DOI:10.16016/j.1000-5404.201607095

PD-L1 和 APE1 在早期宫颈鳞癌中的表达及临床意义

段 威,隋江东,李 清,李梦侠,杨宇馨,何 乐,程仕光,王 东 (400038 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 探讨早期宫颈鳞癌组织中程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1,PD-L1)和脱嘌呤/脱嘧啶内切核酸酶 1(apurinic/apyrimidinic endonuclease1,APE1)的表达与临床特征及预后的关系。**方法** 采用免疫组织化学的方法(IHC)检测 PD-L1 和 APE1 蛋白在 64 例早期宫颈鳞癌组织中的表达,分析 PD-L1、APE1 表达以及两者共表达与早期宫颈癌临床特征的关系;采用 Spearman 等级相关分析检测 APE1 与 PD-L1 表达的相关性,Kaplan-Meier 法分析早期宫颈鳞癌患者中 APE1 与 PD-L1 的表达与术后生存的关系,Cox 回归模型分析早期宫颈鳞癌患者预后的危险因素。**结果** 早期宫颈癌患者 APE1 和 PD-L1 蛋白表达阳性率分别为 70.31% 和 67.18%。PD-L1 的表达与分期、淋巴结转移有显著相关性($P<0.05$),而 APE1 的表达仅与淋巴结转移密切相关($P=0.038$)。另外,APE1 与 PD-L1 的表达正相关($r^2=0.347$, $P=0.005$),且两者共表达与淋巴结转移相关,其术后生存期比单一阳性表达的宫颈癌患者明显缩短 ($P<0.05$)。多因素 COX 回归模型结果显示,APE1 的表达和淋巴结转移是影响早期宫颈鳞癌预后的独立危险因素,危险度分别为 16.187($P=0.01$)和 27.340($P<0.001$)。**结论** PD-L1 和 APE1 表达的联合检测对早期宫颈鳞癌预后评估具有潜在的临床价值。

[关键词] 早期宫颈鳞癌;程序性死亡配体-1;脱嘌呤/脱嘧啶内切核酸酶 1
[中图法分类号] R345; R730.23; R737.33 [文献标志码] A

Expression and clinical significance of APE1 and PD-L1 in early stage cervical squamous cell carcinoma

Duan Wei, Sui Jiangdong, Li Qing, Li Mengxia, Yang Yuxin, He Le, Cheng Shiguang, Wang Dong (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression levels of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and programmed death ligand-1 (PD-L1) in early stage cervical squamous cell carcinoma and explore their clinical significance. **Methods** Immunohistochemical staining was applied to detect the expression of APE1 and PD-L1 in 64 samples of early stage cervical squamous cell carcinoma. The correlation of their expression with clinicopathological features of the patients with cervical cancer was analyzed. Spearman rank correlation analysis was used to study the correlation between APE1 expression and PD-L1expression, Kaplan-Meier survival analysis to evaluate the impact of APE1 and PD-L1 expression on postoperative survival of the patients, and Cox univariate and multivariate prognostic analysis to explore the prognostic factors of the patients. **Results** The positive rate of APE1 was 70.31%, and that of PD-L1 was 60.18% in the 64 samples. The expression of PD-L1 was closely correlated with the stage of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) and lymphatic metastasis ($P<0.05$), and the expression of APE1 expression was closely correlated with lymphatic metastasis ($P=0.038$). Spearman rank correlation analysis indicated that the expression of APE1 was positively correlated with that of PD-L1 ($r^2=0.347$, $P=0.005$), and their co-expression was closely correlated with lymphatic metastasis, and the survival time was obviously shorter in those with co-expression than those with single expression ($P<0.05$). Multivariate Cox analysis

[通信作者] 王 东,E-mail:dongwang64@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161021.1700.024.html

revealed that the expression of APE1 and lymphatic metastasis were independent risk factors for the prognosis of the patients with early stage cervical squamous cell carcinoma (Hazard ratio = 16.187, $P = 0.01$; Hazard ratio = 27.340, $P < 0.001$). **Conclusion** Combinatorial detection of APE1 and PD-L1 is of potential value for the prognosis evaluation of early stage cervical squamous cell carcinoma.

