

SPP1、PD-L1 的表达与 M2 巨噬细胞 在肝细胞癌中的关系及对预后的影响研究

吴婧婧¹, 黄琦¹, 彭瑶¹, 杨洋²

摘要 目的 探讨分泌性磷蛋白 1 (SPP1) 及程序性死亡因子配体-1 (PD-L1) 在肝细胞癌 (HCC) 患者中的表达及与 M2 巨噬细胞的相关性以及对预后的影响。方法 采用免疫组化法检测 81 例肝癌患者中 SPP1、PD-L1 以及 CD163 (M2 巨噬细胞常用标志物) 的表达, 并分析 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达与患者临床特征相关性以及与患者预后的关系, 同时分析了 SPP1、PD-L1 与肝癌组织中 M2 巨噬细胞的相关性。结果 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达在肝癌患者中升高, SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达均与患者 BCLC 分期相关 ($P < 0.05$), 与年龄、性别均无关。同时, SPP1 的表达还在肿瘤直径大、肝内多发肿瘤的 HCC 中患者中增高; PD-L1 的表达在肝内多发肿瘤、有乙肝病毒 (HBV) 感染的 HCC 患者中增高 ($P < 0.05$)。SPP1、PD-L1 和 CD163 与预后相关, 高表达患者的 3 年生存率 (OSR) 和总生存期 (OST) 低于低表达患者, BCLC 分期、SPP1 和 PD-L1 为独立预后因素。SPP1、PD-L1 表达与 M2 巨噬细胞呈正相关。结论 SPP1、PD-L1 和 CD163 可作为判断肝癌生物学行为的参考指标, SPP1 和 PD-L1 阳性表达提示肝癌患者可能预后不良。

关键词 肝细胞癌; 肿瘤微环境; 巨噬细胞; SPP1; PD-L1

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0970-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.016

肝癌作为全球范围内最常见的癌症之一, 发病率在全球范围内呈上升趋势^[1]。肝细胞癌 (hepato-

cellular carcinoma, HCC) 是肝癌最常见的病理类型, 约占 90%。尽管传统化疗、肝动脉化疗栓塞、免疫检查点抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂等疗法, 一定程度上延长了患者的生存期, 但总体预后仍较差。因此, 迫切需要寻找有效的治疗方法。

肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAM) 是肿瘤微环境中浸润的一类重要免疫细胞, 以 M2 型为主, 而 CD163 为目前公认的 M2 巨噬细胞标志物^[2]。分泌性磷蛋白 1 (secreted phosphoprotein 1, SPP1) 广泛存在于人体的组织与器官内, 其表达在多种肿瘤中均显著上调^[3-5], 巨噬细胞阳性表达 SPP1 的结肠癌患者的无进展生存期 (progression free survival, PFS) 更短^[6]。但目前在 HCC 中针对 SPP1 的研究较少, 且发挥作用机制尚不完全清楚。程序性死亡因子配体-1 (programmed death receptor ligand-1, PD-L1) 是程序性死亡因子-1 (PD-1) 的配体, B7 超家族 i 型跨膜糖蛋白。PD-L1 在人体的多种免疫及肿瘤细胞表面表达^[7-9], 促进活化 T 细胞凋亡, 抑制活化 T 细胞增殖。但 HCC 的免疫微环境中 SPP1 和 PD-L1 在调节巨噬细胞参与肿瘤免疫过程中发挥何种相互作用尚不明确。该研究将探索 HCC 中 SPP1、PD-L1 与 M2 巨噬细胞的表达及与患者预后的相关性, 从而为靶向 M2 巨噬细胞治疗 HCC 提供一定的实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 该研究整群收集 2017—2019 年在安徽医科大学第二附属医院初次诊断并接受手术的 81 例 HCC 患者和 10 例癌旁组织 (对照组) 的石蜡标本, 取分界线以外相应一侧 2 cm 的组织为癌旁组织。全组病例需符合的条件有: ① 手术前未接受过放疗或化疗; ② 年龄、性别、BCLC 分期等资料完整; ③ 标本组织经安徽医科大学第二附属医院病理科专家再次确诊为 HCC。HCC 病人肝组织石蜡切片中男 70 例, 女 11 例, 年龄 30~78 (58.2 ± 11.6) 岁。其中年龄 ≥ 60 岁以上的患者 38 例 (46.9%); BCLC 分期 A 期 57 例 (70.3%), B 期 14 例 (17.3%), C

