

PD-L1在错配修复缺陷型子宫内膜癌和肿瘤相关免疫细胞中的表达:MLH1甲基化和非甲基化亚组间的差异

Gozde Kir, M.D., Zeynep C. Olgun, M.D., Tuçe Soylemez, M.D., Abdullah Aydin, M.D., Berna Demircan, M.D., Ibrahim A. Kaya, M.D., and W. Glenn McCluggage, F.R.C.Path

摘要: 与错配修复 (MMR) 功能正常的子宫内膜癌相比, 错配修复 (MMR) 缺陷型子宫内膜癌表达程序性细胞死亡配体1 (PD-L1) 增加, 但关于散发性和遗传性 MMR 缺失型子宫内膜癌 PD-L1 表达的数据有限。大多数关于子宫内膜癌中 PD-L1 表达的研究都使用了组织微阵列, 但没有检查所有的肿瘤蜡块。在本研究中, 我们分析了 176 例子宫内膜癌切除标本的所有肿瘤蜡块中 PD-L1 的表达。我们比较了 PD-L1 在 MMR 缺陷型和 MMR 正常型子宫内膜癌中的表达, 其中 MMR 缺陷型子宫内膜癌包括 MLH1 和 PMS2 共同缺失亚组, 以及其他 MMR 缺失亚组 (MSH2 和 MSH6 共同缺失亚组、PMS2 孤立缺失亚组和 MSH6 孤立缺失亚组)。MLH1 和 PMS2 共同缺失的子宫内膜癌进行了 MLH1 甲基化检测。在临界值 (Cut off) 为 1% 时, 肿瘤细胞 (TC) PD-L1 阳性率为 21% (n=37), 肿瘤相关免疫细胞 (IC) PD-L1 阳性率为 66.5% (n=117); 在临界值为 5% 时, TC PD-L1 阳性率为 5.1% (n=9), IC PD-L1 阳性率为

39.8% (n=70)。多因素分析提示 MMR 蛋白缺陷与 IC PD-L1 阳性显著相关, 临界值为 1% 和 5% 时均有统计学意义【分别为: 比值比 (OR) =5.236, 95% 置信区间 (CI) =2.075-13.211, $P=0.001$ 及 OR=3.702, 95%CI=1.759-7.791, $P=0.001$ 】。多因素分析显示, 在临界值为 1% 和 5% 时, 与 MMR 蛋白正常亚组相比, IC PD-L1 阳性与 MLH1 和 PMS2 共同缺失显著相关 (MLH1 和 PMS2 共同缺失组: 临界值为 1% 时: OR=5.104, 95%CI=1.876-13.881, $P=0.001$; 临界值为 5% 时: OR=3.322, 95%CI=1.540-7.166, $P=0.002$)。在临界值为 5% 时 (OR=6.102, 95%CI=1.280-10.096, $P=0.026$), 鳞状细胞分化是 TC PD-L1 阳性的独立预测因子。在临界值为 1% 时, 肿瘤大小是 IC PD-L1 阳性的独立预测因子 (OR=6.757, 95%CI=1.569-29.109, $P=0.010$)。总体来说, 在临界值为 1% 时, 52 例 MLH1 甲基化肿瘤中, 48 例 (92.3%) IC PD-L1 阳性; 在临界值为 5% 时, 52 例 MLH1 甲基化肿瘤中, 34 例 (65.4%) IC PD-L1 阳性。与以前的研究相比, 我们的研究结果显示 IC PD-L1 阳性率更高。这可能是因为我们使用了所有的肿瘤蜡块。在临界值为 1% 和 5% 时, MLH1 和 PMS2 共同缺失是 IC PD-L1 阳性的独立预测因子。单因素分析中, 我们观察到 IC PD-L1 阳性率 $\geq 5\%$ 的患者的无病生存率降低了。我们尚需在更大的队列中收集更长期的随访数据对本研究结果进行测试和验证。

关键词: 子宫内膜癌; PD-L1; 错配修复蛋白; 甲基化分析

(*IJGP.2021 Nov.;40(6):575-586*)

最 近引入的免疫检查点抑制剂, 如程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1), 显著改变了几种癌症晚期病例的标准治疗, 例如胃腺癌和食管腺癌、非小细胞肺癌和恶性黑色素瘤。但这种治疗方式尚未广泛应用于子宫内膜癌, 故相关研究

From the Pathology Department, Istanbul Medeniyet University Goztepe Training and Research Hospital (G.K., Z.C.O., T.S., A.A.); Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Istanbul Medeniyet University (B.D., I.A.K.), Istanbul, Turkey; and Department of Pathology, Belfast Health and Social Care Trust, Belfast, UK (W.G.M.).

This study was supported by Istanbul Medeniyet University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: T-GAP-2019-1449).

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Gozde Kir, MD, Pathology Department, Istanbul Medeniyet University Göztepe Research and Training Hospital, Istanbul 34720, Turkey. E-mail: gozkir@yahoo.com.

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website, www.intjgynpathology.com.

数量有限^[1-3]。与 MMR 蛋白正常的子宫内膜癌相比, MMR 缺陷型子宫内膜癌具有不同的免疫性, 如肿瘤浸润淋巴细胞和新抗原生成增加^[4-9]。在一些子宫内膜癌研究中已经报道了关于 PD-L1 在 TC 和 IC 的表达^[10-14]。与 MMR 蛋白正常的子宫内膜癌相比, MMR 缺陷型子宫内膜癌 PD-L1 表达增加, 但关于散发性和遗传性【Lynch 综合征 (LS) 相关】MMR 缺失的子宫内膜癌中 PD-L1 表达的文献报道有限 (表 1) [7, 10, 15-21]。

由于在 Lynch 综合征相关的子宫内膜癌中 MLH1 甲基化不常见, 因此 MLH1 甲基化可作为散发性子宫内膜癌的替代标志物^[20]。在子宫内膜癌中, MLH1 和 PMS2 共同缺失很有可能是由于 MLH1 启动子甲基化所致, 而不是继发于 Lynch 综合征。Lynch 综合征的 MMR 缺失类型包括 MSH2 和 MSH6 共同缺失、MSH6 单独缺失和 PMS2 单独缺失^[19]。在本研究中, 我们比较了 MMR 缺陷型子宫内膜癌的不同亚型和 MMR 蛋白正常组中 TC 和 IC PD-L1 的表达。此外, 我们还比较了 MLH1 和 PMS2 共同缺失伴/不伴有 MLH1 甲基化的肿瘤 PD-L1 的表达。由于 PDL1 在肿瘤中的表达通常是异质性的, 而且之前大多数关于子宫内膜癌的研究都使用了组织微阵列或单个肿瘤蜡块, 因此本研究的另一个特点是我们使用了所有肿瘤蜡块分析切除标本中 PD-L1 的表达情况。

材料和方法

伦理批准

我们的研究获得了国际审查委员会的伦理批准, 注册号为 2019/0076。

患者

该研究包括 176 名连续未经选择的患者, 于 2016 年 11 月至 2020 年 1 月在伊斯坦布尔梅德尼耶大学戈兹特佩培训和研究医院因子宫内膜癌接受手术。收集的数据包括基本临床和病理信息【年龄、组织学类型、肿瘤分级、是否存在淋巴血管侵犯、是否存在坏死、肌层浸润方式、是否存在淋巴结转移、肿瘤相关淋巴细胞的存在和强度、病理 T 分期 (pT 期), 以及国际妇产科联合会分期 (FIGO 分期)】。

