

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.20.009

CD68<sup>+</sup>和 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在口腔鳞状细胞癌中的浸润及作用\*李舒眉<sup>1</sup>,冯红超<sup>2△</sup>,马竹君<sup>2</sup>,韦敬<sup>2</sup>

(1. 贵州医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 贵阳 550004; 2. 贵州省贵阳市口腔医院口腔颌面外科 550001)

**[摘要]** **目的** 了解 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量与口腔鳞状细胞癌(OSCC)临床特征的相关性,探讨 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在 OSCC 中的作用及意义。**方法** 选取贵州医科大学附属口腔医院和贵阳市口腔医院 2013—2016 年手术切除的,经术后病理确诊,且有完整临床资料的 OSCC 患者 42 例,另设 12 例口腔颌面部正常组织作对照。应用免疫组织化学法检测 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在 OSCC 中的浸润数量,并分析其与 OSCC 临床特征的相关性。**结果** OSCC 中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量明显高于对照组( $P < 0.05$ );CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在中低分化的浸润数量明显高于高分化的浸润数量( $P < 0.05$ );CD68<sup>+</sup>巨噬细胞在有淋巴结转移的浸润数量明显低于无淋巴结转移的数量( $P < 0.05$ ),在有淋巴结转移中 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量明显高于 CD68<sup>+</sup>( $P < 0.05$ )。CD68<sup>+</sup>和 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在 OSCC 中的浸润数量呈正相关( $r = 0.48, P = 0.00$ )。**结论** 肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)、M2 型巨噬细胞对 OSCC 具有一定的作用,TAMs 可能抑制 OSCC 的淋巴结转移,而 M2 型巨噬细胞可能促进 OSCC 的淋巴结转移。

**[关键词]** 口腔;癌,鳞状细胞;CD68;CD163;巨噬细胞;免疫组化**[中图分类号]** R780.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)20-2764-03Infiltration and effect of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages in oral squamous cell carcinoma\*Li Shumei<sup>1</sup>, Feng Hongchao<sup>2△</sup>, Ma Zhujun<sup>2</sup>, Wei Jing<sup>2</sup>

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;

2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Guiyang Municipal Stomatological Hospital, Guiyang, Guizhou 550001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation between the number of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages infiltration and the clinical characteristics of oral squamous cell carcinoma (OSCC), and to investigate the role and significance of CD163<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> macrophages in OSCC. **Methods** Forty-two cases of OSCC resected by operation and diagnosed by postoperative pathology with intact clinical data in our hospitals during 2013—2016 were selected. Other 12 cases of oral maxillofacial normal tissue served as controls. The number of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages infiltration in OSCC was detected by immunohistochemistry. Its correlation with clinical characteristics was analyzed. **Results** The number of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages infiltration in OSCC was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ); the infiltration quantity of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages in poor differentiation and moderate differentiation was significantly higher than that in high differentiation ( $P < 0.05$ ). The number of CD68<sup>+</sup> macrophages in lymph node metastasis was significantly lower than that without lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The number of CD163<sup>+</sup> macrophages in the lymph node metastasis was significantly higher than that of CD68<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ). The number of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> macrophages had positive correlation in OSCC ( $r = 0.48, P = 0.00$ ). **Conclusion** Tumor-associated macrophages (TAMs) and M2 macrophages may play an important role in OSCC, TAMs may inhibits lymph node metastasis in OSCC, while M2 macrophages may promote the lymphatic metastasis of OSCC.

**[Key words]** mouth; carcinoma, squamous cell; CD68; CD163; macrophages; immunohistochemistry

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,它具有恶性程度高,常向区域淋巴结转移,晚期可发生远处转移等特点,而颈部淋巴结转移是目前临床上肿瘤致死的主要因素<sup>[1]</sup>。随着研究的深入,人们发现了肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs),特别是其亚型-M2型巨噬细胞与肿瘤的发生、发展密切相关,但目前为止,TAMs和M2型巨噬细胞对肿瘤临床预后的意义仍未达到统一。基于前人的研究,笔者采用公认的CD68抗体标记TAMs,用CD163抗体标记M2型巨噬细胞<sup>[2]</sup>,采用免疫组织化学方法,分析CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量与OSCC临床特征的相关性,探讨CD68<sup>+</sup>、

CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在肿瘤微环境中的作用及意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集贵州医科大学附属口腔医院和贵阳市口腔医院 2013—2016 年手术切除的,经术后病理确诊,且有完整临床资料的 OSCC 患者 42 例,其中男 31 例,女 11 例,年龄 30~77 岁,平均年龄 60 岁。所有患者术前未接受任何针对肿瘤的治疗(如放疗、化疗等),无自身免疫性疾病等其他疾病。其中高分化 12 例,中低分化 30 例;淋巴结转移 24 例。另设 12 例口腔颌面部正常组织作对照(正常组织主要取自整形手术术区的口腔颌面部组织或阻生齿拔除术中切取正常的牙龈组织),男 5 例,女 7 例,平均年龄 35 岁。本课题得到伦理委员会

\* 基金项目:贵阳市卫生局科学技术计划项目([2014]筑卫科技合同字第 15 号)。

作者简介:李舒眉(1990—),住院医师,在读硕士,主要

从事口腔颌面外科工作。△ 通信作者,E-mail:hongchaof@126.com。

的批准,并且所有患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 检测方法和指标 所有标本先用 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片进行非生物素二步法免疫组织化学染色检测。鼠抗人 CD68 单克隆抗体(即用型)、鼠抗人 CD163 单克隆抗体(即用型)、PV-9000 试剂盒、DAB 显色试剂盒均为北京中杉金桥生物技术公司产品,操作步骤参照试剂盒说明书进行。用已知的阳性组织切片做阳性对照,以 PBS 取代一抗做阴性对照。

1.2.2 结果判定 在切片上 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>均表达于巨噬细胞的细胞膜和细胞质内,细胞呈黄褐色或棕褐色阳性巨噬细胞。先在低倍(100 倍)光学显微镜下观察整张切片,选择 5 个不重叠的高倍视野(400 倍)下计数阳性细胞,所有切片由两名研究人员观察,取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间差异比较采用独立样本 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正常组织与 OSCC 组织中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量的比较 CD68<sup>+</sup>与 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞主要在上皮下的结缔组织中表达,在肿瘤细胞中主要在肿瘤浸润的前沿间质中表达。CD68<sup>+</sup>与 CD163<sup>+</sup>在 OSCC 中的浸润数量均高于对照组( $P < 0.05$ )。见图 1、2,表 1。

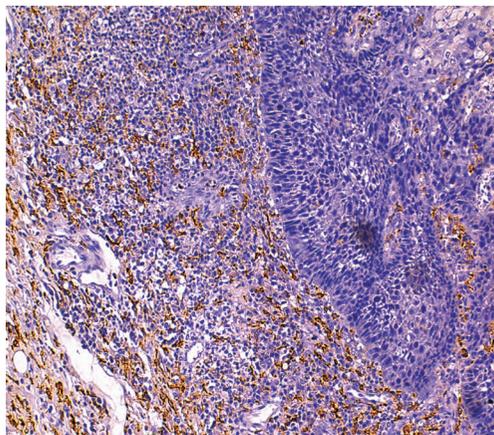


图 1 巨噬细胞在肿瘤浸润的前沿间质中表达(HE×100)

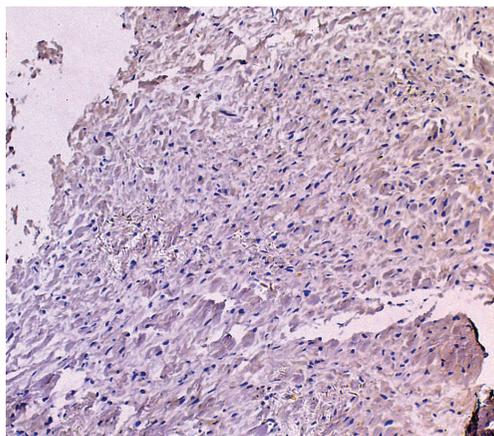


图 2 巨噬细胞在正常组织中的表达(HE×100)

2.2 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞浸润数量与肿瘤的分化程度

的关系 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>在中低分化的浸润数量明显高于高分化的浸润数量( $P < 0.05$ )。见表 2。

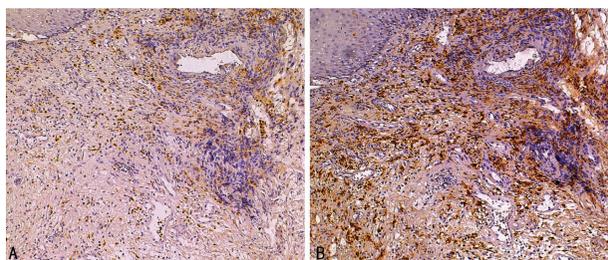
表 1 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞在 OSCC 和正常组织中的浸润数量( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | <i>n</i> | CD68 <sup>+</sup> | CD163 <sup>+</sup> |
|----------|----------|-------------------|--------------------|
| 对照组      | 12       | 20.59±11.77       | 13.25±10.74        |
| OSCC 组   | 42       | 51.76±35.04       | 55.57±30.41        |
| <i>t</i> |          | 5.03              | 5.25               |
| <i>P</i> |          | 0.00              | 0.00               |

