

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.01.013

## PD-L1 在人胶质瘤中的表达及其对肿瘤内浸润性 T 细胞凋亡的影响\*

李巧转<sup>1</sup>, 李 娴<sup>2△</sup>

(1. 解放军第 101 医院病理科, 江苏无锡 214044; 2. 重庆医科大学病理教研室 400016)

**[摘要]** **目的** 探讨程序性死亡-配体 1(PD-L1)在人胶质瘤组织中的表达及其对肿瘤内浸润性 T 细胞凋亡的影响。**方法** 对 2007—2011 年解放军第 101 医院收治的 80 例胶质瘤患者肿瘤组织及 18 例正常脑组织进行 PD-L1 免疫组织化学方法检测,同时检测程序性死亡受体-1(PD-1)在胶质瘤浸润性 T 淋巴细胞的表达,进行相关性分析,TUNEL 法检测胶质瘤内浸润性淋巴细胞的凋亡,应用流式细胞术分析 PD-L1 促进胶质瘤患者外周血中活化 T 细胞的凋亡情况。**结果** 正常脑组织不表达 PD-L1,PD-L1 在胶质瘤中的阳性表达率为 42.50%(34/80),与胶质瘤病理分级、坏死和预后相关( $P<0.05$ )。部分胶质瘤组织及浸润 T 淋巴细胞表达 PD-1,且 PD-L1 阳性的胶质瘤病例淋巴细胞凋亡表达较 PD-L1 阴性病例明显增高。PD-L1 组患者外周血活化 T 细胞的凋亡率为 42.55%明显高于空白对照组,加入抗 PD-1 阻断 PD-L1 与 T 淋巴细胞结合后,PD-L1+抗 PD-1 组活化 T 淋巴细胞凋亡率下降到 26.80%。**结论** 人胶质瘤异常高表达 PD-L1 并与 PD-1 结合促进淋巴细胞的凋亡。

**[关键词]** 神经胶质瘤;细胞凋亡;程序性死亡受体-1;程序性死亡-配体 1

**[中图分类号]** R739.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)01-0037-03

## Expression of programmed death ligand-1 in human glioma and its influence to intratumor infiltrating T lymphocyte apoptosis\*

LI Qiaozhuan<sup>1</sup>, LI Xian<sup>2△</sup>

(1. Department of Pathology, 101 Hospital of PLA, Wuxi, Jiangsu 214044, China; 2. Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of programmed death ligand-1(PD-L1) in glioma and its influence to intratumor infiltrating T lymphocyte apoptosis. **Methods** PD-L1 in 18 cases of normal brain tissues and 80 cases of glioma tissues treated in this hospital during 2007 to 2011 was determined by immunohistochemistry staining, meanwhile the PD-L1 expression in glioma infiltrating T lymphocyte was determined. The correlation analysis was performed. The apoptosis of intratumor infiltrating lymphocytes was examined by TUNEL assay; the peripheral blood activated T lymphocyte apoptosis promoted by PD-L1 was analyzed by flow cytometry. **Results** No expression of PD-L1 in normal brain tissues was observed, but the positive expression rate in glioma was 42.50%(34/80), which was correlated with pathological grade, necrosis and prognosis( $P<0.05$ ). PD-1 was expressed in part of tumor infiltrating T lymphocytes and glioma tissues, moreover the lymphocyte apoptosis expression in the cases of PD-L1 positive glioma was significantly increased compared with that in the cases of PD-L1 negative glioma. The apoptosis rate of activated T lymphocytes was 42.55% respectively, which was significantly higher than that in the blank group; however, adding anti-PD-1 for blocking the combining of PD-L1 with T lymphocyte, the lymphocytes apoptotic rate in the PD-L1+ anti-PD-1 group was dropped to 26.80%. **Conclusion** PD-L1 has aberrantly high expression in human glioma and is combined with PD-1 to promote the apoptosis of lymphocyte.

