

肿瘤相关巨噬细胞中程序性死亡受体配体 1 的表达及其与乳腺癌不良预后的关系

杨 菊¹, 李小静¹, 刘秀萍^{1,2}, 杨 珂¹, 曹 丽¹, 舒维清¹

(1. 复旦大学附属上海市第五人民医院 病理科, 上海, 200240;

2. 复旦大学基础医学院 病理学系, 上海, 200032)

摘要: **目的** 探讨肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)中程序性死亡受体配体 1(PD-L1)的表达及其与乳腺癌不良预后的关系。**方法** 通过单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)数据库、肿瘤微环境单细胞转录组学数据库(TISCH)数据集分析 165 例乳腺癌患者免疫细胞中 PD-L1 的表达。采用多色免疫荧光法检测 PD-L1 在乳腺癌 TAMs 中的表达。诱导 THP-1 单核细胞至 M2 型极化, 并与乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 共培养 24 h; 通过蛋白质印迹(Western blot)和逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 TAMs 中的 PD-L1 表达。**结果** 与原发性乳腺癌相比, 转移癌 TAMs 中 PD-L1 表达上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。TAMs 中 PD-L1 表达与乳腺癌组织学分级呈正相关($P = 0.001$), 与年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、分子亚型和远处转移无相关性($P > 0.05$)。高密度 PD-L1⁺ TAMs 浸润提示预后不良。M2 型巨噬细胞与 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞系共培养后, TAMs 中 PD-L1 mRNA 及 PD-L1 蛋白表达水平增高。**结论** 乳腺癌组织 TAMs 中 PD-L1 的表达与乳腺癌患者的组织学分级和不良预后显著正相关, 且乳腺癌细胞可刺激 M2 型巨噬细胞(TAMs 的主要成分)的 PD-L1 表达。

关键词: 乳腺癌; 肿瘤微环境; 肿瘤相关巨噬细胞; 程序性死亡受体配体 1; 不良预后

中图分类号: R 737.9; Q 813 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2022)13-068-06 DOI: 10.7619/jcmp.20220390

Expression of programmed cell death-ligand 1 of tumor-associated macrophages and its relationship with adverse prognosis of breast cancer

YANG Ju¹, LI Xiaojing¹, LIU Xiuping^{1,2}, YANG Ke¹,
CAO Li¹, SHU Weiqing¹

(1. Department of Pathology, Shanghai Fifth People's Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai, 200240; 2. Pathology Department of Basic Medical College of Fudan University, Shanghai, 200032)

Abstract: **Objective** To explore the expression of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) of tumor-associated macrophages (TAMs) and its relationship with adverse prognosis of breast cancer. **Methods** The expression of PD-L1 in immune cells of 165 breast cancer patients was analyzed by single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) database and tumor immune single-cell hub (TISCH) dataset. Multicolor immunofluorescence was used to detect the expression of PD-L1 in breast cancer TAMs. THP-1 monocytes were induced to m2-type polarization and co-cultured with breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 for 24 h; the expression of PD-L1 in TAMs was detected by western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** PD-L1 expression was significantly upregulated in metastatic TAMs compared with primary breast cancer ($P < 0.05$). The expression of PD-L1 in TAMs was positively correlated with the histological grade of breast cancer ($P = 0.001$), but had no correlation with the patient's age, tumor size, lymph node metastasis, molecular subtype and distant metastasis ($P > 0.05$). High density PD-L1⁺ TAMs infiltration suggested

收稿日期: 2022-02-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81772796); 上海市闵行区自然科学研究课题资助项目(2019MHZ032); 上海市闵行区医学特色专科建设项目(2020MWF02)

通信作者: 刘秀萍, E-mail: xpliu1228@fudan.edu.cn

a poor prognosis. When M2-type macrophages were co-cultured with MCF-7 or MDA-MB-231 cell lines, the expression levels of *PD-L1* mRNA and PD-L1 protein in TAMs increased. **Conclusion** The PD-L1 expression in breast cancer tissue TAMs is significantly positively correlated with histological grade and poor prognosis of breast cancer patients, and breast cancer cells can stimulate PD-L1 expression in M2-type macrophages (the main component of TAMs).

