

论著·基础研究

非小细胞肺癌 PD-L1 蛋白表达、EGFR 基因突变状态及二者相关性研究

邹琳¹, 兰建云², 宋曙², 邵伟伟², 胥传海^{2△}

(盐城市第一人民医院:1. 转化医学中心;2. 病理科, 江苏盐城 224001)

摘要:目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)中程序性死亡因子配体 1(PD-L1)蛋白的表达、表皮生长因子受体(EGFR)基因突变状态及二者的相关性。方法 采用免疫组织化学 EnVision 两步法检测 93 例 NSCLC 石蜡组织标本中 PD-L1 蛋白的表达情况,同时运用突变扩增系统(ARMS)-qPCR 法检测 EGFR 基因突变状态;结合患者临床资料,对 PD-L1 蛋白表达、EGFR 基因突变的临床病理特征及两者的相关性进行研究。结果 93 例肺癌组织中 PD-L1 蛋白表达阳性率为 55.9%(52/93)。PD-L1 蛋白表达与 TNM 分期相关,TNM II、III 期的阳性率显著高于 I 期($P<0.05$),而与性别、年龄、吸烟史、病变部位、肿瘤大小、淋巴结转移、组织学类型及分化类型无关($P>0.05$)。EGFR 基因突变状态与性别、吸烟史、肿瘤大小和组织学类型相关($P<0.05$),更易发生于女性、无吸烟史、肿瘤大小 ≤ 3 cm、腺癌患者,而与患者的年龄、病变部位、淋巴结转移、分化类型和临床分期无关($P>0.05$)。Logistic 回归分析发现,性别可显著影响 EGFR 基因突变状态($P<0.05$)。Spearman 等级相关分析发现,PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态无相关性($P>0.05$)。结论 检测 PD-L1 蛋白表达、EGFR 基因突变状态,有助于高效筛选免疫治疗和靶向治疗的检测对象,为临床用药提供理论依据。

关键词:非小细胞肺癌; 程序性死亡因子配体 1; 表皮生长因子受体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.003

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2019)22-2698-06

文献标识码:A

Expression of PD-L1 protein and mutation of EGFR gene in non-small cell lung cancer and their correlation

ZOU Lin¹, LAN Jianyun², SONG Su², SHAO Weiwei², XU Chuanhai^{2△}

(1. Translational Medical Center; 2. Department of Pathology, Yancheng First People's Hospital, Yancheng, Jiangsu 224001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of programmed death factor ligand 1 (PD-L1) protein and the mutation status of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in non-small cell lung cancer (NSCLC) and their correlation. **Methods** The expression of PD-L1 protein in 93 NSCLC paraffin tissue specimens was detected by immunohistochemical EnVision two-step method, and the mutation status of EGFR gene was detected by mutation amplification system (ARMS)-qPCR. The expression of PD-L1 protein and the clinicopathological characteristics of EGFR gene mutation were studied in combination with the clinical data of patients. **Results** The positive rate of PD-L1 protein expression was 55.9% (52/93). The expression of PD-L1 protein was correlated with TNM stage, and the positive rates of TNM stage II and III were significantly higher than that of stage I ($P<0.05$), but it is not correlated with sex, age, smoking history, location of lesion, size of tumor, lymph node, histological type and differentiation type ($P>0.05$). The mutation status of EGFR gene was correlated with sex, smoking history, tumor size and histological type ($P<0.05$), it was more likely to occur in patients of female, with no smoking history, tumor size <3 cm and adenocarcinoma, but not correlated with age, lesion location, lymph node metastasis, differentiation type and clinical stage ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that sex significantly affected the mutation status of EGFR gene ($P<0.05$). Spearman grade correlation analysis showed that there was no correlation between the expression of PD-L1 protein and the mutation status of EGFR gene ($P>0.05$). **Conclusion** Detection of PD-L1 protein expression and EGFR gene mutation is helpful for screening the targets of immunotherapy and targeted therapy and providing theoretical basis for clinical drug use.

