

·论 著·

宫颈癌组织中 PD-1、HIF-1 α 、TAM 表达变化及相关性研究

刘敏 刘学武 李子军 付晓瑛 徐仙凤 朱爽 周国平

[摘要] 目的 探讨宫颈癌组织中程序性死亡受体1(PD-1)、缺氧诱导因子(HIF)-1 α 、肿瘤相关的巨噬细胞(TAM)的表达变化以及相关性的研究。方法 采用免疫组织化学SP法检测PD-1、HIF-1 α 、TAM在正常宫颈组织24例、宫颈上皮内瘤变(CIN)组织30例、宫颈鳞状细胞癌组织42例中的表达情况,并分析其表达的相关性。结果 PD-1主要表达于宫颈癌组织中,在正常宫颈组织中不表达,PD-1和HIF-1 α 在宫颈癌组织中的阳性表达率明显高于CIN组织(χ^2 分别=38.04、19.56, P 均 <0.05),也明显高于正常宫颈组织($P<0.05$)。TAM在CIN组织中的表达明显高于正常宫颈组织和宫颈癌组织(χ^2 分别=30.59、12.32, P 均 <0.05)。PD-1、HIF-1 α 、TAM的阳性表达在宫颈癌患者不同分化程度、FIGO分期和淋巴结转移之间比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别=8.23、3.83、11.144、11.86、15.97、18.19、18.56、17.40、4.24, P 均 <0.05),在宫颈癌患者不同年龄、肿瘤直径之间比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.08、0.46、0.76、0.00、0.35、0.02, P 均 >0.05)。根据HR-HPV核酸定量拷贝数分为四组:低载量组($10^4\sim 10^5$ 拷贝/ml),中载量组($10^5\sim 10^6$ 拷贝/ml),高载量组($10^6\sim 10^7$ 拷贝/ml)和超高载量组($>10^7$ 拷贝/ml)。四组阳性率分别为7.14%(3/42)、11.91%(5/42)、26.19%(11/42)、47.62%(20/42)。PD-1、HIF-1 α 、TAM与HPV表达呈正相关(r 分别=0.89、0.88、0.90, P 均 <0.05)。结论 子宫颈癌组织中PD-1、HIF-1 α 、TAM呈高表达,并且其表达与肿瘤的发生和发展密切相关,阻断或抑制PD-1、HIF-1 α 、TAM的表达可能成为治疗宫颈癌的新方法。

[关键词] 宫颈癌; 程序性死亡受体-1; 缺氧诱导因子-1 α ; 肿瘤相关的巨噬细胞

Expressions of PD-1, HIF-1 α , and TAM in cervical cancer and their correlation with HPV LIU Min, LIU Xuewu, LI Zijun, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhejiang Quhua Hospital, Quzhou 324004, China.

[Abstract] Objective To investigate the expressions of programmed death receptor-1 (PD-1), hypoxia inducible factor (HIF) - 1 α and tumor associated macrophages (TAM) in cervical cancer, and to explore the correlation with HPV.

Methods The expressions of PD-1, HIF-1 α and TAM in 24 cases of normal cervical tissue, 30 cases of CIN (cervical intraepithelial neoplasia) and 42 cases of cervical squamous cell carcinoma were detected by immunohistochemical SP method, and their correlation with HPV was analyzed.

Results PD-1 was mainly expressed in cervical cancer tissues, but not in normal cervical tissues. The expressions of PD-1 and HIF-1 α in cervical cancer tissues were significantly higher than that in CIN ($\chi^2=38.04, 19.56, P<0.05$) and normal cervical tissues ($P<0.05$). The expression of TAM in CIN tissue was significantly higher than that in normal cervical tissue and cervical cancer tissue ($\chi^2=30.59, 12.32, P<0.05$). The differences in PD-1, HIF-1 α and TAM among different differentiation degree, FIGO stage and lymph node metastasis were statistically significant ($\chi^2=8.23, 3.83, 11.144, 11.86, 15.97, 18.19, 18.56, 17.40, 4.24, P<0.05$). The differences in PD-1, HIF-1 α and TAM among different age, tumor diameter, and tissue type were not statistically significant ($\chi^2=0.08, 0.46, 0.76, 0.00, 0.35, 0.02, P>0.05$). According to the quantitative copy number of HR-HPV nucleic acid, they were divided into four groups: low load group ($10^4\sim 10^5$ copies/ml), medium load group ($10^5\sim 10^6$ copies/ml), high load group ($10^6\sim 10^7$ copies/ml) and ultra-high load group ($>10^7$ copies/ml). The positive rates of the four groups were 7.14% (3/42), 11.91% (5/42), 26.19% (11/42) and 47.62% (20/42), re-

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.012.004

基金项目:衢州市科技项目(2018ASA90018)

作者单位:324004 浙江衢州,浙江衢化医院妇产科(刘敏、刘学武、李子军、付晓瑛、徐仙凤、周国平);浙江省龙游妇保院妇科(朱爽)

spectively. The PD-1, HIF-1 α and TAM were positively correlated with HPV expression ($r=0.89, 0.88, 0.90, P<0.05$).

