

肝细胞癌微环境研究进展及临床意义

齐攀¹, 樊海宁^{2*}

¹青海大学研究生院, 青海 西宁

²青海大学附属医院肝胆胰外科, 青海 西宁

收稿日期: 2023年2月21日; 录用日期: 2023年3月16日; 发布日期: 2023年3月24日

摘要

肝癌已成为全球最高发的癌症之一, 在我国, 它的死亡率高居第二位, 在全球占据第四位。肝癌中肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)占比最高。肝切除术被认为是HCC患者最佳的治疗选择, 其重要性不容忽视。但此方法适用于早期肝脏肿瘤并且手术后复发率极高。我国肝癌诊断多为晚期无法直接进行手术治疗, 因此HCC的预后非常差。近年来, 肝癌的免疫治疗延长了患者的生命, 由于新的治疗方法多是基于肝细胞癌肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的, 因此有必要阐明HCC的肿瘤微环境。在本综述中, 我们总结阐述了HCC肿瘤微环境特征, HCC免疫微环境(tumour immune microenvironment, TIME)五个亚型及与预后的关系, HCC微环境免疫网络, 当前针对免疫微环境的治疗以及临床常用HCC微环境指标。

关键词

肝细胞癌, 肿瘤微环境, Ki-67, 微血管密度

Progress in the Study of Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and Its Clinical Significance

Pan Qi¹, Haining Fan^{2*}

¹Graduate School of Qinghai University, Xining Qinghai

²Hepatic-Biliary-Pancreatic Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining Qinghai

Received: Feb. 21st, 2023; accepted: Mar. 16th, 2023; published: Mar. 24th, 2023

*通讯作者。

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common subtype of liver cancer which ranks fourth in terms of global cancer mortality and second in terms of tumor-related mortality in our country. While surgical resection is the current preferred treatment for liver cancer, it is only suitable for early-stage liver tumors and has an extremely high recurrence rate. Diagnosis of liver cancer in our country is mostly at a late stage, making it difficult to receive direct surgical treatment, resulting in a very poor prognosis for HCC. In recent years, immunotherapy for liver cancer has extended the life of patients. Since new treatment methods are mostly based on the tumor microenvironment (TME) of hepatocellular carcinoma, it is necessary to clarify the TME of HCC. In this review, we summarize and elaborate on the TME characteristics of HCC, the five subtypes of the tumor immune microenvironment (TIME) of HCC and their relationship with prognosis, the immune network of the HCC microenvironment, and the current treatments targeting the immune microenvironment, as well as the commonly used HCC microenvironment indicators in clinical practice.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, Tumor Microenvironment, Ki-67, Microvessel Density

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

肝癌的发病率在全球范围内增加, 不仅在欧洲和美国, 而且在我国也是如此。最新报告表明肿瘤性疾病中肝癌发生率在前六名, 死亡比率在第四名, 而在我国死亡率排第二[1] [2]。HCC 是一种极为常见的病理类型, 在原发性肝癌中患者数量超过 90% [3]。由于诊断晚、对化疗的抵抗力强、复发和转移频繁, HCC 的预后非常差, 在欧美和我国 5 年生存率为 15%~38% [4] [5] [6]。

当前肝细胞癌首选的治疗方案仍然是手术切除, 而针对不可切除的 HCC 可采用局部及系统治疗方法。Ann-Lii Cheng 等人, 将 226 名患者被随机分配到实验组或安慰剂组。进行索拉非尼治疗的 HCC 患者的中位总生存期为 6.5 个月明显高于安慰剂组的 4.2 个月。该实验证实了分子靶向药物(MTAs)索拉非尼, 能够显著延长无法切除的肝癌患者的生存期[7], 而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制剂也被广泛应用于临床治疗[8]。近年来, 分子靶向药物的研发和应用已经变得非常广泛, 尤其是针对 HCC 的免疫检测点抑制剂(ICIs)的治疗, 取得了显著的进步, 发展迅猛。对于晚期 HCC, ICIs 和 VEGF 联合使用比索拉非尼单用有更好的预后[9]。虽然 HCC 的系统治疗已经经历了重大的转变, 但晚期 HCC 的治疗仍然不充分。现有系统疗法都取决于肿瘤微环境, 因此有必要阐明 HCC 的肿瘤微环境, 以期望改进当前的治疗策略, 在未来能提高 HCC 患者的预后。

