

非小细胞肺癌中巨噬细胞集落刺激因子表达及 CD163⁺巨噬细胞浸润与预后的关系

Study of the Expression of Macrophage-colony Stimulating Factor and Infiltration of CD163⁺ in Patients with Non-small Cell Lung Cancer and Their Correlations with Prognosis

CHEN Yuan, MA Wei, LUO Dian-zhong

陈源¹, 马薇², 罗殿中²

(1.浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014; 2.广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530021)

摘要: [目的] 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)中巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的表达及 CD163⁺巨噬细胞浸润与患者预后的关系。[方法] 收集经病理证实的 NSCLC 石蜡包埋组织 43 例。用免疫组化方法分别检测 NSCLC 组织中 M-CSF 的表达及癌巢、癌内间质、癌与正常肺交界区的 CD163⁺巨噬细胞浸润情况, 并分析其与临床病理参数、预后的关系。[结果] ① M-CSF 在癌组织的表达明显高于周围肺组织 (0.027 ± 0.024 vs 0.006 ± 0.004 , $P < 0.05$)。② 癌与正常交界区 CD163⁺ TIMs 密度 (67.95 ± 42.56) 高于癌内间质 (57.40 ± 34.68)、癌巢 (46.28 ± 29.41) 及肿瘤周边肺 (11.02 ± 8.54), $P < 0.05$ 。③ 肿瘤内 M-CSF 密度与癌巢、癌内间质及交界区 CD163⁺ TIMs 密度正相关, $P < 0.05$ 。④ 肿瘤内 M-CSF 高密度与肿瘤高分化相关 ($P < 0.05$), 交界区 CD163⁺ TIMs 密度与临床分期及淋巴结是否受累有关 ($P < 0.05$)。⑤ 交界区 CD163⁺ TIMs 高密度患者平均生存时间 (704d) 明显少于低密度患者 (1309d), $P < 0.05$)。[结论] 交界区 CD163⁺巨噬细胞浸润可以作为 NSCLC 患者预后的独立预测指标。

关键词: 癌, 非小细胞肺; 巨噬细胞; 集落刺激因子; CD163; 预后

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)09-0692-04

大量的临床和实验证据表明肿瘤浸润巨噬细胞 (tumor infiltration macrophages, TIMs) 促进了肿瘤的发生、发展和转移^[1]。巨噬细胞在巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-colony stimulation factor, M-CSF) 诱导下分化为高表达 CD163 等分子的表型^[2]。有关 M-CSF 在非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 的表达及 CD163⁺ TIMs 的分布与预后的研究很少。因此, 我们用免疫组化的方法对 NSCLC 中 M-CSF 的表达及 CD163⁺ TIMs 的分布进行观察, 并结合完整的临床资料, 分析它们的相互关系及与 NSCLC 发生、发展和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集广西医科大学第一附属医院心胸外科 2005 年至 2007 年间手术切除并经病理证实的 NSCLC 标本 43 例, 所有病例均具有完整的癌、癌旁

肺组织。患者年龄 29~75 岁, 中位年龄 58 岁。其中男性 27 例, 女性 16 例。临床分期 (第 7 版 pTNM 分期): I 期 16 例, II 期 5 例, III 期 19 例, IV 期 3 例。鳞癌 18 例, 腺癌 25 例。病理分级: 1 级 7 例, 2 级 20 例, 3 级 16 例。所有患者均排除免疫性疾病及术前放、化疗史和长期糖皮质激素用药史。

1.2 主要试剂

兔抗人单克隆抗体 M-CSF 购自 Epitomics 公司, 鼠抗人单克隆抗体 CD163 购自北京中山金桥生物技术有限公司, EnVision 免疫组化检测试剂盒、DAB 染色试剂购自 DAKO 公司。

1.3 方法

全部标本采用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋切片, EnVision 法免疫组化染色, M-CSF 滴度 1:100, CD163 滴度 1:50, 操作方法严格按照试剂盒说明书进行, DAB 溶液显色, 用 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知的染色阳性片作阳性对照。

