

• 论 著 •

CD8、CD68、FoxP3、PD1 和 PD-L1 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义

李海军, 边沁, 何先伟

四川省广元市中心医院检验科, 四川广元 628000

摘要:目的 探讨 CD8、CD68、FoxP3、程序性死亡因子 1(PD1)和程序性死亡配体 1(PD-L1)在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义。方法 收集 2015 年 1 月至 2018 年 12 月该院 96 例子宫内膜癌患者、68 例子宫内膜组织正常女性为研究对象,采用免疫组化染色法检测肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)上标记抗体 PD1、PD-L1、CD8、CD68、FoxP3 表达,分析各指标表达差异及其与临床病理特征的关系。结果 子宫内膜癌组织中 CD8、CD68、FoxP3 阳性率明显低于正常子宫内膜组织中阳性率,而子宫内膜癌组织 TILs 上 PD1、PD-L1 阳性率高于正常子宫内膜组织 TILs 中阳性率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 在病理学分级 G3、有淋巴结转移子宫内膜癌组织中的阳性率高于在病理学分级 G1~G2、无淋巴结转移子宫内膜癌组织中的阳性率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 异常上调参与子宫内膜癌前病变病情恶性进展,可对其进行监测,作为早期筛查子宫内膜癌前病变恶性转化生物标志物和治疗靶点。

关键词:CD8; CD68; FoxP3; 程序性死亡因子 1; 子宫内膜癌组织

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.10.023 **中图法分类号:**R446.8

文章编号:1673-4130(2021)10-1254-05 **文献标志码:**A

Expression and clinical significance of CD8, CD68, FoxP3, PD1 and PD-L1 in endometrial cancer tissues

LI Haijun, BIAN Qin, HE Xianwei

Department of Clinical Laboratory, Guangyuan Central Hospital,
Guangyuan, Sichuan 628000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of CD8, CD68, FoxP3, programmed death factor 1 (PD1) and programmed death ligand 1 (PD-L1) in endometrial cancer tissues. **Methods** A total of 96 endometrial cancer patients and 68 women with normal endometrial tissues in Guangyuan Central Hospital from January 2015 to December 2018 were collected. Immunohistochemical staining was used to determine the expression of the labeled antibodies PD1, PD-L1, CD8, CD68 and FoxP3 on tumor infiltrating lymphocytes (TILs). The expression difference of each index and their correlations with clinicopathological characteristics were analyzed. **Results** The positive expression rates of CD8, CD68 and FoxP3 in endometrial cancer tissues were lower than those in normal endometrial tissues, while the positive expression rates of PD1 and PD-L1 in TILs of endometrial cancer tissues were higher than those in TILs of normal endometrial tissues ($P < 0.05$). The positive expression rates of CD8, CD68, FoxP3, PD1 and PD-L1 in endometrial cancer tissues at pathological grade G3 and with lymph node metastasis were higher than those at pathological grade G1—G2 and with non-lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** CD8, CD68, FoxP3, PD1 and PD-L1 abnormally up-regulate and involve in the malignant progression of endometrial precancerous lesions, which could be monitored as early screening biomarkers and treatment targets for malignant transformation of endometrial precancerous lesions.

Key words:CD8; CD68; FoxP3; programmed death factor 1; endometrial cancer tissue

子宫内膜癌为原发于子宫内膜的上皮性恶性肿瘤,具有发病因素多、机制尚不明确的特点,有研究报

作者简介:李海军,男,副主任技师,主要从事临床检验研究。

本文引用格式:李海军,边沁,何先伟. CD8、CD68、FoxP3、PD1 和 PD-L1 在子宫内膜癌组织中的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(10): 1254-1258.

