

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.009

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.009>

肿瘤微环境相关因子与直肠癌新辅助化学治疗疗效和预后的相关性

张思宇¹, 郝彦凤², 步鹏², 仝煦楠³, 徐菁¹

(1. 山西医科大学病理教研室, 太原 030001; 2. 山西省肿瘤医院病理科, 太原 030001;
3. 山西医科大学研究生学院, 太原 030001)

[摘要] 目的: 观察直肠癌新辅助化学治疗(neoadjuvant chemotherapy, NAC)前后, 肿瘤微环境中肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)的CD4, CD8, 叉头翼状螺旋转录因子(transcription factor fork head box P3, FOXP3), 细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)和程序性死亡配体(programmed death ligand-1, PD-L1)的表达水平变化, 探讨这些免疫标志物的表达水平与NAC疗效及预后的关系。方法: 采用免疫组织化学的方法检测50例直肠癌患者NAC前后CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs, FOXP3⁺ TILs, CTLA-4⁺ TILs和PD-L1⁺ TILs的表达水平变化, 分析以上指标的表达与临床治疗效果之间的关系, 并采用Kaplan-Meier法及COX比例风险回归模型进行生存分析。结果: 与直肠癌NAC前相比, NAC后CD4⁺ TILs和CD8⁺ TILs明显升高, 差异有统计学意义($P=0.002$, $P=0.001$); 而CTLA-4⁺ TILs和FOXP3⁺ TILs的差异则无统计学意义($P=0.094$, $P=0.068$)。直肠癌中PD-L1在TILs和肿瘤细胞中的表达为阴性。直肠癌NAC后降期组CD4⁺ TILs和CD8⁺ TILs高于未降期组, 差异有统计学意义($P=0.026$, $P=0.048$), FOXP3⁺ TILs和CTLA-4⁺ TILs差异无统计学意义。直肠癌中CD8⁺ TILs高表达者总生存率较好。结论: 免疫系统可能是通过增加CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs来抑制直肠癌肿瘤的生长; N分期, CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs的表达水平是评估NAC效果的敏感指标; CD8⁺ TILs的表达水平与NAC患者的预后相关。

[关键词] 新辅助化学治疗; 直肠癌; 肿瘤微环境

Correlation of tumor microenvironment related markers with the curative effect and prognosis of neoadjuvant chemotherapy of rectal cancer

ZHANG Siyu¹, XI Yanfeng², BU Peng², TONG Xu'nan³, XU Jing¹

(1. Department of Pathology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001; 2. Department of Pathology, Shanxi Provincial Cancer Hospital, Taiyuan 030001; 3. Graduate School, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective: To observe the expression level of CD4, CD8, FOXP3, cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4

收稿日期 (Date of reception): 2017-07-10

通信作者 (Corresponding author): 徐菁, Email: xujing@sxmu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 山西省科技厅重点研发项目 (201603 D321049); 山西省卫生和计划生育委员会科研课题 (2014052)。This work was supported by the Major Research and Development Project of Shanxi Science and Technology Department (201603 D321049); the Scientific Research Task of the Shanxi Health and Family Planning Commission (2014052), China.

(CTLA-4), programmed death ligand-1 (PD-L1) of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the tumor microenvironment before and after the neoadjuvant chemotherapy (NAC) of rectal cancer and to study the correlation of the expression of these immune markers with the curative effect and prognosis of NAC of rectal cancer. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect the 50 patients' changes in expression levels of CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs, FOXP3⁺ TILs, CTLA-4⁺ TILs and PD-L1⁺ TILs in tumor microenvironment before and after NAC, and analyses were conducted on the relationship between the expression of these markers and clinical therapeutic effect; besides, Kaplan-Meier method and COX proportional hazard regression analysis were used in survival analysis. **Results:** Compared with before NAC, the expression level of CD4⁺ TILs and CD8⁺ TILs showed an evident increase after NAC of rectal cancer, with the statistically significant differences ($P=0.002$, $P=0.001$), while there was no statistical difference in the expression level of CTLA-4⁺ TILs and FOXP3⁺ TILs before and after NAC ($P=0.094$, $P=0.068$). PD-L1 in TILs and tumor cells was negatively expressed in rectal cancer. After the NAC of rectal cancer, the expression levels of CD4⁺ TILs and CD8⁺ TILs in the descending group were higher than those in the non-descending group, with the statistically significant differences ($P=0.026$, $P=0.048$). There was no statistic difference in the expression level of CTLA-4⁺ TILs and FOXP3⁺ TILs before and after NAC. In addition, higher level CD8⁺ TILs showed a higher survival rate. **Conclusion:** Increasing the expression level of CD8⁺ TILs and CD4⁺ TILs by immune system can impede the growing progress of tumor. The N staging of rectal cancer, CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs are the sensitive indices of the NAC curative effect, and the prognosis of rectal cancer patients who receive the NAC before the surgery is associated with the expression level of CD8⁺ TILs.