1.4 结果判定

分别由两名病理科医生采用双盲法阅片。肿瘤内及肿瘤旁肺组织胞浆内出现棕黄色颗粒为 M-CSF 阳性表达, M-CSF 的密度通过 Image-pro plus v6.0 图

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科攻 0993003C-1)
通讯作者: 罗殿中, 院长, 教授, 博士生导师, 博士; 广西医科大学第一附属医院, 广西壮族自治区南宁市双拥路 6 号 (530021); E-mail: luodianzhong@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2012-05-11; 修回日期: 2012-07-01

像分析软件测量 M-CSF 蛋白平均光密度值表示,在 400 倍光学显微镜下测 4 个视野平均光密度值,取其平均值作为该病例的 M-CSF 密度;巨噬细胞胞质、胞膜出现清晰的黄褐色至棕黄色颗粒为 CD163 阳性表达。癌巢浸润定义为肿瘤细胞区域出现巨噬细胞;癌内间质浸润定义为分割癌巢之间的结缔组织区域出现巨噬细胞;癌与正常交界区浸润定义为肿瘤浸润边缘与周围肺组织之间区域出现巨噬细胞。不同部位的 CD163⁺ TIMs 密度采用每 400 倍视野下巨噬细胞的个数表示,以同样的方法取 4 个视野的平均值表示其 TIMs 密度。M-CSF 及 CD163⁺ TIMs 密度以中位数为分界点将其分为高密度组和低密度组。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件。计量资料采用 *t* 检验及 Pearson 相关分析;分类资料与临床参数的关系采用 χ^2 检验;生存分析资料采用 Kaplan-Meier 及 Log-Rank 检验法分析;独立预后因素采用 Cox 比例风险回归模型分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 中 M-CSF 表达和分布

M-CSF 蛋白阳性产物为棕黄色颗粒,主要表达在肺癌细胞胞浆内,癌旁肺组织支气管上皮胞浆部分表达,肺泡上皮少量或无表达,见图 1。NSCLC 肿瘤组织 M-CSF 密度 (0.027 ± 0.024) 高于癌旁肺组织 (0.006 ± 0.004),差异有统计学意义 ($t=6.436, P=0.000$)。

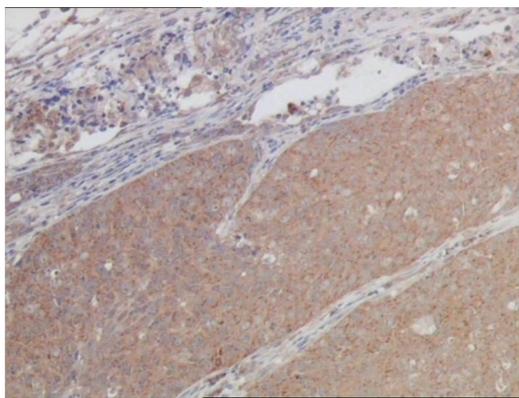


图 1 M-CSF 蛋白在肿瘤中的表达 ($\times 200$)

2.2 NSCLC 中 CD163⁺ 巨噬细胞分布

CD163 阳性产物为棕黄色至棕褐色颗粒,特异性表达在巨噬细胞的胞浆、胞膜处,见图 2。癌与正常交界区 CD163⁺ TIMs 密度 (67.95 ± 42.56) 高于癌内间质 (57.40 ± 34.68)、癌巢 (46.28 ± 29.41) 及癌旁肺组织 (11.02 ± 8.54),差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

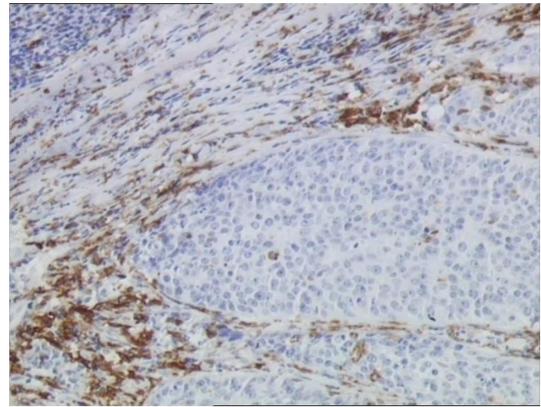


图 2 CD163⁺ TIM 在同一肿瘤病例中的分布,主要分布在交界区 ($\times 200$)

