

程序性死亡配体 1、肿瘤浸润淋巴细胞、FoxP3⁺调节性 T 细胞在非小细胞肺癌中的表达及意义

沙梦玲, 巩玉森

(徐州医科大学附属医院, 江苏 徐州 221006)

摘要: [目的] 检测程序性死亡配体 1(programmed death ligand 1, PD-1)、肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)和叉头转录因子 P3(forkhead box P3, FoxP3)在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达, 分析其相关性及其与临床病理参数之间的关系。[方法] 纳入 2017 年 1 月至 2018 年 12 月于徐州医科大学附属医院手术治疗的 NSCLC 患者 669 例, 收集其手术切除的肿瘤组织, 制成组织微阵列(TMA), 采用免疫组化 EnVision 方法检测肿瘤细胞 PD-L1、肿瘤间质 TIL 和 Treg 的表达水平。[结果] TIL 在 NSCLC 不同组织学类型、性别、吸烟、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM 分期中存在统计学差异($P<0.01$)。PD-L1、FoxP3⁺Treg 在各临床病理参数中均无统计学差异。PD-L1 与 TIL 呈正相关($P<0.01$), FoxP3⁺Treg 与 TIL 呈正相关($P<0.01$)。肿瘤低分化、肿瘤>3cm、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM Ⅲ/Ⅳ期、PD-L1 和 FoxP3⁺Treg 高表达的 NSCLC 患者术后无复发生存期更短($P<0.05$); 鳞癌、男性、吸烟、肿瘤低分化、肿瘤>3cm、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM Ⅲ/Ⅳ期、TIL 极低浸润的 NSCLC 患者术后总生存期更短($P<0.05$)。[结论] PD-L1、FoxP3⁺Treg 高表达、低淋巴细胞浸润的 NSCLC 患者预后不良。PD-L1、FoxP3⁺Treg 可作为 NSCLC 术后复发/转移的独立预后指标。

主题词: 非小细胞肺癌; 程序性死亡配体 1; 肿瘤浸润淋巴细胞; FoxP3⁺调节性 T 细胞

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)01-0036-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.01.B008

Expression of Programmed Death Ligand 1, Tumor Infiltrating Lymphocyte and Foxp3⁺ Regulatory T Cell in Non-small Cell Lung Cancer and Their Significance

SHA Meng-ling, GONG Yu-sen

(Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221006, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of programmed death ligand 1(PD-L1), tumor infiltrating lymphocyte(TIL) and Foxp3⁺ regulatory T cell(FoxP3⁺Treg) in non-small cell lung cancer (NSCLC), and their relationship with clinicopathological parameters of NSCLC. [Methods] A total of 669 NSCLC patients who underwent surgical treatment in the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from January 2017 to December 2018 were enrolled. The tumor tissues were collected for tissue microarray examination. The expression levels of PD-L1, TIL and FoxP3⁺Treg were detected by immunohistochemical EnVision method. [Results] The expression of TIL was associated with gender, smoking history, histological types, lymph node metastasis, vascular invasion, and TNM staging in NSCLC patients($P<0.01$). While the expression PD-L1 and FoxP3⁺Treg was not associated with the clinicopathological features. PD-L1 and FoxP3⁺Treg was positively correlated with TIL($P<0.01$). Patients with low tumor differentiation, tumor>3cm, lymph node metastasis, vascular invasion, TNM Ⅲ/Ⅳ, high PD-L1 expression and high FoxP3⁺Treg expression had shorter recurrence-free survival ($P<0.05$). Patients with squamous cell carcinomas, male gender, smoking, low tumor differentiation, tumor >3cm, lymph node metastasis, vascular invasion, TNM Ⅲ/Ⅳ and low TIL infiltration had shorter overall survival. [Conclusion] The NSCLC patients with high expression of PD-L1 and FoxP3⁺Treg and low lymphocyte infiltration have a poor prognosis. PD-L1 and FoxP3⁺Treg can be used as independent prognostic indicators for postoperative recurrence/metastasis of NSCLC.

