

程序性细胞死亡配体 1 在非小细胞肺癌手术切除标本及配对组织芯片中的表达分析*

苗茜, 林根, 徐海鹏, 吴标, 郑晓彬, 蒋侃, 力超[△]

350014 福州, 福建省肿瘤医院·福建医科大学附属肿瘤医院 胸部内科(苗茜、林根、徐海鹏、吴标、郑晓彬、蒋侃), 病理科(力超)

[摘要] 目的: 观察非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)手术大标本及其配对微阵列组织标本(tissue microarrays, TMA)中程序性死亡受体 1(programmed deathligand 1, PD-L1)表达状态, 探索 PD-L1 表达的一致性及其临床意义。方法: 采用免疫组化检测 PD-L1(SP142)在 129 例 NSCLC 手术切除标本及配对 TMA 标本中肿瘤细胞(tumor cells, TC)及微环境浸润性免疫细胞(immune cells, IC)中的表达, 分析 PD-L1 表达的一致性及其与临床病理特征之间的相关性。结果: PD-L1 表达在手术标本和配对 TMA 测定之间经常表现出不一致, 总体不一致率为 41.9%, k 值等于 0.235(一致性差), IC 的不一致率远高于 TC。总体阴性标本(TC0 / IC0)显示出中度的不一致性(49.6%), 100 例(77.5%) 在手术标本和配对 TMA 中均被认为是 TC0; 然而, 只有 74 例(57.4%) 显示出 IC0 的一致性。有 3 例手术标本判读为 IC3, 但在配对 TMA 中未观察到 IC3。与低评分组(TC1 / IC1)相比, 高 PD-L1 评分组(TC3 / TC2 / IC3 / IC2)具有更好的一致性。不同组织学亚型不一致率之间存在趋势差异, 肺鳞癌不一致率为 33.3%, k 值等于 0.108; 肺腺癌不一致率为 48.5%, k 值等于 0.134(一致性差); PD-L1 表达情况与患者总生存情况并无关联。结论: TMA 中的 PD-L1(SP142)表达低估了手术标本中的 PD-L1 状态。手术标本与配对 TMA 中发现了假阳性和假阴性结果。两种类型标本的不一致表达是肿瘤空间异质性的结果, 可以对目前一些 PD-L1 免疫检查点抑制剂临床试验中的 PD-L1 表达与有效率不一致结果做出解释。使用目前临床可获取的病理小标本筛选 PD-L1 抑制剂优势人群还面临着较大的挑战。

[关键词] PD-L1; 免疫组化; 手术切除标本; 微阵列组织标本; 非小细胞肺癌

[中图分类号] R734.2; R34 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.09.011

引文格式: Miao Q, Lin G, Xu HP, et al. PD-L1 (SP142) expression in resected specimens and paired tissue microarrays removed during surgery for non-small cell lung cancer [J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32(9): 823-830. [苗茜, 林根, 徐海鹏, 等. 程序性细胞死亡配体 1 在非小细胞肺癌手术切除标本及配对组织芯片中的表达分析[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(9): 823-830.]

PD-L1 (SP142) Expression in Resected Specimens and Paired Tissue Microarrays Removed during Surgery for Non-Small Cell Lung Cancer

Miao Qian, Lin Gen, Xu Haipeng, Wu Biao, Zheng Xiaobin, Jiang Kan, Li Chao

Department of Thoracic Medicine, Fujian Provincial Cancer Hospital & Cancer Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China (Miao Qian, Lin Gen, Xu Haipeng, Wu Biao, Zheng Xiaobin, Jiang Kan); Department of Pathology, Fujian Provincial Cancer Hospital & Cancer Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350014, Fujian, China (Li Chao)

Corresponding author: Li Chao, E-mail: lichao3501@163.com

This study was supported by Natural Science Foundation of Fujian Province (NO. 2018J01276) and Youth Scientific Research Project of Fujian Provincial Health and Family Planning Commission (NO. 2017-2-7).

