

CDK4 与 PD - L1 在结直肠癌组织中的表达及相关性分析

王彩莹 高成英 李长天

摘要 目的 探讨结直肠腺癌及癌旁组织中 CDK4 和 PD - L1 蛋白的表达、相互关系及其意义。方法 应用组织芯片及免疫组化 Max Vision 两步法检测结直肠腺癌及癌旁组织中 CDK4 和 PD - L1 蛋白的表达情况。结果 结直肠腺癌组织中 CDK4 和 PD - L1 蛋白表达率分别为 43.47% (50/115)、33.04% (38/115), 显著高于癌旁组织 ($P < 0.01$)。病理类型含黏液、淋巴结转移组 CDK4 阳性表达率高于不含黏液组、淋巴结未转移组 ($P < 0.05$); 癌组织分化程度低的患者 PD - L1 阳性表达率高于分化程度高的病例 ($P < 0.05$)。结直肠腺癌组织中 CDK4 和 PD - L1 蛋白表达呈正相关 ($r_s = 0.204, P < 0.05$)。结论 在结直肠腺癌组织中, CDK4 的表达与 PD - L1 呈正相关, 且 CDK4 的表达与组织类型、淋巴结转移有关, PD - L1 的表达与分化程度呈负相关。

关键词 程序性细胞死亡蛋白配体 1 细胞周期素依赖激酶 4 结直肠腺癌 组织芯片

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.037

Expression and Correlation of CDK4 and PD - L1 in Colorectal Cancer Tissues. Wang Caiying, Gao Chengying, Li Changtian. Gansu University of Chinese Medicine, Gansu 730000, China

Abstract Objective To investigate the expression, correlation and significance of CDK4 and PD - L1 proteins in colorectal adenocarcinoma and adjacent tissues. **Methods** The expression of CDK4 and PD - L1 in colorectal adenocarcinoma and adjacent tissues was detected by tissue chip technology and immunohistochemistry Max Vision two - step method. **Results** The expression rates of CDK4 and PD - L1 in colorectal adenocarcinoma tissues were 43.47% (50/115) and 33.04% (38/115), which were significantly higher than those in adjacent tissues ($P < 0.01$). The pathological type of CDK4 positive expression rate in the group with mucus and lymph node metastasis was higher than that in the group without mucus and lymph node non - metastasis ($P < 0.05$). The positive expression rate of PD - L1 in patients with low differentiation was higher than that in patients with high differentiation ($P < 0.05$). There was a positive correlation between CDK4 and PD - L1 protein expression in colorectal adenocarcinoma ($r_s = 0.204, P < 0.05$). **Conclusion** In colorectal adenocarcinoma, the expression of CDK4 is positively correlated with PD - L1, and the expression of CDK4 is correlated with tissue type and lymph node metastasis, while the expression of PD - L1 is negatively correlated with the degree of differentiation.

Key words PD - L1; CDK4; Colorectal cancer; Tissue chip technology

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是最常见的消化道恶性肿瘤之一。2018 年, Freddie 等^[1] 在《临床医师癌症》杂志在线发表全球癌症统计, 对 185 个国家 36 种癌症的发生率和病死率进行了推算, 结直肠癌的发生率 (6.1%) 排名第 4 位, 次于肺癌 (11.6%)、乳腺癌 (11.6%)、前列腺癌 (7.1%), 病死率 (9.2%) 排名第 2 位, 仅次于肺癌 (18.4%)。估计 2018 年将发生 180 多万例新的结直肠癌病例和 88.1

万例死亡病例。

在结直肠癌的分子水平, 细胞周期失调似乎是癌症进展的一个关键因素, 而细胞周期素依赖激酶 (cyclin - dependent kinase, CDK) 是细胞周期的核心因素。所以, 针对 CDK4/6 的靶向治疗是一种重新控制细胞周期的方案。近年来, CDK4 抑制剂联合免疫检查点抑制剂治疗癌症为抗癌治疗提出了新的治疗方向。因此本研究通过检测 CDK4、程序性细胞死亡蛋白配体 1 (programmed death ligand 1, PD - L1) 在结直肠癌组织中的表达情况, 探讨其与结直肠癌发生、发展和临床病理特征的关系, 进而探讨 CDK4 与 PD - L1 的相关性, 为 CDK4 抑制剂与 PD - L1 抑制剂的联合治疗提供参考。

