



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research

New Technology of Tumor Diagnosis and Treatment—Article

## 外周血免疫特征预测肝内胆管癌患者化疗敏感性

吴彤<sup>a,b,#</sup>, 杨应成<sup>c#</sup>, 郑博<sup>a,b,#</sup>, 施学兵<sup>c</sup>, 李炜<sup>c</sup>, 马文聪<sup>c</sup>, 王珊<sup>d</sup>, 李祉萱<sup>a,b</sup>, 朱妍静<sup>a,b</sup>, 吴建民<sup>e</sup>, 汪凯婷<sup>e</sup>, 赵燕<sup>e</sup>, 伍睿<sup>c</sup>, 隋成军<sup>c</sup>, 莘似韵<sup>a,b</sup>, 吴璇<sup>f</sup>, 陈磊<sup>a,d,g,\*</sup>, 袁振刚<sup>h,\*</sup>, 王红阳<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> International Cooperation Laboratory on Signal Transduction & Key Laboratory of Signaling Regulation and Targeting Therapy of Liver Cancer, Ministry of Education & Shanghai Key Laboratory of Hepatobiliary Tumor Biology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

<sup>c</sup> Department of Hepatobiliary Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

<sup>d</sup> Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China

<sup>e</sup> Institute of Metabolism and Integrative Biology, Fudan University, Shanghai 200433, China

<sup>f</sup> Department of Laboratory Medicine, The Tenth People's Hospital of Shanghai, Tongji University, Shanghai 200072, China

<sup>g</sup> Key Laboratory of Signaling Regulation and Targeting Therapy of Liver Cancer, Ministry of Education, Shanghai 200438, China

<sup>h</sup> Department of Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 May 2020

Revised 13 January 2021

Accepted 21 January 2021

Available online 11 August 2021

#### 关键词

肝内胆管癌

吉西他滨

化疗敏感性

外周血单核细胞

### 摘要

肝内胆管癌(ICC)是第二常见肝癌。化疗仍然是晚期ICC患者的主要治疗方法,但是化疗敏感性因人而异。在本研究中,我们使用飞行时间质谱仪(CyTOF)在单细胞水平上建立ICC患者在化疗前、化疗中和化疗后指定时间点外周血单核细胞(PBMC)的免疫谱;应用多重免疫荧光染色展现某些特定免疫亚群的空间分布;使用组织微阵列(TMA)评估患者预后。本研究共招募了20名接受吉西他滨(GEM)治疗的ICC患者,其中8例对化疗反应良好(R),12例无反应(NR)。我们观察到化疗后患者PBMC组成发生了巨大变化,比如CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>双阳性T细胞(DPT)水平增加。治疗前CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞水平较高的患者对化疗反应良好。我们的研究确定了T细胞亚群的百分比与患者化疗反应性之间存在正相关关系,这表明通过评估PBMC中细胞亚群的比例来预测ICC患者化疗反应性是可行的。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1 引言

肝内胆管癌(ICC)是第二常见原发性肝癌。它被定义为位于第二胆管近端且发病率稳定增加的胆管癌[1]。ICC来源于肝内胆管上皮细胞,手术切除是唯一的治愈性治疗方法[2]。作为一种恶性程度很高的疾病,只有接受根治性R0手术切除的患者才有良好的生存机会[3]。此前,针对不可切除的ICC主要采取姑息治疗[4]。多项研究报告称,放疗和辅助化疗可提高晚期或侵袭性胆道肿瘤的生存率[3,5]。然而,由于复杂的肿瘤异质性,ICC患者对

化疗的反应性各异。因此,迫切需要开发一种无创方法来区分具有良好化疗反应性(R)和对化疗无反应(NR)的患者。

吉西他滨(GEM)是一种核苷类似物,对人类各种实体瘤具有积极的抗肿瘤作用,包括乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌和非小细胞肺癌[6],它常用于ICC起源肝转移癌的治疗[7]。不可切除和转移性ICC的一线化疗药是GEM联合顺铂[8]。除了化学毒性外,GEM还具有免疫调节功能[9–10]。此外已有研究表明患者的免疫状态会影响他们对化疗药物的敏感性[11–13]。需要揭示ICC患者的免疫状态

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: chenlei@smmu.edu.cn (L. Chen), yuangz@163.com (Z.-G. Yuan), hywangk@vip.sina.com (H.-Y. Wang).

与其对GEM的敏感性之间的关系。

在本研究中，我们应用飞行时间质谱仪（CyTOF）进行高维深度免疫分型，以比较ICC患者化疗前、化疗中和化疗后外周血单核细胞（PBMC）的免疫特征。我们发现，具有高水平CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞（代表外周血中T细胞的激活状态）的ICC患者对化疗有更好的反应性。我们还通过多重免疫荧光染色检测了ICC肿瘤组织中CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞的水平，发现其与血液中的水平呈正相关。组织微阵列（TMA）进一步确认了CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞水平高的患者具有更好的总体生存率（OS）。

## 2. 材料方法

### 2.1. 患者和样本特征

分三个不同时间点（化疗前、化疗中、化疗后）采集20例来自东方肝胆外科医院（EHBH）接受GEM联合化学治疗ICC患者的血样。这些ICC患者对化疗的反应性根据实体瘤疗效评价标准（RECIST）分为部分缓解（PR）、

疾病稳定（SD）或疾病进展（PD）。PR和SD患者均被视为R患者，而PD患者被视为NR患者。由于有几名患者在研究期间停止治疗，最终共有49份血样被纳入本研究。表1列出了所有20名患者的临床特征。所有样本均按照当地道德准则匿名编码。我们的CyTOF抗体组由35个细胞表面免疫标记物抗体组成，这些标记物抗体可以检测PBMC的经典免疫表型并发现新的免疫亚群。分离PBMC并用金属标记抗体预染色，然后使用CyTOF检测，进而对高维原始数据进行降维处理以进一步深入分析。分析不同采集时间点R患者与NR患者的免疫亚群分布的差异。

### 2.2. 分离PBMC

将2 mL新鲜血液样品与等体积的盐水混合，然后将混合物小心地滴加在4 mL FicolI液的表面上，并以450g离心25 min。离心后PBMC聚集在混合液的中间层。

### 2.3. 飞行时间质谱流式术和数据处理

每个PBMC样品在如前所述分离后用重金属耦合抗体

表1 ICC患者的临床特征和疗效评估

Patient	Sex	Age	TNM score			TNM stage	Chemo treatment	Before the first chemo			Before the second chemo			Before the third chemo			RECIST
			T	N	M			ECOG	CA19-9 (U·mL <sup>-1</sup> )	WBC (×10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	ECOG	CA19-9 (U·mL <sup>-1</sup> )	WBC (×10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	ECOG	CA19-9 (U·mL <sup>-1</sup> )	WBC (×10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	
1	Male	55	3	0	1	IV	GEMOX	1	12.00	6.10	1	95.6	6.08	2	38.4	6.25	PR
2	Female	44	x	1	1	IV	GEMOX	1	6.50	7.57	2	7.1	5.04	2	10.6	6.11	SD
3	Male	57	x	1	1	IV	GEMOX	1	12981.00	8.46	1	8700.0	8.41	1	1909.0	6.00	SD
4	Male	62	x	1	1	IV	GP	1	61.80	7.76	1	153.0	6.66	1	184.4	7.20	PR
5	Female	61	x	x	1	IV	GEMOX	1	12283.00	8.32	1	1972.0	4.19	1	132.9	4.00	SD
6	Female	54	x	x	1	IV	GS	1	12.30	4.06	1	9.4	2.78	1	10.4	3.59	SD
7	Male	43	x	x	1	IV	GEMOX	2	303.22	6.25	1	95.6	6.08	2	38.4	6.25	PR
8	Female	67	x	x	1	IV	GEMOX	1	953.80	5.45	NA	NA	NA	2	1103.0	5.20	SD
9	Male	56	x	x	1	IV	GEMOX	1	119.20	6.39	1	256.4	5.69	2	454.5	7.00	PD
10	Female	54	2	x	1	IV	GEMOX	1	17.70	3.26	1	14.4	3.36	2	17.5	3.90	PD
11	Male	43	x	1	1	IV	GEMOX	1	221.50	4.05	2	357.8	4.36	2	525.7	4.00	PD
12	Female	53	2	x	1	IV	GEMOX	1	543.40	4.95	1	866.8	8.11	2	916.9	5.00	PD
13	Female	62	2	x	1	IV	GEMOX	1	146.30	11.79	2	132.0	10.93	1	262.1	11.00	PD
14	Female	64	x	1	1	IV	GEMOX	2	1.10	4.99	2	0.5	4.39	NA	NA	NA	PD
15	Female	67	x	x	1	IV	GP	1	219.80	5.32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	PD
16	Female	61	x	x	1	IV	GS	1	52.80	4.47	2	35.5	3.83	NA	NA	NA	PD
17	Male	63	x	1	1	IV	GEMOX	1	187.00	4.57	NA	NA	NA	NA	NA	NA	PD
18	Female	43	2	x	1	IV	GEMOX	2	2.90	9.92	NA	NA	NA	NA	NA	NA	PD
19	Male	67	x	1	1	IV	GP	1	12632.00	7.47	2	15823.0	6.71	NA	NA	NA	PD
20	Male	56	x	x	1	IV	GEMOX	1	200.30	6.80	1	158.7	6.08	1	158.9	7.00	PD

TNM: tumor (T)–node (N)–metastasis (M); GEMOX: gemcitabine plus oxaliplatin; GP: gemcitabine plus cisplatin; GS: gemcitabine plus S-1; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group score standard; CA19-9: carbohydrate antigen 19-9; WBC: white blood cell; NA: not available.

