

NK 细胞及 DCs 在肺鳞癌组织中的浸润与预后关系的研究

张廷平¹ 张百江²

【摘要】 目的 研究肺鳞癌组织中 NK 细胞和 DCs 浸润与预后的关系。**方法** 采用免疫组化 S-P 法,分别用单克隆 CD57 抗体和 S-100 抗体标记 NK 细胞和 DCs,检测肺鳞癌组织中浸润 NK 细胞和 DCs 的数量,分别比较 NK 细胞和 DCs 浸润的程度与肺鳞癌患者术后生存时间的关系。**结果** 长期生存组中 NK 细胞、DCs 浸润的密度为 $(23.3 \pm 12.2)/HPF$ 和 $(7.6 \pm 3.3)/HPF$,均高于短期生存组的 $(9.0 \pm 11.9)/HPF$ 和 $(2.9 \pm 1.2)/HPF$ ($P = 0.027$, $P = 0.016$),高浸润的 NK 细胞和 DCs 组中,平均术后生存时间分别为 45.3 个月和 50.5 个月,显著高于低浸润的 NK 和 DCs,分别为 31.9 和 25.6 个月 ($P = 0.032$, $P = 0.006$)。**结论** 在肺鳞癌中,NK 细胞和 DCs 在肿瘤组织中的浸润数量与肿瘤患者的预后呈正相关,可作为判断肺鳞癌预后的指标之一,两者联合检测意义较大,但两者不是影响预后的独立因素。

【关键词】 肺鳞癌;自然杀伤细胞;树突细胞;预后;免疫组化

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-3070(2007)05-0423-04

Prognostic significances of natural killer cells and dendritic cells infiltrations in lung squamous cell carcinoma

ZHANG Tingping, ZHANG Baijiang

1. The Department of Thoracic Surgery, The People's Hospital of Pingyi County, Pingyi 273300; 2. The Department of Thoracic Surgery, Shandong Tumor Hospital And Institute, Jinan 250117

【Abstract】 Objective To study the relationship between the infiltration of NK cells and DCs in lung squamous cell carcinoma and the prognosis after tumor resection. **Methods** Immunohistochemical staining of CD57 antibody and S-100 protein was performed to evaluate NK cells and DCs infiltration in all tumor tissue of SqCLC patients, respectively. According to the survival time after operation, the patients were classified into long-term survival group and short-term survival group. And the infiltration difference of NK cells and DCs in SqCLC between two groups were compared. **Results** The mean number of NK cells and DCs in long-term survival group was $(23.3 \pm 12.2)/HPF$ and $(7.6 \pm 3.3)/HPF$ respectively, which was much higher than that in short-term survival group [$(9.0 \pm 11.9)/HPF$, $(2.9 \pm 1.2)/HPF$, respectively], the value of P was 0.027 and 0.016 respectively. The survival time after operation of patients with many NK cells and DCs infiltration were 45.3 months and 50.5 months, which were significantly better than that of patients with little NK cells and DCs infiltration ($P = 0.032$, $P = 0.006$), which were 31.9 months and 25.6 months respectively. **Conclusion** These data indicate that the counts of NK cells and DCs infiltration were positively correlated with the prognosis of SqCLC, the two immunological factors were not independent prognostic factors in SqCLC.

【Key words】 Squamous cell lung carcinoma; Natural killer cell; Dendritic cells; Prognosis; Immunohistochemistry

近年来,虽然肺癌手术、放化疗等综合治疗措施有较大的改进,但治疗效果仍不令人满意,因此迫切需要一个精确判断肺癌预后的指标。我们用单克隆抗体 CD57 标记 NK 细胞,用 S-100 抗体标记

树突状细胞(dendritic cells, DCs),通过检测肺鳞癌组织中浸润 NK 细胞和 DCs 的数量、分布等指标,并对肺鳞癌患者术后生存时间、淋巴转移等进行相关研究,旨在探讨肺鳞癌组织中浸润 NK 细胞和