基金项目: 甘肃中医药大学研究生创新基金资助项目 (CX2019 - 39)

作者单位: 730000 兰州, 甘肃中医药大学

通讯作者: 李长天, 教授, 硕士生导师, 电子邮箱: lichangtian68@163.com

资料与方法

1. 一般资料:收集中国人民解放军联勤保障部队第九四零医院 2013 ~ 2017 年的结直肠癌病理组织标本 120 例,癌旁组织 40 例。所有纳入患者均经病理学证实为结直肠癌。将 160 例组织做成组织芯片,通过 HE 染色在镜下逐一进行病理诊断,镜下排除结直肠癌组的 5 例脂肪组织。115 例结直肠癌患者术前均未接受放疗、化疗,其中男性 75 例,女性 40 例。切除时患者年龄 26 ~ 85 岁, < 60 岁者 56 例, ≥ 60 岁者 59 例。肿瘤直径 < 5cm 者 61 例, ≥ 5cm 者 54 例。结肠癌 56 例(其中左半结肠癌 33 例,右半结肠癌 23 例),直肠癌 59 例。高分化腺癌 21 例,中分化腺癌 69 例,低分化腺癌 25 例。其中,病理分型中含黏液有 13 例,不含黏液 102 例。有淋巴结转移 45 例,无淋巴结转移 70 例,浸润深度 T₁ + T₂ 期 27 例, T₃ + T₄ 期 88 例。

2. 组织芯片制作:数据库中挑选确诊为结直肠癌患者的石蜡标本,镜下标记切片上癌的区域,根据切片标记蜡块,利用组织芯片仪制作空白蜡块,同时将做好标记的供体蜡块孔芯转移到受体蜡块,每个蜡块 6 × 7 点组织阵列,含 42 个位点,第一排第 1 个与最后一排倒数第 2 个不插入组织,用于定位(图 1、图 2)。制作结直肠癌组织芯片蜡块 4 个,共 160 例(本实验组织芯片镜下排除 5 例脂肪组织)。

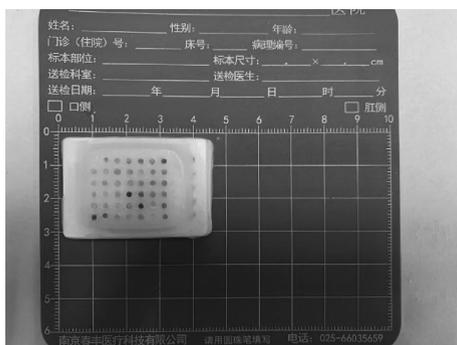


图 1 组织芯片蜡块

3. 染色:将组织芯片以 4 μm 厚度切片,60℃ 烤制 3h,常规脱水脱蜡,EDTA 高温高压修复 3min,3% 过氧化氢 37℃ 下封闭 10min,滴加一抗静置于 37℃ 烤箱 2h,滴加二抗室温静置 20min,DAB 显色,苏木精复染细胞核,1% 盐酸乙醇分化,氨水返蓝,最后不同浓度梯度乙醇脱水,吹干,二甲苯透明,中性树胶封片。免疫组化采用 Max Vision 二步法。兔抗人 CDK4 单克隆抗体、兔抗 PD - L1 抗体、快捷型酶标羊抗鼠/兔

