

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.09.018

PD-L1 在乳腺癌中的表达及其与细胞免疫的相关性分析

王立东^{1,2},徐卫国^{1△},杨鑫¹,李蕊洁²,谌娜娜²,郭红辉³,赵跃鹏⁴

(1. 华北理工大学附属医院肿瘤外科,河北唐山 063009;2. 迁安市人民医院肿瘤放疗科,

河北迁安 064400;3. 迁安市人民医院病理科,河北迁安 064400;4. 承德县医院外科,河北承德 067400)

[摘要] **目的** 观察程序性死亡受体 1(PD-L1)在乳腺癌组织中的表达情况,并探讨其与乳腺癌患者细胞免疫的相关性。**方法** 收集迁安市人民医院乳腺癌石蜡标本 114 例,免疫组织化学技术检测 PD-L1 在乳腺肿瘤组织中的表达情况,分析 PD-L1 的表达与临床病理特征的关系;流式细胞仪检测 PD-L1 阴性、PD-L1 阳性两组患者外周血淋巴细胞亚群中 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD19⁺、CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 细胞的水平及 CD4⁺/CD8⁺ 比值。**结果** 在 114 例乳腺癌标本中,有 35 例患者 PD-L1 阳性表达,表达率为 30.7%,PD-L1 表达与肿瘤大小、组织学分级、Ki-67 高表达相关($P<0.05$);PD-L1 阴性表达患者细胞免疫状态优于 PD-L1 阳性表达者($P<0.05$)。**结论** PD-L1 的表达与乳腺癌更差的临床病理特征密切相关,其机制可能与 PD-L1 阳性表达患者的细胞免疫被破坏相关。

[关键词] 乳腺肿瘤;程序性死亡受体 1;细胞免疫
[中图法分类号] R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)09-1207-03

Expression of PD-L1 in breast cancer and its correlation with cellular immunity

WANG Lidong^{1,2}, XU Weiguo^{1△}, YANG Xin¹, LI Ruijie², CHEN Nana², GUO Honghui³, ZHAO Yuepeng⁴

(1. Department of Oncological Surgery, Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063009, China; 2. Department of Tumor Chemoradiotherapy, Qian'an Municipal People's Hospital, Qian'an, Hebei 064400, China; 3. Department of Pathology, Qian'an Municipal People's Hospital, Qian'an, Hebei 064400, China; 4. Department of Surgery, Chengde County Hospital, Chengde, Hebei 067400, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of PD-L1 in breast cancer tissue and to investigate its correlation with cellular immunity. **Methods** One hundred and fourteen paraffin-embedded specimens of breast cancer were collected from the Qian'an Municipal People's Hospital. The expression of PD-L1 in breast tumor tissue was detected by immunohistochemical technique, then the relationship between PD-L1 expression and tumor clinicopathological characteristics was analyzed; the levels of peripheral blood CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ cells and CD4⁺/CD8⁺ in the patients with PD-L1 negative and PD-L1 positive of the two groups were detected by the flow cytometry. **Results** Among 114 cases of breast cancer specimen, 35 cases (30.7%) were PD-L1 expression positive with the expression rate of 30.7%. The PD-L1 expression was correlated with the tumor size, histological grade and Ki-67 high expression ($P<0.05$); the cellular immunity status in the patients with PD-L1 negative expression was better than that in the patients with PD-L1 positive expression ($P<0.05$). **Conclusion** The PD-L1 expression is closely correlated with the poorer clinicopathological characteristics of breast cancer, its mechanism may be correlated with the disruption of cellular immunity in the patients with PD-L1 positive expression.

[Key words] breast cancer; PD-L1; cellular immunity

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。研究证实,乳腺癌的生物学行为具有高淋巴管侵袭性,转移能力强,尽管经过规范的治疗,但仍然有相当部分乳腺癌患者出现复发转移。据统计,全球每年约 52.2 万人死于乳腺癌^[1]。因此研究乳腺癌中与复发、转移相关,影响患者肿瘤微环境的异常信号通路,可能为乳腺癌的临床治疗提供新的靶点。本研究采用免疫组织化学法检测乳腺肿瘤组织中程序性死亡受体 1(PD-L1)蛋白的表达情况,流式细胞术检测患者外周血淋淋巴细胞亚群水平,探讨 PD-L1 蛋白与乳腺癌临床病理特征的相关性,并分析 PD-L1 蛋白表达水平与乳腺癌患者细胞免疫的相关性,旨在为乳腺癌的临床治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2010 年 9 月至 2016 年 9 月于迁安市人民医院行手术治疗且临床资料完整的 114 例乳腺癌患者病理标本,均为女性患者,年龄为 33~78 岁,中位年龄 51 岁,组织学类型均为浸润性导管癌,术前均未行放疗、化疗或内分泌治疗。乳

