

宫颈癌患者外周血淋巴细胞的表达及其与乏氧诱导因子-1 α 的关系

原娜,王磊,席强,邹念东,张贤雨,张剑红

(河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000)

摘要: [目的] 评价外周血淋巴细胞与宫颈癌临床病理特征及乏氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的关系。 [方法] 采用流式细胞法检测 68 例宫颈鳞癌患者外周血淋巴细胞和免疫组化法检测相应的组织标本中 HIF-1 α 蛋白表达。 [结果] 与 FIGO I/II 期和无淋巴结转移相比,宫颈癌患者外周血中 CD $_4^+$ T、CD $_4^+$ CD $_{25}^{+high}$ CD127 $^{low/neg}$ 、CD $_4^+$ CD $_{25}^{+}$ FoxP $_3^+$ 细胞在 FIGO III 期、淋巴结转移患者明显升高。HIF-1 α 在宫颈癌组织中的阳性和阴性表达率分别为 58.8% 和 41.2%, 其中 CD $_4^+$ CD $_{25}^{+high}$ CD127 $^{low/neg}$ 和 CD $_4^+$ CD $_{25}^{+}$ FoxP $_3^+$ 细胞与 HIF-1 α 呈正相关。68 例患者中位随访时间 60 个月,5 年总生存率为 52.9%, 其中 HIF-1 α (+)和 HIF-1 α (-)患者 5 年生存率分别为 42.5% 和 67.9% ($\chi^2=4.145$, $P=0.042$)。Cox 回归分析提示 HIF-1 α 是宫颈癌的危险因素。 [结论] 宫颈癌淋巴细胞的变化与 HIF-1 α 有关。宫颈癌患者外周血淋巴细胞分布异常,均参与宫颈癌的浸润和转移,有望作为宫颈癌病情评估的参与指标。

关键词: 宫颈癌;乏氧诱导因子-1 α ;淋巴细胞

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)03-0185-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.03.B004

Distribution of Peripheral Blood Lymphocyte Subgroups and Expression of HIF-1 α in Patients with Cervical Cancer

YUAN Na, WANG Lei, XI Qiang, ZOU Nian-dong, ZHANG Xian-yu, ZHANG Jian-hong
(The First Affiliated Hospital of Hebei Northern University; Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: [Objective] To study the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) in tumor tissue and the distribution of peripheral blood lymphocyte subgroups in patients with cervical cancer. [Methods] The flow cytometry was used to examine distribution of peripheral blood lymphocyte subgroups in 68 patients with cervical squamous carcinoma and immunohistochemistry was applied to detect expression levels of HIF-1 α in tumor tissues. [Results] Compared to patients with FIGO I/II stages and without lymph node metastasis, the levels of CD $_4^+$ T cell, CD $_4^+$ CD $_{25}^{+high}$ CD127 $^{low/neg}$ and CD $_4^+$ CD $_{25}^{+}$ FoxP $_3^+$ cells were significantly increased in patients with FIGO III stage and lymph metastasis ($P<0.05$). The expression rate of HIF-1 α in cervical carcinoma was 58.8%. The CD $_4^+$ CD $_{25}^{+high}$ CD127 $^{low/neg}$ and CD $_4^+$ CD $_{25}^{+}$ FoxP $_3^+$ cells were positively associated with the expression of HIF-1 α protein. The patients were followed up for medium 60 months, and the 5-year overall survival rate was 52.9%. The 5-year survival in patients with positive and negative HIF-1 α expression was 42.5% and 67.9% respectively ($\chi^2=4.145$, $P=0.042$). Cox regression analysis showed that the expression of HIF-1 α was an independent risk factor for the survival of cervical cancer ($P<0.05$). [Conclusion] The abnormal lymphocyte subgroup distribution exists in peripheral blood of cervical cancer patients, it is correlated with the HIF-1 α expression, which may be used to assess the progress of cervical cancer patients.

