

# 程序性死亡因子配体 1 在骨肉瘤中的表达及临床病理学意义

浦飞飞<sup>1</sup> 陈凤霞<sup>2</sup> 邵增务<sup>1△</sup> 杨佳铭<sup>1</sup> 张志才<sup>1</sup> 刘建湘<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨程序性死亡因子配体 1(PD-L1)在骨肉瘤细胞和组织中的表达及对患者预后的影响。方法:采用 Western Blot 检测 PD-L1 在骨肉瘤细胞系和成骨细胞系中的表达,并用免疫组织化学(IHC)方法检测肿瘤及癌旁组织中 PD-L1 的表达,用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。结果:PD-L1 在骨肉瘤细胞株中的表达高于正常成骨细胞,而且其在骨肉瘤组织中的表达也显著高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Kaplan-Meier 生存分析显示 PD-L1 高表达患者预后较低表达患者差,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:PD-L1 在骨肉瘤中高表达,其高表达与患者预后不良有关,提示 PD-L1 可作为潜在的治疗靶点。**[关键词]** 程序性死亡因子 1;程序性死亡因子配体 1;骨肉瘤;生存分析;预后**[中图分类号]** R738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)05-0006-05

## Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in Osteosarcoma and Its Clinicopathological Values

PU Feifei<sup>1</sup> CHEN Fengxia<sup>2</sup> SHAO Zengwu<sup>1△</sup> YANG Jiaming<sup>1</sup>  
ZHANG Zhicai<sup>1</sup> LIU Jianxiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;

<sup>2</sup> Department of Radiation Oncology and Medical Oncology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China.

**Abstract Objective:** To investigate the prognostic value of the programmed cell death ligand-1(PD-L1) expression in osteosarcoma cells and tissues. **Methods:** Western Blot was used to detect the expression of PD-L1 in osteosarcoma cells and osteoblast cell line. Immunohistochemical (IHC) method was used to detect the expression of PD-L1 in tumors and adjacent tissues. Survival analysis was conducted by Kaplan-Meier analysis. **Results:** The expression of PD-L1 in osteosarcoma cell lines was higher than that in osteoblast cell line, and the expression of PD-L1 in osteosarcoma tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis showed that patients with high PD-L1 expression had a worse prognosis than those with low expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** PD-L1 is highly expressed in osteosarcoma, which is associated with poor prognosis of patients, suggesting that it may be a potential therapeutic target.

**Keywords:** programmed cell death factor 1 (PD-1); programmed cell death ligand-1 (PD-L1); osteosarcoma; survival analysis; prognosis

骨肉瘤是儿童最常见的原发恶性骨肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来,随着新的辅助化疗技术的应用,患者的生存率得到显著提升,但晚期患者整体预后仍不理想<sup>[2]</sup>。在肿瘤微环境中,程序性死亡因子 1(PD-1)和程序性死亡因

子配体 1(PD-L1)会抑制 T 细胞活性<sup>[3]</sup>,减少细胞因子的产生,这将协助肿瘤细胞逃避免疫系统的监控和攻击<sup>[4]</sup>,阻断 PD-1/PD-L1 信号转导通路,起到抗肿瘤作用<sup>[5]</sup>。目前国内外对骨肉瘤中 PD-L1 表达的研究较少,本研究检测了 PD-L1 在骨肉瘤细胞和肿瘤组织中的表达,分析了 PD-L1 表达水平与患者预后的相关性,为骨肉瘤靶向治疗和免疫治疗提供理论依据。

### 1 研究对象和方法

#### 1.1 研究对象

选取 2011 年 5 月至 2017 年 6 月在华中科技大学

基金项目:国家自然科学基金项目(81904231)

中国博士后科学基金项目(2020M672369)

<sup>1</sup> 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科(武汉,430022)

<sup>2</sup> 武汉大学中南医院肿瘤放疗科

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:shaozengwupro@163.com

同济医学院附属协和医院骨科接受手术切除的 42 例患者骨肉瘤肿瘤组织和癌旁组织。其中男 28 例,女 14 例;年龄 8~72 岁,平均 19 岁。本项目生物样本的使用和病史资料调研经华中科技大学同济医学院医学伦理委员会审查批准(2019-IEC-S274 号),所有患者及家属均签署知情同意书。

