文章编号:1000-5404(2010)11-1173-04

论著

人子宫颈癌 PD-L1 的表达及其与肿瘤内浸润 T 细胞的相关性研究

王渝琦[1],徐光旭[1],耿卫朴[1],唐均英[2],徐 曼[1] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院病理学教研室,分子医学与肿瘤研究中心[1],附属第一医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 观察负性免疫调节分子程序性死亡配体1(programmed death receptor-ligand 1,PD-L1)在人子宫颈癌的表达及其与肿瘤内T淋巴细胞浸润的关系。**方法** 免疫组织化学染色观察5例正常宫颈组织、7例高级别宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia,CINⅡ-Ⅲ)组织和67例子宫颈癌组织中PD-L1的表达和淋巴细胞PD-1的表达,免疫荧光染色观察相应组织内浸润的$CD4^+$T和$CD8^+$T细胞数量,TUNEL法检测淋巴细胞凋亡。**结果** 正常子宫颈上皮不表达PD-L1;宫颈瘤变上皮不表达或弱阳性表达PD-L1,70%(47/67)的宫颈癌表达PD-L1。肿瘤内浸润的部分淋巴细胞表达PD-1。子宫颈瘤变上皮与子宫颈鳞状细胞癌PD-L1表达存在明显差异($P<0.01$),浅表浸润的子宫颈鳞状细胞癌PD-L1的表达略低于深部浸润的鳞状细胞癌,但无显著差异;PD-L1阳性病例肿瘤局部$CD8^+$T细胞数量显著减少,且PD-L1表达与$CD8^+$T细胞数量明显负相关($r=-0.82$,$P<0.01$),但与肿瘤局部$CD4^+$T细胞数量无明显相关性($r=-0.05$,$P>0.05$);部分PD-L1阳性的子宫颈癌局部浸润的淋巴细胞存在凋亡现象。**结论** 子宫颈癌细胞表达PD-L1,且PD-L1的表达与肿瘤局部浸润的$CD8^+$T细胞数量减少有关,但与浸润的$CD4^+$T细胞数量无关。癌细胞表达PD-L1可能促进了肿瘤内浸润的淋巴细胞凋亡。

[关键词] 子宫颈癌;PD-L1;$CD4^+$T cell;$CD8^+$T cell;凋亡
[中图法分类号] R737.33; R392.11; R392.3 **[文献标志码]** A

Expression of programmed death receptor-ligand 1 in human cervical carcinoma and its correlation with tumor infiltrating T cells

Wang Yuqi[1], Xu Guangxu[1], Geng Weipu[1], Tang Junying[2], Xu Man[1] ([1]Department of Pathology, Molecular Medicine and Tumor Research Center, [2]Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To observe the expression of programmed death receptor-ligand 1 (PD-L1) in human cervical carcinoma and its correlation with tumor T cell infiltration. **Methods** Expression of PD-L1 and PD-1 was detected in 5 normal cervical tissue samples, 7 high-level cervical intraepithelial neoplasia (CIN Ⅱ-Ⅲ) tissue samples and 67 cervical carcinoma tissue samples, respectively, with immunohistochemistry staining. The number of tumor infiltrating $CD4^+$T and $CD8^+$T cells was counted with immunofluorescent staining. Apoptotic tumor infiltration lymphocytes were examined by TUNEL assay. **Results** PD-L1 was not expressed in normal cervical epithelium and negatively or weakly expressed in cancerous cervical epithelium. PD-L1 was expressed in 70% (47/67) of cervical carcinoma tissue samples. PD-1 was expressed in partial tumor infiltrating lymphocytes ($P<0.01$). The expression level of PD-L1 was slightly lower in superficial invasive cervical carcinoma tissue samples than in deep invasive carcinoma tissue samples. The number of $CD8^+$T cells was significantly decreased in patients with positive PD-L1. The expression of PD-L1 was negatively correlated with the number of tumor infiltrating $CD8^+$T cells ($r=-0.82$, $P<0.01$) but not with the number of $CD4^+$T cells ($r=-0.05$, $P>0.05$). Apoptosis occurred in partial tumor infiltrating lymphocytes of cervical carcinoma tissue samples. **Conclusion** PD-L1 is expressed in cervical carcinoma cells. The expression of PD-L1 is correlated with the reduced number of tumor infiltrating $CD8^+$T cells but not with the number of $CD4^+$T cells. PD-L1 expression in tumor cells may play role in apoptosis of tumor infiltrating lymphocytes.