Key words: breast cancer; tumor microenvironment; tumor-associated macrophages; programmed cell death-ligand 1; poor prognosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,是女性癌症的第二大死亡原因^[1]。肿瘤微环境(TME)是肿瘤研究的热点,其主要由癌细胞及大量浸润性巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞组成^[2]。乳腺癌细胞可招募肿瘤相关巨噬细胞(TAMs),肿瘤组织中高密度的TAMs浸润与乳腺癌患者的不良预后相关^[3]。程序性死亡受体配体1(PD-L1)在乳腺癌中表达的研究较多,但其预后意义尚未完全清楚。原发性乳腺癌中癌细胞PD-L1的表达与高危临床病理参数和不良预后相关^[4]。癌细胞上高表达PD-L1的患者在进行新辅助化疗后获得病理完全缓解的可能性增加,而癌细胞低表达PD-L1的患者具有更好的总体生存率(OS)^[5]。乳腺癌中关于PD-L1的研究主要集中于癌细胞或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中PD-L1的表达^[6]。TAMs是TME中PD-L1表达的主要来源,且TAMs上PD-L1的表达比癌细胞上的更稳定^[7]。目前,有关巨噬细胞中PD-L1表达的研究较少。本研究检测PD-L1在TAMs中的表达及其与临床病理的相关性,探讨其可能的机制,为乳腺癌的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

使用肿瘤微环境单细胞转录组学数据库(TISCH)获取乳腺癌肿瘤组织单细胞水平转录组学信息。79个数据集中的4个数据集预测了TAMs中编码PD-L1的RNA(命名为CD274)的表达(<http://tisch.comp-genomics.org/search-gene/>)。所有参数均设置为默认值。

1.2 患者队列

本研究由医院研究伦理委员会批准,并根据方案2019MHZ032进行。收集2014年1月—2019年12月复旦大学附属上海市第五人民医院病理科165例浸润性乳腺癌患者组织及相关临床病理资料。165例患者中,82例有淋巴结转移,

83例无淋巴结转移;年龄29~88岁,中位年龄59岁。福尔马林固定的石蜡包埋组织切成4 μm的切片。根据世界卫生组织肿瘤分类标准,由病理医生进行诊断。

1.3 多色免疫荧光组织染色及抗体

所有组织均用福尔马林固定,常规技术包埋于石蜡中。组织切片(4 μm)经脱蜡、返水,并在0.1 mol/L柠檬酸钠(pH 6.0)中进行微波抗原修复,染色前用5%的羊血清封闭20 min。将载玻片上滴加2种抗体[CD68(KP1, ab955, Abcam, 1:25)]和PD-L1(SP142, CST, 1:250)的混合物(2种抗体来自不同的种属),在4℃冰箱中孵育过夜;然后在磷酸盐缓冲液(PBS)中洗涤载玻片,于暗室中与2种二抗的混合物[异硫氰酸荧光素(FITC)或Texas红结合]37℃温箱中孵育1 h;然后将载玻片在PBS中洗涤,并用Hoechst(ab228551, Abcam, 1:1 000)孵育30 s进行复染,使细胞核着色;然后在自来水中短暂冲洗载玻片,封片。立即使用荧光显微镜(蔡司)观察并拍照。

1.4 免疫荧光染色的评估

荧光显微镜低倍镜下观察切片中CD68+PD-L1⁺细胞密集区域,从每个切片中选择5个高倍视野(放大400倍)计数,取平均值即为该组织切片中PD-L1⁺TAMs浸润数量。取PD-L1⁺TAMs计数的中位数,平均值大于中位数即为PD-L1高表达,否则为低表达。

1.5 患者的生存预后

通过门诊或电话定期回访患者。总生存期定义为患者确诊至任何原因导致死亡的时间。随访时间截至2021年12月或死亡。OS测量了所有病例的死亡率,用于预后分析。

1.6 细胞培养和试剂

THP-1单核细胞在添加10%胎牛血清(FBS)(Gibco)和0.05 mmol/L β-聚体(Invitrogen)的RPMI 1640(Invitrogen)中培养。MCF-7和MDA-MB-231细胞在完全RPMI 1640培养基中培

养。所有细胞系每 2 周检查 1 次支原体,使用前均为阴性。

佛波酯(PMA)购自 Sigma Aldrich。白细胞介素(IL)-4 和 IL-13 购自 PeproTech。THP-1 单核细胞经 100 nmol/L PMA 孵育 72 h 后,在 RPMI 培养基中孵育 24 h 分化为巨噬细胞。添加 20 ng/mL IL-4 和 20 ng/mL IL-13 孵育获得 M2 型巨噬细胞。在共培养实验中,THP-1 单核细胞以 100 000 个细胞/孔的密度接种在 24 个 Transwell 板(康宁)中。巨噬细胞与 MCF-7/MDA-MB-231 细胞共培养 24 h。

1.7 蛋白质印迹(Western blot)

使用 Bio-Rad 的标准 Western blot 方案。收集 M2 型巨噬细胞,提取蛋白,用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量。取 30 mg 总蛋白/泳道装入凝胶中。使用抗 PD-L1 和 vinculin(Sigma)的抗体来检测蛋白质,并用过氧化物酶结合的山羊抗兔二抗(Abcam)孵育。使用 ImageJ 软件进行密度分析以量化条带面积。