## 1.2 诊断标准

骨肉瘤诊断参考 2021 版美国国家综合癌症网络(NCCN)《骨肿瘤临床实践指南》,包括临床体征、影像学检查、病理学检查等部分。临床检查可见间歇性疼痛或持续性疼痛,局部肿胀伴有压痛。影像学检查表现为骨组织同时具有新骨生成和骨破坏的特点。病理诊断明确为骨肉瘤。

## 1.3 纳入标准

1) 符合上述诊断标准;2) 未采用 PD-1 或 PD-L1 等免疫治疗;3) 同意参与本项临床研究并签署知情同意书。

## 1.4 排除标准

1) 采用 PD-1 或 PD-L1 等免疫治疗;2) 合并有其他严重疾病。

## 1.5 方法

**1.5.1 细胞系和主要试剂** 骨肉瘤细胞系 U-2OS、MG63、SAOS 和成骨细胞系 hFOB1.19 均购自中国科学院上海典型培养物保藏委员会细胞库,PD-L1 单克隆抗体(ab17483)购自英国 Abcam 公司。

**1.5.2 细胞培养** 骨肉瘤细胞系 U-2OS、MG63 和 SAOS 采用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基(ATCC)。成骨细胞系 hFOB1.19 在含有 10% 胎牛血清的 McCoy's 5a 培养基(ATCC)中培养,培养条件为 37℃ 和 5%CO<sub>2</sub>,当细胞融合度达到 90% 时进行传代,使细胞始终处于对数分裂状态。

**1.5.3 蛋白印记实验** 将细胞用冰冷的 PBS 洗涤 2 次后,加入 1% Triton X-100 裂解缓冲液置于冰上裂解,用 Lowry 法定量测定细胞中蛋白质含量。细胞裂解后,蛋白质通过电泳分离并转移到硝基纤维素膜上。在室温下用含 0.1% TBST 缓冲液的 5% 脱脂牛奶封闭细胞膜 2 h,随后在 4℃ 下用兔抗 PD-L1 单克隆抗体孵育过夜。用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后,用合适的辣根过氧化物酶结合的二抗在室温下反应 2 h。经过 TBST 缓冲液洗涤后,加入增强化学发光剂,观察蛋白条带。

**1.5.4 免疫组织化学(IHC)检测** IHC 检测按照已有研究报道的方法<sup>[6]</sup>进行,操作简述如下:将福尔马林固定过的肿瘤组织经石蜡包埋后再进行染色,并制成 4 μm 的切片。切片在二甲苯中脱蜡,在乙醇溶液中梯度脱水并用 0.3% 过氧化氢淬灭内源性过氧化物酶的活性。使用 0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液进行抗原修

复,并在 37℃ 下用 10% 山羊血清阻断非特异性结合 30 min。随后加入抗人 PD-L1 单克隆抗体(1:100 稀释)4℃ 孵育过夜,然后在 37℃ 下加入辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体(1:500 稀释),最后加入氨基联苯胺(DAB)孵育,并用苏木精进行复染,对切片进行脱水、透明与封片。

免疫组化的结果由两名病理学专家通过盲法分别独立评估,以被染色细胞数占总细胞数的百分比计算染色程度,并结合染色强度进行数据分析。染色强度评分 0~3 分,染色程度评分 0%~100%。将两个评分相乘,得到每个样本免疫组化染色的最终评分。评分 > 1.1 分(中位数)为 PD-L1 高表达,评分 ≤ 1.1 分为 PD-L1 低表达。

**1.5.5 治疗方法** 所有患者经病理诊断明确为骨肉瘤后采用规范化的综合治疗模式,包括术前、术后新辅助化疗及手术治疗,术前及术后化疗方案包括使用大剂量甲氨蝶呤 8~12 g/m<sup>2</sup>、阿霉素 60~90 mg/m<sup>2</sup>、顺铂 100~120 mg/m<sup>2</sup> 及异环磷酰胺 10~15 g/m<sup>2</sup> 共 4 种药物交替进行。手术治疗者包括截肢手术和保肢手术,其中保肢手术分为瘤段切除后的肿瘤型假体置换、大段同种异体骨移植、自体骨灭活再植手术等。

