

Bcl-2、PD-L1 在大肠癌组织中的表达及意义

张美云, 杨永岩, 王新花, 李晓凤

包头市肿瘤医院 综合内科(包头 014030)

【摘要】 目的 探讨结肠癌组织中凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白、免疫共刺激分子 PD-L1 蛋白的表达及其与肿瘤转移的关系。方法 应用免疫组化技术检测 57 例新鲜大肠癌组织及其癌旁正常组织中 Bcl-2、PD-L1 的表达,分析 Bcl-2、PD-L1 表达与大肠癌患者临床病理特征的关系。结果 大肠癌组织中 Bcl-2 蛋白阳性表达率为 75.43%,而癌旁正常组织中阳性表达率为 52.63%,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$);大肠癌组织中有 PD-L1 蛋白的原位表达,阳性表达率为 45.61%,而癌旁正常组织 PD-L1 蛋白阳性表达率为 15.79%,两者差异具有统计学意义($P < 0.01$);Bcl-2 的表达率和表达强度与病理学分化程度有关,高-中分化大肠癌患者癌组织中 Bcl-2 的表达率和表达强度高于低分化者,差异有统计学意义($P < 0.05$);PD-L1 蛋白的阳性表达率与大肠癌的淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与浸润深度无关。在高-中分化组、Dukes 分期 A+B 组、无淋巴结转移组中 Bcl-2 的阳性表达率高于 PD-L1($P < 0.05$),而在低分化组、Dukes 分期 C+D 组、有淋巴结转移组中二者表达率无明显差异($P > 0.05$)。结论 Bcl-2 可能与结肠癌的病理学分化程度有关,PD-L1 可能与结肠癌的转移发展有关;共检测 Bcl-2 和 PD-L1 可能预测大肠癌的病理分化程度、Dukes 分期及有无淋巴结转移。

【关键词】 Bcl-2 PD-L1 大肠癌 临床病理 淋巴结转移

Expression of Bcl-2, PD-L1 and Its Clinical Significance in Colorectal Cancer ZHANG Mei-yun, YANG Yong-yan, WANG Xin-hua, LI Xiao-feng. Department of Composite Medicine, Baotou Tumor Hospital, Baotou 014030, China

【Abstract】 **Objective** To study the expression of Bcl-2 and PD-L1 in colon cancer and its relationship with metastasis. **Methods** Tumor samples were collected from 57 cases of colon cancer, and tumor adjacent normal mucous tissue were obtained as normal control. The expressions of Bcl-2 and PD-L1 were assayed by immunohistochemical staining, and its correlations with patients' clinical pathological indexes were analyzed. **Results** The positive rate of Bcl-2 protein was 75.43% and 52.63% in colon cancer tissues and tumor adjacent colon mucous tissue respectively, with statistically significant difference ($P < 0.05$). While the positive rate of PD-L1 was 45.61% and 15.79% in colon cancer tissues and tumor adjacent colon mucous tissue respectively, also with significant difference ($P < 0.01$). The positive rate of Bcl-2 was correlated with cellular differentiation, and the positive rate of PD-L1 protein was correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of Bcl-2 may be associated with colon cancer pathologic differentiation, and the expression of PD-L1 may be associated with colon cancer metastasis.

【Key words】 Bcl-2 PD-L1 Colon cancer Clinical pathological indexes Lymph node metastasis

大肠癌是胃肠道最常见恶性肿瘤,近年来总体发病率呈上升趋势。大肠癌较易发生淋巴结转移和肝转移,但目前对它的早期诊断和转移预测尚缺乏有效方法。Bcl-2 是一个重要的凋亡抑制基因,研究表明,Bcl-2 基因在多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。许多研究发现,Bcl-2 基因高表达与某些恶性肿瘤如鳞状细胞癌、肝癌、大肠癌和乳腺癌细胞侵袭、转移具有重要的关系^[1-3]。免疫逃逸与肿瘤发生密切相关,B7 家族是这方面研究的一个热点。PD-L1 是近年来发现的 B7 家族新成员,PD-L1 与表达在淋巴细胞表面的程序死亡受体 PD-1 结合后能诱导 T 细胞凋亡,介导