Subject words: non-small cell lung cancer; programmed death ligand 1; tumor infiltrating lymphocyte; Foxp3⁺ regulatory T cell

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌 80%~85%。部分患者在确诊时已属于晚

期, 而放/化疗等传统治疗手段对晚期 NSCLC 患者生存期的改善并不理想, 5 年生存率<15%。发生 KRAS、EGFR、ALK 等基因突变/重排的 NSCLC 患者约半数, 但仍有 30% 基因异常不为所知, 并且患者极易耐药。难以察觉的隐匿性早期转移、肿瘤细胞

基金项目: 徐州市科技计划项目(KC15SH043)

通信作者: 巩玉森, 副主任, 本科; 徐州医科大学附属医院病理科, 江苏省徐州市

泉山区淮海西路 99 号(221006); E-mail: 66647465@qq.com

收稿日期: 2020-04-02; 修回日期: 2020-09-14

对靶向治疗药物的耐药依旧是肿瘤治疗的难题。近几年大量的临床试验表明,以单克隆抗体(mono-clonal antibodies,mAbs)阻断程序性死亡受体 1(programmed death 1,PD-1)/程序性死亡配体 1(programmed death ligand 1,PD-L1)通路的免疫治疗在多种恶性肿瘤中均获得了良好的效果,并且 PD-1/PD-L1 抑制剂的获益程度与 PD-L1 的表达水平密切相关。

肿瘤免疫原性的变化和肿瘤微环境中的免疫抑制信号决定了抗肿瘤免疫反应和免疫治疗的效果。肿瘤弱免疫原性的典型特征是缺乏免疫浸润,而 T 细胞介导的免疫反应是机体抗肿瘤免疫的中心环节。肿瘤细胞和免疫细胞之间的相互作用越来越受到重视。调节性 T 细胞(regulatory T cell,Treg)占人类 CD4⁺T 细胞的 5%~15%,最初被定义为 CD4⁺CD25⁺T 细胞。CD25 表达于所有活化的效应 T 细胞,其他标记(CTLA-4、FoxP3)也被提出用于识别 Treg,但它们的表达并不局限于 Treg。尽管如此,叉头转录因子 P3(forkhead box P3,FoxP3)是目前被广泛认可的认识 Treg 的最佳标记,主要参与 Treg 细胞的发育和免疫抑制功能。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 2017 年 1 月至 2018 年 12 月于徐州医科大学附属医院手术治疗的 NSCLC 患者 669 例,所有病例均为首发,无自身免疫性疾病,手术前均未接受过新辅助化疗或放疗。所有资料均经住院电子病历、影像诊断系统及电话随访获得,随访截止日期为 2019 年 12 月 1 日,其中存活 521 例,死亡 46 例,失访 102 例。按 2015 年 WHO 肺肿瘤分类标准,鳞癌 198 例,非鳞癌 471 例;男性 404 例,女性 265 例;年龄 29~84 岁,中位年龄 64 岁,≤60 岁 242 例,>60 岁 427 例;高分化 29 例,中分化 400 例,低分化 240 例;按第 8 版肺癌 TNM 分期标准:I 期 392 例,II 期 135 例,III 期 135 例,IV 期 7 例;手术时已发生淋巴结转移 191 例,无淋巴结转移 478 例。获取其肿瘤组织石蜡包埋标本,制成组织微阵列(tissue microarray,TMA)。本研究经徐州医科大学附属医院伦理委员会批准。

1.2 研究方法

1.2.1 免疫组化

所有标本经 4%中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,3μm 切片,HE 染色。免疫组化采用 EnVision 法染色,DAB 显色。鼠抗人单抗 PD-L1 购自 Dako 公司,兔抗人单抗 FoxP3 购自 CST 公司,WB 专用一抗二抗稀释液、Tris-EDTA 抗原修复液(10×,pH 9.0)、即用型高效免疫组化二抗试剂盒均购自 Absin 公司。

