

口腔粘膜鳞癌的局部免疫状况分析

廖贵清, 黄洪章

(中山医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

摘要:【目的】从免疫活性细胞表型特征的角度探讨口腔鳞状细胞癌(以下简称鳞癌)原发灶的局部免疫状况及其与肿瘤分化程度的关系。【方法】按一定的纳入标准在60个病例中筛选出16例口腔癌患者,取原发灶标本作冰冻连续切片,厚度 $6\sim 8\mu\text{m}$,分别用抗 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 、 CD_{16} 及 CD_{25} 单抗按ABC法染色,然后镜下观察及计数。【结果】①免疫细胞主要集中在肿瘤间质中,位于肿瘤与正常组织交界区,呈带状分布;有时可见淋巴滤泡,但阳性细胞主要分布于滤泡周围;② CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_{16}^+ 和 CD_{25}^+ 阳性细胞分布情况基本相似,主要位于癌巢周围,但 CD_8^+ 与其他细胞不同,主要散在分布癌巢中;③肿瘤分化程度越高,免疫细胞数量越多,活性越强。【结论】口腔鳞癌原发灶局部存在一定的免疫功能,但这种免疫功能处于被抑制状态,肿瘤分化程度越低,抑制作用越强。

关键词: 癌, 鳞状细胞/免疫学; 口腔肿瘤/免疫学; 淋巴细胞, 肿瘤浸润; 免疫表型分型

中图分类号: R739.87 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04-0253-03

Analysis on Phenotypes of Tumor Infiltrating Lymphocytes from Oral Squamous Cell Carcinoma Patients

LIAO Gui-qing, HUANG Hong-zhang

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objectives】 To analyse the local immunologic response in oral squamous cell carcinoma (SCC) patients and investigate the relationship between degree of tumor differentiation and immunoactivities by examining the phenotypes of infiltrating lymphocytes in situ. 【Methods】 16 patients from 60 cases with oral SCC, which were not given any preoperative treatment, were selected. Frozen continuous slides, obtained from the surgical specimen of primary tumor, were analyzed immunohistochemically using the ABC method with monoclonal antibodies (Anti- CD_3 、 CD_4 、 CD_8 、 CD_{16} and CD_{25}). 【Results】 ① All types of lymphocytes infiltrated in the tumor stroma, mostly located in the connecting zone between tumor and normal tissue in clumps, sometimes in lymphatic follicles. ② CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_{16}^+ and CD_{25}^+ cells had the same infiltrating pattern, but CD_8^+ , different from the others, usually scattered into the cancer nest. ③ The number of tumor-infiltrating lymphocytes was associated with the degree of tumor differentiation. 【Conclusion】 Patients with oral SCC exist significant local immunologic response to tumor, but this activities was inhibited by tumor tissue.

Key words: carcinoma, squamous cell/immunology; mouth neoplasms/immunology; lymphocytes, tumor-infiltrating; immunophenotyping

机体免疫功能的变化与体内肿瘤发生发展有密切关系,口腔及头颈部器官发生肿瘤最明显的免

疫学改变是细胞免疫功能下降。有人发现^[1],与其他部位恶性肿瘤相比,口腔及头颈部癌宿主细胞免

收稿日期: 1999-12-30

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(984219.990089)

作者简介: 廖贵清(1963-),男,江西吉安人,医学博士,副主任医师,主要研究头颈肿瘤的生物治疗;黄洪章,博士导师,教授

疫受损更明显,以往多数学者对其研究主要集中在形态和数量。近年来,已发展到利用抗淋巴细胞单克隆抗体,针对其表面特异性分化抗原进行分型及功能性识别。末稍血中淋巴细胞及亚群虽然可反映机体免疫调节的总体状态,但对口腔癌原发灶局部组织细胞免疫状态的分析能更深入地认识机体防御功能的改变,因而,利用淋巴细胞分化抗原进行肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)分型及功能状态研究具有特殊意义。以往,我们曾将原发灶中的TIL分离出来进行分型及功能研究^[2],本文着重研究TIL的原位分布状态及功能特点,为进一步利用口腔癌的局部免疫功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 检测对象