Conclusion The PD-1, HIF-1 α , and TAM are highly expressed in human cervical carcinoma, and their expression are closely related to the occurrence and development of tumor. Blocking or inhibiting the expressions of PD-1, HIF-1 α and TAM maybe a new method for the treatment of cervical cancer.

[Key words] cervical cancer; programmed death receptor-1; hypoxia inducible factor-1 α ; tumor associated macrophages

宫颈癌是女性生殖系统中恶性肿瘤之一,近年来患者年龄呈现出年轻化的趋势^[1]。有研究表明,在宫颈癌的发生、发展过程中程序性死亡受体1(programmed death receptor-1, PD-1)通路可能发挥着某种至关重要的作用^[2]。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α 是重要的缺氧标志物之一,与肿瘤发展过程密切相关^[3]。肿瘤相关的巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAM)是宫颈癌微环境中含量最多的免疫群体,与肿瘤的进展、转移和不良预后密切相关^[4,5]。本次研究通过检测PD-1、HIF-1 α 、TAM在宫颈癌组织中的表达情况,研究三者与宫颈癌发生发展的关系,旨在为宫颈癌的诊断及治疗提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年3月至2019年12月在浙江衢化医院病理科存档的宫颈组织石蜡标本共96例,其中子宫良性病变的患者手术切除后的正常宫颈组织24例、宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)组织30例、宫颈癌组织42例。患者年龄30~65岁,平均年龄(42.43 $\pm$ 3.61)岁。宫颈癌和CIN组织纳入标准为:①临床资料完整;②病理明确诊断;③术前未接受过放、化疗。对照组纳入标准为术前宫颈薄层液基细胞学检查及术后宫颈的病理检查均未见非典型鳞状细胞或者癌细胞。三组排除标准:①术前3个月内曾进行宫颈治疗;②患者为妊娠状态;③合并其他妇科恶性肿瘤;④合并其他脏器肿瘤。

1.2 方法 所有组织4 μ m厚连续切片,按照常规方法脱蜡至水并且用微波来修复抗原。采用免疫组织化学SP法进行检测,流程按照试剂说明书进行操作。对一抗PD(由英国 Abcam 公司产品)稀释50倍、HIF-1 α (由英国 Abcam 公司产品)稀释100倍以及CD68(由福州迈新生物技术开发有限公司生产)稀释150倍做为单克隆抗体放于4 $^{\circ}$ C环境下对切片进行孵育过夜。然后使用生物素标记的二抗工作液对其进行在室温下孵育30 min。之后对切片使用DAB显色,并使用苏木精对其进行轻度复染。并且

用磷酸盐缓冲液代替一抗作为空白对照组,采用抑制蛋白表达为阳性的结肠癌组织石蜡切片做为阳性对照。

1.3 结果统计 在每张切片中选取癌细胞数目较多的5个高倍视野($\times 400$),在每个视野中计数100个细胞。染色强度:没有着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色或者黑色为3分;阳性细胞百分比:没有阳性细胞为0分,阳性细胞 $<25\%$ 为1分,阳性细胞数在25%~50%之间为2分,阳性细胞数 $>50\%$ 为3分。将每张切片所得的染色强度与阳性细胞百分比相乘,结果0~1分为阴性, ≥ 2 分为阳性。

1.4 人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)检测 采用第二代交叉捕获实验测定HPV-DNA水平,详细操作严格按照仪器和试剂盒的使用说明书的步骤执行。检测结果依据HPV-DNA水平分为阳性和阴性,其中HPV-DNA ≥ 1.0 pg/ml为阳性(+),HPV-DNA < 1.0 pg/ml为阴性(-)。

1.5 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行分析。计数资料比较采用 χ^2 检验和fisher确切概率法,相关性分析采用Spearman相关分析。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同宫颈组织中PD-1、HIF-1 α 和TAM阳性表达比较见表1

表1 不同宫颈组织中的PD-1、HIF-1 α 、TAM阳性表达例(%)

组别	n	PD-1	HIF-1 α	TAM
宫颈癌	42	32(76.19)*#	34(80.95)*#	24(57.14)
CIN	30	9(30.00)	12(40.00)	21(70.00) [#] Δ
正常宫颈	24	0	2(8.33)	1(4.17)

