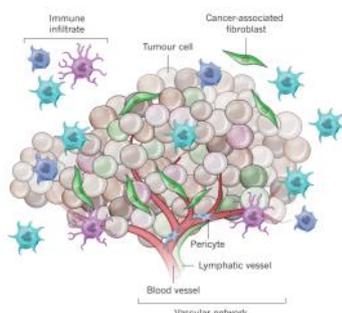


# 肿瘤免疫微环境景观分析方案

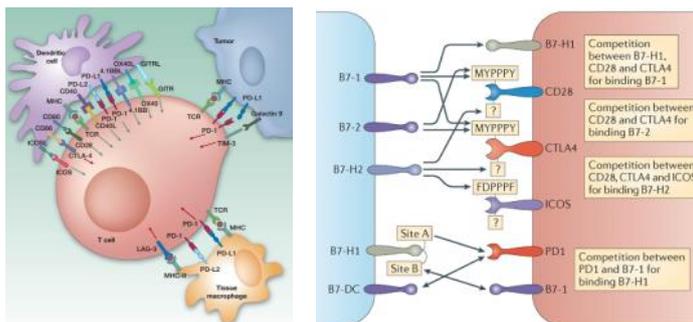
## 研究背景

### 肿瘤免疫、肿瘤微环境成为研究热点

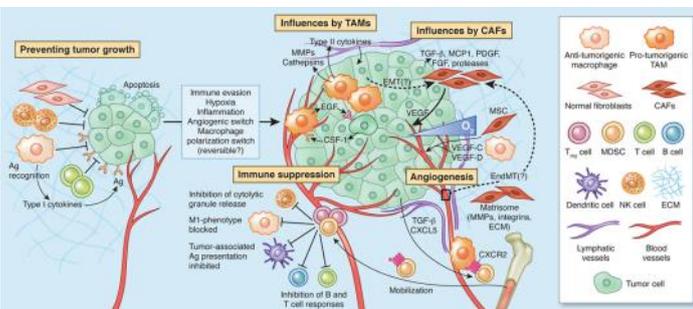


**Science** 杂志评选癌症免疫治疗为 2013 年度首要研究突破 (2013 Science)；肿瘤的发生发展与其所处的微环境密切相关，涉及基质、血管、淋巴管、免疫细胞等因素相互作用。这些细胞群体对肿瘤或抑制、或促进，随其激活状态和相对肿瘤的位置差异而有所不同 (2013 Nature)。

### 肿瘤微环境涉及要素众多、关系复杂



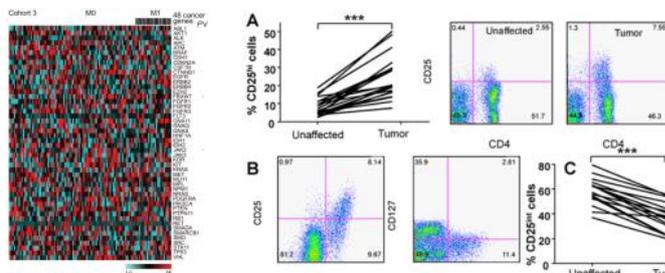
如左图所示，T细胞与其相邻的树突状细胞、巨噬细胞和肿瘤细胞之间借助不同配体和受体的相互作用实现不同的共刺激和共抑制调节 (2013 Clin Cancer Res)；同时配体和受体间的信号传导也存在交叉互作 (右图)，例如B7-H1, CD28和CTLA4三者均可与B7-1相结合 (2013 Nature Reviews Immunology)。



癌变相关的关键分子在微环境中演绎不同的分子事件。肿瘤细胞摆脱免疫系统的监控识别，逃离Tc细胞的杀伤；成纤维细胞和巨噬细胞从抑制生长状态被肿瘤细胞驯化为促癌状态 (如TAMs分泌大量的蛋白酶、细胞因子和生长因子促进肿瘤生长)；MDSCs和Treg扰乱DCs抗原递呈，抑制T细胞和B细胞增殖活化和NK细胞的毒杀作用，打乱免疫平衡；CAFs纤维化激活表达VEGF促进血管新生；低氧和高组织液压等非细胞因素也有着重要作用 (2013 Nature Medicine)。

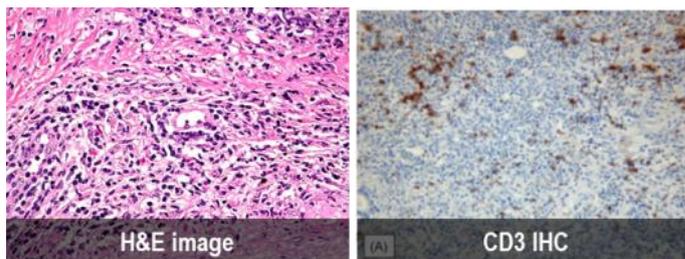
### 常规方法难以满足肿瘤微环境分析的要求

基因检测和流式方法丢失了形态信息  
(Phenotype with no morphology)



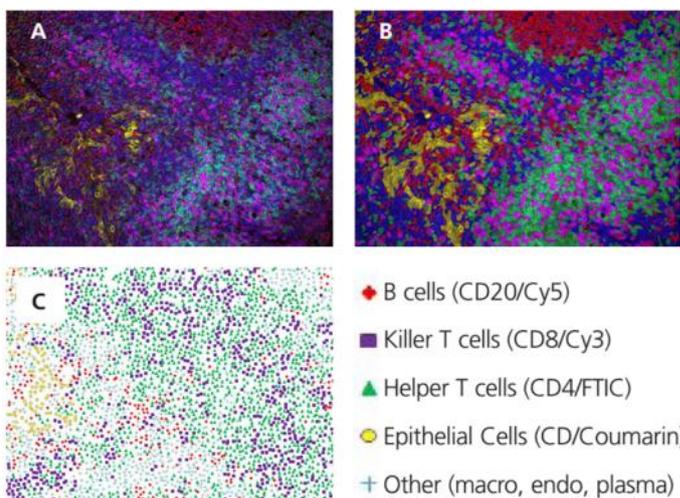
分子水平的检测 (测序, qPCR) 和流式细胞分析能够分辨出足够的基因型或细胞型组分，但是无法判断这些组分在组织原位的空间位置关系，而这种定位关系 (context) 对理解其在组织微环境中的作用是至关重要的。

常规免疫组化无法分辨足够多的细胞表型  
(Morphology with no phenotype)



组织病理成像能够完整呈现组织原位的形态信息，但受制于传统染色成像方法，通常只能标示很少的靶标 ( $\leq 3$ )，无法完整呈现多样化的组织信息。

多标记景观分析是肿瘤微环境研究的有效手段  
(Phenotype with morphology)

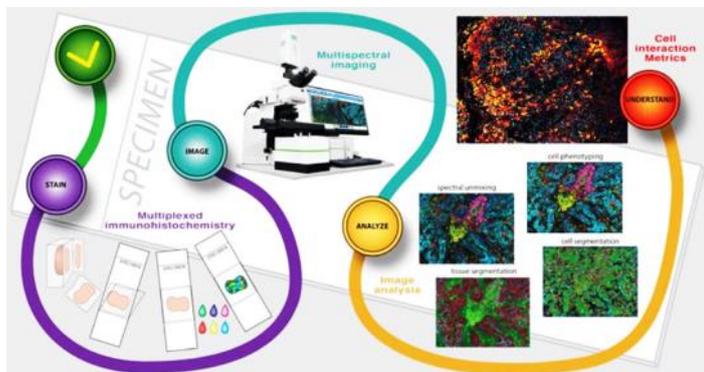


景观 (Landscape) 分析是在一张组织样本上复染多种分子标记 (>7种)，将多元信息呈现在同一画面内，配合软件定量分析，对组织微环境中的目标分子或细胞及其相关因子进行全面分析。

