

## MRI 表观弥散系数预测肝细胞癌肿瘤免疫细胞浸润

黄梦琪, 宋晨宇, 林映宇, 冯仕庭, 彭振鹏  
(中山大学附属第一医院放射诊断专科, 广东广州 510058)

**摘要:**【目的】探索 MRI 弥散加权成像(DWI)的表观弥散系数(ADC)评估肝细胞癌(HCC)免疫细胞浸润的可行性。【方法】纳入初治 HCC 患者 24 例,所有患者均于术前行 MRI DWI 检查。收集患者术后 1 h 内新鲜组织块,分别取瘤内、瘤旁 2 cm 内组织块。采用多色流式细胞分析术获得组织内炎性细胞、T 细胞、B 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞以及 CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> T 细胞、调节性 T 细胞、巨噬细胞比率。在 MRI ADC 图上测量肿瘤 ADC 值、瘤旁肝组织 ADC 值(pADC),计算肿瘤比瘤旁组织相对 ADC 值(rADC)。采用 Pearson's 相关系数分析 ADC 值与肿瘤、瘤旁肝组织免疫细胞浸润的相关性。【结果】肿瘤和瘤旁肝组织免疫细胞数量存在差异,与瘤旁肝组织相比,瘤内 CD45<sup>+</sup> 细胞数量偏少(18.39% vs. 25.38%,  $P=0.026$ ),而 CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> T 细胞明显偏高(46.22% vs. 18.78%,  $P<0.001$ ),此外瘤内调节 T 细胞数量亦明显偏高(3.29% vs. 2.01%,  $P=0.010$ )。ADC 与多类免疫细胞比例具相关性,rADC 与瘤内 CD4<sup>+</sup> T 细胞比率呈正相关( $r=0.523$ ,  $P=0.009$ )、与瘤旁 PD1<sup>+</sup> Tc 细胞呈正相关( $r=0.535$ ,  $P=0.007$ ),肿瘤 ADC 值与瘤旁 CD19<sup>+</sup> B 细胞呈负相关( $r=-0.476$ ,  $P=0.019$ ),pADC 值与 PD1<sup>+</sup> 效应 T 细胞呈负相关( $r=-0.410$ ,  $P=0.047$ )。【结论】HCC 肿瘤与瘤旁肝组织免疫浸润微环境存在差异,MRI ADC 值可以无创性评估肿瘤、瘤旁肝组织免疫浸润情况。

**关键词:** 肝细胞癌;肿瘤免疫;磁共振;弥散成像

中图分类号:R735.7;R445.2

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2021)02-0242-08

### Apparent Diffusion Coefficient of MRI in Predicting the Immune Microenvironment of HCC

HUANG Meng-qi, SONG Chen-yu, LIN Ying-yu, FENG Shi-Ting, PENG Zhen-peng  
(Department of Radiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510058, China)  
Correspondence to: PENG Zhen-peng; E-mail: pengzhp@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】This study intends to explore the feasibility of MRI apparent diffusion coefficient in evaluating the immune infiltration of hepatocellular carcinoma.【Methods】Twenty-four initially treated patients with HCC were included. Fresh tissues were collected within 1 hour after surgery, and the peritumoral liver tissues within 2 cm and tumor tissues were collected respectively with the size of 1.0 cm×0.5 cm×0.3 cm. The ratio of CD45<sup>+</sup> inflammatory cells, CD3<sup>+</sup> T cells, CD19<sup>+</sup> B cells, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> effector T cells and PD1<sup>+</sup> effector T cells, regulatory T cells and macrophages in the corresponding tissues were obtained by multicolor flow cytometry. Two experienced radiologist measured the Apparent Diffusion Coefficient (ADC) of liver tumor and the ADC value of adjacent liver tissue (pADC) on the Apparent Diffusion Coefficient mapping, and calculated the relative ADC value of tumor to adjacent liver tissue (rADC). Pearson's correlation analysis was used to test the correlation between ADC and immune cell infiltration of the tumor and adjacent liver.【Results】There was statistically significant difference of the immune cell ratio between the peritumoral liver tissue and tumor, CD45<sup>+</sup> leukocytes of the tumor were less than the peritumoral liver tissue (18.39% vs. 25.38%,  $P=0.026$ ), while CD8<sup>+</sup> PD1<sup>+</sup> T cells were notably higher (46.22% vs. 18.78%,  $P<0.001$ ). In addition, the Treg cell ratio was also significantly higher than that of the adjacent liver (3.29% vs. 2.01%,  $P=0.010$ ), which indicate more severe immune suppres-

收稿日期:2021-01-21

基金项目:国家自然科学基金(81971684)

