

PD-1/PD-L1 在结直肠癌组织中的表达及其临床意义

刘宗航¹, 史丽芸², 郑立锋¹, 李现雷¹

1. 南京江北人民医院普外科, 江苏 南京 210048; 2. 南京江北人民医院病理科, 江苏 南京 210048

摘要: **目的** 探讨程序性死亡因子(PD)-1/PD 配体 1(PD-L1)蛋白在结直肠癌组织中的表达水平及其与患者临床病理特征的关系。**方法** 收集 2015 年 1 月至 2018 年 6 月 80 例结直肠癌手术患者的术后石蜡组织切片及临床资料。采用免疫组化法检测肿瘤组织中的 PD-1 和 PD-L1 蛋白的表达情况,分析 PD-1 和 PD-L1 与结直肠癌患者临床病理特征的关系。**结果** PD-1 和 PD-L1 蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率分别为 11.2% 和 53.8%。PD-1 蛋白在不同临床病理特征患者间的表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在有淋巴结转移、肿瘤 T 分期高、分化程度低以及病理分期高的患者中,PD-L1 蛋白阳性表达率明显高于无淋巴结转移、肿瘤 T 分期低、分化程度高以及病理分期低的患者,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。配对资料两因素关联性的 χ^2 检验结果显示,结直肠癌组织中 PD-L1 的阳性表达(阳性表达率 53.8%)与 PD-1 表达的缺失(阳性表达率 11.2%)存在显著关联($\chi^2 = 32.93, P < 0.01$)。**结论** PD-L1 在结直肠癌组织中高表达,并与患者的不良临床病理特征有关,以 PD-1/PD-L1 信号通路为靶点的免疫治疗有望成为结直肠癌的潜在治疗方案。

关键词: 结直肠癌; 程序性死亡因子 1; 程序性死亡因子配体 1; 临床病理特征

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)10-1364-04

Expressions and clinical significance of PD-1/PD-L1 in colorectal carcinoma tissues

LIU Zong-hang*, SHI Li-yun, ZHENG Li-feng, LI Xian-lei

* Department of General Surgery, Nanjing Jiangbei People's Hospital, Nanjing, Jiangsu 210048, China

Abstract: Objective To investigate the expression levels of programmed death factor 1 (PD-1) and programmed death ligand 1 (PD-L1) proteins in colorectal carcinoma (CRC) tissues and the relationship between them and the clinicopathological features of patients. **Methods** The paraffin embedded tumor tissues after operation and the clinical data of 80 CRC patients from January 2015 to June 2018 were collected. The protein expressions of PD-1 and PD-L1 in tumor tissues were detected by immunohistochemistry method. The relationship between PD-1/PD-L1 expression and clinicopathological characteristics was analyzed. **Results** The positive rates of PD-1 and PD-L1 in colorectal cancer tissues were 11.2% and 53.8%, respectively. There was no significant difference in the expression of PD-1 protein in the patients with different clinicopathological characteristics ($P > 0.05$), but the positive expression rates of PD-L1 protein in patients with lymph node metastasis, high T stage, low degree of differentiation and high pathological stage were significantly higher than those in patients without lymph node metastasis, low T stage, high degree of differentiation and low pathological stage ($P < 0.05, P < 0.01$). The results of χ^2 test of paired data showed that there was a significant correlation between the expression of PD-L1 (positive expression rate = 53.8%) and the loss of PD-1 expression (positive expression rate = 11.2%) in colorectal cancer ($\chi^2 = 32.93, P < 0.01$). **Conclusions** The high expression of PD-L in colorectal cancer tissues is related to the adverse clinicopathological characteristics of patients. Immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 signaling pathway is expected to become a potential treatment for colorectal cancer.