# 肿瘤免疫微环境景观分析方案

## 技术特点

### 景观分析方法的三个技术突破

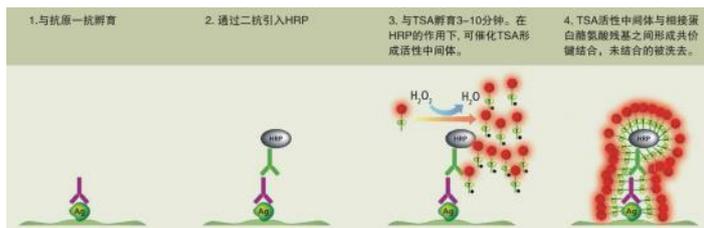


景观分析包括三个步骤：

1. 多标记免疫荧光染色（解决一抗抗体来源冲突的问题）；
2. 光谱成像和信号拆分（解决重叠信号串色干扰的问题）；
3. 细胞型识别和定量统计（解决定量分析标准化的问题）。

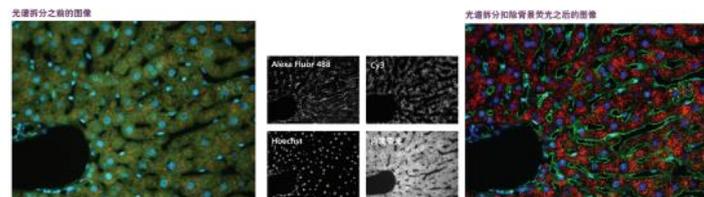
### 突破1. Opal多色免疫荧光标记试剂盒

#### TSA酪胺信号放大系统



Opal试剂盒是在TSA基础上开发的一套多标记复染方案，允许在同一标本中使用相同种属来源的不同一抗，以顺次单染的方式将各色标记的酪胺共价结合到目标抗原上（抗原直标），随后通过微波加热去除抗体（抗体没了但信号仍留在抗原上）。清除上一轮抗体后即可使用新的抗体继续染色，无需担心交叉反应（2014 Method）。

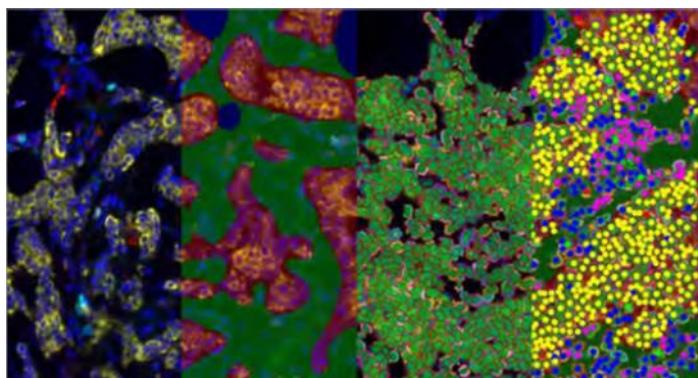
### 突破2. Vectra 光谱成像和信号拆分技术



光谱成像不同于普通的RGB或荧光成像，系统采集420nm—720nm范围的所有信号来记录样本上的“颜色”信号，是一种高分辨率的信号记录方法。同一种染料的光谱特征相同，软件据此可以找出画面中与目标光谱曲线一致的所有信号，生成单一通道的目标信号。借助专利的纯光谱算法，即使重叠在一起的多个信号也能有效的区分开来。

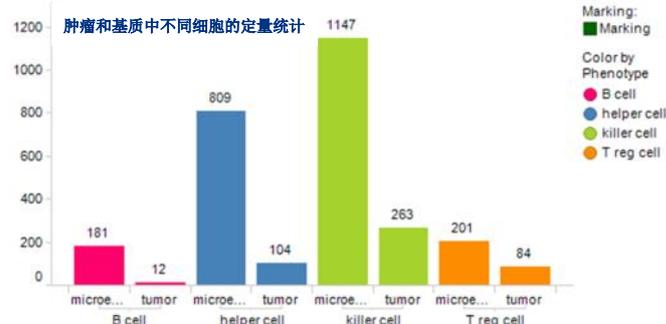
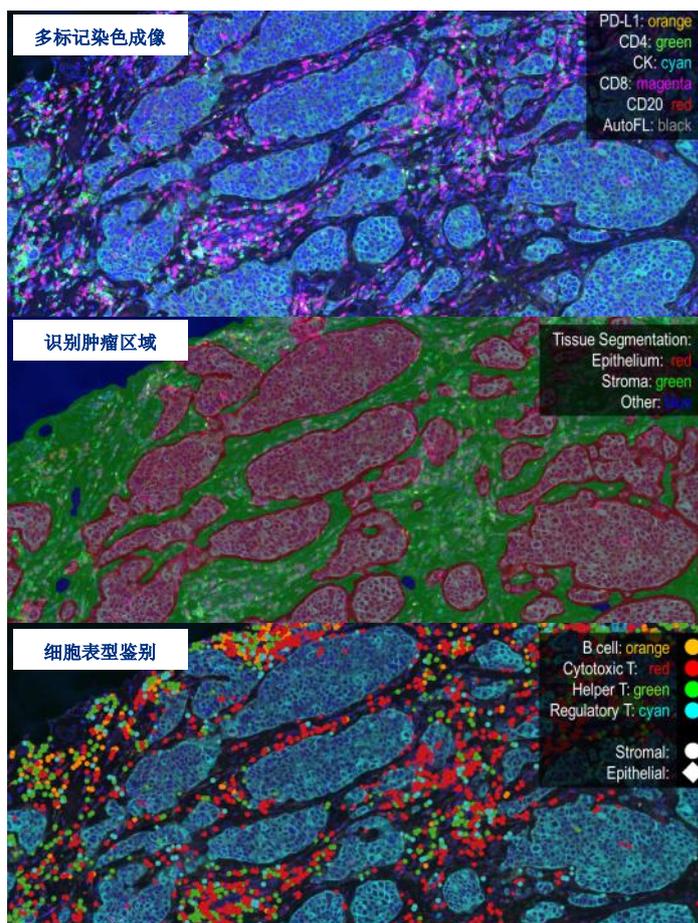