作者简介:黄梦琪,在读博士生,研究方向:腹部影像学,E-mail:mqhuang0702@163.com;彭振鹏,通信作者,E-mail: pengzhp@mail.sysu.edu.cn

sion. Pearson's correlation analysis suggest that the diffusion weighted parameters were associated with the immune cell infiltration. The rADC was positively correlated with CD4<sup>+</sup> T cells ( $r=0.523, P=0.009$ ) and peritumoral PD1<sup>+</sup> effector T cells ( $r=0.535, P=0.007$ ). The ADC was negatively correlated with peritumoral CD19<sup>+</sup> B cells ( $r=-0.476, P=0.019$ ). In addition, the pADC value was negatively correlated with PD1<sup>+</sup> effector T cells of the tumor ( $r=-0.410, P=0.047$ ). Which indicated that the severity of the diffusion limitation in tumor and peritumoral liver parenchymal was correlated with the tumor immunosuppressive microenvironment.【Conclusion】 There are differences in the immune microenvironment between hepatocellular carcinoma and adjacent liver. MRI diffusion parameters can provide noninvasive assessment of immune microenvironment.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; tumor immunity; magnetic resonance imaging; diffusion weighted imaging

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2021, 42(2): 242-249]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国常见的恶性肿瘤, 术后复发率高, 5年生存率低<sup>[1-2]</sup>。免疫治疗尤其是PD1/PDL1为主的免疫检查点抑制剂在中晚期HCC治疗中发挥巨大潜能<sup>[3]</sup>。然而, HCC免疫检查点抑制剂的总客观缓解率约22.7%, 由副作用引起的治疗中断14.9%<sup>[4]</sup>, 治疗过程中出现进展的约30%<sup>[5]</sup>。肝脏免疫耐受环境及慢性炎症所致的免疫抑制微环境, 是治疗无效或耐药的主要原因<sup>[6]</sup>。寻找一种准确、实时评价免疫微环境的方法, 对免疫治疗决策、监测和预后预测至关重要。MRI弥散成像 (diffusion weighted imaging, DWI) 针对水分子扩散运动成像, 可反映肿瘤细胞结构、血管和微结构等, 能重点表征肿瘤微结构的不均质特性<sup>[7]</sup>。因此DWI被广泛用于评估肿瘤侵袭性、复发风险和预后等<sup>[8]</sup>。目前国内外尚无研究采用DWI评估肿瘤及瘤周组织免疫浸润微环境。本研究针对PD1/PD-L1免疫治疗, 尝试用MRI表观弥散系数 (apparent diffusion coefficient, ADC) 评估肿瘤及瘤周免疫细胞浸润的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

纳入2020年10月25日至2020年12月5日在我院接受手术切除治疗的HCC初治患者。纳入标准: 临床诊断为HCC的患者; 行手术切除治疗者; 术前2周内行上腹部钆塞酸二钠增强MRI及DWI检查者。排除标准: 病理诊断为非HCC者; MRI图像质量差、临床实验室资料不齐全者; 在满足患者后续医疗检查所需样品后, 所剩术后取材样品不足以用于流式细胞分析者。本次研究共纳入HCC患

者24例, 其中男性23例, 女性1例, 年龄范围为28~68岁, 平均年龄51.5岁。本研究经过本单位伦理委员会批准申报 (伦理号: IIT-2021-168), 入组患者已签署知情同意书。

### 1.2 磁共振检查方法

采用3.0 T磁共振扫描仪 (MAGNETOM Prisma, 西门子) 及18通道体线圈、仰卧位、足先进扫描, 检查前4 h禁食。弥散成像 (序列名ep2d\_diff\_DKI) 的扫描参数包括: 轴位扫描, 视野 (FOV) 380 mm×380 mm, 层厚6.0 mm, TR 3 500 ms, TE 47.0 ms, 体素大小1.4 mm×1.4 mm×6.0 mm, 带宽2 488 Hz/Px, 压脂方式SPAIR, PAT并行采集加速因子2个, 弥散方向3个。参考Sung等<sup>[9]</sup>的研究方法, DWI成像b值设置4个, 分别为0, 50, 400, 800 s/mm<sup>2</sup>, 低b值用于去除血管内的血液高信号, 高b值用于产生扩散对比; ADC值由两个高低不同b值的图像计算得出, 本研究参考Sung等<sup>[9]</sup>的研究方法, 自动导出ADC图 (b=0, 800 s/mm<sup>2</sup>) 用于测量ADC值。