表 1 不同部位 CD163⁺ TIM 密度

部位	例数	CD163 ⁺ TIM 密度 ($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
癌巢	43	46.28 ± 29.41	3.055	0.004
癌内间质	43	57.40 ± 34.68	2.203	0.033
癌与正常交界区	43	67.95 ± 42.56	-	-
癌旁肺组织	43	11.02 ± 8.54	9.056	0.000

注:各组均与癌正常交界区作比较

2.3 NSCLC 中 M-CSF 的表达与 CD163⁺ TIMs 密度的关系

肿瘤内 M-CSF 密度与不同部位 CD163⁺ TIMs 密度正相关,随着肿瘤内 M-CSF 密度增加,癌巢、癌内间质以及癌与正常交界区 CD163⁺ TIMs 密度均增高 ($r=0.704, r=0.382, r=0.364, P$ 均 < 0.05)

2.4 NSCLC 中 M-CSF 的表达及 CD163⁺ TIM 密度与临床病理参数的关系

M-CSF 高密度者 (≥ 0.021) 在中高分化 NSCLC 中的比例为 33.3% (9/27), 低于低分化 NSCLC 中的比例 81.3% (13/16), 差异有统计学意义 ($\chi^2=9.232, P < 0.05$)。而 M-CSF 蛋白密度与患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型、临床分期等无关 ($P > 0.05$)。交

交界区 CD163⁺ TIMs 高密度者 (≥70.00) 在 I + II 期 NSCLC 患者中的比例为 33.3% (7/21), 低于 III + IV 期的比例 68.2% (15/22); 在淋巴结无受累者中的比例 30.0% (6/20), 低于淋巴结受累者中的比例 69.6% (16/23), 均有统计学差异 ($\chi^2=5.222, \chi^2=6.702, P$ 均 <0.05)。而癌巢、癌内间质 CD163⁺ TIMs 密度与临床病理参数无关 ($P>0.05$)。

2.5 NSCLC 中 M-CSF 的表达及 CD163⁺ TIM 密度与患者生存时间的关系

全部患者从术后开始随访, 截止至 2009 年 12 月 30 日, 随访率 100%。患者生存时间为 90~1 575d, 中位生存期 1 034d, 3 年生存率 47%。单因素分析结果显示, 交界区 CD163⁺ TIM 密度与患者生存期相

关, 交界区 CD163⁺ TIMs 密度高的患者平均生存时间 (704d) 少于密度低者 (1 309d) ($\chi^2=15.776, P<0.05$)。癌巢、癌内间质 CD163⁺ TIMs 密度及肿瘤内 M-CSF 密度与生存期无明显关系, $P>0.05$ 。见图 3。

Cox 比例风险回归模型多因素分析结果显示, 交界区 CD163⁺ TIM 密度和临床分期可以作为非小细胞肺癌患者预后的独立预测指标。见表 2。

3 讨论

巨噬细胞是一个异质性的群体, 在不同的环境下表现为不同的功能。根据 Mantovini 等^[3]的分类法, 可分为经典活化型巨噬细胞 (M1 型) 和替代活化型巨噬细胞 (M2 型), 前者

由 IFN- γ 、LPS 等诱导活化, 高表达 IL-12、TNF α 等, 并参与 Th1 型免疫应答, 具有清除病原微生物、杀灭肿瘤的作用; 与之相反的 M2 型, 由 IL-4、IL-10 等诱导, 高表达 CD163、TGF- β , 参与 Th2 型免疫应答, 具有组织修复及促进肿瘤的作用。TIM 是由外周血单核细胞在肿瘤环境内趋化因子的趋化下进入肿瘤并诱导分化成熟, 关于 TIM 与肿瘤关系的假说也有不同的观点, 如胃癌、结肠癌的 TIM 高密度患者预后好, 其 TIM 起杀灭肿瘤的作用; 然而大量的动物实验和临床研究指出很多组织 TIM 具有促进肿瘤的作用, 如乳腺癌、甲状腺癌、肝癌、黑色素瘤等 TIM 密度高者预后差。