1.8 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

RNA 提取和实时定量 PCR,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,使用 SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen, 18080-051)试剂盒合成 cDNA,按照说明书使用 PerfectStart™ Green qPCR SuperMix (Tran, AQ601)试剂盒进行 RT-PCR。热循环条件如下:95 °C 初始激活 30 s,

95 °C 进行 40 次循环 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s。实验分复孔进行。以 β -actin 为参照,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 PD-L1 基因组转录本的相对表达水平,正向和反向引物见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')
PD-L1 正向引物	GCTGCACTAATTGTCTATTGGGA
PD-L1 反向引物	AATTCGCTGTACTCGGCACC
β -actin 正向引物	CACCAATTGGCAATGAGCGCTTC
β -actin 反向引物	AGTCTTTGCGGATGTCCACGT

1.9 统计学分析

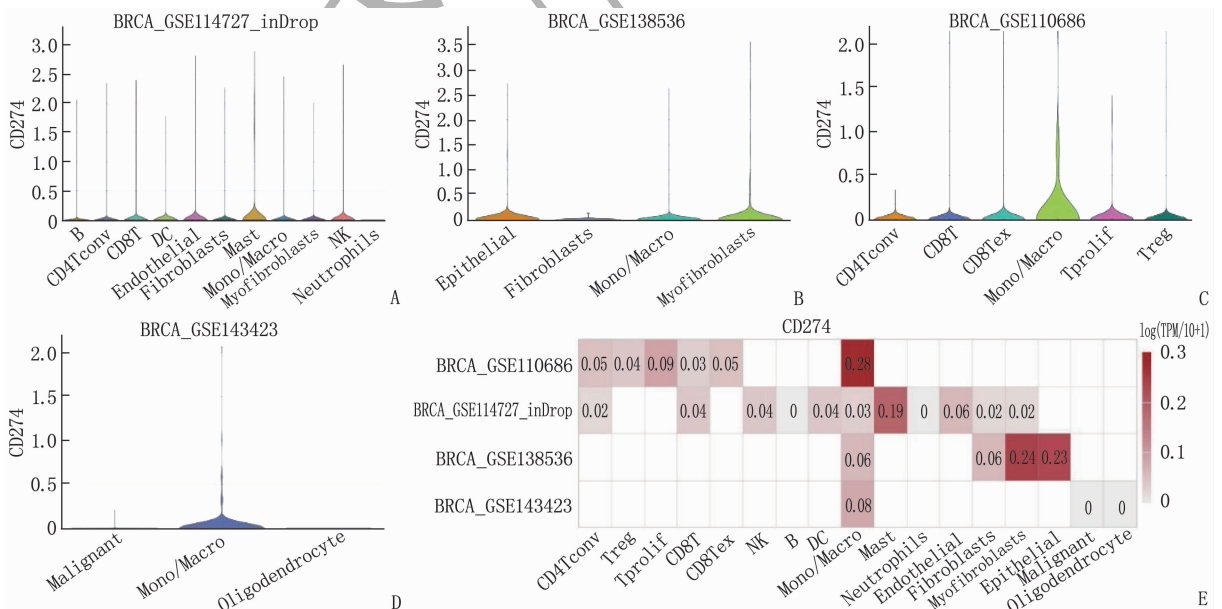
所有分析均使用 SPSS 18.0 进行。PD-L1 表达与患者临床病理特征之间的相关性采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验进行评估。Kaplan-Meier 方法用于估计 OS,对数秩检验用于比较亚组。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原发性乳腺癌组织和转移癌中 PD-L1 的表达
通过 TISCH 进行 scRNA-seq 分析,结果表明,转移性乳腺癌组织中巨噬细胞 PD-L1 的表达高于原发性乳腺癌组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 乳腺癌 TAMs 中 PD-L1 的表达

