

• 临床研究 •

程序性死亡受体 1 及其配体在原发肺黏液表皮样癌中的表达特点及临床意义

福建医科大学教学医院 福建省福州肺科医院病理科 (福州 350008) 刘加夫 吴联平 林清华 陈友轩
林玉琼 陈新富¹

【摘要】 目的 探讨原发肺黏液表皮样癌 (pulmonary mucoepidermoid carcinoma, PMC) 中程序性死亡受体 1 (PD-1) 及其配体 1 (PD-L1)、配体 2 (PD-L2) 表达的临床意义。**方法** 采用免疫组化法检测 41 例手术切除原发肺 PMC 组织中 PD-1、PD-L1、PD-L2 和 CD8+T 细胞表达情况, 分析它们之间的相关性及其与临床病理特征的关系。**结果** 显微镜下观察 PMC 由表皮样细胞、中间型细胞和黏液细胞构成。免疫标志物 PD-L1 在 41 例 PMC 中呈阴性; 所有 PMC 肿瘤组织中 CD8+T 细胞均有不同程度表达, 且其表达阳性数与肿瘤大小呈负相关; PD-1+T 细胞在癌组织中 15 例阴性, 26 例呈阳性表达; PD-L2 均有不同程度表达, 其中 8 例高级别黏液表皮样癌表现为表皮样细胞及中间型细胞胞膜的中等以上强度阳性表达; 33 例低级别黏液表皮样癌中黏液细胞为阴性、中间型细胞及表皮样细胞胞膜呈局灶阳性。单因素分析 PD-L2 高表达与较短的无复发生存期相关, 多因素分析显示 PD-L2 表达可能是预测黏液表皮样癌复发的独立危险因素之一。本研究发现 PD-L2 表达强度与 PMC 的组织学分级呈正相关, 高级别 PMC 中 PD-L2 阳性细胞比例和染色强度综合评分明显高于低级别 PMC。**结论** PD-L2 是 PMC 重要的免疫生物标志物, 可能会成为预测黏液表皮样癌复发的关键因子之一, 其表达综合评分情况有助于黏液表皮样癌组织学分级, 对预测临床预后有一定的作用。

【关键词】 肺肿瘤; 黏液表皮样癌; 程序性死亡受体 1 配体

【中图分类号】 R361⁺.3; R734.2 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2018)06-0016-04

Expression of programmed death receptor 1 and its ligand in primary lung mucoepidermoid carcinoma and its clinical significance

LIU Jiafu, WU Lianping, LIN Qinghua, CHEN Youxuan, LIN Yuqiong, CHEN Xinfu. Department of Pathology, Fuzhou Pulmonary Hospital, Teaching Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350008, China

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance of programmed death receptor 1 (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1) and ligand 2 (PD-L2) in primary lung mucin epidermoid carcinoma (PMC). **Methods** The expressions of PD-1, PD-L1, PD-L2 and CD8+ T cells in 41 patients with primary lung PMC were detected by immunohistochemistry. The correlation between them and their relationship with clinicopathological features were analyzed. **Results** Microscopic observation of PMC consisted of epidermal-like cells, intermediate cells, and mucous cells. The immunological marker PD-L1 was negative in 41 cases of PMC; CD8+ T cells were expressed in different degrees in all PMC tumor tissues, and the positive expression number was negatively correlated with tumor size; PD-1+T cells were negative in 15 cases and positive in 26 cases. PD-L2 was expressed in different degrees. Among them, eight cases of high-grade mucoepidermoid carcinoma showed moderate or higher intensity expression of epidermal-like cells and intermediate cell membrane. In 33 cases of low-grade mucoepidermoid carcinoma, mucus cells were negative, and intermediate cells and epidermal-like cell membranes were focally positive. Univariate analysis of PD-L2 high expression was associated with shorter recurrence-free survival. Multivariate analysis showed that PD-L2 expression may be one of the independent risk factors for predicting recurrence of mucoepidermoid carcinoma. This study found that the intensity of PD-L2 expression was positively correlated with the histological grade of PMC. The proportion of PD-L2 positive cells and the comprehensive score of staining intensity in high-grade PMC was significantly higher than that of low-level PMC. **Conclusion** PD-L2 is an important immunobiomarker for PMC and may be one of the key factors predicting the recurrence of mucoepidermoid carcinoma. The comprehensive evaluation of its expression is helpful for histological grading of mucoepidermoid carcinoma and which has a certain predictive clinical prognosis.

