

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.13.018

肺鳞状细胞癌和腺癌 PD-L1 蛋白及相关 miRNA 表达差异的研究 *

李廷慧¹ 刘芳² 任志鹏² 侯晓彬^{2Δ}

(1 解放军总医院第八医学中心皮肤科 北京 100091; 2 解放军总医院第一医学中心胸外科 北京 100853)

摘要 目的:探讨肺鳞状细胞癌(鳞癌)和腺癌 PD-L1 蛋白及相关 miRNA 表达的差异。**方法:**2019 年 5 月至 2020 年 11 月来我院就诊的非小细胞肺癌初治患者纳入本研究;按照病理类型,将患者分为腺癌组和鳞癌组;H&E 染色检测免疫细胞数量;免疫组化检测 PD-L1、ki-67、PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 的表达;miRNA 测序筛选鳞癌和腺癌间差异表达的 miRNA。**结果:**H&E 染色结果显示鳞癌组微环境中免疫细胞的数量为 86.86 ± 8.96 个/高倍视野 (HPF), 腺癌组的数量为 26.29 ± 3.99 个/HPF ($t=6.173, P<0.001$); 肺鳞癌组微环境免疫细胞 PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 阳性表达的比例分别为 $53.71 \pm 6.88\%$ 、 $35.29 \pm 3.25\%$ 和 $34.43 \pm 3.29\%$, 腺癌组阳性表达的比例分别为 $22.29 \pm 3.80\%$ 、 $13.43 \pm 2.32\%$ 和 $24.00 \pm 1.98\%$ ($t=3.997, P=0.002$; $t=5.476, P<0.001$; $t=2.719, P=0.019$); 肺鳞癌组患者 PD-L1 蛋白阳性表达的比例为 76.67%, 腺癌组的比例为 36.67% ($P=0.001$); 肺鳞癌 PD-L1 (miR-135、miR-24 和 miR-30b 等) 和 PD-1 (miR-802、miR-155 和 miR-3127-5p 等) 相关 miRNA 的表达均显著高于腺癌。**结论:**肺鳞癌 PD-L1 蛋白及相关 miRNA 的表达、微环境免疫细胞 PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 阳性比例均显著高于腺癌。

关键词:非小细胞肺癌;鳞癌;腺癌;PD-L1;miRNA

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)13-2495-04

Differences of PD-L1 Protein and Related miRNA Expression in Lung Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma*

LI Ting-hui¹, LIU Fang², REN Zhi-peng², HOU Xiao-bin^{2Δ}

(1 Department of dermatology, The 8th Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 1000091, China;

2 Department of thoracic surgery, The First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the differences of PD-L1 protein and related miRNA expression between lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Methods:** From May 2019 to November 2020, newly treated patients with non-small cell lung cancer in our hospital were included in this study. According to the pathological types, the patients were divided into adenocarcinoma group and squamous cell carcinoma group. H&E staining was used to detect the number of immune cells. PD-L1, Ki-67, PD-1, CTLA-4 and LAG-3 expression was detected by immunohistochemistry. The differentially expressed miRNAs between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma were screened by miRNA sequencing. **Results:** H&E staining results showed that the number of microenvironment immune cells in squamous cell carcinoma group was 86.86 ± 8.96 /HPF, and that in adenocarcinoma group was 26.29 ± 3.99 /HPF ($t=6.173, P<0.001$). The positive expression rates of PD-1, CTLA-4 and LAG-3 in microenvironment immune cells of lung squamous cell carcinoma group were $53.71 \pm 6.88\%$, $35.29 \pm 3.25\%$ and $34.43 \pm 3.29\%$, respectively, and those of adenocarcinoma group were $22.29 \pm 3.80\%$, $13.43 \pm 2.32\%$ and $24.00 \pm 1.98\%$ ($t=3.997, P=0.002$; $t=5.476, P<0.001$; $t=2.719, P=0.019$). The positive expression of PD-L1 protein was 76.67% in lung squamous cell carcinoma group and 36.67% in adenocarcinoma group ($P=0.001$). The expression of miRNAs associated with PD-L1 (miR-135, miR-24 and miR-30b, etc.) and PD-1 (miR-802, miR-155 and miR-3127-5p, etc.) in lung squamous cell carcinoma was significantly higher than that in adenocarcinoma. **Conclusion:** The expression of PD-L1 protein and related miRNA in lung squamous cell carcinoma, the positive proportion of PD-1, CTLA-4 and LAG-3 in microenvironment immune cells were significantly higher than those in adenocarcinoma.