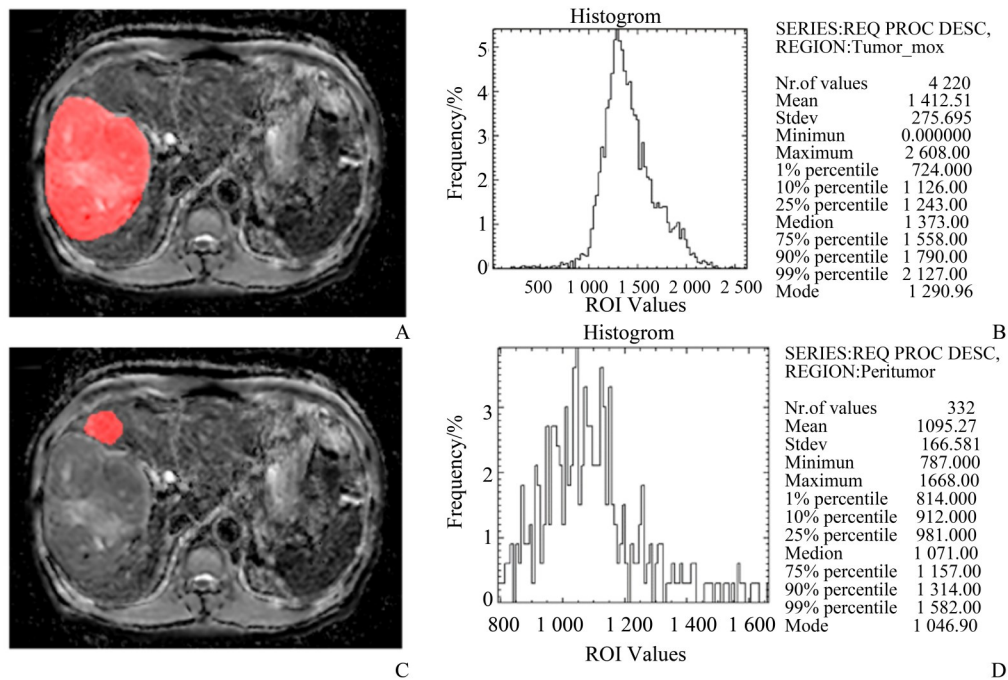
### 1.3 磁共振图像分析

图像采集完成后, 由两名受培训的影像医师先后进行ADC值测量, 选取肿瘤的最大层面, 在ADC图上分别勾画肿瘤和切缘方向的肿瘤旁组织 (距肿瘤<2 cm), 肿瘤的兴趣区尽可能的包括肿瘤组织, 肿瘤旁的兴趣区应避开血管等结构 (图1)。记录肿瘤的ADC值, 肿瘤旁组织的ADC值 (pADC) 并计算相对ADC值 (rADC)。rADC的计算算式为:

$$rADC = \frac{ADC}{pADC}$$

### 1.4 流式细胞分析实验方法

1.4.1 取材 在患者手术切除术后标本离体30 min内收集新鲜肿瘤及肝脏样品, 取无坏死区的肿



A: The ADCs of the maximum layer of the tumor, the ROI is performed by an experienced radiologist to cover the whole tumor area of the maximum layer without avoiding tumor necrosis, cystic degeneration, bleeding etc. B: Histogram of the ROI. C: ADCs map of the maximum layer, the ROI of the peritumoral tissue adjacent the resection margin was delineated avoiding the large vessels. D: Histogram of the ROI. ADCs: apparent diffusion coefficient mapping; ROIs: region of interest.

图1 表观弥散系数图及感兴趣区勾画

Fig.1 Apparent diffusion coefficient mapping and the region of interest

瘤组织约 1.0 cm×0.5 cm×0.3 cm,取切缘方向肿瘤旁(距肿瘤<2.0 cm)有活性肝组织约 1.0 cm×0.5 cm×0.3 cm,组织块离体后置于 1640 培养基中,4℃保存转运。

1.4.2 主要试剂 胶原酶 I 型(翊圣)、胶原酶 IV 型(翊圣)、分散酶 II 型(翊圣)、DNA 酶(Solarbo)、HBSS(HyClone)、红细胞裂解液(Servico)、抗人 CD45(BV510, Biologend)、抗人 CD3(FITC, TonboBioscience)、抗人 CD19(APC/Fire™750, Biologend)、抗人 CD4(PerCP-Cy5.5, TonboBioscience)、抗人 CD8(BV650, BD)、抗人 CD14(PE/Cy7, Biologend)、抗人 68(PE, Biologend)、抗人 CD279(PD-1)(BV412™, Biologend)、抗人 CD25(APC, TonboBioscience)、抗人 Foxp3(PE, eBioscience)、Foxp3/转录因子染色缓冲液(eBioscience)。

1.4.3 单细胞悬液制备 新鲜组织离体后,尽量 1 h 内进行后续实验。倒掉培养基,取组织块于 6 cm 培养皿上,将肿瘤组织剪碎(直径<1 mm),加入适量消化酶,于 15 mL 离心管内,37℃水浴消化 30 min。消化结束后过 70 μm 网筛过滤,在 4℃、400×g 条件

下,离心 5 min 收集沉淀。用 2 mL 红细胞裂解液裂解红细胞,离心收集沉淀。

1.4.4 多色流式细胞分析 细胞沉淀用 6 mL PBS 垂悬成单细胞悬液,每份样品平均分成 3 管。3 号管为空白对照管,1 号管加入抗体抗人 CD45、CD19、CD3、CD4、CD8、PD-1 和 CD14 各 0.5 μL,2 号管加入抗人 CD3、CD4 和 CD25 抗体各 0.5 μL,充分混匀,于室温避光孵育 20 min。加 2 mL PBS 并以 400×g 速度离心 5 min,弃上清液,加 2 mL PBS 垂悬细胞,在 4℃、400×g 条件下离心 5 min 后弃上清液。

