

驱动基因阳性肺鳞癌的疗效及肿瘤免疫微环境探索分析

高青云^{1,2}, 林晓程^{1,2}, 陈雨晴^{3,2}, 高玲玲^{4,2}, 李余发⁵, 郑明英²,
彭楷程^{3,2}, 谭荃荃^{4,2}, 肖法嫒², 杨衿记^{2,1}

(1. 广东省心血管病研究所, 广州 510080; 2. 广东省人民医院、广东省医学科学院, 广东省肺癌研究所, 广州 510080; 3. 华南理工大学医学院, 广州 510006;
4. 南方医科大学第二临床医学学院, 广州 510080; 5. 广东省人民医院病理科、广东省医学科学院, 广州 510080)

[摘要] **目的** 目前,关于鳞状细胞肺癌(squamous cell lung cancer, SqCLC)患者驱动基因突变的频率和最佳治疗方案存在争议。本研究的目的是分析该人群中的突变状态和不同治疗方案的疗效。**方法** 选择2019年9月1日至2021年9月25日在广东省肺癌研究所确诊的局部晚期和晚期SqCLC患者。对所有接受基因检测的患者进行突变状态和疗效的回顾性分析。采用肿瘤患者来源的类器官(patient derived organoid, PDO)进行药敏实验,应用多重免疫组织化学(multi-immunohistochemistry, mIHC)初步探索肿瘤免疫微环境(tumor immune microenvironment, TIME)。**结果** *EGFR*、*ALK*、*MET*、*HER2*和*RET*的突变频率分别为7.8%、1.1%、1.2%、0.6%和0.6%。在21例驱动基因突变阳性患者中,共有14例患者接受了一线酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)治疗,客观缓解率(objective response rate, ORR)为42.9%。第三代TKI在*EGFR*突变患者中的ORR为80.0%。药敏试验为靶向治疗的潜在益处提供了证据。此外,mIHC结果显示驱动基因突变阳性SqCLC患者中巨噬细胞和NK细胞的不同浸润特征。**结论** 靶向治疗对具有驱动基因突变阳性的局部晚期和晚期SqCLC患者有一定的疗效。同时,TIME与该人群靶向治疗和免疫治疗疗效之间的相关性值得探讨。

[关键词] 致癌驱动突变; 鳞状细胞肺癌; 靶向治疗; 肿瘤免疫微环境

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.12019/j.issn.1671-5144.2022.02.008

Explore and Analyze the Therapeutic Effects and Tumor Immune Microenvironment of Driver Gene-Positive Lung Squamous Cell Carcinoma

GAO Qing-yun^{1,2}, LIN Xiao-cheng^{1,2}, CHEN Yu-qing^{3,2}, GAO Ling-ling^{4,2}, LI Yu-fa⁵,
ZHENG Ming-ying², PENG Kai-cheng^{3,2}, TAN Quan-quan^{4,2}, XIAO Fa-man², YANG Jin-ji^{2,1}

(1. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong Lung Cancer Institute, Guangzhou 510080, China; 3. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 4. The Second School of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 5. Department of Pathology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81972164)

[作者简介] 高青云(1994-),女,湖北孝感人,硕士研究生,主要研究方向为肺癌靶向及免疫治疗。

[通讯作者] 杨衿记, Tel:020-83827812, E-mail: yangjinji@gdph.org.cn。

Abstract: Objective At present, there are controversies regarding the frequency and optimum treatment regimen of oncogenic driver mutations in squamous cell lung carcinoma (SqCLC) patients. This study aimed to analyze the mutation status and the efficacy of different treatment regimens in this population. **Methods** Patients with locally advanced and advanced SqCLC diagnosed at the Guangdong Lung Cancer Institute from September 1, 2019, to September 25, 2021, were selected. A retrospective analysis of mutation status and efficacy was performed on all patients who underwent gene detection. To verify and explore the basis for the efficacy of different therapies, drug susceptibility tests using patient-derived organoids and multi-immunohistochemistry (mIHC) were conducted. **Results** The mutational frequencies of *EGFR*, *ALK*, *MET*, *HER2* and *RET* were 7.8%, 1.1%, 1.2%, 0.6% and 0.6%, respectively. Among the 21 patients with oncogenic driver mutations, a total of 14 patients received first-line tyrosine kinase inhibitors (TKIs), with an objective response rate (ORR) of 42.9%. The ORR of 3rd-generation TKIs in patients with *EGFR* mutations was 80.0%. Drug susceptibility tests provided evidence for the potential benefit of targeted therapy. Additionally, the mIHC results indicated the different infiltrating characteristics of macrophages and NK cells in SqCLC patients with oncogenic driver mutations. **Conclusions** Targeted therapy does have certain benefits in locally advanced and advanced SqCLC patients with oncogenic driver mutations. At the same time, the correlation between the tumor immune microenvironment and the efficacy of both targeted therapy and immunotherapy among this population is worth exploring.

Key words: oncogenic driver mutations; squamous cell lung cancer; targeted therapy; tumor immune microenvironment

背景

肺癌是世界上发病率和死亡率最高的恶性肿瘤^[1]。据 Molina 等的研究^[2], 约 85% 的肺癌新诊断病例属于非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 其中肺腺癌 (lung adenocarcinoma, LUAD) 和鳞状细胞肺癌 (squamous cell lung cancer, SqCLC) 是最常见的组织学亚型, 分别占 50% 和 30%^[3]。近年来, 由于高通量生物技术的快速发展, 一系列与 NSCLC 相关的驱动基因被发现。这些基因赋予细胞选择性生长的优势, 并“驱动”它们导致恶性肿瘤的发生, 被称为驱动基因^[4]。驱动基因的发现, 加上基因检测的成熟和靶向药物的开发, 已经彻底改变了晚期 NSCLC 的治疗策略。

一些临床试验表明, 针对这些驱动基因的抑制剂已经取得了令人鼓舞的疗效。表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, *EGFR*)、间变性淋巴瘤激酶 (anaplastic lymphoma kinase, *ALK*) 等酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 在 LUAD 患者中获得了较高的客观缓解率 (objective response rate, ORR) 和延长的生存期^[5-10]。与 LUAD 相比, SqCLC 的驱动基因突变率较低。因此, 针对 SqCLC 的 TKI 治疗也很少^[11]。此外, 与使用 TKIs 治疗的 *EGFR* 突变阳性腺癌 [无进展生存期 (progression-free-survival, PFS) 为 8~12 个月 (month, m)] 相比, SqCLC 患者的疗效略低 (PFS 为 5m)^[12]。SqCLC 中潜在的靶向基因或通路改变, 如 *EGFR* 扩

增已被报道, 但尚未被转化为有意义的临床效果^[13]。其他的治疗方案, 特别是免疫治疗方案, 仍然缺乏对具有驱动基因突变的 SqCLC 的探索。因此, 对驱动基因的突变率、不同治疗方法的疗效和基线肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 进行全面的回顾性分析是必要的。

在本研究中, 我们回顾性分析了局部晚期和晚期 SqCLC 患者的 *EGFR*、人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, *HER2*)、V-RAF 鼠类肉瘤病毒癌基因同源物 B1 (V-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B1, *BRAF*)、Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten rats arcomaviral oncogene homolog, *KRAS*)、*ALK*、间质-上皮细胞转化因子 (mesenchymal epithelial transition factor, *MET*)、神经营养蛋白受体激酶 (neurotrophic tyrosine receptor kinase, *NTRK*)、转染重排 (rearranged during transfection, *RET*) 和 C-ROS 癌基因 1 (c-ros oncogene 1, *ROS1*)^[14] 的突变率以及患者的临床特征。随后, 我们观察不同治疗方案对这些患者的疗效, 为未来的临床治疗提供了潜在的证据。

1 材料与方法

1.1 研究对象与病例数据获取

本研究选取 2019 年 9 月 1 日至 2021 年 9 月 25 日在广东省肺癌研究所确诊的所有局部晚期和晚期 SqCLC 患者。回顾性分析相关驱动基因患者的临床和病理资料, 包括年龄、性别、分期和诊断

时的基因状态。临床分期是根据美国癌症联合委员会第八版的分期进行定义。本研究排除了原发性腺鳞癌或转移灶为腺癌的患者。本研究经广东省人民医院伦理委员会批准(伦理号:GDREC2019217)。

