

PD-L1 在急性髓系白血病中的表达及临床意义

白雪,朱海波,邓琦,李玉明

(天津市第一中心医院血液科,天津 300192)

摘要:目的 探究程序性死亡分子 1 配体-1(PD-L1)在急性髓系白血病(AML)中的表达作用和临床意义。方法 选取 2013 年 1 月~2016 年 12 月在我院进行治疗并确诊为 AML 的初治患者 49 例为观察组,选择同期在我院接受治疗的 27 例非恶性疾病如缺铁性贫血、巨幼细胞性贫血者作为对照组。对比两组患者血液中的 PD-L1 表达水平,分析患者性别、年龄、初诊白细胞计数、亚型的对血液中 PD-L1 的影响,确定 PD-L1 表达与临床疗效的相关性。结果 对照组患者治疗前的 PD-L1 表达与观察组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,观察组的 PD-L1 表达高于对照组,统计学意义显著($P<0.01$)。单因素结果显示,PD-L1 在 AML 初诊患者中的表达水平与患者的性别、年龄、初诊 WBC 数、分型无相关性($P>0.05$);未缓解 AML 患者组 PD-L1 表达水平高于持续完全缓解组 AML 患者($P<0.01$)。结论 PD-L1 可能参与 AML 的免疫逃逸机制,并可能与病情进展及治疗效果相关。

关键词:PD-L1;急性髓系白血病;免疫

中图分类号:R733.71

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.06.025

文章编号:1006-1959(2019)06-0079-03

Expression and Clinical Significance of PD-L1 in Acute Myeloid Leukemia

BAI Xue,ZHU Hai-bo,DENG Qi,LI Yu-ming

(Department of Hematology,Tianjin First Central Hospital,Tianjin 300192,China)

Abstract:Objective To investigate the expression and clinical significance of programmed death molecule 1 ligand-1 (PD-L1) in acute myeloid leukemia (AML). Methods From January 2013 to December 2016, 49 patients with initial diagnosis of AML were enrolled in our hospital. The observation group was selected from 27 non-malignant diseases such as iron deficiency anemia and giants treated in our hospital. A young cell anemia was used as a control group. The levels of PD-L1 in the blood of the two groups were compared. The effects of gender, age, white blood cell count, and subtype on PD-L1 in the blood were analyzed to determine the correlation between PD-L1 expression and clinical efficacy. Results There was no significant difference in the expression of PD-L1 between the control group and the observation group ($P>0.05$). After treatment, the expression of PD-L1 in the observation group was higher than that in the control group,the statistical significance was significant ($P<0.01$). Univariate results showed that the expression level of PD-L1 in newly diagnosed patients with AML was not correlated with gender, age, number of newly diagnosed WBC, and type ($P>0.05$). The expression of PD-L1 was higher in patients without AML. Patients with AML were continuously relieved ($P<0.01$). Conclusion PD-L1 may be involved in the immune escape mechanism of AML and may be related to the progression of the disease and the therapeutic effect.

Key words:PD-L1;Acute myeloid leukemia;Immunity

程序性死亡分子 1 配体-1(programmed death 1 ligand 1,PD-L1),又名 B7 同源分子 1(B7 homologue 1,B7-H1)或 CD274,是 B7/CD28 共刺激分子家族的重要成员,这一免疫标记近年来因与肿瘤发生发展密切相关而成为研究热点。PD-L1 与程序性死亡分子 1(programmed death-1,PD-1)作为负性共刺激分子,两者结合后传递抑制性信号,降低淋巴细胞的免疫功能,削弱淋巴细胞的杀伤作用^[1]。研究表明^[2-4],许多肿瘤细胞高表达 PD-L1,如肺癌、肾癌、乳腺癌、肝癌、胃癌等,其可与肿瘤浸润淋巴细胞表面的 PD-1 结合,限制抗肿瘤免疫应答,参与肿瘤免疫逃逸。但之前的研究大多关注于实体肿瘤,少量研究表明在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia,AML)等恶性血液系统疾病中 PD-L1 也存在高表达^[2]。本研究检测急性髓系白血病患者的