基金项目: 福州市科技计划项目 (2015-S-142-5)

¹ 胸外科

【Key words】lung neoplasms; mucoepidermoid carcinoma; programmed death receptor 1 ligand

肺癌是世界上发病率和死亡率较高的恶性肿瘤,严重威胁人类的生命健康。目前肺癌的治疗方式主要包括手术治疗、化疗、放疗及分子靶向治疗。手术治疗仍然是可能治愈患者的唯一治疗方法,然而大多数肺癌患者发现时已丧失了手术机会。涎腺肿瘤是一类较为复杂的疾病,包括 11 种良性和 20 种恶性肿瘤^[1]。原发肺黏液表皮样癌(primary pulmonary mucoepidermoid carcinoma, PMC)发生率低,在所有肺肿瘤中比例低于 1%。近年来,肿瘤的免疫治疗成为继分子靶向治疗后的新热点,其中以程序性死亡受体 1(programmed cell death-1, PD-1)及其配体 1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)为靶点的免疫治疗药物在临床应用中显示出了较好的疗效和耐受性。PD-1 是由活化的 T 细胞表达的抑制性受体,抑制 T 细胞受体的淋巴细胞增殖,导致癌细胞的免疫逃逸^[2]。PD-L1/2 是 PD-1 的配体,起到调节肿瘤免疫的作用。虽然 PD-1 及其配体在多种肿瘤中进行了广泛的研究,其表达与肿瘤预后不良和临床病理特征相关,但在唾液腺肿瘤中的资料仍然很少。因此,在黏液表皮样癌中进行 PD-1、PD-L1、PD-L2、CD8 免疫组化分析,以评估其表达情况对临床预后的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料:选择 2007 年 1 月至 2016 年 6 月我院病理科诊断的手术切除原发肺的黏液表皮样癌患者 41 例,其中男 25 例,女 16 例;年龄 11~84 岁,中位年龄 44 岁;吸烟患者 16 例,不吸烟患者 25 例;病灶肿瘤直径大小 0.9~5.6 cm,平均 2.9 cm;术后接受系统化疗 8 例。按照第 8 版 TNM 肿瘤临床分期,Ⅰa1 期 4 例、Ⅰa2 期 19 例、Ⅰa3 期 9 例、Ⅱa 期 4 例、Ⅱb 期 5 例。所有患者标本离体后均经过 10% 中性福尔马林浸泡固定,低温石蜡包埋,阴凉处(20℃以下)保存。通过电话、电子病历进行随访,所有患者随访至 2016 年 6 月,失访 3 例。

1.2 方法:

1.2.1 试剂:PD-L2(即用型,克隆号:UMAB223)购自北京中衫公司;PD-1(稀释比 1:100,克隆号:NAT)、PD-L1(稀释比 1:150,克隆号:MXR003)、CD8(即用型,克隆号:SP16)及免疫组化 SP 试剂盒、苏木精等购自福州迈新

公司。

1.2.2 免疫组化染色:所有病例选择代表性肿瘤组织的蜡块,4 μm 厚度连续切片。免疫组化采用 SP 两步法,将切片脱蜡水化,3% H₂O₂ 孵育 10 min 消除内源性过氧化物酶活性,用 PBS 液洗 3 次。切片放置枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)中进行抗原修复,待自然冷却后用 PBS 洗 3 次。分别滴加一抗,放置 4℃冰箱过夜。切片用 PBS 液洗 3 次后,滴加二抗,放置 37℃烤箱孵育 30 min,用 PBS 液洗 3 次后,经 DAB 显色苏木精复染,中性树脂封固。PD-1、PD-L1、PD-L2、CD8 染色阳性为胞膜和(或)胞质出现棕黄色或棕褐色颗粒。PD-1、CD8 具体计数方法:先在低倍视野选取 5 个细胞阳性染色最密集的区域,在高倍镜视野下(×400),每张切片随机观察 5 个视野的肿瘤细胞,计算 200 个细胞/视野染色阳性的细胞比,共计 1 000 个,采用半定量积分法判定,根据阳性细胞和着色深度共同计分。PD-L1、PD-L2 具体计数方法是以综合阳性细胞比例和染色强度计分:阳性细胞比例≤5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分^[3];阳性细胞表达的着色深度:细胞染色强度无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两者得分相乘为最终判定结果:0~2 分为阴性(-),3~4 分为弱阳性(+),5~8 分为中度阳性(++),9~12 分为强阳(+++),其中(-)为阴性。染色结果均由 2 位病理科医师采用双盲法分别阅片核实。