1.2 病理学和免疫组化

所有患者的病理诊断均经广东省人民医院病理科的组织病理学和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)证实。结果由两位专门病理学家独立解释。通过定义肿瘤细胞中程序性死亡配体1(programmed death ligand 1, PD-L1)阳性细胞的比例来评估PD-L1(22C3 pharmDx; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)的表达。肿瘤细胞中PD-L1阳性表达定义为 $\geq 1\%$,而阴性表达定义则相反。

1.3 基因分析

主要使用燃石和世和二代基因测序(next generation sequencing, NGS)检测患者肿瘤组织基因突变状态(包括*EGFR*, *ALK*, *RET*, *ROS1*, *HER2*, *BRAF*, *KRAS*, *MET*, *NTRK*)。此外*EGFR*突变也通过突变扩增阻滞系统(amplification refractory mutation system, ARMS)(AmoyDx, 厦门, 中国)检测。同时也采用IHC抗*ALK*抗体(Ventana, D5F3, Gift of Cell Signaling Technology, Beverly, MA)检测*ALK*突变。根据既往研究,*HER2*和*MET*扩增也通过荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)检测^[15-16]。

1.4 治疗反应评价

在整个队列中,接受靶向药物治疗的患者最初每4周通过常规CT扫描进行评估。如果患者的病情没有进展,则将评估的持续时间调整为每2个月一次。具体根据实体肿瘤(Response Evaluation Criteria in Solid Tumor, RECIST) 1.1版进行疗效评估。PFS的定义是从靶向治疗的开始到肿瘤进展的日期或最后一次随访。

1.5 患者来源的类器官(patient derived organoid, PDO)的培养和药敏试验

样本取自患者恶性胸腔积液(malignant pleural effusion, MPE),并无菌保存于肝素化(10 U/mL)无菌瓶中在4 h内以低温(2~8℃)送往实验室。类器官培养的确切过程是按照前面描述的类似方案进行的^[17]。将样本在112 rcf下离心3 min,并用红细胞裂解液裂解。取沉淀物并用HEPES缓冲液(Thermo Fisher Scientific)清洗。将细胞重悬于

Accuroid肺癌培养液(ALCM; Accurate International Biotech Co. Ltd)中并细胞计数。随后将200 μ L Matrigel(Corning Inc.)加入到100 μ L细胞悬液中以建立类器官,并吸取30 μ L混合物滴入预热的6孔板中,37℃条件下固化30 min。凝胶化后,每孔加入3 mL ALCM。每隔2~3天更换一次培养液。

收集培养超过2周的类器官,使用1 \times TrypLe试剂(Thermo Fisher Scientific)分离。将分离的类器官混合在MBM(membrane-bottomed microwell)+Matrigel(1:1)中。置于冰上种植到384孔白板上。凝胶化后,每孔加入30 μ L MBM,培养48 h。类器官的平均直径被设定为50 μ m作为药物筛选的最低要求。设置了6个加药浓度,5倍稀释的浓度梯度(50、10、2、0.4、0.08和0.016 μ m)。同时设置等浓度安慰剂作为阴性对照组。加药后第3~4天后使用CellTiter-Glo细胞活力检测仪(Promega)检测细胞活力值。使用GraphPad Prism 7.0(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)软件计算半数最大抑制浓度(half-maximal inhibitory concentration, IC50)值。

1.6 多重免疫组化(multi-IHC, mIHC)染色与分析

使用panO7-plex IHC试剂盒(Panovue, Beijing, China)将厚度为5 μ m的福尔马林固定石蜡包埋切片用于mIHC染色,包括CD8、CD56、CD68、HLA-DR和PANCK染色如前所述,TIME的细胞亚群由mIHC鉴定^[18]。

1.7 统计分析

所有统计分析均采用SPSS 26.0软件(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)进行评估,*P*值<0.05被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 晚期SqCLC患者的驱动基因突变频率

如图1所示,266例进行相关驱动基因检测,共25例有驱动基因突变。*EGFR*、*ALK*、*MET*、*RET*和*HER2*的基因突变率分别为7.8%(18/231)、1.1%(3/262)、1.2%(2/166)、0.6%(1/159)和0.6%(1/161)。*KRAS*、*ROS1*、*BRAF*和*NTRK*均未观察到突变。在18例*EGFR*突变患者中,*EGFR*第19外显子缺失最常见(10例,40%),其次是*EGFR*第21外显子L858R(2例,8%),*EGFR*第20外显子插入(2例,8%),*EGFR*第20外显子T790M(1例,4%)。其他驱动基因突变,如L861Q、G719S和S768I(各1例,4%)。2例*MET*突变的患者均为*MET*第14外显子跳跃突变。在*ALK*突变的患者中,有2例患者发生

了 *EML4-ALK* 融合。另一例患者采用 IHC 检测,因此具体融合类型未知。另外 2 例驱动基因阳性的

患者为 *KIF5B-RET* 融合和 *HER2* 插入。患者具体基因突变状态及相应检测方法见表 1。

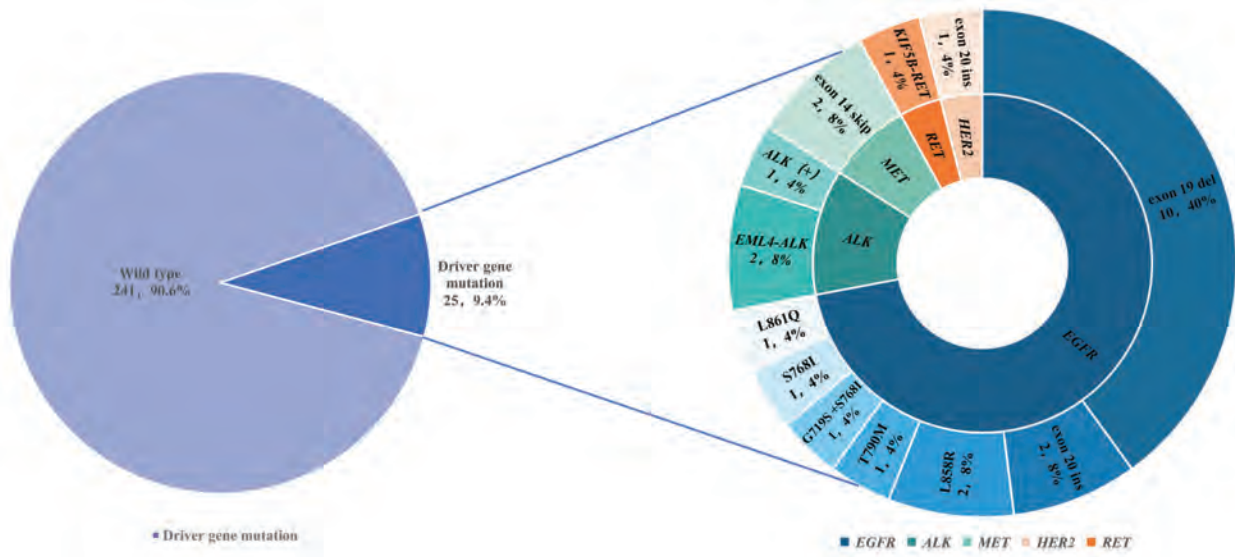


图 1 266 例 SqCLC 患者的驱动基因突变饼图

Fig.1 Mutational landscape of driver genes in 266 SqCLC patients

注:左侧为 266 例 SqCLC 患者进行基因检测后的驱动基因突变比例。右侧为 25 例伴有驱动基因突变的 SqCLC 患者的突变类型。3 例 *ALK* 基因融合患者中,1 例采用 IHC 检测,具体融合类型未知,以 *ALK*(+) 为代表

Note: The proportion of driver gene mutation in 266 SqCLC patients who underwent gene detection was presented on the left. The mutation types of 25 SqCLC patients with driver gene mutations were shown on the right. Among the 3 patients with *ALK* gene fusion, 1 patient was tested by IHC so that the specific fusion type was unknown, which was represented by *ALK* (+)

表 1 敏感驱动基因突变状态结果

Tab.1 Result of sensitive driver gene mutation status

Item	Sample number	Detection method	Percent
<i>EGFR</i> gene			
Exon 19del	10	NGS/ARMS	4.3%(10/231)
Exon 21 L858Rmut	2	NGS/ARMS	0.9%(2/231)
Exon 20ins	2	NGS	0.9%(2/231)
Exon 20 T790Mmut	1	ARMS	0.4%(1/231)
Exon 20 S768I	1	ARMS	0.4%(1/231)
Exon 18 G719Smut, Exon 20 S768Imut	1	NGS	0.4%(1/231)
Exon 21 L861Qmut	1	NGS	0.4%(1/231)
<i>ALK</i> gene			
<i>EML4-ALK</i>	1	NGS	0.4%(1/262)
<i>EML4-ALK, ALK</i> -intergenic	1	NGS	0.4%(1/262)
<i>ALK</i> ⁺	1	IHC(D5F3)	0.4%(1/262)
<i>MET</i> gene			
Exon 14 skip	2	NGS	1.2%(2/166)
<i>RET</i> gene			
<i>KIF5B-RET</i>	1	NGS	0.6%(1/159)
<i>HER2</i> gene			
<i>HER2</i> ins	1	NGS	0.6%(1/161)

