

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.020

PD-L1 和 CD147 在口腔鳞癌中的表达与临床意义 *

曹 博 李吉辰[△] 朴松林 赛音乌力吉 刘 冲 赵大勇

(哈尔滨医科大学附属口腔医院口腔颌面外科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨口腔鳞癌组织中免疫共刺激分子 PD-L1 与细胞外基质蛋白酶诱导因子 CD147 的表达、两者的相关性及其临床意义。**方法:**应用免疫组化技术检测 66 例口腔鳞癌组织及 36 例正常口腔黏膜组织中 PD-L1 和 CD147 的表达,分析 PD-L1、CD147 表达的相关性及二者与口腔鳞癌临床病理参数的关系。**结果:**PD-L1 在口腔鳞癌组织中表达阳性率为 68.18% (45/66),正常口腔黏膜组织中表达阳性率仅为 16.67%(6/36);CD147 在口腔鳞癌组织中表达阳性率为 74.24%(49/66),明显高于其在正常口腔黏膜组织中的表达 13.88%(5/36)。PD-L1 和 CD147 两者在口腔鳞癌组织中阳性表达率与口腔黏膜组织相比均明显升高($P<0.01$)。统计学分析显示,PD-L1 和 CD147 在口腔鳞癌组织中的高表达与患者的性别年龄、吸烟史及肿瘤的体积等因素无明显相关,但与 TNM 分期及鳞癌的组织分化程度紧密相关。口腔鳞癌组织中 PD-L1 与 CD147 两者相关性分析 $r=0.342$, P 值小于 0.01,说明二者的表达呈显著正相关。**结论:**口腔鳞癌组织中 PD-L1 与 CD147 均呈高表达,并且二者的过度表达可能与口腔鳞癌的发生、发展关系密切,合并检测二者可能为 OSCC 的诊疗及预后指明新的方向,为口腔鳞癌的靶向治疗提供新的靶点。

关键词:口腔鳞癌;免疫共刺激分子 PD-L1;细胞外基质蛋白酶诱导因子 CD147;免疫组化

中图分类号:R739.8 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)07-1293-04

Expressions and Clinical Significances of PD-L1 and CD147 in the Oral Squamous Cell Carcinoma*

CAO Bo, LI Ji-chen[△], PIAO Song-lin, SAI Yin wu-liji, LIU Chong, ZHAO Da-yong

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Harbin Medical University,
Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To study the expressions and clinical significances of PD-L1 and CD147 in the oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** The expressions of PD-L1 and CD147 were detected by immunohistochemistry method in 66 cases of OSCC patients and 36 cases of controls with normal oral mucosa tissues. The relationship of PD-L1 and CD147 expressions with the clinicopathologic features were analyzed. **Results:** The positive expressions of PD-L1 and CD147 were detected by immunohistochemistry method in 66 cases of OSCC patients and 36 cases of controls with normal oral mucosa tissues. The relationship of PD-L1 and CD147 expressions with the clinicopathologic features were analyzed. The positive expressions of PD-L1 and CD147 in the OSCC (68.18%,74.24%) were significantly higher than those of in normal oral mucosa tissue (16.67%,13.88%)($P<0.01$). The expression of PD-L1 was positively correlated with the expression of CD147 ($r=0.342$, $P<0.01$). The high expressions of PD-L1 and CD147 were associated with the differentiation degree and TNM stage, but they were not correlated with the gender, age, smoker and tumor size. **Conclusions:** The high expression of PD-L1 and CD147 were closely related to the occurrence, development and metastasis of OSCC. Therefore, combined detection of PD-L1 and CD147 might be valuable for the early diagnosis and prognostic prediction of OSCC. It also provides a new target for the treatment of oral squamous carcinoma.

