

• 论 著 •

PD-L1、HBME-1 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及临床意义

周 翼, 吴林军, 雷建东

(四川省乐山市中医医院检验科, 四川乐山 614000)

摘 要:目的 研究程序性死亡因子配体-1(PD-L1)、人骨髓内皮细胞标记物-1(HBME-1)在甲状腺乳头状癌组织中的表达及临床意义。方法 选取 2017 年 4 月至 2019 年 5 月该院收治的 102 例甲状腺乳头状癌患者为研究对象, 手术切除病灶组织及癌旁正常组织, 分别作为观察组($n=102$)与对照组($n=102$)。通过免疫组化染色, 观察两组 PD-L1、HBME-1 表达情况。通过单因素及多因素分析 PD-L1、HBME-1 表达量与甲状腺乳头状癌一般特征的关系。结果 PD-L1 在观察组中阳性率为 69.61%(71/102), 明显高于对照组的 15.69%(16/102), 差异有统计学意义($\chi^2=60.625, P<0.001$)。HBME-1 在观察组中阳性率为 73.53%(75/102), 明显高于对照组的 6.86%(7/102), 差异有统计学意义($\chi^2=94.291, P<0.001$)。多因素分析结果显示, PD-L1 及 HBME-1 表达阳性是肿瘤发生淋巴结转移及侵犯包膜的危险因素($P<0.05$)。结论 PD-L1 与 HBME-1 在甲状腺乳头状癌组织中均处于高表达状态, 且与患者肿瘤发生淋巴结转移及侵犯包膜密切相关, PD-L1 与 HBME-1 可辅助诊断患者肿瘤发展情况。

关键词:程序性死亡因子配体-1; 人骨髓内皮细胞标记物-1; 甲状腺乳头状癌; 表达量

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.16.020

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2020)16-2003-05

文献标识码:A

Expression and clinical significance of PD-L1 and HBME-1 in papillary thyroid carcinoma

ZHOU Yi, WU Linjun, LEI Jiandong

(Department of Clinical Laboratory, Leshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Leshan, Sichuan 614000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression and clinical significance of programmed death ligand-1 (PD-L1) and human bone marrow endothelial cell marker-1 (HBME-1) in thyroid papillary carcinoma. **Methods** The tumor tissues (experimental group) and adjacent normal tissues (control group) collected from 120 patients with thyroid papillary carcinoma in Leshan Hospital of Traditional Chinese Medicine from April 2017 to May 2019 were enrolled. The expression of PD-L1 and HBME-1 in the two groups were observed by immunohistochemical staining. The relationships between the expression of PD-L1, HBME-1 and the general characteristics of papillary thyroid carcinoma were analyzed by univariate and multivariate analysis. **Results** The positive rate of PD-L1 in the experimental group was significantly higher than that in the control group [69.61%(71/102) vs. 15.69%(16/102), $\chi^2=60.625, P<0.001$]. The positive rate of HBME-1 in the experimental group was significantly higher than that in the control group [73.53%(75/102) vs. 6.86%(7/102), $\chi^2=94.291, P<0.001$]. Multivariate analysis showed that the positive expression of PD-L1 and HBME-1 were risk factors for lymph node metastasis and tumor invasion ($P<0.05$). **Conclusion** PD-L1 and HBME-1 express highly in papillary thyroid carcinoma, and closely relate to tumor lymph node metastasis and tumor invasion. Moreover, the two biomarkers could be used to evaluated tumor development.

Key words: programmed death ligand-1; human bone marrow endothelial cell marker-1; thyroid papillary carcinoma; expression level

甲状腺癌可发生于任何年龄段, 高发于中青年女性。甲状腺癌初期可在甲状腺内局限生长数年, 可经

作者简介:周翼, 女, 副主任技师, 主要从事血细胞及分子生物学研究。

本文引用格式:周翼, 吴林军, 雷建东. PD-L1、HBME-1 在甲状腺乳头状癌组织中的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(16): 2003-2007.