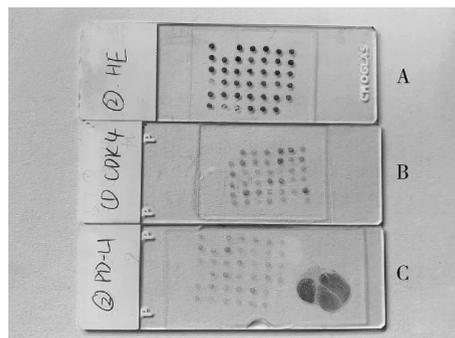


图 2 组织芯片切片

A. HE 染色;B. CDK4 免疫组化染色;C. PD - L1 免疫组化染色

IgG 聚合物均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

4. 结果判读:CDK4 阳性染色主要定位于细胞核,免疫组化染色结果的判断采取半定量法进行评分,标准由两部分构成,即 a(细胞核着色的强度)和 b(阳性细胞所占肿瘤细胞的比例)组成。a:0 分为不着色,1 分为着色弱(淡黄色),2 分为中等着色(黄色),3 分为强着色(棕黄色);b:阳性细胞所占比例 < 5% 为 0 分,阳性细胞所占比例在 5% ~ 25% 为 1 分,阳性细胞所占比例在 26% ~ 50% 为 2 分,阳性细胞所占比例在 51% ~ 75% 为 3 分,阳性细胞所占比例 > 75% 为 4 分。a × b 之积等于 0 分者为表达阴性,记录成免疫组织化学反应(-),1 ~ 4 分判断为弱阳性(+),5 ~ 8 分判断为中度阳性(++),9 ~ 12 分判断为强阳性(+++)。实验结果以评分为 0 分定义为阴性(-), > 0 分统一定义为阳性(+)

PD - L1 阳性染色定位于肿瘤细胞的细胞膜,阳性表达即呈棕黄色或棕褐色颗粒,借鉴肺癌组织中的肿瘤比例评分(tumor proportion score, TPS),即肿瘤阳性细胞占肿瘤细胞总数的百分比。染色结果可分为 3 组,即 < 1% 为阴性,1% ~ 49% 为弱阳性, ≥ 50% 为阳性。本研究采用 SP142 抗体属于通用性型抗体,且在结直肠癌中仍无对 PD - L1 有标准的检测方法及评分标准,采用 1% 的 cut off 值来界定判断其表达情况,即 TPS ≥ 1% 的肿瘤均为表达阳性;否则为阴性^[2]。

5. 统计学方法:应用 SPSS 18.0 统计学软件对数据进行统计分析。CDK4、PD - L1 的表达与结直肠癌临床病理特征的关系采用 χ^2 检验;CDK4 与 PD - L1 表达的相关性的采用 Spearman 秩相关性检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. CDK4 的表达与结直肠癌患者临床病理特

征的关系:CDK4 在结直肠癌组织中的表达明显高于癌旁组织,阳性率分别为 43.5% (50/115) 和 7.5% (3/40),差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1、图 3A、B)。CDK4 在含黏液组与不含黏液组表达的阳性率分别为 15.4% (2/13) 和 47.1% (48/102),在淋巴结转移组与淋巴结未转移组的阳性率分别为 55.6% (25/45) 和 33.3% (25/70),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 CDK4 蛋白与淋巴结转移呈正相关,且

在含黏液的组织学类型中表达更多。不同性别、年龄、分化程度、肿瘤直径及肿瘤部位 CDK4 的阳性表达率比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 1 CDK4 在结直肠腺癌和癌旁组织中的表达

组别	n	CDK4		χ^2	P
		阳性	阴性		
结直肠腺癌组织	115	50	65	17.072	0.000
癌旁组织	40	3	37		

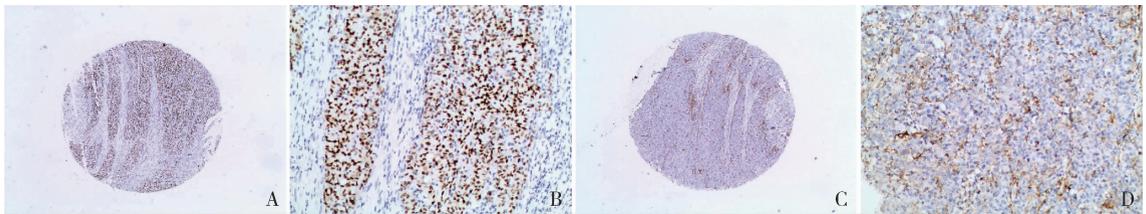


图 3 CDK4 和 PD-L1 在低分化腺癌组织中的表达 (Max Vision 二步法)

