

浸润性膀胱癌分子分型的预后研究及 PD-L1 的表达意义

白钰明¹ 张国文¹ 马可为² 施琳^{1,3}

[摘要] **目的:**探讨浸润性膀胱癌(invasive bladder cancer, IBC)分子分型与预后的关系以及 PD-L1 在不同分子分型中的表达情况。**方法:**回顾性分析 2016 年 1 月—2018 年 12 月内蒙古医科大学附属医院 122 例 IBC 患者的临床资料并进行了随访;采用免疫组织化学方法检测 CK14、CK20 在 IBC 中的表达,将 IBC 分为基底型(CK14+, CK20-)、管腔型(CK14-, CK20+)和双阴型(CK14-, CK20-)三种分子亚型;比较三组患者的临床病理特征;比较不同分子分型膀胱癌患者的生存率;分析 PD-L1 的表达与分子亚型的相关性。**结果:**122 例患者中,基底型 43 例,管腔型 56 例,双阴型 23 例;与管腔型肿瘤比较,基底型和双阴型肿瘤的病理分期多在 T₂ 期以上;与管腔型、双阴型肿瘤患者比较,基底型肿瘤患者更易发生远处转移;管腔型膀胱癌患者的生存率显著高于基底型和双阴型膀胱癌患者($P < 0.05$);与管腔型和双阴型比较,PD-L1 在基底型 IBC 中高表达($P < 0.05$)。**结论:**与管腔型肿瘤患者比较,基底型和双阴型肿瘤患者预后较差;与管腔型和双阴型肿瘤相比,PD-L1 在基底型肿瘤中高表达;提示 PD-L1 可能成为该型患者潜在的免疫治疗靶点。

[关键词] 浸润性膀胱癌;预后;分子分型;免疫组织化学;分子靶点

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2022.03.006

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Prognostic analysis of molecular subtypes of invasive bladder cancer and PD-L1 as a potential prognostic marker

BAI Yuming¹ ZHANG Guowen¹ MA Kewei² SHI Lin^{1,3}

(¹Department of Pathology, Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, 010010, China; ²Department of Urology, Inner Mongolia People's Hospital; ³Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University)

Corresponding author: SHI Lin, E-mail: 13684757835@163.com

Abstract Objective: To investigate the relationship between molecular classification of invasive bladder cancer (IBC) and prognosis, along with the expression level of PD-L1 in different molecular subtypes of IBC. **Methods:** We collected and operated retrospective analysis of the medical record data and follow-up information of total 122 patients at Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University from Jan. 2016 to Dec. 2018. Based on the expression level of biomarkers of CK14 and CK20 detected by immunohistochemistry staining, clinical cases were categorized as basal (CK14+, CK20-) IBC, luminal (CK14-, CK20+) IBC and double-negative (CK14-, CK20-) IBC. We compared the survival rates of patients, as well as the clinicopathological features of the three subtypes. We also elucidated the expression pattern of PD-L1 in different subgroups of IBC. **Results:** Total 122 cases were classified as 43 cases of basal IBC, 56 cases of luminal IBC and 23 cases of double negative subtype IBC. As for pathological stages, compared with luminal IBC, the basal IBC and double negative IBC were more than stage T₂. Patients with basal IBC were more likely to have distant metastasis. Meanwhile, patients with luminal IBC showed significantly higher survival rate than those patients with basal subtype ($P < 0.05$) or double negative subtype ($P < 0.05$). Additionally, we detected relative higher PD-L1 expression level in basal IBC compared with that in luminal IBC or in double-negative IBC ($P < 0.05$). **Conclusion:** Among three subtypes of IBC, patients with basal IBC or double negative IBC had a worse prognosis. Compared with luminal and double negative IBC, PD-L1 expression level was higher in basal IBC, suggesting that PD-L1 may be a potential target for immunotherapy to benefit those patients.

