

PD-1、PD-L1、CMTM6 在口腔鳞癌中的表达及意义

Expression of PD-1, PD-L1 and CMTM6 in Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Significance // FENG Xiao-bo, ZHAO Jiu-zhou, LI Wu, ZHANG Yuan-yuan, ZHANG Song-tao

冯晓波¹, 赵九洲², 李武¹, 张媛媛¹, 张松涛²
(1. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450001;
2. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450001)

摘要: [目的] 探讨 PD-1、PD-L1、CMTM6 蛋白在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)组织中的表达及其临床意义。[方法] 采用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)法检测 44 例 OSCC 患者石蜡标本和 22 例癌旁正常组织中 PD-1、PD-L1、CMTM6 蛋白表达情况, 分析其与临床病理特征的关系及各蛋白之间的相关性。[结果] OSCC 中 PD-1、PD-L1、CMTM6 蛋白阳性表达率分别为 55%(24/44)、66%(29/44)、25%(11/44), 对照组中三种蛋白的阳性表达率分别为 23%(5/22)、14%(3/22)、0(0/22), 组间差异均有统计学意义($P=0.014, 0.002, 0.010$)。PD-L1 阳性表达与临床分期、淋巴结转移相关($P<0.05$), PD-1、CMTM6 的表达情况各临床病理参数均无明显相关性。CMTM6 与 PD-1、PD-L1 表达均呈正相关($r=0.302, P=0.004; r=0.411, P<0.001$)。[结论] PD-1、PD-L1、CMTM6 在 OSCC 中高表达, 可能参与了肿瘤的免疫逃逸, 有望成为口腔鳞癌免疫治疗的靶点。

关键词: 口腔鳞状细胞癌; PD-1; PD-L1; CMTM6

中图分类号: R739.9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2019)06-0577-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.06.B017

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC, 以下简称口腔鳞癌)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率逐年增高。目前虽有手术、放射治疗、化学治疗、靶向治疗等方法, 但临床患者的 5 年生存率仍低于 50%^[1]。近年来肿瘤的免疫治疗取得较好疗效, 特别是程序性死亡受体 1(programmed death 1, PD-1)及其配体(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)这一对负性共刺激分子在黑色素瘤、肺癌、胃癌等多种肿瘤中已被证实存在表达, 并有部分免疫抑制剂应用于临床, 但国内外对 PD-1、PD-L1 在 OSCC 中的研究甚少。此外, CMTM6 可以调控 PD-L1 的表达, 增强肿瘤抑制免疫应答的能力^[2]。本实验通过免疫组化法检测 OSCC 组织及癌旁正常组织中 PD-1、PD-L1、CMTM6 的表达, 以探讨三种蛋白与 OSCC 临床病理特征的相关性及其生物学意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2016 年 1 月至 2017 年 10 月郑州大学附

通信作者: 张松涛, 副主任医师, 博士; 郑州大学附属肿瘤医院甲状腺头颈外科, 河南省郑州市东明路 127 号(450001); E-mail: zhst143@126.com

收稿日期: 2018-05-10; **修回日期:** 2018-08-24

属肿瘤医院病理科存档的 OSCC 石蜡标本 44 例, 所有患者术前均未接受放疗和化疗。44 例患者中男性 31 例, 女性 13 例; 年龄 38~81 岁, 中位年龄 62 岁; 吸烟者 18 例, 不吸烟者 26 例; 饮酒者 15 例, 不饮酒者 29 例; 肿瘤直径 ≤ 2 cm 者 13 例, >2 cm 者 31 例; 分化程度: 低分化 17 例, 中-高分化 27 例; AJCC (2010) 口腔癌 TNM 分期: I~II 期 28 例, III~IV 期 16 例; 有淋巴结转移 16 例, 无转移 28 例。对照组中 22 例正常口腔黏膜组织取自距肿瘤边缘 1.5cm 以上, 病理诊断检查均未见癌细胞。所有标本均经 10% 的中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 组织标本作 4 μ m 厚连续切片。