[**Key words**] early stage cervical squamous cell carcinoma; programmed death ligand-1; apurinic/apyrimidinic endonuclease 1

Correspondence authors: Wang Dong, E-mail: dongwang64@hotmail.com

宫颈癌是50岁以上女性常见的生殖系统恶性肿瘤。我国宫颈癌发病率和病死率约占全世界的1/3[1-2]。ⅠB和ⅡA期宫颈癌盆腔淋巴结转移率分别为12%~22%和10%~27%[3]。早期宫颈癌患者一旦有盆腔淋巴结及髂总淋巴结转移,生存时间明显降低,预后较差[4]。2011年批准了细胞毒T淋巴细胞相关抗原4(CTLA4)单抗Ipilimumab用于黑色素瘤的治疗,并于2014年批准了程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1,PD-L1)单抗Pembrolizumab、Nivolumab作为黑色素瘤治疗的优选药物。随后Ipilimumab联合同步放化疗治疗宫颈癌的一期临床试验(NCT01711515)以及Nivolumab作为复发和转移的宫颈癌患者二线治疗的二期临床试验(NCT02257528)相继进行,因此,免疫抑制相关标志物(如PD-L1等)有望成为治疗宫颈癌的新靶点。

程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1,PD-L1)为B7家族的一个成员,是由抗原呈递细胞表达,具有抑制T淋巴细胞激活的功能。PD-L1通过与其受体结合,诱导T淋巴细胞无反应性和/或凋亡[5-8]。脱嘌呤/脱嘧啶内切核酸酶1(apurinic/apyrimidinic endonuclease 1,APE1)具有DNA损伤修复功能,同时其氧化还原功能可调节很多转录因子,维持转录因子还原状态[9]。在多种肿瘤中发现APE1的过表达和在亚细胞的定位分布与肿瘤浸润,转移和化疗和放疗抵抗性有关[10-11]。已有研究表明PD-L1和APE1分别与肿瘤转移相关,提示PD-L1和APE1在肿瘤发展中发挥重要作用[12-15]。然而,早期宫颈癌中APE1和PD-L1的表达与年龄、淋巴结转移和预后之间的关系缺乏系统详细的报道。本研究检测PD-L1和APE1在早期宫颈鳞癌组织中的表达情况,分析两者之间相关性及其临床意义,为APE1与PD-L1可能存在的相互调控机制的研究提供临床依据。

1 资料与方法

1.1 病例资料及标本收集

收集2013年3月至2015年3月第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤科首次诊断为FIGO分期Ⅰ期或ⅡA期并行手术治疗的早期宫颈癌患者64例,年龄30~65岁,平均47.5岁。患者组织标本均来自病理科标本库,明确病理诊断宫颈癌鳞癌,且64例患者中39例接受了术后常规放化疗,25例术后未行任何辅助治疗。本研究获得第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会批准,遵循伦理学要求,研究对象均知情同意并书面签字。

1.2 免疫组化染色

PD-L1与APE1蛋白表达检测采用免疫组织化学S-P法。所有标本经10%的中性甲醛固定,石蜡包埋。连续4 μm切片,烘片,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,3%双氧水室温孵育10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,EDTA缓冲液高温抗原修复10 min。山羊血清室温封闭20 min后分别滴加PD-L1一抗和APE1一抗,PD-L1单抗(鼠抗)来自GeneTex;APE1多抗(兔抗)由中杉金桥公司提供;PD-L1一抗滴度为1∶100,APE1一抗滴度为1∶3 000。放入湿盒中4 ℃过夜。次日室温下复温,PBS冲洗,二抗室温孵育20 min,DAB显色,苏木精复染后脱水、中性树胶封片,镜下观察。阴性对照采用PBS替代一抗。