1.2.2 判读标准

PD-L1 阳性呈部分或完整的膜染色,表达结果采用肿瘤比例评分(tumor proportion score,TPS)的方法,至少有 100 个存活的肿瘤细胞可进行评估。需排除肿瘤间质中任何染色的免疫细胞(巨噬细胞、浆细胞、中性粒细胞)、坏死的肿瘤细胞、碳末沉着。在×200 光镜(optical field,o.f.)下进行评估。表达水平分为 3 层:阴性(TPS<1%),低表达(1%≤TPS<50%)和高表达(TPS≥50%)^[1]。

在 FoxP3 免疫组化染色切片中检测肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte,TIL)的浸润程度,采用递归分割的方法在×200 光镜下进行评估。其中 TIL≤10/o.f.为极低浸润(1 分),11~70/o.f.为低浸润(2 分),71~150/o.f.为中度浸润(3 分),>150/o.f.为高浸润(4 分)^[2]。

在 FoxP3 免疫组化染色切片中检测 Treg 的表达水平,平均求得 4 个高倍镜(high-power field,HPF)数字图像下 FoxP3⁺Treg 的绝对数量,在×400 光镜下进行评估。鉴于目前还没有被广泛接受的 Treg 标准的阈值来定义临床结果,我们选择瘤内 FoxP3⁺Treg 计数的中位数来确定可能的危险因素^[3-4]。本研究 669 例 NSCLC 中,FoxP3⁺Treg 的数量为 0~80,中位数为 12,Treg<12/o.f.为低表达,Treg≥12/o.f.为高表达。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,组间比较采用秩和检验和 χ^2 检验;单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 分析,并用 Log-rank 检验;多因素生存分析采用 Cox 比例风险回归模型, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-L1 在肿瘤细胞上的表达

PD-L1 阳性表现为肿瘤细胞任何染色强度、完

整或部分细胞膜表达,阳性着色呈棕黄色,其中阴性表达 481 例(71.9%)、低表达 154 例(23.0%)、高表达 34 例(5.1%)(Figure 1);秩和检验结果显示 PD-L1 在 NSCLC 各临床病理参数中表达均无统计学差异。

2.2 肿瘤浸润淋巴细胞在肿瘤间质中的浸润

TIL 极低浸润 48 例(7.2%)、低浸润 370 例(55.8%)、中度浸润 155 例(23.4%)、高浸润 90 例(13.6%)(Figure 2);秩和检验结果显示 TIL 在 NSCLC 不同组织学类型、性别、吸烟、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM 分期中存在统计学差异($P<0.01$)(Table 1)。

2.3 FoxP3⁺Treg 在肿瘤间质中的表达

FoxP3⁺Treg 阳性着色呈棕黄色,其中低表达 590 例(89.0%)、高表达 73 例(11.0%)(Figure 3), χ^2 检验结果显示 FoxP3⁺Treg 在 NSCLC 各临床病理参数中均无统计学差异。

2.4 Spearman 相关性分析

PD-L1 与 TIL 呈正相关($r=0.105$, $P<0.01$),FoxP3⁺Treg 与 TIL 呈正相关($r=0.162$, $P<0.001$)。