Keywords neoadjuvant chemotherapy; rectal cancer; tumor microenvironment

直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一^[1]。外科手术是治疗直肠癌的主要手段, 然而由于直肠癌特殊的解剖学特征, 其复发率和病死率居高不下。新辅助化学治疗(neoadjuvant chemotherapy, NAC)是指在局部治疗(手术或加放射治疗)前所做的全身化学治疗, 目的是使肿块缩小、及早杀灭看不见的转移细胞, 以利于后续治疗。近年来NAC由于具有降低肿瘤分期、提高保肛率、提高手术成功率、降低肿瘤局部复发率等优点, 日益得到人们的重视。大量研究^[2-3]显示NAC的有效率为45%~70%, 然而进行NAC的患者从明确诊断到手术大约需要6~8周的时间, 如果疗效不好反而可能延误病情。

肿瘤微环境是指肿瘤局部浸润的免疫细胞、间质细胞及分泌的活性介质等与肿瘤细胞共同构成的局部内环境。早在1989年Stephen Paget^[4]就提出“种子和土壤”的概念。肿瘤微环境作为“土壤”对肿瘤的发生、发展、侵袭、转移提供必要的物质基础^[5]。肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)作为微环境中重要的组成成分, 对肿瘤进展和结局具有至关重要的作用。然而关于NAC前后肿瘤微环境中TILs的表达变化目前尚未完全清楚。CD4⁺T、CD8⁺T对肿瘤的清除和

识别有着极其重要的作用。调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)可抑制机体对自体同源肿瘤细胞的免疫应答, 被认为是免疫治疗失败的主要原因, 而细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)和程序性死亡配体(programmed death ligand-1, PD-L1)与Tregs共同作用造成免疫逃逸。因此, 本研究选取TILs上与肿瘤进展相关的免疫标志物CD4, CD8, 叉头翼状螺旋转录因子(transcription factor fork head box P3, FOXP3; Tregs的特异性标志物), PD-L1及CTLA-4, 利用免疫组织化学方法观察NAC前后肿瘤微环境的变化, 以期对直肠癌的临床治疗及预后判断提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2012至2015年在山西省肿瘤医院诊断为直肠癌的90例患者。纳入标准: 1)经粗细针穿刺获取组织, 病理诊断为腺癌; 2)确诊前未经过其他特殊治疗(放射治疗, 化学治疗, 内分泌治疗等); 3)患者的临床病例资料完整; 4)NAC后均行手术治疗。本研究已获得山西省肿瘤医院医学伦理委员会审批。最终筛选出50例满足条件的患者。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案及降期未降期分组标准

50例患者均行FOLFOX4治疗方案, 每2~3周(3 d化学治疗+2周休息)为1周期, 术前化学治疗2~4周期。根据美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南2013版行TNM分期, 若术后TNM分期较NAC前T降期或者N降期则纳入降期组, 反之纳入未降期组。

