

• 临床研究 •

## 肿瘤突变负荷在头颈部鳞癌中的预后价值\*

谢继锐, 罗杨坤, 秦远, 郎锦义, 付彬玉, 黄娜<sup>△</sup>

610041 成都, 四川省肿瘤医院·研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学医学院 放疗中心

**[摘要]** 目的: 研究头颈部鳞状细胞癌中肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)的水平及预后价值。方法: 收集肿瘤与癌症基因组图谱中头颈部鳞状细胞癌数据集的临床资料和基因表达谱数据。利用生物信息学方法, 根据体细胞突变数据计算 TMB。采用 Cox 回归模型评价肿瘤突变负荷与总生存率(overall survival, OS)的关系。结果: TMB 水平范围为 0.1 ~ 95.9 mutations/Mb。多因素 logistic 回归分析显示 TMB 水平与肿瘤病变亚部位显著相关。Kaplan-Meier 分析显示高 TMB 患者组的 OS 显著降低( $P=0.007$ )。亚组分析显示口腔癌患者高 TMB 与低 OS 相关( $P=0.004$ ); 在口咽癌、下咽癌和喉癌患者中, 高 TMB 组和低 TMB 组的生存率差异无统计学意义。经混杂因素校正后的多因素分析显示, TMB 是头颈部鳞状细胞癌患者 OS 的独立预后因素( $P=0.022$ , 危险比: 1.416, 95% 可信区间: 1.052 ~ 1.907)。结论: TMB 是影响头颈部鳞癌患者生存的独立预后因素。高 TMB 值能识别出预后差的患者, 他们可能受益于免疫检查点抑制剂治疗。

**[关键词]** 头颈部鳞癌; 肿瘤突变负荷; 免疫治疗; 预后; TCGA

**[中图分类号]** R739.91; R730.7 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.08.006

引文格式: Xie JR, Luo YK, Qin Y, et al. Prognostic value of tumor mutational burden in head and neck squamous cell carcinoma [J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(8): 665-671. [谢继锐, 罗杨坤, 秦远, 等. 肿瘤突变负荷在头颈部鳞癌中的预后价值[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(8): 665-671.]

## Prognostic Value of Tumor Mutational Burden in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Xie Jirui, Luo Yangkun, Qin Yuan, Lang Jinyi, Fu Binyu, Huang Na

Department of Radiation Oncology, Sichuan Cancer Hospital &amp; Institute, Sichuan Cancer Center, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, Sichuan, China

**Corresponding author:** Huang Na, E-mail: 2318968@qq.com

This study was supported by National Key R&amp;D Program of China (NO. 2017YFC0113100).

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the level and prognostic value of tumor mutational burden (TMB) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **Methods:** Clinical information and gene expression profiles from the Cancer Genome Atlas-HNSCC dataset were retrospectively collected. TMB levels were calculated based on data of somatic mutations by using bioinformatics methods. Cox regression model was performed to evaluate the association between TMB and overall survival (OS). **Results:** The TMB level ranged from 0.053 - 95.868 mutations/Mb. Multivariate logistic regression analysis showed that TMB was significantly related to subsites. Kaplan-Meier analysis showed a significant reduction in OS in patients with high TMB ( $P=0.007$ ). Subgroup analyses revealed that high TMB was associated with poorer OS in patients with oral cancer ( $P=0.004$ ). No significant differences in survival were observed between high and low TMB groups in patients with oropharyngeal cancer, hypopharyngeal cancer and laryngeal cancer. Multivariate analysis (confounding factors adjusted) revealed TMB was an independent prognostic factor for OS in HNSCC patients ( $P=0.022$ , hazard ratio: 1.416, 95% confidence interval: 1.052 - 1.907). **Conclusion:** TMB is an independent prognostic factor for the survival of patients with HNSCC. High TMB can identify patients with poor outcome who might benefit from immune checkpoint inhibitors.