Key words: Non-small cell lung cancer; Squamous cell carcinomas; Adenocarcinoma; PD - L1; miRNA

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)13-2495-04

前言

近几年,我国肺癌发病呈快速上升和年轻化的趋势,目前

已经位居癌症死亡的首位。非小细胞肺癌(Non small cell lung cancer, NSCLC)约占所有肺癌的 80%,腺癌和鳞状细胞癌(鳞癌)是最常见的病理类型^[1]。免疫治疗是最有前景的治疗手段,

* 基金项目:全军“十二五”应用基础研究面上项目(CWS11J105)

作者简介:李廷慧(1974-),副主任医师,主要研究方向:免疫调控与疾病发生

Δ 通讯作者:侯晓彬(1975-),男,医学博士,副主任医师,主要研究方向:肺癌的免疫治疗, E-mail: drhouxb@163.com

(收稿日期:2022-01-27 接受日期:2022-02-23)

程序性细胞死亡蛋白 1(Programmed death-1,PD-1)、PD-L1 是最重要的免疫检查点^[2,3]。目前已经有数种 PD-1/PD-L1 抑制剂进入临床使用,包括 Nivolumab、Pembrolizumab 和 Atezolizumab 等。许多临床研究结果均显示 PD-1/PD-L1 抑制剂可显著提高晚期 NSCLC 患者的生存期、总反应率和无进展生存期,疗效优于单纯化疗组^[4-6]。对于肺腺癌等大部分的恶性肿瘤,PD-1/PD-L1 抑制剂的治疗效果与 PD-L1 的表达呈正相关性,而对于肺鳞癌,PD-1/PD-L1 抑制剂的治疗效果与 PD-L1 的表达却不具有相关性^[7,8],引起这种治疗效果差异的原因目前尚不清楚。本项目旨在研究肺腺癌和鳞癌间 PD-L1 蛋白及其 miRNA 表达的差异,为临床免疫治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 临床资料

2019 年 5 月至 2020 年 11 月来我院就诊的 NSCLC 初治患者纳入本项研究。纳入标准:年龄在 18 至 65 周岁之间、病理诊断为 NSCLC、患者知情且同意参与本研究;排除标准:合并小细胞癌、肉瘤和类癌等其他肺部肿瘤、合并肺结核或 HIV 等慢性感染性疾病、合并高血压、糖尿病等慢性代谢性疾病、合并严重的血液系统疾病。按照病理类型,将 NSCLC 患者分为腺癌组和鳞癌组,每组均为 30 例患者。对比两组患者的性别、年龄、BMI、分化程度、临床分期等,均没有统计学差异(P 均 >0.05)。

1.2 试剂和材料

苏木精、伊红、多聚甲醛购于美国 Sigma 公司;羊血清工作液、免疫组化染色试剂盒购于北京中杉金桥生物科技有限公司;PD-L1、ki-67、CTLA-4 和 LAG-3 的一抗购于美国 Abcam 公司;Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司;miRNA 测序由广州锐博生物科技有限公司提供检测服务。

1.3 免疫组化

肺鳞癌和腺癌手术切除标本切成 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 大小,4%多聚甲醛固定过夜,石蜡切片后进行 H&E 染色。一部分切片在 100%二甲苯中脱蜡 30 min,3%过氧化氢处理,羊血清工作液进行抗原封闭。加入 PD-L1、ki-67、PD-1、CTLA-4 或者 LAG-3 的一抗,4 度冰箱中孵育 16 h。PBS 清洗 3 次,加入生物素标记二抗,37 度孵育 4 h。PBS 清洗 3 次后,加入碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液。清洗 3 次后进行免疫组化显色,待显示到合适颜色深度后使用自来水轻柔的冲洗。之后置于苏木精溶液中复染,脱水,透明,封片,最后在显微镜下观察 PD-L1、ki-67、PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 阳性表达细胞的比例。