每管加入 0.8 mL 1×固定破膜剂,避光孵育 40 min。加 2 mL 缓冲液后在 4℃、400×g 条件下离心 5 min,弃上清液,加 2 mL 缓冲液离心 1 次后弃上清液。1 号管加入抗人 CD68 抗体 0.5 μL/管,2 号管加入抗人 Foxp3 抗体 0.5 μL/管,充分混匀,室温避光孵育 40 min。加 2 mL 缓冲液并在 4℃、400×g 条件下离心 5 min,弃上清液,再次加 2 mL 缓冲液混悬细胞,在 4℃、400×g 条件下离心 5 min 收集沉淀,用 0.5 mL 缓冲液再混悬细胞。

用流式细胞分析仪(CytoFLEX,贝克曼库尔特,美国)进行检测,用CytExpert软件获取和分析数据,建立FSC/SSC,每管获取10 000个细胞,根据同型对照分析,检测细胞的类型和比率情况。分别计算CD45<sup>+</sup>炎性细胞/总颗粒数(CD45<sup>+</sup>炎性细胞比率)、CD3<sup>+</sup>T细胞/CD45<sup>+</sup>炎性细胞数(CD3<sup>+</sup>T细胞比率)、CD19<sup>+</sup>B细胞/CD45<sup>+</sup>炎性细胞数(CD19<sup>+</sup>B细胞比率)、CD4<sup>+</sup>T细胞/CD3<sup>+</sup>T细胞数(CD4<sup>+</sup>辅助T细胞比率)、CD8<sup>+</sup>T细胞/CD3<sup>+</sup>T细胞数(CD8<sup>+</sup>效应T细胞比率)、CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>细胞/CD8<sup>+</sup>T细胞数(CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>比率)、CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>细胞/CD3<sup>+</sup>T细胞数(PD1<sup>+</sup>效应T细胞比率,PD1<sup>+</sup>Tc比率)、巨噬细胞/CD45<sup>+</sup>炎性细胞数(巨噬细胞比率,Mac)、调节T细胞/CD3<sup>+</sup>T细胞数(调节T细胞比率,Treg;图2)。

### 1.5 统计学方法

采用SPSS 26.0、R语言、GraphPad Prism 9等统计软件进行统计分析和图形绘制,连续性变量以(均数±标准差)表述,分类变量以频数表示,分类变量及有序多分类变量组间比较采用Fisher精确检验。连续性变量先经过Schapiro-Wilkes正态性检验,组间比较采用 $t$ 检验、配对 $t$ 检验或曼-惠特尼检验,观察者间的一致性用组内相关系数(interclass correlation coefficient, ICC)分析,连续性变量采用Pearson's相关分析, $P<0.05$ 表示差异具统计

学意义。

## 2 结果

本研究24例HCC患者,处于HBV病毒复制活跃期16例,HBV病毒复制数 $<100$  U/mL者8例,余描述性参数具体情况如表1所示。

### 2.1 瘤内与瘤旁肝组织免疫细胞浸润情况

肿瘤组织内浸润的炎性细胞,绝大多数为CD3<sup>+</sup>T细胞(占CD45<sup>+</sup>炎性细胞的比例约70.98%),其次为巨噬细胞(占CD45<sup>+</sup>炎性细胞的比例约4.80%),再次为CD19<sup>+</sup>B细胞(占CD45<sup>+</sup>炎性细胞的比例约3.48%)。CD3<sup>+</sup>T细胞中CD8<sup>+</sup>T细胞多于CD4<sup>+</sup>T细胞(约36.79% vs. 10.46%,  $P<0.001$ ),CD8<sup>+</sup>T细胞约46.22%呈现PD1高表达,余为中或低表达(表2)。通过配对 $t$ 检验比对肿瘤以及瘤旁肝组织各类型免疫细胞数量(表2),结果显示肿瘤内CD45<sup>+</sup>炎性细胞比率明显低于肿瘤旁肝组织(18.39% vs. 25.38%,  $P=0.026$ ),其中瘤内CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>T细胞占比明显增多(46.22% vs. 18.78%,  $P<0.001$ ),此外,瘤内调节T细胞的比率明显高于瘤旁肝组织(3.29% vs. 2.01%,  $P=0.010$ )。

