

本文引用:李鹏,常玉喜,王慧娟,等.程序性死亡受体配体1和E3泛素连接酶Cbl-b在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义[J].新乡医学院学报,2019,36(1):45-49. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.01.009.

【临床研究】

作者简介:李 鹏(1981-),男,河南淇县人,博士,主治医师,研究方向:肿瘤内科综合治疗。

NSCLC tissues were significantly higher than those in paracancerous tissues ($\chi^2 = 5.292, 3.076; P < 0.05$). The expression of PD-L1 protein was not correlated with the age, sex, tumor stage, tumor diameter, the number of positive lymph nodes, pathological type and pathological grade of NSCLC patients ($P > 0.05$). The expression of Cbl-b protein was correlated with the sex of patients and pathological type of NSCLC ($P < 0.05$), but it was not correlated with the age, tumor stage, tumor diameter, the number of positive lymph nodes and pathological grade of NSCLC ($P > 0.05$). The expression of PD-L1 and Cbl-b protein in NSCLC tissues showed a linear relationship ($R^2 = 0.075; P < 0.01$), and the model was $y = 21.464\ 93 + 0.532\ 65x$. The median overall survival (OS) of the patients with high and low expression of PD-L1 protein was 45.0 and 52.0 months, respectively. There was no significant difference in the median OS between the NSCLC patients with high and low expression of PD-L1 protein ($P > 0.05$). Among the 75 patients with squamous cell carcinoma, the median OS of the patients with high and low expression of PD-L1 protein was 45.0 and 81.0 months, respectively; the median OS of the patients with high expression of PD-L1 protein was significantly shorter than that in the patients with low expression of PD-L1 protein ($P < 0.05$). Among the 90 patients with adenocarcinoma, the median OS of the patients with high and low expression of PD-L1 protein was 50.0 and 39.0 months, respectively; there was no significant difference in the median OS between the adenocarcinoma patients with high and low expression of PD-L1 protein ($P > 0.05$). The median OS of the patients with high and low expression of Cbl-b protein was 39.0 and 54.5 months, respectively; the median OS of the patients with high expression of Cbl-b protein was significantly shorter than that in the patients with low expression of Cbl-b protein ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Cbl-b and PD-L1 protein are high in NSCLC tissues. The expression of PD-L1 and Cbl-b protein in NSCLC tissues shows a linear relationship. The expression of Cbl-b protein is related to the sex, pathological type and OS of NSCLC patients. The expression of PD-L1 protein is correlated with the survival time of the patients with squamous cell carcinoma, but there was no correlation between the expression of PD-L1 protein and the survival time of the patients with adenocarcinoma.

Key words: non-small cell lung cancer; programmed death receptor ligand 1; E3 ubiquitin ligase; Cbl-b

近年来研究表明,免疫检测点抑制剂能够激活肿瘤患者体内细胞毒性 T 淋巴细胞,从而促进其杀伤肿瘤细胞,已经成为肺癌的重要治疗方法之一^[1]。程序性死亡受体 1 (programmed death receptor 1, PD-1)/程序性死亡受体配体 1 (programmed death receptor ligand 1, PD-L1)是 T 细胞活化过程中重要的免疫检测点^[2]。PD-L1 选择性表达于多种肿瘤细胞及肿瘤微环境中,能够引起肿瘤微环境中的效应 T 淋巴细胞沉默,导致免疫抑制;而 PD-1 抗体能够阻挡该免疫抑制过程,激活效应 T 淋巴细胞,并增强其抗肿瘤活性。研究显示,PD-1 抗体能够显著改善非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者的预后^[3]。E3 泛素连接酶 Cbl-b 基因属于 Cbl 家族,能够通过抗原、受体识别及共刺激分子负性调节淋巴细胞信号的激活,有望成为免疫调节治疗的靶点^[4]。本研究旨在探讨 PD-L1 和 Cbl-b 在 NSCLC 组织中的表达及其与临床病理特征和患者预后的关系,为 NSCLC 患者的抗肿瘤免疫治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2004 年 7 月至 2009 年 6 月河南省肿瘤医院保存的 NSCLC 组织标本及癌旁组

