

分类号:

密 级: 内部★1年

学 号: 20202014096

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



非小细胞肺癌新辅助免疫治疗疗效和肿瘤细胞 焦亡的探究

学 位 申 请 人	<u>祝迪</u>
指 导 教 师	<u>张鹏教授</u>
申请学位门类级别	<u>医学硕士</u>
学 科、专 业 名 称	<u>临床医学</u>
研 究 方 向	<u>外科学</u>
所 在 学 院	<u>医学院</u>

中国·新疆·石河子

2023年3月

分类号:

密 级: 内部★1年

学 号: 20202014096

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



非小细胞肺癌新辅助免疫治疗疗效和肿瘤细胞 焦亡的探究

学位申请人	祝迪
指导教师	张鹏教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	临床医学
研究方向	外科学
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子

2023年3月

**Evaluating the efficacy of neoadjuvant immunotherapy for non-small
cell lung cancer and exploring tumor cell Pyroptosis**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Doctor of Medicine

By

Zhu Di

Surgery (Lung cancer)

Dissertation Supervisor: Prof. Zhang Peng

March,2023

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：



时间： 2023 年 5 月 11 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间： 2023 年 5 月 11 日

导师签名：



时间： 2023 年 5 月 11 日

摘要

目的：非小细胞肺癌是最常见的肺部肿瘤，对于人们的健康有很大的威胁。新辅助 PD-1 免疫治疗的出现对于非小细胞肺癌患者来说是一道曙光。如今有许许多多的新辅助 PD-1 免疫治疗的临床实验在开展，但是它们的方案中所涉及的 PD-1 免疫治疗的周期数却不尽相同。PD-1 免疫治疗时免疫细胞可以分泌出促进肿瘤细胞焦亡的物质来增强 PD-1 的抗肿瘤反应，但是具体机制还不清楚。所以本研究致力于探讨局部晚期非小细胞肺癌的新辅助 PD-1 免疫治疗联合化疗的治疗周期数与临床疗效的关系，以及探索 PD-1 免疫治疗后肿瘤组织中的细胞焦亡。

方法：回顾性分析 2019 年 10 月至 2022 年 3 月上海市肺科医院收治的 108 例 II-III 期非小细胞肺癌患者新辅助 PD-1 免疫化疗后行根治性手术的临床资料以及肿瘤组织。根据接受的新辅助 PD-1 免疫联合化疗的周期数将患者分为 2 周期组 (N=75) 和大于 2 周期组 (N=33)，收集包括年龄、肿瘤大小、PD-L1 等多个相关因素进行分析。然后通过 t 检验、Mann-Whitney 检验、Pearson 卡方检验或 Fisher 精确检验、Logistic 回归分析等统计学方法进行分析。同时运用单细胞检测 15 例 (3 例治疗前、12 例治疗后) 样本，免疫组织化学检测 12 例肿瘤组织和癌旁组织配对样本，来探索肿瘤组织中的细胞焦亡。

结果：2 个组在年龄、性别、吸烟史等基本信息方面没有明显差异，但是在病情方面 2 周期组相较于大于 2 周期组会更轻 (治疗前影像学肿瘤大小：37.0 mm vs. 49.6 mm, $P=0.022$)，大于 2 周期组的病人影像学缓解会更好 (36% vs. 49%, $P=0.007$)。但是在第二周期结束时对 2 周期组与大于 2 周期组做的比较没有发现影像学缓解具有明显差异 (0.38 (0.21–0.51) vs. 0.35 (0.20–0.44), $P=0.678$)。Logistic 回归分析显示，新辅助 PD-1 免疫化疗周期数是影响影像学缓解的独立因素 (OR: 0.306, 95%CI: 0.103–0.910, $P=0.033$)，而不是影响病理缓解的独立因素 (OR: 0.526, 95%CI: 0.185–1.501, $P=0.230$)。大于 2 个周期的 33 例患者，术前的影像学缓解显著高于第 2 个周期后的影像学缓解 (49% vs. 36%, $P=0.001$)。单细胞检测得到 7442 个恶性细胞。gasdermin D 信号在治疗后的组织中表达明显升高尤其是在 MPR 病人的治疗后组织中，Caspase-1 信号也可以观察到在治疗后 MPR 病人的组织中表达明显升高。治疗后的肿瘤细胞中，MPR 的焦亡信号明显比 NMPR 的高。通过免疫组织化学技术的检测在不同缓解的肿瘤组织中观察到与焦亡相关的蛋白的表达也具有差异。相较于缓解更好的病人的组织，在缓解不好的组织中发现了更多的细胞发生了焦亡。

结论：对于 II-III 期的局部非小细胞肺癌患者来说，新辅助 PD-1 免疫治疗周期数可以影响影像学疗效。此外，对于可能切除的患者，适当增加治疗周期数可以提高患者接受根治性手术的概率。在经过免疫治疗后，肿瘤细胞中的经典焦亡通路的相关信号会发生上调，其中在缓解更好的病人的肿瘤细胞中这种趋势更加明显，但是在免疫组织化学检测的组织中观察到了相反的结果。

关键词：焦亡；新辅助；免疫治疗；非小细胞肺癌；单细胞检测技术

Abstract

Objective: Non-small cell lung cancer is the most common lung tumor and poses a great threat to people's health. The advent of neoadjuvant PD-1 immunotherapy is a ray of hope for patients with non-small cell lung cancer. There are many clinical trials of neoadjuvant PD-1 immunotherapy being conducted today, but the number of cycles of PD-1 immunotherapy involved in their protocols varies. Also, immune cells can secrete substances that promote tumor cell pyroptosis to enhance the anti-tumor response of PD-1 during PD-1 immunotherapy, but the exact mechanism is not clear. Therefore, this study was dedicated to investigate the relationship between the number of treatment cycles of neoadjuvant PD-1 immunotherapy combined with chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer and clinical efficacy, as well as to explore cell pyroptosis in tumor tissues after PD-1 immunotherapy.

Methods: retrospective analysis of clinical data as well as tumor tissues of 108 patients with stage II-III non-small cell lung cancer admitted to Shanghai Pulmonary Hospital from October 2019 to March 2022 who underwent radical surgery after neoadjuvant immunochemotherapy. Patients were divided into a 2-cycle group (N=75) and a greater than 2-cycle group (N=33) according to the number of cycles of neoadjuvant PD-1 immune combination chemotherapy received, and several relevant factors including age, tumor size, and PD-L1 were collected for analysis. The analysis was then performed by t-test, Mann-Whitney test, Pearson chi-square test or Fisher exact test, and logistic regression analysis statistical methods. Single-cell assay for 15 samples (3 pre-treatment and 12 post-treatment) and immunohistochemistry for 12 paired samples of tumor and para-cancerous tissues were also used to explore cellular pyroptosis in tumor tissues.

Results: There were no significant differences between the 2 groups in terms of basic information such as age, gender, and smoking history, but the 2-cycle group had less severe disease compared to the greater than 2-cycle group (pretreatment imaging tumor size: 37.0 mm vs. 49.6 mm, $P=0.022$), and patients in the greater than 2-cycle group had better radiographic remission (36% vs. 49%, $P=0.007$). However, a comparison of the 2-cycle group with the greater than 2-cycle group at the end of the second cycle did not reveal a significant difference in radiographic remission (0.38 (0.21–0.51) vs. 0.35 (0.20–0.44), $P=0.678$). logistic regression analysis showed that the number of neoadjuvant PD-1 immunochemotherapy cycle number was an independent factor affecting radiographic remission (OR: 0.306, 95% CI: 0.103–0.910, $P=0.033$), but not pathological remission (OR: 0.526, 95% CI: 0.185–1.501, $P=0.230$). The 33 patients with greater than 2 cycles had significantly higher preoperative radiographic remission than radiographic remission after the 2nd cycle (49% vs. 36%, $P=0.001$). Single-cell assays yielded 7442 malignant cells. gasdermin D signaling was significantly elevated in post-treatment tissues especially in post-treatment tissues of MPR patients, and

Caspase-1 signaling was also observed to be significantly elevated in post-treatment tissues of MPR patients. The pyroptosis signal was significantly higher in MPR than in NMPR tumor cells after treatment. Differences in the expression of proteins associated with pyroptosis were also observed in tumor tissues in different remission by immunohistochemical techniques. More cells were found to undergo pyroptosis in tissues in poor remission compared to tissues from patients in better remission.

Conclusion: For patients with stage II-III locally acquired non-small cell lung cancer, the number of cycles of neoadjuvant PD-1 immunotherapy can influence radiographic outcomes. In addition, for patients with possible resection, an appropriate increase in the number of treatment cycles can improve the probability of patients undertaking radical surgery. After immunotherapy, upregulation of signals related to the classical pyroptosis pathway occurs in tumor cells, where this trend is more pronounced in tumor cells of patients in better remission, but the opposite result is observed in tissues examined by immunohistochemistry.

Key words: Pyroptosis; Neoadjuvant; Immunotherapy; Non-small cell lung cancer; Single cell sequencing technology

目录

第 1 章 引言	1
1.1 肺癌流行病学	1
1.2 传统化疗与新辅助化疗	2
1.3 新辅助 PD-1 免疫治疗在非小细胞肺癌中的应用	2
1.4 细胞焦亡与免疫治疗	4
1.5 经典细胞焦亡途径：CASPASE-1 依赖的程序性细胞死亡	5
1.6 单细胞 RNA 测序	6
1.7 课题研究目的、理论意义和实际应用价值	7
1.8 研究流程	7
第 2 章 非小细胞肺癌新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与疗效的关系	9
2.1 患者和方法	9
2.1.1 研究设计和患者选择	9
2.1.2 治疗过程	9
2.1.3 疗效评估	10
2.1.4 数据分析	10
2.2 结果	10
2.2.1 患者特征	11
2.2.2 术前免疫化疗的疗效	11
2.2.3 对于免疫治疗周期数大于 2 周期的患者的单独分析	12
2.3 讨论	12
2.3.1 研究局限	14
2.4 结论	14
第 3 章 单细胞检测探索肿瘤细胞焦亡信号表达	24
3.1 新辅助 PD-1 免疫治疗样本收集	24
3.1.1 治疗前样本收集	24
3.1.2 疗后样本收集	26
3.2 单细胞测序	26
3.2.1 建立文库	26
3.2.2 数据质控	27

3.3 分析方法	27
3.3.1 聚类和注释	27
3.3.2 肿瘤细胞鉴别	28
3.3.3 焦亡信号通路富集分析	28
3.3.4 分析流程	28
3.4 结果	29
3.4.1 细胞分类与鉴别	29
3.4.2 焦亡信号通路富集分析	31
3.5 讨论	32
3.6 结论	34
第4章 免疫组织化学染色探索肿瘤中焦亡相关蛋白表达	35
4.1 概述	35
4.2 实验材料	35
4.2.1 临床样本	35
4.2.2 主要仪器	36
4.2.3 实验试剂	36
4.2.4 主要溶液配制	37
4.3 实验步骤	37
4.3.1 制作肿瘤组织石蜡切片	37
4.3.2 进行组织化学染色	38
4.4 实验结果	39
4.5 讨论	42
4.6 结论	42
第5章 总结、展望、反思	43
5.1 总结	43
5.2 展望	45
5.3 反思	45
文献综述	46
参考文献	54
致谢	62
作者简介	63
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	64

中英文略缩词表

缩写词	英文全名	中文全名
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
MPR	Major pathological response	主要病理缓解
TRAEs	Treatment-related adverse events	治疗相关不良反应
OS	Overall Survival	总体生存时间
ORR	Objective Response Rate	客观缓解率
PD-L1	Programmed cell death ligand-1	程序性细胞死亡配体-1
PD-1	Programmed cell death-1	程序性细胞死亡受体-1
pCR	Pathological Complete Response	病理完全缓解
RFS	Relapse-free survival	无复发生存
irAE	Immune-related adverse events	免疫治疗相关不良事件
ICI	Immune checkpoint inhibitors	免疫检查点抑制剂
TMB	Tumor mutation burden	肿瘤突变负荷
RCT	Randomized clinical trial	随机临床试验
CR	Complete remission	完全缓解
PR	Partial remission	部分缓解
PD	Progressive disease	进行性疾病
SD	Stable disease	稳定性疾病
CTLs	Cytotoxic lymphocyte	细胞毒性淋巴细胞
nPD-L1	Nuclear programmed cell death ligand-1	核受体 PD-L1
TNF α	Tumor necrosis factor α	肿瘤坏死因子 α
GSDMD	Gasdermin D	焦孔素 D
EBUS	Electronic ultrasonic bronchoscopy	电子超声气管镜
VATS	Video-assisted thoracoscopic surgery	电视胸腔镜手术

第1章 引言

中国最常见的癌症是肺癌，也是全球癌症死亡的主要原因^[1, 2]。非小细胞肺癌是最常见的肺癌病理类型，约占所有肺癌的 85%^[3]。局部晚期 NSCLC 最有效的治疗方法是根治性手术^[4]。然而，对于中央型或纵膈淋巴结受累的 NSCLC，在诊断时进行完整切除相对困难。新辅助治疗可以提高局部晚期 NSCLC 的 R0 手术率^[5-8]。CheckMate-816 前瞻性随机临床试验（Randomized clinical trial, RCT）表明，与传统新辅助化疗相比，新辅助 PD-1 免疫化疗（PD-1 抑制剂联合化疗）联合根治性手术可显著改善局部晚期 NSCLC 患者的预后。这使得免疫联合化疗的新辅助治疗方案成为治疗的新选择^[9]。因此，新辅助 PD-1 免疫化疗被推荐用于局部晚期 NSCLC 患者^[10]。

然而，不同临床试验采用的治疗周期数并不一致。例如，在一项前瞻性单臂临床试验中，进行了 2 个周期的新辅助 PD-1 免疫化疗方案^[11]。CheckMate-816 和 NADIM 试验中患者接受了 3 个周期的新辅助 PD-1 免疫化疗，KEYNOTE-671 试验（NCT03425643）中患者接受了 4 个周期的新辅助 PD-1 免疫化疗。此外，还有一部分临床试验选择了灵活多变的治疗周期方案，后续治疗根据治疗后疗效评估确定。如治疗 2 个周期后进行影像学评估，效果满意则进行手术；如果效果未达到预期，建议继续按照评估前的原方案进行新辅助 PD-1 免疫化学治疗 1 - 2 个周期^[10, 12]。但在临床实践中，增加治疗周期数并不意味着临床疗效一定可以提高。因此，在临床工作中，手术时机和治疗周期数的选择是局部晚期 NSCLC 新辅助 PD-1 免疫化疗的关键因素。

1.1 肺癌流行病学

根据 2020 年世界卫生组织最新数据显示全世界肺癌发病率（11.4%）和死亡率（18.0%）居恶性肿瘤第一位^[1]，其中原发性支气管肺癌是最常见的恶性肿瘤之一。而在我国，虽然相较于 2015 年肺癌的发病率（19.6%）及死亡率（26.0%），2020 年数据显示的肺癌发病率（17.9%）及死亡率（23.8%）有一定程度的下降，但是依旧居所有恶性肿瘤之首，其中男性肺癌发病率和死亡率均居第一位，女性肺癌发病率居第二位仅次于乳腺癌，但是死亡率仍居第一位^[2, 13]。肺癌依旧是癌症死亡的主要原因。每年的国家的癌症负担也是非常巨大，急需一种可以有效解决肿瘤患者疾病，同时可以减轻国家财政负担的治疗方案。

1.2 传统化疗与新辅助化疗

肺癌最佳的治疗方式仍为根治性切除,但仅适应于部分III期患者^[14]。尽管手术效果明显,但是大于一半的患者在手术切除后会出现复发^[15]。根据以前的数据来看,仅对 IIIA 期 NSCLC 进行局部治疗(手术或放疗)的预后较差。仅接受手术切除的 IIIA 期 NSCLC 患者,如果存在单节段纵膈淋巴结病变,5年总生存率(OS)为20%–30%,而多节段纵膈淋巴结病变仅为5%–10%^[16]。因为存在微转移灶,大多数患者即使在完全切除后,也会迅速复发或者远处转移。辅助或新辅助化疗是杜绝微转移性疾病并调低复发风险的合理方法。根据最新的 CSCO 指南,对于可切除 III 期 NSCLC,推荐手术+辅助化疗或新辅助放疗+手术治疗+辅助治疗;对于不可手术的 III 期患者,则推荐序贯化疗+放疗或诱导化疗+手术治疗。然而,肺癌辅助(LACE 研究)和新辅助的 meta 分析结果显示,术后辅助和术前新辅助化疗相比于单纯手术治疗仅能分别提高 5.4%和 5%的 OS 获益^[17, 18],其中II期和 IIIA 期患者的生存优势相对较大。辅助或新辅助化疗对生存的改善非常有限,且带来较大的副作用,大部分患者(>60%)会出现化疗相关的不良事件,III 期 NSCLC 接受辅助/新辅助化疗的 5 年 OS 仅为 13–36%^[19]。

1.3 新辅助 PD-1 免疫治疗在非小细胞肺癌中的应用

免疫治疗在 NSCLC 中的应用为 NSCLC 的治疗带来了历史性的进展^[20]。尽管生物制剂化疗以及靶向药物在快速的发展,但是一部分晚期的 NSCLC 已经产生了耐药性,所以并没有获得很好的远期生存^[21]。现在越来越多的临床研究结果,都为将免疫治疗应用于 NSCLC 提供了正面的证据^[9, 22]。

PD-1/L1 免疫检查点抑制剂相比于传统化疗可大幅度提高晚期 NSCLC 患者的生存期,已经得到多个 III 期临床研究验证。例如两个大型 III 期临床试验 Keynote-024 和 Keynote-042 结果表明,与化疗相比在肿瘤 PD-L1 表达阳性($\geq 1\%$)的患者中,帕博利珠单抗可显著提高中位生存期且 ≥ 3 级不良事件仅是化疗的一半^[23, 24]。其中 Keynote-042 还根据 PD-L1 表达量进行了分层分析,在 PD-L1 $\geq 50\%$, $\geq 20\%$ 以及 1-49%的患者中的 HR 分别为 0.69, 0.77 和 0.92,这表明 PD-L1 表达越高则 PD-1 单抗的治疗获益越多^[25]。同时,另外两项大型 III 期(Keynote-407 和 Keynote-189)研究结果也显示免疫联合化疗的模式优于单纯化疗。它们的结果显示,在 PD-L1 $\geq 1\%$ 的患者中,帕博利珠单抗联合化疗的中位生存期显著优于单纯化疗,在安全性方面它们 ≥ 3 级不良事件的发生率较高(均>65%)^[26, 27]。在 PD-L1 $< 1\%$ 的患者中,Keynote-407 结果显示无显著差异(HR=0.79, 95%CI:

0.56–1.11), 但是 Keynote-189 结果显示可改善 OS (HR=0.59, 95%CI: 0.38–0.92)。另外, Keynote-189 根据 PD-L1 的分层分析结果同样显示出 PD-L1 表达越高则 PD-1 单抗联合化疗获益越多的现象。这几项研究奠定了抗 PD-1 免疫治疗在晚期驱动基因阴性患者中一线治疗的地位。最新 NCCN 指南推荐 PD-L1 \geq 50%的患者选择 PD-1 单药或联合化疗, 而 1–49%以及 $<$ 1%的患者选择 PD-1 单抗联合化疗^[28]。

PD-1 抑制剂药物对于晚期 NSCLC 患者的生存期具有很大的提升已经得到临床研究证实, 因此对于没有驱动基因突变的 NSCLC 患, PD-1 抑制剂单药或联合化疗已经成为一线标准治疗。CheckMate159^[22]的结果显示, 在可切除的 NSCLC 患者中将 Nivolumab 作为新辅助治疗, 一共 20 例完全切除肿瘤中, MPR 率达到 45% (n=9)。纳入了 181 名 IB–IIIB 的 LCMC3^[29]的研究者在 2021 年的国际肺癌研究协会上公布的结果表明, 在 147 例接受 Atezolizumab 新辅助治疗并且接受手术切除并可评估的驱动基因阴性的患者中, 7%患者达到 pCR (n=10), 20%患者达到 MPR (n=30)。评估 IBI308 单药用于可切除非小细胞肺癌新辅助治疗的开放性、单中心、Ib 期研究聚焦于中国人群^[30]结果也在 2019 年公布, 接受了 2 个周期 sintilimab 新辅助治疗的 40 例患者, 其中 37 例患者接受了手术切除, 16.2%达到 pCR (n=6), 40.5%达到 MPR (n=15)。这些临床试验研究表明, 将免疫治疗作为肺癌新辅助治疗已经成为一种研究热点。

