

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.04.009

· 临床研究 ·

CD39 在头颈部鳞状细胞癌组织中的表达及其预后价值

王学周, 周莉, 李百会, 胡雪, 董瑞峰, 张新伟(天津医科大学肿瘤医院 生物技术研究室 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室 天津市“肿瘤防治”重点实验室 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

[摘要] **目的:** 检测 CD39 在头颈鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)组织中的表达, 分析其表达与患者临床病理特征的关系及其预后意义。**方法:** 选用 2012 年 5 月至 2013 年 12 月在天津市肿瘤医院接受外科手术的 85 例 HNSCC 患者的组织标本及病例资料, Oncomine 数据库获取的基因芯片, 以及 HNSCC 细胞系 SCC15、UM1 和 Cal25。在线分析 CD39 在 HNSCC 组织与正常颊黏膜组织转录水平的差异性, 用 Western blotting 和免疫组化法检测 HNSCC 组织中 CD39 蛋白的表达。采用 Spearman's 检验分析 HNSCC 组织中 CD39 的表达与患者临床病理特征的相关性, Kaplan-Meier 曲线法和 Log rank 检验分析 HNSCC 组织 CD39 表达与生存的关系, Cox 风险比例回归模型评价 CD39 表达与复发风险的关系。**结果:** CD39 在 HNSCC 组织的转录水平显著高于正常颊黏膜组织($P < 0.01$), 其在 HNSCC 细胞 Cal25、SCC-15 和 UM1 中均有表达, UM1 细胞中 CD39 的表达呈地塞米松(dexamethasone, DXM)剂量依赖性。CD39 高表达患者 53(62.4%)例, 其高表达与术前化疗正相关($r = 0.234$, $P < 0.05$), CD39 高表达患者的无复发生存期较低表达组显著缩短($P < 0.05$), CD39 高表达是 HNSCC 复发的独立风险因素($HR = 2.328$, $95\%CI = 1.091 \sim 4.967$; $P < 0.05$)。**结论:** CD39 在 HNSCC 中呈 DXM 诱导性表达和组成性表达, 其在癌组织中过表达是 HNSCC 患者不良预后的独立预测因子, 提示其在 HNSCC 进展过程中可能发挥重要作用。

[关键词] 头颈鳞状细胞癌; UM1 细胞; CD39; 术前化疗; 地塞米松; 预后

[中图分类号] R739.5; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)04-0396-07

Expression of CD39 in head and neck squamous cell carcinoma tissues and its prognostic value

WANG Xuezhou, ZHOU Li, LI Baihui, HU Xue, DONG Ruifeng, ZHANG Xinwei (Biotechnology Lab, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy of Tianjin City, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin City, Tianjin Clinical Research Center for Malignant Cancer, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of CD39 in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tissues, and to analyze its correlation with patients' clinicopathological features and its prognostic significance. **Methods:** Tissue specimens and case data of 85 patients with HNSCC underwent surgery at Cancer Hospital of Tianjin from May 2012 to December 2013 were collected for this study. Gene chips were obtained from Oncomine database, and HNSCC cell lines SCC15, UM1, and Cal25 were selected for this study. Online analysis was performed to compare the differential expression of CD39 in buccal mucosa (BM) tissues and HNSCC tissues, Western blotting and Immunohistochemistry (IHC) were used to detect the protein expression of CD39 in HNSCC tissues. Spearman's correlation analysis was used to study the correlation between the expressions of CD39 and clinicopathological features of HNSCC patients. Both Kaplan-Meier curve analysis and Log rank test were used to analyze the association between the expression of CD39 in HNSCC tissues and the survival of patients, and Cox risk proportional regression model was used to evaluate the relationship between CD39 expression and the risk of relapse. **Results:** The transcription level of CD39 was obviously up-regulated in HNSCC tissues than in BM tissues ($P < 0.01$), and CD39 expression was detected in HNSCC cell lines SCC15, UM1 and Cal25. Dexamethasone (DXM)

[基金项目] 国家科技支撑计划资助项目(No.2015BAI12B00);天津市卫生行业重点攻关项目(No. 15KG145)。Project supported by the National Key Scientific and Technological Project of China (No. 2015BAI12B12), and the Key Projects of Tianjin Health Industry (No. 15KG145)

[作者简介] 王学周(1985-),男,硕士,医师,主要从事恶性肿瘤临床治疗与基础研究, E-mail: 549742405@qq.com

[通信作者] 张新伟(ZHANG Xinwei, corresponding author),博士,教授、主任医师,硕士生导师,主要从事恶性肿瘤临床治疗与基础研究, E-mail: zhangxinwei@tjmuch.com

could enhance the expression of CD39 in UM1 cells in dose-dependent manner. CD39 was highly expressed in 53 (62.4%) HNSCC patients, which was positively correlated with preoperative chemotherapy ($r=0.234$, $P<0.05$). The recurrence-free survival (RFS) of patients with high CD39 expression was significantly shortened ($P<0.05$), and high CD39 expression was an independent relapse risk factor ($HR=2.328$, $95\%CI=1.091-4.967$; $P<0.05$) for patients with HNSCC. **Conclusion:** CD39 is DXM-inducively and constitutively expressed in HNSCC. And over-expression of CD39 is an independent predictor of poor prognosis in HNSCC patients, indicating its important role in the progression of HNSCC.