**[Key words]** glioma; apoptosis; PD-1; PD-L1

胶质瘤是十分常见的中枢神经系统肿瘤,恶性度高,患者生存率低。程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)是免疫球蛋白家族的一种膜蛋白,在继发感染中对免疫介导的组织损伤有重要的保护作用,它包含程序性死亡-配体 1(PD-L1)和程序性死亡-配体 2(PD-L2)两种抑制性配体。研究表明,PD-L1 在非小细胞肺癌、卵巢癌、肾细胞癌等众多肿瘤高表达<sup>[1-3]</sup>。本实验采用免疫组织化学法观察 PD-1/PD-L1 在人胶质瘤组织中的表达,分析其与临床病理特征相关性。TUNEL 法检测胶质瘤内浸润性淋巴细胞的凋亡,流式细胞术分析 PD-L1 促进胶质瘤患者外周血中活化 T 细胞的凋亡情况,为胶质瘤免疫治疗提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 正常脑组织 18 例选自脑外伤出血患者,胶质瘤组织 80 例均取自解放军第 101 医院病理科 2007—2011

年的病理标本,术前未经化疗、放疗与激素治疗,病理诊断明确且有完整的临床病理资料,均取得知情同意。其中男 45 例,女 35 例,年龄 6~75 岁,平均(47.5±5.4)岁。根据 WHO 中枢神经系统肿瘤分型(2011 年版)进行分级,Ⅰ级 3 例,Ⅱ级 24 例,Ⅲ级 20 例,Ⅳ级 33 例。病例资料的随访通过电话和户籍查访两种方法进行,随访时间大于或等于 60 个月,随访成功 54 例(67.5%)。胶质瘤患者外周血选取术后确诊在院的胶质瘤Ⅳ级患者(因Ⅳ级患者 PD-L1 的表达率高),均取得患者及家属同意。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂** 一抗 PD-1(克隆号 UMAB199),PD-L1(克隆号 UMAB228),PD-L2(克隆号 UMAB223),CD3(克隆号 UMAB54)和二抗检测试剂 PV8000 均购自无锡微锐东源生物科技有限公司。

**1.2.2 免疫组织化学方法** 采用的 10% 中性甲醛固定石蜡包埋组织, 4  $\mu\text{m}$  脱蜡水化组织切片, 热修复后磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤, 放置  $\text{H}_2\text{O}_2$  中孵育 15 min, 滴加一抗孵育过夜 (4  $^\circ\text{C}$ ), 二抗室温孵育 30 min 后经二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木精复染。免疫组织化学结果判断: (1) 首先用光学显微镜进行观察, PD-L1、PD-1 主要定位于胶质瘤细胞质或细胞膜, 阳性染色为细胞质出现黄色或者褐色颗粒, 呈弥漫性分布; (2) 在 400 倍视野下, 避开出血和坏死区域, 选取具有代表性的肿瘤区域, 随机选择 10 个视野, 计数 500~1 000 个细胞, 计算每个病例的肿瘤细胞阳性率; (3) 肿瘤细胞阳性率评分: <1% 为 0 分; 1%~<10% 为 1 分; 10%~<50% 为 2 分; 50%~<75% 为 3 分;  $\geq 75\%$  为 4 分; (4) 同时根据染色强度进行记分: 无染色 0 分; 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分; (5) 最后根据肿瘤细胞阳性率和染色程度进行评分相加: 0~3 分为低表达, 4~7 分为高表达。

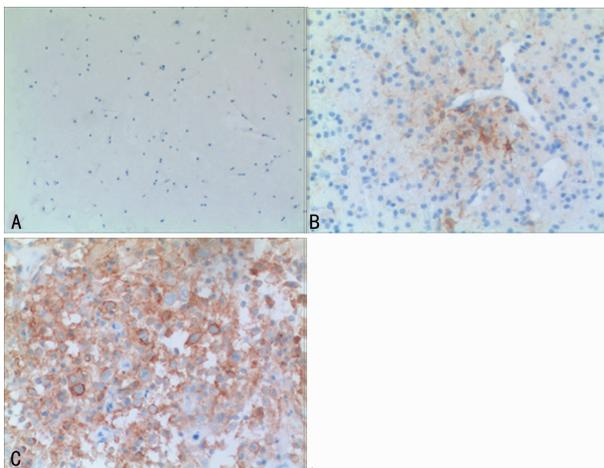
**1.2.3 TUNEL 法检测淋巴细胞凋亡** 切片脱蜡并经抗原修复及 PBS 洗涤后  $\text{H}_2\text{O}_2$  中孵育 20 min, 清洗后滴加 50  $\mu\text{L}$  末端脱氧核糖核酸转移酶 (TdT) 反应液常温孵育 1 h, 洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素 (Streptavidin-HRP) 避光孵育 25 min, DAB 显色苏木素复染封片, 阴性对照以 PBS 代替 TdT。