除此之外, 将两药联合(免疫联合化疗或免疫联合免疫)应用在非小细胞肺癌新辅助治疗中也取得了亮眼的效果。NADIM 研究是一项在西班牙 18 家医院进行的单臂 II 期临床试验, 该研究一共入组了 46 名患者接受 nivolumab 联合化疗序贯辅助治疗, 其中 41 名(89%)患者接受了 R0 手术切除, 在连续 2 年的随访中有 35 名依旧没有发生进展, 在安全性方面, 93% (n=43) 的患者在治疗期间有不良事件发生, 其中 14 (30%) 名患者发生了 3 级以上的治疗相关不良事件。但是这些不良事件并没有导致手术延迟或死亡。这说明免疫治疗联合化疗的耐受性很好。这个结果将人们对于局部晚期 NSCLC 的认识从具有较高致病性的疾病转变为了可以通过免疫治疗联合化疗治愈的疾病^[31]。临床 NEOSTAR 研究在 2019 年报道了 II 期临床研究结果, 在研究中患者分为接受伊匹木单抗联合 nivolumab (NI) 双免疫药物新辅助治疗或单药 nivolumab (N) 新辅助治疗的两组。双药组 (NI) 的 MPR 率 (50%) 远高于单药 (N) 组的 MPR 率 (24%), 两组总的 MPR 率为 30%。客观缓解方面两组相差不多 (N vs. NI: 19% vs. 19%), 总体的客观缓解率为 20%。在安全性方面, 双药组的 3–5 级治疗相关不良事件发生率与单药组相近 (NI vs. N: 13% vs. 10%), 总体发生率为 11%。一项使用 Atezolizumab 与紫杉醇加卡铂的免疫联合化疗的临床试验, 分析了 30 例 IB – IIIA 接受 2 – 4 周期治疗的患者的疗效, 发现有 33% (n=10) 的患者达到了 pCR, 57% (n=17) 的患者达到了 MPR^[32]。除了以上临床研究, 还有许多项免疫联合化疗新辅助治疗肺癌的 III 期临床研究正在开展中。

不同的有关免疫治疗 NSCLC 的临床试验尽管取得了与传统治疗相比较好的结果，但是它们之间取得的结果却不尽相同，有很大一部分原因是来自于它们各自的方案设置以及患者的遵从性。其中对于用药周期数与疗效的关系的研究还比较少，因而本研究将聚焦于此。

1.4 细胞焦亡与免疫治疗

细胞焦亡 (Pyroptosis) 是一种炎性细胞死亡，会导致 gasdermin D (GSDMD) 的分裂和非活性细胞因子 (如 IL-18 和 IL-1 β) 的激活^[33]。在 1996 年弗氏志贺菌感染被 Chen 报道可导致小鼠巨噬细胞发生 caspase-1 介导的程序性细胞死亡^[34]。2001 年 Cookson 首次使用焦亡的概念来描述 caspase-1 依赖的程序性细胞死亡^[35]。

焦亡不同于其他例如坏死、凋亡、自噬等其他细胞死亡形式^[36-38]，它可由感染、中风、心梗、肿瘤等多种刺激触发^[38]。焦亡的主要特征包括 caspase-1 的激活^[39, 40]，细胞膜的破裂^[41]，以及染色体 DNA 的降解^[38]。焦亡时细胞膜的破裂可导致细胞内大量致炎物质的释放^[42]，是一种促进炎症反应的细胞死亡方式^[38, 43]，对炎症反应过程具有重要的调控作用。除了 Caspase-1 这一经典途径外，最近的研究还发现 Caspase-4/5 也可以导致焦亡^[44]，它们都是将 GSDMD 作为下游效应因子^[45]，因此细胞焦亡新的新的定义为 gasdermin 介导的程序性细胞死亡^[46, 47]。有研究发现细胞毒性淋巴细胞 (CTLs) 和自然杀伤细胞 (NK 细胞) 这些免疫细胞可以分泌丝氨酸蛋白酶 Granzyme A 通过肿瘤细胞膜的穿孔素进入细胞内，Granzyme A 裂解后可以激活 GSDMB 诱导肿瘤细胞焦亡^[48]。现有免疫治疗主要是激活自身免疫的 T 细胞，对于人体自身的其他免疫细胞诸如，B 细胞、NK 细胞、CTLs 细胞以及 DC 细胞等的募集作用相较于 T 细胞有所欠缺。所以对于其他免疫细胞的激活也是下一阶段免疫治疗的发展方向。

最近有研究发现，肿瘤细胞的核受体 PD-L1 (nuclear programmed cell death ligand-1, nPD-L1) 可以将肿瘤细胞从由肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 诱导的凋亡转化为焦亡^[49]，又因为焦亡时细胞膜破裂会导致细胞内大量的致炎物质释放会促进炎症反应，可以在肿瘤细胞内引起“炎症风暴”对肿瘤细胞进一步打击、杀灭肿瘤细胞。诱导肿瘤细胞焦亡也是一个具有提高抗肿瘤反应潜力的方向。

免疫系统是人体自身抑制癌症的基础，而免疫逃避就是肿瘤细胞发展成为癌症的主要原因，免疫逃避可以导致人体自身免疫不能清除肿瘤细胞。肿瘤免疫逃避发展会经历消除、平衡、逃逸三个阶段：消除 (人体自身免疫系统对新的肿瘤抗原产生应答进而破坏肿瘤细胞)，平衡 (在人体自身免疫抑制消除下残留的肿瘤细胞出现免疫逃避持续的转移和增殖) 和逃逸 (越来越多的肿瘤细胞克服了免疫抑制，致使肿瘤变成了癌症)。由

于具有只针对肿瘤的这一特性的 T 细胞之间免疫耐受的诱导以及抑制免疫系统检查点的表达导致人体自身免疫系统已经不能对早期癌症进行识别和消灭^[50]。T 细胞上的受体与这些配体结合，可以发出信号，使细胞因子的产生和杀伤活性减弱。因此，如果能够破坏肿瘤的免疫抑制，使机体产生的免疫应答持续时间更长，就可以增强机体的抗肿瘤免疫，这种策略对于控制肿瘤甚至于治愈肿瘤拥有强大的潜力。研究表明肿瘤细胞和/或淋巴细胞表达免疫抑制检查点配体（包括 PD-L1、CTLA-4 等）是导致肿瘤免疫逃逸的重要原因^[14]。针对 PD-1/PD-L1 等免疫检查点阻断的免疫治疗成为了最新的治疗模式，并且在多个癌种中展现出巨大的获益。

在 NSCLC 中免疫治疗主要指的是基于肿瘤细胞表面的 PD-L1 或 T 细胞表面的 PD-1 发展出来的抗 PD-1/L1 治疗方式，即将 PD-1/L1 通路阻断重新激活机体免疫发挥抗肿瘤作用^[51]。因为肿瘤细胞通过 PD-1/L1 通路来进行免疫逃避^[52]，PD-1/L1 单克隆抗体阻断 PD-1/L1 通路就可以防止肿瘤细胞躲避免疫细胞的监视和清除^[53]。

PD-1 是一种 55kd 的 I 型跨膜蛋白，主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞和骨髓细胞上，是 T 细胞共刺激受体 CD28 家族成员之一，还包括 CD28、CTLA-4、ICOS 和 BTLA^[54]。目前已经发现两种主要在抗原呈递细胞上表达的特异性 PD-1 配体：PD-L1（B7-H1 或 CD274）和 PD-L2（B7-DC 或 CD273）。在小鼠和人类系统中 PD-L1 和 PD-L2 与 PD-1 结合时会下调 T 细胞的激活程度^[55-57]。在许多人 NSCLC 中都发现了肿瘤细胞会异常表达 PD-L1^[58, 59]。淋巴细胞和/或肿瘤中 PD-L1 高表达的患者死于癌症的可能性是 PD-L1 低表达患者的 4.5 倍。是因为 PD-L1 高表达导致肿瘤细胞免疫逃逸吗？有研究表明，肿瘤细胞表达 PD-L1 可在体外增加肿瘤特异性 T 细胞凋亡^[60]，另一方面，表达 PD-L1 可保护肿瘤细胞避免效应 T 细胞诱导的凋亡^[61]。对于临床前数据的研究发现，PD-1 对肿瘤具有阻断作用不管这个肿瘤的 PD - L1 表达是阳性还是阴性，这表明 PD-1 对免疫启动发挥了作用。

免疫治疗现有研究的机制表明其主要是通过避免肿瘤细胞免疫逃避和免疫细胞募集来进行抗肿瘤治疗，对于接受免疫治疗的肿瘤是否发生焦亡还不明确，本研究的目的是探索经过免疫治疗的肿瘤细胞是否发生焦亡，为以后的对于免疫导致焦亡的机制研究打下基础。

1.5 经典细胞焦亡途径：Caspase-1 依赖的程序性细胞死亡

细胞的分裂与死亡充斥着每个人的一生，细胞的死亡一直都是研究的热点，肿瘤细胞就是因为细胞无限制的增殖，不正常的死亡导致的。随着对细胞死亡的研究不断地加深，从早期的细胞坏死到细胞凋亡，到近年出现的细胞焦亡以及自噬。细胞坏死和凋亡

依旧是大部分的细胞的主要死亡方式，但是细胞焦亡独特的机制有可能成为促进肿瘤加快消失的靶点。

经典的细胞焦亡途径是细胞受到外界刺激（可以是：细菌抗原、病毒、其他细胞毒性物质以及遗传物质）促进 Pro-caspase1 与 ASC 和 NLRP3 结合组装成炎症小体然后将 Pro-caspase1 变成 Caspase-1，Caspase-1 可以将 ProIL-18、ProIL-1 β 水解成为 IL-18、IL-1 β ，同时 Caspase-1 将焦孔素 D（Gasdermin D, GSDMD）水解成 N 端与 C 端，N 端会使细胞膜的通透性改变进而破裂，细胞膜破裂会导致之前水解形成的 IL-18、IL-1 β 等炎性物质释放促进炎症的发展，对周围的其他细胞形成新的打击。

在这一个过程中可以对炎症进行一个放大的作用，其中重要的 GSDMD 水解是关键步骤，GSDMD 是一个大小为 53kDa 的底物^[45]，Caspase-1 将其剪切产生一个大小为 31kDa 的 N 端片段^[62]，进一步的机制研究表明，GSDMD 的 N-T 末端片段与细胞膜的内小叶相关联，其可在细胞膜中组装成直径为 10~33 纳米大小的孔径^[63]。细胞内外的物质可以不受限制地通过这个孔状结构进行沟通，最终细胞内外压力改变导致细胞膜破裂，促炎细胞因子、内源性配体等等细胞内容物释放^[64, 65]，这就是焦亡。

想要探索经过免疫治疗的肿瘤细胞是否可以发生焦亡，利用焦亡的独特机制在肿瘤内形成联级反应，来促进肿瘤细胞的消灭，就需要检测经过免疫治疗后的肿瘤组织中是否有 GSDMD 水解。

1.6 单细胞 RNA 测序

在单个细胞水平上，一种用于遗传信息(如表观基因组、转录组和基因组)高通量测序的技术被称为单细胞测序。以往的大体积组织的高通量测序由于大体积组织的中充斥着各种细胞类型，无法表现出细胞的异质性信息，只能测量平均信号。为了解决这个问题，单细胞测序技术应运而生。单细胞测序技术可以将组织中的细胞按照类型分为不同的细胞群，针对不同的细胞群进行测序就可以将以往不能发现的异质性信息表现出来。因此，可以揭示每个细胞的基因结构和基因表达状态，而混交样本测序无法获得的异质性信息和罕见细胞的遗传信息。

单细胞测序技术在 2013 年同时被《Nature Methods》和《Science》重点关注并对于其的应用给予了极高的评价^[66, 67]，认为这项技术将改变生物学和医学的许多领域。同样因为单细胞测序技术在许多领域都具有强大的潜力，2015 年《Science Translational Medicine》也对该技术抛来了橄榄枝，让其登上了封面^[68]，在早期单细胞测序技术还没发展完善时，对于大多数科研人员来说都是低通量、低精度、高价格的代名词，即使知道它对于研究的意义也很少有人将其大规模用于科研。经过不断的迭代发展，现在单细

胞测序技术已经发展到相对低的成本，尤其是高通量、高分辨率以及自动化程度高，使得它的效率和应用场景飞速发展。在对于单细胞的应用中，单细胞转录组在科研上主要用来解决细胞异质性的问题，发现以前混合测序时代未能发现的新的细胞亚群，还可以构建完整的细胞谱系。不管研究什么方向，单细胞测序的第一步都是获取组织，对于组织的获取在本研究中，是来自于患者的肿瘤组织，在术前获取肿瘤组织会需要进行有创操作。因此，对于操作的也需要有很高的要求，才能让后续的测序获得合格的组织。

在如今单细胞虽然已经在方方面面都在应用，但依旧存在一些挑战。虽说是高通量但是目前的最多的通量在一百万，这对于某些科研场景已经不够用了；还存在“gene dropouts”的现象，即一个基因在某些细胞可以被检测到，但是在另一个细胞中可能因为目标基因含量过低和捕获率不足而不能被检测到的现象。所以对于捕获率的提高也是被需要的，除此之外还需要提高灵敏度，减少在扩增过程中发生的误差。

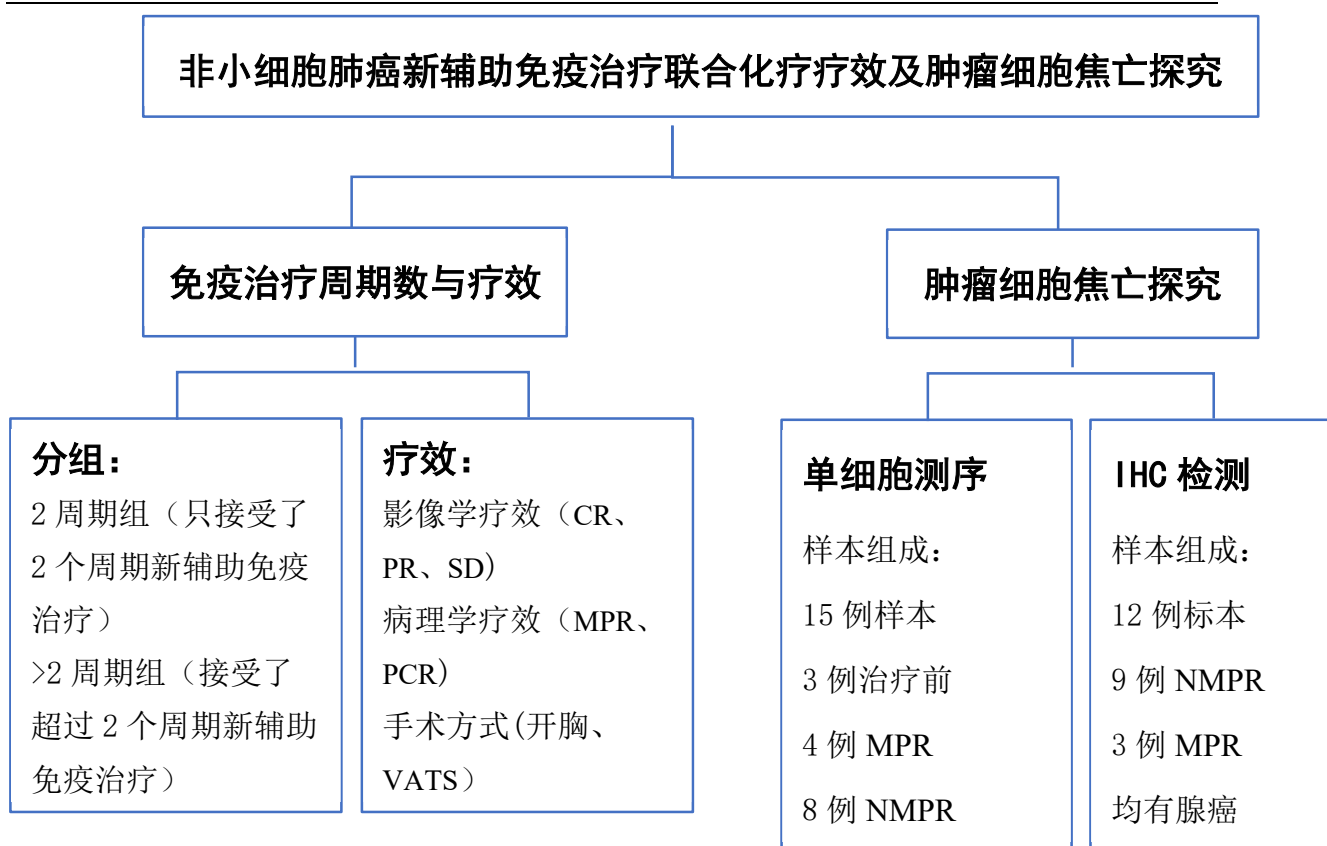
单细胞 RNA 测序允许对单个细胞进行 RNA 测序，因而可以在单个细胞水平进行研究 RNA 表达的差异。通过分析焦亡途径的相关的分子信号就可以达到探索免疫治疗后的肿瘤细胞有无焦亡的目的。

1.7 课题研究目的、理论意义和实际应用价值

研究目的：探讨新辅助 PD-1 免疫化疗治疗局部晚期 NSCLC 的治疗周期数与疗效的相关性，以及探索免疫治疗后的肿瘤细胞是否发生焦亡。

对于非小细胞肺癌免疫治疗和焦亡有重大的理论意义和临床应用价值。免疫治疗在非小细胞肺癌中的积极开展，急需知道怎样来对不同的病人施加不同治疗周期数，以及治疗周期数与哪些因素有关，会怎么样来影响疗效，如果可以通过数据分析、试验论证来解决以上问题，将可以使非小细胞肺癌患者的治疗更加精准，同时如果可以知道免疫治疗后的肿瘤细胞是否发生焦亡可以为以后相关研究奠定基础，本研究将致力于探索以上的问题，为临床实践提供参考依据。

1.8 研究流程



第2章 非小细胞肺癌新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与疗效的关系

2.1 患者和方法

2.1.1 研究设计和患者选择

回顾性纳入 2019 年 10 月至 2022 年 3 月在同济大学附属上海市肺科医院术前接受 PD-1 抑制剂联合化疗后行手术治疗的 108 例局部晚期 NSCLC 患者。

纳入标准为：

1. 患者诊断年龄处于 18 到 75 岁之间；
2. 术后病理为非小细胞肺癌的患者；
3. 通过影像学检查等明确为 II-III B 期（N2 单站）的初治免疫治疗联合化疗的患者（按照国际肺癌研究协会（IASLC）胸部肿瘤分期手册第 8 版判断）；
4. 美国东部肿瘤协作组体能状态（ECOG PS）评分 0-1 分患者；
5. 2-4 周期新辅助 PD-1 免疫化疗患者。
6. 治疗后完整切除的患者。

排除标准：

1. 5 年内有其他肿瘤病史者；
2. EGFR/ALK/ROS1 突变患者；
3. 患者术前接受其他抗癌治疗，包括但不限于局部放疗、单纯化疗、单纯免疫治疗、靶向治疗联合化疗等；
4. 姑息性手术患者。

病理诊断采用经皮穿刺活检或支气管内超声-经支气管针吸活检（EBUS-TBNA）免疫组织化学方法（IHC）。采用计算机断层扫描（CT）评估原发肿瘤。行正电子发射断层扫描/计算机断层扫描（PET/CT）和颅脑磁共振成像（MRI）明确临床分期。

依据患者接受 R0 切除前所接受的新辅助 PD-1 免疫治疗周期数将患者分为 2 周期治疗组和大于 2 周期治疗组，通过比较分析两组患者的影像学疗效、病理学疗效以及手术疗效，来探索新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与疗效的关系。

2.1.2 治疗过程

所有 NSCLC 患者均接受了每周期第 1 天 PD-1 抑制剂（卡瑞利珠单抗、特瑞普利单抗或信迪利单抗）静脉给药（21 日为一个周期）。非鳞癌患者每周期第 1 天给予培美曲塞（500mg/m²）联合卡铂（曲线下面积 5）静脉滴注（21 天为 1 个周期）；肺鳞癌患者每周期第 1 天给予白蛋白结合型紫杉醇（260mg/m²）联合卡铂（曲线下面积 5）静脉滴注（21 天为 1 个周期）。

每个患者都在第 2 个周期结束时进行影像学评估。若患者评估结果为可手术，则及时行手术治疗。手术方式的选择由本中心有经验的主任外科医师决定，包括全肺叶切除、双肺叶切除或全肺切除联合系统性淋巴结清扫。如果对患者的评估认为暂时不能手术，将建议患者继续采用原来的新辅助 PD-1 免疫化疗方案进行治疗 1-2 个周期后再进行评估。

2.1.3 疗效评估

由放射科、胸外科、肿瘤科和病理科组成的多学科综合治疗（MDT）小组评估患者的影像学 and 病理缓解情况。根据《实体瘤疗效评价标准》1.1 版评估影像学缓解情况。主要病理缓解（MPR）定义为残留活肿瘤细胞不超过 10%；病理完全缓解（pCR）定义为无存活肿瘤。影像学部分缓解（PR）定义为肿瘤靶病灶最大径之和减少 $\geq 30\%$ ；影像学完全缓解（CR）定义为所有肿瘤靶病灶消失，无新病灶出现，且肿瘤标志物正常。诱导肺叶切除定义为在治疗前行单肺叶切除不能达到 R0 的患者，包括不能手术或需要切除多个肺叶，治疗后单肺叶切除肿瘤达到 R0 切除的患者，这些患者视为诱导肺叶切除成功。

