

[文章编号 1000-1182(2004)02-0103-03

口腔鳞癌中树突状细胞的免疫组化分析

王志勇¹, 李声伟¹, 胡勤刚², 田卫东¹

(1. 四川大学华西口腔医院 颌面外科, 四川 成都 610041;

2. 南京大学医学院附属口腔医院 外科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的 通过分析口腔鳞癌中浸润性树突状细胞的特征性表型,以探讨其在肿瘤微环境中的功能状态。方法 选择未经任何非手术治疗的初发口腔鳞癌患者标本 34 例作为实验组,30 例口腔正常粘膜组织作为对照组。通过免疫组化技术标记组织中树突状细胞(DC)的 CD1a,HLA-DR 和 CD83 抗原,观察两种组织中的 DC 表达 3 种抗原的状况,结果进行统计学分析。结果 所有病例均未见明显 CD83⁺ DC,但均有 CD1a⁺ DC,其在口腔鳞癌组织中的浸润程度低于正常口腔粘膜组织,差异有显著性($P < 0.05$)。在口腔鳞癌组中有 27 例癌实质内的 DC 表达 HLA-DR 抗原,其 HLA-DR 的阳性表达率为 79.41%。结论 口腔鳞癌组织中的 DC,其浸润程度下降并存在功能成熟障碍。

[关键词] 树突状细胞; 口腔癌; 免疫组化

[中图分类号] R 739.8 [文献标识码] A

Immunohistochemical Analysis of Dendritic Cell in Oral Squamous Cell Carcinoma WANG Zhi-yong¹, LI Sheng-wei¹, HU Qin-gang², TIAN Wei-dong¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital Affiliated College of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective** To elucidate the functional status of dendritic cells (DC) in the tissue of oral squamous cell carcinoma by analyzing characteristic phenotype of them. **Methods** 34 specimens from oral squamous cell carcinoma cases primarily treated with surgery were selected as test group. In addition, 30 specimens of normal mucosa from oral mucocele cases were used as control. Distribution of DC expressing CD1a⁺, HLA-DR⁺ and CD83⁺ in tumor tissue and normal mucous membrane was observed by immunohistochemistry. The number of DC expressing the antigens, which represented the density of DC infiltrating into tissue, was counted by microscope. The density of DC and the rate of DC expressing HLA-DR in oral carcinoma group and control were statistically compared. **Results** There was no CD83⁺ DC in all cases, but CD1a⁺ DC was found in all samples. The density of CD1a⁺ DC in tumor tissue was significantly lower than that in normal mucous membrane ($P < 0.05$). HLA-DR antigen expressed on the surface of DC in tumoral epithelium of 27-case carcinoma specimens and in normal mucous epithelium of 23 cases. The rate of HLA-DR positive expression of TIDC had no statistic significance between the two groups. **Conclusion** The lower density of DC infiltrating in tumor tissue might reflect the microenvironmental immunodeficiency of hosts with oral squamous cell carcinoma, and the functional mature of DC might be inhibited by the immunosuppressive action of oral squamous cell carcinoma.

[Key words] dendritic cell; oral carcinoma; immunohistochemistry

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知功能最强的抗原提呈细胞,其抗原提呈能力是其他抗原提呈细胞的 10~100 倍¹。诸多的研究证实,DC 能在体外摄取肿瘤抗原,并在体内激活初始 T 淋巴细胞产生抗原特异性,从而在肿瘤免疫中发挥至关重要的作用。然而,肿瘤宿主本身 DC 并没有激发机体免疫系统产生有效的抗肿瘤效应,说明肿瘤免疫抑制作用对 DC 有一定影响。因此,对肿瘤微环境中的 DC,即肿

瘤浸润性 DC(tumor infiltrating dendritic cell, TIDC)的研究有助于加深对肿瘤免疫逃逸机制的认识。本文采用免疫组化技术,对 34 例口腔鳞癌 TIDC 的特征性表型进行分析,以探讨口腔鳞癌 TIDC 在机体肿瘤免疫中的功能状态。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本收集 在南京市口腔医院 2001 年~2002 年收治的口腔鳞癌患者中,筛选出初发并且未经任何非手术治疗患者的手术切除标本 34 例,作为实验组。本组资料,男性 23 例,女性 11 例,平均年龄