**1.2.4 流式细胞术检测淋巴细胞凋亡** 分别收集 5 例健康和胶质瘤 IV 级患者的抗凝新鲜外周血, 梯度离心提取单个核细胞后经尼龙毛获得 T 淋巴细胞。经过聚羟基脂肪酸酯 (PHA) 活化的 T 细胞接种于 24 孔板, 每孔 500  $\mu\text{L} \times 10^6$  个/mL, 培养 24 h 后分为空白组 (加入 PBS)、拮抗组 (抗 PD-1 + PD-L1) 和实验组 (加 PD-L1) 共培养 48 h, 收集 T 细胞, 经异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白 V (Annexin V-FITC) 避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用 *t* 检验; 计数资料用率表示, 比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学检测 PD-L1 在胶质瘤组织中蛋白表达** 结果显示: PD-L1 主要定位在肿瘤细胞的细胞质或细胞膜, 呈棕黄色着色 PD-L1 在人正常胶质细胞不表达, 在部分胶质瘤中阳性表达 42.50% (34/80), 见图 1。



A: 正常神经胶质细胞不表达 PD-L1; B: 胶质瘤低表达 PD-L1; C: 胶质瘤高表达 PD-L1

图 1 免疫组织化学检测 PD-L1 在正常胶质细胞、胶质瘤组织的低表达及高表达 ( $\times 200$ )

**2.2 PD-L1 与胶质瘤临床病理因素之间的相关性分析** 实验对胶质瘤 PD-L1 的表达与肿瘤位置、大小、有无坏死及临床病理分期及年龄等进行相关性分析, 结果显示, 病理分级越高, PD-L1 的表达水平越高 ( $P < 0.01$ ); PD-L1 表达与和胶质瘤分级相关的坏死有关, 而与患者的年龄、性别、肿瘤位置、大小无关, 见表 1、2。

表 1 PD-L1 在 80 例胶质瘤组织中的表达与临床病理特征 (n)

项目	n	PD-L1 表达		P
		低表达	高表达	
年龄				0.653
$\leq 45$ 岁	29	9	2	
$> 45$ 岁	51	17	6	
性别				0.095
女	35	11	3	
男	45	15	5	
肿瘤部位				0.741
额部	29	10	2	
顶叶	12	0	1	
枕叶	7	2	0	
颞部	14	4	2	
其他	18	10	3	
肿瘤直径				0.097
$\leq 4$ cm	19	7	2	
$> 4$ cm	61	19	6	
坏死				0.001
无	49	6	1	
有	31	20	7	
WHO 分级				0.000
II	24	2	0	
III	20	7	2	
IV	33	17	6	

表 2 80 例胶质瘤患者在不同影响因素下 PD-L1 表达可信区间分析

项目	危险比	95% CI	P
年龄	0.896	0.485~1.957	0.768
性别	0.624	0.252~1.577	0.314
肿瘤位置	0.835	0.610~1.017	0.550
肿瘤直径	1.242	0.641~3.086	0.216
有无坏死	0.421	0.295~0.703	0.001
WHO 分级	0.409	0.264~0.749	0.000
PD-L1 表达	0.383	0.187~0.729	0.005