**[Key words]** Head and neck squamous cell carcinoma; Tumor mutational burden; Immunotherapy; Prognosis; TCGA

**[收稿日期]** 2020-04-16 **[修回日期]** 2020-05-12

**[基金项目]** \* 国家重点研发计划(编号:2017YFC0113100)

**[通讯作者]** <sup>△</sup>黄娜, E-mail: 2318968@qq.com

头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous

cell carcinoma, HNSCC) 是全球第 6 常见的癌症, 每年新诊断病例约 60 万例<sup>[1]</sup>。大多数头颈部鳞癌患者表现为局部晚期伴有明显淋巴结转移, 得益于多学科治疗的进展, 其疗效得到提高, 但仅有 50% 患者是以根治为目的, 且有 40%~60% 的复发和转移率<sup>[2-3]</sup>。因此, 亟待更优的治疗方法。免疫检查点疗法是一类通过共抑制或共刺激等信号调节 T 细胞活性来提高抗肿瘤免疫反应的治疗方法<sup>[4]</sup>, 在复发/转移头颈部鳞癌中疗效得到肯定<sup>[5-9]</sup>, 并已在根治性治疗中进行探索<sup>[10-11]</sup>; 但仅有一部分患者能从中获益。预测免疫治疗疗效的生物标志包括程序性死亡受体表达, 干扰素  $\gamma$  相关基因特征等<sup>[12]</sup>。肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 是指肿瘤基因组中某一特定区域的体细胞突变总数, 与肿瘤新生抗原数量密切相关, 研究显示具有较高非同义突变负荷的肿瘤倾向于形成更多的新抗原, 更具有免疫原性, 对免疫治疗的反应性更大由此生存率提高<sup>[13-14]</sup>, 但其在头颈部鳞癌中的研究较少。本研究应用癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析 TMB 与头颈部鳞癌临床病理特征的关系, 并评估其预后价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据来源及处理

TCGA 官网 (<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载 TCGA-HNSCC 数据集 (506 例) 的全外显子体细胞突变和基因表达数据; TCGA 全外显子体细胞突变数据为 MAF 格式, 本研究选择下载 vancan 软件处理后的体细胞突变数据计算 TMB。TCGA 中 FP-KM 格式的基因表达数据转化为 TPM 格式作后续分析。收集的临床数据包括年龄、性别、人种、吸烟史、饮酒史、病变亚部位、人乳头瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染、组织学分级、肿瘤分期、生存时间以及存活状态等。HPV 感染阳性定义为 p16 蛋白免疫组化或 HPV 荧光原位杂交阳性或病毒滴度超过 30。

### 1.2 TMB 定义和计算

TMB 定义为外显子编码区域内每 Mb 碱基中体细胞突变 [包括单核苷酸变异 (single nucleotide variants, SNVs); 非同义点突变; 插入和缺失 (insertion-deletion, INDELS)] 的总数。TMB 计算为体细胞突变总数/目标区域大小, 单位为 mutations/Mb。本研究应用 maftools R 软件包计算每个样本的 TMB 分数。

### 1.3 统计学方法

总生存率 (overall survival, OS) 定义为从确诊日期到死亡日期的时间间隔, 生存曲线由 Kaplan-Meier 法生成并由 log-rank test 分析差异。单因素和多因素 Cox 回归分析 TMB 水平与 OS 之间的关联。TMB 的临界值由 X-tile 软件计算。组间差异由卡方或 Fisher 精确检验进行分析, 多因素分析采用 Logistic 回归。统计分析软件采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8, 双侧  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TMB 与头颈部鳞癌患者临床病理参数的关系