Key words: Oral squamous cell carcinoma; PD-L1; CD147; Immunohistochemical

Chinese Library Classification(CLC): R739.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1293-04

前言

口腔鳞癌是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤之一,发病率呈逐年上升趋势^[1]。虽然口腔鳞癌的治疗方法近年来得到不断的

改进,但患者的预后及生存质量仍难以达到预期效果^[2]。免疫逃逸机制是使肿瘤细胞免受宿主防御机制杀伤的重要途径^[3],它可以使肿瘤细胞逃避机体免疫细胞的监视与杀伤,促进肿瘤生长。PD-L1(B7-H1)属于 B7 家族,PD-L1 与机体 T 细胞上的受

* 基金项目:黑龙江省留学归国科学基金项目(LC2009C09)

作者简介:曹博(1987-),男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:口腔颌面部肿瘤的基础研究与治疗,E-mail:357176277@qq.com

△ 通讯作者:李吉辰,男,博士,教授,硕士研究生导师,主要研究方向:口腔颌面部肿瘤的基础研究与治疗,

电话:0451-85556077,E-mail:lijichen@163.com

(收稿日期:2018-05-29 接受日期:2018-06-24)

体 PD-1 组成 PD-1/PD-L1 信号通路,可抑制免疫细胞的产生,使肿瘤细胞免受机体免疫监视及杀伤,形成免疫抑制性肿瘤微环境^[4],PD-L1 在免疫应答的负性调控方面发挥着重要作用,在多种人类恶性肿瘤组织中,如小细胞肺癌^[5]、肝癌^[6]、乳腺癌^[7]以及神经内分泌癌^[8]等,PD-L1 呈现高表达。CD147 分子是一种跨膜糖蛋白,是免疫球蛋白超家族^[9]。CD147 在多种恶性肿瘤细胞中呈现高度表达,可通过诱导基质金属蛋白酶(MMP)的产生引起肿瘤细胞的侵袭转移^[10]。本实验研究旨在初步探究 PD-L1 及 CD147 在口腔鳞癌组织中的表达及二者相关性关系,并结合实验数据进行 PD-L1 和 CD147 与口腔鳞癌病理学参数之间关系的研究分析,从而为其预防、早期诊断及预后判断提供临床诊断指标及相应理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收集哈尔滨医科大学第一临床医院病理科 2010 年 5 月至 2015 年 10 月期间保存的 66 例口腔鳞癌组织石蜡标本进行实验检测,标本患者年龄在 40-78 岁之间,平均年龄 52 岁,其中男性患者及女性患者分别为 40 例、26 例。其中高中分化标本 56 例,低分化 10 例。对照组选取 36 例正常口腔黏膜组织石蜡标本。所有病例资料记录完整,术前均未行放疗或化疗等治疗。口腔鳞癌临床分期应用国际抗癌联盟 (UICC)2010 年制订的 TNM 分期标准。

1.2 试剂与免疫组化检测方法

PD-L1 兔抗人多克隆抗体、CD147 兔抗人多克隆抗体等实验所用材料均购自武汉博奥生物有限公司。实验步骤严格按照

说明书进行,应用 SP 法,常规切片脱蜡,梯度酒精脱水,使用柠檬酸钠微波抗原修复,显微镜下观察。

1.3 结果判定

PD-L1 和 CD147 在口腔鳞癌组织中的抗原阳性表达均为细胞膜被染出棕黄色颗粒。采用双盲法阅片,随机观察 5 个高倍镜不重叠视野($\times 400$)共 200 个瘤细胞,具体分级如下:阳性细胞率以 $\leq 10\%$ 记 0 分, $>10\%-50\%$ 记 1 分, $>50\%-80\%$ 记 2 分, $>80\%$ 记 3 分;具体评分按照染色程度分级:无染色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别记为 0、1、2、3 分;实验结果按两者的得分之积来判读: ≥ 3 分计为阳性(+), < 3 分计为阴性(-)。

1.4 统计学方法

本实验应用 Spearman 法行等级相关分析, χ^2 检验统计数资料,采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 口腔鳞癌及正常口腔黏膜组织中 PD-L1 与 CD147 表达比较

在口腔鳞癌中 PD-L1 和 CD147 均主要表达于细胞膜中,癌细胞均被染成棕褐色。二者在正常口腔黏膜组织中不表达或低表达(见图 1)。口腔鳞癌组织及正常口腔黏膜组织 PD-L1 阳性表达率分别为 68.18%(45/66)、16.67%(6/36)。CD147 在口腔鳞癌组织中阳性表达率为 74.24%(49/66),在口腔黏膜正常组织中阳性表达为 13.88%(5/36)。两种因子在实验组中的阳性表达率均高于对照组($P<0.01$)。见表 1。