**2.3 PD-L1 的表达与患者的预后关系** 按照材料与方法中的分类说明, 将 PD-L1 在胶质瘤中的表达分为低表达组 (评分 0~3 分) 和高表达组 (评分 4~7 分)。进行 Kaplan-Meier 生存

分析发现:PD-L1 低表达组患者 5 年生存率明显高于 PD-L1 高表达组的患者( $P < 0.05$ ),见表 3、图 2。

表 3 54 例胶质瘤随访成功患者 PD-L1 表达 5 年生存率

PD-L1 表达	n	5 年存活率	P
不表达	31	61.3%	0.173
低表达	18	55.6%	0.149
高表达	5	20.0%	0.014

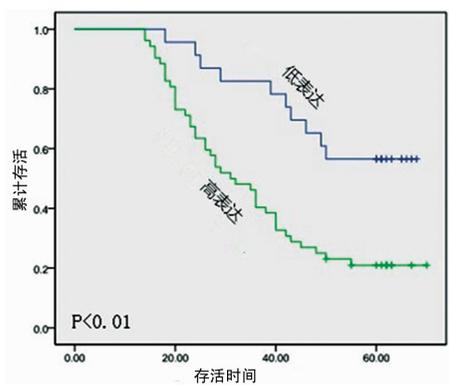


图 2 PD-L1 在胶质瘤组织中 Kaplan-Meier 生存曲线分析结果

2.4 胶质瘤局部浸润的淋巴细胞表达 PD-1 并出现凋亡 免疫组织化学染色显示胶质瘤 IV 级瘤组织内浸润的部分淋巴细胞表达 PD-1。TUNEL 法检测结果显示 PD-L1 强阳性的病例中胶质瘤组织内浸润的淋巴细胞出现凋亡,然而 PD-L1 阴性的胶质瘤病例瘤组织内淋巴细胞凋亡数少,见图 3。

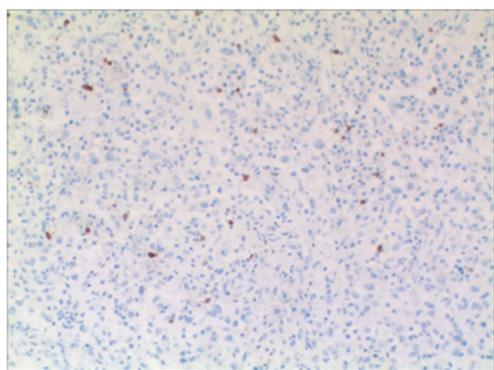


图 3 免疫组织化学检测胶质瘤 IV 级局部浸润淋巴细胞出现凋亡(TUNEL×200)

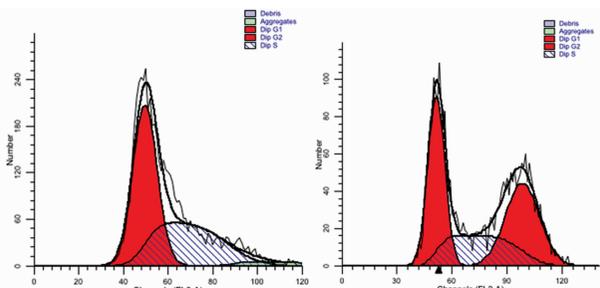


图 4 PD-L1 对外周血活化 T 细胞凋亡的影响

2.5 PD-L1 对患者外周血活化 T 细胞凋亡的影响 流式细胞结果显示重组人 PD-L1 与健康或胶质瘤患者外周血活化的 T 细胞共培养后,重组人 PD-L1 组的凋亡率为 42.55%,明显

高于空白对照组,加入抗 PD-1 阻断 PD-L1 与 T 淋巴细胞结合后,PD-L1+抗 PD-1 组 T 淋巴细胞凋亡率下降至 26.80%,见图 4。

### 3 讨论

恶性胶质瘤患者复发率高、预后较差,迄今为止,胶质瘤局部微环境调节其侵袭性、增殖、凋亡等生物学异常行为的具体分子机制仍不清楚<sup>[4]</sup>。因此,阐明恶性胶质瘤细胞凋亡发生的分子机制,对胶质瘤的治疗及其预后有着重要的意义。