A. CDK4 在低分化腺癌组织中的表达 ($\times 40$); B. CDK4 在低分化腺癌组织中的表达 ($\times 200$); C. PD-L1 在低分化腺癌组织中的表达 ($\times 40$); D. PD-L1 在低分化腺癌组织中的表达 ($\times 200$)

2. PD-L1 的表达与结直肠腺癌患者临床病理特征的关系:PD-L1 在结直肠腺癌组织和癌旁组织中的阳性率为 33.0% (38/115) 和 0 (0/40),在腺癌组织中的表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 3、图 3C、D)。PD-L1 在低、中、高分化组表达的阳性率分别为 52.0% (13/25)、30.0%

(21/69) 和 19.0% (4/21),差异有统计学意义 ($P < 0.05$);在淋巴结转移组与无淋巴结转移组的阳性率分别为 55.6% (20/45) 和 25.7% (18/70),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),PD-L1 蛋白与组织分化程度呈负相关,分化越高,PD-L1 表达越少,且与淋巴结转移呈正相关(表 2)。

表 2 PD-L1 和 CDK4 表达与结直肠腺癌临床病理特征的关系

临床病理参数	n	PD-L1		χ^2	P	CDK4		χ^2	P
		阳性	阴性			阳性	阴性		
性别									
男性	75	24	51	0.106	0.745	33	42	0.024	0.877
女性	40	14	26			17	23		
年龄(岁)									
≥ 60	59	17	42	0.980	0.322	27	32	0.257	0.612
< 60	56	21	35			23	33		
部位									
直肠	59	23	36	4.620	0.099	30	29	2.863	0.239
左半结肠	23	9	14			9	14		
右半结肠	33	6	27			11	22		
直径(cm)									
≥ 5	54	17	37	0.112	0.738	24	30	0.039	0.844
< 5	61	21	40			26	35		
分化程度									
低分化	25	13	12	6.132	0.047*	12	13	2.343	0.310
中分化	69	21	48			32	37		
高分化	21	4	17			6	15		
淋巴结转移									
是	45	20	25	4.343	0.037	25	20	4.388	0.036
否	70	18	52			25	45		
病理类型									
含黏液	13	3	10	0.658	0.417	2	11	4.707	0.030
不含黏液	102	35	67			48	54		
浸润深度									
T ₁ ~ T ₂	27	12	15	2.073	0.150	13	14	0.313	0.576
T ₃ ~ T ₄	88	26	62			37	51		

3. CDK4 和 PD - L1 在结直肠癌组织中表达的相关性:在 115 例结直肠腺癌组织中,CDK4 阳性率 43.5% (50/115),PD - L1 的阳性率为 33.0% (38/115),两者的表达呈正相关 ($r_s = 0.204, P < 0.05$,表 4)。

表 3 PD - L1 在结直肠腺癌和癌旁组织中的表达

组别	n	PD - L1		χ^2	P
		阳性	阴性		
结直肠腺癌组织	115	38	77	17.510	0.000
癌旁组织	40	0	40		

表 4 PD - L1、CDK4 在结直肠腺癌组织中表达的相关性

CDK4	PD - L1		r_s	P
	阳性	阴性		
阳性	22	28	0.204	0.029
阴性	16	49		

讨 论

细胞周期依赖性蛋白激酶 4 是调控细胞周期循环的核心因子,Cyclin D - CDK4/6 - INK4 - Rb 信号通路主要负责 G₁ ~ S 期的调控。本研究结果表明,CDK4 蛋白与淋巴结转移呈正相关,且在含黏液的组织学类型中表达更多。这与已有的研究结果大致相同,CDK4 蛋白与癌组织分化程度呈负相关,与淋巴结转移呈正相关^[32]。

程序性死亡蛋白 1 (PD - 1) 是一种免疫抑制受体,由于持续的炎症刺激而在活化 T 细胞的表面表达。PD - L1 是 PD - 1 的主要配体,表达于恶性肿瘤细胞、活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和树突状细胞,其表达说明宿主免疫反应减弱,预后较差^[4]。但是,Li 等^[5]研究结果则表明,PD - 1 和 PD - L1 表达越高,CRC 患者预后越好。Rosenbaum 等^[6]对已知微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 和突变状态的 181 例结直肠癌患者进行 PD - L1 免疫组织化学检测显示,PD - L1 表达与分化程度低、微卫星不稳定性、BRAF 突变相关。本研究显示,PD - L1 蛋白与组织分化程度呈负相关,分化越高,PD - L1 表达越少,且与淋巴结转移呈正相关。