[Key words] cervical carcinoma;programmed death receptor-ligand 1;$CD4^+$T cell;$CD8^+$T cell;apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC, 2009BB526). Corresponding author: Xu Man, E-mail:manxucqmu08@yahoo.cn

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB526)
[通信作者] 徐 曼,E-mail:manxucqmu08@yahoo.cn

研究发现部分子宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia,CIN)和宫颈癌患者局部免疫水平低下,宫颈癌病灶内出现耐受性树突状细胞、调节T细胞(Tregs)和丧失了免疫功能的细胞毒性T($CD8^+$ T)细胞而使肿瘤细胞逃避宿主的特异性抗肿瘤免疫[1,2];而且肿瘤内浸润的$CD8^+$ T细胞数量与患者的预后密切相关[3]。

$CD8^+$ T细胞的激活除了通过T细胞受体识别MHC分子提呈的肿瘤抗原外,还需要协同刺激信号。近年来研究发现程序性死亡配体1(programmed death receptor-ligand 1,PD-L1)提供负性刺激信号抑制T细胞免疫。文献报道多种恶性肿瘤如卵巢癌、乳腺癌、胃癌表达PD-L1,该分子通过与活化淋巴细胞的程序性死亡1(programmed death-1, PD-1)分子结合,直接参与抑制T细胞的抗肿瘤免疫[4,5];肿瘤病灶内浸润的$CD8^+$ T细胞和$CD4^+$ T细胞表达PD-1, PD-L1与PD-1结合诱导T细胞凋亡,从而使瘤细胞逃避宿主的抗肿瘤免疫[6,7];PD-L1的表达不仅与肿瘤局部浸润的$CD8^+$ T细胞减少有关,也与肿瘤进展快、肿瘤浸润转移、患者预后差有关[8]。本研究观察子宫颈瘤变上皮和子宫颈癌细胞PD-L1的表达、病灶内浸润淋巴细胞PD-1的表达,PD-L1表达与局部$CD4^+$ T和$CD8^+$ T细胞浸润的关系,以及PD-L1对肿瘤内浸润淋巴细胞凋亡的影响。

1 资料与方法

1.1 资料与试剂

收集重庆医科大学附属第一医院2008-2009年妇科住院患者的正常子宫颈组织5例,高级别CIN(CINⅡ-Ⅲ级)组织7例(平均年龄41岁),子宫颈癌67例(鳞状细胞66例,腺癌1例,平均年龄44岁)。将上述组织的5 μm石蜡切片分别进行PD-L1和PD-1免疫组织化学、$CD4^+$ T及$CD8^+$ T细胞免疫荧光和TUNEL细胞凋亡原位检测。兔抗人PD-L1、PD-1(博奥生物),免疫组化试剂盒(北京中杉金桥),鼠抗人FITC-CD4(中杉金桥)和FITC-CD8抗体(博奥生物),TUNEL试剂盒(凯基生物)。

1.2 免疫组织化学染色

组织切片脱蜡至水后3% H_2O_2室温孵育(37 ℃)15 min,经枸橼酸盐溶液微波加热修复抗原后SP9000A液37 ℃孵育15 min,分别滴加兔抗PD-L1、PD1(1∶50,1∶100)4 ℃冰箱孵育过夜,再用SP9000B和SP9000C液37 ℃孵育切片后滴加DAB显色。上述每步后PBS清洗3次。

