DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.013

肺癌放疗或化疗后肿瘤内浸润细胞的免疫组化研究*

张哉根 谢 青 高广正 (第三军医大学附属新桥医院病理科)重庆,630037

提 要 本文对37例放疗或化疗后肺癌组织内淋巴细胞和巨噬细胞进行单克隆抗体Pan-T,Pan-B和Kp_1免疫组化标记,并与58例未接受放疗或化疗肺癌作对比观察分析。结果表明两组肺癌局部反应主要为T淋巴细胞和巨噬细胞,大多数位于癌间质,少数位于癌巢内。部分肿瘤内有B淋巴细胞。治疗组肿瘤内T细胞和巨噬细胞明显多于未治疗组($P<0.05$或$P<0.01$)。这可能是机体对治疗后癌细胞所释放的某种抗原物质的一种免疫反应。

关键词 肺癌;淋巴细胞;巨噬细胞;免疫组化
中图法分类号 R734.205

机体的免疫状态对肿瘤的发生、发展、转移以及预后有着重要影响。据研究认为肿瘤组织中淋巴细胞和巨噬细胞,尤其是T淋巴细胞的浸润,部分地反映了宿主的抗肿瘤免疫反应[1~5]。本文用免疫组化ABC法对95例治疗和未治疗肺癌组织中浸润的淋巴细胞和巨噬细胞进行检测和半定量对比分析,探讨了这些细胞的数量变化、分布以及与治疗的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

肺癌95例,分组及分类见表1。所用材料均为手术切除标本,福尔马林固定。

表1 肺癌类型及治疗情况

Tab 1 Types and treatment of lung cancer

Group	Squamous cell carcinoma	Adenocarcinoma	Small cell carcinoma
Non-therapy	24	23	11
Chemotherapy	14	11	4
Radiotherapy	6	0	2
Total	44	34	17

1.2 手术前的治疗方案

1.2.1 化疗组术前1~2周一次性大剂量给药共25例。药物与剂量:CTX 100 mg,ADM 30 mg,DDP 80~120 mg,MMC 10 mg,VCR 1 mg,VP-16 100 mg,CVP 300~500 mg,5-FU 500 mg。

1.2.2 术前2~3周采用COMVP方案,常规给药一个疗程,共4例。

1.2.3 放疗组常规术前放疗8例,照射剂量4 Gy/(20 $F\cdot 4$ w)。

1.3 ABC染色方法

单克隆抗体Pan-T标记T淋巴细胞,Pan-B标记B淋巴细胞,Kp_1标记巨噬细胞,工作液浓度均为1∶80。抗体均来自Dako公司。一抗37℃孵育60 min,二抗37℃孵育30 min,三抗37℃孵育45 min。DAB显色,苏木素复染。以正常淋巴结淋巴细胞膜和巨噬细胞胞浆着棕黄色颗粒为阳性对照,PBS液代替一抗作阴性对照。