本研究显示 CDK4 与 PD - L1 的表达呈正相关,差异有统计学意义 ($r_s = 0.204, P < 0.05$),但是相关研究显示,PD - L1 在肿瘤中的表达并不是稳定的。Zhang 等^[7]对小鼠动物模型及人类原发性前列腺癌的研究发现,PD - L1 蛋白稳定性受 Cyclin D - CDK4

和 Cullin 3^{SPOP} E3 连接酶的调控。体内抑制 CDK4/6 可提高 PD - L1 蛋白水平,主要通过抑制 Cyclin D - CDK4 介导的斑点型锌指结构蛋白 (speckle - type POZ protein, SPOP) 磷酸化,从而促进复合物/细胞周期体 (APC/C^{dh1}) 降解 SPOP。SPOP 功能缺失会破坏泛素介导的 PD - L1 降解,导致小鼠肿瘤和原发性人类前列腺癌标本中 PD - L1 水平升高,肿瘤浸润淋巴细胞 (TILs) 数量减少。因此,将 CDK4/6 抑制剂治疗与抗 PD - L1 免疫治疗结合使用,可以增强肿瘤的消退,显著提高小鼠肿瘤模型的整体生存率。此研究说明了 CDK 调控 PD - L1 蛋白稳定性的分子机制,揭示了联合 CDK4/6 抑制剂与 PD - 1/PD - L1 免疫检查点抑制剂可以提高癌症的治疗效果。

肿瘤细胞中 PD - L1 上调有两种不同机制,即先天性免疫抵抗和适应性免疫抵抗^[8]。前者指的是肿瘤细胞内的致癌信号导致 PD - L1 的表达上调,例如 ALK 基因重排和 EGFR 突变型肺癌^[9,10]。相反,适应性免疫抵抗是指肿瘤细胞在抗肿瘤免疫反应产生局部炎症信号时,诱导 PD - L1 表达^[11]。Goel 等^[12]通过研究乳腺癌小鼠模型发现,CDK4/6 抑制剂不仅能诱导肿瘤细胞周期阻滞,还能促进抗肿瘤免疫,表现为增强肿瘤抗原的表达、细胞毒性 T 细胞识别并抑制调节性 T 细胞增殖。最终,CDK4 抑制剂通过增加免疫检查点阻断进一步增强肿瘤消除。

近年来,免疫治疗成为继手术、放疗、化疗、靶向治疗后一种新的肿瘤治疗方式。免疫检查点抑制剂、CAR - T 细胞、肿瘤疫苗等新的免疫治疗策略不断显现。免疫治疗联合细胞周期素依赖激酶抑制剂方案也在计划与实施中以实现 PD - 1/PD - L1 通路的更好阻断,从而发挥对肿瘤更好的抑制效果。CDK4/6 抑制剂与抗 PD - L1 或抗 PD - 1 抗体结合的临床试验已在乳腺癌和肺癌患者中进行。笔者今后仍需开展 CDK4/6 抑制剂联合抗 PD - 1/PD - L1 抗体治疗实体肿瘤更多的临床试验,从而进一步明确该方案的确切疗效,并探索可能出现的不良反应以及更有效的免疫指标,为临床治疗结直肠癌提供新的治疗方案,对结直肠癌患者的预后提供一定的帮助。

参 考 文 献

- Freddie B, Jacques F, Isabelle S, et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. A Cancer J Clin, 2018, 68: 394 - 424
- 王丽. PD - L1 和 Foxp3 + Treg 细胞在结直肠癌组织中的表达及