2.5 生存分析

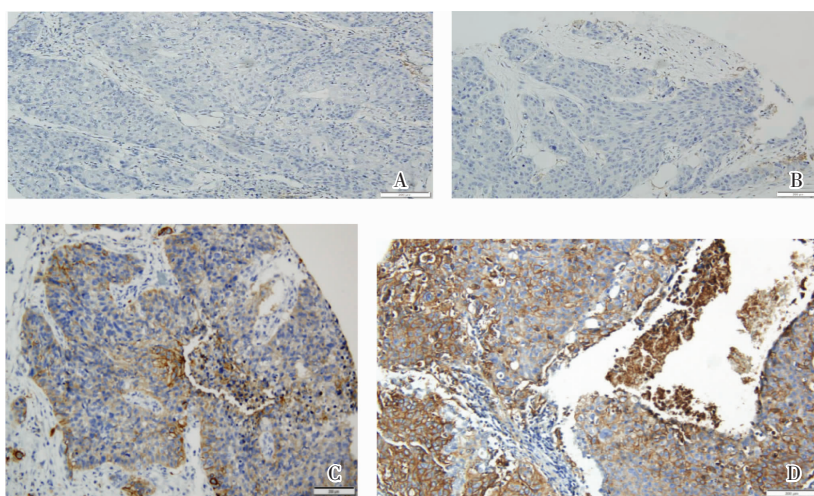
对 669 例 NSCLC 患者进行 Kaplan-Meier 生存分析,生存日期为手术日至死亡日至本次随访时仍存活的时间。肿瘤低分化、肿瘤>3cm、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM Ⅲ/Ⅳ期、PD-L1 和 FoxP3⁺Treg 高表达的 NSCLC 患者术后无复发生存期(recurrence-free survival, RFS)更短($P<0.05$);鳞癌、男性、吸烟、肿瘤低分化、肿瘤>3cm、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM Ⅲ~Ⅳ期、TIL 极低浸润的 NSCLC 患者术后总生存期(overall survival, OS)更短($P<0.05$)(Figure 4~6)。

采用 Cox 比例风险回归模型进行多因素生存分析,结果显示淋巴结转移、PD-L1、FoxP3⁺Treg 可作

为 NSCLC 患者术后 RFS 的独立预后因素($P<0.05$),淋巴结转移、TNM 分期可作为 NSCLC 患者术后 OS 的独立预后因素($P<0.05$)(Table 2)。

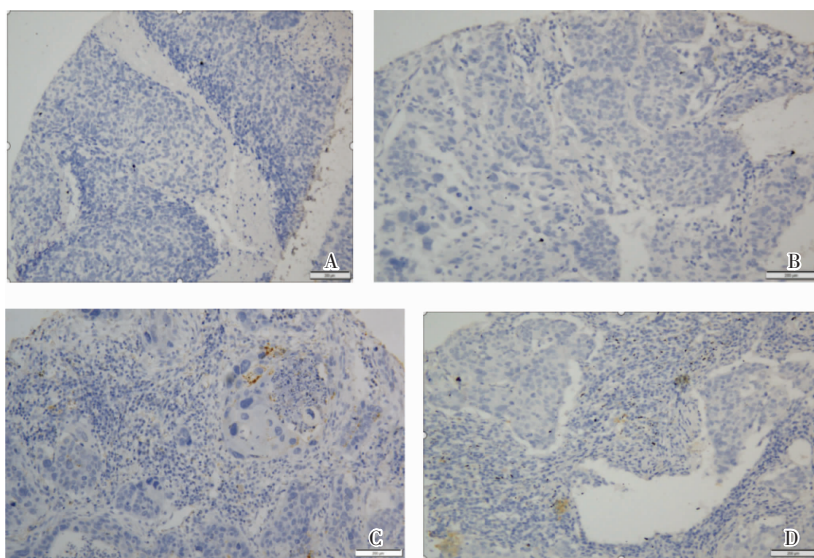
3 讨论

在本研究中,肿瘤低分化、肿瘤>3cm、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM Ⅲ/Ⅳ期的 NSCLC 患者术后 RFS 更短($P<0.05$),鳞癌、男性、吸烟、肿瘤低分化、肿瘤>



A: PD-L1 (Dako 22C3) negative ($\times 200$); B: PD-L1 (Dako 22C3) negative ($\times 200$); C: PD-L1 (Dako 22C3) low expression ($\times 200$); D: PD-L1 (Dako 22C3) high expression ($\times 200$).