[Key words] head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC); UM1 cell; CD39; preoperative chemotherapy (PC); dexamethasone (DXM), prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(4): 396-402. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.04.009]

CD39 (ENTPD1) 是水解 ATP 生成腺苷的限速酶, 其广泛表达在内皮细胞、淋巴细胞、上皮细胞、间质细胞和肿瘤细胞等, 并在机体的生理和病理过程中发挥重要功能^[1-2]。虽然腺苷在机体具有重要的生理功能, 但是肿瘤能够赋予腺苷刺激肿瘤细胞自身增殖以及减弱机体抗肿瘤免疫力的功能^[3]。研究^[2,4-5]表明, CD39 是一种新的免疫检查点抑制剂靶点。抗 CD39 治疗可逆转肿瘤细胞对 T 细胞增殖的抑制作用, 增强细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxicity T lymphocyte, CTL) 和 NK 细胞介导的细胞毒性作用^[4]。一项临床前研究^[6]表明, 抗 CD39 单克隆抗体能够阻断 ATP 水解生成免疫抑制性腺苷, 能够刺激树突状细胞 (dendritic cell, DC)、巨噬细胞 (macrophage, M) 和恢复 T 细胞的活化状态, 从而产生抗肿瘤免疫。近来另有一些研究^[7-9]表明, CD39 在 CD8⁺T 细胞及 Foxp3⁺T 细胞均有表达, 其与不同的 T 细胞表面标志物的结合能够鉴别不同功能的 T 细胞亚群。然而, 目前尚不清楚 CD39 在头颈鳞状细胞癌 (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) 表达的临床特征及意义。为此, 本研究通过分析 CD39 在 HNSCC 组织和正常颊黏膜 (buccal mucosa, BM) 组织中转录水平的差异性, 检测其在 HNSCC 组织样本和多种细胞系表达水平, 进一步探讨其表达水平与患者临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床病理标本 收集天津市肿瘤医院 2012 年 5 月至 2013 年 12 月接受外科根治术的 HNSCC 患者病例资料及手术标本, 并随访至 2018 年 12 月。病例纳入标准: (1) 年龄 18~80 岁; (2) 无远处转移; (3) 手术切缘镜下阴性; (4) 诊断确切; (5) 病例信息完备。病例排除标准: (1) 术前接受放疗者; (2) 合并第二原发性肿瘤者; (3) 失访者。共收集到符合要求的研究对象 85 例, 其中男性 67 例、女性 18 例; 在 60 个月的随访期内, 其中复发例数为 36 (42.4%), 死亡例数为 34 (40.0%)。肿瘤病理分期采用第 7 版美国癌症联合会 (AJCC) 分期系统进行评估。无复发生存 (recurrence-free survival,

RFS) 为主要观察终点, 总生存期 (overall survival, OS) 为次要观察终点。

1.1.2 HNSCC 基因芯片 通过在线访问 Oncomine 数据库 (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) 在 GINOS 等^[10] 先前发布的基因芯片 (Affymetrix U133A) 对 CD39 的检测结果进行分析, 比较 CD39 在 13 例 BM 组织和 41 例 HNSCC 组织中转录水平的差异性。

1.2 细胞系及主要试剂

HNSCC 细胞系 SCC15、UM1 和 Cal25 由天津医科大学肿瘤医院公共实验室提供, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (Gibco) 和 DMEM (Gibco) 分别在 10 cm 直径培养皿中培养 24 h 后传代。CD39 鼠单克隆抗体 (clone: IMG 17B5F11) 购自 Abcam 公司。

1.3 Western blotting (WB) 检测 HNSCC 细胞系中 CD39 蛋白的表达

6 孔板每孔铺 5×10^5 个对数期上述肿瘤细胞, 加入 1 ml 上述培养基, 待肿瘤细胞贴壁后加入地塞米松 (dexamethasone, DXM) 并调平培养基至 2 ml/孔, 对照组培养基中 DXM 浓度为 0 nmol/L, 实验组培养基中 DXM 浓度分别为 1×10^3 nmol/L 和 1×10^4 nmol/L, 培养 24 h 后收样提取总蛋白。对上述所提取的蛋白进行浓度测量和上样量计算, 剩余样品按照上样量计算要求加入上样缓冲液, 混匀后立即行 95 °C 金属浴 10 min, 冰上冷却后上样。按照 DXM 浓度由低到高的处理组顺序选择居中孔道上样, 以 80 V 电压进行电泳, 边电泳边观察, 待样品压齐后, 电压调至 120 V 继续进行 PAEG-PAGE、转膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 加入 CD39 (1:2 000) 一抗和 GAPDH 于 4 °C 冰箱过夜孵育。次日, 用 TPST 洗膜液快速 (7 min/次) 洗膜后, 分别加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠和抗兔二抗 (1:5 000), 室温下孵育 1 h 后, 洗膜后加入化学发光显影液曝光。以 GAPDH 为内参, 比较各组 CD39 蛋白的表达量。

