

CD155/TIGIT 在骨肉瘤组织中的表达

梁金容^{1,2,3}, 张雅文^{1,2,3}, 孙元珏², 胡海燕³

摘要 目的 研究 CD155/TIGIT 在骨肉瘤患者中的表达及其意义。方法 通过癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库分析骨肉瘤远处转移患者和非转移患者肿瘤组织中 CD155 及 TIGIT 的表达差异,并收集骨肉瘤患者手术切除组织制备病理切片和组织芯片,采用 HE 染色观察肿瘤组织细胞形态,免疫组织化学染色检测 CD155、TIGIT 表达并评分,根据评分结果分为高表达组和低表达,采用卡方检验分析 CD155/TIGIT 的表达与临床特征及预后的关系。结果 TCGA 数据库数据显示骨肉瘤伴有转移的患者 CD155、TIGIT 表达更高。病理切片 HE 染色显示 CD155/TIGIT 高表达的肿瘤组织含更多双核或多核、核深染、明显异形的肿瘤细胞。组织芯片免疫组化染色及评分分析显示 CD155、TIGIT 的表达与临床分期、和远处转移相关 ($P < 0.05$),而与年龄、性别、肿瘤大小、病理类型及肿瘤坏死率无明显相关。结论 CD155、TIGIT 有可能是判断骨肉瘤预后的指标之一。

关键词 骨肉瘤;CD155/TIGIT;TCGA 数据库;组织芯片;预后

中图分类号 R 738.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0037-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.007

骨肉瘤是具有高度异质性的恶性骨肿瘤^[1],好发于儿童,接受外科手术联合新辅助化疗、辅助化疗的局部病变患者 5 年生存率可达 78%,但伴有远处转移的患者生存率仅为 25%^[2-3]。

近年来,包括 CTLA-4 和 PD-1 在内的免疫检查点抑制剂的使用已在临床试验中得到评估,并被证明可延长患者生存期^[4]。然而,它们的临床肿瘤抑制效果似乎有限,因此有必要寻找新的治疗靶点。TIGIT 是最近发现的一种共抑制受体,其与 CD155 之间的相互作用可介导淋巴细胞的功能衰竭和低反应性,并诱导肿瘤细胞的免疫逃逸。CD155/TIGIT

在骨肉瘤中的表达及其临床意义研究甚少。该研究运用了 TCGA 数据库、苏木精-伊红染色法和免疫组化法检测 CD155/TIGIT 在骨肉瘤组织中的表达并通过 χ^2 检验分析其临床意义,为免疫治疗在骨肉瘤中的应用提供理论依据。

1 方法

1.1 病例资料 收集 2017 年至 2019 年在上海市第六人民医院肿瘤内科就医的 90 例骨肉瘤患者手术切除组织制备病理切片及组织芯片。患者的选择标准为:① 手术切除前未接受新辅助化疗或放疗;② 除骨肉瘤外,患者无其他类型疾病。从病历中收集患者相关临床病理数据,总生存率 (overall survival, OS) 从患者随访中收集。收集 80 例 (90 例肿瘤组织芯片中 10 例脱落故除去相应的患者) 患者的临床资料,其中男性 51 例,女性 29 例;年龄 6 ~ 70 (19.45 ± 4.24) 岁, < 15 岁 47 例, ≥ 15 岁 33 例。这项回顾性研究符合医院伦理委员会的标准,患者均签署了知情同意书。

1.2 癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库分析 从 TCGA 数据库中下载 44 例患者肿瘤组织中不同基因表达的数据,22 例患者无远处转移,其余 22 例患者伴远处转移。所得的原始数据经 R 语言转化成 RPKM 值再进行后续的一系列分析。

1.3 病理组织学检测 将已脱蜡病理切片放入苏木精水溶液中染色数分钟,酸水及氨水中分色各数秒钟,流水冲洗数分钟后放入蒸馏水片刻后放入 70% 和 90% 酒精中脱水各 10 min,放入酒精伊红染色液染色 2 ~ 3 min,染色后的切片经纯酒精脱水,再经二甲苯使切片透明,最后使用中性树脂封片。显微镜观察,采集图像。