Key words: non-small cell lung cancer; programmed death factor ligand 1; epidermal growth factor receptor

作者简介:邹琳,女,主管技师,主要从事基因检测研究。△ 通信作者, E-mail: xuchuanhai1702@163.com.

本文引用格式:邹琳, 兰建云, 宋曙, 等. 非小细胞肺癌 PD-L1 蛋白表达、EGFR 基因突变状态及二者相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2698-2702.

肺癌位居全球总人口癌症致死率排行之首,占癌症总患者的 18.4%^[1]。大多数肺癌患者在确诊时已为晚期,治疗难度大,病死率高。随着分子生物学和精准医疗的飞速发展,肿瘤药物治疗已从传统的放疗发展到分子靶向治疗。近年来,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂治疗晚期非小细胞肺癌患者(NSCLC)已成熟应用于临床,患者获益明显,但是耐药问题限制了药物的治疗效果^[2-3]。为延长患者的寿命,亟需研发新的治疗方法或药物,目前以程序性死亡因子 1(PD-1)/程序性死亡因子配体 1(PD-L1)单抗为代表的封锁免疫检查点治疗是治疗晚期 NSCLC 最有希望的方法之一^[4],成为医学肿瘤界研究的热点。临床研究已证实,对患者进行 PD-L1 蛋白水平的检测,有利于患者选择药物。2018 年第 6 版美国国立综合癌症网络临床实践指南(NCCN)推荐对肿瘤患者进行更广谱的驱动基因检测,这其中就包括对 PD-L1 蛋白表达和 EGFR 基因状态进行检测。目前,国内关于 PD-L1 与 EGFR 基因突变相关性研究的文献报道较少。本文旨在研究 93 例 NSCLC 组织中 PD-L1 蛋白的表达、EGFR 突变状态及二者的相关性,以便进一步研究肺癌的发生机制,更高效筛选 PD-L1 蛋白检测对象,协助指导临床,为患者提供最合适的治疗方案。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 6 月至 2019 年 1 月盐城市第一人民医院病理科存档,经病理证实的 93 例 NSCLC 患者的蜡块组织。93 例患者中男 51 例,女 42 例;年龄 39~80 岁,中位年龄 62 岁;无吸烟史 60 例,有吸烟史 33 例;病变部位:左侧 40 例,右侧 53 例;肿瘤大小:≤3 cm 59 例,>3 cm 34 例;淋巴结转移:无转移者 71 例,有转移者 22 例;组织学类型:腺癌 82 例,鳞癌 11 例;临床 TNM 分期:I 期 61 例,II 期 18 例,III 期 14 例。组织学分化类型:低分化 25 例,中分化 29 例,高分化 39 例。临床分期参照 2017 年国际肺癌研究中心(IASLC)第 8 版肺癌 TNM 分期解读。组织学分析参照 2006 年 WHO 肺肿瘤组织学分类标准。

1.2 试剂与仪器 PD-L1(28-8)购自美国 abcam 公司;内源性过氧化物酶、乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液、HRP 标记抗鼠/兔二抗、DAB 增强显色系统均购自福建迈新公司;FFPE 石蜡组织 DNA 提取试剂盒(56404)购自美国凯杰公司;人类 EGFR29 基因突变检测试剂盒(ADx-EG01)购自厦门艾德公司。仪器包括德国蔡司 Zen 显微数字成像系统,国产海尔生物安全柜,美国科威尔(Quawell 6000)超微量分光光度计,德国艾本德(Eppendorf)离心机及移液器,国产宏石全自动荧光定量 PCR 仪(SLAN96S)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学 (1)石蜡包埋组织 4 μm 切