织(距离癌组织 > 5 cm 处)标本各 165 例,其中,男 46 例,女 119 例;年龄 39 ~ 75 (63.11 ± 9.54) 岁;病理类型^[5]:腺癌 90 例,鳞状细胞癌 75 例;肿瘤分期^[6]:I 期 57 例,II 期 61 例,III 期 44 例,IV 期 3 例;病理分级^[7]:1 级 26 例,2 级 99 例,3 级 40 例。所有患者术前未接受放射治疗和化学治疗,术后经病理学检查确诊。NSCLC 组织及正常肺组织经甲醛固定,石蜡包埋保存。本研究通过医院医学伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、柠檬酸抗原修复液(杭州昊鑫生物科技股份有限公司),PD-L1 一抗、Cbl-b 一抗(美国 CST 公司);移液器(加拿大 BBI 公司),WD-9405 型生物化学摇摆平台(北京沃德生物医学仪器公司),SYQ MDX-280 高压锅(上海申安医疗器械厂),XDS-100 倒置显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司),水浴箱(北京长安科学仪器厂)。

1.3 免疫组织化学方法检测 NSCLC 组织和癌旁组织中 PD-L1 和 Cbl-b 蛋白的表达 取石蜡标本,连续切片,厚度约 5 μm,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;体积分数 3% 过氧化氢溶液中浸泡 3 ~ 5 min,阻断内源性过氧化物酶;

PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;98 ℃ 下柠檬酸修复液修复30 ~ 60 s,室温下自然冷却;PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min;滴加一抗 (PD-L1 抗体稀释比例为 1 : 200, Cbl-b 抗体稀释比例为 1 : 250),4 ℃ 冰箱过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加二抗,室温下孵育 40 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;3,3'-二氨基联苯胺显色,PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min;流水冲洗,苏木精复染;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;以 PBS 替代一抗作为阴性对照,光学显微镜下观察。

1.4 结果判定 PD-L1 蛋白和 Cbl-b 蛋白阳性信号均为棕黄色颗粒样物质,PD-L1 蛋白主要定位于细胞膜,Cbl-b 蛋白位于细胞膜和(或)细胞质。阳性细胞指肿瘤细胞膜和(或)细胞质有棕黄色颗粒的细胞;肿瘤细胞存在棕黄色颗粒者为阳性表达,若不存在为阴性表达。随机选取 5 个高倍镜视野,观察阳性细胞着色程度和阳性细胞数占同类细胞总数的百分比。PD-L1 表达按照显色强度进行分级:未着色为 0 级,浅黄色为 1 级,棕黄色为 2 级,棕褐色为 3 级;定义 0 级为阴性表达,1 ~ 3 级为阳性表达;阳性细胞比例≥50% 为高表达,<50% 为低表达^[8]。Cbl-b 表达按照显色强度进行分级:未着色为 0 级,浅黄色为 1 级,棕黄色或棕褐色为 2 级;定义 0 级为阴性表达,1 ~ 2 级为阳性表达;阳性细胞比例≥25% 为高表达,<25% 为低表达,以 25% 为分界值由 R 软件进行拟合曲线分析所得^[9]。PD-L1 或 Cbl-b 阳性患者的判断标准根据肿瘤比例评分 (tumor proportion score, TPS)^[10-11],TPS = (可见 PD-L1 或 Cbl-b 阳性肿瘤细胞数/所有可见肿瘤细胞数) × 100%,若 TPS ≥ 1% 为阳性,TPS < 1% 为阴性。

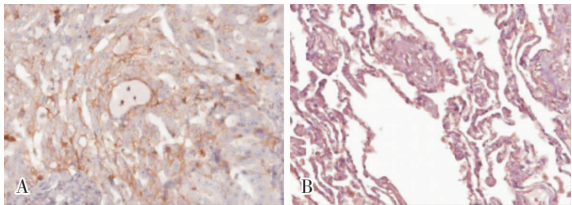
1.5 随访与资料采集 患者均接受手术治疗,随访方式包括定期复查、电话随访及家庭随访,末次随访日期为 2014 年 8 月 20 日,中位随访时间为 47 个月,生存时间以月为单位,总生存期 (overall survival, OS)指患者从确诊之日起至死亡或末次随访时间。

1.6 统计学处理 应用 SAS 9.3 软件和 R 软件进行统计分析。肿瘤组织中 PD-L1 和 Cbl-b 表达水平与患者的临床病理特征的关系采用 χ^2 检验进行分析,PD-L1 与 Cbl-b 表达的关系采用直线相关分析,