在乳腺癌组织样本的间质和癌细胞中均可观察到 PD-L1 和 CD68 的表达,其表达主要定位于

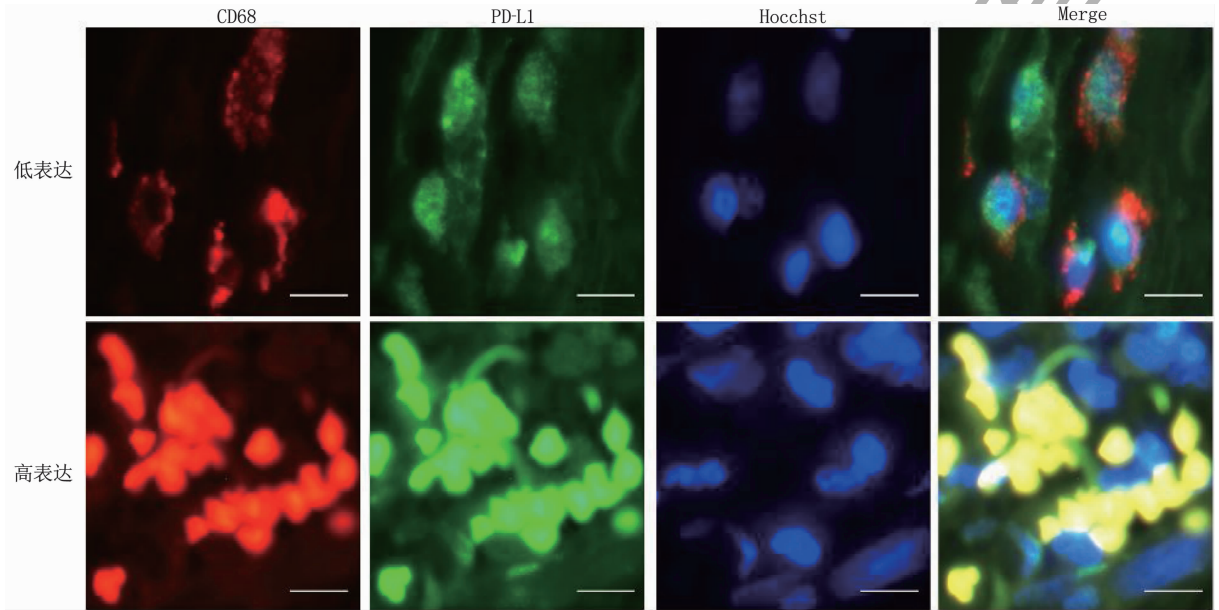


A、B: 原发性乳腺癌; C、D: 转移性乳腺癌; E: 原发性乳腺癌(BRCA_GSE114727、BRCA_GSE138536)、转移性乳腺癌(BRCA_GSE110686、BRCA_GSE143423)

图 1 原发性乳腺癌组织和转移癌中巨噬细胞 PD-L1 的表达

细胞质中,呈颗粒状(图 2)。为了检测乳腺癌 TAMs(CD68 阳性细胞)中 PD-L1 的表达,从每个切片选取 5 个高密度区域计算 PD-L1⁺CD68⁺(图 1 中黄色部分所示)细胞的数量,165 例乳腺癌患

者的中位数为(19.24 ± 10.01)/高倍视野。为了研究 TAM 中 PD-L1 表达与临床病理特征之间的关系,根据 PD-L1⁺CD68⁺细胞的中位数将乳腺癌患者分为 PD-L1 高表达组和 PD-L1 低表达组(图 2)。



比例尺为 10 μm, 计算至少 3 次独立试验平均值。

图 2 乳腺癌中 PD-L1⁺(绿色)、CD68⁺(红色)和 PD-L1⁺CD68⁺(黄色)的免疫荧光染色。

2.3 患者的临床病理特征及其与 TAMs 中 PD-L1 表达的相关性

165 例乳腺癌患者均为女性,122 例患者年龄 ≥ 50 岁,43 例年龄 < 50 岁;72 例患者肿瘤 ≤ 2 cm,78 例患者肿瘤 > 2 ~ 5 cm,15 例患者肿瘤 > 5 cm。其中 83 例患者无淋巴结转移,43 例患者 1 ~ 3 个淋巴结转移阳性,20 例患者 4 ~ 9 个

淋巴结转移阳性,19 例有 ≥ 10 个淋巴结转移阳性。诊断时,6 例患者处于 I 期,62 例患者处于 II 期,97 例患者处于 III 期或 IV 期。PD-L1⁺TAMs 浸润密度与组织学分级相关($P < 0.05$),PD-L1⁺TAMs 浸润与年龄、肿瘤直径、淋巴结转移、分子亚型和远处转移无相关性($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 患者临床病理特征及其与 TAMs 中 PD-L1 表达的关系

病理特征	分类	PD-L1 ⁺ M2 TAMs		χ^2	P
		低表达(n=83)	高表达(n=82)		
年龄	<50 岁	19	24	0.870	0.379
	≥50 岁	64	58		
肿瘤直径	≤2 cm	40	32	2.601	0.272
	2 ~ 5 cm	38	40		
	>5 cm	5	10		
淋巴结转移	0	47	36	2.707	0.439
	1 ~ 3 个	19	24		
	4 ~ 9 个	9	11		
	>10 个	8	11		
组织学分级	I 级	5	1	14.566	0.001
	II 级	41	21		
	III ~ IV 级	37	60		
分子分型	Luminal A	13	14		
	Luminal B	51	45		
人类表皮生长因子受体 2 过表达	无	19	23	0.787	0.675
	有	73	69		
远处转移	无	73	69	0.498	0.480
	有	10	13		