染色[14]。抗体组合包含涉及各种免疫亚群的35种抗体(见附录A中的表S1)。CyTOF抗体组既可以检测PBMC的经典免疫亚群,也可以发现新的免疫亚群。预偶联抗体直接从供应商处购买。分离后,PBMC用 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 顺铂染色2 min,然后与金属偶联表面抗体在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min。接下来,用固定破膜缓冲液固定细胞。最后,使用铈加固定破膜缓冲液进行细胞固定和可视化,该过程持续一夜,然后在Helios质谱流式细胞仪(Fludigm,美国)上进行分析。根据制造商的说明使用EQ™ Four Element Calibration Beads对信号进行校正。每个样品收集250 000~300 000个细胞。文件(.fcs)被上传到Cytobank,手动门控圈出目标细胞群,导出.fcs文件。在进一步分析之前,对高维原始数据进行降维处理。在R软件上使用Cytokit程序从每个.fcs文件中进行随机抽样。然后在这些细胞上执行基于 $t$ 分布随机邻近嵌入( $t$ -SNE)和基于FlowSOM/Renograph算法聚类的可视化。鉴定在不同收集时间点的R患者与NR患者中差异分布的免疫细胞亚群。

#### 2.4. 多重免疫荧光染色

用多重免疫组织化学检测试剂盒(Perkin-Elmer)对含有75名ICC患者癌组织的两个组织芯片进行染色,并使用Vectra 3.0病理学成像系统显微镜(Perkin-Elmer)获取图像。将载玻片脱蜡至水,并使用Trilogy缓冲液(CellMarque)通过高压灭菌15 min来修复抗原。载玻片用 $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 处理15 min,洗涤,并使用 $4\%$ 牛血清白蛋白(BSA)/磷酸盐缓冲盐水(PBS)/ $0.1\%$  Triton X-100(均来自Sigma)封闭。使用的抗体是:抗CD8、抗CD4和抗CXCR3抗体。用于每种抗体的检测染料为:opal570染料(CD8)、opal520染料(CD4)和opal690染料(CXCR3)。4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)用作核复染剂。使用Halo Image Analysis软件(Indica Labs)Highplex FL模块分析数字图像,该模块允许同时分析任何细胞区室[细胞核、细胞质和(或)膜]中多达8个免疫荧光标记的标记物。所有标记均阴性的细胞为黑色,单个标记阳性的细胞根据标记颜色着色,三个标记均阳性的细胞被标记为蓝色。所有75名患者的临床特征列于附录A中的表S2。本实验中使用的抗体和相应的稀释比例列于附录A中的表S3。

#### 2.5. 数据和软件

本文发布的CyTOF数据的登录号和相关数据已上传到Mendeley数据库:10.17632/3b9yc9296n.2。本研究中使用的软件列于附录A中的表S1。

#### 2.6. 伦理批准和知情同意声明

以下所有程序均符合人体实验伦理委员会(机构和国家的)伦理标准,并符合2008年修订的1975年《赫尔辛基宣言》。所有患者均知情同意纳入本研究。

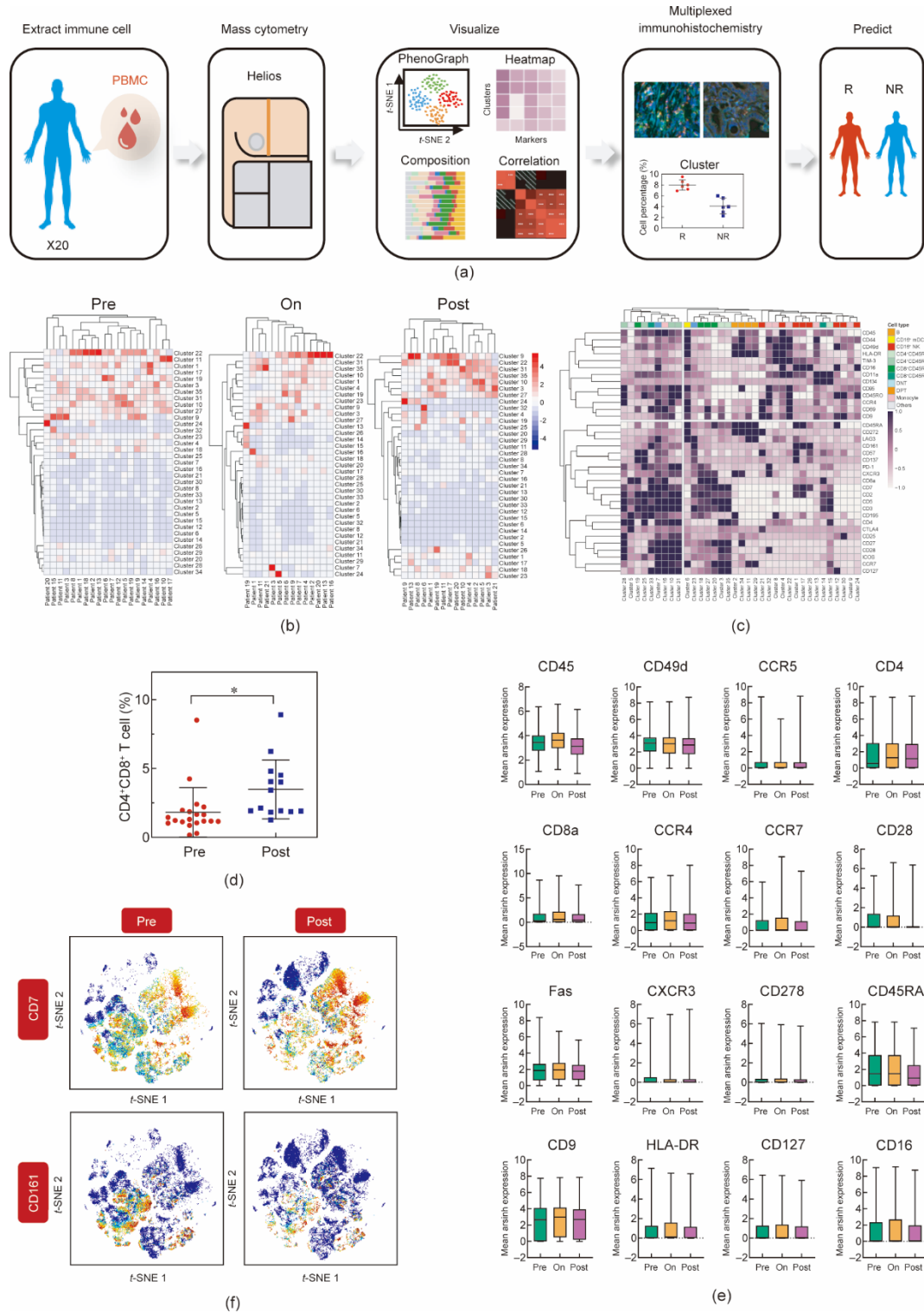
### 3. 结果

#### 3.1. GEM联合化疗改变PBMC的免疫状态

为了探索外周血免疫微环境是否可以预测ICC患者对GEM的反应性,我们设计了一个基于CyTOF的工作流程。PBMC按第2节所述分离和处理以进行分析。基于对PBMC单细胞水平的深入分析,我们想要确定PBMC中可以预测ICC患者化疗敏感性的特定免疫亚群。多重免疫荧光染色用于区分PBMC和肿瘤组织内免疫特征的异同[图1(a)]。原始文件经处理后,从每个样本的 $\text{CD}45^+$ 细胞中随机抽取5000个细胞进行进一步分析。使用经典的PhenoGraph聚类方法,共划分了35个免疫亚群。我们观察到经GEM联合化疗后PBMC中的大多数免疫亚群发生了重大变化,并且这些亚群的变化在不同患者中存在很大差异[图1(b)]。图1(c)描绘了每个亚群的分子表达情况。根据这35个亚群,经典免疫谱系包括B细胞、 $\text{CD}16^+$ 自然杀伤(NK)细胞、 $\text{CD}16^+$ 髓样树突细胞(mDC)、 $\text{CD}4^+\text{CD}45\text{RA}^+$ T细胞、 $\text{CD}4^+\text{CD}45\text{RO}^+$ T细胞、 $\text{CD}8^+\text{CD}45\text{RA}^+$ T细胞、 $\text{CD}8^+\text{CD}45\text{RO}^+$ T细胞、 $\text{CD}4/\text{CD}8$ 双阴性T(DNT)细胞、 $\text{CD}4/\text{CD}8$ 双阳性T(DPT)细胞和单核细胞可以进一步被细化[图1(c)]。经过系统分析,我们发现DPT细胞亚群的大小显著受到GEM联合化疗的影响,化疗后DPT细胞显著富集[图1(d)]。PBMC来源的免疫细胞在化疗前、化疗中和化疗后的多种表面标志物的表达如图1(e)所示。如 $t$ -SNE图[图1(f)]所示,GEM联合化疗提升了CD7的表达水平,同时降低了CD161的表达。

