

文章编号:1005-6947(2005)10-0740-04

· 实验研究 ·

胃癌浸润性树突状细胞 CD83 和 S100 的表达及其临床意义

雷晓, 余佩武, 石彦, 唐波, 饶芸, 吴森, 周立新

(第三军医大学附属西南医院 普通外科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨肿瘤组织浸润树突状细胞(tumor infiltrating dendritic cells, TIDCs)在胃癌组织的表达及临床意义。方法 采用免疫组化、原位杂交及流式细胞术分别检测45例胃癌组织的TIDCs的S100, CD83及CD83 mRNA表达,并分析它们与临床病理特点的关系。结果 免疫组化显示胃癌组织(42/45)中有S100⁺DCs不均一表达,CD83表达于癌旁及正常黏膜。原位杂交显示CD83 mRNA有少量(7/45)表达。流式细胞术可检测到较低水平CD83表达(4%)。S100和CD83 mRNA表达数量与患者年龄、性别、肿瘤部位、浸润深度、病理分期及淋巴结转移情况无显著相关性。免疫组化检测CD83表达与TNM呈负相关($r = -0.924, P < 0.01$);流式细胞术检测CD83与TNM分期及淋巴结转移呈负相关($r = -0.879, P < 0.01$; $r = -0.782, P < 0.05$)。结论 胃癌TIDCs以未成熟状态为主,S100表达提示其数量,CD83表达提示其功能,且与胃癌TNM分期及淋巴结转移有关,是更好的临床观测指标。

关键词:胃肿瘤/病理学;肿瘤浸润力;CD83;S100

中图分类号:R735.7;R73-37

文献标识码:A

Expressions and clinical significance of CD83 and S100 on gastric cancer infiltrating dendritic cells

LEI Xiao, YU Pei-wu, SHI Yan, TANG bo, RAO Yun, WU Miao, ZHOU Li-xin

(Department of General Surgery, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and clinical significance of tumor infiltrating dendritic cells (TIDCs) within gastric tumor tissues. **Methods** Immunohistochemistry (IHC), in-situ hybridization (ISH) and flow cytometry were applied to detect the expression of S100, CD83 mRNA and CD83 on DCs in 45 gastric adenocarcinoma tissues. The co-relationship of the S100 and CD83 expression with clinical pathological features was analyzed. **Results** IHC showed that S100 expression was unevenly distributed within 42 cancer tissue and CD83 was only expressed in tumor-adjacent tissue and normal tissue. ISH showed that CD83 mRNA was limitedly expressed within 7 samples. S100 expression had no significant correlation with clinical pathological features, while CD83 reversely correlated with TNM stages. Detected by flow cytometry, CD83 was expressed in low level in all 45 gastric cancer tissues and negative correlations were found with lymph node metastasis and TNM stages of gastric cancer ($r = -0.879, P < 0.01$; $r = -0.782, P < 0.05$). **Conclusions** TIDCs in gastric cancer tissue mainly appear in an immature state. The expression of S100 suggests the amount of TIDCs, while CD83 suggests their function. CD83 expression correlated with lymph node metastasis and TNM stages of gastric cancer, and could be used as a marker in further research.