Key words: Colorectal carcinoma; Programmed death factor 1; Programmed death ligand 1; Clinicopathological features

结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤,近年来结直肠癌的发病率和死亡率呈不断上升趋势,严重危害了

人民的生命健康^[1-2]。目前治疗结直肠癌的主要方法包括外科手术、放疗、化疗等。但是对于许多局部

或全身转移的晚期肿瘤患者而言,传统的治疗方法疗效不佳,晚期结直肠癌患者的 5 年生存率长期徘徊在 10% 左右^[3]。近十年来,肿瘤免疫治疗逐渐成为一种新的治疗模式,相关免疫抑制剂的问世大大延长了许多晚期肿瘤患者的生存期^[4-5]。其中以程序性死亡因子 1(PD-1)/程序性死亡因子配体 1(PD-L1)信号通路为靶点的免疫抑制剂的研究成为最大的热点^[6-8]。其相关的抗体药物产品已经应用于治疗肺癌等一些进展期恶性肿瘤的患者,并取得了令人瞩目的效果。但目前 PD-1/PD-L1 在结直肠肿瘤中的表达情况及其相关机制尚不明确。本研究拟通过免疫组化的方法检测 PD-1/PD-L1 蛋白在结直肠癌标本中的表达情况,并结合患者的临床资料,分析其与患者临床病理特征的关系,以期 PD-1/PD-L1 抑制剂对结直肠癌患者免疫治疗应用的可能性作一些初步的探索。

1 资料与方法

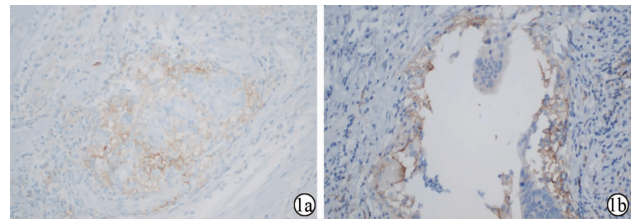
1.1 一般资料 选取南京江北人民医院 2015 年 1 月至 2018 年 6 月 80 例结直肠癌患者术后的石蜡组织标本。其中管状腺癌 65 例,乳头状腺癌 4 例,黏液腺癌 8 例,未分化癌 1 例,类癌 2 例。所有纳入研究的患者均有完整的病历资料。其相应的临床病理特征包括年龄、性别、肿瘤的大小、分化程度、有无淋巴结转移以及术后病理分期等。所有患者术前均未接受化疗或者放疗,术前均接受 CT、MRI 或 B 超检查,以排除局部或者远处转移。

1.2 免疫组化 染色石蜡包埋组织以厚 4 μm 连续切片,常规脱蜡水化,室温下 3% 过氧化氢孵育 10 min,微波炉抗原修复 10 min,冷却至室温,每张切片滴加过氧化酶阻断溶液,室温孵育 10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育 15 min,甩除玻片上多余液体,加入一抗[PD-1(NAT)鼠单克隆抗体:clone SC265 diluted 1:100, Santa Cruz Biotechnology; PD-L1(SP142)兔单克隆抗体:clone SC2566 diluted 1:100, Santa Cruz Biotechnology]后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;滴加生物素标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min;滴加二氨基联苯氨(DAB)显色 30 s,苏木素复染,梯度酒精脱水、透明、中性树胶封固。用已知阳性的肺腺癌组织作为阳性对照,使用 1% PBS 代替一抗作为阴性对照。见图 1。

1.3 免疫组化染色结果 PD-1 和 PD-L1 的表达主要定位于细胞膜或者细胞质,阳性表达是指细胞膜或细胞质中出现黄色或棕褐色染色者。每个切片于高倍镜下随意取 5 个不同的视野计数,计数所有细胞。

表达强度按照阳性细胞的百分比计算,阳性细胞数 < 20% 为阴性,阳性细胞数 $\geq 20\%$ 为阳性。细胞质或细胞膜上任一项阳性均视为阳性表达。免疫组化结果判定由两位高年资病理医师共同作出。见图 1。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。分类资料采用频数(%)表示,PD-1 与 PD-L1 表达的关联性分析采用配对资料 χ^2 检验;PD-1 和 PD-L1 的表达与患者临床病理特征的关系采用四格表 χ^2 检验或 $R \times C$ 表 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:1a:PD-1 阳性表达;1b:PD-L1 阳性表达。

图 1 PD-1 和 PD-L1 在结直肠癌组织中的阳性表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

