

· 临床研究 ·

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2023.02.007

PD-L1 和 Siglec-15 调控卵巢癌细胞恶性生物学行为的机制及其临床意义

赵爱月, 邱燕如, 郑雪琴, 戴毅君(福建医科大学附属第二医院 肿瘤内科, 福建 泉州 362000)

[摘要] **目的:** 探讨卵巢癌组织中 PD-L1 与唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素 15(Siglec-15) 的关系及其临床意义以及两者对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭的影响。**方法:** 收集 2017 年 1 月至 2019 年 12 月福建医科大学附属第二医院妇科 50 例手术切除的卵巢癌组织和配对输卵管组织的石蜡包埋标本, 采用免疫组化染色 Envision 法检测癌组织和输卵管组织中 PD-L1 和 Siglec-15 的表达水平, Kaplan-Meier 生存曲线和 Logistic 回归分析 PD-L1 和 Siglec-15 表达与患者预后的关系。利用瞬时转染技术在卵巢癌细胞 SKOV3 中分别转染 si-PD-L1 和 si-NC, 用 qPCR 和 WB 法检测 SKOV3 细胞中 PD-L1 的表达对 Siglec-15 的影响, 用 CCK-8 及 Transwell 法验证 PD-L1 及 Siglec-15 表达对 SKOV3 细胞增殖、迁移及侵袭的影响。**结果:** 50 例卵巢癌组织中, PD-L1 与 Siglec-15 均呈高表达(50.00% 与 42.00%)。PD-L1 表达与肿瘤病理类型、有无腹水、淋巴结转移、FIGO 分期及卵巢癌复发与否具有关联(均 $P < 0.05$); Siglec-15 表达与卵巢癌患者淋巴结转移及 FIGO 分期具有关联(均 $P < 0.05$)。成功构建 PD-L1 低表达 SKOV3 细胞株, 降低 PD-L1 表达可使 Siglec-15 表达升高。**结论:** PD-L1 和 Siglec-15 在卵巢癌组织中均有较高的阳性表达率, PD-L1 是卵巢癌复发的独立风险因素。PD-L1 和 Siglec-15 两者的表达呈负相关, 降低 PD-L1 表达可使 Siglec-15 表达水平升高而抑制 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭的能力。

[关键词] 卵巢癌; 程序性死亡蛋白配体 1; 唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素 15; SKOV3 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.31; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)02-0142-08

Mechanism of PD-L1 and Siglec-15 in regulating malignant biological behavior of ovarian cancer cells and its clinical significance

ZHAO Aiyue, QIU Yanru, ZHENG Xueqin, DAI Yijun (Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between programmed death-ligand 1 (PD-L1) and sialic acid-binding Ig-like lectin 15 (Siglec-15) in ovarian cancer (OC) and its prognostic significance and their effects on the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells. **Methods:** A total of 50 paraffin samples of ovarian cancer tissues and tissues of ipsilateral oviducts resected from patients with OC from January 2017 to December 2019 were collected from the Second Attached Hospital of Fujian Medical University. The expression levels of PD-L1 and Siglec-15 of cancer tissues and oviduct tissues were detected by immunohistochemical staining Envision method. Kaplan-Meier survival and Logistic regression analysis were used to analyze the relationship between the expressions of PD-L1 and Siglec-15, and the prognosis of OC patients. Si-PD-L1 and si-NC were respectively transfected in ovarian cancer cells SKOV3 by transient transfection technology. The effect of PD-L1 expression on Siglec-15 in ovarian cancer cells SKOV3 was detected by qPCR and WB assays. CCK-8 and Transwell assays were used to verify the effect of PD-L1 and Siglec-15 expressions on the proliferation, migration and invasion of SKOV3 cells. **Results:** In the 50 cases of ovarian cancer, PD-L1 and Siglec-15 were highly expressed (50.00% and 42.00%). The expression of PD-L1 is significantly correlated with tumor pathological type, ascites, lymph node metastasis, FIGO stage and recurrence (all $P < 0.05$). The expression of Siglec-15 is significantly correlated with lymph node metastasis and FIGO stage (both $P < 0.05$). Ovarian cancer cell lines with low expression of PD-L1 were successfully constructed. Knockdown of the expression of PD-L1 could increase the expression of Siglec-15. **Conclusion:** PD-L1 and Siglec-15 have a high positive expression in ovarian cancer tissues. PD-L1 is an independent risk factor for disease recurrence. The expression of PD-L1 is negatively correlated with that of Siglec-15. Knocking down the expression of PD-L1 could increase the expression of Siglec-15, and inhibit the proliferation, migration and invasion of SKOV3 cells.

