

CD3⁺T 淋巴细胞在膀胱癌肿瘤上皮与癌旁尿路上皮中的分布差异研究

詹 辉, 王剑松, 武城闯, 王海峰, 丁明霞, 柯昌兴

(昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 云南省泌尿外科研究所, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 观察 CD3⁺T 淋巴细胞在膀胱癌肿瘤上皮及癌旁正常尿路上皮中的分布差异, 并探讨其意义。**方法** 收集膀胱癌手术病例 28 例, 术后取其膀胱癌组织标本及癌旁正常组织标本, 采用免疫组织化学方法观察肿瘤上皮及癌旁正常尿路上皮中 CD3⁺T 淋巴细胞的数量及分布, 计数 2 种上皮内的 T 淋巴细胞数量并比较其差异。**结果** 在癌旁正常尿路上皮内可见较多的 T 淋巴细胞分布; 而在肿瘤上皮中则少见 T 淋巴细胞分布, 癌旁正常尿路上皮组每 5 个典型 200 倍视野中的上皮内 T 淋巴细胞平均数为 (15 ± 4.5) 个, 肿瘤上皮组则为 (4 ± 2.2) 个, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 膀胱癌肿瘤上皮与癌旁正常尿路上皮中 CD3⁺T 淋巴的分布存在着差异, 这一现象可能与膀胱癌的免疫逃避机制及预后相关, 值得进一步的深入研究。

[关键词] 尿路上皮癌; 癌旁组织; CD3⁺T 淋巴细胞; 分布

[中图分类号] R737.14 [文献标识码] A [文章编号] 2095 - 610X (2014) 01 - 0028 - 04

Distributional Difference of CD3⁺T Lymphocyte in Tissue of Bladder Cancer and Epithelium of Paracancer Area

ZHAN Hui, WANG Jian - song, WU Cheng - chuang, WANG Hai - feng, DING Ming - xia, KE Chang - xing
(The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, The Urological Institute of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to observe the distribution of CD3⁺T lymphocyte in the tissue of bladder cancer and epithelium of paracancer area, and analyze the significance. **Methods** Biopsy was performed in 28 patients with bladder cancer, and the distribution and number of CD3⁺T lymphocyte in tissue of bladder cancer and epithelium of paracancer area were observed and compared using immunohistochemistry. **Results** Many of CD3⁺T lymphocytes could be observed in the epithelium of paracancer tissues, but CD3⁺T lymphocytes in cancer nests was few. The average number of CD3⁺T lymphocytes in every 5 typical microscope visual fields of paracancer tissues and cancer nests was 15 ± 4.5 and 4 ± 2.2, respectively, and the difference was significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Distribution of CD3⁺T lymphocytes in bladder cancer nests and paracancer tissues was different, which may be related to the immune escape and prognosis of bladder cancer. It is worthy of further research.

[Key words] Urothelium carcinoma; Paracancer tissues; CD3⁺T lymphocyte; Distribution

恶性肿瘤的免疫逃避机制近年来日益受到研究者关注, 研究发现恶性肿瘤细胞通过诱导机体产生一系列的免疫抑制细胞、细胞因子或信号通路使得肿瘤细胞可以逃避机体免疫系统的监视及清除而长期在体内存活下去。肿瘤细胞诱导的机体免疫主要

为细胞免疫, 而 T 淋巴细胞在其中扮演着重要的作用, 为了解 T 淋巴细胞在膀胱癌肿瘤上皮及癌旁正常尿路上皮中的分布差异, 笔者设计进行了本研究。

[基金项目] 云南省卫生厅科技处内设机构基金资助项目 (2011WS0082)

[作者简介] 詹辉 (1977 ~), 男, 云南保山市人, 医学博士, 讲师, 主要从事泌尿系统疾病的诊断与治疗工作。

[通讯作者] 王剑松. E-mail: jiansongwang@yahoo.com

1 资料与方法

1.1 一般资料

共纳入2011年1月至2011年10月于昆明医科大学第二附属医院行膀胱癌膀胱全切手术的病例28例,所有病例术后病理检查均诊断为膀胱尿路上皮癌,其中I级21例,II级6例,III级1例。

1.2 方法

免疫组化法:于术后分别取其膀胱癌组织标本及癌旁正常组织标本,制作成病理切片后,采用免疫组织化学方法观察肿瘤上皮及癌旁正常尿路上皮中CD3⁺T淋巴细胞的数量及分布特点。每张切片选取5个典型的200倍视野,计数每个视野中上皮内浸润的T淋巴细胞(CD3⁺淋巴细胞)数量并相加,然后分别计算2组(肿瘤上皮组及癌旁正常尿路上皮组)的均数并比较其差异。