腺癌病理标本根据第 7 版国际抗癌联盟(UICC)乳腺癌 TNM 分期标准分期。根据术后免疫组织化学结果,雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)表达大于 10%,即认为阳性;当人类表皮生长因子受体 2(HER-2)为 3+时认定为阳性,0~1+认定为阴性,2+时需结合 FISH 检测结果,如存在基因拷贝数扩增认定为阳性,反之则为阴性;选择 Ki67 阳性指数 14%作为其表达水平高低的界定点,免疫组织化学结果显示 Ki67≥14%判定为 Ki67 高表达,<14%认定为 Ki67 低表达^[2];组织学分级:应用 Bloom-Richardson 分级法将乳腺癌组织标本分为 I、II、III 级。本研究通过该院伦理委员会审批。患者及家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器和试剂 石蜡切片机购自德国 Leica 公司;倒置光学显微镜购自日本 Nikon 公司;病理标本微波处理仪购自意大利 MILESTON 公司,4℃冰箱购自美的冰箱厂,鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体购自 Proteintech 公司;柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液、5%牛血清清蛋白(BSA)封闭液、二抗、链霉素亲和

素-生物素-过氧化物酶(SABC)、二氨基联苯胺(DAB)显色剂、苏木素购自 MDL 公司。

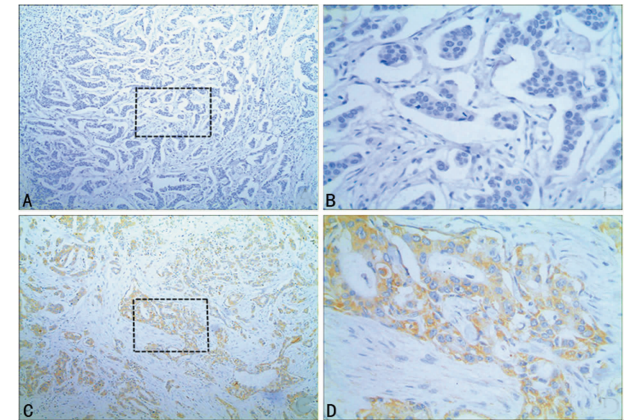
1.2.2 免疫组织化学方法 乳腺癌组织石蜡块连续切片,每片 2.5 μm,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,3%双氧水室温下浸泡切片 10 min,柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液抗原修复,自然冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后使用 5%BSA 封闭液封闭组织,一抗(鼠抗人 PD-L1 单克隆抗体 1:100)孵育 4℃过夜。PBS 清洗后孵育二抗 37℃,30 min。滴加 SABC 试剂孵育 30 min,DAB 显色,苏木素-伊红(HE)复染,梯度乙醇脱水,树脂封片观察,随机观察 5 个高倍视野。

1.2.3 染色结果评定 细胞质及细胞膜棕褐色为 PD-L1 阳性表现,染色结果按照每张切片阳性细胞比例及着色深浅计分,行半定量分析。根据每个视野阳性细胞率及着色强度进行分级计分,然后根据两项之积平均数判定其阳性强度。染色强度评分:无色判定为 0 分,淡黄色判定为 1 分,棕黄色判定为 2 分,棕褐色判定为 3 分;再按阳性细胞百分率评分;阳性细胞小于 5%为 0 分,5%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积小于或等于 1 为阴性,大于 1 为阳性^[3]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。非正态分布计量资料用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验。单因素分析采用 Fisher 确切概率法。计数资料用频数表示,组间比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组织化学染色结果 实验结果显示,PD-L1 阳性表达时,组织细胞膜和细胞质呈均匀染色状态,为棕褐色,见图 1。在 114 例乳腺癌组织中,35 例 PD-L1 蛋白阳性表达,阳性率为 30.7%。



A:阴性表达(HE×100);B:阴性表达(HE×400);C:阳性表达(HE×100);D:阳性表达(HE×400)。

图 1 乳腺癌组织中 PD-L1 的表达

2.2 PD-L1 表达与临床病理特征关系 PD-L1 表达与肿瘤大小(T 分期)、Ki-67 表达水平、组织学分级相关($P<0.05$)。与年龄、淋巴结状态、ER、PR、Her-2 表达水平无相关性($P>0.05$)。PD-L1 主要表达于肿瘤较大、分级高、Ki-67 高表达的患者,见表 1。