[Key words] ovarian cancer (OC); programmed death-ligand 1 (PD-L1); sialic acid-binding Ig-like lectin 15 (Siglec-15); SKOV3 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(2): 142-149. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.02.007]

[基金项目] 泉州市科技计划(No.2018N015S); 吴阶平基金(No.320.6750.2021-02-136)

[作者简介] 赵爱月(1981—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事实体瘤的临床研究, E-mail: drzhaoyue@126.com

[通信作者] 戴毅君, E-mail: wjyl2021@163.com

卵巢癌是世界上第三大最常见的妇科恶性肿瘤^[1-2], 2018年, 全球新增卵巢癌病例29.5万例, 病死18.5万例^[3]。中国每年新增卵巢癌死亡人数2.3万, 居女性总体恶性肿瘤死亡率的第10位^[4]。上皮性卵巢癌是最常见的病理类型, 约占整体卵巢癌的90%^[5], 其中又可分为浆液性卵巢癌、黏液性卵巢癌、透明细胞癌及子宫内膜样癌^[6]。卵巢癌发病隐匿, 早期缺乏特异性临床表现, 确诊时80%为III/IV期(5年生存率分别为42%和26%)^[7-8]。传统的治疗手段未取得突破性进展, 近年来, 随着肿瘤靶向治疗尤其是免疫治疗的兴起, 为这部分患者提供了补充治疗手段^[9-10]。但单纯免疫治疗仅能使少部分患者获益, 而在多项研究^[11-13]中发现, 联合治疗显示出明显的协同疗效。PD-L1是免疫治疗疗效的重要指标, 唾液酸结合性免疫球蛋白样凝集素15 (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15, Siglec-15) 是新兴的免疫治疗靶点, 研究^[14-15]显示, Siglec-15可能与PD-L1的抗肿瘤效果有互补作用。因此, 探索PD-L1和Siglec-15在卵巢癌组织中的表达水平具有重要的临床意义。本研究通过检测卵巢癌组织中PD-L1和Siglec-15的表达水平, 分析两者间的相互关系并探讨其表达与患者临床病理特征和预后的关系, 同时在细胞水平验证PD-L1表达水平对Siglec-15表达的影响及其对卵巢癌细胞SKOV3增殖、迁移及侵袭能力的影响, 旨在为卵巢癌的诊断、治疗和预后评估提供试验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2017年1月至2019年12月在福建医科大学附属第二医院妇科行手术切除的50例女性卵巢癌患者组织和配对输卵管组织标本^[16], 由2位以上病理科医师确诊。同时收集患者的临床资料, 包括患者年龄、肿瘤病理类型、肿瘤最大径、有无腹水、CA125水平、是否发生淋巴结转移、是否绝经、FIGO分期及复发与否。50例卵巢癌患者中, 年龄27~80(中位年龄51)岁; 术后病理确诊有淋巴结转移的占48.0%, FIGO病理分期为I~II期占52.0%; 共有16例发生复发, 复发判断标准均为结构复发。对所有患者进行随访, 随访起始时间为2017年1月, 存活患者随访至研究截止时间为随访终点(死亡患者当即终结随访)。随访中位数时间为37.0个月。同时通过住院、门诊及电话随访等方式随访术后患者生存和预后情况。本研究通过本院伦理委员会审批(伦理审批编号: 2021-234), 研究对象均签署知情同意书。

纳入标准: 有完整的临床和病理资料以及随访资料等; 临床和病理确诊为原发性卵巢癌并行手术

治疗; 所有患者术前均未接受放、化疗, 无合并其他系统恶性肿瘤。

排除标准: 诊断时伴有其他原发肿瘤的; 患者在手术切除肿瘤前接受过放、化疗的; 病历资料、随访资料或病理组织缺失的患者; 围手术期死亡患者。

1.2 细胞及主要试剂

SKOV3细胞购自Procell公司。浓缩型鼠抗人PD-L1/CD274单克隆抗体(克隆号2B11D11)购自Proteintech公司, Siglec-15单克隆抗体(克隆号BF8008)购自Affinity公司, 抗体稀释液、鼠/兔通用二抗、PBS缓冲液、DAB染色剂均购自福州迈新公司, 胎牛血清及McCoy's 5A培养基购自Gibco公司, PD-L1引物、Siglec-15引物、GAPDH引物、PD-L1 siRNA由上海生工生物工程有限公司合成, 动物RNA抽提试剂盒(R0026)购自上海碧云天公司, cDNA合成试剂盒(产品编号: RRO47Q)、TB Green qPCR Premix扩增试剂盒(产品编号: RR420Q)购自日本TaKaRa公司。

1.3 免疫组化染色 Envision 法检测卵巢癌组织中 PD-L1 及 Siglec-15 的表达

常规石蜡包埋、4 μm厚连续切片, 经烤片、脱蜡及水化后, 在柠檬酸抗原修复液中高压抗原修复, 阻断内源性过氧化氢酶活性, 滴加均1:800稀释的PD-L1和1:200稀释的Siglec-15一抗常温处理1.5 h后弃去, 二抗(常温处理30 min, DAB常温显色1.5 min, 于去离子水中终止显色, 苏木精复染、盐酸乙醇分化、梯度乙醇脱水、吹干、封片等, 在100倍光学显微镜下观察。用已知阳性组织作为阳性对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照。阳性结果判别方法: 免疫组化评估由2位病理科医生采用双盲法操作, PD-L1及Siglec-15蛋白定位于细胞膜和细胞质, 基于免疫阳性染色癌细胞的百分比对PD-L1及Siglec-15表达进行评分, 随机选取5个视野计数并计算阳性细胞百分率的平均数作为最后结果, 评分≥1%为PD-L1^[9]及Siglec-15^[17]阳性。