Key words invasive bladder cancer; prognosis; molecular subgroup; immunohistochemistry; molecular target

膀胱癌分为肌层浸润性膀胱癌和非肌层浸润性膀胱癌,肌层浸润性膀胱癌大多分期晚,虽然采

用根治性膀胱切除术,但术后仍有较高的转移和死亡风险^[1];T₁期非肌层浸润性膀胱癌虽然未浸润到肌层,但其仍具有较高的复发率,因而膀胱癌总体预后较差。决定其预后的传统因素包括肿瘤分级、脉管侵犯和非尿路上皮癌(如小细胞癌)、淋巴结转移、TNM分期等^[2],有关膀胱癌分子分型与其预后的关系研究报道较少。本研究对 132 例浸润

¹内蒙古医科大学基础医学院病理学教研室(呼和浩特, 010010)

²内蒙古自治区人民医院泌尿外科

³内蒙古医科大学附属医院病理科

通信作者:施琳, E-mail: 13684757835@163.com

性膀胱癌(invasive bladder cancer, IBC)患者术后生存情况进行随访分析,并探讨了分子分型与预后的相关性;并检测了PD-L1在不同分子分型IBC中的表达,以期IBC的治疗提供新靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析2016年1月—2018年12月内蒙古医科大学附属医院病理科收录的经手术治疗并确诊为IBC的132例患者临床病理资料。由2位病理科医生核实所有标本的苏木精-伊红(HE)切片,确认肿瘤组织学类型、分级、病理分期、脉管侵犯、淋巴结转移等各种病理参数。纳入标准:①所有患者均接受经尿道膀胱肿瘤切除术或根治性膀胱切除术;②术后病理标本都明确诊断为浸润性尿路上皮癌;③术后石蜡标本保存完整,待测组织充分;④临床和病理资料完整;⑤经长期随访,有影像学证据证实疾病进展。排除标准:①石蜡标本缺失或临床病理资料不完整;②疑似诊断病例合并其他恶性肿瘤或重大疾病;③从手术至随访时间<6个月内出现疾病进展,视为无效手术;④电话随访失访或拒绝提供信息的患者。以查阅病历和电话的方式随访患者,记录患者的生存情况(死亡或截至查找资料时存活)、具体死亡时间、死亡病因,计算总生存期(overall survival, OS)。OS为手术至任何病因引起死亡的时间间隔,在截至随访时仍生存,以最后一次随访日期为终止观察日期。随访截止日期为2020年12月31日,失访5例。

1.2 免疫组织化学

所有石蜡标本均作4 μm厚的连续组织切片,采用免疫组化SP法进行检测。组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化及高温抗原修复后,分别进行一抗孵育并4℃过夜,其中CK14和CK20为即用型抗体,均购自福州迈新公司;PD-L1稀释浓度为1:200,购自美国CST公司。二抗孵育后进行DAB显色苏木素复染,然后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片观察。

1.3 免疫组化结果判断

CK14和CK20以肿瘤细胞的细胞质着色为阳性表达。综合考虑染色强度和阳性细胞数,采用半定量积分法判定免疫组化染色结果,计算阳性细胞百分数并赋予分值,≤5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分;观察着色强度并赋予分值,无着色为0分,浅黄色为1分,黄色为2分,棕黄色为3分。结果判定:本实验中每张切片随机取5个400倍视野,每个视野均进行阳性细胞百分比计分与着色强度计分。上述2种计分结果相乘,0~1分为阴性(-);2~3分为弱阳性(+);4~6分为中等阳性(++);7~12分为强阳性(+++)^[3];PD-L1以

肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞的细胞膜着色为阳性表达,具体判读标准见参考文献[4]。

1.4 IBC的分子分型

由于基底型肿瘤高表达CK14,管腔型肿瘤高表达CK20^[5-6],本研究以CK20和CK14两种蛋白的表达水平为标准,将所有入组患者分为基底型(CK14+,CK20-)、管腔型(CK14-,CK20+)以及双阴型(CK14-,CK20-)三种分子亚型。

1.5 观察指标

①比较不同分子分型膀胱癌的临床病理特征;②比较不同分子分型膀胱癌患者的生存率;③比较不同分子分型膀胱癌患者PD-L1的表达情况。

1.6 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,分类变量采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法;相关性分析采用Spearman分析;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IBC的分子分型结果