M-CSF 是巨噬细胞的主要调节因子, 不仅可以趋化单核细胞进入组织中, 还可以诱导、分化单核细胞

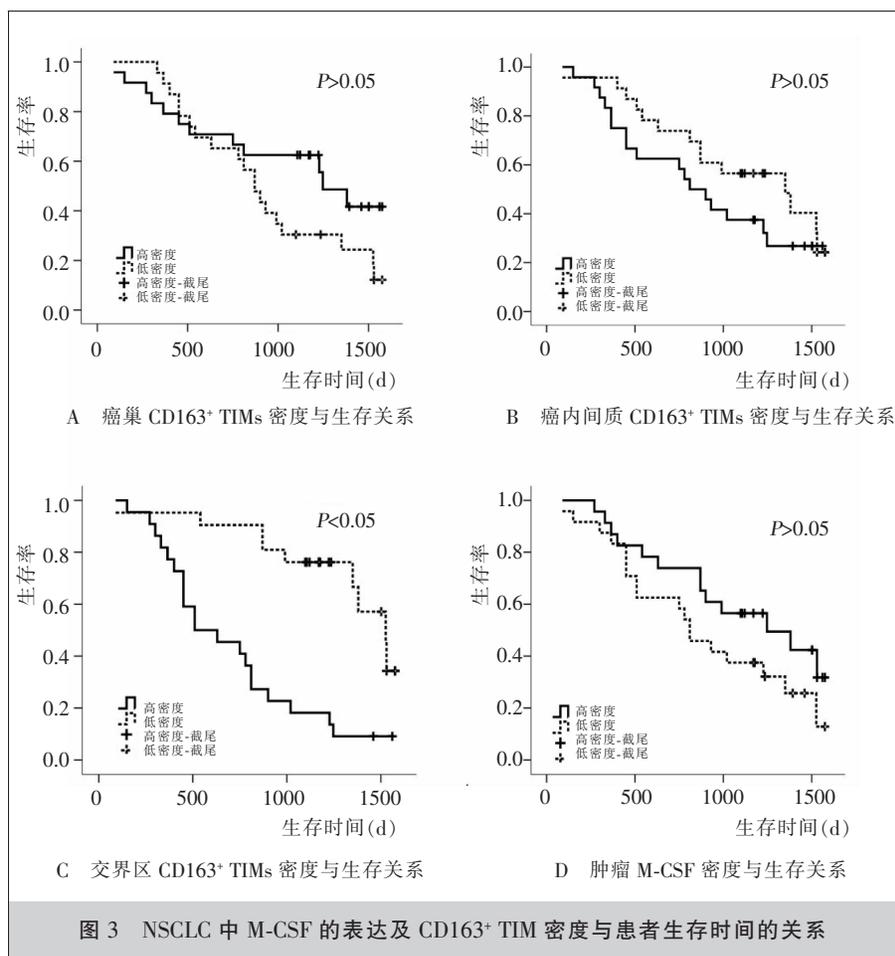


图 3 NSCLC 中 M-CSF 的表达及 CD163⁺ TIM 密度与患者生存时间的关系

表 2 Cox 多因素分析结果

参数	β	SE	Wald	P 值	RR	95%CI
交界区 CD163 ⁺ TIM 密度	1.376	0.432	10.152	0.001	3.958	1.698~9.227
临床分期	1.252	0.436	8.250	0.004	3.498	1.488~8.220

