

CD200R 在肺鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义*

孙倩 李舒展 魏枫 任秀宝

摘要 目的:探讨白细胞分化抗原 CD200 受体(CD200 receptor, CD200R)在肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC)组织中的表达及其临床意义。方法:选取 2004 年 1 月至 2011 年 12 月 100 例于天津医科大学肿瘤医院行手术切除的 LSCC 患者组织标本,应用免疫组织化学法检测 CD200R 的表达,体外细胞实验验证 CD200R 对细胞增殖的作用。结果:CD200R 主要在 LSCC 组织的细胞质和细胞膜表达,55%(55/100)呈高表达,45%(45/100)呈低表达。高表达患者的总生存(overall survival, OS)期和无病生存(disease free survival, DFS)期分别为 46 个月和 32 个月,均低于低表达患者($P=0.020$, $P=0.001$)。CD200R 是患者预后的独立影响因素($P<0.05$)。CD200R 表达降低后细胞生长和克隆形成能力降低。结论:LSCC 患者组织中存在 CD200R 表达,且其高表达与患者的不良预后相关。敲低 CD200R 后细胞的生长增殖能力降低,CD200R 可作为预测 LSCC 复发和生存的新型标志物,为肿瘤治疗技术开发提供新的依据。

关键词 肺鳞状细胞癌 CD200R 免疫组织化学法 预后

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2019.19.714

CD200R expression and its clinical significance in lung squamous cell carcinoma

Qian Sun, Shuzhan Li, Feng Wei, Xiubao Ren

Correspondence to: Xiubao Ren, E-mail: renxiubao@tjmuch.com

Department of Immunology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy, Tianjin 300060, China

This work was supported by the National Key Technology R & D Program (No. 2018YFC1313400)

Abstract Objective: To investigate the expression and clinical significance of the leukocyte differentiation antigen CD200 receptor (CD200R) in lung squamous cell carcinoma (LSCC). **Methods:** LSCC specimens were collected from 100 patients who were enrolled in the study and underwent surgical resection from January 2004 to December 2011 at Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital. CD200R expression was detected by immunohistochemistry, and the effect of CD200R expression on cell proliferation and colony formation capacity was determined by *in vitro* cellular assays. **Results:** CD200R was found to be mainly expressed in the cytoplasm and cell membrane, with 55% (55/100) of the patient specimens exhibiting high expression and 45% (45/100) showing low expression of CD200R. The overall survival (OS) and disease free survival (DFS) of the patients with high CD200R expression were 46 months and 32 months, respectively, and were significantly shorter than those of patients with low CD200R expression ($P=0.020$ for OS and $P=0.001$ for DFS). CD200R was an independent prognostic factor for the patients ($P<0.05$). The *in vitro* cellular assays showed that the proliferation and colony forming capacity of the LSCC cells were significantly decreased after knocking down CD200R expression. **Conclusions:** High expression of CD200R in LSCC tissues is associated with poor prognosis. CD200R knockdown inhibits LSCC cell proliferation. Thus, CD200R can be used as a new biomarker to predict the recurrence and survival of LSCC, as well as a therapeutic target for LSCC.

Keywords: lung squamous cell carcinoma (LSCC), CD200R, immunohistochemistry, prognosis

肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LSCC)是世界范围内常见的恶性肿瘤之一,占所有肺癌病例的 30%,每年导致全世界约 400 000 例患者死亡^[1]。LSCC 的特点是治疗反应差,预后差,复发率高,且目前仍缺乏分子靶向治疗^[2]。因此,鉴定可能表明预后不良并揭示潜在相关机制的关键分子标志

物对于寻找新的 LSCC 治疗靶点至关重要。免疫检查点在维持免疫耐受中具有重要作用,可防止免疫细胞过度活化,避免发生慢性炎症和自身免疫^[3]。作为免疫检查点之一,白细胞分化抗原 CD200 及其受体(CD200 receptor, CD200R)均是跨膜糖蛋白,其相互作用调节髓样细胞活化和 Th1/Th2 细胞因子产生