道其病死率已居恶性肿瘤的前 10 位^[1]。近年一些学者探讨了子宫内膜癌前病变与子宫内膜癌的关系,发现细胞免疫水平与疾病密切相关,考虑通过评估 T 淋巴细胞及肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)相关分子标志物的表达水平来防治子宫内膜癌前病变的恶性发展^[2-3]。TILs 参与肿瘤微环境组成和局部免疫应答,既往研究已证实 TILs 表达水平影响癌症化疗效果,考虑与相关标记抗体对临床指标的影响有关^[4]。肿瘤细胞浸润后 T 淋巴细胞活化程度增加,程序性死亡因子 1(PD1)表达上调,与程序性死亡配体 1(PD-L1)相互作用后诱导 T 淋巴细胞凋亡,进而下调机体抗肿瘤免疫应答。另外,近年以 PD-L1 为靶点的治疗药物已在乳腺癌患者中得到应用^[5]。但目前关于 TILs 标记抗体 CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 与子宫内膜癌发生和发展关系的报道较少,且尚缺乏临床数据支持。因此,本研究就此展开讨论,明确子宫内膜癌前病变恶性发展的预测因子,以期为子宫内膜癌防治提供新的预测依据和治疗靶点,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1 月至 2018 年 12 月本院 96 例子宫内膜癌患者纳入子宫内膜癌组,68 例子宫内膜正常女性纳入正常子宫内膜组。子宫内膜癌患者年龄 26~60 岁,平均(42.25±4.14)岁,<49 岁 38 例,≥49 岁 58 例;病理学分级 G1~G2 级 45 例, G3 级 51 例;国际抗癌联盟分期 I 期 42 例, II~III 期 54 例;有淋巴结转移 22 例,无淋巴结转移 74 例;正常子宫内膜来源女性年龄 28~56 岁,平均(41.85±4.08)岁,<49 岁 42 例,≥49 岁 26 例。子宫内膜癌组与正常子宫内膜组年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$),有可比性。入选标准:(1)经病理学检查确诊;(2)子宫发育正常的女性;(3)年龄 18~65 岁;(4)入院前均未接受放疗、化疗或靶向治疗;(5)未发生全身其他部位转移;(6)卡氏(KPS)评分≥70 分;(7)预计生存期超过 1 年。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤;(2)依从性差,不能定期随访;(3)有乳腺癌既往史;(4)过敏体质或凝血功能异常;(5)沟通障碍或严重精神疾病;(6)临床资料不完整,相关检查不完善;(7)未完成治疗;(8)因疾病恶化或出现严重并发症需进行其他治疗。本研究经本院医学伦理委员会讨论并通过,患者及家属均签署知情同意书。

1.2 方法 采用 RM2235 组织切片机(德国徕卡)将所有包蜡组织切成 4 μm 连续切片,依次采用二甲苯(南通新能源物资有限公司)、枸橼酸钠缓冲液(北京泰泽瑞达科技有限公司)及 3%过氧化氢溶液(北京百欧博伟生物技术有限公司)进行脱蜡、抗原修复、梯度乙醇水化,磷酸盐缓冲液(PBS)(上海颖心实验室设备有限公司)漂洗,内源性过氧化物酶活性消除;滴加小

鼠抗人 PD1、PD-L1、CD8、CD68、FoxP3 多克隆抗体(浓度 1:100,购自美国 Santa Cruz 公司)4℃孵育过夜;PBS 漂洗,滴加即用型生物素化二抗 37℃孵育 30 min;PBS 漂洗,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃孵育 20 min;PBS 漂洗,经 DAB 显色试剂盒(Solarlaio)显色,苏木精(湖南汇百待生物科技有限公司)复染,梯度乙醇脱水,透明,中性树脂(南京森贝伽生物科技有限公司)封片,DMM-440 倒置显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司)下观察 CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 表达。

1.3 染色判定标准 由两名具有执业资格的病理科医生采用双盲法对结果进行判断和分析;每张切片中选取癌细胞数较多的 5 个高倍视野(SP,×400),每个视野计数 100 个细胞;染色强度:0 分为不着色,1 分为淡黄色,2 分为深黄色,3 分为棕黄色;阳性细胞百分率:1 分为阳性细胞百分率 0~30%,2 分为阳性细胞百分率>30%;两项之和进行综合判定:PD1、PD-L1 表达量 0~1 分判定为-,2~6 分判定为+^[6];CD8、CD68、FoxP3 表达量≤3 分判定为-,>3 分判定为+^[7]。