病理评价

手术切除标本置于福尔马林中固定。标本离体至于固定液内开始固定的间隔时间 <10 分钟。固定时间为 6 至 72 小时。

切片采用标准技术进行处理和石蜡包埋。切片厚 4 μ m, 用苏木精和伊红染色进行常规组织学染色。对每个病例的所有肿瘤切片进行复阅来评估上述参数。在复阅过程中, 复阅者不知道 MMR 蛋白免疫组化染色结果。根据 Quick 等人^[22]的研究, 将子宫浸润肌层模式分为侵袭性浸润、推挤式浸润、MELF 浸润、腺肌症样浸润和恶性腺瘤样浸润。在肌层浸润类型 >1 种的病例中, 采用主要模式。

肿瘤相关淋巴细胞的程度采用 4 级量表进行评估。0 分表示肿瘤相关淋巴细胞缺失。轻度肿瘤相关淋巴细胞 (得分为 1) 指浸润边缘有淋巴细胞呈轻度斑片状增加。中度肿瘤相关淋巴细胞 (得分 2) 指浸润边缘有带状淋巴细胞浸润。重度肿瘤相关淋巴细胞 (得分 3) 指肿瘤相关淋巴细胞非常明显地在浸润边缘形成杯状区域^[23]。

免疫组织化学 (IHC)

本研究中, 只选取 1 个有代表性的肿瘤蜡块进行 MMR 蛋白免疫组化染色, 而使用全部肿瘤蜡块进行 PD-L1 评估。所有蜡块均制作成 4 μ m 的病理切片, 使用莱卡 BOND-MAX 染色系统, 根据说明书行如下抗体的免疫组织化学染色检测其在标本中的表达。选用抗体有: MLH1 (Novocastra, 克隆号: ES505, 1:50), PMS2 (Novocastra, 克隆号: MOR4G, 1:100), MSH2 (Novocastra, 克隆号: 25D12, 未稀释), MSH6 (Novocastra, 克隆号: PU29, 1:100), and PD-L1 (Cell Signaling, 克隆号: E1L3N, 1:200)。

免疫组化切片由研究中的两名参与者 (G.K. 和 T.S.) 双盲法阅片评估。当结果不一致时, 由两位病理学家使用双头显微镜共同复阅切片并达成一致意见。肿瘤细胞核染色完全消失, 并存在对外照或作为内对照的周围非肿瘤细胞 (如: 淋巴细胞、内皮细胞及间质细胞) 阳性时判定为 MMR 表达缺失。

PD-L1 每例使用 1 至 5 个肿瘤蜡块进行染色。在肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞中, 细胞膜和细胞质着色判定为 PD-L1 阳性 (图 1)。肿瘤区域内所有 PD-L1 阳性的肿瘤细胞占切片中全部肿瘤细胞总数的百分比为肿瘤细胞 PD-L1 评分。肿瘤区域内所有 PD-L1 阳性的肿瘤相关免疫细胞占切片全部免疫细胞总数的百分比为免疫细胞 PD-L1 评分。

DNA 甲基化分析

从既往子宫内膜癌 MLH1 和 PMS2 免疫组化缺失的 55 例患者的蜡块中提取基因组 DNA, 并选取 34 例因良性病变切除

表1.当前和先前研究中子宫内膜癌中PD-L1的表达：MMR蛋白完整亚组和MMR缺失亚组中肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞PD-L1阳性率、临界值以及PD-L1表达与生存之间的相关性

研究	数量	组织分型	MMR状态	PD-L1抗体	在肿瘤/肿瘤相关免疫细胞中的PD-L1阳性率(%, 临界值)	PD-L1与存活率的关系
Howitt et al. ^[7]	63	END+NE	MSI, MSS	E1L3N	POLE and MSI: ~20% TC, ~40% IC, 没有临界值* MSS: ~20% TC, ~15% IC, 没有临界值*	—
Bregar et al. ^[15]	70	END+NE	MSI, MSS	E1L3N	MSI: 62% TC or IC (1%临界值), 46% TC or IC (5%临界值) MSS: 22% TC or IC (1%临界值), 7% TC or IC (5%临界值)	—
Yamashita et al. ^[16]	149	END	MSI, MSS	28-8	MSI: 48% TC (5% 临界值) MSS: 25% TC (5% 临界值)	PFS: 增加 (秩和检验) OS: 不显著 (秩和检验)
Li et al. ^[10]	700	END+NE	MMR 缺陷, MMR 正常	SP263	MMR 缺失: 26% TC, 3.7% IC (1% 临界值) MMR 正常表达: 3.7% TC, 5.9% IC (1% 临界值)	无意义
Kim et al. ^[17]	183	END+NE	MMR 缺陷, MMR 正常	E1L3N	MMR 缺失: TC未知, 77% IC (1% 临界值) MMR 正常: unknown TC, 27% IC (1% 临界值)	TC: 无显著 (秩和检验) IC: 无进展生存期降低 (秩和检验)
Asaka et al. ^[18]	76	END+NE	MMR 缺失, MMR 正常	SP263	MMR 缺失: 39% TC (1% 临界值), unknown IC MMR 正常: 21% TC (1% 临界值), Unknown IC	无意义
Sloan et al. ^[19]	67	END+NE	MMR缺失 Lynch综合征相关 MLH1高甲基化 MMR正常	SP142	MMR loss: 53% TC, 100% IC (1% 临界值) Lynch 综合征相关: 70% TC, 100% IC MLH1 高甲基化: 33% TC, 100% IC MMR 正常: 10% TC, 65% IC (1% 临界值)	无意义
Pasanen et al. ^[20]	682	END	MMR 缺失 MMR 缺失 甲基化 MMR 缺失 非甲基化 MMR 正常	未知	MMR 缺失: 9.4% TC, 41.3% IC (1% 临界值) MMR 缺失 甲基化: 10.1% TC, 43.2% IC MMR 缺失 非甲基化: 9.1% TC, 43.2% IC MMR 正常: 7.6% TC, 20.4% IC (1% 临界值)	—
Chavez et al. ^[21]	162	END+NE	MMR缺失 突变缺失型MMR 表观遗传缺失型MMR	SP263	MMR 缺失: (PD-L1, 连续参数) 突变缺失型 MMR 表观遗传缺失型 MMR 在MMR缺失亚组的TC和IC PD-L1表达无差异	—
本研究	176	END+NE	MMR缺失: MLH1和/或PMS2缺失 甲基化 非甲基化 其他MMR蛋白缺失 MMR正常	E1L3N	MMR 缺失: 17% TC, 87% IC (1% 临界值) 8% TC, 62% IC (5% 临界值) MLH1 和/或 PMS2 缺失: 15% TC, 89% IC (1% 临界值) 5.6% TC, 62% IC (5% 临界值) 甲基化: 19.2% TC, 92.3% IC (1% 临界值) 5.8% TC, 65.4% IC (5% 临界值) 非甲基化: 0% TC, 33% IC (1% 临界值) 0% TC, 0% IC (5% 临界值) 其他 MMR 蛋白缺失: 28% TC, 71% IC (1% 临界值) 28% TC, 57% IC (5% 临界值) MMR 正常: 23% TC, 56% IC (1% 临界值) 3% TC, 28% IC (5% 临界值)	TC) 不显著 (秩和检验) IC: 无进展生存期降低 (秩和检验)