1.2.2 组织芯片制作

1)用组织芯片空白阵列蜡块制备仪制作受体蜡块, 孔径1.8 mm; 2)50例直肠癌患者蜡块重新切片, 常规染色后进行病理诊断阅片, 在富含肿瘤细胞处定位标记。用穿刺针对比切片在蜡块的相应位置穿孔, 取出组织芯; 3)然后将组织芯填入组织孔内。为防止切片、染色、免疫组织化学过程中脱片、掉片或穿刺部位偏差, 每例样本上样2个孔; 4)为防止组织芯在孔内下滑, 将组织芯片倒放在载玻片上, 放入55 °C的烤箱内10 min, 在将要融化时取出, 室温冷却。反复多次, 使组织芯与受体蜡块融合, 防止切片及染色过程中掉片。

1.2.3 免疫组织化学

1.2.3.1 主要仪器和试剂

免疫组织化学仪器购于罗氏诊断产品(上海)有限公司(Benchmark XT); CD4(EP204), CD8(C8/114B)及PD-L1(sp142)购于基因科技(上海)股份有限公司; FOXP3(236A/E7)购于美国Abcam公司; CTLA4(sc-376016)购于Santa Cruz公司。免疫组织化学的石蜡切片厚度为3 μm 。

1.2.3.2 结果判读

由两位中级以上医师, 采用双盲法进行判读。选取5个高倍镜视野, 计数TILs阳性细胞百分比, 并计算平均数。

1.2.4 随访

从患者首次确诊开始算起, 所有患者随访至2017年5月1日, 中位随访时间27个月。所有患者通过门诊随访或电话随访进行。总生存期(overall survival, OS)定义为从病理确诊到死亡的时间。

1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计软件对资料进行分析。 $\alpha=0.05$ 作为检验标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。计数资料组间比较采用 χ^2 检验; 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用t检验; 单因

素患者生存分析采用Kaplan-Meier检验; 预后的多因素分析采用COX比例风险回归模型。

2 结果

2.1 病例特点

50例患者中, 男29例, 女21例。年龄32~78(55.10 \pm 11.13)岁。病理类型分为高分化2例, 中分化37例, 低分化11例。浸润深度T3期17例, T4期33例。无淋巴结转移18例, 有淋巴结转移32例。肿瘤距肛缘 >7 cm者11例, ≤ 7 cm者39例。降期组15例, 未降期组35例。

2.2 肿瘤免疫标志物特点

CD4在间质TILs胞膜中表达(图1A); CD8在间质TILs的胞质中表达(图1B); CTLA4和FOXP3在TILs的胞质中表达, 肿瘤细胞也有染色(图1C, D); PD-L1在直肠癌的癌细胞和间质细胞中为阴性(图1E)。CD4⁺ TILs在NAC前后阳性细胞百分比分别为14.7% \pm 8.57%和20.8% \pm 8.19%, 差异有统计学意义($P=0.002$); CD8⁺ TILs在NAC前后阳性细胞百分比分别为15.9% \pm 6.45%和22.5% \pm 11.08%, 差异有统计学意义($P=0.001$); CTLA-4⁺ TILs和FOXP3⁺ TILs在NAC前后阳性细胞百分比差异无统计学意义($P=0.094$, $P=0.068$; 图2)。

2.3 临床病理特征和NAC前肿瘤免疫标志物与治疗效果相关性

分析性别、年龄、组织学分化程度、T分期、N分期、肿瘤距肛缘距离与治疗效果相关性。无淋巴结转移的患者更容易通过NAC获得降期的效果($P=0.021$, 表1)。其余临床病理特征与治疗效果差异均无统计学意义($P>0.05$)。NAC前肿瘤免疫标志物与治疗效果差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 NAC后肿瘤免疫标志物与治疗效果相关性

NAC后CD4⁺ TILs阳性细胞百分比在未降期与降期组分别为19.17% \pm 7.82%和24.73% \pm 7.94%, 差异具有统计学意义($P=0.026$)。CD8⁺ TILs在未降期组与降期组分别为20.48% \pm 10.51%和27.20% \pm 11.29%, 差异具有统计学意义($P=0.048$)。CTLA-4⁺ TILs和FOXP3⁺ TILs在未降期组与降期组差异无统计学意义($P=0.367$, $P=0.261$)。