Figure 1 PD-L1 expression in non-small cell lung cancer

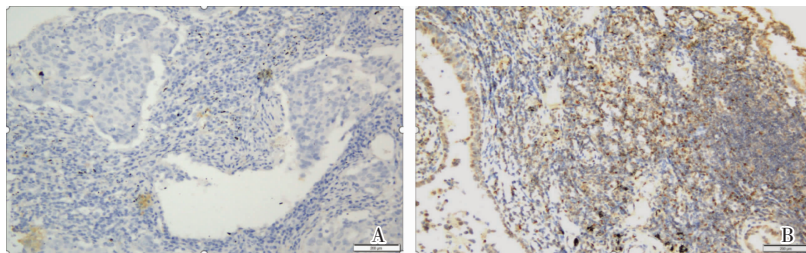


A: TIL score of 1 in the tumor stroma ($\times 200$); B: TIL score of 2 in the tumor stroma ($\times 200$); C: TIL score of 3 in the tumor stroma ($\times 200$); D: TIL score of 4 in the tumor stroma ($\times 200$).

Figure 2 Tumor infiltrating lymphocyte expression in non-small cell lung cancer

Table 1 Association of tumor infiltrating lymphocyte count and characteristics

Variable	TIL ≤10/o.f. (n=48)	TIL 11~70/o.f. (n=370)	TIL 71~150/o.f. (n=155)	TIL >150/o.f. (n=90)	Z	P
Histologic type					-4.145	<0.001
SCC	23	122	32	19		
Non-SCC	25	248	123	71		
Gender					-3.380	0.001
Male	35	234	88	42		
Female	13	136	67	48		
Age(years old)					-1.382	0.167
≤60	11	137	51	40		
>60	37	233	104	50		
Smoking					-3.138	0.002
Yes	24	221	107	64		
No	24	149	48	26		
Differentiation					0.114	0.945
High	1	17	8	3		
Medium	31	214	95	54		
Low	16	139	52	33		
Tumor size					6.970	0.073
T1	24	223	103	63		
T2	16	94	32	18		
T3	5	33	12	7		
T4	3	20	8	2		
Lymph node status					-3.366	0.001
Positive	23	112	36	19		
Negative	25	258	119	71		
Vascular invasion					-3.020	0.003
Yes	12	45	13	6		
No	36	325	142	84		
TNM stage					15.068	0.002
I	17	208	100	62		
II	15	81	24	15		
III	15	77	29	13		
IV	1	4	2	0		



A:Low Treg count with FoxP3⁺ lymphocytic expression(×200)
B:High Treg count with FoxP3⁺ lymphocytic expression(×200)

Figure 3 FoxP3⁺ Treg in non-small cell lung cancer

3cm、淋巴结转移、脉管侵犯、TNM Ⅲ/Ⅳ期的 NSCLC 患者术后 OS 更短 ($P<0.05$)。Conforti 等^[5]研究也表明,男性比女性 NSCLC 患者术后 OS 更短,其原因可能与女性雌激素的分泌有关。雌激素在调节免疫系统中的作用以及潜在的治疗价值有待更多的研究去证实。

目前 NSCLC 的辅助治疗已纳入免疫治疗。与直接针对肿瘤细胞的传统治疗不同,免疫治疗充分利用机体的自身免疫系统,通过改变肿瘤微环境的成分实现对肿瘤细胞的杀伤。通过免疫组化染色检测的 PD-L1 表达水平是目前被广泛认可的能够预测 NSCLC 对 PD-1/PD-L1 抑制剂反应的生物标志物^[6-8]。在本研究中,PD-L1 ≥50% 的 NSCLC 患者术后 RFS 更短 ($P<0.01$),可见 PD-L1 高表达的 NSCLC 患者预后不良。

虽然 PD-L1 已纳入 NSCLC 的常规检测,但仍有不足之处,包括检测方法的多样性、阳性表达判读的复杂性、指导临床治疗的阈值的特殊性以及表达不均匀的生物学事实。学者们也正致力于寻找可替代或可互补的标志物,旨在与 PD-L1 表达联合使用以提高其预测能力,研究方向主要集中在肿瘤突变负荷(tumor mutation burden,TMB)或肿瘤免疫微环境的评估。机体的免疫系统时刻监视着肿瘤的发生,但肿瘤细胞可通过修饰表面抗原、改变肿瘤微环境的成分来躲避免疫系统的识别和杀伤^[9-11]。文献指出,肿瘤弱免疫原性的典型特征是缺乏免疫浸润^[12]。Giatromanolaki 等^[2]研究也表明,淋巴

