

PD-1、PD-L1 在喉癌中的表达及临床意义*

张再兴,周尚清

(华北理工大学附属医院耳鼻咽喉科,河北唐山 063000)

[摘要] **目的** 探讨程序性死亡因子 1(PD-1)和 PD 配体 1(PD-L1)与喉癌患者临床病理特征的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 PD-1 和 PD-L1 在 45 份喉癌组织(喉癌组)及 37 份声带息肉组织(息肉组)中的表达情况,分析 PD-1 和 PD-L1 与喉癌患者临床病理特征的关系。**结果** 喉癌组中 PD-1、PD-L1 的阳性表达率分别为 57.78%、66.67%,PD-1、PD-L1 表达主要定位于肿瘤细胞或肿瘤间质淋巴细胞的细胞膜或细胞质;息肉组中 PD-1、PD-L1 的阳性表达率分别为 8.11%、13.51%。喉癌组 PD-1、PD-L1 阳性表达率明显高于息肉组($P<0.01$)。PD-1 与 PD-L1 在喉癌组织中的表达有相关性。PD-1、PD-L1 在Ⅲ、Ⅳ期喉癌组织的阳性表达率明显高于Ⅰ、Ⅱ期($P<0.05$)。PD-1、PD-L1 在高分化喉癌组织的阳性表达率明显高于中、低分化的阳性表达率($P<0.05$)。**结论** PD-1 与 PD-L1 在喉癌发生、发展过程中发挥重要作用,两种蛋白的表达与喉癌的临床分期及分化程度密切相关。

[关键词] 喉肿瘤;程序性死亡因子 1;程序性死亡因子配体 1;免疫组织化学

[中图分类号] R767.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)05-0635-03

Expression of PD-1 and PD-L1 in laryngeal carcinoma and its clinical significance*

ZHANG Zaixing, ZHOU Shangqing

(Department of Otorhinolaryngology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between programmed death 1(PD-1) and programmed death ligand 1(PD-L1) with clinicopathological characteristics in the patients with laryngeal carcinoma. **Methods** The expression levels of PD-1 and PD-L1 in 45 samples of laryngeal carcinoma tissue(laryngeal carcinoma group) and 37 samples of vocal cord polyp tissues(polyp group) were detected by using the immunohistochemical method. Then the relationship between PD-1 and PD-L1 with clinicopathological characteristics in the patients with laryngeal carcinoma was analyzed. **Results** The positive expression rates of PD-1 and PD-L1 in the laryngeal carcinoma group were 57.78% and 66.67% respectively. PD-1, PD-L1 mainly located in cytoplasm or cell membrane of laryngeal carcinoma cells or interstitial lymphocyte. The positive expression rates of PD-1 and PD-L1 in the polyp group were 8.11% and 13.51% respectively. The positive expression rates of PD-1 and PD-L1 in the laryngeal carcinoma group were significantly higher than those in the polyp group($P<0.01$). The expression of PD-1 and PD-L1 in laryngeal carcinoma tissue had a correlation. The positive expression rates of PD-1 and PD-L1 in the laryngeal carcinoma tissue of stage Ⅲ and Ⅳ were significantly higher than those of stage Ⅰ and Ⅱ ($P<0.05$). The positive expression rates of PD-1 and PD-L1 in highly differentiated laryngeal carcinoma tissue were significantly higher than those in moderately and lowly differentiated carcinoma tissue($P<0.05$). **Conclusion** PD-1 and PD-L1 play an important role in the occurrence and development of laryngeal carcinoma. The expression of PD-1 and PD-L1 is closely correlated to the clinical stage and differentiation degree of laryngeal carcinoma.

[Key words] laryngeal neoplasms; programmed death 1; programmed death ligand 1; immunohistochemistry

近年来程序性死亡因子 1(programmed death 1, PD-1)与 PD 配体 1(PD ligand 1, PD-L1)在恶性肿瘤中的高表达逐渐引起研究者的关注。PD-1 是一种位于淋巴细胞表面的受体蛋白,主要位于 T 细胞表面,具有负向调节 T 细胞活性的功能^[1]。PD-L1 属于 B7 家族的成员之一,可以在活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及其他免疫细胞表面广泛表达。PD-1 与其配体结合后,使下游的脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)和磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)发生去磷酸化,从而传递抑制性信号,发挥负性调节作用^[2-4]。近年来,以 PD-1 及其配体为靶点的免疫治疗显示出了较好的疗效,给晚期肺癌的治疗带来了新的希望^[5]。本研究拟通过免疫组织化学(IHC)方法检测 PD-1、PD-L1 在喉癌及声带息肉组织中的表达情况,并分析两种蛋白与喉癌患者临床

