

胃癌微环境中肥大细胞的临床病理学意义

刘亚楠 王娟 蔺丽慧 李佳 彭霞 肖晖 李飞 戴慧蓉 李莉

基金项目:上海市科委基础处重点项目(11JC1410300);国家自然科学基金面上项目(81072448)

作者单位:200080 上海市,上海市第一人民医院检验科

通讯作者:李莉,Email:annylish@hotmail.com

【摘要】 目的 初步探讨肥大细胞(mast cell, MC)在胃癌微环境中的生物学意义。方法 采用免疫组织化学方法对 31 份胃癌标本、20 份胃良性病变标本中的 MC 进行标记,并分析 MC 数目与胃癌及临床病理资料之间的关系。结果 胃癌组中 MC 数目显著高于胃良性病变组,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。高、中、低分化胃癌组织中 MC 数目差异无统计学意义($P > 0.05$)。胃癌患者高龄组与低龄组间 MC 数目差异有统计学意义($P < 0.05$),而在性别比例、TNM 分期、浸润深度、分化级别、局域淋巴结转移、神经、脉管浸润各临床病理因素分组中差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论 MC 参与肿瘤微环境及肿瘤的形成与发展,但与重要临床病理资料无明显相关性。

【关键词】 肥大细胞;胃癌;微环境;类胰蛋白酶

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.03.002

Clinicopathological significance of mast cells in the gastric cancer microenvironment

LIU Ya-nan, WANG Juan, LIN Li-hui, et al. Department of Clinical Laboratory, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China.

【Abstract】 **Objective** To study the biology significance of mast cells (MC) in gastric cancers microenvironment. **Methods** The numbers of MC in tissue specimens collected from 31 cases of gastric cancer and 20 cases of benign gastric lesion were counted by immunohistochemical staining method and the correlation of MC counts with gastric cancer and clinical pathology data were analyzed. **Results** There was a significant increase in the number of MC in gastric cancer compared with benign gastric lesion, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$); There were no statistical significance in the differences of MC counts was observed among high, medium and low differentiated gastric cancer ($P > 0.05$). There was statistical significance was found in different age groups of gastric cancer patients ($P < 0.05$), but no associations were noted between MC counts and various clinicopathological features such as gender proportion, tumor TNM stage, invasion grade, histology grade, lymph node metastasis, invasion in blood vessels and perineural invasion (P all > 0.05). **Conclusion** MC in gastric cancer promote tumor formation and progress, but has rare correlation with clinical pathological feature.

【Key words】 Mast cell; Gastric cancer; Microenvironment; Tryptase

肿瘤的形成和发展取决于机体促肿瘤和抗肿瘤作用间的平衡,这不仅与肿瘤细胞本身特性有关,还涉及到肿瘤细胞所处的微环境^[1]。肿瘤细胞与微环境中其他成分之间的相互作用是肿瘤形成发展的重要因素^[2]。作为多功能细胞因子之源的肥大细胞(mast cell, MC)除参与过敏反应、抗感染外,越来越多的研究^[3]发现其也参与构成肿瘤微环境,影响肿瘤的形成与发展。本文研究采用免疫组化标记 MC 特异性类胰蛋白酶,分析 MC 在不同类型胃癌组织中的差异,探讨其临床病理学意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2009 年 5 月-2011 年 3 月我

院手术切除及胃镜活检标本。31 例胃癌患者标本(高分化 10 例、中分化 11 例、低分化 10 例),其中男性 19 例,女性 12 例;年龄 46~76 岁。TNM 分期按国际抗癌联盟 1997 年标准判定。20 例慢性浅表性胃炎患者标本,其中男性 10 例,女性 10 例;年龄 34~79 岁。标本经 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 mm 厚连续切片,进行免疫组化检测。所有病例均经病理切片和免疫组化染色确诊。

1.2 试剂 抗 MC 类胰蛋白酶的单克隆抗体(AA1, DAKO)、二步法抗兔/抗鼠通用型免疫组化检测试剂盒(EnVision™ Detection KIT)购自基因科技(上海)有限公司。BASO 苏木素(梅尔氏)购自(上海)珠

