E., Yang, W., Kirtani, P., Sugie, T., Ehinger, A., Castaneda, C.A., Kok, M., McArthur, H., Siziopikou, K., Badve, S., Fineberg, S., Gown, A., Viale, G., Schnitt, S.J., Pruneri, G., Penault-Llorca, F., Hewitt, S., Thompson, E.A., Allison, K.H., Symmans, W.F., Bellizzi, A.M., Brogi, E., Moore, D.A., Larsimont, D., Dillon, D.A., Lazar, A., Lien, H., Goetz, M.P., Broeckx, G., El Bairi, K., Harbeck, N., Cimino-Mathews, A., Sotiriou, C., Adams, S., Liu, S.W., Loibl, S., Chen, I.C., Lakhani, S.R., Juco, J.W., Denkert, C., Blackley, E.F., Demaria, S., Leon-Ferre, R., Gluz, O., Zardavas, D., Emancipator, K., Ely, S., Loi, S., Salgado, R., Sanders, M. and International Immuno-Oncology Biomarker Working Group (2020) The Path to a Better Biomarker: Application of a Risk Management Framework for the Implementation of PD-L1 and TILs as Immuno-Oncology Biomarkers in Breast Cancer Clinical Trials and Daily Practice. *The Journal of Pathology*, **250**, 667-684. <https://doi.org/10.1002/path.5406>
- [10] Savas, P., Salgado, R. and Loi, S. (2021) Seeing the Forest and the Tree: TILs and PD-L1 as Immune Biomarkers. *Breast Cancer Research and Treatment*, **189**, 599-606. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06287-4>
- [11] Stanton, S.E., Adams, S. and Disis, M.L. (2016) Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncology*, **2**, 1354-1360. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>
- [12] Ravelli, A., Roviello, G., Cretella, D., et al. (2017) Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Breast Cancer: Beyond the Prognostic and Predictive Utility. *Tumor Biology*, **4**, 1-8. <https://doi.org/10.1177/1010428317695023>
- [13] Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., et al. (2010) Tumor-Associated Lymphocytes as an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 105-113. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.7370>
- [14] Mao, Y., Qu, Q., Zhang, Y., et al. (2014) The Value of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) for Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, **9**, e115103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115103>
- [15] Li, S., Zhang, Y., Zhang, P., et al. (2022) Predictive and Prognostic Values of Tumor Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancers Treated with Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-Analysis. *Breast*, **66**, 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.10.001>
- [16] Foldi, J., Silber, A., Reisenbichler, E., et al. (1970) Neoadjuvant Durvalumab plus Weekly Nab-Paclitaxel and Dose-Dense Doxorubicin/Cyclophosphamide in Triple-Negative Breast Cancer. *npj Breast Cancer*, **7**, Article No. 9.
- [17] van den Ende, N.S., Nguyen, A.H., Jager, A., et al. (2023) Triple-Negative Breast Cancer and Predictive Markers of Response to Neoadjuvant Chemotherapy: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 2969. <https://doi.org/10.3390/ijms24032969>