

多发性骨髓瘤患者血清可溶性PD-L1水平在辅助诊断及临床分型的价值研究

何进¹, 张艳^{2a}, 申娟娟^{2b}, 鞠少卿^{2a} (1. 杭州余杭嘉木护理院, 杭州 310000; 2. 南通大学附属医院
a. 医学检验中心; b. 临床医学研究中心, 江苏南通 226001)

摘要: 目的 探讨多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 患者血液可溶性程序性死亡受体-1 (soluble programmed death-ligand 1, sPD-L1) 表达及临床意义。方法 选取MM患者65例 (MM组), 健康体检者65例 (对照组); 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测sPD-L1表达量; 采用受试者工作特征 (receiver operator characteristic curve, ROC) 曲线评估各指标单独及联合检测对MM的诊断效能。结果 MM组和对照组sPD-L1表达量分别为1.330 (0.482, 3.000) ng/ml和0.310 (0.280, 0.360) ng/ml, MM患者显著高于健康对照者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); ISS-II期患者sPD-L1表达水平高于ISS-I期 ($P<0.05$), ISS-III期患者sPD-L1水平高于ISS-II期患者 ($P<0.05$); sPD-L1表达水平与 β_2 微球蛋白 (β_2 -microglobulin, β_2M) 相关 ($P=0.033$); sPD-L1曲线下面积 (AUC) 为0.789, 高于 β_2M , λ 轻链和 κ 轻链。sPD-L1诊断MM的灵敏度最高, sPD-L1, λ 轻链和 β_2M 单独或者联合应用得到较理想的诊断效能。结论 MM患者sPD-L1表达水平增高, 检测sPD-L1水平变化可用于MM的辅助诊断及临床分型。

关键词: 多发性骨髓瘤; 可溶性程序性死亡受体-1; 受试者工作特征曲线

中图分类号: R733.3; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-015-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.004

Value of Blood Soluble PD-L1 in the Auxiliary Diagnosis and Clinical Subtype of Multiple Myeloma

HE Jin¹, ZHANG Yan^{2a}, SHEN Xian-juan^{2b}, JU Shao-qing^{2a}

(1. Hangzhou Yuhang Jiamu Nursing Home, Hangzhou 310000, China; 2a. Center of Laboratory Medicine; b. Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression level and clinical value of sPD-L1 in multiple myeloma (MM). **Methods** 65 MM patients (MM group) and 65 healthy controls (control group) were selected. The expression of sPD-L1 was detected by ELISA. The receiver operator characteristic curve (ROC) was used to evaluate the diagnostic efficacy of each indicator alone and combined detection on MM. **Results** The relative expression levels of sPD-L1 in MM group and control group were 1.330 (0.482, 3.000) ng/ml and 0.310 (0.280, 0.360) ng/ml, respectively, and MM group was significantly higher than the control group. The levels of sPD-L1 were significantly higher in ISS-II MM patients than ISS-I patients, the difference was statistically significant ($P<0.05$). And the levels of sPD-L1 were higher in ISS-III patients than ISS-II patients ($P<0.05$). The expression levels of sPD-L1 were significantly correlated with β_2 -microglobulin (β_2M) ($P=0.033$). The area under the curve (AUC) of sPD-L1 was 0.789, which higher than that of β_2M , λ light chain and κ light chain. The diagnostic sensitivity of sPD-L1 was highest. sPD-L1, λ light chain or β_2M was used alone or in combination to obtain better diagnostic efficiency. **Conclusion** The sPD-L1 level was increased in MM patients, and the detection of sPD-L1 level changes can be used for the auxiliary diagnosis and clinical subtype of MM.