2023-03-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82003037); 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085QH413、2208085-QH255); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划资助项目 (编号: 2021xkjT035); 安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵育计划 (编号: 2019GQFY12); 安徽省转化医学研究院科研基金 (编号: 2022zhyx-C40、2022zhyx-C79)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院肿瘤科, 合肥 230601

²中国科学技术大学附属第一医院 (安徽省立医院) 神经外科, 中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230036

作者简介: 吴婧婧, 女, 主治医师, 博士;

杨洋, 男, 主治医师, 博士, 责任作者, E-mail: pitt8745@163.com

期 10 例 (12.3%), 无 D 期患者; 肝脏单发肿瘤 68 例 (84.0%), 多发肿瘤 13 例 (16.0%); 肿瘤直径 > 5 cm 46 例 (56.8%), 肿瘤直径 ≤ 5 cm 35 例 (43.2%); 有 HBV 感染患者 71 例 (87.7%), 无 HBV 感染患者 10 例 (12.3%)。

1.2 试剂与仪器 CD163(美国 Santa Cruz 公司); SPP1(江苏亲科生物研究中心有限公司); PD-L1(英国 Abcam 公司); 石蜡切片机(上海徠卡仪器有限公司, RM2016); 脱水机(武汉俊杰电子有限公司, JJ-12J), 数字切片扫描仪 Panoramic MIDI(匈牙利 3DHISTECH 公司); 光学显微镜(重庆重光实业有限公司, COIC, XSP-C204)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化检测肝组织石蜡切片 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达 HCC 组织经甲醛固定、梯度乙醇脱水后, 将组织和石蜡置于包埋框内, 冷却后即成蜡块。进行防脱处理后, Leica 石蜡切片机切成厚 4 ~ 6 μm 薄片, 将蜡片裱贴于载玻片上, 烤干待用。免疫组化法染色按 MaxVision 二步法进行, 具体操作参照说明书。以磷酸盐缓冲液(PSB)代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片为阳性对照。在光学显微镜(COIC 公司, XSP-C204)下结合常规 HE 切片观察免疫组化切片的染色反应。数字切片扫描仪下进行拍照。

观察 SPP1、PD-L1 和 CD163 在细胞中的染色情况, 在细胞膜或者细胞质中出现棕黄色着色为阳性细胞, 根据细胞的染色强度以及阳性细胞率进行评分。①按染色强度记分: 无色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分; ②按阳性细胞率计分: 阳性细胞率 ≤ 4% (0 分), 5% ~ 24% (1 分), 25% ~ 49% (2 分), 50% ~ 74% (3 分), 阳性细胞率 ≥ 75% (4 分), 两者结果相乘即为总评分, 总评分 ≤ 1 分为阴性, 2 ~ 4 分为弱阳性, 5 ~ 8 分为中等阳性, 9 ~ 12 分为强阳性。在该研究中将阴性和弱阳性定义为低表达, 中等阳性和强阳性定义为高表达。

1.3.2 随访 随访方式为电话随访, 截止时间为 2022 年 4 月 30 日。该研究中有 79 例患者取得完整随访资料。总生存时间为手术时间到死亡或随访截止时间。到随访截止时间未死亡的患者定义为结尾数据。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。采用四格表的 χ^2 检验、Fisher 确切概率法分析两种蛋白在肝癌组织及癌旁组织中的表达与患者临床特征关系。两种蛋白与生存期分析采用 Kap-

lan-Meier 法对总生存期 (overall survival, OS) 绘制生存曲线, 并进行 log-rank 检验影响, 生存时间的危险因素采用单因素和多因素 Cox 回归模型。采用 χ^2 检验分析两种蛋白之间及与 M2 巨噬细胞表达的相关性。当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPP1、PD-L1 和 CD163 在肝癌中的表达 81 例 HCC 患者组织中, 高表达 SPP1、PD-L1 和 CD163 的患者例数分别为 39 (48.1%), 32 (39.5%) 和 38 (48.1%), 高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。见图 1。