*数值摘自图表。

END: 子宫内膜样; IC: 肿瘤相关免疫细胞; MMR: 错配修复; MSI: 微卫星不稳定; MMS: 微卫星稳定; Mut: 突变的; NE: 非子宫内膜样; OS: 总体生存率; PD-L1:程序性死亡配体; PFS: 无进展生存期; POLE: 聚合酶epsilon; TC: 肿瘤细胞

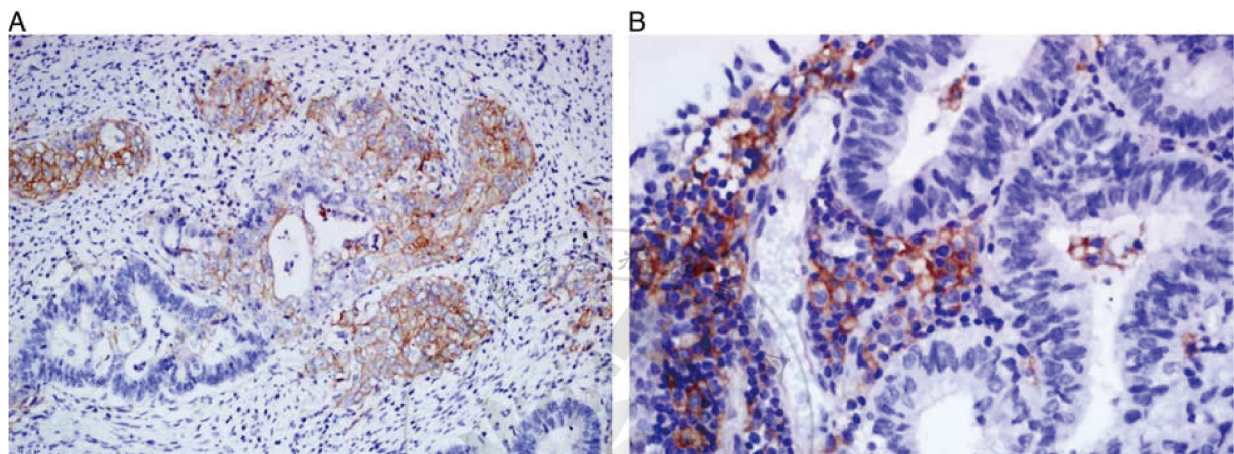


图1.肿瘤细胞 (A, 200×) 和肿瘤相关免疫细胞 (B, 400×) 中的程序性死亡配体 1 (PD-L1) 阳性。

子宫患者的内膜标本作为对照。切取厚度 10 μ m 的蜡片, 使用 PureLink™ 基因组 DNA 小量提取试剂盒提取 DNA (本试剂盒购自赛默飞世尔科技公司), 随后使用 EZDNA 甲基化金试剂盒对 DNA 进行修饰 (本试剂盒购自 Zymo Research 公司)。从每个样本中提取 400ng 的 DNA, 与 130 μ l 重亚硫酸盐混合溶液在 200 μ l PCR 管中混合。将其放在热循环装置中(购自美国加州伯乐公司) 98 $^{\circ}$ C 孵育 5min, 随后改用 64 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 小时。然后将样品转移到 Zymo-Spin IC 吸附柱上, 清洗、脱硫, 然后再次清洗样品。重亚硫酸盐处理后的 DNA 最终洗脱于 10 μ l 的缓冲液中, 取 2 μ l 用于后续的 PCR 操作。

根据文献^[24]进行甲基化特异性 PCR (MSP)。使用 MSP 引物扩增修饰后的 DNA, 该引物特异性识别重亚硫酸盐处理后 MLH1 基因的非甲基化或甲基化启动子序列。识别甲基化 MLH1 基因的引物序列上游为 5'-TT TTTTTAGGAGTGAAG-GAGGTTAC-3', 下游为 5'-ACTAAACACGAATACTACGAAC GAT-3'。识别非甲基化 MLH1 基因的引物序列上游为 5'-TTTTTTTAGGAGTGAAGGAGGTTAT-3', 下游为 5'-ACTA-AACACAAATACTACAAACAAT-3'。PCR 采用 ZymoTaqDNA 聚合酶(购自 Zymo Resarrch 公司)。PCR 反应体系包括 2 \times 扩增缓冲液、25 mM dNTP、浓度为 0.5 μ mol/L 的引物上游及下游序列。首先 95 $^{\circ}$ C 下反应 10min; 再以 95 $^{\circ}$ C 30 秒, 55.5 $^{\circ}$ C 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 1min 为循环重复 40 次。最后一次延伸时 72 $^{\circ}$ C 维持 7 min。PCR 产物置于 10%聚丙烯酰胺凝胶上, 用溴化乙锭染色, 在紫外线照射下观察。使用全部甲基化的人基因组 DNA 对照来确保 MSP 引物在检测启动子甲基化状态方面的特异性。

统计分析

使用 IBM SPSS 22 进行统计分析。使用 Fisher 确切概率法、皮尔逊卡方检验和 Freeman-Halton 检验分析临床病理特征与 PD-L1 表达之间的相关性, 定义 P 值 < 0.05 为有统计学意义。采用多元 logistic 回归分析 PD-L1 阳性与阴性表达的优势比 (ORs) 和 95% 置信区间 (CIs)。总体生存时间定义为子宫内 膜癌手术日期至子宫内 膜癌相关死亡日期。无病生存时间定义为子宫内 膜癌手术日期到首次复发或疾病进展的日期。使用 log-rank 检验进行单因素生存分析, 使用多因素 Cox 回归分析进行无病生存分析。

结果

临床病理资料

本研究共纳入患者 194 例, 其中 18 例因剩余肿瘤组织不足以进行免疫组化而被排除。其余 176 例进行 PD-L1 和 MMR 蛋白免疫组化染色 (附表 1, 附加数字内容 <http://links.lww.com/IJGP/A113>)。

患者平均年龄为 62 岁, 中位年龄为 62 岁 (28-90 岁)。因为大多数患者年龄大于 60 岁 (n=104, 59.1%), 我们选择 60 岁作为分组界限。组织学类型方面, 分为子宫内 膜样癌和非子宫内 膜样癌。子宫内 膜样癌按 FIGO 分级划分为两组。FIGO I 级和 II 级为低级别子宫内 膜样癌, FIGO III 级为高级别子宫内 膜样癌。患者中共有低级别子宫内 膜样癌 131 例 (74.4%), 高级别子宫内 膜样癌 13 例 (7.4%), 非子宫内 膜样癌 32 例 (18.2%)。非子宫内 膜样癌包括浆液性癌 10 例 (5.7%)、透明细胞癌 6 例 (3.4%)、癌肉瘤 9 例 (5.1%)、未分化癌 6 例

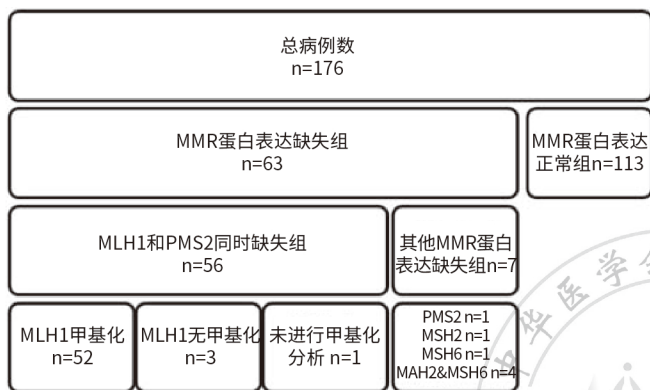


图2. 研究人群的流程图。MMR表示错配修复。

(3.4%) 和去分化癌 1 例 (0.6%)。

MMR 蛋白表达状态分为三组：MMR 蛋白正常表达组 (n=113, 64.2%)、MLH1 和 PMS2 同时缺失组 (n=56, 31.8%) 和其他 MMR 蛋白表达缺失组 (仅缺失 PMS2, 仅缺失 MSH6 和及 MSH2、MSH6 同时缺失) (n=7, 4%)。在 MLH1 和 PMS2 同时缺失的肿瘤中评估 MLH1 甲基化情况 (图 2)。