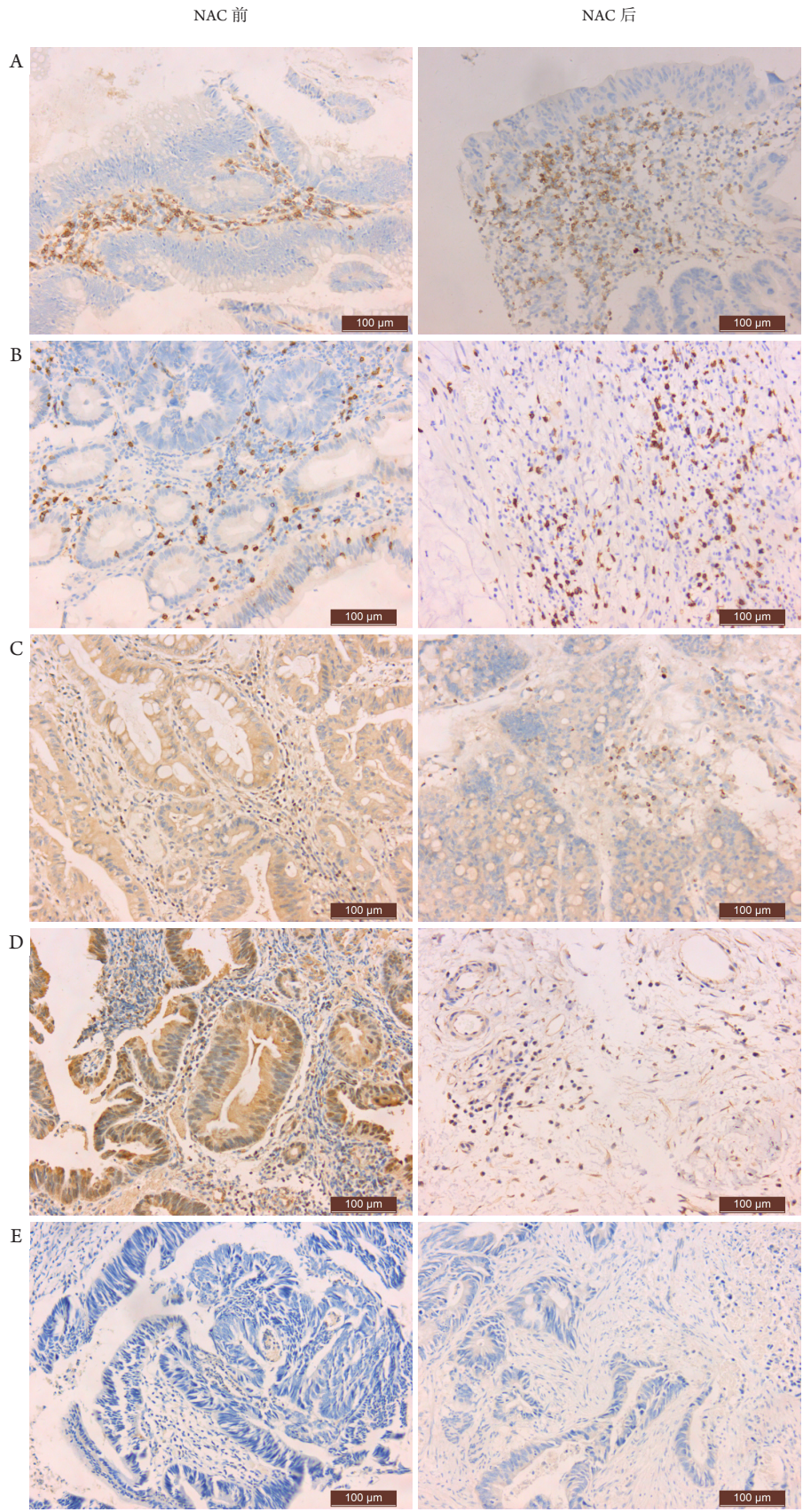


图 1 肿瘤微环境相关因子在 NAC 前后直肠癌中的阳性表达情况 (IHC, × 200)

Figure 1 Positive expression of tumor microenvironment related markers before and after NAC of rectal cancer (IHC, × 200)

(A) CD4⁺ TILs; (B) CD8⁺ TILs; (C) CTLA-4⁺ TILs; (D) FOXP3⁺ TILs; (E) PD-L1⁺ TILs.