淋巴管扩散至其他组织,其发病受激素、遗传易感、环境等因素影响,缺碘、放射性物质照射、电离辐射过度、甲状腺炎均可引起甲状腺肿瘤^[1]。患者常表现为颈部无痛性肿块,少数患者会有吞咽困难症状。甲状腺癌按照病理组织分型分为乳头状癌、髓样癌、滤泡癌、低分化癌、未分化癌、鳞状细胞癌,甲状腺乳头状癌是甲状腺癌中最常见的类型^[2]。近年来,通过检测各种生物标记物在肿瘤中的表达从而辅助诊断肿瘤已成为临床研究热点。人骨髓内皮细胞标记物-1(HBME-1)是内皮细胞微绒毛表面的一种抗原,在肿瘤血管形成及生长过程中发挥重要作用^[3]。有研究发现,HBME-1 在恶性间质肿瘤中高表达^[4],推测 HBME-1 可在临床辅助诊断甲状腺乳头状癌时发挥重要作用。程序性死亡因子配体-1(PD-L1)是程序性死亡因子的配体,已被多项研究证实存在于多种恶性肿瘤中。有研究报道 PD-L1 在肺癌细胞的免疫逃逸机制中发挥重要作用,它可通过与程序性死亡因子结合,促进 T 细胞凋亡,从而使肺癌细胞不被杀伤^[5]。但目前,对 PD-L1 在甲状腺乳头状癌中表达情况的研究较少。本研究通过检测甲状腺乳头状癌中 HBME-1 及 PD-L1 表达情况,探究两种指标对评估肿瘤进展情况的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 4 月至 2019 年 5 月本院收治的甲状腺乳头状癌患者 102 例为研究对象。纳入标准:(1)符合甲状腺癌诊断标准^[6],经病理组织学检查诊断为乳头状癌;(2)接受甲状腺乳头状癌肿瘤切除手术;(3)年龄 18~65 岁。排除标准:(1)良性甲状腺肿瘤;(2)合并其他恶性肿瘤;(3)合并免疫系统疾病;(4)合并感染性疾病;(5)哺乳期及妊娠期女性。通过手术切除患者病灶组织及癌旁甲状腺正常组织,分别作为观察组与对照组。本研究纳入患者年龄 26~65 岁,平均(42.62±5.37)岁;男 57 例,女 45 例;已发生淋巴结转移 37 例,未发生淋巴结转移 65 例;TNM 分期 I~II 期 65 例,III~IV 期 37 例。本研究获得本院医学伦理委员会批准,所有患者及家属对本研究内容充分知晓,自愿签署知情同意书。

1.2 方法 对两组甲状腺组织进行免疫组化染色,免疫组化染色原理:以携带显色剂的特异性抗体与抗原结合为理论基础,观察抗原抗体反应复合物在细胞中的呈色反应,对相应蛋白进行定性及定量分析^[7-9]。方法:(1)将两组病理组织进行常规石蜡包埋、切片、脱蜡、水化(同一患者制作两张病理切片),使用磷酸盐缓冲液(PBS,上海莼试生物技术有限公司,货号:CS-0779S)冲洗 3 次,每次 2 min;(2)向切片中滴加 3%过氧化氢溶液 50 μ L,室温下放置 10 min 后使用

PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;(3)向切片中滴加 50 μ L 山羊血清封闭液(爱必信上海生物科技有限公司,货号:abs933),室温孵育 30 min,使用 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;(4)向切片中分别滴加 PD-L1 抗体(上海沪震实业有限公司,货号:1234-00-00)、HBME-1 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司],4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育一夜后使用 PBS 冲洗 3 min;(5)向切片中滴加 50 μ L 酶标鼠抗兔复合物,室温孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;(6)向切片中滴加 2 滴 DAB 溶液(合肥康源生物科技有限公司,货号:DAB002)染色,同时使用显微镜观察,当镜下观察到棕色时终止染色,自来水冲洗 1 min;(7)向切片中滴加苏木素染液(上海源叶生物科技有限公司,货号:R20568-100 mL)复染 30 min,自来水冲洗 2 min;(8)使用 85%、95%、100%梯度酒精分别脱水 5 min,二甲苯透明 5 min,中性树脂封片,贴标签后显微镜观察染色情况。阴性对照使用 PBS 代替酶标鼠抗兔复合物。