肿瘤微环境(TME)主要有癌细胞, 各种免疫细胞、基质细胞、内皮细胞以及癌症相关的成纤维细胞(Cancer-Associated Fibroblasts, CAF)。免疫细胞又包括 T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、B 细胞等 TME 与肿瘤组织的形成、存活和转移密切相关[10]。

2. 肝细胞癌肿瘤微环境

2.1. HCC 肿瘤微环境特征

肝脏是参与人体重要的免疫反应也是主要组成部分,早在 2006 年就有研究认为肝脏是免疫器官[11]。肝细胞癌微环境内的免疫细胞与肿瘤通过互作用,形成了一种独特的肿瘤免疫微环境,其中包括抗肿瘤细胞、促肿瘤细胞以及受争议的细胞。抗肿瘤细胞主要由 T 细胞、自然杀伤细胞(NK)、树突状细胞(Dendritic Cells, DC)和 M1 巨噬细胞组成,它们可以有效地抑制肿瘤的生长和发展,从而提高患者的生存率和预后。调节性细胞(Tregs)、骨髓源性抑制细胞(MDSC)、CAF 和 M2 巨噬细胞,这四个都是促肿瘤细胞,都可以促进肿瘤的发生发展为 HCC 患者带来较差的预后;当前有争议的癌症免疫细胞类型: B 细胞[12]。

2.2. HCC 免疫微环境亚型

肿瘤免疫微环境的是导致肿瘤转移、复发和耐药性的主要因素[13],但不同的 TIME 亚型与肝癌的临床相关性如何仍不清楚。Xue R 等人关于肿瘤免疫微环境的研究,对 189 个样本进行了单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)分析。此样本取自 124 名 HCC 患者和 8 只实验老鼠,最终通过分析 100 多万个细胞将 HCC 患者的 TIME 可分为五个不同的类别:激活、抑制、排斥和驻留。这些类别可能会影响患者的生命周期,并且可能会对治疗产生重要影响。

分型依据以下几个方面:细胞集群、功能标记基因表达、与 TIME 相关的基因特征、预后的相关性。五个亚型的特征与预后关系如下[14]:

免疫激活型(immune activation, TIME-IA): 含有活化的髓样细胞和 T 细胞簇, HCC 患者表现出免疫激活状态。

免疫抑制性髓样细胞型(immune suppressive myeloid, TIME-ISM): 富含“髓样细胞免疫抑制”和“促肿瘤细胞因子”的特征,共同表现出的免疫抑制和促肿瘤特性。与较差的预后相关。

免疫抑制性基质型 (immune suppressive stromal, TIME-ISS): 富含“基质”和“癌症相关成纤维细胞”的特征,与较差预后的关联。

免疫排斥型 (immune exclusion, TIME-IE): 包含大多数内皮细胞和间质细胞群,但缺乏免疫细胞。特别是富集的成纤维细胞可以将 T 细胞从肿瘤细胞中排除[15]。

免疫驻留型 (immune residence, TIME-IR): 包含肝脏驻留细胞群,包括居住的 NK 细胞、Kupffer 细胞和肝窦内皮细胞。与更好的预后有关。

2.3. HCC 肿瘤微环境免疫网络

HCC 的肿瘤微环境的组成复杂,它们在肿瘤发生和发展过程中发挥着至关重要的作用,是肿瘤治疗的关键因素[16]。而这个复杂免疫微环境系统主要包括七个步骤,即 HCC 的癌症 - 免疫循环七步: 1) 癌细胞增生坏死或治疗死亡释放抗原。2) DCs 可以捕获和吞噬肿瘤细胞,并将它们转移到淋巴结。3) DCs 可以消化肿瘤细胞的抗原,并将这些信息传递给 CD8+细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)。(d) T 细胞迁移到 HCC 组织。4) T 细胞浸润到癌细胞中。5) T 细胞通过识别 HCC 细胞上的 T 细胞受体(TCR)然后与其结合。6) HCC 细胞被 T 细胞杀死[17]。