病理特征的关系,以期探讨喉癌发生、发展的可能机制,为进一步认识肿瘤免疫机制和肿瘤的免疫治疗提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院耳鼻咽喉头颈外科行手术治疗并病理证实的初治喉癌患者手术切除组织标本 45 份(喉癌组),所有病例术前均未接受放疗及化疗,另选同期收治的声带息肉组织 37 份作为对照(息肉组)。所有标本均经 4%多聚甲醛固定,自动脱水机脱水,石蜡包埋,以 4 μm 厚度组织切片,备用。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 主要实验试剂:PD-1 兔抗人单克隆抗体 ab137132、PD-L1 兔抗人单克隆抗体 ab205921 购自英国 ABCAM 公司。喉癌及声带息肉组织中 PD-1、PD-L1 蛋白免疫组织化学染色:喉癌组织石蜡切片 60℃干烤 4 h 后,常规脱蜡至

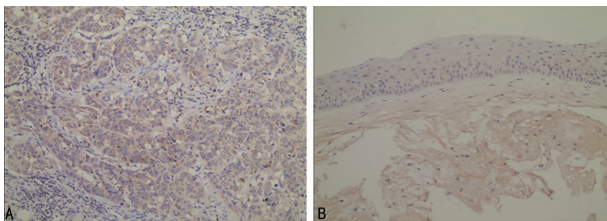
水,3%过氧化氢浸泡 10 min 灭活内源性过氧化物酶,然后加入 10 mmol/L pH 6.0 枸橼酸钠缓冲液 100 °C 煮沸 10 min,进行抗原修复。室温自然冷却 30 min 后加入正常马血清室温下封闭 20 min,加入一抗兔抗人 PD-1、PD-L1 单克隆抗体,按 1:100 稀释,4 °C 过夜,PBS 洗 3 次后加入生物素化二抗室温 30 min,PBS 洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素室温下 30 min,PBS 洗 3 次,DAB 显色,苏木精复染,脱水透明,中性树胶封片后光镜下观察。声带息肉组织石蜡切片处理方法与喉癌组织相同。

1.2.2 结果判定 PD-1 和 PD-L1 在组织中阳性显色评定标准为在细胞膜或细胞质中出现淡黄色至棕褐色颗粒。最终判定 PD-1 和 PD-L1 表达结果需结合组织切片的染色强度和阳性细胞百分比来评定阳性表达。染色强度评分如下^[2]:细胞膜或细胞质出现淡黄色颗粒为弱染色记 1 分,出现棕黄色颗粒为中等染色记 2 分,出现棕褐色颗粒为强染色记 3 分。随机选择 5 个高倍视野,每个视野 100 个肿瘤细胞或间质细胞中 PD-1 或 PD-L1 阳性显色强度大于或等于 2 分的、细胞数目大于或等于 5% 时,或者阳性显色强度与阳性细胞数目二者相乘结果大于或等于 10% 时,则判定为该组织切片 PD-1 或 PD-L1 阳性表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,PD-1 与 PD-L1 二者之间表达相关性比较及其与临床病理特征关系分析采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组组织中 PD-1 的表达比较 喉癌组中 PD-1 的阳性率为 57.78%(26/45),光镜下可见肿瘤细胞或肿瘤间质细胞的细胞膜或细胞质出现淡黄色至棕褐色颗粒;肿瘤细胞阳性率为 37.78%(17/45),间质细胞阳性率为 51.11%(23/45)。息肉组中 PD-1 阳性率为 8.11%(3/37)。PD-1 在喉癌组中阳性率明显高于息肉组($\chi^2 = 19.80, P < 0.01$),见图 1。



A:喉癌组织;B:声带息肉组织

图 1 PD-1 在两组组织中表达(IHC×200)

2.2 两组组织中 PD-L1 的表达比较 喉癌组 PD-L1 的阳性率为 66.67%(30/45),光镜下可见肿瘤细胞或间质细胞的细胞膜或细胞质出现淡黄色至棕褐色颗粒;肿瘤细胞阳性率为 48.89%(22/45),间质细胞阳性率为 42.22%(19/45)。息肉组中 PD-L1 阳性率为 13.51%(5/37)。PD-L1 在喉癌组中阳性率明显高于息肉组($\chi^2 = 21.33, P < 0.01$)。

