文章编号:1000-5404(2006)05-0401-03

论著

CD83⁺肿瘤浸润性树突状细胞在胃癌组织的表达及临床意义

雷 晓,余佩武,饶 芸,唐 波,石 彦,吴 森,周立新 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 肿瘤组织浸润树突状细胞(tumor infiltrating dendritic cells,TIDCs)数量和功能对患者预后有显著床意义,但CD83⁺TIDCs在胃癌组织中的表达情况尚不清楚,需要进行研究。**方法** 采用免疫组化、原位杂交及流式细胞术检测45例胃癌TIDCs的CD83蛋白、CD83 mRNA以及S-100表达,并分析其临床意义。**结果** 免疫组化显示胃癌组织(42/45)中有S100⁺散在表达;CD83主要表达于胃癌组织癌旁及正常胃黏膜上。原位杂交显示CD83 mRNA在少数标本中(7/45)表达。流式细胞术检测到低水平CD83表达(4%,45/45)。S-100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。CD83蛋白免疫组化表达与胃癌TNM分期显著负相关($r=-0.924$, $P<0.01$);CD83流式细胞检查的表达率与胃癌TNM分期及淋巴结转移呈显著负相关($r=-0.879$, $P<0.01$; $r=-0.782$, $P<0.05$)。**结论** 胃癌TIDCs CD83表达与胃癌TNM分期及淋巴结转移有关,可作为临床研究指标使用。

关键词:肿瘤浸润树突状细胞;胃癌;CD83;S-100
中图法分类号:R392.12;R730.23;R735.2 **文献标识码**:A

Expressions and clinical significance of CD83⁺ dendritic cells in gastric cancer tissue

LEI Xiao, YU Pei-wu, RAO Yun, TANG Bo, SHI Yan, WU Miao, ZHOU Li-xin (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the expression of S-100 and CD83 in gastric tumor tissues and evaluate their clinical significance as TIDCs markers in gastric cancer patients, since they can reflect the function of tumor infiltrating dendritic cells (TIDCs). Methods Immunohistochemistry (IHC), in situ hybridization (ISH) and flow cytometry were applied to detect the expression of S-100, CD83 mRNA and protein on DCs in 45 gastric adenocarcinoma tissues. The relationships of S-100 and CD83 expression with clinical pathological features was analyzed. Results IHC showed that S-100 expression was unevenly distributed within 42 cases of cancer tissues, but CD83 only expressed in para-cancerous tissues and normal tissues. ISH showed that CD83 mRNA was limitedly expressed in 7 samples. S-100 expression had no significant correlation with clinical pathological features while CD83 correlated with TNM stages reversely. Detected by flow cytometry, CD83 was low level expressed in all 45 gastric cancer tissues and negative correlations were found with lymphoid metastasis and TNM stages of gastric cancer($r=-0.879$, $P<0.01$; $r=-0.782$, $P<0.05$). Conclusion TIDCs CD83 expression correlated with lymphoid metastasis and TNM stages of gastric cancer, and could be used as a marker in further research.

Key words: tumor infiltrating dendritic cells; stomach neoplasm; CD83; S-100

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意义。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S-100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S-100蛋白等在肿瘤局部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,本研究分别检测S-100蛋白和CD83在胃癌组织中的表达,分析其临床意义,以期为TIDCs在胃癌中的检测提供一定的实验依据。

作者简介:雷 晓(1970-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤外科治疗方面的研究。电话:(023)66692865, E-mail: lei_xiaoxiao@mail.yahoo.com.cn
通讯作者:余佩武,电话:(023)68754161,E-mail:yupeiwu01@sina.com
收稿日期:2005-06-13;修回日期:2005-09-01

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌标本来源于2003年4月至2005年3月本院住院手术的45例患者，术前均未接受化疗和放疗。其中男性37例，女性8例，平均年龄(54±10.2)岁。患者临床病理情况：胃底部21例，胃体部15例，胃窦部9例；肿瘤分化程度上，高分化4例，中分化19例，低分化(包括低分化腺癌和黏液腺癌)22例；肿瘤浸润深度上，浸润黏膜及黏膜下层3例，肌层16例，浆膜面26例；肿瘤淋巴转移阳性者39例，阴性6例；TNM分期上，Ⅰ期2例，Ⅱ期7例。Ⅲ期15例，Ⅳ期21例。术中切下胃肿瘤后立即取材，避开坏死组织，每例两份，分别用于常规石蜡包埋及酶消化处理。

1.2 免疫组化及原位杂交

标本固定液及梯度乙醇均用DEPC(Sigma)处理水配置，常规制备石蜡标本，4 μm连续切片，HE染色确定病理类型。胃癌组织S00及CD83表达以SABC免疫组化方法检测，采用兔抗人S-100，兔抗人CD83，Histostain-Plus试剂盒(SP9001，北京中山)。切片以柠檬酸缓冲液92～96 ℃修复抗原，PBS代替一抗作为阴性对照，DAB显色，苏木精复染。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，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，着色位于细胞膜和/或细胞质。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10 g，洗必泰冲洗3次，浸泡于含1 000 U/ml青霉素、1 000 μg/ml链霉素、5 μg/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 ℃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离心30 min；吸取界面层细胞，10倍体积PBS稀释后1 200 r/min离心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。

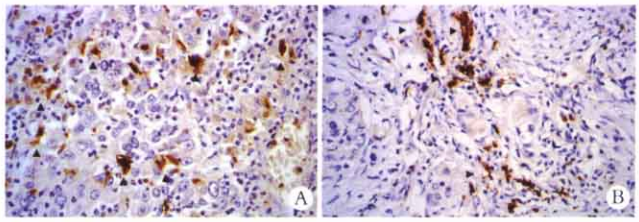
1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计程序进行t检验及相关性分析。