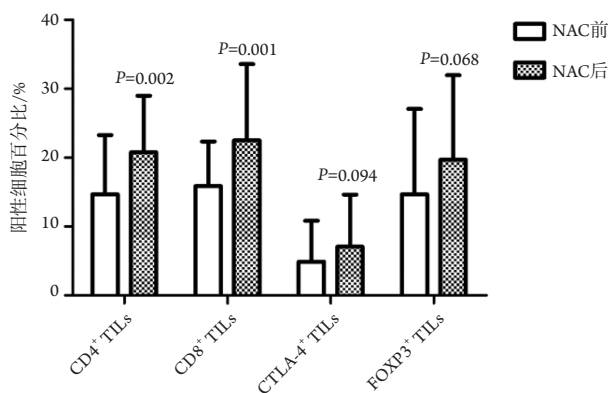


图2 新辅助化疗前后免疫参数比较

Figure 2 Comparison of immune parameters before and after NAC

表1 临床病理特征和NAC前肿瘤免疫标志物与治疗效果相关性

Table 1 Correlation of therapeutic effect with clinical pathological features and tumor immune markers before NAC

临床病理特征	未降期	降期	P
性别			0.851
男	20	9	
女	15	6	
年龄 / 岁	54.94 ± 11.86	55.46 ± 9.58	0.881
组织学分化			0.209
高分化	1	1	
中分化	24	13	
低分化	10	1	
浸润深度			0.700
T3	12	6	
T4	23	9	
N分期			0.021
无转移	9	9	
有转移	26	6	
距肛缘距离 /cm	5.97 ± 2.69	4.80 ± 3.09	0.184
CD4 ⁺ TILs/%	15.08 ± 9.59	13.93 ± 5.70	0.667
CD8 ⁺ TILs/%	15.54 ± 6.58	16.73 ± 6.28	0.555
CTLA-4 ⁺ TILs/%	4.54 ± 5.80	5.93 ± 6.35	0.454
FOXP3 ⁺ TILs/%	15.37 ± 13.84	13.33 ± 8.18	0.598

2.5 总生存期(overall survival, OS)分析

通过Kaplan-Meier生存分析法对OS进行单因素分析, 得出NAC后CD8⁺ TILs和N分期与OS有相关性。无淋巴结转移的患者OS长, 生存时间为(26.50±1.50)个月(P=0.021, 图3A)。

CD8⁺ TILs高表达的患者OS长, 生存时间为(22.43±1.36)个月(P=0.002, 图3B)。对有统计学意义的单因素用COX比例风险回归模型进行多因素分析, 发现NAC后CD8⁺ TILs是影响直肠癌NAC患者OS的独立预后因素(P=0.032, 表2)。

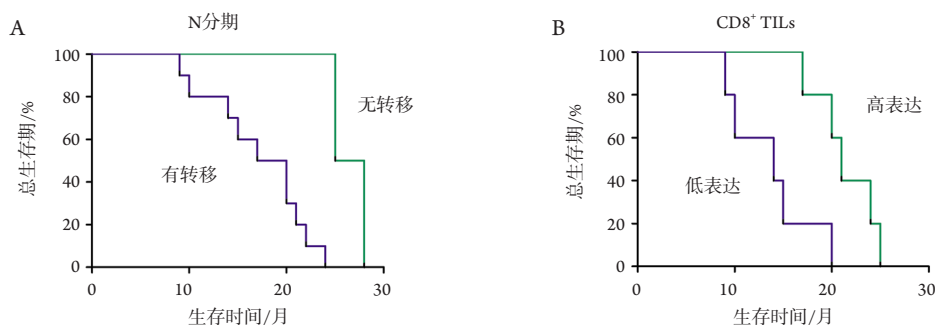


图3 单因素分析生存曲线

Figure 3 Univariate analysis of survival curve

表2 免疫标志物及临床病理特征与总生存期的相关性

Table 2 Correlation of the immune markers and clinical pathological features with the overall survival