注:+,融合类型未知

Note: +, fusion type unknown

2.2 具有驱动基因突变阳性的晚期 SqCLC 的临床特征

我们分析了 25 例驱动基因突变阳性的患者,其中男性 11 例,女性 14 例。Ⅲ期患者 7 例,Ⅳ期患者 18 例。6 例患者有吸烟史,19 例患者无吸烟史。有吸烟史的患者 *EGFR* 突变率为 83.3% ($n=5$),无吸烟史的患者 *EGFR* 突变率为 68.4% ($n=13$)。 *ALK* 融合

患者 3 例,其中男性 2 例,女性 1 例。 *MET* 突变患者 2 例,其中男性 1 例,女性 1 例。另外, *RET* 融合 1 例, *HER2* 插入 1 例,均为女性。大多数患者的肿瘤标志物在基线时出现异常 ($n=20, 80.0%$)。在有 *MET* 突变的患者中,肿瘤主要为外周型 ($n=2$)。其余基因在不同性别、年龄组、吸烟史、TNM 分期或肿瘤标记物之间的突变频率均未观察到显著性差异,见表 2。

表 2 驱动基因阳性晚期 SqCLC 的临床特征总结

Tab.2 Summary of clinical characteristics of advanced SqCLC with positive sensitive driver gene

Clinical characteristics	No. of patients					
	Total	<i>EGFR</i>	<i>ALK</i>	<i>MET</i>	<i>RET</i>	<i>HER2</i>
Age						
≤60	16	12	2	1	1	0
>60	9	6	1	1	0	1
Sex						
Male	11	8	2	1	0	0
Female	14	10	1	1	1	1
Smoking history						
Never-smoker	19	13	2	2	1	1
Ever-smoker	6	5	1	0	0	0
Clinical stage at diagnosis						
Ⅲ	7	7	0	0	0	0
Ⅳ	18	11	3	2	1	1
Serum tumor markers						
Normal	5	5	0	0	0	0
Abnormal	20	13	3	2	1	1
Gross type						
Central type	12	8	2	0	1	1
Peripheral type	4	1	1	2	0	0
Uncertain	9	9	0	0	0	0
Site of tumor location						
Left lung	9	5	2	1	1	0
Right lung	16	13	1	1	0	1

2.3 不同治疗方案在驱动基因阳性 SqCLC 患者中的疗效

除参与临床试验的 4 例患者外,最终纳入驱动基因突变阳性患者 21 例。20 例接受治疗的患者 (95.2%) 中,14 例 (70.0%) 接受了一线 TKI, ORR 为 42.9%, 而 2 例患者的疗效无法评估。7 例患者在最后一次随访日期前没有进展。所有患者的 PFS 如图 2 所示。在 10 例一线接受 *EGFR*-TKI 治疗的 *EGFR* 突变患者中,5 例接受了第一或第二代 TKI, 5 例接受了第三代 TKI。此外,第三代 TKI 的 ORR 为 80.0%。化疗 2 例 (10.0%), 其中单纯化疗 1 例,同步放化疗 1 例。2 例患者均达到部分缓解 (partial response, PR) 的最佳疗效,但 PFS 分别仅

为 3.3m 和 5.5m。安罗替尼作为一种抗血管生成治疗药物用于 1 例患者 (5.0%), PFS 仅为 0.4m, 最佳疗效为疾病进展 (progression disease, PD)。还有 3 例 (15.0%) 患者接受了一线免疫治疗,基因状态分别为 *KIF5B-RET*、*EGFR* 20exon、*EGFR* 19del。PD-L1 均呈低表达 (PD-L1 < 50%)^[19], 治疗方案分别为白蛋白紫杉醇+卡铂+帕博利珠单抗 (albumin-bound paclitaxel + carboplatin + pembrolizumab, PCK)、紫杉醇+卡铂+纳武利尤单抗、白蛋白紫杉醇+卡铂+帕博利珠单抗。在这 3 例患者中,PR 2 例,疾病稳定 (stable disease, SD) 1 例,疾病控制率 (disease control rate, DCR) 为 100%, ORR 为 66.7%。

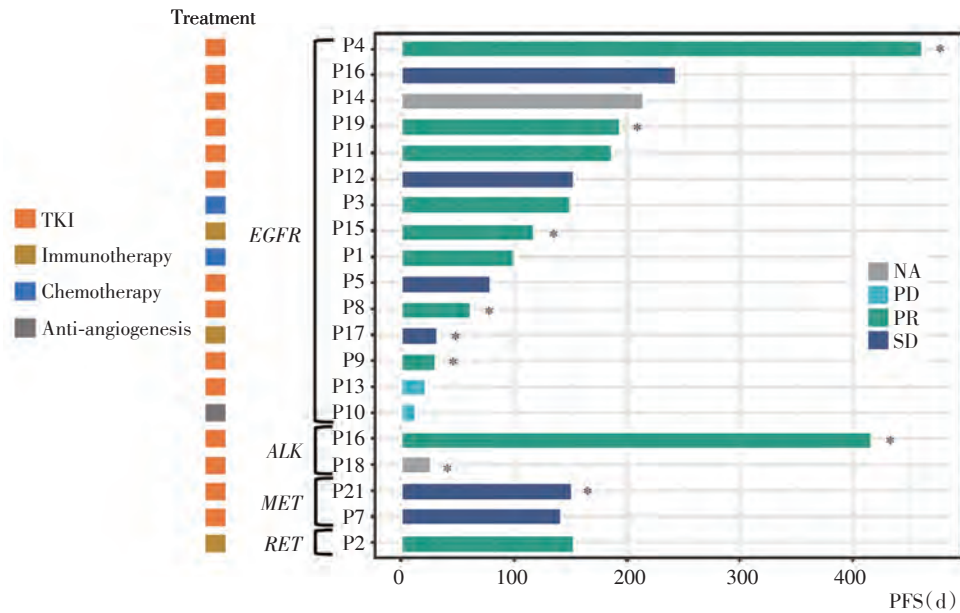


图2 20例发生驱动基因突变SqCLC患者的突变状态、治疗方案、治疗疗效和PFS情况

Fig.2 The mutation status, treatment regimens, efficacy of treatment, and PFS of 20 treated SqCLC patients with the druggable mutation

注:*表示截止随访日期尚未进展; NA, 未能提供

Note: *Ongoing treatment; NA, not available

2.4 PDO药敏实验

我们在2例患者中使用MPE培养了PDO。这2例病例在一线治疗进展后都进行了重新活检。我们在胸腔穿刺后立即收集MPE进行培养。其中,P2为*KIF5B-RET*融合的SqCLC患者,一线治疗采用PCK方案治疗。P2的PDO用卡铂+白蛋白紫杉醇和LOXO-292进行药敏实验。IC50值分别为15.3和5.7,抑制率分别为36.8%和56.7%。结果表明,该患者在接受TKI治疗时的疗效可能优于化疗。随后P2患者二线接受LOXO-292治疗,最佳疗效PR(-55%),PFS为4.3m。P16为*EGFR* L858R突变的SqCLC患者,一线阿法替尼耐药后其PDO进行了阿法替尼和奥希替尼的药敏实验。结果表明,P16对第一代和第三代TKI均有一定的敏感性。但该患者在接受二线奥希替尼治疗1周后失访,因此未进行临床疗效验证,见图3。

2.5 基于mIHC探索肿瘤免疫微环境

在经组织病理和质量评估后,对5例驱动基因突变阳性SqCLC患者的基线石蜡包埋标本进行mIHC检测,其中1例患者在一线免疫治疗前和二线靶向治疗后有组织标本。这5例患者PD-L1的表达水平均较低(<50%),见图4,图5。