注: *:与CIN组织比较, $P<0.05$; #:与正常宫颈组织比较, $P<0.05$; Δ :与宫颈癌组织比较, $P<0.05$ 。

由表1可见,PD-1主要表达于宫颈癌组织中,在正常宫颈组织中不表达,PD-1和HIF-1 α 在宫颈癌组织中的阳性表达率明显高于CIN组织(χ^2 分别=38.04、19.56, P 均 <0.05),也明显高于正常宫颈组

组织($P<0.05$)。TAM在CIN组织中的表达明显高于正常宫颈组织和宫颈癌组织(χ^2 分别=30.59、12.32, P 均 <0.05)。

2.2 PD-1、HIF-1 α 、TAM在宫颈癌组织中的阳性表达与临床病理特征的关系见表2

表2 PD-1、HIF-1 α 、TAM在宫颈癌组织中的阳性表达与临床病理特征的关系

临床资料	<i>n</i>	PD-1	HIF-1 α	TAM
年龄				
<46岁	34	24(70.59)	23(67.65)	26(76.47)
≥46岁	8	6(75.00)	6(75.00)	7(87.50)
肿瘤直径				
<4cm	32	24(75.00)	14(43.75)	14(43.75)
≥4cm	10	7(70.00)	4(40.00)	4(40.00)
分化程度				
低分化	40	36(90.00)	33(82.50)	36(90.00)
中高分化	2	1(50.00)	1(50.00)	1(50.00)
FIGO分期				
I期	22	12(54.54)	10(45.45)	14(63.64)
II期	20	17(85.00)	16(80.00)	19(95.00)
淋巴结转移				
无	30	13(43.33)	14(46.67)	19(63.33)
有	12	10(83.33)	11(91.67)	10(83.33)

由表2可见,PD-1、HIF-1 α 、TAM的阳性表达在宫颈癌患者不同分化程度、FIGO分期和淋巴结转移之间比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别=8.23、3.83、11.14、11.86、15.97、18.19、18.56、17.40、4.24, P 均 <0.05),在宫颈癌患者不同年龄、肿瘤直径之间比较,差异均无统计学意义(χ^2 分别=0.08、0.46、0.76、0.00、0.35、0.02, P 均 >0.05)。

2.3 宫颈癌与PD-1、HIF-1 α 、TAM相关性分析 对宫颈癌患者进行HPV检测,阳性率为92.86%(39/42),根据HR-HPV核酸定量拷贝数分为四组:低载量组($10^4\sim 10^5$ 拷贝/ml),中载量组($10^5\sim 10^6$ 拷贝/ml),高载量组($10^6\sim 10^7$ 拷贝/ml)和超高载量组($>10^7$ 拷贝/ml)。四组阳性率分别为7.14%(3/42)、11.91%(5/42)、26.19%(11/42)、47.62%(20/42)。以HPV是否阳性表达为因变量,PD-1、HIF-1 α 、TAM与HPV表达呈正相关(r 分别=0.89、0.88、0.90, P 均 <0.05)。

3 讨论

宫颈腺癌是宫颈第二多见的恶性肿瘤。早期的宫颈癌患者可以进行手术治疗,但是对于晚期和复发的宫颈癌患者,手术治疗具有一定的局限性,传统放、化疗的毒副作用影响太大,所以寻求新的治疗方式具有重要意义。本次研究旨在探求PD-1、HIF-1 α 、TAM与宫颈癌的表达关系,旨在为宫颈癌

的治疗能够提供新策略。

肿瘤组织的淋巴细胞,特别是T淋巴细胞中都可以检测出来PD-1蛋白的表达^[6]。在人类的多种类型细胞中PD-1都有表达,其中包括T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、活化的单核细胞、树突状细胞等^[7,8]。本次研究中,结果显示PD-1在宫颈癌组织中的阳性表达率高达76.19%,在正常宫颈组织中不表达,并且在宫颈CIN及宫颈癌组织中的表达率呈现逐渐升高的趋势,同时宫颈癌患者中PD-1表达与癌细胞的分化程度和FIGO分期有关,低分化癌细胞的宫颈癌组织中PD-1表达水平远远高于中-高分化的癌细胞(P 均 <0.05),提示在宫颈癌从早期到晚期的发展过程中,癌细胞逐渐增多,导致T细胞的功能受到抑制,进而发生免疫功能减弱甚至丧失的情况,最终导致癌细胞得以逃脱。

HIF-1 α 蛋白是肿瘤内细胞缺氧调节基因的表观调控中心已经被证实,在低氧微环境下,它能够成为肿瘤细胞提供所需要的空间和营养物质^[9-11]。本次研究发现,HIF-1 α 在宫颈癌中的阳性表达率为80.95%,明显高于正常宫颈组织和CIN组织(P 均 <0.05),由此可见,HIF-1 α 表达水平的增加,会增加患宫颈癌的风险。同时,HIF-1 α 蛋白的表达与宫颈癌的分化程度、FIGO分期、淋巴结转移有关系,与肿瘤直径等因素无关,证明HIF-1 α 在宫颈癌的发生发展中起着一定的作用。