1.4 miRNA 测序

收集肺鳞癌和腺癌手术切除的新鲜标本(鳞癌和腺癌各 4 例),置于液氮中保存。采用 Trizol 试剂处理标本后,由广州锐博生物科技有限公司进行 miRNA 测序,筛选差异表达的 miRNA。

1.5 统计学分析

数据采用 GraphPad 软件进行统计分析,计数资料之间的比较采用卡方检验,计量资料之间的比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表明鳞癌组和腺癌组之间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般资料

鳞癌组患者男性 18 名,女性 12 名,平均年龄 57.71 ± 3.39 岁,平均 BMI 为 $21.29 \pm 0.87 \text{ kg/m}^2$;腺癌组男性 14 名,女性 16 名,平均年龄 49.57 ± 3.42 岁,平均 BMI 为 $22.05 \pm 0.93 \text{ kg/m}^2$ 。对比两组患者的一般资料,差异均没有统计学意义(P 均 >0.05)。

表 1 患者的一般资料
Table 1 General patient information

Items	Squamous carcinoma	Adenocarcinoma	P value
Gender (male)	18	14	0.438
Age (year)	57.71 ± 3.39	49.57 ± 3.42	0.116
BMI(kg/m^2)	21.29 ± 0.87	22.05 ± 0.93	0.559
Differentiation			0.302
High - medium	12	17	
Low	18	13	

2.2 微环境免疫细胞 PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 的表达的比较

H&E 染色的结果显示鳞癌组微环境免疫细胞的数量为 86.86 ± 8.96 个/高倍视野(HPF),腺癌组的数量为 26.29 ± 3.99 个/HPF,两组之间具有显著的统计学差异($t=6.173$, $P<0.001$);肺鳞癌组微环境免疫细胞 PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 阳性表达的比例分别为 $53.71 \pm 6.88\%$ 、 $35.29 \pm 3.25\%$ 和 $34.43 \pm 3.29\%$,腺癌组阳性表达的比例分别为 $22.29 \pm 3.80\%$ 、 $13.43 \pm 2.32\%$ 和 $24.00 \pm 1.98\%$,差异均具有显著的统计学意义($t=3.997$, $P=0.002$; $t=5.476$, $P<0.001$; $t=2.719$, $P=0.019$)。图 1。

2.3 PD-L1 蛋白的表达的比较

肺鳞癌组患者 PD-L1 蛋白阳性表达的比例为 76.67%,腺癌组的比例为 36.67%,差异具有显著的统计学意义($P=0.001$);腺癌组患者 ki-67 增殖指数为 $24.71 \pm 2.60\%$,腺癌组的增殖指数为 $20.29 \pm 3.83\%$,差异不具有统计学意义($t=0.957$, $P=0.357$)。图 2。

2.4 PD-1 和 PD-L1 相关 miRNA 表达的比较

肺鳞癌 PD-L1 (miR-135、miR-24、miR-30b、miR-141、miR-802、miR-1184 和 miR-429) 和 PD-1 (miR-802、miR-155、miR-3127-5p、miR-940 和 miR-181) 相关 miRNA 的表达均显著高于腺癌。图 3。

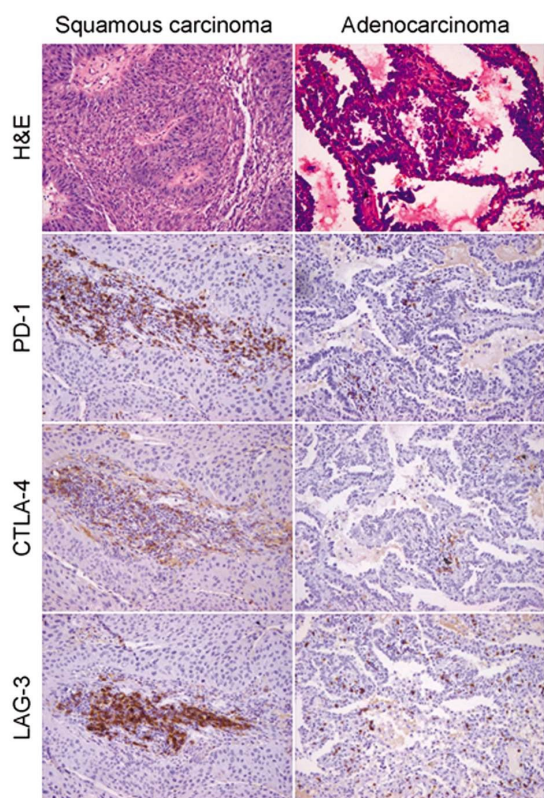


图1 H&E 染色检测免疫细胞的数量,免疫组化检测 PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 阳性表达免疫细胞的比例

