

M1、M2 型肿瘤相关巨噬细胞与胃癌淋巴结转移的关系

Relationship between Lymph Node Metastasis and Tumor-associated Macrophage of Type M1 and M2 in Gastric Carcinoma // HE Yu, JIANG Ji-fei, XU Qiang, et al.

何 玉, 蒋吉飞, 徐 强, 降礼军, 谢 云, 蒋 鸥

(内江市第二人民医院肿瘤中心, 四川 内江 641100)

摘 要: [目的] 分析 M1、M2 型巨噬细胞与胃癌淋巴结转移的关系。[方法] 随机选取行胃癌 D2 根治术的病例 50 例, A 组 30 例为有淋巴结转移组, B 组 20 例为无淋巴结转移组。检测 50 例胃癌患者癌组织中 CD68、CD163 的表达情况。另外从 50 例标本中, 选取 20 例淋巴结有癌转移组中的无癌转移淋巴结, 每例随机选取 1 枚未转移淋巴结, 共 20 枚 (C 组); 淋巴结无癌转移组中, 每例随机选取 1 枚淋巴结, 共 20 枚 (D 组)。检测 C、D 两组淋巴结中 CD68、CD163 的表达情况。[结果] A、B 两组胃癌组织中 M1 型巨噬细胞均数分别为 20.12 ± 2.90 和 20.09 ± 2.44 , 差异无统计学意义 ($P=0.970$); M2 型巨噬细胞均数分别为 20.41 ± 2.36 和 14.68 ± 2.69 , 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。C、D 组淋巴结中, M2 型巨噬细胞均数分别为 11.10 ± 1.04 和 7.70 ± 1.93 , 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。[结论] M2 型巨噬细胞可能参与并促进胃癌的局部淋巴结转移。已有局部淋巴结癌转移的患者更易发生其它淋巴结癌转移, 并且 M2 型巨噬细胞可能参与其中。

主题词: 肿瘤相关巨噬细胞; M1 型巨噬细胞; M2 型巨噬细胞; 胃癌; 转移淋巴结;

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1671-170X(2017)08-0728-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.08.B018

胃癌的淋巴结转移影响患者预后, 胃癌的淋巴结转移不仅与肿瘤本身的特性有关, 还与肿瘤相关的炎症反应有关。肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAMs) 是肿瘤组织中数量较多的免疫细胞, 在肿瘤的发生、发展及转移中扮演了重要的角色。根据巨噬细胞不同的功能特性, 通常把巨噬细胞分为 M1 和 M2 两型。目前多数研究发现肿瘤相关巨噬细胞促进胃癌的侵袭、转移, 并认为主要是 M2 型巨噬细胞的作用^[1]。本研究分析 M1、M2 型巨噬细胞与淋巴结转移的关系, 以期对胃癌治疗、预后评估提供新的视角。

1 资料与方法

1.1 一般资料

按病理号随机选取我院 2007 年 1 月至 2008 年 12 月行胃癌 D2 根治术的病例 50 例, 年龄 28~69

岁, 平均年龄 47.6 岁。男性 38 例, 女性 12 例; 病理类型为腺癌 46 例, 印戒细胞癌 4 例; I A 期 2 例, I B 期 8 例, II A 期 7 例, II B 期 12 例, III A 期 18 例, III B 期 3 例; 30 例有淋巴结转移 (定义为 A 组), 20 例无淋巴结转移 (定义为 B 组)。另外, 从这 50 例标本中, 按病理号先后顺序, 选取前 20 例淋巴结有癌转移组中的无癌转移淋巴结, 每例随机选取 1 枚未转移淋巴结, 共 20 枚 (定义为 C 组); 淋巴结无癌转移组中, 每例随机选取 1 枚淋巴结, 共 20 枚 (定义为 D 组)。