Keywords: multiple myeloma; soluble programmed death-ligand 1; receiver operator characteristic curve

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是第二常见的血液系统恶性肿瘤^[1]。即使最近的治疗方案有了进步, 患者通常也会产生耐药性并复发^[2]。对传统治疗方法难以适应的患者预后较差。目前正在寻找新的治疗策略以及预测MM耐药和预后的生物标志物^[3-4]。

程序性死亡配体1 (programmed deathligand 1, PD-L1), 也被称为B7-H1和CD274, 是一种细胞表面糖蛋白, 与T淋巴细胞上的受体程序性死亡-1 (PD-1) 结合, 通常涉及细胞暴露于长时间的抗原刺激时, 免疫反应终止, 免疫衰竭^[5]。在抗原呈递细胞、血管内皮细胞、胰岛细胞以及免疫特异性位

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (NO. 81271920)。

作者简介: 何进 (1984-), 男, 主管技师, 主要从事临床生化与分子生物检验, E-mail: 153445920@qq.com。

通讯作者: 鞠少卿, 男, 主任技师, 博士生导师, 主要从事分子标志物的基础与临床研究, E-mail: Jsq814@hotmail.com。

点(胎盘、睾丸及眼睛)上低表达,在大量恶性肿瘤中也有表达^[6]。PD-1的另一个配体PD-L2的表达受到更多的限制,活化后可在树突状细胞和巨噬细胞上发现^[7]。

PD-1和PD-L1阻断抗体是一种很有前途的新型免疫治疗策略。在MM中定位PD-1/PD-L1轴的相关性已在临床前模型中得到证实,两种主要的PD-1抑制剂纳武单抗(nivolumab)和派姆单抗(pembrolizumab)以及PD-L1抑制剂度伐单抗(durvalumab)在MM中被研究^[8]。ROSSILLE等^[9]人最近发现,血液中可溶性PD-L1(sPD-L1)浓度可以预测弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)患者的总体生存期和治疗反应。目前关于sPD-L1在MM中的临床意义尚未十分清楚。本研究旨在检测sPD-L1在MM患者中的表达情况,并探究sPD-L1水平在疾病辅助诊断及预测治疗反应中的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2017年10月~2019年04月期间,由南通大学附属医院诊断为多发性骨髓瘤并且未接受治疗的患者65例,其中女性29例,男性36例,年龄16~85岁,平均年龄 65 ± 11 岁。65例同时期健康对照者作为对照。健康组年龄20~78岁,平均年龄 58 ± 8 岁。MM的诊断、分期及风险状态均按照美国国家综合癌症网络指南(NCCN)(2015年第3版,2017年第3版)。本研究经南通大学附属医院伦理委员会批准,且所有受试的患者及健康体检者均知情同意。

1.2 仪器与试剂 sPD-L1检测试剂盒(CSB-E13644h)购于武汉华美生物工程有限公司。血清LDH浓度用日立7600-020全自动生化仪检测; β_2M , κ 链和 λ 链浓度用AXSYM全自动免疫分析仪检测。

1.3 方法

1.3.1 血清标本采集与处理:用含有分离胶的真空采血管采集MM患者与健康供者外周血,室温4000 r/min离心8 min分离血浆,分装于1.5 ml RNase-free的EP管中置 -80°C 长期保存。

1.3.2 ELISA检测sPD-L1:每孔加入100 μl 样品或

者标准品,37 $^\circ\text{C}$ 孵育2 h;去除孔内液体不洗,每孔添加100 μl 生物素标记抗体,37 $^\circ\text{C}$ 孵育1 h;洗涤3次,每孔添加100 μl 亲和素标记的过氧化物酶,37 $^\circ\text{C}$ 孵育1 h;洗涤5次,加入90 μl TMB,37 $^\circ\text{C}$ 避光反应30 min;加入50 μl 终止液,450 nm波长下读数。

1.4 统计学分析 采用SPSS软件18.0和Graphpad Prism 6.0软件进行分析及绘图。计量资料以中位数(四分位间) $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示;组间比较采用Mann-Whitney U 检验;ROC曲线评估各指标单独及联合检测对MM的诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MM患者sPD-L1的表达水平 见图1。ELISA检测MM患者sPD-L1表达水平。结果显示,MM患者组和健康对照组MM患者sPD-L1表达水平分别为1.330(0.482, 3.000) ng/ml和0.310(0.280, 0.360) ng/ml,MM患者sPD-L1表达水平显著高于健康对照组($P < 0.0001$)。