1.4 细胞培养与转染

细胞在含10%胎牛血清和1%双抗的培养基中进行培养, 培养皿或者培养瓶放置于37℃、5%CO₂条件的培养箱中, 每2~3 d在倒置显微镜下观察细胞生长状态。根据贴壁细胞的密度和生长状态以及培养基颜色等每隔2~3 d更换新鲜培养基1次。由上海生工生物工程有限公司设计并合成3条PD-L1基因的编码区siRNA片段(si-PD-L1-1、si-PD-L1-2、si-PD-L1-3)及空载对照siRNA片段(NC)。选择细胞密度70%~80%时进行转染: 将SKOV3细胞用胰酶消化, 完全培养基终止、离心, 接种于10 cm培养皿, 置于培养箱中; 24 h后分别在SKOV3细胞培养皿中共转染3条干扰siRNA作为实

验组(si-PD-L1组)、转染阴性对照无义系列siRNA作为对照组(si-NC组),仅加入LipoRNAi转染试剂作为空白组(Control组)。转染后24 h更换新的完全培养基继续培养;转染72 h后进行qPCR及WB法检测转染效果。转染的siRNA序列:si-PD-L1-1为5'-CGAAUUACUGUGAAAGUCAAUTT-3';si-PD-L1-2为5'-GGCAUUGUCUGAACGCAUUUATT-3';si-PD-L1-3为5'-UGGAGGAUAAGAACAUAUUCTT-3';NC siRNA为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.5 qPCR及WB法检测SKOV3细胞中PD-L1和Siglec-15的表达

1.5.1 qPCR法检测 细胞转染24 h后,根据mRNA提取试剂盒提取各组细胞中的总RNA,根据反转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,根据TB Green qPCR Premix扩增试剂盒以cDNA作为模板进行qPCR反应:95 °C预变性5 min→95 °C变性30 s→60 °C退火/延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算PD-L1、Siglec-15 mRNA的相对表达量。引物序列:Siglec-15 F为5'-CGCGGATCGTCAACATCTC-3', R为5'-GTTCGGCGGCACTAGGTG-3'; PD-L1 F为5'-GCTGCACTAATTGTCTATTGGG-3', R为5'-CACAGTAATTCGCTTGATGTCG-3'。

1.5.2 WB法检测 提蛋白,用SDS-PAGE分离,转移至PVDF膜上,加入相应稀释的抗体4 °C过夜,相应二抗溶液摇床反应1 h,滴加ECL化学发光底物于膜上,避光反应1 min后,在暗室中胶片曝光、显影和定影。采用Image-J软件测定蛋白条带的灰度值,以GAPDH的蛋白信号灰度为内参照计算蛋白相对表达量。验证成功构建PD-L1低表达细胞株,检测PD-L1表达水平对Siglec-15的影响。

1.6 CCK-8及Transwell法检测细胞增殖、迁移及侵袭能力

1.6.1 CCK-8法检测细胞增殖能力 转染24 h后计数细胞并以完全培养基稀释至细胞密度为 5×10^4 个/mL,在96孔板中每孔加入100 μ L细胞悬液,设置5~8个复孔,分别在0、24、48、72 h这4个时间点加入10 μ L CCK-8试剂及90 μ L的不含血清的McCoy's 5A基础培养基,继续培养2 h后用酶标仪测定450 nm处光密度(D)值。

1.6.2 Transwell法检测细胞迁移侵袭能力 转染siRNA片段24 h后,用血球计数板计数细胞并以不含血清的McCoy's 5A基础培养基稀释至细胞密度为 1×10^5 个/mL,将无matrigel基质胶和有matrigel基质

胶的Transwell小室放入24孔板中,在小室上室加入200 μ L细胞悬液,下室加入600 μ L含10%胎牛血清和1%双抗完全培养基,置于37 °C、5% CO₂条件的培养箱中培养;培养24~48 h后,4%多聚甲醛固定细胞5 min,0.1%结晶紫染色5 min,PBS清洗2次,Transwell小室倒扣置于载玻片上,200倍显微镜下随机选取5个视野,统计小室细胞的迁移及侵袭数。

1.7 统计学处理

所有实验均重复3次,采用SPSS 25.0软件进行统计学分析和GraphPad Prism 8.0软件进行绘图。正态分布计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,PD-L1及Siglec-15表达与卵巢癌患者病理特征的关系采用 χ^2 或者Fisher精确检验,PD-L1与Siglec-15表达的关系分析采用Pearson相关性分析,生存分析应用Kaplan-Meier生存曲线法,多因素分析采用Logistic回归法,两组均数间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织中PD-L1表达及其与患者临床病理特征的关系