2.1.4 数据分析

符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示，组间比较采用 t 检验；不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位数间距表示，组间比较采用 Mann-Whitney 检验。分类变量以频数和各自的百分比表示，并根据情况采用 Pearson 卡方检验或 Fisher 精确检验进行比较。多因素分析采用 Logistic 回归分析。所有统计分析均采用 SPSS 软件（IBM 发行，版本 26）进行计算。双侧 P 值小于 0.05 被认为有统计学意义。

2.2 结果

2.2.1 患者特征

患者的特征信息列于表 2-1。初诊中位年龄为 65.0 岁 (57.0–68.0 岁)，影像学初诊肿瘤中位数大小为 42.0 mm (30.1 – 56.8 mm)。大多数患者为男性 (87.0%)、吸烟者 (73.1%)、N2 期 (75.9%)、组织学鳞状细胞癌 (55.6%) 和 PD-L1 阴性表达 (77.8%)。接受卡瑞利珠单抗、特瑞普利单抗和信迪利单抗治疗的患者分别为 23 例 (21.3%)、34 例 (31.5%) 和 51 例 (47.2%)。接受 2 周期和大于 2 周期新辅助 PD-1 免疫治疗的患者分别为 75 例 (69.4%) 和 33 例 (30.6%)。两组患者初诊时肿瘤中位大小差异有统计学意义 (2 周期 vs. 大于 2 周期: 37.0 mm vs. 49.6 mm, $P=0.022$)，其余指标两组间差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。

2.2.2 术前免疫化疗的疗效

2.2.2.1 影像学疗效

治疗 2 个周期组和大于 2 个周期组 CT 诊断肿瘤的中位数大小分别为 37.0 mm 和 49.6mm。2 个周期治疗组患者的影像学退缩率显著低于大于 2 个周期治疗组患者 (36% vs. 49%, $P=0.007$) (表 2-2, 图 2-1)。同时，对两个组的患者在接受两个周期治疗后的影像学评估时的同期影像学退缩率 (2 个周期 vs. 大于 2 个周期: 0.36 ± 0.22 vs. 0.35 (0.20–0.44)) (表 2-2) 进行比较发现，两组患者的差异不具有统计学意义。Logistic 回归分析显示，新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与影像学退缩率相关，即只接受 2 个周期新辅助 PD-1 免疫治疗的患者相对于接受大于 2 个周期新辅助 PD-1 免疫治疗的患者达到 PR 的概率减少 (OR: 0.173, 95% CI: 0.051–0.584, $P=0.005$) (表 2-3)。所有患者接受治疗后影像学缓解累积在图 2-3 进行了展示。

2.2.2.2 病理学疗效

此外，2 个周期和大于 2 个周期治疗组的病理学肿瘤退缩率无显著差异 (2 个周期 vs. 大于 2 个周期: 80% vs. 85%, $P=0.925$) (表 2-2 和图 2-1)。Logistic 回归分析显示，新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与 MPR 无相关性 (OR: 0.450, 95%CI: 0.161–1.257, $P=0.127$)，但是术前影像学评估肿瘤退缩率越高的患者术后病理更容易达到 MPR (OR: 64.550, 95%CI: 4.557–910.309, $P=0.002$) (表 2-4)。

2.2.2.3 手术疗效评估

只接受 2 个周期新辅助 PD-1 免疫治疗与接受大于 2 个周期新辅助 PD-1 免疫治疗的患者相比，确诊时被评估为可手术患者的比例显著升高 (2 个周期 vs. 大于 2 个周期:

74.7% vs. 51.5%, $P=0.018$) (表 2-1), 这意味着对于不能手术的患者, 接受大于 2 个周期的新辅助 PD-1 免疫化疗可以提高进行 R0 切除的概率。两组都是采用 VATS 进行手术的患者所占的比例较多, 但是两组的差异并不显著 (2 个周期 vs. 大于 2 个周期: 58.7% vs. 69.7%, $P=0.227$) (表 2-2)。Logistic 回归分析显示, 新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与手术方式无相关性 (OR: 0.411, 95% CI: 0.150–1.129, $P=0.085$), 治疗前肿瘤大小对手术方式的影响具有统计学意义 (OR: 1.040, 95% CI: 1.015–1.067, $P=0.002$) (表 2-5)。

2.2.3 对于免疫治疗周期数大于 2 周期的患者的单独分析

如图 2-1 所示, 根据患者治疗前后的自我对照分析, 在第 2 周期新辅助 PD-1 免疫治疗末的影像学退缩率明显低于术前的影像学退缩率 (0.36 (IQR: 0.20–0.44) vs. 0.50 (IQR: 0.31–0.57), $P=0.001$)。

2.3 讨论

本研究分析 NSCLC 患者接受不同周期数新辅助 PD-1 免疫治疗后的疗效影响因素。75 例患者在术前免疫治疗 2 个周期后接受手术, 其中 25 例 (33.3%) 获得 pCR, 35 例 (46.7%) 获得 MPR, ORR 为 60.5%。33 例患者在治疗 2 个周期以上后接受手术治疗, 其中分别有 7 例 (21.2%) 和 14 例 (42.4%) 获得 pCR 和 MPR, ORR 为 78.8%。增加治疗周期数并不能改善病理反应, 但是可以增加可以手术概率, 尤其是对于肿瘤大的患者。

在 2022 年 ASCO 会议上, neoSCORE 研究: 一项随机、单中心、两组 II 期研究得出结论, 接受 3 个周期信迪利单抗联合化疗的患者 MPR 率高于接受 2 个周期 MPR 的患者, 从 26.9% 提高到 41.4%, 绝对增幅为 14.5%, 提示 3 个周期新辅助 PD-1 治疗可能给患者带来更好的病理反应。鳞癌患者 3 个周期治疗可获得较高的 MPR 率。同时, 3 个周期的新辅助 PD-1 免疫不会增加手术和不良事件的额外风险。但本研究并未得出增加新辅助治疗周期数对鳞状细胞癌 MPR 率有益的结论。在数据收集时, 发现由于肿瘤组织太少, 部分患者在筛查期并没有明确的肿瘤亚型。经治疗后效果较好, 且术后达到病理完全缓解, 故术后病理无法明确肿瘤亚型。无法确定病理亚型的患者设为非鳞状细胞癌组。然而, 这部分数据 90% 集中在 MPR 组, 影响了分析结果, 导致了有偏倚的结论, 可能导致鳞癌组得疗效被低估了。

共识推荐非小细胞肺癌新辅助 PD-1 免疫治疗的治疗周期为 6–8 周^[10], 但不同新辅

助治疗临床试验使用的治疗周期并不一致。其中 CheckMate-159 临床试验采用每 2 周为 1 个周期^[22]，其他大多数采用 3 周为 1 个周期。而免疫治疗联合化疗的相关试验，如 CheckMate-816、Lung-Mate001、NEOMUN^[9, 12, 69]，一般使用 3 个周期的药物治疗，有的试验可使用多达 4 个周期。

在 CheckMate-816 中，免疫化疗组的中位无事件生存期为 31.6 个月，显著优于单纯化疗组的 20.8 个月，免疫化疗组患者的 pCR 为 24.0%，显著高于化疗组患者（2.2%）。在本研究中，新辅助 PD-1 免疫治疗联合化疗的病理缓解率，无论是 2 个周期（33.3%）还是 2 个周期以上（21.2%），均得到了相似的结果。2 个治疗周期组的 MPR 和 pCR 比例高于大于 2 个周期组，但差异无统计学意义。这提示增加治疗周期数对患者的病理反应影响不大。在此次研究中，一些患者的治疗累积优势甚至因治疗周期数的增加而被“侵蚀”（图 2-3.B）。这些因为治疗增加而被“侵蚀”的患者基本数据为：一共 3 位患者，男性 2 例，女性 1 例，年龄 56–72 岁。仅 1 例患者达到 pCR，其中 1 例残留肿瘤细胞为 90%，1 例残留肿瘤细胞为 20%。获得 pCR 的 1 例患者为 PD-L1 阳性，另外 2 例为阴性。1 例术前分期为 IIIA 期，2 例为 IIIB 期，1 例术后病理为腺癌，2 例为鳞癌。这些患者的基本特征与其它患者相比没有差异，他们之间的疗效差异更有可能是由于肿瘤的基因与分子相关水平的差异，但是这一水平的研究在本研究中没有被涉及，因此需要更深入的研究来解释。增加治疗周期数可能导致某些患者的疾病进展。由于缺乏关于这些患者分子、基因特征的透彻研究，因此很难发现可能因长期治疗而导致疾病进展的患者。为避免延误患者的根治性治疗，当患者达到手术要求时应及时手术，避免增加治疗周期数。

近年来，针对 PD-1/PD-L1 的免疫治疗备受关注 and 期待^[70]。有证据表明，PD-L1 表达的患者对抗 PD-1/PD-L1 免疫治疗反应更好^[71, 72]。还分析了所有患者 PD-L1 表达在两个治疗组之间的分布，结果无统计学意义。这可能解释了两组之间的病理缓解情况缺乏统计学显著差异。既往研究显示 PD-L1 表达与免疫应答呈正相关^[73]。本研究中 PD-L1 阳性组与 PD-L1 阴性组的病理（PD-L1 阳性 vs. PD-L1 阴性：86.5% vs. 42.5%， $P=0.249$ ）和影像学反应（PD-L1 阳性 vs. PD-L1 阴性： 0.41 ± 0.17 vs. 0.37 ± 0.28 ， $P=0.652$ ）差异均无统计学意义。这可能是由于本研究样本量有限，且本研究仅针对接受过手术的患者，未纳入所有接受过免疫治疗的患者，需要更大样本的多中心试验加以完善。尽管如此，PD-L1 阳性肿瘤的数值病理缓解率是 PD-L1 阴性肿瘤的 2 倍。这一趋势与既往研究的结论一致，即从免疫治疗中获益的患者 PD-L1 表达更高^[14, 74, 75]。

根据既往研究，新辅助 PD-1 免疫化疗的疗效一般在第 2 个治疗周期后进行评估^[12]，本研究也是如此。分析了 2 个周期治疗后被评估为不可手术的患者，并建议增加治疗周期数。对接受二次评估的患者进行了自身前后比较（图 2-2）。将 2 个周期治疗后的影像学缓解与最后一次治疗后的影像学缓解进行了比较，结果发现增加治疗周期数后，影像

学缓解显著改善。对于可能可切除的患者，增加治疗周期数可提高可手术的概率。

2.3.1 研究局限

由于本研究为回顾性研究，因此本研究也存在既往回顾性研究的局限性，如潜在的选择性偏倚。其次，患者是否需要增加治疗周期数完全取决于影像学评估和临床项目研究者的判断。最后，本研究中患者均为近期手术，尚需长期生存预后数据进一步验证结果。

虽然本研究存在诸多局限性，但这是第一个探讨治疗周期数与术前免疫治疗联合化疗疗效关系的回顾性研究。

2.4 结论

适当增加新辅助 PD-1 免疫化疗（PD-1 联合铂类为基础的双药化疗）周期数可以提高影像退缩率，增加 R0 切除的概率，虽然病理疗效随着新辅助 PD-1 免疫治疗周期数的增加也是呈现上升趋势但是没有统计学差异。此外，初诊时肿瘤体积较大的患者可能需要的新辅助 PD-1 免疫化疗周期数会更多。

表 2-1 患者基本信息

特征类别	总体 n=108	2 周期组 n=75	大于 2 周期组 n=33	P 值
年龄 (yr)	65.0 (57.0–68.0)	65.0 (57.0–68.0)	64.0 (56.5–68.0)	0.751
≥60	73 (67.6)	53 (70.7)	20 (60.6)	0.303
<60	35 (32.4)	22 (29.3)	13 (39.4)	
性别 (%)				
男性	94 (87.0)	65 (86.7)	29 (87.9)	1.000
女性	14 (13.0)	10 (13.3)	4 (12.1)	
吸烟史 (%)				
不吸烟	29 (26.9)	22 (29.3)	7 (21.2)	0.380
曾经或现在吸烟	79 (73.1)	53 (70.7)	26 (78.8)	
治疗前肿瘤大小 (mm)	42.0 (30.1–56.8)	37.0 (28.0–54.0)	49.6±17.25	0.022*
T0–2	69 (63.90)	52 (69.3)	17 (51.5)	0.076
T2–4	39 (36.1)	23 (30.7)	16 (48.5)	
治疗前被侵犯淋巴结 (%)				
N0–1	26 (24.1)	15 (20.0)	11 (33.3)	0.135
N2	82 (75.9)	60 (80.0)	22 (66.7)	0.135

续表 2-1 患者基本信息

特征类别	总体 n=108	2 周期组 n=75	大于 2 周期组 n=33	P 值
PD-L1 表达量 (%)				
0-1	84 (77.8)	57 (76.0)	27 (81.8)	0.503
1-100	24 (22.2)	18 (24.0)	6 (18.2)	
肿瘤病理类型 (%)				
肺鳞癌	60 (55.6)	42 (56.0)	18 (54.5)	0.889
非鳞癌	48 (44.4)	33 (44.0)	15 (45.5)	
治疗前手术评估 (%)				
可完整切除	73 (67.6)	56 (74.7)	17 (51.5)	0.018*
不可完整切除	35 (32.4)	19 (25.3)	16 (48.5)	

* P< 0.05;

表 2-2 治疗周期数与疗效的单因素分析

特征类别	总体 n=108	2 周期组 n=75	大于 2 周期组 n=33	P 值
治疗后肿瘤大小 (mm)	24.0 (16.0-47.1)	23.0 (16.2-34.0)	26.3±16.5	0.920
T0-2	100 (92.6)	70 (93.3)	30 (90.9)	0.698
T2-4	8 (7.4)	5 (6.7)	3 (9.1)	
影像学退缩率 (%)	40.0±24.0	36.0±22.0	49.0±25.0	0.007*
第二周末	36.0±21.0	36.0±22.0	35.0 (20.0-44.0)	0.678
病理学肿瘤大小 (mm)	28.0 (20.0-38.0)	27.0 (20.0-36.0)	28.0 (18.5-42.0)	0.489
T0-2	98 (90.7)	69 (92.0)	29 (87.9)	0.720
T2-4	10 (9.3)	6 (8.0)	4 (12.1)	
肿瘤残余 (%)	15.0 (0.0-70.0)	20.0 (0.0-80.0)	15.0 (3.0-57.5)	0.925
0-10	49 (45.4)	35 (46.7)	14 (42.4)	0.683
>10	59 (54.6)	40 (53.3)	19 (57.6)	

续表 2-2 治疗周期数与疗效的单因素分析

特征类别	总体 n=108	2 周期组 n=75	大于 2 周期组 n=33	P 值
完全病理学缓解率 (%)	32 (29.6)	25 (33.3)	7 (21.2)	0.204
手术方式 (%)				
开胸	41 (38.0)	31 (41.3)	10 (30.3)	0.277
VATS	67 (62.0)	44 (58.7)	23 (69.7)	0.277
出血量 (毫升)	50.0 (50.0–50.0)	50.0 (50.0–50.0)	50.0 (50.0–75.0)	0.726
手术时间 (分钟)	120.0 (120.0–180.0)	120.0 (120.0–180.0)	151.8±54.6	0.420
住院天数 (天)	7.0 (5.0–7.0)	7.0 (5.0–8.0)	7.0 (6.0–9.0)	0.322

VATS, 电视胸腔镜手术; * P< 0.05;

表 2-3 PR 的多元分析

相关因素	组别	OR	95%置信区间	P 值
治疗周期数	2	0.173	0.051-0.584	0.005*
	2-4			
PD-L1 表达量	0-1	0.457	0.131-1.593	0.219
	1-100			
吸烟史	Yes	0.692	0.235-2.036	0.504
	No			
治疗后肿瘤大小 (mm)		1.051	1.013-1.091	0.008
MPR	Yes	5.258	1.848-14.960	0.002*
	No			
肿瘤病理学类型	肺鳞癌	2.907	1.038-8.138	0.042
	非鳞癌			

PR, 影像学部分缓解; OR, 比值比; MPR, 病理学主要缓解; * P>0.05;

表 2-4 MPR 的多元分析

相关因素	组别	OR	95%置信区间	P 值
治疗周期数	2	0.450	0.161–1.257	0.127
	2–4			
PD-L1 表达量	0–1	1.292	0.438–3.807	0.642
	1–100			
吸烟史	Yes	0.693	0.247–1.947	0.486
治疗后肿瘤大小 (mm)		1.011	0.958–1.066	0.699
影像学退缩率 (%)		64.550	4.577–910.309	0.002*
肿瘤病理学类型	肺鳞癌	2.251	0.886–2.251	0.088
	非鳞癌			
病理学肿瘤大小 (mm)		0.971	0.927–1.017	0.213

OR, 比值比; MPR, 病理学主要缓解; * P>0.05;

表 2-5 手术方式的多元分析

相关因素	组别	OR	95%置信区间	P 值
治疗周期数	2	0.411	0.150-1.129	0.085
	2-4			
性别	女性	3.867	0.622-24.027	0.147
	男性			
吸烟史	Yes	1.303	0.403-4.208	0.658
年龄 (岁)	>=60	1.724	0.665-4.467	0.262
	<60			
治疗前肿瘤大小 (mm)		1.040	1.015-1.067	0.002*
影像学退缩率 (%)		0.891	0.138-5.740	0.903
肿瘤病理学类型	肺鳞癌	0.872	0.345-2.206	0.773

OR, 比值比; * P>0.05;

