

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.06.017

· 短篇论著 ·

吲哚胺 2,3-双加氧酶在肝癌组织的表达及其临床意义

Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

武亚娟^{1,2}, 王琦^{2*}, 武希润², 董胜利³, 刘晓丽⁴, 张晓琴⁴ (1. 山西省肿瘤医院 内科, 山西 太原 030001; 2. 山西医科大学第二医院 消化内科, 山西 太原 030001; 3. 山西医科大学第二医院 普外科, 山西 太原 030001; 4. 山西医科大学第二医院 病理科, 山西 太原 030001)

[摘要] 目的: 探讨吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)在原发性肝癌细胞、癌旁肝细胞及肿瘤浸润淋巴细胞中的表达及其临床意义。方法: 选择经临床确诊的 21 例原发性肝癌患者的手术切除和(或)肝穿刺所取肝癌组织及癌旁组织标本, 通过免疫组织化学染色法检测肝癌及癌旁组织 IDO 的表达, 并分析其与临床病理特征的关系。结果: IDO 在原发性肝癌细胞与肿瘤浸润淋巴细胞的表达水平相对较低, 在癌旁肝硬变细胞中表达明显增高($P < 0.01$)。IDO 表达强度与患者的年龄、性别、TNM 分期无关($P > 0.05$); 与患者大体病理分型有一定的相关性, 浸润型 IDO 表达强度较块状型明显增高($P < 0.05$); 有血管浸润及癌栓形成患者 IDO 也呈高表达状态($P < 0.05$); IDO 的表达还与病理组织学分化情况相关, 低分化肿瘤组织 IDO 的表达强度明显增高($P < 0.05$)。结论: IDO 的表达与肝细胞癌恶性有一定的相关, 故 IDO 拟可以作肝癌预后差的一个参考指标。

[关键词] 吲哚胺 2,3-双加氧酶, 肝癌, 病理特征; 预后

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0585-03

吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是肝脏以外唯一可催化色氨酸分子中吲哚环氧化裂解, 从而沿犬尿酸途径分解代谢的限速酶。IDO 表达增加可导致细胞微环境中色氨酸的耗竭, 使处于迅速分裂期的细胞或病原微生物, 如肿瘤细胞、T 细胞以及病毒、细菌等的增殖受到抑制^[1]。Ishio 等^[2]的研究提示, 在缺乏游离色氨酸的环境中活化的 T 细胞停滞于 G₁ 中期, 并且易发生凋亡。研究^[3-4]发现, 大量人肿瘤细胞株、实体肿瘤(宫颈癌、胃癌、结肠癌、黑色素瘤和胰腺癌等)及血液系统恶性肿瘤细胞都构成性地表达 IDO, 使局部 T 淋巴细胞增殖受抑, T 细胞活化信号转导受阻, 从而介导肿瘤细胞逃避免疫系统的攻击, 而 IDO 的抑制剂 1-甲基色氨酸(1-methyl tryptophan, 1-MT)能部分逆转这些作用。Kazuhiko^[6]认为抑制 IDO 的表达可能恢复子宫内膜癌患者的免疫功能。另有研究^[7-8]表明细胞中 IDO 的失调伴随 *Bin1* 基因的丢失可导致免疫逃逸从而促进肿瘤的发生; IDO 过表达与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)高转移率明显相关。

本研究通过免疫组化的方法分析 IDO 在肝细胞癌中的表达情况及其与患者临床病理特征的关系, 初步探讨 IDO 在肝细胞癌免疫抑制中的作用, 为肝癌的综合治疗寻求新靶点。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2006 年 3 月至 2007 年 8 月山西医科大学第二医院住院肝细胞癌患者 21 例, 其中 6 例为经手术切除组织确诊, 15 例皆是据其临床表现及相应的影像学检查和肝穿刺活检病理确诊。男性 20 例, 女性 1 例, 年龄 38~64 岁; HbsAg(+)19 例, 抗 HCV(+)2 例; 肝功能 Child-Pugh A 级 3 例, B 级 12 例, C 级 6 例; AFP > 500 ng/ml 6 例, 200~500 ng/ml 8 例, < 200 ng/ml 7 例; 结合手术后病理和(或)影像学资料, 弥漫型 3 例, 结节型 4 例, 小肝癌 3 例; 其中包膜完整 6 例, 有血管浸润 9 例, 合并门脉癌栓 4 例; TNM 分期: T1-4 期依次为 2、6、8、5 例; N 0-1 期分别为 15、6 例; M 0-1 期分别为 17、4 例。取距离肿瘤组织 1.5 cm 为癌旁肝组织。