TCGA-HNSCC 数据集包含 506 例头颈部鳞癌患者数据, 总突变率为 93.48%。前 10 位突变的基因为 *TP53*, *TTN*, *FAT1*, *CDKN2A*, *MUC16*, *CSMD3*, *PIK3CA*, *NOTCH1*, *SYNE1*, *LRP1B* (图 1)。TMB 范围为 0.1~95.9 mutations/Mb (中位值 3.1)。按 TMB 临界值为 4.2 mutations/Mb 将患者分为高低两组。结果显示, TMB 水平与年龄 ( $P = 0.017$ )、吸烟史 ( $P = 0.035$ )、病变亚部位 ( $P < 0.001$ ) 显著相关 (表 1)。多因素 Logistic 回归分析显示, TMB 水平仅与病变亚部位显著相关 ( $P < 0.001$ ) (表 2)。喉癌具有最高的 TMB 值而口咽癌具有最低的 TMB 值, 口咽癌 TMB 值与其他 3 种癌种 TMB 相比差异均具有统计学意义 (图 2)。

### 2.2 TMB 与头颈部鳞癌患者预后的关系

本研究分析了 TMB 与头颈部鳞癌患者 OS 的关系。结果显示, 与具有低水平 TMB 的患者相比, 高水平 TMB 的患者预后较差 ( $P = 0.007$ ) (图 3)。单因素分析显示年龄、性别、病变位于口腔、临床分期以及 TMB 是影响预后的指标 (表 3)。将上述指标纳入多因素分析显示 TMB 是头颈部鳞癌患者生存的独立预后因素 (表 4)。

### 2.3 TMB 与不同病变亚部位头颈部鳞癌患者预后的关系

本研究分析了 TMB 在不同病变亚部位头颈部鳞癌中的预后价值。由于下咽癌病例数较少 (10 例), 故与喉癌合并分析。结果显示: 在口腔癌中, 与具有低水平 TMB 的患者相比, 高水平 TMB 的患者的预后较差 ( $P = 0.004$ ); 在口咽癌和下咽及喉癌中, 高低水平 TMB 组间生存率差异无统计学意义 ( $P = 0.866$ ;  $P = 0.483$ ) (图 4)。