作者单位: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(天津市 300060)

*本文课题受国家重点研发计划项目(编号:2018YFC1313400)资助

通信作者:任秀宝 renxiubao@tjmuch.com

来介导肿瘤免疫反应,移植排斥以及自身免疫和炎症反应中的T细胞刺激^[4]。CD200R是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员,最初主要在髓系细胞中被发现,研究表明CD200R也可在粒细胞、T细胞和肥大细胞上表达^[5]。虽然在肿瘤中有关CD200R表达尚有报道,但在LSCC中CD200R表达研究鲜有报道。本研究旨在通过对LSCC患者的CD200R表达进行检测,分析其与患者的临床参数以及生存时间等相关性,同时敲低鳞癌细胞系中CD200R表达并检测其对细胞生长增殖和克隆形成能力的影响,探讨其是否可作为预测患者预后新的标志物,为肿瘤免疫治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集2004年1月至2011年12月100例于天津医科大学肿瘤医院接受治疗的LSCC患者的组织标本,所有患者手术前均未行化疗或放疗,并根据国际癌症控制联盟(UICC)/TNM(第7版)进行分类,其中I期39例、II期29例、III期25例、IV期7例。患者中位生存时间为64个月,随访期为0~120个月。本研究获得天津医科大学肿瘤医院伦理委员会批准且患者知情同意。

1.1.2 组织芯片 所有LSCC患者的样本通过H&E染色进行组织学评价。组织芯片由上海超越生物技术有限公司制造。

1.1.3 试剂 CD200R抗体购自美国Abcam公司,二抗购自福建迈新公司,DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,actin抗体购自美国Cell Signaling公司,CCK8试剂盒购自美国Life Technologies公司。

1.1.4 细胞系 肺鳞癌细胞系NCI-H520细胞由本实验室培养和传代,培养基为RPMI 1640和10%胎牛血清。

1.1.5 CD200R siRNA序列合成 为验证CD200R在肿瘤细胞中表达的意义,合成针对CD200R的小干扰RNA,序列为5'-GCAAGGAGAATCATGCTTTAG-3',由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成,合成后按照说明书经Lipo3000试剂进行转染,48 h后收集细胞行相应实验。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法 将石蜡切片依次经过脱蜡,抗原修复,清洗,封闭后,将一抗抗体以1:50比例进行4℃冰箱过夜孵育,PBS清洗3次后,室温进行二抗孵育,30 min之后使用DAB显色,苏木素溶液复染,脱水透明后封片,重复晾干后进行分析。所有染色结果均由两位病理科医师单独评估判定,细胞质及细胞膜呈褐色染色的肿瘤细胞视为阳性。强度的

评分标准为:阴性为0、弱阳性为1分、阳性为2分、强阳性为3分,阳性肿瘤细胞百分比评分标准为:1为1%~50%、2为51%~75%、3为≥76%,将每个样本的得分相乘得到最终评分。评分≥6分定义为高表达,评分<6分定义为低表达。

1.2.2 免疫印迹方法 SDS裂解液裂解细胞后将样品煮沸10 min,取上清用于免疫印迹检测。转膜后封闭1 h,之后加入一抗4℃过夜后PBS洗3次,二抗室温孵育1 h后曝光。

1.2.3 CCK8方法 在96孔板中接种细胞悬液 1×10^3 /100 μ L,培养不同时间点后取出孔板,加入CCK8溶液10 μ L/孔,孵箱内继续孵育1~4 h后检测细胞增殖,使用酶标仪测定450 nm吸光度OD值用以绘制细胞增殖曲线。

1.2.4 克隆形成能力检测 收集单细胞悬液将100~200个细胞接种在100 mm培养板中,持续培养14天以观察克隆生长情况。当细胞克隆清晰可见时,停止培养,多聚甲醛固定后,使用结晶紫染色并通过软件进行计数。