[收稿日期 2002-12-31; 修回日期 2003-10-10

[作者简介]王志勇(1967-),男,江苏人,主治医师,博士

[通讯作者]胡勤刚, Tel: 025-3609574

55岁,年龄范围38~73岁。

另外,收集该院的口腔粘液腺囊肿的手术切除标本30例,以其携带的正常粘膜上皮作为对照组。所有标本均经HE切片复查并重新证实诊断。

1.1.2 主要试剂和设备 选用单克隆抗体:鼠抗人CD1a mAb(购自NeoMarkers公司,美国);鼠抗人CD83 mAb(购自Serotec公司,英国);鼠抗人HLA-DR mAb(购自NeoMarkers公司,美国)。免疫组化成套试剂盒(购自NeoMarkers公司,美国);0.25%胰蛋白酶(购自上海华精生物技术公司);国产家用微波炉(格兰仕公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本处理及切片制作 所有手术切除后的标本,均沿纵向剖开取材,经10%中性福尔马林固定后,石蜡包埋制成组织蜡块。将石蜡包埋好的组织块,制成4~5 μm厚的连续切片,置于60℃烘箱内烘烤6h以上备用。

1.2.2 免疫组化染色(S-P法) 操作步骤为:按有关试剂的产品说明书进行操作。简化其操作程序,常规脱蜡至水,滴加过氧化物酶阻断剂10min后行抗原修复。依次滴加封闭血清5min,一抗37℃、2h,生物素标记的二抗37℃、30min,链亲和素过氧化物酶液37℃、20min。每步骤后均用缓冲液(PBS或TBS)洗涤5min,DAB显色,苏木素复染,干燥,中性树胶封片。

抗原修复方法操作步骤为:针对CD1a,HLA-DR,CD83采用不同的抗原修复方法。CD1a于1mmol/L EDTA(pH8.0)修复液中,高压锅煮7.5min。HLA-DR,于PBS缓冲液中(pH7.4),微波加热4.5min(国产微波炉,750W,中高档火力)。CD83,于0.1%胰蛋白酶CaCl₂溶液中,37℃消化10min 20s。

实验对照:以PBS代替一抗作为阴性对照,以扁桃体组织作为阳性对照。

1.2.3 计数及统计方法 由3位病理科主治医师阅片。每张切片任意取DC分布最密集的5个区,在光镜高倍视野下(HPF ×40)计数CD1a阳性细胞的数目。以5个高视倍视野下CD1a阳性细胞平均数代表该标本切片中的DC浸润程度。采用成组资料样本均数的t检验统计分析实验组与对照组的DC浸润程度。结合形态观察每例标本的DC表达HLA-DR⁺的状况,以²检验比较两组HLA-DR阳性表达率。

2 结果

2.1 DC的形态与分布

在光镜下,DC的形态不规则,有长短不一的树状突起。在口腔粘膜组织中,DC主要位于上皮组织的

基底层和棘层中,分布比较均匀,散在(图1)。上皮深层的结缔组织内也有少量分布。在口腔鳞癌组织中,DC分布不均匀,常密集呈灶。在癌实质内,DC数量较多,其树状突起常与癌细胞密切接触(图2)。癌旁间质内DC,数量相对较少。