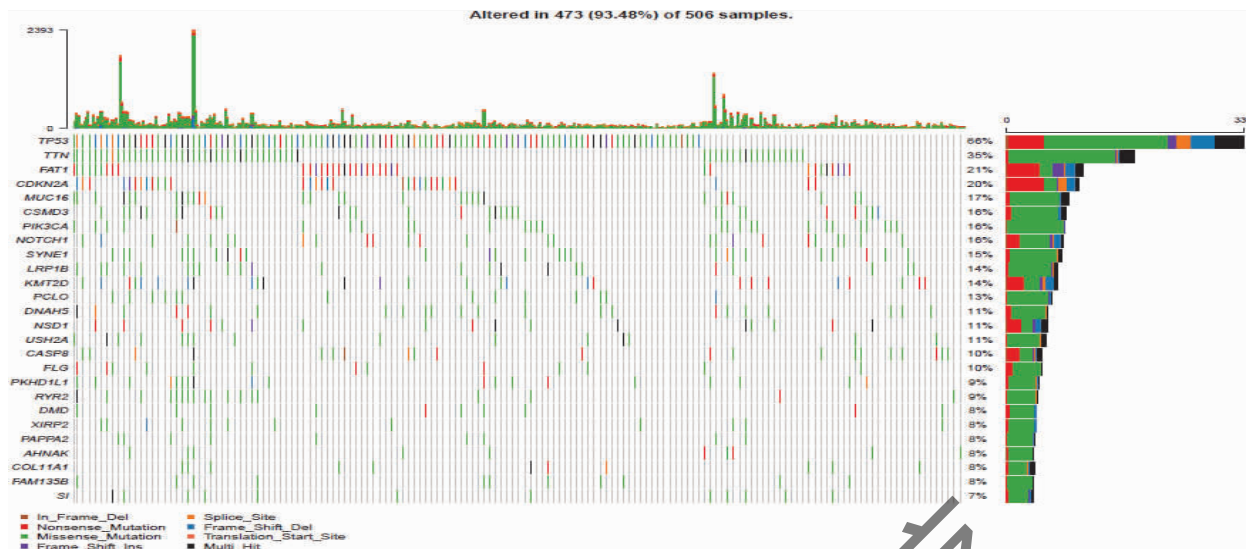


图 1 TMB 的瀑布图

Figure 1. Waterfall Plot of Tumor Mutational Burden

表 1 TMB 与头颈部鳞癌临床病理参数的关系

Table 1. Relationship between TMB and Clinicopathological Parameters of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Characteristic	TMB			P
	Total (n = 506)	Low (n = 355) (%)	High (n = 151) (%)	
Age				0.017
≤61	269	201 (56.6)	68 (45.0)	
>61	237	154 (43.4)	83 (55.0)	
Gender				0.644
Male	369	261 (73.5)	108 (71.5)	
Female	137	94 (26.5)	43 (28.5)	
Race				0.886
Caucasian	435	304 (85.6)	131 (86.8)	
Others	58	40 (11.3)	18 (11.9)	
Unknown	13	11 (3.1)	2 (1.3)	
Tobacco use				0.035
No	118	92 (25.9)	26 (17.2)	
Yes	369	250 (71.8)	119 (80.8)	
Unknown	19	13 (2.3)	6 (2.0)	
Alcohol use				0.807
No	160	111 (31.3)	49 (32.5)	
Yes	335	236 (66.5)	99 (66.2)	
Unknown	11	8 (2.3)	3 (2.0)	
Pathologic grading				0.655
GX	17	13 (3.7)	4 (2.6)	
G1	62	45 (12.7)	17 (11.3)	
G2	302	209 (58.9)	93 (61.6)	
G3	118	81 (22.8)	37 (24.5)	
G4	4	4 (1.1)	0 (0.0)	
Unknown	3	3 (0.8)	0 (0.0)	
HPV infection				0.143
Negative	78	55 (15.5)	23 (15.2)	
Positive	66	53 (14.9)	13 (8.6)	
Unknown	362	247 (69.6)	115 (76.2)	

(Table 1 continues on next page)

(Continued from previous page)

Characteristic	TMB			P
	Total (n = 506)	Low (n = 355) (%)	High (n = 151) (%)	
Tumor subsite				<0.001
Oropharynx	76	67 (18.9)	9 (6.0)	
Oral cavity	309	231 (65.1)	78 (51.7)	
Hypopharynx	10	6 (1.7)	4 (2.6)	
Larynx	111	51 (14.4)	60 (39.7)	
Clinical stage				0.059
I	22	19 (5.4)	3 (2.0)	
II	78	59 (16.6)	19 (12.6)	
III	87	65 (18.3)	22 (14.6)	
IV	301	198 (55.8)	103 (68.2)	
Unknown	18	14 (3.9)	4 (2.6)	

The P value was calculated by chi-square test or Fisher exact test.

TMB: Tumor mutational burden; HPV: Human papillomavirus.

表 2 TMB 水平影响因素的多因素 Logistic 回归分析

Table 2. Multivariate Logistic Regression Analysis of Influencing Factors Related to the TMB Level

Characteristic	HR	95% CI	P
Age			0.123
≤61	1.000	-	
>61	1.392	0.914 - 2.118	
Tobacco use			0.497
No	1.000	-	
Yes	1.205	0.704 - 2.061	
Clinical stage			0.248
I	1.000	-	
II	1.858	0.473 - 7.293	0.375
III	1.709	0.443 - 6.590	0.436
IV	2.571	0.715 - 9.252	0.148
Tumor subsite			<0.001
Oropharynx	1.000	-	
Oral cavity	0.445	0.210 - 0.941	0.034
Hypopharynx	2.009	0.551 - 7.324	0.290
Larynx	3.579	2.240 - 5.718	<0.001