平均肿瘤大小为 4.15cm, 中位肿瘤大小为 3.7cm (0.1-13cm)。根据肿瘤大小将病例分为 2 个亚组：肿瘤大小 <2cm (n=15, 8.5%) 和肿瘤大小 ≥2cm (n=161, 91.5%)。FIGO 分期分为 3 组：多数病例 (n=97) 为 IA 期 (55.1%), 32 例为 IB 期 (18.2%), 47 例 ≥II 期 (26.7%)。pT 分期也分为 3 组, 大部分患者 (n=98) 为 1A 期 (55.7%), 34 例为 1B (19.3%), 44 例 ≥2 期 (25%)。105 例患者 (59.6%) 进行了盆腔和/或主动脉旁淋巴结清扫, 22 例出现淋巴结转移 (20.9%)。20 例肿瘤中存在鳞状分化 (11.4%)。170 例中明确了肿瘤的肌层浸润模式, 分别为: MELF 浸润 (n=28, 16.5%)、侵袭性浸润 (n=108, 63.5%)、推挤性浸润 (n=9, 5.3%)、腺肌症样浸润 (n=24, 14.1%) 和恶性腺瘤样浸润 (n=1, 0.6%)。肿瘤相关淋巴细胞分为无浸润 (n=85, 48.3%)、轻度浸润 (n=59, 33.5%)、中度浸润 (n=27, 15.3%)、重度浸润 (n=5, 2.8%)。

DNA 甲基化分析

MLH1 和 PMS2 同时缺失的肿瘤共 56 例, 其中 1 例由于肿瘤组织所剩无几而被排除, 其余均进行了 MLH1 甲基化检测。MSP 分析显示, 在 55 例 MLH1 和 PMS2 同时缺失的肿瘤中, 有 52 例 MLH1 基因发生了甲基化。而在所有正常子宫内膜

组织样本 (n=34) 中, 我们仅检测到了非甲基化特异性扩增子的扩增, 表明 MLH1 基因在正常子宫内膜组织中未被甲基化。

子宫内膜癌的 PD-L1 染色

阳性临界值为 1% 时, 肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性率分别为 21% (n=37) 和 66.5% (n=117)。阳性临界值为 5% 时, 肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性率分别为 5.1% (n=9) 和 39.8% (n=70)。我们观察到相同病例的不同切片中肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 染色存在差异, 但没有对差异程度进行比较。在 69 例中, 肿瘤细胞靠近肌层的一面染色更加明显, 而 12 例肿瘤中宫腔面染色更加明显。

PD-L1 表达与临床病理特征的关系

分别以 1%、5% 为阳性临界值时肿瘤细胞 PD-L1 阳性情况

阳性临界值为 1% 时, 肿瘤细胞 PD-L1 阳性与高级别子宫内膜样癌、肿瘤体积大、肿瘤分期晚期、肿瘤相关淋巴细胞浸润显著相关 ($P=$ 分别为 0.006、0.043、0.040 和 0.038), 但采用多变量 logistic 回归分析时, 这些因素无统计学意义 (表 2)。

在以 5% 为临界值的单因素分析中, 与 MLH1 和 PMS2 同时缺失组及 MMR 正常组相比, 其他 MMR 蛋白表达缺失组肿瘤细胞有更高的 PD-L1 阳性表达 ($P=0.014$)。由于其他 MMR 蛋白表达缺失组仅有 7 例患者, 我们在统计分析中选择了校正后的 P 值。以 5% 为阳性临界值时, 鳞状分化与肿瘤细胞 PD-L1 阳性显著相关 ($P=0.033$)。多元 logistic 回归分析显示, 鳞状分化是肿瘤细胞 PD-L1 阳性的独立预测因子 ($OR=6.102$, 95%CI=1.280-10.096, $P=0.026$)。

分别以 1%、5% 为阳性临界值时肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性情况

阳性临界值为 1% 时, 单因素分析显示 MMR 蛋白表达状态【二分类 (MMR 蛋白正常表达与 MMR 蛋白表达缺失) 及三分类 (MMR 蛋白正常表达、MLH1 和 PMS2 同时缺失与其他 MMR 蛋白表达缺失)】、肿瘤体积大、更高的 pT 分期、肿瘤相关淋巴细胞浸润均与肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性表达显著相关 (P 值分别为 0.001、0.001、0.001、0.030 和 0.003)。为了消除交叉数据偏差, 我们分别对二分类和三分类的 MMR 蛋白表达状态进行了多元 logistic 回归分析。结果显示, MMR 蛋白表达状态 (二分类)、MMR 蛋白表达状态 (三分