1.4 免疫组化检测 HNSCC 组织中 CD39 蛋白的表达 4 μm 石蜡包埋组织切片 70 °C 烤箱烘烤 1 h 后,

常规脱蜡,去离子水中浸泡复水 15 min,枸橼酸盐 (pH=6.0)高压热修复 3 min,缓慢冷却后 H₂O₂ 封闭 20 min,5%胎牛血清封闭 1 h,加入 CD39 抗体(1:400)置于 4 °C 冰箱过夜孵育。次日,采用即用型二抗试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)先行一抗增强孵育 30 min,再行抗鼠兔二抗孵育 30 min。以上每步操作均用 PBS 清洗 3 次,每次洗 5 min。DAB 显色 40 s 立即用蒸馏水终止显色反应,苏木精复染 3 min,盐酸酒精分化 8 s,氨水返蓝 3 min,脱水、封片和晾片。

结果评估:由 2 名专业实验技术人员独立评估每张染色切片的 CD39 表达水平。鉴于 HNSCC 组织中 CD39 表达的免疫反应评分 (immune response score, IRS) 目前没有公开发布的免疫组化标准,本研究采用阳性细胞分布比例和染色强度积分法对 CD39 表达水平进行半定量评分。阳性细胞比例:0,0 分;≤33%, 1 分;>33%~66%, 2 分;>66%, 3 分。染色强度:阴性, 0 分;弱阳性, 1 分;中度阳性, 2 分;强阳性, 3 分。IRS 为阳性细胞比例和染色强度积分的总和,理论评分范围为 0~12,定义 IRS≤6 为 CD39 低表达或 CD39^{low}, IRS≥7 为 CD39 高表达或 CD39^{high}。

1.5 统计学处理

采用 SPSS22 统计学软件进行统计分析。用 Spearman's 相关性分析研究 HNSCC 组织 CD39 的表达水平与临床病理特征之间的相关性, Mann-Whitney 检验比较 CD39 在接受术前化疗 (preoperative chemotherapy, PC) 和未接受 PC 两组之间表达水平的差异,卡方检验比较 CD39 高、低表达个案数在 PC 和非 PC 两组之间分布的差异。通过绘制 Kaplan-Meier 曲线和采用 Log rank 检验分析 HNSCC 组织 CD39 表达水平与患者预后的关系,单因素和多因素 Cox 风险比例回归模型评价 CD39 表达水平与患者复发和死亡风险的关系。以 P<0.05 或 P<0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HNSCC 患者的一般临床病理特征

在 85 例 HNSCC 患者中,肿瘤深度和范围(以下简称大小)局限在 T1 期的 35(41.2%)例,超出 T1 期的 50(58.5%)例;未发生淋巴结转移的 59(69.4%)例,发生淋巴结转移的 26(30.6%)例;TNM 病理分期为 I 期 31(36.5%)例,大于 I 期 54(63.5%)例;下咽癌 9(10.6%)例,非下咽部癌 76(89.4%)例;接受 PC 的 54(63.5%)例,未接受 PC 的 31(36.5%)例。见表 1。

2.2 CD39 在 HNSCC 组织和细胞系中的表达

通过对 GINOS 等^[10] 先前发布的基因芯片 (Affymetrix U133A) 检测结果进行分析后,发现

CD39 在 HNSCC 组织的转录水平显著高于其在 BM 组织的转录水平(倍数: 1.618, P<0.01; 图 1A)。WB 实验结果(图 1B)发现, CD39 在 Cal25、SCC-15 和 UM1 细胞中均有蛋白水平的表达。

免疫组化染色结果(图 2)显示, CD39 在 HNSCC 组织中广泛表达,主要在细胞膜和细胞质中染色,强弱不等,呈淡黄色至棕褐色。85 例 HNSCC 患者中, CD39 蛋白高表达 53(62.4%)例,低表达 32(37.6%)例(表 1)。