免疫组化染色结果(图1)显示,PD-L1阳性表达定位于细胞膜和细胞质,阳性染色为棕褐色,50例卵巢癌组织中PD-L1阳性表达率为50.00%(25/50),输卵管组织阳性表达率为12.00%(6/50),癌组织中PD-L1阳性表达率显著高于输卵管组织($\chi^2=16.877$, $P < 0.001$)。卡方检验分析结果(表1)显示,PD-L1表达与肿瘤病理类型、有无腹水、淋巴结转移、FIGO分期及复发与否具有显著相关性(均 $P < 0.05$),与患者年龄、肿瘤最大径、CA125水平和是否绝经均无显著相关性(均 $P > 0.05$)。

2.2 卵巢癌组织中Siglec-15表达及其与患者临床病理特征的关系

免疫组化染色结果(图1)显示,Siglec-15阳性表达定位于细胞膜和细胞质,阳性染色为棕褐色,50例卵巢癌组织中Siglec-15阳性表达率为42.00%(21/50),输卵管组织阳性表达率为8.00%(7/50),卵巢癌组织中Siglec-15阳性表达率显著高于输卵管组织($\chi^2=14.890$, $P < 0.01$)。卡方检验分析结果(表1)显示,Siglec-15表达与卵巢癌患者淋巴结转移及FIGO分期具有关联(均 $P < 0.05$),与患者年龄、肿瘤最大径、病理类型、有无腹水、CA125表达水平、是否绝经以及复发与否均无关联(均 $P > 0.05$)。

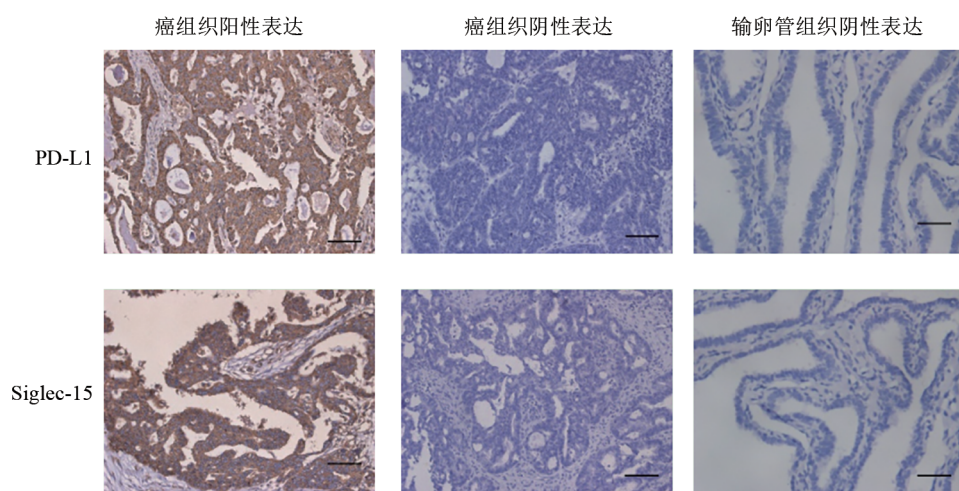


图1 卵巢癌组织中PD-L1及Siglec-15表达($\times 200$, 标尺: $100\ \mu\text{m}$)

2.3 卵巢癌组织中PD-L1与Siglec-15表达呈负相关

Pearson 相关分析结果显示, PD-L1 与 Siglec-15 的表达呈负相关($R = -0.332, P < 0.05$), PD-L1 阴性患者 Siglec-15 阳性表达率显著增加, PD-L1⁻和 PD-L1⁺患者的 Siglec-15 阳性表达率分别为 60.00% 和 24.00% ($P < 0.01$)。同时发现, PD-L1⁺/Siglec-15⁻型卵

巢癌患者的肿瘤更容易发生复发($P < 0.05$), 提示该类型卵巢癌患者其肿瘤的恶性程度可能更高。而与患者年龄、肿瘤最大径、肿瘤病理类型、有无腹水、CA125 表达水平、是否绝经、淋巴结转移、FIGO 分期无显著相关性(均 $P > 0.05$)。

表1 卵巢癌组织中PD-L1和Siglec-15表达与病理特征的关系(n)

病理特征	N	PD-L1				Siglec-15				PD-L1 ⁺ /Siglec-15 ⁻			
		阳性	阴性	χ^2	P	阳性	阴性	χ^2	P	是	否	χ^2	P
年龄/岁													
≤60	17	10	7	0.802	0.551	8	9	0.271	0.763	7	10	0.110	0.767
≥60	33	15	18			13	20			12	21		
肿瘤最大径/cm													
≤3	9	5	4	0.136	1.000	5	4	0.828	0.464	4	5	0.193	0.715
>3	41	20	21			16	25			15	26		
病理类型													
浆液性	31	20	11	6.876	0.019	14	17	0.335	0.768	14	17	1.776	0.237
非浆液性	19	5	14			7	12			5	14		
腹水													
有	18	13	5	5.556	0.038	9	9	0.739	0.551	8	10	0.496	0.552
无	32	12	20			12	20			11	21		
CA125 表达													
≤35%	37	19	18	0.104	1.000	16	21	0.090	1.000	14	23	0.002	1.000
>35%	13	6	7			5	8			5	8		
绝经													
是	30	16	14	0.333	0.773	14	16	0.670	0.560	12	18	0.127	0.774
否	20	9	11			7	13			19	31		
淋巴结转移													
有	24	16	8	5.128	0.046	14	10	5.055	0.044	10	14	0.263	0.772
无	26	9	17			7	19			9	17		
FIGO 分期													
I~II	26	9	17	5.128	0.046	7	19	5.055	0.044	9	17	0.263	0.772
III~IV	24	16	8			14	10			10	14		
复发													
有	16	15	1	18.015	0.000	6	10	0.196	0.763	10	6	5.995	0.027
无	34	10	24			15	19			9	25		