PD-L1 的表达情况,探究其在急性髓系白血病中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1 月~2016 年 12 月天津市第一中心医院就诊,确诊为 AML 的初治患者 49 例为研究对象,作为观察组,排除急性早幼粒细胞白血病患者,所有患者均符合世界卫生组织(WHO)诊断分型标准^[5],其中 M2 8 例,M4 16 例,M5 25 例;男 26 例,女 23 例,年龄 15~82 岁,中位年龄 54 岁。选择同期在我院接受治疗的 27 例非恶性疾病如缺铁性贫血、巨幼细胞性贫血者作为对照组,男 13 例,女 14 例,年龄 15~83 岁,中位年龄 56 岁。两组患者性别、年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过本院伦理委员会批准,患者均已签署知情同意书并表示能够完成病例收集。

1.2 试剂与仪器 Ficoll 淋巴细胞分离液(天津川页生化制品有限公司);Trizol 试剂(Invitrogen,美国);DEPC、氯仿、异丙醇、无水乙醇(天津化学试剂公司);反转录试剂(Fermentas,美国);Realtime 试剂(Kapa,美国);荧光定量 PCR 仪(Roche,瑞士)。

基金项目:1.天津市卫生局科技基金攻关项目(编号:15KG135);2.天津市卫计委重点攻关项目(编号:16KG110)

作者简介:白雪(1979.3-),女,辽宁大连人,硕士,主治医师,主要从事血液病临床工作与白血病基础研究

通讯作者:邓琦(1972.3-),女,天津人,硕士,主任医师,主要从事血液肿瘤常规诊疗及生物免疫治疗

1.3 方法 选用荧光定量 PCR 对 PD-L1 进行监测,包括引物设计、RNA 提取、反转录和定量测定四个步骤。

1.3.1 引物设计 使用 Primer 5.0 软件设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物片段长度
PD-L1	F: 5'-CTTCTTATTATGCCTTGGTGTGCA-3' R: 5'-GGAATACGTCTCTCCAAATGTG-3'	139bp
β -actin	F: 5'-GGAACACACCTTCTACAATG-3' R: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'	163bp

1.3.1 骨髓单个核细胞的分离及 RNA 的提取 采集骨髓 2~5 ml, EDTA 抗凝, Ficoll 淋巴细胞分离液密度梯度离心法收集单个核细胞。Trizol 提取细胞总 RNA, 经紫外分光光度计测定浓度和纯度。

1.3.2 反转录 反转录反应体系为 Reverse Transcription 预混液 6 μ l, Total RNA 14 μ l, 反应总体积 20 μ l。反转录反应条件为: 25℃ 15 min, 55℃ 40 min, 85℃ 5 min。

1.3.3 实时荧光 SYBR Green 相对定量 PCR 将各模板 cDNA 在相同条件下进行相对定量 PCR, 反应体系为: 2 \times KAPA SYBR FAST Mix 7.5 μ l, Primer Mix (10 μ mol/L) 1 μ l, cDNA (10 ng) 1 μ l, DEPC H₂O 5.5 μ l, 反应总体积 15 μ l。实时荧光相对定量 PCR 扩增条件为: 先 95℃ 30 s, 后 95℃ 3 s, 60℃ 30 s 循环 40 次。数据由 LightCycler96 系统软件依样本荧光值自动计算得出样本中感兴趣的目标基因和内参基因的相对表达水平, 并将最终结果表示为这些基因的比例, 比例=目标(目的基因 PD-L1)浓度/参考(内参基因 β -actin)浓度。

1.4 观察指标 对比两组患者治疗前后的 PD-L1 表达水平, 对比分析不同性别、年龄、WBC、亚型的 AML 患者 PD-L1 表达水平, 以及不同疗效情况下的患者的 PD-L1 表达差异。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验, 计数资料以 (%) 表示, 采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计学意义显著。

2 结果

2.1 观察组临床疗效 观察组患者中, 9 例未接受化疗, 20 例经 1~2 次诱导化疗获得完全缓解, 并持续 1.5 年以上, 15 例经 2 次或以上诱导化疗未达到完全缓解, 5 例为诱导化疗缓解后再复发患者, 临床有效率为 40.82% (20/49)。