表 1 喉癌组织中 PD-1 与 PD-L1 表达的相关性

PD-1	n	PD-L1		χ^2	P
		+	-		
+	26	23	3	10.94	<0.01
-	19	7	12		

2.3 PD-1、PD-L1 在喉癌组织中表达的相关性 45 份喉癌组织有 26 例被判定为 PD-1 阳性表达,30 例被判定为 PD-L1 阳性表达,26 例 PD-1 阳性表达的喉癌组织有 23 例 PD-L1 为阳

性表达,3 例阴性表达,19 例 PD-1 阴性表达的喉癌组织有 7 例 PD-L1 为阳性表达,12 例阴性表达。PD-1、PD-L1 在喉癌组织的阳性表达呈正相关($P < 0.01$),见表 1。

2.4 PD-1 及 PD-L1 在喉癌组织中的表达与临床病理特征的相关性 PD-1、PD-L1 在喉癌组织中的表达与临床分期和分化程度密切相关($P < 0.05$),但与患者年龄、性别、发生部位无关($P > 0.05$),见表 2。

表 2 喉癌组织中 PD-1 及 PD-L1 表达与临床病理特征的关系(n)

项目	n	PD-1		χ^2	P	PD-L1		χ^2	P
		+	-			+	-		
年龄(岁)				0.390	0.532			0.046	0.831
≥61	19	12	7			13	6		
<61	26	14	12			17	9		
性别				0.003	0.954			0.207	0.649
男	31	18	13			20	11		
女	14	8	6			10	4		
临床分期				6.253	0.012			6.429	0.011
I+II	21	8	13			10	11		
III+IV	24	18	6			20	4		
肿瘤部位				1.910	0.167			2.179	0.140
声门上型	22	15	7			17	5		
声门型	23	11	12			13	10		
分化程度				0.177	0.006			7.810	0.020
高分化	16	13	3			14	2		
中分化	16	10	6			11	5		
低分化	13	3	10			5	8		

3 讨论

PD-1 具有抑制机体免疫系统的功能,属于 I 型跨膜蛋白。PD-1 有两种结合配体,分别为 PD-L1 和 PD-L2。PD-L2 主要表达在活化的树突状细胞、巨噬细胞上,其表达较为局限。PD-L1 可以在活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及其他免疫细胞表面广泛表达,因此 PD-L1 在体内的作用要远远超过 PD-L2^[6]。研究发现, γ -干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-4、IL-10 和粒细胞刺激因子等多种细胞因子可以上调 PD-L1 的表达^[7]。目前已有研究发现 PD-1、PD-L1 在胃癌、乳腺癌、肾细胞癌、肝癌、口腔鳞癌等肿瘤中表达率明显增高,部分与 TNM 分期及预后密切相关^[8-11]。肿瘤微环境中 PD-L1 与 PD-1 结合后抑制机体的免疫反应,从而肿瘤细胞和其他细胞可以维持 PD-L1 在机体内较高水平的表达。PD-L1 也可以作为保护肿瘤细胞的分子,可以避免肿瘤细胞被细胞毒性 T 淋巴细胞分解、破坏^[12]。在肿瘤微环境中可能采用上调 PD-L1 在肿瘤细胞中的表达作为一种抑制宿主的免疫反应的方式,由此来逃脱免疫系统对肿瘤细胞的攻击。PD-1 与癌症的预后关系并无明确的实验证实,但是,值得注意的是 KIM 等^[13]发现 PD-1 在肺癌的肿瘤浸润性淋巴细胞的阳性表达率明显增高,且 PD-1 的表达与预后有关。已有文献证实 PD-L1 在乳腺癌、胃癌的表达与患者的预后不良密切相关^[14-15]。

本实验研究发现喉癌组 PD-1、PD-L1 表达均高于息肉组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。因此,可以考虑检测 PD-1、PD-L1 的表达,这将对于诊断喉癌具有辅助作用。本实验研究发现 PD-1 表达的肿瘤细胞及淋巴细胞区域 PD-L1 也多同样高表达,因此 PD-1 在喉癌组织中表达情况与 PD-L1 表达情况密切相关。通过对比喉癌的临床病理特征及 PD-1、PD-L1 在

喉癌组织中的表达情况,发现 PD-1、PD-L1 在喉癌中的表达情况与喉癌的临床分期与组织分化程度密切相关。Ⅲ、Ⅳ期喉癌组织 PD-1、PD-L1 的阳性表达率明显高于 I、Ⅱ期($P < 0.05$),由此可以考虑随着肿瘤临床分期增高 PD-1、PD-L1 的阳性表达率也明显增高,这与文献报道基本相符^[4,15]。高、中、低分化喉癌组织 PD-1、PD-L1 的阳性表达率有逐渐降低的趋势,且三者间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),表明肿瘤的分化程度与 PD-1、PD-L1 的表达密切相关。