Fig.1 H&E staining was used to detect the number of immune cells, and immunohistochemistry was used to detect the proportion of PD-1, CTLA-4 and LAG-3 positive immune cells

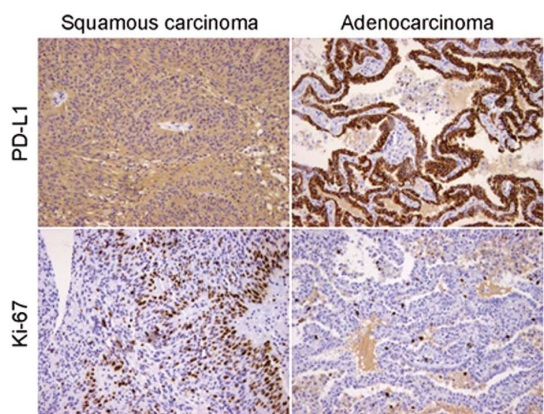


图2 免疫组化检测 PD-L1 和 ki-67 的表达,图显示 PD-L1 阳性表达的肺鳞癌和腺癌的病理学特征

Fig. 2 Immunohistochemistry was used to detect the expression of PD-L1 and Ki-67, showing the pathological features of lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma with positive PD-L1 expression

3 讨论

进入 21 世纪后,环境污染、吸烟和人口老龄化等使得我国肺癌的发病逐年快速升高。手术切除是早期肺鳞癌和腺癌最主要的治疗手段,晚期 NSCLC 则倾向于更优化的个体治疗方案。目前已经有数种针对肺腺癌的靶向药物进入临床,临床研究的结果显示这些药物具有很好的治疗效果。而对于肺鳞癌,目前还没有十分有效的靶向药物^[9]。随着分子生物学、免疫学及生物

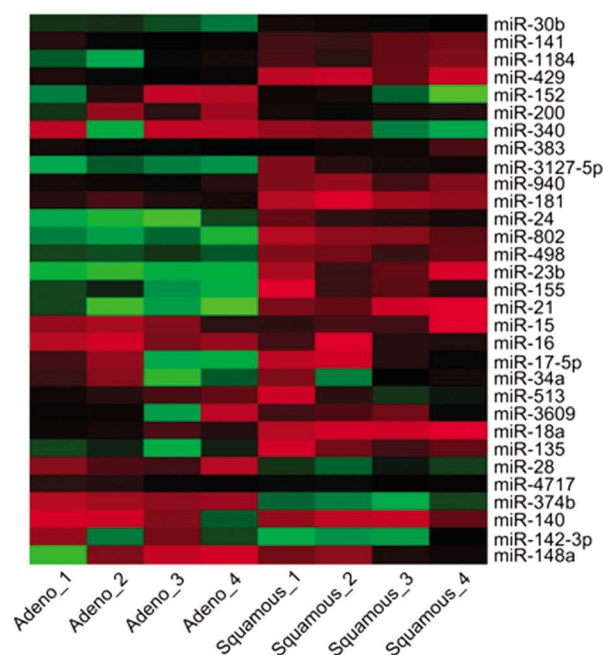


图3 miRNA 表达的热图,肺鳞癌 PD-1 和 PD-L1 相关 miRNA 表达显著高于腺癌

Fig.3 Heat map of miRNA expression, pd-1 and PD-L1 related miRNA expression in lung squamous cell carcinoma was significantly higher than that in adenocarcinoma