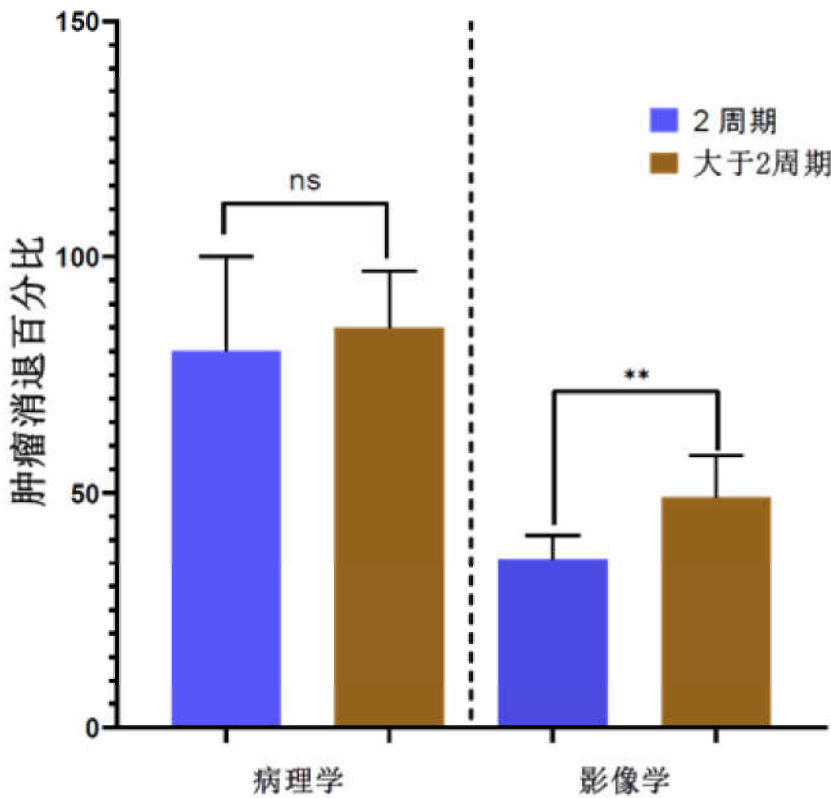


图 2-1 大于 2 周期患者第二周期与手术前影像学肿瘤消退的比较

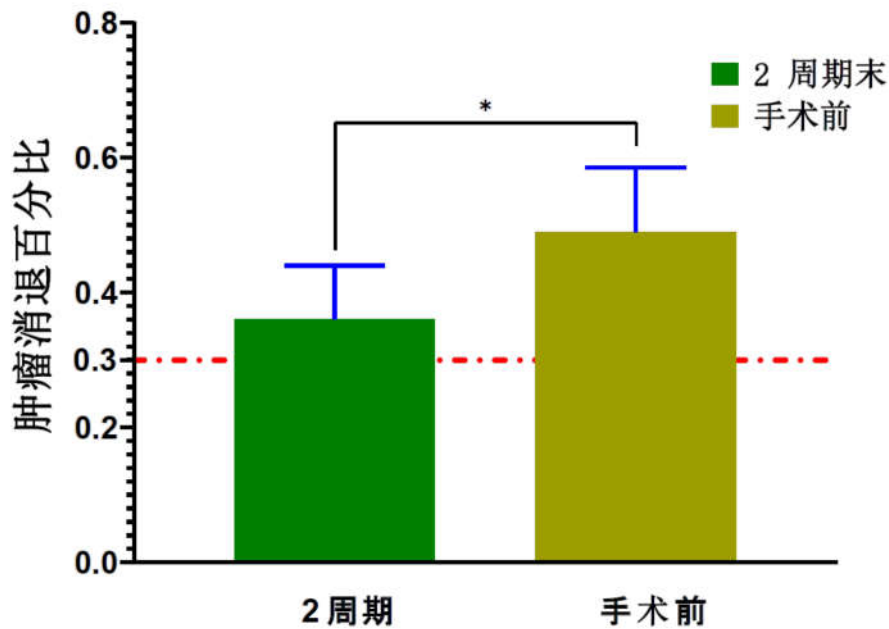


图 2-2 大于 2 周期组,2 周期末 vs.术前的病理学和影像学肿瘤缓解率的比较

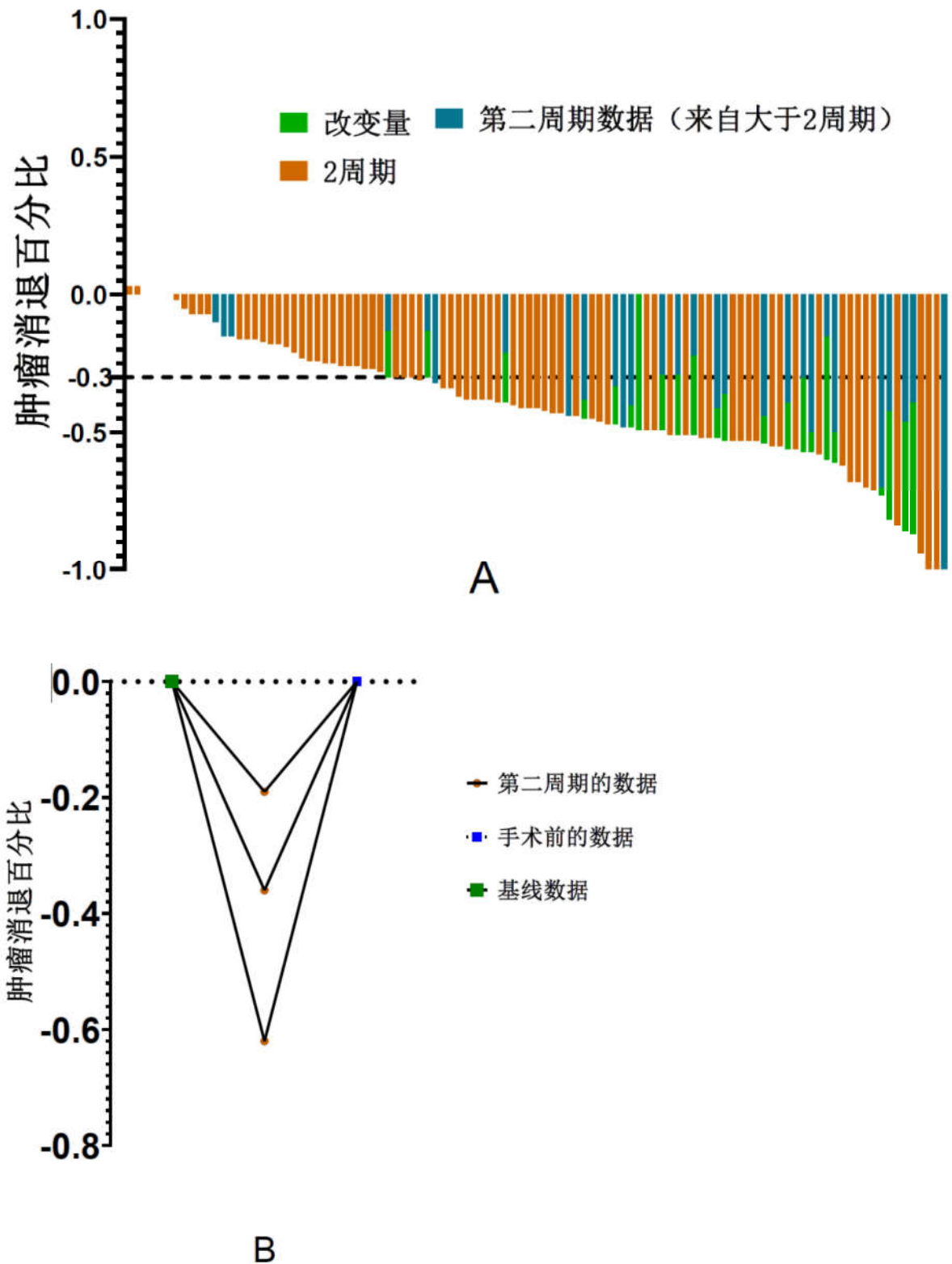


图 2-3 A: 影像学缓解持续累积的患者; B: 继续治疗肿瘤增大的患者

第3章 单细胞检测探索肿瘤细胞焦亡信号表达

3.1 新辅助 PD-1 免疫治疗样本收集

对于新辅助 PD-1 免疫治疗的病人在治疗前,会对其使用电子超声气管镜(Electronic ultrasonic bronchoscopy, EBUS)来对异常肿大的淋巴结进行采取组织的操作,组织首先用来明确患者的病理和其次进行组织检测为后期的研究提供对照,对于 EBUS 不适用、淋巴结位置不适合或者没有明显肿大的淋巴结的患者,会采用在 CT 导航下经皮肺部穿刺来对肿瘤组织进行取样,作用也是首先用来明确病理和其次为后期的研究提供对照。

经过新辅助 PD-1 免疫治疗后的患者,会建议患者在上海市肺科医院胸外科进行手术治疗,和胸外科进行合作:当患者进行手术时,会进入手术室等待获取肿瘤组织和组织旁的正常组织,并及时进行处理。

本次分析收取了 3 例免疫治疗前的肿瘤组织,12 例免疫治疗后的组织,并且按照病理缓解分为:4 例 MPR 以及 8 例 NMPR。

由于 EBUS 是由上海市肺科医院的气管镜科室进行操作,所以在此处仅是描述一下,但是 CT 导航下经皮肺部穿刺是由自己完成我将详细描述。

3.1.1 治疗前样本收集

治疗前样本收集需要进行 CT 导航下经皮肺部穿刺,以下为操作细节。

3.1.1.1 操作名称

CT 导航下经皮肺部穿刺

3.1.1.2 操作对象

符合方案条件的待筛选的新辅助 PD-1 免疫治疗患者。

3.1.1.3 操作材料

1 胸部穿刺工具包*1(包含:5ml 注射器*1、50ml 注射器*1、无菌手套*1、小纱布*2、胸部穿刺针*2、洞巾、无菌药盘*1)

2 半自动肺部穿刺一次性活检针(Max-core[®])购自卫尔医疗

- 3 利多卡因 10ml
- 4 纱布*2 包
- 5 载玻片*1 片
- 6 固定液*1 管
- 7 组织收集管*1 管
- 8 液体培养基*1 管
- 9 棉签*1 包
- 10 皮肤消毒液*1 瓶
- 11 无菌手套*1
- 12 胶带*1

3.1.1.4 操作地点

上海市肺科医院肺部穿刺专用 CT 机房，这个机房不同于普通的 CT 机房，这个机房配备有所有肺部穿刺需要的材料，以及这个机房的 CT 机也需要执行操作的人自己进行操作，以便于对穿刺针的角度、位置进行调整。

3.1.1.5 操作步骤

在进行这项操作之前需要向患者充分告知相关的风险签订知情同意后，嘱咐患者于 CT 机床躺好，根据患者的肿瘤位置来决定患者是侧着身躺在 CT 机床上或者正面向上平躺在 CT 机床上，将手举过头顶或根据肿瘤位置选择抱胸，充分暴露预计将要消毒的皮肤区域；手部消毒后，打开胸部穿刺工具包，按照无菌原则，将纱布、半自动肺部穿刺一次性活检针、无菌手套放入打开的胸部穿刺工具包所形成的无菌区域，利多卡因小心打开并于皮肤消毒液一起置于置物台，将所需棉签置于皮肤消毒液中，再次手部消毒带好无菌手套，将胸部穿刺工具包中的胸部穿刺针当作标志物，按照患者肿瘤位置选择贴于腋中线、腋前线或者腋后线，对于肿瘤位置特殊的患者，标志物也有可能贴于脊柱旁。

将标志物放置好后，脱下手套，丢入医疗垃圾袋，来到 CT 机操作室利用计算机登记患者信息，对患者进行普通 CT 扫描一次，等待 CT 扫描完成，影像构建成功后，仔细选择穿刺位置和角度，选择穿刺位置时需要注意：尽量避免血管繁杂的层面；非必要不要跨肺叶进行穿刺；根据所用的半自动肺部穿刺一次性活检针预留出足够的距离来进行后续的组织收取操作；不要选择肋骨下缘作为穿刺点。决定穿刺角度时也要避免直接对着大血管或者血管聚集处（比如：肺门），尽量采用容易操作的角度（比如：垂直皮肤、垂直地面或平行地面等等），测量预计进针点与标记物的距离以及进针深度，并记录下位置、角度以及距离。

决定好了进针角度与位置后,记住所选的 CT 层面并在患者身体上定位到这个层面,运用记号笔在患者皮肤上对预计进针点进行标记,进行手部消毒后,戴好无菌手套,对患者以预计进针点为圆心,直径大约 5cm 所形成的皮肤区域进行消毒,然后逐层进行麻醉,在麻醉时应当避免扎破壁胸膜进入胸腔,充分麻醉完成后需要等待几分钟,待麻醉药起效后,按照预定的位置、角度、深度将半自动肺部穿刺一次性活检针附带的胸部穿刺针刺入肺部,再一次进行 CT 扫描,观察胸部穿刺针的位置与深度,并进行测量是否适合进行下一步获取组织。如果不能进行下一步,则需要重复之前的操作来进行调整,直到适合进行下一步,在这个过程中患者有可能发生气胸,需要提前准备好新的胸部穿刺针来进行胸腔闭式引流术的操作。

当胸部穿刺针的位置合适之后,则需要应用半自动肺部穿刺一次性活检针来进行获取肿瘤组织,每一次释放半自动肺部穿刺一次性活检针后都需要注意封闭好胸部穿刺针防止气胸,获取的肿瘤组织先用注射器的针尖置于载玻片上,等待获取足够的肿瘤组织后,用 50ml 注射器在保持负压的情况下将胸部穿刺针慢慢退出来,等待胸部穿刺针完整退出来后,再一次进行 CT 扫描,观察有无明显的出血、空气以及其他的异常,如果有异常则需要对症处理,如若没有则可以进行结束操作,安置好患者后,将组织及时送至实验室进行处理保存。

3.1.2 治疗后样本收集

在患者手术当日提前进入手术室等待,包含肿瘤组织的肺部组织被主刀切离下来后,然后组织在主刀检查后移交给器械护士,戴好无菌手套,将组织用无菌弯盘装到一旁,使用剪刀在被剖开的肿瘤组织截面,剪取一小块足够量的组织,然后在肿瘤旁剪取一部分正常的癌旁组织,需要注意的是:剪取肿瘤组织时,不能破坏肿瘤的形状以及包膜等会影响病理诊断的因素。获取组织后,及时将获取的组织送至实验室进行初步处理,然后进行保存。

3.2 单细胞测序

3.2.1 建立文库

收集来的治疗前和治疗后的样本经过实验室初步处理后,会及时的对其进行进一步的操作,为了获取肺癌样本的单细胞转录组信息,按照制造商提供的方案使用 BD Rhapsody 单细胞分析系统 (BD Biosciences)。

BD 平台通过将单细胞悬液随机分布在板上约 20 万个微孔来捕获单细胞。然后将具有独特分子标识 (UMIs) 和细胞条形码的磁珠加载至微孔板至饱和, 以便微孔中仅能保留一个细胞和一个磁珠。将具有多聚腺苷酸化的 RNA 分子探针加入细胞裂解缓冲液后, 会与磁珠发生杂交。然后珠子被回收到单个试管中进行逆转录, 建立 cDNA 文库。

在 cDNA 合成过程中, 每个 cDNA 分子的 5' 端 (即信使 RNA 转录本的 3' 端) 都会被 UMI 和细胞标记, 用来表明其细胞来源。单细胞全转录组扩增流程将被用于制备全转录组文库。微珠随后进行第二链 cDNA 合成、接头连接和通用扩增。利用全转录组扩增产物的随机引物 PCR 制备测序文库, 以富集与细胞标签和 UMI 连接的转录本 3' 端。

使用 Bioanalyzer 2100 上的高灵敏度 DNA 芯片 (Agilent) 和 Qubit 高灵敏度 DNA 分析 (Thermo Fisher Scientific) 对测序文库进行定量。使用 2x150 化学方法在 NovaSeq6000 (Illumina) 上对文库进行测序。BD Rhapsody 分析管线用于处理原始测序数据, 生成每个样本的唯一分子标识符 (UMI) 矩阵。

3.2.2 数据质控

在 R 软件 (3.6.3 版本) 中使用 Seurat 分析包 (3.3.2 版本) 对于每个样本得到的 UMI 矩阵进行质控。对于每个细胞, 使用 4 条质量控制 (QC) 标准。符合以下任一标准的细胞被删除: (1) 表达基因小于 500 个; (2) 线粒体基因占比超过 20%; (3) 核糖体基因占比超过 50%; (4) 管家基因 (ACTB, GAPDH 和 MALAT1) 的 UMI 总和小于 1。为了去除潜在的双细胞, 使用 Scrublet 算法 (0.2.1 版本) 检测双细胞。将预期的双细胞占比设为 2.5%, 其余参数为默认值。随后根据计算得到的双细胞的评分分布手动调整阈值, 将呈评分双峰分布的阈值设为两峰之间的低点值, 然后将大于该阈值的细胞全部去除。

3.3 分析方法

3.3.1 聚类和注释

使用 Seurat 分析包的 NormalizeData 和 ScaleData 函数对表达矩阵进行归一化处理和中心化。然后应用 FindVariableFeatures 函数筛选前 2000 个高频变异基因并进行主成分分析 (PCA)。使用 FindClusters 函数对前 20 PCA 结果进行无监督聚类, 分辨率为 0.8,

一共得到 26 个细胞亚群。最后使用 tSNE 算法将 PCA 的高维数据投射在 2 维平面上以便于可视化。随后使用经典的标志基因将 26 个亚群分为上皮细胞（EPCAM），基质细胞（COL1A1）和免疫细胞（PTPRC，编码 CD45）。

3.3.2 肿瘤细胞鉴别

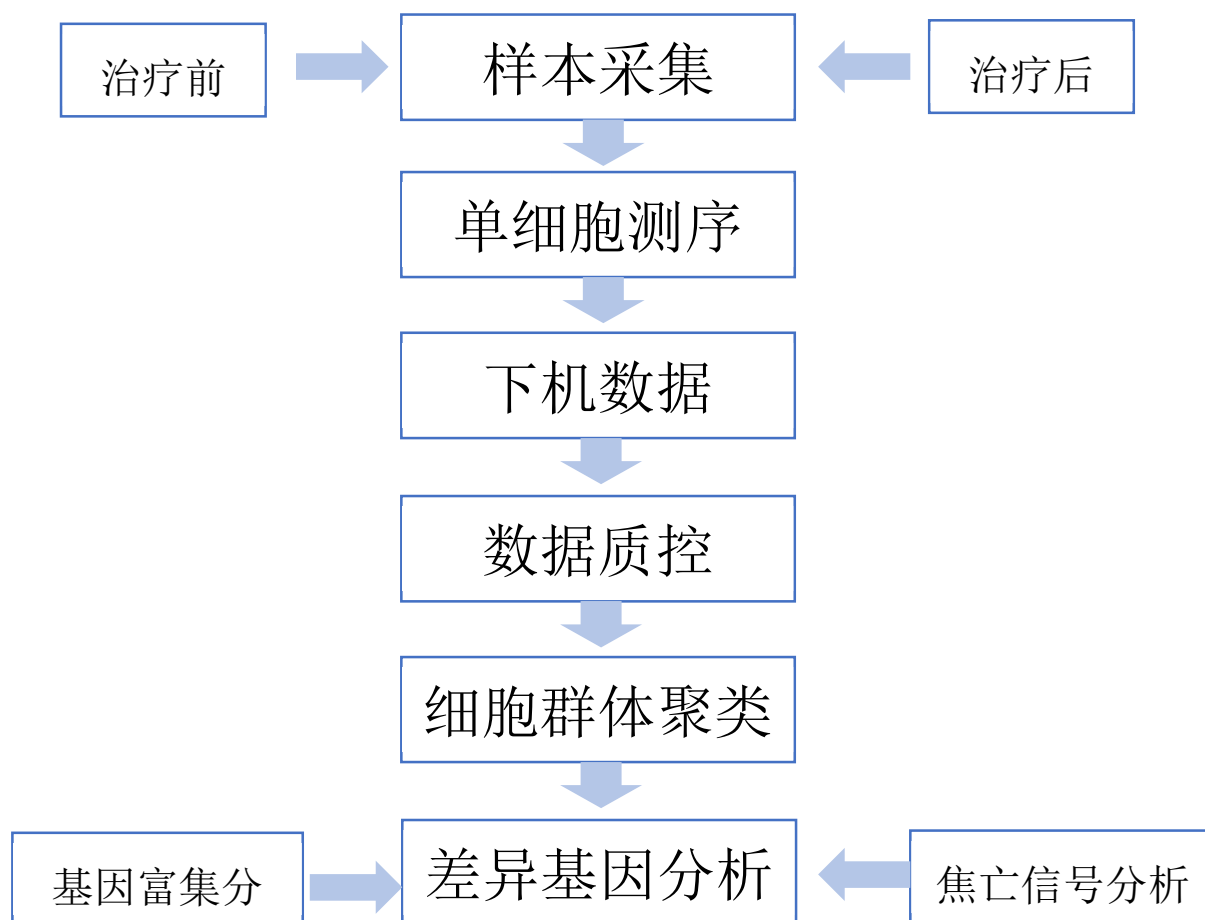
为了从所有上皮细胞中鉴别恶性细胞，使用 CopyKAT 算法（0.1.0 版本）来估计拷贝数变异（copy number variations, CNVs）的情况。将基质细胞为正常参考，所有参数均为默认值，得到基因片段在各条染色体的增加或丢失的值随后基于各个基因片段的值进行 k-means 聚类，最终将上皮细胞分为正常和恶性细胞。

3.3.3 焦亡信号通路富集分析

为了估计癌细胞中焦亡的特征，使用 Seurat 中的 AddModuleScore 函数和来自 GOBP_PYROPTOSIS 通路的基因集计算每个细胞的富集信号（*msigdb.v7.5.1.symbols.gmt*, download from <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>）。

3.3.4 分析流程

分析流程如下：



3.4 结果

3.4.1 细胞分类与鉴别

总共收集到 15 个样本，包括 3 例治疗前（treatment-naïve, TN），4 例治疗后 MPR 和 8 例非 MPR（NMPR）样本。数据聚类 and 质控后得到 92000 个单细胞，其中包括了 81329 个免疫细胞（CD45）、1221 个基质细胞（COL1A1）和 12873 个上皮细胞（EPCAM）（图 3-1）。