M1 巨噬细胞诱导的肿瘤坏死因子(TNF)- β 和白细胞介素(IL)-12,自然杀伤(NK)细胞产生的干扰素(IFN)- γ , CTL 分泌的 IL-2 都可以进一步激活 T 细胞。免疫循环具备负反馈机制;当过度抑制时,循环会随着癌症免疫反应的放大而停止。早在 1995 年就有研究显示当小鼠 CTLA-4 缺陷时,所有 T 细胞亚群激活和大量 T 细胞增殖[18]。Daniel L Barber 等人在小鼠体能够通过阻断无功能 CD8+ T 细胞的 PD-1/PD-L1

抑制性途径,恢复了 CD8+ T 细胞的增殖和免疫功能[19]。上述两个实验证明了 CTL 相关蛋白-4 (CTLA-4)、PD-1 都可以抑制 T 细胞的活性,从而有效地阻止免疫反应的过度发生。

3. 当前针对肝细胞癌肿瘤微环境的治疗

3.1. 分子靶向药

近年来,索拉非尼作为一种分子靶向治疗技术,在晚期 HCC 患者的治疗中取得了成果显著。它具有强大的抗肿瘤活性,抑制血管内皮生长因子和血小板源性生长因子的表达是其发挥抗癌作用的关键,有效地延长 HCC 患者的总生存期以及无法复发生存期。乐伐替尼(Lenvatinib)具有显著的抗炎作用,它能够有效地阻断 VEGFR1-三、FGFR、PDGFR α 以及酪氨酸激酶受体的表达,进而阻断新生血管的形成与发育,并且显著降低血液的渗透性和 TMEs [20]。有根据最新的研究结果,乐伐替尼和索拉非尼都具有良好的抗癌作用。乐伐替尼的总体生存时间(OS)与索拉非尼的相比,其有效性、疾病控制能力以及无进展生存时间(PFS) [21]均优于索拉非尼。身体无法耐受索拉非尼或乐伐替尼的以及无法进行手术切术的 HCC 的二线治疗包括瑞戈菲尼(Regorafenib)、卡博替尼、舒尼替尼、利尼伐尼、布立尼布和替万替尼(Tivantinib),其靶向酪氨酸激酶及其相关通路[22]。

3.2. 免疫检查点抑制剂(Immune Checkpoint Inhibitors, ICIs)

ICIs 免疫疗法改变了 HCC 辅助治疗仅使用分子靶向药的治疗模式,改善了 HCC 晚期患者或有肝外转移患者的治疗结果。一项有关替西木单抗单克隆抗体药物研究显示:晚期 HCC 患者使用替西木单抗(Tremelimumab)治疗后部分反应率为 17.6%,疾病的控制率高达 76.4%。疾病进展时间约为 6.5 个月[23]。纳武单抗(nivolumab)是全球首次针对 PD-1 的单克隆抗体药物。Dr Anthony B El-Khoueiry, 等人关于 262 例 HCC 患者的研究,显示在使用纳武单抗治疗的患者的客观缓解率显著高达 20% [24]。ICIs 抗肿瘤效果显著,目前关于 ICIs 的研究仍在进行中。

4. 肝细胞癌微环境临床常用指标

4.1. Ki-67

Ki-67 是一种蛋白,目前已经确定与肿瘤细胞的生长和增殖相关。Ki-67 与 HCC 术后复发率呈现正相关,2021 年一项 Ki-67 与 HCC 肝移植术后复发率的研究得出结果:在 HCC 复发组 37 名患者和对照组 23 名患者的术后 HCC 样本中,Ki67 的阳性表达率分别为 67.5%和 39.1% [25]。

Ki-67 与 HCC 的总生存期有关。在 2023 年 Xihua Yang 等人研究证明 Ki-67 在 HCC 中的表达与一些临床病理参数高度相关如:AFP ≥ 400 ng/mL ($P = 0.015$)、肿瘤大小 ≥ 5 cm ($P = 0.012$)、肿瘤包膜不全($P < 0.001$)、MVI ($P = 0.001$)、PVT ($P = 0.003$)、BCLC 晚期($P = 0.01$)、VCE。该研究显示 20 个月生存率 Ki-67 高表达组($>50\%$)为 12.8%、低表达组为 31.8% [26]。在 HCC 中 Ki67 高表达与患者的总生存期呈负相关。Ki-67 常规检测方法是基于细胞染色比的免疫组化,当前使用 CT 及其他影像学方法预测 Ki-67 的研究很有潜力。