1.3 免疫荧光染色

组织脱蜡至水后用枸橼酸盐溶液微波加热修复抗原,经0.3%的H_2O_2室温孵育10 min后,SP9000A液37 ℃孵育15 min,再分别加入鼠抗人CD4(1∶40)或鼠抗人CD8(1∶50)4 ℃冰箱孵育过夜,FITC标记抗鼠抗体(1∶50)37 ℃避光孵育1 h后,PBS清洗并用甘油封片,荧光显微镜观察。

1.4 TUNEL细胞凋亡原位检测

每张切片加50 μl TdT酶反应液37 ℃避光反应60 min,PBS清洗后滴加Streptavidin-HRP工作液50 μl,37 ℃避光反应30 min并经PBS清洗后滴加DAB显色。

1.5 统计学分析

每一张切片400倍镜下并采集5个不重叠视野,采用Image -proplus图像分析软件进行分析。图像分析结果IA所得数据分5个等级并记0~5分,得到相对积分光密度平均分值,再用SPSS11.5统计软件进行统计学分析。PD-L1与$CD4^+$ T及$CD8^+$ T细胞数量的相关性采用Bivariate Correlation相关性分析,各组数据值以$\bar{x} \pm s$表示,均数间差异采用t检验或单因素方差分析。

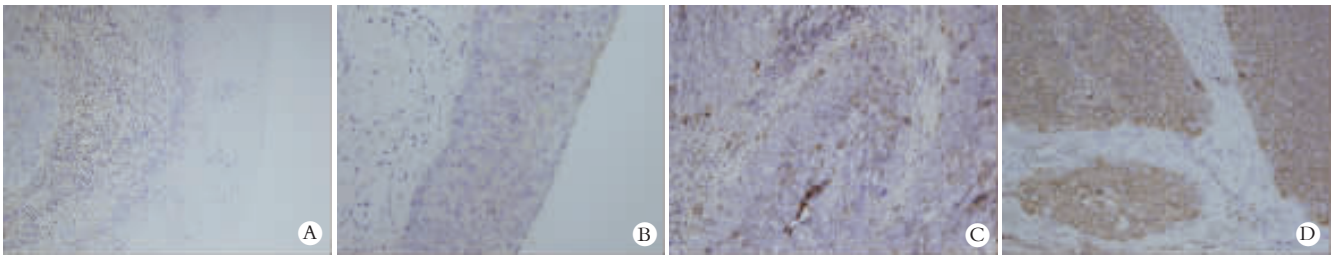
2 结果

2.1 PD-L1在瘤变子宫颈上皮和子宫颈癌细胞表达

正常子宫颈上皮不表达PD-L1, CINⅡ~Ⅲ级的瘤变宫颈上皮不表达或弱阳性表达PD-L1,其相对积分光密度平均值为(0.82±0.75);70%(47/67)子宫颈癌表达PD-L1,浅表浸润(浸润深度<0.5 cm)和深部浸润的子宫颈鳞状细胞癌PD-L1的相对积分光密度平均值分别为(2.70±1.68)和(2.90±1.72),且39%(26/67)的子宫颈癌(尤其是深部浸润的)强阳性表达PD-L1。子宫颈瘤变上皮与浅表浸润的宫颈鳞状细胞癌和深部浸润的宫颈鳞状细胞癌的PD-L1表达存在明显差异($P<0.05$, $P<0.01$),且部分病例少量间质细胞表达PD-L1(图1)。

2.2 CIN和宫颈癌病灶内浸润的淋巴细胞表达PD-1

免疫组化染色结果显示CIN病灶中瘤变上皮内浸润的个别淋巴细胞和部分间质内浸润的淋巴细胞表达PD-1;宫颈癌癌巢内浸润的个别淋巴细胞以及部分间质内浸润的淋巴细胞表达PD-1(图2)。



A:正常子宫颈(×100);B:CINⅢ(×400);C:浅表浸润的子宫颈鳞状细胞癌(×200);D:深部浸润的子宫颈鳞状细胞癌(×200)

图1 免疫组化检测PD-L1在正常子宫颈上皮、CINⅢ和子宫颈癌的表达 (S-P)