### 突破3. InForm 细胞、组织表型识别和定量统计



InForm 软件采用流程化的定量病理分析界面，将图像中记录的光谱信号和生物标记物、组织形态信息关联起来，最终将肿瘤组织微环境的多元景观完整、精确的呈现出来。

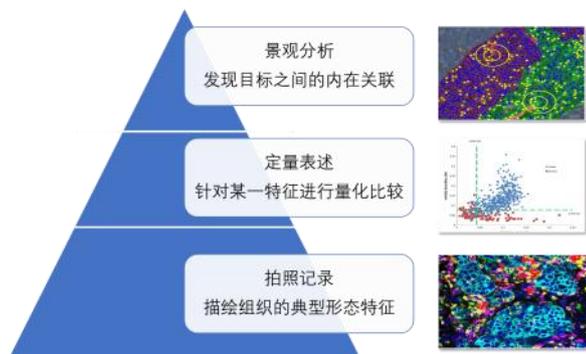
### 典型案例：乳腺癌微环境分析（6色）



# 肿瘤免疫微环境景观分析方案

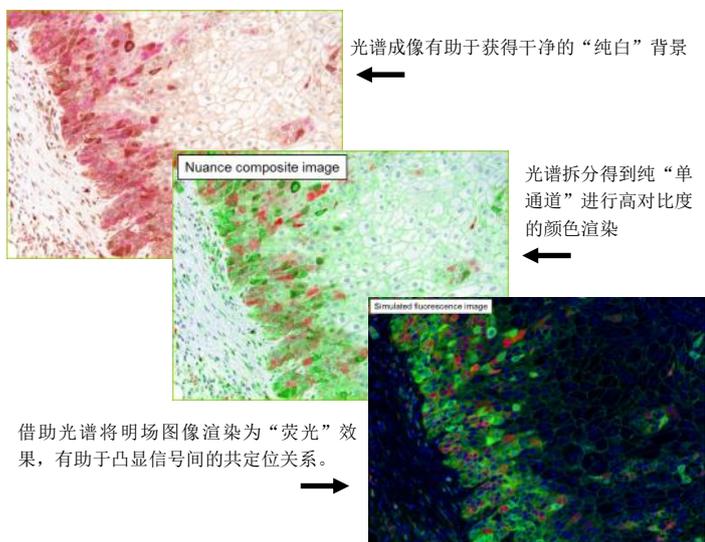
## 技术优势

### 组织成像的三个层次需求

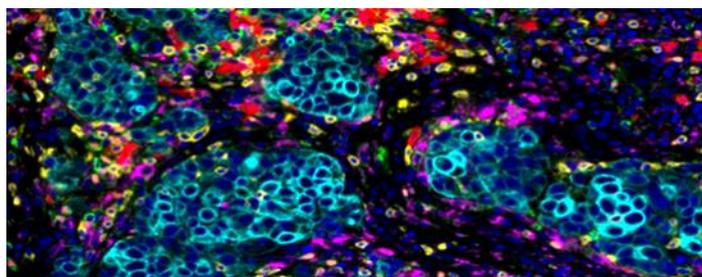


#### 1. 基本需求：拍一张精彩的照片！

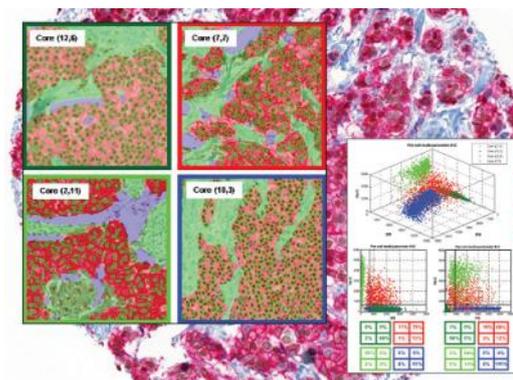
##### 明场模式下的光谱成像（识别叠加颜色，明场荧光效果互换）



##### 荧光模式下的光谱成像（扣除自发荧光背景，多色荧光成像）



#### 2 中级需求：对图像结果进行量化比较！

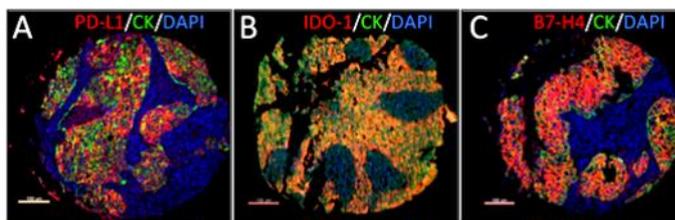


inForm软件可以智能识别不同的组织类型，测量特定组织（如肿瘤、坏死、炎症）的面积；也可以对染色强度进行评分；或者给出两个markers间的共定位比例。

#### 3. 高级需求：组织微环境景观分析 (Landscape / Context)

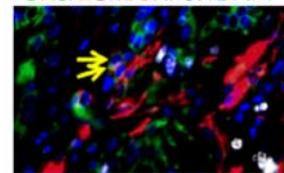
##### 3.1 判断不同蛋白表达水平的相关性

下图显示三种免疫调控蛋白PD-L1、IDO-1、B7-H4 的表达相关性，复染CK标识肿瘤组织 (Schalper 2017 Clin Cancer Res)

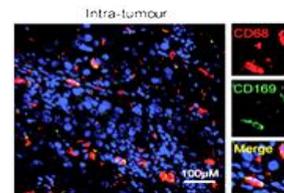


##### 3.2 识别特殊细胞及其功能状态

###### CK8/ $\alpha$ SMA/Ki-67/DAPI

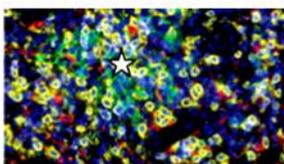


左图利用CK8和 $\alpha$ SMA定义EMT细胞，并用Ki-67判断细胞的增殖状态 (Zheng 2015 Nature)

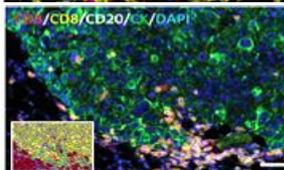


左图利用CD68和CD169定义巨噬细胞的特定亚群，进而分析其临床意义和预后价值 (Zhang 2016 J Pathol)

##### 3.3 组织免疫微环境分析 (TILs 统计分析)



左图标识CD8\CD68\PD1\PD-L1\DAPI 显示抗体药物治疗后肿瘤组织的免疫细胞生发中心 (Nghiem 2016 N Engl J Med)

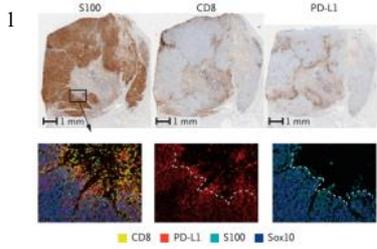


左图标识CD3\CD8\CD20\CK\DAPI 显示两种抗体药物联合治疗下小鼠移植瘤处的免疫细胞招募状态 (Sanmamed 2015 Cancer Res)

#### 更多标志物选择

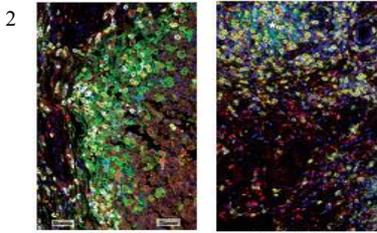
Biomarker Category	Example Biomarkers
Breast Tumor Type	ER, PR, HER2/neu
Apoptosis	Fax, FasL, TRAIL receptors, activated caspases, pAKT, Survivin, MCL-1, Bcl-2
Cell Cycle Control	p53, p21, p27, p16, Cyclins D1, E
Signal Transduction	STAT1, 3 and 5, c-kit, HSP90
Therapy Responses	MDR1, GST-it, pSR, HER2/neu
Adhesion	E-cadherin, J3-catenin, CD44, CD24, Claudin-1
Migration	CXCR4
Angiogenesis	VEGF, Flt-4, HIF-1a
Proliferation	Ki-67
Immune Response	CD3-, PD-L1, Tregs, Macrophages, Cytokines
Inflammation	NF-KB, COX2, CSF-1R

**PerkinElmer 定量病理系统代表文章——高分文章**



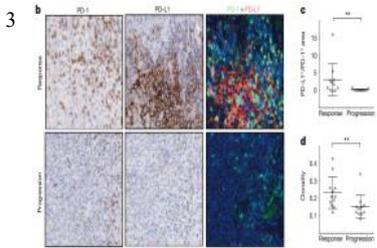
**2016 N Engl J Med IF 59.558**  
多色标记判断CD8和PD-L1的定位关系，同时复染S100和Sox10准确界定肿瘤区域。

Zaretsky, J. M., et al. (2016). "Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma." *N Engl J Med* 375(9): 819-29.