1.3 统计学方法

采用SPSS统计学软件对结果进行分析,对2

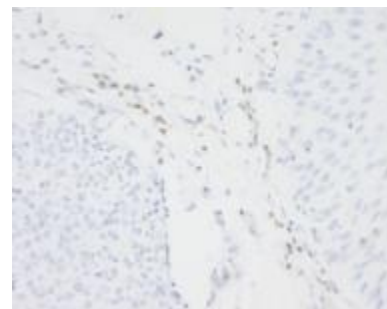
组计数资料采用配对 t 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在病理切片中CD3⁺T淋巴细胞呈棕色染色,在癌旁组织内可见较多的T淋巴细胞向上皮内浸润,并可见到间质内有较多的T淋巴细胞聚集于上皮基底层下,并与基底层紧密接触,这一现象在癌旁正常上皮内普遍存在,而在肿瘤组织中则少见。T淋巴细胞向癌巢内浸润,且间质内的T淋巴细胞常与肿瘤上皮基底层保持一定的距离(图1),在肿瘤上皮组中仅有1例出现T淋巴细胞聚集于癌巢周围,并有癌巢内T淋巴细胞浸润的现象(图2)。癌旁正常尿路上皮组每5个200倍典型视野中的上皮内浸润T淋巴细胞平均数为 (15 ± 4.5) 个,肿瘤上皮组每5个200倍典型视野中的癌巢内浸润T淋巴细胞平均数为 (4 ± 2.2) 个,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



A (200×)



B (200×)

图1 T淋巴细胞在膀胱癌肿瘤上皮与癌旁正常上皮的分布

Fig. 1 Distribution of CD3⁺T lymphocyte in tissue of bladder cancer and epithelium of paracancer area

A:癌旁正常尿路上皮,可见较多棕色染色的T淋巴细胞浸润于尿路上皮内;

B:图为膀胱癌肿瘤上皮,可见棕色的T淋巴细胞位于癌巢之外,肿瘤上皮内几乎不见浸润。

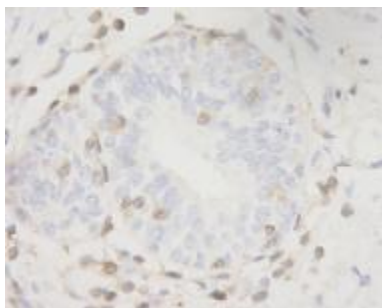


图2 膀胱癌肿瘤上皮组中唯一的1例T淋巴细胞聚集于癌巢周围并向肿瘤上皮内浸润(400×)

Fig. 2 Only one case in the cancer tissues group with many of T lymphocyte (brown) in the cancer tissues (400×)

3 讨论

细胞免疫是机体对恶性肿瘤的主要免疫反应形式,而T淋巴细胞在细胞免疫中发挥着主要的作用。淋巴细胞与肿瘤细胞之间的相互作用复杂而多样,研究发现肿瘤组织中浸润的淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)在体外培养扩增诱导后,可发挥特异性的杀灭肿瘤细胞的作用。有研究者应用TIL静脉回输并联合IL-2、CTX治疗恶性黑色素瘤,可使肿瘤达到部分或完全消退^[1-3]。Rosenberg实验室采用TIL对化疗无效的晚期恶性黑色素瘤患者行免疫替代疗法治疗,达到了部分缓

解的结果^[9]。尽管细胞免疫疗法在肿瘤治疗中取得了令人振奋的效果,但是研究者也发现在很多患者的肿瘤组织内,虽然有大量的淋巴细胞浸润,却并未对肿瘤的生长产生抑制作用,因此认为肿瘤组织或细胞中可能存在着抑制机体免疫系统发挥抗肿瘤作用的机制。而近年来的研究发现,肿瘤细胞可以通过诱导机体产生免疫抑制细胞(如 Treg 细胞、髓源性抑制细胞)、具有免疫抑制功能的细胞因子或是诱导免疫细胞凋亡等机制来对抗机体的抗肿瘤免疫,使肿瘤细胞得以逃避机体的免疫监视作用而存活下来^[4-6]。而在目前的研究中,关于肿瘤对 T 淋巴细胞在组织内分布影响的研究较为少见,为了解膀胱癌对 T 淋巴细胞在肿瘤组织及癌旁正常尿路上皮中的分布有无影响,笔者设计进行了本研究,由于 CD3 是 T 淋巴细胞共有的标记物,因此笔者在本研究中主要观察 CD3⁺ 的 T 淋巴细胞。