#### 3.2. 化疗前R患者与NR患者具有不同的免疫图谱

为了确定潜在的化疗敏感性预测因素,接下来我们使用CyTOF分析了20例ICC患者化疗前的PBMC,并从每个样本中随机抽取了5000个 $\text{CD}45^+$ 细胞进行进一步分析。FlowSOM定义了30个免疫亚群[图2(a)]。二维 $t$ -SNE图显示了PBMC中免疫细胞所有30个免疫亚群的分布情况。基于分子表达,我们进一步将30个亚群按照经典免疫谱系重新划分[图2(a)]。T细胞,包括 $\text{CD}4^+$ T、 $\text{CD}8^+$ T、DPT和DNT在PBMC中占优势,而单核细胞、 $\text{CD}16^+$ NK细胞、B细胞、 $\text{CD}16^+$ mDC和其他细胞亚群占



**图 1.** 吉西他滨联合化疗改变 PBMC 的免疫特征。(a) 整个工作流程的图文摘要。收集 ICC 患者化疗全程的 PBMC 样本。从外周血中提取的免疫细胞孵育金属标记的抗体后利用飞行时间质谱流式仪进行检测分析。采集到的数据降维后进行可视化处理。通过手动圈门和聚类算法划分细胞亚群。(b) 热图显示了所有患者在化疗前、化疗中和化疗后全部 35 个亚群的细胞百分比。(c) 热图显示了所有样本（所有患者化疗前、化疗中、化疗后样本）35 个亚群中 35 个细胞表面标记物的平均表达水平。(d) 化疗前和化疗后样本中 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 细胞的百分比。P < 0.05。(e) 比较所有患者中多种细胞表面标记物（CD45、CD49d、CCR5、CD4、CD8a、CCR4、CCR7、CD28、Fas、CXCR3、CD278、CD45RA、CD9、HLA-DR、CD127 和 CD16）在化疗前、化疗中和化疗后的细胞百分比。(f) 代表性的 t-SNE 图显示化疗后某些表面标记物的表达变化。

比很小。特征基因的表达模式如图 2 (b) 所示。热图显示了 30 个免疫亚群和 PBMC 不同谱系的分子表达特征[图

2 (c) 和 (d) ]。为了进一步探究 8 名 R 患者和 12 名 NR 患者 PBMC 免疫组成情况，我们分析了 R 和 NR 患者之间

在经典免疫谱系方面是否存在显著差异并绘制了患者的树状图。经典免疫谱系在R组（患者1~8）和NR组（患者9~20）之间没有显著性差异[图2（e）]。图2（f）详细展示了20名患者的免疫组成情况。有趣的是，与R患者相比，NR患者中只有CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞比例显示出下降趋势，而其他免疫谱系的分布在两组中相对相似[见附录A中的图S1（a）]。根据患者的树状图，一些具有相似免疫组成的NR患者被聚类到一起[图2（f）]。R和NR组中PBMC不同免疫亚群的比例在附录A中的图S1（b）中进行了比较。我们注意到R患者的几个亚群比例明显高于NR患者，包括CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞（3亚群）和CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞（6和10亚群）[图2（g）]。总的来说，R和NR患者仅在T细胞方面表现出不同的免疫组成。此外，个体差异是一个不可忽视的因素。如图2（h）所示，经典谱系的组成在患者之间差异很大。与其他患者不同，11号和20号患者中经典免疫谱系的占比相当小。在大多数患者中，CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞所占比例最大，而5号患者的PBMC中CD16<sup>+</sup>NK细胞的比例最大。这些结果表明不同患者PBMC存在高度异质的免疫环境。

### 3.3. 外周血中某些T细胞亚群与化疗反应性相关

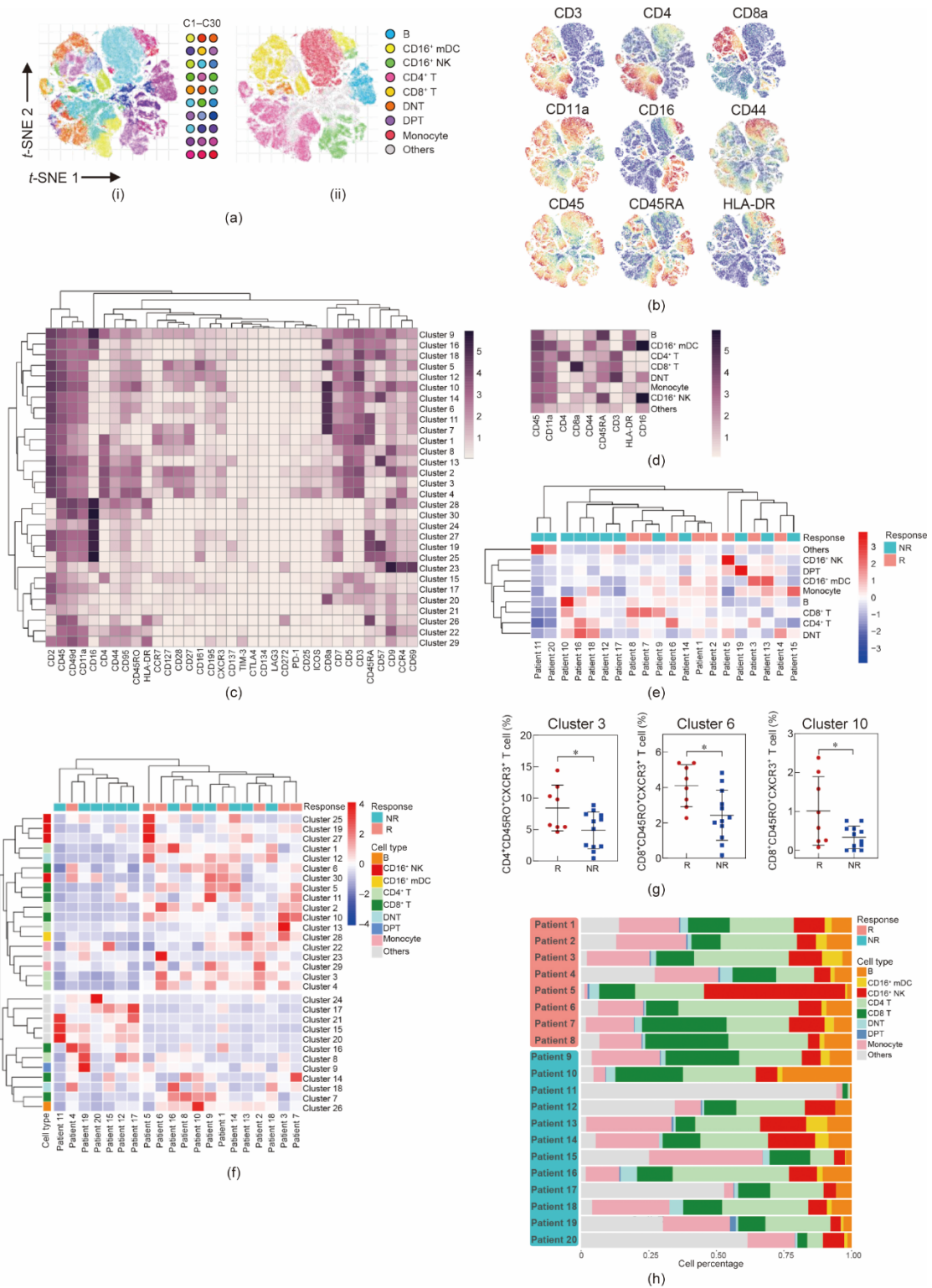
接下来我们关注R组和NR组患者外周血T细胞组成的差异。分别在化疗前、化疗中和化疗后收集患者T细胞，并从中随机抽取5000个进行分析。我们使用*t*-SNE图来呈现外周血29个已识别T细胞亚群的分布情况[图3（a）]。发现在R患者和NR患者之间外周血T细胞亚群的分布存在显著差异[图3（b）]。与图1（b）中的结果类似，在R组和NR组中，大多数T细胞亚群在化疗后都发生改变[图3（c）]。我们观察到无论是R还是NR组患者，化疗后CD4<sup>+</sup>幼稚T（Tnaive）细胞（5、6和14亚群）都增加，而CD4<sup>+</sup>中央记忆T（Tcm）细胞（9、22和26亚群）均减少。根据患者的树状图，R和NR患者可以根据他们不同的T细胞免疫组成而被划分开来[图3（d）]。聚类分析显示，1、16和22亚群在化疗前时间点可以更准确地将患者划分到不同的组别[图3（e）]，然而，从其他两个时间点收集的样本不能很好地将患者分组[图3（e）]。16和22亚群均为CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞。与之前的发现类似，化疗前16和22亚群在R组患者中均上调[图3（f）]。然而，化疗前R患者的22亚群（CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞）比NR患者增加得相对更显著，而16亚群（CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞）则呈现相反的趋势[图3（f）]。