表 2 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞与肿瘤分化程度的关系

| 分化程度     | <i>n</i> | CD68 <sup>+</sup> | CD163 <sup>+</sup> |
|----------|----------|-------------------|--------------------|
| 中低分化     | 30       | 60.93±30.95       | 62.92±27.58        |
| 高分化      | 12       | 5.94±4.77         | 18.86±10.99        |
| <i>t</i> |          | 4.64              | 4.13               |
| <i>P</i> |          | 0.00              | 0.00               |

2.3 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞浸润数量与淋巴结转移的关系 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞在有淋巴结转移中的浸润数量明显低于无淋巴结转移中的浸润数量,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量与淋巴结转移无相关性。在有淋巴结转移中 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量明显高于 CD68<sup>+</sup>,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而在无淋巴结转移中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3、表 3。



A:CD68<sup>+</sup>;B:CD163<sup>+</sup>

图 3 在有淋巴结转移中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的表达情况(HE×100)

表 3 OSCC 中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>的浸润数量与淋巴结转移的关系

| 淋巴结转移    | <i>n</i> | CD68 <sup>+</sup> | CD163 <sup>+</sup> | <i>t</i> | <i>P</i> |
|----------|----------|-------------------|--------------------|----------|----------|
| 无        | 18       | 70.76±36.21       | 50.67±27.21        | 1.88     | 0.07     |
| 有        | 24       | 37.52±26.93       | 59.26±32.65        | 2.52     | 0.02     |
| <i>t</i> |          | 3.42              | 0.90               |          |          |
| <i>P</i> |          | 0.01              | 0.37               |          |          |

2.4 相关性分析 CD68<sup>+</sup>与 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞之间存在正相关( $r = 0.48, P = 0.00$ );在 OSCC 中,CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>巨噬细胞的浸润数量与患者的性别、年龄、肿瘤大小无相关性( $P > 0.05$ )。

3 讨 论

OSCC 是我国口腔颌面部最常见的恶性肿瘤,多发生于中

老年人,男性多于女性,常影响患者的面形及功能,甚至因转移到重要部位而无可挽救。因此,了解肿瘤发生、发展的机制成为了研究者们一直以来的目标。

巨噬细胞是肿瘤微环境中数量最多的炎症细胞群,通过释放许多化学物质影响肿瘤细胞。文献表明,TAMs 至少有两种亚型:即经典活化的 M1 型巨噬细胞和替代性(选择性)活化的 M2 型巨噬细胞。多数研究认为 M1 型巨噬细胞具有抗肿瘤的作用<sup>[3]</sup>,而 M2 型巨噬细胞能够促进肿瘤的发生、发展<sup>[4]</sup>。本研究用公认的 CD68 抗体标记 TAMs,用 CD163 抗体标记 M2 型巨噬细胞<sup>[2]</sup>。结果显示 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞在 OSCC 的浸润数量明显高于对照组( $P < 0.05$ )。提示肿瘤中确实存在炎症反应,这种现象可能是由于肿瘤细胞或间质细胞分泌的细胞因子通过某种机制募集了血液循环中的单核细胞,使其在肿瘤组织处演变成巨噬细胞,亦或由局部组织中的巨噬细胞增殖而来,这种促进肿瘤的炎症反应被列为肿瘤的第七大特征<sup>[5]</sup>。