如2.4所描述的,P2为*KIF5B-RET*融合的SqCLC患者,一线接受PCK方案治疗,最佳疗效达到PR,PFS为5m^[20],然后接受RET-TKI作为二线治疗。基线和免疫治疗后组织的mIHC结果对比显示,在表达阳性率方面,肿瘤实质中M2和表达低水平CD56的NK细胞(NK cells expressing low levels of CD56, CD56dim)细胞的阳性率显著降低(26.36%~9.85%, 78.05%~57.11%),M1和表达高水平CD56的NK细胞(NK cells expressing high levels of CD56, CD56bright)细胞的阳性率升高(1.63%~11.95%、0.28%~30.95%),CD8细胞表达水平没有明显变化(4.95%~6.61%),始终处于一个较高水平^[21]。而在肿瘤间质中M2和CD56dim细胞的阳性率中则是升高的(18.33%~28.50%, 36.70%~64.36%)。同样,我们也观察到了肿瘤实质和肿瘤间质中各细胞密度的上述变化,见图6。

其余4例患者均未接受过免疫治疗。P3和P5为*EGFR* 19del患者。P3同时接受了化疗和放疗,最佳疗效为PR,PFS为5.0m。P5一线接受奥希替尼靶向治疗,但PFS仅为2.7m。两例患者肿瘤间质中CD8⁺T细胞的阳性率(分别为7.1%和11.1%)均高于肿瘤实质(分别为1.0%和7.7%),肿瘤实质

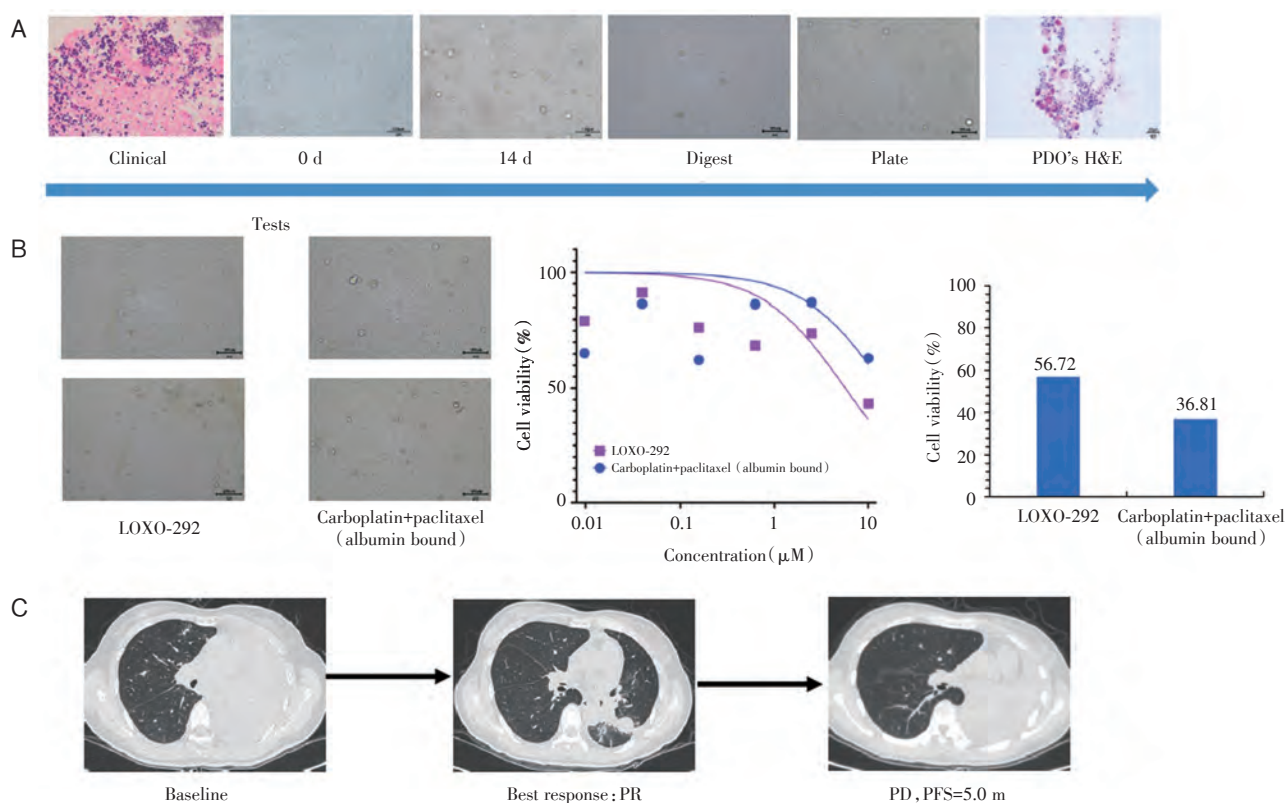


图3 PDO的建立、药敏试验及P2的CT扫描结果

Fig.3 Establishment of PDO and the results of drug susceptibility test as well as computed tomography scans of P2

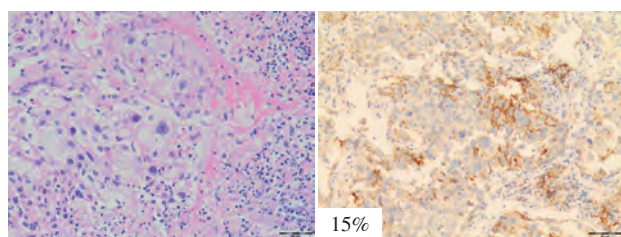


图4 P2的IHC图像

Fig.4 IHC results of P2

注:左图:H&E染色,右图:PD-L1 IHC(15%)

Note: H&E staining of P2 was shown on the left and PD-L1 IHC with expression level was on the right. The expression level of PD-L1 was 15%

中M1、M2、CD56dim和CD56bright的阳性率和密度均高于肿瘤间质。P13为EGFR L858R突变患者,一线接受阿法替尼治疗,PFS仅为0.7m,肿瘤间质中M2细胞的阳性率(17.4%)高于肿瘤实质(13.2%),其他细胞的阳性率和密度在肿瘤实质中均高于肿瘤间质。P6为ALK融合患者,一线接受了阿来替尼治疗,并在最后一次随访中仍然维持PR。在肿瘤实质(94.8%)和间质(100%)中CD56细胞几乎均为CD56dim。肿瘤间质中

CD56dim的阳性率(8.6%)高于肿瘤实质(7.1%)。然而,所有细胞的密度在肿瘤实质都高于肿瘤间质。此外,这4例患者均显示,CD56bright细胞在肿瘤间质和肿瘤实质中的阳性率均小于5%,见图7。

3 讨论

目前,SqCLC患者中致癌驱动突变的频率较低,例如中国人群中LUAD和SqCLC中EGFR突变的频率分别为40.3%和4.4%^[22],与LUAD患者相比,难以在具有致癌驱动突变的SqCLC患者中探索靶向治疗的疗效。若致癌驱动突变阳性,SqCLC患者是否应进行常规基因检测并接受TKI治疗仍存在争议。

在我们的研究中,SqCLC患者EGFR的突变频率为7.8%(18/231),这与既往的报道基本一致。据1项荟萃分析^[23]报告显示,东亚SqCLC患者EGFR突变频率略高于欧美SqCLC患者(4.6% vs. 3.3%),而EGFR突变在中国人群中的突变频率要高得多,范围为4%~20%^[18,24-25]。对于伴有EGFR突变的SqCLC患者,大多数突变发生在第19~21外

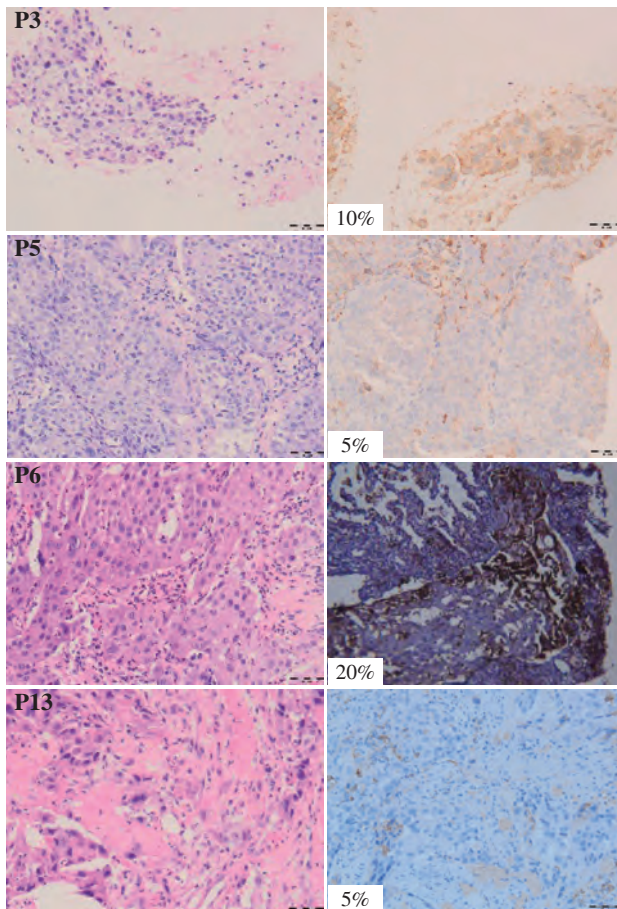


图5 P3、P5、P6、P13的IHC图像

Fig.5 IHC results of P3、P5、P6、P13

注:左侧为P3、P5、P6、P13的H&E染色,右侧为PD-L1 IHC。PD-L1的表达水平列在每个IHC图片的左下角

Note: H&E staining of P3, P5, P6, and P13 were shown on the left and PD-L1 IHC of these patients were on the right. The expression level of PD-L1 was listed in the lower left corner of each IHC picture

