

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.006

文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0033-05

肝癌患者 TACE 治疗前后外周血 PD-1、PD-L1 的表达及临床意义 *

程小珍¹, 李晓东², 王顺兰³, 谢宇宙¹, 毛山山¹, 朱燕兴¹, 崔荣花¹, 王美清¹

(1. 中南大学湘雅医学院附属海口医院 肿瘤化疗科, 海南 海口 570208; 2. 加州大学戴维斯分校 - 医学院 临床免疫研究室, 美国 加州 CA95817; 3. 中南大学湘雅医学院附属海口医院 中心实验室, 海南 海口 570208)

摘要:目的 探讨原发性肝癌患者行肝动脉化疗栓塞术 (TACE) 前后外周血程序性死亡分子 1 (PD-1)、配体 (PD-L1) 的表达及临床意义。**方法** 采集中南大学湘雅医学院附属海口医院 28 例中晚期肝癌患者 (肝癌组) TACE 治疗前后外周血及 20 例健康体检者 (对照组) 外周血标本, 流式细胞仪检测 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞及抗原提呈细胞 (APC) 表面 PD-1、PD-L1 的表达, 并随访 PD-1、PD-L1 表达与肿瘤分化、疗效的关系。**结果** 肝癌组外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞及 APC 表面 PD-1、PD-L1 表达与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肝癌组均高于对照组; 治疗前后肝癌组外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 及 APC 表面 PD-L1 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 治疗后较治疗前下降; CD4⁺T、CD8⁺T 及 APC 表面 PD-1 表达也较治疗前下降, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 细胞分化差的肝癌组患者外周血 PD-1、PD-L1 表达较高; 治疗效果差的肝癌组外周血 PD-1、PD-L1 表达较高。**结论** 肝癌患者外周血 PD-1、PD-L1 表达升高, 治疗前后监测 PD-1、PD-L1 表达可能预测患者预后状态。

关键词: 肝肿瘤; 化学栓塞, 治疗性; 程序性死亡分子 1; 程序性死亡分子配体 1

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Expression and clinical significance of PD-1/PD-L1 in hepatocellular carcinoma patients*

Xiao-zhen Cheng¹, Xiao-dong Li², Shun-lan Wang³, Zong-zhou Xie¹, Shan-shan Mao¹,
Yan-xing Zhu¹, Rong-hua Cui¹, Mei-qing Wang¹

(1. Department of Tumor-Chemotherapy, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital, Haikou, Hainan 570208, China; 2. Clinical Immunology Laboratory, Davis School of Medicine, University of California, California, CA95817, USA; 3. Central laboratory, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of programmed death 1 (PD-1) / programmed death ligand 1 (PD-L1) in peripheral blood of patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC) pre and post-transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and its clinical significance. **Methods** A total of 20 healthy volunteers and 28 HCC patients were enrolled. The levels of PD-1 and PD-L1 on the surface of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and antigen-presenting cells (APC) in peripheral blood were detected by flow cytometry. Relationship between the expression of PD-1 and PD-L1 and the differentiation and outcomes of tumor was analyzed. **Results** The levels of PD-1 and PD-L1 on the surface of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and APC in peripheral blood of HCC patients were increased

收稿日期: 2018-05-28

* 基金项目: 海南省海口市重点科技计划项目 (No: 2014-084)

than those in healthy volunteers ($P < 0.05$). The expression of PD-L1 on the surface of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and APC in peripheral blood of HCC patients was decreased after TACE comparing to those in patients prior to treatments, while no obvious difference was identified in patients prior to and post treatments. High expression of PD-1 and PD-L1 was determined in patients with poor differentiation or poor outcomes. **Conclusions** The levels of PD-1 and PD-L1 in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma are responsive to TACE and clinical prognosis.