表2. 肿瘤细胞PD-L1阳性与临床病理特征的单变量和二元logistic回归分析, 阳性临界值分别为1%和5%

指标	肿瘤细胞PD-L1表达 (阳性临界值1%)				肿瘤细胞PD-L1表达 (阳性临界值5%)					
	阴性	阳性	P (单变量)	OR	P (多变量)	阴性	阳性	P (单变量)	OR	P (多变量)
年龄(岁)			0.238 †					0.490 ‡		
<60	60 (43.2%)	12 (32.4%)				67 (40.1%)	5 (55.6%)			
≥60	79 (56.8%)	25 (67.6%)				100 (59.9%)	4 (44.4%)			
组织学类型			0.006* †		0.212			0.102 §		
低级别子宫内膜样癌	109 (78.4%)	22 (59.5%)		1.00	—	124 (74.3%)	7 (77.8%)			
高级别子宫内膜样癌	6 (4.3%)	7 (18.9%)		3.589 (0.850–15.163)	0.082	11 (6.6%)	2 (22.2%)			
非子宫内膜样癌	24 (17.3%)	8 (21.6%)		1.280 (0.411–3.983)	0.670	32 (19.2%)	0 (0%)			
MMR蛋白表达情况			0.631 †					0.285 †		
MMR正常表达	88 (63.3%)	25 (67.6%)				109 (65.3%)	4 (44.4%)			
MMR表达缺失	51 (36.7%)	12 (32.4%)				58 (34.7%)	5 (55.6%)			
MMR蛋白表达情况			0.719 §					0.014* §		
MMR正常表达	88 (63.3%)	25 (67.6%)				109 (65.3%)	4 (44.4%)			
MLH1、PMS2 共同缺失	46 (33.1%)	10 (27%)				53 (31.7%)	3 (33.3%)			
其它MMR蛋白表达缺失	5 (3.6%)	2 (5.4%)				5 (3%)	2 (22.2%)			
肿瘤大小(cm)			0.043* ‡		0.998			0.440 ‡		
<2	15 (10.8%)	0 (0%)		1.00	—	15 (9%)	0 (0%)			
≥2	124 (89.2%)	37 (100%)		3314 (0.001–10327)		152 (91%)	9 (100%)			
FIGO分期			0.075 †					0.481 §		
IA	82 (59%)	15 (40.5%)				93 (55.7%)	4 (44.4%)			
IB	25 (18%)	7 (18.9%)				29 (17.4%)	3 (33.3%)			
≥II	32 (23%)	15 (40.5%)				45 (26.9%)	2 (22.2%)			
T分期			0.040* †		0.760			0.546 §		
1A	83 (59.7%)	15 (40.5%)		1.00	—	94 (56.3%)	4 (44.4%)			
1B	27 (19.4%)	7 (18.9%)		1.225 (0.420–3.577)	0.710	31 (18.6%)	3 (33.3%)			
≥2	29 (20.9%)	15 (40.5%)		1.484 (0.510–4.319)	0.469	42 (25.1%)	2 (22.2%)			
淋巴结转移			0.067 †					0.631 ‡		
无	65 (83.3%)	18 (66.7%)				78 (78.8%)	5 (83.3%)			
有	13 (16.7%)	9 (33.3%)				21 (21.2%)	1 (16.7%)			
鳞状分化			0.103 †					0.033* ‡	6.102 (1.280–10.096)	0.026*
无	126 (90.6%)	30 (81.1%)				150 (89.8%)	6 (66.7%)			
有	13 (9.4%)	7 (18.9%)				17 (10.2%)	3 (33.3%)			
MELF 浸润			0.057 †					0.134 ‡		
无	121 (86.4%)	27 (75%)				142 (85%)	6 (66.7%)			
有	19 (13.6%)	9 (25%)				25 (15%)	3 (33.3%)			
肌层浸润模式			0.141 §					0.557 §		
侵袭性浸润	88 (64.7%)	20 (58.8%)				104 (64.2%)	4 (50%)			
推挤性浸润	9 (6.6%)	0 (0%)				9 (5.6%)	0 (0%)			
腺肌症样浸润	19 (14%)	5 (14.7%)				23 (14.2%)	1 (12.5%)			
MELF	19 (14%)	9 (26.5%)				25 (15.4%)	3 (37.5%)			
恶性腺瘤样浸润	1 (0.7%)	0 (0%)				1 (0.6%)	0 (0%)			
肿瘤性坏死			0.819 †					0.416 ‡		
无	104 (74.8%)	27 (73%)				125 (74.9%)	6 (66.7%)			
有	35 (25.2%)	10 (27%)				42 (25.1%)	3 (33.3%)			
淋巴细胞浸润情况			0.038* §		0.291			0.098 §		
无	70 (50.4%)	15 (40.5%)		1.00	—	82 (49.1%)	3 (33.3%)			
轻度	48 (34.5%)	11 (29.7%)		4575... (0.001–46193)	0.999	57 (34.1%)	2 (22.2%)			
中度	16 (11.5%)	11 (29.7%)		3872... (0.001–39659)	0.999	23 (13.8%)	4 (44.4%)			
重度	5 (3.6%)	0 (0%)		1059... (0.001–10308)	0.999	5 (3%)	0 (0%)			
淋巴血管侵犯			0.091 †					0.079 ‡		
无	115 (82.7%)	26 (70.3%)					5 (55.6%)			

有	24 (17.3%)	11 (29.7%)		31 (18.6%)	4 (44.4%)	
是否复发			0.581 ‡			0.809 ‡
是	135 (97.1%)	37 (100%)		163 (97.6%)	9 (100%)	
否	4 (2.9%)	0 (0%)		4 (2.4%)	0 (0%)	
生存情况			0.617 ‡			0.261 ‡
存活	134 (96.4%)	35 (94.6%)		161 (96.4%)	8 (88.9%)	
死亡	5 (3.6%)	2 (5.4%)		6 (3.6%)	1 (11.1%)	

粗体和斜体的值表示有统计学意义。

*有显著意义

† 卡方检验

‡ Fisher确切检验。

§ Freeman-Halton 检验

MELF：伴微囊、伸长及碎片状浸润的浸润模式；

MMR：错配修复

类)、更大的肿瘤大小对与肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性表达的影响具有统计学意义 (统计量分别为: OR=5.236, 95%CI=2.075-13.211, $P=0.001$ 、 $P=0.005$ 和 OR=6.757, 95%CI=1.569-29.109, $P=0.010$)。MLH1 和 PMS2 同时缺失的肿瘤中, 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性率比 MMR 蛋白正常表达的肿瘤高 5 倍 (OR=5.104, 95%CI=1.874-13.881, $P=0.001$)。

阳性临界值为 5% 时, 单因素分析中显示 MMR 蛋白表达状态 (二分类)、MMR 蛋白表达状态 (三分类)、肿瘤体积大、更高级别 FIGO 分期、更高的 pT 分期、肿瘤相关淋巴细胞浸润情况、淋巴结转移、血管侵犯和肿瘤复发均与肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性表达显著相关 (P 值分别为 0.001、0.001、0.001、0.005、0.021、0.020、0.001、0.019、0.024)。为了消除交叉数据偏差, 我们分别对二分类和三分类的 MMR 蛋白表达状态进行了多元 logistic 回归分析。结果显示, MMR 蛋白表达状态 (二分类)、MMR 蛋白表达状态 (三分类) 对肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性表达的影响具有统计学意义 (统计量分别为: OR=3.702、95%CI=1.759-7.791、 $P=0.001$ 和 0.005)。MLH1 和 PMS2 同时缺失的肿瘤中, 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性率比 MMR 蛋白正常表达的肿瘤高 3 倍 (OR = 3.322, 95% CI=1.540-7.166, $P=0.002$) (表 3)。

不同甲基化结果中肿瘤细胞、肿瘤相关免疫细胞PD-L1阳性情况

在 55 例 MLH1 和 PMS2 缺失的肿瘤中, 52 例 MLH1 甲基化, 3 例未甲基化。在未甲基化病例中, 选取 1% 或 5% 作为阳

性临界值时肿瘤细胞 PD-L1 表达均阴性。仅有 1 例 (33%) 的肿瘤相关免疫细胞在阳性临界值 1% 时 PD-L1 表达阳性, 阳性临界值选择 5% 时, 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 表达均为阴性。甲基化病例中阳性临界值为 1% 时, 有 10 例 (19.2%) 肿瘤细胞 PD-L1 阳性, 48 例 (92.3%) 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性。阳性临界值为 5% 时, 有 3 例 (5.8%) 肿瘤细胞 PD-L1 阳性, 34 例 (65.4%) 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性 (表 1)。

染色蜡块数量与肿瘤细胞、肿瘤相关免疫细胞PD-L1阳性情况

PD-L1 阳性率 (TC 和 IC) 以该抗体染色的蜡块数进行分组评估 (表 4)。53 个病例仅使用 1 个蜡块染色, 34 例呈阳性 (64.1%)。67 个病例使用 2 个蜡块染色, 43 例呈阳性 (64.2%)。43 个病例使用 3 个蜡块进行染色, 34 例呈阳性 (79.1%)。11 个病例中使用 4 个蜡块染色, 8 例呈阳性 (72.7%)。2 个病例使用 5 个蜡块染色, PD-L1 表达均为阳性 (表 4)。

随访情况

无病生存期和总生存期的平均随访时间均为 19 个月, 中位随访时间均为 17 个月 (范围为 4-46 个月)。阳性临界值选取 1% 和 5% 时, 在肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性的患者中有 4 例肿瘤复发, 而肿瘤细胞 PD-L1 阳性的病例中没有观察到复发。阳性临界值选取 1%, 在肿瘤细胞 PD-L1 阳性的患者中, 有 2 例患者死于内膜癌, 而在肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性的患者中有 5 例患者死于内膜癌。阳性临界值为