海贝索生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学染色 将切片脱蜡并采用梯度酒精水化,蒸馏水洗涤;pH=6.0柠檬酸缓冲液微波抗原修复15 min,切片完全冷却后,PBS洗涤3次;3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶影响。5%BSA封片30 min后,弃封闭液,加入1:5000稀释的抗MC类胰蛋白酶的单克隆抗体50 μ l,放湿盒内4 $^{\circ}$ C过夜培养;PBS充分洗涤3次后加入二抗50 μ l室温孵育30 min;PBS充分洗涤3次后加入1:50稀释的DAB显色液50 μ l,显微镜下观察,适时终止反应;BASO苏木素(梅尔氏)染色30 s后自来水内充分返蓝;梯度酒精脱水后烤片5 min,中性树胶封片。

经免疫组化染色,MC的胞浆呈棕色,避开血管周围、组织边缘及坏死区,各组织标本在高倍视野下连续计数5个MC密集区中MC数目,求其平均数。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MC免疫组织化学染色结果 如图1所示,类胰蛋白酶阳性的MC被染成棕色,主要分布在胃间质中,镜下可见胃癌组织中MC数目明显高于胃良性病变组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

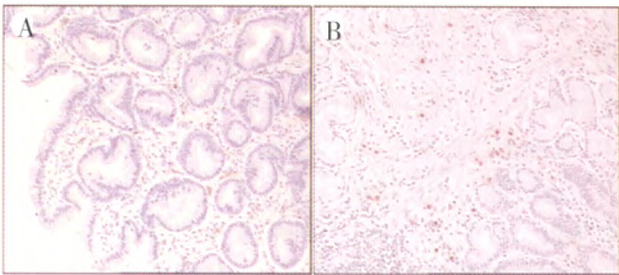


图1 免疫组化示类胰蛋白酶阳性MC($\times 100$)

注:A为良性病变组织;B为胃癌组织

2.2 不同组织中MC数目比较结果 胃癌组织中MC数目明显高于胃良性病变组,且差异有统计学意义($P < 0.05$)(图2);高、中、低分化程度胃癌组织中MC数目比较差异无统计学意义($F = 0.310, P > 0.05$)(图3)。

2.3 胃癌MC数目与各临床病理资料的关系 不同临床病理组别中性别比例、TNM分期、浸润深度、分化级别、局域淋巴结转移、脉管浸润、神经浸润各组MC数目比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05);年龄构成两组间MC数目比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

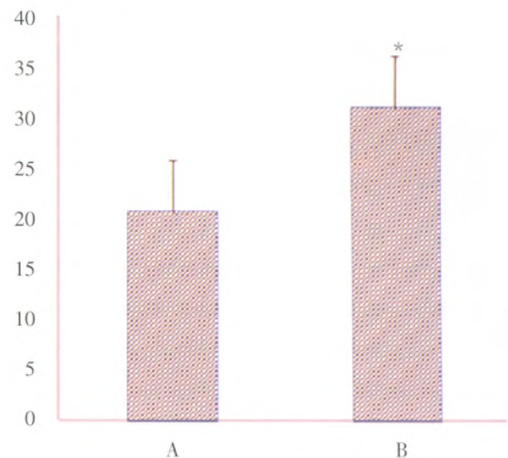


图2 在胃癌和胃良性病变组织中MC数目比较
注:A为胃良性病变组;B为胃癌组;*与良性病变组比较, $P < 0.05$

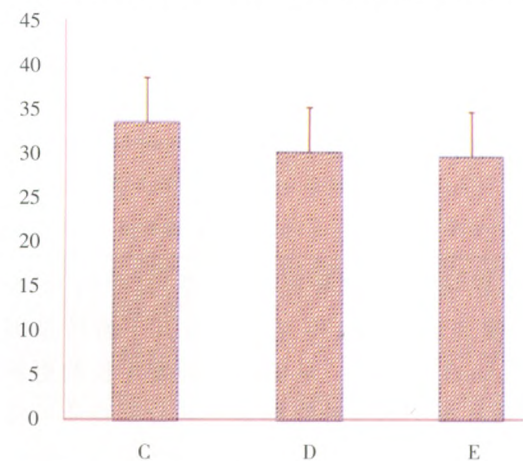


图3 不同分化程度胃癌组织中MC数目比较
注:C为高分化胃癌;D为中分化胃癌;E为低分化胃癌

3 讨论

起初研究者认为肿瘤的发生与遗传背景有关,故从基因遗传学角度探讨肿瘤的发生机制。在以肿瘤细胞为中心的研究模式中我们发现了一些癌基因、抑癌基因及其相关调节分子,但是这并不能完全解释肿瘤的发生与发展,因此我们需转换角度去全面考虑认识肿瘤^[4]。早在1889年,Paget^[5]提出了肿瘤的“种子和土壤学说”,这为肿瘤微环境概念的提出奠定了基础。而早期研究者着重于种子(肿瘤细胞),忽略了土壤(肿瘤微环境)的异质性、结构上的复杂性和功能上的重要性。

