

结直肠腺癌中 CD163⁺巨噬细胞、CD8⁺T 细胞与微血管密度的相关性

蔡秋莉, 陈 芸, 蔡昕怡, 刘英竹, 江 凡, 张丽娟

(昆明医科大学第三附属医院, 云南 昆明 650100)

摘 要: [目的] 探讨结直肠腺癌中 CD163⁺巨噬细胞、CD8⁺T 细胞、微血管密度(MVD)的相关性及与患者临床病理因素的关系。[方法] 通过免疫组化 SP 法检测 61 例结直肠腺癌组织及远癌组织中 CD163⁺巨噬细胞、CD8⁺T 细胞、CD34 的表达水平, 分析 CD163⁺巨噬细胞、CD8⁺T 细胞、MVD 的相关性及与患者临床病理因素的关系。[结果] CD163、CD8、MVD 在癌组织及远癌组织中的表达差异具有统计学意义(P 均 <0.001)。CD163 与 MVD 的表达具有显著正相关性($r=0.615$, $P<0.001$), CD8 与 MVD 的表达具有负相关性($r=-0.320$, $P=0.012$), CD8 与 CD163 的表达具有显著负相关性($r=-0.370$, $P=0.003$)。CD163⁺巨噬细胞与结直肠腺癌分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期相关($P<0.05$), MVD 与结直肠腺癌肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期相关($P<0.05$), CD8⁺T 细胞与患者性别、年龄、肿瘤位置、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移均无关($P>0.05$)。[结论] 联合靶向消除 TAMs 及促进 CD8⁺T 细胞的活化与增殖可能对结直肠癌的抗血管生成治疗有一定意义。

关键词: 结直肠肿瘤; 肿瘤相关巨噬细胞; CD8⁺T 细胞; 血管生成

中图分类号: R735.3⁺4 文献标志码: A 文章编号: 1671-170X(2021)08-0622-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.08.B004

Relationship Among CD163⁺ Macrophage, CD8⁺ T Cell, Microvessel Density and Clinicopathological Features in Patients with Colorectal Adenocarcinoma

CAI Qiu-li, CHEN Yun, CAI Xin-yi, LIU Ying-zhu, JIANG Fan, ZHANG Li-juan
(The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650100, China)

Abstract: [Objective] To investigate the relationship among CD163⁺ macrophage, CD8⁺ T cell, microvessel density (MVD) and clinicopathological features in patients with colorectal adenocarcinoma. [Methods] The expression of CD163⁺ macrophage, CD8⁺ T cells, and CD34 in 61 colorectal adenocarcinoma cancer tissues and distant cancer tissues were detected by immunohistochemical SP method. The relationship among CD163⁺ macrophage, CD8⁺ T cells, MVD and clinicopathological features of patients were analyzed. [Results] The expressions of CD163, CD8 and MVD were significantly different between cancer tissues and distant cancer tissues (all $P<0.001$). CD163 was positively correlated with MVD ($r=0.615$, $P<0.001$), CD8 was negatively correlated with MVD ($r=-0.320$, $P=0.012$), and CD8 was significantly negatively correlated with the expression of CD163 ($r=-0.370$, $P=0.003$). CD163⁺ was correlated with the degree of differentiation, lymphatic metastasis, distant metastasis, and TNM stage of colorectal adenocarcinoma ($P<0.05$). MVD was correlated with the location, degree of differentiation, lymphatic metastasis, distant metastasis, and TNM stage ($P<0.05$). CD8⁺ T was not corrected with gender, age, tumor location, differentiation degree, TNM stage, lymphatic metastasis, and distant metastasis in ($P>0.05$). [Conclusion] The study indicates that combined targeted elimination of tumor associated macrophages and promotion of CD8⁺ T cell activation and proliferation may have an effect on anti-angiogenic therapy for colorectal cancer.