Subject words: cervical cancer; hypoxia inducible factor-1 α ; lymphocyte

恶性肿瘤发生发展与肿瘤微环境密切相关,特

别是免疫微环境的失衡,不仅可以改变调节性和效应性 T 细胞的功能,而且促进调节性 T 细胞(regulatory cells, Treg)、肿瘤相关巨噬细胞、髓源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)等免疫抑制细胞的表达^[1-2]。其中辅助性 T 细胞(CD $_3^+$ CD $_4^+$ T, 简

基金项目: 河北省卫生计生厅科研基金项目(20180861)

通信作者: 原娜,主治医师,硕士;河北北方学院附属第一医院放疗科,河北省张家口市桥西区长青路 12 号(075000);E-mail: yuannuo1983@126.com

收稿日期: 2019-06-25; **修回日期:** 2019-09-18

称 CD₄⁺T 和效应性 T 细胞(CD₃⁺CD₈⁺T, 简称 CD₈⁺T)因其功能不同受到关注。CD₄⁺T 细胞认为具有免疫双刃剑—免疫刺激和免疫抑制作用, 在肿瘤中发现其可启动和维持抗肿瘤免疫反应, 而 CD₈⁺T 细胞通过结合肿瘤表面主要组织相容性复合体 I 型(major histocompatibility complex, MHC) 分子直接发挥抗肿瘤作用。CD₈⁺T 细胞与 CD₄⁺Treg 细胞在肿瘤发展中起着重要的作用^[3]。CD₄⁺Treg 细胞除了抑制 CD₈⁺T 细胞, 还促进其凋亡; 可表达内源性抗凋亡分子而使肿瘤细胞免于坏死。其中 CD₄⁺ CD₂₅^{+/high}CD127^{low/neg} 和 CD₄⁺ CD₂₅⁺FoxP3⁺细胞是 CD₄⁺Treg 细胞的两个特征性组合^[4]。多项研究已证实, 肝癌、头颈部肿瘤、宫颈癌等患者外周血中发现 Treg 细胞与 CD₈⁺T 细胞“交流”^[5]。

多数研究认为放疗敏感性下降与肿瘤微环境的改变有关, 其中, 乏氧的存在是造成放疗抵抗的重要因素^[6]。乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是乏氧条件下激活的产物, 可保护肿瘤细胞免于治疗的杀伤作用, 被作为乏氧的特征性标志物^[7]。HIF-1 α 在调节固有性和适应性免疫也起着重要作用, 参与 T 细胞的分化^[8]。因此, 本研究探讨同步放化疗宫颈癌患者组织标本中 HIF-1 α 的表达与外周血淋巴细胞的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取河北北方学院附属第一医院 2013 年 1 月至 2014 年 1 月期间宫颈鳞癌患者外周血及其组织蜡块 68 例。年龄 33~75 岁, 中位年龄 60 岁, 年龄 $\leq$ 60 岁 40 例, $>$ 60 岁 28 例; 按国际妇产科联盟(2014 版 FIGO)宫颈癌分期 I B 期 12 例, II 期 33 例, III 期 23 例; 肿瘤大小 $\leq$ 4cm 26 例, $>$ 4cm 42 例; 淋巴结转移阳性 32 例, 淋巴结转移阴性 36 例。所有患者经活检病理证实后行同步放化疗, 治疗前无手术、无自身免疫性疾病及高血压等其他慢性病。所有标本均经过 10% 福尔马林中性溶液浸泡, 常规脱水, 透明, 浸蜡, 石蜡包埋。

1.2 主要试剂

CD3-APC/CD4-FITC/CD8-PE 单克隆抗体、CD4-FITC/CD25-PE/CD127-RPE/FoxP3⁺-RPE 单克隆抗体

和兔抗人 HIF-1 α 单克隆抗体购自美国 Epitomics 公司, 人血浆抗凝蛋白 S(SP)试剂盒及二氨基联苯胺染色剂(DAB)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。按 SP 法进行操作, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知的阳性切片同时同一条件下染色作阳性对照。

1.3 免疫组化 HIF-1 α 判定标准

按 S-P 法进行操作, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知的阳性切片同一条件下染色作阳性对照。HIF-1 α 结果采用半定量积分法。