2.4 乳腺癌患者 PD-L1⁺TAMs 浸润密度与生存时间呈负相关

随访期间 12 例患者死于乳腺癌,最短生存时间为 1 个月。采用 Kaplan-Meier 生存分析, PD-L1⁺TAMs 高表达和低表达患者的平均生存时间分别为 88.70 和 78.58 个月。PD-L1⁺TAMs 高表达和低表达患者的生存曲线不同。PD-L1⁺TAMs 的高表达与较差的 OS 相关($P=0.014$)。见图 3。

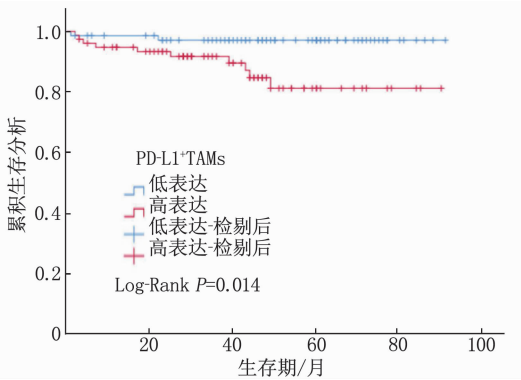


图 3 TAMs 中 PD-L1 的表达对乳腺癌预后的影响

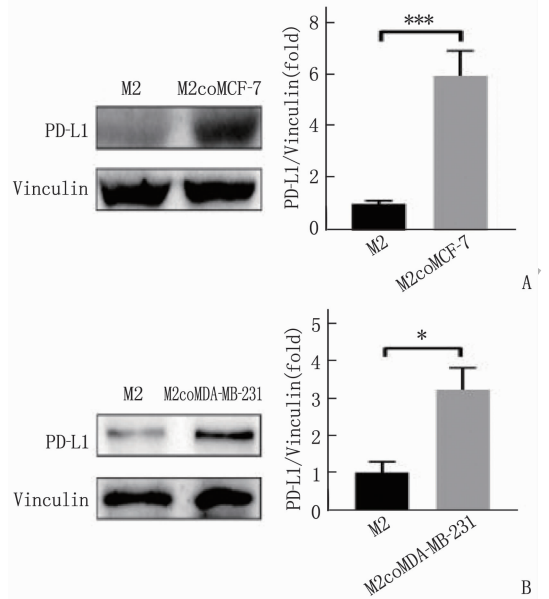
2.5 巨噬细胞中 PD-L1 的表达

通过与 PMA、IL-4 和 IL-13 孵育将 THP-1 单核细胞诱导为 M2 型巨噬细胞,并检测其中 PD-L1 的表达。Western blot 结果显示与 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞共培养 24 h 后, M2 型巨噬细胞中 PD-L1 蛋白表达水平增加($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。见图 4。在与 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞共同培养的 M2 型巨噬细胞中, PD-L1 mRNA 丰度更高($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。见图 5。

3 讨论

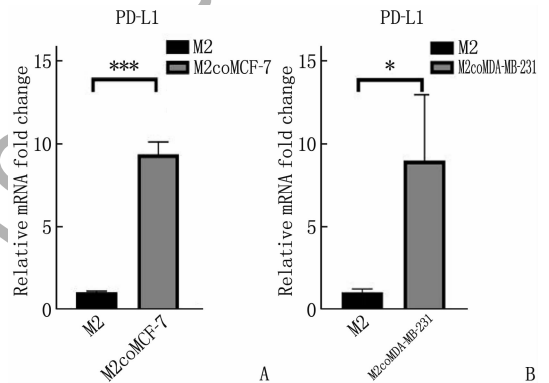
乳腺癌是一种严重影响女性身心健康的恶性肿瘤,目前主要治疗方法为手术切除、局部放疗和化疗^[1]。M2 型 TAMs 与多种癌症的生长、迁移和侵袭有关。同时, M2 型 TAMs 也可能通过表达免疫检查点蛋白 PD-L1/程序性死亡受体配体 2 (PD-L2) 和 CD80/CD86 促进免疫监视肿瘤逃逸,使 TAMs 成为免疫检查点抑制剂程序性死亡受体-1 (PD-1) 的直接靶点^[8-9]。抑制 M2 型 TAM 中 IL-10/STAT3/NF- κ B 信号通路,可阻断免疫抑制性 TME 的发展^[8]。目前,多种针对肿瘤相关巨噬细胞的治疗策略已经被开发^[9-13]。