**1.5.6 随访方法** 在结束治疗后立即对患者开始随访,治疗完成后 2 年内每 3 个月 1 次;第 3 年每 4 个月 1 次;第 4 年和 5 年每 6 个月 1 次;5 年后每年 1 次至术后第 10 年。随访内容包括骨肉瘤是否转移、骨肉瘤是否复发以及是否出现放化疗毒副反应和手术并发症。检查项目包括胸部 CT、局部 X 线、骨扫描和功能评分、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶指标等。

## 1.6 统计学方法

本实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。采用  $\chi^2$  检验、费希尔精确检验和  $t$  检验来评估免疫组化染色评分和临床变量之间的关系。采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,曲线间差异采用 Log-Rank 检验。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 骨肉瘤患者的临床特征

研究对象共 42 例,其中男 22 例,女 20 例。20 岁以下 25 例,占 59.52%;20~40 岁 5 例,占 11.90%;40 岁以上 12 例,占 28.57%。根据病理分型、Enneking 分期及肿瘤位置(见表 1)、手术方式及存活率(见表 2)进行分类。

### 2.2 PD-L1 表达与病理参数的关系

在骨肉瘤患者中,PD-L1 的表达与组织类型、手术方式和是否存活间存在显著相关性(见表 3),与其他参数间无明显相关性(见表 4)。

表 1 骨肉瘤患者的病理分型、Enneking 分期及肿瘤位置

临床特点		例数/例	比例/%
病理分型	传统中央型骨肉瘤	31	73.81
	血管扩张型骨肉瘤	5	11.90
	骨旁骨肉瘤	3	7.14
	小细胞骨肉瘤	2	4.76
	纤维型骨肉瘤	1	2.38
Enneking 分期	Ⅱ B	23	54.76
	Ⅲ	19	21.43
肿瘤位置	股骨	23	54.76
	胫骨	2	28.57
	其他	7	16.67

表 2 手术方式及存活率

临床特点		例数/例	比例/%
手术方式	保肢体	13	30.95
	截肢	29	69.04
是否存活	是	20	47.62
	否	22	42.38

表 3 PD-L1 与组织类型、手术方式和是否存活的相关性(例)

分类		阳性(IHC)		阴性(IHC)		P
		+++	++	+	-	
组织类型	周围组织	8	8	16	10	<0.001
	肿瘤组织	3	25	9	5	
手术方式	保肢	1	4	5	3	0.012
	截肢	11	8	7	3	
是否存活	是	5	7	4	4	<0.001
	否	9	6	5	2	

表 4 PD-L1 表达与性别、年龄、病理分型及 Enneking 分期的相关性(例)

分类		阳性(IHC)		阴性(IHC)		P
		+++	++	+	-	
性别	男	9	4	5	4	0.429
	女	8	7	2	3	
年龄/岁	>40	2	1	5	1	1.000
	20~40	1	1	4	6	
	<20	1	2	6	2	
病理分型	传统中央型骨肉瘤	3	6	9	13	0.348
	血管扩张型骨肉瘤	0	0	3	2	
	骨旁骨肉瘤	0	2	0	1	
	小细胞骨肉瘤	0	0	1	1	
	纤维型骨肉瘤	0	1	0	0	
Enneking 分期	Ⅱ B	3	5	8	7	0.351
	Ⅲ	2	4	5	8	

2.3 PD-L1 在骨肉瘤细胞和成骨细胞中的表达

Western Blot 检测结果显示,PD-L1 在骨肉瘤细胞系 U-2OS、MG63、SAOS 中高表达,在成骨细胞系 hFOB1.19 中低表达,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1。

2.4 IHC 检测结果

IHC 检测结果显示,骨肉瘤肿瘤组织中 PD-L1 免疫组化染色评分明显高于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。