4.2. 微血管密度(Microvessel Density, MVD)

HCC 是实体肿瘤中血管化程度最高的肿瘤之一,主要血管改变表现为肝窦毛细血管化和动脉化。MVD 是实验室和临床评估血管新生的标准方法,也与 HCC 的预后相关。2006 年 Qing Zhang, 等人对 HCC 肝移植术后患者 MVD 做评估得出肿瘤组织中高 MVD 与无复发生存率呈负相关[27]。近些年研究未发现肿瘤内 MVD 与总生存率和无复发生存率有显著关系[28]。当前对测量 MVD 来进行预后的预测仍存

在争议。MVD 可以用来判断索拉非尼和乐伐替尼等具有强抗血管生成能力药物治疗效果的评价[29]。因此我们认为肝癌组织中血管生成的测量可能对肝癌的预后和治疗具有重要意义。

5. 结论与展望

微环境的变化会影响肿瘤的发展, 因此, 利用分子靶向技术、ICIs 技术以及其他免疫疗法, 可以大大改善微环境, 从而提高患者的生存率, 并且在临床上取得良好的效果, 成为一种重要的抗癌辅助治疗方式, 并成为继传统的化疗、放疗和手术治疗后进一步改善 HCC 预后的治疗。但目前免疫治疗替代传统化疗治疗尚为时过早, 在临床应用过程中还有很长的路要走。Ki-67 除了肿瘤细胞的生长和增殖相关还代表着较高的术后复发率与较短总生存期。MVD 对于 HCC 预后的预测仍有争议可能收试验的混杂因素影响, 进行严格设计的研究是必要的。HCC 作为预后较差的肿瘤之一, 对于微环境的细胞及非细胞成分的研究远远不够需要我们继续研究探索来寻找更多替代或补充传统治疗的方法。

参考文献

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., *et al.* (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] International Agency for Research on Cancer. Liver Source: Globocan 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>
- [3] Llovet, J.M., Kelley, R.K., Villanueva, A., *et al.* (2021) Hepatocellular Carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, **7**, 6. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>
- [4] Altekruse, S.F., Henley, S.J., Cucinelli, J.E. and McGlynn, K.A. (2014) Changing Hepatocellular Carcinoma Incidence and Liver Cancer Mortality Rates in the United States. *The American Journal of Gastroenterology*, **109**, 542-553. <https://doi.org/10.1038/ajg.2014.11>
- [5] Xu, L., Kim, Y., Spolverato, G., *et al.* (2016) Racial Disparities in Treatment and Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma in the United States. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, **5**, 43-52.
- [6] Zhang, G., Li, R., Deng, Y. and Zhao, L. (2018) Conditional Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma: Results from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, **12**, 515-523. <https://doi.org/10.1080/17474124.2018.1453806>
- [7] Cheng, A.L., Kang, Y.K., Chen, Z., *et al.* (2009) Efficacy and Safety of Sorafenib in Patients in the Asia-Pacific Region with Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Phase III Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *The Lancet Oncology*, **10**, 25-34. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70285-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70285-7)
- [8] Zhu, A.X., Kang, Y.K., Yen, C.J., *et al.* (2019) Ramucirumab after Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma and Increased Alpha-Fetoprotein Concentrations (REACH-2): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology*, **20**, 282-296.
- [9] Finn, R.S., Qin, S., Ikeda, M., *et al.* (2020) Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, **382**, 1894-1905. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915745>
- [10] Hinshaw, D.C. and Shevde, L.A. (2019) The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, **79**, 4557-4566. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
- [11] Racanelli, V. and Rehermann, B. (2006) The Liver as an Immunological Organ. *Hepatology*, **43**, S54-S62. <https://doi.org/10.1002/hep.21060>
- [12] Hao, X., Sun, G., Zhang, Y., *et al.* (2021) Targeting Immune Cells in the Tumor Microenvironment of HCC: New Opportunities and Challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, Article ID: 775462. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775462>
- [13] Li, X., *et al.* (2021) The Immunological and Metabolic Landscape in Primary and Metastatic Liver Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **21**, 541-557. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00383-9>
- [14] Xue, R., Zhang, Q., Cao, Q., *et al.* (2022) Liver Tumour Immune Microenvironment Subtypes and Neutrophil Heterogeneity. *Nature*, **612**, 141-147. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05400-x>
- [15] Feig, C., *et al.* (2013) Targeting CXCL12 from FAP-Expressing Carcinoma-Associated Fibroblasts Synergizes with Anti-PD-L1 Immunotherapy in Pancreatic Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 12205-12210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220511110>