1.4 免疫组化评分 免疫组织化学按说明书进行。兔抗人一抗 CD155 (VB2940273B, invitrogen, 美国)、TIGIT (ab243903, abcam, 美国) 浓度为 1 : 200,山羊抗兔二抗浓度为 1 : 200。免疫组化试剂盒以及二抗购于赛维尔公司 (武汉)。测量区域平均阳性强度为 0、1、2、3 分;阴性无着色,计 0 分;弱

2022-10-10 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:82072967)

作者单位:¹ 安徽理工大学医学院, 淮南 232000

² 上海市奉贤区中心医院肿瘤内科, 上海 200000

³ 上海市第六人民医院肿瘤内科, 上海 200000

作者简介:梁金容,女,硕士研究生;

胡海燕,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xuril104@163.com

阳性淡黄色,计1分;中阳性棕黄色,计2分;强阳性棕褐色计3分。对细胞阳性比率进行评分:0~5%为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。以染色强度和染色范围评分的乘积来表示最终结果:阴性=0分,弱阳性=1~4分,阳性=5~8分,强阳性=9~12分。

1.5 统计学处理 所得数据使用 SPSS 22 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验分析 CD155/TIGIT 在肿瘤转移患者和非转移患者之间的表达差异, χ^2 检验确定肿瘤细胞上 CD155 表达、肿瘤浸润性免疫细胞上 TIGIT 与临床病理特征之间的相关性,生存率通过 Kaplan - Meier 方法进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCGA 数据库分析骨肉瘤肿瘤组织中 CD155、TIGIT 表达 从 TCGA 数据库所得的原始数据经 R 语言转化为 RPKM 值,使用 SPSS 22 两独立样本 *t* 检验分析 CD155 及 TIGIT 在骨肉瘤未转移患者和转移患者之间的表达。结果表明,CD155 在骨肉瘤伴远处转移患者中的表达量更高($t = 2.781$, $P = 0.008$),TIGIT 也能得出相似的结论($t = 2.416$, $P = 0.020$),差异有统计学意义。

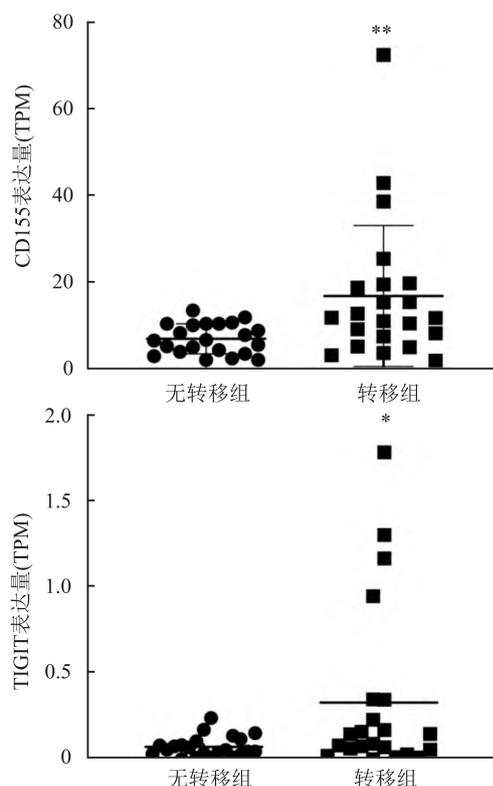


图1 CD155、TIGIT 在非转移和转移患者肿瘤组织中的表达与无转移组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 HE 染色观察 CD155/TIGIT 不同表达状态下的肿瘤细胞形态 将患者的病理切片进行 HE 染色,显微镜下观察肿瘤细胞形态,与 CD155/TIGIT 低表达患者的肿瘤组织相比,CD155/TIGIT 高表达的患者肿瘤组织中可见更多双核或多核、核深染、明显异形的肿瘤细胞。