Subject words: colorectal cancer; tumor-associated macrophages; CD8⁺T cells; angiogenesis

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化

基金项目: 云南省科技厅昆明医科大学应用基础研究联合专项 (2017FE468-070)

通信作者: 张丽娟, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 硕士; 昆明医科大学第三附属医院病理科, 云南省昆明市西山区昆州路 519 号 (650100); E-mail: 13769171381@163.com

收稿日期: 2021-05-20; 修回日期: 2021-07-12

道恶性肿瘤, 2020 年全球癌症报告显示, CRC 已位居全球癌症发病率第 3 位和死亡率第 2 位^[1]。血液滋养能促进肿瘤生长, 血管生成在很大程度上影响着肿瘤的进展。以血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体(VEGFR)为靶点的抗血管生成

药物能使结直肠癌患者从中获益,但部分患者最终会出现耐药^[2]。所以,探索新的抗血管生成治疗途径仍然是目前研究的热点问题。

肿瘤间质中有大量巨噬细胞,巨噬细胞包括经典活化的 M1 型与替代性活化的 M2 型,M1 型巨噬细胞在针对入侵病原体的先天反应中起重要作用,M2 型巨噬细胞在组织修复和肿瘤进展中起重要作用。M2 型巨噬细胞即肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs),能促进肿瘤血管生成^[3]。CD163 是一种高特异性的 M2 型巨噬细胞标志物,近年来被广泛应用于 TAMs 的标记。CD8⁺T 淋巴细胞是 T 淋巴细胞的主要组成成分,它能够特异性识别并结合 MHC I 类分子复合物,通过释放穿孔素、颗粒酶导致肿瘤细胞裂解和死亡。活化的 CD8⁺T 细胞能产生大量干扰素- γ (IFN γ),不仅能抑制肿瘤相关成纤维细胞分泌 VEGF,还能直接作用于血管内皮细胞,驱动血管退化,诱导肿瘤缺血^[4]。肿瘤中的 TAMs 可表达程序性死亡配体 1(PD-L1),与 CD8⁺T 细胞表面 PD-1 结合,通过招募 SHP-2 蛋白,抑制 PI3K-AKT 通路的表达,进而限制 CD8⁺T 细胞的活性与增殖^[5];TAMs 还可表达 B7-H4^[6],B7-H4 蛋白属于 B7 家族成员,是 T 细胞免疫应答中主要的负性免疫调控抑制因子,可与活化的 CD8⁺T 细胞表面受体结合,致使 IL-2 生成减少,而 IL-2 即 T 细胞生长因子,从而导致 CD8⁺T 细胞的增殖减少^[7]。本研究通过免疫组化 SP 法检测 CD163、CD8、CD34 在结直肠腺癌中的表达,探讨 CD163⁺巨噬细胞、CD8⁺T 细胞、MVD 表达的相关性及与患者临床病理因素的关系,探索潜在的针对肿瘤微环境的抗血管生成治疗的可能性,旨在为探索结直肠癌患者新的抗肿瘤治疗方法提供线索。

1 资料与方法

1.1 研究对象

回顾性收集云南省肿瘤医院 2016 年 8 月至 2019 年 9 月期间原发性结直肠腺癌根治性标本 61 例,以癌组织作为实验组,相应的远癌组织(距离癌组织 5 cm 以上的肠组织)作为对照组。其中男性 33 例(54.1%),女性 28 例(45.9%);年龄<60 岁 29 例(47.5%),≥60 岁 32 例(52.5%);左半结肠肿瘤 40 例(65.6%),右半结肠肿瘤 21 例(34.4%);高分化 23 例

(37.7%),中、低分化 38 例(62.3%);TNM 分期 I~II 期 29 例(47.5%),III~IV 期 32 例(52.5%);无淋巴结转移 34 例(55.7%),有淋巴结转移 27 例(44.3%);无远处转移 50 例(82.0%),有远处转移 11 例(18.0%)。入组标准:①原发性结直肠癌根治术标本;②病理分型为结直肠腺癌;③术前无放化疗史;④无合并其他肿瘤;⑤有完整的临床病理资料。

1.2 主要试剂

CD163、CD8、CD34 鼠抗人单克隆抗体,S-P 试剂盒,DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组化