排除5例失访者以及5例CK14和CK20均阳性表达患者,共入组122例患者。免疫组织化学方法检测结果显示,基底型43例(35.2%),管腔型56例(45.9%),双阴型23例(18.9%);PD-L1阳性39例(32.0%),阴性83例(68.0%)。

2.2 不同分子分型的IBC临床病理特征比较

不同分子亚型与患者临床病理特征关系如表1所示, χ^2 检验显示:三种分子亚型在年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤数目、组织学变异、肿瘤分级、脉管浸润、淋巴结转移、有无复发方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。而在肿瘤病理分期和远处转移方面比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与管腔型肿瘤比较,基底型和双阴型肿瘤的病理分期多在T₂期以上;与管腔型和双阴型肿瘤患者比较,基底型肿瘤患者更易发生远处转移。

2.3 不同分子分型IBC患者的生存率比较

不同分子分型膀胱癌患者的生存率比较,差异有统计学意义($P<0.05$);其中管腔型膀胱癌患者的生存率显著高于基底型和双阴型膀胱癌患者,差异均有统计学意义($P<0.05$);而基底型患者与双阴型患者的生存率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.4 PD-L1在IBC不同分子分型中的表达

CK14和CK20分别作为IBC基底型、管腔型肿瘤的标志物,比较PD-L1与CK14和CK20表达相关性。结果如表3所示,PD-L1表达与CK14表达呈正相关($P<0.05$),与CK20表达呈负相关($P<0.05$);PD-L1在基底型肿瘤中表达上调,与管腔型和双阴型肿瘤比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表4、图1。

表 1 不同分子分型的 IBC 患者的临床病理特征比较

例(%)					
变量	基底型 (n=43)	管腔型 (n=56)	双阴型 (n=23)	χ^2	P 值
年龄				4.653	0.098
≤70 岁	32(74.4)	36(64.3)	11(47.8)		
>70 岁	11(25.6)	20(35.7)	12(52.5)		
性别				0.633	0.729
男	34(79.1)	46(82.1)	20(87.0)		
女	9(20.9)	10(17.9)	3(13.0)		
肿瘤大小				3.424	0.18
≤3 cm	23(53.5)	40(71.4)	14(60.9)		
>3 cm	20(46.5)	16(28.6)	9(39.1)		
肿瘤数目				1.896	0.388
单发	36(83.7)	44(78.6)	21(91.3)		
多发	7(16.3)	12(21.4)	2(8.7)		
组织学变异				2.856	0.24
有	15(34.9)	13(23.2)	4(17.4)		
无	28(65.1)	43(76.8)	19(82.6)		
肿瘤分级				2.535	0.281
低级别	36(83.7)	51(91.1)	18(78.3)		
高级别	7(16.3)	5(8.9)	5(21.7)		

表 2 不同分子分型 IBC 患者的生存率比较

分子分型	例数	生存例数	生存率/%	χ^2	P 值
基底型	43	27	62.8		
管腔型	56	48	85.7	7.677	0.022
双阴型	23	15	65.2		

表 3 PD-L1 与 CK14 及 CK20 的相关性

PD-L1	CK14		CK20	
	阴性	阳性	阴性	阳性
阴性	54	29	33	50
阳性	13	26	26	13
P 值	0.001		0.005	
r_s	0.297		-0.251	