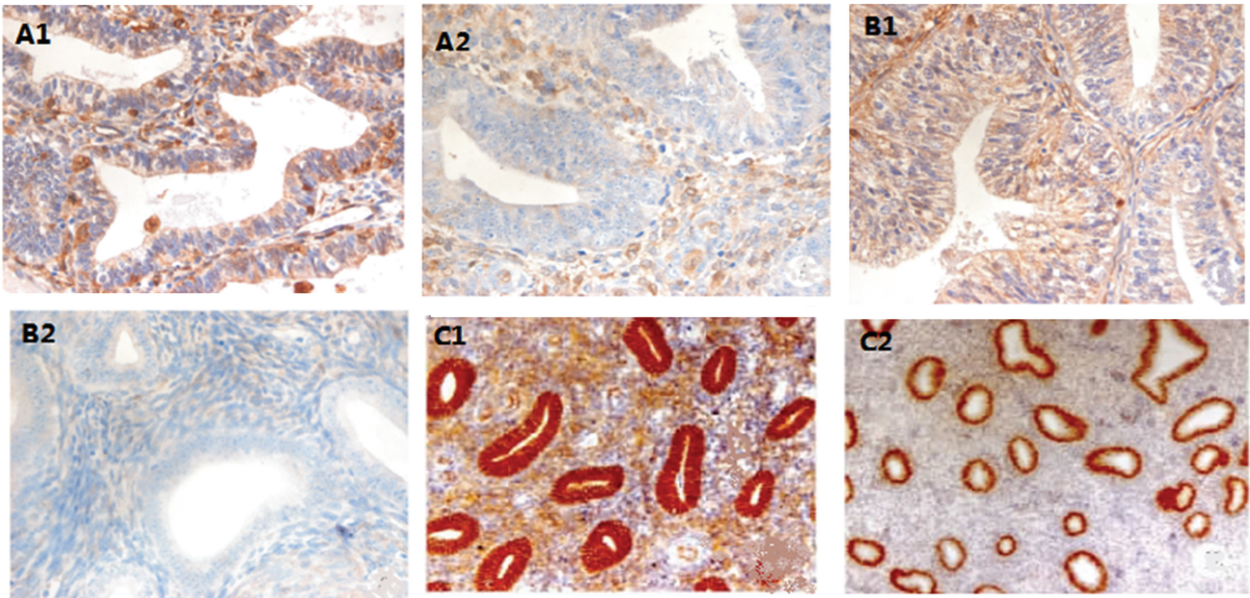
1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计分析,计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,组间有序分类资料比较采用 Ridit 分析;采用 Kendall's tau-b 法对等级资料进行相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD8、CD68、FoxP3 在 TILs 细胞上的表达情况 CD8、CD68 主要定位于 TILs 细胞膜上,FoxP3 主要定位于 TILs 细胞核上,为棕黄色颗粒,CD8、CD68、FoxP3 在正常子宫内膜组织中呈强阳性表达,见图 1。子宫内膜癌组织中 CD8、CD68、FoxP3 阳性率分别为 33.33%(32/96)、36.46%(35/96)、37.50%(36/96),明显低于正常子宫内膜组织中 CD8、CD68、FoxP3 阳性率[64.71%(44/68)、70.59%(48/68)、67.65%(46/68)],差异有统计学意义($P<0.05$)。

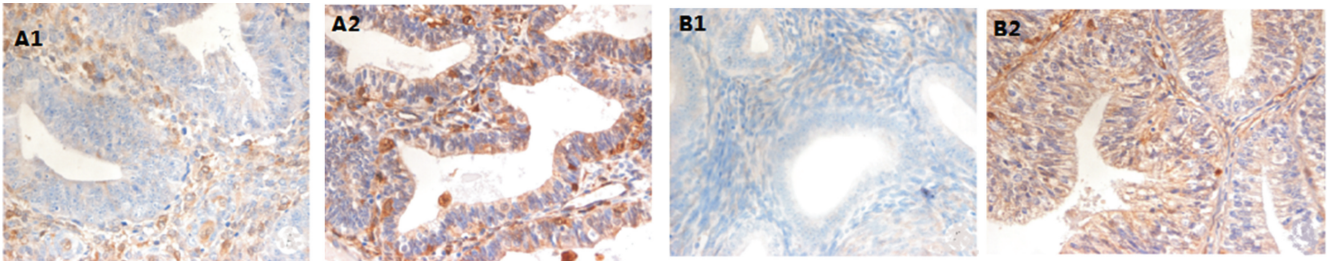
2.2 PD1、PD-L1 在 TILs 及 T 淋巴细胞上的表达情况 PD1、PD-L1 主要定位于细胞膜或(和)细胞质上,为棕黄色颗粒;PD1、PD-L1 在子宫内膜癌组织中 TILs 及 T 淋巴细胞上均呈阳性表达,见图 2、3。子宫内膜癌组织中 TILs 上的 PD1、PD-L1 阳性率分别为 34.38%(33/96)、36.46%(35/96),高于正常子宫内膜组织中 TILs 上的 PD1、PD-L1 阳性率[14.71%(10/68)、20.59%(14/68)],差异有统计学意义($P<0.05$)。子宫内膜癌 T 淋巴细胞上的 PD1、PD-L1 阳性率分别为 16.67%(16/96)、19.79%(19/96),与正常子宫内膜组织 T 淋巴细胞上的 PD1、PD-L1 阳性率[17.65%(12/68)、16.18%(11/68)]比较,差异无统