为了进一步阐明这些亚群的功能，我们探索了化疗前样本中不同亚群之间的共存和互斥情况。我们观察到27亚群（CD4<sup>+</sup>CD9<sup>+</sup>Tcm）与R组中的16和22亚群呈正相关[图3（g）]，除了CXCR3外，其表达谱与22亚群相似。NR组中亚群之间的共存关系与R组中不同，25亚群（CTLA4<sup>+</sup>DPT）、5亚群和6亚群（CD45RA<sup>+</sup>Tnaive）共存，而所有这些亚群都与16和22亚群互斥[图3（g）]。我们还分析了其他免疫谱系，包括B细胞、NK细胞、单核细胞和DC的组成情况，其聚类的*t*-SNE图和热图见附录A中的图S2（a）、（b）。然而，根据B细胞、NK细胞、单核细胞或DC细胞群，无法很好地将患者分组[见附录A中的图S2（c）]。

我们新引入了一个由12名接受GEM治疗的ICC患者（6名R和6名NR）组成的独立队列（患者信息见附录A中的表S4），以进一步探讨外周血免疫环境对化疗敏感性的影响。我们分析了PBMC中CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞的百分比，并验证了以下发现：PBMC中CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞水平高的患者对基于GEM的治疗更敏感，并表现出更好的临床预后[图3（h）]。为了研究CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞的临床应用前景，我们分析了化疗前22亚群大小与多个临床指标之间的相关性[图3（i）]，发现22亚群与全身炎症指标如R患者的白细胞（WBC）/中性粒细胞（NEUT）数量显著负相关，而NR患者的22群与WBC/NEUT数量呈正相关趋势（ $P = 0.0929/0.0754$ ），这表明22亚群的增加提示R患者的全身炎症反应受到抑制[附录A中的图S2（d）]。总的来说，我们的数据显示R和NR组患者外周血中T细胞亚群的分布情况不同，尤其是在化疗前差异更为明显。

### 3.4. ICC患者外周血中激活状态T细胞提示良好的化疗反应性

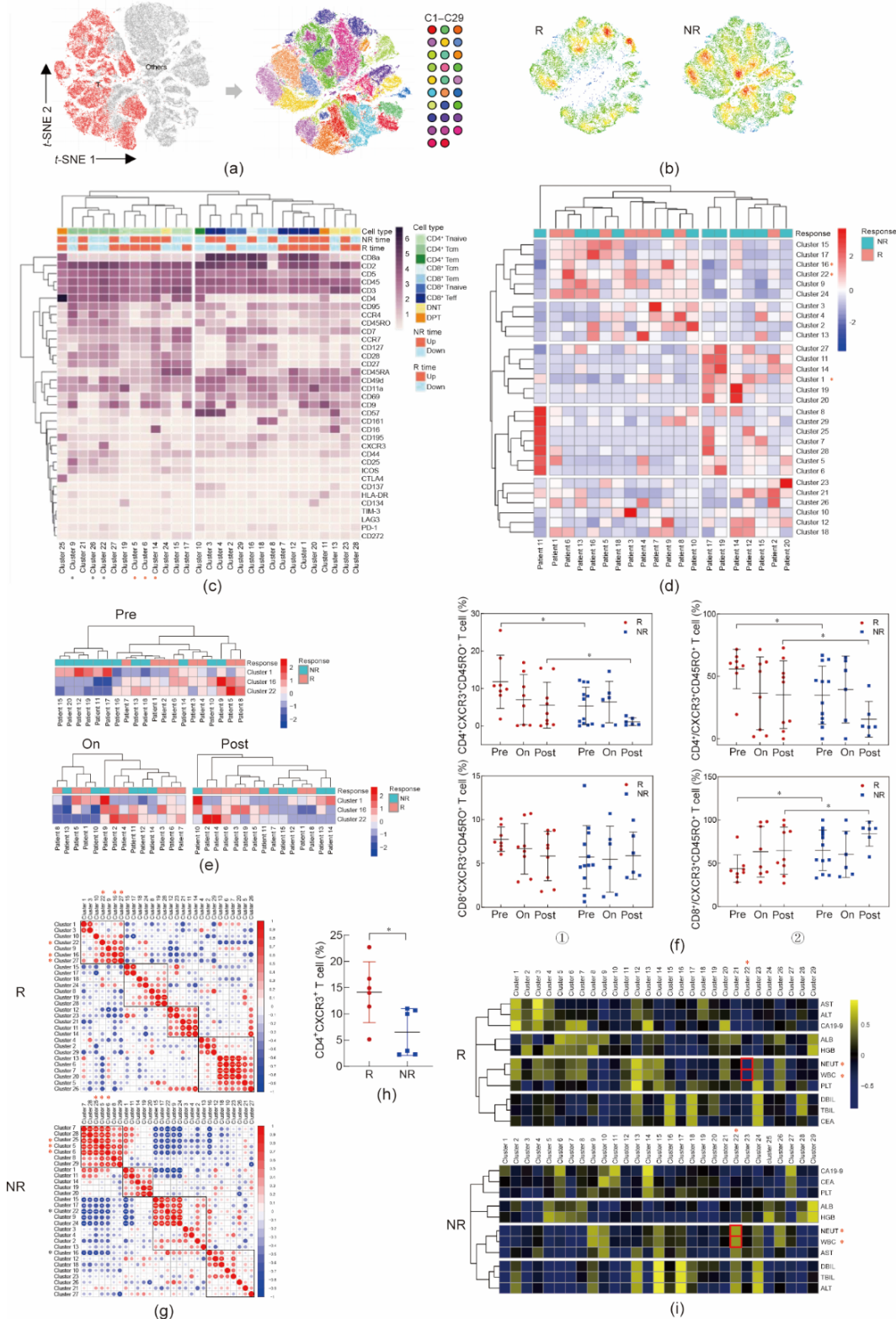
为了进一步探索R组和NR组患者之间T细胞分子表达谱的差异，我们检测了R组和NR组患者T细胞所有35个标志物的表达情况，发现根据不同表面标志物的表达水平可以将R与NR组患者很好地划分开[图4（a）]。接下来我们进行了基于免疫分子表达的多元逻辑回归分析。受试者工作特征曲线（ROC）显示，这35种表面标志物对R与NR组患者具有较高的区分能力（附录A中的图S3）。每个标志物的贡献显示在附录A中的表S5中。R组的CXCR3、CD45RO、HLA-DR、CD49d和CD11a显著高于NR组[图4（b）]。这些免疫分子的表达显示T细胞处于激活状态。我们发现CXCR3和CD45RO联合可以有效预测ICC患者的化疗敏感性[图4（c）]。R和NR组中T



**图2.** R患者和NR患者化疗前外周血单核细胞的免疫特征。(a) 20个样本的t-SNE图显示：(i) 通过Phenograph聚类法将免疫细胞划分为30个亚群；(ii) 将免疫细胞按经典的免疫亚群进行划分。(b) PBMC样本表面标记物标准化的t-SNE图。(c) 热图显示了30个免疫亚群中所有35个标记物的平均表达水平。(d) 热图显示了所有经典免疫亚群的标志物表达情况。(e) 热图显示了20名患者中经典免疫亚群的细胞百分比。标准化方法：行标准化。(f) 热图显示了所有20名患者中30个免疫亚群的细胞百分比。标准化方法：行标准化。(g) 绘制R和NR患者3、6、10亚群的细胞百分比。 $P < 0.05$ 。(h) 每个ICC患者不同经典免疫亚群的比例。

