

肿瘤相关巨噬细胞在食管鳞癌中的临床病理特征分析*

冯 稳¹, 于庆凯¹, 陈奎生², 孙淼淼^{1△}, 张建波¹

(1. 郑州大学附属肿瘤医院病理科, 郑州 450003; 2. 郑州大学第一附属医院病理科, 郑州 450052)

[摘要] **目的** 通过检测肿瘤相关巨噬细胞(TAM)在食管鳞癌组织中的表达, 研究 TAM 浸润在食管鳞癌中的临床病理特征。**方法** 以郑州大学附属肿瘤医院胸外科接受手术治疗的食管癌患者为研究对象, 分别收集每位患者手术切除的食管组织标本, 其中包括 90 份鳞癌组织标本, 20 份癌旁组织标本, 20 份正常食管组织标本。以免疫组化法分别检测 CD206 及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)在各组织标本中的表达, 对比分析检测结果。**结果** CD206 在食管鳞癌组织中的表达显著升高($P < 0.01$), CD206 的阳性表达与食管鳞癌组织的临床分期、浸润深度和淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。MCP-1 在食管鳞癌组织中的阳性表达显著升高($P < 0.05$), 与食管鳞癌组织的浸润深度和淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。TAM 浸润数量与 MCP-1 的表达呈正相关($r = 0.617, P < 0.05$)。**结论** 通过免疫组化检测 TAM 在食管鳞癌组织中的表达, 揭示了 TAM 在食管鳞癌中的临床病理特征, 对准确评估食管鳞癌患者的临床预后及指导临床治疗具有重要的理论和实践价值。

[关键词] 肿瘤相关巨噬细胞; 食管肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 淋巴转移

[中图分类号] R602

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)36-5078-03

The clinical pathological characteristics of tumor-associated macrophages in esophageal squamous cell carcinoma*

Feng Wen¹, Yu Qingkai¹, Chen Kuisheng², Sun Miaomiao^{1△}, Zhang Jianbo¹

(1. Department of Pathology, the Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China;

2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of tumor-associated macrophages(TAM) in esophageal squamous cell carcinoma, and to study the clinical pathological characteristics of TAM in the esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** Patients with esophageal squamous cell carcinoma who accepted operation were chosen as study subjects, and tissue samples of esophagus were collected, including 90 squamous cell carcinoma tissues, 20 paracancerous atypical hyperplasia and 20 normal mucosa tissues, and the expression of CD206, MCP-1 were detected by immunohistochemistry. **Results** The positive expression of CD206 was significantly increased in tissues of esophageal squamous cell carcinoma($P < 0.01$), and it was positively correlated with clinical stage, invasion depth and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma($P < 0.05$). The expression of MCP-1 was significantly increased in esophageal squamous carcinoma tissues($P < 0.05$), and its positive expression was closely correlated with depth of invasion and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma($P < 0.05$). There was a positive relation between TAM infiltration quantity and the expression of MCP-1($r = 0.617, P < 0.05$). **Conclusion** The positive expression of TAM was up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma tissues, and its number was positively correlated with clinical stage, invasion depth and lymph node metastasis.

[Key words] tumor-associated macrophages; esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; lymphatic metastasis

食管癌是全球常见的消化道肿瘤, 我国是世界上食管癌高发地区之一, 每年平均病死约 15 万人。在组织学上分为鳞癌、腺癌、小细胞癌、腺棘皮癌等类型, 其中以鳞癌为主, 占 95% 以上^[1]。近年来通过对肿瘤微环境的研究发现, 免疫细胞及其分泌的细胞因子可促进肿瘤的发生、发展、侵袭和转移、血管生成等, 构成肿瘤微环境的免疫细胞种类繁多, 发挥不同的作用, 其中数量最多的当属肿瘤相关巨噬细胞(TAM)^[2], 因其表面特异性表达 CD206, 可以通过检测 CD206 来间接评估 TAM 在肿瘤组织中的浸润数量^[3-4]。单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)对单核细胞具有趋化活性, 激活单核细胞和巨噬细胞, 促进 TAM 的局部浸润^[5-6], 而活化的巨噬细胞可抑制肿瘤细胞的生长。本研究拟通过检测 CD206、MCP-1 在食管鳞癌组织中的表达, 阐述 TAM 浸润在食管鳞癌组织中的临床病理特征, 同时研究 TAM 在食管癌的分期、浸润深度和淋巴结转移中的临床意义, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2014 年 1 月至 2015 年 11 月在郑州大学附属肿瘤医院胸外科接受手术治疗的食管癌患者为研究对象, 临床资料完整, 其中男 50 例, 女 40 例, 平均年龄(60.0 ± 18.43)岁。分别取患者的食管癌组织标本, 经病理学检查全部确诊为食管鳞癌, 其中 30 例呈高分化, 33 例呈中分化, 27 例呈低分化; 35 例侵及黏膜下层, 55 例侵及肌层或食管外膜; 38 例有淋巴结转移, 52 例无淋巴结转移; I ~ II 期 74 例, III ~ IV 期 16 例(患者出现吞咽、呼吸困难, 需手术缓解局部压迫症状)。食管癌旁组织 20 份, 分别取自距离患者癌床组织边缘 3 cm 以内且经病理诊断为不典型增生。食管正常组织 20 份, 分别取自患者手术的切缘部分, 距离癌床组织边缘 3 cm 以外且病理诊断为正常食管组织。组织标本均以 10% 的多聚甲醛进行固定, 石蜡包埋, 连续切片(厚度 4 μm)备用。