2.5 PD-L1 表达对骨肉瘤患者预后的影响

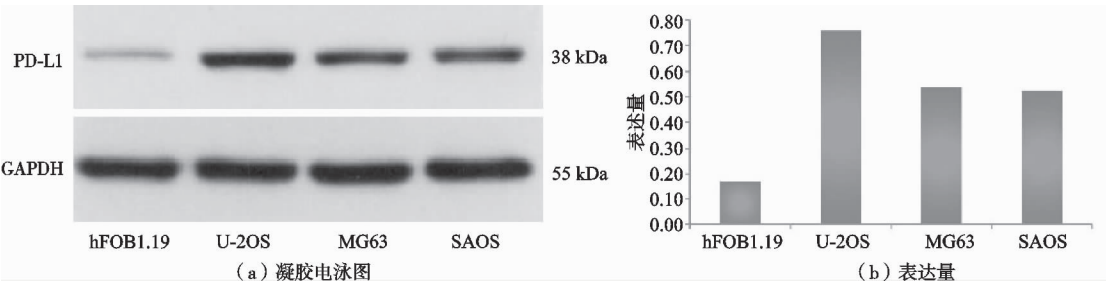


图 1 PD-L1 在骨肉瘤细胞和成骨细胞中的表达 (PD-L1 在骨肉瘤细胞系 U-2OS、MG63、SAOS 中高表达,在成骨细胞系 hFOB1.19 中低表达)

Kaplan-Meier 分析结果表明,PD-L1 高表达患者总生存率低于 PD-L1 低表达患者(见图 3),表明 PD-L1 高表达与骨肉瘤高死亡风险显著相关,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

3 讨论

随着医学的不断进步,肿瘤的治疗已从传统的手术加化疗向分子靶向治疗以及免疫治疗等新领域转变<sup>[7]</sup>。PD-L1 在骨肉瘤发生过程中的生物学基础仍不清楚,还需要进一步的研究。有研究表明,PD-1 和 PD-L1 结合后,可使得 PD-1 胞质区免疫受体酪氨酸抑制基序结合内酪氨酸磷酸化,会使得 SHP-2 磷酸酶

逐步提升,进而使得 SHP-2 磷酸酶可持续提升,引发 Syk 以及磷脂酰肌醇等下游分子去磷酸化,抑制信号传导<sup>[8]</sup>。淋巴细胞增殖活化以及辅助细胞 T 分化也会受到抑制,进而使得患者机体呈现免疫负调节。其中 PD-1/PD-L1 刺激分子也可使得免疫应答产生负调节,最终使得肿瘤免疫出现逃逸<sup>[9]</sup>。此外,Bax 是凋亡通路中重要基因,促进细胞凋亡,Bcl-2 是抗凋亡基因,而通过拮抗 PD-L1 可上调 Bax,下调 Bcl-2,表明拮抗 PD-L1 可激活凋亡通路,抑制肿瘤细胞生长<sup>[10]</sup>。

