

人肝细胞癌组织肿瘤相关巨噬细胞的浸润水平及其临床意义

康富标¹, 王 玲², 彭焕彦¹, 李 东¹, 孙殿兴¹

(1. 白求恩国际和平医院, 河北 石家庄 050082;

2. 河北医科大学第四医院, 河北 石家庄 050011)

摘 要: [目的] 通过检测人肝细胞癌组织中肿瘤相关巨噬细胞的浸润水平和特点, 探讨肿瘤相关巨噬细胞在肝癌发生、进展中的作用。[方法] 以 CD68 分子为巨噬细胞标志, 采用免疫组织化学法检测 116 例肝细胞癌肿瘤组织巨噬细胞的浸润水平和特点。[结果] 肝细胞癌组织中 CD68 阳性表达率为 94.8%(110/116), 而癌旁组织为 17.2%(20/116)。巨噬细胞的浸润水平在不同 TNM 分期、是否存在血管侵袭、淋巴结转移及微卫星病灶分组间均有统计学差异 ($P<0.05$), 与患者预后呈负相关 ($P=0.001$)。[结论] 人肝细胞癌组织肿瘤相关巨噬细胞呈高浸润状态, 且浸润水平与多项临床病理特征和预后密切相关, 提示其可能参与了肝癌的发生、进展。

关键词: 肝肿瘤; 肿瘤相关巨噬细胞; CD68; 免疫组织化学

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)11-0923-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.11.B011

Infiltration Level of Tumor-associated Macrophages in Human Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Significance

KANG Fu-biao¹, WANG Ling², PENG Huan-yan¹, et al.

(1. Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China; 2. The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: [Objective] To examine the level and characteristics of tumor-associated macrophage in human hepatocellular carcinoma (HCC) and to evaluate its role in the progression of HCC. [Methods] Macrophages marked by CD68 molecule in liver tissues from 116 patients with HCC were examined by immunochemistry staining. [Results] About 94.8%(110/116) samples were positive for CD68 in these tumor specimens, while 17.2%(20/116) in adjacent tissues. Significant differences of macrophages' infiltration were found among early and late TNM stages and exists or not of vascular invasion, lymph metastasis and microsatellite lesions ($P<0.05$). Meanwhile, the levels of macrophages in tumor tissues were negatively correlated with postoperative prognosis ($P=0.001$). [Conclusions] Macrophages are shown high infiltration levels in HCC tissues and closely relate to several clinical parameters, tumor staging and survival of HCC. Therefore, TAMs might involve in the mechanisms of HCC.

Subject words: hepatocellular neoplasms; tumor-associated macrophages; CD68; immunohistochemistry

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种原发于肝细胞的恶性肿瘤, 是严重危害人类生命健康的重大疾病。全球每年约有 74.8 万人罹患肝癌, 位列肿瘤性疾病男性发病率第 5 位和女性发病率第 7 位, 死亡率则分别高居第 2 位和第 6 位^[1,2]。HCC 也是我国高发的恶性肿瘤之一, 据估计约占全球每

年新发和死亡病例的 50%。虽然近年来医疗技术迅猛发展, 但 HCC 特别是晚期患者的疗效仍差强人意。

HCC 患者预后不良的重要原因是肿瘤的高度侵袭性和高转移率, 而肿瘤的侵袭、转移被认为与上皮间质转化(EMT)、新生血管形成等机制密切相关^[3,4]。研究发现, 在肿瘤微环境中存在的巨噬细胞, 即肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs), 可能参与了诱导 EMT、促进血管生成和细胞外基质(ECM)重建等机制^[5-8]。因此, TAMs 在 HCC 中扮演的

通讯作者: 康富标, 主治医师, 博士; 白求恩国际和平医院全军肝病诊治中心, 河北省石家庄市中山西路 398 号(050082); E-mail: kangfb@hotmail.com