[收稿日期] 2019-05-20 **[修回日期]** 2019-08-30

[基金项目] * 福建省自然科学基金(编号:2018J01276); 福建省卫计委青年科研课题(编号:2017-2-7)

[通讯作者] [△]力超, E-mail: lichao3501@163.com

[Abstract] **Objective:** To observe the expression status of

programmed death-ligand 1 (PD-L1, SP142) in large specimens removed during surgery for non-small cell lung cancer (NSCLC) and their paired tissue microarrays (TMA), and explore the consistency of PD-L1 expression and its clinical significance. **Methods:** PD-L1 (SP142) immunohistochemistry assay was used to evaluate PD-L1 (SP142) expression in tumor cells (TC) and tumor-infiltrating immune cells (IC) in resected surgical specimens and matched pairs of TMA in 129 patients with NSCLC, and analyze the consistency of PD-L1 expression and the correlation between the PD-L1 expression and its clinicopathological characteristics. **Results:** PD-L1 expression was frequently discordant between surgical specimens and matched TMA. The overall discordance rate was 41.9%, and k value was equal to 0.235 (poor agreement). The discordance rate of PD-L1 expression in IC was much higher than that in TC. The overall negative specimens (TC0/IC0) showed a moderate discordance (49.6%). A hundred specimens (77.5%) were considered TC0 both in resected surgical specimens and paired TMA. However, only 74 IC0 specimens (57.4%) showed consistency in PD-L1 expression. Three resected specimens were considered IC3, but none IC3 was observed in paired TMA. Compared with the low PD-L1 group (TC1/IC1), the high PD-L1 group (TC3/TC2/IC3/IC2) showed better consistency. There was a difference in discordance rates among different histologic subtypes. The discordance rate of PD-L1 expression in lung squamous cell carcinoma was 33.3%, and k value was equal to 0.408; that in adenocarcinoma of lung was 48.5%, and k value was equal to 0.134; there was no association between PD-L1 expression and gender, tumor stage, smoking history, histology. **Conclusion:** PD-L1 (SP142) expression in TMA specimens underestimate that in resected surgical specimens. False positive and false negative results are found in surgical specimens and paired TMA. The inconsistent expression in two types of specimens is the result of spatial heterogeneity of the tumor, which can explain the inconsistent results of PD-L1 expression and treatment efficiency in some current clinical trials of PD-1 and PD-L1 inhibitors. The use of current clinically available small pathological specimens to screen sensitive population of PD-L1 inhibitors is still facing great challenge.

[**Key words**] PD-L1; Immunohistochemistry; Surgical resected specimen; Tissue microarray; Non-small cell lung cancer

免疫治疗是目前肺癌治疗领域里继手术、化疗、放疗、靶向治疗后新出现的极有潜力的新型治疗方法。该方法通过使肿瘤免疫正常化,减少抗肿瘤的豁免,从而让患者得到持续性的临床获益。程序性死亡受体 1-蛋白及程序性死亡配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-1/PD-L1) 抗体是在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中研究最多的免疫检测点抑制剂。目前,PD-1 及 PD-L1 抗体已被批准在晚期 NSCLC 临床一线及二线使用。PD-L1 检测可用于预测 PD-1/PD-L1 抑制剂的优势人群,PD-L1 表达越高,治疗效果越好。Atezolizumab 是针对 PD-L1 的人源化的 IgG1 单克隆抗体,目前已被批准在 NSCLC 中一线及二线使用^[1-3]。PD-L1 (SP142) VENTANA 法是美国食品药品监督管理局批准的针对 Atezolizumab 使用 PD-L1 补充诊断检测方法。与其他 PD-L1 检测方法不同,该方法除了检测肿瘤细胞 (tumor cells, TC) 中 PD-L1 的表达情况,还检测了免疫细胞 (immune cells, IC) 中 PD-L1 表达情况,高表达的患者 (即评价 $\geq 50\%$ TC 或者 $\geq 10\%$ IC) 可能从 Atezolizumab 的治疗中延长生存^[1]。我们通过检测手术切除标本及其配对微阵列组织标本 (tissue microarrays, TMA) 的 PD-L1 (SP142 VENTANA 法) 表达情况,了解肿瘤内 PD-L1 表达的一致性,并且进一步分析 PD-L1 的表达与临

床病理特征之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本收集及临床资料

纳入 2008 年 10 月至 2010 年 12 月在福建省肿瘤医院接受手术的 NSCLC 患者,收集到经福尔马林固定及石蜡包埋的手术标本 129 例。术后分期根据第 8 版美国癌症联合会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) TNM 系统进行分期,病理类型根据 2015 年世界卫生组织肺癌诊断标本进行分类。患者均未在手术前接受过治疗,所有患者未使用过免疫治疗。

1.2 配对 TMA 的构建

所有供体组织蜡块行常规病理切片后做 HE 染色,病理专家作二次诊断,并在 HE 切片上根据典型病理形态区域作标记,阵列制作利用组织芯片制作仪 (Beecher Instruments, Inc) 在受体蜡块 (空白蜡块) 上打孔 (直径 2.0mm),然后根据 HE 片上精确范围在供体组织蜡块相应位置获取所要组织芯放入受体蜡块阵列孔中,并记录组织编号,重复上述步骤制成阵列块 4 块 (共 150 点),所得的组织芯片的每个点都经过病理诊断。