在宫颈癌病变中发现,TAM与CIN的发展密切相关^[12]。研究发现,宫颈病变基质中TAM数量高于上皮,但是伴随着宫颈病变进展,这种差距在逐渐减少^[13-15],说明TAM由基质在向上皮浸润,提示着TAM在宫颈癌发展中具有重要作用。本次研究结果显示,TAM在CIN组织中的阳性表达率明显高于其他两组(P 均 <0.05),在CIN组的阳性表达率为70.00%,由此认为TAM可作为CIN进展的预测因子。并与宫颈癌FIGO分期、分化程度等呈明显的正相关。TAM在宫颈病变组织中高水平表达,在宫颈病变的发生发展、浸润和转移发挥着作用,证明TAM的表达及其伴随的炎症反应微环境的改变也可能参与宫颈癌病变的发生和发展。

综上所述,PD-1、HIF-1 α 和TAM蛋白与宫颈癌的发生和发展密切相关,三者共同作用于肿瘤的生长、浸润和转移。在治疗中,对宫颈癌患者进行联合检测PD-1、HIF-1 α 和TAM则有助于指导临床治疗、评估预后,同时也可能为宫颈癌的靶向治疗提

供相应的理论基础。本次研究也存在一定的不足之处,样本量有限且均取自本院患者,存在一定的选择性误差,可能导致研究结果有一定的偏差,此后可扩大样本量进行相关研究。

参考文献

- 1 王欣,杨永秀.宫颈癌患者合并多原发恶性肿瘤一例并文献复习[J].国际妇产科学杂志,2019,47(4):478-480.
- 2 Sandra T, Anmt VN, Eline N, et al. PRIMMO study protocol: a phase II study combining PD-1 blockade, radiation and immunomodulation to tackle cervical and uterine cancer[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 247-258.
- 3 周文芳,徐方云.缺氧诱导因子-1与肿瘤关系的研究进展[J].南昌大学学报:医学版,2017,57(3):87-90.
- 4 Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer[J]. Cancer Cell, 2015, 27(4): 462-72.
- 5 Franklin RA, Liao W, Sarkar A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages[J]. Science, 2014, 344(6186): 921-925.
- 6 Liu YC, Wu L, Tong RZ, et al. PD-1/PD-L1 inhibitors in cervical cancer[J]. Frontiers in pharmacology, 2019, 10(4): 25-26.
- 7 Heeren AM, Rotman J, Stam AGM, et al. Efficacy of PD-1 blockade in cervical cancer is related to a CD⁸⁺ FoxP3+CD²⁵⁺ T-cell subset with operational effector functions despite high immune checkpoint levels[J]. JTC, 2019, 7(1): 56-57.
- 8 Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-molnar E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(1): 24-25.
- 9 殷林林,舒丽莎.PD-L1/PD-1通路在宫颈癌中的研究进展[J].医学研究杂志,2018,47(7):16-20.
- 10 孙小英,李敬芳.缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子在宫颈鳞状细胞癌患者中的表达及相关性分析[J].河南医学研究,2018,27(21):3885-3886.
- 11 彭辉,肖仁斌,王江涛,等.Keap1/Nrf2/HIF-1 α 通路在宫颈癌中的表达及临床意义研究[J].中国当代医药,2019,26(9):251-254.
- 12 Li XS, Wu SD, Li DC, et al. Intravoxel incoherent motion combined with dynamic contrast-enhanced perfusion MRI of early cervical carcinoma: correlations between multimodal parameters and HIF-1 α expression[J]. J Magn Reson Imaging, 2019, 50(3): 578-584.
- 13 Chen XJ, Wu S, Yan RM, et al. The role of the hypoxia-Nrp-1 axis in the activation of M2-like tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of cervical cancer[J]. Molecular Carcinogenesis, 2019, 58(3): 388-397.
- 14 Meyer HJ, Gundermann P, Höhn AK, et al. Associations between whole tumor histogram analysis parameters derived from ADC maps and expression of EGFR, VEGF, HIF-1 α , Her-2 and Histone 3 in uterine cervical cancer[J]. MRI, 2018, 64(10): 68-74.
- 15 Li N, Meng DD, Gao L, et al. Overexpression of HOTAIR leads to radioresistance of human cervical cancer via promoting HIF-1 α expression[J]. Radiat Oncol, 2018, 13(1): 34-36.

(收稿日期 2020-02-14)

(本文编辑 蔡华波)