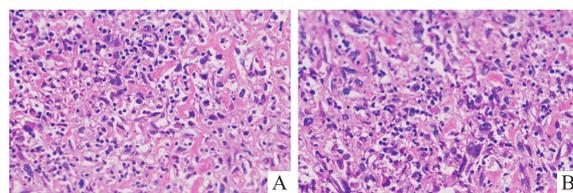


图2 CD155/TIGIT 不同表达状态下肿瘤组织 HE 染色 HE × 200
A:CD155/TIGIT 低表达;B:CD155/TIGIT 高表达

2.3 免疫组织化疗法分析骨肉瘤细胞组织芯片中 CD155、TIGIT 的表达 按照免疫组化评分结果将 80 例(组织芯片共 90 例患者肿瘤组织,其中 10 例脱落或不清晰未计入)骨肉瘤原发灶的组织芯片分为高表达组和低表达组。CD155(低表达组 vs 高表达组: 5.07 ± 0.65 vs 10.25 ± 1.37)(图 3A)、TIGIT(低表达组 vs 高表达组: 3.78 ± 0.98 vs 7.56 ± 1.06)(图 3B)表达高低与骨肉瘤患者临床病理特征分析结果见表 1,本研究未观察到 CD155/TIGIT 的表达呈显著的正相关关系。经卡方检验分析 CD155、TIGIT 的表达量高低与患者的年龄、性别、肿瘤大小、化疗坏死率、病理类型间均无关,但与临床分期和有无转移有关($P < 0.05$),见表 1。

2.4 生存分析 此次研究的中位随访时间为 24 个月,在此期间 30 例患者因死亡而终止采访。绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,以比较骨肉瘤患者 CD155、TIGIT 高表达与低表达之间的 OS。如图 4,与高 CD155、TIGIT 水平的患者相比,低 CD155、TIGIT 水平的患者的 OS 明显更长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

CD155 是免疫球蛋白超家族 Nectin 家族的一员,在正常生理情况以极低水平表达于树突状细胞、成纤维细胞和内皮细胞,参与细胞间黏附、迁移、增殖和免疫反应的调节^[5-6]。肿瘤细胞表面表达的 CD155 可与 NK 细胞、T 细胞表面的 TIGIT、CD96、CD226 结合,CD226 是共刺激激活受体,而 TIGIT、CD96 则是共抑制受体。TIGIT、CD96、CD226 与 CD155 的结合取决于他们之间的亲和力,TIGIT 与