1.3 染色与判读

在获得手术标本和配对的 TMA 后,将每个 FF-

PE 组织和 TMA 切成 4 μ m, 并使用兔单克隆抗体(克隆 SP142; Ventana, Roche Group, Tucson, AZ)在自动染色平台上进行免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检测(Benchmark ULTRA; Ventana), 使用浓度为 1:60^[1]。使用 OptiView DAB IHC 检测试剂盒(Ventana)和 OptiView Amplification Kit(Ventana)来显示结合的抗 PD-L1 一抗; 切片用苏木精复染。IC 表达被划分为 IC0 vs IC1 vs IC2 vs IC3, TC1/2/3 或 IC1/2/3 定义为肿瘤细胞或肿瘤微环境浸润性免疫细胞中 PD-L1 表达大于等于 1%, TC2/3 或 IC2/3 定义为 PD-L1 表达大于等于 5%; TC3 定义为肿瘤细胞中 PD-L1 表达大于等于 50%, 而 IC3 定义为肿瘤微环境浸润性免疫细胞中 PD-L1 表达大于等于 10%; TC0 与 IC0 为 PD-L1 表达不到 1%。总体判读时以 TC 与 IC 高分作为判读, 如 TC3 分及 IC0 分时, 总体判读仍为 3 分。

1.4 统计学方法

使用 SPSS22.0 软件进行统计学分析, 描述性统计数据用于总结患者的人口统计学和结果。协议统计(Cohen 的 κ 系数)用于评估配对病变之间 PD-L1 表达的异质性。一致性水平被归类为差(≤ 0.4)、一般(0.40~0.75)和良好(≥ 0.75)。Fisher 精确检验用于比较组内的比例。以 $P < 0.05$ 为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般临床特征

129 例患者中年齡大于 60 岁患者 50 例, 占全部人群 38.8%, 小于 60 岁患者 79 例, 占全部人群 61.2%; 男性 88 例, 占全部人群 68.2%, 女性 41 例, 占全部人群 31.8%; 既往吸烟史患者 55 例, 占全部人群 42.6%, 不吸烟患者 74 例, 占全部人群 57.4%; 病理鳞癌、肉瘤样癌、腺癌及腺鳞癌分别 45 例、1 例、70 例及 13 例, 占全部人群 34.9%、0.8%、54.3% 及 10.1%; TNM(AJCC 分期第 7 版)I 期、II 期、III 期、IV 期分别为 28 例、26 例、60 例及 15 例, 占全部人群 21.7%、20.2%、46.5% 及 11.6%(表 1)。

表 1 患者的一般临床特征、病理类型及 TNM 分期

Table 1. General Clinical Characteristics, Pathological Types and TNM Stage of Patients

Variable		N	N %
Age	$\leq 60y$	79	61.2
	$> 60y$	50	38.8

(Table 1 continues on next page)

(Continued from previous page)

Variable		N	N %
Sex	Male	88	68.2
	Female	41	31.8
Smoking history	No	74	57.4
	Yes	55	42.6
Histology	Squamous cell carcinoma	45	34.9
	Sarcomatoid carcinoma	1	0.8
	Adenocarcinoma	70	54.3
Adenosquamous carcinoma		13	10.1
	TNM stage		
	I	28	21.7
II	26	20.2	
III	60	46.5	
IV	15	11.6	