1.2 方 法

采用免疫组化 SP 法。CD163 作为 M2 型巨噬细胞的特异性标记, CD68 作为所有巨噬细胞的标记。视相邻两张切片为同一个切面, 一张切片行 CD68 检测, 另一张行 CD163 检测。所有试剂均为福州迈新生物技术开发有限公司产品。具体步骤: 所有蜡块 4 μ m 切片; 标本放入 50~60℃烤箱过夜; 常规二甲苯脱蜡, 水化, 流水冲洗并浸泡于水中; PBS 液冲洗 3 次; 抗原修复: ① pH 9.0 EDTA 加热抗原修复 (95℃, 15~20min), 自然冷却 20min 以上, 再用冷水

通讯作者: 蒋 鸥, 副院长, 主任医师, 硕士生导师, 博士; 内江市第二人民医院院办公楼, 四川省内江市东兴区新江路 244 号 (641100); E-mail: jiangou816@163.com

收稿日期: 2017-01-07; **修回日期:** 2017-03-13

冲洗缸子,加快冷却至室温,PBS 冲洗 3×5min;②胰酶修复:滴入胰酶试剂,恒温箱放置 15min;③恒温箱中,胃酶修复 30min;④将切片放入高压锅,柠檬酸法修复至喷气 2min;自来水冲淋锅盖,自然冷却至室温后取出切片;放入自来水,PBS 冲洗 3 次;灭活内源性过氧化物酶阻断剂 10min,PBS 冲洗 5min,共 3 次;滴加一抗,4℃ 冰箱孵育过夜或 37℃恒温箱 1h,PBS 冲洗 5min,共 3 次;滴加二抗,37℃孵育 30min,PBS 冲洗 5min,共 3 次。DAB 反应显色 3~5min,自来水充分冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水,透明,干燥,中性塑胶封固。

1.3 结果判定

CD68 阳性巨噬细胞的细胞质着棕色,颗粒状;CD163 阳性巨噬细胞的细胞膜着棕色。每张切片由 2 人双盲随机观察 5 个高倍视野(200×),分别计数这 5 个视野的阳性染色细胞,取平均值。CD163 阳性细胞数目即为 M2 型巨噬细胞数目。因 TAMs 目前主要分为 M1 型和 M2 型,故 M1 型巨噬细胞数目≈(相邻两张切片中)CD68 阳性细胞数目-CD163 阳性细胞数目。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果

CD68 阳性细胞:主要为细胞质着棕色,颗粒状;CD163 阳性细胞:细胞膜和细胞质着棕色。见 Figure 1。

2.2 TAMs 与淋巴结转移的关系

A、B 两组胃癌组织中 M1 型巨噬细胞计数相近,分别为 20.12 ± 2.90 和 20.09 ± 2.44 ,差异无统计学意义($P > 0.05$),见 Table 1。

A 组胃癌组织中 M2 型巨噬细胞计数明显高于 B 组,分别为 20.41 ± 2.36 和 14.68 ± 2.69 ,差异有统计学意义($P < 0.001$),见 Table 1。

C 组与 D 组淋巴结中,M2 型巨

噬细胞在 C 组中数目较多,与 D 组相比差异有统计学意义($P < 0.001$)。见 Table 2。

3 讨论

目前多数理论认为,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)中的 M1 型巨噬细胞具有抗肿瘤作用,而 M2 型巨噬细胞促进肿瘤浸润、转移。胃癌中研究有相似结果。有研究发现巨噬细胞与胃癌淋巴结转移情况呈正相关^[2]。局部有淋巴结转移的胃癌组织,TAMs 的计数高于无淋巴结转移者,推测 TAMs 可能促进胃癌的局部淋巴结转移^[3]。由于胃癌淋巴结转移情况影响预后,故 TAMs 的侵袭情况与预后具有一定相关性。Wang 等^[4]研究发现 CD68 阳性的巨噬细胞可作为胃癌根治术后预后的独立危险因素。部分研究发现,胃癌中 TAMs 高密度的较 TAMs 低密度的 DFS 及 OS 均缩短^[5],支持 TAMs 影响肿瘤预后。而 TAMs 高侵袭的胃癌预后不良,可能与转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$,TGF- $\beta 1$)信号通路有关^[5]。目前具体机制尚不明确。