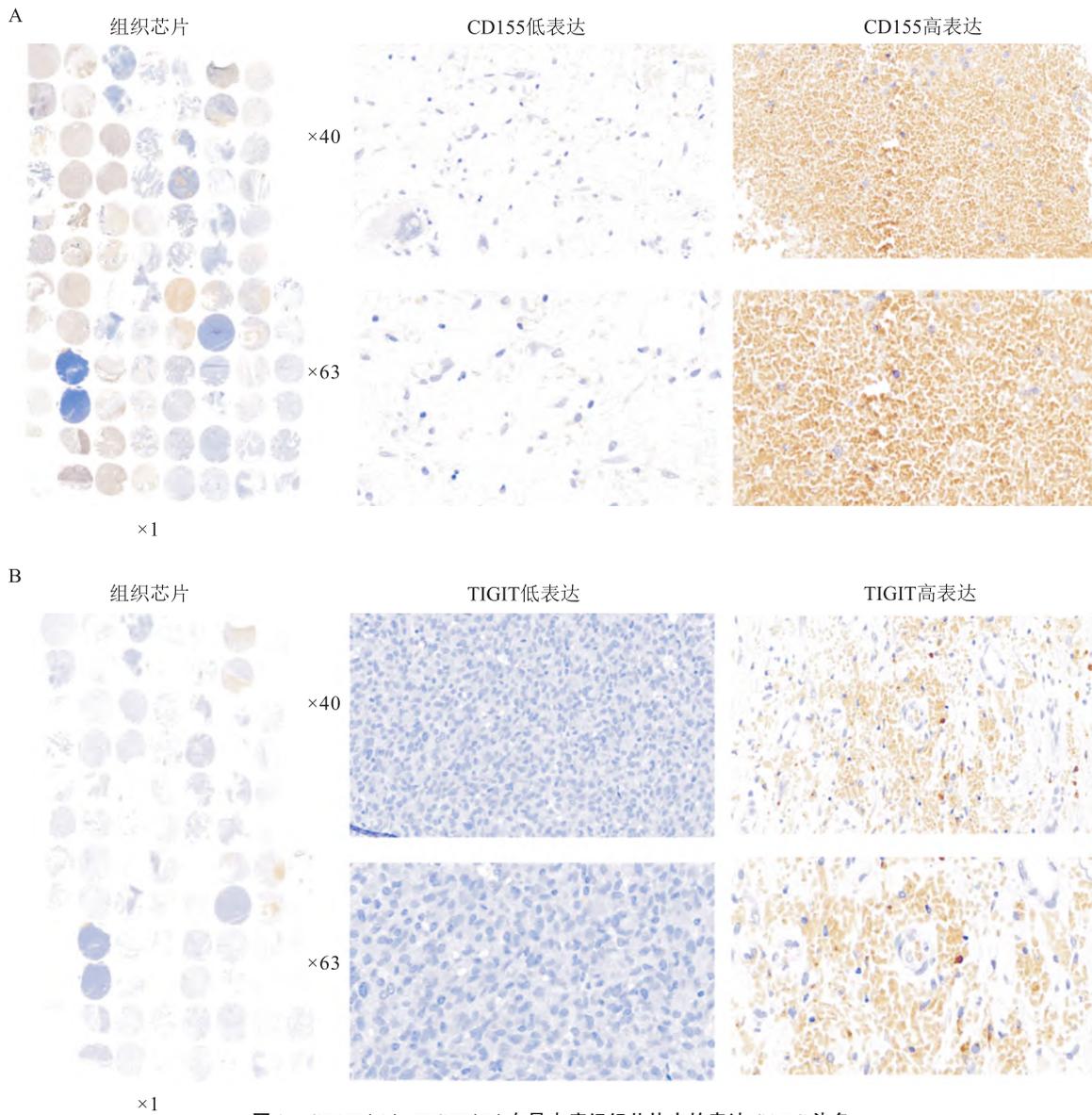


图3 CD155 (A)、TIGIT (B) 在骨肉瘤组织芯片中的表达 SABC 染色

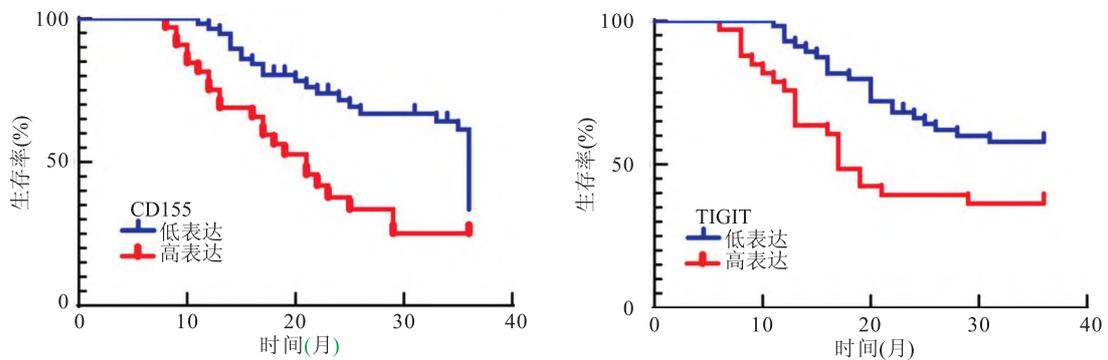


图4 CD155、TIGIT 表达与生存率分析

CD155 的亲合力最高,其次是 CD96、CD226,因此 CD155 首先与 TIGIT 结合直接发挥免疫抑制作用,与此同时 TIGIT 可抑制 CD155 与 CD226 的结合从而发挥间接免疫抑制作用^[7-9]。

先前的研究^[10]表明 CD155/TIGIT 与多种肿瘤的发生、发展及预后不良有密切关系。Zhou et al^[11]的研究结果表明 CD155 在肺转移组织和骨肉瘤高转移细胞系 K7M2-WT 中显著上调,而阻断 CD155

表1 骨肉瘤组织中 CD155、TIGIT 的表达与临床特征的分析

临床特征	CD155 表达				TIGIT 表达			
	低表达 (n=47)	高表达 (n=33)	χ^2 值	P 值	低表达 (n=55)	高表达 (n=25)	χ^2 值	P 值
性别							2.361	0.124
男	31	20	0.240	0.624	32	19		
女	16	13			23	6		
年龄(岁)							1.734	0.188
≤15	30	17	1.213	0.271	35	12		
>15	17	16			20	13		
肿瘤大小(cm)							1.455	0.228
≤10	27	13	2.527	0.112	30	10		
>10	20	20			25	15		
临床分期							4.752	0.029
I~II	22	8	4.212	0.040	25	5		
III	25	25			30	20		
病理类型							0.002	0.967
普通型*	39	28	0.050	0.823	46	21		
变异型#	8	5			9	4		
肺转移							4.728	0.030
有	6	11	4.901	0.027	8	9		
无	41	22			47	16		
肿瘤坏死率(%)							0.035	0.852
≤90	29	21	0.031	0.860	34	16		
>90	18	12			21	9		