阳性结果判断:HBME-1 定位于细胞膜,观察到细胞膜为棕黄色或棕褐色即为阳性,PD-L1 定位于细胞膜或细胞质,观察到细胞膜或细胞质为棕黄色或棕褐色即为阳性。每张切片选取 5 个高倍镜视野,人工计数每个视野中阳性细胞数目,统计平均阳性细胞数。染色强度评分标准:无任何着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞数评分标准:阳性细胞数<总细胞数的 30%为 1 分,阳性细胞数>总细胞数的 30%为 2 分。染色强度评分 $\times$ 阳性细胞数评分为 0~<2 分表示阴性,2~<4 分表示弱阳性、4~6 分表示强阳性^[10]。阳性率=(弱阳性例数+强阳性例数)/总例数 $\times$ 100%。

1.3 观察指标 (1)观察组与对照组中 PD-L1 的免疫组化结果;(2)观察组与对照组中 HBME-1 免疫组化结果;(3)PD-L1 与 HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌一般特征的单因素分析,纳入研究的因素包括年龄是否大于或等于 45 岁、性别、病灶大小、有无淋巴结转移、肿瘤数量、是否侵犯包膜;(4)PD-L1、HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌一般特征的多因素分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用配对 χ^2 检验;多因素分析采用 Logistic 回归分析法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 PD-L1 免疫组化结果比较 PD-L1 在观察组中阳性率为 69.61%(71/102),明显高于对照组的 15.69%(16/102),差异有统计学意义($\chi^2=60.625$, $P<0.001$),见表 1。观察组 PD-L1 阳性细胞也较多,

对照组几乎无 PD-L1 阳性细胞,见图 1。

表 1 两组 PD-L1 免疫组化结果比较

组别	n	强阳性(n)	弱阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
观察组	102	56	15	31	69.61
对照组	102	5	11	86	15.69

2.2 两组 HBME-1 免疫组化结果比较 HBME-1 在观察组中阳性率为 73.53%(75/102),明显高于对照组的 6.86%(7/102),差异有统计学意义($\chi^2=94.291, P<0.001$),见表 2。免疫组化结果显示观察组 HBME-1 阳性细胞较多,对照组几乎无 HBME-1 阳性细胞,见图 1。

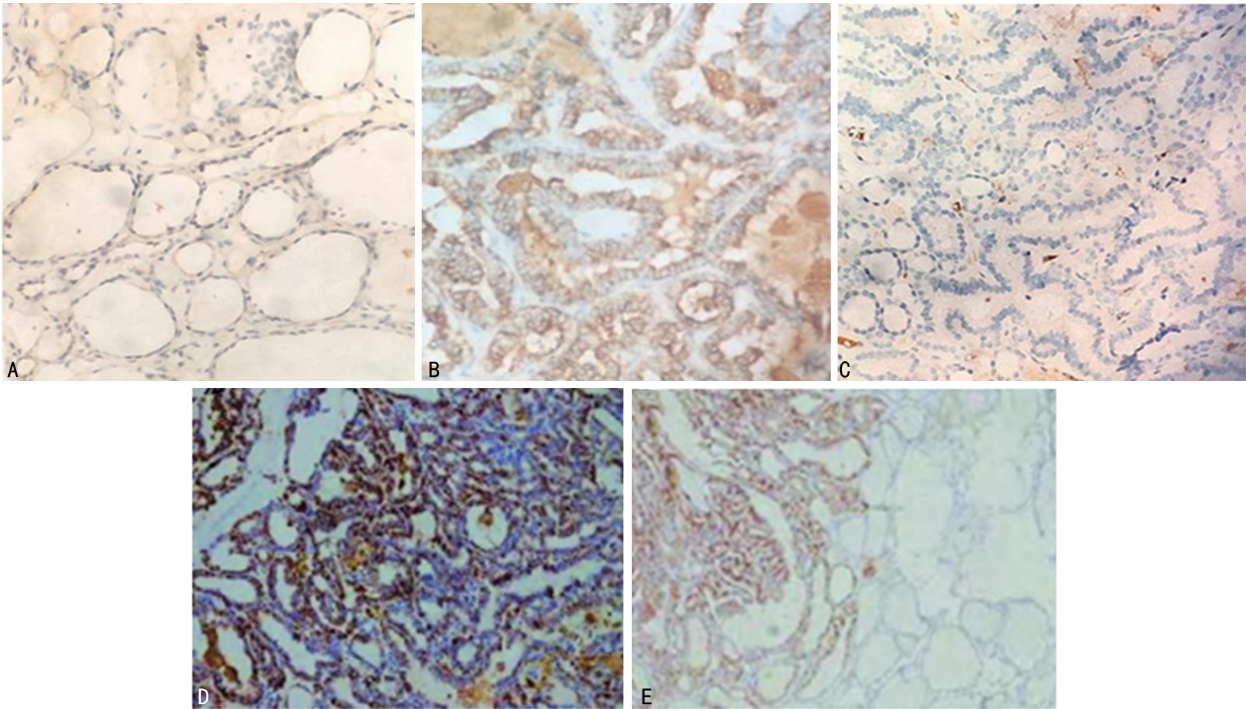
2.3 PD-L1 及 HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌一般特征的单因素分析 有淋巴结转移、侵犯包膜患者 PD-L1 阳性率明显高于无淋巴结转移、侵犯包膜