本研究发现,胃癌组织中,A、B 两组 M1 型巨噬细胞的浸润情况无明显差异,提示 M1 型巨噬细胞

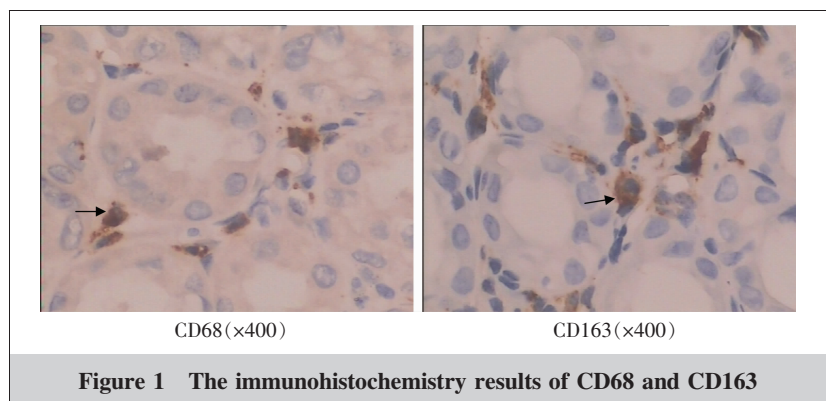


Table 1 Number of M1 and M2 macrophages between group A and B

Group	Specimens	Number of M1 macrophages	<i>t</i>	<i>P</i>	Number of M2 macrophages	<i>t</i>	<i>P</i>
A	30	20.12 ± 2.90	0.390	0.970	20.41 ± 2.36	5.831	<0.001
B	20	20.09 ± 2.44			14.68 ± 2.69		

Table 2 Number of M2 macrophages between group C and D

Group	Specimens	Number of M2 Macrophages	<i>t</i>	<i>P</i>
C	20	11.10 ± 1.04	6.958	<0.001
D	20	7.70 ± 1.93		

的浸润情况与淋巴结转移无明显关系。A 组中, M2 型巨噬细胞在癌组织中的计数明显较 B 组高, 差异有统计学意义, 提示 M2 型巨噬细胞在胃癌组织中的浸润与淋巴结转移具有相关性, 与上述研究结果一致。Zhang 等^[7]研究发现 TAMs 可通过促进淋巴管内皮细胞管样结构形成、增殖和迁移等方式而诱导淋巴管的生成。淋巴管的形成为胃癌淋巴结转移创造了不可或缺的条件。由于本实验采用了同时进行 CD68 及 CD163 免疫组化染色, 进一步揭示主要为 M2 型巨噬细胞作用。具体机制推测为与 TAMs 产生的一些金属蛋白酶有关。研究发现, TAMs 产生的金属蛋白酶-4(metalloproteinase-4, MMP-4)可能促进胃癌细胞扩散的进程^[8]。TAMs 通过表达 MMP-9 和 MMP-2 促进胃癌细胞的侵袭和转移^[9]。另有研究发现, TAMs 可通过 VEGF 和 VEGF-C 的表达促进胃癌的淋巴结转移^[10]。