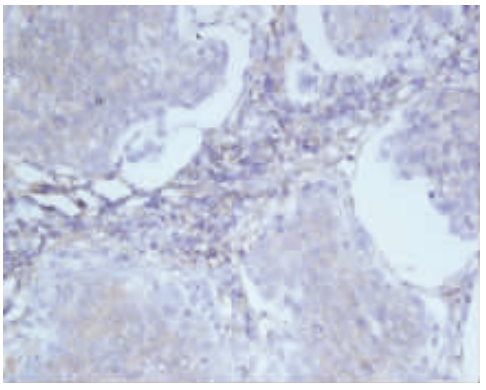


图 2 免疫组化检测 PD-1 在宫颈癌内浸润淋巴细胞的表达 （S-P ×400）

2.3 高级别 CIN 和子宫颈癌局部 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞的浸润

免疫荧光染色结果显示高级别 CIN 瘤变上皮内偶见 CD8⁺T 细胞浸润，间质内大量 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞浸润；浅表浸润的子宫颈癌间质内大量淋巴细胞浸润，癌巢内及其边缘每 5 个高倍视野 CD4⁺T 细胞的平均数为（2.60 ± 0.49）；CD8⁺T 细胞在癌巢内及其边缘浸润明显，每 5 个高倍视野 CD8⁺T 细胞的平均数为（9.10 ± 4.99）；深部浸润的鳞状细胞癌癌巢及其边缘浸润的淋巴细胞数量明显减少（图 3）。

2.4 高级别 CIN 和子宫颈癌局部淋巴细胞凋亡

TUNEL 法检测结果显示高级别 CIN 上皮层及间质内未见明显淋巴细胞凋亡；40%（4/10）PD-L1 阳性的子宫颈癌癌巢内及间质淋巴细胞存在凋亡现象；尤其在 PD-L1 高表达（3.5 ~ 5 分）的病例淋巴细胞凋亡更明显；PD-L1 阴性宫颈癌病例癌巢内及间质未见淋巴细胞凋亡（图 4）。

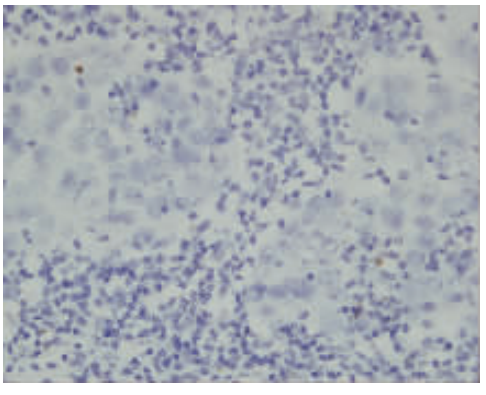


图 4 免疫组化检测子宫颈癌浸润淋巴细胞的凋亡 （TUNEL ×400）

2.5 PD-L1 表达与局部 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞浸润的相关性

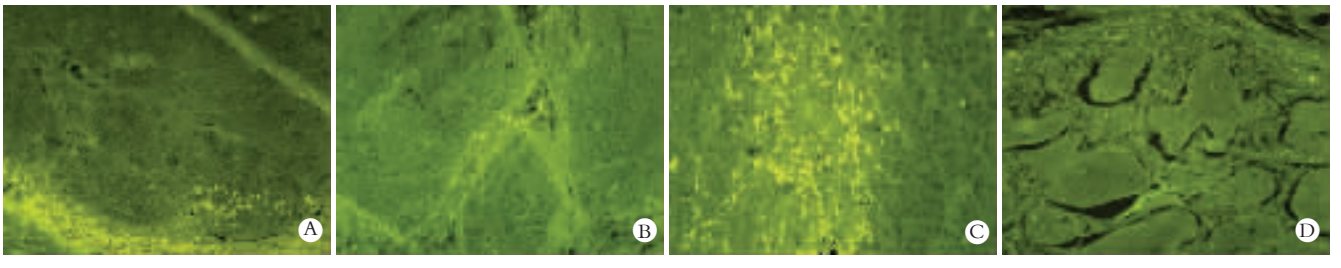
Bivariate Correlation 相关性分析结果显示子宫颈癌细胞 PD-L1 的表达与癌巢及其边缘浸润的 CD8⁺T 细胞数量减少显著相关（$r = -0.82$，$P < 0.01$），但 PD-L1 的表达与癌巢及其边缘浸润的 CD4⁺T 细胞数量无明显相关性（$P > 0.05$）（表 1）。