细胞表面标志物的共表达模式如图4 (d) 所示。在R组中，HLA-DR的表达与PD-1密切相关，提示T细胞处于晚

期免疫激活状态。然而，在NR组中，PD-1与CD272 (BTLA1) 共表达，这意味着T细胞的状态相比于R组更加



**图3.** 外周血中某些T细胞亚群与患者化疗反应性相关。(a) *t*-SNE图(所有患者化疗前、化疗中、化疗后血液样本)显示,通过Phenograph聚类法将T细胞中划分为29个亚群。(b) *t*-SNE图分别显示了R和NR患者的细胞密度。(c) 热图显示了29个免疫亚群中所有35个标记物的平均表达水平。Tem: 效应记忆性T细胞, Teff: 效应T细胞。(d) 热图显示了20名患者化疗前所有29个T细胞亚群的细胞百分比。(e) 热图显示所有患者在化疗前、化疗中、化疗后1、16、22亚群的细胞百分比。(f) (i) 不同时间点R和NR患者CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞的百分比;(ii) 比较不同时间点R和NR患者CD4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>T细胞比率。*P* < 0.05。(g) R和NR患者的亚群丰度相关性模式不同。(h) 12例ICC患者组成的独立队列中CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞的百分比(6例化疗反应良好,6例无反应)。(i) 热图显示了免疫亚群丰度与患者临床特征之间的相关性。AST: 天冬氨酸转氨酶; ALT: 丙氨酸转氨酶; ALB: 白蛋白; HGB: 血红蛋白; PLT: 血小板; DBIL: 直接胆红素; TBIL: 总胆红素; CEA: 癌胚抗原。

受到抑制。

我们获取了两组中各两名患者的临床信息，影像学数据显示，7号患者（R）的肿瘤在化疗后显着缩小，而19号患者（NR）的肿瘤在化疗后进展[图5（a）]。与19号

患者相比，7号患者具有更高的CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T细胞比例和更低的CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T细胞比例，尤其是在化疗前时间点[图5（b）]。除了CXCR3，我们在7号患者中其他免疫分子（包括CD49d、CD11a和

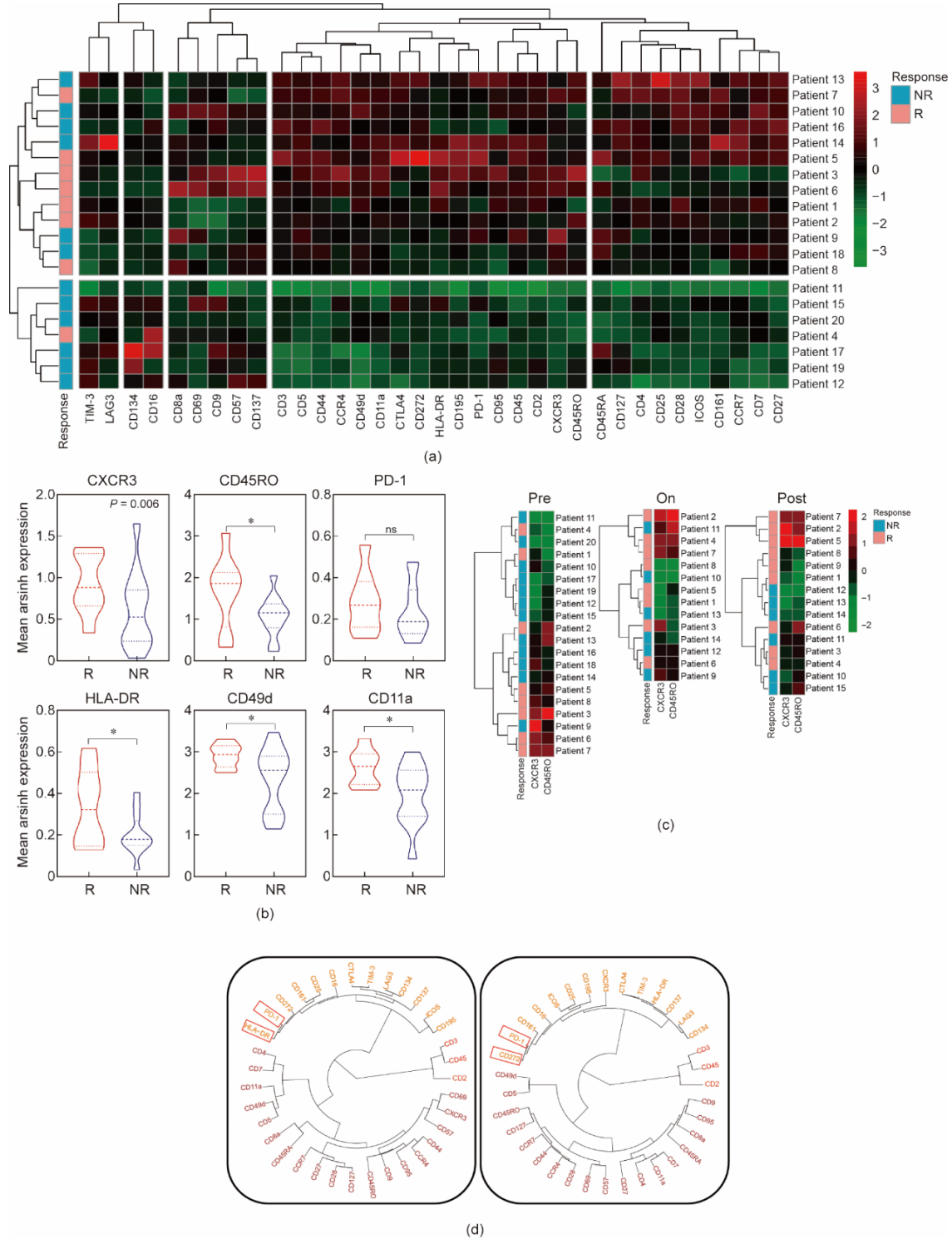
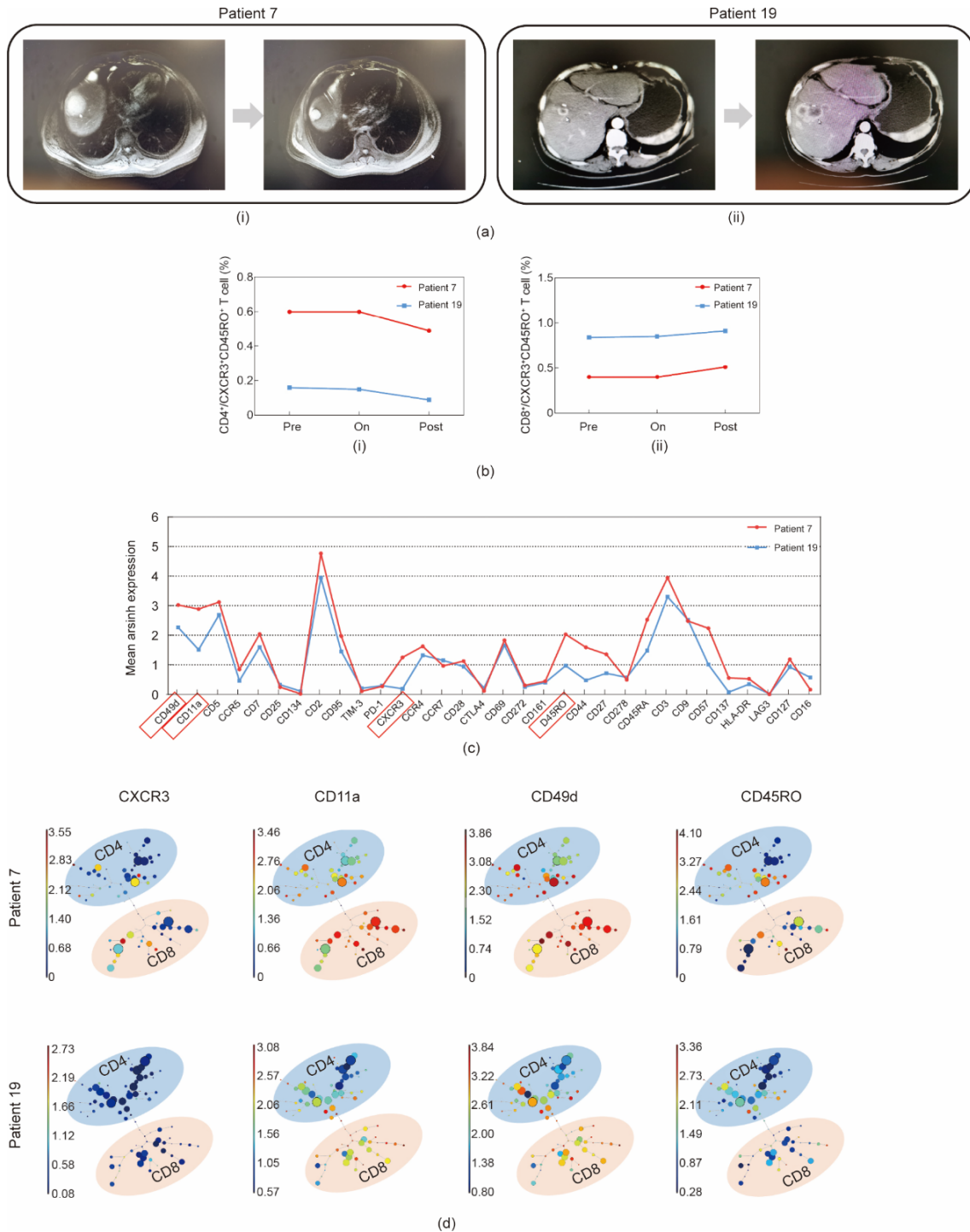


