

PD-1、PD-L1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织中的差异性表达及其临床意义*

金静霞¹ 郑翠苹¹ 陈丽雅¹ 叶琼¹ 吴圣豪¹

【摘要】 目的:探讨程序性死亡因子-1(PD-1)、程序性死亡配体-1(PD-L1)在弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)中的表达及其临床意义。**方法:**采用免疫组织化学方法检测 50 例初诊 DLBCL 组织(DLBCL 组)和 45 例淋巴结良性增生病变组织(对照组)中 PD-1、PD-L1 蛋白的表达情况,并分析 PD-1 及 PD-L1 的表达与临床病理特征的关系。**结果:**DLBCL 组中 PD-1、PD-L1 的阳性表达率均显著高于对照组(58.00% : 24.44%, 64.00% : 28.89%, 均 $P < 0.05$)。DLBCL 组中 PD-1 表达与临床病理特征均无明显相关性;而 PD-L1 表达与 B 症状、EBV 感染、肿瘤分期及病理分型均有明显相关性(均 $P < 0.05$)。PD-1 阳性组中 PD-L1 表达率更高(82.76% : 38.10%, $P < 0.05$)。**结论:**PD-L1 在 DLBCL 组织中高表达,并与分期、病理分型、B 症状及 EBV 感染相关。推测 PD-L1 的表达可能是 DLBCL 的一个不良预后因子,以 PD-1/PD-L1 信号通路为靶点的治疗有望成为难治性 DLBCL 的潜在方案。

【关键词】 弥漫大 B 细胞淋巴瘤;程序性死亡因子-1;程序性死亡配体-1;预后

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2018.01.008

【中图分类号】 R733.4 **【文献标志码】** A

The differential expression levels and clinical significance of PD-1 and PD-L1 in tumor tissues of diffuse large B cell lymphoma

JIN Jingxia ZHENG Cui ping CHEN Liya YE Qiong WU Shenghao

(Department of Hematology, Wenzhou Central Hospital, Theorem Clinical College, Wenzhou Medical University, Wenzhou, 325000, China)

Corresponding author: ZHENG Cui ping, E-mail: cuipingzheng@163.com

Abstract Objective: To investigate the expression levels and clinical significance of programmed cell death factor-1 (PD-1) and programmed cell death 1 ligand (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). **Method:** Immunohistochemistry was used to detect expression levels of PD-1 and PD-L1 in DLBCL (test group, $n=50$) and benign proliferative lesions of lymph node tissues (control group, $n=45$). The correlation of PD-1 and PD-L1 expressions with clinicopathological characteristics were analyzed. **Result:** The expression levels of PD-1 and PD-L1 were significantly higher in DLBCL group than those in control group (58.00% vs 24.44%, 64.00% vs 28.89%, $P < 0.05$). In patients with DLBCL, the expression of PD-1 showed no significant correlation with clinicopathological variables, but the expression of PD-L1 showed significant correlation with B symptoms, EBV infection, tumor stage and pathological classification ($P < 0.05$). The expression of PD-L1 was much higher in DLBCL with the positive expression of PD-1 (82.76% vs 38.10%, $P < 0.05$). **Conclusion:** There is high expression level of PD-L1 in DLBCL, which is correlated with stage, pathological classification, B symptoms and EBV infection. The expression level of PD-L1 can be used as a poor prognostic factor for DLBCL, and PD-1/PD-L1 pathway-targeted immunotherapy may have therapeutic potential in refractory DLBCL.

Key words diffuse large B cell lymphoma; PD-1; PD-L1; prognosis

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)是非霍奇金病中最常见的肿瘤,占 30%~35%^[1]。DLBCL 的组织学形态、免疫表型、遗传学特征、临床表现及转归在不同患者间存在明显差异,以蒽环类为基础的如 R-CHOP 化疗方案是目前 DLBCL 的标准治疗方案^[2-3],但复发率较

高。尽管使用利妥昔单抗改善了 DLBCL 的预后,利妥昔单抗联合 GDP 方案是治疗复发难治性 DLBCL 一个安全、有效的挽救方案,有效率可达 78.6%,但只有 60% 的患者可以达到长期的完全缓解^[4-6],故研究针对其发病机制的治疗方案迫在眉睫。程序性死亡因子-1(PD-1)/程序性死亡因子受体(PD-L1)信号通路是免疫“检查点”之一,在维护自我耐受性和控制过度增殖中发挥重要作用,同时该信号通路是肿瘤免疫逃逸的机制之一。PD-1 属

* 基金项目:省科技厅课题(No:2014C33159)

¹温州市中心医院(浙江温州,325000)