DCs的特点以及与预后的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源 全部标本均系1998年1月-2001年9月山东省平邑县人民医院胸外科手术切除的肺鳞癌组织蜡块,对影像检查、手术情况等相关临床资料完整、术前无放疗、化疗史者,采用电话、写信及登门等方式随访,获取手术后生存时间及具体的死因等。下述情况应排除在外:(1)手术切除后30天内死亡;(2)死于与肺鳞状细胞癌无关的原因;(3)肺鳞癌术前2周内呼吸道感染病史。随访53人,符合上述条件的患者共47例。男36例,女11例,年龄49-75岁,平均年龄62.6岁,中位年龄61岁。根据术后病理结果,参照国际抗癌联盟(UICC)1997年的TNM分期标准,其中I期11例,II期21例,III期15例。有淋巴转移36例,无淋巴节转移11例。根据肿瘤浸润深度分为T₁期6例,T₂期30例,T₃期11例。其中肺叶切除术41例,左侧全肺切除术6例。其中有淋巴转移36例,无淋巴转移11例。术后生存时间8个月-5年。根据术后生存期的差异,将本组病例分为短期生存组(术后生存期<36个月)、长期生存组(术后生存期≥36个月)。全部肺肿瘤标本经4%甲醛固定,常规脱水浸蜡、石蜡包埋,切片厚度4 μm,HE染色,用日本产奥林巴斯BX41双目显微镜观察确诊为鳞状细胞癌。

1.2 试剂 鼠抗人CD57单克隆抗体(克隆系NK-1)工作液、兔抗人多克隆S-100抗体工作液、DAB染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学染色 采用S-P法,将蜡块切片,厚度4 μm。NK细胞用CD57抗体标记,I抗用鼠抗人CD57单克隆抗体工作液;DCs用S-100抗体标记,I抗用兔抗人S-100多克隆抗体工作液,分别对肿瘤组织进行免疫组化染色,所有步骤均按试剂说明书进行。

1.4 免疫组化染色结果判断 NK细胞:阴性对照为淋巴结,以CD57免疫组化染色细胞膜和细胞核呈棕黄色染色者计数;DCs:阴性对照为黑色素瘤细胞,以细胞质S-100呈棕黄色阳性反应的细胞计数。由病理科医生双盲阅片,对每张切片随机计数,对每张切片随机计数10个含有阳性细胞的高倍视野(×400),分别计数阳性细胞数,取其平均值。

1.5 统计学分析 采用SPSS 12.0统计学软件对结果进行统计学分析。对长期生存组、短期生存组之间每高倍视野NK细胞、DCs均数的比较,以及各病理参数分组的细胞均数的比较采用t检验,生存率的计算和生存曲线的绘制采用Kaplan-Meier方

法,以Log rank检验比较两组生存差异的显著性。

2 结果

2.1 长期生存组与短期生存组之间NK细胞、DCs每高倍视野细胞均数的比较 免疫组化染色结果显示,CD57阳性的NK细胞染色主要定位于胞膜和胞核,呈棕黄色,与其他浸润的淋巴细胞一起分布在癌巢周围及肿瘤的间质中。孤立的CD57阳性的NK细胞,有时也会出现在距离肿瘤细胞很近的地方。在本组47例肺鳞癌组织中,CD57阳性的NK细胞每高倍视野细胞浸润数为(0.4-46.3)/HPF,平均(17.2±13.9)/HPF。长期生存组中NK细胞浸润平均数为(23.3±12.2)/HPF,明显高于短期生存组平均数(9.0±11.9)/HPF, $P=0.027$ 。S-100阳性的DCs,细胞质和细胞核均有阳性着色,细胞形态不规则,胞质可见长短不一、数目不等的树突状突起。在肺鳞癌组织中,S-100阳性的DCs多数呈区域性分布在间质和癌巢周围,常和淋巴细胞相伴浸润。47例肺鳞癌组织中,每高倍视野浸润的DCs数为1.2-17.8/HPF,平均为(5.6±3.5)/HPF。长期生存组和短期生存组每高倍视野DCs平均数分别为(7.6±3.3)/HPF和(2.9±1.2)/HPF,两组差异有统计学意义, $P=0.016$ 。

2.2 肺鳞癌组织中NK细胞和DCs的浸润与临床病理特征的关系 NK细胞与DCs在肺鳞癌组织中的浸润与患者的年龄及性别等因素无关。但是两者均与患者的临床分期、肿瘤的浸润程度及淋巴结有无转移等因素有关。无淋巴结转移组的NK细胞与DCs浸润数明显高于有淋巴结转移组,两组差异有统计学意义($P=0.02$, $P=0.001$),NK细胞与DCs在I期肺鳞癌组织中的细胞浸润数高于II、III期中的细胞数,两者差异有统计学意义($P=0.03$, $P=0.04$),但它们在II、III期中的细胞数虽然有差别,但两者差异无统计学意义($P=0.54$, $P=0.873$)。如表1中所显示,与NK细胞与DCs在各期肺鳞癌组织中的细胞浸润结果类似,NK细胞与DCs浸润结果在T₁组中的数量高于T₂及T₃组,差异有统计学意义,随着肿瘤浸润程度的加深,NK细胞与DCs在肺鳞癌组织中的浸润数量逐渐减少,但在T₂及T₃组之间差异无统计学意义($P=0.09$, $P=0.089$)。