1.2 免疫组化方法

免疫组化采用 SP 两步法, 68 $^{\circ}$ C 烤片 20min, 二甲苯脱蜡, 酒精梯度脱水, 枸橼酸钠缓冲液中抗原修复, 待自然冷却后用 PBS 冲洗 3 次。滴加一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。PBS 冲洗 3 次后, 滴加二抗山羊抗兔抗体, 放置室温 30 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木精复染, 中性树胶封片。鼠抗人 PD-1 单克隆抗体(1:200 稀释)、PD-L1 单克隆抗体(1:200 稀释)、CMTM6 单克隆抗体(1:100 稀释)均购自上海优宁维生物科技有限公司。

1.3 结果判定标准

先在低倍镜下观察整张切片, 选择表达最多的

区域,以细胞浆或细胞膜出现黄至棕褐色颗粒为阳性显色,计数阳性细胞所占的比例及染色强度来评定阳性表达;PD-1、PD-L1、CMTM6 具体结果判断参考 Al-Shibli 等^[3]判断标准:阳性细胞染色强度分级:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞密度分级为:阳性细胞数≤10%为 1 分,10%~50%为 2 分,>50%为 3 分;两项得分相乘,≥3 分为阳性表达。肿瘤细胞及肿瘤间质内任一项阳性均为阳性表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,采用 χ^2 检验分析 PD-1、PD-L1 和 CMTM6 蛋白表达及其与临床参数间的关系,Speaeman 检验分析各蛋白之间的相关性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-1、PD-L1 和 CMTM6 蛋白表达

PD-1 蛋白表达于淋巴细胞的胞浆和胞膜上,肿瘤组织中 PD-1 阳性表达率(55%)较癌旁正常组织(23%)上调($P=0.014$)。PD-L1、CMTM6 蛋白主要表达于肿瘤细胞的胞浆及细胞膜上,呈棕黄色或棕褐色(Figure 1)。OSCC 中 PD-L1 和 CMTM6 阳性表达率(66%,25%)明显高于癌旁正常组织(14%,0),差异均有统计学意义($P=0.002$ 、 $P=0.010$)。见 Table 1。

2.2 PD-1、PD-L1 和 CMTM6 蛋白表达与 OSCC 临床病理特征的关系

OSCC 组织中 PD-L1 的表达与 TNM 分期 ($P=0.022$) 和淋巴结转移 ($P=0.022$) 相关,PD-1 和 CMTM6 蛋白表达与各临床病理参数均无明显相关性(Table 2)。

2.3 PD-1、PD-L1 与 CMTM6 蛋白之间的相关性

Speaeman 检验显示,OSCC 中 CMTM6 蛋白与 PD-1、PD-L1 蛋白表达水平均呈正相关 ($r=0.302$, $P=0.004$; $r=0.411$, $P<0.001$)。

3 讨论

肿瘤具有潜在的免疫原性,肿瘤细胞可通过一种或多种抑制途径来抑制抗肿瘤 T 淋巴细胞的应答,进而逃避免疫系统的监测。T 淋巴细胞作为机体介导肿瘤免疫应答的核心,受到多种信号通路的复杂调节。其中 PD-1 是 CD28 超家族成员之一,由位于 2 号染色体长臂 37 区 3 带(2q37.3)的 PDCD1 基因编码,机体内的肿瘤微环境会诱导浸润的 T 淋巴细胞高表达 PD-1 分子,肿瘤细胞会高表达其配体 PD-L1,PD-1/PD-L1 之间相互作用可将细胞阻滞在 G_0/G_1 期,进而抑制 T 淋巴细胞的激活、增殖及细胞因子的分泌。T 细胞受抑导致免疫抑制性肿瘤微环境形成,使肿瘤细胞逃避机体免疫监测和杀伤,从而