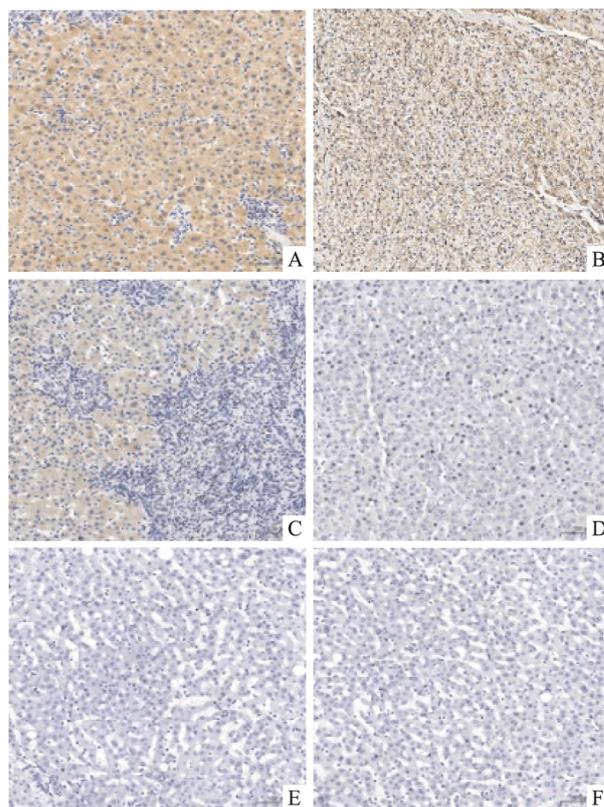


图 1 SPP1、PD-L1 和 CD163 在 HCC、癌旁组织中的表达 × 100
A - C: SPP1、PD-L1、CD163 在 HCC 组织中的阳性表达; D - F: SPP1、PD-L1、CD163 在癌旁组织中的表达

2.2 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达与 HCC 患者临床特征的关系 SPP1、PD-L1 和 CD163 的高表达与 HCC 患者 BCLC 分期均相关 ($P < 0.05$), 与年龄、性别均无关 ($P > 0.05$)。同时, SPP1 的表达还在肿瘤直径大、肝内多发肿瘤的 HCC 中患者中增高; PD-L1 的表达在肝内多发肿瘤、有 HBV 感染的 HCC 患者中增高 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 SPP1 和 PD-L1 在 HCC 组织中表达的相关性及与 HCC 患者生存的相关性 (包括单因素、多因素

生存分析)

2.3.1 SPP1 和 PD-L1 在 HCC 组织中表达的相关性 39 例 SPP1 高表达的 HCC 患者中有 21 例 PD-L1 高表达, SPP1 和 PD-L1 在 HCC 组织中呈正相关 ($c=0.272, P=0.011$)

2.3.2 生存因素分析 对 81 例 HCC 病例进行单因素 COX 回归模型分析, 结果显示 BCLC 分期、SPP1 高表达和 PD-L1 高表达均与 HCC 患者预后相关 ($P < 0.05$) 将上述因素纳入多因素 COX 回归模

型分析, 结果显示 BCLC 分期、SPP1 高表达和 PD-L1 高表达均是影响预后的独立因素 ($P < 0.05$)。见表 2、3。

2.3.3 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达与 HCC 患者生存情况的关系 81 例患者中 79 例患者随访, 其中 73 例患者在随访期内死亡 (94.9%), 死因均与肿瘤相关。全组患者 3 年生存率为 24%, SPP1, PD-L1 和 CD163 的高表达均与预后相关 ($P < 0.01, P < 0.01, P = 0.01$)。见图 2。

表 1 HCC 组织中 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达与其临床病理特征的关系 (n)