2.4 卵巢癌组织中PD-L1和Siglec-15表达与患者生存和预后的关系

通过Kaplan-Meier法绘制生存曲线进行生存分析(图2)显示,Siglec-15表达与卵巢癌患者的PFS及OS无关联(均 $P>0.05$),PD-L1表达与卵巢癌患者的

PFS及OS具有关联(均 $P<0.05$);PD-L1⁺以及PD-L1⁺/Siglec-15⁻与卵巢癌患者更差的PFS及OS相关。同时将所有患者分为复发和非复发组,通过Logistic回归分析发现,PD-L1是卵巢癌复发的独立风险因素($Wald=20.628, P<0.01$)。

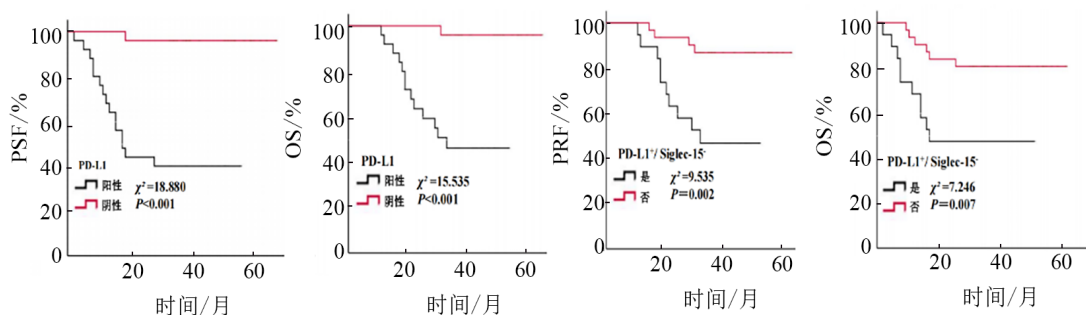


图2 Kaplan-Meier法分析PD-L1和Siglec-15表达水平与卵巢癌患者PFS及OS的关系

2.5 沉默PD-L1基因明显促进SKOV3细胞中Siglec-15 mRNA及蛋白的表达

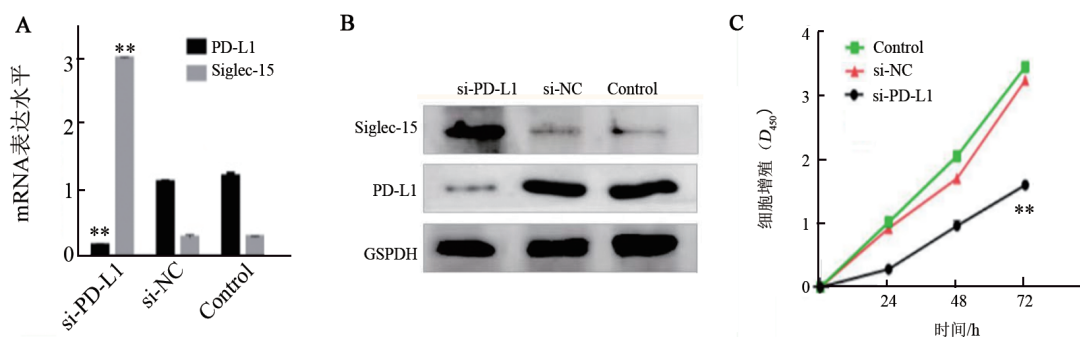
qPCR及WB法对转染效率进行检测,结果(图3A)显示,空载对照组(si-NC组)与空白对照组(Control组)mRNA及蛋白的表达水平差异无统计学意义(均 $P>0.05$),而实验组(si-PD-L1组)mRNA及蛋白表达水平显著低于si-NC组和Control组(均 $P<0.05$)。证明SKOV3细胞PD-L1基因沉默成功。

同时对沉默PD-L1基因后对Siglec-15表达水平进行检测,结果(图3A、B)显示,si-NC组与Control组Siglec-15 mRNA及蛋白表达水平差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),而si-PD-L1组Siglec-15 mRNA及蛋白表达水平显著高于si-NC组与Control组(均 $P<0.05$),

结合术后病理组织的免疫组化结果显示的两者表达与病理特征及预后的关系,再次证明PD-L1与Siglec-15呈负相关,PD-L1可调控Siglec-15的表达并影响卵巢癌细胞的恶性生物学行为。