Keywords: hepatocellular carcinoma; chemoembolization, therapeutic; programmed death 1; programmed death ligand 1

原发性肝癌的全球发病率呈上升趋势, 预计到 2020 年肝癌新发病例将上升至 95 374 例^[1]。在全球癌症死亡原因中排名第 3 位^[2]。我国是肝癌的高发地, 其发病率和病死率均占世界首位。原发性肝癌恶性程度高, 早期多无明显的症状和体征, 出现临床症状时多处于中晚期, 导致约 80% 的患者就诊时已无法行根治性手术切除, 非手术治疗以肝动脉介入栓塞化疗 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 为首选, 生存期可获得明显延长。自 2008 年以来索拉非尼药物治疗成为晚期肝癌患者标准的一线治疗方法, 能延长晚期肝癌患者近 3 个月生存期^[3]。肝癌对放化疗均相对不敏感, 治疗效果差, 新兴的免疫治疗给肝癌患者带来新的曙光, 近年来程序性死亡受体 1 (programmed death 1, PD-1) 和程序性死亡配体 (programmed death ligand 1, PD-L1) 作为免疫治疗新的靶点成为国内外学者研究热点之一。

PD-1, 又称 CD279, 为 CD28 免疫球蛋白超家族成员, 是一种重要的免疫抑制分子。PD-L1, 又称 CD274 或 B7-H1 (B7 homolog 1), 是 B7 家族中一个负性 T 细胞共刺激分子。目前研究结果表明, 表达于肿瘤细胞表面的 PD-L1 与表达于 CD8⁺T 细胞表面的受体 PD-1 的结合后, 可以在体外抑制 T 细胞的增殖和细胞因子的产生, 进而导致细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 的凋亡和耗竭, 从而抑制机体的抗肿瘤免疫和介导肿瘤免疫逃逸的发生^[4]。

关于 PD-1 与 PD-L1 的体内研究, 目前主要集中在采用免疫组织化学来检测恶性肿瘤组织标本, 关于恶性肿瘤治疗前后外周血 PD-1 和 PD-L1 表达变化的研究较少, 目前尚未见文献关于肝癌患者介入治疗前后外周血 PD-1 和 PD-L1 表达变化及临床意义研究的报道。既往研究显示, 多种恶性肿瘤组织如非小细胞肺癌^[5-6]、胃癌^[7]、肝癌^[8]、乳腺癌^[9]、宫颈癌等^[10]患者组织标本中 PD-1 和 PD-L1 表达升高, 且高水平 PD-1 和 PD-L1 可能与肿瘤的恶性程度高、肿瘤分期

晚、预后差有关, 但 PD-L1 与各种不同恶性肿瘤预后之间的相关性仍存在争议^[11]。因原发性肝癌患者手术标本获取不易, 本研究通过流式细胞术检测 TACE 治疗前后肝癌患者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 及抗原提呈细胞 (antigen-presenting cells, APC) 表面 PD-1 和 PD-L1 表达变化, 并分析 PD-1 和 PD-L1 表达与患者细胞分化程度、疗效的关系, 探讨 PD-1 和 PD-L1 与肿瘤进展及疗效的关系, 为肝癌患者的免疫治疗提供更多的理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2014 年 1 月—2016 年 12 月中南大学湘雅医学院附属海口医院临床资料完整的 28 例有 TACE 治疗指征的中晚期肝癌患者 (肝癌组)。均经临床及病理组织学检查确诊为原发性肝癌, 且无手术指征。其中, 男性 25 例, 女性 3 例; 年龄 36 ~ 71 岁, 中位年龄 57 岁; 病理类型均为肝细胞癌, 高-中分化 16 例, 低分化 12 例。所有患者肝、肾、心、肺功能基本正常, KPS 评分 >60 分, 预计生存期 >3 个月, 且无合并自身免疫性疾病。所有患者或法定代理人知情并签署知情同意书, 并报本院医学伦理委员会批准。选取同时期体检的年龄、性别相匹配的健康志愿者 20 例为对照组。

1.2 材料与方法

1.2.1 主要试剂与材料 荧光抗体 PerCP-Cy5.5-CD4、APC-H7-CD8、PE-PD-1、PE-Cy7-PD-L1、APC-CD85g (ILT7)、FITC-CD149 (美国 BD 公司), 红细胞裂解液 (FACS Lysing Solution, 美国 BD 公司)、淋巴细胞分离液 (美国 Cell Grow 公司), FACS Canto 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2.2 TACE 治疗 所有患者均采用 Seldinger 技术经股动脉穿刺行动脉灌注化疗, 化疗方案为: 吡柔比星

25 ~ 40 mg/m²+ 奥沙利铂 100 ~ 130 mg/m², 将碘油与化疗药混匀制成乳剂行远侧栓塞, 依肿瘤的大小一般用碘油 5 ~ 20 ml, 注入适量的明胶海绵行近侧栓塞。