工程技术研究的深入和临床转化,免疫治疗已经成为当前肿瘤治疗领域的研究热点^[10]。PD-1 是目前最常用的免疫检查点,主要表达于活化的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞和巨噬细胞等。调节性 T 细胞和 M2 型单核/巨噬细胞表面等免疫抑制细胞表面也可以检测到 PD-1 的高表达^[11]。PD-L1 是 PD-1 的主要配体,在许多恶性肿瘤表面高表达,包括 NSCLC、尿路上皮癌、恶性黑色素瘤和前列腺癌等^[12-14]。我们收集肺鳞癌和腺癌手术切除标本各 30 例,免疫组化结果显示肺鳞癌 PD-L1 阳性表达的比例显著高于腺癌,鳞癌内浸润免疫细胞 PD-1 阳性表达的比例也高于腺癌,差异均具有统计学意义。这些结果提示 PD-1/PD-L1 抑制剂对肺鳞癌的治疗效果似乎要优于腺癌,然而临床研究结果却显示对于 PD-L1 表达 $\geq 1\%$ 的 NSCLC 患者,PD-1/PD-L1 抑制剂治疗肺鳞癌组的总生存率、无进展生存期、客观缓解率均显著低于腺癌组。这说明一些因素可能影响了肺鳞癌的 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗效果。

CTLA-4 和 LAG-3 是另外两种常用的免疫检查点,目前有关靶向药物正在进行临床实验,均显示出很好的临床疗效^[15-17]。CTLA-4 又被称为 CD152,主要在活化的 T 细胞和调节性 T 细胞表面表达,可通过与抗原呈递细胞表面的 CD80 或 CD86 结合,达到抑制免疫反应的作用。研究显示 CTLA-4 的表达与 NSCLC 的恶性程度、临床分期以及分化程度均具有一定的相关性^[18]。LAG-3 主要在活化的 T 细胞、NK 细胞、以及调节性 T 细胞表面高表达,在维持免疫平衡和内环境稳定中发挥着重要的生物学功能^[19]。研究显示 NSCLC 微环境内 LAG-3⁺ 免疫细胞比例显著升高,参与了肿瘤的免疫逃逸和远处转移。我们进一步比较了 NSCLC 不同病理类型间 CTLA-4 和 LAG-3 的差异,结果显示肺鳞癌微环境中 CTLA-4⁺ 和 LAG-3⁺ 免疫细胞的比例均显著高于腺癌。在 PD-1/PD-L1 抑制剂阻断 PD-1 与

PD-L1 后,鳞癌内高表达 CTLA-4和 LAG-3 的免疫细胞免疫激活被抑制,很难发挥相应的肿瘤杀伤活性,这可能是 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗肺鳞癌效果不佳的重要原因,具体的机制还需要进一步研究。

miRNA 主要在转录后水平调控靶基因的表达,越来越多的证据表明 miRNA 家族在 NSCLC 的发生、进展、转移和复发中均发挥着重要的作用^[20]。我们前期筛选和明确了 9 种具有诊断意义的 miRNA (miR-486-1、miR-486-2、miR-153、miR-210、miR-9-1、miR-9-2、miR-9-3、miR-577 和 miR-4732),可用于肺腺癌的筛查和治疗效果的预测^[21]。miRNA 与免疫反应具有紧密的相关性,是维持免疫稳态的关键分子,可调控 T 细胞的增殖、活化、分化和免疫应答等^[22-24]。miRNA 调控 PD-L1 的表达,主要是通过 PTEN/AKT (miR-18a、miR-23a-5p 和 miR-21 等)和 STAT (miR-802 和 miR-135 等)等通路介导的^[25]。我们采用 miRNA 测序筛选了肺腺癌和鳞癌之间 miRNA 差异,结果显示鳞癌细胞内促进 PD-L1 和 PD-1 表达的 miRNA 均显著高于腺癌。最新研究显示肿瘤细胞可通过外泌体递送 PD-L1 信号,抑制 PD-1/PD-L1 抑制剂引起的 T 细胞活化和增殖,敲除外泌体生成和分泌的关键基因可明显提高 PD-1/PD-L1 抑制剂的治疗效果^[26]。这提示鳞癌细胞可能通过外泌体将 PD-L1 相关 miRNA 递送到免疫细胞内,诱导 PD-1/PD-L1 抑制剂的耐药,相关机制需要进一步实验验证。

综上,肺鳞癌 PD-L1 蛋白及相关 miRNA 的表达、微环境免疫细胞 PD-1、CTLA-4 和 LAG-3 阳性比例均显著高于腺癌,我们的研究为 NSCLC 的免疫治疗提供了新的理论参考。