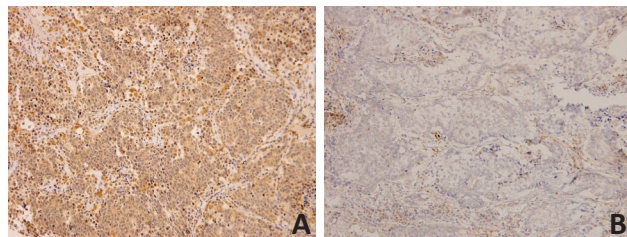
1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。 χ^2 检验用于确定CD200R表达与临床病理参数之间的相关性,使用Kaplan-Meier法评估总体生存(overall survival, OS)期和无病生存(disease free survival, DFS)期,利用Cox风险回归模型进行多因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LSCC组织中CD200R的表达情况

CD200R主要在胞浆和细胞膜着色表达(图1)。55%(55/100)患者的癌组织中CD200R高表达,45%(45/100)为低表达。CD200R表达水平在与患者的临床病理特征之间的关系,包括年龄、性别、吸烟状况、T分期、淋巴结转移、远处转移和临床分期方面,CD200R高表达和低表达之间无显著性相关($P > 0.05$,表1)。



A:高表达;B:低表达

图1 免疫组织化学法检测LSCC患者组织中CD200R的表达(SP×200)

2.2 LSCC组织中CD200R表达水平与患者预后的关系

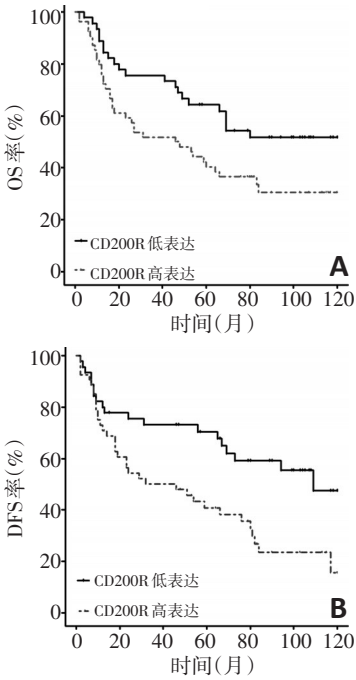
100例LSCC患者组织中CD200R表达与预后之间关系表明,CD200R高表达患者的中位总生存(median OS, mOS)期和DFS期为46个月和32个月,而低表达患

者未达到mOS和中位DFS(median DFS,mDFS)。Kaplan-Meier生存分析进一步表明CD200R高表达与预后不良有关,在LSCC中CD200R高表达患者的OS和DFS更短($P=0.020,P=0.001$,图2)。

表1 LSCC患者组织中的CD200R表达与临床病理特征的关系

特征	例数 (n=100)	CD200R		P
		低表达(n=45)	高表达(n=55)	
年龄(岁)				0.451
≤60	36	18(50.0)	18(50.0)	
>60	64	27(42.2)	37(57.8)	
性别				0.511
男	70	33(47.1)	37(52.9)	
女	30	12(40.0)	18(60.0)	
吸烟状态				0.786
不吸烟	21	10(47.6)	11(52.4)	
吸烟	79	35(44.3)	44(55.7)	
T分期				0.700
T1/T2期	73	32(43.8)	41(56.2)	
T3/T4期	27	13(48.1)	14(51.9)	
淋巴结转移				0.384
无转移	62	30(48.4)	32(51.6)	
有转移	38	15(39.5)	23(60.5)	
远处转移				1.000
无转移	93	42(45.2)	51(54.8)	
有转移	7	3(42.9)	4(57.1)	
临床分期				0.546
I/II期	68	32(47.1)	36(52.9)	
III/IV期	32	13(40.6)	19(59.4)	