图4. R组患者化疗前免疫细胞表面标志物表达特征。(a) 热图显示了所有20名患者治疗前PBMC中所有35个标记物的平均表达水平；(b) 比较R、NR患者几种表面标志物（CXCR3、CD45RO、PD-1、HLA-DR、CD49d和CD11a）的表达水平；(c) 热图显示所有患者化疗前、化疗中、化疗后CD45RO和CXCR3的平均表达水平；(d) 聚类树展示了R、NR患者化疗前所有35个表面标志物的聚类情况。



CD45RO) 也显著高于19号患者[图5 (c)]。已有研究将 CD11a<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞鉴定为含有肿瘤反应性T细胞的群体, 并且发现较高水平的CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T细胞与化疗后更好的OS相关[15–16]。用FlowSOM算法来分析质谱数据共得到80个亚群。根据80个亚群之间表型的相似

性, 我们将它们进一步划分为20个元群[图5 (d)、附录A中的图S4]。与19号患者相比, 7号患者中更多的元群为CXCR3、CD11a、CD49d和CD45RO阳性, 这证实了R组患者中的T细胞更加活化并且对化疗具有更好的反应性[图5 (d)、附录A中的图S4]。

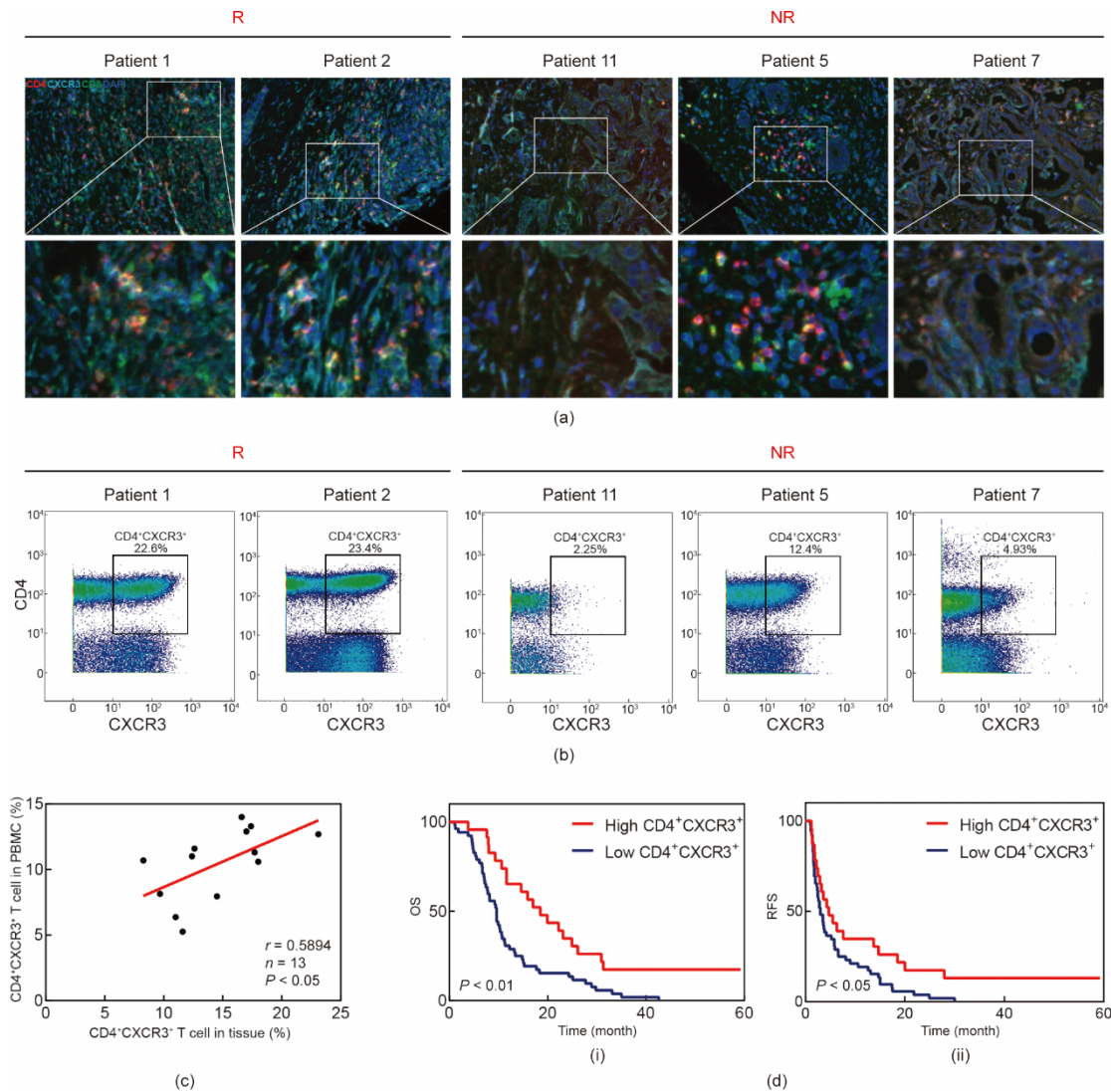


**图5.** 典型病例化疗前PBMC表面标志物表达情况与患者的临床预后情况。(a) 计算机断层扫描 (CT) 图像显示患者7 (来自R组) (i) 和患者19 (来自NR组) (ii) 的肿瘤在化疗前后的变化情况。(b) (i) 患者7和患者19化疗前CD4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T细胞的百分比; (ii) 患者7和患者19化疗前CD8<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T细胞的百分比。P<0.05。(c) 患者7和患者19 PBMC中32个表面标记物的平均表达水平。P<0.05。(d) 对患者7和患者19外周血中提取的淋巴细胞进行SPADE分析。每个圆代表一个细胞亚群。颜色深浅表示表面标记的表达水平。

### 3.5. 肿瘤环境中 CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的水平反映了 PBMC 的状况并具有预后价值

我们共采集了 5 名 ICC 患者的活检组织 (1、2、5、7 和 11 号患者), 用于比较配对肿瘤组织和 PBMC 之间的免疫特征。为了评估 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的数量, 我们应用了多重免疫荧光染色[图 6 (a)]。有趣的是, 我们发现外周血和配对肿瘤组织之间的 T 细胞呈正相关。1 和 2 号患者来自 R 组, 外周血中 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平较高, 其 ICC 组织中也有更多浸润的 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞, 而来自 NR 组的 5、7 和 11 号患者外周和瘤内 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞数量都很少[图 6 (a) 和 (b)]。为了验证 PBMC 和 ICC 肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的一致性, 我们收集了 13 对来自东方肝胆外科医院独立 ICC 患者队列的配对血液和肿

瘤组织样本。从血液/肿瘤样本中分离 PBMC/肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL), 并计算 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的百分比。分析结果证实了外周血和配对肿瘤组织之间的 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞呈正相关[图 6 (c)]。这 13 名患者的临床特征列于附录 A 中的表 S6。接下来, 我们探讨了 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平是否影响 ICC 患者的临床预后。Kaplan-Meier 生存分析显示 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平与总体生存和无复发生存呈正相关[图 6 (d)]。多个生存和复发相关临床病理变量的单因素分析显示只有 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平和肿瘤大小与 OS 显著相关 (表 2)。然后对每个参数进行多因素分析, 证实了 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平是影响 ICC 患者生存的独立且显著的因素 (表 2)。



**图 6.** 肿瘤环境中 CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的水平反映了 PBMC 的状况并具有预后价值。(a) ICC 组织微阵列中 CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞和 CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的多重免疫荧光染色。使用 Halo 软件的 Highplex FL 模块分析 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的定位。比例尺: 100  $\mu$ m。(b) 流式分析展示了 R 和 NR 患者 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的水平。(c) 外周血和配对肿瘤组织之间 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的相关性。根据 Pearson 相关性分析,  $P < 0.05$ 。r: Pearson 相关系数; n: 样本数。(d) Kaplan-Meier 生存分析展示了 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平与总生存期、无进展生存期之间的相关性。  $P < 0.05$ 。OS: 总生存率; RFS: 无复发生存率。

表2 单因素和多因素生存分析

Variables	OS			
	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>P</i> value <sup>a</sup>	HR (95% CI)	<i>P</i> value <sup>a</sup>
CXCR3 expression	0.729 (0.556–0.956)	0.021	0.719 (0.539–0.960)	0.025
Age	1.029 (0.999–1.059)	0.052	1.007 (0.977–1.037)	0.666
Tumor number	1.683 (1.188–2.383)	0.007	1.985 (1.333–2.955)	0.001
Diabetes	1.719 (0.935–3.160)	0.099	1.486 (0.733–3.013)	0.271
Hypertension	1.746 (0.992–3.075)	0.066	1.990 (1.030–3.845)	0.041

HR: Hazard ratio, CI: confidence interval.

<sup>a</sup>*P* value indicated the significance of difference in OS under different survival and recurrence-related clinicopathological variables.