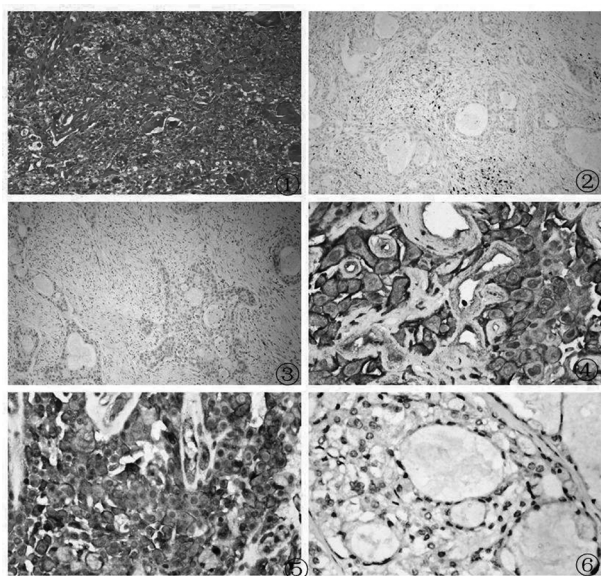
1.2.3 观察指标:无复发生存期,指手术治疗后至局部进展或远处转移的时间;总生存期,指手术治疗后到死亡的时间。

1.3 统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。采用 Log-rank 检验对各组间生存率曲线进行比较。应用单变量和多变量 Cox 比例风险回归模型分析免疫相关标记物表达对无复发生存期和总生存期的影响。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-1、PD-L1、PD-L2 及 T 细胞亚型标记物在 PMC 中的表达分析:显微镜下观察 PMC 由表皮样细胞、中间型细胞和黏液细胞构成(图 1①)。免疫标志物 PD-L1 在 41 例 PMC 中呈阴性;所有 PMC 肿瘤组织中 CD8+T 细胞均有不同程度表达

(图 1②), 与肿瘤大小呈负相关, 肿瘤体积越小 CD8+T 细胞表达数越多, 体积越大 CD8+T 细胞阳性数越少。PD-L1 在 PMC 肿瘤组织中不表达 (图 1③)。PD-1+T 细胞在癌组织中 15 例阴性, 26 例呈阳性表达, PD-L2 和 PD1 表达两者间无明显相关性; PD-L2 在 41 例 PMC 中均有不同程度表达, 8 例高级别黏液表皮样癌表现为表皮样细胞及中间型细胞胞膜的强阳性表达 (图 1④), 部分中间型细胞可表现为细胞膜及细胞质的阳性 (图 1⑤)。33 例低级别黏液表皮样癌中黏液细胞为阴性 (图 1⑥)、中间型细胞及表皮样细胞包膜局灶阳性, 部分中间型细胞可表现为细胞膜及细胞质的阳性。



注: 图①, HE 镜下见丰富黏液细胞及中间型细胞 (10×20); 图②, CD8 在肿瘤组织中浸润的 T 淋巴细胞呈阳性表达 (10×10); 图③, PD-L1 在肿瘤组织中阴性表达 (10×10); 图④, PD-L2 在肿瘤组织中表皮样细胞胞膜阳性表达 (10×20); 图⑤, PD-L2 在肿瘤组织中中间型细胞胞膜阳性表达 (10×20); 图⑥, PD-L2 在肿瘤组织中黏液细胞阴性表达 (10×20)。

图 1 黏液表皮样癌 HE 染色及免疫组化图

2.2 PMC 患者生存分析: 所有患者随访至 2016 年 6 月, 平均随访时间 77.6 个月。平均无复发生存时间 51.1 个月, 平均总生存时间 77.3 个月。PD-L2 表达强度与 PMC 的组织学分级呈正相关, 高级别 PMC 中 PD-L2 阳性细胞比例和染色强度综合评分明显高于低级别 PMC。单因素分析结果显示免疫标记物表达对患者总生存期无显著影响 ($P > 0.05$)。单因素分析肿瘤组织 PD-L2 表达影响患者无复发生存时间, 多因素分析结果显示 PD-L2 表达可能是影响无复发生存率的独立危险因素之一。

PD-L2 高表达与患者较短的无复发生存时间有关。

3 讨论

原发肺黏液表皮样癌是原发于肺的恶性涎腺肿瘤的一种常见亚型, 具有高复发率和转移率, 大多数患者对化疗药物反应差^[4-5]。以 PD-1/PD-L1 抑制剂为靶点的免疫药物在多种恶性肿瘤的治疗中显示出良好的临床获益。因此, 许多研究分别报道了免疫相关标志物在多种实体肿瘤中的表达及其意义, 但在恶性涎腺肿瘤中的研究资料较少, 原发肺原发黏液表皮样癌的资料则更少。本组通过免疫组化法检测 41 例手术切除原发肺 PMC 组织中 PD-1、PD-L1、PD-L2 和 CD8+T 细胞表达情况, 分析它们之间的相关性以及与临床预后的关系。