1.2.3 PD-1 和 PD-L1 检测 在 TACE 治疗前、治疗后 1 个月内采集肝癌患者外周血 5 ~ 10 ml。流式管加混匀全血 80 μ l, 加预先按比例混合的荧光抗体(18 μ l, 共 6 种), 涡旋混匀, 避光室温 45 min; 加 1.2 ml 红细胞裂解液, 涡旋 1 min, 避光室温 15 min; 2 100 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 PBS 1.5 ml, 涡旋, 2 100 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 300 ~ 400 μ l 固定液(1% 多聚甲醛 PFA, 4 $^{\circ}$ C 保存), 2 h 内上机检测。

1.3 疗效评价

治疗前 1 周、治疗后 3 个月评价疗效, 常规行肝脏彩超/CT/MRI、胸部 CT 检查, 对比治疗前后肿瘤大小变化。按《常见恶性肿瘤诊治规范》来评价肝癌患者的疗效, 显效 (PR): 肿瘤缩小 <50%; 有效 (PC): 肿瘤缩小介于 25% ~ 50%; 稳定 (NC): 肿瘤缩小 >25%; 进展 (PD): 肿瘤增大 >25%, 并有新病灶出现。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间数据的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组外周血 PD-1、PD-L1 表达比较

肝癌组患者外周血 CD4⁺PD-1、CD8⁺PD-1、APC PD-1、CD4⁺PD-L1、CD8⁺PD-L1 及 APC PD-L1 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肝癌组均高于对照组。见表 1。

2.2 肝癌组治疗前后外周血 PD-1、PD-L1 表达比较

肝癌组患者经 TACE 治疗后 1 个月内外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 及 APC 表面 PD-L1 水平与治疗前比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 治疗后较治疗前下降, CD4⁺T、CD8⁺T 及 APC 表面 PD-1 表达也较治疗前下降, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 肝癌组外周血 PD-1、PD-L1 表达与肿瘤细胞分化程度的关系

细胞分化差的肝癌组患者外周血 PD-1、PD-L1 表达较高, 以 CD8⁺T 细胞表面的 PD-1、PD-L1 表达升高最明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 PD-1、PD-L1 表达与疗效的关系

肝癌组患者经 TACE 治疗后 3 个月, 治疗有效 (PR+PC+NC) 的患者有 15 例, 肿瘤进展 (PD) 的 13 例, 其中肿瘤进展者 PD-L1 表达高于治疗有效的患者, CD8⁺PD-L1 表达升高比较明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 两组外周血 PD-1、PD-L1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ PD-1	CD8 ⁺ PD-1	APC PD-1	CD4 ⁺ PD-L1	CD8 ⁺ PD-L1	APC PD-L1
肝癌组	28	8.97 \pm 4.49	3.18 \pm 0.78	2.70 \pm 0.78	11.18 \pm 1.32	50.52 \pm 18.09	32.12 \pm 2.91
健康组	20	4.51 \pm 1.58	1.01 \pm 0.64	0.98 \pm 0.37	5.09 \pm 1.53	8.37 \pm 2.76	13.09 \pm 4.34
<i>t</i> 值		9.980	19.130	6.740	8.260	128.460	64.650
<i>P</i> 值		0.003	0.000	0.014	0.007	0.000	0.000

表 2 肝癌组治疗前后外周血 PD-1、PD-L1 表达比较 ($n=28, \bar{x} \pm s$)

时间	CD4 ⁺ PD-1	CD8 ⁺ PD-1	APC PD-1	CD4 ⁺ PD-L1	CD8 ⁺ PD-L1	APC PD-L1
治疗前	8.97 \pm 4.49	3.18 \pm 0.78	2.70 \pm 0.78	11.18 \pm 1.32	50.52 \pm 18.09	32.12 \pm 2.91
治疗后	7.43 \pm 4.28	2.76 \pm 3.36	1.85 \pm 1.59	5.78 \pm 2.40	29.77 \pm 14.36	17.37 \pm 2.67
<i>t</i> 值	0.540	1.230	4.170	7.500	38.800	44.280
<i>P</i> 值	0.470	0.276	0.051	0.011	0.000	0.000