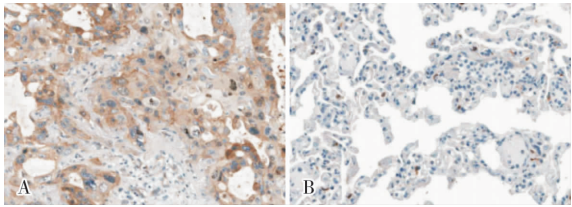
PD-L1 和 Cbl-b 表达与 OS 的关系采用 log-rank 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 方法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组织和癌旁组织中 PD-L1 和 Cbl-b 蛋白的表达 结果见图 1 和图 2。NSCLC 组织中 PD-L1 和 Cbl-b 阳性表达率分别为 72.73% (120/165)、38.79% (64/165),癌旁组织中 PD-L1 和 Cbl-b 阳性表达率均为 7.88% (13/165);NSCLC 组织中 PD-L1 和 Cbl-b 阳性表达率显著高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.292、3.076, P < 0.05$)。



A: NSCLC 组织;B: 癌旁组织。
图 1 NSCLC 组织和癌旁组织中 PD-L1 蛋白的表达 (免疫组织化学, ×200)
Fig. 1 Expression of PD-L1 protein in NSCLC and paracancerous tissues (immunohistochemistry, ×200)



A: NSCLC 组织;B: 癌旁组织。
图 2 NSCLC 组织和癌旁组织中 Cbl-b 的表达 (免疫组织化学, ×200)
Fig. 2 Expression of Cbl-b protein in NSCLC and paracancerous tissues (immunohistochemistry, ×200)

2.2 PD-L1 和 Cbl-b 表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系 结果见表 1。PD-L1 蛋白表达与 NSCLC 患者的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤直径、阳性淋巴结数、病理类型及病理分级无关 ($P > 0.05$)。Cbl-b 蛋白表达与 NSCLC 患者的性别及肿瘤病理类型有关 ($P < 0.05$),与患者的年龄、肿瘤分期、肿瘤直径、阳性淋巴结数及病理分级无关 ($P > 0.05$)。

表 1 PD-L1 和 Cbl-b 的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship between the expression of PD-L1,Cbl-b and clinicopathological characteristics of NSCLC patients

临床病理因素	n	PD-L1		χ^2	P	Cbl-b		χ^2	P
		阴性/例(%)	阳性/例(%)			阴性/例(%)	阳性/例(%)		
年龄									
≥65 岁	100	31(31.00)	69(69.00)	1.778	0.182	65(65.00)	35(35.00)	1.534	0.216
<65 岁	65	14(21.54)	51(78.46)			36(55.38)	29(44.62)		
性别									
男	46	13(28.26)	33(71.74)	0.031	0.859	21(45.65)	25(54.35)	6.504	0.011
女	119	32(26.89)	87(73.11)			80(67.23)	39(32.77)		
肿瘤分期									
I ~ II 期	118	34(28.81)	84(71.19)	0.500	0.481	76(64.41)	42(35.59)	1.781	0.185
III ~ IV 期	47	11(23.40)	36(76.60)			25(53.19)	22(46.81)		
肿瘤直径									
≤3 cm	57	18(31.58)	39(68.42)	0.814	0.367	37(64.91)	20(35.09)	0.502	0.479
>3 cm	108	27(25.00)	81(75.00)			64(59.26)	44(40.74)		
阳性淋巴结数									
<2 个	125	32(25.60)	93(74.40)	0.727	0.394	80(64.00)	45(36.00)	1.688	0.194
≥2 个	40	13(32.50)	27(67.50)			21(52.5)	19(47.50)		
病理类型									
腺癌	90	24(26.67)	66(73.33)	0.037	0.848	38(42.22)	52(57.78)	30.073	0.000
鳞状细胞癌	75	21(28.00)	54(72.00)			63(84.00)	12(16.00)		
病理分级									
1 ~ 2 级	125	35(28.00)	90(72.00)	0.158	0.691	75(60.00)	50(40.00)	0.360	0.549
3 级	40	10(25.00)	30(75.00)			26(65.00)	14(35.00)		

2.3 NSCLC 组织中 PD-L1 与 Cbl-b 蛋白表达的相关性 NSCLC 组织中 PD-L1 和 Cbl-b 蛋白表达呈直线关系 ($R^2 = 0.075, P < 0.01$), 其模型为 $y = 21.464\ 93 + 0.532\ 65x$ 。