收稿日期: 2016-01-27; **修回日期:** 2016-02-05

角色值得关注。CD68 是一种分子量约 110kD 的胞浆蛋白,主要表达于单核—巨噬细胞系统,是巨噬细胞最可靠的标志物^[9]。本实验以 CD68 为巨噬细胞标志,研究肝癌组织 TAMs 的浸润水平和特点及其与临床病理资料之间的相关性,探讨 TAMs 在 HCC 发生、进展中的作用,以期对 HCC 的机制研究和临床治疗提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 标本来源

标本取自 2004 年 1 月至 2008 年 12 月在白求恩国际和平医院和河北医科大学第四医院诊断为肝细胞癌并接受肿瘤切除手术的患者共计 116 例。分别采集新鲜肝癌组织和癌旁肝组织。其中男性 84 例,女性 32 例,年龄 38~74 岁,中位年龄 54 岁。肝功能按照 Child-Pugh 分级,A 级 60 例,B 级 56 例。肿瘤最大结节直径 $\leq 5\text{cm}$ 77 例, $>5\text{cm}$ 39 例。乙型肝炎病毒表面抗原(Hepatitis B surface antigen,HBsAg)阳性 76 例。所有患者均未行化疗、放射治疗及生物免疫治疗,并排除自身免疫性疾病和其他肿瘤,且均具备完整的临床病理资料。同时收集 7 例接受诊断性肝穿刺的正常肝组织(男性 5 例,女性 2 例,年龄 28~54 岁)作为对照。所有实验研究均得到患者的知情同意,并经医院医学伦理部门批准。

1.2 免疫组化方法

组织标本经 4%多聚甲醛固定,常规脱水、透明、石蜡包埋,切 5 μm 厚切片。切片烘烤过夜,二甲苯脱蜡,梯度乙醇内水化。热抗原修复并用 3%甲醇过氧化氢溶液阻断内源性抗原,10%正常血清封闭阻断背景非特异性染色。采用兔抗人 CD68 单克隆抗体(1:200 稀释,Abcam 公司)作为一抗,湿盒内过夜。生物素标记二抗(北京中山金桥公司)和辣根酶标记的链霉卵白素工作液依次孵育,DAB 显色,苏木精复染,脱水封片。请 2 位病理医师采用双盲独立进行观察、评分检测。每张切片随机选取 5 个 $\times 200$ 倍视野,以可见棕黄色染色颗粒为 CD68 阳性细胞,每个视野分别计数阳性细胞数目后取均值。结果可见,7 例健康对照肝组织均可见散在分布的少量 CD68 阳性细胞,且个体间差异较小(6~19/视野,中位数为 11)。以此作为标准,目的切片巨噬细胞浸润

数量 <20 /视野视为阴性, ≥ 20 /视野为阳性。阳性浸润水平分为三个等级:低浸润水平为 20~125/视野,中等浸润水平为 126~250/视野,高浸润水平为 >250 /视野。

1.3 随访

所有患者术后定期(约每 3 个月)随访,检查项目至少包括肝功能、甲胎蛋白(AFP)水平和 B 超等。最终截止随访时间为 2012 年 12 月 31 日,所有病例平均随访时间为 33.5 个月(9~62 个月)。

1.4 统计学处理

实验结果数据分析采用 SPSS20.0 软件进行处理。计数资料的组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。生存资料的数据分析采用 Kaplan-Meier 法,组间比较采用 Log-rank 检验。 $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TAMs 在 HCC 组织中的表达