表3. 肿瘤相关免疫细胞PD-L1阳性与临床病理特征的单变量和二元logistic回归分析, 阳性临界值分别为1%和5%

指标	肿瘤细胞PD-L1表达 (阳性临界值1%)					肿瘤细胞PD-L1表达 (阳性临界值5%)				
	阴性	阳性	P (单变量)	OR	P (多变量)	阴性	阳性	P (单变量)	OR	P (多变量)
年龄 (yr)			0.057 †					0.077 †		
>60	30 (50.8%)	42 (35.9%)				49 (46.2%)	23 (32.9%)			
≥60	29 (49.2%)	75 (64.1%)				57 (53.8%)	47 (67.1%)			
组织学类型			0.501 §					0.878 †		
低级别子宫内膜样癌	47 (79.7%)	84 (71.8%)				80 (75.5%)	51 (72.9%)			
高级别子宫内膜样癌	3 (5.1%)	10 (8.5%)				8 (7.5%)	5 (7.1%)			
非子宫内膜样癌	9 (15.2%)	23 (19.7%)				18 (17%)	14 (20%)			
MMR蛋白表达情况			0.001* †	5.236 (2.075-13.211)	0.001*			0.001* †	3.702 (1.759-7.791)	0.001*
MMR正常表达	51 (86.4%)	62 (53%)				82 (77.4%)	31 (44.3%)			
MMR表达缺失	8 (13.6%)	55 (47%)				24 (22.6%)	39 (55.7%)			
MMR蛋白表达情况			0.001* §		0.005*			0.001* §		0.005*
MMR正常表达	51 (86.4%)	62 (53%)	1.00			82 (77.4%)	31 (44.3%)	1.00		—
MLH1、PMS2 共同缺失	6 (10.2%)	50 (42.7%)	5.104 (1.876-3.881)	0.001		21 (19.8%)	35 (50%)	3.322 (1.540-7.166)	0.002	
其它MMR蛋白表达缺失	2 (3.4%)	5 (4.3%)	2.396 (0.281-20.404)	0.424		3 (2.8%)	4 (5.7%)	4.335 (0.618-30.491)	0.140	
肿瘤大小 (cm)			0.001* †	6.757 (1.569-29.109)	0.010*			0.005* †	7.313 (0.806-66.372)	0.077
<2	12 (20.3%)	3 (2.6%)				14 (13.2%)	1 (1.4%)			
≥2	47 (79.7%)	114 (97.4%)				92 (86.8%)	69 (98.6%)			
FIGO分期			0.053 †		0.639			0.021* †		0.605
IA	40 (67.8%)	57 (48.8%)	1.00		—	67 (63.2%)	30 (42.9%)	1.00		—
IB	7 (11.9%)	25 (21.3%)	1.302 (0.442-3.834)	0.631		14 (13.2%)	18 (25.7%)	1.250 (0.454-3.346)	0.666	
≥II	12 (20.3%)	35 (29.9%)	1.521 (0.621-3.729)	0.359		25 (23.6%)	22 (31.4%)	1.546 (0.658-3.632)	0.317	
T分期			0.030* †		0.507			0.020* †		0.357
1A	41 (69.5%)	57 (48.8%)	1.00		—	68 (64.2%)	30 (42.9%)	1.00		—
1B	7 (11.9%)	27 (23%)	1.539 (0.535-4.425)	0.424		16 (15.1%)	18 (25.7%)	1.119 (0.418-2.931)	0.820	
≥2	11 (18.6%)	33 (28.2%)	1.608 (0.655-3.948)	0.300		22 (20.7%)	22 (31.4%)	1.850 (0.759-4.263)	0.160	
淋巴结转移			0.276 †					0.405 †		
无	29 (85.3%)	54 (76.1%)				46 (82.1%)	37 (75.5%)			
有	5 (14.7%)	17 (23.9%)				10 (17.9%)	12 (24.5%)			
鳞状分化			0.391 †					0.612 †		
无	54 (91.5%)	102 (87.2%)				95 (89.6%)	61 (87.1%)			
有	5 (8.5%)	15 (12.8%)				11 (10.4%)	9 (12.9%)			
MELF 浸润			0.764 †					0.764 †		
无	50 (84.7%)	98 (83.8%)				90 (84.1%)	58 (84.1%)			
有	9 (15.3%)	19 (16.2%)				17 (15.9%)	11 (15.9%)			
肌层浸润模式			0.845 §					0.691 §		
侵袭性浸润	37 (66.1%)	71 (62.3%)				63 (61.8%)	45 (66.2%)			
推挤性浸润	2 (3.6%)	7 (6.1%)				6 (5.9%)	3 (4.4%)			
腺肌症样浸润	8 (14.3%)	16 (14%)				16 (15.7%)	8 (11.8%)			
MELF	9 (16.1%)	19 (16.7%)				17 (16.7%)	11 (16.2%)			
恶性腺瘤样浸润	0 (0%)	1 (0.9%)				0 (0%)	1 (1.5%)			
肿瘤性坏死			0.135 †					0.148 †		
无	48 (81.4%)	83 (70.9%)				83 (78.3%)	48 (68.6%)			
有	11 (18.6%)	34 (29.1%)				23 (21.7%)	22 (31.4%)			
淋巴细胞浸润情况			0.003* §		0.195			0.001* §		
无	38 (64.4%)	47 (40.2%)	1.00		—	63 (59.4%)	22 (31.4%)	1.00		
轻度	18 (30.5%)	41 (35%)	1.211 (0.527-2.786)	0.652		31 (29.1%)	28 (40%)	1.847 (0.824-4.143)	0.137	
中度	3 (5.1%)	24 (20.5%)	4.603 (1.158-18.303)	0.030		11 (10.4%)	16 (22.9%)	2.693 (0.988-7.339)	0.053	
重度	0 (0%)	5 (4.3%)	8612 (0.001-19064)	0.999		1 (0.9%)	4 (5.7%)	9.368 (0.908-96.659)	0.060	
淋巴血管侵犯			0.058 †					0.019* †	1.232 (0.504-3.011)	0.647
无	52 (88.1%)	89 (76.1%)				91 (85.8%)	50 (71.4%)			

有	7 (11.9%)	28 (23.9%)		15 (14.2%)	20 (28.6%)	
是否复发			0.302 †			0.024* † 202.112 (0.001-21188) 0.254 † † †
是	59 (100%)	113 (96.6%)		106 (100%)	66 (94.3%)	
否	0 (0%)	4 (3.4%)		0 (0%)	4 (5.7%)	
生存情况			0.777 †			0.338 †
存活	57 (96.6%)	112 (95.7%)		103 (97.1%)	66 (94.3%)	
死亡	2 (3.4%)	5 (4.3%)		3 (2.9%)	4 (5.7%)	

粗体和斜体的值表示有统计学意义。

*有显著意义

† 卡方检验

‡ Fisher确切检验.