1.3 染色结果判定

免疫组化结果光镜下显示,阳性表达的组织呈棕色或棕黄色颗粒状,APE1表达均主要集中于细胞核,偶可见细胞浆表达,PD-L1主要为细胞浆表达。光镜下随机对10个高倍镜(×400)视野计数,共计1 000个肿瘤细胞,并分级如下:阳性细胞率<10%计为阴性,用(-)表示;阳性细胞率≥10%计为阳性,用(+)表示;阳性细胞率≥30%计为阳性,用(++)表示;阳性细胞率≥60%计为阳性,用(+++)表示。(-)及(+)代表低表达,(++)、(+++)代表高表达。

1.4 随访

64例患者全部获得随访,采用电话随访方式或者门诊方式。总生存时间定义为自手术之日起至出现与宫颈癌相关的死亡的时间。死于其他原因或在随访期内生存的病例则作为截尾事件处理。全部患者随访10~34个月,中位随访时间22个月。

1.5 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件,PD-L1和APE1表达与临床病理特征的关系采用χ^2检验,运用Spearman等级

相关分析 PD-L1 与 APE1 表达的相关性,患者生存时间使用 Kaplan - Meier 法分析,多因素分析采用 Cox 回归评估各临床病理参数对预后的相对危险度,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 早期宫颈鳞癌组织 PD-L1 和 APE1 表达与临床病理特征之间的关系

免疫组化染色显示,APE1 表达均主要集中于细胞核,偶可见细胞浆表达,PD-L1 主要为细胞浆表达(图 1)。PD-L1 的阳性率为 67.18%(43/64);APE1 的阳性率为 70.31%(45/64),见表 1。早期宫颈鳞癌组织中 PD-L1 的表达与年龄差异无统计学意义,而与分期($P=0.022$)、淋巴结转移($P=0.041$)差异有统计学意义。表明 PD-L1 表达越高,宫颈癌的恶性程度越高。APE1 在早期宫颈鳞癌中的表达与年龄以及早期宫颈癌分期无显著相关性,而与淋巴结转移差异有统计学意义($P=0.038$,表 1),说明 APE1 表达越高,患者越容易出现淋巴结转移。

2.2 早期宫颈鳞癌组织 APE1、PD-L1 表达相关性及其与术后生存时间的关系

利用 Spearman 相关分析显示,64 例早期宫颈鳞癌手术组织标本中,APE1 与 PD-L1 两者表达存在正相关($r^2=0.347$,$P=0.005$)。为了排除术后放化疗对生存的影响,将 25 例术后未行治疗的早期宫颈癌鳞癌患者分为 APE1 和 PD-L1 共阳性者 12 例,共阴性者 13 例,利用 Kaplan-Meier 生存分析显示 PD-L1 与 APE1 共阳性表达的宫颈癌患者术后中位生存期明显差于 PD-L1 和 APE1 共阴性患者($P<0.001$),中位总生存期分别为(22.000 ± 1.298)和(33.000 ± 2.864)个月(图 2)。此外,结果显示 56.2%(36/64)的宫颈癌组织共同表达 APE1 与 PD-L1,且 APE1 与 PD-L1 共表达仅与肿瘤淋巴结转移相关($P=0.047$,表 1)。