PD-1 是免疫球蛋白 B7-CD28 家族成员之一, 由胞外段、疏水性跨膜区、胞内段组成, 其胞内段含有免疫受体酪氨酸抑制基序 (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM)、免疫受体酪氨酸转换基序 (immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITSM)^[6], 其中 ITSM 的激活与效应性 T 细胞应答活性密切相关。PD-1 可表达于活化的 CD4+T 细胞、CD8+T 细胞、B 细胞、自然杀伤 T 细胞、单核细胞和树突状细胞上^[7]。在众多实体肿瘤中, 肿瘤细胞之所以能逃逸免疫监视, 其中可能的重要机制是 PD-L1 表达于肿瘤细胞, 其表达水平可被视为一个不良预后的标志物^[8]。即肿瘤细胞 PD-L1 表达增加与逃逸宿主的免疫机制密切相关, 而在本组研究中, PD-L1 在肺原发黏液表皮样癌组织中均不表达。虽然肿瘤组织中存在 CD8 阳性和 PD-1 阳性的 T 淋巴细胞浸润, 但与患者生存期无显著相关性。Hyeyoon 等^[9]研究表明肿瘤组织中 CD8+T 细胞和肿瘤细胞 PD-L1 表达情况与肿瘤大小密切相关, 肿瘤体积越小 PD-L1 的表达越低, 相反肿瘤体积越小 CD8+T 细胞表达得越多; 同时 PD-L2 和 PD1 表达两者间没有明显的相关性, 与本组研究结果一致。这说明肺原发黏液表皮样癌可能不是通过肿瘤细胞表达 PD-L1 途径发挥免疫逃逸。同时还发现 PD-L2 的高表达与唾液腺肿瘤更短的无复发生存期相关, PD-L2 可能是重要的研究和治疗靶点之一。以 PD-L2 表达为治疗靶点的临床研究可能具有广泛应用前景, 目前 PD-L2 在原发性和转移性或复发性黏液表皮样癌中的表达与临床预后的相关性还缺乏大样本量的病例研究。PD-L2 可以在多种类型细胞上表达, 包括树突细胞、B 细胞、T 细胞的亚群及肿瘤细胞。PD-L2 在免疫调控中起

重要作用,类似于 PD-L1 通过与 PD-1 的结合调节 T 细胞免疫反应。然而,已知 PD-1/PD-L2 之间的相互作用与 PD-1/PD-L1 不同,PD-L2 阳性表达与肾细胞癌中较短的无复发生存期显著相关^[10]。在本组研究中,8 例高级别 PMC 患者组织学中 PD-L2 阳性细胞比例和染色强度综合评分明显高于在 33 例低级别 PMC 患者,且提示 PD-L2 表达强度与 PMC 的组织学分级呈正相关。PD-L2 表达强度与 PMC 的无复发生存期显著相关。PD-L2 弱阳性表达患者,无复发生存期较长,而 PD-L2 中等强度以上阳性表达患者,无复发生存期较短。

综上所述,对黏液表皮样癌预后因素分析中可发现 PD-L1 呈阴性表达;PD-L2 表达不一,PD-L2 中等强度以上阳性表达的患者预后相对较差;PD-L2 表达强度与 PMC 的组织学分级呈正相关,高级别 PMC 中 PD-L2 阳性细胞比例和染色强度综合评分明显高于低级别 PMC。黏液表皮样癌预后与 CD8 及 PD-1 阳性的 T 淋巴细胞表达无显著相关性。因此研究 PD-L2 在黏液表皮样癌中表达的作用和临床意义具有重要的临床价值。PD-L2 途径可能成为黏液表皮样癌免疫治疗的靶点之一,其表达综合评分情况有助于黏液表皮样癌组织学分级,对预测临床预后有一定的作用。

参考文献

- [1] El-Naggar A K, Chan J, Takata T, et al. The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book; editors'perspectives [J]. Human Pathology, 2017 (66): 10.
- [2] Pardoll D M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy [J]. Nature Reviews Immunology, 2002, 2 (4): 227-238.
- [3] Jr M C K, Miller L S, Cox E B, et al. Estrogen receptor analyses, correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies [J]. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 1985, 109 (8): 716.
- [4] Grandi C. Salivary duct carcinoma: clinical characteristics and treatment strategies [J]. Head & Neck, 2015, 19 (2): 126-133.
- [5] Dillon P M, Chakraborty S, Moskaluk C A, et al. Adenoid cystic carcinoma: a review of recent advances, molecular targets, and clinical trials [J]. Head & Neck, 2016, 38 (4): 620-627.
- [6] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death [J]. Embo Journal, 1992, 11 (11): 3887-3895.
- [7] Keir M E, Butte M J, Freeman G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. Annual Review of Immunology, 2008, 26 (1): 677-704.
- [8] Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104 (9): 3360-3365.
- [9] Chang H, Kim J S, Choi Y J, et al. Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors [J]. Oncotargets & Therapy, 2017 (10): 2983-2992.
- [10] Shin S J, Jeon Y K, Kim P J, et al. Clinicopathologic analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in renal cell carcinoma: association with oncogenic proteins status [J]. Annals of Surgical Oncology, 2016, 23 (2): 694-702.