§ Freeman-Halton 检验

|| 多因素Cox回归分析

MELF: 伴微囊、伸长及碎片状浸润的浸润模式;

MMR: 错配修复

5% 时, 无病生存期与肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性之间显著相关 (log-rank $P=0.004$, 图 3)。

讨论

PD-L1 表达在许多癌症类型中都有报道, 特别是在新抗原高度形成的高免疫原性肿瘤中, 如伴有 MMR 缺陷的结直肠癌和胃癌、高危人乳头状瘤相关头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌等^[25-29]。已有研究表明, PD-L1 在子宫内膜癌中的表达与 MMR 蛋白缺陷相关。这可能揭示了肿瘤中存在的免疫逃逸机制, 并提供了新的治疗靶点^[7, 10, 15-21]。部分研究^[12, 16]仅在肿瘤细胞或肿瘤相关免疫细胞中评估了 PD-L1 的表达情况, 部分研究在肿瘤细胞和肿瘤相关免疫细胞中均评估了 PD-L1 的表达。

在本研究纳入的病例中, 阳性临界值为 1% 时, 肿瘤细胞 PD-L1 阳性病例数占有所有病例的 21%, 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性病例数占有所有病例的 66.5%。阳性临界值为 5% 时, 肿瘤细胞 PD-L1 阳性病例数占有所有病例的 5.1%, 肿瘤相关免疫细胞 PD-L1 阳性病例数占有所有病例的 39.8%。与既往研究相比, 本次研究肿瘤相关免疫细胞的 PD-L1 阳性率更高^[7, 10-14, 17-20, 30], MMR 蛋白丢失的频率 (63/176, 35.7%) 则与文献^[20]中报道的相似。与其他研究相比, 本研究 MLH1 和 PMS2 共同缺失率偏高, MSH2 和/或 MSH6 缺失率偏低, 这可能是由于各种突变的频率存在一定的种族差异^[10, 20, 21, 31, 32]。

多变量分析中, MMR 蛋白缺乏是与 IC PD-L1 阳性 (临界值为 1% 和 5%) 相关的具有统计学意义的参数。我们还比较了 MMR 蛋白正常亚组与 MLH1 和 PMS2 共同缺失亚组以及其他 MMR 蛋白缺失亚组的 TC 和 IC PD-L1 阳性率 (临界值为 1%

和 5%)。多变量分析结果显示, 与 MMR 蛋白正常亚组相比, IC PD-L1 阳性率 (临界值为 1% 和 5%) 与 MLH1 和 PMS2 共同缺失显著相关。在文献回顾中, 我们发现只有 3 项研究评估了 MMR 缺陷型子宫内膜癌^[19-21]亚组 (MLH1 和 PMS2 共同缺失亚组和其他 MMR 缺失亚组) 中 TC 和 IC PD-L1 阳性率 (表 1)。Pasanen 等人^[20]和 Chavez 等人^[21]对 PD-L1 表达和 MMR 缺陷亚组进行了统计分析。Pasanen 等人^[20]将 MMR 缺陷亚组分为甲基化和非甲基化两种, 其研究显示 MMR 缺陷亚组之间 TC 和 IC PD-L1 表达无统计学显著差异 (临界值为 1%)。Chavez 等人^[21]将 MMR 缺陷亚群分为突变型和表观遗传型。他们将 PD-L1 表达作为一个连续变量进行评估, 没有发现 TC 和间质细胞 PD-L1 表达与 MMR 缺陷亚组之间具有统计学意义^[21]。另一项研究表明, 与 MLH1 高甲基化和 MMR 蛋白正常亚组相比, 在 Lynch 综合征相关组中 TC PD-L1 的表达更常见^[19] (临界值为 1%)。

我们还观察到, 在 MLH1 和 PMS2 共同缺失的肿瘤组中, 94.6% 表现出甲基化, 其概率与文献报道的相似^[31]。52 例 MLH1 甲基化肿瘤中, 48 例 (92.3%) 显示 IC PD-L1 阳性 (临界值为 1%), 34 例 (65.4%) 显示 IC PD-L1 阳性 (临界值为 5%)。

表 4. PD-L1 染色结果为阳性的肿瘤蜡块数量

n/N (%)				
1个蜡块	2个蜡块	3个蜡块	4个蜡块	5个蜡块
34/53 (64.1)	43/67 (64.2)	34/43 (79.1)	8/11 (72.7)	2/2 (100)

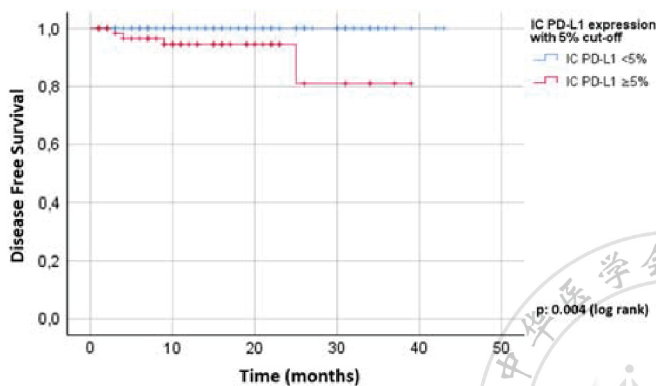


图3. Kaplan-Meier 所分析的肿瘤相关免疫细胞 (IC) 程序性死亡配体 1 (PD-L1) 阳性 (临界值为 5%) 与无病生存期的关系

在本研究中, 我们有一项新的发现, 在子宫内膜癌中, TC PD-L1 阳性率 (临界值为 5%) 与鳞状分化显著相关。鉴于肺、宫颈和头颈部鳞状细胞癌中 PD-L1 的高表达, 这一结果可能并不令人惊讶^[33-35]。此外, 在目前的研究中, 肿瘤大小 ≥ 2 cm 是 IC PD-L1 阳性的独立预测因子 (临界值为 1%)。

一些研究评估了子宫内膜癌中总生存率和无病生存率与 PD-L1 表达之间的关系, 但只有 2 项研究确定了其具有统计学意义^[16, 17]。Kim 等人^[17]显示, IC PD-L1 阳性 (临界值为 1%) 是无进展生存期的一个不利独立预后因素 ($P=0.042$)。Yamashita 等^[16]报道 TC PD-L1 阳性与无进展生存期的增加具有统计学意义 ($P=0.033$), 而多变量 Cox 回归分析显示 PD-L1 表达无统计学意义。通过单因素分析, 我们观察到复发病例的 IC PD-L1 阳性率 (临界值为 5%) 较高。我们利用秩和检验观察到 IC PD-L1 阳性 (临界值为 5%) 与无病生存率之间的关系。然而, 本研究的局限性在于随访时间相对较短。

在肿瘤中 PD-L1 的表达通常呈异质性, 但据我们所知, 除了我们之前对一个很小的队列病例进行的研究^[36]外, 之前关于子宫内膜癌的研究并没有检测所有肿瘤蜡块的 PD-L1 表达。我们根据染色块数评估 (TC 和 IC) PD-L1 阳性率 (表 4), 当我们对 3 个或 4 个肿瘤蜡块进行染色时, 阳性率高于 1 个或 2 个肿瘤蜡块 (分别为 79.1% 和 72.7%, 相对于 65.3% 和 64.2%)。为了尽量减少由于染色异质性造成的变异性, 我们建议在评估子宫内膜癌 PD-L1 时, 至少对 3 个石蜡块进行染色。而另一个重要的问题是, 应选哪些肿瘤蜡块进行 PD-L1 染色。因为我们病例所有的肿瘤蜡块都进行染色, 所以我们能够了解哪些区域优先染色。总的来说, 我们观察到在肌层浸润方向有更明显的染色, 尽管这并不一致; 在 69 例患者中, 肌层浸润面的染色更为明