表 1 HNSCC 患者的临床病理特征

Tab.1 Clinicopathological features of HNSCC patients

Clinicopathological feature (n1 vs n2)	n1 (%)	n2 (%)
Depth & extent (T1 vs T2-T4)	35 (41.2)	50 (58.8)
LM (N0 vs N1-N3)	59 (69.4)	26 (30.6)
TNM stage (I vs II-IV)	31 (36.5)	54 (63.5)
Sites (Non vs Hypopharynx)	76 (89.4)	9 (10.6)
Mixed PDC (No vs Yes)	61 (71.8)	21 (24.7)
Age (<60 vs ≥60 years)	51 (60.0)	34 (40.0)
Gender (Male vs Female)	18 (21.2)	67 (78.8)
PC (No vs Yes)	31 (36.5)	54 (63.5)
Smoking index (<400 vs ≥400)	36 (42.4)	49 (57.6)
Drinking (No & Mild vs Constant)	49 (57.6)	36 (42.2)
CD39-IRS (Low vs High)	32 (37.6)	53 (62.4)

LM: Lymphatic node metastasis;

PC: Preoperative chemotherapy

2.3 CD39 表达水平与临床病理特征的相关性

Spearman's 相关性分析结果(图 3)显示,在 HNSCC 组织 CD39 的表达水平与患者接受 PC 呈显著正相关(r=0.234, P<0.05),而与肿瘤的大小、淋巴结转移、TNM 病理分期、混合低分化成份、原发肿瘤的部位、患者的年龄、性别、吸烟指数和饮酒史均无显著相关性(均 P>0.05)。

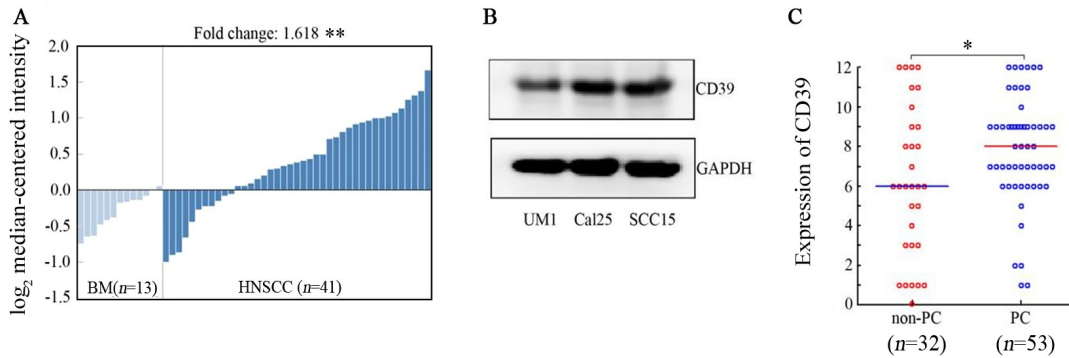
2.4 CD39 表达对 HNSCC 患者生存和预后的影响

通过绘制 Kaplan-Meier 曲线及 Log rank 检验进行生存分析(图 4)显示, CD39 高表达组 HNSCC 患者的 RFS 较低表达组显著缩短(P<0.05),但是两组间 OS 差异无统计学意义(P>0.05)。

单因素 Cox 风险比例回归模型(表 2)显示,肿瘤的大小(HR=3.438, 95%CI=1.546~7.558; P<0.01)、淋巴结转移(HR=4.021, 95%CI=2.077~7.784; P<0.01)、TNM 病理分期(HR=2.682, 95%CI=1.221~5.891; P<0.05)、下咽部位(HR=3.395, 95%CI=1.529~7.539; P<0.01)、混合低分化成份(HR=2.088, 95%CI=1.036~4.207; P<0.05)和 CD39 表达(HR=2.174, 95%CI=

1.020~4.619; $P < 0.01$)均是影响HNSCC复发的危险因素。多因素Cox模型结果(表2)显示,CD39高表达($HR=2.328$, $95\%CI=1.091\sim 4.967$; $P < 0.05$)、肿瘤大小($HR=2.554$, $95\%CI=1.118\sim 5.381$; $P < 0.05$)和淋巴结

转移($HR=3.115$, $95\%CI=1.560\sim 6.222$; $P < 0.01$)均可作为影响HNSCC患者复发的独立预后因素。单因素和多因素Cox模型(数据未给)均显示,CD39表达水平不是影响HNSCC患者OS的独立因素(均 $P > 0.05$)。