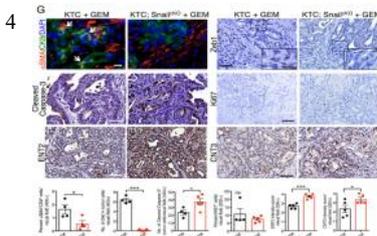
**2016 N Engl J Med IF 59.558**  
多标记NSE、CD8、CD68、PD1、PD-L1综合分析肿瘤组织微环境状态。

Nghiem, P. T., et al. (2016). "PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 374(26): 2542-52. IF 59.558



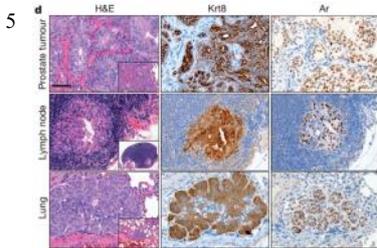
**2014 Nature IF 38.138**  
多标记染色并统计PD-1、PD-L1、CD8等分子标志的定位表达，并对细胞增殖、毒性、干扰素表达等进行检测。

Tumeh, P. C., et al. (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." *Nature* 515(7528): 568-71. IF 38.138



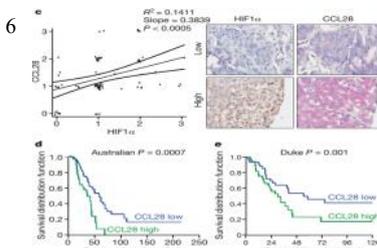
**2015 Nature IF 38.138**  
多标记检测αSMA、CK8的定位关系，统计分析阳性细胞数目或依据信号强度进行自动化病理评分。

Zheng, X., et al. (2015). "EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer." *Nature* 527(7579): 525-30. IF 38.138



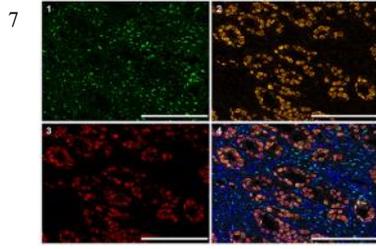
**2011 Nature IF 38.138**  
全自动化TMA扫描和批量定量分析，利用光谱成像对DAB染色光密度进行精准定量。

Ding, Z., et al. (2011). "SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression." *Nature* 470(7333): 269-273. IF 38.138



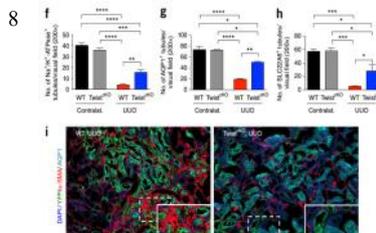
**2011 Nature IF 38.138**  
光谱成像精准定量拆分交叠的DAB和Perma Red信号，分析CCL28和HIF1α蛋白表达的相关性，并判断肿瘤的预后相关性。

Facciabene, A., et al. (2011). "Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells." *Nature* 475(7355): 226-30. IF 38.138



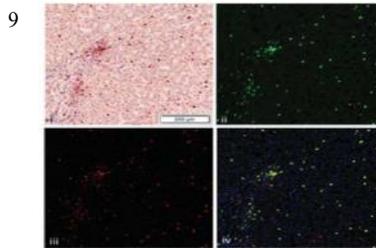
**2015 Nat Genet IF 31.616**  
多标记分析AR、FoxA1、HOXB13蛋白的共定位关系，发现三者在前列腺肿瘤细胞中具有明显的共表达趋势。

Pomerantz, M. M., et al. (2015). "The androgen receptor cistrome is extensively reprogrammed in human prostate tumorigenesis." *Nat Genet* 47(11): 1346-51. IF 31.616



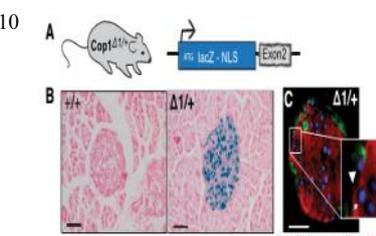
**2015 Nat Med IF 30.357**  
以多标记共表达为特征识别处于上皮间质转化阶段的肾脏细胞，判断其AQP1蛋白的表达情况，寻找肾纤维化中EMT与AQP1表达的关系。

Lovisa, S., et al. (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis." *Nat Med* 21(9): 998-1009. IF 30.357



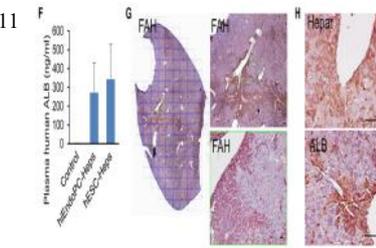
**2015 Nat Med IF 30.357**  
光谱成像记录明场双色复染样品，改以模拟荧光形式呈现CD15和CD66b的共定位关系。

Pallett, L. J., et al. (2015). "Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells." *Nat Med* 21(6): 591-600. IF 30.357



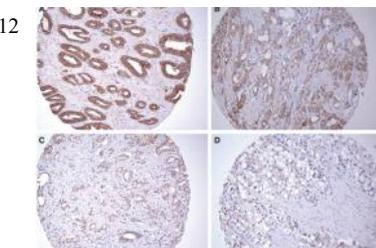
**2015 Cell IF 28.710**  
多色标记显示β半乳糖苷酶的表达与胰岛素和高血糖素的定位关系。

Suriben, R., et al. (2015). "β-Cell Insulin Secretion Requires the Ubiquitin Ligase COP1." *Cell* 163(6): 1457-1467. IF 28.710



**2016 Cell Stem Cell IF 22.387**  
光谱识别和定量分析小鼠肝脏中人源干细胞表达的水平。{军事医学科学院}

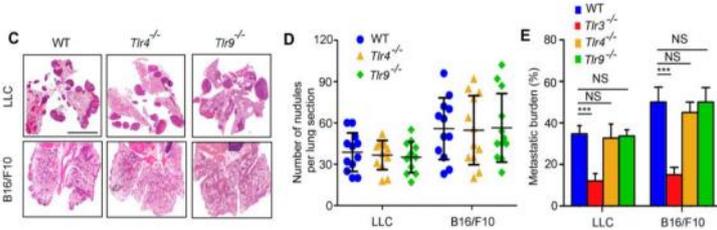
Wang, Y., et al. (2016). "Conversion of Human Gastric Epithelial Cells to Multipotent Endodermal Progenitors using Defined Small Molecules." *Cell Stem Cell* 19(4): 449-461. IF 22.387



**2011 Clin Oncol IF 20.982**  
全自动TMA扫描，DAB着色强度光谱定量，智能软件评分，借此判断VDR分子在前列腺癌中的预后价值。

Hendrickson, W. K., et al. (2011). "Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression." *J Clin Oncol* 29(17): 2378-85. IF 20.982