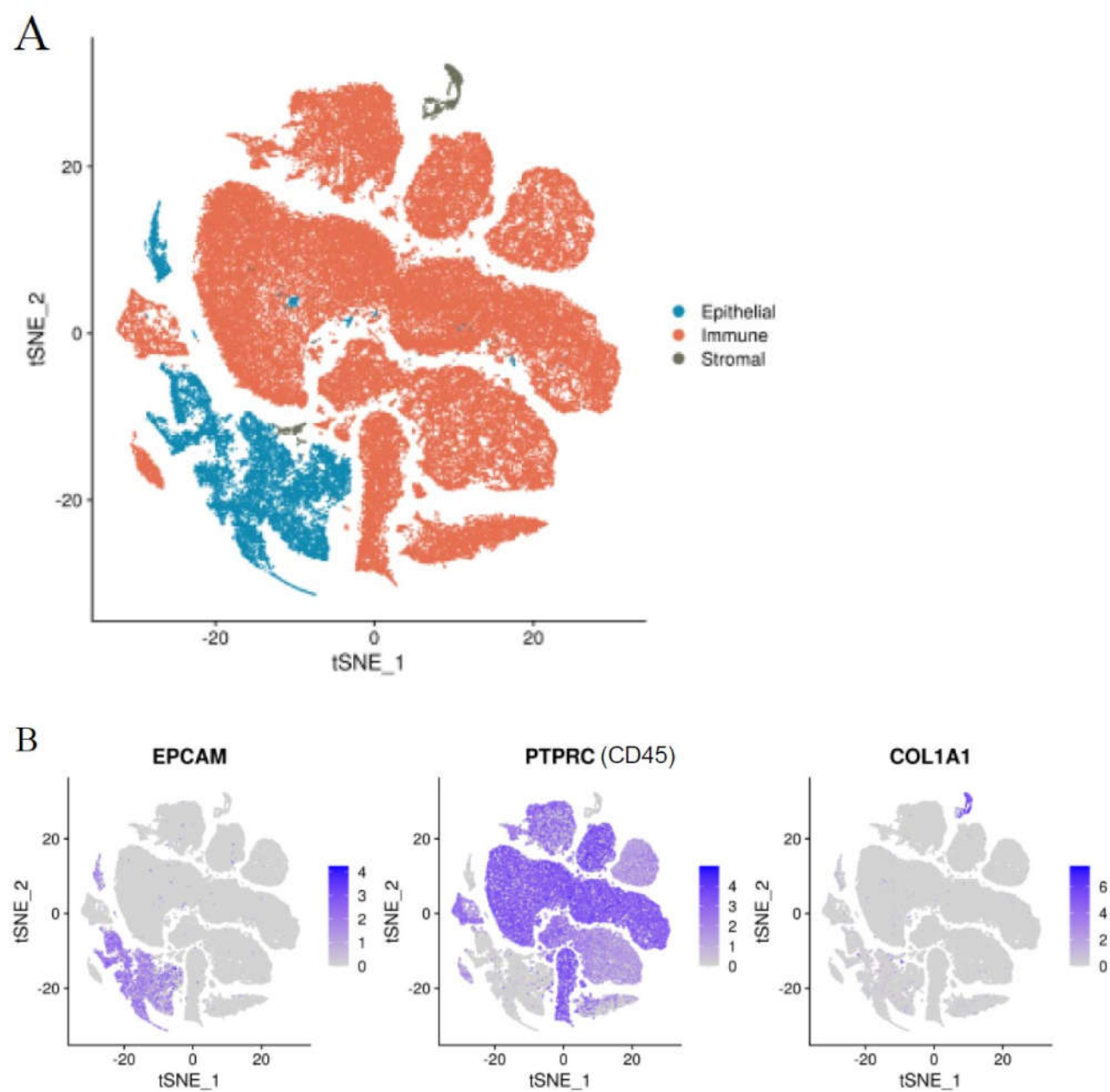


图 3-1 A: 将所有细胞分为三类: 上皮细胞 (Epithelial)、免疫细胞 (Immune)、基质细胞 (Stromal);
B: 进行检验图 A 的细胞分类。

然后选取上皮细胞进行下游分析, 使用 CopyKAT 算法鉴别到 7442 个恶性细胞 (图 3-2)。

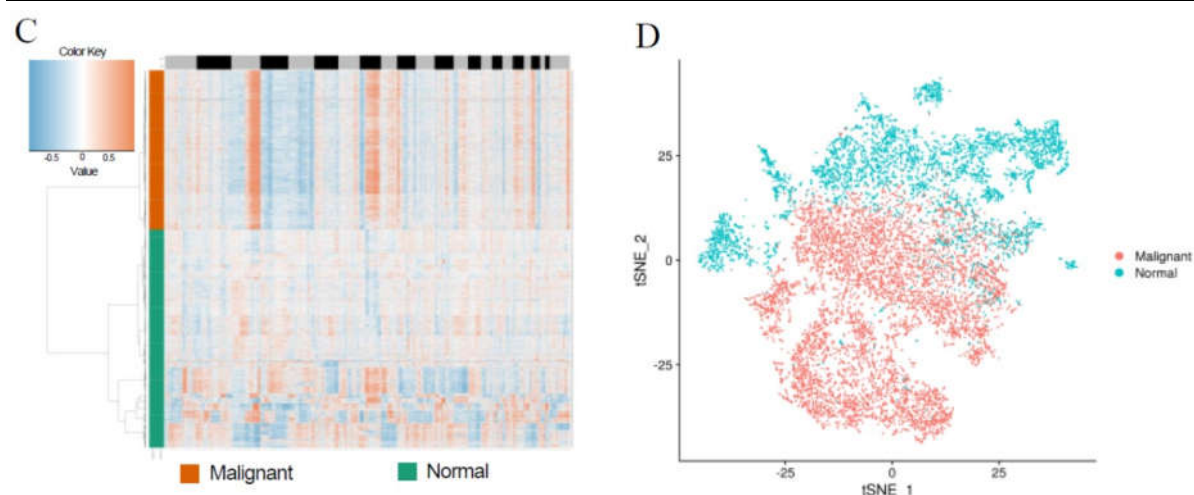


图 3-2 使用 CopyKAT 把肿瘤细胞和正常的上皮细胞分开图； D: tsne 上肿瘤和正常的聚类分布。

3.4.2 焦亡信号通路富集分析

焦亡信号通路的相关信号分析如图 4-3、4-4 所示。焦亡通路关键信号 GSDMD 和 Caspase-1 以及其他相关的信号在治疗前和治疗后的 MPR 和 NMPR 的组织中的表达程度不一，根据分析显示：信号 GSDMD 在治疗后的组织中表达明显升高尤其是在 MPR 病人的治疗后组织中，信号 Caspase-1 也可以观察到在治疗后 MPR 病人的组织中表达明显升高（图 3-3）。

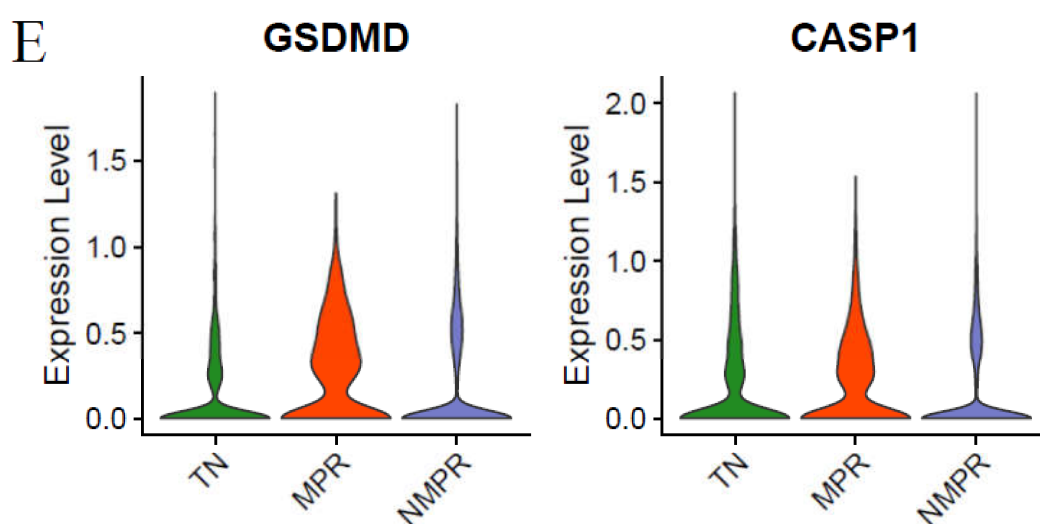


图 3-3 E: 治疗前、治疗后 MPR 组和 NMPR 组，肿瘤细胞焦亡信号 GSDMD、Caspase-1 的表达比较

通过对来自 GOBP_PYROPTOSIS 通路的基因列表的富集分析显示，治疗后的肿瘤细胞中，MPR 的焦亡信号明显比 NMPR 的高（图 3-4）；对非经典焦亡通路的相关信号

进行分析时发现，虽然治疗后 Caspase-4/8 信号相较治疗前有所减弱，但是在 MPR 组的信号还是明显高于 NMPR 组（图 3-5）。

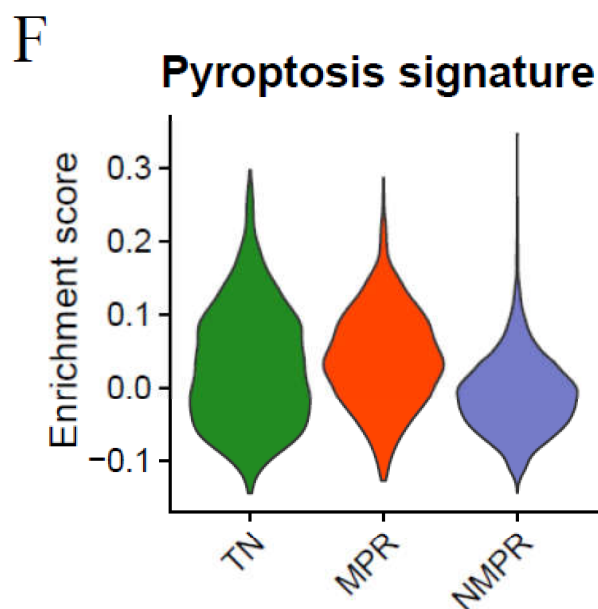


图 3-4 F：治疗前、治疗后 MPR 组和 NMPR 组，肿瘤细胞的富集分析比较。

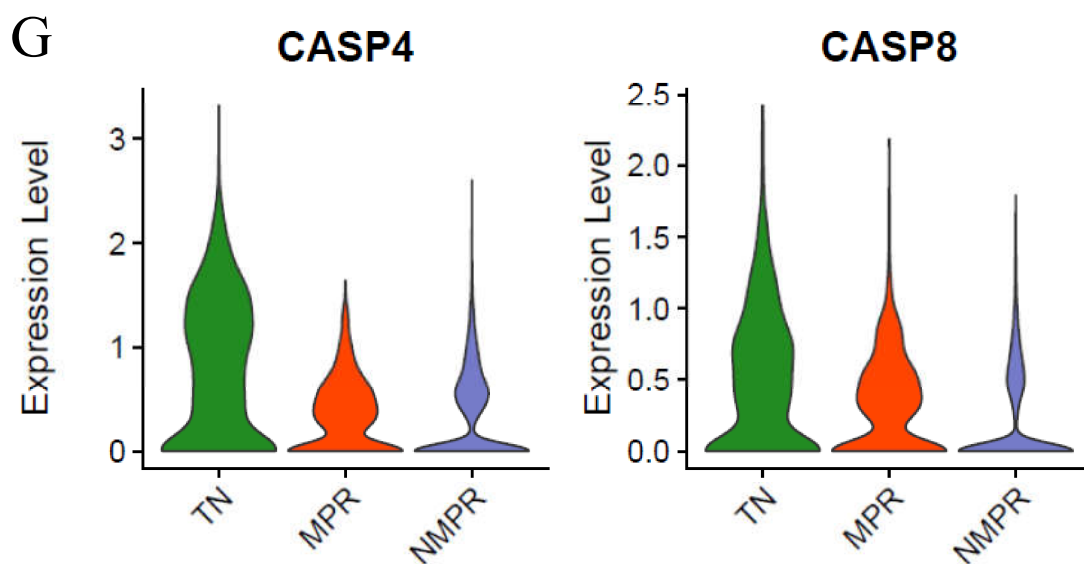


图 3-5 G：治疗前、治疗后 MPR 组和 NMPR 组，肿瘤细胞中的非经典焦亡通路的关键信号的表达比较。

3.5 讨论

免疫检查点阻断疗法在非小细胞肺癌的治疗中的应用已经十分广泛了,但是由于缺乏肿瘤抗原以及进而对于机体的适应性免疫不能有效地启动,对于需要激活机体免疫来进行抗肿瘤反应的免疫疗法来讲并不能取得好的效果。细胞焦亡是一种程序性炎性细胞死亡,当肿瘤细胞发生焦亡时会产生大量的炎性因子,可以使肿瘤细胞内的肿瘤抗原释放激活启动自适应性的免疫反应,因此目前的研究多聚焦于如何更好的诱导肿瘤细胞焦亡。

促进肿瘤组织发生焦亡,提高抗肿瘤反应的方法有很多。目前有研究开发新型的化疗方案,利用光动力联合化疗治疗方案,将利用这一方案形成新型的工程化纳米胶束体系,通过将药物通过光动力更多的在肿瘤部位聚集,提高传统药物肿瘤靶向性,纳米胶束富集在肿瘤细胞中,除了降低全身毒性和副作用外,还可以诱导肿瘤细胞焦亡,释放炎症因子和肿瘤相关抗原,进一步激活抗原提呈细胞,最终启动适应性免疫。尤其是,当这种方案与免疫疗法联合之后,对于 PD-1 阻断治疗的疗效可以显著增强,对于之后的控制肿瘤生长以及防止肿瘤复发也有很好作用^[76]。除此之外,还有构建 Nano-CRISPR 支架 (Nano-CD) 用来将药物送至肿瘤细胞后,利用 Nano-CD 里面所包含的一种特异性的 sgRNA 来诱导肿瘤细胞焦亡,从而导致肿瘤细胞中所蕴含的肿瘤相关抗原释放,来引发抗肿瘤免疫反应的级联扩增。根据研究, Nano-CD 联合 PD-1 治疗可以产生持久的免疫记忆和强大的全身抗肿瘤反应,从而预防疾病复发抑制肿瘤转移^[77],在实验中经过这种方案治疗的负荷黑色素瘤细胞的小鼠的生存率得到了提高。

虽然现有的很多研究大多是通过佐剂或者增加化疗药物的靶向性等手段来提高肿瘤细胞里的药物富集来诱导肿瘤焦亡,但是这样的方案与 PD-1 免疫治疗联合同样也可以观察到更好的抗肿瘤反应,说明不管是免疫治疗诱导还是化疗诱导抑或是通过其他什么手段来诱导肿瘤细胞焦亡来增加抗肿瘤反应是一个可以深入研究的方向。同时有研究发现,正常的免疫细胞也可以分泌一些物质来诱导肿瘤细胞焦亡,比如,颗粒酶 Granzyme B 由杀伤细胞分泌可以直接切割 gasdermin E,促使肿瘤细胞焦亡,释放出更多的肿瘤抗原进一步激活机体的免疫系统进行抗肿瘤反应,抑制肿瘤细胞生长^[78];由 CTLs 和 NK 细胞等淋巴细胞释放的丝氨酸蛋白酶 Granzyme A,并且通过位于肿瘤细胞表面的穿孔素进入肿瘤细胞,然后对 GSDMB 蛋白进行特异性地高效切割,最终导致肿瘤细胞发生焦亡^[48]。这进一步说明了这些免疫细胞可以成为新的免疫治疗靶点。

对于接受了 PD-1 免疫治疗的患者的治疗前和治疗后的肿瘤细胞进行的单细胞分析显示在免疫治疗后,肿瘤细胞中的焦亡信号产生了改变,尤其是在经典焦亡相关信号,相较于 NMPR 组病理缓解率较好的 MPR 组里可以发现更高的焦亡信号表达。这些都说明了结果都说明了,PD-1 免疫治疗后的肿瘤细胞中有肿瘤细胞发生了焦亡。这个结果结合现有的诱导肿瘤焦亡可以增强抗肿瘤反应的研究结论,可以很好的解释焦亡信号强的肿瘤细胞的患者 PD-1 免疫治疗后的病理缓解率更好。但是在分析结果中还发现,并不

是在治疗后所有的焦亡信号都会上调，比如非经典焦亡通路的 Caspase-4/8 信号分子在分析结果中显示，与治疗后的肿瘤细胞相比它们的信号在治疗前的肿瘤细胞中更加的强，具体机制需要更加深入的研究来进行阐明。

3.6 结论

通过单细胞测序检测可以在部分接受新辅助 PD-1 免疫治疗的患者的肿瘤细胞中发现经典焦亡通路的相关信号会发生上调，其中在病理缓解更好的病人的肿瘤细胞中焦亡相关信号的上调更加明显。

第4章 免疫组织化学染色探索肿瘤中焦亡相关蛋白表达

4.1 概述

根据单细胞测序的结果,已经分析得出焦亡相关信号在经过免疫治疗后肿瘤细胞发生了上调。之前的研究已经发现,不管是 Caspase-1 还是-4、-8 或者-11 都是通过将 gasdermin 裂解^[45,46],被裂解的会产生两种片段: GSDMD-N 和 GSDMD-C。原本在完整 gasdermin 中氨基末端和羧基末端结构域之间存在的分子内抑制性相互作用随着裂解活化被释放,导致细胞膜发生穿孔细胞内外物质随意交换产生焦亡^[33]。因此,猜想在经过免疫治疗后的发生焦亡的肿瘤细胞中会有 gasdermin 蛋白的表达。又因为单细胞测序分析显示,经典途径的焦亡信号上调明显。根据既有研究,经典途径是通过 Caspase-1-gasdermin D 通路导致肿瘤细胞焦亡^[40]。因此,将 gasdermin D 作为目标蛋白,运用免疫组织化学染色来验证在经过免疫治疗后的肿瘤细胞里 gasdermin D 的表达水平。

4.2 实验材料

4.2.1 临床样本

所有的接受过免疫治疗的非小细胞肺癌患者的肿瘤组织都来自于上海市肺科医院。皆由研究者自行进行收集,并且通过了病理科复检,全部为 NSCLC 成分,不含有 SCLC 成分。并且按照肿瘤残余将样本分为了 MPR 和 NMPR 组,在每个组中都含有鳞癌和腺癌的肿瘤组织,具体信息参照表 5-1。该操作经过了伦理审查委员会批准,同时获取了患者本人的同意并且签署了知情同意书。

表 4-1 样本具体信息

序号	编号	病理	残余肿瘤细胞	亚型
1	BD10#T	MPR	0	腺癌
2	BD11#T	MPR	1%	鳞癌
3	BD12#T	MPR	5%	鳞癌
4	BD13#T	MPR	10%	鳞癌

续表 4-1 样本具体信息

序号	编号	病理	残余肿瘤细胞	亚型
5	BD1#T	non-MPR	100%	腺癌
6	BD2#T	non-MPR	90%	鳞癌
7	BD3#T	non-MPR	80%	腺癌
8	BD4#T	non-MPR	95%	鳞癌
9	BD5#T	non-MPR	70%	鳞癌
10	BD6#T	non-MPR	20%	腺癌
11	BD7#T	non-MPR	80%	腺癌
12	BD8#T	non-MPR	40%	鳞癌

4.2.2 主要仪器

1. 购自 Amersham Biosciences 公司的恒温水浴锅
2. 购自 Eppendorf 公司的无菌移液管 (5ml、10ml、25ml)
3. 购自 Eppendorf 公司的微量移液器 (2 μ l、10 μ l、20 μ l、200 μ l、1000 μ l)
4. 购自 Eppendorf 公司的无菌移液枪头 (10 μ l、200 μ l、1000 μ l)
5. 购自 Fisher Scientific 公司的零下 20 $^{\circ}$ C 低温冰箱
6. 购自 Fisher Scientific 公司的 4 $^{\circ}$ C 冰箱
7. 购买自 DIAPATH 公司的脱水机
8. 包埋机购买自俊杰公司
9. 冻台购买自俊杰电子公司
10. 病理切片机购买自徕卡仪器公司
11. 组织摊片机购买自科迪仪器公司
12. 烤箱购买自莱玻瑞仪器设备公司
13. 防脱载玻片购买自 Servicebio 公司
14. 盖玻片购买自 Servicebio 公司
15. 高压锅购买自美的电器公司
16. 购买自 Servicebio 公司的脱色摇床
17. 购买自 Servicebio 公司的组化笔
18. 购买自 Nikon 公司的显微镜
19. 购买自 Nikon 公司的成像系统
20. 购买自 Fil-Tech 公司的超净工作台

4.2.3 实验试剂

1. 购买自 Gibco 公司的胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)
2. 购买自 Sigma-Aldrich 公司的无镁/钙离子磷酸盐缓冲盐溶液 (Phosphate Buffer Saline, PBS)
3. 购买自 Sigma-Aldrich 公司的 4%多聚甲醛 (Paraformaldehyde)
4. 购买自国药集团的二甲苯
5. 购买自国药集团的无水乙醇
6. 购买自 Sigma-Aldrich 公司的柠檬酸三钠
7. 购买自国药集团的 30% H_2O_2
8. 购买自索莱宝科技有限公司的牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA)
9. 购买自 Biosharp 公司的苏木精染液
10. DAB 显色剂购买自基因科技 (上海) 有限公司
11. 购买自 Cell Signaling Technology (CST) 公司的抗 GSDMD 单克隆抗体, 36425S

4.2.4 主要溶液配制

1. 3% H_2O_2 溶液配制: 将 10ml 30% H_2O_2 至 90 ml dH_2O 中。
2. 柠檬酸盐修复液: 要制备 1000 mL 的柠檬酸盐修复液, 向 3 g 的柠檬酸三钠和 0.4g 的柠檬酸混合物中加入 1000ml ddH_2O 。
3. 抗体稀释液: 将一抗用无镁/钙离子磷酸盐缓冲盐溶液进行稀释。

4.3 实验步骤

4.3.1 制作肿瘤组织石蜡切片

1. 获取肿瘤组织: 在上文第三章已经详细叙述样本的获取, 在此不再赘述。
2. 固定肿瘤组织: 将新鲜肿瘤组织, 将其浸泡于 4%的多聚甲醛里, 在室温条件下固定 24 小时以上。
3. 获取适当的大小: 将已经固定好的肿瘤组织, 置于通风橱柜中, 用符合规范的手术刀切取目标位置的组织, 将取下的组织放入已经做好了标识的包埋盒中。
4. 肿瘤组织脱水: 将上一步的包埋盒置于脱水机中, 由于脱水是用酒精梯度来完成的, 所以要依次加入不同浓度的酒精。75%酒精 4 小时, 85%酒精 2 小时, 90%酒精 2 小时, 95%酒精 1 小时, 无水乙醇 I 30 分钟, 无水乙醇 II 30 分钟, 酒精苯 5-10 分钟, 二甲苯 I 5-10 分钟, 二甲苯 II 5-10 分钟。