肿瘤免疫逃逸,促进肿瘤生长,在外周免疫耐受调节中发挥重要作用。在此我们应用免疫组化方法研究了大肠癌组织中 Bcl-2、PD-L1 的表达,并结合传统的临床病理特征,探讨其与肿瘤病理分期,淋巴结转移的关系及临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

收集包头肿瘤医院病理科 2007 年 1 月至 2010 年 12 月有完整病例资料的大肠癌患者根治性手术切除组织的石蜡包埋标本及癌旁正常组织 57 例,其中男 35 例,女 22 例,平均年龄(60±24)岁。直肠癌

(包括肛管癌)31 例,结肠癌 26 例。按照 WHO 病理学分级标准分为高-中分化腺癌 33 例,低分化腺癌 24 例。按照 Dukes 分期分为 A+B 期 32 例,C+D 期 25 例。

1.2 Bcl-2、PD-L1 免疫组化检测方法

全部病例采用免疫组化 Envision 二步法进行染色,实验以上海长岛生物工程公司提供的阳性片为阳性对照,以 PBS 为阴性对照,Bcl-2 及 PD-L1 的一抗滴度为 1:100,以 Envision 试剂盒中抗体为二抗,作为质量控制标准。

1.3 结果判定

采用双盲法阅片,蛋白定位于细胞膜或质,阳性以胞膜或胞质出现棕色或棕黄色染色为标准。随机计数 10 个高倍镜视野共 1000 个瘤细胞,分级如下:阴性(-):阳性细胞率 $<10\%$;阳性(+):阳性细胞率 $\geq 10\%$;阳性(++): $\geq 30\%$;阳性(+++): \geq

60%。(+)及以上表达者即统计为阳性病例。

1.4 统计学方法

率之间的比较选用 χ^2 检验,等级资料分析用秩和检验(Kruskal-Wallis H Test),四格表资料用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Bcl-2 及 PD-L1 在大肠癌组织和癌旁正常组织中的表达

免疫组化染色结果显示(图 1~图 4):在大肠癌组织中 Bcl-2 和 PD-L1 蛋白阳性染色位于癌细胞的胞浆中,呈淡黄色至棕黄色细颗粒,细胞核不染色。而 Bcl-2 和 PD-L1 在癌旁正常组织中表达较弱或不表达。从表 1 可知,与癌旁正常组织相比,大肠癌组织 Bcl-2 及 PD-L1 阳性表达率升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