按照 S-P 试剂盒说明书步骤:切片常规脱蜡,3% H₂O₂ 灭活内源性酶,热修复抗原,兔血清阻断非特异性染色,依次滴加一抗(1:50 稀释)、生物素标记的二抗和酶标链霉亲和素,温箱孵育(37℃,30 min),DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。将已知阳性组织切片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判读

巨噬细胞/淋巴细胞胞膜或胞浆出现黄褐色至棕黄色颗粒状为 CD163/CD8 阳性表达;内皮细胞胞膜或胞浆出现棕黄染色,呈裂隙状、单个或簇状为 CD34 阳性表达,其中含有 8 个以上红细胞的血管及肌层较厚的大血管不做阳性计数。显微镜低倍($\times 100$)镜下观察选取 3 个阳性表达热点区,然后高倍($\times 400$)镜下随机选取 5 个阳性表达热点区计数,取 5 个视野总和的平均值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用配对样本 *t* 检验分析 CD163、CD8、MVD 在结直肠癌组织、远癌组织中的表达。采用两独立样本 *t* 检验分析 CD163、CD8、MVD 与各临床病理因素的关系。采用 Spearman 相关性分析检测 CD163、CD8、MVD 之间的相关性。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CD163、CD8、MVD 的表达

镜下见组织间质中巨噬细胞胞膜或胞浆内含清晰的黄褐色至棕黄色颗粒状者为 CD163 阳性表达

(Figure 1), 淋巴细胞胞膜上有黄褐色至棕黄色染色者为 CD8 阳性表达 (Figure 2), 内皮细胞胞膜或胞浆为黄褐色至棕黄色染色者为 CD34 阳性表达, 管腔呈裂隙状、单个或簇状 (Figure 3)。CD163、CD8、MVD 在结直肠癌组织及远癌组织中的表达有显著性差异 ($P < 0.01$) (Table 1)。

2.2 CD163、CD8、MVD 间相关性分析

Spearman 相关性分析结果显示, CD163 与 MVD 之间具有显著正相关性 ($r = 0.615, P < 0.001$); CD8 与 MVD 之间具有负相关性 ($r = -0.320, P = 0.012$); CD8 与 CD163 之间具有显著负相关性 ($r = -0.370, P = 0.003$) (Figure 4~6)。

2.3 CD163、CD8、MVD 在结直肠癌腺癌中的表达与患者临床病理因素的关系

CD163 与结直肠癌腺癌分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期相关 ($P < 0.05$); 与患者性别、年龄、肿瘤位置无关 ($P > 0.05$)。MVD 与结直肠癌腺癌肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期相关 ($P < 0.05$); 与患者性别、年龄无关 ($P > 0.05$)。CD8 与结直肠癌腺癌患者性别、年龄、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期均无关 ($P > 0.05$) (Table 2)。

3 讨论

肿瘤间质中的血管滋养是肿瘤进展的必备条件, 而结直肠癌含有丰富的血管, 其间质内血管生成是结直肠癌进展的重要因素^[8]。由于右半结肠癌组织具有高水平的 VEGF 表达, 所以右侧结肠肿瘤具有较高的血管生成能力^[9]。本研究中, MVD 在结直肠癌腺癌组织间质中高密度表达, 且与结直肠癌腺癌肿瘤位置、分化

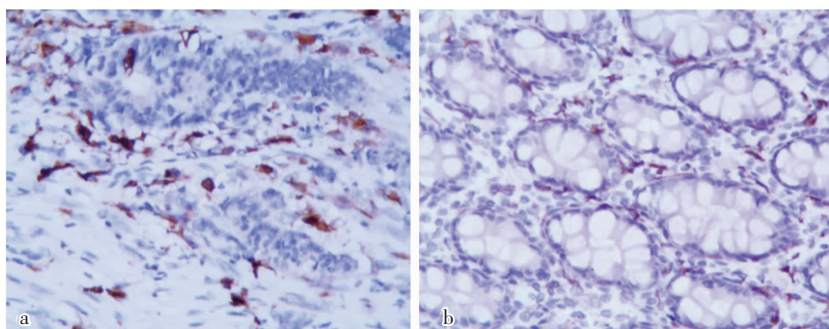


Figure 1 Expression of CD163 in cancer tissue(a) and distant cancer tissue(b)($\times 200$)