1.4 评判标准

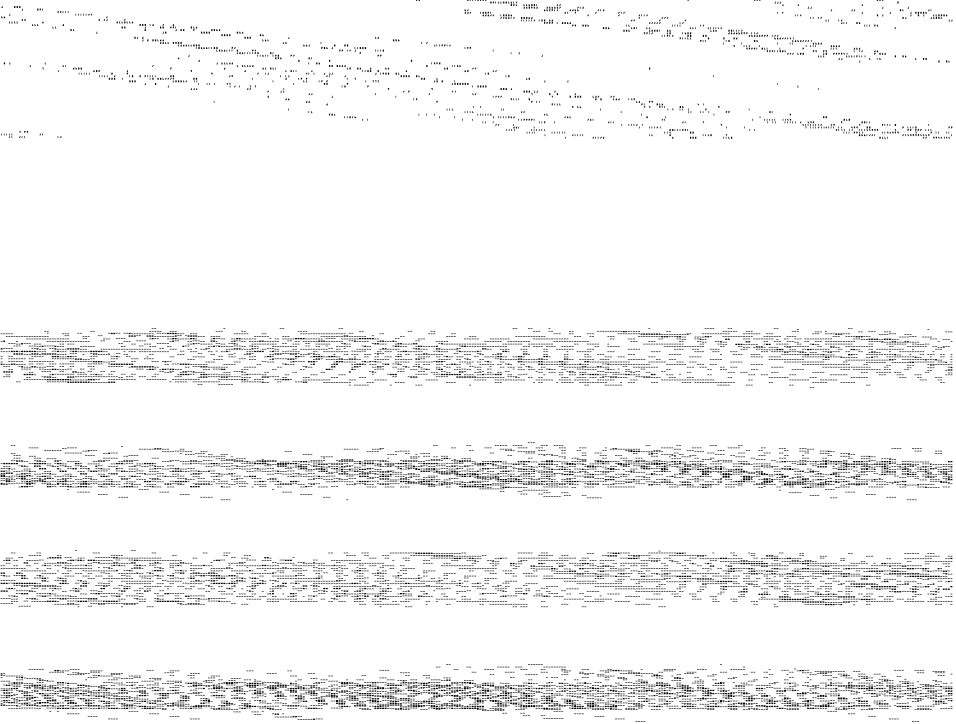
为避免观察中的局限性和主观性,评判者不了解分组情况,双盲法对整张切片进行综合评定,将标记阳性的浸润细胞分为四个等级:0为无阳性细胞,+为少量,卅为大量,介于+和卅之间的为中等量(卄)。观察阳性细胞的分布,将其分为癌巢周围和癌巢内。统计学处理,t检验,各组间比较,0~+为免疫反应不明显,卄~卅为明显。

2 结果

染色后的T、B淋巴细胞胞膜呈棕黄色阳性反应。B淋巴细胞在绝大部分肿瘤组织中缺乏,少数肿瘤内呈滤泡样结构分布(图1),偶见散在分布。T淋巴细胞分布较弥散(图2),少数成片。阳性的巨噬细胞胞浆内有棕黄色颗粒。巨噬细胞体积大,胞浆丰富,有些呈多边形,放疗后的肺癌组织内可见破骨样巨细胞(图3)。治疗与未治疗组肺癌中T、B淋巴细胞和巨噬细胞分布特点见表2。治疗组肺癌组织中T细胞和巨噬细胞数量均明显高于未治疗组(图4,5),两组之间的比较见表3、4。治疗组中T细胞和巨噬细胞两者呈正比例增加。治疗组T细胞各类型间比较,统计学上差异无显著性。B细胞只在少数病例中出现,两组间比较,差异无显著性。

* 全军"八五"攻关项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　治疗与未治疗组肺癌内 T 细胞浸润程度的比较

Tab 3　Comparison of T-cell infiltration between therapeutic and non-therapeutic group of lung cancer

Tumor type	Non-therapeutic group			Chemotherapy group			Radiotherapy group		
	Cases	0～+	++～+++(%)	Cases	0～+	++～+++(%)	Cases	0～+	++～+++(%)
Squamous cell carcinoma	24	14	10 (41.8)	19	10	9 (47.5)	5	1	4
Adenocarcinoma	23	18	5 (21.7)	11	6	5 (45.5)	/	/	/
Small cell carcinoma	11	11	0 (0)	6	2	4 (66.7)	2	/	2
Total	58	43	15 (25.9)	36	18	18 (50.8)*	7	1	6 (85.7)**

*：$t=5.6808$，$P<0.05$ *vs* non-therapeutic group，**：$t=9.5897$，$P<0.01$ *vs* non-therapeutic group

表 4　治疗与未治疗组肺癌内巨噬细胞浸润程度的比较

Tab 4　Comparison of Macrophage infiltration between therapeutic and non-therapeutic group of lung cancer

Tumor type	Non-therapeutic group			Chemotherapy group			Radiotherapy group		
	Cases	0～+	++～+++	Cases	0～+	++～+++	Cases	0～+	++～+++
Squamous cell carcinoma	24	14	10 (41.8)	19	9	10 (52.6)	5	1	4 (80.1)
Adenocarcinoma	23	16	7 (30.7)	11	5	6 (54.5)	/	/	/
Small cell carcinoma	11	10	1 (9.9)	6	2	4 (66.7)	2	/	2 (100.0)
Total	58	40	18 (32.1)	36	16	20 (55.6)*	7	1	6 (85.7)**