2.3 肺鳞癌组织中NK细胞和DCs的浸润与患者预后的关系 将每高倍视野下浸润的NK细胞数分为高、低浸润两组,NK细胞浸润≥25/HPF为高浸润组,共13例;NK细胞浸润数<25/HPF为低浸润组,共34例。同样将DCs浸润也分为高、低浸润

两组,DCs 浸润 ≥ 6 /HPF 为高浸润组,共 19 例;DCs 浸润 < 6 /HPF 为低浸润组,共 28 例。高浸润的 NK 细胞和 DCs 组中,术后平均生存期分别为 45.3 个月和 50.5 个月,明显高于低浸润的 NK 细胞和 DCs 的 31.9 和 25.6 个月($P=0.032$, $P=0.006$)。为进一步比较 NK 细胞及 DCs 与术后生存时间的关系,将本组患者依据 NK 细胞及 DCs 的浸润情况的不同分为如下 4 组: NK 细胞和 DCs 均为高浸润的 HH 组, NK 细胞及 DCs 分别为高、低浸润的 HL 组, NK 细胞及 DCs 分别为低、高浸润的 LH 组, NK 细胞及 DCs 分别为低、低浸润的 LL 组。其中 HH 组 9 例(50.7 ± 10.7)个月, HL 组 4 例(33.0 ± 15.7)个月, LH 组 10 例(50.2 ± 8.3)个月, LL 组 24 例(24.3 ± 13.4)个月。对上述 4 组结果比较,发现 LL 组的术后生存时间明显短于上述 3 组, $P < 0.05$ 。将 TNM 分期、淋巴结转移、患者年龄、性别及 NK 细胞和 DCs 的浸润纳入 Cox 多因素风险比例模型,发现 TNM 分期、淋巴结转移为影响预后的独立因素, NK 细胞和 DCs 的浸润虽然与预后相关,但不能成为影响预后的独立因素。

表 1 肺鳞癌组织中 NK 细胞、DCs 浸润与临床病理特征的关系

分组	n	NK 细胞	P 值	DCs	P 值
年龄(岁)					
<60	16	16.7 $\pm$ 13.1	0.85	6.7 $\pm$ 2.4	0.27
≥ 60	31	17.4 $\pm$ 14.5		7.4 $\pm$ 4.7	
性别					
男	36	16.9 $\pm$ 14.1	0.79	5.3 $\pm$ 3.3	0.479
女	11	18.2 $\pm$ 14.1		6.3 $\pm$ 4.1	
临床分期					
I	11	25.8 $\pm$ 7.9	0.03	8.6 $\pm$ 3.7	0.04
II	21	13.3 $\pm$ 14.2	0.54	4.6 $\pm$ 3.3	0.873
III	15	16.4 $\pm$ 15.0		4.8 $\pm$ 2.5	
淋巴结转移					
有	36	14.6 $\pm$ 14.4	0.02	4.7 $\pm$ 3.9	0.001
无	11	25.8 $\pm$ 7.9		8.6 $\pm$ 3.7	
肿瘤浸润程度					
T ₁	6	35.5 $\pm$ 11.2	0.02	10.8 $\pm$ 4.5	0.027
T ₂	30	16.4 $\pm$ 12.6	0.09	5.3 $\pm$ 2.7	0.089
T ₃	11	9.1 $\pm$ 9.8		3.7 $\pm$ 2.1	

3 讨论

肺癌是常见的恶性肿瘤之一。近几年来,尽管治疗方法有了很大改进,但手术后总体 5 年生存率不足 30%,因此迫切需要一个判断肺癌预后的指标。目前肺癌的预后主要根据肿瘤的细胞类型、分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移等进行判断,其结果仍较显粗略。NK 细胞和 DCs 是体内两个重