患者,差异有统计学意义($P<0.05$);有淋巴结转移、侵犯包膜患者 HBME-1 阳性率明显高于无淋巴结转移、侵犯包膜患者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.4 PD-L1 及 HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌影响因素的多因素分析 将单因素分析中差异有统计学意义($P<0.05$)的因素纳入多因素分析,结果显示,PD-L1、HBME-1 表达阳性均是淋巴结转移及侵犯包膜的高危因素($P<0.05$),即 PD-L1、HBME-1 表达阳性率越高,患者肿瘤组织发生淋巴结转移、侵犯包膜的风险越大,见表 4。

表 2 两组 HBME-1 免疫组化结果比较

组别	n	强阳性(n)	弱阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
观察组	102	36	39	27	73.53
对照组	102	0	7	95	6.86



注:A 为免疫组化染色阴性对照,无任何着色($\times 200$);B 为 HBME-1 染色阳性细胞($\times 200$);C 为 HBME-1 染色阴性细胞($\times 200$);D 为 PD-L1 染色阳性细胞($\times 200$);E 为 PD-L1 染色阴性细胞,几乎无着色($\times 200$)。

图 1 两组 PD-L1 及 HBME-1 免疫组化染色图片

表 3 PD-L1 及 HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌影响因素的单因素分析[n(%)]

影响因素	n	PD-L1 阳性	χ^2	P	HBME-1 阳性	χ^2	P
性别							
男	57	38(66.67)	0.528	0.467	46(80.70)	3.414	0.065
女	45	33(73.33)			29(64.44)		
年龄(岁)							
≥ 45	68	52(76.47)	2.409	0.121	53(77.94)	2.040	0.153
< 45	34	21(61.76)			22(64.71)		

续表 3 PD-L1 及 HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌影响因素的单因素分析[n(%)]

影响因素	<i>n</i>	PD-L1 阳性	χ^2	<i>P</i>	HBME-1 阳性	χ^2	<i>P</i>
病灶大小(cm)							
≤1.0	30	21(70.00)	0.003	0.955	26(86.67)	3.768	0.052
>1.0	72	50(69.44)			49(68.06)		
淋巴结转移							
有	37	34(91.89)	13.628	<0.001	35(94.59)	7.022	0.008
无	65	37(56.92)			40(61.54)		
肿瘤数量(个)							
1	29	19(65.52)	0.321	0.571	24(82.76)	1.773	0.183
>1	73	52(71.23)			51(69.86)		
侵犯包膜							
是	39	34(87.18)	9.215	0.002	37(94.87)	14.777	<0.001
否	63	37(58.73)			38(60.32)		

表 4 PD-L1 及 HBME-1 表达情况与甲状腺乳头状癌影响因素的多因素分析

项目	影响因素	β	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>
PD-L1	有淋巴结转移	0.819	0.283	8.375	1.344~3.620	0.004	2.269
	侵犯包膜	0.618	0.233	7.035	1.068~2.659	0.008	1.855
HBME-1	有淋巴结转移	0.834	0.307	7.380	1.195~3.987	0.007	2.302
	侵犯包膜	0.643	0.196	10.762	1.147~2.475	<0.001	1.903