*：$t=5.5458$，$P<0.05$ *vs* non-therapeutic group，**：$t=6.1990$，$P<0.01$ *vs* non-therapeutic group

3　讨论

我们对 95 例治疗与未治疗肺癌组织中淋巴细胞和巨噬细胞进行了免疫组化标记，结果表明两组肺癌组织中均以细胞免疫为主，局部反应主要为 T 细胞和巨噬细胞，少数病例有 B 细胞。这些细胞主要分布在癌组织间质中，少数位于癌巢内。T 细胞和巨噬细胞在治疗组的反应较未治疗组更为明显。

肿瘤组织中具有免疫活性的细胞主要指 T 淋巴细胞或称 CD_4^+(Th)细胞及 CD_8^+(T_S)细胞，巨噬细胞等，而这些细胞对肿瘤的影响一直有两种不同的观点，即抑制或促进肿瘤生长。以往的研究绝大部分是对未治疗肿瘤组织中这些免疫活性的细胞检测，其研究结果几乎都认为这些细胞具有抗肿瘤作用[1~6]。而最近的研究[7]认为肿瘤内 T 淋巴细胞除了黑色素瘤中的 T 细胞具有较高的抗自身肿瘤特异性外，其它肿瘤均未表现出这种抗自体肿瘤的特异性。甚至有些研究者认为肿瘤中的淋巴细胞起到刺激肿瘤生长的作用。肿瘤内原位 T 淋巴细胞多处于功能抑制状态，因此对肿瘤细胞系及自身肿瘤细胞不具溶解性，只有将其从肿瘤中分离、扩增、致敏后才具有强大的攻击、杀伤肿瘤作用[8,9]。由此可见，肿瘤内免疫活性细胞的抗肿瘤效应，值得进一步研究。

一般认为当机体接受放疗或化疗后，机体的免疫机能多处于受抑制状态，而我们的结果显示肺癌治疗组中 T 淋巴细胞和巨噬细胞均明显多于未治疗组。这种接受治疗后肿瘤组织中免疫活性细胞增多，究竟是治疗后宿主抗肿瘤反应增强还是治疗后的一种组织反应，其机理尚不清楚。Hiratsuka 等[10]认为可能是癌组织经放疗或化疗后，癌细胞被破坏，继而释放出某种物质，而机体则对这些抗原物质产生了免疫反应。

巨噬细胞作为免疫活性细胞除了能直接参与肿瘤细胞的杀伤外，并为 T 淋巴细胞递呈某些抗原物质，增强 T 细胞的功能。据研究认为[7]肺内巨噬细胞可使局部治疗中的 T 淋巴细胞得以增殖与恢复。本组材料中 T 淋巴细胞的反应程度与巨噬细胞成正比，这是否与肺内巨噬细胞能增殖、恢复 T 细胞的作用有关，值得研究。对于肺癌放疗或化疗后肿瘤内 T 淋巴细胞和巨噬细胞数量增多的意义，有待随访观察进一步探讨。

参考文献

1 Giannini A, Bianchiss S, Messerrini L *et al*. Prognostic significance of accessory cells and lymphocytes in nasopharyngeal carcinoma. Path Res Pract, 1991; 187: 496

2 Nakanoma T, Nakamura K, Deguchi N *et al*. Immunohistochemical analysis of tumor infiltrating lymphocytes in seminoma using monocloning antibodies. Vichows Arch [A], 1992; 421: 409