片,贴于涂胶片上,60℃烤片 2 h。二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化组织切片,EDTA 高压锅抗原修复 4 min,阻断内源性过氧化物酶 10 min,滴加一抗 PD-L1(1:100,Abcam 公司)室温孵育 1 h,HRP 标记的二抗(迈新公司)室温孵育 15 min。DAB 显色 2~5 min,苏木素复染 1 min,流水冲洗,1%盐酸-乙醇快速分化,大量流水冲洗,梯度乙醇水化,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察判读并采图。(2)结果判断:由 3 位高年资医师采用盲法判读结果,意见不统一时,讨论到结果一致。用正常扁桃体组织作为 PD-L1 蛋白染色的阳性对照(上皮隐窝着色)和阴性对照(内皮、成纤维细胞无着色)。光镜下观察结果,每片观察 5 个高倍视野(×200 倍),计数 100 个细胞。无论着色是淡黄色、棕黄色还是黄褐色,计数肿瘤细胞中呈部分或者完整的胞膜着色的阳性百分比<5%为阴性,≥5%为阳性^[5]。

1.3.2 EGFR 基因突变检测 (1)将患者的肺癌组织蜡块,对照 HE 切片用金刚石刻字笔划出肿瘤区域,连续切 5~10 张 4 μm 切片,除去非肿瘤组织,将蜡片放入 1.5 mL 离心管(EP 管)中,盖好管盖,做好标记。在样本制备区生物安全柜内,按凯杰公司(Qiagen)的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织 DNA 抽提试剂盒说明书(56404)提取肿瘤组织 DNA。提取完毕,立即用超微分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,确保达到质控标准(A_{260}/A_{280} :1.8~2.0)。按试剂盒说明书用双蒸水稀释样本 DNA 浓度至 2 ng/μL,吸取 42.3 μL DNA,加入 2.7 μL TaqDNA 聚合酶,震荡混匀后瞬时离心;将混合好的 DNA、酶混合物依次吸取 5.0 μL,沿着上管壁加入 8 联管反应条(反应条中的试剂包括引物、探针、dNTPs、Buffer)中,盖好管盖,离心 15 s。(2)将 8 连管反应条通过传递窗移入 PCR 扩增区,上机扩增。PCR 程序为第 1 阶段:95℃ 5 min,1 个循环;第 2 阶段:95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,15 个循环;第 3 阶段:93℃ 25 s,60℃ 35 s(收集 FAM 和 VIC 荧光信号),72℃ 20 s,31 个循环。检测完毕取出反应条,用一次性手套包好扔进垃圾桶,保存实验结果,按说明书判读结果。(3)每个样本的检测条为 8 个孔。1~7 号孔分别检测 Exon18 G719X(G719A、G719S、G719C)、Exon19 Del(19 种)、Exon20 T790M、Exon20 S768I、Exon20 Ins、Exon21 L858R、Exon21 L861Q 位点,8 号孔为 DNA 质控孔。外控由 FAM 信号指示,内控由 VIC 信号指示,每次实验均设阴、阳性对照。

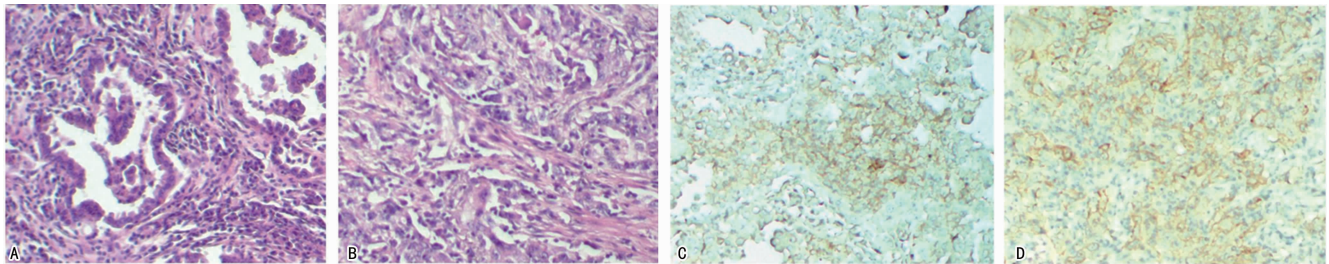
1.4 统计学处理 将数据导入 SPSS15.0 和 Stata 7.0 软件进行统计学分析。计数资料以[n(%)]表示,采用 χ^2 检验;采用 Logistic 回归模型分析 EGFR 基因突变状态的危险因素比值比(OR);采用 Spearman 等级相关分析 PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态的相关性。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结 果