通信作者:郑翠苹, E-mail: cuipingzheng@163.com

于 CD28/CTLA-4 家族,主要表达在活化的 T 细胞、B 细胞、胸腺细胞等^[1],其受体有 2 个,PD-L1 和 PD-L2,PD-L2 与 PD-L1 有很高的相似性,但二者也具有一定的差异。如 PD-L2 的体内组织分布具有局限性,只在巨噬细胞、树突状细胞和一些 B 细胞亚类的膜表面表达。PD-L1 作为 B7 家族的新成员,主要表达在抗原递呈细胞,而且在多种肿瘤细胞均高表达,PD-L1 分子在免疫应答调节中起到关键点的作用^[7-8]。活化的 T 细胞表面的 PD-1 与抗原递呈细胞表面的 PD-L1 结合后,导致了免疫耐受^[9]。PD-L1 在肿瘤中的表达可能与疾病进展及差预后相关^[10]。肿瘤免疫逃逸机制主要是 T 细胞的失活,不能发挥抗肿瘤的作用,在肿瘤组织中 PD-1/PD-L1 结合后可抑制 T 细胞活化^[11],导致肿瘤免疫逃逸,有研究证实使用 PD-1/PD-L1 免疫抑制剂后可显著提高抗肿瘤活性^[12]。我们研究了 50 例 DLBCL 患者肿瘤组织中 PD-1 及 PD-L1 的表达情况,并分析了淋巴瘤组织中 PD-1、PD-L1 表达与其临床病理特征的相关性,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

选择 2015-01—2016-12 我院初发新诊断的 DLBCL 病理组织 50 例作为观察组,其中男 28 例,女 22 例;年龄 ≥ 60 岁 27 例, < 60 岁 23 例;I~II 期 31 例,III~IV 期 19 例;应用 PCR 方法检测 EBV DNA,EBV 阳性 14 例,阴性 36 例(EBV 阳性率为 28%,考虑与检测方法和地域有关);ABC 亚型 28 例,GCB 亚型 22 例(GCB 亚型比例为 44%,考虑与本研究中外 DLBCL 患者较多有关)。选择同期参加淋巴结活检为淋巴结良性增生性病变的 45 例石蜡标本作为对照组。患者取标本前均未接受任何治疗,2 组研究对象在年龄、性别方面具有可比性。采用 Ann Arbor-Costwald 改良分期系统进行分期,及国际预后指数进行预后评分。

1.2 方法

将所有标本进行蜡块固定,切片后进行脱蜡,水化处理,采用 PV-8000 二步检测法,一抗购买自福州迈新公司,鼠抗人 PD-1 单克隆抗体及兔抗人 PD-L1 单克隆抗体,二抗为即用型,PV-8000,北京中杉公司,实验严格按照各试剂说明书进行。

1.3 结果判读

免疫组织化学染色后的切片在高倍镜下观察,结果分别由 2 位病理学专家评定,阳性结果参照 Mu 等^[13]评判标准,并适当调整。随机读取 5 个高倍视野($\times 400$ 倍),每个视野计数 100 个细胞中 PD-1 的阳性细胞数,并求其平均值作为该患者的 PD-1 阳性细胞数。以所有患者 PD-1 阳性细胞数的平均值作为阈值,大于该阈值的定义为 PD-1 表达阳性,否则为阴性;PD-L1 采取同样方法。

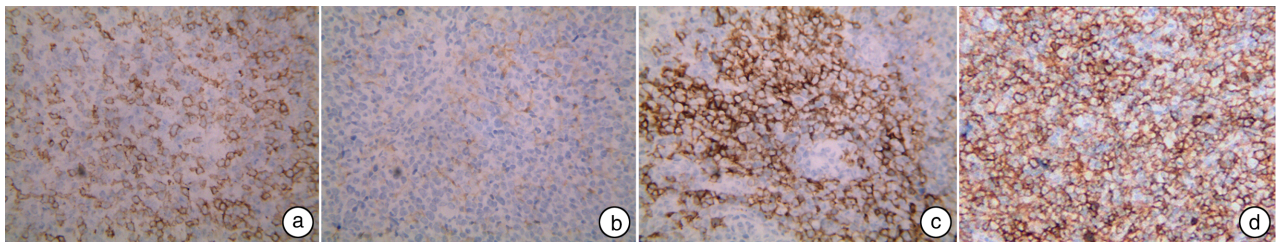
1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行分析。计数资料采用例(%)表示,PD-1 与 PD-L1 表达关联性及其与临床病理特征关系分析采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 DLBCL 组及对照组中 PD-1、PD-L1 表达