3 周晓军，袁定东. 肿瘤局部浸润巨噬细胞的观察. 中华病理学杂志，1985; 14: 105

4 张惠忠，陆献瑜，赵美卿. 肺癌组织中免疫活性细胞和 β_2微球蛋白的免疫组化研究. 癌症，1993; 12: 291

5 骆成玉，詹新恩. 乳腺癌组织中 T 细胞亚群分布的观察与分

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

析.实用癌症杂志,1994;9:1
6 王强修,杜德利.癌间浸润淋巴细胞和巨噬细胞.实用癌症杂志,1992;7:172
7 高 静,赵德容,孙岚玲.杀伤肿瘤细胞的免疫活性细胞.国外医学:肿瘤学分册,1994;21:331
8 李 莉,孔宪涛.肿瘤免疫治疗的新型效应细胞——肿瘤浸润淋巴细胞.国外医学:免疫学分册,1993;5:236
9 张滨学,吴秉铨,殷 澄等.肿瘤浸润淋巴细胞体外扩增及抗肿瘤研究.中华病理学杂志,1992;21(2):79
10 Hiratsuka H, Imamure M, Ishii Y *et al*. Immunohistologic detection of lymphocytes subpopulations infiltrating human oral cancer with special reference to its clinical significance. Cancer,1984;53:245

(收稿:1995-09-29;修回:1996-05-01)
(编辑 冯崇英)

Immunohistochemical study of infiltrating cells in lung cancer after radiotherapy or chemotherapy

Zhang Zaigen, Xie Qing, Gao Guangzheng (Department of Clinical Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract Thirty-seven specimens of lung cancer treated with radiotherapy or chemotherapy were studied with immunohistochemical methods of Pan-T, Pan-B and Kp_1 and other 58 lung cancer specimens without radio- or chemotherapy were studied likewise to serve as the control. It was found that the infiltrating cells in both the groups were mainly T-lymphocytes and macrophages, of which most distributed in the interstitial tissue and some in the cancerous nests. B-lymphocytes were found in a part of the specimens. The number of infiltrating T-cells and macrophages was significantly larger in the treated group than in the control ($P<0.05$ to 0.01), which might be due to an immune reaction against certain antigenic substance released by the cancerous cells after treatment.

Key words lung cancer; lymphocyte; macrophage; immunohistochemistry

培养的角朊细胞原位固定石蜡包埋技术

In situ fixation and paraffin embedding of keratinocytes in cell culture

钟白玉 聂祝湘 刘荣卿 (第三军医大学附属西南医院皮肤科) 重庆,630038

近年来,角朊细胞培养技术已逐渐在一些实验室开展起来。通过倒置显微镜可以观察到培养细胞生长的形态学变化过程,但仅能观察到细胞平面形态。本文介绍一种原位固定、石蜡包埋技术。该技术可以观察到细胞的纵切面形态及细胞与支持物(基质)之间的关系。现报告如下:

1 材料和方法

1.1 培养细胞支持物的制备

1.1.1 鼠尾胶原的制备[1] 取大白鼠鼠尾一根,去除污物后,于75%酒精浸泡30 min,去毛皮取其尾腱,剪碎后在无菌条件下浸泡于1/1000的醋酸溶液中,置4℃冰箱72 h后,以3000 rpm离心1 h。

1.1.2 取上清液1 ml加入培养皿中(φ35 mm),通入氨气使其凝固平衡后备用。

1.2 表皮细胞的培养

取包皮环切术后包皮皮肤,去除皮下组织后用0.25%胰蛋白酶在4℃冰箱内消化16 h,分散的表皮细胞过280目不锈钢网,然后接种于上述已制备好的支持物上,在37℃含5%CO_2孵箱内培养。培养基为DMEM(含10%小牛血清、10 ng/ml表皮生长因子、1.2 u/ml胰岛素、100 u/ml青霉素、100 μg/ml链霉素)培养基。接种的数目为每ml含活细胞为1×10^6(台盼蓝清除计算)。培养液隔日更换一次,培养14 d后进行原位固定、石蜡包埋。

1.3 原位固定、石蜡包埋法

吸去培养液,用Bouin's固定液或Karnovsky's固定液固定2 h后,用塑料刮匙沿培养皿边缘分离支持物,继续固定8 h,按常规进行脱水、透明、浸蜡和包埋。另一种方法是:用Bouin's固定液或Karnovsky's固定液固定后不分离支持物,直接将培

(下转 239 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net