肿瘤细胞与肿瘤微环境中其他成分之间的相互作用是肿瘤发展的决定因素,其决定了肿瘤的存亡与进展^[2]。肿瘤细胞和微环境中其他细胞成分之间的作用是相互的,即一方调控,影响另一方的基因表达或表型。如坏死肿瘤细胞释放的肿瘤抗原作用于基质中上皮细胞表面的Toll样受体后释放生物介质活化巨噬细胞,活化的巨噬细胞可以释放环氧

表 1 胃癌患者 MC 数目与临床病理资料的关系[n(%)]

	因素	例数	MC 数目		χ^2 值	P 值
			低水平(<29.8%)	高水平(\geq 29.8%)		
年龄	< 65	18	6(33.33)	12(66.67)	3.895	0.0484
	\geq 65	13	9(69.23)	4(30.77)		
性别	男	15	7(46.67)	8(53.33)	0.034	0.8528
	女	16	8(50.00)	8(50.00)		
TNM 分期	\leq II	14	6(42.86)	8(57.14)	0.313	0.5761
	\geq III	17	9(52.94)	8(47.06)		
浸润深度	\leq T2	11	4(36.36)	7(63.64)	0.987	0.3205
	\geq T3	20	11(55.00)	9(45.00)		
分化级别	高分化	10	4(40.00)	6(60.00)	0.912	0.3708
	中分化	11	5(45.45)	6(54.55)		
	低分化	10	6(60.00)	4(40.00)		
局域淋巴结转移	无	12	5(41.67)	7(58.33)	0.354	0.5518
	有	19	10(52.63)	9(47.37)		
脉管浸润	无	24	12(50.00)	12(50.00)	0.111	1.0000
	有	7	3(42.86)	4(57.14)		
神经浸润	无	19	11(57.89)	8(42.11)	1.777	0.2734
	有	12	4(33.33)	8(66.67)		

化酶-2、IL-6、肿瘤坏死因子- α 等,其中的 IL-6 可以与肿瘤表面的 GP130 结合调节其下游转录因子 NF- κ B、Stat3 的表达,从而促进肿瘤生长的更新循环^[6]。微环境中的非肿瘤细胞或其分泌物质可促进肿瘤的生长,但是某些因素也对肿瘤的发生发展产生不利影响。这些因素促进或拮抗肿瘤的作用也会因肿瘤类型、肿瘤发展阶段的不同而有所差异^[7]。因此肿瘤微环境的探讨在肿瘤研究中显得尤为重要。

大量的研究证据显示,浸润到肿瘤微环境中的髓源性细胞对肿瘤的生长和血管形成等起到重要作用,这其中就包括 MC。早在 1871 年,MC 就被免疫学者们所认识。MC 起源于髓系细胞,起初人们对 MC 的关注主要集中在过敏反应和抗寄生虫感染方面,而目前研究发现其功能是复杂多样的^[1,8,9]。现代的观点认为 MC 不仅在天然免疫中起作用,而且在适应性免疫中也起到了重要作用。近年来发现 MC 在自身免疫性疾病、移植反应、心血管疾病、肿瘤、糖尿病、肥胖等疾病中都起到重要作用^[1]。目前关于 MC 在肿瘤中的作用有两种观点,一种认为 MC 可以抑制肿瘤生长^[10-12],另一种则认为其有促进肿瘤生长的作用^[13-15]。

MC 的特性和功能的复杂性可能是 MC 在肿瘤微环境中作用差异的原因。本文研究发现胃癌组织中 MC 平均数目明显高于胃良性病变组织,提示 MC 参与重构胃癌肿瘤微环境,一方面可能通过与肿瘤