1.2 方法

1.2.1 取材和病理切片的制备 手术切除患者食管癌组织后立即以生理盐水清洗干净,急送病理科,分别留取每位手术患者的癌组织、癌旁组织、正常组织标本各一块,以 10% 中性福尔马林溶液固定 24 h 以上,制备石蜡包块,制作连续切片(厚度 4 μm,德国 Leica 切片机),分别以 CD206、MCP-1 免疫组化染色,显微镜下观察。

1.2.2 免疫组化 石蜡常规包埋,组织切片的厚度为 4 μm,将其放置于载玻片上,二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水,经抗原修复后以 10% 的山羊血清做封闭,加一抗(鼠抗人 CD206 单克隆抗体 1:100;兔抗人 MCP-1 多克隆抗体 1:50,购自美国 Abcam 公司)置于湿盒内孵育过夜。滴加二抗,湿盒内保存,室温下 20 min;用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次;滴加 DAB 显色液,以中性树胶封片,自然风干 24 h。显微镜(Olympus, BX43, 日本)下观察组织切片并采集图像。

1.2.3 结果判定

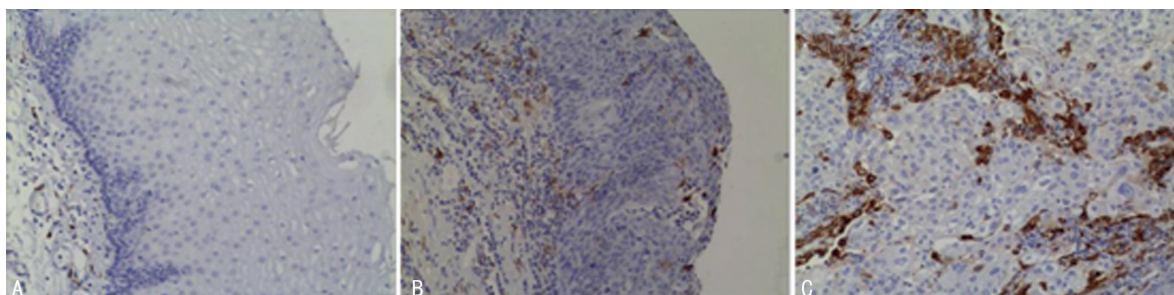
1.2.3.1 TAM 计数 参考文献[7-8]的方法,CD206 阳性表达位于细胞质,呈棕黄色颗粒,阳性细胞即 TAM。在普通光镜下观察组织切片,先在低倍镜(×100)下找到 TAM 的密集区域,然后切换至高倍物镜(×400)观察,在 TAM 富集区域随机选取 5 个视野,分别计数各个视野下阳性细胞的数量,取平均值。

1.2.3.2 MCP-1 结果判定 MCP-1 阳性表达于细胞质,呈棕黄色颗粒。普通光镜下观察组织病理切片,先在低倍镜(×100)下找到 MCP-1 的密集区域,然后切换至高倍物镜(×400)观察,随机选取 5 个视野,分别计数阳性细胞数,取其平均数,根据 MCP-1 阳性细胞所占百分比和 MCP-1 阳性染色的深浅对切片观察结果进行判定^[7]。评分标准:按阳性细胞数百分比计分:0 分(<1%),1 分(1%~25%),2 分(26%~50%),3 分(51%~75%),4 分(≥76%);按阳性细胞染色深浅计分:0 分(无染色),1 分(淡黄色),2 分(棕黄色),3 分(棕褐色)。总判定标准为阳性细胞所在百分比得分与染色强度得分之和,0~3 分为低表达,4~6 分为高表达。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS16.0 对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 *t* 检验;计数资料采用四格表 χ^2 检验,两变量之间的相关性分析采用 Pearson 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各食管组织中 TAM 计数 食管鳞癌及癌旁组织中富含 CD206 阳性细胞,即 TAM 在食管鳞癌组织中的浸润数量(28.58 ± 8.63)个/HP 较癌旁组织(12.43 ± 4.02)个/HP、正常食管组织(4.36 ± 2.45)个/HP 多,见图 1。