2.2 手术标本与配对 TMA 中 PD-L1 表达比较

所有的标本中有 59 例(46.0%)手术标本判读阳性(TC1/2/3 和/或 IC1/2/3), 而在相应配对的 TMA 中只有 31 例(24.0%)判读阳性(TC1/2/3 和/或 IC1/2/3); 24 例(18.7%)手术标本判读阳性(TC2/3 和/或 IC2/3), 而在相应配对的 TMA 中只有 18 例(14.0%)判读阳性(TC2/3 和/或 IC2/3); 10 例(8.7%)手术标本判读强阳性(TC3 和/或 IC3), 在相应配对的 TMA 中有 8 例(6.2%)判读强阳性(TC3 和/或 IC3), 见表 2 和图 1(手术标本及 TMA 的 TC 均判读强阳性)。总体不一致率为 41.9%, k 值等于 0.235(一致性差)。IC 的不一致率远高于 TC(39.5% vs 15.5%), k 值为 0.113 vs 0.489(一致性差与中等一致性)。总体阴性(TC0/IC0)显示出中度的不一致率为 49.6%, 100 例(77.5%)在手术标本和配对 TMA 中均被认为是 TC0, 然而, 只有 74 例(57.4%)显示出 IC0 的一致性。有 3 例手术标本判读为 IC3, 但在配对 TMA 中未观察到 IC3。与低评分组(TC1/IC1)相比, 可以看到高 PD-L1 评分组(TC3/TC2/IC3/IC2)具有更好的一致性。不同组织学亚型不一致率之间存在趋势差异, 鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma, SCC)中 TC1-3/IC1-3 评分不一致率为 33.3%(手术标本为 46.7% 阳性表达, 配对 TMA 为 26.7% 阳性表达), k 值等于 0.408; 腺鳞癌(adenosquamous carcinoma, ADC)中 TC1-3/IC1-3 评分不一致率为 48.5%(手术标本为 45.2% 阳性表达, 配对 TMA 为 22.6% 阳性表达), k 值等于 0.134(一致性差); 其他病理类型中 TC1-3/IC1-3 评分不一致率为 35.7%(手术标本为 57.1% 阳性表达, 配对 TMA 为 28.6% 阳性表达), k

值等于 0.444, 详见表 2~4。在大部分标本中, 配对 TMA 较手术标本都低评了 PD-L1 的表达, 详见图 2 (手术标本的 IC 判读强阳性, TMA 的 IC 判读阴性)。但是在少数几个样本中见到手术标本阴性或弱阳性而配对 TMA 判读阳性, 详见图 3 手术标本的 TC 判读弱阳性, TMA 判读强阳性)。6 例在手术标本中判读阴性 (TC0/IC0) 的标本在配对 TMA 中判读为阳性, 2 例判读为 TC1, 4 例判读 IC1。与 TC 相关的不一致率为 31%, 而与 IC 相关的不一致率为 69%。分析中可见, 在手术标本中 IC 阳性率 (39%) 高于 TC 阳性率 (19%), 但是在 TMA 标本中 IC 与 TC 的阳性率都为 15%, TC3 与 IC3 的样本并无关联。

表 2 手术标本与配对 TMA 标本最终 SP142 判读
Table 2. Final Interpretation of SP142 Stain in Surgical Specimens and Paired Tissue Microarrays

Surgical sample	Chip sample			
	-	1+	2+	3+
-	100	3	1	0
1+	27	3	5	0
2+	5	3	3	3
3+	2	1	2	5

2.3 PD-L1 表达与总生存曲线的关系

就总生存期而言, 无论是通过手术标本 IHC 染

色结果来进行判断 (图 4), 还是通过配对 TMA 标本结果进行判断, 与 PD-L1 表达阴性的患者相比, 表达 PD-L1 阳性 (TC1/2/3 和或 IC1/2/3) 的患者都没有无优势, 差异无统计学意义 (55.2 个月 vs 55.1 个月, $P = 0.624$; 53.5 个月 vs 55.2 个月, $P = 0.833$)。

表 3 手术标本与配对 TMA 标本 TC SP142 判读
Table 3. Interpretation of SP142 Stain in Tumor Cells in Surgical Specimens and Paired Tissue Microarrays

Surgical sample	Chip sample			
	-	1+	2+	3+
-	100	3	1	0
1+	6	1	1	0
2+	2	2	3	3
3+	2	0	0	5

表 4 手术标本与配对 TMA 标本 IC SP142 判读
Table 4. Interpretation of SP142 Stain in Immune Cells in Surgical Specimens and Paired Tissue Microarrays

Surgical sample	Chip sample			
	-	1+	2+	3+
-	100	3	1	0
1+	6	1	1	0
2+	2	2	3	3
3+	0	1	2	5