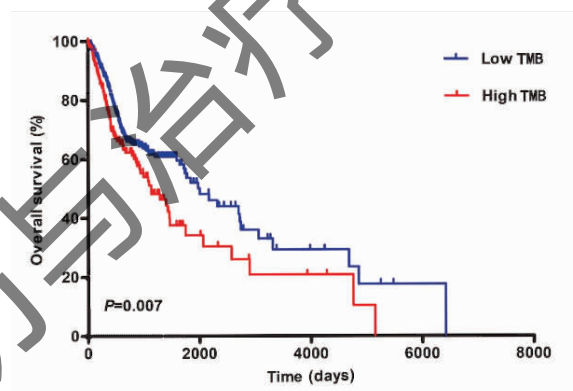


图 3 不同 TMB 水平头颈部鳞癌患者的生存曲线

Figure 3. Overall Survival of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Different TMB Groups

表 3 头颈部鳞癌患者预后影响因素的单因素 Cox 回归分析  
Table 3. Univariate Cox Regression Analysis of Factors Affecting Prognosis of Patients with Squamous Cell Carcinoma

Characteristic	HR	95% CI	P
Age			0.014
≤61	1.000	-	
>61	1.424	1.073 - 1.889	
Gender			0.013
Male	1.000	-	
Female	1.455	1.083 - 1.956	
Race			0.199
Caucasian	1.000	-	
Others	1.332	0.860 - 2.064	
Tobacco use			0.480
No	1.000	-	
Yes	1.136	0.797 - 1.620	
Alcohol use			0.295
No	1.000	-	
Yes	0.854	0.635 - 1.148	

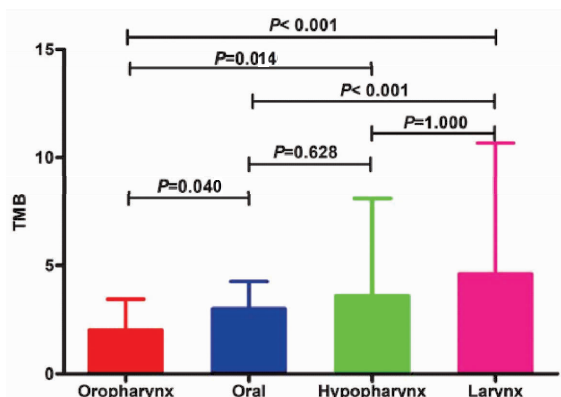


图 2 不同病变亚部位的头颈部鳞癌 TMB 水平

Figure 2. TMB Levels in Different Subsites of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

(Table 3 continues on next page)

(Continued from previous page)

Characteristic	HR	95% CI	P
Pathologic grading			0.376
G1 - 2	1.000	-	
G3 - 4	0.860	0.616 - 1.200	
HPV infection			0.172
Negative	1.000	-	
Positive	0.580	0.265 - 1.267	
Tumor subsite			0.156
Oropharynx	1.000	-	
Oral cavity	1.609	0.213 - 0.875	0.032
Hypopharynx	2.280	0.513 - 3.765	0.518
Larynx	1.341	0.575 - 1.161	0.260
Clinical stage			0.015
I - II	1.000	-	
III - IV	1.632	1.098 - 2.427	
TMB			0.008
Low	1.000	-	
High	1.484	1.109 - 1.985	

Abbreviations as indicated in Table 1.

表 4 头颈部鳞癌患者预后影响因素的多因素 Cox 回归分析  
Table 4. Multivariate Cox Regression Analysis of Factors Affecting Prognosis of Patients with Squamous Cell Carcinoma

Characteristic	HR	95% CI	P
Age			0.106
≤61	1.000	-	
>61	1.278	0.949 - 1.721	
Gender			0.005
Male	1.000	-	
Female	1.541	1.137 - 2.089	
Tumor subsite			0.164
Oropharynx	1.000	-	
Oral cavity	1.677	0.521 - 1.134	0.133
Hypopharynx	1.664	0.412 - 3.082	0.815
Larynx	1.011	0.463 - 1.012	0.058
Clinical stage			0.010
I - II	1.000	-	
III - IV	1.690	1.133 - 2.520	
TMB			0.022
Low	1.000	-	
High	1.416	1.052 - 1.907	

Abbreviations as indicated in Table 1.