2.6 沉默PD-L1基因促进Siglec-15表达的同时显著抑制SKOV3细胞的增殖能力

通过CCK-8法检测SKOV3细胞的增殖能力,分别比较各时间点3组细胞增殖速度,结果(图3C)显示,0~72 h si-NC组与Control组D值差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),而si-PD-L1组从第24 h开始,D值显著低于si-NC组和Control组(均 $P<0.05$),说明沉默PD-L1基因在促进Siglec-15表达的同时可显著抑制SKOV3细胞的增殖能力。



与si-NC或Control组比较,** $P<0.01$

图3 瞬时转染siRNA后SKOV3细胞PD-L1和Siglec-15的mRNA及蛋白质表达水平(A)与增殖能力的改变(B)

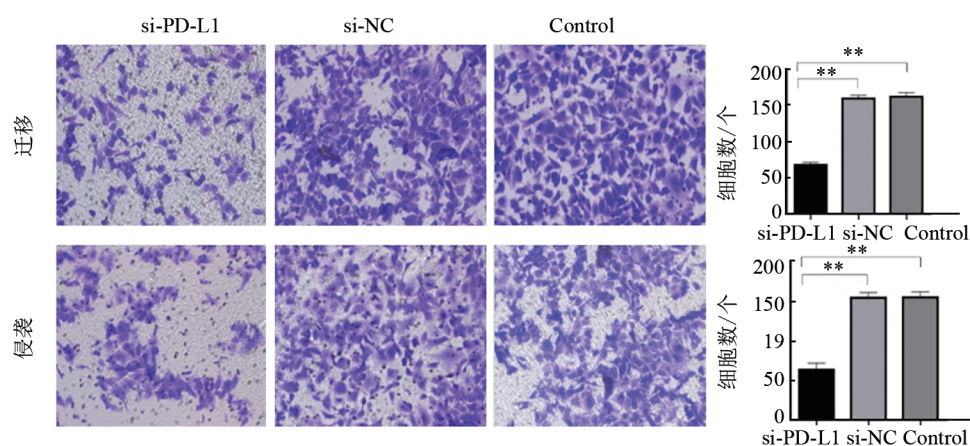
2.7 沉默PD-L1基因促进Siglec-15表达的同时显著抑制SKOV3细胞的迁移及侵袭能力

Transwell迁移实验检测结果(图4)显示,si-NC组与Control组迁移能力的差异无统计学意义

($P>0.05$),而si-PD-L1实验组迁移能力显著低于si-NC组和Control组(均 $P<0.05$)。Transwell侵袭实验检测结果(图4)显示,si-NC组与Control组侵袭能力差异无统计学意义(均 $P>0.05$),而si-PD-L1

组侵袭能力显著低于 si-NC 组和 Control 组(均 $P < 0.01$)。实验结果表明, 沉默 PD-L1 基因在促进 Siglec-15 表

达的同时可显著抑制 SKOV3 细胞的迁移与侵袭能力。



与 si-NC 或 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 沉默 PD-L1 对 SKOV3 细胞迁移和侵袭能力的影响

3 讨论

免疫逃逸在肿瘤发生发展中起重要作用, PD-L1 与 PD-1 结合, 向细胞传递抑制信号, 诱导 T 细胞凋亡和失能, 抑制肿瘤抗原特异性 CD8⁺ T 细胞的激活、增殖和杀伤作用, 从而实现肿瘤免疫逃逸^[3,18]。

手术治疗及化疗是卵巢癌的重要治疗手段, 能使部分患者得到临床获益, 但仍有 70% 的患者会发生复发, 对于这部分患者, 5 年生存率不足 20%^[19], 因此, 亟待寻找新的治疗手段改善这部分患者预后。随着免疫治疗在各大癌种取得长足进展, 已有部分研究显示, 抗 PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂能够使这部分患者得到获益。一项 II 期临床试验 (KEYNOTE-100)^[9] 纳入 285 例患者, 探索了帕博利珠单抗在晚期复发性卵巢癌患者中的抗肿瘤活性和安全性, 结果显示, 总体 ORR 率为 8.0%, 中位 PFS 均为 2.1 个月, 中位 OS 未达到。其中, 82 例 PD-L1 高表达, 82 例 PD-L1 低表达 (联合阳性评分 combined positive score, CPS > 10%) 患者的 ORR 为 17.1%, CPS < 1% 的 ORR 为 3.7%, 提示 PD-L1 高表达更能从免疫治疗中获益。研究 PD-L1 在浆液性卵巢癌中的表达水平, 对于筛选出从免疫治疗中应答更高的患者具有重要意义。

LIU 等^[20] 的研究结果显示, PD-L1 在卵巢癌中的阳性率为 52.5%, PD-L1 表达水平与患者的年龄及病理分型相关, PD-L1 在老年患者中表达水平较高。XUE 等^[21] 研究发现, PD-L1 在卵巢癌中的阳性率为 44.16%, PD-L1 的表达与 FIGO 分期显著相关 ($P = 0.026$), III/IV 期患者 PD-L1 表达水平显著高于