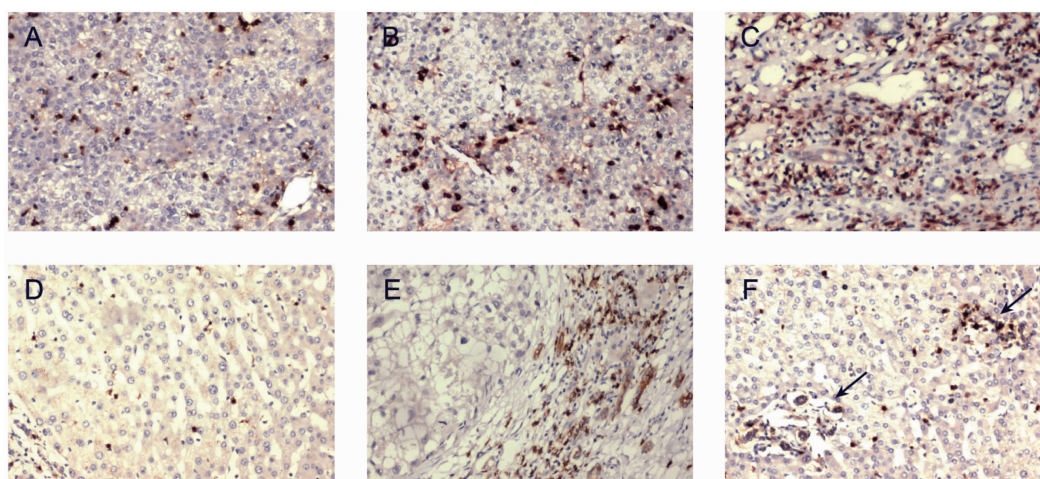
免疫组化显示,CD68 分子在大多数 HCC 组织中呈中、高水平表达,主要分布于肿瘤间质巨噬细胞的胞质和胞膜,呈灶状或片状分布,在肿瘤边缘、血管周围较为集中(Figure 1A~F)。HCC 组织 CD68 阳性表达率为 94.8%(110/116),明显高于对应样本癌旁组织的 17.2%(20/116)($P<0.01$)。按浸润水平分级,癌组织中无浸润和低浸润水平 21 例,中等浸润 49 例,高浸润 46 例,而癌旁组织均为无浸润或低浸润水平。此外,同一个体 CD68 分子在转移灶较原发灶往往存在更高的浸润水平。

2.2 HCC 组织 TAMs 的表达与临床病理特征的关系

资料分析提示,在不同年龄、性别、肝纤维化程度、Child-Pugh 分级、HBsAg 状态、术前 AFP 水平等组别间,TAMs 的浸润水平无统计学差异($P>0.05$),而在不同 TNM 分期($P=0.011$)和是否存在血管侵袭($P=0.004$)、淋巴结转移($P=0.010$)、微卫星病灶($P=0.041$)等组别间有显著性差异(Table 1)。临床 TNM 分期越晚,TAMs 的浸润水平越高。在存在血管侵袭、淋巴结转移和微卫星病灶等组织病理特征的患者中,较相对应的阴性组,TAMs 存在更高的浸润水平。

2.3 HCC 组织 TAMs 的表达与患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存分析结果显示,TAMs 高浸润



Note: A: Low infiltration; B: Moderate infiltration; C: High infiltration; D: Tumor-adjacent normal tissue; E: Tumor margin tissue; F: Tumor tissue surrounded vessel.

Figure 1 Relationship between TAMs' infiltration and clinicopathological parameters of the HCC cases