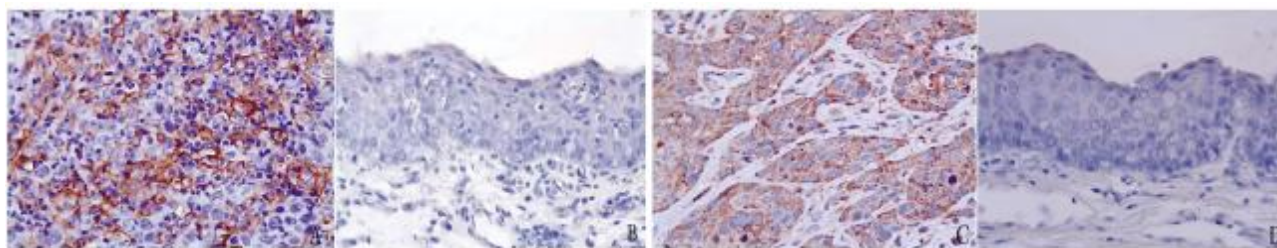


图 1 PD-L1 和 CD147 在口腔鳞癌及正常口腔黏膜组织中的表达比较($\times 400$ 倍)

Fig.1 Comparison of the expressions of PD-L1 and CD147 between the OSCC and normal oral mucosa tissues ($\times 400$)

A: PD-L1 在口腔鳞癌组织中的表达;B: PD-L1 在正常口腔黏膜组织中的表达;C: CD147 在口腔鳞癌组织中的表达;D: CD147 在正常口腔黏膜组织中的表达

A: Expression of PD-L1 in OSCC tissue; B: Expression of PD-L1 in normal oral mucosa tissue; C: Expression of CD147 in OSCC tissue; D: Expression of CD147 in normal oral mucosa tissue

表 1 PD-L1 和 CD147 在口腔鳞癌及正常口腔黏膜组织中的表达

Table 1 The expressions of PD-L1 and CD147 between the OSCC and normal oral mucosa tissues

Groups	n	PD-L1		Positive rate(%)	CD147		Positive rate(%)
		+	-		+	-	
OSCC tissues	66	45	21	68.18	49	17	74.24
Normal oral mucosa tissues	36	6	30	16.67*	5	31	13.88*

注: * $P<0.01$ 与正常口腔黏膜组织相比。

Note: * $P<0.01$ compared with the normal oral mucosa tissues.

2.2 口腔鳞癌组织中 PD-L1 及 CD147 的表达与患者临床病理特征的关系

本实验中,PD-L1 的表达口腔鳞癌的 TNM 分期及组织分

化程度呈显著正相关 ($P < 0.05$), 与其他实验因素则无明显相关,CD147 的表达情况与 PD-L1 基本一致。详见表 2。

表 2 qPD-L1、CD147 的表达与口腔鳞癌临床病理参数的关系

Table 2 Correlation of the expressions of PD-L1 and CD147 with the clinicopathologic features of OSCC

Factors		PD-L1				CD147			
		+	-	x ²	P	+	-	x ²	P
Gender									
Female	26	18	8	0.022	0.552	16	10	3.621	0.054
Male	40	27	13			33	7		
Age(year)									
≤ 55	28	21	7	1.042	0.227	23	5	1.587	0.165
> 55	38	24	14			26	12		
Smoker									
Yes	29	17	12	2.108	0.113	19	10	2.059	0.125
No	37	28	9			30	7		
Degree of Differentiation									
Well/Moderately	56	35	21	5.500	0.015	39	17	4.089	0.039
Poorly	10	10	0			10	0		
Tumor size									
≤ 4 cm	27	15	12	3.358	0.0969	20	7	0.001	0.599
> 4 cm	39	30	9			29	10		
Clinical stage									
I - II	39	20	19	12.551	<.0001	24	15	8.046	0.004
III -IV	27	25	2			25	2		