Key words: Stomach Neoplasms/pathol; Neoplasms Invasiveness; CD83; S100

CLC number: R735.7; R73-37

Document code: A

收稿日期:2004-11-08; 修订日期:2005-05-16。

作者简介:雷晓(1970-),男,重庆人,第三军医大学西南医院主治医师,主要从事胃肠道肿瘤外科治疗方面的研究。

通讯作者:雷晓 电话:023-65416909, 13883796628(手机); E-mail:lei_xiaoxiao@yahoo.com.cn。

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是功能强大的抗原递呈细胞,对激发抗肿瘤免疫有重要作用。检测其在肿瘤组织内的表达数量,对分析患者免疫状况有提示意义。既往研究中常使用 S100 免疫组织化学染色方法进行检测,结果提示肿瘤组织内浸润性树突状细胞(tumor infiltrating dendritic cells, TIDCs)与患者预后有关。目前认为,DCs 表面分子众多,包括 S100 等在肿瘤局部神经组织 DCs 中有表达。CD83 是成熟 DCs 的一种相对特异性表面分子,对 DCs 功能有提示意义,但目前对 CD83 作为 TIDCs 检测指标的报道较少。为了解其在胃癌中的表达,笔者分别检测 S100 和 CD83 在胃癌组织中的表达,分析其临床意义,以期 TIDCs 在胃癌中的检测选择合适指标提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌标本来源于 2003 年 4 月~2004 年 4 月本院住院手术的 45 例患者,术前均未接受化疗和放疗。其中男 37 例,女 8 例;平均年龄(54 ± 10.2)岁。患者临床病理情况见附表。术中切下胃肿瘤后立即取材,避开坏死组织,每例 2 份,分别用于常规石蜡包埋及酶消化处理。

附表 胃癌临床病理情况

病理特点	例数(%)
肿瘤部位	
胃窦	21(47)
胃体	15(33)
胃底	9(20)
分化程度	
高分化	4(9)
中分化	19(42)
低分化 [†]	22(49)
浸润深度	
黏膜及黏膜下	3(7)
肌层	16(37)
浆膜层	26(56)
淋巴转移	
有	39(87)
无	6(13)
TNM 分期	
I	2(4)
II	7(16)
III	15(33)
VI	21(47)

注:† 包含低分化腺癌及黏液腺癌

1.2 免疫组化及原位杂交

标本固定液及梯度酒精均用 DEPC(Sigma)处理水配置,常规制备石蜡标本,4 μ m 连续切片,HE 染色确定病理类型。胃癌组织 S100 及 CD83 表达以免疫组化方法检测,采用兔抗人 S100,兔抗人 CD83, Histostain-Plus 试剂盒(SP9001,北京中山),操作按说明书进行。切片以柠檬酸缓冲液 92~96 $^{\circ}$ C 修复抗原,PBS 代替一抗作为阴性对照,DAB 显色,苏木素复染。胃癌组织 CD83 mRNA 表达以 CD83 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德)检测,按说明进行操作,DAB 显色。切片梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜观察拍照。阴性对照无显色;阳性染色为细胞呈现高于背景的棕黄色,着色位于胞膜和/或胞浆。高倍镜下随机计数 10 个视野中阳性细胞数量,取平均值用于统计分析。

1.3 流式细胞检测

分离肿瘤组织内单个核细胞并检测其中 CD83 表达。切取肿瘤组织 10g,洗必泰冲洗 3 次,浸泡于含 1 000 U/mL 青霉素、1 000 μ g/mL 链霉素、5 μ g/mL 甲硝唑的 DMEM 培养基(Gibco)中,30 min 后 PBS 冲洗。剪碎后加入含 0.1% VI 型胶原酶(Sigma)的 DMEM 10 mL 中,37 $^{\circ}$ C 恒温水浴振荡过夜,200 目钢网过滤,离心弃上清,沉淀细胞以 PBS 洗涤 1 次并重悬,缓慢加于密度为 1.077 的淋巴细胞分离液(天津生物技术)上,室温下 2 500 r/min \times 30 min 离心;吸取界面层细胞,10 倍体积 PBS 稀释后 1 200 r/min \times 10 min 洗涤 2 次。沉淀细胞 PBS 重悬并计数。取 2×10^6 细胞,加入流式细胞检测管,离心弃上清,分别加入抗 CD83-FITC 及 IgG1-FITC 同型对照抗体(Immnotech),混匀后室温避光孵育 15 min,1 mL PBS 稀释上机。流式细胞仪(Beckman Coulter, XL 型)以荧光微球调校,对照抗体标记细胞调节非特异性表达率 $< 0.5\%$ 后检测 CD83 表达,每样本检测 $> 5 000$ 个细胞。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计程序处理,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异非常显著。

2 结果

2.1 胃癌组织 S100, CD83 及 CD83 mRNA 表达

45 例胃癌组织中, 42 例检测到 S100 阳性表达。各标本间表达强度及阳性细胞分布不均匀, 或在肿瘤细胞间(图 1a)、或集中于瘤细胞团边缘组织中(图 1b)。3 例黏液腺癌组织中未检测到 S100 表达。S100 阳性细胞较大, 形态多样不规则, 大小不等, 染色强弱不一, 部分细胞可见较长的细胞突

a b

图 1 胃癌组织 S100 表达(DAB × 400)