计学意义($P>0.05$)。



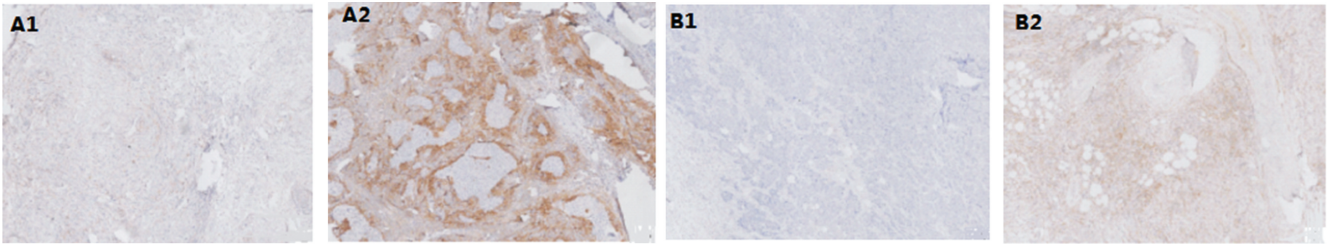
注: A1 为正常子宫内膜 CD8 表达; A2 为子宫内膜癌 CD8 表达; B1 为正常子宫内膜 CD68 表达; B2 为子宫内膜癌 CD68 表达; C1 为正常子宫内膜 FoxP3 表达; C2 为子宫内膜癌 FoxP3 表达。

图 1 CD8、CD68、FoxP3 阳性表达 (SP, $\times 400$)



注: A1 为正常子宫内膜 PD1 表达; A2 为子宫内膜癌 PD1 表达; B1 为正常子宫内膜 PD-L1 表达; B2 为子宫内膜癌 PD-L1 表达。

图 2 PD1、PD-L1 在 TILs 上阳性表达 (SP, $\times 400$)



注: A1 为正常子宫内膜 PD1 表达; A2 为子宫内膜癌 PD1 表达; B1 为正常子宫内膜 PD-L1 表达; B2 为子宫内膜癌 PD-L1 表达。

图 3 PD1、PD-L1 在 T 淋巴细胞上阳性表达 (SP, $\times 400$)

2.3 子宫内膜癌患者 PD1、PD-L1 在 TILs 与 T 淋巴细胞上表达的相关分析 子宫内膜癌患者 PD1、PD-L1 在 TILs 与 T 淋巴细胞上的阳性率无关 ($P>0.05$)。见表 1。

2.4 CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 与子宫内膜癌患者年龄及临床病理特征的关系 CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 在病理学分级 G3、有淋巴结转移子宫内膜癌组织中的阳性率高于在病理学分级 G1~G2、无淋巴结转移子宫内膜癌组织中的阳性率, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 1 PD1、PD-L1 在 TILs 与 T 淋巴细胞上表达的相关分析 (n)				
T 淋巴细胞 (n)	TILs		r	P
	阳性	阴性		
PD1				
阳性	16	30	4.230	0.623
阴性	17	33		
PD-L1				
阳性	19	29	6.200	0.210
阴性	16	32		

表 2 CD8、CD68、FoxP3、PD1、PD-L1 与子宫内膜癌患者年龄及临床病理特征的关系(*n*)

项目	<i>n</i>	CD8(+)	χ^2	<i>P</i>	CD68(+)	χ^2	<i>P</i>	FoxP3(+)	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)			1. 373	<0. 05		0. 442	<0. 05		1. 012	<0. 05
<49	38	13			14			15		
≥49	58	19			21			21		
病理学分级			9. 226	<0. 05		5. 086	<0. 05		6. 585	<0. 05
G1~G2	45	4			11			10		
G3	51	28			24			26		
肿瘤分期			2. 489	<0. 05		0. 564	<0. 05		1. 021	<0. 05
I	42	15			17			16		
II~III	54	17			18			20		
淋巴结转移			4. 242	<0. 05		5. 406	<0. 05		5. 211	<0. 05
有	22	17			15			16		
无	74	15			20			20		