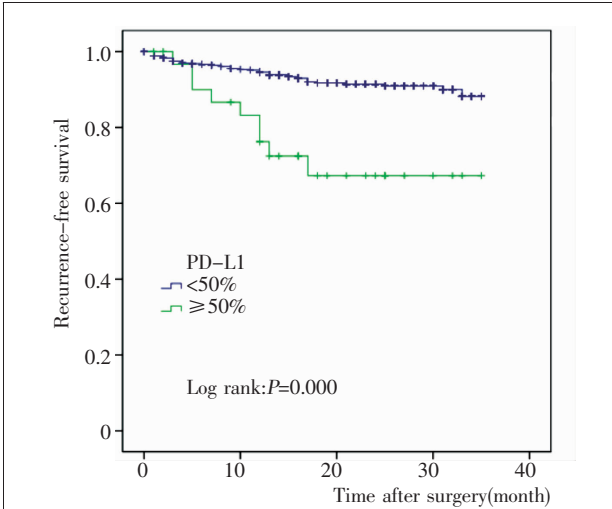


Figure 4 Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival by PD-L1 expression(<50% vs ≥50%)

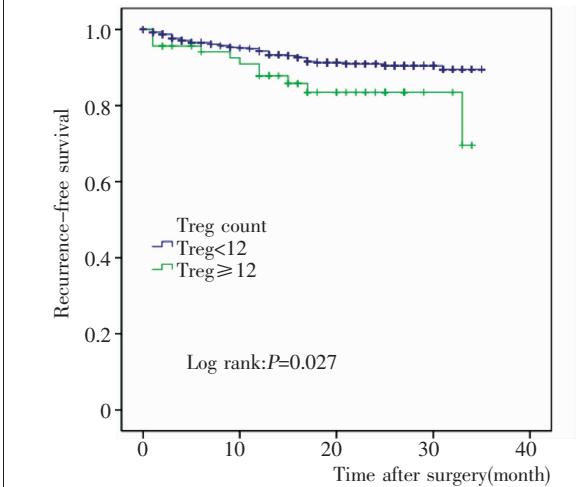


Figure 5 Kaplan-Meier curves for recurrence-free survival by FoxP3+Treg count(<12 vs ≥12)

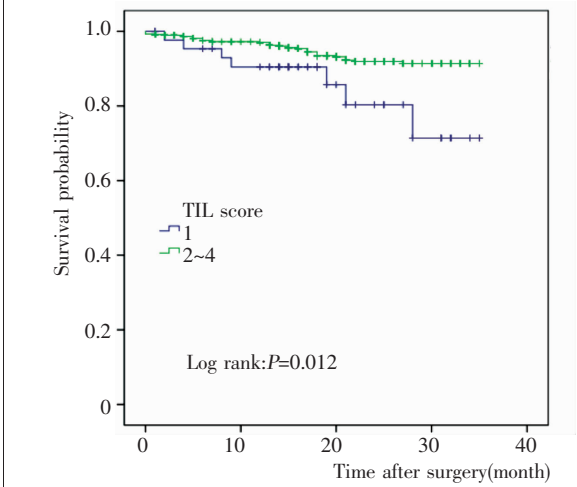


Figure 6 Kaplan-Meier curves for overall survival by TIL score(1 vs 2~4)