2.1 PD-L1 蛋白与患者临床病理特征的关系 PD-L1 蛋白表达以肿瘤细胞完整或部分薄膜出现棕黄色颗粒为阳性,着色深浅不一,见图 1。巨噬细胞浸润时也会有阳性表达,可以作为阳性内对照。本研究中 93 例肺癌组织中有 52 例观察到 PD-L1 蛋白表达的阳性信号(55.9%,52/93),而癌旁组织中完全无 PD-L1 蛋

白表达。同时,PD-L1 蛋白表达与 TNM 分期相关,在不同 TNM 分期的 NSCLC 表达存在明显差别,其中 TNMⅡ(83.3%,15/18)、Ⅲ期(57.1%,8/14)肺癌的阳性率显著高于Ⅰ期(47.5%,29/61),差异有统计学意义($P<0.05$)。PD-L1 蛋白表达与患者性别、年龄、吸烟史、病变部位、肿瘤大小、淋巴结转移、组织学类型及分化类型差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。



注:A 表示肺腺癌石蜡组织 HE 染色;B 表示肺鳞癌石蜡组织 HE 染色;C 表示 PD-L1(28-8)蛋白在肺腺癌中的阳性表达(En Vision 两步法);D 表示 PD-L1(28-8)蛋白在肺鳞癌中的阳性表达(×200,En Vision 两步法)

图 1 PD-L1(28-8)蛋白在 NSCLC 中的表达

表 1 PD-L1 蛋白表达、EGFR 基因突变状态与患者临床病理特征的关系

临床参数	n	PD-L1				EGFR			
		阴性(n=41)	阳性(n=52)	χ^2	P	野生型(n=47)	突变型(n=46)	χ^2	P
性别				0.388	0.533			18.162	0.000
男	51	21	30			36	15		
女	42	20	22			11	31		
年龄(岁)				0.140	0.709			1.849	0.174
≤60	36	15	21			15	21		
>60	57	26	31			32	25		
吸烟史				2.270	0.132			10.075	0.002
无	60	23	37			23	37		
有	33	18	15			24	9		
病变部位				0.072	0.789			0.861	0.353
左侧	40	17	23			18	22		
右侧	53	24	29			29	24		
肿瘤大小(cm)				0.744	0.388			4.304	0.038
≤3	59	28	31			25	34		
>3	34	13	21			22	12		
淋巴结转移				1.759	0.185			0.185	0.667
无	71	34	37			35	36		
有	22	7	15			12	10		
组织学类型				0.302	0.583			8.134	0.004
腺癌	82	37	45			37	45		
鳞癌	11	4	7			10	1		
分化类型				2.257	0.323			0.685	0.710
低分化	25	9	16			11	14		
中分化	29	16	13			16	13		
高分化	39	16	23			20	19		
临床分期				7.233	0.027			3.079	0.215
Ⅰ	61	32	29			27	34		
Ⅱ	18	3	15			12	6		
Ⅲ	14	6	8			8	6		