HIF-1 α 表达强度判定标准: 未见阳性细胞者及阳性细胞数 $\leq$ 5% 为 0 分, 6%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, $\geq$ 76% 为 4 分; 显色度按细胞着色深浅计分: 0 分无着色, 1 分浅黄色, 2 分棕黄色, 3 分棕褐色。两者积分相乘, 0~4 分为阴性, 5~12 分为阳性。

1.4 RTOG、ESTRO 等靶区勾画及放疗计划制定

放疗采用调强放疗, 常规分割, 包括盆腔 (45~50Gy/25F)+腔内近距离(35Gy/7F), A 点剂量 80~85Gy。同步单药顺铂 40mg/m² 周方案化疗, 4~6 周期。

1.5 随访

患者治疗结束后 1 个月开始随访, 以后每 3 个月随访一次至 2 年, 2~5 年每 6 个月随访一次, 5 年后每 1 年随访一次, 3 年无联系者归为失访。全组病例随访时间截止到 2018 年 12 月。生存时间(overall survival, OS) 为从放疗开始至随访截止或因肿瘤原因死亡的时间, 患者死亡为终点事件, 失访、存活或死于非肿瘤的计为截尾数据。

1.6 统计学处理

数据分析采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 比较用单因素方差分析, 计数资料以率(%)表示, 比较采用 χ^2 检验, 相关分析采用 Spearman 法。采用 Kaplan-Meier 生存分析法评估总生存率, 并采用 Log-Rank 检验差异, 影响生存的多因素分析采用 Cox 回归模型。P $<$ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌外周血淋巴细胞水平与临床特征关系

68 例宫颈癌患者外周血 CD₄⁺T 细胞、CD₈⁺T 细胞、CD₄⁺CD₂₅^{+/high}CD127^{low/neg} 和 CD₄⁺CD₂₅⁺FoxP3⁺细胞水

平在 FIGO I B、II 和 III 期分别 $(24.33 \pm 0.92)\%$ 、 $(24.96 \pm 1.28)\%$ 、 $(4.23 \pm 0.71)\%$ 、 $(3.97 \pm 0.57)\%$ ； $(25.25 \pm 1.83)\%$ 、 $(24.65 \pm 1.15)\%$ 、 $(4.45 \pm 0.39)\%$ 、 $(4.16 \pm 0.28)\%$ 和 $(26.06 \pm 1.24)\%$ 、 $(23.57 \pm 1.43)\%$ 、 $(4.71 \pm 0.61)\%$ 、 $(4.36 \pm 0.38)\%$ ；在有淋巴结转移及无淋巴结转移分别为 $(26.05 \pm 1.42)\%$ 、 $(23.99 \pm 1.44)\%$ 、 $(4.70 \pm 0.49)\%$ 、 $(4.35 \pm 0.40)\%$ 和 $(24.75 \pm 1.56)\%$ 、 $(24.66 \pm 1.25)\%$ 、 $(4.32 \pm 0.56)\%$ 、 $(4.06 \pm 0.34)\%$ ；差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)；而在不同年龄、肿瘤大小间无统计学差异 ($P > 0.05$) (Table 1)。

2.2 宫颈癌组织标本中 HIF-1 α 表达

HIF-1 α 阳性呈棕黄色颗粒，表达于肿瘤细胞核 (Figure 1, 2)，HIF-1 α 在宫颈癌组织中阳性和阴性表达率分别为 58.8% 和 41.2%。