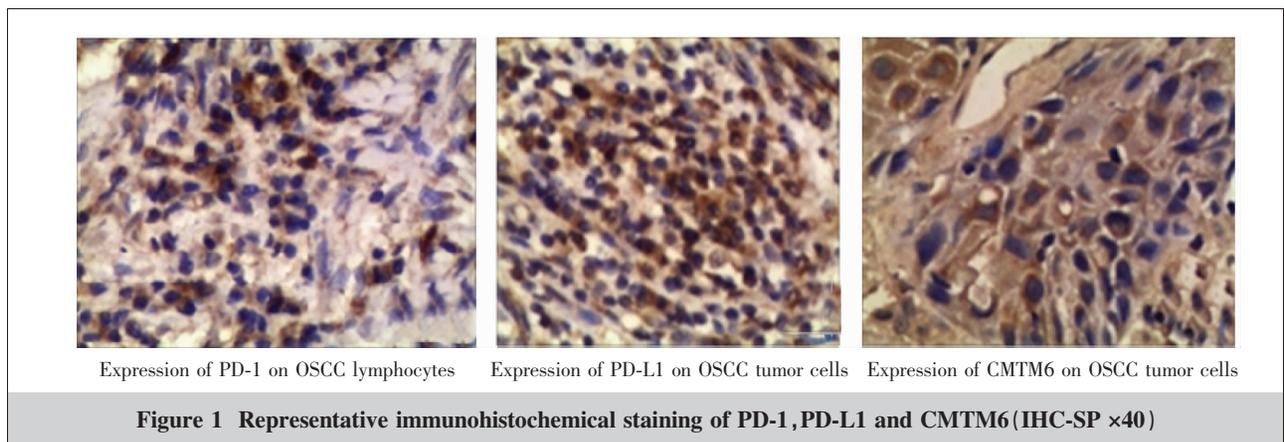


Table 1 The expression of PD-1,PD-L1 and CMTM6 protein in OSCC

Groups	n	PD-1				PD-L1				CMTM6			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
OSCC group	44	24	20	6.028	0.014	29	15	16.045	0.002	11	33	4.923	0.010
Control group	22	5	17			3	19			0	22		

Table 2 Relationship between the expression of PD-1,PD-L1 and CMTM6 with clinical parameters of OSCC

Variable	n	PD-1				PD-L1				CMTM6			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
Gender													
Male	31	18	13	0.524	0.469	19	12	0.422	0.516	9	22	0.328	0.567
Female	13	6	7			10	3			2	11		
Age(years)													
≥ 60	29	15	14	0.273	0.601	20	9	0.354	0.552	8	21	0.034	0.854
<60	15	9	6			9	6			3	12		
Smoking													
Yes	18	10	8	0.013	0.911	10	8	1.453	0.228	6	12	0.501	0.479
No	26	14	12			19	7			5	21		
Drinking													
Yes	15	11	4	3.240	0.072	9	6	0.354	0.552	6	9	1.652	0.199
No	29	13	16			20	9			5	24		
Tumor size(cm)													
≤ 2	13	7	6	0.004	0.952	7	6	0.554	0.457	4	9	0.036	0.849
>2	31	17	14			22	9			7	24		
Clinical stage													
I~II	28	13	15	2.046	0.153	15	13	5.216	0.022	6	22	0.131	0.717
III~IV	16	11	5			14	2			5	11		
Pathological grading													
Low	17	7	10	1.997	0.158	11	6	0.018	0.894	4	13	0.000	1.000
Medium-high	27	17	10			18	9			7	20		
Lymph node metastasis													
Yes	16	10	6	0.642	0.423	14	2	5.216	0.022	3	13	0.131	0.717
No	28	14	14			15	13			8	20		

参与肿瘤的发生、发展过程^[4]。趋化素样因子超家族6(CMTM6)与PD-L1共同定位于质膜和循环核内体上,CMTM6通过加强PD-L1蛋白的表达,促进其与PD-1结合,进一步抑制T细胞的抗肿瘤反应^[5]。

本研究发现,PD-L1主要表达于口腔鳞癌的瘤细胞上,且与淋巴结转移相关($P=0.022$),提示PD-L1可能参与抑制T细胞的免疫活性,进而促进肿瘤的浸润和转移;此外本实验还发现部分癌间质的淋巴细胞上也有PD-L1表达,这表明口腔鳞癌患者肿物切除术后,残余淋巴结中PD-L1蛋白表达,可能会继续影响原发病灶周围微环境的抗肿瘤免疫,从而导致术后生存期缩短。Kim等^[6]研究发现PD-L1在头颈鳞癌的淋巴细胞上而非肿瘤细胞上的表达与患者预后密切相关。鉴于肿瘤细胞和淋巴细胞上均有PD-L1的表达,我们认为PD-L1可能在这两种细胞上的调控机制不同,免疫细胞上的PD-L1可能是通过适应性机制进行调节,肿瘤细胞上PD-L1的表达可能是瘤体内的调控机制,如缺氧诱导的HIF-1 α 、致癌信号通路激活、上皮间充质转换等^[7-9]。本实