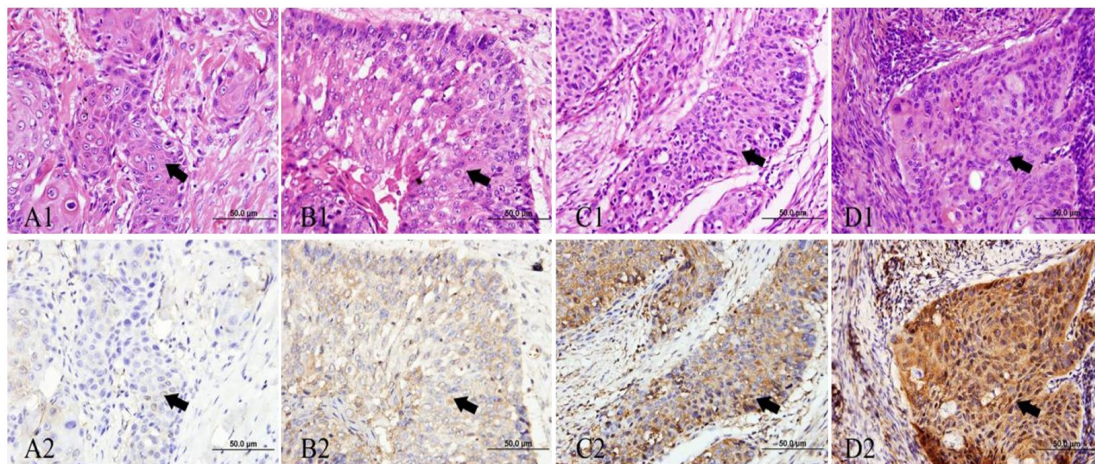


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: On-line analysis of differential transcription level of CD39 in BM tissues and in HNSCC tissues with Oncomine database; B: WB detected the expression of CD39 in HNSCC cell lines UM1, Cal25 and SCC15; C: Differential expression of CD39 in PC group and non-PC group

图1 CD39在HNSCC组织中的表达

Fig.1 The expression of CD39 in HNSCC tissues



Arrows indicate HNSCC tissues

A1, B1, C1 and D1 were H-E staining of cancer tissues for 4 patients with HNSCC, and the corresponding IHC staining were A2 (negative), B2 (weakly positive), C2 (moderately positive) and D2 (strongly positive), respectively

图2 HNSCC组织中CD39的表达($\times 400$)

Fig. 2 Expression of CD39 in HNSCC tissues ($\times 400$)

2.5 HNSCC患者CD39表达上调的影响因素

如图1C所示,接受PC组HNSCC患者CD39表达水平显著高于未接受PC组($P < 0.05$)。进一步分析(图3、图5A)发现,CD39低表达组32例HNSCC患者,其中14例(43.7%)接受PC、18例(56.3%)未接受PC;而CD39高表达组53例HNSCC患者,其中40例(75.5%)接受PC、13例(24.5%)未接受PC;CD39高、低表达个案数在PC和非PC两组间的分布差异有统计学意义($\chi^2=8.67$, $P < 0.01$)。体外梯度浓度DXM刺

激实验(图5B)发现,UM1细胞在 1×10^4 nmol/L的DXM作用下,其CD39蛋白的表达明显增多。

3 讨论

HNSCC是全球常见的恶性实体肿瘤,每年发病大约为60万例,其主要根治方法为外科手术和放射治疗,但即使切缘阴性仍有很高的复发率^[11-13]。几项III期临床试验^[14-15]结果表明,多西紫杉醇(docetaxel, TAX)、顺铂(cis-platinum, DDP)、5-氟尿嘧啶(5-fluo-

ouracil, 5-FU)联合方案(TPF 方案)用于 HNSCC 患者诱导化疗能够显著改善患者的生存,从而 TPF 方案被推荐应用于有选择性 HNSCC 患者的 PC。糖皮质激素是化疗常用的一种辅助用药,特别是在含有多西他赛等紫杉类的方案中,如 TPF 方案,DXM 可以用于预防过敏反应、恶心和呕吐^[16-17]。然而,DXM 等糖皮质激素的应用也会产生诸多不良反应,如高血压、骨质疏松、高血糖、消化性溃疡、失眠等。既往有研究^[18-19]表明,DXM 能够增加体内和体外的 cAMP 水平。近来又有研究^[20-21]表明,cAMP 能够促进 CD39 的表达。目前有关 CD39 在肿瘤学的研究,主要集中在

抗肿瘤免疫治疗方面,CD39 与 CD73 共同水解 ATP 产生小分子腺苷,腺苷与 T 淋巴细胞和 NK 细胞的腺苷受体结合会显著增加抗肿瘤免疫抑制作用,从而促进肿瘤免疫逃逸,这就是 CD39 的表达与肿瘤进展之间联系的免疫学机制^[1-5]。现针对这一免疫逃逸机制设计的 CD39 靶向抗体已经开发出来并在临床前试验中取得了良好的抗肿瘤治疗效果^[6]。但是 CD39 免疫组化单指标作为实体瘤预后预测因子的研究尚不多见,并且 CD39 在肿瘤细胞表达的影响因素目前也很少有所发现。