5. 肿瘤组织浸蜡：这一步也需要按照浓度梯度依次进行。将脱水完成的包埋盒放入在 65℃ 条件下融化的石蜡I中 1 小时，然后置入同样 65℃ 条件下融化的石蜡II中 1 小时，最后置于 65℃ 融化石蜡III中 1 小时。

6. 肿瘤组织包埋：将浸好蜡的组织块取出，选择符合大小的模具，同时调整包埋机的滴蜡速度，防止过快产生气泡。在模具中滴入液态蜡，趁液态蜡没有凝固将浸好蜡的组织放入模具，然后贴上标识。

7. 冷冻石蜡块：将已经包埋好的组织石蜡块放入-20℃的冷冻台里进行冷冻凝固，待石蜡完全凝固后将其取出，并用工具进行修整使其规整。

8. 进行切片：将蜡块提前放入 4℃ 冰箱预冷，在切片机上固定好蜡块，调整蜡块与刀片的距离，然后调整切片的厚度，然后粗切直到看到完整的蜡片上有组织后切换切片的厚度，调整到 4 微米的厚度。在整个过程中需要均匀用力，右手摇动控制刀片的把手，左手执毛笔迎接刚被切下来的切片。当有切片打卷时，需要用毛笔将刚被切下的切片边缘按住缓慢摇动右手把手，这样可以得到较平整的切片。

9. 温水捞片：在水槽中放入 40℃ 左右的温水，用毛笔和镊子小心将切片放入水槽中展开。然后用防脱载玻片平行切片贴近切片，轻轻将其捞起。在用防脱载玻片打捞切片的时候需要注意，为了防止水槽底部的气泡上浮，残留在片子上，防脱载玻片的边缘尽量不要触底。

10. 烤片：将捞好切片的防脱载玻片放到 60℃ 的烘烤箱内烘烤。直到防脱载玻片的水分烤干以及石蜡烤化后取出贴好标识后常温保存备用。

4.3.2 进行组织化学染色

1. 烘片：取出已经制备好的石蜡切片，放入 60℃ 的烘烤箱中进行烘烤 2 小时。

2. 脱蜡：为了将蜡脱的足够干净，依次将已经烘烤好的切片放入二甲苯I10 分钟，二甲苯II10 分钟，二甲苯III10 分钟。

3. 水化：与脱水相反，将脱蜡完成的切片依次放入无水乙醇I5 分钟，无水乙醇II5 分钟，90%乙醇 5 分钟，85%乙醇 5 分钟，75%乙醇 5 分钟，然后使用蒸馏水浸泡 2 次，10min/每次，然后用蒸馏水冲洗一次。

4. 抗原修复：本次抗原修复使用柠檬酸钠缓冲液（柠檬酸三钠 3000mg+柠檬酸 400mg 将水加至 1L, PH6.0），将柠檬酸钠缓冲液置于高压锅内加热煮沸，然后将已经水化完成的切片放入修复盒中，随后将修复盒放到高压锅内（一定要确保修复盒被柠檬酸钠缓冲液完全浸没），将高压锅盖盖上煮 10 分钟。

5. 冷却：高压锅煮时间足够后，停火，待锅内气体全部排出后，然后打开锅盖，自然冷却至室温，在这个过程中也需要确保修复盒被柠檬酸钠缓冲液完全浸没。

6. 随后将组织切片置于 PBS 内完全浸泡, 然后置于脱色摇床上晃动 3 次, 每次持续 5 分钟。
7. 封闭内源性过氧化物酶: 在避光的条件下, 将切片置入 3%的 H₂O₂ 溶液中, 浸泡 25 分钟。
8. 随后继续将组织切片置于 PBS 内完全浸泡, 然后置于摇床上晃动 3 次, 每次持续 5 分钟。
9. 血清封闭非特异性位点: 将切片表面的水分甩干, 然后在切片上的组织覆盖范围内滴加 3%BSA 使其均匀覆盖组织, 在室温下进行封闭 30 分钟。
10. 滴加一抗: 用滤纸吸去或轻轻甩掉封闭液, 然后直接滴加使用 PBS 按照一定比例配置好的一抗, 将切片平放于湿盒内然后将湿盒放入 4℃冰箱过夜, 也可以在 37℃条件下放置 2 小时。
11. 随后将组织切片置于 PBS 内完全浸泡, 然后置于摇床上晃动 3 次, 每次持续 5 分钟。
12. 滴加二抗: 在切片上的组织覆盖范围内滴加二抗使其均匀覆盖组织, 在室温下进行孵育 60 分钟。
13. 随后将组织切片置于 PBS 内完全浸泡, 然后置于摇床上晃动 3 次, 每次持续 5 分钟。
14. DAB 显色: 将切片的多余水分去除, 使用 DAB 显色液覆盖组织, 在显微镜下观察显色程度, 阳性是棕黄色, 颜色合适时, 使用自来水冲洗终止染色。用自来水充分冲洗后进入下一步。
15. 复染细胞核: 使用苏木精染色 3 分钟后, 自来水冲洗干净, 在显微镜下进行确认颜色, 若是颜色不够可以再次重复使用苏木精染色。
16. 分化: 使用 1%的盐酸乙醇分化液分化 1-3 秒, 然后用自来水缓慢冲洗 20 分钟。
17. 脱水封片: 依旧使用浓度差来进行, 将切片依次放入 75%乙醇 5 分钟、85%乙醇 5 分钟, 90%乙醇 5 分钟, 95%乙醇 5 分钟, 无水酒精I 5 分钟, 无水酒精II 5 分钟, 正丁醇 5 分钟, 二甲苯I 5 分钟, 二甲苯II 5 分钟, 脱水。
18. 将切片从二甲苯中拿出来自然晾干后, 滴加适量的中性树胶封片, 小心盖上盖玻片 (防止气泡产生), 然后自然晾干。
19. 最后使用显微镜, 进行镜检、拍照。

4.4 实验结果

我们检测了病理类型为鳞癌、腺癌的 MPR 和 NMPR 的肿瘤组织以及癌旁组织中的

焦亡细胞，结果如图 4-1、4-2。

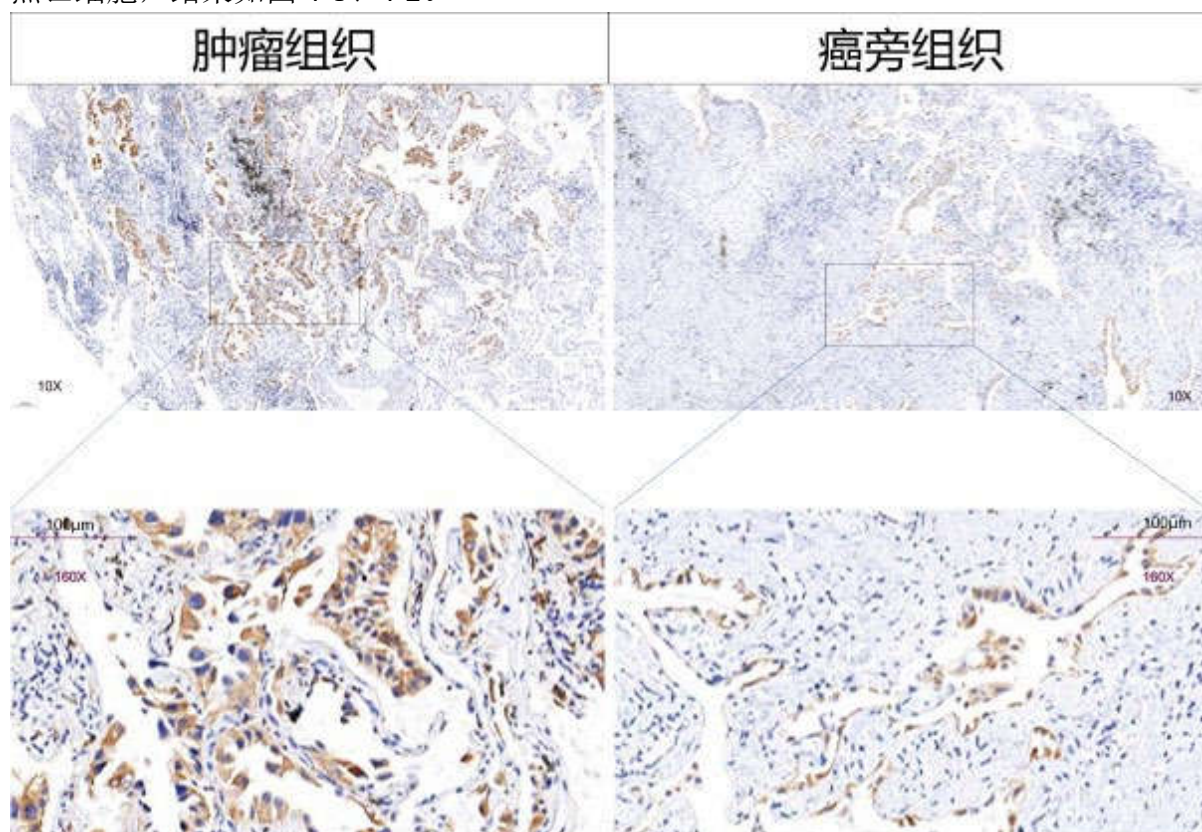


图 4-1 肿瘤组织和癌旁组织中的焦亡细胞。

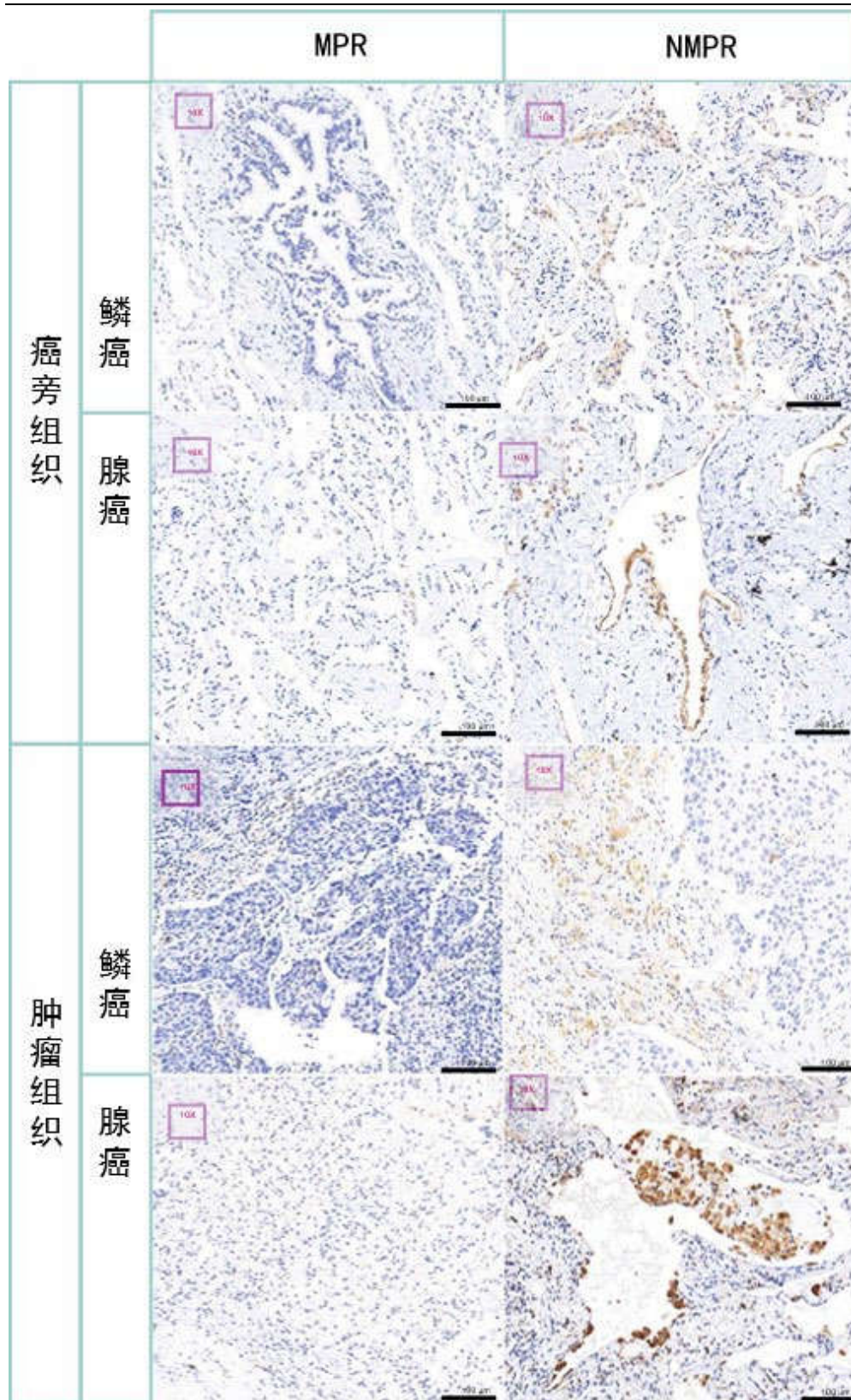


图 4-2 MPR、NMPR 两组的鳞癌以及腺癌的肿瘤组织和癌旁组织的免疫组化。

4.5 讨论

通过试验结果可以发现,在肿瘤组织以及正常的癌旁组织中都可以发现有细胞焦亡的迹象,这验证了关于新辅助 PD-1 免疫治疗后的肿瘤细胞会发生焦亡的猜想。但是,在实际的观测当中发现 MPR 组的肿瘤组织可以观测到的焦亡细胞相较于 NMPR 组来说少了很多。根据分组要求,MPR 组的肿瘤细胞残余肿瘤细胞不大于 10%,因此在 MPR 组的肿瘤组织中蕴含的肿瘤细胞也就更少。

根据研究表明^[33,46],焦亡的下游信号 gasdermin 裂解成为 N 端和 C 端,N 端作用于细胞膜导致细胞膜穿孔,进而导致细胞死亡。所以,在 MPR 组由于肿瘤细胞减少所以对于 GSDMD 的检测所取得效果弱于 NMPR 组也就可以解释了,即在接受新辅助 PD-1 免疫治疗的患者的肿瘤标本中由于免疫治疗的刺激导致肿瘤焦亡,反过来焦亡的肿瘤增强了免疫抑制剂的抗肿瘤反应,让患者取得了较好的疗效。但是,免疫治疗具体诱导肿瘤细胞焦亡的机制需要进一步的研究。现有研究^[48],CTLs 分泌颗粒酶通过细胞膜的穿孔素进入肿瘤细胞导致 GSDMB 裂解诱导肿瘤细胞焦亡,增强 PD-1 抑制剂的抗肿瘤反应,对于研究免疫治疗导致肿瘤细胞焦亡的具体机制这是一个比较好的方向。

除了在肿瘤组织的切片中观察到了焦亡细胞,在正常的癌旁组织中也观察到了有细胞的焦亡,但是主要是淋巴免疫细胞的焦亡。两组之间的焦亡细胞比例也存在差异,在 NMPR 的切片中可以观察到更多的焦亡细胞,这可能是由于 PD-1 抑制剂的广泛作用机制导致正常免疫细胞免疫耐受被破坏受到了其他免疫细胞的攻击导致了焦亡。这可能是 NMPR 组对于免疫治疗耐受的原因,即 PD-1 抑制剂破坏了正常细胞与肿瘤细胞的免疫耐受^[79],导致两者同时激活了患者自身免疫受到了免疫细胞的攻击。对于肿瘤细胞的攻击会导致抗肿瘤反应,同时在免疫组织化学的切片中观察到了焦亡细胞,说明免疫细胞对肿瘤细胞的攻击会导致焦亡;对于正常免疫细胞的攻击会导致免疫细胞死亡,在癌旁组织的免疫组织化学切片中观察到了细胞焦亡这可以作为佐证,但是正常免疫细胞的焦亡会导致患者自身的免疫系统减弱表现为对于免疫治疗的免疫耐受。以上猜想需要进一步的研究和试验来进行探索,其中具体的机制更需要借助新的技术手段来发现。

4.6 结论

接受新辅助 PD-1 免疫治疗的患者的肿瘤细胞会发生焦亡。通过免疫组织化学检测可以在接受 PD-1 抑制剂的部分患者的肿瘤组织中发现焦亡相关蛋白的表达上调。

第5章 总结、展望、反思

肿瘤不管是对于个人还是国家来说都是一个极其重的负担，每年因为肿瘤逝去的人不计其数。在所有的肿瘤中，对人们威胁最大的就是肺癌，身患肺癌的患者在早期不会有很多的临床症状，其中最为常见的就是咳嗽，但是肺癌引起的咳嗽与感冒、肺炎以及哮喘等肺部疾病引起的咳嗽，对于常人来讲并没有什么区别，只能通过其他的病史、检查来将其鉴别。但是肺癌一旦发展成为晚期肿瘤患者就会面临各种各样的痛苦。

临床上肺癌晚期患者常见的就诊的原因是咯血^[80]。因为咯血而来的患者大多都是肿瘤已经发展到了一定的程度了，这时的患者直接手术治疗已经不是最好的处理了，接受新辅助 PD-1 免疫治疗对于患者来说可以有更好的预后。

手术是治疗早期肺癌最有效的方法，也是治疗肺癌最常用的手段。对于所有的肺癌都应争取根治性切除（R0），以减少复发和转移。为了提高肺癌患者的生存质量，对于肺癌治疗的研究一直都在进行，靶向治疗在驱动基因阳性的患者群所表现的出来的鼓舞人心的疗效也在激励着人们不断研究抗肿瘤治疗，但是对于驱动基因阴性的患者就不能用靶向来进行治疗，免疫负调控的发现为抗肿瘤治疗带来了新的曙光。

免疫负调控发现了人体自身细胞为了避免被免疫细胞“误伤”，进化出了 PD-1/PD-L1 通路来调节 T 细胞的激活程度，在遇到自身细胞时就可以降低 T 细胞激活程度来维持免疫耐受。不仅人体正常细胞可以通过 PD-1/PD-L1 通路来躲避 T 细胞的清除，研究发现肿瘤细胞也可以通过这种方式来躲避 T 细胞的监察^[53]。PD-1 免疫治疗可以阻断这一通路，然后重新激活自身免疫进行抗免疫治疗。想要增加免疫治疗的抗肿瘤反应，根据目前的研究热点细胞焦亡是一个值得研究的方向。焦亡可以在肿瘤细胞内依据其炎性程序性死亡的特性，只需要一小部分的肿瘤细胞发生焦亡就可以依靠炎症物质的释放，构建瀑布式反应导致肿瘤细胞大面积快速死亡。焦亡的另外一个定义：gasdermin 介导的细胞程序性死亡。诱导细胞焦亡也就是诱导 gasdermin 裂解，这为诱导肿瘤细胞提供了方案，只要可以完成这个诱导就可以依靠焦亡，来增强抗肿瘤反应。

在本研究中分析了新辅助 PD-1 免疫治疗周期数与疗效的关系，因为患者每个人的病情都不一样，即使同一分期的病人病情也有不小的差异，但是现阶段的新辅助 PD-1 免疫治疗尚没有根据病人病情的来进行差异化治疗，所以想要研究一下治疗周期数与疗效是否有关系。为以后新辅助 PD-1 免疫治疗标准治疗流程提供参考。

5.1 总结

在研究中发现对于2个周期组的患者和大于2个周期组的患者在MPR以及PCR这两个方面并没有差异，但是由于这是一个回顾性研究，也就是说明两个组的患者不是随机分配的，而是根据用药后的影像学评估结果客观形成的。根据分析可以发现2个周期组的患者相较于大于2个周期组的患者在初诊时的肿瘤更小，通过分析两组的肿瘤影像学缓解可以明显看到接受大于2个周期治疗的患者影像学缓解较好。进一步，通过比较两个组的患者在治疗前的手术评估可以发现接受2个周期治疗的患者在治疗前手术评估情况也较好（可完整切除的患者占同组所有患者的比例较高）。说明对于病情较轻（2个周期组）的患者，所需要的治疗周期数也会较少，这个结果与临床实践和常识相符。

针对影像学缓解指标（PR）、病理学缓解指标（MPR）、手术评估情况的多因素分析发现，大于2个周期治疗组相较于2个周期治疗组更容易发生PR；发生MPR的患者是PR的概率是NMPR的5倍多，同样患者每增加一个百分点的影像学缓解率成为MPR的概率会增加64倍；在手术评估情况的多因素分析中发现肿瘤每增加1厘米可以增加概率致使治疗前的手术评估为不能完整切除。