选取临床诊断为口腔癌的病人,在活检时留取标本液氮保存。取材部位为正常组织与肿瘤组织交界区。病例纳入标准:①有完整的病历记载;②原发灶直径2~4 cm,而且未涉及两个或两个以上的解剖区,临床分类为T₃;③病理诊断为鳞状细胞癌,有病理分级;就诊前未作任何抗癌治疗;④患者无系统性疾病及免疫性疾病;⑤未使用过任何激素类药物和免疫制剂。

在近60例病例中,按以上标准筛选出16例进行研究,其中男性10例,女性6例,年龄50~65岁,平均年龄58.5岁;病变部位:舌癌8例,颊癌4例,口底癌2例,腭癌2例;病理分级:I级8例,II级5例,III级3例。

1.2 主要材料

单抗CD₃、CD₄、及CD₈(武汉生物制品研究所产品);单抗CD₁₆、CD₂₅(Becton Dickinson公司产品);生物素标记的兔抗鼠IgG,卵白素DH及生物素标记的过氧化物酶(Vector公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 冰冻切片 16例病人标本均以冰冻切片机连续切片,厚度6~8 μm,4℃丙酮固定10 min。

1.3.2 染色方法 将切片裱于涂有乳胶的清洁玻片上,经60℃处理24 min,37℃处理24 min;梯度酒精95%、80%、75%各处理3 min;PBS洗3 min,0.05%胰蛋白酶37℃消化20 min;PBS洗3 min,0.3% H₂O₂ 甲醇25℃处理20 min;PBS洗3 min,70%山羊血清37℃处理15 min,待干后直接滴加一抗,37℃反应60 min;PBS洗3 min,加生物素化二抗,37℃反应40 min;PBS洗3 min,ABC复合物,37℃处理40 min;PBS洗3 min,0.04% DAB,0.03% H₂O₂ 显色5~12 min,清水终止反应;苏木素衬染5~10 min,1%盐酸酒精分色,1/500氨水还原;80%、95%、100%酒精梯度脱水各1 min,二甲苯1~2 min透明;加拿大胶封片。相同方法进行淋巴结淋巴细胞染色,作阳性对照。

1.3.3 镜下观察及阳性细胞计数 先用低倍镜观察,在肿瘤组织间质中找出淋巴细胞分布区,选淋巴细胞浸润最多处,换成高倍(×400)镜,按前、后、左、右、中移动切片一小格,计5个高倍视野的阳性细胞平均数。

2 结果

2.1 T细胞分布情况

T细胞及各亚群主要集中在肿瘤组织的间质中,表现为带状分布;有时可见淋巴滤泡,但阳性细胞位于淋巴滤泡周围,在滤泡内数量极少或无;在癌巢中也可见阳性细胞,但数量较少,呈散在分布。

2.2 T细胞及各亚群数量与肿瘤分化程度关系

总体来看,肿瘤组织分化程度越高,淋巴细胞总数及各亚群数越多(表1)。CD₂₅⁺细胞代表T细胞被激活,其数量低表明TIL大多处于无活性或被抑制状态。

表1 肿瘤分化程度与TIL各亚群表达的关系
Table 1 Relationship between tumor differentiation degree and distribution of TIL

Degree of tumor differentiation	CD ₃ ⁺ cells	CD ₄ ⁺ cells	CD ₈ ⁺ cells	CD ₁₆ ⁺ cells	CD ₂₅ ⁺ cells
I	60±20	30±15	20±10	20±15	25±20
II	15±10	8±4	10±25	6±4	7±5
III	10±5	4±2	3±1	6±3	5±3

1) Group I compared with group II, $P < 0.05$ in each phenotype; 2) Group I compared with group III, $P < 0.01$ in each phenotype; 3) Group II compared with group III, $P < 0.05$ in CD₃⁺ cells and CD₄⁺ cells, $P > 0.05$ in the other phenotypes

3 讨论

有资料表明,正常口腔粘膜及结缔组织中无淋巴细胞浸润,口腔肿瘤组织中淋巴细胞的出现代表了机体对肿瘤发生后的反应,具有潜在杀伤活性,在一定程度上限制肿瘤的发展^[3,4]。本研究观察发现,淋巴细胞在肿瘤组织的分布有一定规律性,肿瘤间质中淋巴细胞分布较多,呈带状或簇状,接近癌巢;然而在癌巢内,淋巴细胞极少,有的甚至无淋巴细胞浸润。同时,在浸润的淋巴细胞中,大部分处于无活性或抑制状态($CD_3^+ CD_{25}^-$),这反应肿瘤细胞在受到机体免疫攻击时,也可能对机体施以一定的作用。可能通过某些机制(如分泌 TGF- β)使肿瘤局部的免疫功能衰竭或被抑制。这样,机体免疫效应细胞和肿瘤细胞就处于一种相互作用、相互抑制的状态,这种状态的改变与肿瘤消长有密切关系^[5~7]。