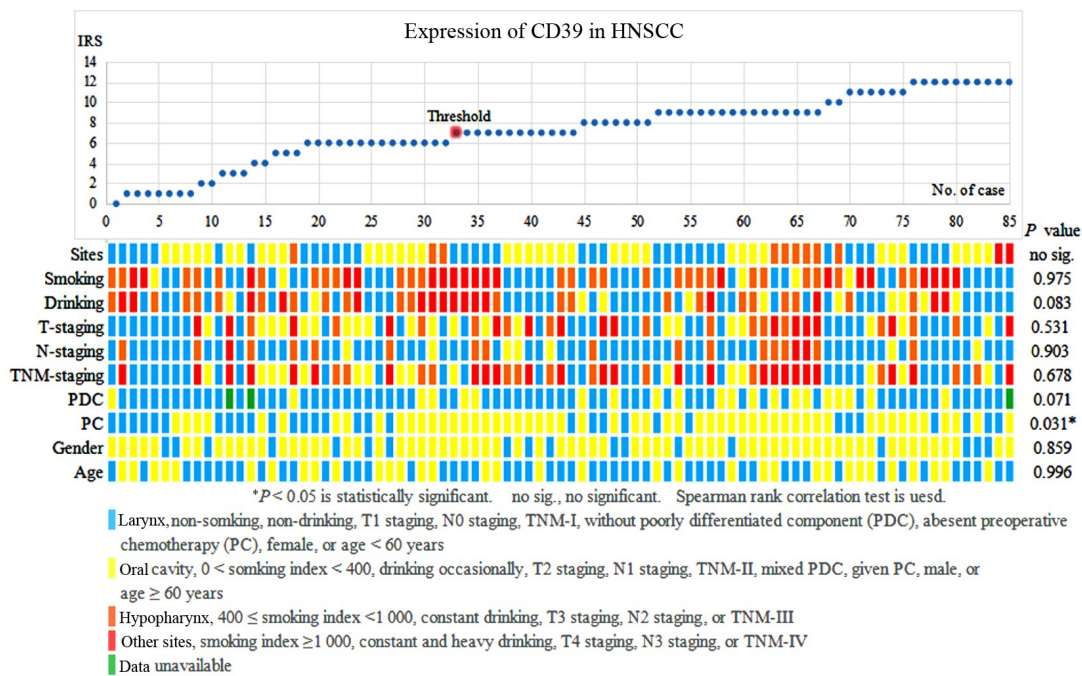


图3 CD39 表达水平与 HNSCC 患者临床病理特征的相关性

Fig.3 Correlation between CD39 expression and clinicopathological features of HNSCC patients

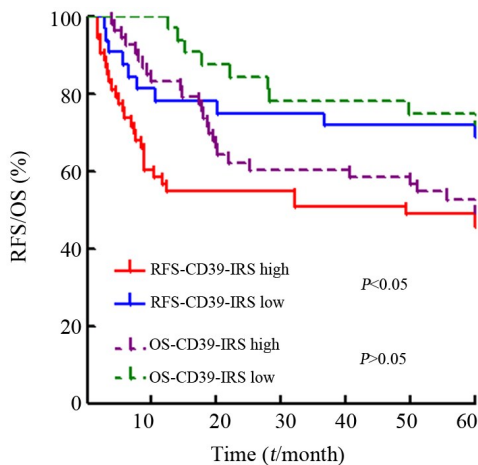


图4 CD39 表达对 HNSCC 患者 RFS/OS 的影响

Fig.4 Effect of CD39 expression on RFS/OS of HNSCC patients

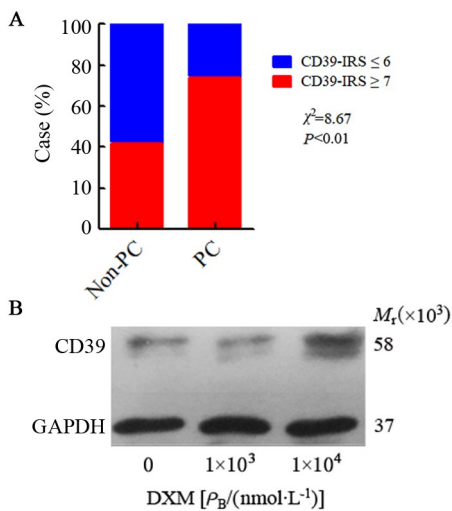
本研究结果显示,在 HNSCC 患者中接受 PC 组

患者 CD39 表达水平显著高于未接受 PC 组,体外培养的 UM1 细胞中 CD39 表达呈 DXM 浓度依赖性,提示 CD39 在 HNSCC 组织可呈诱导性表达。CD39 在体外培养的 SCC15、UM1 和 Cal25 细胞中均有表达,提示 CD39 在 HNSCC 细胞系中可呈组成性表达。Oncomine 在线基因芯片数据分析表明,HNSCC 组织中 CD39 的转录水平明显高于 BM 组织,表明 CD39 在 HNSCC 组织过表达。本研究组间差异性比较显示,PC 组 CD39 表达明显高于非 PC 组,卡方分布和相关性分析均提示 CD39 在 HNSCC 的表达与 PC 相关,通过对 SCC-15、Cal25 和 UM1 3 种 HNSCC 细胞系进行体外梯度浓度 DXM 刺激实验发现,UM1 细胞中 CD39 的表达呈 DXM 浓度依赖性。上述结果提示,辅助用于抗肿瘤化疗的 DXM 可能是一些 HNSCC 患者体内肿瘤组织中 CD39 表达上调的诱导因素。