2.2 EGFR 突变状态与患者临床病理特征的关系 93 例 NSCLC 中 EGFR 突变型 46 例,野生型 47 例,

突变率为 49.5%,其中包含 Exon19 Del 突变 19 例, Exon21 L858R 突变 26 例,Exon20 S768I 突变 1 例,

Exon20 T790 突变 1 例, Exon20 Ins 突变 3 例, Exon19 Del、Exon20 T790 双突变 1 例。由于 Exon20 T790M 和 Exon20 Ins 为酪氨酸激酶抑制剂(TKI)耐药位点, 这 5 例耐药位点突变占总例数的 5.37%, 提示患者可能对 1 代 TKI 耐药, 含有 T790 M 突变的患者可以使用 3 代 TKI 抑制剂奥希替尼(AZD9291)。为便于数据统计分析, 将包含这 2 个位点的突变组和无突变组合并为野生型组。由表 2 可以看出, EGFR 突变状态与患者的性别、吸烟史、肿瘤大小和组织学类型相关, 女性患者的突变率(73.8%, 31/42)显著高于男性患者(29.4%, 15/51), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 无吸烟史(61.7%, 37/60)、肿瘤大小 ≤ 3 cm (57.6%, 34/59)、腺癌(54.9%, 45/82)的患者突变率高于有吸烟史(27.3%, 9/33)、肿瘤大小 > 3 cm (35.3%, 12/34)、鳞癌(9.09%, 1/11)的患者($P < 0.05$); 而与患者年龄、病变部位、淋巴结转移、分化类型和临床分期无关($P > 0.05$)。

为进一步分析影响 EGFR 基因突变状态的独立因素, 通过 Logistic 回归模型对 EGFR 基因突变状态进行多因素分析发现, 在控制性别、吸烟史、肿瘤大小和组织学类型后, 患者性别可显著影响 EGFR 基因突变状态($P < 0.05$), 而吸烟状态、肿瘤大小和组织学类型与 EGFR 基因突变状态无相关性($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 EGFR 基因突变预测的多因素分析

变量	OR	95%CI	P
性别(女 vs. 男)	0.232	0.075~0.721	0.011
吸烟(否 vs. 是)	0.683	0.206~2.257	0.532
肿瘤大小(≤ 3 cm vs. > 3 cm)	0.568	0.210~1.533	0.264
组织学类型(腺癌 vs. 鳞癌)	0.185	0.021~1.640	0.130

2.3 PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态的相关性 Spearman 等级相关分析显示, PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态无相关性($r = -0.161$, $P > 0.05$), 见表 3。

表 3 PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态的相关性

组别	n	PD-L1		χ^2	P	r
		阴性	阳性			
EGFR 野生型	47	17	30	2.415	0.123	-0.161
EGFR 突变型	46	24	22			

3 讨 论

肿瘤的发生、发展与人类免疫系统关系密切。正常情况下, 免疫系统会通过 T 细胞杀伤肿瘤细胞, T 细胞过度激活会引起炎症损伤, 误伤正常细胞等^[6]。T 细胞通过免疫检查点抑制剂保护免疫系统, 类似“刹车”的作用, 而这一特点也会被肿瘤细胞所利用, 抑制免疫系统的肿瘤免疫功能。免疫检查点抑制剂

是指共同抑制 T 淋巴细胞信号通路的分子, 包含细胞毒性 T 细胞(CTL)、PD-1 及其配体 PD-L1 等^[6-7]。当 T 细胞表面的 PD-1 蛋白与肿瘤细胞表面的 PD-L1 蛋白结合时, PD-1/PD-L1 信号通路被激活, 戴上面具的 PD-L1 蛋白的肿瘤细胞和正常细胞混在一起, 躲避 CTL 的识别和攻击, 从而在人体内繁衍生息^[7-8], 这提示 PD-1/PD-L1 结合可能在抗肿瘤免疫过程中参与了免疫逃逸, 发挥负调控作用。科学家们由此获得启发, 只要能阻断二者的结合, 就能充分激活 T 细胞, 重新识别和杀伤肿瘤细胞, 起到抗肿瘤的作用。基于这一特性, 研究者研发了 2 种人源性单克隆抗体 PD-1、PD-L1, 用来阻止 PD-1/PD-L1 结合, 从而使机体恢复肿瘤免疫功能。目前, 封锁免疫检查点 PD-1/PD-L1 的肿瘤免疫靶向疗法, 在 NSCLC、恶性黑色素瘤、淋巴瘤、膀胱癌、胃癌、肾细胞癌等多种类型肿瘤患者的治疗中取得卓越的疗效^[4]。随着国内首个 PD-1 抑制剂欧狄沃(纳武利尤单抗注射液)被批准上市, 中国正式开启免疫治疗时代。