3 讨 论

甲状腺乳头状癌患者早期症状不明显,多数患者在体检时通过 B 超发现甲状腺结节,再通过体格检查、病理组织学检查进一步确诊。一般甲状腺乳头状癌未发生转移的患者,经手术治疗后 10 年生存率在 80%以上。多数已出现淋巴结转移患者不具有手术适应证或通过手术无法完全切除肿瘤,在姑息治疗后预后情况较差。早期发现、确诊,并进行手术治疗是提高甲状腺乳头状癌患者预后的重要手段。甲状腺乳头状癌瘤体常为灰白色实质瘤,一般大小在 1 cm 以内;巨大甲状腺乳头状癌瘤体可达到 6 cm,瘤体常位于甲状腺包膜周围,导致包膜受到肿瘤侵犯^[11],其中心切面似乳头状,因此称为乳头状肿瘤。但不是所有乳头状癌患者的病理标本均为典型乳头状,因此,仅依靠病理检查诊断并不适用于所有患者。随着分子生物学及免疫组化技术在医学诊断、辅助诊断中的发展,高灵敏度、高特异度的分子标志物在辅助诊断肿瘤时的应用价值逐渐升高^[12]。将特异性分子标志物应用于肿瘤筛查中可提示早期肿瘤病变、是否存在淋巴结转移风险等。

HBME-1 本质为一种酸性氨基酸多聚糖蛋白,常用于临床诊断或鉴别诊断间皮细胞癌、胰腺癌、肺癌及乳腺癌,免疫组化中阳性表现为细胞膜黄染^[13-15]。

有研究发现,在甲状腺乳头状癌中 HBME-1 表达量明显高于良性增生的甲状腺乳头状癌^[16-17],提示甲状腺乳头状癌的恶性病变可能与 HBME-1 有关。PD-L1 在多种癌症中过表达,目前抗 PD-L1 药物已获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准,临床常应用于治疗尿路转移性非小细胞肺癌^[18]。

本研究通过对甲状腺乳头状癌患者的病灶组织、癌旁正常组织进行免疫组化染色,发现观察组中 HBME-1 及 PD-L1 阳性率明显升高,提示 HBME-1 及 PD-L1 确实在甲状腺乳头状癌组织中处于高表达状态,其高表达可能与甲状腺乳头状癌的发生、发展关系密切。将甲状腺乳头状癌患者临床一般特征与观察组中的 HBME-1、PD-L1 阳性率进行单因素分析,结果显示有淋巴结转移、侵犯包膜患者 PD-L1 阳性率明显升高,与曹益嘉等^[19]研究结果具有一致性,提示 PD-L1 高表达可能与甲状腺乳头状癌发展进程有关。年龄、性别、病灶大小及肿瘤数量与 PD-L1 表达阳性无明显关系,但曹益嘉等^[19]研究结果还表明年龄≥45 岁甲状腺乳头状癌患者中的 PD-L1 阳性率较高,可达到 79%,与本研究年龄因素研究结果不一致。分析原因可能是由于本研究纳入样本量不足,虽然≥45 岁患者 PD-L1 阳性率可达到 76.47%,但与<45 岁患者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HBME-

1 也在有淋巴结转移、侵犯包膜的甲状腺乳头状癌患者中阳性率较高,与病灶大小、性别、肿瘤数量无明显关系。进一步多因素分析结果显示,PD-L1、HBME-1 高表达是甲状腺乳头状癌患者发生淋巴结转移及侵犯包膜的危险因素,与甲状腺乳头状癌发展进程密切相关,提示 PD-L1、HBME-1 高表达的甲状腺乳头状癌患者具有高淋巴结转移、侵犯包膜风险。

4 结 论

PD-L1 与 HBME-1 在甲状腺乳头状癌病灶组织中过表达,两者表达量过高与患者肿瘤发生淋巴结转移及侵犯包膜有关。PD-L1 与 HBME-1 均可作为甲状腺乳头状癌发展过程中的敏感分子标记物,可应用于临床辅助诊断患者病情发展,指导临床选择合适的治疗方案。但由于纳入样本量有限,本研究未对 PD-L1 与 HBME-1 在甲状腺乳头状癌中的高表达机制进行深入研究,后续可对 PD-L1 与 HBME-1 在甲状腺乳头状癌中被激活的信号通路进行分析,为完善 PD-L1 与 HBME-1 在甲状腺乳头状癌中表达及其作用机制提供一定参考价值。