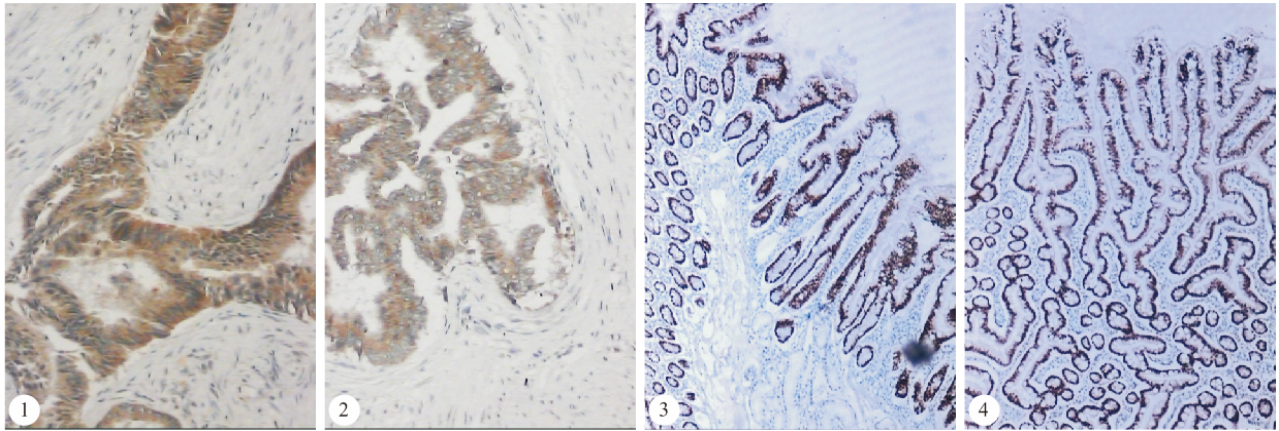


图 1 Bcl-2 在结肠癌组织中的表达(+++). Envision $\times 100$

图 2 PD-L1 在结肠癌组织中的表达(+++). Envision $\times 100$

图 3 Bcl-2 在癌旁正常组织中的表达(+). Envision $\times 100$

图 4 PD-L1 在癌旁正常组织中的表达(+). Envision $\times 100$

Fig 1 Expression of Bcl-2 in colorectal cancer tissue (+++), Envision $\times 100$

Fig 2 Expression of PD-L1 in colorectal cancer tissue

(+++), Envision $\times 100$

Fig 3 Expression of Bcl-2 in paraneoplastic normal tissue (+), Envision $\times 100$

Fig 4 Expression of

PD-L1 in paraneoplastic normal tissue (+), Envision $\times 100$

表 1 Bcl-2 及 PD-L1 在大肠癌组织及癌旁正常组织中的表达〔例数 (%)〕

Table 1 Expressions of Bcl-2 and PD-L1 in colon cancer and tumor adjacent normal colon mucous tissue [case(%)]

| Group | n | Bcl-2 positive | PD-L1 positive |
|------------------------------------|----|----------------|----------------|
| Colon cancer | 57 | 43 (75.43)* | 26 (45.61)* |
| Tumor adjacent normal colon mucous | 57 | 30 (52.63) | 9 (15.79) |

* $P<0.05$, vs. tumor adjacent normal colon mucous tissue

2.2 大肠癌组织中 Bcl-2 和 PD-L1 与临床病理特征的关系

从表 2 可知,高-中分化组与低分化组相比,Bcl-2 和 PD-L1 阳性表达率均降低($P<0.05$);有淋巴结转移组与无淋巴转移组相比,Dukes 分期 C+D

组与 Dukes 分期 A+B 组相比,PD-L1 阳性表达率升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在高-中分化组、Dukes 分期 A+B 组、无淋巴结转移组中,Bcl-2 的阳性表达率高于 PD-L1 ($P<0.05$),而在低分化组、Dukes 分期 C+D 组、有淋巴结转移组中,二者的阳性表达率无明显差异($P>0.05$)。

2.3 Bcl-2 及 PD-L1 的表达程度与大肠癌组织病理分化程度的关系

不同病理分化程度的大肠癌组织中 Bcl-2 及 PD-L1 的表达程度不同。高-中分化大肠腺癌患者癌组织中 Bcl-2 和 PD-L1 的表达强度低于低分化者,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 2 大肠癌组织中 Bcl-2 和 PD-L1 与临床病理特征的关系〔例数 (%)〕

Table 2 Relationship between Bcl-2 and PD-L1 in colorectal carcinoma and clinicopathological features〔case(%)〕

| Pathological feature | n | Bcl-2 positive | PD-L1 positive |
|---------------------------|----|----------------|----------------|
| Sex | | | |
| Male | 35 | 24 (68.57) | 15 (42.86) |
| Female | 22 | 19 (86.36) | 11 (50.00) |
| Age (yr.) | | | |
| ≥60 | 36 | 27 (75.00) | 14 (38.89) |
| <60 | 21 | 16 (76.19) | 12 (57.14) |
| Depth of invasion | | | |
| Subserous | 8 | 4 (50.00) | 4 (50.00) |
| Serosa and serial | 49 | 39 (79.59) | 22 (44.90) |
| Degree of differentiation | | | |
| High-middle | 33 | 21 (63.64)*·# | 8 (24.24)*·* |
| Low | 24 | 22 (91.67) | 18 (75.00) |
| Dukes stage | | | |
| A+B | 27 | 22 (81.48)# | 8 (29.63)△ |
| C+D | 30 | 21 (70.00) | 18 (60.00) |
| Lymph node metastasis | | | |
| Yes | 30 | 21 (70.00) | 18 (60.00)& |
| No | 27 | 22 (81.48)# | 8 (29.63) |

* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, vs. low-differentiation; $\Delta P < 0.05$, vs. C+D stage; & $P < 0.05$, vs. no lymph node metastasis; # $P < 0.05$, vs. PD-L1 in the same clinicopathological feature

表 3 Bcl-2 及 PD-L1 表达强度与大肠癌组织病理分化程度的关系
Table 3 Relationship between the expression lever of Bcl-2 and PD-L1 and the pathological differentiation of colorectal carcinoma

| Histologic grade | n | Bcl-2 | | | PD-L1 | | |
|------------------|----|-------|----|----|-------|----|----|
| | | - | + | ++ | - | + | ++ |
| Low | 24 | 2 | 14 | 8* | 6 | 12 | 6* |
| High-middle | 33 | 12 | 15 | 6 | 25 | 4 | 4 |

* $P < 0.05$, vs. high-middle grade

3 讨论

早期淋巴结转移是近年来临床上发现大肠癌的一个特点,并对大肠癌患者愈后影响很大,我们迫切需要揭开大肠癌淋巴结转移的机制。

目前对肿瘤患者可出现分子水平异常改变的报道有许多,如细胞的生长、凋亡调控,血管生成以及免疫逃避等。Bcl-2 是一个重要的凋亡抑制基因,研究表明,Bcl-2 基因在多种恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的发生发展及预后密切相关^[4-6],许多研究发现,Bcl-2 基因高表达与某些恶性肿瘤如鳞状细胞癌、肝癌、大肠癌和乳腺癌细胞侵袭、转移具有重要的关系。Bcl-2 基因表达水平增高或降低后,癌细胞侵袭性也相应地增强或者减弱。本研究发现,不同病理分化程度的大肠癌患者癌组织中 Bcl-2 的表达程度不同,高-中分化大肠腺癌患者癌组织中 Bcl-

2 的表达强度低于低分化者。因本组研究中病例数少,故没有做 Bcl-2 和 PD-L1 的表达程度与其他临床病理特征的关系的分析。已有资料表明 Bcl-2 蛋白表达率和表达强度随着腺癌分化程度的降低而升高,也可能是肿瘤恶性程度增加的内在机制之一^[7]。由此提示,该基因在某些癌细胞侵袭中发挥着重要的作用,因而可用于肿瘤疗效的评估。

肿瘤的发病机制目前尚不十分清楚,但研究发现,免疫逃避机制是其发生的重要机制之一。目前,围绕其做了大量研究,PD-L1 是近年发现的 B7 家族的新成员,其对调节 T 细胞和 B 细胞反应有很明显的效应。PD-L1 除了在淋巴组织表达外,还在非淋巴组织表达,且 PD-L1 在非淋巴组织上的表达可以调节外周器官中 T 细胞和 B 细胞的免疫反应和炎症反应。PD-L1 在体外可通过其抑制性受体 PD-1 抑制 Th1 为主的免疫反应,从而在诱导 T 细胞凋亡和肿瘤免疫逃避中发挥重要作用。本研究结果表明,PD-L1 蛋白在伴有淋巴结转移的大肠癌中表达比未发生淋巴结转移的大肠癌组织中的表达高,其发生机制与 PD-L1 的受体 PD-1 或另一个非 PD-L1 受体在淋巴结中特异性高表达有关^[8,9]。PD-L1 在不同病理分化程度的大肠癌患者癌组织中的表达程度不同,这与刘书漫等^[9]做出的 PD-L1 的表达水平与病理分化程度无关的结论不相符,可能与样本量少或存在另外的 PD-L1 受体在癌细胞中表达有关。这为我们进一步揭开大肠癌早期淋巴结转移的机制指明了研究的方向,又为减少淋巴结转移、临床应用 PD-L1/PD-1 抗体药物提供了新的思路。

本研究还发现,在高-中分化、Dukes 分期 A+B、无淋巴结转移大肠癌组织中 Bcl-2 的阳性表达率高于 PD-L1($P < 0.05$),而在低分化、Dukes 分期 C+D、有淋巴结转移癌组织中二者表达率无明显差异($P > 0.05$)。此结果提示联合检测 PD-L1 与 Bcl-2 的表达可能预测大肠癌的病理分化程度、Dukes 分期及有无淋巴结转移。