2.2 两组治疗前后 PD-L1 mRNA 表达比较 两组患者治疗前的 PD-L1 表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。治疗后, 观察组的 PD-L1 表达高于对照组, 统计学意义显著 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 两组治疗前后 PD-L1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

时间	对照组	观察组	t	P
治疗前	(4.93 \pm 0.11) $\times 10^{-5}$	(4.32 \pm 0.31) $\times 10^{-6}$	0.453	0.218
治疗后	(6.03 \pm 0.23) $\times 10^{-5}$	(2.43 \pm 0.18) $\times 10^{-4}$	-3.258	0.000

2.3 观察组 PD-L1 mRNA 表达的影响因素 观察组患者在初诊治疗前, 男性与女性 PD-L1 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 以年龄 60 岁为界, 观察组患者初诊治疗前 ≥ 60 岁和 < 60 岁的 PD-L1 表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 以白细胞计数 $30 \times 10^9/L$ 为界, 观察组患者初诊治疗前 $\geq 30 \times 10^9/L$ 和 $< 30 \times 10^9/L$ 的 PD-L1 表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在初诊治疗前各亚型患者 PD-L1 表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。初诊治疗前, 持续完全缓解、未缓解、复发患者的 PD-L1 表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中, 未缓解患者 PD-L1 表达水平高于持续完全缓解患者, 统计学意义显著 ($P < 0.01$), 见表 3。

3 讨论

随着诊断水平的提高, 化疗方案的不断改进、靶向药物以及造血干细胞移植等治疗手段的广泛应用, 血液系统恶性肿瘤的诊治水平得到了很大的提高, 使患者的预后有了较大改善, 但仍有部分患者因原发耐药或缓解后复发导致死亡。近几年发现, 多种肿瘤细胞表面高表达 PD-L1, 对 PD-L1 参与肿瘤免疫逃逸及利用 PD-L1 进行免疫治疗的相关研究已成为目前国内外肿瘤学研究的热点, 但之前的研究多关注于 PD-L1 在实体肿瘤中的表达及作用, PD-L1/PD-1 信号通路在实体肿瘤中的免疫负调控作用已得到广泛的证实, 而关于其在急性髓系白血病等血液系统恶性肿瘤中的表达及临床意义则报道较少。

AML 原始细胞抑制 T 细胞功能, 但这一途径的确切性质目前并不清楚, B7 家族分子可能是这种免疫抑制效应的原因之一。有文献报道小鼠 AML 模型中, 肿瘤的进展导致调节 T 细胞的增强和 CD8 细胞毒性 T 细胞上 PD-1 表达的增强, PD-1/PD-L1 相互作用促进调节 T 介导的对 T 效应细胞的抑制, 从而

表 3 观察组患者 PD-L1 mRNA 表达的影响因素

影响因素	n	PD-L1 表达水平	t	P
性别				
男	26	$(3.57 \pm 0.03) \times 10^{-4}$	-0.411	0.681
女	23	$(1.49 \pm 0.05) \times 10^{-4}$		
年龄				
≥60 岁	16	$(2.38 \pm 0.13) \times 10^{-4}$	-0.394	0.693
<60 岁	33	$(2.43 \pm 0.11) \times 10^{-4}$		
WBC				
≥30×10 ⁹ /L	13	$(4.91 \pm 0.21) \times 10^{-5}$	-1.495	0.135
<30×10 ⁹ /L	36	$(3.21 \pm 0.14) \times 10^{-4}$		
亚型				
M2	8	$(1.85 \pm 0.11) \times 10^{-4}$	1.578	0.454
M4	16	$(3.87 \pm 0.16) \times 10^{-4}$		
M5	25	$(2.43 \pm 0.17) \times 10^{-4}$		
临床疗效				
持续完全缓解	20	$(9.93 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	7.485	0.024
未缓解	15	$(1.25 \pm 0.16) \times 10^{-3}$		
复发	5	$(2.32 \pm 0.18) \times 10^{-4}$		