临床特征	n	SPP1		P 值	PD-L1		P 值	CD163		P 值
		高	低		高	低		高	低	
年龄 (岁)				0.306			0.170			0.825
<60	43	23	20		20	23		20	23	
≥60	38	16	22		12	26		19	19	
性别				0.400			0.372			0.522
男	70	35	35		29	41		35	35	
女	11	4	7		3	8		4	7	
肿瘤大小 (cm)				0.029			0.319			0.146
>5	46	27	19		16	30		25	21	
≤5	35	12	23		16	19		14	21	
单发或多发				0.023			0.017			0.132
单发	68	29	39		23	45		30	38	
多发	13	10	3		9	4		9	4	
BCLC 分期				0.002			0.001			0.022
A	57	20	37		16	41		22	35	
B	14	4	10		8	6		9	5	
C	10	1	9		8	2		8	2	
D	0									
乙肝				0.220			0.005			0.739
有	71	36	35		24	47		35	36	
无	10	3	7		8	2		4	6	

表 2 81 例 HCC 患者预后的单因素 COX 回归模型

因素	B	SE	Wald(χ^2)	P 值	OR (95% CI)
BCLC	0.574	0.221	6.722	0.010	1.776(1.150~2.740)
性别	0.030	0.358	0.007	0.934	1.030(0.510~2.080)
年龄	0.441	0.283	2.423	0.120	1.554(0.892~2.705)
HBV 感染	-0.214	0.414	0.268	0.605	0.807(0.359~1.816)
是否单发	-0.313	0.379	0.680	0.410	0.731(0.348~1.538)
肿瘤直径	-0.164	0.279	0.345	0.557	0.849(0.491~1.468)
SPP1	0.653	0.312	4.394	0.036	1.922(1.043~3.540)
PD-L1	0.710	0.296	5.473	0.017	2.034(1.138~3.636)
CD163	0.194	0.280	0.483	0.487	1.215(0.702~2.101)

表 3 81 例 HCC 患者预后的多因素 COX 回归模型

因素	B	SE	Wald(χ^2)	P 值	OR (95% CI)
BCLC	0.508	0.204	6.224	0.013	1.662(1.115~2.476)
SPP1	0.651	0.284	5.243	0.022	1.917(1.098~3.346)
PD-L1	0.633	0.271	5.470	0.019	1.884(1.108~3.202)

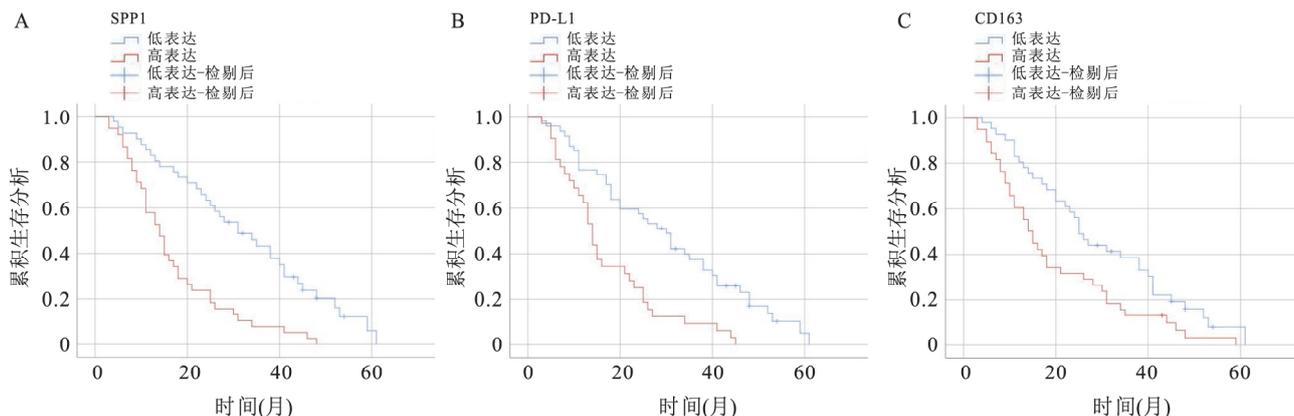


图2 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达与 HCC 患者生存时间的关系

A: SPP1; B: PD-L1; C: CD163

2.4 SPP1 和 PD-L1 与肝癌组织 M2 巨噬细胞的相关性 39 例 HCC 组织 SPP1 高表达患者中有 30 例 CD163 高表达, SPP1 和 CD163 在 HCC 组织中呈显著正相关 ($r=0.485, P<0.001$); 32 例 HCC 组织 PD-L1 高表达患者中有 20 例 CD163 高表达, PD-L1 和 CD163 在 HCC 组织中呈显著正相关 ($r=0.226, P=0.038$)。