关于 PD-L1 蛋白在 NSCLC 的表达及其与临床病理特征的关系的研究结果截然不同^[9-12]。来自中国台湾的 YANG 等^[9]报道 PD-L1 表达的阳性率为 39.9%, 在高分化肿瘤中的阳性率较高; 来自韩国首尔 CHA 等^[10]报道, 323 例肺癌中有 60 例(18.6%) PD-L1 表达阳性, 以前或现在的吸烟者中较高的 PD-L1 表达($\geq 50\%$)更为普遍, 并且与吸烟者年龄增加相关; 来自日本福岡的 TAKADA 等^[11]采用免疫组织化学检测 497 例肺腺癌组织中 PD-L1 蛋白的表达, 临界值为 5% 时的阳性率为 20.4% (85 例), 临界值为 1% 时的阳性率为 43.5% (144 例), PD-L1 蛋白倾向于在男性、吸烟者、高级别临床分期、淋巴结转移中高表达。本研究中 PD-L1 蛋白表达的阳性率为 55.9%, 这与来自韩国首尔的 KOH 等^[12]研究结果接近; PD-L1 蛋白表达与 TNM 分期相关, TNM II (83.3%)、III 期(57.1%)肺癌的阳性率显著高于 I 期(47.5%), 差异有统计学意义($P < 0.05$), 这与 TAKADA 等^[11]的研究一致; 而 PD-L1 蛋白表达与患者性别、年龄、吸烟史、病变部位、肿瘤大小、淋巴结转移、组织学类型及分化类型差异无统计学意义($P > 0.05$)。这可能是由于种族、组织学类型、临床分期、样本量大小的差异造成的。此外, 目前检测 PD-L1 蛋白的生产厂家、克隆号、配套的检测仪器、检测条件、判读时的临界值尚无统一标准也会得出不同的结果。

EGFR 基因位于人类 7 号染色体, 包含 28 个外显子, 其酪氨酸激酶编码区为 18~24 号外显子。EGFR 定位于细胞膜, 通过 RAS/RAF/MEK/MAPK、PI3K/AKT/mTOR 途径传进细胞核。当该通路的信号传导异常时, EGFR 突变引发其自身磷酸化, 激活酪氨酸激酶, 并进一步激活下游信号通路, 促进肿瘤的发生。NSCLC 中 19 号外显子缺失和 21 号外显子

L858R 点突变是目前最常见的突变方式^[13]。与传统的化疗相比,口服 TKI 毒性更低,能显著改善患者的生活质量,延长患者生存期,治疗效果更持久^[14]。DEARDEN 等^[15]报道亚洲 NSCLC 患者 EGFR 突变率为 47.9%。THATCHER 等^[16]首次报道 EGFR 基因突变率在女性、无吸烟史、腺癌或东亚患者中更高,此类人群更易从 EGFR-TKI 治疗中获益。而随后 SHI 等^[17]研究发现,EGFR 基因突变的独立影响因素为吸烟史、病理类型。本研究 93 例 NSCLC 中 EGFR 突变率为 49.5%,这与 DEARDEN 等^[15]的研究一致。本研究还发现,女性(73.8%)、无吸烟史(61.7%)、肿瘤大小 ≤ 3 cm(57.6%)、腺癌(454.9%)的患者突变率高于男性(29.4%)、有吸烟史(27.3%)、肿瘤大小 > 3 cm(35.3%)、鳞癌(9.09%)的患者($P < 0.05$);而与患者年龄、病变部位、淋巴结转移、分化类型和临床分期无关($P > 0.05$)。Logistic 回归分析发现,患者性别可独立影响 EGFR 基因突变状态($P < 0.05$),这与 SHI 等^[17]研究结果不一致,可能原因是样本人群来源地区的差异、回顾性样本选择的偏倚和不同检测方法的灵敏度不同。