抑制抗肿瘤免疫应答^[7,8]。miRNA(miR)34a 可在肿瘤发生中调节关键基因的转录,Kasumi-1 细胞 miR-34a 过表达可抑制 PD-L1 的表达^[9],以上动物模型及细胞实验提示 PD-L1 可能在 AML 的免疫逃逸机制中也发挥作用,从而有可能与 AML 的治疗效果和预后相关。本次研究结果显示,观察组患者 PD-L1 表达水平高于对照组,未缓解患者初治时 PD-L1 表达水平最高,其次为复发患者,而持续完全缓解的患者表达水平最低,这与马红等^[10]研究结果一致,提示 PD-L1 表达水平可能与 AML 疗效相关,PD-L1 表达水平高者治疗更为困难,可能与化疗失败相关。另外,PD-L1 在初诊治疗前 AML 患者中的表达水平与患者性别、年龄、初诊 WBC 数、分型并无相关性,提示 PD-L1 可能是影响 AML 疗效的独立因素。

大量研究已表明,PD-L1/PD-1 信号通路在削弱抗肿瘤免疫应答方面发挥重要作用^[11-14],靶向这一途径的检查点治疗,如在多种实体瘤的挽救治疗中取得良好疗效的 PD-1 抗体 Nivolumab、Pembrolizumab 及 PD-L1 抗体 BMS-936559、MEDI4736 已取得突破性进展,其在恶性血液病中也逐渐崭露头角,有望联手化疗、造血干细胞移植等,成为未来急性髓系白血病等血液系统恶性肿瘤免疫治疗的新靶点。

参考文献:

- [1]王文超,汪宇,施乐华,等.PD-1/PD-L1 信号通路及其在肿瘤免疫治疗中的作用[J].第二军医大学学报,2017,38(9):1190-1195.
- [2]徐凡,蔡真.PD-1/PD-L1 抑制剂治疗急性髓细胞性白血病的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(6):634-639.
- [3]Xu F,Xu L,Wang Q,et al.Clinicopathological and prognostic value of programmed death ligand-1 (PD-L1) in renal cell carcinoma: a meta-analysis [J].Int J Clin Exp Med,2015,8(9):14595-14603.

- [4]Mazel M,Jacot W,Pantel K,et al.Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells [J].Mol Oncol,2015,9(9):1773-1782.
- [5]陈泽,蔡志梅,赵利东,等.BCL-2 与 PD-L1 联合检测在预测初治急性白血病患者预后中的价值分析[J].中国实验血液学杂志,2017,25(6):1636-1640.
- [6]Zheng ZX,Bu ZD,Liu XJ,et al.Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications[J].Chin J Cancer Res,2014,26(1):104-111.
- [7]李萌,董航,赵悦荣,等.sTRAIL 及 sPD-L1 在急性髓细胞白血病患者血清中的表达[J].黑龙江医药科学,2018,41(1):63-65.
- [8]李金花,庞楠楠,张正昊,等.PD-1/PD-L1 共刺激分子在慢性淋巴细胞白血病患者中的表达及临床意义[J].中华血液学杂志,2017,38(3):198.
- [9]Wang X,Li J,Dong K,et al.Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia [J].Cell Signal,2015,27(3):443-452.
- [10]马红,李宁.PD-L1 的表达与初发急性白血病患者临床特征及预后关系的研究 [J].中国实验血液学杂志,2016,24(4):1034-1038.
- [11]Madosky Rowdo FP,Baron A,Urrutia M,et al.Immunotherapy in cancer:a combat between tumors and the immune system:you win some, you lose some[J].Front Immunol,2015,26(6):127.
- [12]张占芳,张秋堂,邢海洲,等.PD-L1 在急性白血病中的表达及其临床意义[J].中国实验血液学杂志,2015,23(4):930-934.
- [13]Giri A,Walia SS,Gajra A.Clinical Trials Investigating Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer [J].Rev Recent Clin Trials,2016,11(4):297-305.
- [14]de Guillebon E,Roussille P,Frouin E.Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers [J].World J Gastrointest Oncol,2015,7(8):95-101.

收稿日期:2018-12-15;修回日期:2018-12-25

编辑/王海静