参 考 文 献

- Skommer J, Brittain T, Raychaudhuri S. Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variations in the mitochondrial pathway of cell death. *Apoptosis*, 2010; 15(10): 1223-1233.
- Czabotar PE, Lessene G. Bcl-2 family proteins as therapeutic targets. *Curr Pharm Design*, 2010; 16(28): 3132-3148.
- Kudoh T, Kimura J, Lu ZG, et al. D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis in response to DNA damage. *Exp Cell Res*, 2010; 316(17): 2849-2858. (下转第 859 页)

量进一步分析。

参 考 文 献

- 1 Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, *et al.* Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*,2009;49(4):1335-1374.
 - 2 Zeuzem S, Berg T, Moeller B, *et al.* Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepatitis*,2009;16(2):75-90.
 - 3 Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, *et al.* Peginterferon-alpha 2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C—a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Int Med*,2004;140(5):346-355.
 - 4 Yan KK, Guirgis M, Dinh T, *et al.* Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*,2008;14(21):3416-3420.
 - 5 Lin CK, Liu TH, Yang SH. Nonlinear position controller design with input-output linearisation technique for an interior permanent magnet synchronous motor control system. *Iet Power Electronics*,2008;1(1):14-26.
 - 6 Liu CH, Liu CJ, Lin CL, *et al.* Pegylated interferon-alpha-2a plus ribavirin for treatment-naïve asian patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: a multicenter, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*,2008;47(10):1260-1269.
 - 7 Ge DL, Fellay J, Thompson AJ, *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*,2009;461(7262):399-401.
 - 8 Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature Genetics*, 2009; 41 (10) : 1100-1174.
 - 9 Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*,2009;41(10):1105-1181.
 - 10 中华医学会肝病学会、传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南. *中华肝脏病学杂志*,2004;12(4):194-198.
 - 11 Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, *et al.* IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*,2010;52(6):1888-1896.
 - 12 Sarasin-Filipowicz M, Christen V, Duong FH, *et al.* Interferon regulated gene expression in the liver determines response to treatment in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2008;134(4):A758-A758.
 - 13 何伶俐, 陈竹, 陈杨等. 聚乙二醇化干扰素联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎的临床疗效观察及影响疗效的相关因素分析. *中华肝脏病学杂志*,2011;19(1):34-37.
 - 14 廖祥伟, 凌云, 李新华等. 宿主 IL28B 基因型联合病毒基因型对慢性丙型肝炎抗病毒疗效的预测. *中国病毒病杂志*,2011;1(1):35-39.
 - 15 Montes-Cano MA, Garcia-Lozano JR, Abad-Molina C, *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*,2010;52(1):33-37.
 - 16 McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, *et al.* Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*,2010;138(7):2307-2314.
- (2012-03-20 收稿,2012-07-24 修回)
编辑 吕熙
-
- (上接第 829 页)
- 4 Krecicki T, Fraczek M, Kozlak J, *et al.* Bcl-xl, protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol*,2006;29(1):55-58.
 - 5 Zhao WL, Daneshpouy ME, Mounier N, *et al.* Prognostic significance of Bcl-xL gene expression and apoptotic cell counts in follicular lymphoma. *Blood*,2007;103(2):695-697.
 - 6 Watanabe J, Kushihata F, Honda K, *et al.* Prognostic significance of Bcl-xL in human hepatocellular carcinoma. *Surgery*,2008;135(6):604-612.
 - 7 邓文英, 罗素霞, 陈小兵等. Bcl-2, Caspase-3 在大肠癌中的表达及意义. *现代肿瘤学*,2009;17(12):2363-2365.
 - 8 Wang S, Bajorath J, Flies DB, *et al.* Molecular modeling and functional mapping of PD-L1 ang B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med*,2006;197(9):1083-1091.
 - 9 刘书漫, 刘国红, 张钦宪. PD-L1 在结肠癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志*,2009;17(8):841-843.
- (2012-04-27 收稿,2012-08-30 修回)
编辑 汤洁