参考文献

- [1] 武现生,唐云,陈志达,等. VEGF 和 p53 蛋白在甲状腺肿瘤中的表达及在诊断甲状腺良、恶性肿瘤中的应用价值研究[J]. 癌症进展,2017,15(4):428-431.
- [2] 孙凤兰,韩涛,葛静. 高频彩超在甲状腺癌颈部淋巴结转移诊断中应用价值[J]. 临床军医杂志,2018,46(12):1492-1493.
- [3] QIAO J, LI C, ZHANG Y, et al. HBME-1 expression in differentiated thyroid carcinoma and its correlation with the ultrasonic manifestation of thyroid[J]. Oncol Lett, 2017,14(6):6505-6510.
- [4] 马秋洁,张盛忠,吴建设. 恶性间皮瘤的肿瘤相关成纤维细胞的特点[J]. 临床与病理杂志,2017,37(1):45-49.
- [5] HERBST R S, BAAS P, KIM D W, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial[J]. Lancet, 2016,387(10027):1540-1550.
- [6] 林恩德,吴国洋. 甲状腺癌诊断技术进展[J]. 国际外科学杂志,2017,44(12):803-808.
- [7] 吕彦利,康秀梅,岳胜南,等. 分化型甲状腺癌患者的 NIS

表达情况及其与甲状腺超声特征的关系[J]. 癌症进展, 2018,16(12):1477-1480.

- [8] 唐霞琳,张健,陶世冰. 分化型甲状腺癌术后相关激素水平及 TSH 抑制治疗合适介入时间的研究[J]. 实用癌症杂志,2018,33(11):1873-1875.
- [9] SCHEEL A H, PENAULT-LLORCA F, HANNA W, et al. Physical basis of the ‘magnification rule’ for standardized immunohistochemical scoring of HER2 in breast and gastric cancer[J]. Diagn Pathol, 2018,13:19.
- [10] 杨东杰. 细胞缝隙连接蛋白 43、自噬相关基因 Beclin-1 表达水平与甲状腺癌患者 TNM 分期的相关性研究[J]. 河南医学研究, 2018,27(16):2893-2895.
- [11] KIM Y J, HONG H S, JEONG S H, et al. Papillary thyroid carcinoma arising within a follicular adenoma: a case report, ultrasound features, and considerations[J]. Ultrasound Q, 2017,33(1):62-65.
- [12] 赵洪雨,曾亮. 免疫组织化学标志物在髓母细胞瘤分子分型中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2018,45(4):247-252.
- [13] 刘匡辉,董春慧,陈玲. 同时性甲状腺淋巴瘤和甲状腺癌病例合并文献分析[J]. 实用癌症杂志, 2018,33(12):1989-1991.
- [14] 郭富饶,姜欢,戴微微,等. 甲状腺癌患者血清 TNF- α 、IL-17 水平与疾病状态及患者生活质量的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018,39(17):2163-2165.
- [15] ARCOLIA V, JOURNE F, RENAUD F, et al. Combination of galectin-3, CK19 and HBME-1 immunostaining improves the diagnosis of thyroid cancer[J]. Oncology Letters, 2017,14(4):4183-4189.
- [16] CHEN Y J, ZHAO R M, ZHAO Q, et al. Diagnostic significance of elevated expression of HBME-1 in papillary thyroid carcinoma[J]. Tumour Biol, 2016,37(7):8715-8722.
- [17] 姜丽娜,刘莹,赵琳,等. P2X7 受体表达与乳头状甲状腺癌淋巴结转移的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018,39(15):1827-1831.
- [18] 董丽娜,王静莹. PD-1/PD-L1 抑制剂在晚期尿路上皮癌中的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2018,24(2):140-145.
- [19] 曹益嘉,王成龙,胡代星,等. BRAF V600E 和 PD-L1 蛋白表达在甲状腺乳头状癌中的临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2018,43(2):235-239.

(收稿日期:2020-01-02 修回日期:2020-03-15)