A: 正常食管组织; B: 癌旁组织; C: 食管鳞癌组织。

图 1 免疫组化检测各食管组织中 CD206 的表达(×100)

2.2 食管鳞癌组织中 TAM 的浸润数量与患者临床资料的关系 TAM 在食管癌组织的浸润数量与食管鳞癌患者性别、年龄、肿瘤分化程度和肿瘤大小之间无相关性(*P* > 0.05),与临床分期、浸润深度和淋巴结转移有相关性(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 食管鳞癌组织中 TAM 数量与患者一般临床资料的关系($\bar{x} \pm s$)

临床资料	<i>n</i>	TAM 计数(个/HP)	<i>t</i>	<i>P</i>
性别				
男	50	28.24 ± 8.34	0.65	>0.05
女	40	25.54 ± 7.18		
年龄				
≤60 岁	43	27.83 ± 7.14	-1.58	>0.05
>60 岁	47	31.28 ± 8.65		
肿瘤大小				
<3 cm	34	27.31 ± 8.81	-1.74	>0.05
≥3 cm	56	31.79 ± 8.71		
肿瘤分化程度				
高、中	53	28.67 ± 6.64	-1.31	>0.05
低	37	31.54 ± 9.75		
浸润深度				

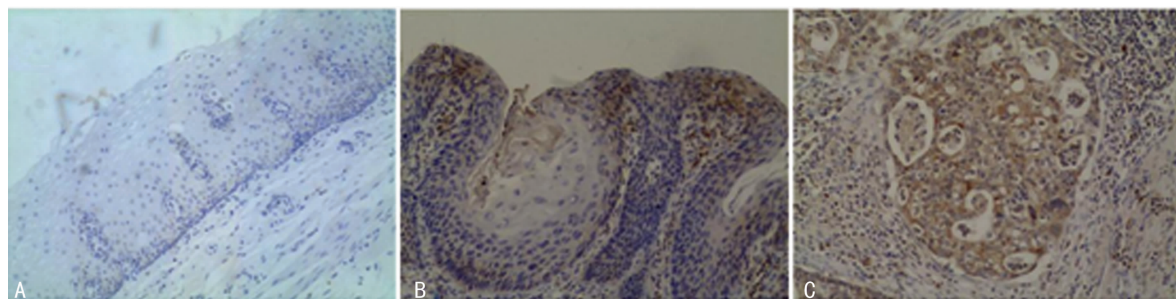
续表 1 食管鳞癌组织中 TAM 数量与患者一般临床资料的关系

临床资料	<i>n</i>	TAM 计数(个/HP)	<i>t</i>	<i>P</i>
黏膜下层	35	23.72 ± 7.02	-2.25	<0.05
肌层或食管外膜	55	32.52 ± 9.84		
淋巴结转移				
有	38	38.13 ± 13.52	6.31	<0.05
无	52	18.72 ± 5.34		
临床分期				
I ~ II	74	21.36 ± 5.93	-6.30	<0.05
III ~ IV	16	34.54 ± 12.96		

2.3 各食管组织中 MCP-1 的表达情况 食管鳞癌组织和癌旁组织中 MCP-1 的表达(78%、55%)明显高于正常食管组织(10%),食管鳞癌组织中 MCP-1 表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2。

2.4 食管鳞癌组织中 MCP-1 表达与肿瘤浸润深度及淋巴结转移的关系 食管鳞癌组织中 MCP-1 的表达与食管鳞癌的浸润深度、淋巴结转移密切相关(*P* < 0.05),见表 2。

2.5 食管鳞癌组织中 TAM 浸润数量与 MCP-1 表达的关系 食管鳞癌组织中 TAM 的浸润数量与 MCP-1 的表达呈正相关(*r* = 0.617, *P* < 0.05)。



A: 正常食管组织; B: 癌旁组织; C: 食管鳞癌组织。

图 2 免疫组化检测各食管组织中 MCP-1 的表达($\times 100$)

表 2 食管鳞癌组织中 MCP-1 表达与浸润深度及淋巴结转移的关系(n)

临床病理指标	n	低表达	高表达	χ^2	P
浸润深度					
黏膜下层	35	7	18	5.32	<0.05
肌层或食管外膜	55	13	52		
淋巴结转移					
有	38	5	23	6.76	<0.05
无	52	15	47		