项目	<i>n</i>	PD1(+)	χ^2	<i>P</i>	PD-L1(+)	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)			1. 241	<0. 05		0. 658	<0. 05
<49	38	15			13		
≥49	58	18			22		
病理学分级			6. 520	<0. 05		6. 021	<0. 05
G1~G2	45	5			6		
G3	51	28			29		
肿瘤分期			3. 025	<0. 05		0. 424	<0. 05
I	42	13			16		
II~III	54	20			19		
淋巴结转移			4. 025	<0. 05		5. 201	<0. 05
有	22	18			19		
无	74	5			16		

3 讨 论

PD1、PD-L1 可相互作用,共同对 T 淋巴细胞活性产生抑制,T 淋巴细胞正常传递和激活功能下降后,可抑制肿瘤免疫机制进而形成肿瘤微环境。二者在细胞组织中表达,具有影响细胞黏附、生长、凋亡、增殖、炎性反应、免疫调节等多种生物学功能。王钰聪等^[8]发现,PD1、PD-L1 在非小细胞肺癌细胞质或细胞质基质中表达上调时,患者 5 年生存率更低。DU-RUISSEAUX 等^[9]采用抗 PD1、PD-L1 的人源化单克隆抗体治疗肺癌后发现,T 淋巴细胞功能和肺癌耐药性均明显升高,提示 PD1、PD-L1 可诱导癌细胞耐药。以上研究表明,PD1、PD-L1 可促进肿瘤细胞发展。目前,抗 PD1、PD-L1 的人源化单克隆抗体已获得批准用于治疗转移性尿路上皮癌及三阴性乳腺癌等,药物安全性试验结果表明,当 PD1、PD-L1 阳性表达时治疗客观缓解率更高^[10]。因此,推测进行 PD1、PD-L1 表达的监测对于疾病发展的预测有重要价值。本研

究结果显示,PD1、PD-L1 在子宫内膜癌组织中 TILs 及 T 淋巴细胞上均呈阳性表达,且子宫内膜癌组织中 TILs 上的 PD1、PD-L1 阳性率明显高于正常子宫内膜组织中 TILs 上的 PD1、PD-L1 阳性率。进一步分析二者与子宫内膜癌病理特征的关系,发现当 PD1、PD-L1 阳性率升高时,病理分级越高,更易发生淋巴结转移。这与国内学者田大伟等^[11]的研究结果基本一致,PD1、PD-L1 可促进肿瘤细胞生长和增殖。另外,本研究中 PD1、PD-L1 阳性率低于 PRAT 等^[12]的报道,考虑与本研究样本量较少有关。

TILs 包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞,当 T 淋巴细胞通过激活而聚集后可刺激 PD1/PD-L1 途径逃脱免疫系统清除肿瘤细胞。本研究中 CD8、CD68、FoxP3 和 PD1、PD-L1 在子宫内膜癌中均呈阳性表达。另外,T 淋巴细胞中 PD1、PD-L1 阳性率比较,差异无统计学意义($P>0. 05$),说明 T 淋巴细胞中的 PD1、PD-L1 表达数量并不能决定癌症的发生和

发展。沈辉等^[13]的研究结果显示, TILs 比例较高的乳腺癌患者经化疗或分子靶向治疗后, 高 TILs 表达患者无病生存期高于低 TILs 表达患者。ZHU 等^[14]的研究指出, CD8、CD68、FoxP3 在膀胱癌组织切片中阳性率低于正常膀胱组织。本研究结果显示, CD8、CD68、FoxP3 阳性率越高, 病理分级越高, 且存在淋巴结转移, 与上述研究结果一致。分析其作用机制可得, 肿瘤患者在接受化疗药物治疗后, 肿瘤细胞会释放出肿瘤相关抗原, 从而触发对肿瘤细胞免疫应答反应。CD68 为一类可检测人体组织中巨噬细胞的分子标记物, 可调节巨噬细胞浸润导致的血管新生、癌浸润深度、病理分期等的发展。CD8、CD68、FoxP3 高表达与肿瘤细胞的免疫应答反应相关, 可促进肿瘤细胞坏死, 进而提高治疗客观缓解率。李国等^[15]的研究结果显示, 向机体回输 CD8⁺ T 淋巴细胞型细胞因子后, 肿瘤微环境中 CD4⁺ TILs 抗肿瘤作用增强。