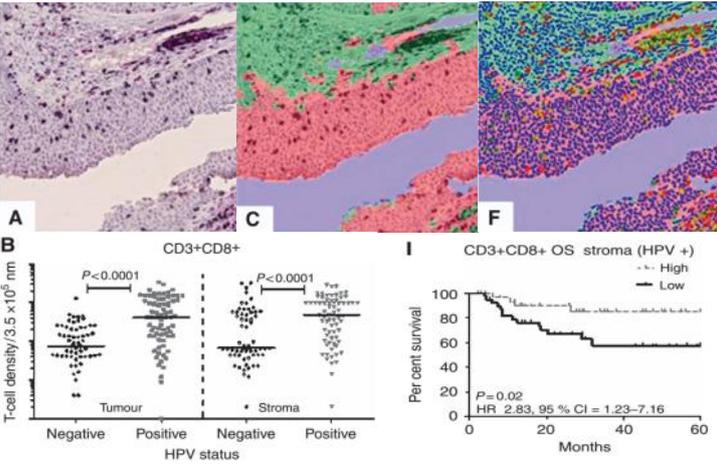
1



Liu, Y., et al. (2016). "Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to

小鼠肺癌组织，HE染色(左)，软件智能识别肺部转移瘤的灶点数目(Nodules, 中)和癌灶区域面积(metastatic burden, 右)，精准定量分析小鼠体内移植瘤的转移效率。(第二军医大学)

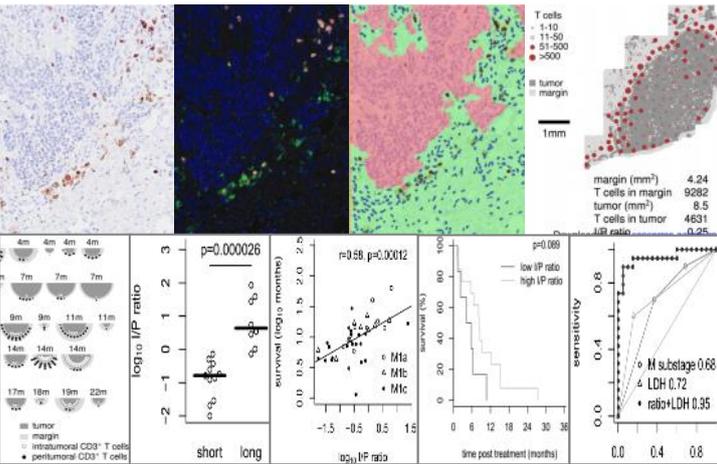
2



Oguejiofor, K., et al. (2015). "Stromal infiltration of CD8 T cells is associated with improved clinical outcome in HPV-positive oropharyngeal squamous carcinoma." *Br J Cancer* 113(6): 886-93. IF 5.569

口咽鳞癌组织，IHC四色复染光谱拆分，软件智能识别肿瘤间质中的细胞数目(第一行)；对比CD3+CD8+细胞数目在HPV阴性/阳性病人的肿瘤间质实质中的数量分布；确认间质中CD8+数目是HPV阳性病人的良性预后指标。

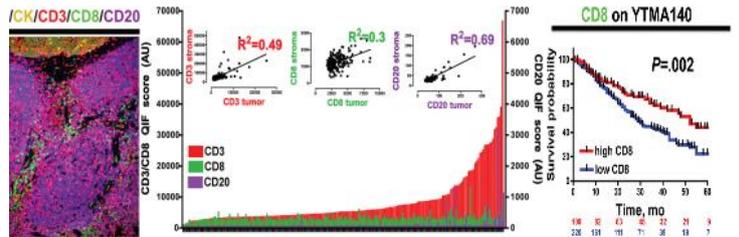
3



Vasaturo, A., et al. (2016). "T-cell Landscape in a Primary Melanoma Predicts the Survival of Patients with Metastatic Disease after their Treatment with Dendritic Cell Vaccines." *Cancer Res* 76(12): 3496-506. IF 8.556

黑色素瘤组织，CD3免疫组化染色，光谱成像并转化为模拟荧光以提高图像对比，软件自动识别肿瘤和间质，以景观图(landscape)呈现T细胞在肿瘤组织中的浸润情况(第一行)；对关键指标I/P Ratio与肿瘤大小(第二行左1)、以肿瘤存活期为标准的组间差异(左2)、生存期相关性(左3)、生存曲线差异(左4)分析确认其为有效的预后指标，ROC分析确认I/P Ratio比LDH更加敏感。

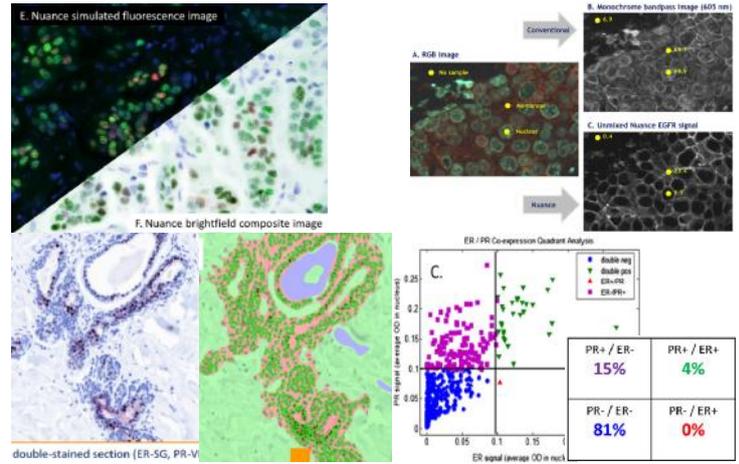
4



Schalper, K. A., et al. (2015). "Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 107(3). IF 11.370

小细胞肺癌组织，多色IF染色(左)，软件智能识别肿瘤和间质中的TILs数目，判断两个区域中的相关性(中)，并分析分子标记与生存曲线间的相关性。

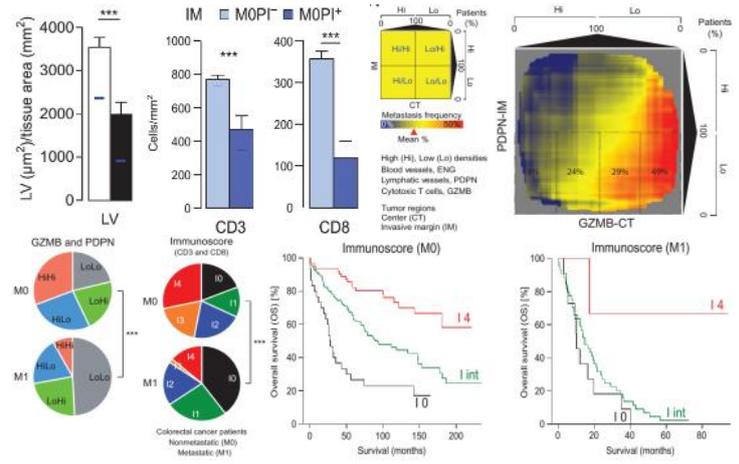
5



Mansfield, J. R. (2010). "Cellular context in epigenetics: quantitative multicolor imaging and automated per-cell analysis of miRNAs and their putative targets." *Methods* 52(4): 271-80. IF 3.503

光谱成像方法优势总结：荧光和明场模式的自由互换(左上)；大幅提高IF图像信噪比达数十倍(右上)；自动识别特定组织和细胞(下左)，并对细胞进行类流式聚类统计分析(下右)。