2.3 宫颈癌组织标本中 HIF-1 α 表达与外周血淋巴细胞水平的关系

68 例宫颈癌组织标本中 HIF-1 α (+)40 例，HIF-1 α (-)28 例。其中 HIF-1 α (+)和 HIF-1 α (-)组中 CD_4^+ T 细胞、 CD_8^+ T 细胞、 $CD_4^+CD_{25}^{+high}CD_{127}^{low/neg}$ 和 $CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$ 细胞的百分比分别为 $(25.38 \pm 1.64)\%$ 、 $(24.19 \pm 1.31)\%$ 、 $(4.58 \pm 0.62)\%$ 、 $(4.26 \pm 0.44)\%$ 和 $(25.33 \pm 1.62)\%$ 、 $(24.56 \pm 1.45)\%$ 、 $(4.29 \pm 0.40)\%$ 和 $(4.10 \pm 0.30)\%$ 。Spearman 法分析，HIF-1 α 与 Treg 细胞呈正相关，其中 $CD_4^+CD_{25}^{+high}CD_{127}^{low/neg}$ 和 $CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$ 细胞相关系数分别为 0.216 和 0.220，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；而 HIF-1 α 与 CD_4^+ T 细胞、 CD_8^+ T 细胞无相关性 ($P > 0.05$) (Table 2)。

Table 1 Comparison peripheral blood lymphocytes in cervical cancer patients(%)

Clinical characters	N	CD_4^+	CD_8^+	$CD_4^+CD_{25}^{+high}CD_{127}^{low/neg}$	$CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$
Age(years old)					
≤ 60	40	25.25 ± 1.69	24.28 ± 1.41	4.16 ± 0.41	4.45 ± 0.58
> 60	28	25.52 ± 1.52	24.43 ± 1.34	4.18 ± 0.39	4.46 ± 0.53
P		0.495	0.669	0.514	0.429
FIGO stage					
I B	12	$24.33 \pm 0.92^*$	$24.96 \pm 1.28^*$	$4.23 \pm 0.71^*$	$3.97 \pm 0.57^*$
II	33	25.25 ± 1.83	24.65 ± 1.15	4.45 ± 0.39	4.16 ± 0.28
III	23	26.06 ± 1.24	23.57 ± 1.43	4.71 ± 0.61	4.36 ± 0.38
P		0.008	0.002	0.038	0.013
Tumor size					
$\leq 4cm$	26	25.35 ± 1.64	23.97 ± 1.54	4.25 ± 0.33	4.49 ± 0.50
$> 4cm$	42	25.37 ± 1.63	24.57 ± 1.22	4.12 ± 0.44	4.43 ± 0.59
P		0.970	0.077	0.962	0.374
Lymph metastasis					
Yes	32	$26.05 \pm 1.42^*$	$23.99 \pm 1.44^*$	$4.70 \pm 0.49^*$	$4.35 \pm 0.40^*$
No	36	24.75 ± 1.56	24.66 ± 1.25	4.32 ± 0.56	4.06 ± 0.34
P		0.001	0.043	0.004	0.002

Note: *, $P < 0.05$ 。

Table 2 Correlation of HIF-1 α level and peripheral blood lymphocytes in cervical cancer patients(%)

Index	HIF-1 α (+) (n=40)	HIF-1 α (-) (n=28)	r	P
CD_4^+	25.38 ± 1.64	25.33 ± 1.62	0.042	0.367
CD_8^+	24.19 ± 1.31	24.56 ± 1.45	0.097	0.216
$CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^{low/neg}$	4.58 ± 0.62	4.29 ± 0.40	0.216	0.038
$CD_4^+CD_{25}^+FoxP_3^+$	4.26 ± 0.44	4.10 ± 0.30	0.220	0.035

2.4 宫颈癌组织 HIF-1 α 表达和外周血淋巴细胞水平与生存间关系

68 例患者中位随访时间 60 个月，其中 36 例存活，5 年总生存率为 52.9%。HIF-1 α (+) 有 17 例存活，5 年生存率为 42.5%，HIF-1 α (-) 19 例存活，5 年生存

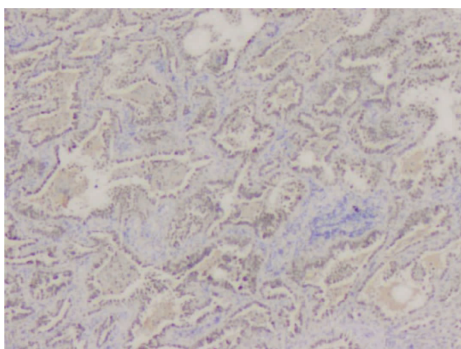


Figure 1 Positive expression of HIF-1 α in cervical cancer tissue (×100)