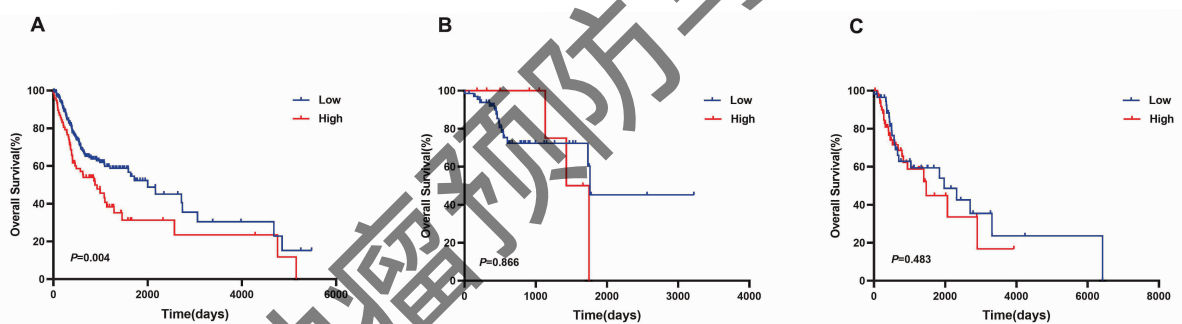


图 4 不同病变亚部位头颈部鳞癌患者的生存曲线 A. 口腔癌; B. 口咽癌; C. 喉及下咽癌

Figure 4. Overall Survival of Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Different TMB Groups

A. Oral cancer; B. Oropharyngeal cancer; C. Laryngeal and hypopharyngeal cancer

### 3 讨论

肿瘤发生体细胞突变有多种原因,如 DNA 修复缺陷、DNA 复制机制固有的错误、DNA 酶修饰和外源性暴露<sup>[15]</sup>。突变形式包括非同义突变(大多是错义突变即点突变)、同义突变、插入和缺失以及拷贝数改变。这些基因突变的累积,尤其是一些驱动基因的突变,使肿瘤发生恶性转化<sup>[16]</sup>。TMB 是外显子编码区域内每 Mb 碱基中体细胞突变的总数,代表肿瘤基因组的稳定性水平和微环境的异质性<sup>[17]</sup>。随着下一代测序的广泛应用,TMB 在肿瘤筛查,监测和治疗中的作用越来越受到重视,尤其是近年来,TMB 作为一种可能识别免疫治疗反应相关的生物

学标志更受到较多关注。研究显示在不同肿瘤中 TMB 水平不一;在黑色素瘤、弥漫大 B 细胞淋巴瘤以及鳞癌中具有较高水平的 TMB,而白血病和儿童肿瘤具有较低水平的 TMB<sup>[18]</sup>。TMB 在同一类肿瘤中也存在差异;如因吸烟状态、EGFR 基因突变及人种而异等<sup>[19]</sup>。目前尚无关于头颈部鳞癌 TMB 水平与临床病理参数之间关系的报道。本研究分析结果显示 TMB 与年龄、吸烟史,以及病变亚部位相关,但多因素分析结果显示 TMB 仅与病变亚部位相关;喉癌具有最高的 TMB 值而口咽癌具有最低的 TMB 值。头颈部鳞癌因 HPV 感染分为具有截然不同生物学意义的两种类型,HPV 阳性肿瘤与病毒感染相关,主要发生在口咽部,而 HPV 阴性肿瘤与环境因

素尤其是吸烟相关,主要发生在喉,下咽和口腔。HPV 感染后 E7 癌蛋白被发现会导致中心体异常,破坏有丝分裂的保真度,增加染色体错聚和非整倍体的风险,而染色体不稳定则可能导致基因突变增加,理论上 HPV 阳性肿瘤如口咽癌应具有较高的 TMB 值<sup>[20]</sup>。然而,本研究结果显示 TMB 与 HPV 感染无相关性,与 Wang 等<sup>[20]</sup>基于 TCGA 和大样本的研究结果相同。可能的解释是其他物质主要影响 HPV 阳性 HNSCC 中的 TMB,或只有一些特定的 HPV 肿瘤蛋白(如 HPV E7)可以增加 TMB 或改变肿瘤非整倍体<sup>[20]</sup>。另外,本研究受资料所限定义 HPV 阳性的方法包括了病毒滴度、P16 蛋白免疫组化以及荧光原位杂交法,可能会对分析结果有影响。因此,TMB 与 HPV 感染状态之间的关系应扩大样本及精确测定后进一步分析。总之,本研究结果显示的不同解剖部位具有不同的 TMB 水平对于头颈部鳞癌患者的预后及免疫治疗疗效的预测具有一定的提示意义,应做进一步研究。