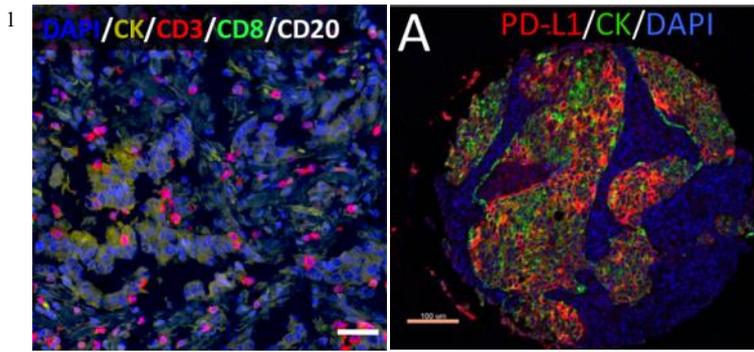
6



Mlecnik, B., et al. (2016). "The tumor microenvironment and Immunoscoring are critical determinants of dissemination and distant metastasis." *Sci Transl Med* 8(327): 327ra26. IF 16.264

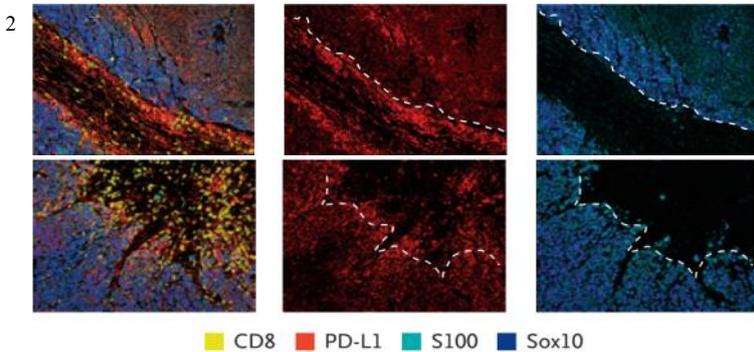
结直肠癌组织肿瘤微环境和免疫评分分析，定量对比PDPN标记的淋巴管面积(左上)在转移(黑)和非转移(白)病人中的差异；统计CD3、CD8等8种TILs密度(上中)与肿瘤M0M1分级的关联；利用肿瘤间质中的淋巴管(PDPN)和实质中的Tc细胞(GZMB)数量对病人进行分组寻找其与肿瘤转移间的关系(上右，下左)；利用CD3和CD8免疫评分(I0-I5)比较M0\M1组的病人差异(下中)，并分析其与生存曲线间的关联(下右)。

5



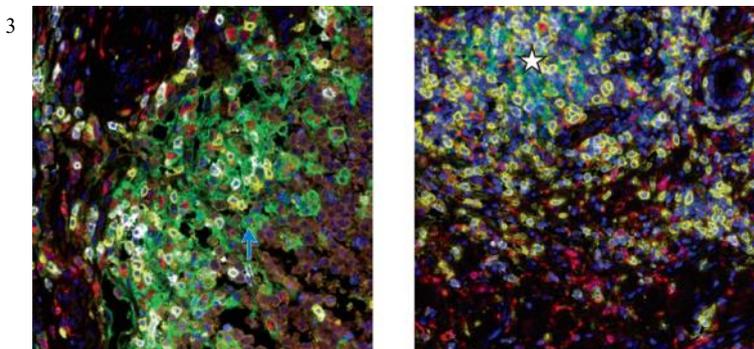
Schalper, K. A., et al. (2017). "Differential Expression and Significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in Human Lung Cancer." *Clin Cancer Res* 23(2): 370-378. IF 8.738

非小细胞肺癌组织, TILs: CK、CD3、CD8、CD20; 三种免疫调控蛋白PD-L1、IDO-1、B7-H4的表达相关性。



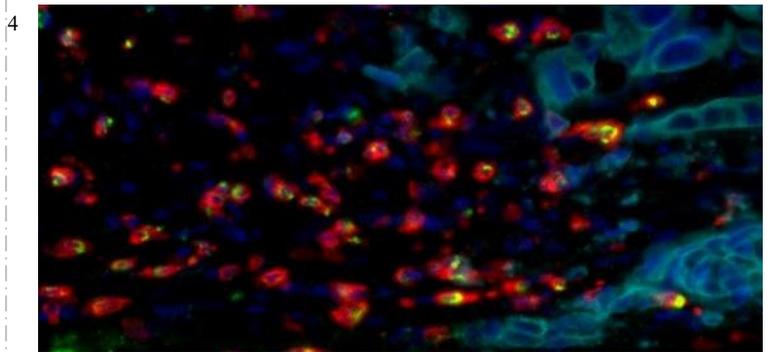
Zaretsky, J. M., et al. (2016). "Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma." *N Engl J Med* 375(9): 819-29. IF 59.558

黑色素瘤组织, CD8、PD1、S100、Sox10, PD-1抗体药物治疗病人复发机理。



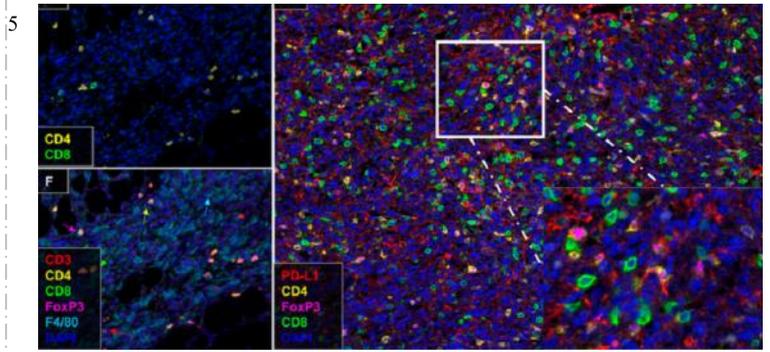
Nghiem, P. T., et al. (2016). "PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma." *N Engl J Med* 374(26): 2542-52. IF 59.558

Merkel细胞癌组织, NSE、CD8、CD68、PD1、PD-L1综合分析免疫治疗前后肿瘤组织微环境状态变化。



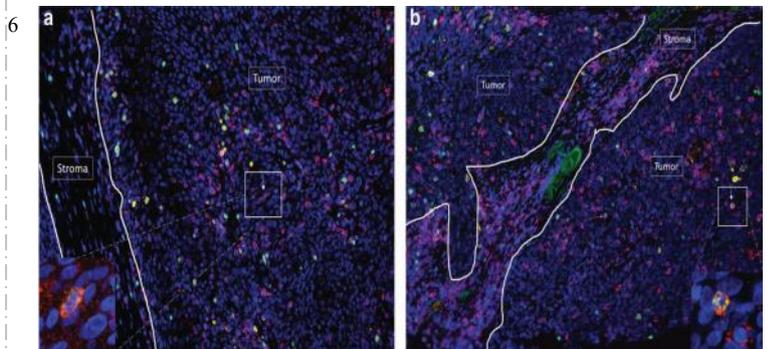
Mlecnik, B., et al. (2016). "The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis." *Sci Transl Med* 8(327): 327ra26. IF 16.264