针对大于2周期治疗的患者以第2周期完成后的影像学评估数据为切割，做了一个前后对照分析发现，增加治疗周期数后，患者的影像学缓解明显改善。由于本研究的患者都是经过手术的患者，说明在接受治疗大于2个周期的患者，原本在第二个周期后被评估不能进行手术，在经过之后的治疗也顺利接受了R0切除，说明增加治疗周期数可以增加疗效。

综合以上结果可以得出，病情越重的患者可能需要的治疗周期数越多，增加治疗周期数可以将原本不能手术的患者转变为可以手术。

为了探索新辅助PD-1免疫治疗后的肿瘤细胞中的细胞焦亡情况，我们利用单细胞测序分析了免疫治疗前后以及MPR组与NMPR组肿瘤组织里的焦亡相关信号的情况。在免疫治疗后的肿瘤细胞中观察到了焦亡相关信号的上调，尤其是在MPR组的肿瘤细胞可以发现焦亡相关信号强度较NMPR组更加明显。这在一定程度上验证了之前的猜想。

除了单细胞测序探索外，还进行了免疫组织化学，用来检测免疫治疗后的肿瘤细胞中gasdermin D的表达情况，在免疫组织化学的切片中我们也发现了发生焦亡的细胞，不仅有肿瘤细胞还有免疫淋巴细胞。在MPR组和NMPR组可观测发生焦亡的细胞比例差异明显，在MPR组肿瘤组织很少可以观测到肿瘤细胞发生焦亡，我们猜想这是由于肿瘤细胞残存过少，即肿瘤细胞焦亡加强了抗肿瘤反应。同时，在癌旁组织中观测到的焦亡细胞远少于肿瘤组织，在NMPR组的癌旁组织中焦亡细胞相较于MPR组肿瘤组织要略多，是不是因为淋巴细胞焦亡促进了肿瘤的免疫耐药。这需要更加先进的荧光免疫、共聚焦显微镜以及更加完善的实验设计来进行探究。

5.2 展望

新辅助 PD-1 免疫治疗是对于驱动基因阴性的非小细胞肺癌患者的具有里程碑意义的治疗方式。但是正如“人无完人，金无足赤”一般，没有十全十美的治疗方式。

免疫治疗虽然避免了肿瘤细胞在 T 细胞眼下进行逃避，但是也会导致正常细胞的免疫耐受被破坏。所以免疫治疗有可能会自身免疫性疾病，例如：免疫性肺炎、免疫性肝炎以及最为凶险的免疫性心肌炎；在研究中还发现免疫治疗可能导致淋巴细胞焦亡，这也可能是发生耐药的原因。除此之外，有关于免疫治疗也还有不少的可以完善的地方，对于不同病情的病人的进行精准、规范化的治疗流程还未建立；在有限的治疗周期数内提高抗肿瘤反应，现阶段对于这一方向的研究也在蓬勃发展，可以预见的是随着对于肺癌、免疫治疗、焦亡等领域的研究深入，日后对于非小细胞肺癌的患者的治疗将会越来越有效，肺癌患者将会趋于早期化，治疗将会趋于根治性。新辅助 PD-1 免疫治疗的目标是为患者带来更好的远期预后，使更多不能直接手术的患者可以经过治疗后接受更好的手术的治疗。

5.3 反思

本研究存在的不足之处有以下几个方面：在临床实验方面，进行的是一个回顾性的研究，分组是根据病人临床诊疗过程中的疗效而形成的，相较于前瞻性实验来说存在很大的偏倚。在基础方面，本研究只是通过两种手段进行了新辅助 PD-1 免疫治疗后的肿瘤组织中存在焦亡细胞的探索，对于免疫治疗怎么导致的焦亡具体的机制涉及不够深入，怎么定向诱导肿瘤细胞焦亡的机制没有涉及。但是硕士研究生的时间太短、大环境的影响这些客观原因的存在也对研究产生了不能忽略的影响。这些不足也是以后研究的方向。

文献综述

PD-1/L1 免疫治疗在非小细胞肺癌中的治疗进展

摘要: 肺癌的死亡率高居世界所有肿瘤榜首, 发病率仅次于乳腺癌, 在我国每年新增的肿瘤患者其中新增人数最多也是肺癌。非小细胞肺癌是肺癌中占比最大的一种类型, 常规对于非小细胞肺癌的治疗有手术切除、化疗和放射治疗, 随着对于肿瘤机制的研究深入新的治疗方式逐渐进入了临床实践当中。比如, 针对特定基因突变的靶向治疗、生物药物溶瘤病毒、利用物理粒子的质子治疗以及利用人体自生免疫的免疫治疗。免疫治疗的出现填补了没有基因驱动突变患者的治疗空白, 因此免疫治疗在非小细胞肺癌领域的得到了迅速的发展, 本文就新辅助 PD-1 程序性细胞死亡配体-1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 和程序性细胞死亡受体-1 (programmed cell death-1, PD-1) 新辅助免疫治疗在非小细胞肺癌中的进展进行综述。

关键词: 新辅助治疗; PD-1/L1 免疫治疗; 非小细胞肺癌

Therapeutic advances in PD-1/L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer

Abstract: Lung cancer has the highest mortality rate among all tumors in the world and is second only to breast cancer in terms of incidence. The conventional treatments for non-small cell lung cancer include surgical resection, chemotherapy and radiation therapy, but new treatment modalities are gradually entering clinical practice as research on tumor mechanisms progresses. For example, targeted therapies targeting specific genetic mutations, biologic lysing viruses, proton therapy using physical particles, and immunotherapy using the body's autoimmunity. The emergence of immunotherapy has filled the therapeutic gap for patients without gene drive mutations, and therefore immunotherapy is rapidly developing in the field of non-small cell lung cancer. This article reviews the progress of neoadjuvant immunotherapy with programmed cell death ligand-1 (PD-L1) and programmed cell death receptor-1 (PD-1) in non-small cell lung cancer.

Keywords: neoadjuvant therapy; PD-1/L1 immunotherapy; non-small cell lung cancer

6.1 背景

原发性支气管肺癌是最常见的恶性肿瘤之一，根据 2020 年最新数据显示肺癌死亡率（18.0%）居恶性肿瘤第一位，而发病率（11.4%）也仅次于女性乳腺癌^[1]。2020 年我国的数据显示肺癌的发病率（17.9%）及死亡率（23.8%）均排在所有恶性肿瘤的榜首，虽然相较于 2015 年发病率（19.6%）及死亡率（26.0%）有一定程度的下降，但是其中男性发病率和死亡率仍居第一位，在女性群体中发病率仅次于乳腺癌居于第二位，但是死亡率仍居第一位^[2, 13]。肺癌已成为癌症死亡的主要原因。

近 10 年余以来，针对肺癌驱动基因的研究以及靶向治疗药的开发，靶向治疗取得了较好的临床实践。EGFR 和 ALK 突变的靶向治疗已经成为晚期肺癌的一线治疗^[28]。对于 III 期的非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer，NSCLC），也有越来越多的证据表明辅助/新辅助靶向治疗的效果优于辅助/新辅助化疗^[81-83]。2 项临床试验的结果表明，在 EGFR 突变的 II-III A 期 NSCLC 患者中，吉非替尼辅助治疗的中位无病生存期显著高于化疗组，且毒副作用更低^[81, 82]。CTONG1103 试验的结果显示新辅助厄洛替尼治疗的中位无进展生存期显著高于化疗^[83]。这些研究结果表明，对于存在基因突变的患者，靶向治疗的辅助或新辅助治疗模式将提高 III 期患者的生存期。然而，对于无驱动基因突变的患者，系统治疗的手段仍然依赖于传统化疗，急需新的药物以及治疗模式的转变。新辅助 PD-1 免疫治疗表现出来的效果有成为填补这一治疗空白的潜力。本综述主要来梳理一下现阶段主要的新辅助 PD-1 临床试验的现状。

6.2 PD-1/L1 免疫治疗的发展

5 年前，美国的詹姆斯·艾利森和日本的赵乔庶佑由于他们发现了“免疫检查点疗法”2018 年斯德哥尔摩卡罗林斯卡学院宣布，授予他们诺贝尔生理学或医学奖用以表彰，免疫检查点疗法是一种可以抑制免疫调节的癌症治疗方法。现在免疫疗法已经成为抗癌治疗史的一个新的里程碑，免疫治疗是 NSCLC 患者新的希望。

人体里有很多免疫细胞，巨噬细胞、NK 细胞、DC 细胞等固有免疫细胞还有 B 细胞、T 细胞这些获得性免疫细胞。固有免疫细胞主要的作用是针对外来的细菌、病毒等抗原进行免疫作用；获得性免疫细胞则是会对人体自身的细胞进行监视、清除活动。肿瘤细胞是大多属于人体自身细胞的变异，主要依赖于 T 细胞来进行免疫活动。事实上也是，人体每时每刻都有细胞在发生变异，大多数的变异细胞都会被 T 细胞以及其他免疫细胞准时清除，但是有一小部分变异细胞会出现免疫逃避，从而躲过免疫细胞的清除。这是因为在平时 T 细胞主要处于免疫监视状态，T 细胞只有活化的时候才能发挥作用。T 细胞的活化依靠 TCR 与抗原肽-MHC 复合物结合和抗原提呈细胞的共刺激分子与 T

细胞表面相应的受体或配体相互作用这两个正调节系统的调控,第一个通路是 T 细胞的眼睛来对抗原进行识别;第二个通路主要是配合第一个通路产生协同。此外, T 细胞还拥有负性调节系统,例如 CTLA4-B7 通路和 PD-1/PD-L1 通路,这些通路可以避免 T 细胞被过度刺激^[84],是免疫耐受的主要组成通路。

为了维持免疫耐受,避免正常细胞激活 T 细胞后受到 T 细胞的错误攻击,人体发展出了一种对免疫系统拥有抑制性的信号通路,随着对这些信号通路的研究不断深入,在可以产生免疫逃避的肿瘤组织中也发现了 PD-1/L1 抑制通路的表达,这已经被证实是肿瘤细胞可以发生免疫逃避进而发展成为恶性疾病的主要原因。根据肿瘤这一逃避机体免疫系统清除的特点提出了针对抑制免疫系统通路的“免疫检查点疗法”。

因此得益于对于免疫负调节的研究,科学家于是想到利用 CTLA-4、PD-1 和 PD-L1 作为靶点来制作针对这些靶点的抑制剂,来重新激活人体免疫细胞对于肿瘤细胞的免疫应答。现如今针对免疫检查点做出的药物如过江之鲫,比如, K 药(派木单抗, pembrolizumab, 帕博利珠单抗)、O 药(纳武单抗, nivolumab)针对这些药物的临床试验也在如火如荼地开展。

6.3 关于 PD-1/L1 免疫药物应用于非小细胞肺癌的新辅助临床试验

如今已经 PD-1/L1 免疫药物 O 药已经作为二线治疗晚期非小细胞肺癌,这得益于一系列的国际、多中心、开放、随机三期试验,其中重要的临床试验有 CheckMate 017、CheckMate 057、CheckMate 078、KEYNOTE 010 还有 OAK 等等,其中 CheckMate 017 的结果显示总体生存时间(Overall Survival, OS)9.2 个月,客观缓解率(Objective Response Rate, ORR)20%,无进展生存时间(PFS)3.5 个月,治疗相关不良反应(Treatment-related adverse events, TRAEs)发生率 7%,全都优于多西他赛组^[85];相似的结果在 KEYNOTE 010 中也取得了^[86]。然后得益于 KEYNOTE 024 等的临床试验结果,帕博利珠单抗在 2016 年被 FDA 批准用于非小细胞肺癌转移的一线治疗单一药物^[87]。

正是由于免疫治疗药物的接连获批,它的有效性以及安全性得到了众多国际多中心随机临床试验的背书,所以将它应用于病人术前的新辅助 PD-1 临床试验也陆续开展了。接下来我就来将主要的新辅助 PD-1 临床试验结果进行一个叙述。在本综述中所有的手术均指 R0 切除,以及排除不在试验里的手术(试验之后继续其他全身治疗后在进行手术的情况)。

临床试验(NCT02259621)是一个 II 期临床试验主要招募了 21 例 IB-III A 期的 NSCLC 的患者,主要是为了评估纳武利尤用于新辅助 PD-1 的安全性和可行性,初步结果揭示手术率 95%,MPR 率 45%,pCR 率 15%,三到五级 TRAEs 发生率 4.5%,它出色的安全性为纳武利尤用于新辅助提供了保障^[22],在经过了中位 63 个月的随访后,五年无复

发生生存率 60%，五年生存率 80%，尤其是达到 pCR 的患者在 5 年后均无病生存，同时在对患者的分析发现，I/II 期 NSCLC 患者的五年无复发生存率在数值上优于 IIIA 期患者 [88]。

临床试验 (NCT02938624) 是一个 I 期需要招募 28 例 I-II 的 NSCL 患者，试验对于不同组的患者给予了不同剂量的帕博利珠单抗，试验目的是评估将帕博利珠单抗用于新辅助的安全性和有效性以及剂量安全，在 2019 年的 ASCO 大会时，该试验一共有 10 名患者揭示初步的试验结果：手术率 100%，MPR 率 40%，没有发生剂量相关的不良事件 [89]。由于该试验的总体结果没有发表，具体数据无从获知。

LCMC3 是一个将 PD-L1 抑制剂阿替利珠单抗 (Atezolizumab) 用于新辅助的二期临床试验，将 MPR 率作为初步结局，在 2021 年的第 21 届世界肺癌大会 (WCLC) 上，该研究的研究者公布了一些数据：一共纳入 181 名患者，其中 159 名接受了手术，手术率 87.8%，MPR 率 20.4%，6.8% pCR，三到五级 TRAEs 发生率 6%。根据数据分析 MPR 与 PD-L1 表达正相关，与 EGFR/ALK 突变负相关 [90]。这是一个新的尝试将基因驱动阳性的患者来给予免疫治疗，并分析它们的关系，试图找到新的生物标志物来预测病人的预后。

NEOSTAR 是一个招募 I-III A、单站 N2 淋巴结侵犯的非小细胞肺癌患者的 II 期临床试验，主要终点是 MPR，试验是为了比较单药 (纳武利尤单抗) 和双药 (纳武利尤单抗 + 伊匹单抗 (Ipilimumab)) 的疗效。一共入组了 44 名患者，其中有 37 名患者在试验期间进行了手术，手术率 84%，双药组 MPR 率 50%，pCR 率 38%，三到五级 TRAEs 发生率 10%；单药组 MPR 率 24% pCR 率 10%，13%。根据数据可以分析出双药的疗效和安全性都是优于单药 [91]，这为新辅助提供了新的方案。

Ib 临床试验 (ChiCTR-OIC-17013726) 招募了 40 例 IA-III A 患者来对新的免疫药物信迪利单抗 (Sintilimab) 的安全性进行试验。该试验的手术率是 93%，MPR 率 41%，三到五级 TRAEs 发生率 10%，该试验还发现治疗后的正电子发射计算机断层显像 (PET-CT) 的标准摄取值降低与疗效具有相关性 [11]，该实验不仅说明了信迪利单抗的安全性和疗效也提供了一个新的预测疗效的标志。

NADIM 是一个用来试验纳武利尤单抗联合化疗用于 III A (有 N2 组淋巴结侵犯或者肿瘤达到 T4) 患者新辅助的安全性和可行性的 II 期临床试验。该实验一共入组 46 名患者，手术率是 89%，MPR 率 83%，pCR 率 59%，三到五级 TRAEs 发生率 30%，该试验的结果是鼓舞人心的 [31]。在这个试验中新辅助显示出的对于晚期患者的疗效，对于一些不能进行 R0 手术的患者来说是一次革命，对于临床实践来说也是意义非凡，尤其是对于外科来说，一些手术难度太大的患者都可以先进行新辅助，获取手术机率或者降低手术风险的机会。

LungMate 002 是一个入组 II-III 期患者的临床试验。患者需要接受 2-4 个周期的特

瑞普利单抗加卡铂为基础的化疗，主要终点为安全性和主要病理反应（MPR）。结果显示三到五级 TRAEs 发生率为 6.0%，客观缓解率（ORR）为 76.0%，其中 16.0%（n=8）完全缓解（Complete remission, CR），60.0%（n=30）部分缓解（Partial remission, PR），20.0%（n=10）稳定性疾病（Stable disease, SD）和 4.0%（n=2）进行性疾病（Progressive disease, PD）。对所有 72%（n=36）接受手术的患者进行 R0 切除；55.6%（n=20）达到 MPR，其中 27.8%（n=10）pCR^[92]。

LungMate 001 同样是一个免疫联合化疗的临床试验，入组的患者需要接受新辅助治疗周期：信迪利单抗和卡铂，吉西它滨用于鳞状细胞癌，或培美曲塞用于腺癌和非小细胞肺癌。主要终点为不良事件和主要病理反应。一共纳入 50 例患者，其中 23 例（46%）在新辅助化学免疫治疗后获得部分缓解（PR）。三到五级 TRAEs 发生率为 8%。30 例（60%）患者接受了手术，有 13 例（43.3%）达到主要病理反应（MPR）^[12]。

临床试验（NCT02716038）也是一个使用阿替利珠单抗免疫联合化疗的 II 期临床试验，主要入组 30 名 IB–IIIA 期的患者，MPR 作为主要终点。试验结果手术率是 87%，MPR 率是 57%，pCR 率是 33%，三到五级 TRAEs 发生率 6%^[32]。免疫治疗联合化疗逐渐成为临床试验的主流，事实也证明这种免疫联合化疗的方案可以取得更好的疗效。

PRINCEPS 是一个 II 期应用阿替利珠单抗对 I–IIIA 期的 30 名患者进行新辅助，目的在于观察该药物的毒性以及安全性。结果显示手术率 97%，没有患者达到 MPR 或影像学的缓解，无三级以上治疗相关不良反应^[93]。该实验对于患者的筛选很有宽的标准，对于治疗后的手术间隔时间十分短（<15 天）留给药物效应的的时间太短可能是导致其没有 MPR 病人出现的原因，对于新辅助治疗后手术间隔时间也是一个关键的问题，该研究说明了手术间隔时间太短有可能会影响药物疗效。

临床试验（NCT03030131）是一个试验德瓦鲁单抗（Durvalumab）疗效的研究。一共入组 46 例手术患者，9 例行全肺切除术，31 例行肺叶切除术，3 例行双叶切除术，3 例行开胸探查术（胸膜癌 2 例，食管侵犯 1 例）。41 例患者进行了为 R0 切除（90%）。没有 3–5 级 durvalumab 相关的不良事件。由于术后 90 天死亡率过高而研究停止^[94]。

试验（NCT03694236）是一个 Ib 期主要目的是来探索新的可以用来预测疗效的生物标记物。共有 14 名患者入选，三到五级 TRAEs 发生率为 7%。11 名患者接受了手术 79%，pCR 率为 36.4%，MPR 率为 72.7%^[95]。

对于新辅助的临床试验的梳理，综述只写了重要的以及近期的，以往的试验已有前人进行了叙述，在此就不再赘述，关于这些试验有的成功有的失败甚至于中途停止试验。这说明免疫治疗在它卓越的疗效也潜藏着许多的风险，这些风险也是挑战与机遇，这是免疫治疗通向下一个阶段的必经之路。

6.4 新辅助 PD-1 免疫治疗在非小细胞肺癌应用的潜在风险与机遇

6.4.1 免疫治疗相关不良事件

在所有的临床试验中都逃不掉治疗相关不良事件这一个评价指标,在有关免疫治疗的临床试验出了上文提到的治疗相关不良事件这一个指标外,还需要关注的是免疫治疗相关不良事件(immune-related adverse events, irAE),因为免疫治疗阻断了免疫负调节通路,固然阻止了肿瘤细胞的免疫逃避,因为免疫负调节是避免自身免疫疾病的基础所以不可避免会导致免疫细胞攻击正常的细胞,所以就会导致免疫性肝炎、免疫性心肌炎以及免疫性肺炎等等自身免疫疾病,加上该类疾病在在临床实践中难以察觉,所以在免疫检查点抑制剂(Immune checkpoint inhibitors, ICI)应用于临床应该更加小心,对于 irAE 要形成一套从发现到处理以及治疗的流程,提高针对 irAE 的警觉,在临床实践里积累这方面的诊断以及管理经验。