显子上,这在我们的研究中是一致的。此外,我们还发现了1例 *EGFR* 18外显子G719S突变合并20外显子S768I突变的患者。据Gou等^[22]研究,中国SqCLC患者中 *ALK*的阳性频率约为2.0%。然而,在我们的研究中, *ALK*的阳性频率仅为1.1%(3/262),这可能是由于我们的研究样本量较小。此外,对于伴有 *MET*、*HER2*和 *RET*突变阳性的SqCLC患者较少报道。

根据既往研究^[26],中国女性和不吸烟与SqCLC患者较高的 *EGFR*突变率相关。本研究中,有吸烟史的患者($n=5$) *EGFR*突变率为83.3%,无吸烟史的患者($n=13$) *EGFR*突变率为68.4%,但无显著差异。此外,性别与 *EGFR*突变率也无显著相关性。考虑本研究的样本量有限,加上不同检测方法的差异,可能是结果不一致的原因。年龄、分期、基

线肿瘤标志物水平和肿瘤位置与 *EGFR*突变率无关,这与其他研究基本一致^[25,27]。

在治疗方案方面,由于在以往的针对 *EGFR*-TKI和 *ALK*-TKI治疗相应驱动基因阳性NSCLC的II期/III期临床研究中,较少纳入了携带 *EGFR/ALK*阳性的肺鳞癌患者,因而无法在这些临床试验中确定驱动基因阳性肺鳞癌患者使用 *EGFR*-TKI和 *ALK*-TKI的疗效。两项回顾分析关于 *EGFR*-TKI治疗 *EGFR*阳性SqCLC患者疗效的研究^[28-29]结果显示, *EGFR*阳性SqCLC的ORR为25.0%~31.8%,DCR为50.0%~81.8%,中位PFS为1.9~5.0m。此外在既往个案报道^[30]中, *ALK*-TKI治疗 *ALK*融合SqCLC患者中位PFS可达7.1m,提示其治疗效果可能与 *ALK*阳性肺腺癌相近,但由于样本量太小,目前还不能完全肯定。在我们的研究中,接受一线TKI治疗的肺鳞癌患者ORR为42.9%。此外关于免疫治疗是否能在驱动基因阳性NSCLC患者中发挥作用目前尚存争议,全球多中心IMMUNOTARGET研究^[31]是迄今为止规模最大的驱动基因阳性NSCLC患者应用免疫治疗的真实世界研究。大多数为肺腺癌患者,仅2例SqCLC患者。一线使用免疫治疗药物只有5%患者。使用免疫治疗的总体治疗应答率为19%,中位PFS为2.8m。在本研究中,3例一线接受免疫治疗的SqCLC患者ORR为66.7%,DCR为100%。尽管相比于靶向治疗,免疫治疗获益相对较小,但并不排除免疫治疗的可能性,因此提示TKI及免疫治疗在驱动基因阳性SqCLC患者中的潜力和有效性值得进一步探索,同时也需要更多的临床试验来为驱动基因阳性SqCLC患者的个体化治疗提供令人信服的证据。

PDO作为一种三维临床前模型,可能比其他体外模型更好地代表肿瘤的特征^[32]。采用PDO的药敏试验已在一些研究中报道,但其与临床相关性仍在探索之中。Kim等的一项研究^[33]证实了来自晚期LUAD的PDO的临床相关性,而来自SqCLC患者的PDO却鲜有报道。我们的研究在2例患者中进行了PDO药敏试验,均显示对TKI敏感。对于P2的PDO药敏试验,提示TKI的敏感性高于化疗,并已通过临床疗效得到验证。虽然只有2例患者进行了PDO药敏试验,其中1例(P16)缺乏临床疗效验证,但体外试验仍初步证实了TKI对驱动基因突变SqCLC患者的益处。

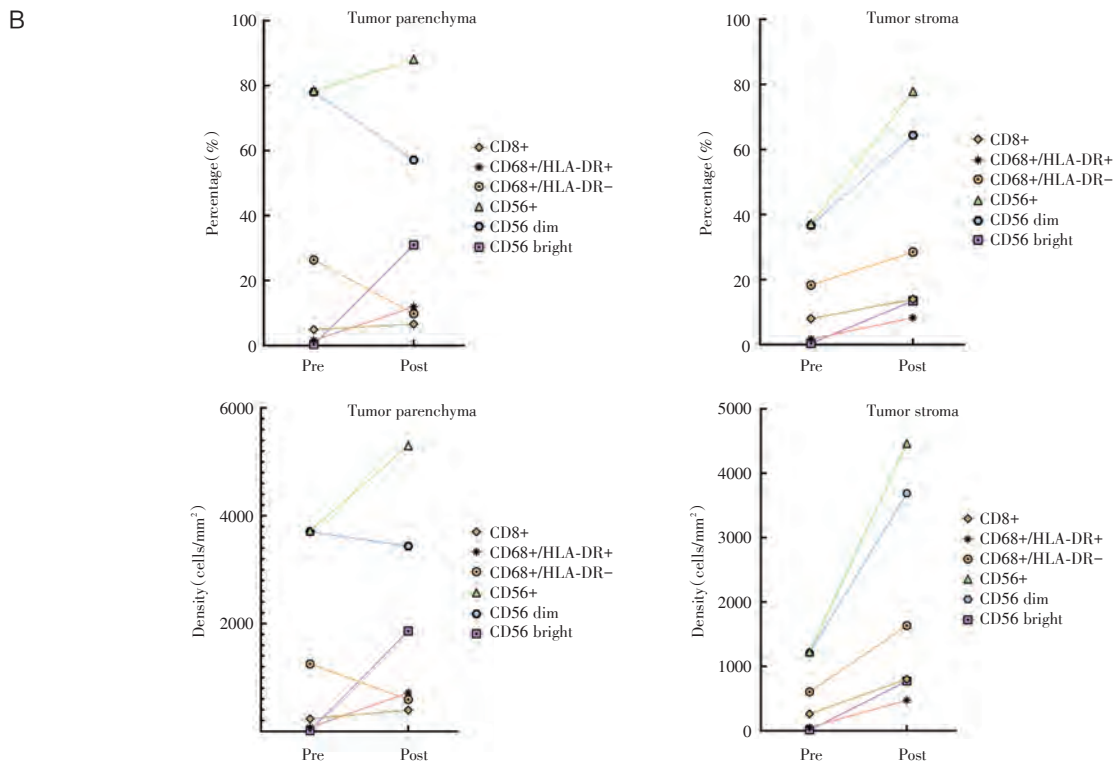
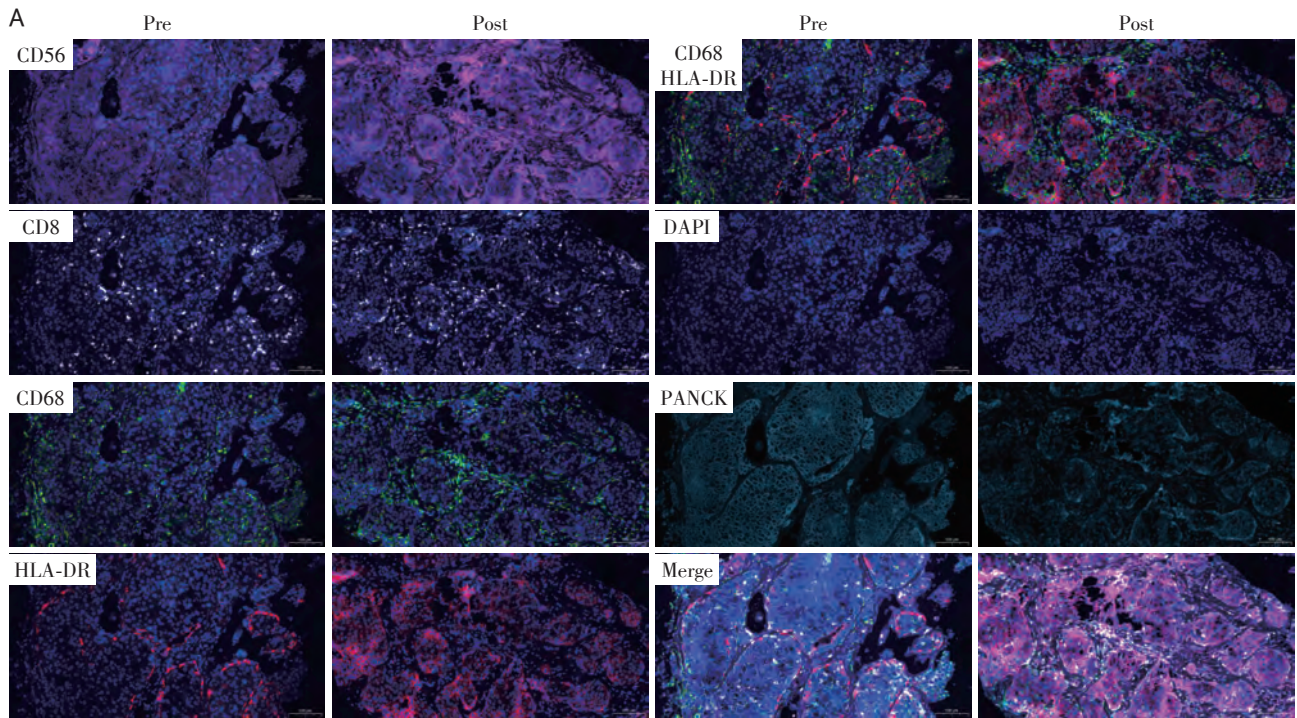