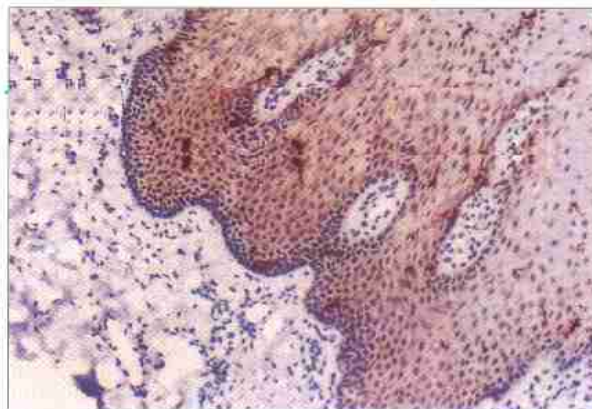


图1 正常黏膜组织中,DC主要位于上皮组织的基底层和棘层中,分布比较均匀,散在 免疫组化S-P法 ×10

Fig 1 Distribution of DC in normal mucous tissue SP ×10

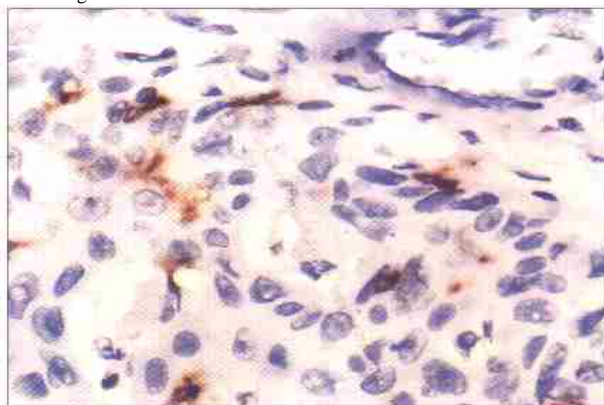


图2 口腔鳞癌组织中DC分布不均匀,常密集呈灶,其树状突起常与癌细胞密切接触 免疫组化S-P法 ×40

Fig 2 Distribution of DC in oral squamous cell carcinoma SP ×40

2.2 抗原表达状况

CD1a在所有被检测的组织中均有强阳性表达,表达部位为胞浆和胞膜。CD83在癌组织和正常口腔粘膜上皮均未见明确表达。

HLA-DR其特异性较差,但在粘膜上皮和癌实质内,结合形态分析,可以观察DC的HLA-DR表达状况。它表达于DC的胞膜;在34例癌组织中,有27例癌实质内存在HLA-DR⁺DC。30例正常口腔粘膜上皮中,有23例显示HLA-DR⁺DC。

2.3 DC浸润程度

2.3.1 CD1a⁺DC的浸润程度 CD1a阳性DC在口腔鳞癌组的浸润数目(HPF下)少于正常口腔粘膜组,其差异有显著性($P < 0.05$),结果见表1。

表1 口腔鳞癌组织与正常粘膜上皮中 CD1a⁺ DC 均数的比较

Tab 1 Comparison of CD1a⁺ DC mean between oral squamous cell carcinoma and normal mucosa

	HPF 下 DC 数目的均数	标准差
口腔鳞癌组	17.00	13.56
正常粘膜上皮组	24.40	11.63

$t = 2.013$ $P < 0.05$

2.3.2 DC 表达 HLA-DR 的状况 口腔鳞癌组的癌实质内浸润的 DC 表达 HLA-DR 的阳性率(HPF 下)较正常粘膜上皮者升高,但其差异无显著性($P > 0.05$)。结果见表 2。

表2 口腔鳞癌组织与正常粘膜上皮中 DC 的 HLA-DR 阳性表达率的比较

Tab 2 Comparison of the positive rate of DC expressing HLA-DR between oral squamous cell carcinoma and normal mucosa

	HLA-DR 阳性 表达例数	HLA-DR 阴性 表达例数	HLA-DR 阳性 表达率(%)
口腔鳞癌组	27	7	79.41
正常粘膜上皮组	23	7	76.67

$\chi^2 = 0.0703$ $P > 0.05$

3 讨论

DC 是目前已知功能最强的抗原提呈细胞。在体内,它经历不成熟到成熟的发育过程。随着发育成熟,DC 能表达一系列分化抗原,其中最直接与其功能有关的是 CD1a, MHC-I 类分子, HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD40 等。CD1a 是一种递呈脂类抗原的分子,目前被公认为 DC 的主要特征性标志,已广泛地应用于 DC 分离、纯化和体外培养的鉴定。笔者采用 CD1a 免疫组化技术标记 DC,结果表明,口腔鳞癌中 CD1a⁺ DC 的浸润程度明显低于正常口腔粘膜上皮。这一结果与 Lissoni 等² 的临床对照研究相似。他们发现癌症患者外周血中成熟和不成熟 DC 的百分比明显低于健康者。由于 DC 是唯一能够激活初始型 T 细胞增殖的抗原提呈细胞,而且 DC 表面 CD1a⁺ 抗原可调节 T 细胞间的相互作用。因此,在口腔鳞癌微环境中,CD1a⁺ DC 的缺乏反映了肿瘤具有抑制 DC 的浸润从而限制由其诱导的抗肿瘤细胞免疫反应。

CD83 属于免疫球蛋白超家族成员,它高表达于激活状态 DC 的表面,被认为是成熟 DC 的特异性标志³。HLA-DR 是 MHC-I 类分子,能与经胞内处理的抗原多肽结合而高表达于成熟 DC 的表面,以利于 DC 的抗原提呈。HLA-DR 的不表达或低表达说明 DC