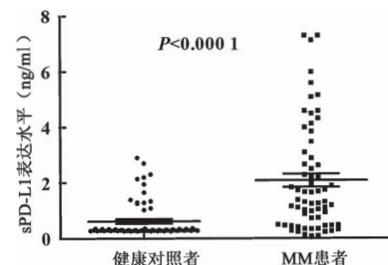
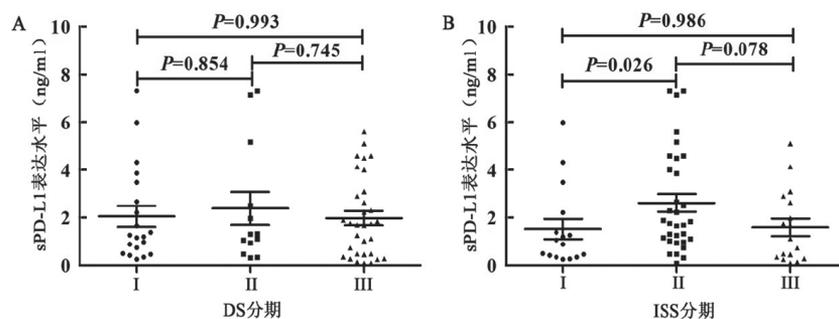


图1 MM患者及健康对照者sPD-L1表达水平(ng/ml)

2.2 MM患者sPD-L1与MM临床分期的关系 根据以下分期系统对本研究中65例MM患者进行了分期:Durie-Salmon(DS),国际分期系统(ISS)。然后,根据疾病分期对MM患者sPD-L1水平进行分析,发现与DS-I期相比,DS-II期和DS-III期患者sPD-L1表达水平无显著差异($P > 0.05$),图2A。ISS-II期患者sPD-L1表达水平高于ISS-I期,ISS-III期患者sPD-L1水平高于ISS-II期患者($P < 0.05$),ISS-I期和ISS-III期之间无显著差异($P > 0.05$),图2B。以上结果表明MM患者sPD-L1水平可能对MM疾病分期具有一定的临床价值。



A. sPD-L1与DS分期的关系

B. sPD-L1与ISS分期的关系

图2 sPD-L1与MM临床分期的关系

2.3 MM患者sPD-L1表达水平与临床病理特征的关系 见表1。将患者sPD-L1表达水平与临床病理参数相关联。评估sPD-L1表达水平与性别、年龄、M蛋白、 β_2M 、轻链、总蛋白和LDH之间的关系。

结果显示sPD-L1表达水平与 β_2M ($P=0.033$)相关。而性别、年龄、M蛋白、总蛋白、轻链和LDH与sPD-L1表达水平不相关 ($P>0.05$)。

表1 sPD-L1与MM患者临床病理参数的关系 [M(P_{25} , P_{75})]

临床参数		n	sPD-L1表达量	U/H值	P值
性别	男	34	1.195 (0.428, 2.955)	465.0	0.419
	女	31	1.670 (0.496, 3.100)		
年龄(岁)	<65	30	1.530 (0.492, 3.895)	493.5	0.683
	≥ 65	35	1.317 (0.480, 2.500)		
M蛋白	IgA	38	1.804 (0.850, 3.928)	4.369	0.113
	IgG	8	1.195 (0.480, 3.735)		
	未分类	19	0.980 (0.352, 1.661)		
轻链	λ	39	1.330 (0.466, 2.900)	456.5	0.613
	κ	26	1.354 (0.895, 3.290)		
总蛋白	离群值区间	40	1.489 (0.486, 3.965)	403.0	0.591
	参考区间	25	1.295 (0.464, 2.398)		
β_2M ($\mu g/ml$)	<3.5	23	1.030 (0.466, 1.699)	336.0	0.033
	≥ 3.5	42	1.804 (0.680, 4.179)		
LDH (U/L)	离群值区间	17	1.317 (0.399, 3.000)	359.5	0.474
	参考区间	39	1.661 (0.496, 3.480)		

2.3 sPD-L1对MM的诊断效能评价 见图3。根据65例MM患者和45例健康对照sPD-L1, β_2M , λ 轻链和 κ 轻链的表达水平, 绘制受试者工作曲线(ROC曲线), 并以曲线下面积(AUC)评价诊断效能。结果显示, sPD-L1的AUC为0.789 (95% CI: 0.705~0.873) 高于 β_2M (AUC: 0.777; 95% CI: 0.697~0.856), λ 轻链 (AUC: 0.698; 95% CI: 0.599~0.796) 和 κ 轻链 (AUC: 0.770; 95% CI: 0.688~0.852)。提示sPD-L1作为MM辅助诊断标志物具有较好的诊断效能。