3 讨论

HCC 是消化系统常见肿瘤, 其病因至今尚不完全明确, 缺乏有效治疗手段, 总体预后不佳, 因此迫切需要新的治疗方法。肿瘤微环境主要指肿瘤细胞与非肿瘤细胞(免疫细胞、成纤维细胞、血管和淋巴管内皮细胞)及细胞外成分(细胞因子及趋化因子, 细胞外基质等)相互作用形成的复杂结构。巨噬细胞、T 淋巴细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、中性粒细胞、树突状细胞和骨髓源性抑制细胞(MDSCs)等主要免疫细胞组成了肿瘤免疫微环境^[10]。巨噬细胞是单核细胞系的分化细胞, 不同微环境中, 表现为不同亚型, 主要分为 M1 和 M2 型。一般认为 TAM 更接近于 M2 表型, 可被 IL-10、IL-13、IL-4 激活, 具有促进肿瘤生长和转移作用^[11-12]。

课题组前期研究^[13]表明, 晚期 HCC 患者的 M2 巨噬细胞表达增多, 该研究表明 M2 巨噬细胞在 HCC 患者肿瘤组织中的高表达明显高于癌旁组织, 同时在肿瘤直径大、BCLC 分期晚的患者中表达升高。其机制可能为晚期 HCC 患者中 $\beta 2$ -AR 表达升高, 下游 cAMP/PKA/CREB 和 cAMP/IL-6/STAT3 信号通路被激活, 使 M2 巨噬细胞分泌促肿瘤细胞因子如 IL-6 等增多, 促进了肝癌进展。但是否有其他

机制作用于 M2 巨噬细胞, 影响肝癌进展仍需深入研究。本文进一步研究了 SPP1、PD-L1 与 M2 巨噬细胞及与预后的相关性。

SPP1 是一种重要的细胞外基质成分, 由多种细胞分泌, 包括肿瘤细胞、免疫细胞、成纤维细胞、破骨细胞、平滑肌、淋巴细胞和上皮细胞。在多种肿瘤的肿瘤组织和血清中 SPP1 的表达上调与患者不良预后相关^[14-16]。有研究^[17]表明, 在肺腺癌中, SPP1 可调节巨噬细胞向 M2 型极化, 但具体机制尚不清楚, 在 HCC 中研究较少。该研究表明, SPP1 在 HCC 患者肿瘤组织中的表达高于癌旁组织, 在 BCLC 分期晚、肿瘤直径大、肝内多发肿瘤病灶的患者中升高, 且为肝癌患者的独立预后因素, 高表达 SPP1 的患者生存期短于低表达患者。同时, SPP1 的表达与 M2 巨噬细胞的数量呈正相关, 提示针对 SPP1 靶点的治疗可能是改善 HCC 患者预后的潜在治疗方案。

PD-L1 在肿瘤免疫逃逸中起关键作用, 靶向 PD-L1 已成为多种癌症的一线治疗方法^[18]。研究^[19]表明, 抑制 SPP1 下游 Cdk5 基因的表达可减弱肿瘤细胞 PD-L1 的表达, 并促进抗肿瘤免疫。本研究中, PD-L1 的表达与 HCC 患者的年龄和性别无明显相关, 在肝内多发肿瘤、有 HBV 感染的 HCC 患者中增高, 且为 HCC 患者预后独立因素, PD-L1 高表达 HCC 患者生存期较低表达患者缩短。PD-L1 的表达与 SPP1 的表达、M2 巨噬细胞的数量呈正相关。上述研究结果为今后在 HCC 治疗中, 联合使用 SPP1 抑制剂和 PD-L1 抑制剂提供了一定的理论依据。

综上所述, 该研究表明了 HCC 患者中 SPP1、PD-L1 和 CD163 的异常高表达, 并且与患者的预后

不良密切相关,临床监测 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达有助于预测 HCC 患者的预后。同时 SPP1、PD-L1 和 CD163 的表达有一定的相关性,提示 SPP1 和 PD-L1 可能通过对巨噬细胞的调节作用影响 HCC 发生发展。通过抑制 SPP1 和 PD-L1 的表达干预 HCC 肿瘤微环境中巨噬细胞的极化过程,可能为今后 HCC 的靶向治疗及免疫治疗提供有利的理论依据。