图6 P2的mIHC图像及前后变化

Fig.6 mIHC results and variations of P2

注: A. 一线免疫治疗和二线TKI治疗后基线组织的mIHC结果。CD8(白色)、CD56(粉色)、CD68(绿色)、DAPI(蓝色)、HLA-DR(红色)、PANCK(青色); B. 显示了肿瘤实质和间质中每个标志物的阳性率和密度的变化

缩写: DAPI, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

Note: A. The mIHC results of tissue at baseline of 1st line immunotherapy and after 2nd line TKI therapy were presented on the first line and the second line. CD8 (White), CD56 (Pink), CD68 (Green), DAPI (Blue), HLA-DR (Red), PANCK (Cyan); B. The variations of positive rate and density of each marker in tumor parenchyma and stroma were displayed

Abbreviation: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole

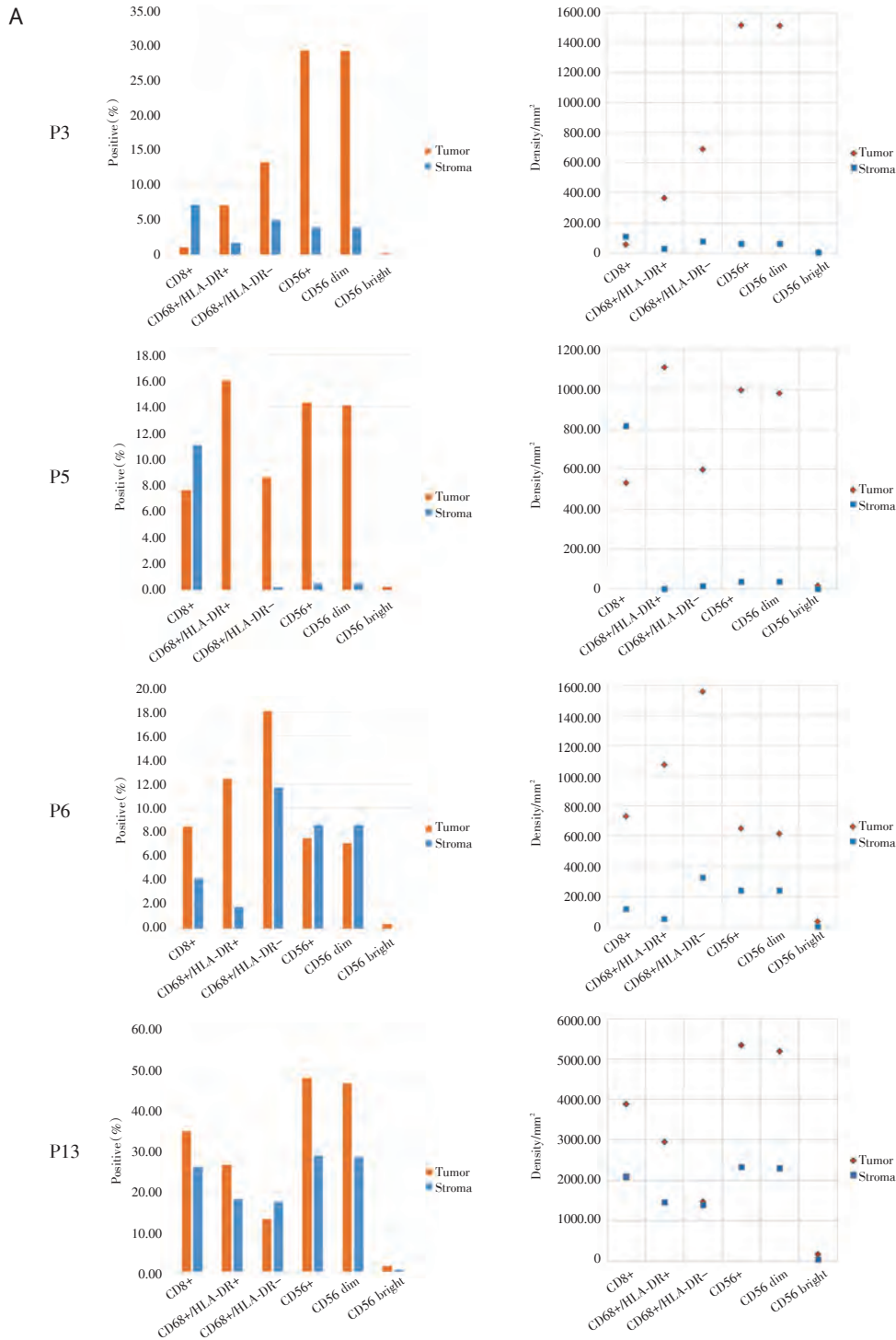


图7 4例患者的TIME结果

Fig.7 The baseline TIME in 4 patients

注：A. P3、P5、P6、P13肿瘤实质和间质中各标记物的阳性率和密度；B. P3、P5、P6、P13的mIHC镜下图。颜色显示：CD8（白色）、CD56（粉红色）、CD68（绿色）、DAPI（蓝色）、HLA-DR（红色）、PANCK（青色）；C. 3例一线接受靶向治疗患者的计算机断层扫描。P3同时接受化疗和放疗，最佳疗效PR。P5接受奥希替尼治疗，最佳疗效SD。P6接受了阿来替尼治疗，并在最后一次随访日期继续进行PR。P13接受了阿法替尼治疗，但PFS仅为0.7m，因此未进行疗效评价

Note: A. Positive rate and density of each marker in tumor parenchyma and stroma of P3、P5、P6、P13; B. mIHC results of P3, P5, P6, P13. CD8 (White), CD56 (Pink), CD68 (Green), DAPI (Blue), HLA-DR (Red), PANCK (Cyan); C. Computed tomography of three patients with first-line patients receiving targeted therapy. P3 received concurrent chemotherapy and radiotherapy with the best efficacy of PR. P5 received osimertinib with the best efficacy of SD. P6 received alectinib and continued PR by the last follow-up date. P13 received afatinib but the PFS was only 0.7 m, so that did not have an efficacy evaluation