结直肠癌组织, CD8、GZMB、CK、NKp46; 比较转移和非转移病人肿瘤组织微环境和免疫评分的特点和差异。



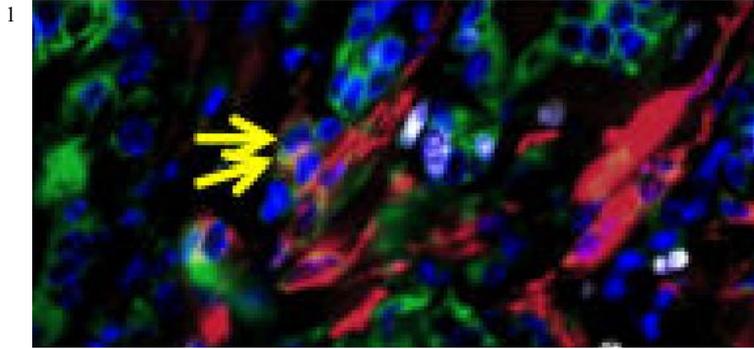
Feng, Z., et al. (2016). "Multispectral Imaging of T and B Cells in Murine Spleen and Tumor." *J Immunol* 196(9): 3943-50. IF 4.985

小鼠脾脏和种植瘤组织, CD3、CD4、CD8、FoxP3、F4/80、PD-L1, 多色标记染色方法的建立和优化。



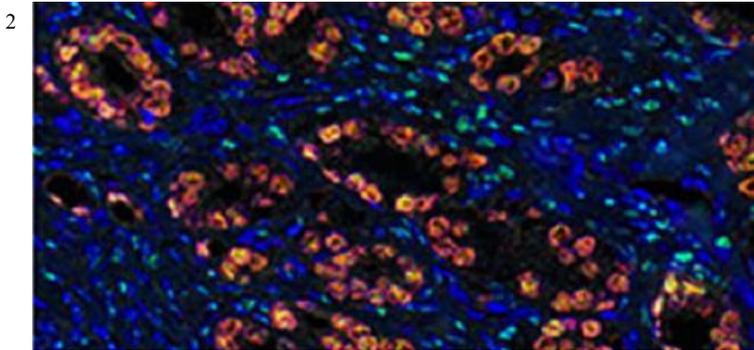
Montler, R., et al. (2016). "OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells in head and neck cancer." *Clin Transl Immunology* 5(4): e70. IF

头颈癌组织, PD-1、OX40、FoxP3、CD3, 判断免疫调节蛋白在肿瘤组织微环境中的表达部位、共定位关系和丰度比例。



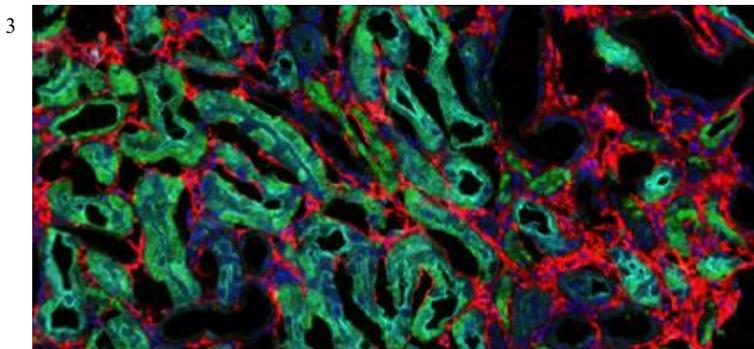
Zheng, X., et al. (2015). "EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer." *Nature* 527(7579): 525-30. IF 38.138

胰腺癌组织, CK8、 $\alpha$ SMA、Ki-67, 多重标记识别EMT+细胞并判断其增殖状态, 显示抑制EMT在肿瘤化疗中的作用。



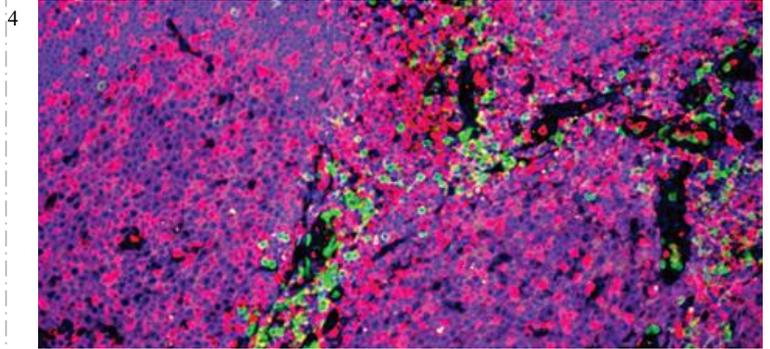
Pomerantz, M. M., et al. (2015). "The androgen receptor cistrome is extensively reprogrammed in human prostate tumorigenesis." *Nat Genet* 47(11): 1346-51. IF 31.616

前列腺肿瘤组织, FOXA1、HOXB13、AR (雄性激素受体), 发现三者共定位表达, 进而研究两种蛋白在AR顺反组重编程中的作用。



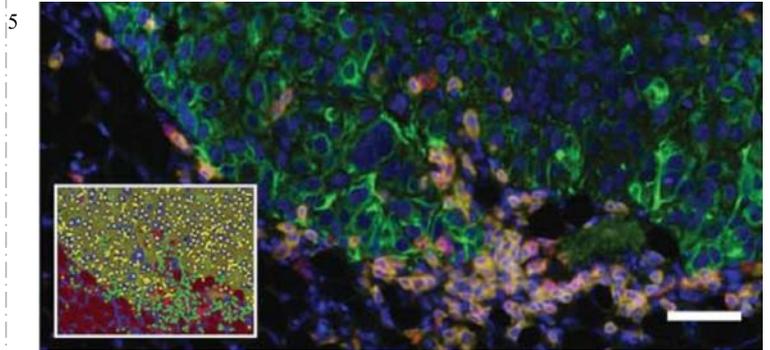
Lovisa, S., et al. (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis." *Nat Med* 21(9): 998-1009. IF 30.357

肾脏纤维化组织, YFP、 $\alpha$ SMA、AQP1, 识别处于EMT状态的细胞, 并判定其AQP1表达情况, 进而分析EMT在肾脏纤维化中的作用。



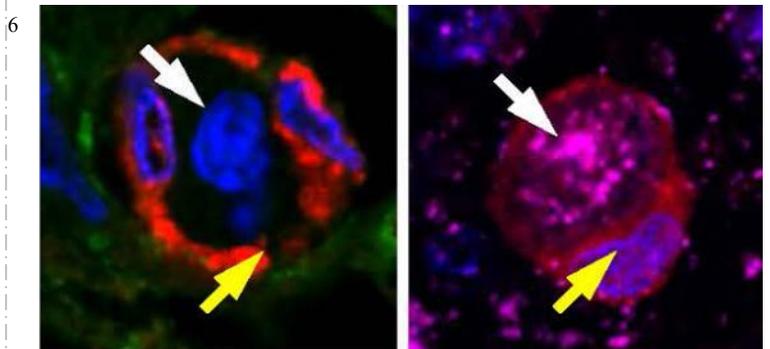
Schalper, K. A., et al. (2015). "Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 107(3). IF 11.370