2.4 PD-L1 和 Cbl-b 蛋白表达与 NSCLC 患者预后的关系 结果见图 3 和图 4。PD-L1 蛋白高表达患者 29 例, 中位 OS 为 45.0 个月; 低表达患者 136 例, 中位 OS 为 52.0 个月; PD-L1 蛋白高表达与低表达 NSCLC 患者的中位 OS 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。75 例鳞状细胞癌患者中, PD-L1 蛋白高表达患者 21 例, 中位 OS 为 45.0 个月; 低表达患者 54 例, 中位 OS 为 81.0 个月; PD-L1 蛋白高表达的鳞状细胞癌患者的中位 OS 显著短于低表达患者 ($P < 0.05$)。90 例腺癌患者中, PD-L1 高表达患者 8 例, 中位 OS 为 50.0 个月; 低表达患者 82 例, 中位 OS 为 39.0 个月; PD-L1 高表达与低表达腺癌患者的中位 OS 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Cbl-b 蛋白高表达患者 31 例, 中位 OS 为 39.0 个月; 低表达患者 134 例, 中位 OS 为 54.5 个月; Cbl-b 蛋白高表达患者的中位 OS 显著短于低表达患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

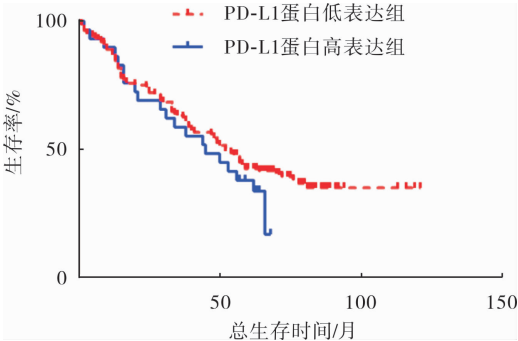


图 3 PD-L1 蛋白表达与 NSCLC 患者生存期的关系
Fig. 3 Relationship between the expression of PD-L1 protein and OS of NSCLC patients

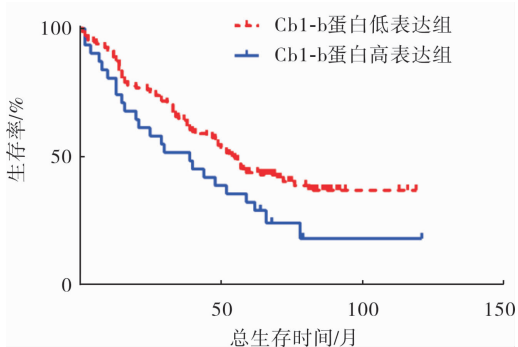


图 4 Cbl-b 蛋白表达与 NSCLC 患者生存期的关系
Fig. 4 Relationship between the expression of Cbl-b protein and OS of NSCLC patients

3 讨论

免疫治疗是目前肿瘤治疗的重要手段,可以显著提高 NSCLC 患者的生存时间,其主要机制是将免疫检测点基因作为治疗靶点。PD-1/PD-L1 是重要的靶点之一^[12-13],然而,目前 PD-L1 在 NSCLC 中的作用尚未明确。一项对 293 例 NSCLC 患者的研究显示,总体人群中 PD-L1 蛋白表达与预后无显著相关性,但是,PD-L1 蛋白表达阳性且淋巴结阴性的肺癌患者预后较差;PD-L1 阳性在腺癌和男性有吸烟史的患者中更常见,PD-L1 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞在鳞状细胞癌和肺大细胞癌更常见^[14]。另外一项对 522 例 NSCLC 患者的研究显示,总体人群中 PD-L1 表达与 OS 无显著相关性,然而经过多变量分析,在纵隔淋巴结转移的患者中,PD-L1 强阳性与患者无复发生存时间及 OS 显著缩短相关^[8]。SUN 等^[15]检测 1 070 例 NSCLC 术后病理标本中 PD-L1 蛋白表达情况,发现 PD-L1 阳性细胞率仅为 44%,ⅢB/Ⅳ期 NSCLC 及鳞状细胞癌患者 PD-L1 阳性细胞率较高,PD-L1 表达强阳性与 OS 较短相关;在Ⅰ期患者中,PD-L1 高表达患者的复发率显著高于低表达患者。因此,PD-L1 在 NSCLC 组织中的表达及临床意义仍有待于进一步研究。