## 4. 讨论

先前的研究强调了肿瘤微环境 (TME) 在肿瘤化疗和放疗中的作用[5,17–21]。肿瘤患者治疗前局部免疫微环境的状态和全身免疫状况可能会影响他们对化疗和放疗的反应性。最近的一项研究[5]指出, 经预处理后 PBMC 的全身免疫谱可用作预测肝细胞癌 (HCC) 对钇-90 (<sup>90</sup>Y) - 放射性栓塞 (RE) 持续治疗反应的生物标志物。GEM 是一种经典的化疗药物, 已被证明对多种肿瘤有效, 包括 ICC [6,22–26]。然而, 由于个体和肿瘤的异质性, ICC 患者对基于 GEM 的化疗反应性各不相同[27]。因此, 找到预测 ICC 患者的化疗敏感性的生物标志物对加快 ICC 化疗的个体化治疗进程具有重要意义, 这不仅会使临床医生更准确地选择治疗策略, 还可以减少不必要的医疗费用。在本文中, 我们使用 CyTOF 检测了 20 名患者的 PBMC, 发现 R 和 NR 患者的全身免疫状况存在显著差异。PBMC 中 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平较高的患者对基于 GEM 的化疗更敏感。此外我们发现 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞在 PBMC 中的丰度与在肿瘤组织中的丰度之间存在很强的相关性。

尽管患者之间存在异质性, 我们的研究依然确定了一些一般模式。研究发现, GEM 作为一种常见的化疗药物, 在人体内具有免疫调节功能[28–29]。我们证实了基于 GEM 的化疗对患者的全身免疫谱具有调节作用。化疗后, 与 NR 患者相比, R 患者的 DPT 细胞和 CD7<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK 细胞水平升高, 表明有效的化疗可以激活患者的免疫系统[30–31]。据报道, DPT 细胞存在于各种病理条件下, 包括病毒感染、炎症性疾病和癌症[32–33]。使用含有 5-ALA 的纳米复合物的强大光动力疗法可以通过增加 DPT 细胞来治疗转移性黑色素瘤[31]。

为了建立 PBMC 免疫状态与患者化疗敏感性之间的联系, 我们继续探索 R 和 NR 组患者在化疗前的差异。有趣的是, 我们发现 R 患者和 NR 患者外周血中 T 细胞的分布

存在显著差异, 尤其体现在 22 亚群 (CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 细胞) 和 16 亚群 (CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 细胞) 上, 这两个亚群均为 CXCR3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T 细胞。干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 诱导的趋化因子受体 CXCR3 及其内源性配体主要参与炎症和伤口愈合[34–35]; 它们在 TME 中也扮演着重要的双重角色。研究人员在活化的 T 淋巴细胞上发现了 CXCR3, 其配体具有抗癌活性[36–37]。CXCR3<sup>+</sup> 淋巴细胞向 TME 的迁移被认为参与了抗肿瘤反应[38]。癌症中 CXCR3<sup>+</sup> 效应记忆 CD8<sup>+</sup> T 细胞的数量和细胞毒性在化疗后增加[39]。化疗药物, 如紫杉醇, 也会使肿瘤内的 CD4<sup>+</sup> T 细胞分布向 Th1 (CXCR3<sup>+</sup>) 表型转变[40]。然而, 外周血单个核细胞和肿瘤组织中 T 细胞 CXCR3 的表达水平是否与化疗的疗效有关尚需进一步深入研究。

进一步分析免疫亚群与临床指标之间的相关性, 结果表明, CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的增加表明 R 患者的肝脏状况更好。R 组中 CXCR3、CD45RO、HLA-DR、CD49d 和 CD11a 的表达水平升高表明 T 细胞处于激活状态, 与更强的化疗反应性呈正相关。此外, CXCR3 和 CD45RO 联合应用可有效预测 ICC 患者的化疗敏感性。我们的数据还检测了 ICC 患者配对的肿瘤组织和 PBMC 中 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞的数量, 证实肿瘤内免疫微环境的状态与 PBMC 一致, 并且在 R 组更为活跃。通过多重免疫荧光染色, 我们发现 CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 细胞水平与总生存率和无复发生存率呈正相关。

近几年出现的 CyTOF 技术是一种基于电感耦合等离子体质谱的灵敏检测方法, 用于深入分析精准系统免疫学所需的单细胞蛋白质的表达情况[41]。CyTOF 可以同时检测一个细胞上 40 多种标记物, 解除了传统流式细胞仪检测参数数量的限制, 使细胞类型的划分更加容易[42]。使用传统的基于荧光的流式细胞术同时检测核糖核酸 (RNA) 和蛋白质、进行抗原特异性 T 细胞筛选以及分析染色质修饰会受到可用参数数量和复杂光谱重叠补偿过程

的限制[43]。CyTOF目前可以同时可靠地量化多达45个参数，并在未来的应用中会有更高的多重检测能力，在维度增加方面取得了突破[42]。在本研究中，我们利用CyTOF实现了对PBMC的深入分析，并描绘了ICC患者的系统免疫谱。然而，本研究仍有局限性——CyTOF技术不如流式细胞术敏感；CyTOF的抗体组需要仔细设计和验证；需要有经验的操作技师；而且仪器和试剂都很昂贵[41,44]。这些局限性意味着CyTOF目前无法广泛应用。需要进行更多的改进，使更多的医院能够使用CyTOF机器，供全球的临床医生使用。为了验证我们CyTOF结果的准确性，我们通过流式细胞术检测了R组和NR组中PBMC的分子表达。此外，因为化疗前患者没有常规进行活检，而且并非所有患者都经历了整个化疗过程，我们的研究还受到了化疗前后同一患者肿瘤组织可获得性的限制。患者的外周血比肿瘤组织更容易获得，且更便于临床应用，因此我们主要关注PBMC中的T细胞。然而，如果我们招募更多接受手术切除联合GEM化疗的ICC患者，通过连续切片进行免疫组织化学染色等实验，进一步研究CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞如何浸润肿瘤，这些问题就可以解决。我们目前的研究还有其他局限性——患者主要从一个临床中心招募，我们的发现还需要用一个独立的验证队列进行验证，缺乏这一队列可能导致ICC患者外周血CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞数量或T细胞标志物对ICC患者GEM敏感性的分化能力被高估或低估。为此，我们计划未来在多中心水平上进行后续研究，在前瞻性ICC队列中验证我们当前的发现，并分析胆管癌细胞中CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T细胞潜在的生物学功能。尽管如此，这些局限并不影响我们通过对于基于GEM的化疗前后不同时间点PBMC中的T细胞进行全面、高维分析所得出的结论。

## 5. 结论

综上所述，我们不仅证实了化疗药物会影响ICC患者的免疫特征，还揭示了ICC患者的免疫功能直接决定了他们对化疗的敏感性。此外，我们还明确了ICC患者PBMC的免疫谱可以反映全身免疫功能的状况，并确定了可以用于预测化疗反应性的生物标志物。分析PBMC的免疫环境以指导ICC患者治疗具有广阔前景。

## Acknowledgements

This work was supported by the National Research Program of China (2017YFA0505803, 2017YFC0908100),

the State Key Project for Infectious Diseases (2018ZX10732202-001), National Natural Science Foundation of China (81790633, 81672860, 61922047, 81422032, and 81902412), National Natural Science Foundation of Shanghai (17ZR143800), and National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (81702298). We thank the support of the Shanghai Key Laboratory of Hepato-biliary Tumor Biology and Military Key Laboratory on Signal Transduction. This study is supported by the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission.

## Compliance with ethics guidelines

Tong Wu, Ying-Cheng Yang, Bo Zheng, Xue-Bing Shi, Wei Li, Wen-Cong Ma, Shan Wang, Zhi-Xuan Li, Yan-Jing Zhu, Jian-Min Wu, Kai-Ting Wang, Yan Zhao, Rui Wu, Cheng-Jun Sui, Si-Yun Shen, Xuan Wu, Lei Chen, Zhen-Gang Yuan, and Hong-Yang Wang declare that they have no conflict of interest.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.01.014>.

## References

- [1] Bridgewater J, Galle PR, Khan SA, Llovet JM, Park JW, Patel T, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* 2014;60(6):1268–89.
- [2] Endo I, Gonen M, Yopp AC, Dalal KM, Zhou Q, Klimstra D, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann Surg* 2008;248(1):84–96.
- [3] El-Diwany R, Pawlik TM, Ejaz A. Intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2019;28(4):587–99.
- [4] Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2014;383(9935):2168–79.
- [5] Chew V, Lee YH, Pan Lu, Nasir NJM, Lim CJ, Chua C, et al. Immune activation underlies a sustained clinical response to yttrium-90 radioembolisation in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2019;68(2):335–46.
- [6] Shewach DS, Lawrence TS. Gemcitabine and radiosensitization in human tumor cells. *Invest New Drugs* 1996;14(3):257–63.
- [7] Nezami N, Camacho JC, Kokabi N, El-Rayes BF, Kim HS. Phase Ib trial of gemcitabine with yttrium-90 in patients with hepatic metastasis of pancreaticobiliary origin. *J Gastrointest Oncol* 2019;10(5):944–56.
- [8] Lowery MA, Goff LW, Keenan BP, Jordan E, Wang R, Bocobo AG, et al. Secondline chemotherapy in advanced biliary cancers: a retrospective, multicenter analysis of outcomes. *Cancer* 2019;125(24):4426–34.
- [9] Xie X, Ma L, Zhou Y, Shen W, Xu D, Dou J, et al. Polysaccharide enhanced NK cell cytotoxicity against pancreatic cancer via TLR4/MAPKs/NF- $\kappa$ B pathway in vitro/vivo. *Carbohydr Polym* 2019;225:115223.