- States of America*, **110**, 20212-20217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320318110>
- [16] Chew, V., Lai, L., Pan, L., *et al.* (2017) Delineation of an Immunosuppressive Gradient in Hepatocellular Carcinoma Using High-Dimensional Proteomic and Transcriptomic Analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, E5900-E5909. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706559114>
- [17] Chen, D.S. and Mellman, I. (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, **39**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- [18] Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., *et al.* (1995) Loss of CTLA-4 Leads to Massive Lymphoproliferation and Fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4. *Immunity*, **3**, 541-547. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90125-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6)
- [19] Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., *et al.* (2006) Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection. *Nature*, **439**, 682-687. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
- [20] Koyama, N., Saito, K., Nishioka, Y., *et al.* (2014) Pharmacodynamic Change in Plasma Angiogenic Proteins: A Dose-Escalation Phase I Study of the Multi-Kinase Inhibitor Lenvatinib. *BMC Cancer*, **14**, 530. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-530>
- [21] Kudo, M., Finn, R.S., Qin, S., Han, K.H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J.W., Han, G., Jassem, J., *et al.* (2018) Lenvatinib versus Sorafenib in First-Line Treatment of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Randomised Phase 3 Non-Inferiority Trial. *The Lancet*, **391**, 1163-1173. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30207-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30207-1)
- [22] Marino, D., Zichi, C., Audisio, M., Sperti, E. and Di Maio, M. (2019) Second-Line Treatment Options in Hepatocellular Carcinoma. *Drugs Context*, **8**, Article ID: 212577. <https://doi.org/10.7573/dic.212577>
- [23] Sangro, B., Gomez-Martin, C., de la Mata, M., *et al.* (2013) A Clinical Trial of CTLA-4 Blockade with Tremelimumab in Patients with Hepatocellular Carcinoma and Chronic Hepatitis C. *Journal of Hepatology*, **59**, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.02.022>
- [24] El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T., *et al.* (2017) Nivolumab in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (CheckMate 040): An Open-Label, Non-Comparative, Phase 1/2 Dose Escalation and Expansion Trial. *The Lancet*, **389**, 2492-2502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31046-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31046-2)
- [25] Zhang, X., Wu, Z., Peng, Y., *et al.* (2021) Correlation between Ki67, VEGF, and p53 and Hepatocellular Carcinoma Recurrence in Liver Transplant Patients. *BioMed Research International*, **2021**, Article ID: 6651397. <https://doi.org/10.1155/2021/6651397>
- [26] Yang, X., Ni, H., Lu, Z., *et al.* (2023) Mesenchymal Circulating Tumor Cells and Ki67: Their Mutual Correlation and Prognostic Implications in Hepatocellular Carcinoma. *BMC Cancer*, **23**, 10. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10503-3>
- [27] Zhang, Q., Chen, X.G., Zhou, J., *et al.* (2006) CD147, MMP-2, MMP-9 and MVD-CD34 Are Significant Predictors of Recurrence after Liver Transplantation in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Cancer Biology & Therapy*, **5**, 808-814. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.7.2754>
- [28] Yang, Y., Fu, N., Wang, H. and Hao, J. (2021) Leukocytes Infiltration Correlates Intratumoral Microvessel Density and Influence Overall and Late-Phase Disease-Free Survival in Hepatocellular Carcinoma. *Medicine (Baltimore)*, **100**, e28135. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028135>
- [29] Zhang, Q., Wu, J., Bai, X. and Liang, T. (2020) Evaluation of Intra-Tumoral Vascularization in Hepatocellular Carcinomas. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, **7**, Article ID: 584250. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.584250>