- 临床病理学意义[D]. 兰州:兰州大学,2019
- 3 虞杰,干文娟,顾冬梅,等. 结直肠癌组织中 DPC4、CDK4 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2015,31(11):1278-1280
 - 4 Hansen JD, Du Pasquier L, Lefranc MP, et al. The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective[J]. Mol Immunol, 2009, 46(3):457-472
 - 5 Li Y, Liang L, Dai W, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1):5-15
 - 6 Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, et al. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes [J]. Modern Pathol, 2016, 29(9):1-9
 - 7 Zhang J, Bu X, Wang H, et al. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via Cul3^{SPOP} to control cancer immune surveillance[J]. Nature, 2018, 553(7686):91-95
 - 8 Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4):252-264
 - 9 Akbay EA, Koyama S, Carretero J, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors[J]. Cancer Discov, 2013, 3(12):1355-1363
 - 10 Ota K, Azuma K, Kawahara A, et al. Induction of PD-L1 expression by the EML4-ALK oncoprotein and downstream signaling pathways in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(17):4014-4021
 - 11 Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity [J]. Cell, 2015, 160:48-61
 - 12 Goel S, Decristo MJ, Watt AC, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity[J]. Nature, 2017, 548(7668):471-475
- (收稿日期:2020-03-02)
(修回日期:2020-03-18)

血清肿瘤标志物联合 D-二聚体对 NSCLC 患者 VTE 的诊断

王子琛 赵杰 贾晓民 杜永亮 蒋宇

摘要 目的 探讨血清肿瘤标志物联合 D-二聚体对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者发生静脉血栓栓塞症(venous thromboembolism, VTE)的预测诊断价值。方法 回顾 2016 年 1 月~2018 年 12 月在徐州医科大学附属医院住院的 NSCLC 合并 VTE 患者 117 例,并与同期 NSCLC 非 VTE 患者 386 例的癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、糖类抗原(cancer antigen 125, CA125)、神经元烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、肺癌抗原(cytokeratin-19-fragment, CYFRA21-1)、D-二聚体进行比较。血清肿瘤标志物通过二元 Logistic 回归分析危险因素。采用 ROC 曲线评价血清肿瘤标志物和 D-二聚体对 VTE 的诊断价值及联合诊断价值。结果 NSCLC 合并 VTE 患者的 CA125、CYFRA21-1 及 D-二聚体均明显高于非 VTE 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),两组 CEA、NSE 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。通过二元 Logistic 回归分析,CA125、D-二聚体升高是 VTE 的危险因素,CA125、CYFRA21-1、D-二聚体对 NSCLC 合并 VTE 预测的曲线下面积(area under the curve, AUC)分别为 0.707、0.561 和 0.728($P < 0.05$)。CA125 预测 NSCLC 合并 VTE 的敏感度为 67.5%,特异性为 63.7%,截断值为 38.72;CYFRA21-1 预测 NSCLC 合并 VTE 的敏感度为 34.2%,特异性为 80.1%,截断值为 12.54;D-二聚体预测 NSCLC 合并 VTE 的敏感度为 60.7%,特异性为 78.3%,截断值为 1.56。CA125 联合 D-二聚体预测 AUC 为 0.773,敏感度为 64.1%,特异性为 81.3%。结论 血清肿瘤标志物 CA125 联合 D-二聚体可以提高 NSCLC 患者 VTE 的临床诊断价值。

关键词 血清肿瘤标志物 非小细胞肺癌 静脉血栓栓塞症 D-二聚体 诊断

中图分类号 R563.5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.038

Diagnosis of Venous Thromboembolism in NSCLC Patients with Serum Tumor Markers Combined with D-dimer. Wang Zichen, Zhao Jie, Jia Xiaomin, et al. Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Jiangsu 221000, China

Abstract Objective To investigate the predictive diagnostic value of serum tumor markers combined with d-dimer for venous thromboembolism (VTE) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** 117 NSCLC patients with VTE who were admitted to the affiliated hospital of XuZhou medical university from January 2016 to December 2018 were reviewed and compared with 386

作者单位:221000 徐州医科大学附属医院(王子琛、蒋宇);221006 徐州医科大学第二附属医院(赵杰、贾晓民、杜永亮)

通讯作者:赵杰,副教授,硕士生导师,电子信箱:15005206612@163.com