既往研究发现, 有癌转移淋巴结中巨噬细胞数目高于无癌转移淋巴结, 提示 TAMs 参与胃癌的淋巴结转移^[11]。但淋巴结有癌转移的胃癌患者, 其无癌转移的那部分淋巴结与淋巴结完全无癌转移患者中那部分淋巴结比较, TAMs 数目及分布是否相似, 值得进一步研究。由于既往普遍认为 TAMs 中参与淋巴结转移的主要为 M2 型, 故在此研究中, 我们仅研究了 C、D 两组淋巴结中 M2 型巨噬细胞的情况。C、D 二组淋巴结中, M2 型巨噬细胞在 C 组中数目较多, 与 D 组相比, 差异有统计学意义。提示在已发生淋巴结转移的病例中, 无癌转移淋巴结的微环境已发生明显变化, 并且 M2 型巨噬细胞参与其中。推测在已发生淋巴结癌转移的患者中, 肿瘤细胞尚未转移到其它无癌淋巴结之前, 此时肿瘤细胞已经释放一些物质(如 IL-1, 前列腺素 E2 等^[12]), 刺激血液中的单核细胞, 游走到无癌转移淋巴结中, 分化为 M2 型巨噬细胞, 为下一步肿瘤转移创造条件; 或者, 推测 M2 巨噬细胞先于肿瘤细胞到达未转移淋巴结, 诱导肿瘤的淋巴结转移, 导致已有淋巴结癌转移的患者, 更易发生其它淋巴结癌转移。Go 等^[13]研究了 49 例胃癌患者, 发现与无微转移灶的淋巴结相比, 有微转移灶的淋巴结中 TAMs 密度增加; 淋巴结中 TAM 的密度与淋巴管的密度呈明显正相关; 胃周淋巴结有癌转移者, 其相邻的无癌转移淋巴结, 与胃周淋巴结无癌转移组淋巴结相比, TAMs 密度更高。并

推测淋巴结中聚集的 TAMs 可能诱导淋巴管生成, 并准备一个微环境以促进肿瘤细胞的转移。上述结果与本实验相似。

研究胃癌中巨噬细胞情况不仅可以了解巨噬细胞分布情况, 并可了解其与淋巴结转移的关系, 以及与预后的相关性, 并可为胃癌患者治疗提供新的视角。TAMs 可能成为胃癌治疗的另一种手段。Yamaguchi 等^[14]研究发现, M2 型 TAMs 促进胃癌患者腹膜播散, 并会导致肿瘤的扩散与进展, 推测腹腔内的 TAMs 可能成为有腹膜播散患者的潜在治疗靶点。Banciu 等^[15]研究发现, 载有泼尼松龙磷酸盐(LPs-PLP)的 PEG 脂质体对巨噬细胞有选择行毒性, 通过清除 TAMs 而减少 TAMs 介导的促血管生成因子, 如 GM-CSF、M-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-9 的产生抑制肿瘤血管生成。另外, Etzerodt 等^[16]发现, CD163 靶向的单克隆抗体介导的 PEG 阿霉素脂质体显著增加了脂质体在 CD163 转染的细胞和巨噬细胞中的吸收; 且对 CD163 表达的人单核细胞表现出较强的细胞毒作用。提示针对 TAMs 或者 CD163 表达的巨噬细胞的靶向治疗, 具有较大的研究价值, 可能会是肿瘤防治的一个新方向。

综上所述, TAMs 与胃癌的淋巴结转移有一定的关系, 并推测主要为 M2 型巨噬细胞的作用。但目前肿瘤侵袭与淋巴结转移具体机制尚不明确, 未来尚需进一步研究。由于本研究入组淋巴结数目偏少, 尚需大样本研究证实, 下一步可能需要在细胞趋化实验中进一步明确。

参考文献:

- [1] de Vries M, Briaire-de Bruijn I, Malessy MJ, et al. Tumor-associated macrophages are related to volumetric growth of vestibular schwannomas [J]. *Otol Neurotol*, 2013, 34(2): 347-352.
- [2] Ding HX, Zhao LM, Shan BE, et al. Expression and correlation of tumor-associated macrophages and CCL5 in gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2016, 32(1): 74-78. [丁海霞, 赵连梅, 单保恩, 等. 肿瘤相关巨噬细胞和 CCL5 在胃癌中的表达及其相关性研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(1): 74-78.]
- [3] Wang XF, Zheng HY, Pan YL, et al. Correlation of chemotactic factor MCP-1 and TAMs expression with angiogenesis in gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Clinical and*