既往研究对 TMB 在肿瘤中的预后价值进行了探讨;LACE-Bio-II Study 研究对 908 例石蜡包埋标本应用靶向基因图谱计算非同义突变 TMB,结果显示高 TMB 值与可切除非小细胞肺癌患者预后较好相关<sup>[21]</sup>。Eder 等<sup>[22]</sup>应用靶向基因图谱和全外显子测序计算 TMB,结果显示高 TMB 值与 HNSCC 患者预后较差相关。Wang 等<sup>[23]</sup>研究结果显示 TMB 在各个肿瘤中的预后价值不一,如在皮肤癌,卵巢癌和膀胱癌中高 TMB 提示较好的预后,而在食管癌,甲状腺癌,肝癌等癌中提示较差的预后。因此,TMB 在恶性肿瘤中的预后价值可能具有癌种间差异性。本研究结果显示在头颈部鳞癌中高 TMB 患者具有较差的总生存率,多因素分析也显示 TMB 是生存的独立负性预后因素,与 Eder 等及 Wang 等<sup>[22-23]</sup>研究结果一致。由于头颈部鳞癌是一大类来源于不同解剖部位肿瘤的统称,前面结果显示 TMB 水平因病变亚部位而不同,本研究进一步对不同病变亚组进行了分析,结果显示高水平 TMB 的口腔癌患者的预后显著较差;而在口咽癌和下咽及喉癌中,高低水平 TMB 组间预后差异无统计学意义,提示 TMB 在头颈部鳞癌中的负性预后作用可能主要体现在口腔癌中。而对于口咽癌和下咽及喉癌而言,由于 TCGA-HNSCC 数据集中病例数较小,故 TMB 的预后价值需扩大样本量进一步分析。在免疫治疗时代,TMB 更多是作为一种反映免疫治疗疗效的生物标志物而受到关注。理论上高 TMB 值的肿瘤往往携带高的

新抗原负荷,新抗原的一个子集可以被识别为“非自身”,导致 T 细胞活化和肿瘤靶向免疫反应,免疫检查点分子负性调节 T 细胞活化,抑制新抗原驱动的免疫反应,使肿瘤逃避免疫监视;而免疫检查点抑制剂恢复抗肿瘤免疫应答和新抗原驱动的抗肿瘤免疫应答激活提示高 TMB 的肿瘤更易对免疫检查点阻断产生反应<sup>[13]</sup>。临床研究结果也表明高 TMB 患者在免疫治疗方面的应答率和疗效都高于低 TMB 患者<sup>[24]</sup>。本研究使用的 TCGA-HNSCC 数据集是接受手术 +/- 放疗的患者,没有接受免疫治疗,而高 TMB 是 OS 的不良预后因素,这提示高 TMB 可能与先前治疗的抵抗性有关。鉴于高 TMB 的复发/转移 HNSCC 患者对免疫治疗有较高的应答率,手术 +/- 放疗联合免疫检查点抑制剂可能是该类患者一个更优化的选择。

#### 4 结论

本研究结果显示不同解剖部位来源的头颈部肿瘤具有不同的 TMB 水平;TMB 是影响头颈部鳞癌患者生存的独立预后因素,鉴于高 TMB 值肿瘤对免疫治疗具有较高的反应性,因此 TMB 可作为一种生物学标志物识别出预后差的患者,他们可能受益于免疫治疗。由于本研究使用公共数据库进行回顾性分析,无独立数据集进行验证,因此相关结论有待于进一步研究。