### 2.2 MRI ADC值测量的一致性

两位医生先后独立地对ADC值进行测量,结

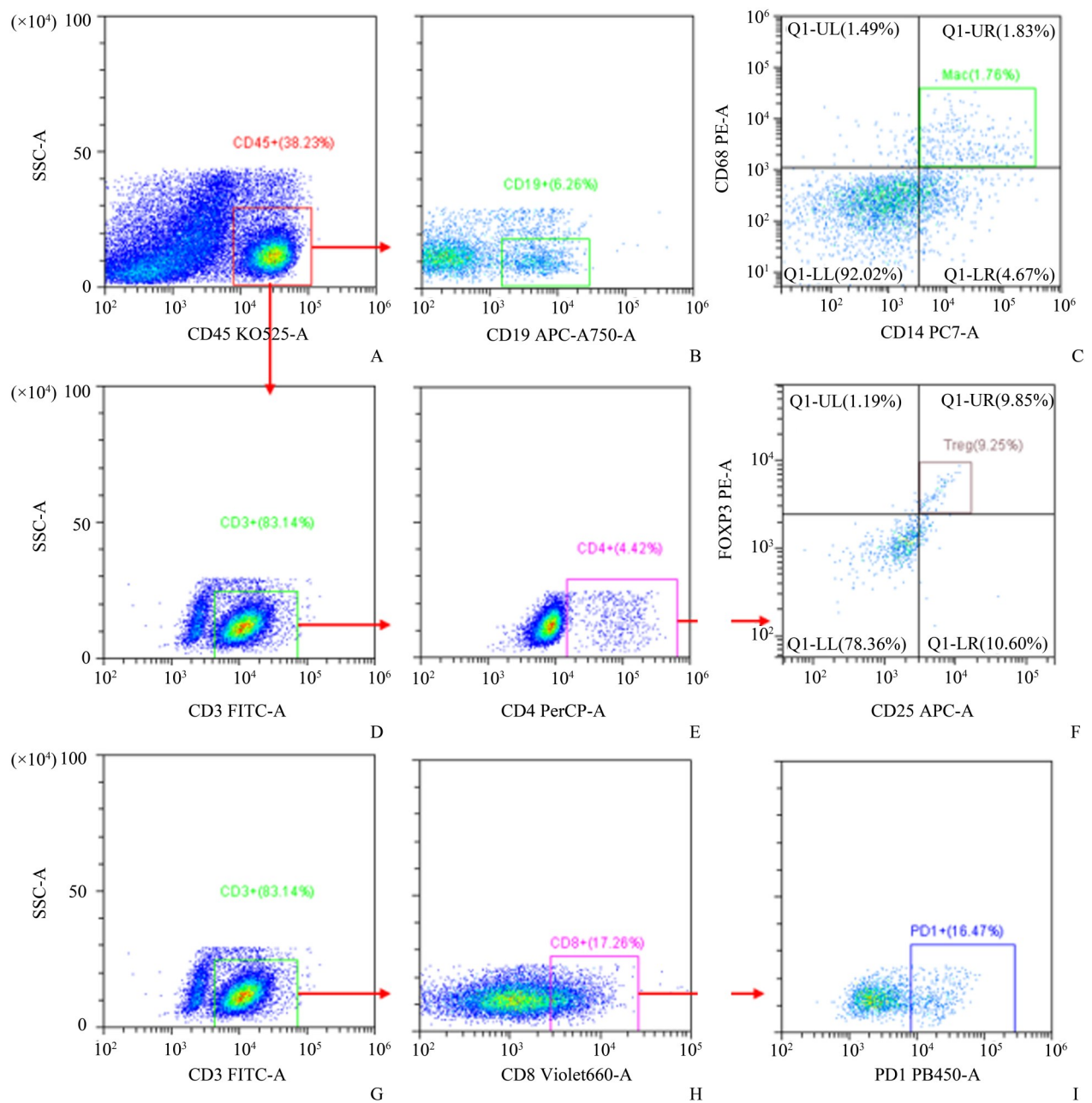
表1 患者基线数据对比表

Table1 Descriptive data of enrolled patients

[ $n, (\bar{x} \pm s)$ ]

Items	HBV DNA-	HBV DNA+	$Z/t/\chi^2$	$P$
$N$	8	16		/
Sex (male/female)	8/0	15/1	0.522	1.000
Age/years	53.00±11.19	50.31±10.11	0.573	0.559
AFP/( $\mu$ g/L)	20.20(4.10~1081.46)	116.02(6.95~499.51)	-0.919	0.358
MVI(+/-)	2/6	8/8	1.371	0.388
Max <sub>diameter</sub> /mm	61.38±41.81	69.56±19.62	-0.526	0.612
Liver fibrosis			6.116	0.013
S0	2	0		
S1	2	1		
S2	2	6		
S3	2	2		
S4	0	7		

HBV DNA-: the copy number of hepatitis B virus $<100$  U/mL; HBV DNA+: the copy number of hepatitis B virus  $\geq 100$  U/mL; AFP: alpha foetoprotein; MVI: microvascular invasion



A: the CD45<sup>+</sup> cell population (red box); B-D: the further selected CD19<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cell populations from the CD45<sup>+</sup> cell population (green box). E shows the further selected CD4<sup>+</sup> cell population within the CD3<sup>+</sup> cell population (purple box). F is the CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cell population selected from the CD4<sup>+</sup> cell population (brown box); G is the CD8<sup>+</sup> cell population selected from the CD3<sup>+</sup> cell population (purple box); I is the PD1<sup>+</sup> cell population selected from the CD8<sup>+</sup> cell population (blue box).