- [10] Mu XY, Wang RJ, Yao ZX, Zheng Z, Jiang JT, Tan MY, et al. RS 504393 inhibits M-MDSCs recruiting in immune microenvironment of bladder cancer after gemcitabine treatment. *Mol Immunol* 2019;109:140–8.
- [11] Zhang LN, Xin T, Chen M, Gao P. Chemoresistance in mesenchymal lung cancer cells is correlated to high regulatory T cell presence in the tumor microenvironment. *IUBMB Life* 2019;71(7):986–91.
- [12] Duan S, Wang P, Liu F, Huang H, An W, Pan S, et al. Novel immune-risk score of gastric cancer: a molecular prediction model combining the value of immunerisk status and chemosensitivity. *Cancer Med* 2019;8(5):2675–85.
- [13] Givechian KB, Wnuk K, Garner C, Benz S, Garban H, Rabizadeh S, et al. Identification of an immune gene expression signature associated with favorable clinical features in Treg-enriched patient tumor samples. *NPJ Genom Med* 2018;3(1):14.
- [14] Zheng B, Wang D, Qiu X, Luo G, Wu T, Yang S, et al. Trajectory and functional analysis of PD-1(high) CD4+CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma by singlecell cytometry and transcriptome sequencing. *Adv Sci* 2020;7(13):2000224.
- [15] Yan Y, Cao S, Liu X, Harrington SM, Bindeman WE, Adjei AA, et al. CX3CR1 identifies PD-1 therapy-responsive CD8+ T cells that withstand chemotherapy during cancer chemoimmunotherapy. *JCI Insight* 2018;3(8):e97828.
- [16] Ouyang H, Zhang L, Xie Z, Ma S. Long noncoding RNA MAFG-AS1 promotes proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of miR-6852. *Exp Ther Med* 2019;18(4):2547–53.
- [17] Zhang Y, Xu J, Zhang N, Chen M, Wang H, Zhu D. Targeting the tumour immune microenvironment for cancer therapy in human gastrointestinal malignancies. *Cancer Lett* 2019;458:123–35.
- [18] Cao Z, Ji J, Zhang C, Wang F, Xu H, Yu Y, et al. The preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio is not a marker of prostate cancer characteristics but is an independent predictor of biochemical recurrence in patients receiving radical prostatectomy. *Cancer Med* 2019;8(3):1004–12.
- [19] Hanoteau A, Newton JM, Krupar R, Huang C, Liu HC, Gaspero A, et al. Tumor microenvironment modulation enhances immunologic benefit of chemoradiotherapy. *J Immunother Cancer* 2019;7(1):10.
- [20] Kostine M, Briaire-de Bruijn IH, Cleven AHG, Vervat C, Corver WE, Schilham MW, et al. Increased infiltration of M2-macrophages, T-cells and PD-L1 expression in high grade leiomyosarcomas supports immunotherapeutic strategies. *Oncoimmunology* 2018;7(2):e1386828.
- [21] Krupar R, Hautmann MG, Pathak RR, Varier I, McLaren C, Gaag D, et al. Immunometabolic determinants of chemoradiotherapy response and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2018;188(1):72–83.
- [22] Ganesan P, Mehra N, Joel A, Radhakrishnan V, Dhanushkodi M, Perumal Kalayarasi J, et al. Gemcitabine, vinorelbine and dexamethasone: a safe and effective regimen for treatment of relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 2019;84:106188.
- [23] Zeng FL, Xiao Z, Wang CQ, Jiang Y, Shan JL, Hu SS, et al. Clinical efficacy and safety of synthetic thymic peptides with chemotherapy for non-small cell lung cancer in China: a systematic review and meta-analysis of 27 randomized controlled trials following the PRISMA guidelines. *Int Immunopharmacol* 2019;75:105747.
- [24] Tucci ST, Kheirloomoom A, Ingham ES, Mahakian LM, Tam SM, Foiret J, et al. Tumor-specific delivery of gemcitabine with activatable liposomes. *J Control Release* 2019;309:277–88.
- [25] Kettunen K, Boström PJ, Lamminen T, Heinosalo T, West G, Saarinen I, et al. Personalized drug sensitivity screening for bladder cancer using conditionally reprogrammed patient-derived cells. *Eur Urol* 2019;76(4):430–4.
- [26] Kim JW, Lee KH, Kim JW, Suh KI, Nam AR, Bang JH, et al. Enhanced antitumor effect of binimetinib in combination with capecitabine for biliary tract cancer patients with mutations in the RAS/RAF/MEK/ERK pathway: phase Ib study. *Br J Cancer* 2019;121(4):332–9.
- [27] Ahn KS, O'Brien D, Kang YN, Mounajjed T, Kim YH, Kim TS, et al. Prognostic subclass of intrahepatic cholangiocarcinoma by integrative molecularclinical analysis and potential targeted approach. *Hepatol Int* 2019;13(4):490–500.
- [28] Schneible JD, Singhal A, Liloja RL, Hall CK, Grafmüller A, Menegatti S. Tailoring the chemical modification of chitosan hydrogels to fine tune the release of a synergistic combination of chemotherapeutics. *Biomacromolecules* 2019;20(8):3126–41.
- [29] Zhao P, Zhu D, Zhang Z, Han B, Gao D, Wei X, et al. Gemcitabine treatment enhanced the anti-tumor effect of cytokine induced killer cells by depletion of CD4+CD25<sup>bri</sup> regulatory T cells. *Immunol Lett* 2017;181:36–44.
- [30] Li Z, Wang C, Deng H, Wu J, Huang H, Sun R, et al. Robust photodynamic therapy using 5-ALA-incorporated nanocomplexes cures metastatic melanoma through priming of CD4+CD8+ double positive T cells. *Adv Sci* 2019;6(5):1802057.
- [31] Kim R, Kawai A, Wakisaka M, Funaoka Y, Yasuda N, Hidaka M, et al. A potential role for peripheral natural killer cell activity induced by preoperative chemotherapy in breast cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(4):577–85.
- [32] Giraldo NA, Bolaños NI, Cuellar A, Guzman F, Uribe AM, Bedoya A, et al. Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1294.
- [33] Minagawa A, Yoshikawa T, Yasukawa M, Hotta A, Kunitomo M, et al. Enhancing T cell receptor stability in rejuvenated iPSC-derived T cells improves their use in cancer immunotherapy. *Cell Stem Cell* 2018;23(6):850–8.e4.
- [34] Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 2014;32(1):659–702.
- [35] Chen YP, Wu HL, Boyé K, Pan CY, Chen YC, Pujol N, et al. Oligomerization state of CXCL4 chemokines regulates G protein-coupled receptor activation. *ACS Chem Biol* 2017;12(11):2767–78.
- [36] Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996;184(3):963–9.
- [37] Luster AD, Leder P. IP-10, a-CXC-chemokine, elicits a potent thymusdependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993;178(3):1057–65.
- [38] Mullins IM, Slingluff CL, Lee JK, Garbee CF, Shu J, Anderson SG, et al. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res* 2004;64(21):7697–701.
- [39] Medler TR, Murugan D, Horton W, Kumar S, Cotechini T, Forsyth AM, et al. Complement C5a fosters squamous carcinogenesis and limits T cell response to chemotherapy. *Cancer Cell* 2018;34(4):561–78.e6.
- [40] Thomas SN, Vokali E, Lund AW, Hubbell JA, Swartz MA. Targeting the tumordraining lymph node with adjuvanted nanoparticles reshapes the anti-tumor immune response. *Biomaterials* 2014;35(2):814–24.
- [41] Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol* 2012;33(7):323–32.
- [42] Wu T, Wu X, Wang HY, Chen L. Immune contexture defined by single cell technology for prognosis prediction and immunotherapy guidance in cancer. *Cancer Commun* 2019;39(1):21.
- [43] Landhuis E. Single-cell approaches to immune profiling. *Nature* 2018;557(7706):595–7.
- [44] Atkuri KR, Stevens JC, Neubert H. Mass cytometry: a highly multiplexed singlecell technology for advancing drug development. *Drug Metab Dispos* 2015;43(2):227–33.