灵敏度、特异度和准确率。数据显示sPD-L1的灵敏度最高(83.1%), 而 λ 轻链的特异度最高(84.6%)。将两种指标联合检测时, 发现sPD-L1和 β_2M 组合的灵敏度最高(96.9%)。上述结果表明sPD-L1与 λ 轻链, β_2M 单独或者联合应用可用于MM辅助诊断。

3 讨论

近年来, PD-1和PD-L1在许多疾病中的表达及作用被广泛研究^[10-11]。许多学者发现PD-L1在MM患者骨髓瘤浆细胞上过表达, 但在健康供者的正常浆细胞上不表达, MM细胞表面PD-L1表达高, 骨髓瘤细胞上的PD-L1与T细胞上的PD-1直接相互作用, 诱导其对抗骨髓瘤化疗产生耐药性^[12]。

DHODAPKAR等^[13]报道了PD-L1的表达与临床MM的风险增加之间的相关性。在本研究中, 我们发现与健康对照组相比, MM患者的sPD-L1水平明显升高。有研究发现健康献血者的血清sPD-L1浓度随年龄增长而增加, 提示循环中的sPD-L1水平与个体免疫系统的健康有关^[14], 因此, sPD-L1可能在调节免疫活动中发挥重要作用。此外, 在MM患者中, 血清sPD-L1水平与 β_2M 相关, 而与其他临床特征无关。在sPD-L1与MM分期的相关性分析中, 发现ISS分期较高级别的MM病人其sPD-L1的表达水平也相应较高, 提示其与

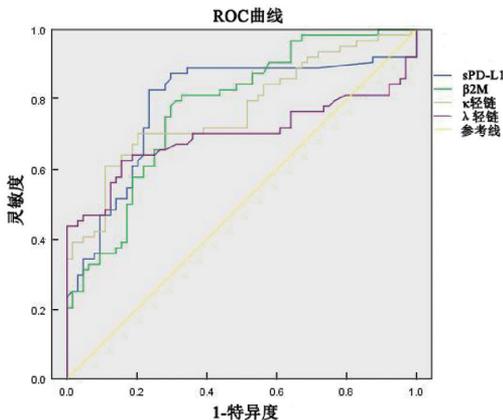


图3 ROC曲线评价各指标的诊断效能

2.4 sPD-L1, β_2M 及轻链联合检测对MM的诊断价值 见表2。比较MM和健康对照者中各指标的

MM 的恶性进程有一定的关系。WANG 等^[15]发现血清 sPD-L1 水平与 MM 预后的关系,包括治疗反应和疾病进展。尚不清楚 sPD-L1 水平升高导致 MM 患者预后不良的机制,但可能的解释是除了抑制肿瘤特异性 CTL 细胞外,PD-L1 与 PD-1 结合可通过 Akt 信号通路诱导 MM 细胞产生耐药性^[16]。

表 2 sPD-L1, β_2 M, λ 轻链及 κ 轻链联合检测 [%(*n*)]

类别	灵敏度	特异度	正确度	阳性预测值	阴性预测值
sPD-L1	83.1 (54/65)	76.9 (50/65)	80.0 (104/130)	78.3 (54/69)	82.0 (50/61)
β_2 M	81.5 (53/65)	67.7 (44/65)	74.6 (97/130)	71.6 (53/74)	78.6 (44/56)
κ 轻链	70.8 (46/65)	80.0 (52/65)	75.4 (98/130)	78.0 (46/59)	73.2 (52/71)
λ 轻链	63.1 (41/65)	84.6 (55/65)	73.8 (96/130)	80.4 (41/51)	69.6 (55/79)
sPD-L1 + β_2 M	96.9 (63/65)	52.0 (34/65)	74.6 (97/130)	69.2 (63/91)	94.4 (34/36)
sPD-L1 + κ 轻链	95.4 (62/65)	61.5 (40/65)	78.5 (102/130)	71.3 (62/87)	93.0 (40/43)
sPD-L1 + λ 轻链	93.8 (61/65)	64.6 (42/65)	79.2 (103/130)	53.5 (61/114)	91.3 (42/46)