本研究结果显示,原发性乳腺癌 TAMs 中 PD-L1 的表达与组织学分级显著正相关;原发性乳腺癌中 PD-L1⁺TAMs 的浸润密度与患者的生存



A: M2 型巨噬细胞与 MCF-7 细胞系共培养 24 h; B: M2 型巨噬细胞与 MDA-MB-231 细胞系共培养 24 h。与 M2 型巨噬细胞中 PD-L1 表达比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 4 M2 型巨噬细胞中 PD-L1 的表达。



A: M2 型巨噬细胞与 MCF-7 细胞系共培养 24 h; B: M2 型巨噬细胞与 MDA-MB-231 细胞系共培养 24 h。与 M2 型巨噬细胞中 PD-L1 mRNA 表达比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 5 M2 型巨噬细胞 PD-L1 mRNA 表达水平。

时间呈负相关;与肿瘤组织 TAMs 中 PD-L1 低表达患者相比, PD-L1 高表达患者总体生存率更差。TME 在肿瘤侵袭和转移中的作用受到广泛关注^[14]。目前, TME 被认为是诊断治疗的靶点或预后的生物标志物。在免疫系统中, TAMs 是癌症免疫抑制的主要驱动因素^[15]。研究^[4]表明,在乳腺癌患者中, TAMs 浸润率高的患者 OS 较差。

乳腺癌中 PD-L1 的表达与高 TIL 水平和存在不良预后因素呈正相关^[16]。肿瘤浸润性免疫细胞中 PD-L1 阳性表达与较差的 OS 显著相关。本研究中, PD-L1⁺TAMs 浸润数量越多, OS 越差。

TISCH 的 scRNA-seq 数据显示,与原发性乳腺癌相比,转移时巨噬细胞中 PD-L1 的表达显著上调。乳腺肿瘤组织 PD-L1⁺TAMs 浸润密度与患者生存时间呈负相关,高密度组的总体生存率显著降低。提示 PD-L1⁺TAMs 的高度浸润性是乳腺癌免疫逃逸的一个重要因素,这与单细胞分析^[17]的结果一致。巨噬细胞具有显著可塑性,使其能够有效地适应环境变化,并改变表型和生理学特性^[15]。巨噬细胞的异质性最初被描述为 2 大类: M1(经典激活)和 M2(交替激活),大多数 TAMs 更倾向于 M2 型巨噬细胞^[18-19]。本研究发现,极化后 M2 型巨噬细胞中 PD-L1 的表达显著高于 THP-1 单核细胞。本研究将 M2 型巨噬细胞与乳腺癌细胞系 MCF-7 或 MDA-MB-231 共培养 24 h, TAMs 中 PD-L1 mRNA 及 PD-L1 蛋白表达水平增高。相关研究^[20-21]显示, 4T1 细胞共培养后,巨噬细胞 PD-L1 水平增加;口腔鳞状细胞癌患者的原代肿瘤细胞可通过 IL-10 刺激单核细胞上的 PD-L1 表达,与本研究结果一致。既往研究^[6]表明, PD-L1 表达主要通过 I 型和 II 型干扰素信号途径调节。一项研究^[22]表明, TNF- α 是一种细胞因子,可导致单核细胞 PD-L1 表达上调。TAMs 中 PD-L1 表达的调节方式可能与肿瘤细胞自身不同。故 PD-L1 的表达是 TAMs 的一个重要特征,其调控理论有待进一步探讨。

综上所述,乳腺癌组织 TAMs 中 PD-L1 的表达是相关不良临床结果的独立预后因素。TAMs 中 PD-L1 阳性表达与组织学分级和不良预后显著正相关,可能在肿瘤进展中起重要作用。靶向 TAMs 中的 PD-L1 可能为乳腺癌治疗提供一种新的治疗方法。但本研究存在一定局限性,本研究未明确调节 TAMs 中 PD-L1 表达的潜在信号通路,其次仅探讨了 M2 型 TAMs 中 PD-L1 的表达,以及未证实 TAMs 中 PD-L1 的表达在抗 PD1/PD-L1 治疗中的预测价值,仍需进一步研究阐明。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA a Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.

[2] XU L P, XIE X L, LUO Y. The role of macrophage in regulating tumour microenvironment and the strategies for reprogramming tumour-associated macrophages in antitumour therapy[J]. Eur J Cell Biol, 2021, 100(2): 151153.

[3] ZHAO J D, LIU H Z, ZHANG X M, et al. Tumor cells interleukin-22 expression associates with elevated tumor-associated

macrophages infiltrating and poor prognosis in patients with breast cancer[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, 36(2): 160-166.