表 4 PD-L1 与 IBC 分子分型的相关性

分子分型	例数	PD-L1		χ^2	P 值
		阴性	阳性		
基底型	43	17	26		
管腔型	56	48	8	25.214	0
双阴型	23	18	5		

3 讨论

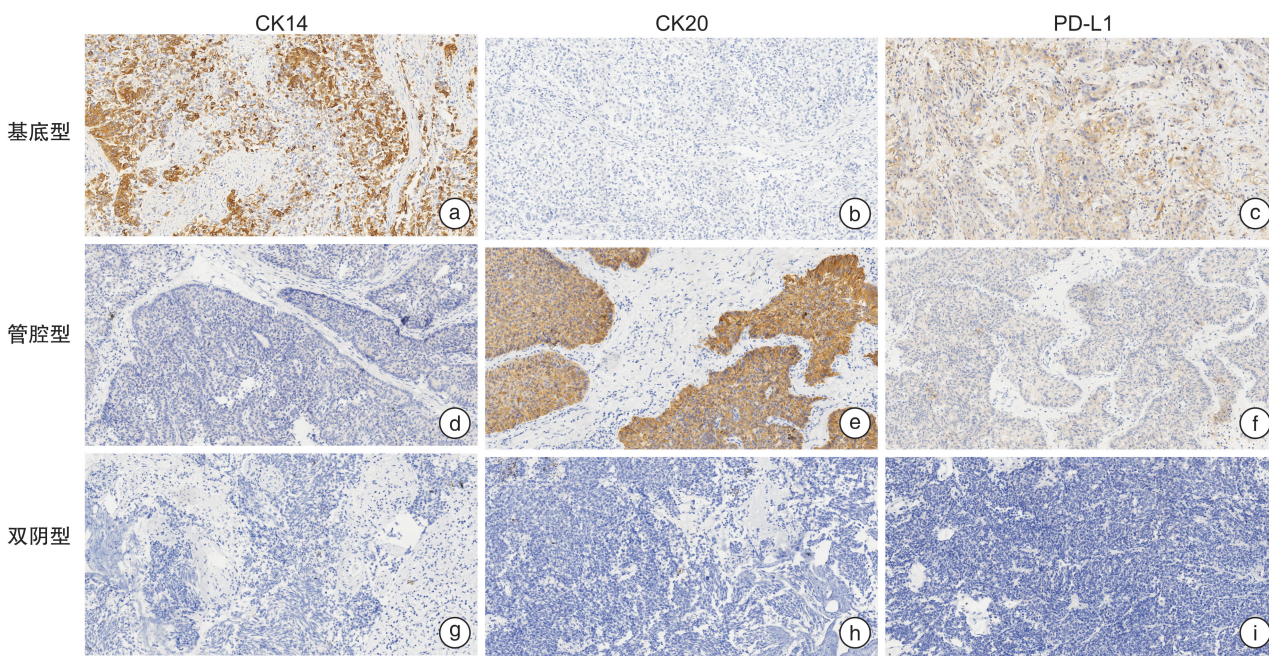
膀胱癌是一种常见的泌尿系统恶性肿瘤,分为肌层浸润性膀胱癌与非肌层浸润性膀胱癌。T₁ 期膀胱癌虽然归为非肌层浸润性膀胱癌,但其具有许多肌层浸润性膀胱癌的遗传特征,在患者确诊后总死亡率高达 33%^[7];在接受根治性膀胱切除术后的肌层浸润性膀胱癌患者中,5 年生存率仅为 39%

~66%^[8]。因此寻找一种可以独立预测膀胱癌生存风险的预后因子显得尤为重要。目前国内外研究发现影响患者术后的预后因素有临床和病理分期,包括肿瘤浸润状态和有无淋巴结转移(TNM 分期)、肿瘤分级、脉管侵犯和非尿路上皮癌(如小细胞癌)^[2]。最近的研究显示分子分型为影响膀胱癌预后的重要因素^[3],常见膀胱癌分子分型的方案有以下四种:TCGA 四分法(I~IV 型);NCU 二分法(管腔样型、基底样型);MDA 三分法(管腔样型、基底样型、P53 样型);Lund 五分法(基底样 A 型、基底样 B 型、基因不稳定型、鳞癌型、未筛选型)^[9]。这些分型有很多共性,比如基底型和管腔型的存在。然而,由于分子分型备选指标的不同,其预后也不尽相同,这就需要我们探索几种具有代表性的指标来预测膀胱癌的进展,以提供有效的临床诊疗手段。