本研究中笔者在膀胱癌组织及癌旁组织中观察到了 T 淋巴细胞分布的有趣现象,在癌旁组织内可见较多的 T 淋巴细胞向上皮内浸润,并可见到间质内有较多的 T 淋巴细胞聚集于上皮基底层下,并与基底层紧密接触,这一现象在癌旁正常上皮内普遍存在;而在肿瘤组织中则少见 T 淋巴细胞向癌巢内浸润,且间质内的 T 淋巴细胞常与肿瘤上皮基底层保持一定的距离,在 2 组病例中,上皮内浸润的 T 淋巴细胞在数量上存在明显的统计学差异,肿瘤组织表现出了一种对 T 淋巴细胞的“排斥性”,而这种“排斥性”可能在膀胱癌的免疫逃避机制中发挥着值得关注的作用。

目前关于肿瘤上皮对 T 淋巴细胞所表现出的“排斥性”的相关研究尚少,结合以往的报道,这种“排斥性”的机制可能与以下几个方面相关:(1)肿瘤组织通过某些机制消灭了浸润入肿瘤上皮内的淋巴细胞。近年来许多研究^[7,8]均发现并证实肿瘤细胞膜有 Fas 和(或) Fas L 蛋白表达,其 Fas L 能与 TIL 的 Fas 结合,启动 T 细胞内凋亡信号,通过诱导细胞凋亡来清除 T 细胞。而肿瘤细胞膜的 Fas 却对 T 淋巴细胞的 Fas L 结合后的敏感性低。基于这一认识,有作者^[9]提出了癌细胞反攻模式,即癌细胞尽管有 Fas 受体,激活的 T 细胞 Fas L 能与其结合,但不能启动凋亡,而癌细胞膜的 Fas L 反能结合于激活 T 细胞上的 Fas 受体,使 T 细胞凋亡,从而允许肿瘤生长,并促进肿瘤的浸润及转移^[10]。因此这种肿瘤反攻模式的存在可能导致浸润入肿瘤上皮中的淋巴细胞数量明显减少。然而,也有研究发现在癌旁组织中也可是有高水平的 Fas L 表达,并可诱导该处的淋巴细胞凋亡,因此

这一机制对淋巴细胞在肿瘤上皮与癌旁上皮中分布差异的影响有待进一步的研究明确;(2)肿瘤组织有可能通过某一种或几种影响淋巴细胞迁移的机制阻止了 T 淋巴细胞向肿瘤上皮内的浸润。淋巴细胞迁移的机制包括粘附分子、细胞因子、趋化因子、蛋白酶等多种因子的作用,而肿瘤组织有可能通过对这些因子产生影响来阻止了 T 淋巴细胞向肿瘤上皮内的浸润,从而使肿瘤细胞逃脱了免疫系统的监视与清除。

此外在本研究中,癌巢组有 1 例病例出现了明显包绕并浸润癌巢的 T 淋巴细胞,此既肿瘤组织浸润的淋巴细胞(TIL)。以往研究表明,有明显肿瘤浸润淋巴细胞的患者,其预后往往好于无明显 TIL 的患者^[11-14],而笔者的观察表明,这种现象在膀胱癌标本中并不多见,这一现象的存在与膀胱癌患者预后之间的关系值得进一步研究探讨。

本研究表明,膀胱癌肿瘤上皮与癌旁正常尿路上皮中 T 淋巴的分布存在着差异,这一现象可能与膀胱癌的免疫逃避机制及预后相关,值得进一步的深入研究。

[参考文献]

- [1] ROSENBERG S A, RESTIFO N P, YANG J C, et al. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(4): 299 - 308
- [2] HEEMSKERK B, LIU K, DUDLEY M E, et al. Adoptive c-ell therapy for patients with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2[J]. *Hum Gene Ther*, 2008, 19(5): 496 - 510.
- [3] ROSENBERG S A, DUDLEY M E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma[J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2): 233 - 240.
- [4] YOUNG J I, NAGARAJ S, COLLAZO M, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice [J]. *J Immunol*, 2008, 181(8): 5791 - 5802.
- [5] KUSMARTSEV S, NAGARAJ S, GABRILOVICH D I. Tumor associated CD8⁺ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells [J]. *J Immunol*, 2005, 175(7): 4583 - 4592.
- [6] KELSEN J. Regulatory T cells and their importance to human illnesses[J]. *Ugeskr Laeger*, 2006, 168(4): 32 - 37.
- [7] MAHMOOD Z, SHUKLA Y. Death receptor: targets for cancer therapy [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(6): 887 - 889.
- [8] HOUSTON A M, MICHAEL ROBINSON J M, WALSH M-