1.2 免疫组化法检测肝癌及癌旁组织中 IDO 的表达

组织石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度酒精至水, 抗原修复, 山羊血清封闭。滴加 1:25 稀释绵羊抗人 IDO 多克隆抗体(CHEMICON 公司产品), 37℃ 孵育 2 h, 滴加二抗, DAB 显色, 显微镜下观察见棕黄色反应后终止, 苏木精衬染, 盐酸酒精分化, 蓝化, 中性树脂封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 免疫组化染色结果的判断

[作者简介] 武亚娟(1982-), 女, 山西省垣曲县人, 硕士研究生, 医师, 主要从事肝癌免疫治疗方面的研究, E-mail: wuyajuanwj@126.com

* Corresponding author. E-mail: wangqiqi72000@yahoo.com.cn

由两位病理医师分别双盲阅片。IDO 免疫组化以细胞质呈棕黄色为阳性染色, 按阳性细胞百分率记分: $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分。0 分为阴性, > 1 分为阳性, 其中 1~2 分为弱阳性(+), 3 分为中等度阳性(++), 4 分为强阳性(+++)。规定阴性(-)及弱阳性(+)为 IDO 缺失或弱表达, 中等度阳性(++)及强阳性(+++)为 IDO 强表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件包进行 χ^2 和校正 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IDO 在 HCC 组织及癌旁组织的表达情况

21 例肝癌组织均为肝细胞癌, 其癌周肝组织均合并肝硬化。免疫组化结果显示, IDO 表达于部分 HCC 肿瘤细胞、癌旁肝硬化细胞及肿瘤浸润淋巴细胞的胞质中(图 1)。

IDO 在癌旁肝细胞表达强度较高, 而在肝癌细胞及肿瘤浸润淋巴细胞中表达强度相对较低(表 1)。

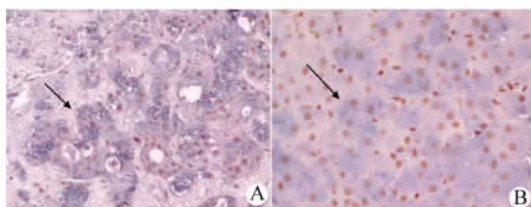


图 1 HCC 组织及癌旁组织中 IDO 的表达

A: 肝癌细胞胞质中 IDO 的表达;
B: 癌旁组织细胞胞质中 IDO 的表达

表 1 IDO 在 HCC 组织及癌旁组织的表达情况

分 组	例数	IDO 表达 [n(%)]	
		(-) ~ (+)	(++) ~ (+++)
HCC 组织	21	17(81.0%)	4(19.0%)
癌旁肝组织	21	8(38.1%)	13(61.9%)*
肿瘤浸润淋巴组织	21	18(85.7%)	3(14.3%)

** $P < 0.05$ 与 HCC 组织及肿瘤浸润淋巴组织比较

2.2 IDO 表达强度与患者临床病理特征的关系

HCC 原发灶中 IDO 的表达强度与患者年龄、性别及肝癌 TNM 分期无关; 与感染肝炎病毒种类及肝脏储备功能分级无明显相关; HCC 有无完整包膜与 IDO 的表达强度无明显相关; 而与血清 AFP 值有相关性, AFP > 500 ng/ml 组的 IDO 表达强度明显增高 ($P < 0.05$); 结节型及弥漫型 HCC 中 IDO 的表达强

度较高 ($P < 0.05$); 有血管浸润及伴癌栓形成组织 IDO 高表达(表 2)。

表 2 IDO 表达强度与患者临床病理特征间的关系

项 目	例数	IDO(n)	
		(-) ~ (+)	(++) ~ (+++)
年龄(岁)			
> 50	11	9	2
≤ 50	10	8	2
性别			
男	20	16	4
女	1	1	0
T 分期			
T1 + T2	8	6	2
T3 + T4	13	11	2
N 分期			
N0	15	12	3
N1	6	5	1
M 分期			
M0	17	13	4
M1	4	4	0
HBsAg(+)	19	15	4
抗 HCV(+)	2	2	0
肝功能 Child-Pugh 分级			
A 级	3	3	0
B 级	12	9	3
C 级	6	5	1
血清 AFP 值($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)			
> 500	5	2	3*
200 ~ 500	9	8	1
< 200	7	7	0
瘤块类型			
块状型	11	11	0
弥漫型	3	1	2 Δ
结节型	4	2	2
小瘤型	3	3	0
包膜			
有	6	6	0
无	15	11	4
血管浸润			
有	9	5	4 \blacktriangle
无	12	12	0
癌栓形成			
有	4	1	3 ∇
无	17	15	2