- [4] HUANG W F, RAN R, SHAO B, et al. Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 178(1): 17-33.
- [5] DAVEY M G, RYAN É J, DAVEY M S, et al. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand 1 expression in patients diagnosed with breast cancer: meta-analysis[J]. Br J Surg, 2021, 108(6): 622-631.
- [6] VRANIC S, CYPRIAN F S, GATALICA Z, et al. PD-L1 status in breast cancer: current view and perspectives[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 72: 146-154.
- [7] NOGUCHI T, WARD J P, GUBIN M M, et al. Temporally distinct PD-L1 expression by tumor and host cells contributes to immune escape[J]. Cancer Immunol Res, 2017, 5(2): 106-117.
- [8] CAVALCANTE R S, ISHIKAWA U, SILVA E S, et al. STAT3/NF- κ B signalling disruption in M2 tumour-associated macrophages is a major target of PLGA nanocarriers/PD-L1 antibody immunomodulatory therapy in breast cancer[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(11): 2284-2304.
- [9] CECI C, ATZORILI M G, LACAL P M, et al. Targeting tumor-associated macrophages to increase the efficacy of immune checkpoint inhibitors: a glimpse into novel therapeutic approaches for metastatic melanoma[J]. Cancers, 2020, 12(11): 3401.
- [10] BART V M T, PICKERING R J, TAYLOR P R, et al. Macrophage reprogramming for therapy[J]. Immunology, 2021, 163(2): 128-144.
- [11] ZHAO W R, HU X C, LI W H, et al. M2-like TAMs function reversal contributes to breast cancer eradication by combination dual immune checkpoint blockade and photothermal therapy[J]. Small, 2021, 17(13): e2007051.
- [12] BINNEWIES M, POLLACK J L, RUDOLPH J, et al. Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy[J]. Cell Rep, 2021, 37(3): 109844.
- [13] CENDROWICZ E, SAS Z, BREMER E, et al. The role of macrophages in cancer development and therapy[J]. Cancers, 2021, 13(8): 1946.
- [14] HERNÁNDEZ-CAMARERO P, LÓPEZ-RUIZ E, MARCHAL J A, et al. Cancer: a mirrored room between tumor bulk and tumor microenvironment[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 217.
- [15] NAKAMURA K, SMYTH M J. Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment[J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(1): 1-12.
- [16] GUO H, DING Q Q, GONG Y, et al. Comparison of three scoring methods using the FDA-approved 22C3 immunohistochemistry assay to evaluate PD-L1 expression in breast cancer and their association with clinicopathologic factors[J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1): 69.

间、漏口大小、糖化血红蛋白水平是内镜辅助治疗结直肠癌吻合口漏疗效的独立影响因素,提示当发生结直肠癌吻合口漏时,应积极控制血糖及糖化血红蛋白水平,行早期内镜治疗,并根据漏口大小选择合适的方式,使患者获得最大的临床受益。

参考文献

[1] CONG Z J, HU L H, BIAN Z Q, *et al.* Systematic review of anastomotic leakage rate according to an international grading system following anterior resection for rectal cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75519.

[2] DAVIS B, RIVADENEIRA D E. Complications of colorectal anastomoses; leaks, strictures, and bleeding[J]. *Surg Clin North Am*, 2013, 93(1): 61-87.

[3] BRUCE J, KRUKOWSKI Z H, AL-KHAIRY G, *et al.* Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery[J]. *Br J Surg*, 2001, 88(9): 1157-1168.

[4] CHOPRA S S, MRAK K, HÜNERBEIN M. The effect of endoscopic treatment on healing of anastomotic leaks after anterior resection of rectal cancer[J]. *Surgery*, 2009, 145(2): 182-188.

[5] KÄHLER G. Anastomotic leakage after upper gastrointestinal surgery; endoscopic treatment[J]. *Visc Med*, 2017, 33(3): 202-206.

[6] CLIFFORD R E, FOWLER H, GOVINDARAJAH N, *et al.* Early anastomotic complications in colorectal surgery: a systematic review of techniques for endoscopic salvage[J]. *Surg Endosc*, 2019, 33(4): 1049-1065.

[7] 王艳丽, 谢霞, 周建云, 等. OTSC 吻合夹在内镜下治疗食管癌术后吻合口瘘中的应用[J]. *局解手术学杂志*, 2019, 28(4): 299-302.

[8] 李玮浩, 赵松, 崔广晖, 等. 内镜下钛夹治疗食管癌胃癌术后吻合口瘘[J]. *中国内镜杂志*, 2013, 19(5): 516-518.

[9] 唐亮, 陈征, 黄志刚, 等. 肠镜辅助-纽扣内置肠腔堵压治疗大肠吻合口瘘两例(附文献复习)[J]. *皖南医学院学报*, 2010, 29(5): 369-371.