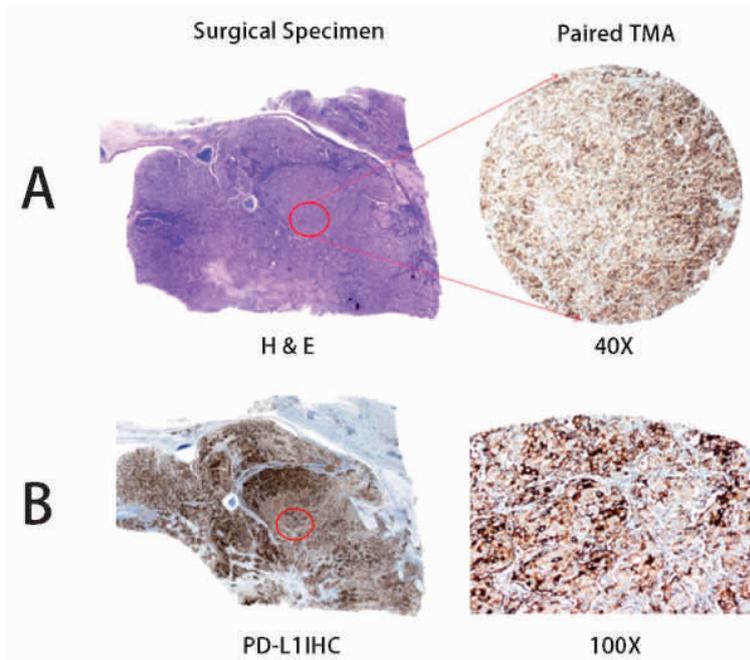


图 1 手术标本强阳性, 配对 TMA 标本强阳性 (TC)

Figure 1. Strongly Positive Expression in Both Surgical Specimens and Paired Tissue Microarrays (Tumor Cells)

Panel A and B show hematoxylin and eosin stain and immunohistochemical staining of PD-L1 (SP142) in surgical specimens and paired tissue microarrays. The red circle indicates the area of tissue microarrays in corresponding resected specimens. PD-L1 expression is highly concordant between surgical specimens and paired TMA.

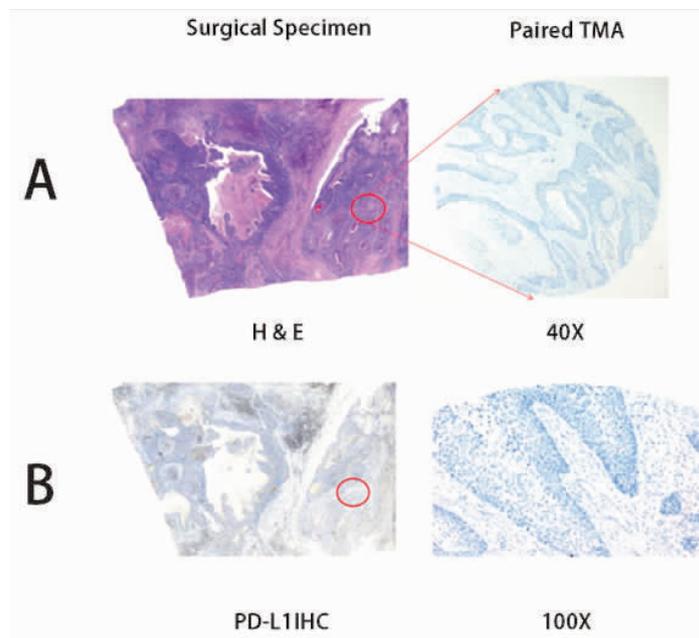


图 2 手术标本强阳性,配对 TMA 阴性 (IC)

Figure 2. Strongly Positive Expression in Surgical Specimens and Negative Expression in Paired Tissue Microarrays (Immune Cell)

Panel A and B show hematoxylin and eosin stain and immunohistochemical staining of PD-L1 (SP142) in surgical specimens and paired tissue microarrays. The red circle indicates the area of tissue microarrays in corresponding resected specimens. PD-L1 (SP142) expression in TMA specimens underestimate that in matched resected surgical specimens.

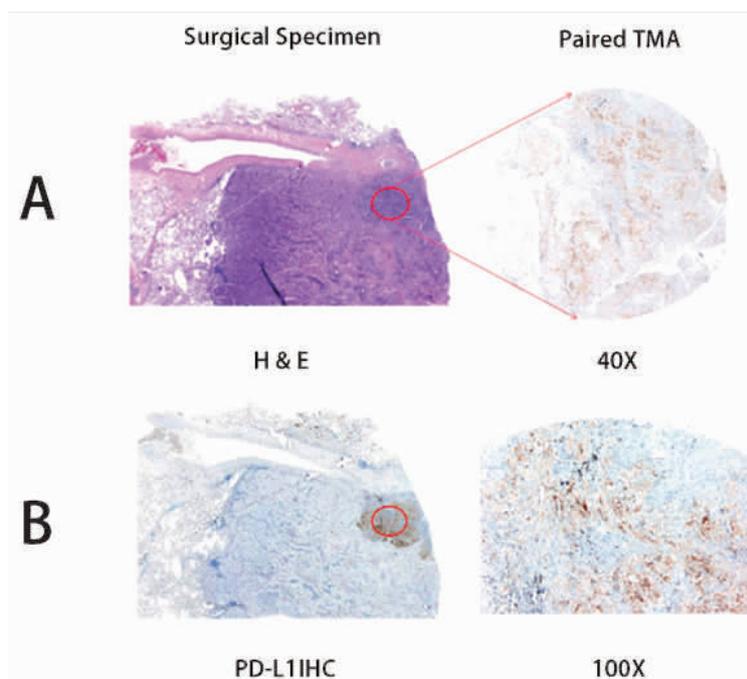


图 3 手术标本弱阳性,配对 TMA 强阳性 (TC)