()内为%



A:OS率;B:DFS率
图2 LSCC组织中CD200R表达水平与患者预后的关系

2.3 单因素和Cox 风险回归模型多因素分析

单因素分析结果显示,T分期、淋巴结转移、远处转移和CD200R表达与OS有显著性相关;淋巴结转移、远处转移和CD200R表达与DFS有显著性相关。将上述单因素变量纳入Cox 风险回归模型多因素分析,结果表明淋巴结转移,远处转移和CD200R表达是较短的OS和DFS的独立危险因素(表2、3, $P<0.05$)。CD200R表达可作为预测较差OS和DFS的独立影响因素。

表2 影响OS率的单因素和多因素分析

特征	单因素分析		多因素分析	
	风险比(95%CI)	P	风险比(95%CI)	P
年龄(>60岁 vs. ≤60岁)	1.321(0.757 ~ 2.304)	0.327	—	—
性别(男性 vs. 女性)	1.557(0.922 ~ 2.699)	0.096	—	—
吸烟状态(吸烟 vs. 不吸烟)	1.113(0.563 ~ 2.202)	0.758	—	—
T分期(T3/T4期 vs. T1/T2期)	1.971(1.145 ~ 3.394)	0.014	1.647(0.910 ~ 2.983)	0.100
淋巴结转移(有转移 vs. 无转移)	2.332(1.387 ~ 3.919)	0.001	2.179(1.288 ~ 3.685)	0.004
远处转移(有转移 vs. 无转移)	3.290(1.398 ~ 7.744)	0.006	2.954(1.239 ~ 7.040)	0.015
CD200R表达(高表达 vs. 低表达)	1.866(1.091 ~ 3.192)	0.023	1.787(1.042 ~ 3.067)	0.035

表3 影响DFS率的单因素和多因素分析

特征	单因素分析		多因素分析	
	风险比(95%CI)	P	风险比(95%CI)	P
年龄(>60岁 vs. ≤60岁)	0.728(0.427 ~ 1.242)	0.244	—	—
性别(男性 vs. 女性)	0.981(0.542 ~ 1.776)	0.950	—	—
吸烟状态(吸烟 vs. 不吸烟)	0.728(0.397 ~ 1.335)	0.305	—	—
T分期(T3/T4期 vs. T1/T2期)	1.274(0.704 ~ 2.305)	0.424	—	—

表3 影响DFS率的单因素和多因素分析 (续表3)

特征	单因素分析		多因素分析	
	风险比(95%CI)	P	风险比(95%CI)	P
淋巴结转移(有转移 vs. 无转移)	2.497(1.470 ~ 4.241)	0.001	2.262(1.315 ~ 3.893)	0.003
远处转移(有转移 vs. 无转移)	4.197(1.857 ~ 9.488)	0.001	3.662(1.582 ~ 8.479)	0.002
CD200R表达(高表达 vs. 低表达)	2.232(1.277 ~ 3.902)	0.005	2.188(1.246 ~ 3.841)	0.006

2.4 肺鳞癌细胞系中敲低 CD200R 表达对细胞生长和克隆形成能力的影响

免疫印迹法结果显示,敲低 CD200R 后其蛋白表达下调(图3),CCK8 细胞增殖实验结果显示 CD200R 表达下降后细胞的增殖速度减缓(图4, $P<0.05$),克隆形成实验结果显示敲低 CD200R 后克隆数明显减少(图5, $P<0.01$),表明 CD200R 在细胞的生长增殖中发挥一定作用。