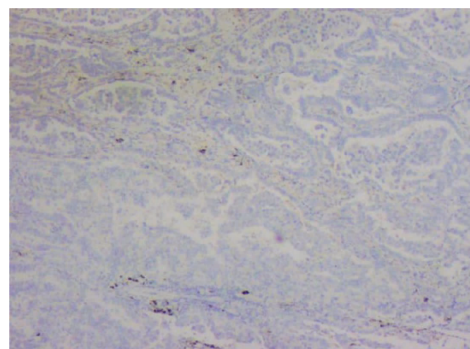


Figure 2 Negative expression of HIF-1 α in cervical cancer tissues (×100)

率为 67.9%, 差异有统计学意义($\chi^2=4.145, P=0.042$)。Cox 回归分析提示 HIF-1 α 是宫颈癌的危险因素($P<0.05$), 而 CD4⁺T、CD8⁺T、CD4⁺CD25⁺/high CD127^{low/neg} 和 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 细胞均不是宫颈癌独立的危险因素($P>0.05$) (Figure 3, Table 3)。

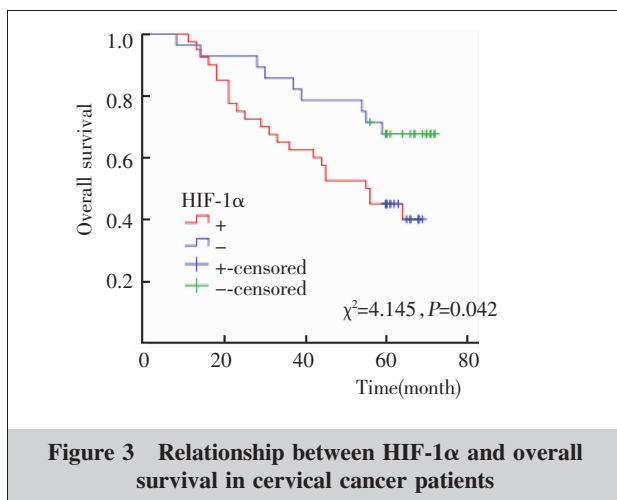


Figure 3 Relationship between HIF-1 α and overall survival in cervical cancer patients

Table 3 Cox regression analysis on HIF-1 α and peripheral blood lymphocytes in cervical cancer patients

Variance	β	SE	Wald	OR	95%CI	P
HIF-1 α	0.882	0.431	4.196	2.416	1.039~5.618	0.042
CD4 ⁺	0.035	0.102	0.117	0.966	0.790~1.180	0.732
CD8 ⁺	0.106	0.236	0.202	1.112	0.701~1.764	0.653
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low/neg}	0.127	0.509	0.062	0.881	0.325~2.391	0.804
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0.025	0.710	0.001	1.026	0.255~4.125	0.971

3 讨论

研究报道肿瘤患者体内缺乏 CD8⁺T 细胞时, CD4⁺T 适应性发挥抗肿瘤作用^[9]。研究发现宫颈癌组织中 CD4⁺Tregs 细胞升高, 考虑与肿瘤微环境改变有关, 包括免疫细胞的失衡和间质成分变化, 从而促使 CD4⁺T 分化为 CD4⁺Tregs 细胞^[10]。多项研究发现宫颈癌患者外周血中 CD4⁺Tregs 细胞升高^[5, 10]。本研究发现 CD4⁺T 及 CD4⁺CD25⁺/high CD127^{low/neg}、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 细胞均与宫颈癌 FIGO 分期(肿瘤浸润程度)和淋巴结转移间有关, 说明 CD4⁺T 和 CD4⁺Tregs 细胞参与宫颈癌细胞浸润及转移, 可能是调节性 T 细胞引起免疫靶点如程序性死亡受体-1 (programmed cell death-1, PD-1)、细胞毒 T 淋巴细胞相关蛋白(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)和人类白细胞抗原-E(human leukocyte antigen-E, HLA-E)等分