Figure 3. Weakly Positive Expression in Surgical Specimens and Strongly Positive Expression in Paired Tissue Microarrays (Tumor Cells)

Panel A and B show hematoxylin and eosin stain and immunohistochemical staining of PD-L1 (SP142) in surgical specimens and paired tissue microarrays. The red circle indicates the area of tissue microarrays in corresponding resected specimens. PD-L1 (SP142) expression in TMA specimens underestimate that in matched resected surgical specimens.

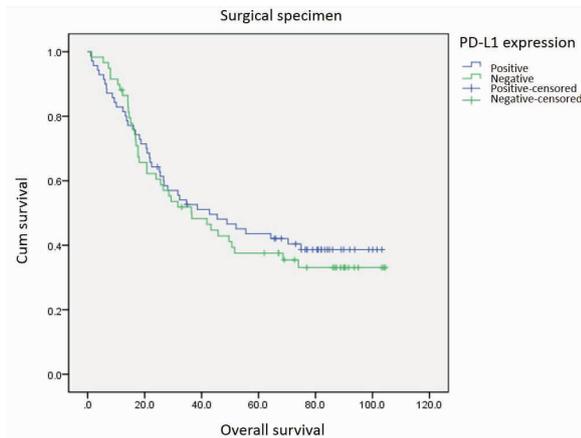


图 4 总生存期与手术标本中 PD-L1 表达情况的相关性
Figure 4. Correlation between Overall Survival and PD-L1 Expression of Surgical Specimen

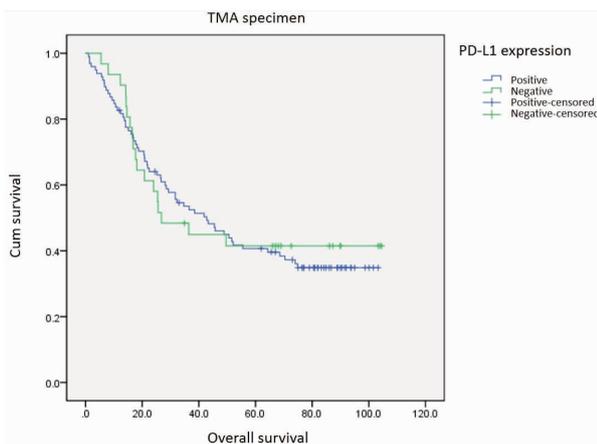


图 5 总生存与 TMA 标本中 PD-L1 染色情况的相关性
Figure 5. Correlation between Overall Survival and PD-L1 Expression of TMA Specimen

3 讨论

在免疫治疗的运用中,有效的疗效预测因子有助于筛选能够获得最佳疗效受益人群,也是广受关注的热点之一。PD-L1 是目前研究和临床中应用最多的生物标志物^[4-5],但是,由于 PD-L1 本身检测试剂克隆号较多,不同检测平台以及不同的判读标准等问题导致其“预测角色”需要谨慎而辩证地对待^[6]。PD-L1 主要表达在肿瘤细胞表面或肿瘤浸润的微环境中,但不是所有肿瘤细胞都有表达 PD-L1^[3],并且 PD-L1 的表达本身存在时间与空间的异质性,即同一个患者不同时期的 PD-L1 的表达可能是不一致的,不同病灶之间甚至同一病灶之间都存在这种表达不一致的异质性。因此,以检测 PD-L1 表达情况作为预测免疫治疗疗效的指标时存在一定局限性,尤其目前临床上对晚期肺癌患者往往使用穿刺小标本进行检测,这会导致更加明显的不稳定

性^[7-8]。

目前临床在进行 PD-L1 检测时送检的病理标本往往为气管镜或肺穿刺及淋巴结穿刺的小标本,小标本是否能够完全代表整个肿瘤的 PD-L1 表达情况呢?本研究基于这个想法进行了初步探索。我们收集了 129 例手术标本,以手术本来模拟整个肿瘤,配对 TMA 来模拟临床送检的小标本,通过检测 PD-L1 表达的情况,探讨两者间一致性问题。TMA 技术是将若干石蜡包埋块上的各种组织转移到一个新石蜡块上重新构建微型化高通量组织阵列的方法,可以有效地进行各类临床病理组织的观察和研究。TMA 技术可以在一块切片上同时放置几十到一百个样品,进行高通量的基因和蛋白质分析,且能够充分利用组织资源,将多个样品的平行实验一次性完成。这项技术近些年主要用于鉴定肿瘤特征的生物标志物,并可用于进行预测标志物筛选或通过回顾性研究寻找生物疗法的潜在靶点^[9-11]。