有关于 irAE 的研究,该研究整合了七个学术中心包含超过 16000000 件药物相关不良反应,汇聚包含针对 PD-1 的纳武利尤单抗和帕博利珠单抗、CTLA-4 的伊匹木单抗、PD-L1 的阿替利珠单抗、阿维鲁单抗和德瓦鲁单抗等市面上主流的免疫药物,目的是为了确定致死性 ICI 相关毒性作用谱、时间和临床特征^[96]。经过分析发现,对于不同的免疫检查点致死性 ICI 相关死亡谱不尽相同:抗 CTLA-4 死亡中,大多数通常死于结肠炎,而与抗 PD-1/ L1 相关的死亡通常死于肺炎、肝炎和神经毒性作用。PD-1/CTLA-4 联合死亡常死于结肠炎和心肌炎。对于联合治疗、抗 PD-1 和伊匹单抗单药治疗,致死性毒性作用通常在治疗开始后早期发生。心肌炎的病死率最高,而内分泌事件和结肠炎的病死率仅为 2%–5%。根据一项纳入了 3545 名接受了免疫检查点疗法的患者进行的回顾性研究的结果显示免疫相关不良事件的病死率为 0.6%; 另一项 meta 分析纳入了 112 项试验的 19217 例患者结果表明不同的免疫检查点药物的药物毒性相关的病死率差异较大,最高的是针对 CTLA-4 的 1.08%, 针对 PD-1 和 PD-L1 的药物病死率相近分别为 0.36% 和 0.38%, 针对双检查点的会比单药更高可以达到 1.23%。

通过该研究可以发现虽然 irAE 的发病率很低,但是起病急、病程短、死亡率高特征在提醒研究者要时刻警惕,这是免疫治疗甚至于药物临床试验的风险,如何可以在获取最大的疗效的同时减少不良事件的发生,是亟待解决也是必须解决的问题。

6.4.2 免疫治疗的获益人群筛选

免疫治疗已经成为越来越多基因驱动阴性的患者的主流选择,但是对于具有免疫治疗获益的人群的特征,依旧不是很清楚。根据免疫治疗的原理,阻断 PD-1/L1 通路防止肿瘤细胞逃逸重新激活人体自身免疫,有许多临床试验将 PD-L1 的表达量作为一个筛选指标来看是否会有疗效差异^[12, 92]。但是有的研究表明 PD-L1 的表达量高的会有更好

的疗效,还有的研究也得出 PD-L1 的表达量低的也可以有获益。这种结果说明对于预测免疫治疗疗效的标志物依旧还需要探索。对于肿瘤细胞进行单细胞测序然后进行分析,进而寻找标志物的研究也越来越多。这可以用来探索肿瘤中具有时间和空间异质性的生物标志物。

但是并不是所有的生物标记物都可以在临床实践中应用,比如 PD-L1 表达水平几乎仅能通过侵入性操作来获得;肿瘤突变负荷(tumor mutation burden, TMB)可以通过抽血进行高通量测序来获得,但是这样的经济成本过高很难在临床上普及。但是这种标记物对于患者的疾病诊断、预后监测,临床的诊疗活动来说又是必不可少的。所以一种易行、敏感、有效的标志物是一个挑战也是一个改变临床实践的机遇。

6.4.3 临床试验终点的选择

现阶段大多数的验证疗效的临床试验都是将 MPR 作为主要终点,但是与病人密切相关的是五年的生存率、无进展生存时间这是可以反应病人生活质量的指标。但是这些指标需要以年为单位的长期随访,在实际情况下难以实现,因此需要找到一个可以代替五年的生存率、无进展生存时间这些可以真实反应病人生活质量的指标,主要病理缓解率(MPR)、完全病理缓解(pCR)、客观缓解率和影像学缓解率等指标进入了人们的视野。完全病理缓解与五年的生存率具有一致性^[97],可以用来反应病人生活质量,在临床实践中易于操作是非常理想的主要终点指标,但是在病人中很少有人达到 pCR,对于剩下的病人也需要找到一个可以用来预测预后的指标。

为了找到这一指标 Pataer 等人开展了一项研究 OS 与 MPR 的研究,研究结果显示 MPR 与 OS 显著相关^[98],又因为 MPR 与 pCR 相比病人更容易达到,对于病人群体的预测更加全面,因此在临床试验上将 MPR 作为主要终点的研究越来越多。

在以往新辅助都是化疗这些替代指标可以适用,现在在新辅助免疫开展的背景下,对于运用 MPR 是否适用还是存在争议,因为免疫治疗药物与传统化疗药物的作用机制有很大的差异。

6.5 总结

新辅助 PD-1 免疫治疗在临床实践中的运用,为患者尤其是晚期患者带来了福音。但是也仍然面对着许多的风险与困难,这些挑战需要的是更多的临床试验来进行探索与研究。现阶段的新辅助的研究仍然是属于小样本的研究,需要更多的国际、多中心、随机、开放的大样本试验,进行人群的研究以及长期的随访生存数据分析,才能真正将新辅助 PD-1 免疫治疗推向一个新的台阶

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1): 7-33.
- [4] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2021 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021, 19(3): 254-266.
- [5] MITSUDOMI T, MORITA S, YATABE Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(2): 121-128.
- [6] SCAGLIOTTI G, HANNA N, FOSSELLA F, et al. The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies [J]. *Oncologist*, 2009, 14(3): 253-263.
- [7] MOK T S, WU Y L, THONGPRASERT S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(10): 947-957.
- [8] DALY M E, SINGH N, ISMAILA N, et al. Management of Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: ASCO Guideline [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40(12): 1356-1384.
- [9] FORDE P M, SPICER J, LU S, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(21): 1973-1985.
- [10] LIANG W, CAI K, CHEN C, et al. Expert consensus on neoadjuvant immunotherapy for non-small cell lung cancer [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2020, 9(6): 2696-2715.
- [11] GAO S, LI N, GAO S, et al. Neoadjuvant PD-1 inhibitor (Sintilimab) in NSCLC [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(5): 816-826.
- [12] ZHANG P, DAI J, SUN F, et al. Neoadjuvant Sintilimab and Chemotherapy for Resectable Stage IIIA Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Ann Thorac Surg*, 2022, 114(3): 949-958.
- [13] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[14] RINI B I, POWLES T, ATKINS M B, et al. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 393(10189): 2404-2415.

[15] HOWINGTON J A, BLUM M G, CHANG A C, et al. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines [J]. *Chest*, 2013, 143(5 Suppl): e278S-e313S.

[16] RUSCH V W. Stage III Non-small Cell Lung Cancer [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016, 37(5): 727-735.

[17] PIGNON J P, TRIBODET H, SCAGLIOTTI G V, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(21): 3552-3559.

[18] GROUP N M-A C. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data [J]. *Lancet*, 2014, 383(9928): 1561-1571.

[19] FELIP E, ALTORKI N, ZHOU C, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2021, 398(10308): 1344-1357.

[20] CRISS S D, MOORADIAN M J, SHEEHAN D F, et al. Cost-effectiveness and Budgetary Consequence Analysis of Durvalumab Consolidation Therapy vs No Consolidation Therapy After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small Cell Lung Cancer in the Context of the US Health Care System [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(3): 358-365.

[21] WANG L, DONG X, REN Y, et al. Targeting EHMT2 reverses EGFR-TKI resistance in NSCLC by epigenetically regulating the PTEN/AKT signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 129.

[22] FORDE P M, CHAFT J E, SMITH K N, et al. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(21): 1976-1986.

[23] RECK M, RODRIGUEZ-ABREU D, ROBINSON A G, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(19): 1823-1833.

[24] RECK M, RODRIGUEZ-ABREU D, ROBINSON A G, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(7): 537-546.

[25] MOK T S K, WU Y L, KUDABA I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2019,

393(10183): 1819-1830.

[26] PAZ-ARES L, VICENTE D, TAFRESHI A, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Patients With Metastatic Squamous NSCLC: Protocol-Specified Final Analysis of KEYNOTE-407 [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(10): 1657-1669.

[27] GANDHI L, RODRIGUEZ-ABREU D, GADGEEL S, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2078-2092.

[28] ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022, 20(5): 497-530.

[29] LEE J, CHAFT J, NICHOLAS A, et al. PS01.05 Surgical and Clinical Outcomes With Neoadjuvant Atezolizumab in Resectable Stage IB–IIIB NSCLC: LCMC3 Trial Primary Analysis [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2021, 16(3): S59-S61.

[30] LI N, YING J, TAO X, et al. P1.18-06 Efficacy and Safety of Neoadjuvant PD-1 Blockade with Sintilimab in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2019.

[31] PROVENCIO M, NADAL E, INSA A, et al. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(11): 1413-1422.

[32] SHU C A, GAINOR J F, AWAD M M, et al. Neoadjuvant atezolizumab and chemotherapy in patients with resectable non-small-cell lung cancer: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(6): 786-795.

[33] FANG Y, TIAN S, PAN Y, et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109595.

[34] CHEN Y, SMITH M R, THIRUMALAI K, et al. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE [J]. *EMBO J*, 1996, 15(15): 3853-3860.

[35] COOKSON B T, BRENNAN M A. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3): 113-114.

[36] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS J M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1): 107-120.

[37] HERSH D, MONACK D M, SMITH M R, et al. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(5): 2396-2401.

[38] BERGSBAKEN T, FINK S L, COOKSON B T. Pyroptosis: host cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(2): 99-109.

- [39] SUN G W, LU J, PERVAIZ S, et al. Caspase-1 dependent macrophage death induced by *Burkholderia pseudomallei* [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(10): 1447-1458.
- [40] BERGSBAKEN T, COOKSON B T. Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(11): e161.
- [41] MARIATHASAN S, WEISS D S, DIXIT V M, et al. Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(8): 1043-1049.
- [42] HETT E C, SLATER L H, MARK K G, et al. Chemical genetics reveals a kinase-independent role for protein kinase R in pyroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2013, 9(6): 398-405.
- [43] MASTERS S L, GERLIC M, METCALF D, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells [J]. *Immunity*, 2012, 37(6): 1009-1023.
- [44] SHI J, ZHAO Y, WANG Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [J]. *Nature*, 2014, 514(7521): 187-192.
- [45] SHI J, ZHAO Y, WANG K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 660-665.
- [46] SHI J, GAO W, SHAO F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245-254.
- [47] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.
- [48] ZHOU Z, HE H, WANG K, et al. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells [J]. *Science*, 2020, 368(6494).
- [49] HOU J, ZHAO R, XIA W, et al. PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(10): 1264-1275.
- [50] KIM R, EMI M, TANABE K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape [J]. *Immunology*, 2007, 121(1): 1-14.
- [51] BRAHMER J R, TYKODI S S, CHOW L Q, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2455-2465.
- [52] CHEN M, LI C, SUN M, et al. Recent developments in PD-1/PD-L1 blockade research for gastroesophageal malignancies [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1043517.
- [53] PARDOLL D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.
- [54] NISHIMURA H, HONJO T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(5): 265-268.
- [55] CARTER L, FOUSER L A, JUSSIF J, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects

both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2 [J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(3): 634-643.

[56] LANGER C J, GADGEEL S M, BORGHAEI H, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(11): 1497-1508.

[57] RITTMAYER A, BARLESI F, WATERKAMP D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 255-265.

[58] KONISHI J, YAMAZAKI K, AZUMA M, et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5094-5100.

[59] DONG H, CHEN L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2003, 81(5): 281-287.

[60] JOSEPH R W, SULLIVAN R J, HARRELL R, et al. Correlation of NRAS mutations with clinical response to high-dose IL-2 in patients with advanced melanoma [J]. *J Immunother*, 2012, 35(1): 66-72.

[61] AZUMA T, YAO S, ZHU G, et al. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells [J]. *Blood*, 2008, 111(7): 3635-3643.

[62] KAYAGAKI N, STOWE I B, LEE B L, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling [J]. *Nature*, 2015, 526(7575): 666-671.

[63] CASE C L, KOHLER L J, LIMA J B, et al. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(5): 1851-1856.

[64] ASHBAUGH D G, BIGELOW D B, PETTY T L, et al. Acute respiratory distress in adults [J]. *Lancet*, 1967, 2(7511): 319-323.

[65] KENNY E F, HERZIG A, KRUGER R, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways [J]. *Elife*, 2017, 6.

[66] Method of the year 2013 [J]. *Nat Methods*, 2014, 11(1): 1.

[67] The biology of genomes. Single-cell sequencing tackles basic and biomedical questions [J]. *Science*, 2012, 336(6084): 976-977.

[68] NAVIN N E. Delineating cancer evolution with single-cell sequencing [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(296): 296fs229.

[69] EICHHORN F, KLOTZ L V, BISCHOFF H, et al. Neoadjuvant anti-programmed Death-1 immunotherapy by Pembrolizumab in resectable nodal positive stage II/IIIa non-small-cell lung cancer (NSCLC): the NEOMUN trial [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 413.

[70] DELAMARRE L. The immunotherapy prize! [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(5): eaat7955.

[71] SEIWERT T Y, BURTNES B, MEHRA R, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(7): 956-965.

[72] TOPALIAN S L, HODI F S, BRAHMER J R, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(26): 2443-2454.

[73] SHEN X, ZHAO B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis [J]. *BMJ*, 2018, 362: k3529.

[74] MOTZER R J, TANNIR N M, MCDERMOTT D F, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(14): 1277-1290.

[75] HERBST R S, GIACCONE G, DE MARINIS F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(14): 1328-1339.

[76] XIAO Y, ZHANG T, MA X, et al. Microenvironment-Responsive Prodrug-Induced Pyroptosis Boosts Cancer Immunotherapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(24): e2101840.

[77] WANG N, LIU C, LI Y, et al. A cooperative nano-CRISPR scaffold potentiates immunotherapy via activation of tumour-intrinsic pyroptosis [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 779.

[78] ZHANG Z, ZHANG Y, XIA S, et al. Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity [J]. *Nature*, 2020, 579(7799): 415-420.

[79] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.

[80] GERSHMAN E, GUTHRIE R, SWIATEK K, et al. Management of hemoptysis in patients with lung cancer [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(15): 358.

[81] ZHONG W Z, WANG Q, MAO W M, et al. Gefitinib Versus Vinorelbine Plus Cisplatin as Adjuvant Treatment for Stage II-III A (N1-N2) EGFR-Mutant NSCLC: Final Overall Survival Analysis of CTONG1104 Phase III Trial [J]. *J Clin Oncol*, 2021, 39(7): 713-722.

[82] LI N, OU W, YE X, et al. Pemetrexed-carboplatin adjuvant chemotherapy with or without gefitinib in resected stage IIIA-N2 non-small cell lung cancer harbouring EGFR mutations: a randomized, phase II study [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(6): 2091-2096.

[83] ZHONG W Z, YAN H H, CHEN K N, et al. Erlotinib versus gemcitabine plus cisplatin as neoadjuvant treatment of stage IIIA-N2 EGFR-mutant non-small-cell lung cancer: final overall survival analysis of the EMERGING-CTONG 1103 randomised phase II trial [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 76.

[84] SHARMA P, ALLISON J P. The future of immune checkpoint therapy [J]. *Science*,

2015, 348(6230): 56-61.

[85] BRAHMER J, RECKAMP K L, BAAS P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): 123-135.

[86] BORGHAEI H, PAZ-ARES L, HORN L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17): 1627-1639.

[87] PAI-SCHERF L, BLUMENTHAL G M, LI H, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond [J]. *Oncologist*, 2017, 22(11): 1392-1399.

[88] ROSNER S, REUSS J E, ZAHURAK M, et al. Five-Year Clinical Outcomes after Neoadjuvant Nivolumab in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2023: OF1-OF6.

[89] BAR J, URBAN D, OFEK E, et al. Neoadjuvant pembrolizumab (Pembro) for early stage non-small cell lung cancer (NSCLC): Updated report of a phase I study, MK3475-223 [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2019, 37(15_suppl): 8534-8534.

[90] LEE J, CHAFT J, NICHOLAS A, et al. PS01.05 Surgical and Clinical Outcomes With Neoadjuvant Atezolizumab in Resectable Stage IB–IIIB NSCLC: LCMC3 Trial Primary Analysis [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2021, 16(3, Supplement): S59-S61.

[91] CASCONI T, WILLIAM W N, JR., WEISSFERDT A, et al. Neoadjuvant nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in operable non-small cell lung cancer: the phase 2 randomized NEOSTAR trial [J]. *Nat Med*, 2021, 27(3): 504-514.

[92] ZHU X, SUN L, SONG N, et al. Safety and effectiveness of neoadjuvant PD-1 inhibitor (toripalimab) plus chemotherapy in stage II-III NSCLC (LungMate 002): an open-label, single-arm, phase 2 trial [J]. *BMC Med*, 2022, 20(1): 493.

[93] BESSE B, ADAM J, COZIC N, et al. 1215O - SC Neoadjuvant atezolizumab (A) for resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Results from the phase II PRINCEPS trial [M]. 2020.

[94] WISLEZ M, MAZIERES J, LAVOLÉ A, et al. 1214O Neoadjuvant durvalumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Preliminary results from a multicenter study (IFCT-1601 IONESCO) [J]. *Annals of Oncology*, 2020, 31: S794.

[95] HONG M H, AHN B, KIM H R, et al. FP03.02 Interim Analysis of Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Durvalumab for Potentially Resectable Stage III Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2021, 16(3, Supplement): S194-S195.

[96] WANG D Y, SALEM J E, COHEN J V, et al. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(12): 1721-1728.

[97] DUNNWARD L K, GRALOW J R, ELLIS G K, et al. Tumor metabolism and blood flow changes by positron emission tomography: relation to survival in patients treated with neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(27): 4449-4457.

[98] PATAER A, KALHOR N, CORREA A M, et al. Histopathologic response criteria predict survival of patients with resected lung cancer after neoadjuvant chemotherapy [J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(5): 825-832.

致谢

论文完成之际，我首先要感谢我的导师张鹏教授，感谢导师在学业、生活上给予我的帮助以及对我的教导，其次感谢石河子大学的诸多老师在我研究生学习生涯对我的帮助，尤其是石河子大学医学院第一附属医院胸外科主任朱佳龙教授、尹来波主任、胡思远主任，呼吸二科主任张中宏教授，科教科焦老师；还要感谢上海市肺科医院这个平台，还有胸外科的主任宋楠博士在临床技能以及手术技术方面给予我的帮助，还有杨洁博士、张乐乐博士、余浣莎博士在我的研究生学习生涯中给予我的帮助和在我遇到困难时给予的援手，在整个学习生涯中也受到许多师兄师姐的帮助，比如边栋亮师兄为我的研究提供帮助指导我 SCI 论文的书写，章靖师兄帮我检查 SCI 论文，胡俊杰师兄也对我的研究给予大量的帮助。还有孙凤环师姐、姜聪师兄都在对我的学业给予莫大的帮助。

正是有了各位老师和师兄师姐的帮助，我的研究生生涯充满了乐趣和收获。在我的研究生生涯还有许许多多帮助过的老师和同学，由于时间有限不能一一列出敬请原谅。衷心感谢所有的遇见，愿大家万事顺意。

最后感谢所有评审专家在百忙之中的审阅指导。

2023 年 3 月

作者简历

基本信息：

祝迪，男，1996年8月出生。

2015年9月至2020年7月，成都医学院临床医学5年制，顺利获得临床医学学士学位。

2020年7月至今，石河子大学临床医学胸外科专业，攻读硕士学位。

已发表论文：

- [1] Zhu S, Ge T, Xiong Y, Zhang J, **Zhu D**, Sun L, Song N, Zhang P. Surgical Options for Resectable Lung Adenosquamous Carcinoma: A Propensity Score-Matched Analysis. *Front Oncol.* 2022 Jul 1;12: 878419. (2022 IF: 6.224)

修回论文：

- [1] **Zhu D**, Huang Z, Xiao K, et al. Does the treatment cycle affect the efficacy of neoadjuvant immunochemotherapy for non-small cell lung cancer in locally advanced stage? Retrospective experience based on a single center.

石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表

研究生姓名	祝迪	学制	3 年制
专业	临床医学	研究方向	外科学


学术评语：

肺癌的死亡率和发病率位居所有肿瘤前列。随着研究的深入，人们发现免疫疗法已经成为抗癌治疗史的一个新的里程碑，为 NSCLC 患者带来新的希望。然而关于 NSCLC 免疫治疗疗效与治疗周期数以及潜在的机制尚不明确。

为此，该生回顾性分析 2019 年 10 月至 2022 年 3 月于上海市肺科医院收治的 II-III 期 NSCLC 患者新辅助免疫化疗后行根治性手术的临床资料。然后通过合适的统计学方法进行分析。结果提示对于 II-III 期非小细胞肺癌患者，新辅助治疗周期数可以影响免疫化疗的影像学疗效。此外，对于可能切除的患者，适当增加治疗周期数可以提高接受根治性手术的机会。

为进一步分析潜在的影响机制，该生通过单细胞测序技术分析了 MPR 样本与 NMPR 样（3 例治疗前、12 例治疗后（4 例 MPR、8 例 NMPR））中富集通路的差异，利用免疫组织化学技术进行验证。结果提示 gasdermin D 信号通路在治疗后的组织中表达明显升高，尤其是在 MPR 病人的治疗后组织中。治疗后的肿瘤细胞中，MPR 的焦亡信号明显比 NMPR 的高。

作为一名硕士研究生，该生学习态度端正，严格要求自己，勤奋好学，孜孜不倦，取得了不错的专业课成绩。在读期间，认真好学，获得了较强的临床动手能力。此外，该生较好的完成了论文，该论文研究内容丰富，逻辑思路清晰，书写规范，数据详实，同意进行论文答辩。

指导教师签字： 

2022 年 3 月 9 日