子的升高, 导致 M1 巨噬细胞和 I 型 MHC 相关链分子 A 的减少, 辅助宫颈癌细胞的免疫逃逸和发展^[11-12]。但是, CD4⁺T 和 CD4⁺Tregs 细胞与年龄及肿瘤大小无统计学意义相关, 特别是肿瘤大小, 也是肿瘤浸润深度的表现。随着癌细胞浸透宫颈屏障向周围扩散时, CD4⁺T 细胞的分化功能紊乱, 促使分化为 CD4⁺Tregs 细胞的数量持续升高, 增强免疫功能的抑制。研究发现宫颈鳞癌细胞表面出现异常糖基化, 通过糖结合受体巨噬细胞半乳糖-型别素影响骨髓免疫细胞的成熟和分化, 阻断 CD8⁺T 细胞的激活并诱导其凋亡, 促进癌细胞的转移^[13]。本研究中 CD8⁺T 细胞在宫颈癌 FIGO 分期及淋巴结转移间有差异, 并随着分期越晚, 转移越多, CD8⁺T 细胞逐渐减少, 提示随着宫颈癌细胞的浸润和转移, 免疫效应 CD8⁺T 细胞数量出现减少并影响杀伤功能, 这与 Das 研究^[14]结果相似。

研究认为机体免疫状态的失衡与肿瘤微环境密切相关, 涉及到肿瘤内乏氧和肿瘤间质成分的改变。乏氧不仅利于 CD4⁺Tregs 细胞分化并免于凋亡, 而促

进 CD4⁺T 细胞的增殖转化及抑制其分泌细胞因子的功能^[15-16]。在乏氧状态下, HIF-1 α 在调节固有性和适应性免疫细胞如巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等功能中起着重要作用。本研究发现 HIF-1 α 阳性的患者, CD4⁺Tregs 细胞的两种组分较 HIF-1 α 阴性者升高, 而 CD4⁺T 细胞有升高趋势, CD8⁺T 细胞有下降趋势但均无统计学

意义, 说明作为具有慢性缺氧特征的宫颈癌组织, HIF-1 α 升高可影响免疫功能, 参与肿瘤浸润及转移, 原因如下: 在肿瘤浸润的早期阶段, HIF-1 α 通过改变代谢途径如糖酵解和脂肪合成等影响 mTOR 信号来调节 T 细胞的不同分化, mTORC1-HIF-1 α 信号轴可提供限速糖酵酶促进糖酵解进而诱导 CD4⁺T 细胞的分化^[17]; 通过影响腺苷 A2A 受体诱导 FoxP3 形成促进 CD4⁺Treg 细胞的发展, 并抑制 T 细胞的抗肿瘤功能^[18-19]; 上调趋化因子配体 28(CCL28)募集 CD4⁺Treg 细胞并促进血管生成^[20]。

目前多项研究认为 HIF-1 α 在宫颈癌表达高于正常, 已作为宫颈癌预后的风险因子^[21]。本文分析发现 HIF-1 α 表达高患者的 5 年生存期缩短, 同时是宫颈癌的危险因素, 提示 HIF-1 α 高表达与宫颈癌的预后显著性相关; 但未发现 CD4⁺T、CD8⁺T、CD4⁺CD25⁺/high CD127^{low/neg}、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 细胞是宫颈癌预后不

良的风险因素。Fu 等^[22]研究认为 CD₄⁺ CD25⁺ T 细胞升高在肿瘤组织内是预后差的表现,而 Tregs 细胞不是预后因素。研究发现乏氧下 HIF-1 α 可上调肿瘤细胞的 PD-L1,使其抵抗效应性 T 细胞的杀伤^[23]。因此, HIF-1 α 表达下调可为临床治疗提供理论依据。

综上所述,宫颈癌外周血中 CD₄⁺ T、CD₈⁺ T 及 CD₄⁺ CD25^{high}CD127^{low/neg}、CD₄⁺ CD25⁺FoxP₃⁺细胞与宫颈癌 FIGO 分期及淋巴结转移相关,其中 CD₄⁺ CD25^{high}CD127^{low/neg}、CD₄⁺ CD25⁺FoxP₃⁺细胞与 HIF-1 α 升高呈正相关。HIF-1 α 是宫颈癌预后的危险因素。