I/II 期患者, PD-L1 高表达组的 OS 显著短于低表达组, 表明 PD-L1 高表达与卵巢癌患者更差的临床预后相关。本研究结果显示, PD-L1 在卵巢癌组织中的表达率为 50.00% (25/50), 浆液性卵巢癌组织中 PD-L1 表达水平显著高于非浆液性卵巢癌组织。PD-L1 阳性表达的患者其肿瘤 FIGO 分期更晚, 更容易出现癌性腹水、淋巴结转移及复发, 且 PD-L1⁺ 类型患者与更差的 PFS 及 OS 显著相关 ($P < 0.05$)。PD-L1 作为免疫治疗疗效的重要预测指标之一, 说明抗 PD-1/PD-L1 的免疫检查点抑制剂可能对这部分患者有效, 但目前的临床研究结果显示, 以抗 PD-1/PD-L1 为主的免疫治疗对卵巢癌患者疗效有限, 而联合治疗显示出更优的临床获益^[22]。

Siglec-15 可参与调控肿瘤细胞的免疫逃逸过程, 其机制可能是通过与 T 细胞表面配体结合而抑制其活性, 从而介导免疫抑制^[23]。QUIRINO 等^[17] 研究发现, Siglec-15 可在 74.64% 的胃癌患者的肿瘤细胞上呈阳性, 与肿瘤分期及组织类型以及是否发生淋巴结转移密切相关, 但与患者的 PFS 及卵巢癌无显著相关性, 而体外实验显示 Siglec-15 的基因消融或抗体阻断可增强 T 细胞的抗肿瘤免疫。WANG 等^[24] 研究发现, Siglec15 蛋白在抑制了 T 细胞的增殖和激活后, 在野生型小鼠中以单克隆抗体为靶向的 Siglec-15 可逆转 T 细胞抑制, 减缓肿瘤的生长。一项 I 期临床试验 (NCT03665285)^[25] 纳入了包括非小细胞肺癌在内的多种肿瘤类型的 49 例患者, 探索了靶向 Siglec-15 抗体 NC318 的安全性, 结果初步显示了 NC318 单抗良好的安全及耐受性, 提示靶向 Siglec-15 可能成为一种新的免疫治疗手段。本研究结果显示, Siglec-15

在卵巢癌组织中的表达率为 42.00% (21/50), Siglec-15 阳性表达的患者 FIGO 分期更晚, 更容易发生淋巴结转移(均 $P < 0.05$)。但 Siglec-15 与患者的 PFS 及 OS 无显著相关性, 与 QUIRINO 等^[17]的研究结果一致。

Siglec-15 与 PD-L1 的表达呈负相关, 其机制可能是由于 IFN- γ 是 PD-L1 诱导所需的主要细胞因子, 而 IFN- γ 可抑制 Siglec-15 表达, 这意味着 Siglec-15 靶向可能是对 PD-1/PD-L1 靶向治疗无效的肿瘤患者的一种补充方法^[24]。但是, 目前尚无关于 PD-L1 及 Siglec-15 在卵巢癌组织中的表达水平及机制的相关研究报道, 因此探讨 PD-L1 和 Siglec-15 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义具有重要意义。本研究结果亦显示, Siglec-15 的表达与 PD-L1 的表达呈负相关, 且 PD-L1⁺/Siglec-15 患者更容易发生复发转移, 与 WANG 等^[24]的研究结果相似。本研究从细胞水平实验显示, 抑制 PD-L1 表达使 SKOV3 细胞的增殖、迁移及侵袭能力受到抑制的同时可促进 Siglec-15 表达, 而 Siglec-15 可参与调控肿瘤细胞的免疫逃逸机制, 这也许可以解释抗 PD-1/PD-L1 的免疫治疗仅能使得少部分患者获益, 因为抑制 PD-L1 表达的同时, Siglec-15 表达升高可能激活部分通路促进免疫逃逸, 导致治疗效果不佳, 这也提示 Siglec-15 作为新型免疫治疗预测指标, 未来可能在抗 PD-1/PD-L1 靶向治疗无效的患者中发挥重要的作用。