2.3 PD-L1 阳性表达与 PD-L1 阴性表达患者淋巴细胞亚群计数的比较 经两独立样本的秩和检验,PD-L1 阴性表达患者 $CD3^+$ 、 $CD3^+CD4^+$ 、 $CD3^-CD16^+CD56^+$ 细胞的水平高于 PD-L1 阳性表达患者($Z=10.705, 9.135, 7.563; P=0.009, 0.016, 0.024$),差异有统计学意义,见表 2。

表 1 PD-L1 的表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系(n)

项目	n	PD-L1 阳性	PD-L1 阴性	χ^2	P
年龄(岁)				1.109	0.295
≥35	108	32	76		
<35	6	3	3		
T 分期				5.710	0.017
T1+T2	98	26	72		
T3	16	9	7		
N 分期				1.171	0.281
有	80	27	53		
无	34	8	26		
ER				0.420	0.519
—	47	16	31		
+	67	19	48		
PR				1.175	0.280
—	50	18	32		
+	64	17	47		
Her-2				3.000	0.085
—	81	21	60		
+	33	14	19		
Ki-67(%)				4.002	0.046
<14	45	9	36		
≥14	69	26	43		
组织学分级				5.968	0.015
I+II	65	14	51		
III	49	21	28		

表 2 PD-L1 阳性表达与 PD-L1 阴性表达患者淋巴细胞亚群计数的比较 $[M(P_{25}, P_{75})]$

T 亚群(%)	PD-L1 阳性(n=35)	PD-L1 阴性(n=79)	Z	P
CD3 ⁺	55.23(47.23~60.76)	63.59(49.35~67.13)	10.705	0.009
CD3 ⁺ CD4 ⁺	44.65(39.57~49.95)	52.19(47.35~61.25)	9.135	0.016
CD3 ⁺ CD8 ⁺	25.19(20.17~35.43)	21.31(15.13~32.14)	-2.732	0.531
CD3 ⁻ CD19 ⁺	53.74(50.14~60.19)	56.02(49.13~63.09)	3.072	0.670
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	19.02(15.13~32.72)	27.52(21.83~34.75)	7.563	0.024
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	2.35(2.10~2.79)	2.27(2.09~2.53)	-0.732	0.818

3 讨 论

PD-1 是 CD28/CTLA-4 共刺激受体家族中的一员,与其配体 PD-L1 相互作用向 T 细胞传递一个抑制信号从而在肿瘤部位产生免疫抑制的肿瘤微环境^[4]。肿瘤细胞可异常上调 PD-1 及 PD-L1 的表达,抑制 T 细胞的免疫活性,造成肿瘤免疫逃逸,导致肿瘤发生、发展^[5]。PD-L1 不仅表达于抗原提呈细胞(APC)和树突状细胞,也表达于活化的单核细胞和 B 细胞,不同器官的非淋巴组织^[6]。研究表明,PD-L1 亦表达于人类多种肿瘤细胞表面,例如肺癌、肾癌、黑色素瘤、乳腺癌等,抑制 T 细胞的活化,诱导其凋亡,促进肿瘤进展^[7]。

本研究纳入 114 例乳腺浸润性导管癌患者,免疫组织化学法检测乳腺癌组织中 PD-L1 蛋白表达情况,结果显示 PD-L1 表达于乳腺癌组织的细胞膜和细胞质中,染色均匀,着色明显,共 35 例 PD-L1 阳性表达,阳性率为 30.7%。区燕华等^[8]用免疫组织化学方法检测了 154 例乳腺癌组织中 PD-L1 的表达情况,结果显示其阳性表达率为 22.7%,与本课题研究结果相近。耿卫朴^[9]研究了 40 例乳腺浸润性导管癌中 PD-L1 的表达情况,发现 PD-L1 阳性表达率为 45%,与本课题研究结果有一定差别。本研究采用 Fisher 确切概率法分析 PD-L1 与临床病理特征的相关性,结果显示 PD-L1 表达与肿瘤大小、组织学分级、Ki-67 的表达情况相关($P<0.05$),与 ER、PR、Her-2、淋巴结状态无明显关联性。PD-L1 主要表达于肿瘤大于 5 cm、Ki-67 高表达及高组织学分级患者中,与 QIN 等^[10]报道的结果相似,提示 PD-L1 的表达与更差的病理学特征相关。本研究采用独立样本秩和检验对 PD-L1 阳性表达组与 PD-L1 阴性表达组患者淋巴细胞亚群计数进行了比较,结果显示 PD-L1 阴性表达组患者 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 细胞的水平高于 PD-L1 阳性表达组患者,两组 CD3⁺CD8⁺、CD3⁻CD19⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的细胞表达水平差异无统计学意义,而以上标记细胞亚群所代表的功能分别为:CD3⁺ 与人体 T 细胞免疫相关,其降低提示着机体免疫功能低下;CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD8⁺ 代表着辅助/诱导型 T 细胞和抑制/细胞毒性 T 细胞,其升高与降低与总 T 细胞相似;CD3⁻CD19⁺ 细胞水平的高低可反映机体细胞免疫的状态;CD3⁻CD16⁺CD56⁺ 细胞的水平则反映机体内 NK 细胞的活性,其可见于某些肿瘤细胞及病毒感染的细胞毒性作用;CD4⁺/CD8⁺ 比值的异常提示患者机体免疫功能处于失衡状态。本研究的结果提示,PD-L1 的高表达可以恶化乳腺癌患者自身的细胞免疫,其机制可能与 PD-L1 相关通路抑制患者机体细胞免疫相关。