本研究结果显示,NSCLC 组织中 PD-L1 和 Cbl-b 阳性表达率显著高于癌旁组织,PD-L1 蛋白表达与 NSCLC 患者的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤直径、阳性淋巴结数、病理类型及病理分级无关,Cbl-b 蛋白表达与 NSCLC 患者的性别及肿瘤病理类型有关,且 Cbl-b 蛋白高表达患者的中位 OS 显著短于低表达患者;NSCLC 组织中 PD-L1 蛋白表达与患者的中位 OS 无显著相关性,但是,PD-L1 蛋白高表达的鳞状细胞癌患者的中位 OS 显著短于低表达患者,PD-L1 高表达与低表达腺癌患者的中位 OS 比较差异无统计学意义;另外,NSCLC 组织中 PD-L1 和 Cbl-b 蛋白表达呈直线关系;提示二者可能存在共同表达,参与肿瘤的局部免疫调节,但尚有待进一步细胞学研究证实。

综上所述,Cbl-b 蛋白和 PD-L1 蛋白在 NSCLC 组织中呈高表达;Cbl-b 蛋白表达情况与 NSCLC 患者的性别、病理类型及 OS 有关;PD-L1 蛋白表达与鳞状细胞癌患者的生存期有相关性,但 PD-L1 蛋白表达与腺癌患者的生存期无相关性;PD-L1 与 CBLB 蛋白表达呈直线相关。本研究为进一步研究 Cbl-b 基因作为 NSCLC 潜在的免疫治疗靶点提供了临床数据支持。

参考文献:

[1] OKAZAKI T,HONJO T. PD-1 and PD-1 ligands;from discovery to clinical application[J]. *Int Immunol*,2007,19(7):813-824.

[2] FREEMAN G J, LONG A J, IWAI Y, *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation[J]. *J Exp Med*,2000,192(7):1027-1034.

[3] ZHOU G W, XIONG Y, CHEN S, *et al.* Anti-PD-1/PD-L1 antibody therapy for pretreated advanced nonsmall-cell lung cancer; a meta-analysis of randomized clinical trials[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016,95(35):e4611.

[4] PAOLINO M, THIEN C B, GRUBER T, *et al.* Essential role of E3 ubiquitin ligase activity in Cbl-b-regulated T cell functions[J]. *J Immunol*,2011,186(4):2138-2147.

[5] TRAVIS W D, HARRIS C. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart[M]. Lyon: IARC Press, 2004: 53-58.

[6] GREENE F L. The American Joint Committee on Cancer; updating the strategies in cancer staging[J]. *Bull Am Coll Surg*,2002,87(7):13-15.

[7] SUN Z, AUBRY M C, DESCHAMPS C, *et al.* Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer; an analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2006,131(5):1014-1020.

[8] AMERATUNGA M, ASADI K, LIN X, *et al.* PD-L1 and tumor infiltrating lymphocytes as prognostic markers in resected NSCLC [J]. *PLoS One*,2016,11(4):e0153954.

[9] LEPIKHOVA T, KARHEMO P R, LOUHIMO R, *et al.* Drug sensitivity screening and genomic characterization of 45 HPV-negative head and neck carcinoma cell lines for novel biomarkers of drug efficacy[J]. *Mol Cancer Ther*,2018,17(9):2060-2071.

[10] ROACH C, ZHANG N, CORIGLIANO E, *et al.* Development of a companion diagnostic PD-L1 immunohistochemistry assay for pembrolizumab therapy in non-small-cell lung cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*,2016,24(6):392-397.

[11] GANDHI L, RODRIGUEZ-ABREU D, GADGEEL S, *et al.* Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer[J]. *N Engl J Med*,2018,378(22):2078-2092.

[12] LITTMAN D R. Releasing the brakes on cancer immunotherapy [J]. *Cell*,2015,162(6):1186-1190.

[13] MITCHELL P L, JOHN T. Lung cancer in 2016; immunotherapy comes of age[J]. *Lancet Respir Med*,2016,4(12):947-949.

[14] STERLACCI W, FIEGL M, DROESER R A, *et al.* Expression of PD-L1 identifies a subgroup of more aggressive non-small cell carcinomas of the lung[J]. *Pathobiology*,2016,83(5):267-275.

[15] SUN J M, ZHOU W, CHOI Y L, *et al.* Prognostic significance of PD-L1 in patients with non-small cell lung cancer; a large cohort study of surgically resected cases[J]. *J Thorac Oncol*,2016,11(7):1003-1011.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)