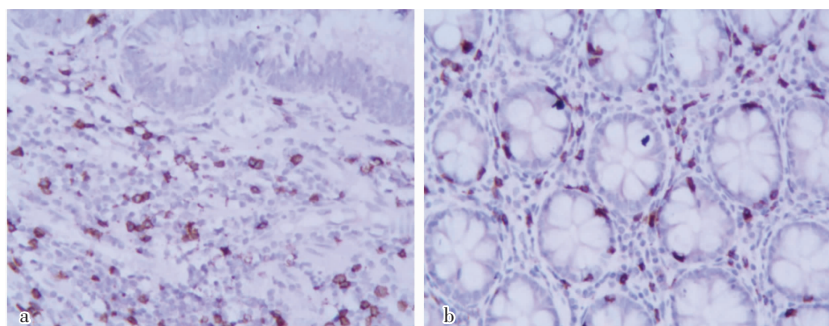


Figure 2 Expression of CD8 in cancer tissue(a) and distant cancer tissue(b)($\times 200$)

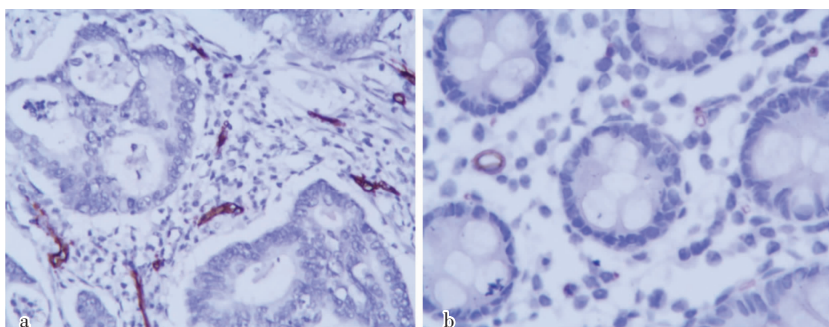


Figure 3 Expression of CD34 in cancer tissue(a) and distant cancer tissue(b)($\times 200$)

Table 1 Expression of CD163, CD8 and MVD in colorectal adenocarcinoma and distal carcinoma tissues ($\bar{x} \pm s$)

Group	Express value	<i>t</i>	<i>P</i>
CD163			
Cancer tissues	184.2492±30.5174	30.471	<0.001
Distal cancer tissues	80.0273 ±11.7799		
CD8			
Cancer tissues	296.2918± 80.0286	17.940	<0.001
Distal cancer tissues	116.5148±33.2271		
MVD			
Cancer tissues	85.5596±16.2983	23.545	<0.001
Distal cancer tissues	29.6934± 4.6725		

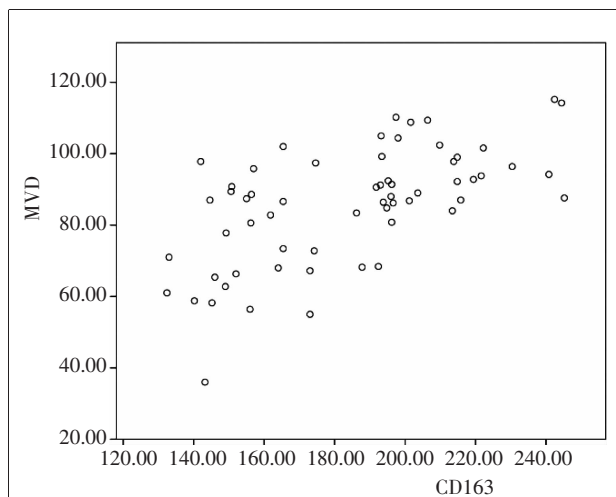


Figure 4 Distribution point diagram of CD163 and MVD expression values in cancer tissue