与常规化疗方法相比,PD-1/PD-L1 抗体应用广泛,对于手术切除或未切除患者均可使用,辅助治疗效

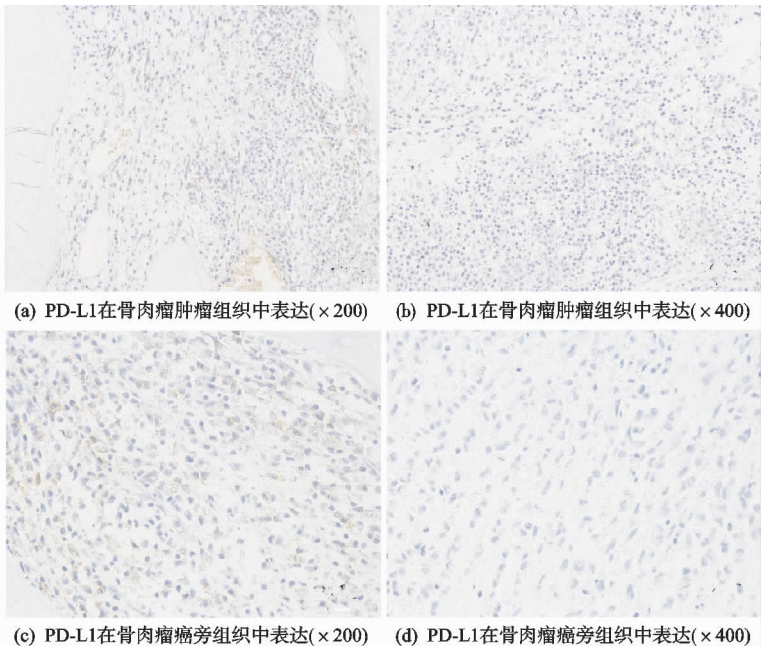


图 2 IHC 检测骨肉瘤肿瘤组织和癌旁组织 PD-L1 表达

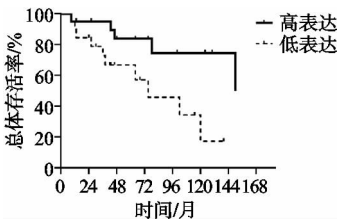


图 3 骨肉瘤患者 PD-L1 表达水平的 Kaplan-Meier 生存分析曲线 (PD-L1 高表达患者总生存率低于 PD-L1 低表达患者)

果明显。2014 年 9 月以来,PD-L1 抑制剂(PD-L1 抗体)已经被批准用于恶性黑色素瘤、非小细胞肺癌等 MSI 阳性的实体瘤,显示出了鼓舞人心的疗效<sup>[11]</sup>。采用 PD-1/PD-L1 抗体与常规化疗联合治疗,能进一步提高疗效,同时也能抑制不良反应的发生,安全性较高<sup>[12]</sup>。除此之外,有研究者还发现,PD-L1 可作为检测非小细胞肺癌的分子标志物,对疾病的诊断有着极为重要的价值<sup>[13]</sup>。随着 PD-L1 表达的增高,肿瘤的恶性程度及转移的风险也会随之增加,其水平的升高与患者的生存率有着明显的负相关关系<sup>[14]</sup>。

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性恶性肿瘤,当肿瘤发展至晚期时,抢救性化疗效果通常不明显,患者 5 年生存率仅为 50%<sup>[15]</sup>,发掘新的方法来改善患者的预后显得极为重要。随着对骨肉瘤了解的不加深,研究者发现骨肉瘤可能是具有免疫源性的肿瘤,免疫逃逸可能是骨肉瘤的发病机制之一<sup>[16]</sup>,因此以抗 PD-L1 为代表的免疫检查点抑制剂已用于骨肉瘤的临床治疗。

Lussier 等<sup>[17]</sup>骨肉瘤小鼠模型研究结果表明,运用 PD-1/PD-L1 通路和 CTLA-4 通路联合抑制剂的疗法,可以大幅增加骨肉瘤小鼠模型的生存率,几乎可以

完全控制转移性骨肉瘤,并达到 60% 的无病生存率(DFS)。此外,Wang 等<sup>[18]</sup>的研究也表明,多柔比星预处理的骨肉瘤细胞可抑制 CD8 T 淋巴细胞的增殖,并增强 CD8 T 淋巴细胞的凋亡,而抗 PD-L1 抗体可逆转此效应,当多柔比星与抗 PD-L1 抗体在体内联合使用时,可观察到更好的疗效。随着相关领域研究的深入,相信 PD-1/PD-L1 通路抑制剂对骨肉瘤患者预后的改善会起到至关重要的作用。

本研究通过 IHC 检测了骨肉瘤肿瘤组织中 PD-L1 的表达情况,研究了 PD-L1 的表达与患者预后的关系。Kaplan-Meier 分析表明 PD-L1 是独立的整体生存率预测因子,其过度表达与骨肉瘤患者低生存率有密切关联。此外,本研究分析了 PD-L1 在骨肉瘤细胞株和成骨细胞株中的表达水平,结果显示 PD-L1 在骨肉瘤细胞中表达增加。以上研究表明 PD-L1 极有可能是骨肉瘤患者预后不良的独立预测因子,可以认为是骨肉瘤有价值的生物标志物。