- Experimental Pathology, 2010, 26 (3): 312–316. [王兴芬, 郑海燕, 潘彦路, 等. 胃癌组织中趋化因子 MCP-1 的表达与 TAMs 计数及肿瘤血管生成的相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(3): 312–316.]
- [4] Wang B, Xu D, Yu X, et al. Association of intra-tumoral infiltrating macrophages and regulatory T cell is an independent prognostic factor in gastric cancer after radical resection[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(9): 2585–2593.
- [5] Liu JY, Yang XJ, Geng XF, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages density in gastric cancer: a systemic review and meta-analysis[J]. Minerva Med, 2016, 107(5): 314–321.
- [6] Yan Y, Zhang J, Li JH, et al. High tumor-associated macrophages infiltration is associated with poor prognosis and may contribute to the phenomenon of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 3975–3983.
- [7] Zhang B, Wang J, Gao J, et al. Alternatively activated EAW264.7 macrophages enhance tumor lymphangiogenesis in mouse lung adenocarcinoma [J]. J Cell Biochem, 2009, 107(1): 134–143.
- [8] Gurgel DC, Valen a-Junior JT, Dornelas CA, et al. Immunoe-expression of metalloproteinases 2 and 14 and TIMP-2 inhibitor in main types of primary gastric carcinomas and lymph node metastasis[J]. Pathol Oncol Res, 2015, 21(1): 73–81.
- [9] He N, Jin Q, Wang D, et al. Effect of tumor-associated macrophages on invasion and metastasis of gastric cancer cells [J]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2016, 19 (7): 793–797.
- [10] Wu H, Xu JB, He YL, et al. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer[J]. J Surg Oncol, 2012, 106(4): 462–468.
- [11] Cai F, Zhao Y, Zhao WL. Relationship of tumor associated macrophages with angiogenesis and metastasis in gastric cancer [J]. China Cancer, 2006, 15 (7): 476–477. [蔡方, 赵勇, 赵文丽. 肿瘤相关巨噬细胞与胃癌血管生成及转移关系[J]. 中国肿瘤, 2006, 15(7): 476–477.]
- [12] Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophage in different tumor microenvironments [J]. Cancer Res, 2006, 66 (2): 605–612.
- [13] Go Y, Tanaka H, Tokumoto M, et al. Tumor-associated macrophages extend along lymphatic flow in the pre-metastatic lymph nodes of human gastric cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23 Suppl 2: S230–S235.
- [14] Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, et al. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination [J]. Gastric Cancer, 2016, 19(4): 1052–1065.
- [15] Banciu M, Metselaar JM, Schifflers RM, et al. Antitumor activity of liposomal prednisolone phosphate depends on the presence of functional tumor-associated macrophages in tumor tissue[J]. Neoplasia, 2008, 10(2): 108–117.
- [16] Etzerodt A, Maniechi MB, Graversen JH, et al. Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163[J]. J Control Release, 2012, 160(1): 72–80.

《肿瘤学杂志》关于“在线优先出版”的通告

为了加快学术论文传播速度,缩短出版周期,使作者研究成果的首发权及时得到确认,《肿瘤学杂志》自 2016 年实行“在线优先出版”,经同行评议通过采用的稿件,经编辑部加工处理后在中国知网(CNKI)实行电子版在线优先出版。具体如下:

(1)在线投稿接收之后,编辑部核实文稿的题目、作者、单位等版权作息,作者提供相关信息,供在线出版使用。此信息为文稿最终确认的出版信息,此后作者不再予以更改。

(2)在线出版的 PDF 全文是经作者最终校对的修改定稿。待编辑部完成整个校对流程后替换为正式出版稿,同时给出完整的发表年份、卷、期、起止页码和唯一的文献识别 DOI 号码。

(3)在线出版的文献是《肿瘤学杂志》印刷版本的在线优先网络版,完全满足国内外学术交流的在线检索和引用。

《肿瘤学杂志》编辑部