我们通过 ROC 分析,发现 sPD-L1 的 AUC 高于 β_2 M, λ 轻链和 κ 轻链,且诊断灵敏度最高,联合 λ 轻链, β_2 M 后提高了其特异度,提示 sPD-L1 可能是潜在的 MM 辅助诊断标志物。当然,我们的研究样本量相对较小且来自于单中心,未来的研究应该再收集不同治疗方案的患者样本,以验证 sPD-L1 水平与临床资料的相关性,MM 中 PD-L1 的作用机制仍需进一步探索。

综上所述,sPD-L1 在 MM 患者中的表达高于健康人群,在 MM 辅助诊断和疾病分期方面有一定的临床意义。sPD-L1 诊断价值优于 β_2 M, λ 轻链和 κ 轻链,多指标联合检测可提高 MM 患者的诊断效能,提示 sPD-L1 可能是 MM 诊断的潜在生物指标。

参考文献:

- [1] PAUL B, KANG Shuqi, ZHENG Zhihong, et al. The challenges of checkpoint inhibition in the treatment of multiple myeloma[J]. Cellular Immunology, 2018, 334: 87-98.
- [2] ROBAK P, DROZDZ I, SZEMRAJ J, et al. Drug resistance in multiple myeloma[J]. Cancer Treat Rev, 2018, 70:199-208.
- [3] GUPTA N, SHARMA A, SHARMA A. Emerging biomarkers in multiple myeloma: a review [J]. Clinica Chimica Acta, 2020, 503: 45-53.
- [4] 盘国雄, 谭才燕, 何嘉颖, 等. 多发性骨髓瘤患者血清中 lncRNA PCAT-1 的表达水平与临床预后研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(1): 72-76.
PAN Guoxiong, TAN Caiyan, HE Jiaying, et al. Serum lncRNA PCAT-1 expression level of patients with multiple myeloma and clinical value [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2018, 33(1): 72-76.
- [5] KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity[J]. Annual

Review of Immunology, 2008, 26:677-704.

将 PD-1 抑制剂与免疫调节剂联合应用于 MM 的临床试验获得了一定的效果,然而,关于这些组合的安全性的担忧已经被提出,一些临床试验已经被暂停或搁置,药物调节 PD-L1 的表达可能是治疗 MM 的新途径^[17]。上述结果提示 PD-L1 是 MM 治疗的潜在靶标。

- [6] CHAMOTO K, AL-HABSI M, HONJO T. Role of PD-1 in immunity and diseases[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2017, 410: 75-97.
- [7] KUOL N, STOJANOVSKA L, NURGALI K A. PD-1/PD-L1 in disease[J]. Immunotherapy, 2018, 10(2): 149-161.
- [8] JELINEK T, PAIVA B, HAJEK R. Update on PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 2431.
- [9] ROSSILLE D, AZZAOU I, FELDMAN A L, et al. Soluble programmed death-ligand 1 as a prognostic biomarker for overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a replication study and combined analysis of 508 patients[J]. Leukemia, 2017, 31(4): 988-991.
- [10] HAYASHI H, NAKAGAWA K. Combination therapy with PD-1 or PD-L1 inhibitors for cancer[J]. International Journal of Clinical Oncology, 2020, 25(5): 818-830.
- [11] 李腾达, 陈燕, 谷明莉, 等. PD-L1 在原发性胆汁性肝硬化患者外周血单个核细胞中的变化及意义 [J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(5):1-3.
LI Tengda, CHEN Yan, GU Mingli, et al. Change of PD-L1 in peripheral blood mononuclear cells of patients with primary biliary cirrhosis and its significance [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(5): 1-3.
- [12] HALLETT W H, JING Weiqing, DROBYSKI W R. Immunosuppressive effects of multiple myeloma are overcome by PD-L1 blockade[J]. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2011, 17(8): 1133-1145.
- [13] DHODAPKAR M V, SEXTON R, DAS R, et al. Prospective analysis of antigen-specific immunity, stem-cell antigens, and immune checkpoints in monoclonal gammopathy[J]. Blood, 2015, 126(22): 2475-2478. (下转第 110 页)