对于骨肉瘤而言,检测 PD-1/PD-L1 的表达量可以辅助诊断肿瘤,而阻断 PD-1/PD-L1 信号转导通路可以成为治疗骨肉瘤的有效手段。PD-L1 可以在疾病的诊断、治疗、预后预测、康复等方面发挥极为重要的作用。寻找合适的肿瘤免疫标志物,调整免疫微环境使之适应免疫治疗,精准寻找每个患者最合适的治疗方案,以 PD-L1 为代表的免疫疗法将是肿瘤治疗领域的一片新蓝海。

参考文献

[1] 浦飞飞,邵增务.骨肉瘤基因治疗研究进展[J].国际骨科科学杂志,2013,34(3):193-195.

[2] 浦飞飞,张志才,邵增务,等.骨水泥型与非骨水泥型假体

- 置换治疗膝关节周围骨肉瘤的疗效评价[J]. 中国骨与关节杂志, 2021, 10(2): 107-110.
- [3] 浦飞飞, 邵增务. T 淋巴细胞免疫球蛋白黏蛋白-3 在肿瘤免疫中的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(10): 701-705.
- [4] CHEN S, GUENTHER L M, ARONHALT A, et al. PD-1 and PD-L1 expression in osteosarcoma; which specimen to evaluate? [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2020, 42(8): 482-487.
- [5] ZHANG M L, CHEN L, LI Y J, et al. PD-L1/PD-1 axis serves an important role in natural killer cell induced cytotoxicity in osteosarcoma[J]. Oncol Rep, 2019, 42(5): 2049-2056.
- [6] PU F, CHEN F, ZHANG Z, et al. TIM-3 expression and its association with overall survival in primary osteosarcoma[J]. Oncol Lett, 2019, 18(5): 5294-5300.
- [7] SINKOVICS J G, HORVATH J C. Evidence accumulating in support of cancer vaccines combined with chemotherapy; a pragmatic review of past and present efforts[J]. Int J Oncol, 2006, 29(4): 765-777.
- [8] DAI S, JIA R, ZHANG X, et al. The PD-1/PD-Ls pathway and autoimmune diseases[J]. Cell Immunol, 2014, 290(1): 72-79.
- [9] CHENG X, VEVERKA V, RADHAKRISHNAN A, et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor[J]. J Biol Chem, 2013, 288(17): 11771-11785.
- [10] 王平, 杨文秀, 周杰. 弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织 PD-1/PD-L1 与 C-myc 和 Bcl-2 表达相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(14): 1151-1156.
- [11] 赵宇飞. PD1/PDL1 抑制剂治疗肿瘤[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 24(8): 904-911.
- [12] SUNSHINE J, TAUBE J M. PD-1/PD-L1 inhibitors[J]. Curr Opin Pharmacol, 2015, 23: 32-38.
- [13] 卢俊米, 冯娟, 郑红梅, 等. PD-L1 在非小细胞肺癌中表达的临床意义[J]. 中南大学学报(医学版), 2020, 45(10): 1149-1154.
- [14] LIN H, WEI S, HURT E M, et al. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression[J]. J Clin Invest, 2018, 128(2): 805-815.
- [15] CHOU A J, GELLER D S, GORLICK R. Therapy for osteosarcoma; where do we go from here? [J]. Paediatr Drugs, 2008, 10(5): 315-327.
- [16] KOIRALA P, ROTH M E, GILL J, et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30093.
- [17] LUSSIER D M, JOHNSON J L, HINGORANI P, et al. Combination immunotherapy with  $\alpha$ -CTLA-4 and  $\alpha$ -PD-L1 antibody blockade prevents immune escape and leads to complete control of metastatic osteosarcoma[J]. J Immunother Cancer, 2015, 3: 21.
- [18] WANG J, HU C, WANG J, et al. Checkpoint blockade in combination with doxorubicin augments tumor cell apoptosis in osteosarcoma[J]. J Immunother, 2019, 42(9): 321-330.

(收稿日期: 2021-11-04)