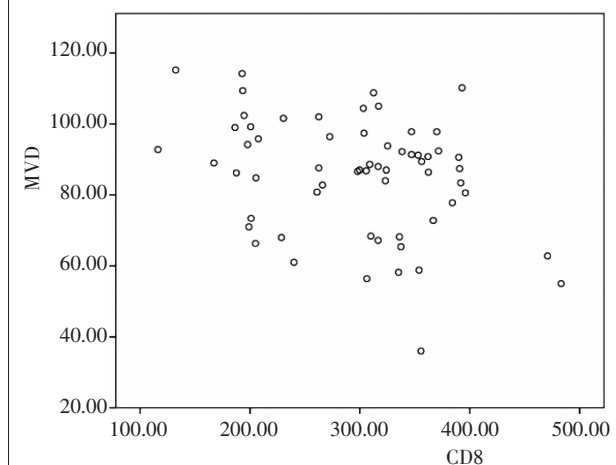


Figure 5 Distribution point diagram of CD8 and MVD expression values in cancer tissue

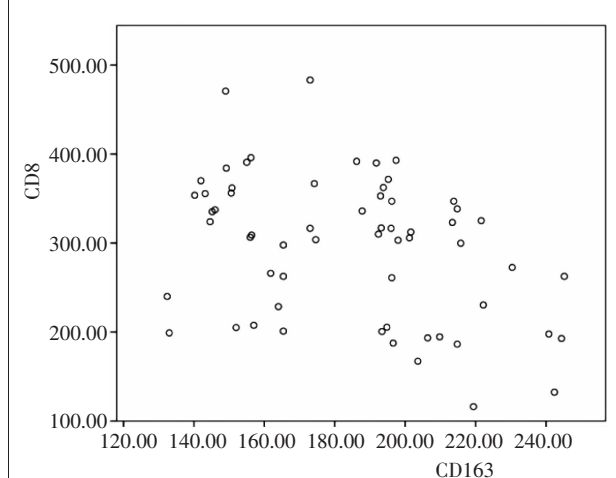


Figure 6 Distribution point diagram of CD163 and CD8 expression values in cancer tissue

程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期相关,结果与以上的研究结论相符合。

肿瘤间质中有大量 TAMs 浸润,既能促进肿瘤新生血管形成,同时又促进肿瘤增殖、侵袭、转移^[3]。本实验中,CD163 在结直肠腺癌组织间质中密集表达,在远癌组织间质中零星散在表达,且 CD163 与 MVD 之间具有显著正相关性,提示 CD163⁺巨噬细胞在结直肠腺癌中高表达,且利于肿瘤血管生成,这与 Badawi 等^[10]的研究结果一致。CD163 与结直肠腺癌的分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期相关,证实了 CD163⁺巨噬细胞在结直肠腺癌中与肿瘤的侵袭和转移密切相关。

活化的 CD8⁺T 细胞能驱动血管退化,诱导肿瘤缺血^[4]。乳腺癌中,CD8⁺T 细胞与 MVD 表达呈正相关^[11]。胆管癌中,肿瘤部位 CD31 与 CD8 表达呈负相关^[12]。神经胶质瘤中,CD8⁺T 细胞与肿瘤血管生成无关^[13]。在结直肠癌的一项研究中,肿瘤中 CD8⁺T 细胞浸润程度与血管密度、淋巴结受累、远处转移呈负相关,说明 CD8⁺T 细胞在肿瘤血管生成和肿瘤进展中起重要作用^[14]。可见,CD8⁺T 细胞在不同肿瘤中与肿瘤血管生成的关系不尽相同。本实验中,CD8 在结直肠腺癌组织中密集表达,在远癌组织中零星散在表达,且 CD8 与 MVD 间具有负相关性,提示 CD8⁺T 细胞在结直肠癌中高表达,可能在抑制血管生成方面起到一定作用,这点与已有的相关研究结果一致。但对临床病理因素的分析中,CD8⁺T 表达与性别、年龄、肿瘤位置、分化程度、淋巴结转移、远处转移、TNM 分期均无关。而傅超等^[15]的研究中,结直肠癌组织中 CD8⁺T 淋巴细胞水平与肿瘤分期、浸润深度、淋巴结转移密切相关。传统观念认为 CD8⁺T 细胞是杀伤肿瘤细胞的主要效应细胞,然而本研究中,肿瘤中存在大量 CD8⁺T 细胞浸润,但却并未显示出其抗肿瘤效应;右半结肠相对左半结肠具有更多的免疫淋巴细胞浸润,具有较高的细胞毒性^[9],然而本研究结果也未显示出这一差异。针对这一结果的不同,我们结合近年来的相关研究^[16]分析原因,结直肠癌中可能浸润着一群失去了细胞毒性功能的异质性 CD8⁺T 细胞,而结直肠癌中异常表达的 B7 家族负性分子很可能是产生这群失能 T 细胞的主要诱因。