要的免疫细胞。随着研究的深入, NK 细胞和 DCs 在肿瘤免疫中的地位越来越受到重视。许多研究已经阐明肿瘤患者的预后与局部肿瘤组织浸润免疫细胞的相关性^[1-2]。NK 细胞作为一类独立的淋巴细胞群,无需抗原预先致敏即可直接杀伤靶细胞,在机体抗感染、抗肿瘤、免疫调节和造血调控等方面发挥着重要的免疫功能,它在体内自发产生细胞介导的细胞毒作用^[3]。DCs 是人体内最强的抗原提呈细胞,在机体抗肿瘤反应中起重要作用。NK 细胞和 DCs 在肿瘤组织中的浸润与肿瘤患者的预后有密切关系。最初的研究是利用外周血中 NK 细胞和 DCs 的数量、分布和活性等指标,研究肿瘤患者的免疫状态,研究表明肿瘤微环境中免疫细胞的浸润往往比外周血更能确切反映宿主的抗肿瘤免疫状态,并影响着患者的预后,这已在乳腺癌、胃癌、食管癌、结肠癌中证实^[4-8]。目前联合检测肺鳞癌组织中两免疫细胞的分布特点,并探讨它们与肿瘤预后关系的研究尚未见报道,已有将这两种指标的检测用于胃癌及口腔肿瘤等的报告^[7,9]。CD57 作为 NK 细胞的标志物已经广泛应用^[10-12],我们选择单克隆抗体 CD57 作为 NK 细胞的标志物,主要因为它能对石蜡包埋组织中的 NK 细胞恒定而准确的免疫染色^[11]。目前国内外大多用 S-100 蛋白来识别肿瘤组织中浸润的 DCs,以往认为 S-100 蛋白仅存在于神经系统内,是一种神经系统特异蛋白质。后来研究发现 DCs 也存在 S-100 蛋白,且主要位于细胞浆和细胞核上, S-100 蛋白可作为 DCs 的特异性标志物。研究表明, S-100 蛋白阳性 DCs 在肿瘤中的浸润程度与患者的预后呈正相关^[13-14]。

本组虽有较多 II 期及 III 期患者,由于经济困难等因素,所有患者术前、术后均未给予辅助放疗,消除了放疗对患者免疫和预后的影响。TNM 分期是肺鳞癌重要的预后指标,本研究中, I 期术后生存时间 55.7 月,明显高于 II 期及 III 期的 37.5 月和 28.9 月,并显示肺鳞癌组织中 NK 细胞和 DCs 的高浸润与患者预后呈正相关。这与胃癌、食管鳞癌、结肠癌及肺腺癌等文献报告的结果一致^[15-18,6-8]。研究表明, NK 细胞和 DCs 在机体抗肿瘤免疫中有协同增强作用,活化的 DCs 能增强 NK 细胞的增殖,并加强其细胞毒作用,同样, NK 细胞能诱导 DCs 的成熟^[19]。两个免疫细胞的缺乏或功能低下,导致机体肿瘤免疫功能的降低,有利于肿瘤的生长、浸润及淋巴结转移,从而影响肿瘤患者的预后。通过比较肺鳞癌各期的 NK 细胞、DCs 浸润与术后生存情况,发现两者 I 期浸润程度显著高

于Ⅱ期及Ⅲ期,但在Ⅱ期及Ⅲ期中NK细胞的浸润差别无显著性。这一现象在胃癌研究有同样发现^[4]。目前认为NK细胞是早期抗肿瘤反应的主要效应细胞之一,同样对相应的抗肿瘤免疫反应有着强烈的影响^[20]。这也可能是在本研究中Ⅰ期NK细胞浸润程度显著高于Ⅱ期及Ⅲ期的主要原因。将TNM临床病理分期、NK细胞及DCs浸润等因素纳入Cox多因素风险比例模型分析,发现TNM分期、淋巴结转移为影响预后的独立因素,尽管NK细胞及DCs的浸润与肺鳞癌术后生存时间呈正相关,但两指标不能作为影响预后的独立因素。