**作者声明:**本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

**学术不端:**本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

**同行评议:**经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

**利益冲突:**所有作者均声明不存在利益冲突。

**文章版权:**本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

#### [参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1):7-30.
- [2] Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 52(Pt 2):

- 228-240.
- [3] Yang H, Cao Y, Li ZM, *et al.* The role of protein p16INK4a in non-oropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma in Southern China[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5) :6147-6155.
- [4] Kim HD, Park SH. Immunological and clinical implications of immune checkpoint blockade in human cancer [J]. *Arch Pharm Res*, 2019, 42(7) :567-581.
- [5] Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, *et al.* Pembrolizumab for platinum- and cetuximab-refractory head and neck cancer; Results from a single-arm, phase II study[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(14) : 1542-1549.
- [6] Ferris RL, Jr BG, Fayette J, *et al.* Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck; 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression [J]. *Oral Oncol*, 2018, 81 :45-51.
- [7] Zandberg DP, Algazi AP, Jimeno A, *et al.* Durvalumab for recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma; Results from a single-arm, phase II study in patients with  $\geq 25\%$  tumour cell PD-L1 expression who have progressed on platinum-based chemotherapy[J]. *Eur J Cancer*, 2019, 107 :142-152.
- [8] Chow LQM, Haddad R, Gupta S, *et al.* Antitumor activity of pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma; Results from the phase Ib KEYNOTE-012 expansion cohort [J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(32) :3838-3845.
- [9] Bahleda R, Braitheh FS, Balmanoukian AS, *et al.* 10440long-term safety and clinical outcomes of atezolizumab in head and neck cancer; Phase Ia trial results[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(suppl\_5) :373.
- [10] Vanpouille-Box C, Formenti SC, Demaria S. Toward precision radiotherapy for use with immune checkpoint blockers [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2) :259-265.
- [11] Uppaluri R, Zolkind P, Lin T, *et al.* Neoadjuvant pembrolizumab in surgically resectable, locally advanced HPV negative head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(s15) :6012.
- [12] 李琦, 李涛, 范羽, 等. PD-1/PD-L1 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2018, 31(4) :248-257.
- [13] Büttner R, Longshore JW, López-Ríos F, *et al.* Implementing TMB measurement in clinical practice; Considerations on assay requirements[J]. *ESMO open*, 2019, 4(1) :e000442.
- [14] Hendriks, Rouleau LE, Benjamin EB. Clinical utility of tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated with immunotherapy [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2018, 6(7) :647-660.
- [15] Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome [J]. *Nature*, 2009, 458(7239) :719-724.
- [16] Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker; Utility for the oncology clinic [J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1) :44-56.
- [17] Xu Z, Dai J, Wang D, *et al.* Assessment of tumor mutation burden calculation from gene panel sequencing data [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12 :3401-3409.
- [18] Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer [J]. *Nature*, 2013, 500(7463) :415-421.
- [19] Wang HF, Wang SS, Tang YJ, *et al.* The double-edged sword-how human papillomaviruses interact with immunity in head and neck cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10 :653.
- [20] Wang J, Sun H, Zeng Q, *et al.* HPV-positive status associated with inflamed immune microenvironment and improved response to anti-PD-1 therapy in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1) :13404.
- [21] Devarakonda S, Rotolo F, Tsao MS, *et al.* Tumor mutation burden as a biomarker in resected non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(30) :2995-3006.
- [22] Eder T, Hess AK, Kunschak R, *et al.* Interference of tumour mutational burden with outcome of patients with head and neck cancer treated with definitive chemoradiation; A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group [J]. *Eur J Cancer*, 2019, 116 :67-76.
- [23] Wang X, Li M. Correlate tumor mutation burden with immune signatures in human cancers [J]. *BMC Immunol*, 2019, 20(1) :4.
- [24] Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, *et al.* Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2) :202-206.