免疫组织化学显示,DLBCL 组及对照组中 PD-1、PD-L1 均呈弥漫性分布,表达情况见图 1。其中 PD-1 蛋白表达阳性淋巴细胞数量为 $0 \sim 50$ (18.65 ± 3.37) 个,以均数 18.65 为阈值, > 18.65 个为阳性结果,DLBCL 组中 PD-1 阳性率为 58.00% (29/50),对照组中 PD-1 阳性率为 24.44% (11/45);PD-L1 蛋白表达阳性淋巴细胞数量为 $0 \sim 70$ (29.97 ± 4.49) 个,以均数 29.97 为阈值, > 29.97 个为阳性结果,DLBCL 组中 PD-L1 阳性率为 64.00% (32/50),对照组中 PD-L1 阳性率为 28.89% (13/45)。DLBCL 组中 PD-1、PD-L1 阳性率均明显高于对照组(均 $P < 0.05$)。



a: 对照组 PD-1 表达; b: 对照组 PD-L1 表达; c: DLBCL 组 PD-1 表达; d: DLBCL 组 PD-L1 表达。

图 1 DLBCL 组及对照组中 PD-1、PD-L1 表达 ($\times 400$)

2.2 DLBCL 组中 PD-1、PD-L1 表达与临床病理特征的关系

对 DLBCL 组中 PD-L1 表达与临床病理特征的关系进行分析,发现 PD-1 表达与临床病理特征

均无明显相关性;而 PD-L1 表达与 B 症状、EBV 感染、肿瘤分期及病理分型均有明显相关性(均 $P < 0.05$),见表 1。

对 DLBCL 组中 PD-1、PD-L1 表达关联性进行

分析,发现 29 例 PD-1 表达阳性组中 PD-L1 阳性率为 82.76%(24/29),21 例 PD-1 表达阴性组中 PD-L1 阳性率为 38.10%(8/21),二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 PD-L1 与 DLBCL 临床病理特征的关系

DLBCL 临床病理特征	例数	DLBCL 组织 PD-L1 表达/例(%)	
		阳性	阴性
年龄/岁			
<60	23	15(65.22)	8(34.78)
≥60	27	17(62.96)	10(37.04)
性别			
男	28	16(57.14)	12(42.86)
女	22	16(72.73)	6(27.27)
部位			
结内	21	13(61.90)	8(38.10)
结外	29	19(65.52)	10(34.48)
肿瘤分期			
I~II 期	31	16(51.61)	15(48.39)
III~IV 期	19	16(84.21)	3(15.79)
B 症状			
有	18	15(83.33)	3(16.67)
无	32	17(53.13)	15(46.87)
IPI 评分			
0~2	30	18(60.00)	12(40.00)
3~5	20	14(70.00)	6(30.00)
EBV 感染			
有	14	12(85.71)	2(14.29)
无	36	20(55.56)	16(44.44)
病理分型			
ABC	28	22(78.57)	6(21.43)
GCB	22	10(45.45)	12(54.55)

3 讨论

DLBCL 是一组异质性很强的疾病,其病因目前仍不完全清楚,多数为原发,潜在的免疫缺陷是肯定的危险因素之一,与 EBV 或 HHV-8、HIV 等感染都有关。PD-L1 已证实在多种人类肿瘤中表达,如恶性黑色素瘤、直肠癌、胰腺癌、肝细胞癌和卵巢癌等,甚至一些血液系统疾病恶性肿瘤中 PD-L1 过度表达,且与临床预后有关^[14]。吴圣等^[15]采用免疫组织化学法比较了胃癌组织及癌旁组织 PD-1 的表达,发现胃癌组织中 PD-1 的表达显著高于癌旁组织($P<0.05$)。马薇等^[16]研究发现,PD-1、PD-L1 在肺癌中癌间质过度表达。

本研究证实了 PD-1/PD-L1 在 DLBCL 中表达明显高于正常人,且分期越高,PD-L1 表达率越高,这可能提示 PD-1/PD-L1 信号通路在 DLBCL 的发病中起重要作用,提示 PD-L1 可能是 DLBCL 的预后影响因子。

本研究还证实了 PD-1/PD-L1 的表达与 EBV 感染及 B 症状有关,Kwon 等^[17]同样发现 PD-L1 表达与 EBV 感染和 B 症状明显相关,且 PD-L1 表达与 PD-1 表达呈正相关。Kiyasu 等^[18]报道 PD-L1 表达与预后相关,PD-L1 表达率越高,预后越差。PD-L1 在肿瘤组织中高表达机制可能是基因突变或与 EBV 感染有关^[19-21],目前机制仍不明确。EBV 可上调 PD-1/PD-L1 表达可能与激活 JAK/STAT 信号通路有关^[22]。这些数据表明 PD-1/PD-L1 通路可能在 DLBCL 微环境的作用,从而推测该信号通路可能是 DLBCL 的发病机制之一。