2 结果

2.1 临床病理特征 80 例病例中,男 42 例,女 38 例。33 例患者在接受手术时的年龄 > 60 岁,占 41.2%。接受手术时中位年龄 59 岁(40 ~ 85 岁)。肿瘤 TNM 分期中的 T 分期为 T1 期 7 例(8.8%),T2 29 例(36.2%),T3 34 例(42.5%),T4 10 例(12.5%)。术后病理检查发现淋巴结转移 39 例,占 48.8%。肿瘤组织高、中、低分化的例数分别为 31 例、16 例和 33 例,分别占 38.8%、20.0%、41.2%。27 例患者术后临床病理分期为 I 期(33.8%),29 例为 II 期(36.2%),24 例为 III 期(30.0%),无 IV 期患者被纳入研究。见表 1。

2.2 PD-1、PD-L1 的表达与患者临床病理特征的关系 PD-1 蛋白在不同临床病理特征患者间的表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。是否淋巴结转移、不同临床病理分期、不同肿瘤 T 分期以及不同肿瘤分化程度患者 PD-L1 蛋白的表达差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

2.3 PD-1 和 PD-L1 在结直肠癌组织中的表达及其相关性 免疫组化检测结果显示,80 例患者结直肠癌组织中 PD-1 蛋白表达阳性率为 11.2% (9/80),与 PD-L1 表达蛋白表达阳性率 53.8% (43/80) 之间差异有明显统计学意义($\chi^2 = 32.93, P < 0.01$),亦即结直肠癌组织中 PD-L1 的阳性表达与 PD-1 表达的缺失存在明显关联。

表 1 PD-1 和 PD-L1 在结直肠癌中的表达与临床病理特征的关系 [n = 80, 例(%)]

| 临床特征 | 例数 | PD-1 的表达 | | χ^2 值 | P 值 | PD-L1 的表达 | | χ^2 值 | P 值 |
|---------|----|----------|----------|------------|-------|-----------|----------|------------|-------|
| | | 阴性(%) | 阳性(%) | | | 阴性(%) | 阳性(%) | | |
| 年龄 | | | | | | | | | |
| ≤60 岁 | 47 | 41(87.2) | 6(12.8) | 1.539 | 0.165 | 22(46.8) | 25(53.2) | 1.309 | 0.225 |
| >60 岁 | 33 | 30(90.9) | 3(9.1) | | | 15(45.5) | 18(54.5) | | |
| 性别 | | | | | | | | | |
| 男 | 42 | 37(88.1) | 5(11.9) | 2.564 | 0.956 | 20(47.6) | 22(52.4) | 1.897 | 0.545 |
| 女 | 38 | 34(89.5) | 4(10.5) | | | 17(44.7) | 21(55.3) | | |
| 肿瘤 T 分期 | | | | | | | | | |
| T1 | 7 | 6(85.7) | 1(14.3) | 1.826 | 0.143 | 5(71.4) | 2(28.6) | 5.453 | 0.033 |
| T2 | 29 | 26(89.7) | 3(10.3) | | | 20(69.0) | 9(31.0) | | |
| T3 | 34 | 30(88.2) | 4(11.8) | | | 10(29.4) | 24(70.6) | | |
| T4 | 10 | 9(90.0) | 1(10.0) | | | 2(20.0) | 8(80.0) | | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | | | |
| 阴性 | 37 | 33(89.2) | 4(10.8) | 1.236 | 0.274 | 23(62.2) | 14(37.8) | 7.943 | 0.012 |
| 阳性 | 43 | 38(88.4) | 5(11.6) | | | 14(32.6) | 29(67.4) | | |
| 分化程度 | | | | | | | | | |
| 高分化 | 31 | 15(48.4) | 16(51.6) | 1.382 | 0.587 | 21(67.7) | 10(32.3) | 10.766 | 0.017 |
| 中分化 | 16 | 7(43.8) | 9(56.2) | | | 9(56.3) | 7(43.7) | | |
| 低分化 | 33 | 17(51.5) | 16(48.5) | | | 14(42.4) | 19(57.6) | | |
| 病理分期 | | | | | | | | | |
| I 期 | 27 | 13(48.1) | 14(51.9) | 2.455 | 0.833 | 18(66.7) | 9(33.3) | 12.343 | 0.002 |
| II 期 | 29 | 15(51.7) | 14(48.3) | | | 15(51.7) | 14(48.3) | | |
| III 期 | 24 | 13(54.2) | 11(45.8) | | | 7(29.2) | 17(70.8) | | |