表2 HNSCC 患者RFS影响因素Cox回归分析
Tab.2 Cox regression analysis of factors influencing the RFS of HNSCC patients

Clinicopathological features	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
Depth & extent (T1 vs T2-T4)	3.438 (1.564~7.558)	0.002	2.554 (1.118~5.831)	0.026
LM (N0 vs N1-N3)	4.021 (2.077~7.784)	0.000	3.115 (1.560~6.222)	0.001
TNM stage (I vs II-IV)	2.682 (1.221~5.891)	0.014	1.413 (0.545~3.663)	0.477
Sites (Non- vs Hypopharynx)	3.395 (1.529~7.539)	0.003	1.818 (0.770~4.291)	0.173
PDC (No vs Yes)	2.088 (1.036~4.207)	0.039	1.764 (0.864~3.603)	0.119
Age (<60 vs ≥60 years)	1.086 (0.560~2.107)	0.086	-	-
Gender (Male vs Female)	0.194 (0.500~0.194)	0.151	-	-
PC (No vs Yes)	1.382 (0.691~2.765)	0.360	-	-
Smoking index (<400 vs ≥400)	1.165 (0.583~2.330)	0.665	-	-
Drinking (No or Mild vs Constant)	1.517 (0.789~2.916)	0.211	-	-
CD39-IRS (Low vs High)	2.174 (1.020~4.619)	0.044	2.328 (1.091~4.967)	0.029

LM: Lymphatic metastasis; PDC: Poorly differentiated component; PC: Preoperative chemotherapy



A: Proportions of cases in the non-PC group and PC group, respectively; B: WB to detect the expression of CD39 in UM1 cells after stimulation with different gradient concentrations of DXM

图5 CD39在HNSCC组织中表达的影响因素分析
Fig.5 Analysis of factors affecting the expression of CD39 in HNSCC tissues

本研究通过生存分析显示,CD39高表达组HNSCC患者的RFS期较低表达组显著缩短;Cox模型结果表明,CD39的表达可以作为HNSCC患者复发的独立危险因素,提示CD39在肿瘤复发过程中发挥重要作用,这可能与CD39水解ATP产生腺苷分子而导致的免疫抑制有关^[1,6]。本研究HNSCC患者的OS无显著性差异,这可能与患者手术复发后的混杂因素有关。需要指出的是,TPF方案是选择性地用于HNSCC的术前诱导化疗的方案,本研究纳入的54例接受PC患者和31例未接受PC患者的治疗方案全部基于美国国立综合癌症网络临床实践指南推荐。本研究非PC组不是PC(术前TPF诱导化疗)生存获益的对照

组,PC生存获益的对照组是应该使用TPF诱导治疗而实际上未用的那部分“假设患者”,假如本研究纳入的54例HNSCC患者未接受PC,根据既往临床试验可知,这54例患者的预后应该会更差^[14-15]。因此,诱导化疗生存获益和CD39高表达与本研究CD39高表达组RFS更短并不矛盾,而且本研究结果进一步提示CD39的表达水平很可能是对TPF方案获益人群再次进行风险分层的生物标志物。本研究的亚组分析发现,54例PC患者按照CD39表达水平分组后,两组呈现预后趋势的差异;在31例非PC患者中也得到类似结果;两个亚组分析的P值均未达到显著性要求可能与样本量太少有关。

综上所述,本研究发现CD39可作为评估HNSCC患者不良预后的重要生物标志物。此外,脱敏治疗的DXM可能诱导了HNSCC组织中CD39蛋白的表达上调。由于本研究主要基于回顾性病例资料,例数较少(仅有85例),且不同部位HNSCC组织中基因表达可能存在差异性,因此本研究的部分结论需要设计更加严格的临床研究来验证。后续课题组将进行必要的前瞻性研究,进一步探索CD39表达易受诱导上调的敏感人群并比较CD39表达水平和方式之各亚组的预后差异性,以及实施一些必要的细胞学和动物学实验,为进一步深入探讨CD39在HNSCC进展中可能发挥的重要作用机制提供参考依据,从而为HNSCC的临床试验设计提供理论依据和新思路。

[参考文献]

[1] BASTID J, REGAIRAZ A, BONNEFOY N, et al. Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity[J]. Cancer Immunol Res, 2015, 3