肿瘤组织中淋巴细胞浸润的程度与肿瘤分化程度关系尚不完全清楚。有研究认为,分化程度越低,其分泌的免疫抑制因子越多,免疫抑制作用越强。Finke 等研究 TIL 时,发现其表面 T 细胞受体(TCRs)和 P56^{lck}明显减少或缺乏,并且其丢失与 TIL 增殖活性有关,丢失越多,增殖越慢。本研究也发现,肿瘤分化程度越低,TIL 数量和功能越低。

TIL 是由不同亚群细胞组成的集合体,按其细胞表面的分化抗原不同可分为多个亚群,其中主要有 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_{16}^+ 及 CD_{25}^+ 细胞等。各亚群细胞在不同条件下有不同数量比例,并在一定条件下保持平衡,从而保存了机体免疫稳定性。然而,在肿瘤组织中各亚群的平衡被打破。本研究发现 TIL 中 CD_8^+ 细胞大量增加,导致 CD_4/CD_8 比值下降,而且肿瘤分化程度越低,比值也越小。

CD_{16}^+ 主要为自然杀伤(NK)细胞,是免疫监视的重要效应细胞,其功能特点是能杀伤表达弱抗原的肿瘤细胞。因为大多数人类肿瘤属弱抗原,故 NK 细胞具有广谱杀伤人类肿瘤的作用。有研究表明,NK 细胞主要分布在肿瘤组织中其他淋巴细胞之间,其数量与其他淋巴细胞总量成正比。本研究发现 NK 细胞多位于癌巢附近间质,癌巢内 NK

细胞远较间质少,在分化低的肿瘤中,癌巢内几乎无 NK 细胞。这表明,口腔鳞癌原发灶局部具有一定的自然免疫功能,但这种功能也可能受到来自肿瘤细胞的抑制。

CD_{25}^+ 的表达是淋巴细胞被激活的标志,胞膜上 CD_{25} 分子与 IL-2 结合是淋巴细胞增殖的重要条件,因此, CD_{25}^+ 的表达水平也可以反映 TIL 被激活的程度。本实验中,16 例标本有 5 例表达了较高水平的 CD_{25}^+ (大于 150 个阳性细胞/高倍视野),另 3 例表达较低(5~10 个阳性细胞/高倍视野),其他 8 例均未见 CD_{25}^+ 阳性细胞。同时发现, CD_{25}^+ 阳性细胞与肿瘤分化有关,分化程度越低 CD_{25}^+ 细胞越少。这也表明,多数口腔鳞癌(特别是低分化鳞癌)TIL 处于被抑制的静止状态。

参考文献:

- [1] 曹阳,陆昌语,张启平. 口腔鳞癌患者免疫功能测定及其临床意义[J]. 口腔颌面外科杂志,1994,4(1):18.
- [2] 廖贵清,毛祖,陈卓辉. 口腔癌 TIL 的表型及细胞毒活性测定[J]. 现代口腔医学杂志,1998,12(1):5.
- [3] Jan C W, San E F, Ian W M, *et al*. Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma[J]. Invest-ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(8): 2603.
- [4] List A F, Spier C M, Miller T P, *et al*. Deficient tumor infiltrating T-lymphocytes response in malignant lymphoma: relationship to HLA expression and host immunocompetence[J]. Leukemia, 1993, 7(3): 398.
- [5] Tucci M G, Offidani A, Lucarini G, *et al*. Advance in the advance of malignant transformation of keratinocytes: an immunohistochemistry study[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 1998, 10(2): 118.
- [6] Troy A J, Summers K L, Daridson P J, *et al*. Minimal recruitment and activation of dendritic cell within renal cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(3): 585.
- [7] Taylor D D, Gerceel T C. Tumor-reactive immunoglobulins in ovarian cancer: diagnostic and therapeutic significance? [J]. Oncol Rep, 1998, 5(6): 1519.

(编辑 刘清海)