[10] MARTIN G, DUPRÉ A, MÜLLIEZ A, *et al.* Validation of a score for the early diagnosis of anastomotic leakage following elective colorectal surgery[J]. *J Visc Surg*, 2015, 152(1): 5-10.

[11] MCDERMOTT F D, HEENEY A, KELLY M E, *et al.* Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks[J]. *Br J Surg*, 2015, 102(5): 462-479.

[12] SHOGAN B D, CARLISLE E M, ALVERDY J C, *et al.* Do we really know why colorectal anastomoses leak? [J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(9): 1698-1707.

[13] 喻学桥, 周卫平, 蔡国豪, 等. 结直肠漏评分系统预测左侧结直肠切除术后吻合口漏的分析[J]. *中华普通外科杂志*, 2015, 30(6): 447-450.

[14] 中华医学会外科学分会结直肠外科学组, 张忠涛. 中国直肠癌手术吻合口漏诊断、预防及处理专家共识(2019版)[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2019, 22(3): 201-206.

[15] RAHBARI N N, WEITZ J, HOHENBERGER W, *et al.* Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum; a proposal by the International Study Group of Rectal Cancer[J]. *Surgery*, 2010, 147(3): 339-351.

[16] MIRNEZAMI A, MIRNEZAMI R, CHANDRAKUMARAN K, *et al.* Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak; systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Surg*, 2011, 253(5): 890-899.

[17] ANGEJA B G, DE LEMOS J, MURPHY S A, *et al.* Impact of diabetes mellitus on epicardial and microvascular flow after fibrinolytic therapy[J]. *Am Heart J*, 2002, 144(4): 649-656.

[18] SINGLETON J R, SMITH A G, RUSSELL J W, *et al.* Microvascular complications of impaired glucose tolerance[J]. *Diabetes*, 2003, 52(12): 2867-2873.

[19] REUDINK M, HUISMAN D E, VAN ROOIJEN S J, *et al.* Association between intraoperative blood glucose and anastomotic leakage in colorectal surgery[J]. *J Gastrointest Surg*, 2021, 25(10): 2619-2627.

[20] BOSMANS J W A M, JONGEN A C H M, BIRCHENOUGH G M H, *et al.* Functional mucous layer and healing of proximal colonic anastomoses in an experimental model[J]. *Br J Surg*, 2017, 104(5): 619-630.

[21] WEILAND T, ROHRER S, SCHMIDT A, *et al.* Efficacy of the OTSC System in the treatment of GI bleeding and wall defects; a PMCF meta-analysis[J]. *Minim Invasive Ther Allied Technol*, 2020, 29(3): 121-139.

[22] LAMAZZA A, STERPETTI A V, DE CESARE A, *et al.* Endoscopic placement of self-expanding stents in patients with symptomatic anastomotic leakage after colorectal resection for cancer: long-term results[J]. *Endoscopy*, 2015, 47(3): 270-272.

[23] WILSON J L, LOUIE B E, FARIVAR A S, *et al.* Fully covered self-expanding metal stents are effective for benign esophagogastric disruptions and strictures[J]. *J Gastrointest Surg*, 2013, 17(12): 2045-2050.

[24] 徐义军, 张文杰. 消化道吻合口瘘内镜微创治疗的现状及进展[J]. *中华普通外科杂志*, 2019, 28(4): 491-497.

[25] VAN BOECKEL P G, DUA K S, WEUSTEN B L, *et al.* Fully covered self-expandable metal stents (SEMS), partially covered SEMS and self-expandable plastic stents for the treatment of benign esophageal ruptures and anastomotic leaks[J]. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12: 19.

(本文编辑: 梁琥)

(上接第 73 面)

[17] WU S Z, AL-ERYANI G, RODEN D L, *et al.* A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers[J]. *Nat Genet*, 2021, 53(9): 1334-1347.

[18] HINSHAW D C, SHEVDE L A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(18): 4557-4566.

[19] MANTOVANI A, MARCHESI F, JAILLON S, *et al.* Tumor-associated myeloid cells: diversity and therapeutic targeting[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(3): 566-578.

[20] JING W Q, GUO X, WANG G Y, *et al.* Breast cancer cells promote CD169⁺ macrophage-associated immunosuppression through

JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 106012.

[21] JIANG C H, YUAN F L, WANG J, *et al.* Oral squamous cell carcinoma suppressed antitumor immunity through induction of PD-L1 expression on tumor-associated macrophages[J]. *Immunobiology*, 2017, 222(4): 651-657.

[22] HARTLEY G, REGAN D, GUTH A, *et al.* Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF- α [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(4): 523-535.

(本文编辑: 周娟)