Table 2 Prognostic value of recurrence-free survival and overall survival

Variable	RFS						OS					
	Univariate Analysis			Multivariate Analysis			Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	Hazard ratio	95%CI	P	Hazard ratio	95%CI	P	Hazard ratio	95%CI	P	Hazard ratio	95%CI	P
Histologic type (SCC vs non-SCC)	0.896	0.508~1.582	0.706				0.497	0.278~0.891	0.019	1.232	0.609~2.489	0.562
Gender(Male vs Female)	1.122	0.665~1.893	0.667				0.302	0.141~0.647	0.002	2.176	0.850~5.570	0.105
Age(≤60 vs >60 years old)	0.927	0.544~1.580	0.780				1.343	0.717~2.518	0.357			
Smoking(Yes vs No)	1.641	0.976~2.758	0.062				2.844	1.563~5.176	0.001	0.755	0.358~1.591	0.755
Differentiation(High/Medium vs Low)	1.985	1.180~3.339	0.010	1.255	0.723~2.180	0.419	2.653	1.475~4.774	0.001	1.571	0.836~2.950	0.160
Tumor size(T1 vs T2~4)	2.013	1.197~3.387	0.008	1.321	0.760~2.298	0.324	2.085	1.167~3.726	0.013	0.956	0.498~1.836	0.893
Lymph node metastasis(Yes vs No)	3.819	2.257~6.465	0.000	0.309	0.159~0.600	0.001	5.442	2.937~10.081	0.000	0.421	0.187~0.948	0.037
Vascular invasion(Yes vs No)	3.101	1.718~5.596	0.000	0.604	0.318~1.148	0.124	3.529	1.883~6.615	0.000	0.666	0.337~1.320	0.244
TNM(I / II vs III / IV)	2.590	1.519~4.416	0.000	0.818	0.417~1.604	0.559	5.632	3.131~10.130	0.000	2.244	0.255~1.351	0.040
PD-L1 (<50% vs ≥50%)	4.039	1.980~8.238	0.000	3.933	1.878~8.237	0.000	0.472	0.065~3.427	0.458			
TIL(1 vs 2~4)	0.931	0.337~2.573	0.890				0.373	0.167~0.835	0.016	0.587	0.255~1.351	0.211
Foxp3+Treg(low vs high)	2.063	1.068~3.983	0.031	2.054	1.052~4.011	0.035	0.419	0.102~5.176	0.230			

细胞浸润极低(TIL-score 1)的肿瘤患者预后明显较差。本研究结果与之一致,TIL 极低浸润 (1 分)的 NSCLC 患者术后 OS 更短($P<0.05$)。

肿瘤免疫微环境中 T 细胞亚群的比例和功能改变是肿瘤免疫逃逸的关键,尤其是 $CD4^+CD25^+$ Treg^[6]。Treg 是一组具有免疫抑制功能的 T 细胞亚群,其正常功能是通过细胞间接触、分泌调节性细胞因子 IL-10、TGF- β 等方式抑制 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞的增殖分化,维持免疫耐受,防止自身免疫性疾病的发生。免疫逃逸学说显示,肿瘤患者局部或全身处于免疫耐受或缺陷状态,可能与 Treg 数量增加、功能增强有关。目前 FoxP3 被认为是识别 $CD4^+CD25^+$ Treg 的特异性标记^[13-17]。通过免疫组化染色检测肿瘤间质中 FoxP3 表达水平可了解肿瘤免疫微环境中 $CD4^+CD25^+$ Treg 的浸润程度,进而可评估肿瘤局部免疫反应状态,为肿瘤免疫治疗方案的选择提供依据。多项研究表明,FoxP3⁺Treg 的表达与 NSCLC 患者预后不良相关^[18-24]。本研究结果显示 FoxP3⁺Treg 高表达的 NSCLC 患者术后 RFS 更短 ($P<0.05$)。用 FoxP3 特异性抑制 $CD4^+CD25^+$ Treg 的活性或能成为 NSCLC 免疫治疗的有效靶点。本研究显示,淋巴结转移、PD-L1、FoxP3⁺Treg 可作为 NSCLC 术后复发/转移的独立预后指标。

由于免疫调节系统的复杂性和恶性肿瘤的异质性,联合治疗依旧是未来很长一段时间的主要治疗手段。随着免疫治疗的兴起,学者们也越来越多重视机体免疫系统在抗肿瘤治疗中的潜在价值,将各种改变肿瘤免疫微环境的手段整合到 PD-1/PD-L1 的阻断治疗中,有望成为肿瘤免疫治疗的重要联合手段之一。