表 1 PD-L1 与 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞浸润的相关性分析

细胞	癌巢内浸润情况	n	PD-L1			r	P
			阴性	弱阳	强阳		
CD8⁺T 细胞	无浸润	3	0	0	3	−0.82	<0.01
	个别浸润	15	1	1	13		
	较多浸润	12	3	4	5		
CD4⁺T 细胞	无浸润	0	0	0	0	−0.05	>0.05
	个别浸润	20	3	3	14		
	较多浸润	10	0	5	5		

3 讨论

宫颈局部免疫水平低下使瘤变的宫颈上皮不能被免疫清除是子宫颈癌发生发展的重要原因。宫颈局部微环境免疫功能下降与多种因素有关[9]。因近期研究发现多种恶性肿瘤表达 PD-L1 与肿瘤内浸润的 CD8⁺T 减少有关[10]，我们首先观察了高级别 CIN 瘤变上皮和宫颈癌细胞 PD-L1 的表达情况，结果显示高级别 CIN 病例瘤变上皮不表达或微弱表达 PD-L1；70% 的宫颈癌病例表达 PD-L1，而且 PD-L1 的表达与癌组织的浸润深度存在关系，即浅表浸润的宫颈癌弱阳性表达 PD-L1，而深部浸润的宫颈癌多强阳性表达 PD-L1，同一病例中浅表浸润的癌细胞 PD-L1 的表达强度也低于深部浸润的癌细胞。Wu 等[11]也发现胃癌细胞表达 PD-L1 与肿瘤的浸润深度有关。此外，PD-L1 也表达于部分病例的少数间质细胞。本研究中发现宫颈癌细胞 PD-L1 的表达阳性表达率（70%）明显高于 Karim 等[12]报道的宫颈癌 PD-L1 阳性率（19%），其原因可能与选择的宫颈癌病例多为浅表浸润癌以及采用组织芯片染色所观察的范围局限有关。



A：浅表浸润宫颈鳞癌内 CD4⁺T 细胞（×200）；B：深部浸润宫颈鳞癌内 CD4⁺T 细胞（×200）；C：浅表浸润宫颈鳞癌内 CD8⁺T 细胞（×400）；D：深部浸润宫颈鳞癌内 CD8⁺T 细胞（×200）