3 讨 论

巨噬细胞是来源于骨髓的单核细胞,参与机体的固有和适应性细胞免疫反应,是机体重要的免疫细胞之一。TAM 在肿瘤组织中广泛浸润,参与组成肿瘤的微环境,与其他免疫细胞一起调控肿瘤细胞的发生、发展、侵袭等生物学功能。研究发现在肺癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、直肠癌等肿瘤组织中 TAM 的浸润数量与患者的生存期密切相关,可以作为评估肿瘤进展、复发、转移的重要预测因子之一^[9-13]。

本研究结果发现,在正常食管组织中不表达 TAM,而在食管鳞癌组织中 TAM 的表达显著上调,其浸润数量较癌旁组织和正常食管组织显著增多,与程明国等^[14]一致。本研究结果显示,在食管鳞癌组织中 TAM 的浸润数量与患者的性别、年龄、肿瘤的分化程度和大小无相关性,而与临床分期、浸润深度、淋巴结转移有相关性,提示 TAM 在食管鳞癌的发生、浸润方面可能发挥一定的生物学作用。

食管肿瘤的全身转移主要是通过血液、淋巴、消化道等途径,其中以淋巴转移较早,也较为重要,实现这一途径的前提条件是淋巴管的生成。MCP-1 增加 TAM 的浸润从而促进肿瘤血管和淋巴管的生成,MCP-1 的阳性表达越多,恶性肿瘤的进展越快,癌间质的炎性细胞浸润的也越多,肿瘤越容易发生转移^[6]。本研究结果提示,MCP-1 的表达在正常食管组织中极低,但在食管鳞癌及其癌旁组织中均显著升高,进一步研究结果提示,MCP-1 的表达与食管鳞癌的浸润深度和淋巴转移关系密切,证实了 MCP-1 参与恶性肿瘤中淋巴管的生成过程。

综上所述,本研究通过免疫组化检测 TAM 在食管鳞癌组织中的表达,揭示了 TAM 在食管鳞癌中的临床病理特征。在食管癌的临床病理过程中,TAM 的浸润数量与其临床分期、浸润深度和淋巴转移有一定的相关性,本研究结果对准确评估食管鳞癌患者的临床预后及指导临床治疗具有重要的理论和实践价值。

参考文献

- [1] 汪灏,李京沛,谭黎杰. 微创食管癌切除术临床疗效的现状评价[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2013, 29(7): 390-391.
- [2] 刘洋,许新华. 肿瘤相关巨噬细胞的研究进展[J]. 广东医学, 2013, 34(18): 2898-2901.
- [3] 张庆勇,朱武飞,王群兴. 肿瘤相关巨噬细胞与肿瘤的发生发展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(1): 106-108.
- [4] 王鹏亮. 肿瘤相关巨噬细胞在炎症与肿瘤之间的影响[J]. 河南医学研究, 2014, 23(2): 146-148.
- [5] 宋军民,李杨,李琳,等. 人胃癌组织中 MCP-1 和 CD34 的表达及临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(4): 344-347.
- [6] 李彩霞,江玲,邓伟,等. 子宫内膜癌中 NF- κ B、MCP-1 蛋白的表达及意义[J]. 重庆医学, 2015, 44(1): 36-39.
- [7] Shabo I, Olsson H, Elkarim R, et al. Macrophage infiltration in tumor stroma is related to tumor cell expression of CD163 in colorectal cancer [J]. Cancer Microenviron, 2014, 7(1/2): 61-69.
- [8] Komohara Y, Niino D, Saito Y, et al. Clinical significance of CD163(+) tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma [J]. Cancer Sci, 2013, 104(7): 945-951.
- [9] 刘小艳,许新华. 肿瘤相关巨噬细胞在肺癌中的研究现状[J]. 重庆医学, 2014, 43(16): 2079-2081.
- [10] 陆宁,佟仲生. 肿瘤相关巨噬细胞在乳腺癌中的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2014, 37(2): 122-125.
- [11] 周锡进,李国华. 肿瘤相关巨噬细胞在胃癌中的作用[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 30(20): 1261-1263.
- [12] 王梦一,廖泉,赵玉沛. 胰腺癌中的肿瘤相关巨噬细胞[J]. 中华肝胆外科杂志, 2014, 20(5): 321-323.
- [13] 袁娜娜,卢高峰,唐芙爱. 人结肠直肠癌组织中肿瘤相关巨噬细胞的检测[J]. 郑州大学学报(医学版), 2013, 48(1): 106-108.
- [14] 程明国,沈若武,王守彪,等. 肿瘤相关巨噬细胞在骨肉瘤生长及侵袭中的作用[J]. 中国农村卫生, 2012(z1): 41-42.