- D, et al. The "Fas counterattack" is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability [J]. *Hum Pathol*, 2007, 39(2): 243 - 250.
- [9] BULER L M, HEWETT P J, BUTLER W J, et al. Down-regulation of Fas expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(9): 1454 - 1459.
- [10] STEINMAN R M, COHN Z A. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organ of mice. V. Purification of spleen dendritic cells. New surface markers, and maintenance in vitro [J]. *Exp Med*, 1979, 149(1): 1 - 16.
- [11] FUKUNAGA A, MIYAMOTO M, CHO Y, et al. CD8⁺ Tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma [J]. *Pancreas*, 2004, 28(1): 26 - 31.
- [12] 徐芳英, 董健康, 朱益民, 等. 结直肠癌独立预后因素: TNM 分期、肿瘤芽、神经周围侵犯、癌旁淋巴细胞浸润和尿糖 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(5): 366 - 369.
- [13] 周坚, 杨清元, 罗小琴. HLA-DR 表达与卵巢癌临床病理及预后的关系 [J]. *海南医学院学报*, 2005, 11(3): 173 - 176.
- [14] 欧宗兴. 重组白介素-2 治疗恶性胸腔积液 [J]. *海南医学院学报*, 2000, 6(1): 10 - 11.

(2013 - 11 - 14 收稿)

(上接第 24 页)

是能合成和分泌 ALP, ALP 活性是成骨细胞的一个重要标志^[7]. 经 ALP 染色后呈阳性, 符合成骨细胞的生物学特性. 成骨细胞作为特殊钙化组织的主要功能细胞, 有别于其他类型细胞的生物学特性, 细胞汇合后细胞堆积生长, 发生胶原堆积和钙盐沉积, 能形成钙化结节, 经茜素红染色呈阳性, 符合成骨细胞的生物学特性. 所以, 钙化节结的形成是体外培养成骨细胞的又一个重要的生物学特性^[8].

本实验的细胞 ALP 染色、钙化节结染色均呈阳性反应, 显示所培养细胞具有较强的 ALP 活性以及钙化能力. 以上证实, 本实验所获得的细胞具有体内成骨细胞的形态学特征、生物学行为和成骨潜能, 为进一步研究髌突改建的机制中成骨细胞的作用打下了良好的基础.

本实验成功培养出新生 SD 大鼠髌突软骨下骨成骨细胞, 为进一步研究成骨细胞在髌突改建中的作用机制, 从细胞水平上研究提供了充足、可靠的靶细胞.

[参考文献]

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 第 2 版, 西安: 世界图书出版西安公司, 2007: 67.
- [2] 胡静, 郑洪新. 改良成骨细胞体外培养和鉴定方法 [J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(1): 76 - 78.
- [3] PECK W, BIRGE S J, FEDAK S A. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation [J]. *Science*, 1964, 14(6): 1476 - 1477.
- [4] MILLS B G, SINGER F R, WEINER L P, et al. Long-term culture of cells from bone affected by Paget's disease [J]. *Calcif Tissue Int*, 1979, 29(2): 79 - 87.
- [5] 钟近洁, 张东辉, 许永华, 等. 乳鼠成骨细胞的原代培养与鉴定 [J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(8): 669 - 672.
- [6] 鄂玲玲, 刘洪臣, 吴霞, 等. 改良大鼠下颌骨成骨细胞原代培养与鉴定 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2007, 5(4): 226 - 229.
- [7] LIN Y, TANAKA N, OHKUMA S, et al. Applying an excessive mechanical stress alters the effect of subchondral osteoblasts on chondrocytes in a coculture system [J]. *Eur J Oral Sci*, 2010, 118(2): 151 - 158.
- [8] 李忠, 杨柳, 戴刚, 等. 关节镜下半月板部分切除制备骨关节炎动物模型 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(10): 919 - 921.

(2013 - 10 - 14 收稿)