研究发现 PD-L1 可以独立作为胰腺癌患者预后评价的指标;同时在胃癌患者,高表达 PD-L1 患者临床分期晚,病理分化差<sup>[5-6]</sup>,PD-L1 高表达病例其肿瘤扩散指数 ki-67 表达也上调,肿瘤细胞培养中运用阻断剂下调 PD-L1 后肿瘤细胞的转移与复发也程相对静止状态<sup>[7-8]</sup>。在非小细胞肺癌中,PD-L1 在肿瘤细胞及肿瘤间质与淋巴细胞表达成正相关,也与临床分期及预后呈正相关<sup>[9]</sup>。这都提示阻断 PD-L1 可能是肿瘤免疫治疗的有效手段。本研究检测了 80 例胶质瘤石蜡切片中 PD-L1 的表达,结果发现胶质瘤各级别之间 PD-L1 的表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),PD-L1 的表达随胶质瘤级别的增高而增高,进一步的随访显示胶质瘤高表达 PD-L1 的患者 5 年生存率较低<sup>[10-11]</sup>。

在机体的免疫应答过程中,T 细胞是适应性免疫的生发中心。T 细胞在静息状态下低表达 PD-1,而 T 细胞的激活引起 PD-1 的表达上调。本研究表明胶质瘤中浸润性淋巴细胞部分表达 PD-1,同时 TUNEL 实验结果显示高表达 PD-L1 胶质瘤内浸润性淋巴细胞凋亡明显,流式细胞结果也显示 PD-L1+抗 PD-1 组 T 细胞的凋亡率明显下降,PD-L1 蛋白促进胶质瘤外周血活化 T 细胞的凋亡,这提示了胶质瘤高表达的 PD-L1 与淋巴细胞表达的 PD-1 结合促进淋巴细胞的凋亡,进而抑制抗肿瘤免疫功能。这可能与 T 细胞跨膜受体 PD-1 与配体 PD-L1 结合后,其碳端结构域磷酸化继而去磷酸化其下游因子磷脂酰 3 激酶和脾酪氨酸激酶,进而抑制 T 细胞活化,诱导 T 细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>有关。

综上所述,人胶质瘤组织异常高表达 PD-L1,且与病理分级和患者预后密切相关,PD-L1 与 PD-1 结合促进肿瘤内浸润的 T 淋巴细胞的凋亡,因此 PD-1/ PD-L1 信号通路有望成为胶质瘤免疫治疗的靶点之一。

### 参考文献

- [1] PADDAS K, RIESS J W, SCHWARTZ E J, et al. Diffuse high intensity PD-L1 staining in thymic epithelial tumors [J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(3): 500-508.
- [2] KATSUYA Y, FUJITA Y, HORINOUCHE H, et al. Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma [J]. Lung Cancer, 2015, 88(2): 154-159.
- [3] SCHULTHEIS A M, SCHEEL A H, OZRETIC L, et al. PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas [J]. Eur J Cancer, 2015, 51(3): 421-426.
- [4] YIN B J, LI Z Y, YU S B, et al. The roles of mTNF- $\alpha$  and sTNF- $\alpha$  in endotoxin shock [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2002.
- [5] GADIOT J, HOOIJKAAS A I, KAISER A D, et al. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma [J]. Cancer, 2011, 117(10): 2192-2201.
- [6] WANG L C, MA Q Y, CHEN X L, et al. (下转第 42 页)