2.3 PD-L1 和 CD147 表达的相关性分析

阳性表达的 PD-L1 在 66 例口腔鳞癌组织中占 45 例 (CD147 阳性 38 例, 阴性 7 例); 阴性表达的 PD-L1 占 21 例

(CD147 阳性 11 例, 阴性 10 例)。应用 Spearman 等级相关性分析数据结果, $r=0.342$, $P=0.008 < 0.01$, 证明二者表达存在显著正相关。见表 3。

表 3 口腔鳞癌组织中 PD-L1 和 CD147 表达的相关性

Table 3 Correlation of the PD-L1 expression with CD147 expression in the OSCC tissue

PD-L1	CD147		Total	r	P
	+	-			
+	37	7	45	0.342	0.008
-	11	10	21		
Total	49	17	66		

3 讨论

肿瘤的免疫逃逸机制是肿瘤的发生发展的重要机制之一^[11], 目前, 围绕该机制做了大量研究。PD-L1(曾命名为 B7-H1)是近年发现的 B7 家族中的刺激分子, 属于 1 型跨膜蛋白, 与其他 B7 家族分子不同的是它具有负向调节免疫效应^[12]。正常生理状况下, PD-L1 与淋巴细胞表面的 PD-1 的相结合, 可导致免疫

细胞凋亡, 进而使淋巴细胞的功能得到抑制, 此机制在避免自身免疫性疾病及免疫耐受中意义重大^[13,14]。但在肿瘤的发生发展中, 肿瘤细胞高表达的 PD-L1 与免疫细胞上的 PD-1 结合后通过上述机制使肿瘤细胞免受淋巴细胞的杀伤, 引起肿瘤细胞的免疫逃逸^[15]。PD-L1 在正常组织中呈低表达或不表达, 而在其他类型的肿瘤如非小细胞肺癌、肾细胞癌、肝癌、乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤中呈过度表达, 并与肿瘤的分期、淋巴结转移及

预后等临床病例参数关系密切^[16,17]。如今 PD-L1 相关抗体已应用于临床,并取得了很好的临床效果^[18,19]。

本实验中,口腔鳞癌组织中 PD-L1 的阳性率为 68.18%,明显高于对照组正常黏膜组织 16.67%,说明高表达的 PD-L1 在口腔鳞癌的发生发展过程中意义重大。研究显示 PD-L1 的高表达与肿瘤恶性程度呈正相关,与肿瘤的 TNM 分期关系同样紧密($P < 0.05$),这使它有望作为判断口腔鳞癌的预防、早期诊断及预后判断等相关临床病理参数的重要指标。

CD147 基因定位于人 19 号 p13,它是 MMPs 的诱导子,能够刺激基质细胞 MMPs 的产生,调节由 MMPs 激活的胶原平衡,进而破坏细胞在组织中的结构支架,干扰细胞间的相互通讯,降解细胞外基质及基膜,促进肿瘤局部侵袭和转移^[20]。正常细胞中 CD147 低表达甚至不表达,在多种恶性肿瘤中(如乳腺癌、肺癌、肾癌、恶性黑色素瘤、淋巴瘤等)可以检测到 CD147 的高度表达^[21]。文献报道 CD147 高表达于口腔鳞癌^[22],通过本实验我们发现 CD147 的表达与口腔鳞癌的 TNM 分期关系紧密,并且口腔鳞癌的恶性程度越高,CD147 的表达越高,而与患者年龄、性别及肿瘤大小无关($P > 0.05$)。细胞基膜与细胞外基质是癌细胞侵袭转移的主要障碍,CD147 能够刺激基质金属蛋白酶(MMPs)的产生,后者可以破坏机体的组织学屏障,使肿瘤细胞暴露于正常组织,以利于肿瘤向周围组织的侵袭和转移,陈丽等^[23]在实验中发现 MMPs 的高表达与口腔鳞癌患者区域性淋巴结转移关系密切。因此,CD147 有望成为预测口腔鳞癌转移侵袭的关键指标。

Schmidt J 等^[24]应用基因敲除的方法敲除间变性大细胞淋巴瘤激酶(ALK)阳性细胞系上的 C/EBP β ,通过免疫组化的方法进行试验对比,结果与对照组相比,实验组 CD147 及 PD-L1 的表达明显下降,说明 CD147 及 PD-L1 是 C/EBP β 的下游靶点,并且二者表达呈正相关,这与本实验所得结论相一致。