综上所述, PD1、PD-L1 在子宫内膜癌组织中呈高表达, 而 CD8、CD68、FoxP3 呈低表达, 且与子宫内膜癌临床病理特征关系密切, 考虑可通过人为干预治疗改变 PD1、PD-L1 比例, 增强患者免疫调节能力, 为治疗子宫内膜癌提供新的策略依据。但由于研究时间短, 本研究未对患者的长期生存率进行分析, 暂不能明确 PD1、PD-L1 靶向治疗药物的有效性, 关于 PD1、PD-L1 靶向治疗药物的应用和开展仍需在临床中进一步探讨。

参考文献

- [1] FELIX A S, YANG H P, BELL D W, et al. Epidemiology of endometrial carcinoma: etiologic importance of hormonal and metabolic influences [J]. PLoS One, 2017, 8 (943): 3-46.
- [2] COLIN J R S, AMY P, NICHOLAS P, et al. Peritumoral granulomatous reaction in endometrial carcinoma: association with DNA mismatch repair protein deficiency, particularly loss of PMS2 expression[J]. Histopathology, 2018, 73(3): 428-437.
- [3] RASHID T, YOUNGPIERCE J L, GARRETTMAYER E, et al. Cd8, Foxp3, and Cd45ro⁺ lymphocytic infiltrates in type I and type II endometrial cancers in African American and European American Females[J]. Int J Gynecol Pathol, 2017, 36(6): 88-92.
- [4] 王文佳, 陈东来, 赵裕欢, 等. 食管鳞癌微环境中肿瘤浸润淋巴细胞的研究进展[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2019, 35(2): 122-128.
- [5] 王高强, 高玲. 程序性死亡配体 1(PD-L1)在乳腺癌患者外周血和癌组织中的表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 3227-3231.
- [6] FLORENCE M, EMMANUEL P, NADIA Y, et al. Abstract 590: a new standardized CD8 and PD-L1 dual assay [J]. Cancer Res, 2017, 77(13): 590-590.
- [7] DAUFFENBACH L M, SIA G C, ZHENG J, et al. Abstract 1669: multiplex immunohistochemical staining of PD-L1, PD-1, CD3, CD4, CD8, CD68, FoxP3, and Ki-67 and image analysis of tumor and invasive margin in human FFPE NSCLC tissue[J]. Cancer Res, 2017, 77(13): 1669-1669.
- [8] 王钰聪, 徐英辉, 李宏伟, 等. PD1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗非小细胞肺癌的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(4): 1029-1032.
- [9] DURUISSEAU M, ROUQUETTE I, ADAM J, et al. Efficacy of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors and PD-L1 testing in thoracic cancers[J]. Ann Pathol, 2017, 37(1): 61-78.
- [10] 汪龙, 宋佳伟, 韩一萱, 等. 治疗尿路上皮癌新药: 程序性死亡配体 1 抑制剂 durvalumab[J]. 中国新药与临床杂志, 2018, 37(7): 391-394.
- [11] 田大伟, 胡海龙. 晚期尿路上皮癌中针对 PD-1/PD-L1 的免疫治疗研究进展[J]. 国际生物医学工程杂志, 2019, 42(1): 88-93.
- [12] PRAT A, NAVARRO A, PARE L, et al. Immune-related gene expression profiling after PD-1 blockade in non-small cell lung carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma and melanoma[J]. Cancer Res, 2017, 77(13): 3540-3550.
- [13] 沈辉, 盛晗, 陆建菊, 等. 程序性死亡受体 1 和 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子 3 在乳腺癌肿瘤微环境中的表达、分布及其与临床病理特征的关系[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(17): 1352-1357.
- [14] ZHU R, CHEN L, XIONG Y, et al. An upregulation of CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells with suppressive function through interleukin 2 pathway in pulmonary arterial hypertension[J]. Exp Cell Res, 2017, 358(2): 182-187.
- [15] 李国, 樊超强, 赵敦勇. DEC-205 靶向的肝素酶 CD4⁺ CD8⁺ T 细胞表位肽纳米颗粒疫苗的抗肿瘤免疫效应研究[J]. 免疫学杂志, 2019, 11(4): 321-326.

(收稿日期: 2020-09-15 修回日期: 2020-12-29)