变量	单因素分析		多因素分析		
	Log-rank	P	B	标准误	P
CD4 ⁺ TILs	0.255	0.614			
CD8 ⁺ TILs	9.227	0.002	1.852	0.863	0.032
CTLA-4 ⁺ TILs	3.435	0.064			
FOXP3 ⁺ TILs	0.057	0.812			
T分期	0.093	0.760			
N分期	5.364	0.021	-11.740	166.211	0.944
性别	1.469	0.225			
年龄	0.914	0.339			

3 讨论

CD4⁺ T细胞不仅可以通过IFN-g对肿瘤细胞产生杀伤作用, 还可以通过各种途径激活CD8⁺ T细胞。CD8⁺ T细胞被激活以后聚集到肿瘤部位诱导细胞凋亡^[6]。本研究显示NAC后CD4⁺ TILs和CD8⁺ TILs的表达水平明显高于NAC前。无淋巴结转移、CD4⁺ TILs高表达、CD8⁺ TILs高表达的患者在NAC后临床分期降低。一方面说明NAC前患者的免疫功能低下, 另一方面提示化学治疗药物可能诱导CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs表达水平升高。已有研究^[7]证明: 化学治疗可以诱导肿瘤死亡受体的表达并募集CD4⁺ TILs, CD8⁺ TILs等免疫细胞, 将肿瘤免疫微环境转变为活化状态, 从而对NAC有更好的反应。CD8⁺ TILs高表达的患者预后明显好于CD8⁺ TILs低表达的患者, 这也充分说明肿瘤微环境中的CD8⁺ TILs对肿瘤的发生发展有抑制作用, 使得CD8⁺ TILs高表达的患者预后较好。这与文

献[8-9]报道的研究结果相符。

Tregs为T细胞亚群的一种, 是肿瘤免疫抑制的主要参与者^[10-13]。目前认为FOXP3是Tregs最具特异性的标志物。在T淋巴细胞表面上有一种抑制分子CTLA-4^[14-15]。Tregs持续性表达的CTLA-4通过与B7(CD80/CD86)的相互作用抑制T细胞活化^[16]。本研究显示CTLA-4⁺ TILs和FOXP3⁺ TILs在NAC前后保持相对稳定, 并且与直肠癌预后无相关性。这两个因素都对T细胞具有免疫抑制作用, 说明NAC可能并没有改变肿瘤微环境中的免疫抑制状态。这可能意味着肿瘤产生的免疫抑制状态是持续的、非特异性的。在这种免疫微环境状态下, NAC对肿瘤细胞的杀伤作用被削弱。因此, 为达到良好的治疗效果, 可以考虑NAC联合免疫治疗方法。但是关于FOXP3⁺ TILs的表达与肿瘤发生发展之间的关系尚无一致的结论, Frey等^[17]研究发现FOXP3⁺ TILs高表达与良好的预后相关, 而Lin等^[18]却认为FOXP3⁺ TILs与肿瘤进展相关。本研究

中CTLA-4⁺ TILs的表达与直肠癌NAC的预后无相关性, 然而有研究^[19]显示CTLA-4⁺ TILs的表达与预后不良相关, 因此还需进一步加大样本量进行研究。

PD-L1是一种重要的抑制性分子^[20]。PD-L1可以通过与PD-1结合在T细胞上抑制T细胞增殖和细胞因子的产生, 这在免疫耐受和免疫逃逸中起重要作用^[21-22]。目前, 抗PD1抗体nivolumab和pembrolizumab已经被食品药品监督管理局批准应用于肾细胞癌、非小细胞肺癌等恶性肿瘤的治疗。而本研究显示: 无论是肿瘤细胞或基质细胞, PD-L1表达都相当低, 提示抗PD-1单克隆抗体应用于直肠癌可能无明显效果。