图2 多色流式细胞分析术分析流程图

Fig.2 The analysis of multi-color flow cytometry

果显示 rADC 值、ADC 值及 pADC 值等测量值在两位医生之间都取得了良好的一致性(表3)。

### 2.3 MRI ADC值与免疫细胞浸润比率的相关性分析

Pearson's 相关性分析结果提示 ADC 与多个类型的免疫细胞比率具有相关性(表4,图3)。rADC 与瘤内的 CD4<sup>+</sup>T 细胞比率成正相关( $r=0.523, P=$

0.009), 肿瘤弥散受限程度越重, 肿瘤内辅助 T 细胞比率越低。rADC 值与瘤旁肝组织的 PD1<sup>+</sup>Tc 细胞比率亦呈正相关( $r=0.535, P=0.007$ ), 间接显示肝组织弥散受限程度越重, rADC 值越高, 肝组织的 pPD1<sup>+</sup>Tc 比率越高(图4)。

肿瘤 ADC 值与瘤旁肝组织 CD19<sup>+</sup> B 细胞数呈

表2 肿瘤与癌旁组织免疫细胞浸润比率对比分析  
Table 2 Comparative analysis of the immune cells infiltration in tumor and peritumor

[ $\bar{x} \pm s, \%, (n=24)$ ]

Items	Tumor	Peritumor	<i>t</i>	<i>P</i>
CD <sub>45</sub>	18.39±21.18	25.38±17.57	-2.376	0.026 <sup>1)</sup>
CD <sub>3</sub>	70.98±16.57	74.74±10.65	-1.192	0.245
CD4	10.46±18.49	7.26±5.65	0.814	0.424
CD8	36.79±13.18	42.99±18.68	-1.431	0.166
CD4PD1	58.61±27.96	4.91±4.81	9.813	<0.001 <sup>2)</sup>
CD8PD1	46.22±23.20	18.79±10.64	6.921	<0.001 <sup>2)</sup>
PD1+Tc	23.01±13.46	19.71±12.29	1.120	0.274
CD19	3.48±2.69	4.20±2.31	-1.111	0.278
Mac	4.80±7.42	1.68±1.85	1.951	0.066
Treg	3.29±3.56	2.01±2.46	2.812	0.010 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *P*<0.05; <sup>2)</sup> *P*<0.001; Mac: macrophage

负相关( $r=-0.476, P=0.019$ ), ADC 值越低, 肿瘤弥散受限程度越重, 瘤旁肝组织 CD19<sup>+</sup> B 细胞数量越多(图4)。

pADC 值与瘤内 PD1<sup>+</sup>Tc 细胞浸润比率呈负相关( $r=-0.410, P=0.047$ ), pADC 值越低, 肝组织弥散受限程度越严重, 肝硬化程度越严重, 肿瘤内 PD1<sup>+</sup>Tc 细胞越高, 肿瘤免疫抑制微环境情况越重(图4)。

### 3 讨论

免疫细胞是肿瘤微环境中重要的组成部分之一, 与肿瘤的发生发展及预后密切相关。本研究结果显示, HCC 肿瘤组织内浸润的炎性细胞, 绝大多数为 CD3<sup>+</sup>T 细胞, CD3<sup>+</sup>T 细胞中以 CD8<sup>+</sup> T 细胞为多, CD8<sup>+</sup> T 细胞约 46.22% 呈现 PD1 高表达, 与 Ma

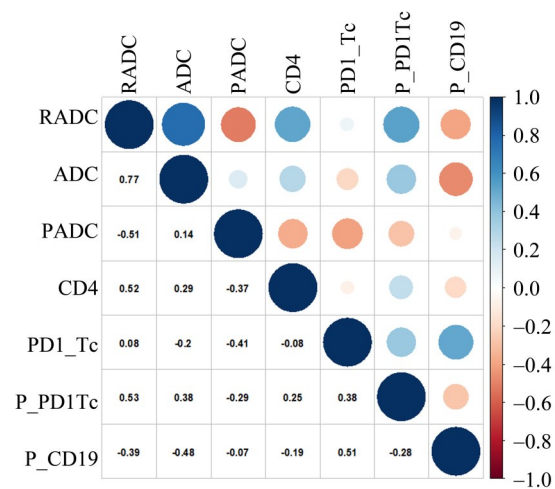


图3 MRI表观弥散系数与肿瘤、肿瘤旁免疫细胞浸润比率的Pearson's相关分析

Fig.3 The Pearson's correlation analysis of the ADC with the immune cell percentage of the tumor and peritumoral area