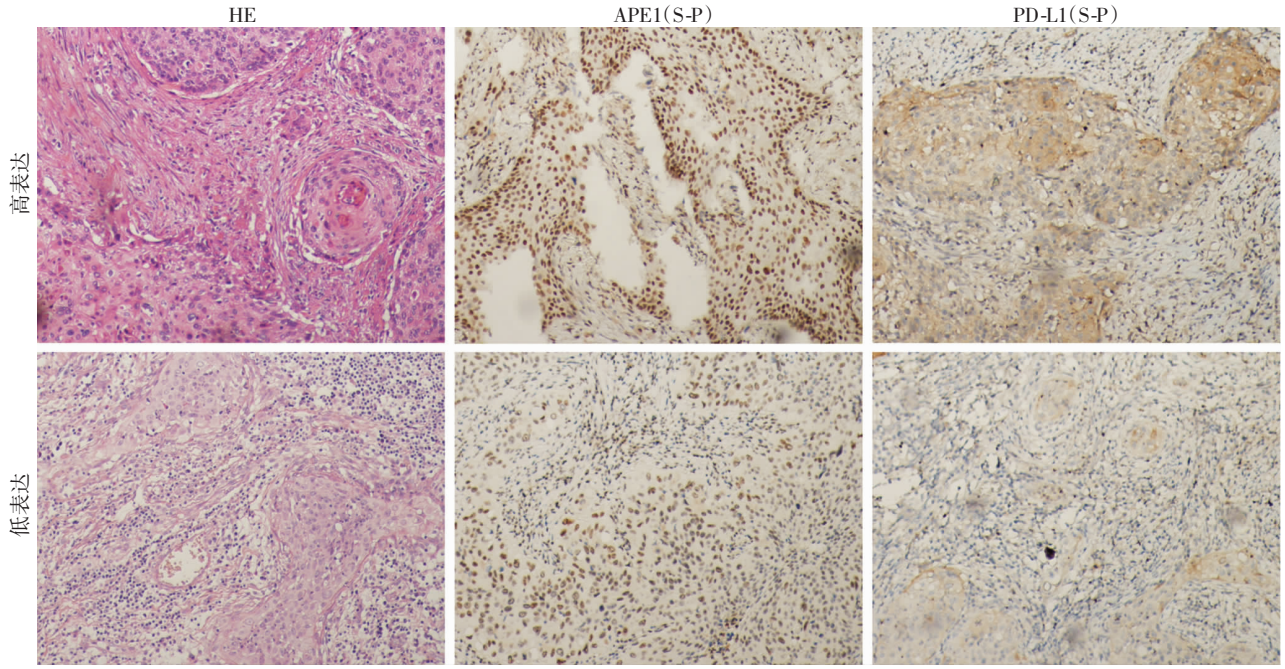


图 1 APE1 和 PD-L1 在早期宫颈鳞癌组织中的表达 (×100)

表 1 APE1 和 PD-L1 表达与早期宫颈鳞癌临床病理特征之间的关系[例(%)]

临床特征	例数	APE1 高表达	*P* 值	PD-L1 高表达	*P* 值	共表达阳性	*P* 值
年龄(岁)							
≥50	18	15(83.33)	0.154	15(83.33)	0.085	13(72.22)	0.078
<50	46	30(65.22)		28(60.87)		22(47.83)	
分期							
Ⅰ期	39	27(69.23)	0.813	22(56.41)	0.022	19(48.72)	0.231
Ⅱ期	25	18(72.00)		21(84.00)		16(64.00)	
淋巴结转移							
阳性	33	27(81.82)	0.038	26(78.79)	0.041	22(66.67)	0.047
阴性	31	18(58.06)		17(54.84)		13(41.94)	

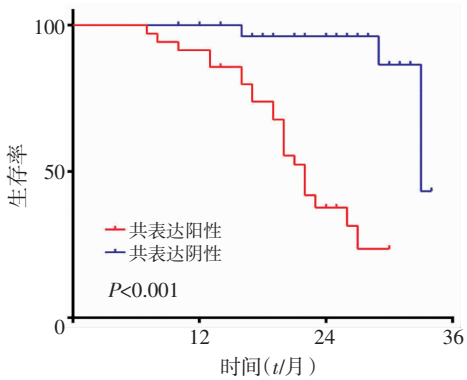


图 2 APE1 和 PD-L1 共阳性表达与患者术后生存分析

2.3 影响早期宫颈鳞癌患者预后的因素

采用 Kaplan-Meier 统计学方法进一步分析得出早期宫颈鳞癌患者的年龄($P=0.041$)、淋巴结转移($P<0.001$)与中位总生存时间显著相关,分期与生存之间没有相关性(表 2)。Cox 回归模型单因素分析显示 APE1 高表达、PD-L1 高表达和淋巴结转移均影响患者的预后,Cox 回归模型多因素分析,结果显示 APE1 的表达和淋巴结转移是早期宫颈鳞癌的预后影响因素,危险度分别为 16.187 和 27.340,而 PD-L1 并不是影响预后的独立危险因素。说明 APE1 高表达的患者和出现淋巴结转移的患者,其出现死亡的可能性更大。然而,临床分期与 PD-L1 不是早期宫颈鳞癌的预后影响因素(表 3)。