参考文献

- [1] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450–62.
- [2] Rebelo S P, Pinto C, Martins T R, et al. 3D–3–culture: a tool to unveil macrophage plasticity in the tumour microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2018, 163: 185–97.
- [3] Cai X, Zhang H, Li T. The role of SPP1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2022, 51(6): 732–41.
- [4] Sun G, Shang Z, Liu W. SPP1 regulates radiotherapy sensitivity of gastric adenocarcinoma *via* the wnt/beta-catenin pathway [J]. *J Oncol* 2021, 2021: 1642852.
- [5] Tang H, Chen J, Han X, et al. Upregulation of SPP1 is a marker for poor lung cancer prognosis and contributes to cancer progression and cisplatin resistance [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 646390.
- [6] Qi J, Sun H, Zhang Y, et al. Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP⁺ fibroblasts and SPP1⁺ macrophages in colorectal cancer [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1742.
- [7] Velcheti V, Schalper K A, Carvajal D E, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(1): 107–16.
- [8] Boland J M, Kwon E D, Harrington S M, et al. Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung [J]. *Clin Lung Cancer*, 2013, 14(2): 157–63.
- [9] Zhang N, Zhang H, Wu W, et al. Machine learning-based identification of tumor-infiltrating immune cell-associated lncRNAs for improving outcomes and immunotherapy responses in patients with low-grade glioma [J]. *Theranostics*, 2022, 12(13): 5931–48.
- [10] Kim J, Bae J S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6058147.
- [11] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [12] Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology [J]. *Hepatology*, 2014, 59: 2034–42.
- [13] Wu J J, Yang Y, Peng W T, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 regulating β 2-adrenergic receptor signaling in M2-polarized macrophages contributes to hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 5499–513.
- [14] Anborgh P H, Mutrie J C, Tuck A B, et al. Role of the metastasis-promoting protein osteopontin in the tumor microenvironment [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(8): 2037–44.
- [15] Cao D X, Li Z J, Jiang X O, et al. Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(30): 3923–30.
- [16] Mirza M, Shaughnessy E, Hurley J K, et al. Osteopontin-c a selective marker of breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(4): 889–97.
- [17] Zhang Y, Du W W, Chen Z L, et al. Upregulation of PD-L1 by SPP1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(2): 449–57.
- [18] Chang E, Pelosof L, Lemery S, et al. Systematic review of PD-1/PD-L1 inhibitors in oncology: from personalized medicine to public health [J]. *Oncologist* 2021, 26(10): e1786–99.
- [19] Dorand R D, Nthale J, Myers J T, et al. Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity [J]. *Science*, 2016, 353(6297): 399–403.

The correlation of the expression of SPP1, PD-L1 and M2-polarized macrophages in hepatocellular carcinoma and their influence on prognosis

Wu Jingjing¹, Huang Qi¹, Peng Yao¹, Yang Yang²

¹ Dept of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

² Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230036

Abstract Objective To evaluate the expression of programmed death receptor ligand-1 (SPP1), programmed cell death (PD-L1) in hepatocellular carcinoma (HCC), their correlation with M2-polarized macrophages, and their impact on prognosis. **Methods** Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of SPP1, PD-L1, and CD163 (commonly used markers of M2-polarized macrophages) in 81 HCC patients. The correlation between the expression of SPP1, PD-L1, and CD163 and the clinical characteristics of patients and their prognosis

网络出版时间: 2023-05-31 09:53:41 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1633.015.html>