*普通型包括成骨性骨肉瘤、成软骨性骨肉瘤、成纤维性骨肉瘤;#变异型包括毛细血管扩张性骨肉瘤、小细胞型骨肉瘤、上皮样骨肉瘤、巨细胞瘤型骨肉瘤

表达之后,骨肉瘤细胞侵袭和转移明显减少。Le Goux et al^[12]评估了 33 个基因在膀胱癌发生过程中参与免疫反应的可能性和预后价值,发现 TIGIT 的升高会增强膀胱癌的侵袭性。Zhao et al^[13]用免疫组织化学检测了 114 例 PSCCE 中 CD155 和 TIGIT 的表达,并评估了它们与患者临床病理特征与生存率的关系,发现 CD155/TIGIT 高表达并与肿瘤大小、T 分期、远处转移、TNM 分期和 Ki-67 评分显著相关,且 CD155 表达是原发性食管小细胞癌的独立预后因素。

本研究通过 TCGA 数据库收集并分析了 44 例骨肉瘤患者 CD155/TIGIT 表达情况,显示伴有远处转移的患者 CD155/TIGIT 表达量高于局部肿瘤患者($P < 0.05$)。HE 染色表明 CD155/TIGIT 高表达患者肿瘤组织中含有更多双核或多核、核深染、明显异形的肿瘤细胞。免疫组化结果显示 CD155/TIGIT 在部分骨肉瘤患者中高表达,但两者之间无严格的正相关关系,结合临床资料进一步分析显示 CD155/TIGIT 的高表达与临床分期和远处转移相关($P < 0.05$),而与年龄、性别、肿瘤大小、病理类型及肿瘤坏死率无明显相关。Kaplan - Meier 生存分析显示

CD155/TIGIT 高表达与较短的总生存率显著相关,其 P 值均 < 0.05 , 差异有统计学意义,这与 CD155/TIGIT 在其他肿瘤中的表达及意义类似。Murakami et al^[14]用免疫组织化学染色法检测了 100 例接受肿瘤完全切除的大肠癌患者 CD155/TIGIT 的表达,评估了 CD155/TIGIT 表达与预后的相关性,发现 CD155/TIGIT 高表达的患者预后比其他表达水平的患者差,且高 CD155/TIGIT 表达被确定为独立的不良预后因素。Duan et al^[15]采用免疫组织化学、逆转录定量 PCR 分析和 Western blot 检测肝癌患者癌组织和外周血中 TIGIT/CD155 的表达,随着肿瘤分化程度从高到低,肝癌患者癌组织中 TIGIT/CD155 的表达水平上调,TIGIT 表达增加与 AFP 水平呈正相关。

综上所述,过表达的 CD155 与 T 细胞、NK 细胞等细胞表面的共抑制受体 TIGIT 结合,促进骨肉瘤细胞的进展,且与患者的不良预后有着密切的关系,对预测骨肉瘤患者预后有着重要的意义,并为骨肉瘤的临床治疗提供了一种新的可能性。目前,CD155/TIGIT 影响肿瘤进展的机制研究多集中于肿瘤细胞免疫逃逸。He et al^[16]证明在结直肠癌中,阻断 CD155/TIGIT 信号通路可通过激活 NF- κ B 通路中 I κ B 和 p65 的磷酸化过程,增强肿瘤浸润 CD8⁺ T 细胞的免疫反应性。在肝细胞癌中,过表达的 CD155 使 CD8 T 细胞上的 TIGIT 上调,从而减少干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-17A 的分泌,并增加效应细胞中白细胞介素-10 的分泌,促进肿瘤进展。然而 CD155/TIGIT 促进骨肉瘤进展的具体机制仍不清楚,本课题组后续将收集骨肉瘤患者外周血和手术切除组织并通过流式细胞术、免疫印迹或免疫组织化学等方法对其进行分析,以明确其作用机制。