关于 PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态的关系,目前尚不清楚,仍是当前的研究热点。本研究通过 Spearman 等级相关分析发现,PD-L1 蛋白表达与 EGFR 基因突变状态无相关性($P > 0.05$),这与 YANG 等^[4]报道一致;而 TAKADA 等^[11]报道 PD-L1 蛋白倾向于在 EGFR 野生型中高表达;AZUMA 等^[18]发现 PD-L1 的表达在 EGFR 突变型中要显著高于 EGFR 野生型。

鉴于目前 PD-L1 检测标准和判读标准不统一,本研究使用的 PD-L1 抗体克隆号为 28-8,在未来的研究中可以使用其他一些克隆号,如 22C3、SP142、SP263 等进一步深入研究。此外,除了在蛋白水平运用免疫组织化学检测 PD-L1,已有文献报道在多种癌症中通过外周血中循环肿瘤 RNA 检测 PD-L1 基因的表达水平^[19],随着 2 代测序技术的不断发展和普及,以后可以通过检测肿瘤突变负荷更高效地筛选免疫治疗患者,在基因水平以更好地指导患者用药。

4 结 论

检测 PD-L1 蛋白表达、EGFR 基因突变状态有助于高效筛选免疫治疗和靶向治疗的检测对象,为临床用药提供理论依据。

参考文献

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. INT J CANCER, 2019, 144(8): 1941-1953.

[2] TSUI D W, MURTAZA M, WONG A S, et al. Dynamics of multiple resistance mechanisms in plasma DNA during

EGFR-targeted therapies in non-small cell lung cancer [J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(6): e7945.

[3] HAN F, HE J X, LI F, et al. Emerging roles of MicroRNAs in EGFR-Targeted therapies for lung cancer [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 1-10.

[4] YANG J L, CHEN J, WEI J, et al. Immune checkpoint blockade as a potential therapeutic target in non-small cell lung cancer [J]. Expert Opin Biol Ther, 2016, 16(10): 1209-1223.

[5] BUTTNER R, GOSNEY J R, SKOV B G, et al. Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry testing: a review of analytical assays and clinical implementation in non-small-cell lung cancer [J]. J CLIN ONCOL, 2017, 35(34): 3867-3876.

[6] LONGO D L, BOUSSIOTIS V A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway [J]. N Engl J Med, 2016, 375(18): 1767-1778.

[7] XIA B, HERBST R S. Immune checkpoint therapy for non-small-cell lung cancer: an update [J]. Immunotherapy, 2016, 8(3): 279-298.

[8] KEIR M E, LIANG S C, GULERIA I, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance [J]. J Exp Med, 2006, 203(4): 883-895.

[9] YANG C Y, LIN M W, CHANG Y L, 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.

[10] CHA Y J, KIM H R, LEE C Y, et al. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its relationship with p53 status [J]. Lung Cancer, 2016, 97(1): 73-80.

[11] TAKADA K, OKAMOTO T, SHOJI F, et al. Clinical significance of PD-L1 protein expression in surgically resected primary lung adenocarcinoma [J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(11): 1879-1890.

[12] KOH J, GO H, KEAM B, et al. Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status [J]. Modern Pathol, 2015, 28(9): 1154-1166.

[13] KOBAYASHI S, BOGGON TJ, DAYARAM T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. N Engl J Med, 2005, 352(8): 786-792.

[14] SHEA M, COSTA D B, RANGACHARI D. Management of advanced non-small cell lung cancers with known mutations or rearrangements: latest evidence and treatment approaches [J]. Ther Adv Respir Dis, 2016, 10(2): 113-129.