表 3 肝癌组外周血 PD-1、PD-L1 表达与肿瘤分化程度的关系 ($\bar{x} \pm s$)

分化程度	n	CD4 ⁺ PD-1	CD8 ⁺ PD-1	APC PD-1	CD4 ⁺ PD-L1	CD8 ⁺ PD-L1	APC PD-L1
高-中分化	16	9.26 ± 5.20	0.80 ± 0.96	1.47 ± 1.05	3.91 ± 2.58	29.39 ± 29.54	30.48 ± 25.43
低分化	12	9.10 ± 5.70	5.08 ± 4.71	1.80 ± 1.68	14.64 ± 21.24	67.30 ± 31.19	35.71 ± 19.13
t 值		0.080	3.090	-0.650	-2.010	-3.280	0.620
P 值		0.939	0.005	0.519	0.055	0.003	0.539

表 4 肝癌组外周血 PD-1、PD-L1 表达与疗效的关系 ($\bar{x} \pm s$)

疗效评价	n	CD4 ⁺ PD-1	CD8 ⁺ PD-1	APC PD-1	CD4 ⁺ PD-L1	CD8 ⁺ PD-L1	APC PD-L1
PR+PC+NC	15	7.73 ± 3.67	2.13 ± 3.76	1.54 ± 1.23	5.83 ± 5.53	28.04 ± 27.08	28.08 ± 20.82
PD	13	10.87 ± 6.49	4.21 ± 4.38	1.69 ± 1.49	11.60 ± 20.80	65.95 ± 33.37	38.13 ± 22.18
t 值		-1.600	1.340	-0.290	0.180	7.240	1.230
P 值		0.122	0.193	0.772	0.675	0.012	0.229

3 讨论

原发性肝癌恶性程度高、治疗效果差、危害大,目前尚无特效的治疗方法和有效的疗效监测指标,综合使用介入、化疗、免疫、分子靶向等治疗是目前提高肿瘤局部控制率、改善疗效、延长生存期的主要方法,迫切需要新的治疗手段来改善患者预后。PD-1 和 PD-L1 是一对负性免疫共刺激分子,因其参与 T 淋巴细胞活化、介导肿瘤免疫逃逸,近年来成为国内外学者的研究热点,也是肿瘤免疫治疗的靶点之一。

生理情况下,组织细胞表面的 PD-L1 与淋巴细胞表面的 PD-1 结合后,可抑制淋巴细胞功能,诱导活化的淋巴细胞凋亡,在维持外周 T 淋巴细胞耐受和调节炎症反应发挥重要作用,从而避免自身免疫性疾病的发生^[13]。到目前为止,应用免疫组织化学方法已经在多种恶性肿瘤组织表面检测到 PD-L1 高表达,PD-L1 可与肿瘤浸润淋巴细胞表面的 PD-1 结合,可抑制淋巴细胞的功能及诱导其发生凋亡,从而抵抗淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤作用,最终导致肿瘤发生免疫逃逸^[14]。但 PD-1 和 PD-L1 表达与各种恶性肿瘤患者预后关系尚不明确,比如在肝癌、胃癌患者中高表达 PD-L1 患者预后不良,在乳腺癌患者中高表达 PD-L1 则对预后有益,而在非小细胞肺癌^[15-16]中高表达 PD-L1 预测预后作用存在争议。

本研究通过流式细胞仪检测发现,肝癌组患者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 及 APC 表面 PD-1、PD-L1 表达高于对照组,与既往研究结果一致^[17-18]。本研究还发现,肝癌组患者治疗前 PD-1 和 PD-L1 表达升高,经

过治疗后 PD-1 和 PD-L1 表达下降,与 ZENG 等^[19]的研究结果一致,但 PD-L1 表达下降较明显,且 PD-1、PD-L1 表达与肿瘤组织分化程度有关,肿瘤细胞分化差的患者外周血 PD-1、PD-L1 表达较高。因本研究样本例数较少,未能进一步分析 PD-1、PD-L1 表达与患者年龄、性别、AFP 等指标之间的关系,需要在今后进一步加大样本量来研究,以获得更多的关于 PD-1 和 PD-L1 表达与患者临床生物学特征之间相关性的信息。本研究还发现,经治疗后疗效好的患者外周血 PD-1、PD-L1 表达较低,考虑治疗后疗效好的患者体内肿瘤负荷减少更明显所致,动态监测外周血 PD-1 和 PD-L1 表达可能预测患者疗效。既往有研究报道 PD-L1 表达与患者肿瘤的侵袭性、血管侵犯等有关,考虑细胞分化差、恶性程度高的肿瘤侵袭性更强、更容易出现血管侵犯,也更容易出现远处转移和疾病不容易控制^[20-21]。笔者推测,TACE 阻断肿瘤血管可能减少肿瘤细胞浸润,进一步降低 PD-L1 表达,对于治疗效果不好的患者联合使用抑制肿瘤血管生成的药物可能可以进一步降低 PD-L1 表达,从而可能进一步增加治疗效果。