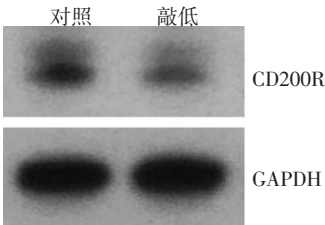


图3 免疫印迹法检测 NCI-H520 细胞中敲低 CD200R 后蛋白表达情况

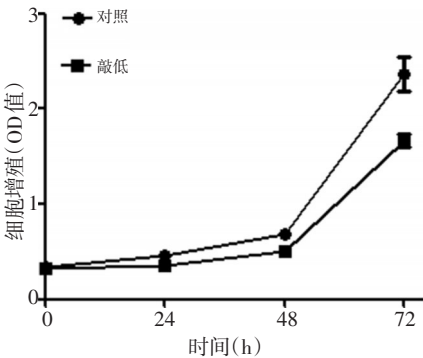


图4 CCK8 实验检测敲低 NCI-H520 细胞中 CD200R 后细胞的增殖情况

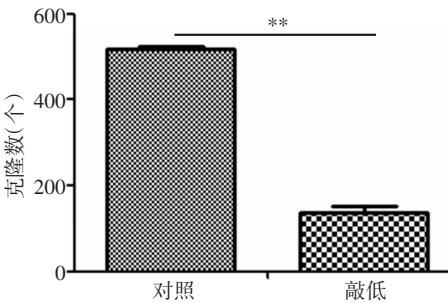


图5 克隆形成实验检测 NCI-H520 细胞中敲低 CD200R 后对细胞克隆数的影响

3 讨论

近年来,免疫疗法已成为继手术及放化疗后的第四位癌症治疗方法,在多种肿瘤中显示出较好疗

效。免疫检查点可防止免疫细胞的过度激活,控制淋巴细胞增生、慢性炎症和自身免疫等反应。抑制免疫检查点途径已成为新型肿瘤治疗方法并受到广泛关注^[6],抗 PD-1 和 CTLA-4 的抗体已被批准用于治疗部分肿瘤并取得了良好效果^[7-8],而其他的免疫检查点仍缺乏相关研究。

CD200R 已知的唯一配体为 CD200,二者之间的相互作用在免疫抑制和调节中非常重要。CD200 在大量细胞上表达,如胸腺细胞、活化 T 细胞、B 细胞、树突状细胞(DC)、血管内皮细胞和毛囊细胞等。而 CD200R 的表达范围则相对比较局限,关于该免疫检查点通路的研究,大部分是集中在炎症和免疫性疾病等方面,在肿瘤中并不多见。关于 CD200 在肿瘤中的表达有部分报道,如在胰腺癌、膀胱癌、结肠癌和卵巢癌中呈高表达^[9-10],且 CD200 也是多发性骨髓瘤和急性髓性白血病的独立预后因素,对患者的 OS 率降低可进行预测。然而,CD200R 在肿瘤中的表达情况鲜有报道。Sun 等^[11]研究发现,CD200R 可在肝细胞肝癌高表达,且和患者的预后相关。也有研究报道,CD200 和 CD200R 在肾脏和膀胱肿瘤中有一定表达,但尚未分析其与临床病理参数和预后的关系^[12]。

本研究采用免疫组织化学法检测 LSCC 组织中 CD200R 的表达发现,55%(55/100)癌组织中 CD200R 呈高表达,45%(45/100)呈低表达。CD200R 表达水平与年龄、性别、吸烟状况、T 分期、淋巴结转移、远处转移和临床分期等无显著性相关。此外,CD200R 高表达患者的 OS 和 DFS 均明显低于 CD200R 低表达者,单因素及多因素分析结果表明,CD200R 可作为预测生存的独立危险因素。

目前,CD200R 在肿瘤中的作用机制仅有部分报道。Pilch^[13]等研究发现激动性抗 CD200R 抗体的应用可改善 TLR7 信号通路介导的抗肿瘤作用,并改变局部肿瘤微环境,降低肿瘤相关巨噬细胞标志物表达和细胞因子 IL-1 β 的产生能力,减缓肿瘤进展。Liu^[14]等研究发现 CD200R 缺陷型小鼠接受 CD200 阳性 B16 黑色素瘤细胞静脉注射后在多个器官表现出大量肿瘤生长,而在野生型小鼠中相同肿瘤的生长受到限制,即 CD200R 缺陷小鼠中肿瘤微环境发生改