参考文献:

- [1] Rutkowski MR, Svoronos N, Perales-Puchalt A, et al. The tumor macroenvironment: cancer-promoting networks beyond tumor beds[J]. *Adv Cancer Res*, 2015, 128: 235–262.
- [2] Wu L, Liu H, Guo H, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in cervical carcinoma patients[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 9507–9515.
- [3] Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4⁺CD25^{high}FoxP₃⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis[J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1469–1480.
- [4] Santegoets SJ, Dijkgraaf EM, Battaglia A, et al. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2015, 64(10): 1271–1286.
- [5] Kurmyshkina OV, Kovchur PI, Schegoleva LV, et al. T- and NK-cell populations with regulatory phenotype and markers of apoptosis in circulating lymphocytes of patients with CIN3 or microcarcinoma of the cervix: evidence for potential mechanisms of immune suppression[J]. *Infect Agent Cancer*, 2017, 12: 56.
- [6] Portella L, Scala S. Ionizing radiation effects on the tumor microenvironment [J]. *Semin Oncol*, 2019 Jul 30. pii: S0093-7754(19)30097-1.
- [7] Zhang T, Suo C, Zheng C, et al. Hypoxia and metabolism in metastasis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1136: 87–95.
- [8] Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity[J]. *Immunity*, 2014, 41(4): 518–528.
- [9] Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM, et al. Use of tumor-responsive T cells as cancer treatment[J]. *Lancet*, 2009, 373(9664): 673–683.
- [10] Chang WC, Li CH, Chu LH, et al. Regulatory T cells suppress natural killer cell immunity in patients with human cervical carcinoma [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(1): 156–162.
- [11] Burk RD, Chen Z, Saller C, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer [J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 378–384.
- [12] Heeren AM, Punt S, Bleeker MC, et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix[J]. *Mod Pathol*, 2016, 29(7): 753–763.
- [13] Sahasrabudhe NM, Van der Horst JC, Spaans V, et al. MGL ligand expression is correlated to lower survival and distant metastasis in cervical squamous cell and adenosquamous carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 29.
- [14] Das D, Sarkar B, Mukhopadhyay S, et al. An altered ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in cervical cancer tissues and peripheral blood- a prognostic clue? [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(2): 471–478.
- [15] Westendorf AM, Skibbe K, Adamczyk A, et al. Hypoxia enhances immunosuppression by inhibiting CD4⁺ effector T Cell function and promoting Treg activity[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1271–1284.
- [16] Cho SH, Raybuck AL, Blagih J, et al. Hypoxia-inducible factors in CD4⁺ T cells promote metabolism, switch cytokine secretion, and T cell help in humoral immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(18): 8975–8984.
- [17] Hukelmann JL, Anderson KE, Sinclair LV, et al. The cytotoxic T cell proteome and its shaping by the kinase mTOR[J]. *Nature Immunology*, 2016, 17(1): 104–112.
- [18] Hatfield S, Veszeleiova K, Steingold J, et al. Mechanistic justifications of systemic therapeutic oxygenation of tumors to weaken the hypoxia inducible factor 1 α -mediated immunosuppression[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1136: 113–121.
- [19] Ma SR, Deng WW, Liu JF, et al. Blockade of adenosine A2A receptors enhances CD8⁺ T cells response and decreases regulatory T cells in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 99.
- [20] Ren L, Yu Y, Wang L, et al. Hypoxia-induced CCL28 promotes recruitment of regulatory T cells and tumor growth in liver cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 17(46): 75763–75773.
- [21] Kanjanapan Y, Deb S, Young RJ, et al. Glut-1 expression in small cervical biopsies is prognostic in cervical cancers treated with chemoradiation[J]. *Clin Transl Radiat Oncol*, 2017, 2: 53–58.
- [22] Fu J, Xu D, Liu Z, et al. Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2328–2339.
- [23] Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, et al. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(3): 665–674.