显, 在 12 例患者中, 肿瘤的腔缘方向染色更为明显。

结论

在我们的连续未经选择的子宫内膜癌病例队列中, IC PD-L1 的阳性率高于以前的研究, 部分原因可能是使用了所有肿瘤蜡块进行染色切片。通过多变量分析, MLH1 和 PMS2 共同缺失是 IC PD-L1 阳性的独立预测因素 (临界值为 1% 和 5%)。MLH1 甲基化组比 MLH1 非甲基化组 IC PD-L1 阳性率更高 (临界值为 1% 和 5%)。我们还有一个新发现, TC PD-L1 阳性 (临界值为 5%) 与鳞状细胞分化显著相关。通过单因素分析, 我们观察到 IC PD-L1 阳性 (临界值为 5%) 患者无病生存率降低。我们尚应在更大的队列中收集更长期的随访数据对本研究结果进行测试和确认。

参考文献

1. Fashoyin-Aje L, Donoghue M, Chen H, et al. FDA approval summary: pembrolizumab for recurrent locally advanced or metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma expressing PD - L1. *Oncologist* 2019;24:103-9.
2. Gubens MA, Sequist LV, Stevenson JP, et al. Pembrolizumab in combination with ipilimumab as second-line or later therapy for advanced non-small-cell lung cancer: KEYNOTE-021 cohorts D and H. *Lung Cancer* 2019;130:59-66.
3. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med* 2018;378:1789-801.
4. Soslow RA. Endometrial carcinomas with ambiguous features. *Semin Diagn Pathol* 2010;27:261-73.
5. Mills AM, Liou S, Ford JM, et al. Lynch syndrome screening should be considered for all patients with newly diagnosed endometrial cancer. *Am J Surg Pathol* 2014;38:1501-9.
6. Mills AM, Longacre TA. Lynch syndrome screening in the gynecologic tract: current state of the art. *Am J Surg Pathol* 2016;40:e35-e44.
7. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, et al. Association of polymerase e-mutated and microsatellite-unstable endometrial cancers with neoantigen load, number

- of tumor-infiltrating lymphocytes, and expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol* 2015;1:1319–23.
8. Clarke BA, Cooper K. Identifying lynch syndrome in patients with endometrial carcinoma: shortcomings of morphologic and clinical schemas. *Adv Anat Pathol* 2012;19:231–8.
 9. Mills AM, Sloan EA, Thomas M, et al. Clinicopathologic comparison of lynch syndrome-associated and “lynch-like” endometrial carcinomas identified on universal screening using mismatch repair protein immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2016;40:155–65.
 10. Li Z, Joehlin-Price AS, Rhoades J, et al. Programmed death ligand 1 expression among 700 consecutive endometrial cancers: strong association with mismatch repair protein deficiency. *Int J Gynecol Cancer* 2018;28:59–68.
 11. Pasanen A, Ahvenainen T, Pellinen T, et al. PD-L1 expression in endometrial carcinoma cells and intratumoral immune cells: differences across histologic and TCGA-based molecular subgroups. *Am J Surg Pathol* 2020;44:174–81.
 12. Crumley S, Kurnit K, Hudgens C, et al. Identification of a subset of microsatellite-stable endometrial carcinoma with high PD-L1 and CD8+lymphocytes. *Mod Pathol* 2019;32:396–404.
 13. Gargiulo P, Della Pepa C, Berardi S, et al. Tumor genotype and immune microenvironment in POLE-ultramutated and MSI-hypermethylated endometrial cancers: new candidates for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2016;48:61–8.
 14. Mo Z, Liu J, Zhang Q, et al. Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 is associated with differentiation status and histological type of endometrial cancer. *Oncol Lett* 2016;12:944–50.
 15. Bregar A, Deshpande A, Grange C, et al. Characterization of immune regulatory molecules B7-H4 and PD-L1 in low and high grade endometrial tumors. *Gynecol Oncol* 2017;145:446–52.
 16. Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M, et al. Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. *Oncotarget* 2017;9:5652–64.
 17. Kim J, Kim S, Lee HS, et al. Prognostic implication of programmed cell death 1 protein and its ligand expressions in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2018;149:381–7.
 18. Asaka S, Yen TT, Wang TL, et al. T cell-inflamed phenotype and increased Foxp3 expression in infiltrating T-cells of mismatch-repair deficient endometrial cancers. *Mod Pathol* 2019; 32:576–84.
 19. Sloan EA, Ring KL, Willis BC, et al. PD-L1 expression in mismatch repair-deficient endometrial carcinomas, including lynch syndrome-associated and MLH1 promoter hypermethylated tumors. *Am J Surg Pathol* 2017;41:326–33.
 20. Pasanen A, Loukovaara M, Bützow R. Clinicopathological significance of deficient DNA mismatch repair and MLH1 promoter methylation in endometrioid endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 2020;33:1443–52.
 21. Chavez JA, Wei L, Suarez AA, et al. Clinicopathologic characteristics, tumor infiltrating lymphocytes and programmed cell death ligand-1 expression in 162 endometrial carcinomas with deficient mismatch repair function. *Int J Gynecol Cancer* 2019;29:113–8.
 22. Quick CM, May T, Horowitz NS, et al. Low-grade, low-stage endometrioid endometrial adenocarcinoma: a clinicopathologic analysis of 324 cases focusing on frequency and pattern of myoinvasion. *Int J Gynecol Pathol* 2012;31:337–43.
 23. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2645–54.
 24. Herman JG, Graff JR, Myöhänen SBDN, et al. Methylationspecific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9821–6.
 25. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509–20.
 26. Rimm DL, Han G, Taube JM, et al. A prospective, multiinstitutional, pathologist-based assessment of 4

- immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2017;3:1051–8.
27. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2016;29:1165–72.
 28. Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013;73:1733–41.
 29. Ma C, Patel K, Singhi AD, et al. Programmed death-ligand 1 expression is common in gastric cancer associated with Epstein-Barr virus or microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:1496–506.
 30. Eggink FA, Van Gool IC, Leary A, et al. Immunological profiling of molecularly classified high-risk endometrial cancers identifies POLE-mutant and microsatellite unstable carcinomas as candidates for checkpoint inhibition. *Oncoimmunology* 2016;6:e1264565.
 31. Watkins JC, Yang EJ, Muto MG, et al. Universal screening for mismatch-repair deficiency in endometrial cancers to identify patients with Lynch syndrome and Lynch-like syndrome. *Int J Gynecol Pathol* 2017;36:115–27.
 32. Haruma T, Nagasaka T, Nakamura K, et al. Clinical impact of endometrial cancer stratified by genetic mutational profiles, POLE mutation, and microsatellite instability. *PLoS One* 2018; 13:e0195655.
 33. Keller MD, Nepl C, Irmak Y, et al. Adverse prognostic value of PD-L1 expression in primary resected pulmonary squamous cell carcinomas and paired mediastinal lymph node metastases. *Mod Pathol* 2018;31:101–10.
 34. Yang W, Lu YP, Yang YZ, et al. Expressions of programmed death (PD)-1 and PD-1 ligand (PD-L1) in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinomas are of prognostic value and associated with human papillomavirus status. *J Obstet Gynaecol Res* 2017;43:1602–12.
 35. Tang H, Zhou X, Ye Y, et al. The different role of PD-L1 in head and neck squamous cell carcinomas: a meta-analysis. *Pathol Res Pract* 2020;216:152768.
 36. Kir G, Soylemez T, Olgun ZC, et al. Correlation of PD-L1 expression with immunohistochemically determined molecular profile in endometrial carcinomas. *Virchows Arch* 2020. [Epub ahead of print].

(宁博涵 张青霞 董颖 翻译 刘爱军 审校)