综上,本实验研究表明 PD-L1 和 CD147 的高度表达与口腔鳞癌的 TNM 分期及恶性分化程度密切相关,共检测二者可能为口腔鳞癌的诊治指明新的方向。但口腔鳞中 PD-L1 与 CD147 的相互作用机制有待于继续探索研究。

参考文献(References)

- [1] 张鹏,欧阳少波,王军,等.程序性死亡分子 1 及其配体在口腔鳞状细胞癌患者外周血中的表达及临床意义[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(5): 529-533
- [2] Gang-cai Zhu, Chang-yun Yu, Li She, et al. Metadherin Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression Is Dependent Upon the PI3K/Akt Pathway in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck[J]. *Medicine*, 2015, 94(6): 1-10
- [3] Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJ. Targeting epigenetic readers in cancer[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(7): 647-657
- [4] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4): 252-264
- [5] Yamane H, Isozaki H, Takeyama M, et al. Programmed cell death protein 1 and programmed death-ligand 1 are expressed on the surface of some small-cell lung cancer lines [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5 (4): 1553-1557
- [6] Kan G, Dong W. The expression of PD-L1 APE1 and P53 in hepato-

- cellular carcinoma and its relationship to clinical pathology[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(16): 3063-3071
- [7] Pan BJ, Xu C, Ping GQ, et al. Correlation analysis of PD-L1 expression and prognosis in triple-negative breast cancers [J]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2017, 46(12): 822-826
- [8] Phillips T, Millett MM, Zhang X, et al. Development of a Diagnostic Programmed Cell Death 1-Ligand 1 Immunohistochemistry Assay for Nivolumab Therapy in Melanoma [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2018, 26(1): 6-12
- [9] Pennings GJ, Kritharides L. CD147 in cardiovascular disease and thrombosis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40(7): 747-755.
- [10] Fei F, Li S, Fei Z, Chen Z. The roles of CD147 in the progression of gliomas[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(11): 1351-1359
- [11] Hamid O, Carvajal RD. Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13(6): 847-861
- [12] 王师, 罗龙龙, 吕明, 等. PD-1/PD-L1 信号通路及其在肿瘤中的应用[J]. *国际药学研究杂志*, 2015, 42(2): 143-147
- [13] Chang DY, Song SH, You S, et al. Programmed death-1 (PD-1)-dependent functional impairment of CD4⁺T Cells in recurrent genital papilloma[J]. *Clin Exp Med*, 2014, 14(3): 305-313
- [14] Dawn E, Dolan P, Shilpa G. PD-1 pathway inhibitors: changing the landscape of cancer immunotherapy [J]. *Cancer Control*, 2014, 21(3): 231-237
- [15] Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(4): 227-242
- [16] Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(2): 157-163
- [17] 施敬瑶, 张海洋, 陈公琰. PD-1/PD-L1 信号通路在实体瘤中的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(10): 47-50
- [18] Rizvi NA, Mazieres J, Planchard D, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(3): 257-265
- [19] Merelli B, Massi D, Cattaneo L, et al. Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: biological rationale, clinical challenges and opportunities[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 89(1): 140-65
- [20] Yang H, Chen BL. CD147 in ovarian and other cancers [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(1): 2-8
- [21] Gdaniel Grass, Lauren BT, Momka B, et al. CD147, CD44, and the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway cooperate to regulate breast epithelial cell invasiveness[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(36): 26089-26104
- [22] Liu Y, Cui, Chen J, et al. Isolation and phenotypic characterization of side population cells in oral squamous cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3642-3646
- [23] 陈丽, 向丽, 周铁军, 等. 口腔鳞癌中 RECK 和 MMP-9 蛋白的表达及临床意义[J]. *泸州医学院学报*, 2014, 37(1): 75-78
- [24] Schmidt J, Bonzheim I, Steinhilber J, et al. EMMPRIN (CD147) is induced by C/EBP β and is differentially expressed in ALK⁺ and ALK⁻ anaplastic large-cell lymphoma[J]. *Lab Invest*, 2017, 97(9): 1095-1102