提呈外源性抗原能力低下。CD83 的不表达表明无激活状态 DC 的存在⁴。本研究结果显示,在 34 例口腔鳞癌实质内有 27 例存在 HLA-DR⁺ DC,其阳性表达率为 79.41%,较正常口腔粘膜上皮内 DC 的 HLA-DR 表达率升高,但差异无显著性。在另一方面,笔者采用扁桃体组织作为阳性对照,在阳性对照均显示为阳性结果时,鳞癌组织和正常粘膜上皮中,未发现明显表达 CD83 的 DC。一般认为,正常黏膜中的 DC(也即是 Langerhans 细胞)是不成熟的 DC,通常不表达 CD83 抗原。至于肿瘤组织内的 DC,Chen 等⁵ 对肝癌的研究发现在肝癌结节中的 DC 不表达 CD83 抗原。这些结果与笔者的研究结果相一致。本研究结果说明,口腔鳞癌中浸润的 DC 经历肿瘤抗原刺激,产生一定程度的 HLA-DR 表达,但其表达程度并未达到有意义的高表达,而不表达 CD83 进一步表明口腔鳞癌中 T1DC 是非激活状态的不成熟 DC。Ishida 等⁶ 对荷瘤宿主这类 DC 的功能分析表明,其抗原摄取能力,迁移进入引流淋巴结以及刺激初始型 T 细胞的功能均被完全抑制。因此,这类 DC 存在功能成熟缺陷,因而难以完成其抗原提呈功能。

至于 T1DC 功能成熟缺陷以及浸润程度下降的可能机制,有实验研究证明:一、癌细胞可诱发 DC 的凋亡,从而导致 DC 在肿瘤微环境中的数量下降⁷,二、肿瘤细胞分泌的血管内皮生长因子,可于造血前体细胞水平抑制 Flt-3 扩增造血前体细胞和 DC 而导致荷瘤宿主 DC 的数量减少⁸,而且还可抑制 Flt-1 诱导 DC 转录因子 NF- κ B 的激活而致 DC 成熟程度降低和功能缺陷⁹。三、肿瘤分泌的其他一些因子,如 IL-10 可以抑制 DC 的分化成熟,下调共刺激分子的表达,并可抑制 DC 在肿瘤内的聚集¹⁰; TGF- β 可显著抑制 DC 的产生和 DC 的分化成熟¹¹。

综上所述,口腔鳞癌组织的 DC,其浸润程度下降,并存在功能成熟缺陷。这反映了口腔鳞癌对肿瘤微环境内 DC 免疫功能的抑制作用。

[参考文献]

- 1] Inaba K, Pack M, Inaba M, et al. High levels of a major histocompatibility complex self peptide complex on dendritic from the T cell areas of lymph node J. J Exp Med, 1997, 186(5): 665-672.
- 2] Lissoni P, Vigore L, Ferranti R, et al. Circulating dendritic cells in early and advanced cancer patients: diminished percent in metastatic disease J. J Biol Regul Homeost Agents, 1999, 13(4): 216-219.
- 3] Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily J. J Immunol, 1995, 154(8): 3821-3835.

(下转第 131 页)

本研究 74 例 RMS 患者治疗中采用了下述原则:在确诊的基础上,查清病变累及的范围和器官。在术中冰冻切片检查的监测下,尽量较广泛地切除原发病灶。术后配合放疗控制可能残余的病变,并可辅助化疗预防和治疗远处转移。

本研究的扩大切除是指按常规在原发肿瘤边界外 1 cm 的正常组织切除肿瘤外,对其邻接区的组织器官亦尽可能纳入切除范围。第一次手术的彻底性是影响预后的关键,RMS 原发灶治疗以区域性扩大切除为主。但手术治疗范围和方法应根据患者的年龄,肿瘤的大小、病理分型、临床分期、病变部位和临床生物学行为决定。通过对 74 例 RMS 患者的观察及随访,可见多形型分化最高却最少见,转移亦发生较晚,预后是最好的;胚胎型最常见且多见于 15 岁以前儿童及婴儿⁶,早期即沿血道和淋巴道引起广泛转移至肺、局部淋巴结、骨、肝、肾、胰等;腺泡型预后最差,发展快,早期就转移至肺、局部淋巴结、胸膜等。儿童患者的 RMS 多系胚胎型,加之患儿的体质弱,难以耐受大的手术,且手术切除对患儿的颌面部发育有较大的影响,因此一般采用放疗与化疗联合治疗,但效果较差;本研究 12 例婴幼儿患者复发高达 63%,而 5 年生存率仅为 42%。对于临床 I、II 期高分化,症状不明显的患者采用局部病灶切除术并补充适当剂量的放疗,其 5 年生存率最高,达到了 75%;对分化较差并有症状的患者,除采用扩大切除术并制定严格的放疗方案外,必要时配合化疗,5 年生存率也可达 71%,本研究随访的所有临床 I、II 期患者,复发仅为 25%,5 年生存率达到了 75%;临床 III、IV 期的患者入院时多已有远处转移,有手术指征者一般先采用术前辅助性化疗或放、化疗,使原发肿瘤缩小或转移灶得