有几项研究对 NSCLC 的手术标本及相应穿刺小标本进行了 PD-L1 表达的一致性探索,但大多数研究的结果都表现出的一致性。其中,仅有 Kitazono 等^[12]的研究显示了良好的一致性,该研究纳入了 79 例患者,其手术标本与活检小标本的一致性高达 92%。但 Ilie 等^[9]开展的另外一项研究纳入了 160 例 NSCLC 患者,分析了手术前诊断小标本与术后标本的 PD-L1 表达情况,无论在 TC 还是 IC 的判读上都有较差的一致性,在判读阴性的小标本中与术后标本判读的不一致性(57/128, 46%)。Kitazono 的研究使用的 PD-L1 检测试剂与 Ilie 使用的检测试剂克隆号不一致可能是导致结论差异较大的原因,Kitazono 的研究使用的 PD-L1 检测抗体为 catalog no. 4059, Iliie 使用的 PD-L1 检测抗体为 SP142。本研究结果与 Ilie 研究相似(总体不一致率为 41.9%)。在所有标本中,小标本均较手术标本低判了 PD-L1 的表达,这一点与绝大多数研究相似。本研究除了发现配对 TMA 低判 PD-L1 的表达的情况外,还发现了配对 TMA 标本高判的情况,这主要与肿瘤的异质性特别是空间异质性有关。本研究与 Ilie 均使用 SP142 进行 PD-L1 检测,不同之处则在于本研究使用手术标本与其配对 TMA 进行比较,而非术前穿刺小标本,这在最大限度上减少了肿瘤的空间异质性与时间异质性。

另外,我们的研究还发现 IC 的不一致率远高于 TC(39.5% vs 15.5%),*k* 值为 0.113 vs 0.489(一致性差与中等一致性)。这种差异主要是病理学家对

于 IC 的判读困难造成的,TC 通常显示为膜染色,IC 显示为细胞质染色,与小淋巴细胞形态难以鉴别,均表现为点状信号,因此病理学家对于 IC 的判断似乎更加困惑,这一点在既往研究及我们的研究中都可以看到^[3]。

另外 TC 是阳性肿瘤细胞与肿瘤细胞总数的比值,IC 的判读是对于阳性细胞占肿瘤区域的比值,区域主观性更强更模糊,除此之外,病理医师对免疫细胞的观察能力的不同,这些都导致不同病理科医生的判读结果一致性差。这一点在蓝印计划中同样得到证实,病理学家在对任何抗体染色的 TC 进行评分时显示出极好的一致性,但对用任何抗体染色的 IC 评分差异较大^[7]。

在石蜡包埋组织的 IHC 研究中,在使用 5% 的细胞染色阈值判读阳性标准时,不同文献报道的 PD-L1 阳性表达范围从 19.6% 到 57.5%^[12-14]。在我们的研究中,以同样 5% 的细胞染色作为阈值判读的阳性率仅为 24 例(18.7%)(TC3/2 和/或 IC3/2),远低于其他研究数据,这可能与本研究使用 SP142 抗体有关。Rimm 等^[13]的研究在 2 个独立的染色平台上评估了 4 种不同的 PD-L1 抗体,由多名病理科医生盲态下对 4 种不同克隆号的 PD-L1 检测判读的一致性进行了比较,研究中比较了 DakoLink 48 平台上的 28-8 抗体,Dako Link 48 平台上的 22c3 抗体,Ventana Benchmark 平台上的 SP142 抗体和 Leica Bond 平台上的 E1L3N 抗体。在 90 个样本中,SP142 抗体的判读与其余三个克隆号的判读结果显示了统计学上低判差异,而另外 3 个克隆号的判读结果显示了较好的一致性。一些研究发现 PD-L1 的表达率可能与肿瘤分期、预后有关^[14-17],但 2019 年发布的 EXPRESS 研究结果则显示 PD-L1 的表达与年龄、性别、病理类型、吸烟史、原发灶或转移灶都没有相关性,而是主要跟 EGFR 及 ALK 是否突变状态有关,这是目前真实世界研究中关于 PD-L1(22C3 抗体)最大样本量的数据。本研究为中国较大样本量的真实数据研究,结果显示,PD-L1 的表达情况与患者的总生存情况也无相关性,与 EXPRESS 研究类似^[18]。由于本研究样本量较小,该结果尚需在规模更大的患者组中验证。