细胞直接相互作用影响肿瘤细胞某些基因表达甚至其生物学特性;另一方面微环境中的 MC 可受肿瘤微环境中其他免疫细胞或肿瘤细胞的影响,释放多种生物活性介质,形成利于肿瘤生长与转移的环境,如白三烯、组胺能增加血管通透性,利于肿瘤细胞转移。本文研究结果显示,高、中、低分化胃癌组织中的 MC 数目无明显差异,在组织分布方面亦无差别,但在细胞形态上部分病例标本存在差异,多数标本中 MC 成圆形或卵圆形,而少数标本中 MC 形态稍成梭形,这可能与 MC 功能状态有关或存在其他影响因素所致。目前关于 MC 与肿瘤关系的报道中较多论及其与各临床资料间的关系,一些研究者^[6]认为其与肿瘤分期、淋巴结转移有关,还有学者^[16]认为其与肿瘤患者预后相关。但这些研究因诸多影响因素而存在争议。本文研究探讨胃癌患者年龄构成、性别构成、肿瘤分期及浸润深度、分化级别、有无局域淋巴结转移、有无神经、脉管浸润各方面临床资料与 MC 间的关系,发现年龄构成与 MC 数目有明显的相关性,而其他各方面与 MC 数目均无明显关系。可能存在的原因有:研究样本过少造成数据统计无明显差异;患者经过治疗或合并存在其他疾病影响肿瘤中 MC 迁移趋化;MC 在肿瘤微环境中的主要区别在于其分布及功能状态;有研究^[17]显示 MC 在肿瘤的始发阶段起重要作用,肿瘤后期则作用不太。

来自骨髓造血祖细胞的 MC 具有高度异质性,

由于微环境作用,可使 MC 的表现型发生变化,分化为不同亚型的 MC,其胞浆颗粒所含成分不同,故不同物质的释放可能对肿瘤产生不同的影响,这可能是肿瘤研究与动物模型研究存在差异的主要原因。深入研究肿瘤微环境中 MC 的可塑性、异质性及其分泌的生物活性物质所引起的生物学效应,将有助于进一步了解 MC 与肿瘤生长的关系。

本文研究初步证实 MC 参与重构肿瘤微环境,影响肿瘤的形成与发展,但涉及的分子机制尚待进一步探讨。此外,本文研究样本例数较少,存在一定局限性,加大样本量将有助于我们更好认识 MC 在不同肿瘤微环境中的功能作用,也为肿瘤的生物免疫治疗提供更广阔的思路。

4 参考文献

- 1 Trinchieri G. Cancer and Inflammation: An Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30: 677-706.
- 2 Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2012, 21: 309-322.
- 3 Rodewald HR, Feyerabend TB. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction? *Immunity*, 2012, 37: 13-24.
- 4 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
- 5 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1889, 1: 571-573.
- 6 Oshima H, Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 2012, 47: 97-106.
- 7 Theoharides TC, Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol*, 2004, 25: 235-241.

- 8 Sayed BA, Christy A, Quirion MR, et al. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol*, 2008, 26: 705-739.
- 9 Christy AL, Brown MA. The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity. *J Immunol*, 2007, 179: 2673-2679.
- 10 Sinnamon MJ, Carter KJ, Sims LP, et al. A protective role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 2008, 29: 880-886.
- 11 Fleischmann A, Schlomm T, Köllermann JK, et al. Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis. *The Prostate*, 2009, 69: 976-981.
- 12 Rajput AB, Turbin DA, Cheang MC, et al. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4444 cases. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107: 249-257.
- 13 Soucek L, Lawlor ER, Soto D, et al. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med*, 2007, 13: 1211-1218.
- 14 Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19977-19982.
- 15 Ribatti D, Finato N, Crivellato E, et al. Angiogenesis and mast cells in human breast cancer sentinel lymph nodes with and without micrometastases. *Histopathology*, 2007, 51: 837-842.
- 16 Khazaie K, Blatner NR, Khan MW, et al. The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30: 45-60.
- 17 Gounaris E, Erdman SE, Restaino C, et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19977-19982.

(收稿日期: 2012-07-20)

(本文编辑: 杨军)

(上接第 176 页)

- studies on thymidine kinase and its sioenzymes in Ehilich ascites tumor cells. *Cell Prolif*, 1991, 24: 3-14.
- 5 庞津敏, 岑千红, 熊晓燕. 胸苷激酶 1 及其在乳腺癌中的研究进展. *中国妇幼保健*, 2009, 24: 4188-4190.
 - 6 李春海. 肿瘤标志学基础与临床. 军事医科出版社, 2008: 57.
 - 7 He Q, Skog S, Wang N, et al. Characterization of a peptide antibody against C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine ki-

nase, which is marker for cell proliferation. *Eur J Cell Biol*, 1996, 70: 117-124.

- 8 He Q, Zou L, Zhang PA, et al. The clinical significance of thymidine kinase 1 measurement in serum of breast cancer patients using anti-TK1 antibody. *Int J Biol Markers*, 2000, 15: 139-146.

(收稿日期: 2012-04-01)

(本文编辑: 李霖)