为成熟巨噬细胞,高表达 CD163,低表达 IL-12^[2-4]。M-CSF 高表达与胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌及肝癌等肿瘤患者预后不良有关,Kaminska 等^[5]指出 NSCLC 患者中血清 M-CSF 浓度高者预后差,但未研究其在 NSCLC 肿瘤组织中的表达。本研究观察到 M-CSF 主要表达在肺癌细胞胞浆内,NSCLC 肿瘤组织 M-CSF 蛋白密度明显高于周边肺组织,分化级别越低,M-CSF 蛋白密度越高,但 M-CSF 蛋白的表达与患者的预后没有明显关系,说明肿瘤细胞随着恶性程度的增加,肿瘤组织分泌更多的 M-CSF,同时趋化循环血单核细胞进入肿瘤。

CD163 是富含半胱氨酸清道夫受体超家族一员,特异性地表达在单核巨噬细胞系,IFN- γ 、GM-CSF 等诱导 CD163 的表达下调,IL-10、M-CSF 等诱导 CD163 的合成及高表达^[6]。本研究发现肿瘤组织不同部位均有 CD163⁺ TIMs,主要分布在肿瘤内及癌正常交界区,并且随着肿瘤内 M-CSF 增加,肿瘤内及癌与正常交界区 CD163⁺ TIM 增多,说明 TIMs 来源于外周血单核细胞,在肿瘤 M-CSF 等细胞因子的趋化下,进入肿瘤微环境并活化为高表达 CD163 的 M2 型巨噬细胞,TIMs 是 M2 型巨噬细胞的范例^[3]。

有报道 NSCLC 患者 TIM 与预后有关但结果不一致,甚至相悖。Ma 等^[7]发现 NSCLC 组织的癌巢、间质中均有 CD163⁺ TIMs,但它们均与患者预后无关。Chen 等^[8]发现 NSCLC 肿瘤内的 TIMs 与患者预后负相关。本研究分析了肿瘤内不同部位 CD163⁺ TIMs 与临床病理参数及预后的关系,结果显示癌巢、癌内间质 CD163⁺ TIMs 与患者预后无关,与 Ma 等的结果一致,而交界区 CD163⁺ TIMs 与患者的预后负相关的结果说明区分肿瘤不同部位的重要性,本研究还发现交界区 CD163⁺巨噬细胞高浸润与临床分期和淋巴结是否受累有关,进一步说明肿瘤交界区 TIMs 促进肿瘤的浸润与转移。Lewis 等^[9]提出在肿瘤中不同区域内的巨噬细胞的作用不同,我们推测 NSCLC 患者的肿瘤交界区的 TIM 与患者预后负相关的机制可能与交界区微环境有关,交界区肿瘤细胞和巨噬细胞通过自分泌及旁分泌方式相互作用,在肿瘤细胞分泌的 M-CSF 等细胞因子活化下交

界区巨噬细胞发生表型和功能的改变,高表达 CD163 分子,并分泌表皮生长因子(EGF)等细胞因子作用于交界区肿瘤细胞,通过分泌一系列的细胞因子、趋化因子、蛋白酶(如 VEGF、MMPs、uPA)等生物活性分子,促进交界区肿瘤周围基质的降解、血管密度增加、肿瘤细胞迁移活性的增强等,进而促进肿瘤发生浸润和转移,但具体的机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 39-51.
- [2] Kowal K, Silver R, Sławińska E, et al. CD163 and its role in inflammation [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2011, 49(3): 365-374.
- [3] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes [J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(11): 549-555.
- [4] Espinosa I, Beck AH, Lee CH, et al. Coordinate expression of colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1-related proteins is associated with poor prognosis in gynecological and nongynecological leiomyosarcoma [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(6): 2347-2356.
- [5] Kaminska J, Kowalska M, Kotowicz B, et al. Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF—an independent prognostic factor[J]. *Oncology*, 2006, 70(2): 115-125.
- [6] Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(7-8): 1650-1660.
- [7] Ma J, Liu L, Che G, et al. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 112.
- [8] Chen JJ, Lin YC, Yao PL, et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(5): 953-964.
- [9] Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 605-612.