参考文献

- [1] Rojas G A, Hubbard A K, Diessner B J, et al. International trends in incidence of osteosarcoma (1988 - 2012) [J]. Int J Cancer, 2021, 149(5): 1044 - 53.
- [2] Gaspar N, Occean B, Pacquement H, et al. Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study [J]. Eur J Cancer, 2018, 88: 57 - 66.
- [3] 张香路,王震,常俊,等. FASTKD4 在骨肉瘤组织中表达及对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(3): 355 - 60.
- [4] Livingston M, Jagosky M, Robinson M, et al. Phase II study of pembrolizumab in combination with doxorubicin in metastatic and unresectable soft-tissue sarcoma [J]. Clin Cancer Res, 2021, 27

- (23): 6424–31.
- [5] Molfetta R, Zitti B, Lecce M, et al. CD155: A multi-functional molecule in tumor progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 922.
- [6] O'donnell J, Madore J, Li X, et al. Tumor intrinsic and extrinsic immune functions of CD155 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 65: 189–96.
- [7] Deuss F A, Watson G M, Fu Z, et al. Structural basis for CD96 immune receptor recognition of nectin-like protein-5, CD155 [J]. *Structure*, 2019, 27(2): 219–28.
- [8] Anderson A C, Joller N, Kuchroo V K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation [J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 989–1004.
- [9] 周海波, 陈 炯, 邬高华, 等. CD155 蛋白在胰腺癌组织和细胞系中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(8): 1294–8.
- [10] Liu L, You X, Han S, et al. CD155/TIGIT, a novel immune checkpoint in human cancers (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(3): 835–45.
- [11] Zhou B, Li Y, Gu F, et al. Overexpression of CD155 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7312–8.
- [12] Le Goux C, Vacher S, Pignot G, et al. mRNA expression levels of genes involved in antitumor immunity: Identification of a 3-gene signature associated with prognosis of muscle-invasive bladder cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(11): e1358330.
- [13] Zhao K, Ma L, Feng L, et al. CD155 overexpression correlates with poor prognosis in primary small cell carcinoma of the esophagus [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 7: 608404.
- [14] Murakami D, Matsuda K, Iwamoto H, et al. Prognostic value of CD155/TIGIT expression in patients with colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0265908.
- [15] Duan X, Liu J, Cui J, et al. Expression of TIGIT/CD155 and correlations with clinical pathological features in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3773–81.
- [16] He W, Zhang H, Han F, et al. CD155/TIGIT signaling regulates CD8 T-cell metabolism and promotes tumor progression in human gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(22): 6375–88.

Expression of CD155/TIGIT in osteosarcoma

Liang Jinrong^{1,2,3}, Zhang Yawen^{1,2,3}, Sun Yuanjue², Hu Haiyan³

(¹Medical College of Anhui University of Technology, Huainan 232000; ²Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 200000; ³Dept of Oncology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200000)

Abstract Objective To investigate the expression of CD155/TIGIT in patients with osteosarcoma and its significance. **Methods** The expression differences of CD155 and TIGIT in tumor tissues of distant metastatic osteosarcoma patients and non-metastatic osteosarcoma patients were analyzed by cancer Genome Atlas (TCGA) database. The surgically removed tissues of osteosarcoma patients were collected to prepare pathological sections and tissue chips, and the tumor tissue and cell morphology were observed by HE staining. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CD155 and TIGIT, and the scores were divided into high expression group and low expression group according to the scores. Chi-square test was used to analyze the relationship between CD155/TIGIT expression and clinical features and prognosis. **Results** TCGA database data showed higher expression of CD155 and TIGIT in patients with osteosarcoma accompanied by metastasis. HE staining of pathological sections revealed that tumor tissues with high expression of CD155/TIGIT contained more binuclear or multinucleated, hyperchromatic and obviously heteromorphic tumor cells. Immunohistochemical staining and score analysis of tissue chip showed that the expression of CD155 and TIGIT was correlated with clinical stage and distant metastasis ($P < 0.05$), but not with age, sex, tumor size, pathological type and tumor necrosis rate. **Conclusion** CD155 and TIGIT may be one of the prognostic indicators of osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; CD155 / TIGIT; TCGA database; tissue chip; prognosis