参考文献(References)

- [1] Yang CY, Yang JC, Yang PC. Precision Management of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Annu Rev Med*, 2020, 71: 117-136
- [2] Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1120-1133
- [3] Dummer R, Lebbé C, Atkinson V, et al. Combined PD-1, BRAF and MEK inhibition in advanced BRAF-mutant melanoma: safety run-in and biomarker cohorts of COMBI-i [J]. *Nat Med*, 2020, 26 (10): 1557-1563
- [4] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(17): 1627-1639
- [5] Horn L, Spigel DR, Vokes EE, et al. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057) [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(35): 3924-3933
- [6] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): 123-135
- [7] Abu Hejleh T, Furqan M, Ballas Z, et al. The clinical significance of soluble PD-1 and PD-L1 in lung cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 143: 148-152
- [8] Tsoukalas N, Kiakou M, Tsapakidis K, et al. PD-1 and PD-L1 as immunotherapy targets and biomarkers in non-small cell lung cancer [J]. *J BUON*, 2019, 24(3): 883-888
- [9] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-454
- [10] Nosaki K, Saka H, Hosomi Y, et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in elderly patients with PD-L1-positive advanced non-small-cell lung cancer: Pooled analysis from the KEYNOTE-010, KEYNOTE-024, and KEYNOTE-042 studies [J]. *Lung Cancer*, 2019, 135: 188-195
- [11] Bodor JN, Boumber Y, Borghaei H. Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancer*, 2020, 126(2): 260-270
- [12] Miyazawa T, Marushima H, Saji H, et al. PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer Including Various Adenocarcinoma Subtypes[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 25(1): 1-9
- [13] Zhang M, Li G, Wang Y, et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10255
- [14] Gao Y, Yang J, Cai Y, et al. IFN- γ -mediated inhibition of lung cancer correlates with PD-L1 expression and is regulated by PI3K-AKT signaling[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4): 931-943
- [15] Formenti SC, Rudqvist NP, Golden E, et al. Radiotherapy induces responses of lung cancer to CTLA-4 blockade [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (12): 1845-1851
- [16] Reck M, Borghaei H, O'Byrne KJ. Nivolumab plus ipilimumab in non-small-cell lung cancer[J]. *Future Oncol*, 2019, 15(19): 2287-2302
- [17] Datar I, Sanmamed MF, Wang J, et al. Expression Analysis and Significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in Human Non-Small Cell Lung Cancer Using Spatially Resolved and Multiparametric Single-Cell Analysis[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(15): 4663-4673
- [18] Corrales L, Scilla K, Cagle C, et al. Immunotherapy in Lung Cancer: A New Age in Cancer Treatment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 995: 65-95
- [19] Ma C, Sun X, Shen D, et al. Ectopic expression of LAG-3 in non-small-cell lung cancer cells and its clinical significance[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(6): e23244
- [20] Pozza DH, De Mello RA, Araujo RLC, et al. MicroRNAs in Lung Cancer Oncogenesis and Tumor Suppression: How it Can Improve the Clinical Practice? [J]. *Curr Genomics*, 2020, 21(5): 372-381
- [21] Ren ZP, Hou XB, Tian XD, et al. Identification of nine microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(2): 315-327
- [22] He Y, Wang Y, Zhao S, et al. sLAG-3 in non-small-cell lung cancer patients' serum[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 4781-4784
- [23] Cheng Z, Qiu S, Jiang L, et al. MiR-320a is downregulated in patients with myasthenia gravis and modulates inflammatory cytokines production by targeting mitogen-activated protein kinase 1 [J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(3): 567-76
- [24] Chen H, Lu Q, Chen C, et al. β -catenin regulates effects of miR-24 on the viability and autophagy of glioma cells [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(2): 1285-1290
- [25] Ashrafzadeh M, Zarrabi A, Hushmandi K, et al. PD-1/PD-L1 axis regulation in cancer therapy: The role of long non-coding RNAs and microRNAs[J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117899
- [26] Poggio M, Hu T, Pai CC, et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory [J]. *Cell*, 2019, 177(2): 414-427