2.2 胃癌组织 S100, CD83 及 CD83 mRNA 表达与临床的关系

免疫组化结果显示, 在不同患者年龄、性别、肿瘤部位、病理类型、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期的患者, 其胃癌组织内 S100 和 CD83 mRNA 表达差异无显著性 ($P > 0.05$); CD83 在不同患者年龄、性别、肿瘤部位、病理类型、分化程度、及淋巴结转移间表达差异无显著性 ($P > 0.05$), 在 III 期和 IV 期胃癌组织中表达均显著低于 I 期 + II 期胃癌组织 ($t = -2.51, P < 0.05$)。其表达与 TNM 呈非常显著负相关 ($r = -0.924, P < 0.01$)。

流式细胞检测结果分析显示, 胃癌组织内 CD83 表达率在不同年龄、性别、肿瘤部位、病理类型、分化程度患者间无差异。在淋巴结转移阳性的胃癌中, CD83 表达为 $(3.7 \pm 1.8)\%$, 淋巴结转移阴性的 CD83 表达为 $(7.8 \pm 1.5)\%$, 两者间差异有显著性 ($t = -3.17, P < 0.05$)。相关分析显示 CD83 表达与淋巴结转移情况呈负相关 ($r = -0.782, P < 0.05$)。在不同胃癌组织 TNM 分期间, I 期 + II

起。CD83 在肿瘤组织内无表达; 远离肿瘤的正常黏膜组织内均有 CD83 阳性细胞表达 ($n = 45$) (图 2), 胞体较大, 圆形, 无明显细胞突起; 7 例有 CD83 mRNA 表达, 位于远离肿瘤的黏膜下组织近肌层中, 阳性细胞分布集中, 胞体较小, 圆形或不规则形, 无明显细胞突起(图 3)。

45 例胃癌组织经流式细胞仪均检测到 CD83 表达, 范围在 $0.7\% \sim 9.61\%$, 平均表达率为 $(4.2 \pm 2.3)\%$ 。

图 2 远癌正常黏膜

CD83 表达(DAB
× 200)

图 3 黏膜下近肌层

CD83 mRNA 表
达(DAB × 400)

期与 III 期和 IV 期间 CD83 表达均存在差异 ($t = -3.28, P < 0.05$; $t = -3.35, P < 0.05$)。相关分析表明, CD83 表达与胃癌 TNM 分期间存在非常显著负相关性 ($r = -0.879, P < 0.01$)。

3 讨论

DCs 在激发机体抗肿瘤免疫中有重要作用。以 DCs 为基础的肿瘤生物治疗研究显示, DCs 疫苗对体外肿瘤细胞^[1]、肿瘤动物模型^[2]及临床肿瘤患者^[3]都显现出较好的抗肿瘤效果, 提示 DCs 在临床抗肿瘤研究中有较好的应用前景, 近年来在临床肿瘤研究中深受重视。研究表明, 肿瘤组织内 TIDCs 的数量与功能对机体免疫有重要提示意义, 与肿瘤患者预后有一定关系。因此, 临床采用一定手段检测肿瘤组织中 TIDCs 的表达情况, 对了解患者机体免疫状况及判断预后有一定意义。

检测 S100 表达情况是既往 DCs 研究中常用的指标之一。有报道^[4-6]消化道肿瘤组织内 S100 阳性细胞数量与患者临床病理特点及预后存在显著相关性。由于 S100 蛋白是含众多成员的小分子钙

结合蛋白家族,在神经组织和单核细胞上有表达,可以作为局部组织中 DCs 的标志应用。但对肿瘤组织进行 S100 染色很难区分其表达是在 DCs 还是在神经组织。即使 S100 标记到 DCs 上,其表达数量也只能反映肿瘤组织内浸润 DCs 数量,对其功能无提示作用。因此,近期有报道 S100⁺ DCs 数量与肿瘤患者预后无关^[7]。本研究中对胃癌 S100 表达检测结果显示与患者临床病理情况间相关性不显著,提示 S100 不是胃癌 TIDCs 检测较好的指标。