非小细胞肺癌组织TMA, CK、CD3、CD8、CD20, 客观定量TILs并判断其临床预后意义。



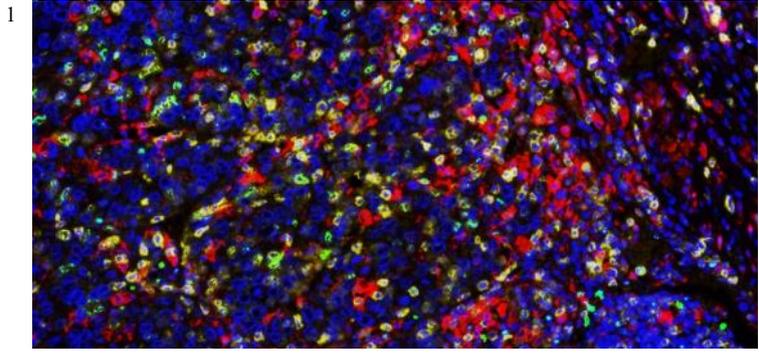
Sanmamed, M. F., et al. (2015). "Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T Lymphocytes Engrafted in Rag2<sup>-/-</sup>IL2R $\gamma$  null Immunodeficient Mice." *Cancer Res* 75(17): 3466-78. IF 8.556

小鼠人源胃癌种植瘤组织, CD3、CD8、CD20、CK, 借助小鼠模型研究人源抗体药物urelumab和nivolumab的对TILs的作用效果。

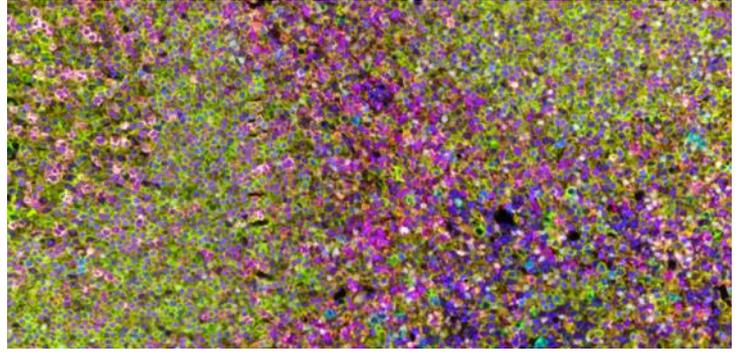


Huang, H., et al. (2015). "Detecting cell-in-cell structures in human tumor samples by E-cadherin/CD68/CD45 triple staining." *Oncotarget* 6(24): 20278-87. IF 5.008

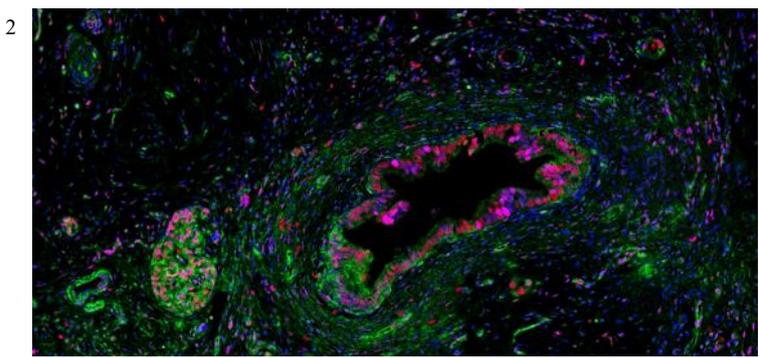
多种肿瘤组织TMA, E-cadherin, CD68、CD45, 多色复染建立识别肿瘤cell-in-cell结构的高效方法。  
(军医医学科学院)



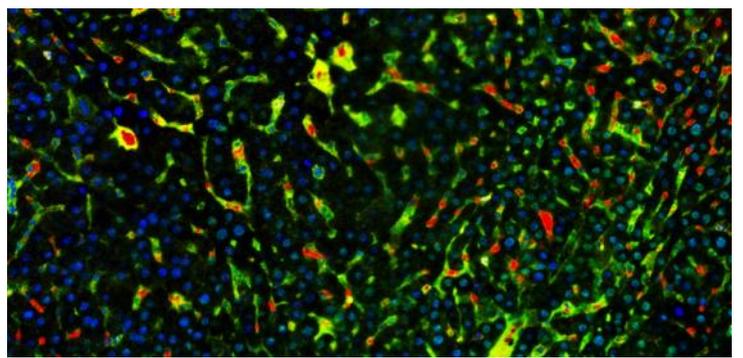
中山大学肿瘤医院  
人源肝癌组织，四色复染



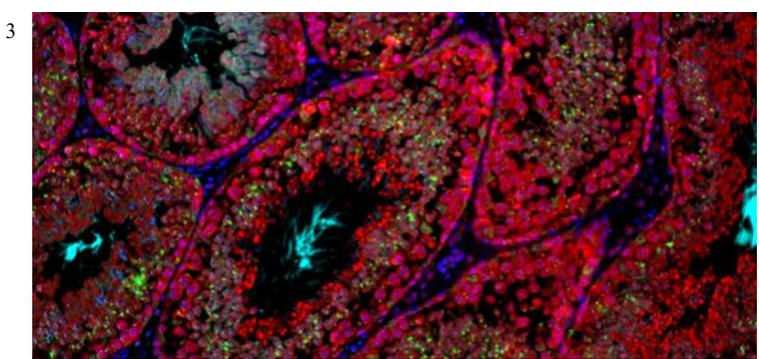
中国科学院巴斯德研究所  
人源扁桃体组织，八色复染



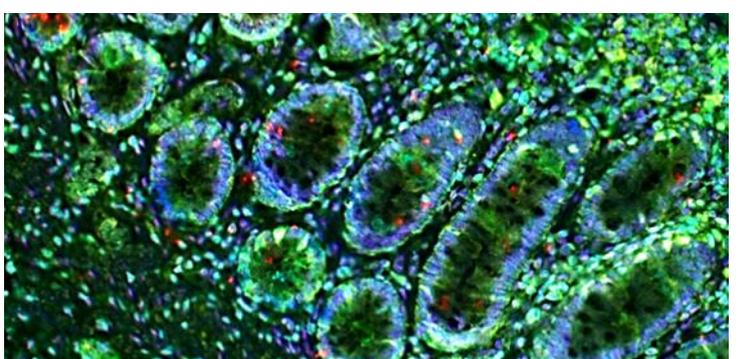
中国医学科学院基础医学研究所  
人源胰腺癌组织，四色复染



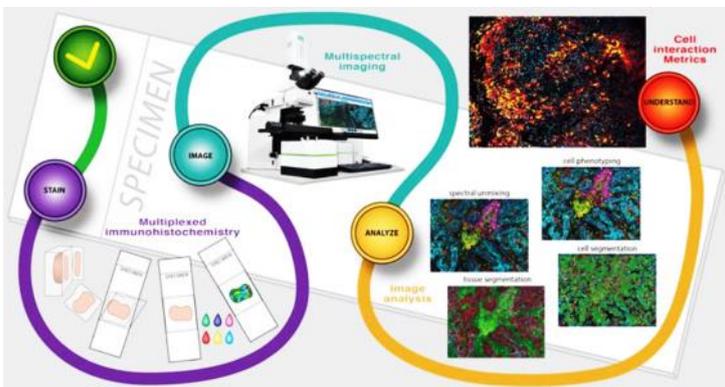
第二军医大学  
人源肿瘤组织，四色复染



中国科学院生物物理研究所  
小鼠睾丸组织，四色复染



福建中医药大学  
结肠癌组织，五色复染



Opal多标记免疫荧光染色技术!  
Vectra光谱定量病理分析系统!  
最专业的组织微环境分析方案!



Polaris 新一代组织病理成像分析平台  
中国区产品经理 焦磊 博士  
电话: 13810277863  
邮箱: Raymond.jiao@perkinelmer.com