本研究还发现 PD-L1 在 ABC 亚型中的表达高于 GCB 亚型,这与先前研究一致,Chen 等^[23]同样证实了 PD-L1 在 non-GCB 亚型或 ABC 亚型中的表达显著高于 GCB 亚型($P=0.04$),Lenz 等^[24]研究发现 ABC 亚型在目前临床治疗手段下预后比 GCB 差,进一步推测 PD-L1 与 DLBCL 的预后相关性。

近期关于 PD-1/PD-L1 信号通路的研究发现,高表达 PD-L1 的肿瘤患者 PD-1/PD-L1 信号通路抑制剂更敏感^[25-26]。Armand 等^[27]进行的关于 PD-1 抗体 pidilizumab 的研究发现,使用 PD-1/PD-L1 信号通路阻断剂治疗 DLBCL,共 72 例患者入组,只有 66 例完成计划治疗,16 个月的总生存率可达 85%,16 个月的无疾病进展生存率 72%,在 35 例接受自体造血干细胞移植后有残留病灶的患者,接受 pidilizumab 治疗后,总体有效率为 51%,包括 34%的完全缓解和 11%的部分缓解,显著提高了难治复发性 DLBCL 的生存率。

总之,本研究表明 PD-L、PD-L1 在 DLBCL 中高表达,PD-L1 表达与 PD-1 表达有关联性,还与 EBV 感染、B 症状、肿瘤分期及病理分型密切相关,推测 PD-L1 的表达可能是 DLBCL 的预后不良因子,以 PD-1/PD-L1 信号通路为靶点的免疫治疗可能成为难治性 DLBCL 的新策略。

参考文献

- [1] Sabattini E, Bacci F, Sagrarnoso C, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview[M]//WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, 2008: 83-87.
- [2] Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma[J]. N Engl J Med, 2002, 346: 235-242.
- [3] Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-

- cell lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 3121—3127.
- [4] Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte [J]. *Blood*, 2010, 116: 2040—2045.
- [5] 陈艳欣, 郑晓云, 刘庭波, 等. 利妥昔单抗联合 CHOP 与单用 CHOP 方案治疗初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤疗效及安全性对比 [J]. *临床血液学杂志*, 2015, 28(9): 760—763.
- [6] 宾燕成, 张华, 李虎生, 等. 利妥昔单抗联合 GDP 方案治疗复发难治性弥漫大 B 细胞淋巴瘤的疗效观察 [J]. *临床血液学杂志*, 2015, 28(9): 764—766.
- [7] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 677—704.
- [8] Freeman GJ, Long AJ, 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: 1027—1034.
- [9] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell costimulation and co-inhibition [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 227—242.
- [10] Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, et al. Tumor infiltrating PD-1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas [J]. *PLoS one*, 2013, 8: e82870—e82870.
- [11] Atanackovic D, Luetkens T, Kröger N. Coinhibitory molecule PD-1 as a potential target for the immunotherapy of multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2014, 28: 993—1000.
- [12] Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer [J]. *N Engl J Med*, 2012, 2012: 2443—2454.
- [13] Mu CY, Huang JA, Chen Y, et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation [J]. *Med Oncol*, 2011, 28: 682—688.
- [14] Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2010, 116: 3268—3277.
- [15] 吴圣, 邵婧怡, 王芳, 等. PD-L1 和 PD-1 在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6): 821—825.
- [16] 马薇, 罗殿中, 陈源, 等. PD-L1 和 PD-1 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(9): 1551—1553.
- [17] Kwon D, Kim S, Kim P, et al. Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas [J]. *Histopathology*, 2015, 68: 1079—1089.
- [18] Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood*, 2015, 126: 2193—2201.
- [19] Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers [J]. *Nature*, 2016, 534: 402—406.
- [20] Green MR, 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: 1611—1618.
- [21] Fang W, Zhang J, Hong S, et al. EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: implications for oncotargeted therapy [J]. *Oncotarget*, 2014, 5: 12189—12202.
- [22] Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells [J]. *Int Immunol*, 2005, 17: 133—144.
- [23] Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 3462—3473.
- [24] Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 2313—2323.
- [25] Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20: 5064—5074.
- [26] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients [J]. *Nature*, 2014, 515: 563—567.
- [27] Armand P, Nagler A, Weller EA, et al. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31: 4199—4206.