肿瘤中 TAMs 可表达 PD-L1,与 CD8⁺T 细胞表面 PD-1 结合,限制 CD8⁺T 细胞的活性与增殖^[5]。另

Table 2 Relationship of CD163, CD8 and MVD expression with clinicopathologic factors in colorectal adenocarcinoma ($\bar{x} \pm s$)

Clinicopathological factors	n	CD163			CD8			MVD		
		Expression	t	P	Expression	t	P	Expression	t	P
Gender										
Male	33	184.30±28.56	0.130	0.990	290.27±73.90	-0.626	0.534	88.08±14.16	1.293	0.202
Female	28	184.19±33.21			303.39±87.54			82.59±18.33		
Age (years)										
<60	29	183.82±29.08	-0.104	0.917	297.59±85.11	0.119	0.906	84.40±18.68	-0.513	0.610
≥60	32	184.64±32.22			295.12±75.16			86.60±14.03		
Position										
Left	40	185.67±29.97	0.504	0.617	301.65±82.90	0.741	0.463	82.18±16.76	-2.477	0.017
Right	21	181.34±32.21			286.10±75.16			92.00±13.52		
Degree of differentiation										
High	23	162.50±22.32	-5.178	<0.001	319.68±69.23	1.895	0.063	76.77±16.87	-3.402	0.002
Medium-low	38	197.41±27.24			197.41±27.24			90.88±13.57		
Lymphatic metastasis										
No	34	167.98±28.80	-6.121	<0.001	297.38±85.59	0.120	0.905	79.49±16.90	-3.714	<0.001
Yes	27	204.73±17.73			294.93±74.02			92.50±11.50		
Distant metastases										
No	50	180.31±31.68	-3.384	0.020	303.08±76.89	1.282	0.222	83.61±16.70	-2.633	0.015
Yes	11	202.16±15.40			265.44±90.46			94.40±11.10		
TNM staging										
I ~ II	29	162.51±27.37	-7.037	<0.001	309.41±80.74	1.222	0.227	76.94±16.79	-4.439	<0.001
III ~ IV	32	92.30±11.30			284.41±78.75			93.37±11.27		

外, TAMs 还表达 B7-H4 蛋白, 与 CD8⁺T 细胞表面受体结合, 抑制 CD8⁺T 细胞增殖^[6-7]。在宫颈癌的研究中证实, 肿瘤间质中 TAMs 可表达 B7-H4, 促进 CD8⁺T 细胞凋亡^[17]。在黑色素瘤中, 特定地消耗 CD163⁺巨噬细胞, 肿瘤间质中活化的 CD8⁺T 细胞则大量浸润, 肿瘤也明显消退^[18]。可见, TAMs 在免疫抑制方面起到了重要作用, 间接促进了肿瘤的发展。本实验结果显示, CD163 与 CD8 之间具有显著负相关性, CD8⁺T 细胞浸润数量随着 CD163⁺巨噬细胞浸润数量的增加而减少, 提示在结直肠腺癌中, TAMs 可能对 CD8⁺T 细胞具有拮抗作用。但在结直肠癌中 TAMs 是否通过 PD-1/PD-L1 作用机制抑制了 CD8⁺T 细胞的活化与增殖, 是否通过表达 B7-H4, 促进了 CD8⁺T 细胞凋亡, 或者还存在其他作用机制, 有待进一步探索。