综上所述, 本研究结果显示, PD-L1 与 Siglec-15 在卵巢癌组织中有较高的表达水平, 前者与患者更差的预后相关, PD-L1 是卵巢癌复发的独立风险因素。PD-L1 与 Siglec-15 的表达成负相关, PD-L1 可调控 Siglec-15 的表达并影响卵巢癌细胞的恶性生物学行为, 但两者相互作用的机制尚不明确, 靶向 PD-L1 及 Siglec-15 的联合治疗是否能够使得更多的卵巢癌患者获益有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] KUROKI L, GUNTUPALLI S R. Treatment of epithelial ovarian cancer[J/OL]. *BMJ*, 2020, 371:m3773[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33168565/>. DOI:10.1136/bmj.m3773.
- [2] 符圆圆, 郑盼盼, 孔彩霞, 等. HHLA2 及其受体 TMIGD2 在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(9): 822-827. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.006.
- [3] XUE C Y, XU Y, YE W F, *et al.* Expression of PD-L1 in ovarian cancer and its synergistic antitumor effect with PARP inhibitor[J]. *Gynecol Oncol*, 2020, 157(1): 222-233. DOI:10.1016/j.ygyno.2019.12.012.
- [4] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.
- [5] 梁运霞, 张玉文, 秦珍珠, 等. STAT2、CD24 和 CD44 在卵巢癌组织中的表达及其与卵巢癌临床病理特征的关系[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2021, 30(4): 354-358. DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2021.04.008.
- [6] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CAA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.
- [7] VAN ZYL B, TANG D, BOWDEN N A. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(5): R303-R318. DOI: 10.1530/ERC-17-0336.
- [8] 吕微, 贾云泷, 王佳丽, 等. 桥接整合因子 1 在上皮性卵巢癌组织和细胞中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2022, 29(1): 43-49. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.01.007.
- [9] MATULONIS U A, SHAPIRA-FROMMER R, SANTIN A D, *et al.* Antitumor activity and safety of pembrolizumab in patients with advanced recurrent ovarian cancer: results from the phase II KEYNOTE-100 study[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(7): 1080-1087. DOI: 10.1093/annonc/mdz135.
- [10] LAMPERT E J, ZIMMER A, PADGET M, *et al.* Combination of PARP inhibitor olaparib, and PD-L1 inhibitor durvalumab, in recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept phase II study[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(16): 4268-4279. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0056.
- [11] YANG C, XIA B R, ZHANG Z C, *et al.* Immunotherapy for ovarian cancer: adjuvant, combination, and neoadjuvant[J/OL]. *Front Immunol*, 2020, 11: 577869[2022-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7572849/>. DOI:10.3389/fimmu.2020.577869.
- [12] HERRERA F G, IRVING M, KANDALAFT L E, *et al.* Rational combinations of immunotherapy with radiotherapy in ovarian cancer[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(8): e417-e433[2022-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364594/>. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30401-2.
- [13] ANGIUS G, SEPE P, PAPA A, *et al.* Innovations in the treatment of ovarian cancer. Analysis of the therapeutic development: from platinum to immunotherapy[J]. *Recent Prog Med*, 2017, 108(6): 269-281. DOI:10.1701/2715.27714.
- [14] 毛艳艳, 刘丽丽, 黄瑶庆. 肿瘤免疫治疗新兴靶点[J]. *生命科学*, 2021, 33(10): 1225-1230. DOI:10.13376/j.cbbs/2021135.
- [15] LI B H, ZHANG B L, WANG X Z, *et al.* Expression signature, prognosis value, and immune characteristics of Siglec-15 identified by pan-cancer analysis[J/OL]. *Oncoimmunology*, 2020, 9(1): 1807291[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7480813/>. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1807291.
- [16] 甄娟, 刘玉东, 宋春红, 等. 卵巢癌中 MSI2 蛋白表达及与临床病理特征的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2022, 38(1): 40-45. DOI:10.13315/j.cnki.cjcep.2022.01.008.
- [17] QUIRINO M W L, PEREIRA M C, DEODATO DE SOUZA M F, *et al.* Immunopositivity for Siglec-15 in gastric cancer and its association with clinical and pathological parameters[J/OL]. *Eur J Histochem*, 2021, 65(1): 3174[2022-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7967265/>. DOI: 10.4081/ejh.2021.3174.
- [18] 鲍昱霖. 以肿瘤相关免疫细胞为标志物预测和评估抗 PD-1/PD-L1 疗效的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(4): 384-391. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.04.011.
- [19] LEDERMANN J, HARTER P, GOURLEY C, *et al.* Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous

- ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(8): 852-861. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70228-1.
- [20] LIU F R, LIU J, ZHANG J G, *et al.* Expression of STAT1 is positively correlated with PD-L1 in human ovarian cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(10): 963-971. DOI: 10.1080/15384047.2020.1824479.
- [21] XUE C Y, ZHU D W, CHEN L J, *et al.* Expression and prognostic value of PD-L1 and PD-L2 in ovarian cancer[J]. *Transl Cancer Res*, 2019, 8(1): 111-119. DOI: 10.21037/tcr.2019.01.09.
- [22] LEE E K, KONSTANTINOPOULOS P A. Combined PARP and immune checkpoint inhibition in ovarian cancer[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(9): 524-528. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.06.004.
- [23] SUN J, LU Q, SANMAMED M F, *et al.* Siglec-15 as an emerging target for next-generation cancer immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(3): 680-688. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-19-2925.
- [24] WANG J, SUN J W, LIU L, *et al.* Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy[J]. *Nat Med*, 2019, 25(4): 656-666. DOI:10.1038/s41591-019-0374-x.
- [25] HE F, WANG N, LI J W, *et al.* High affinity monoclonal antibody targeting Siglec-15 for cancer immunotherapy[J/OL]. *J Clin Transl Res*, 2021, 7(6): 739-749[2022-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8710358/>. PMID:PMC8710358.
- [收稿日期] 2022-09-15 [修回日期] 2023-01-12
[本文编辑] 阮芳铭