验还发现癌旁正常组织的上皮细胞中偶有PD-L1表达,但其染色强度相对与肿瘤组织较弱,且分布不集中或成点片状聚集。PD-1在口腔鳞癌组织淋巴细胞上的表达明显高于癌旁正常组织,但其阳性表达与各临床病理特征均无明显相关性。作为PD-L1的调控因子,CMTM6也同样高表达于口腔鳞癌组织中,并与PD-1、PD-L1表达呈正相关,这初步表明CMTM6与PD-1、PD-L1在调控肿瘤微环境的免疫反应中具有协同作用,推测CMTM6可能激活或加强PD-1/PD-L1信号通路,发挥免疫抑制的作用。Mezzadra等^[2]研究发现CMTM6能使表达PD-L1的肿瘤细胞增强抑制T细胞的能力,且剔除CMTM6会降低PD-L1的表达,进而显著减轻对肿瘤特异性T细胞活性的抑制,但其具体调控机制今后还需深入研究。

基于目前研究发现抗PD-1、PD-L1的单克隆抗体阻断PD-1/PD-L1信号通路,恢复T细胞的免疫杀伤功能,能够发挥良好的治疗效果,如今已有数个PD-1/PD-L1靶向药物进入临床试验,并且在非小细

胞癌^[10]、黑色素瘤^[11]、胃癌^[12]、头颈部肿瘤^[13]、结直肠癌^[14]等疾病中均表现出明显的抗肿瘤活性,具有良好的应用前景。本研究得出:CMTM6和PD-1、PD-L1蛋白在口腔鳞癌组织中表达明显均高于癌旁正常组织,初步表明PD-1、PD-L1、CMTM6可能共同参与口腔鳞癌的免疫逃逸;CMTM6与PD-1、PD-L1之间的相关性进一步证实CMTM6在PD-1/PD-L1免疫逃逸过程中发挥一定的协同作用,因此我们认为PD-1、PD-L1、CMTM6均有望成为口腔鳞癌免疫治疗的靶点。

参考文献:

- [1] Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts[J]. Arch Iran Med, 2015, 18(5): 314-319.
- [2] Mezzadra R, Sun C, Jae LT, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators [J]. Nature, 2017, 549(7670): 106-110.
- [3] Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma[J]. Histopathology, 2009, 55(3): 301-312.
- [4] Pedoem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, et al. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity[J]. Clin Immunol, 2014, 153(1): 145-152.
- [5] Burr ML, Sparbier CE, Chan YC, et al. CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity[J]. Nature, 2017, 549(7670): 101-105.
- [6] Kim HR, Ha SJ, Hong MH, et al. PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients [J]. Sci Rep, 2016, 6: 36956.
- [7] Noman MZ, Desantis G, Janji B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation[J]. J Exp Med, 2014, 211(5): 781-790.
- [8] Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, et al. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 149.
- [9] Atefi M, Avramis E, Lassen A, et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(13): 3446-3457.
- [10] Nishijima TF, Shachar SS, Nyrop KA, et al. Safety and tolerability of PD-1/PD-L1 inhibitors compared with chemotherapy in patients with advanced cancer: a meta-analysis [J]. Oncologist, 2017, 22(4): 470-479.
- [11] Shoushtari AN, Munhoz RR, Kuk D, et al. The efficacy of anti-PD-1 agents in acral and mucosal melanoma[J]. Cancer, 2016, 122(21): 3354-3362.
- [12] Shitara K, Ozguroglu M, Bang YJ, et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2018, 392(10142): 123-133.
- [13] Ferris RL, Blumenschein GJ, Fayette J, et al. Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression[J]. Oral Oncol, 2018, 81: 45-51.
- [14] Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study[J]. Lancet Oncol, 2017, 18(9): 1182-1191.