等<sup>[10]</sup>的流式分析结果一致。但 Rohr-Udilova 等<sup>[11]</sup>的研究采用基因测序结果分析免疫细胞分群, 发现未活化 CD4<sup>+</sup>记忆细胞、辅助 T 细胞和巨噬细胞比例更为丰富。这种差异可能与不完全取材导致取材偏倚、免疫细胞的分析方法、HCC 肿瘤分化程度或肝慢性疾病背景不一致等因素有关。

与瘤旁组织相比, 瘤内 CD45<sup>+</sup>炎性细胞比率偏低而瘤内 CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>T 细胞占比明显偏多, 瘤内调节 T 细胞的比率也明显偏高。PD1 是 T 细胞表面的负调控因子, 上调会引起 T 细胞功能抑制, 在肿瘤中促进肿瘤免疫逃逸<sup>[12]</sup>。调节 T 细胞来源于外周血 T 淋巴细胞或肝脏常驻 T 细胞转化, 同样与促免疫抑制相关<sup>[13]</sup>。因此, 肿瘤组织内炎性细胞浸润数减少、CD8<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup>T 细胞数增多、Treg 细胞数增多, 均提示肿瘤比癌旁肝组织免疫抑制微环境更严重。

抗 PD-1 抗体被认为是起中断活化的 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup>T 细胞表面的 PD1 与肿瘤细胞表面配体的结

表3 观察者间MRI表观弥散系数测量一致性  
Table 3 Interclass correlation coefficient between observers

Parameter	Observer1	Observer2	ICC	95%CI	<i>P</i>
rADC	1.19±0.32	1.18±0.34	0.946	(0.876, 0.977)	<0.001
ADC	1 122.96±247.23	1 118.06±148.43	0.992	(0.981, 0.996)	<0.001
pADC	963.97±148.44	972.26±185.90	0.837	(0.622, 0.929)	<0.001

ICC: interclass correlation coefficient; ADC: apparent dispersion coefficient

表4 MRI表观弥散系数与免疫细胞比率的相关分析  
Table 4 Correlation analysis of ADC and immune cell ratio

Parameter	Immune cell	<i>r</i>	<i>P</i>
rADC	CD4+ T cell	0.523	0.009 <sup>1)</sup>
rADC	pPD1+ Tc cell	0.535	0.007 <sup>1)</sup>
ADC	pCD19+ Bcell	-0.476	0.019 <sup>1)</sup>
pADC	PD1+ Tc cell	-0.410	0.047 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *P*<0.05; ADC: apparent dispersion coefficient

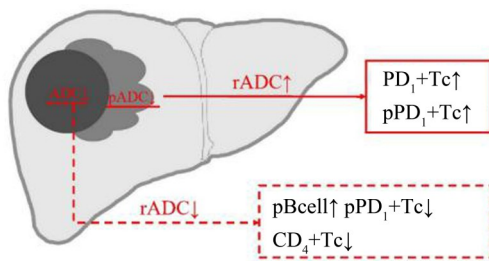


图4 肿瘤、肿瘤旁肝组织弥散受限与免疫浸润环境的关系  
Fig.4 The relationship between the ADC of the tumor, the peritumoral liver tissue with immune microenvironment

合,从而提高CD8<sup>+</sup>T细胞的抗肿瘤作用。然而,肿瘤组织内PDL1的表达比我们想象的要低,因此还存在其他免疫细胞参与了CD8<sup>+</sup>T细胞表面的PD1的上调,例如调节T细胞、巨噬细胞、骨髓源性抑制细胞等<sup>[14]</sup>。此外,肿瘤组织内浸润的B细胞与T细胞密切分布并参与了T细胞的抗肿瘤过程<sup>[15]</sup>。PD1/PDL1通路免疫治疗的疗效取决于复杂的肿瘤-免疫微环境,除了与肿瘤内T细胞浸润相关外,调节T细胞、巨噬细胞、B细胞、骨髓源性抑制细胞等均参与了T细胞的活化、抑制和抗肿瘤过程,寻找可靠的生物标志物能筛选适合PD1/PDL1通路的免疫治疗的HCC患者和对患者治疗过程进行监测显得尤为重要。为更好分析免疫细胞与免疫治疗疗效的相关性,本研究选择CD45<sup>+</sup>炎性细胞、CD3<sup>+</sup>T细胞、CD19<sup>+</sup>B细胞、CD4<sup>+</sup>辅助T细胞、CD8<sup>+</sup>效应T细胞以及PD1<sup>+</sup>的效应T细胞、调节T细胞、巨噬细