[15] DEARDEN S, STEVENS J, WU Y L, et al. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap) [J]. Ann Oncol, 2013, 24(9): 2371-2376. (下转第 2707 页)

的形式被分泌出来。通过使用含有硫氧还蛋白(trxA)和便于蛋白生产、纯化的双融合伴侣原核表达载体 pET32a^[14],从而增加重组 Lp-PLA2 的可溶性。使用相对较低的温度(30 ℃)诱导蛋白表达,并在培养基中适当提高抗菌药物水平(0.1 mg/mL 的卡那霉素),这些方式也有助于提高外源蛋白表达水平^[15]。

4 结 论

本研究获得大量高纯度的人 Lp-PLA2 重组蛋白,并通过该蛋白免疫得到对应的具有高特异性的单克隆抗体,为后续 Lp-PLA2 检测试剂盒的开发奠定了基础。

参考文献

[1] 黄美容. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(4): 93-96.

[2] MAIOLINO G, LENZINI L, PEDON L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 single-nucleotide polymorphisms and cardiovascular events in patients with coronary artery disease[J]. J Cardiovasc Med, 2015, 16(1): 29-36.

[3] 周平, 罗云, 邢娜, 等. 肿瘤坏死因子 α 介导动脉粥样硬化发生机制的研究进展[J]. 世界中医药, 2015(8): 1163-1168.

[4] 倪文娟, 王云枝. Lp-PLA2、YKL-40 和 2 型糖尿病及其大血管病变发病的相关性研究[J]. 糖尿病新世界, 2015, 18(15): 38-40.

[5] 中国老年学学会心脑血管病专业委员会. Lp-PLA2 临床应用专家建议[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(10): 9-11.

[6] YANG L, LIU Y, WANG S, et al. Association between Lp-PLA2 and coronary heart disease in Chinese patients[J]. J Int Med Res, 2017, 45(1): 159-169.

[7] 王贤进, 赵艳芳. Lp-PLA2 与冠心病的相关性研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(17): 3363-3366.

[8] ŠTEFANIC P, KOPOLOVETS I, HERTELYOVÁ Z, et al. Lipoprotein associated phospholipase A2 as a marker of vulnerable atherosclerotic plaque in patients with internal carotid artery stenosis[J]. Georgian Med News, 2017, 267(1): 27-34.

[9] YANG Y, XUE T, ZHU J, et al. Serum lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts the formation of carotid artery plaque and its vulnerability in anterior circulation cerebral infarction[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2017, 160(1): 40-45.

[10] CASAS J P, NINIO E, PANAYIOTOU A, et al. PLA2G7 genotype, lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and coronary heart disease risk in 10 494 cases and 15 624 controls of European ancestry[J]. Circulation, 2010, 121(21): 2284-2293.

[11] KARABINA S, NINIO E. Plasma PAFAH/PLA2G7 genetic variability, cardiovascular disease, and clinical trials[J]. Enzymes, 2015, 38(1): 145-155.

[12] SEEMA G, MADHU S V, SHILPA S. Lipoprotein associated phospholipase A2 activity & its correlation with oxidized LDL & glycaemic status in early stages of type-2 diabetes mellitus[J]. Indian J Med Res, 2015, 141(1): 107-114.

[13] 李苏亮, 齐欣, 王建军, 等. Lp-PLA2 的重组表达及单克隆抗体的制备[J]. 中国血液流变学杂志, 2013, 13(1): 20-23.

[14] SOFIA C, ANDRÉ A, ANTÓNIO C, et al. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli; the novel Fh8 system[J]. Front Microbiol, 2014, 5(1): 63.

[15] 苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16-23.

(收稿日期: 2019-02-20 修回日期: 2019-05-04)

(上接第 2702 页)

[16] THATCHER N, CHANG A, PARIKH P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (iressa survival evaluation in lung cancer)[J]. Lancet, 2005, 366(9496): 1527-1537.

[17] SHI Y, AU J S, THONGPRASERT S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER)[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(2): 154-162.

[18] AZUMA K, OTA K, KAWAHARA A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2014, 25(10): 1935-1940.

[19] ISHIBA T, USHER J L, ELSHIMALI Y, et al. Frequencies and expression levels of programmed death ligand 1 (PD-L1) in circulating tumor RNA (ctRNA) in various cancer types[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(3): 621-625.

(收稿日期: 2019-02-22 修回日期: 2019-05-06)