到理想的控制后再行扩大切除,从而提高手术切除率、降低致残率;不具备手术指征的患者,则采用放疗或放、化疗来减缓肿瘤的生长,控制远位转移以延长患者的生存时间,但这些患者的 5 年生存率只有 41%,患者多死于远位转移导致的病情恶化,与 Hessa 等⁷和彭大为等⁸的报道相似。Golubicic 等⁹采用放疗治疗患者的 5 年生存率也同样较低。如何提高此类患者的 5 年生存率是目前研究的重点。

[参考文献]

- 1] 梁传余,罗清礼.头颈部横纹肌肉瘤(附 68 例分析)J. 华西医学,1997,12(2):203-204.
- 2] Salwa-Zurawska W, Biczysko WA. Usefulness of immunohistochemical testing and electron microscopy in the diagnosis of embryonal rhabdomyosarcomaJ. Med Sci Monit, 2002, 8(1):39-46.
- 3] 陈世范,马德选,应月强.电镜在横纹肌肉瘤诊治中的价值J. 安徽医科大学学报,1998,33(3):222-223.
- 4] 黄宝生.横纹肌肉瘤骨侵蚀 X 线表现(附 4 例报告并复习文献)J. 实用放射学杂志,1995,11(11):672-676.
- 5] Hagiwara A, Inoue Y, Nakayama T. The "botryoid sign": A characteristic feature of rhabdomyosarcomas in the head and neckJ. Neuro-radiology, 2001, 43(4):331-335.
- 6] 贾问炬.儿童口腔及颌面部胚胎性横纹肌肉瘤J. 华西口腔医学杂志. 1991,9(2):123-124.
- 7] Hessa A, Schroder U, Schroder R. Rhabdomyosarcoma in the area of the head-neck: A synopsis of some cases, therapeutic possibilities and prognosesJ. Laryngorhinootologie, 1998, 77(10):557-563.
- 8] 彭大为,沙允文.横纹肌肉瘤 57 例临床分析J. 江苏医药, 1990,16(6):316-317.
- 9] Golubicic I, Nikitovic M, Bokun J. Role of radiotherapy in combined therapy of soft tissue sarcoma in children and adolescentsJ. Sp Arh Celok Lek, 2000,128(5-6):172-178.

(本文编辑 邓本姿)

(上接第 105 页)

- 4] 王正昕,曹雪涛.肿瘤浸润性树突状细胞的研究进展J. 国外医学免疫学分册, 1998,21(6):326-329.
- 5] 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 hepatocarcinogenesisJ. Cancer Lett, 2000,148(1):49-57.
- 6] Ishida T, Oyama T, Carbone DP, et al. Defective function of Langerhans cell in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitorsJ. J Immunol, 1998, 161(9):4842-4851.
- 7] Pirtskhalashvili G, Shurin GV, Gambotto S, et al. Transduction of dendritic cell with Bcl-xL increase their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in miceJ. J Immunol, 2000, 165(4):1956-1964.
- 8] Ohm JE, Shurin MR, Esche C, et al. Effect of vascular endothelial growth factor and Flt3-ligand on dendritic cell generation *in vivo*J. J Immunol, 1999, 163(6):3260-3268.
- 9] Oyama T, Ran S, Ishida T, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor- κ B activation in hemopoietic progenitor cellsJ. J Immunol, 1998, 160(3):1224-1232.
- 10] Grolomoni G, Riccioni-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapyJ. J Immunol Today, 1997, 18(3):102-104.
- 11] 张毅,武汉磐,张雁云,等.转化生长因子 β 对鼠造血祖细胞产生树突状细胞的调控作用J. 中华医学杂志,1999,79(3):178-180.

(本文编辑 王 晴)