图 3 免疫荧光观察子宫颈癌 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞浸润 （荧光显微镜）

研究中观察到高级别 CIN 的 PD-L1 表达与否与瘤变上皮及间质内浸润的淋巴细胞无明显关系;浅表浸润的宫颈癌 PD-L1 表达微弱,癌巢及间质内淋巴细胞浸润明显;而深部浸润的宫颈癌 PD-L1 表达强,癌巢及间质内极少淋巴细胞浸润。文献[13]报道 PD-L1 与活化 T 细胞的 PD-1 结合而发挥免疫负调节作用。我们对高级别 CIN 和宫颈癌病灶内浸润淋巴细胞进行 PD-1 免疫组化染色后,发现 CIN 病灶中瘤变上皮内和间质浸润的部分淋巴细胞表达 PD-1;宫颈癌癌巢和间质内浸润的部分淋巴细胞也表达 PD-1,提示瘤细胞可能通过 PD-L1/PD-1 途径负性调节局部的免疫水平。因 T 淋巴细胞在抗病毒感染和抗肿瘤免疫中发挥关键作用,我们对高级别 CIN 和宫颈癌病灶内 $CD4^+$T 和 $CD8^+$T 细胞浸润进行了免疫荧光染色观察,结果发现高级别 CIN 瘤变上皮内浸润的 $CD4^+$T 和 $CD8^+$T 细胞极少,而间质内浸润的 $CD4^+$T 和 $CD8^+$T 细胞较多;浅表浸润的宫颈癌间质内大量 T 细胞浸润,癌巢内和癌巢边缘浸润的 $CD8^+$T 较多,而 $CD4^+$T 细胞主要分布于癌间质;深部浸润的宫颈癌癌巢及间质内浸润的 $CD8^+$T 和 $CD4^+$T 细胞数量均明显减少。与 Monnier-Benoit 等[14]的研究结果一致。因肿瘤内浸润的 $CD8^+$T 细胞数量是估计宫颈癌患者预后的独立因素[15],我们进一步对 PD-L1 与癌巢内浸润的 $CD8^+$T 细胞进行统计学相关分析,结果显示宫颈癌细胞表达 PD-L1 与癌巢内浸润的 $CD8^+$T 细胞减少明显相关,该结果与 Hamanishi[10]观察到人卵巢癌 PD-L1 表达与肿瘤浸润的 $CD8^+$T 负相关的结果一致。癌细胞表达 PD-L1 导致浸润的 $CD8^+$T 减少可能与癌细胞的PD-L1 与活化 $CD8^+$T 细胞膜上的 PD-1 结合后,该分子细胞质区尾部的免疫受体酪氨酸抑制基序下调 CD3/CD28 诱导的 PI3K/Akt 激酶活性,同时也下调凋亡抑制基因 Bcl-xL 的转录,从而抑制 T 细胞增殖和功能并促进其凋亡[16]。由于表达 PD-1 的 T 细胞凋亡是肿瘤免疫逃逸的原因之一,我们观察了宫颈癌细胞表达 PD-L1 与肿瘤内浸润淋巴细胞凋亡的关系,结果发现部分 PD-L1 阳性的宫颈癌病例(4/10)癌巢和间质内部分淋巴细胞发生了凋亡,故我们推测癌巢及癌巢边缘浸润的 $CD8^+$T 细胞减少可能与 PD-L1/PD-1 途径促进其凋亡有关。

参考文献:

[1] Jayshree R S, Sreenivas A, Tessy M, *et al*. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis[J]. Indian J Med Res, 2009, 130(3): 286 - 295.

[2] 陈明, 林仲秋. HPV 感染致宫颈癌的免疫逃避机制[J]. 国外医学: 妇产科学分册, 2007, 34(1): 50 - 53.

[3] Piersma S J, Jordanova E S, van-Poelgeest M I, *et al*. High number of intraepithelial CD8 + tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 354 - 361.

[4] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, *et al*. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(19): 12293 - 12297.

[5] Inman B A, Frigola X, Dong H, *et al*. Costimulation, coinhibition and cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7(1): 15 - 30.

[6] Dong H, Strome S E, Salomao D R, *et al*. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion [J]. Nat Med, 2002, 8(8): 793 - 800.

[7] Thompson R H, Dong H, Lohse C M, *et al*. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6): 1757 - 1761.

[8] Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, *et al*. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors[J]. Neoplasia, 2006, 8(3): 190 - 198.

[9] Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, *et al*. FOXP3 + Tregs and B7-H1 +/PD-1 + T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 57.

[10] 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 U S A, 2007, 104(9): 3360 - 3365.

[11] Wu C, Zhu Y, Jiang J, *et al*. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance[J]. Acta Histochem, 2006, 108(1): 19 - 24.

[12] Karim R, Jordanova E S, Piersma S J, *et al*. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1 + T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(20): 6341 - 6347.

[13] Keir M E, Francisco L M, Sharpe A H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(3): 309 - 314.

[14] Monnier-Benoit S, Mauny F, Riethmuller D, *et al*. Immunohistochemical analysis of CD4 + and CD8 + T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix[J]. Gynecol Oncol, 2006, 102(1): 22 31.

[15] Jordanova E S, Gorter A, Ayachi O, *et al*. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8 +/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(7): 2028 - 2035.

[16] Parry R V, Chemnitz J M, Frauwirth K A, *et al*. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21): 9543 - 9553.

(**收稿**:2010-03-28;**修回**:2010-04-08)

(编辑 栾 嘉)