在个体化精准医学时代,肿瘤分子分型是肿瘤研究的热点之一。LUND 研究小组用免疫组化方法检测 28 种蛋白抗体验证了基于 mRNA 的分子分型,其中基底型肿瘤组织高表达 CK14 和 CK5/6,低表达 GATA3 和 FOXA3^[5]。Choi 等^[6]研究证实 CK5/6 和 CD44 可作为基底型肿瘤的标志物,CK20 可作为管腔型肿瘤标志物。本研究基于 Dadhania 等^[10]和 Guo 等^[11]的研究成果上,将 IBC 分为基底型(CK14+,CK20-)、管腔型(CK14-,CK20+)以及双阴型(CK14-,CK20-)三种分子亚型,结果显示与管腔型肿瘤比较,基底型肿瘤和双阴型肿瘤患者预后更差。已有多项研究表

明在膀胱癌中,基底型肿瘤患者预后较差,管腔型预后相对较好^[12],与本研究结果相似。而 Hede-gaard 等^[13]的研究表明具有管腔型肿瘤特征的患者预后更差。Rebola 等^[14]通过 CK20 和 CK5/6 将膀胱癌分为双阴型(CK20-,CK5/6-)、共表达型(CK20+,CK5/6+)、基底型(CK20-,CK5/6

+)和管腔型(CK20+,CK5/6-)四种分子亚型,研究结果表明管腔型是影响预后的独立危险因素,与本研究结果相反。出现差异的原因可能与免疫组织化学分型的备选指标不同有关,这需要进一步去探讨管腔型肿瘤中 CK14 与 CK5/6 的表达对预后的影响。



a:CK14(+);d,g:CK14(-);e:CK20(+);b,h:CK20(-);c:PD-L1(+);f,i:PD-L1(-)。

图1 IBC不同分子分型中PD-L1表达(免疫组化,×40)

近年来,随着肿瘤的免疫治疗临床试验的不断完善与发展,免疫治疗已成为国内外学者的研究热点之一。目前免疫检查点抑制剂(ICIs)已经被批准用于治疗膀胱癌,大大改变了膀胱癌的治疗前景。程序性死亡受体-1(PD-1)及其配体(PD-L1)是免疫活性的重要负性调节因子,可阻止自身免疫性疾病的发生发展。PD-L1的高表达与膀胱癌患者的不良预后相关^[15]。Kim 等^[16]研究发现PD-L1的高表达与基底型肿瘤相关。目前,PD-L1免疫检查点抑制剂单药已被批准作为治疗晚期和转移性尿路上皮癌的二线药物。本研究发现与管腔型及双阴型肿瘤比较,PD-L1在基底型肿瘤组织中高表达,且基底型患者的预后较差,与上述结果一致,提示该型患者可能从PD-L1免疫检查点抑制剂治疗中获益。

本研究存在一定局限性:本研究纳入样本量太少,且入组患者的病理分期为T₁~T₄期,入组患者较为分散;本研究为回顾性研究,临床证据级别有限,且对部分患者的随访时间太短;远处转移、淋巴结转移的分组例数都比较少,在一定程度上影响了本研究结果的可信度;后续仍需要积累大量的临床及病理资料进行更好的验证。

综上所述,在进行膀胱癌手术后的患者中,与管腔型肿瘤患者比较,基底型肿瘤和双阴型肿瘤患者预后较差;与管腔型和双阴型肿瘤比较,PD-L1在基底型肿瘤中高表达;提示PD-L1可能成为该型患者潜在的免疫治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jain RK, Sonpavde G. Neoadjuvant therapy for muscle-invasive bladder cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2020, 20(7):603-614.
- [2] Kimura T, Ishikawa H, Kojima T, et al. Bladder preservation therapy for muscle invasive bladder cancer: the past, present and future[J]. Jpn J Clin Oncol, 2020, 50(10):1097-1107.
- [3] Al Sharaky DR, Abdelwahed M, Asaad N, et al. Stratification of urinary bladder carcinoma based on immunohistochemical expression of CK5, CK14 and CK20[J]. J Immunoassay Immunochem, 2021, 42(3):236-251.
- [4] 中华医学会病理学分会泌尿与男性生殖系统疾病病理专家组.膀胱浸润性尿路上皮癌PD-L1(SP263)免疫组织化学检测病理专家共识[J].中华病理学杂志, 2020, 49(11):1102-1107.
- [5] Sjö Dahl G, Eriksson P, Liedberg F, et al. Molecular

- classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification[J]. *J Pathol*, 2017, 242(1):113-125.
- [6] Choi W, Porten S, Kim S, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(2):152-165.
- [7] Jordan B, Meeks JJ. T1 bladder cancer: current considerations for diagnosis and management[J]. *Nat Rev Urol*, 2019, 16(1):23-34.
- [8] Martini A, Sfakianos JP, Renström-Koskela L, et al. The natural history of untreated muscle-invasive bladder cancer[J]. *BJU Int*, 2020, 125(2):270-275.
- [9] 孔家瑾, 张璐, 郑克文. 膀胱癌分子机制及分子分型的研究进展[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2021, 36(3):236-241.
- [10] Dadhania V, Zhang M, Zhang L, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use [J]. *EBio Medicine*, 2016, 12:105-117.
- [11] Guo CC, Bondaruk J, Yao H, et al. Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):9743.
- [12] Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer[J]. *Cell*, 2018, 174(4):1033.
- [13] Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, et al. Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(1):27-42.
- [14] Rebola J, Aguiar P, Blanca A, et al. Predicting outcomes in non-muscle invasive (Ta/T1) bladder cancer: the role of molecular grade based on luminal/basal phenotype [J]. *Virchows Arch*, 2019, 475(4):445-455.
- [15] Kawahara T, Ishiguro Y, Ohtake S, et al. PD-1 and PD-L1 are more highly expressed in high-grade bladder cancer than in low-grade cases; PD-L1 might function as a mediator of stage progression in bladder cancer[J]. *BMC Urol*, 2018, 18(1):97.
- [16] Kim B, Lee C, Kim YA, et al. PD-L1 Expression in Muscle-Invasive Urinary Bladder Urothelial Carcinoma According to Basal/Squamous-Like Phenotype [J]. *Front Oncol*, 2020, 10:527385.

(收稿日期:2021-10-12)

(上接第 183 页)

- [6] 皋文君, 刘砚燕, 袁长蓉. 国际肿瘤化疗药物不良反应评价系统——通用不良反应术语标准 4.0 版[J]. *肿瘤*, 2012, 32(2):142-144.
- [7] 赖军明, 胡爽, 林红, 等. 分子靶向药物及程序性死亡蛋白 1 抑制剂在晚期原发性肝癌中的临床研究进展[J]. *中华肿瘤杂志*, 2019, 41(6):406-409.
- [8] 王玮玮. 阿昔替尼对晚期难治性肾细胞癌生存期和生活质量的影响[J]. *临床研究*, 2021, 29(3):54-55.
- [9] 孟旭辉, 刘龙发. 阿昔替尼单药或联合帕博利珠单抗治疗舒尼替尼治疗失败的伴肝转移肾细胞癌的疗效及安全性分析[J]. *肿瘤药学*, 2021, 11(6):724-731.
- [10] Erickson JJ, Gilchuk P, Hastings AK, et al. Viral acute lower respiratory infections impair CD8⁺ T cells through PD-1[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7):1109-1113.
- [11] Teh J, Narasimhan V, Schultz S, et al. Re: Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2019, 76(1):126-127.
- [12] 叶雄俊, 刘军, 张一帆, 等. 帕博利珠单抗联合阿昔替尼治疗晚期肾细胞癌的初步疗效分析[J/OL]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2020, 6(4):39-43.
- [13] Rini BI, Plimack ER, Stus V, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(12):1116-1127.
- [14] Powles T, Plimack ER, Soulières D, et al. Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib monotherapy as first-line treatment of advanced renal cell carcinoma (KEYNOTE-426): extended follow-up from a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2020, 21(12):1563-1573.
- [15] Atkins MB, Plimack ER, Puzanov I, et al. Axitinib in combination with pembrolizumab in patients with advanced renal cell cancer: a non-randomised, open-label, dose-finding, and dose-expansion phase 1b trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(3):405-415.
- [16] Motzer RJ, Powles T, Atkins MB, et al. IMmotion151: a randomized phase III study of atezolizumab plus bevacizumab vs sunitinib in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J Clin Oncol* 2018, 36(9):578-584.

(收稿日期:2021-06-01)