2 结果

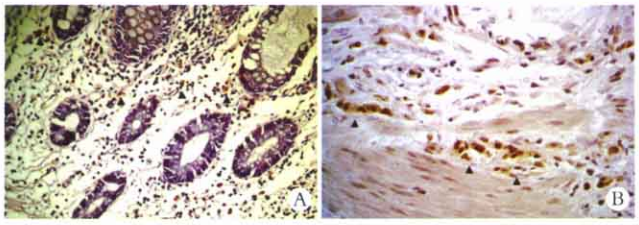
2.1 胃癌组织S-100、CD83及CD83 mRNA表达

45例胃癌组织进行免疫组化检测，42例检测到S-100蛋白阳性表达。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S-100蛋白表达。S-100蛋白阳性细胞较大，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起；CD83免疫组化在肿瘤组织内未检测到表达，远离肿瘤的正常黏膜组织内均有CD83阳性细胞表达(图2A)，胞体较大，圆形，无明显细胞突起。原位杂交检测到7例有CD83 mRNA表达，位于远离肿瘤的黏膜下组织近肌层中(图2B)。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。



A：不均匀分布；B：集中于瘤细胞团边缘组织中

图1 胃癌组织低分化癌腺S-100蛋白 (S-P×100)



A：癌旁正常黏膜(ICH×400)；B：胃癌(S-P×200)

图2 胃黏膜CD83⁺的免疫组化表达

45例胃癌组织经流式细胞仪均检测到CD83表达，表达率为0.7%～9.61%(4.2±2.3)%。流式细胞检测结果分析显示，胃癌组织内CD83表达率在不同患者年龄、性别、肿瘤部位、病理类型、分化程度间未见差异显著性。在淋巴结转移阳性的胃癌中，CD83表达为(3.7±1.8)%，淋巴结转移阴性的CD83表达为(7.8±1.5)%，两种情况间差异有显著性($t=-3.17$，$P<0.05$)。相关分析显示CD83表达与淋巴结转移情况呈显著负相关($r=-0.782$，$P<0.05$)。在不同胃癌组织TNM分期间，Ⅰ期+Ⅱ期同Ⅲ期和Ⅳ期间CD83表达均存在差异显著性($t=-3.28$，$P<0.05$，$t=-3.35$，$P<0.05$)；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，肿瘤组织内浸润性树突状细胞（tumor infiltrating dendritic cells，TIDCs）的数量与功能对机体免疫状态有重要提示意义，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，对了解机体免疫状况及说明患者预后有一定意义。

检测S-100蛋白表达情况是既往DCs研究中常用的指标之一。有报道消化道肿瘤组织内S-100蛋白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[4-6]。由于S-100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S-100染色很难区分其表达是在DCs还是在神经组织。即使S-100抗体标记到DCs上，其统计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S-100⁺DCs数量与肿瘤患者预后无关[7]。本研究中对胃癌S-100蛋白表达检测结果显示其表达与患者临床病理资料间相关性不显著，提示S-100蛋白作为胃癌TIDCs检测指标的意义有待进一步研究。

研究表明，肿瘤情况下DCs与正常情况下有很大差别，肿瘤可对DCs免疫有显著的抑制作用，包括抑制DCs成熟，降低其迁移能力，抑制其抗原递呈功能等。目前认为，肿瘤局部DCs数量相对正常组织不是减少，而是DCs的成熟度降低，在肿瘤组织局部存在未成熟DCs堆积现象[8]。因此局部数量不能完全反映DCs免疫功能状况，有必要使用能代表DCs功能的特异性表面分子标志作为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、粘附分子、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表达在DC成熟时上调，可作为DC成熟标志，而成熟是DCs发挥免疫激发功能的基本条件之一。另一方面，在对乳腺癌的研究中，DCs上CD83表达相对于常规S-100、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的指标可能更有意义。本研究检测显示，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分期晚的肿瘤组织CD83表达低，提示CD83对胃癌病理状况和免疫状态有说明意义，可以作为TIDCs的检测指标使用。

本研究表明，原位杂交显示肿瘤组织CD83的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主要表达于癌旁及正常组织。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，而有研究表明，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表达情况。这些结果也提示，CD83在胃癌组织中表达减少，结合S-100蛋白表达情况，说明胃癌内的DCs是处于未成熟状态，与文献[11]报道肝癌结节内CD83表达缺失相符合。因此，单纯以反映胃癌组织中TIDCs数量的S-100指标不足以完全说明其临床意义，而反映其功能的CD83指标与临床病理间有一定关系，可以作为进一步研究DCs与胃癌患者免疫的关系指标。

参考文献：

[1] 吴　森，余佩武，蔡志民，等. 负载胃癌酸洗抗原树突状细胞诱导高效特异的抗胃癌细胞效应[J]. 第三军医大学学报，2002，24(10)：1236－1238.

[2] 雷　晓，余佩武，石　彦，等. 树突状细胞肿瘤疫苗诱导抗胃癌作用的实验研究[J]. 中华胃肠外科杂志，2002，5(1)：45－48.

[3] 汪　灏，余佩武，郝　群，等. 树突状细胞疫苗对胃癌患者术后免疫功能影响的初步观察[J]. 中华胃肠外科杂志，2004，7(4)：301－304.

[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(3)：264－266.

[5] 刘思纯，袁世珍，陈国桢. 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. 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 J I，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 S M，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 Lett，2000，148(1)：49－57.

（编辑　陈聪连）