PD-L1 在 TMA 样本中往往出现低判,这部分解释了临床治疗时部分 PD-L1 阴性的患者接受免疫治疗仍可能有效,因此在临床活检标本出现阴性的情况下,我们需慎重对待,尽可能多结合其他免疫预测指标综合考虑,比如需要结合 TMB 等其他标志物

避免遗漏获益患者。本研究在避免了时间异质性的基础上手术标本与配对 TMA 仍表现出非一致性,这可能与空间异质性有关,因此如果临床操作可行的话,进行多点穿刺送检标本的 PD-L1 表达可能更有指导意义。

我们的研究未对标本的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase,ALK)及鼠类肉瘤病毒癌基因(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog,KRAS)情况进行评估,因此并未进一步分析 PD-L1 表达与 EGFR、ALK 及 KRAS 之间的关联。有证据表明,驱动基因 EGFR 的突变激活免疫逃避,此外,EGFR 酪氨酸激酶抑制剂治疗可下调 PD-L1 在 NSCLC 细胞系中的表达。这与目前研究中 EGFR 突变的患者 PD1/PD-L1 单抗治疗效果欠佳有一定相符性^[18],EXPRESS 中也提到 EGFR 突变患者免疫治疗效果不好,各大指南中目前也是排除 EGFR、ALK 突变患者在一线使用免疫治疗。另外,本研究为术后标本,生存预后主要与分期有关,因此在统计权重上占过多比例可能导致其他因素与预后的相关性不强。最后,本研究最大的局限性在于回顾性研究,且没有 PD-1/PD-L1 单抗后续治疗的进一步研究。

总体而言,在不尽如人意的临床数据中大家认识到,尽管 PD-L1 不是一个最佳的生物标志物,但是在目前有限的预测指标中仍是可用的生物标志物。在强阳性的判读中仍然有较好的指导意义,但是在中等阳性及阴性的判读中,小标本是否能够代表全身 PD-L1 表达状态的意义需要慎重考虑,对于选择优势人群或者剔除非优势人群仍然存在较大的困扰。多点穿刺标本减少空间异质性可能值得在临床进行推荐,这需要更多的临床研究进一步证实。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论

文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Herbst RS, Soria JC, Kowanz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients[J]. *Nature*, 2014, 515(7528): 563-567.
- [2] Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 255-265.
- [3] Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(24): 2288-2301.
- [4] Wu X, Zhang H, Xing Q, et al. PD 1 + CD8 + T cell are exhausted in tumors and functional in draining lymphnodes of colorectal cancer patients[J]. *Br J Cancer*, 2014, 111(7): 1391-1399.
- [5] Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8 + T cells in melanoma patients [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(5): 2046-2058.
- [6] 陈正庭, 曹轲, 常莉, 等. 放疗联合免疫检查点抑制剂在晚期非小细胞肺癌中的研究进展 [J]. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(1): 86-92.
- [7] Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the blueprint PD-L1 IHC assay comparison Project [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(2): 208-22.
- [8] McLaughlin J, Han G, Schalper KA, et al. Quantitative assessment of the heterogeneity of PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2016, 2(1): 46-54.
- [9] Ilie M, Long-Mira E, Bence C, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(1): 147-153.
- [10] Albanghali M, Green A, Rakha E, et al. Construction of tissue microarrays from core needle biopsies - a systematic literature review [J]. *Histopathology*, 2016, 68(3): 323-332.
- [11] Franco R, Caraglia M, Facchini G, et al. The role of tissue microarray in the era of target-based agents [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(6): 859-869.
- [12] Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, et al. Reliability of small biopsy samples compared with resected specimens for the determination of programmed death-ligand 1 expression in non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2015, 16(5): 385-390.
- [13] Rimm DL, Han G, Taube JM, et al. A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(8): 1051-1058.
- [14] Chen Y, Mu C, Huang J, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study [J]. *Tumori*, 2012, 98(6): 751-755.
- [15] Mu C, Huang J, Chen Y, et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(3): 682-688.
- [16] Yang C, Lin M, Chang Y, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(7): 1361-1369.
- [17] Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(2): 157-163.
- [18] Dietel M, Savelov N, Salanova R, et al. Real-world prevalence of programmed death ligand 1 expression in locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: The global, multicenter EXPRESS study [J]. *Lung Cancer*, 2019, 134: 174-179.