3 讨论

近年来,免疫检测点抑制剂的使用逐渐成为肿瘤治疗的一个热点,其带来的研究成果给无数中晚期癌症患者带来的新的希望^[9-10]。这其中以 PD-1 及 PD-L1 信号通路为靶点的免疫治疗最受关注^[11]。PD-1 是免疫球蛋白 CD28 超家族的一员,具有在 T 细胞外周效应器活化阶段抑制 T 细胞免疫检查点的功能,从而可引起表达 PD-1 和 PD-L1 的细胞产生免疫耐受^[12]。PD-1 可表达于 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等免疫细胞,其在静止状态的 T 细胞不表达,只在 T 细胞被激活时才诱导表达^[13]。PD-1 的配体有 PD-L1 和 PD-L2 两种,其中 PD-L1 是 PD-1 的主要配体。PD-L1 属于穿膜型蛋白,可在炎症介质的刺激下诱导并表达于多种细胞。许多肿瘤细胞可高表达 PD-L1 蛋白。肿瘤细胞中 PD-L1 分子的表达上调能够促使肿瘤的浸润和转移,且能够使肿瘤细胞逃避 CD8 阳性 T 细胞的杀伤,从而达到逃避机体免疫监视的目的^[14]。近年来国内外许多相关研究表明,PD-1/PD-L1 信号通路可能通过诱导 T 细胞外周耐受、凋亡、功能衰竭以及抑制 T 细胞增殖、共刺激信号失衡等诸多方面来发挥肿瘤细胞的免疫逃逸作用^[15]。

目前相关研究表明 PD-1 和 PD-L1 在多种恶性肿瘤中均有高表达,例如乳腺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、肾癌、淋巴瘤等肿瘤均可检测到其异常表

达^[16-18],但针对 PD-1 和 PD-L1 信号通路在结直肠癌中的表达及其相关调控机制的研究较为少见。有研究表明,正常的结肠上皮细胞可检测到 PD-1 和 PD-L1 的 mRNA,但不能检测到其细胞表达 PD-1 和 PD-L1 蛋白。另有一些报道表明,直肠癌组织中 PD-L1 相对于癌旁组织有更高的阳性表达率^[19-20]。在本研究中,笔者通过免疫组化检测发现结直肠癌组织中 PD-1 蛋白表达阳性率仅为 11.2%,而 PD-L1 的表达阳性率达到 53.8%,提示结直肠癌组织中 PD-L1 的阳性表达与 PD-1 表达的缺失存在明显关联。对于 PD-1 低表达的原因,笔者推测 PD-1 可能更多的表达于相关淋巴细胞而不是肿瘤细胞本身。同时笔者发现 PD-1 蛋白在不同临床病理特征患者间的表达差异均无统计学意义,其原因亦考虑与 PD-1 主要表达于淋巴细胞有关。相反,PD-L1 蛋白的表达在是否淋巴结转移、不同临床病理分期、不同肿瘤 T 分期及不同肿瘤分化程度患者均有统计学差异,其原因可能是肿瘤微环境中 PD-L1 与淋巴细胞中表达的 PD-1 结合后抑制机体的免疫反应,从而导致肿瘤细胞可以维持 PD-L1 在体内高表达。同时 PD-L1 作为肿瘤细胞的保护因子,避免了肿瘤细胞被机体细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤^[21]。以上结果表明,PD-1/PD-L1 信号通路在结直肠癌发生、发展中可能起到重要作用,并提示 PD-L1 可能是结直肠癌预后的影响因子,其机制可能是结直肠癌组织中 PD-L1 通过调节免疫或肿瘤微环境,促使肿瘤浸润和转移的结果。