本研究通过临床数据进一步证实了在胰腺炎急性期,患者血浆 Apelin-13 和 Apelin-36 水平显著升高,且胰腺炎症越重,血浆 Apelin-13 和 Apelin-36 水平升高越明显。血浆 CRP 水平作为评估 AP 严重程度及预后的指标被广泛认可,入院 48 h 内 CRP > 150 mg/dL 预测 SAP 的灵敏度、特异度分别为 80% 和 65%<sup>[13]</sup>。本研究证实,入院第 4 天 SAP 患者的血浆 CRP 水平显著高于 MAP 患者,与先前的研究结论一致;但在入院时 SAP 和 MAP 患者的 CRP 水平比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),因此 CRP 在早期评估 AP 的严重程度仍有一定局限性。而本研究证明,血浆 Apelin-13 和 Apelin-36 水平在患者入院时已发生显著改变,与 APACHE II 评分呈显著正相关,且 SAP 与 MAP 患者的血浆 Apelin-13 和 Apelin-36 水平差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),故 Apelin-13 和 Apelin-36 反映 AP 的严重程度比 CRP 更为敏感,是早期有效预测 SAP 的指标。从另一方面而言,对于血浆 Apelin-13 和 Apelin-36 水平升高的患者,应密切观察临床表现,警惕重症化倾向,及时干预,为患者提供最佳的治疗方案,改善预后。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组,《中华胰腺病杂志》编辑委员会,《中华消化杂志》编辑委员会. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013 年,上海)[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(9): 656-660.
- [2] THROWER E C, GORELICK F S, HUSAIN S Z. Molecular and cellular mechanisms of pancreatic injury[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010, 26(5): 484-489.
- [3] TATEMOTO K, HOSOYA M, HABATA Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(2): 471-476.
- [4] ZENG X J, YU S P, TAYLOR T, et al. Protective effect of apelin on cultured rat bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis[J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(3): 357-367.

- [5] WANG Z, YE J, HAN Y H. Acute pancreatitis associated with herpes zoster; Case report and literature review[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(47): 18053-18056.
- [6] CHEN H, WAN D Y, WANG L, et al. Apelin protects against acute renal injury by inhibiting TGF- $\beta$ 1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(7): 1278-1287.
- [7] BAO H J, ZHANG L, HAN W C, et al. Apelin-13 attenuates traumatic brain Injury-Induced damage by suppressing autophagy[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(1): 89-97.
- [8] CIRILLO P, ZIVIELLO F, PELLEGRINO G, et al. The adipokine apelin-13 induces expression of prothrombotic tissue factor[J]. *Thromb Haemost*, 2015, 113(2): 363-372.
- [9] 魏丽, 贾伟平, 吴海娅, 等. 肥胖及 2 型糖尿病患者血清 apelin 水平及其相关因素分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2007, 23(2): 130-133.
- [10] ASLAN M, CELIK O, CELIK N, et al. Cord blood nesfatin-1 and apelin-36 levels in gestational diabetes mellitus[J]. *Endocrine*, 2012, 41(3): 424-429.
- [11] KARADAG S, OZTURK S, GURSU M, et al. The relationship between apelin and cardiac parameters in patients on peritoneal dialysis: is there a new cardiac marker? [J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15(1): 18.
- [12] HAN S, ENGLANDER E W, GOMEZ G A, et al. Pancreatitis activates pancreatic apelin-APJ axis in mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013, 305(2): G139-G150.
- [13] NISTAL M, ZOLTANI M, LOHSE A W, et al. Analysis of the power of common diagnostic tools in the management of acute pancreatitis[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014(8): 438697.

(收稿日期: 2017-06-26 修回日期: 2017-08-27)

(上接第 39 页)

- Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma[J]. *World J Surg*, 2010, 34(5): 1059-1065.
- [7] SENDUR M A, AKSOY S, DEMIRCI S, et al. Can targeted programmed death-1 antibody be a new treatment approach in breast cancer[J]. *J BUON*, 2014, 19(2): 584-590.
- [8] GHEBEH H, TULBAH A, MOHAMMED S, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(4): 751-758.
- [9] 马薇, 罗殿中, 陈源, 等. PDL1 和 PD-I 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(9): 1551-1554.
- [10] KERR K M, TSAO M S, NICHOLSON A G, et al. Pro-

grammed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer; In what state is this art? [J]. *J Thoracic Oncol*, 2015, 10(7): 985-989.

- [11] CIMINO-MATHEWS A, THOMPSON E, TAUBE J M, et al. PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2016, 47(1): 52-63.
- [12] SUN H Y, SUN C, XIAO W H. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations[J]. *Cytokine*, 2014, 65(1): 33-41.
- [13] VASSILIKI A M, PRANAM C. Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications[J]. *Cancer J*, 2004, 34(2): 167-175.

(收稿日期: 2017-07-18 修回日期: 2017-09-26)