研究中,我们发现部分病例存在NK细胞及DCs高浸润,但术后生存时间较短,或NK细胞及DCs低浸润,术后生存时间长,这与我们的研究结论相背。我们分析产生这种现象有如下原因:(1)肿瘤的预后与肿瘤本身的生物学特性及肿瘤的分期等因素相关;(2)组织标本的选取、切片对NK细胞及DCs检查结果的影响 研究结果发现NK细胞及DCs都在肿瘤的间质及癌巢周围有较高的浸润,但在肿瘤细胞间浸润NK细胞及DCs数目极少,如研究切片中癌巢及间质的比例多少、肿瘤组织有无坏死组织等情况对检查结果都有相应的影响;(3)肿瘤细胞的免疫逃逸 研究表明,肿瘤与DCs之间存在着微妙的相互作用,肿瘤局部的细胞因子是影响DCs生物学特征的关键因素^[21]。这些细胞因子大部分是由肿瘤细胞分泌的免疫抑制因子,包括TGF β , VEGF, IL-10等,他们的存在可能是造成TIDC表型异常及功能低下的原因^[22]。肿瘤细胞分泌的一些免疫抑制因子,改变了DCs的成熟过程,使其呈现不同于正常成熟DCs的表型,从而削弱了其抗原提呈功能,造成了肿瘤免疫逃逸;(4)吸烟对NK细胞的影响 由于肺鳞癌的发生与长期大量的吸烟有关,研究证实吸烟能降低NK细胞的活性^[9],不同个体吸烟程度可能影响免疫细胞在肿瘤组织中的分布。

参考文献

- Altomann S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Lymphocyte infiltrates as prognostic variable in female breast cancer[J]. *Eur J Cancer*, 1992; 28A:859-864
- Ikeguchi M, Saito H, Katano K, et al. Correlation between the lymphocytic infiltration of tumors and the proliferative activity of cancer cells from surgically treated esophageal carcinoma[J]. *Oncology*, 1997; 54(4):311-317
- Brittenden J, Heys SD, Ros J, et al. Natural killer cells and cancer[J]. *Cancer*, 1996; 77:1226-1243
- 汤绚丽,朱有法,姚根有,等.胃癌组织中NK细胞和DCs浸润的数量及意义[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2005; 20(3):222-225
- Furihata M, Ohtsuki Y, Sonobe H, et al. Prognostic significance of simultaneous infiltration of LA-DR positive dendritic cells and tumor infiltrating lymphocytes into human esophageal carcinoma[J]. *Tohoku J Exp Med*, 1993; 169(3):187-195
- Ishigami S, Natsugoe S, Matsumoto M, et al. Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2003; 10(5):1237-1240
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2000; 16:159(1):103-108
- Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, et al. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor infiltrating immune cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004; 53(11):978-986
- Sakakura K, Chikamatsu K, Sakurai T, et al. Infiltration of dendritic cells and NK cells into the sentinel lymph node in oral cavity cancer[J]. *Oral Oncology*, 2005; 41(1):89-96
- Vaquero J, Coca S, Mogallon R, et al. Immunohistochemical study of natural killer cells in tumor-infiltrating lymphocytes of primary intracranial germinomas[J]. *J Neurosurg*, 1990; 72(4):619-625
- Vincent M, Thiery JP. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evaluation in peripheral and central nervous system[J]. *Dev Biol*, 1984; 103(2):468-481
- 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2000:171-176
- Ishigami S, Aikou T, et al. Prognostic value of HLA-D expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer[J]. *Oncology*, 1998; 55(1):65-69
- Maehara Y, Kabashima A, Tokunaga E, et al. Recurrences and relation to tumor growth potential and local immune response in node negative advance gastric cancer[J]. *Oncology*, 1999; 56(4):322-327
- Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 1997; 79(12):2320-2328
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma[J]. *Cancer*, 2000; 88(3):577-583
- Takanami L, Takeuchi K, Giga M. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001; 121(6):1058-1063
- Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, et al. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression[J]. *Molecular Immunology*, 2005; 42(4):541-546
- Terme M, Menard C, Taieb J, et al. The dialogue between natural killer cells and dendritic cells[J]. *International Congress Series*, 2005; 1285:169-176
- Kurosawa S, Harada M, Matsuzaki G, et al. Early appearing tumor-infiltrating natural killer cells play crucial role in the generation of anti-tumor T lymphocytes[J]. *Immunology*, 1995; 85(2):338-346
- Vicari AP, Treilleux I, Lebecque S. Regulation of the trafficking of tumour-infiltrating dendritic cells by chemokines[J]. *Semin Cancer Biol*, 2004; 14(3):161-169
- MahNke K, Schmitt E, Bonifaz L, et al. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells[J]. *Immunol cell Biol*, 2002; 80(5):477-483

(收稿:2007-05-20)