综上所述,结直肠癌的发生发展涉及多种因素及分子机制的共同作用,PD-L1 的高表达与患者的不良预后有关,有望成为结直肠癌免疫治疗的靶点和预后评估的指标,值得更进一步研究探索。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115 - 132.
- [2] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1350 - 1356.
- [3] Fisher KW, Lopez-Beltran A, Montironi R, et al. Precision medicine in colorectal cancer: evolving genomic landscape and emerging consensus [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(19): 2711 - 2719.
- [4] Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch repair deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2018, 372(26): 2509 - 2520.
- [5] Liu Y, Ma J, Yu K, et al. Expression of programmed cell death 1/programmed cell death ligand 1 in the tumor microenvironments of primary gastrointestinal diffuse large B cell lymphomas [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(4): 507 - 512.
- [6] Li L, Sun RF, Miao Y, et al. PD-1/PD-L1 expression and interaction by automated quantitative immunofluorescent analysis show adverse prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma having T-cell infiltration: a study from the International DLBCL Consortium Program [J]. *Mod Pathol*, 2019, 32(6): 741 - 754.
- [7] Shi YF, Deng LJ, Song YQ, et al. CD3⁺/CD8⁺ T-cell density and tumoral PD-L1 predict survival irrespective of rituximab treatment in Chinese diffuse large B-cell lymphoma patients [J]. *Int J Hematol*, 2018, 108(3): 254 - 266.
- [8] Hu LY, Xu XL, Rao HL, et al. Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study [J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 94.
- [9] Liu HB, Hu YS, Rimoldi R, et al. Epigenetic treatment-mediated modulation of PD-L1 predicts potential therapy resistance over response markers in myeloid malignancies: a molecular mechanism involving effectors of PD-L1 reverse signaling [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(2): 2543 - 2550.
- [10] Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents [J]. *Leukemia*, 2014, 28(6): 1280 - 1288.
- [11] Morales-Betanzos CA, Lee H, Gonzalez-Ericsson PI, et al. WITHDRAWN: Quantitative mass spectrometry analysis of PD-L1 protein expression, N-glycosylation and expression stoichiometry with PD-1 and PD-L2 in human melanoma [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(10): 1705 - 1707.
- [12] Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 561.
- [13] Chang A, Schlafer D, Flowers CR, et al. Investigational PD-1 inhibitors in HL and NHL and biomarkers for predictors of response and outcome [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(1): 55 - 70.
- [14] Villasboas JC, Ansell S. Checkpoint inhibition: programmed cell death 1 and programmed cell death 1 ligand inhibitors in Hodgkin lymphoma [J]. *Cancer J*, 2016, 22(1): 17 - 22.
- [15] 邢玉斐, 潘雪, 钱斌, 等. 晚期非小细胞肺癌患者外周血 PD-1 和 PD-L1 分子的表达及其意义 [J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(2): 111 - 114.
- [16] Sakai H, Takeda M, Sakai K, et al. Impact of cytotoxic chemotherapy on PD-L1 expression in patients with non-small cell lung cancer negative for EGFR mutation and ALK fusion [J]. *Lung Cancer*, 2019, 127: 59 - 65.
- [17] Luo WX, Wang ZF, Tian PW, et al. Safety and tolerability of PD-1/PD-L1 inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(10): 1851 - 1859.
- [18] Saito H, Shimizu S, Kono Y, et al. PD-1 expression on circulating CD8⁺ T-cells as a prognostic marker for patients with gastric cancer [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(1): 443 - 448.
- [19] Yoneshima Y, Ijichi K, Anai S, et al. PD-L1 expression in lung adenocarcinoma harboring EGFR mutations or ALK rearrangements [J]. *Lung Cancer*, 2018, 118: 36 - 40.
- [20] Inaguma S, Lasota J, Wang ZF, et al. Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas [J]. *Mod Pathol*, 2017, 30(2): 278 - 285.
- [21] Chen LP, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3384 - 3391.

收稿日期: 2019-01-27 修回日期: 2019-03-02 编辑: 王国品