肿瘤的免疫治疗已然成为一种治疗肿瘤的重要方式。得益于癌细胞对常规治疗较敏感,使得部分乳腺癌患者的生存时间较其他恶性肿瘤患者更长,但复发转移性乳腺癌目前尚不可治愈,现有治疗手段终将会对这部分患者失效。这些肿瘤患者

有可能在现有治疗方法全部失败后再次获益于抗 PD-1/PD-Ls 治疗,使其生存期进一步延长。本研究采用免疫组织化学法,以乳腺癌组织中 PD-L1 蛋白的表达情况为切入点,探讨 PD-L1 蛋白与乳腺癌临床病理特征的相关性,并分析 PD-L1 蛋白表达水平与乳腺癌患者细胞免疫的相关性,结果显示 PD-L1 的表达与乳腺癌更差的临床病理特征密切相关,PD-L1 的表达可以提示患者细胞免疫功能的下降。

参考文献

[1] 陈万青,郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床,2015,42(13):668-674.

[2] MU K,LI L,YANG Q,et al. A standardized method for quantifying proliferation by Ki-67 and cyclin A immunohistochemistry in breast cancer[J]. Ann Diagn Pathol, 2015,19(4):243-248.

[3] 刘琳,赵坡,张忠梅,等. 乳腺癌 TMSG-1 蛋白的表达及临床病理意义[J]. 中国现代医学杂志,2013,23(13):59-61.

[4] BACHY E,COIFFIER B. Anti-PD1 antibody:a new approach to treatment of lymphomas[J]. Lancet Oncol, 2014,15(1):7-8.

[5] HAWKES E A,GRIGG A,Chong G. Programmed cell death-1 inhibition in lymphoma[J]. Lancet Oncol,2015, 16(5):234-245.

[6] TOPALIAN S L,HODI F S,BRAHMER J R,et al. Safety,activity,and immune correlates of Anti-PD-1 antibody in cancer[J]. N Engl J Med,2012,366(26):2443-2454.

[7] BOLAND J M,KWON E D,HARRINGTON S M,et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung[J]. Clin Lung Cancer,2013,14(2): 157-163.

[8] 区燕华,林骏,罗深秋. 程序性死亡因子配体 1 在乳腺癌中的表达及意义[J]. 广东医学,2015,36(10):1515-1517.

[9] 耿卫朴. 人乳腺癌中共刺激分子 PD-L1、PD-L2 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2017,33(1): 59-62.

[10] QIN T,ZENG Y,QIN G,et al. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 33972-33981.

(收稿日期:2017-10-18 修回日期:2017-12-24)

(上接第 1206 页)

[8] SOLOMON M,ERASMUS N,HENKEL R R. In vivo effects of Eurycoma longifolia Jack(Tongkat Ali) extract on reproductive functions in the rat [J]. Andrologia, 2015, 46(4):339-348.

[9] WAHAB N A,MOKHTAR N M,HALIM W N,et al. The effect of eurycoma longifolia Jack on spermatogenesis in estrogen-treated rats[J]. Clinics(Sao Paulo), 2010, 65(1):93-98.

[10] HENKEL R R,WANG R,BASSETT S H,et al. Tongkat Ali as a potential herbal supplement for physically active

male and female seniors-a pilot study[J]. Phytother Res, 2014,28(4):544-550.

[11] ANG H H,LEE K L,KIYOSHI M. Sexual arousal in sexually sluggish old male rats after oral administration of Eurycoma longifolia Jack [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol,2004,15(3/4):303-309.

[12] 程贝,柳琴. 东革阿里提取物抗疲劳作用的实验研究[J]. 药学与临床研究,2015,23(4):358-360.

(收稿日期:2017-10-21 修回日期:2017-12-05)