变,靶向CD200R信号转导可能干扰肿瘤的转移和生长。Mihirshahi^[15]等研究发现酪氨酸激酶2(Dok2)及其下游蛋白RAS p21蛋白激活剂1(RasGAP)在人和小鼠髓系细胞CD200R信号转导中发挥重要作用,shRNA敲低Dok2和RasGAP后CD200R介导的细胞激活被抑制。本研究在NCI-H520细胞中敲低CD200R表达后,细胞的增殖降低,证实其可能在肿瘤生长中发挥一定作用。关于CD200R在肿瘤细胞和其他免疫细胞中的信号调节机制仍需进一步研究。

综上所述,本研究发现在LSCC组织中CD200R高表达,且与患者的不良预后相关,敲低CD200R后细胞生长增殖能力和克隆形成能力下降。因此,CD200R可作为一种新的肿瘤标志物,用于临床上评估患者预后。而CD200R很有可能是影响肿瘤发生发展的重要免疫检查点之一,对其作用及调节机制的深入研究将为肿瘤治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Shen Y, Pan X, Yang J. Gene regulation and prognostic indicators of lung squamous cell carcinoma: TCGA-derived miRNA/mRNA sequencing and DNA methylation data[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12):22896-22910.
- [2] Mello FW, Melo G, Modolo F, et al. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: literature review and new data from Brazil[J]. J Clin Exp Dent, 2019, 11(1):e62-e69.
- [3] Ghahremanloo A, Soltani A, Modaresi SMS, et al. Recent advances in the clinical development of immune checkpoint blockade therapy[J]. Cell Oncol (Dordr), 2019, 42(5):609-626.
- [4] Gorczynski RM. CD200 and its receptors as targets for immunoregulation[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2005, 6(5):483-488.
- [5] Gao S, Hao B, Yang XF, et al. Decreased CD200R expression on monocyte-derived macrophages correlates with Th17/Treg imbalance and disease activity in rheumatoid arthritis patients[J]. Inflamm Res, 2014, 63(6):441-450.
- [6] Ring EK, Markert JM, Gillespie GY, et al. Checkpoint proteins in pediatric brain and extracranial solid tumors: opportunities for immunotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(2):342-350.
- [7] Ma K, Jin Q, Wang M, et al. Research progress and clinical application of predictive biomarker for immune checkpoint inhibitors[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2019, 19(6):517-529.
- [8] Fan L, Li Y, Chen JY, et al. Immune checkpoint modulators in cancer immunotherapy: recent advances and combination rationales[J]. Cancer Lett, 2019, 456:23-28.
- [9] Lawlor RT, Dapraà V, Girolami I, et al. CD200 expression is a feature of solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas[J]. Virchows Arch, 2019, 474(1):105-109.
- [10] Rexin P, Tauchert A, Hanze J, et al. The immune checkpoint molecule CD200 is associated with tumor grading and metastasis in bladder cancer[J]. Anticancer Res, 2018, 38(5):2749-2754.
- [11] Sun H, Xu J, Huang M, et al. CD200R, a co-inhibitory receptor on immune cells, predicts the prognosis of human hepatocellular carcinoma[J]. Immunol Lett, 2016, 178:105-113.
- [12] 侯睿达,安治国,刘俊婷,等. CD200和CD200R在膀胱和肾脏肿瘤表达的研究[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(10):1661-1663.
- [13] Pilch Z, Tonecka K, Braniewska A, et al. Antitumor activity of TLR7 is potentiated by CD200R antibody leading to changes in the tumor microenvironment[J]. Cancer Immunol Res, 2018, 6(8):930-940.
- [14] Liu JQ, Talebian F, Wu L, et al. A critical role for CD200R signaling in limiting the growth and metastasis of CD200(+) melanoma[J]. J Immunol, 2016, 197(4):1489-1497.
- [15] Mihirshahi R, Barclay AN, Brown MH. Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells[J]. J Immunol, 2009, 183(8):4879-4886.

(2019-06-21收稿)

(编辑:张侃 校对:李玲妹)

作者简介

孙倩 专业方向为肿瘤免疫检查点作用机制,肿瘤微环境免疫抑制机制等。

E-mail:sunqian923@126.com