表 2 早期宫颈鳞癌患者临床特征与中位生存时间的相关性分析

临床特征	例数	中位时间(个月)	*P* 值
年龄(岁)			0.041
≥50	18	22	
<50	46	33	
临床分期			0.105
Ⅰ	39	33	
Ⅱ	25	26	
淋巴结转移			<0.001
阳性	33	20	
阴性	31	33	

表 3 早期宫颈鳞癌患者预后影响因素分析

参数	单因素分析		多因素分析	
	HR(95% *CI*)	*P* 值	*HR*(95% *CI*)	*P* 值
年龄	1.050(1.003~1.100)	0.039		0.253
淋巴结转移				
阴性				
阳性	22.929(5.184~101.423)	<0.001	27.340(4.882~153.107)	<0.001
临床分期				
Ⅰ				
Ⅱ	1.911(0.852~4.285)	0.116		0.792
APE1				
低表达				
高表达	16.092(2.154~120.228)	0.007	16.187(1.952~134.210)	0.010
PD-L1				
低表达				
高表达	6.917(1.618~29.569)	0.009		0.349

3 讨论

本研究发现 PD-L1 阳性表达与早期宫颈鳞癌患者淋巴结转移相关,且患者总生存时间也较短,提示 PD-L1 可能在宫颈癌的恶性进展中具有重要意义。这与阻断 PD-L1 与其受体结合可以提高肿瘤治疗效果的临床结果一致。在肿瘤微环境的免疫应答机制中,PD-L1 作为负调控分子,通过其与受体 PD-1 结合抑制 T 细胞增殖并促进细胞分泌免疫抑制因子[7],前期研究表明乳腺癌组织中 PD-L1 表达与肿瘤体积及分期正相关[16];肝癌中 PD-L1 高表达患者术后总生存时间明显较短[17];肾细胞癌患者中 PD-L1 高表达者出现转移和死亡的概率是 PD-L1 阴性者的 4 倍[18]。这些报道结果与本研究均提示 PD-L1 在不同类型肿瘤的发生、发展中具有普遍的促进作用。迄今鲜有研究表明 PD-L1 表达在早期宫颈癌中的临床意义,而其具体的分子机制更不明确。研究表明,NF-κB、AP-1 活性受到抑制时相应 PD-L1 的表达下降[19-20],提示这些转录因子参与 PD-L1 的表达调控,促进肿瘤免疫逃逸的发生。

本研究发现,APE1 在早期宫颈癌中的表达与淋巴结转移、术后生存时间存在相关性,说明 APE1 表达越高,早期宫颈癌越容易发生恶性进展,与 PD-L1 表达具有相同意义。这与 Woo 等[21]在乳腺癌中研究结果类似。本研究还发现 APE1 表达和淋巴结转移可以作为早期宫颈鳞癌患者预后的影响因素,与 Qing 等[22]在胃癌中的研究结论一致。本研究发现在宫颈癌中 APE1 与 PD-L1 表达呈正相关,且 APE1 与 PD-L1 共表达阳性与淋巴结转移及术后生存均相关,提示 APE1 和 PD-L1 之间相互调控参与宫颈癌恶性进展。现有研究提示 APE1 可以维持体内转录因子的还原活性状态,其中包括参与 PD-L1 转录调控的重要转录因子 NF-κB 和 AP-1。由此我们推测,APE1 可能通过调节 NF-κB 和 AP-1 等一类转录因子的活性进而影响 PD-L1 表达,其信号通路尚需要进一步验证。此外,本研究发现骨肉瘤细胞中 APE1 的表达受到 miR-513a-5p 的调控,而此 miRNA 同时也可调控 PD-L1 的表达,据此我们推测受到同一 miRNA 调节的两个基因极有可能在同一生物学过程中发挥作用,这一假设亦需要进一步证实。

综上所述,本实验结果显示 PD-L1 与 APE1 表达呈正相关,同时二者高表达时早期宫颈鳞癌患者预后较差。PD-L1 与 APE1 在早期宫颈鳞癌的进展中发挥重要作用,推测 APE1 可能参与了调控 PD-L1 表达,进而使肿瘤发生免疫逃逸,促进肿瘤的转移。因此,APE