参考文献:

- [1] Kim H, Chung JH. PD-L1 testing in non-small cell lung cancer: past, present, and future [J]. J Pathol Trans Med, 2019, 53(4): 199-206.
- [2] Giatromanolaki A, Banham AH, Harris AL, et al. FOXP3 infiltrating lymphocyte density and PD-L1 expression in operable non-small cell lung carcinoma[J]. Exp Lung Res, 2019, 45(3-4): 76-83.
- [3] Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer[J]. Eur J Cancer, 2008, 44(13): 1875-1882.
- [4] Shimizu K, Nakata M, Hirami Y, et al. Tumor-infiltrating Foxp3⁺ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(5): 585-590.
- [5] Conforti F, Pala L, Bagnardi V, et al. Sex-based heterogeneity in response to lung cancer immunotherapy: a systematic review and meta-analysis[J]. J Natl Cancer Inst, 2019, 111(8): 772-781.
- [6] Haragan A, Field JK, Davies MPA, et al. Heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: implications for specimen sampling in predicting treatment response[J]. Lung Cancer, 2019, 134: 79-84.
- [7] Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer[J]. Engl J Med, 2015, 372(21): 2018-2028.
- [8] Fehrenbacher L, von Pawel J, Park K, et al. Updated efficacy analysis including secondary population results for OAK: a randomized phase III study of atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer [J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(8): 1156-1170.
- [9] Peng J, Yu Z, Xue L, et al. The effect of Foxp3-overexpressing Treg cells on non-small cell lung cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5860-5868.
- [10] Schafer CC, Wang Y, Hough KP, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase regulates anti-tumor immunity in lung cancer by metabolic reprogramming of immune cells in the tumor microenvironment[J]. Oncotarget, 2016, 7(46): 75407-75424.
- [11] Chan R, Sethi P, Jyoti A, et al. Investigating the radioresistant properties of lung cancer stem cells in the context of the tumor microenvironment [J]. Radiat Res, 2016, 185(2): 169-181.
- [12] Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies [J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(3): 197-218.
- [13] Hansmann L, Schmidl C, Kett J, et al. Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression[J]. J Immunol, 2012, 188(3): 1275-1282.
- [14] Qiu J, Che G, Liu F, et al. The detection and clinical significance of peripheral regulatory $CD4^+CD25^+CD127^+$ low T cells in patients with non-small cell lung cancer [J]. Clin Transl Oncol, 2019, 21(10): 1343-1347.
- [15] Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation[J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4272-4276.
- [16] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells[J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336.
- [17] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. Science, 2003, 299(5609): 1057-1061.
- [18] Usó M, Jantus-Lewintre E, Bremnes RM, et al. Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers[J]. Oncotarget, 2016, 7(33): 52849-52861.
- [19] Kadota K, Nitadori JI, Adusumilli PS. Prognostic value of the immune microenvironment in lung adenocarcinoma[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(5): e24036.
- [20] Zhang GQ, Han F, Fang XZ, et al. $CD4^+$, IL17 and Foxp3 expression in different pTNM stages of operable non-small cell lung cancer and effects on disease prognosis[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3955-3960.
- [21] Suzuki K, Kadota K, Sima CS, et al. Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: tumor interleukin-12 receptor $\beta 2$ (IL-12R $\beta 2$), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(4): 490-498.
- [22] Tao H, Mimura Y, Aoe K, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells [J]. Lung Cancer, 2012, 75(1): 95-101.
- [23] O'Callaghan DS, Rexhepaj E, Gately K, et al. Tumour islet Foxp3⁺ T-cell infiltration predicts poor outcome in non small cell lung cancer[J]. Eur Respir J, 2015, 46(6): 1762-1772.
- [24] Tao H, Shien K, Soh J, et al. Density of tumor-infiltrating FOXP3⁺ T cells as a response marker for induction chemoradiotherapy and a potential prognostic factor in patients treated with trimodality therapy for locally advanced non-small cell lung cancer[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2014, 20(6): 980-986.