* $P < 0.05$ 与血清 AFP < 200 ng/ml 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与块状型肿瘤组比较; $\blacktriangle P < 0.05$ 与无血管浸润组比较; $\nabla P < 0.05$ 与无癌栓形成组比较

3 讨 论

近年来对 IDO 的生物学特性进行了大量的研究发现,表达 IDO 的细胞主要分布在胸腺髓质和次级淋巴管的 T 细胞区,并散见于一些免疫耐受或免疫特赦组织中^[3-4]。Munn 等^[9]观察到乳腺癌和黑素瘤患者的区域淋巴结中,抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)是否表达 IDO 是诱导肿瘤免疫耐受的主要原因。Astigiano 等^[10]则观察到在非小细胞肺癌组织中表达 IDO 的既不是肿瘤细胞也不是 APC,而是浸润肿瘤的嗜酸性粒细胞。因此可以认为 IDO 在肿瘤的表达会因为肿瘤类型的不同而表达于不同细胞。

本研究中 HCC 肿瘤细胞及肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltration lymphocyte, TIL)中 IDO 强表达者分别为总例数的 19.0% 及 14.3%,且发现肝细胞癌肿瘤浸润组织中有类似树突状外形的细胞表达 IDO,此结果与 IDO 主要分布于免疫耐受及免疫特赦组织的结论一致。而癌旁肝硬变细胞中 IDO 强表达达 61.9%,可以提示在肝硬化发展至肝癌之前,IDO 已大量表达于肝细胞,促进色氨酸的分解代谢,影响了 T 细胞的增殖,抑制肝脏的免疫系统,为肝癌的发生发展提供了有利条件。

本研究将 IDO 表达强度与临床特征的关系作分析后发现,IDO 表达强度与患者的年龄、性别、TNM 分期无关,提示肿瘤细胞是否表达 IDO 在肿瘤发展过程中不发挥重要作用;结合患者影像学资料,肝细胞癌弥漫型较块状型 IDO 表达增高,而结节型介于两者之间,可以提示,IDO 的表达强度与肿瘤的恶性程度相关;IDO 在有血管侵入、伴癌栓形成者表达增高,提示 IDO 可以做为 HCC 预后判断指标之一。

近年来大量的研究表明免疫抑制酶 IDO 在肿瘤细胞逃避免疫监视,导致肿瘤发生过程中起着重要作用。本研究的结果提示 IDO 可以抑制机体的免疫功能,介导肿瘤的免疫逃逸。在肝硬化发展到肝癌之前,肝硬变细胞中 IDO 的表达增高,可能由于色氨酸的消耗使其周围淋巴细胞处于 G₀/G₁ 期, T 细胞处于免疫抑制及功能缺失状态,进一步出现 T 细胞凋亡,介导肿瘤免疫逃逸,为肿瘤的发生发展创造了有利条件。而 IDO 的表达

与肝细胞癌的恶性程度相关,故 IDO 可以作为肝癌预后差的一个指标。随着对 IDO 的代谢性免疫调节功能及对诱导肿瘤免疫逃逸机制研究的进一步深入,可为临床预防和治疗肿瘤提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Terness P, Chuang JJ, Bauer T, *et al.* Regulation of human auto-and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO[J]. *Blood*, 2005, 105(6): 2480-2486.
- [2] Ishio T, Goto S, Tahara K, *et al.* Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepato-cellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(3): 319-326.
- [3] Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, *et al.* Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *Nat Med*, 2003, 9(10): 1269-1274.
- [4] 唐晓琼,赵智刚,王红祥,等. 急性髓细胞白血病细胞的吲哚胺 2,3-双加氧酶介导免疫逃逸的实验研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2006, 14(3): 539-542.
- [5] Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor response[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(2): 792-801.
- [6] Ino K, Yamamoto E, Shibata K, *et al.* Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(8): 2310-2317.
- [7] Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy[J]. *Nat Med*, 2005, 11(3): 312-319.
- [8] Pan K, Wang H, Chen MS, *et al.* Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(11): 1247-1253.
- [9] Munn DH, Sharma MD, Hou D, *et al.* Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(2): 280-290.
- [10] Astigiano S, Morandi B, Costa R, *et al.* Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(4): 390-396.

[收稿日期] 2008-08-24

[修回日期] 2008-11-01

[本文编辑] 王莹