和 PD-L1 很可能成为预测早期宫颈鳞癌患者预后的标志物和免疫治疗的新靶点,但两者之间具体的调控机制,还需要大量基础研究来证实。

参考文献:

[1] de Freitas A C, Gurgel A P, Chagas B S, *et al*. Susceptibility to cervical cancer: an overview[J]. Gynecol Oncol, 2012, 126(2): 304-311. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.03.047

[2] Zeng Z, Yang H, Li Z, *et al*. Prevalence and Genotype Distribution of HPV Infection in China: Analysis of 51, 345 HPV Genotyping Results from China's Largest CAP Certified Laboratory[J]. J Cancer, 2016, 7(9): 1037-1043. DOI: 10.7150/jca.14971

[3] Sakuragi N. Up-to-date management of lymph node metastasis and the role of tailored lymphadenectomy in cervical cancer [J]. Int J Clin Oncol, 2007, 12(3): 165-175. DOI: 10.1007/s10147-007-0661-2

[4] Waggoner S E. Cervical cancer[J]. Lancet, 2003, 361(9376): 2217-2225. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13778-6

[5] Keir M E, Liang S C, Guleria I, *et al*. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance[J]. J Exp Med, 2006, 203(4): 883-895. DOI: 10.1084/jem.20051776

[6] Dong H, Zhu G, Tamada K, *et al*. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1365-1369. DOI: 10.1038/70932

[7] 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. DOI: 10.1038/nm730

[8] Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity[J]. J Mol Med, 2003, 81(5): 281-287. DOI: 10.1007/s00109-003-0430-2

[9] Xanthoudakis S, Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity[J]. EMBO J, 1992, 11(2): 653-665.

[10] Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, *et al*. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3): 601-620. DOI: 10.1089/ars.2008.2194

[11] Li M, Wilson D R 3rd. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(4): 678-707. DOI: 10.1089/ars.2013.5492

[12] Ock C Y, Kim S, Keam B, *et al*. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(13): 15901-15914. DOI: 10.18632/oncotarget.7431

[13] Kurimoto R, Iwasawa S, Ebata T, *et al*. Drug resistance originating from a TGF-beta/FGF-2-driven epithelial- to-mesenchymal transition and its reversion in human lung adenocarcinoma cell lines harboring an EGFR mutation[J]. Int J Oncol, 2016, 48(5): 1825-1836. DOI: 10.3892/ijo.2016.3419

[14] Wei X, Li Q, Li Y, *et al*. Prediction of survival prognosis of non-small cell lung cancer by APE1 through regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition[J]. Oncotarget, 2016, 7(19): 28523-28539. DOI: 10.18632/oncotarget.8660

[15] Jiang X, Shan J, Dai N, *et al*. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 regulates angiogenesis in a transforming growth factor beta-dependent manner in human osteosarcoma[J]. Cancer Sci, 2015, 106(10): 1394-1401. DOI: 10.1111/cas.12763

[16] 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. DOI: 10.1593/neo.05733

[17] Gao Q, Wang X Y, Qiu S J, *et al*. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 2009, 15(3): 971-979. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1608

[18] Thompson R H, Kuntz S M, Leibovich B C, *et al*. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up[J]. Cancer Res, 2006, 66(7): 3381-3385. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4303

[19] Lin K, Cheng J, Yang T, *et al*. EGFR-TKI down-regulates PD-L1 in EGFR mutant NSCLC through inhibiting NF-kappaB [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015. 463(1/2): 95-101. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.030

[20] Green M R, Rodig S, Juszczynski P, *et al*. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(6): 1611-1618. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1942

[21] Woo J, Park H, Sung S H, *et al*. Prognostic value of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) expression in breast cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99528. DOI: 10.1371/journal.pone.0099528

[22] Qing Y, Li Q, Ren T, *et al*. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 901-909. DOI: 10.2147/DDDT.S75152

(收稿:2016-07-14;修回:2016-09-18)

(编辑 汪勤俭)