综上所述,肝癌患者外周血 PD-1、PD-L1 表达升高,且与细胞分化、治疗效果有关,严密及动态监测患者外周血 PD-1、PD-L1 表达变化可能可以预测患者疗效、预后情况,同时可能根据 PD-1、PD-L1 表达与患者更多的临床生物学特征筛选出对 TACE 及免疫治疗效果更好的病例,为肝癌患者免疫治疗提供理论基础。

参考文献:

- [1] CHACKO S, SAMANTA S. Hepatocellular carcinoma: A life-threatening disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1679-1688.
- [2] TESTINO G, LEONE S, PATUSSI V, et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and proposal of treatment[J]. *Minerva Med*, 2016, 107(6): 413-426.
- [3] GE S, HUANG D. Systemic therapies for hepatocellular carcinoma[J]. *Drug Discov Ther*, 2015, 9(5): 352-362.
- [4] ZHANG Y, HUANG S, GONG D, et al. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8⁺T lymphocytes in human non-small cell lung cancer[J]. *Cell Mol Immunol*, 2010, 7(5): 389-395.
- [5] CHEN Y B, MU C Y, HUANG J A. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study[J]. *Tumori*, 2012, 98(6): 751-755.
- [6] SHENG J, FANG W, YU J, et al. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20090.
- [7] BÖGER C, BEHRENS H M, MATHIAK M, et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of western patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 24269-24283.
- [8] WANG B J, BAO J J, WANG J Z, et al. Immunostaining of PD-1/PD-Ls in liver tissues of patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(28): 3322-3329.
- [9] ZHANG M, SUN H, ZHAO S, et al. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19): 31347-31354.
- [10] REDDY O L, SHINTAKU P I, MOATAMED N A. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) is expressed in a significant number of the uterine cervical carcinomas[J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1): 45.
- [11] WANG X, TENG F, KONG L, et al. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes[J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9: 5023-5039.
- [12] NI L, DONG C. New B7 Family checkpoints in human cancers[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(7): 1203-1211.
- [13] BERSANELLI M, BUTI S. From targeting the tumor to targeting the immune system: Transversal challenges in oncology with the inhibition of the PD-1/PD-L1 axis[J]. *World J Clin Oncol*, 2017, 8(1): 37-53.
- [14] 吴介恒, 杨安钢, 温伟红. PD-1/PD-L1 参与肿瘤免疫逃逸的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, 30(7): 777-780.
- [15] PAN Z K, YE F, WU X, et al. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis[J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(3): 462-470.
- [16] SORENSEN S F, ZHOU W, DOLLED-FILHART M, et al. PD-L1 expression and survival among patients with advanced non-small cell lung cancer treated with chemotherapy[J]. *Transl Oncol*, 2016, 9(1): 64-69.
- [17] ZHENG H, LIU X, ZHANG J, et al. Expression of PD-1 on CD4⁺T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 56233-56240.
- [18] 胥萍, 陈慧, 陈永井, 等. 肺癌患者外周血中单个核细胞表面程序性死亡蛋白 1 及其受体的表达和生物学意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(12): 910-913.
- [19] ZENG Z, SHI F, ZHOU L, et al. Upregulation of circulating PD-L1/PD-1 is associated with poor post-cryoablation prognosis in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23621.
- [20] GU X, GAO X S, XIONG W, et al. Increased programmed death ligand-1 expression predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9: 4805-4813.
- [21] CALDERARO J, ROUSSEAU B, AMADDEO G, et al. Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma: relationship with clinical and pathological features[J]. *Hepatology*, 2016, 64(6): 2038-2046.

(张西倩 编辑)