Table 1 Levels of TAMs' infiltration in HCC and adjacent normal liver tissues

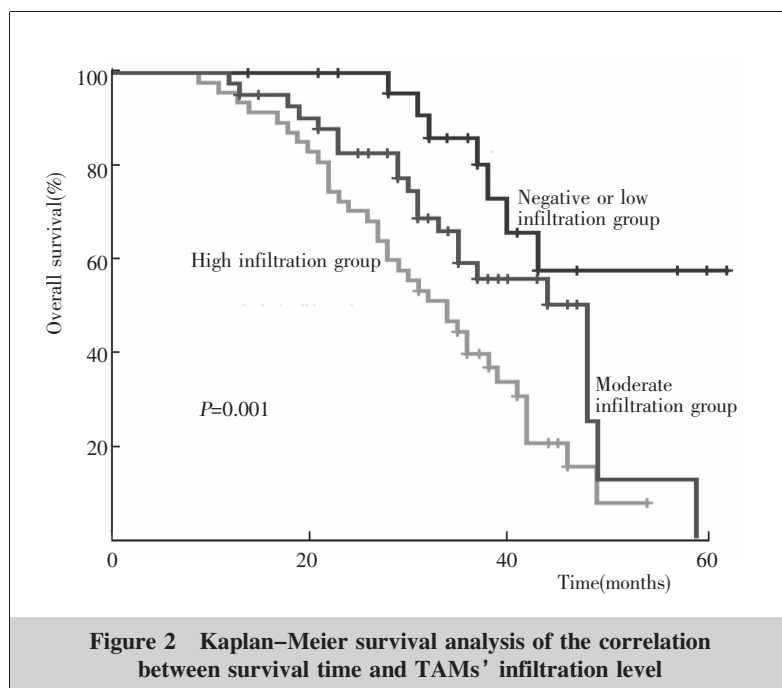
Parameters		N	TAMs' infiltration			Z	P
			Low	Moderate	High		
Age (years)	≤50	43	9	21	13	-1.452	0.147
	>50	73	12	28	33		
Gender	Male	84	14	36	34	-0.501	0.617
	Female	32	7	13	12		
Vascular invasion	+	54	5	21	28	-2.871	0.004
	-	62	16	28	18		
TNM stage	I ~ II	77	18	34	25	-2.558	0.011
	III ~ IV	39	3	15	21		
Lymph metastasis	+	32	2	12	18	-2.570	0.010
	-	84	19	37	28		
Tumor size (cm)	≤5	77	17	31	29	-1.137	0.256
	>5	39	4	18	17		
Tumor encapsulation	+	18	2	9	7	-0.309	0.757
	-	98	19	40	39		
Microsatellite tumors	+	31	2	13	16	-2.039	0.041
	-	85	19	36	30		
Child-Pugh classification	A	60	11	27	22	-0.537	0.591
	B	56	10	22	24		
HBsAg	+	76	11	36	29	-0.267	0.790
	-	40	10	13	17		
AFP	≤200	49	9	26	14	-1.465	0.143
	>200	67	12	24	31		

组患者预后与低浸润组患者比较有显著性差异 ($P=0.001$)。TAMs 高浸润和中等浸润水平患者的总体生存率均显著低于无或低浸润组患者(Figure 2)。

3 讨论

巨噬细胞是一类重要的固有免疫细胞，通常认为是由单核细胞(monocytes)移行至组织发育而来，主要发挥吞噬功能、抗原提呈、细胞毒作用以及细胞因子分泌和免疫调节作用。肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)泛指在肿瘤微环境中存在的巨噬细胞，是包括肝癌在内多种实体肿瘤组织中含量最丰富的免疫细胞之一^[10]。在某些情况下，TAMs 甚至可占到肿瘤组织细胞群体的 50%~80%^[11]。目前研究认为 TAMs 可能参与了肿瘤的发生、生长及侵袭转移，并可能与肿瘤血管和淋巴管的形成密切相关^[5-8]。

巨噬细胞可以按功能分为 M1 和 M2 两个亚型，巨噬细胞在不同条件下分别向两个亚型分化的过程称为巨噬细胞的极化^[12,13]。M1 亚型巨噬细胞可提呈抗原，参与 Th1 型免疫反应，发挥抗感染、抗肿瘤作用。M2



亚型能大量合成和分泌 IL-10、TGF- β 等抗炎因子、免疫抑制因子,可抑制 T 细胞的活化和增殖并能促进肿瘤细胞的生长和转移。本研究发现,肝细胞癌组织标本中 TAMs 的浸润水平显著升高,阳性表达率和浸润程度均明显高于癌旁的相对正常肝组织,而且 TAMs 的浸润水平与肿瘤 TNM 分期相关,即 TNM 分期越晚, TAMs 的浸润水平越高。不仅如此,生存分析结果显示, TAMs 高浸润组总体生存率较低浸润组更低,组间比较有显著性差异。TAMs 的高水平浸润及其与病程的相关性提示肝细胞癌组织浸润 TAMs 可能趋向于 M2 亚型,在肝癌的发生、进展中发挥免疫抑制和促瘤作用。