综上所述,PD-1 与 PD-L1 可能在喉癌的发生、发展过程中发挥重要作用,两种蛋白表达与喉癌的临床分期及分化程度密切相关。有关 PD-1/PD-L1 分子通路在喉癌中的作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] YANG W, SONG Y, LU Y L, et al. Increased expression of programmed death(PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia[J]. Immunology, 2013, 139(4): 513-522.
- [2] RUSAK M, ELJASZEWICZ A, BOLKUN L, et al. Prognostic significance of PD-1 expression on peripheral blood CD4⁺ T cells in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia[J]. Pol Arch Med Wewn, 2015, 125(7/8): 553-559.
- [3] ZHANG L, DU H, XIAO T W, et al. Prognostic value of PD-1 and TIM-3 on CD3⁺ T cells from diffuse large B-cell lymphoma[J]. Biomed Pharmacother, 2015, 75(10): 83-87.
- [4] TAMURA T, OHIRA M, TANAKA H, et al. Programmed death-1 ligand-1 (PDL1) expression is associated with the prognosis of patients with stage II/III gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2015, 35(10): 5369-5376.
- [5] ANAGNOSTOU V K, BRAHMER J R. Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(5): 976-984.
- [6] TAUBE J M, KLEIN A, BRAHMER J R, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(19): 5064-5074.
- [7] ACHLEITNER A, CLARK M E, BIENZLE D. T-regula-

tory cells infected with feline immunodeficiency virus up-regulate programmed death-1 (PD-1) [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2011, 143(3/4): 307-313.

- [8] MUENST S, SOYSAL S D, GAO F, et al. The presence of programmed death 1(PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 139(3): 667-676.
- [9] SHIN S J, JEON Y K, CHO Y M, et al. The association between PD-L1 expression and the clinical outcomes to vascular endothelial growth factor-targeted therapy in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma[J]. Oncologist, 2015, 20(11): 1253-1260.
- [10] MALASPINA T S, GASPAROTO T H, COSTA M R, et al. Enhanced programmed death 1(PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2011, 60(7): 965-974.
- [11] BAYRAM S, AKKIZ H, ÜLGER Y, et al. Lack of an association of programmed cell death-1 PD1. 3 polymorphism with risk of hepatocellular carcinoma susceptibility in Turkish population: a case-control study [J]. Gene, 2012, 511(2): 308-313.
- [12] CHEN L, HAN X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future[J]. J Clin Invest, 2015, 125(9): 3384-3391.
- [13] KIM M Y, KOH J, KIM S, et al. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers [J]. Lung Cancer, 2015, 88(1): 24-33.
- [14] MUENST S, SCHAEERLI A R, GAO F, et al. Expression of programmed death ligand 1(PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 146(1): 15-24.
- [15] QING Y, LI Q, REN T, et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer[J]. Drug Des Dev Ther, 2015, 9(9): 901-909.

(收稿日期: 2017-06-22 修回日期: 2017-09-26)

(上接第 634 页)

- kinase pathways in ovarian granulosa cells by the novel growth factor type 1 follicle-stimulating hormone receptor. Role in hormone signaling and cell proliferation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(36): 27615-27626.
- [9] 唐文豪, 姜辉, 马潞林, 等. 非梗阻性无精子症患者睾丸体积、生殖激素水平与睾丸穿刺取精结果的相关性研究[J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(1): 48-51.
 - [10] TSUJIMURA A, MATSUMIYA K, YASUSHI M, et al. Prediction of successful outcome of microdissection testicular sperm extraction in men with idiopathic nonobstructive azoospermia[J]. J Urol, 2004, 172(5 Pt 1): 1944-1947.

- [11] CHRISTMAN M S, GUDEMAN S R, NORK J J, et al. Operating characteristics of follicle-stimulating hormone in azoospermic men[J]. Fertil Steril, 2014, 101(5): 1261-1265.
- [12] 邓永键, 经芳艳, 周娜, 等. 结合血清卵泡刺激素、抑制素 B、染色体核型和 Y 染色体 AZF 基因微缺失与睾丸穿刺取精术成功率的相关性[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(10): 1469-1474.
- [13] 张贤生, 高晶晶, 杨佳佳, 等. 睾丸组织 Johnsen 评分对非梗阻性无精子症患者取精成功率的预测[J]. 中国男科学杂志, 2013, 27(1): 23-26.

(收稿日期: 2017-06-22 修回日期: 2017-09-02)