综上所述, N分期, CD4⁺ TILs及CD8⁺ TILs是NAC疗效的敏感指标; CD8⁺ TILs是影响直肠癌NAC患者OS的独立预后因素。目前关于NAC对肿瘤微环境影响的研究报道较少, 主要集中在NAC后的改变。另外, 也有研究^[23]使用流式细胞仪检测人体外周血相关指标来预测肿瘤微环境与肿瘤进展的相关性, 然而利用实体肿瘤的病变组织应是研究肿瘤微环境的可靠方法。肿瘤微环境是一个复杂的综合系统, 深入研究直肠癌细胞周围炎性微环境的免疫调控机制, 探索肿瘤微环境与直肠癌信号调控通路、代谢通路等之间可能存在的关系, 将有助于为直肠癌的病理机制及免疫治疗提供新的视角。

参考文献

- International Agency for Research on Cancer. Colorectal cancer estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012[R/OL]. Globocan 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- Kim NK, Hur H. New perspectives on predictive biomarkers of tumor response and their clinical application in preoperative chemoradiation therapy for rectal cancer[J]. *Yonsei Med J*, 2015, 56(6): 1461-1477.
- Schrag D, Weiser MR, Goodman KA, et al. Neoadjuvant chemotherapy without routine use of radiation therapy for patients with locally advanced rectal cancer: a pilot trial[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(6): 513-518.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1989, 8(2): 98-101.
- Albini A, Magnani E, Noonan DM. The tumor microenvironment: biology of a complex cellular and tissue society[J]. *QJ Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 54(3): 244-248.
- Kumamoto Y, Mattei LM, Sellers S, et al. CD4⁺ T cells support cytotoxic T lymphocyte priming by controlling lymph node input[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(21): 8749-8754.
- Kalbasi A, June CH, Haas N, et al. Radiation and immunotherapy: a synergistic combination[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 2756-2763.
- Yasuda K, Nirei T, Sunami E, et al. Density of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer[J]. *Radiat Oncol*, 2011, 6: 49.
- García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(6): 488.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3[J]. *Science*, 2003, 299(5609): 1057-1061.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death[J]. *Immunity*, 2004, 21(4): 589-601.
- Paust S, Lu L, Mccarty N, et al. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(28): 10398-10403.
- von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(4): 338-344.
- Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors[J]. *Neoplasia*, 2006, 8(3): 190-198.
- Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2084-2091.
- Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, et al. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation[J]. *J Immunol*, 1999, 162(10): 5813-5820.
- Frey DM, Droezer RA, Viehl CT, et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(11): 2635-2643.
- Lin YC, Mahalingam J, Chiang JM, et al. Activated but not resting regulatory T cells accumulated in tumor microenvironment and correlated with tumor progression in patients with colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(6): 1341-1350.
- Salvi S, Fontana V, Boccardo S, et al. Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61(9): 1463-1472.

20. Bloch O, Crane CA, Kaur R, et al. Gliomas promote immunosuppression through induction of B7-H1 expression in tumor-associated macrophages[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(12): 3165-3175.
21. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(6): 467-477.
22. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677-704.
23. 王海波, 刘海义, 苏文, 等. 直肠癌新辅助治疗后外周血调节性T细胞水平与肿瘤缓解的关系[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2015, 18(4): 361-364.
WANG Haibo, LIU Haiyi, SU Wen, et al. Relationship between CD4+CD25(High)CD127(low) regularly T cells in the peripheral blood and tumor regression after neoadjuvant therapy in patients with rectal cancer[J]. *Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2015, 18(4): 361-364.

本文引用: 张思宇, 郝彦凤, 步鹏, 仝煦楠, 徐菁. 肿瘤微环境相关因子与直肠癌新辅助化疗疗效和预后的相关性[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(1): 47-54. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.009

Cite this article as: ZHANG Siyu, XI Yanfeng, BU Peng, TONG Xu'nan, XU Jing. Correlation of tumor microenvironment related markers and the curative effect with prognosis of neoadjuvant chemotherapy of rectal cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(1): 47-54. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.009