进一步分析可见, TAMs 的浸润与年龄、性别、肝功能和纤维化程度、病毒感染状态、甲胎蛋白水平等均无明显关系,而与肿瘤侵袭、转移相关的组织学证据,包括血管侵袭、淋巴结转移与微卫星病灶形成等关系密切。在存在上述组织学特征的分组中, TAMs 的浸润水平均高于对应组,组间比较有显著性差异。结果提示, TAMs 除可能通过免疫学机制发挥作用外,还通过某种特定途径参与了肿瘤的侵袭、转移的机制。阅片显示, TAMs 在 HCC 组织边缘、转移灶中往往存在更高的浸润水平,也支持 TAMs 参与肿瘤侵袭、转移的可能。Ding 等^[14]通过免疫组化研究同样发现,癌缘 CD68 阳性巨噬细胞密度与血

管侵犯有显著相关性,结果与本研究一致。而在 HCC 细胞荷瘤小鼠模型中,删除 TAMs 可通过控制转移及抗血管生成机制显著增加索拉菲尼的抗肿瘤作用^[15]。Fan 等^[16]还发现 HCC 组织 TAMs 可能通过分泌 TGF- β 诱导上皮间质转化 (EMT)进而介导癌缘肿瘤干细胞(SCS)样细胞生成,而 EMT 正是肿瘤侵袭转移的重要机制。

总之,本研究系统地检测了 TAMs 在 HCC 组织中的浸润水平,并与临床病理特征之间的关系进行了初步探索,表明 TAMs 与 HCC 的疾病进展关系密切,并可能参与了肿瘤的侵袭、转移,但具体机制尚有赖于进一步研究。由于巨噬细胞的极化过程具有可调节性,在特定条件下可能实现动态型别转换,通过

诱导 M2 亚型 TAMs 向 M1 亚型转化,可能使 TAMs 从促瘤作用转变为抑瘤作用^[17]。因此,进一步对 HCC 组织浸润 TAMs 表型、分布、分型及功能的研究不仅有助于理解肿瘤的发生、发展机制,而且有望为临床治疗寻找新的有效靶点。

参考文献:

- [1] Abdel-Rahman O. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): from bench to bedside[J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2013, 25(4): 165-171.
- [2] Flores A, Marrero JA. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics [J]. Clin Med Insights Oncol, 2014, 8: 71-76.
- [3] Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255.
- [4] Rossi L, Zoratto F, Papa A, et al. Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastrointest Oncol, 2010, 2(9): 348-359.
- [5] Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, et al. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment[J]. Cancer Growth Metastasis, 2014, 7: 9-18.
- [6] Santoni M, Massari F, Amantini C, et al. Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2013, 62(12): 1757-1768.
- [7] Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, et al. Tumor associated

- macrophages and neutrophils in cancer [J]. Immunobiology, 2013, 218(11):1402-1410.
- [8] Li Y, Peng JJ, Wei D, et al. The relationship of tumor associated macrophages with tumor infiltration and metastasis in colon cancer[J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(5):342-344. [李焱, 彭晶晶, 魏东, 等. 结肠癌中肿瘤相关巨噬细胞与肿瘤浸润转移的关系[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(5):342-344.]
- [9] Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, et al. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry[J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(7):774-784.
- [10] Wan S, Kuo N, Kryczek I, et al. Myeloid cells in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2015, 62(4):1304-1312.
- [11] Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J]. Cancer Res, 2006, 66(2):605-612.
- [12] 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.
- [13] Mantovani A, Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(7):1478-1483.
- [14] Ding T, Xu J, Wang F, et al. High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection[J]. Hum Pathol, 2009, 40(3):381-389.
- [15] Zhang W, Zhu XD, Sun HC, et al. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(13):3420-3430.
- [16] Fan QM, Jing YY, Yu GF, et al. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2014, 352(2):160-168.
- [17] Wu T, Zhou WX. The polarization of tumor associated macrophages and tumor progression[J]. Modern Oncology, 2015, 23(12):1753-1756. [吴婷, 周武雄. 肿瘤相关巨噬细胞的极化与肿瘤的发展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(12):1753-1756.]

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。

《肿瘤学杂志》编辑部