- (3): 254-265. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-14-0018.
- [2] ZHAO H, BO C, KANG Y, et al. What else can CD39 tell us?[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 727[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5479880/>. DOI:10.3389/fimmu.2017.00727.
- [3] VIGANO S, ALATZOGLOU D, IRVING M, et al. Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-cell function[J/OL]. *Front Immunol*, 2019, 10: 925[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6562565/>. DOI:10.3389/fimmu.2019.00925.
- [4] ALLARD B, LONGHI M S, ROBSON S C, et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets[J/OL]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 121-144[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5338647/>. DOI:10.1111/imr.12528.
- [5] COLLIN M. Immune checkpoint inhibitors: a patent review (2010-2015) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(5): 555-564. DOI: 10.1080/13543776.2016.1176150.
- [6] PERROT I, MICHAUD H A, GIRAUDON-PAOLI M, et al. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies[J/OL]. *Cell Rep*, 2019, 27(8): 2411-2425.e9[2019-10-19]. <http://www.cell.com/cell-reports/home>. DOI:10.1016/j.celrep.2019.04.091.
- [7] YERO A, FARNOS O, RABEZANAHARY H, et al. Differential dynamics of regulatory T-cell and Th17 cell balance in mesenteric lymph nodes and blood following early antiretroviral initiation during acute Simian immunodeficiency virus infection[J/OL]. *J Virol*, 2019, 93(19): e00371-e00319[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6744245/>. DOI:10.1128/JVI.00371-19.
- [8] YOST K E, SATPATHY A T, WELLS D K, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade[J/OL]. *Nat Med*, 2019, 25(8): 1251-1259[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6689255/>. DOI:10.1038/s41591-019-0522-3.
- [9] HAMED F N, ÅSTRAND A, BERTOLINI M, et al. Alopecia areata patients show deficiency of FOXP3⁺CD39⁺ T regulatory cells and clonotypic restriction of Treg TCR β -chain, which highlights the immunopathological aspect of the disease[J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0210308[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6611701/>. DOI:10.1371/journal.pone.0210308.
- [10] GINOS M A, PAGE G P, MICHALOWICZ B S, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(1): 55-63. DOI:10.1158/0008-5472.can-03-2144.
- [11] GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J/OL]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4): 524-548[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6103527/>. DOI:10.1001/jamaoncol.2016.5688.
- [12] FORASTIERE A A, ZHANG Q, WEBER R S, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(7): 845-852[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577950/>. DOI:10.1200/JCO.2012.43.6097.
- [13] 周建军, 赵云富, 王国栋. 维生素C逆转口腔鳞状细胞癌顺铂耐药的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(1): 31-36. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.005.
- [14] LORCH J H, GOLOUBEVA O, HADDAD R I, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2011, 12(2): 153-159[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356902/>. DOI:10.1016/S1470-2045(10)70279-5.
- [15] JANORAY G, POINTREAU Y, GARAUD P, et al. Long-term results of a multicenter randomized phase III trial of induction chemotherapy with cisplatin, 5-fluorouracil, docetaxel for larynx preservation[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(4): djv368. DOI:10.1093/jnci/djv368.
- [16] JEERAKORNPASSAWAT D, SUPRASERT P. Randomized, controlled trial of dexamethasone versus dexamethasone plus hydrocortisone as prophylaxis for hypersensitivity reactions due to paclitaxel treatment for gynecologic cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27(8): 1794-1801. DOI:10.1097/IGC.0000000000001069.
- [17] HESKETH P J, BOHLKE K, KRIS M G. Antiemetics: American society of clinical oncology clinical practice guideline update summary [J]. *J Oncol Pract*, 2017, 13(12): 825-830. DOI:10.1200/JOP.2017.026351.
- [18] ABRAHAM G, SCHUSSER G F, UNGEMACH F R. Dexamethasone-induced increase in lymphocyte beta-adrenergic receptor density and cAMP formation in vivo[J]. *Pharmacology*, 2003, 67(1): 1-5. DOI:10.1159/000066787.
- [19] CHEN T L, FELDMAN D. Glucocorticoid receptors and actions in subpopulations of cultured rat bone cells. Mechanism of dexamethasone potentiation of parathyroid hormone-stimulated cyclic AMP production[J/OL]. *J Clin Invest*, 1979, 63(4): 750-758[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372011/>. DOI: 10.1172/JCI1109359.
- [20] BULLEN J W, TCHERNYSHYOV I, HOLEWINSKI R J, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1[J/OL]. *Sci Signal*, 2016, 9(430): ra56[2019-10-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5541497/>. DOI:10.1126/scisignal.aaf0583.
- [21] CUI M, DING H Y, CHEN F Z, et al. Mdivi-1 protects against ischemic brain injury via elevating extracellular adenosine in a cAMP/CREB-CD39-dependent manner[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 240-253. DOI:10.1007/s12035-014-9002-4.

[收稿日期] 2019-10-22

[修回日期] 2020-01-29

[本文编辑] 党瑞山