相关分析显示:CD68<sup>+</sup> 和 CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞在 OSCC 中的浸润数量呈正相关关系( $r = 0.48, P < 0.01$ ),并且二者间的数量差异较小。说明了 TAMs 可能倾向于表达 M2 型巨噬细胞,这与大多数研究相一致<sup>[4]</sup>。有文献表明,M2 型巨噬细胞具有较低的抗原递呈能力,能够促进血管的生成,参与调节性 T 细胞的分化和免疫抑制,诱导局部免疫耐受状态<sup>[6]</sup>。有学者报道,高水平的 TAMs 或 M2 型巨噬细胞与不良的临床特征相关<sup>[7]</sup>。本研究结果显示:CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞在中低分化的浸润数量明显高于高分化者( $P < 0.05$ ),CD68<sup>+</sup> 巨噬细胞在无淋巴结中转移的数量明显高于有淋巴结转移者( $P < 0.05$ ),说明 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞与 OSCC 的病理分级及淋巴转移有一定的关系。查阅国内外文献可知,TAMs 在一般情况下可通过直接介导细胞毒作用(macrophage-mediated tumor cytotoxicity, MTC)和抗体依赖的细胞毒作用(antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC)来杀伤肿瘤细胞,在前期的研究中用显微镜在体外观察到癌细胞被单核/巨噬细胞吞噬、裂解的图像,但在缺氧条件下单核/巨噬细胞杀伤肿瘤细胞的能力减弱<sup>[8]</sup>。在对此进一步探索研究中,有研究者提出,由于巨噬细胞是动态的非均质的免疫细胞,可在不同的肿瘤微环境刺激下发生不同性质的活化,因此可分化为不同的亚群:一种是经典活化的巨噬细胞,又称为 M1 型巨噬细胞;另一种是替代性(选择性)活化的巨噬细胞,又称为 M2 型巨噬细胞。其中 M2 型巨噬细胞主要出现在肿瘤中晚期,可通过减弱急性期炎症反应,抑制 Th1 型免疫应答,释放一系列活性分子来促进肿瘤血管、淋巴管的生成,而且还可通过诱导基质重建和肿瘤细胞的免疫耐受等机制,来促进肿瘤的发生、发展、侵袭和转移<sup>[9-11]</sup>,这与本研究结果相一致。

本研究结果还发现:CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞在淋巴结有转移的情况下染色数量比 CD68<sup>+</sup> 巨噬细胞多。这种现象的出现与 TAMs、M2 型巨噬细胞的所属关系有一定矛盾。国内外文献对此也众说纷纭,有研究表明肿瘤细胞本身也表达 CD163,如乳腺癌、直肠癌、膀胱癌<sup>[12]</sup>。从结果中得出 CD68<sup>+</sup> 巨噬细胞具有抑制肿瘤转移的作用,所以猜测:可能当 CD163<sup>+</sup> 细胞染色数量大于 CD68<sup>+</sup> 细胞染色数量时,由于 CD163<sup>+</sup> 阳性细胞分泌的促肿瘤的因子多于 CD68<sup>+</sup> 阳性细胞产生的抗肿瘤的因子,

所以能促进淋巴结转移。

本试验通过检测 OSCC 中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup> 的表达,标记了 TAMs、M2 型巨噬细胞在 OSCC 中的浸润数量与分化、淋巴结转移有关,证实了 TAMs 和 M2 型巨噬细胞在 OSCC 的肿瘤微环境中肿瘤细胞和其他细胞之间相互作用较复杂,对于 TAMs 和 M2 型巨噬细胞在 OSCC 中的具体作用及相关机制仍有待深入研究。

## 参考文献

- [1] 冯红超,宋宇峰,魏宏琳,等.巨噬细胞移动抑制因子和基质金属蛋白酶 2 在口腔癌生长和转移中的作用[J].现代口腔医学杂志,2009,23(2):135-137.
- [2] Coffelt SB, Lewis CE, Naldini L, et al. Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors[J]. Am J Pathol, 2010, 176(4): 1564-1576.
- [3] Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 44(3): 143-161.
- [4] Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer[J]. J Surg Res, 2011, 167(2): e211-219.
- [5] Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity[J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(2): 231-237.
- [6] Sica A, Lm'ghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. Seminars in cancer biology[J]. Academic Press, 2008, 18(5): 349-355.
- [7] Lu CF, Huang CS, Tjui JW, et al. Infiltrating macrophage count. A significant predictor for the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan[J]. Head Neck, 2010, 32: 18-25.
- [8] 冯红超,彭江帆,马洪,等.单核/巨噬细胞在缺氧微环境下对 Tca8113 舌鳞癌细胞系杀伤作用的实验研究[J].中国医学科学院学报, 2009, 25(6): 842-844.
- [9] Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity[J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(2): 231-237.
- [10] Epelman S, Lavine KJ, Gwendalyn J. Randolph, Origin and Functions of Tissue Macrophages[J]. Immunity, 2014, 41(1): 21-35.
- [11] Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, et al. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 44(2): 143-161.
- [12] Maniecki MB, Etzerodt A, Ulhoi BP, et al. Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor CD163 in malignant cells[J]. Int J Cancer, 2012, 131(10): 2320-2331.