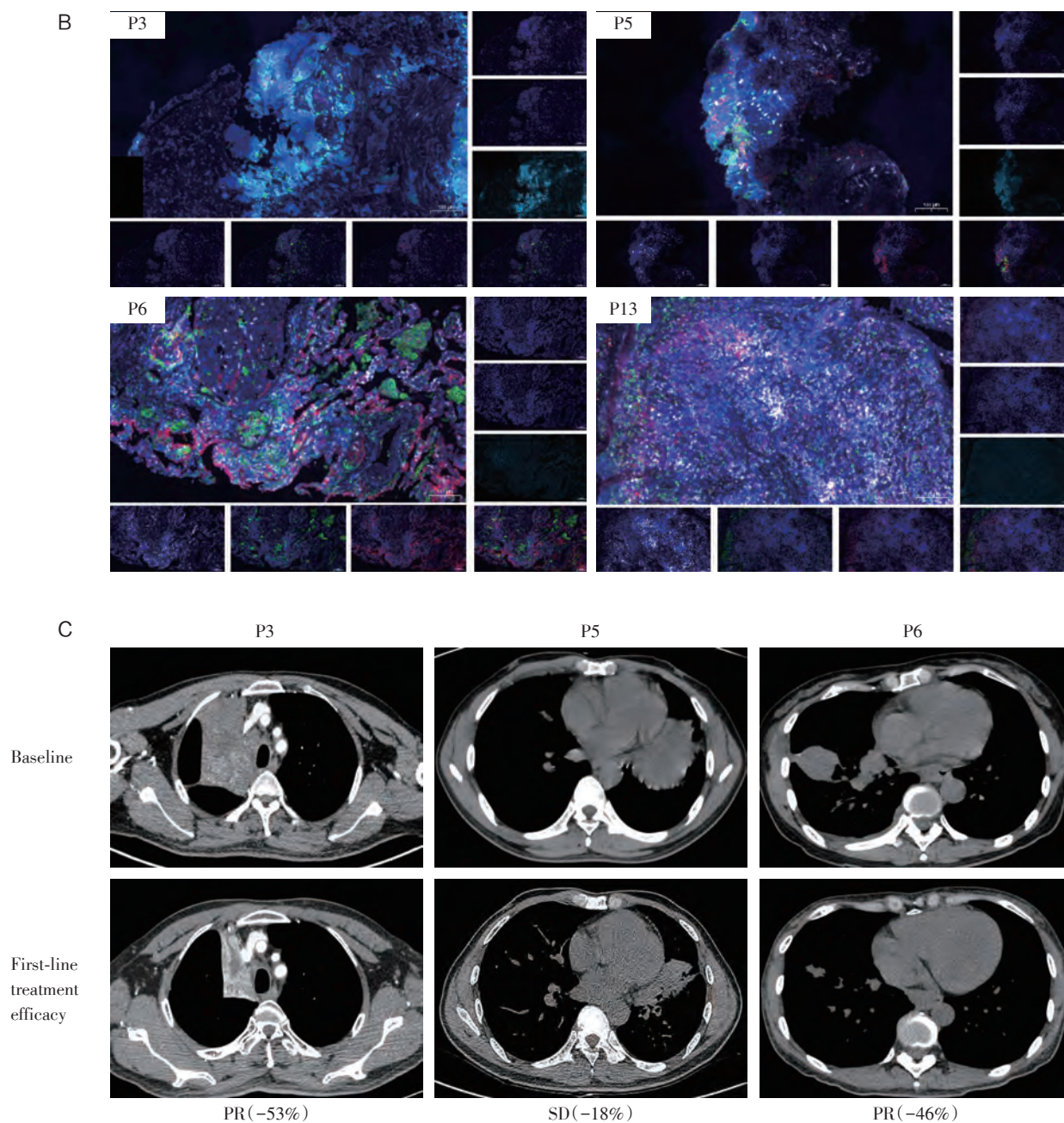


图7 4例患者的TIME结果(续)

Fig.7 The baseline TIME in 4 patients (continus)

此外很少有研究探索具有致癌驱动基因突变 SqCLC 患者基线 TIME 的特征。本研究对 5 例患者进行 mIHC 检测,以探讨基线 TIME 的特征。虽然 P2 的 CD8⁺T 细胞在免疫治疗前后没有明显变化,但 CD8⁺T 细胞的阳性率始终或接近于高水平 (>5%)。在肿瘤实质中,M2 巨噬细胞的阳性率明显降低,而在肿瘤间质中则明显升高。此外,在肿瘤实质和肿瘤间质中,M1 的阳性率均显著增加。Li 等^[34]认为,CD8⁺T 细胞的高浸润水平和 M2

细胞的低浸润水平可能是免疫治疗的潜在预后和预测因素。在肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) 中 M1 起到抗肿瘤作用,而 M2 则促进肿瘤生长^[35]。然而,我们在巨噬细胞中的变化与一项在抗 PD-L1 应答的小鼠肺上皮细胞 (货号: TC-1) 宫颈肿瘤模型上进行的研究^[36]不一致,该研究表明,将 M2 重编程为 M1 细胞和激活的抗原提呈细胞可以导致肿瘤对 PD-L1 阻断重新反应。对于 NK 细胞,细胞毒活性较强

的CD56dim占NK细胞的90%以上,表达中等亲和力的白细胞介素-2受体(interleukin-2 receptor, IL-2R),而CD56bright可产生大量的细胞因子,主要发挥免疫调节作用,高表达IL-2R^[34,37]。此外,NK细胞通常被认为具有治疗潜力,特别是CD56bright^[38]。然而,在P2的肿瘤间质和实质中,CD56bright始终处于高水平。该患者中高水平的CD8⁺T和CD56bright的mIHC结果与免疫治疗后的临床反应一致。然而,耐药后免疫细胞的变化与之前报道的LUAD不一致,这可能是由于TKI干扰引起的。此外,这也可能表明了SqCLC患者的独特性,特别是那些具有致癌驱动突变的患者。

正如Qu等^[39]报道的,免疫细胞在LUAD和SqCLC之间存在显著差异,如M2和活化的NK细胞在LUAD较高,而M1和静息的NK细胞在LUAD较低。在我们研究中其他4例进行mIHC检测患者中,3例显示肿瘤间质中CD8⁺T细胞浸润水平较高(>5%)。这也可以进一步解释,TIME富含来自免疫细胞的趋化因子^[40],从而提示了免疫治疗的可能性。然而,这4例患者的CD56bright浸润水平均较低。一些对EGFR或ALK突变NSCLC患者的研究^[41-43]显示,PD-L1抑制剂的ORR水平较低,但对TKIs耐药后PD-L1水平较高。mIHC结果初步提示,免疫治疗可能在未来有利于这类患者,为进一步探索具有致癌驱动突变的SqCLC患者的免疫治疗提供了证据。

由于我们的研究样本量小,只有2例患者进行了PDO药敏试验,同时未进行基因验证。如果将来有更多的患者和可获得的组织样本,应该添加更多的数据来支持我们的研究结果。此外,患者来源的PDO模型也应进行基因检测,以确保其基因组的一致性,而药敏试验的结果也将更好地指导临床用药。同样,只有5例患者接受了mIHC检测,因此无法进一步探讨TIME中细胞浸润与靶向治疗或免疫治疗疗效之间的相关性,以及具有不同致癌驱动突变的SqCLC患者中TIME的特异性差异。有必要进行更多更大样本量的研究来重点关注靶向治疗和免疫治疗对具有致癌驱动突变晚期SqCLC患者的疗效。

综上,本研究初步分析了本中心真实世界中驱动基因阳性晚期肺鳞癌患者的突变率、不同治疗疗效、肿瘤免疫微环境特征。本研究的不足在

于这是一项单中心的回顾性分析,样本量较小,可能存在选择偏倚。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1):11-30.
- [2] MOLINA J R, YANG P, CASSIVI S D, et al. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5):584-594.
- [3] CHEN Z, FILLMORE C M, HAMMERMAN P S, et al. Non-small-cell lung cancers: A heterogeneous set of diseases[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(8):535-546.
- [4] VOGELSTEIN B, PAPADOPOULOS N, VELCULESCU V E, et al. Cancer genome landscapes [J]. Science, 2013, 339(6127):1546-1558.
- [5] HAN J Y, PARK K, KIM S W, et al. First-SIGNAL: First-line single-agent irressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(10):1122-1128.
- [6] ZHOU C C, WU Y L, CHEN G Y, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 study [J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8):735-742.
- [7] 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.
- [8] ZHOU C C, WU Y L, LIU X, et al. Over all survival (OS) results from OPTIMAL (CTONG0802), a phase III trial of erlotinib (E) versus carboplatin plus gemcitabine (GC) as first-line treatment for Chinese patients with EGFR mutation-positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. J Clin Oncol, 2012, 30(15S):Abstr7520.
- [9] ROSELL R, CARCERENY E, GERVAIS R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(3):239-246.
- [10] FUKUOKA M, WU Y L, THONGPRASERT S, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS) [J]. J Clin Oncol, 2011, 29(21):2866-2874.
- [11] HIRSCH F R, HERBST R S, GANDARA D R. EGFR tyrosine kinase inhibitors in squamous cell lung cancer [J]. Lancet