胞等与PD1/PDL1通路免疫治疗密切相关的免疫细胞进行分析。

本研究结果表明MRI ADC与多个免疫细胞浸润情况相关。rADC与肿瘤旁的pPD1<sup>+</sup>Tc比率呈正相关,与瘤内的CD4<sup>+</sup>辅助T细胞比率呈正相关,ADC值与瘤旁CD19<sup>+</sup>B细胞比率呈负相关,pADC值与肿瘤PD1<sup>+</sup>Tc浸润比率呈负相关。组织的弥散受限程度与ADC值呈负相关,肿瘤内细胞密度越大,间质成分越复杂,弥散受限越严重,ADC值越低。因此肿瘤ADC值越低,弥散受限程度越严重,瘤内CD4<sup>+</sup>辅助T细胞越少,瘤旁B细胞越多,pPD1<sup>+</sup>Tc越少。有研究表明,PD-1/PD-L1抑制剂可以逆转CD8<sup>+</sup>细胞的抑制性功能状态,但并非所有的PD1<sup>+</sup>T细胞均具有可逆性,肿瘤免疫微环境中的其他细胞也参与调节了这一过程<sup>[5]</sup>。物理环境(例如乳酸堆积、酸性环境、缺氧)、代谢竞争、CD4<sup>+</sup>T辅助细胞的缺乏和高表达免疫调节分子均会限制和影响细胞毒性T细胞产生IFN- $\gamma$ <sup>[16]</sup>。因此ADC和rADC值越低,瘤内CD4<sup>+</sup>辅助T细胞减少,瘤内CD8<sup>+</sup>T细胞功能抑制,瘤旁B细胞增多,pPD1+Tc比例减少,提示肿瘤免疫抑制微环境。此外有研究表明,ADC值与肝纤维化和肝硬化严重程度呈负相关<sup>[17]</sup>,故pADC值越低,提示细胞越密集,间质成分越复杂,肝纤维化和肝硬化级别越严重,但肿瘤PD1<sup>+</sup>Tc聚集越多,可为抗PD-1抗体治疗提供靶点,可能提示抗PD1<sup>+</sup>抗体治疗靶细胞比率越高,更倾向于出现治疗反应。

本研究存在一些局限性:第一,本研究为单中心研究,样本量小,可能会存在选择偏倚。第二,本研究采用的ADC基于单指数模型,主要与细胞密度相关,如采用更先进的计算模型分别表征微灌注、微结构甚至亚结构等信息可能会更全面地反映肿瘤免疫微环境信息。

综上所述,弥散成像可无创性地评估肿瘤及瘤旁肝组织免疫细胞浸润情况,有望成为免疫检查点疗法筛选患者、疗效及预后预测的有效手段。

## 参考文献

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Abate D, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(12): 1749-1768.
- [2] 汪国营. 肝癌肝移植新进展——2019年ILTS年会速递[J]. *器官移植*, 2020, 11(1): 47-53.  
Wang GY. New progress on liver transplantation for liver cancer: 2019 ILTS annual collection [J]. *Organ Transpl*, 2020, 11(1): 47-53.
- [3] Tang J, Yu JX, Hubbard-Lucey VM, et al. Trial watch: The clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(12): 854-855.
- [4] Ziogas Ioannis A, Evangelidou Alexandros P, Giannis Dimitrios, et al. The role of immunotherapy in hepatocellular carcinoma: A systematic review and pooled analysis of 2, 402 patients [J]. *Oncologist*, 2020. doi: 10.1002/onco.13638.
- [5] Iñárraera M, Melero I, Sangro B. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: Facts and hopes [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(7): 1518-1524.
- [6] Pinter M, Jain RK, Duda DG. The Current landscape of immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma: A review [J]. *JAMA Oncol*, 2020, 10.1001/jamaoncol.2020.3381.
- [7] Tang L, Zhou XJ. Diffusion MRI of cancer: From low to high b-values [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2019, 49(1): 23-40.
- [8] Kim JY, Kim JJ, Hwangbo L, et al. Diffusion-weighted MRI of estrogen receptor-positive, HER2-negative, node-negative breast cancer: association between intratumoral heterogeneity and recurrence risk [J]. *Eur Radiol*, 2020, 30(1): 66-76.
- [9] Sung PS, Choi MH, Yang H, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in hepatocellular carcinoma as a predictor of a response to cisplatin-based hepatic arterial infusion chemotherapy [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 600233.
- [10] Ma J, Zheng B, Goswami S, et al. PD1 CD8 T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7: 331.
- [11] Rohr-Udilova N, Klinglmüller F, Schulte-Hermann R, et al. Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 6220.
- [12] Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(3): 153-167.
- [13] Jiang R, Yang J, Chen Y, et al. The long noncoding RNA lnc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion [J]. *Nat Commun*, 2017, 8, 15129.
- [14] Langhans B, Nischalke HD, Krämer B, et al. Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68: 2055-2066.
- [15] Gamelo M, Tan A, Her Z, et al. Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2017, 66(2): 342-351.
- [16] Fu Y, Liu S, Zeng S, et al. From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 396.
- [17] Yang L, Rao S, Wang W, et al. Staging liver fibrosis with DWI: is there an added value for diffusion kurtosis imaging? [J]. *Eur Radiol*, 2018, 28(7): 3041-3049.

(编辑 余菁)