综上所述, CD163⁺巨噬细胞与肿瘤微血管密度之间具有显著正相关性, CD8⁺T 细胞与肿瘤微血管密度之间具有负相关性, 而 CD163⁺巨噬细胞与 CD8⁺T 细胞之间又具有显著负相关性, TAMs 可能对 CD8⁺T 细胞具有拮抗作用。因此我们推测, 联合靶向消除 TAMs 及促进 CD8⁺T 细胞的活化与增殖可能对

结直肠癌的抗血管生成治疗产生一定意义。

参考文献:

- [1] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, et al. 2020 global cancer statistics report interpretation [J]. Journal of Multidisciplinary Cancer Management, 2021, 7(2): 1-14.
- [2] Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions [J]. Angiogenesis, 2014, 17(3): 471-494.
- [3] Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? [J]. Pathol Int, 2016, 66(9): 491-505.
- [4] Kammertoens T, Friese C, Arina A, et al. Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression [J]. Nature, 2017, 545(7652): 98-102.
- [5] Cassetta L, Kitamura T. Targeting tumor-associated macrophages as a potential strategy to enhance the response to immune checkpoint inhibitors [J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6(6): 38.
- [6] Kryczek I, Wei S, Zou L H, et al. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode

- for regulatory T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 177(1):40–44.
- [7] Ou DW, Wang XJ, Metzger DL, et al. Suppression of human T-cell responses to beta-cells by activation of B7-H4 pathway[J]. *Cell Transplant*, 2006, 15(5):399–410.
- [8] Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer [J]. *Signal Transduct Ear*, 2020, 5(1):22.
- [9] Zhang LH, Zhao YT, Dai Y, et al. Immune landscape of colorectal cancer tumor microenvironment from different primary tumor location[J]. *Front Immunol*, 2018, 9(9):1578.
- [10] Badawi MA, Abouelfadl DM, El-Sharkawy SL, et al. Tumor-associated macrophage (TAM) and angiogenesis in human colon carcinoma [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2015, 3(2):209–214.
- [11] 拉宗, 王建霞, 崔倪, 等. 乳腺浸润性导管癌微环境中 CD4 和 CD8 阳性 T 细胞表达与血管新生的关联性分析 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2014, 40(5):1069–1073.
La Z, Wang JX, Cui N, et al. Correlation analysis of expression of CD4 and CD8 positive T cells and angiogenesis in microenvironment of infiltrating ductal carcinoma of breast [J]. *Journal of Jilin University (Medical Edition)*, 2014, 40 (5):1069–1073.
- [12] Roberto T, Tiziana A, Simona R, et al. Inflammatory cells infiltrate and angiogenesis in locally advanced and metastatic cholangiocarcinoma[J]. *Eur J Clin Invest*, 2019, 49(5):13087.
- [13] Mu LY, Yang CG, Gao Q, et al. CD4⁺ and perivascular Foxp3⁺ T cells in glioma correlate with angiogenesis and tumor progression[J]. *Front Immunol*, 2017, 8(8):1451.
- [14] Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, et al. The prognostic significance of the tumor-infiltrating programmed cell death-1⁺ to CD8⁺ lymphocyte ratio in patients with colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8):4165–4172.
- [15] 傅超, 梅婷婷, 汪鸿涛, 等. 人结直肠癌组织 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞与患者预后的关系 [J]. *温州医科大学学报*, 2020, 50(1):30–35.
Fu C, Mei TT, Wang HT, et al. The relationship between CD4⁺、CD8⁺T lymphocytes and prognosis of patients in human colorectal cancer tissues [J]. *Journal of Wenzhou Medical University*, 2020, 50 (1):30–35.
- [16] Chen Y, Mo J, Jia X, et al. The B7 family member B7–H6: a new bane of tumor [J]. *Pathol Oncol Res*, 2018, 24 (4):717–721.
- [17] 沈依帆. 人子宫颈癌 M2 型巨噬细胞浸润与 T 细胞亚型的相关性及其调节作用[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
Shen YF. Correlation between M2 type macrophage infiltration and T cell subtype and its regulatory effect in son of man cervical cancer[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2016.
- [18] Etzerodt A, Tsalkitzi K, Maniecki M, et al. Specific targeting of CD163⁺ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(10):2394–2411.