Pirfenidone 通过癌相关成纤维细胞抑制胆道肿瘤侵袭

魏亦成^{1,2,3}, 王紫怡⁴, 李 炜⁵, 殷佩浩^{1,2,3,5}

摘要 目的 探究吡非尼酮(PFD)通过癌相关成纤维细胞(CAF)抑制胆道肿瘤侵袭的相关机制。方法 从胆道肿瘤患者的肿瘤组织中提取原代CAF,运用Western blot方法检测CAF的标志蛋白:波形蛋白(VIM), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),成纤维细胞激活蛋白(FAP)。鬼笔环肽实验显示成纤维细胞骨架功能。ELISA和Western blot实验验证正常成纤维细胞(NF)与CAF的TGF- β 表达差异。通过CAF中加入PFD观察CAF的功能变化。ELISA、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot实验验证CAF的TGF- β 表达变化。通过皮下瘤小鼠模型验证血清中TGF- β 的变化。胶原收缩实验观察CAF胶原收缩功能的改变。明胶酶谱实验观察CAF的培养基中的MMP2、MMP9的变化。Western blot方法检测CAF中SMAD信号通路蛋白变化。结果 CAF的相关标志蛋白VIM, α -SMA,FAP均高表达,且CAF的丝状肌动蛋白(F-actin)表达丰富。ELISA实验显示CAF的TGF- β 表达增强。Western blot实验验证CAF的胶原功能更强。

Western blot实验、PCR实验和相关现象实验说明PFD能抑制CAF的胶原生成和TGF- β 表达。SMAD信号通路相关蛋白实验证明PFD能通过抑制TGF- β /SMAD信号通路从而影响肿瘤侵袭。结论 癌症患者中提取的CAF的功能以胶原生成成为主,而PFD通过TGF- β /SMAD信号通路抑制CAF的胶原产生和胶原重塑相关过程从而起到抑制肿瘤侵袭的作用。

关键词 Pirfenidone; 癌相关成纤维细胞; TGF- β /SMAD通路; 胆囊癌; 胆管癌; 胶原收缩; 侵袭

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0975-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.017

胆囊癌(gallbladder cancer,GBC)和胆管癌(cholangiocarcinoma,CCA)目前发病率在高收入国家呈上升趋势,由于胆道肿瘤的侵袭性较强导致肿瘤恶性程度高和预后较差^[1]。肿瘤的侵袭能力与肿瘤微环境(tumor microenvironment,TME)具有密切关系,其中癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast,CAF)在肿瘤微环境中起到了重要作用。在CAF的过去研究中指出存在多种功能不同的CAF,例如炎症CAF和肌成纤维细胞CAF(myofibroblast-like CAF,myCAF)^[2]。其中myCAF与胶原蛋白的产生相关^[3]并且能够增加细胞外基质的刚度^[4],是TME形成和重塑的重要因素。

吡非尼酮(Pirfenidone,PFD)是一种新型抗纤维化剂,被批准用于特发性肺纤维化和其他纤维化相

2023-03-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873137);上海市普陀区临床特色专病建设项目(编号:2020tszb03);上海市普陀区中心医院教学课题(编号:Y-446)

作者单位:¹安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

²安徽医科大学第五临床医学院,合肥 230032

³上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所,上海 200062

⁴华东理工大学药学院,上海 200237

⁵上海中医药大学附属普陀医院普外科,上海 200062

作者简介:魏亦成,男,硕士研究生;

殷佩浩,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yinpeihao@shutem.edu.cn

were analyzed. The relationship between SPP1, PD-L1, and M2-polarized macrophages in HCC tissue was also analyzed. **Results** The expression of SSP1, PD-L1 and CD163 increased in HCC tissues compared with para-carcinoma tissues. The expression of SSP1, PD-L1 and CD163 were all related to the BCLC staging ($P < 0.05$), but were not related to age and sex. The expression of SSP1 was elevated in HCC patients with large tumor diameter and multiple intrahepatic tumors, PD-L1 was elevated in HCC patients with multiple intrahepatic tumors and HBV infection. SSP1, PD-L1 and CD163 were related to the prognosis, and high expression patients had lower 3-year OSR and OST compared to low expression patients. Cox analysis showed the BCLC staging, SPP1 and PD-L1 were independent prognostic factors. The expression of SPP1 and PD-L1 were positively correlated with M2 macrophages in HCC. **Conclusion** SPP1, PD-L1 and CD163 can be used to evaluate the biological behaviors of HCC, and the positive expression of SPP1 and PD-L1 suggests that HCC patients may have a poor prognosis.

Key words hepatocellular carcinoma; tumor microenvironment; macrophage; SPP1; PD-L1