- Oncol, 2015, 16(8):872-873.
- [12] JOSHI A, ZANWAR S, NORONHA V, et al. EGFR mutation in squamous cellcarcinoma of the lung: does it carry the same connotation as in adenocarcinomas? [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10:1859-1863.
- [13] TAGLIAMENTO M, GENOVA C, RIJAVEC E, et al. Afatinib and erlotinib in the treatment of squamous-cell lung cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(18):2055-2062.
- [14] Guidelines Working Committee of Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO). Guidelines of Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) non - small cell lung cancer (2021) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2021. [中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会非小细胞肺癌指南(2021)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2021.]
- [15] CAPPUZZO F, VARELLA G M, SHIGEMATSU H, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(22):5007-5018.
- [16] ZHANG X C, YANG J J, CHEN H J, et al. MET overexpression as a promising therapeutic target in non - small cell lung cancer with acquired resistance to EGFR TKIs. *J Clin Oncol*, 2014, 32(15S):Abstr e19047.
- [17] CHEN J H, CHU X P, ZHANG J T, et al. Genomic characteristics and drug screening among organoids derived from non-small cell lung cancer patients [J]. *Thorac Cancer*, 2020, 11(8): 2279-2290.
- [18] ZHANG C, YIN K, LIU S Y, et al. Multiomics analysis reveals a distinct response mechanism in multiple primary lung adenocarcinoma after neoadjuvant immunotherapy [J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(4): e002312.
- [19] LEE S E, KIM Y J, SUNG M J, et al. Association with PD-L1 expression and clinicopathological features in 1000 lung cancers: A large single-institution study of surgically resected lung cancers with a high prevalence of EGFR mutation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4794.
- [20] GAO Q Y, WANG Q Y, PENG K C, et al. RET-rearranged squamous cell carcinoma of the lung responding to first-line immunotherapy plus chemotherapy [J]. *J Thorac Oncol*, 2021, 16(3S):Abstr S686.
- [21] TOKITO T, AZUMA K, KAWAHARA A, et al. Predictive relevance of PD - L1 expression combined with CD8 + TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 55:7-14.
- [22] GOU L Y, WU Y L. Prevalence of driver mutations in non-small-cell lung cancers in the People's Republic of China [J]. *Lung Cancer (Auckl)*, 2014, 5:1-9.
- [23] DEARDEN S, STEVENS J, WU Y L, et al. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: Meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap) [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9):2371-2376.
- [24] ZHANG Z H, NI C C, YU M, et al. Gene mutation analysis of EGFR in 105 cases of non - small cell lung cancer [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2011, 46(8):740-742. [张志红, 倪琛琛, 于敏, 等. 105例非小细胞肺癌表皮生长因子受体基因突变分析 [J]. *安徽医科大学学报*, 2011, 46(8):740-742.]
- [25] AN C L, LU H H, SHI H, et al. EGFR gene mutation in tumor tissue and peripheral blood from patients with non - small - cell lung cancer [J]. *Med J of Communications*, 2010, 24(6):612-616. [安超伦, 陆辉辉, 施海, 等. 非小细胞肺癌患者肿瘤组织及外周血 EGFR 基因突变研究 [J]. *交通医学*, 2010, 24(6):612-616.]
- [26] ZHANG Q, ZHU L, ZHANG J. Epidermal growth factor receptor gene mutation status in pure squamous-cell lung cancer in Chinese patients [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15:88.
- [27] ZHOU S Z, WANG H L, JIANG W, et al. Clinicopathological characteristics and EGFR-TKIs efficacies in lung squamous cell carcinoma patients harboring an sensitizing mutation [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:8863-8871.
- [28] FANG W, ZHANG J, LIANG W, et al. Efficacy of epidermal growth factor receptor - tyrosine kinase inhibitors for Chinese patients with squamous cell carcinoma of lung harboring EGFR mutation [J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(5):585-592.
- [29] FIALA O, PESEK M, FINEK J, et al. Gene mutations in squamous cell NSCLC: Insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(4):1705-1711.
- [30] WANG W X, SONG Z B, ZHANG Y P. Response to crizotinib in a squamous cell lung carcinoma patient harbouring echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma translocation: A case report [J]. *Thorac Cancer*, 2016, 7(3):355-357.
- [31] MAZIERES J, DRILON A, LUSQUE A, et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: Results from the IMMUNOTARGET registry [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(8): 1321-1328.
- [32] CLEVERS H. Modeling development and disease with organoids [J]. *Cell*, 2016, 165(7):1586-1597.
- [33] KIM S Y, KIM S M, LIM S, et al. Modeling clinical responses to targeted therapies by patient-derived organoids of advanced lung adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(15): 4397-4409.
- [34] LI L N, LU G J, LIU Y, et al. Low infiltration of CD8+ PD-L1+ T cells and M2 macrophages predicts improved clinical outcomes after immune checkpoint inhibitor therapy in non - small cell lung carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:658690.
- [35] XIA Y Q, RAO L, YAO H M, et al. Engineering macrophages for cancer immunotherapy and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2020, 32(40):e2002054.

[36] LIU L L, HE H M, LIANG R J, et al. ROS-inducing micelles sensitize tumor-associated macrophages to TLR3 stimulation for potent immunotherapy[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(6): 2146–2155.

[37] BJÖRKSTRÖM N K, LJUNGGREN H G, MICHAËLSSON J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(5):310–320.

[38] MYERS J A, MILLER J S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(2): 85–100.

[39] QU Y, CHENG B, SHAO N, et al. Prognostic value of immune-related genes in the tumor microenvironment of lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(6):4757–4777.

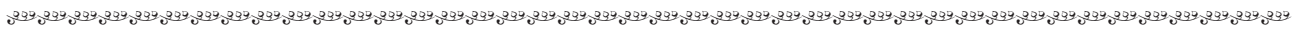
[40] DEVISSER K E, EICHTEN A, COUSSENS L M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(1):24–37.

[41] HORN L, SPIGEL D R, VOKES E E, et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer: Two-year outcomes from two randomized, open-label, phase III trials (CheckMate 017 and CheckMate 057)[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(35):3924–3933.

[42] RECK M, RODRÍGUEZ A 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.

[43] GAINOR J F, SHAW A T, SEQUIST L V, et al. EGFR mutations and ALK rearrangements are associated with low response rates to PD-1 pathway blockade in non-small cell lung cancer: A retrospective analysis[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(18):4585–4593.

[收稿日期] 2022-03-19



《循证医学》关于学术不端的界定

根据国家新闻出版署 2019 年 5 月 29 日发布的《中华人民共和国新闻出版行业标准》(CY/T 174-2019) 学术出版规范期刊学术不端行为界定, 论文作者学术不端行为类型, 包括:

1. 剽窃: 指采用不当手段, 窃取他人的观点、数据、图像、研究方法、文字表述等并以自己名义发表的行为;
2. 伪造: 编造或虚构数据、事实的行为;
3. 篡改: 故意修改数据和事实使其失去真实性的行为;
4. 不当署名: 与对论文实际贡献不符的署名或作者排序行为;
5. 一稿多投: 将同一篇论文或只有微小差别的多篇论文投给两个及以上期刊, 或者在约定期限内再转投其他期刊的行为;
6. 重复发表: 在未说明的情况下重复发表自己(或自己作为作者之一)已经发表文献中内容的行为;
7. 违背研究伦理: 论文涉及的研究未按规定获得伦理审批, 或者超出伦理审批许可范围, 或者违背研究伦理规范, 应界定为违背研究伦理;
8. 其他, 包括但不限于向编辑推荐与自己有利益关系的审稿专家、委托第三方机构或与论文内容无关的他人代写、代投、代修、未经许可使用需要获得许可的版权文献等。

请第一作者或通讯作者本人投稿, 对审稿过程中甚至已经录用的稿件发现学术不端行为, 本刊作退稿处理, 并通告作者所在单位; 对已经发表的论文, 如果发现学术不端行为, 本刊将作撤稿处理, 刊登撤稿声明, 并追究法律责任。所有学术不端行为的作者, 列入本刊黑名单, 并向期刊同行进行通报提醒。