肿瘤情况下的 DCs 与正常情况下有很大差别。研究表明,肿瘤可能对 DCs 免疫有抑制作用,包括抑制 DCs 成熟,降低其迁移能力,抑制其抗原递呈功能等。相对正常组织来说,肿瘤具备的 DCs 数量不是减少,而是 DCs 的成熟度降低。因此在肿瘤组织局部存在未成熟 DCs 堆积现象^[8]。故局部 DCs 数量不能反映其免疫功能状况,有必要使用能反映 DCs 功能的特异性表面分子作为 TIDCs 的检测指标。DCs 表面有大量与功能相关的表面分子,包括 MHC 分子、黏附分子、各种受体、协刺激分子 (co-stimuli molecular, CD80/CD86) 等。其中 CD83 表达相对独特,一方面 CD83 表达是在 DC 成熟时上调,可作为 DC 成熟标志,而成熟 DCs 是其免疫激发功能发挥的基本条件。另一方面,在对乳腺癌的研究中,DCs 上 CD83 表达相对于常规 S100, CD1a 指标等,对肿瘤患者预后更有显著性说明意义^[9]。因此 CD83 作为胃癌 TIDCs 的指标更有意义。本研究检测发现,胃癌组织中 CD83 表达与淋巴结转移和 TNM 分期相关性显著,淋巴结转移阳性及 TNM 分期的肿瘤组织 CD83 表达低,提示 CD83 对胃癌免疫状态有说明意义,可以作为 TIDCs 的检测指标使用。

研究中还发现,原位杂交显示 CD83 mRNA 表达少,主要位于黏膜下近肌层组织中,细胞分布也较集中。免疫组化检测 CD83 则主要表达于正常黏膜下。说明 CD83 主要表达于癌旁。流式细胞仪检测胃癌组织 CD83 有低水平表达,是因为流式细胞仪方法检测需消化肿瘤组织,而研究发现,成熟与未成熟 DCs 存在分布差异^[10],肿瘤组织内是未成熟 DCs,肿瘤组织旁才有成熟 DCs。因此,流式细胞仪检查到的实际是癌旁组织中 DCs 的 CD83 表达。这些结果也提示,CD83 在胃癌组织中表达减少,结合 S100 表达情况,说明胃癌内的 DCs 是以未成熟为

主,与文献报道肝癌结节内 CD83 表达缺失相符合^[11]。

以上结果说明,胃癌组织 TIDCs 成熟度较低,反映其数量的 S100 指标不足以说明其临床意义,而反映其功能的 CD83 指标与临床病理间有一定关系,可以作为检测 TIDCs 指标使用,以进一步研究 DCs 与胃癌患者预后等情况的关系。

参考文献:

- [1] 唐朝晖,邹声泉,邱文洪,等,癌细胞裂解物修饰的 DC 疫苗体外诱导 T 细胞特异性抗胰癌免疫[J]. 中国普通外科杂志,2003,12(4):283-286.
- [2] 雷晓,石彦,余佩武,等,树突状细胞诱导抗胃癌免疫效应的实验研究[J]. 中国普通外科杂志,2002,11(4):230-232.
- [3] Homma S, Matai K, Irie M, *et al.* Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient with advanced gastric carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2003, 38(10):989-994.
- [4] 王正昕,张明徽,李楠,等,胃癌组织中树突状细胞浸润及其表面分子表达的临床意义[J]. 第二军医大学学报,2002,23(2):264-266.
- [5] 刘思纯,袁世珍,陈国桢,等,大肠癌组织树突状细胞与病理特征及预后的关系[J]. 中山医科大学学报,1996,17(4):260-263.
- [6] 龚选举,阎玉虎,吴建平,等,肺癌组织中肿瘤浸润树突状细胞对预后的影响[J]. 中华肿瘤杂志,2000,22(2):135-137.
- [7] Lespagnard L, Gancberg D, Rouas G, *et al.* Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome [J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(3):309-314.
- [8] Almand B, Clark JI, Nikitina E, *et al.* Increased Production of Immature Myeloid Cells in Cancer Patients: A Mechanism of Immunosuppression in Cancer [J]. *J Immunol*, 2001, 166(1):678-689.
- [9] Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(1):92-97.
- [10] Bell D, Chomarat P, Broyles D, *et al.* In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(10):1417-1426.
- [11] Chen S, AKBar SM, Tanimoto K, *et al.* Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer letters*, 2000, 148(1):49-57.