

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.05.012

· 临床研究 ·

乳腺癌患者肿瘤组织中髓源抑制性细胞的临床意义

杜伟娇,于津浦,李 慧,杨莉莉,沈 春,于文文,辛 宁,安秀梅,曹 水,任秀宝[△](天津市肿瘤防治重点实验室;天津医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科,天津 300060)

[摘要] 目的:研究乳腺癌患者肿瘤组织中髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)与乳腺癌临床病理特征的关系。方法:收集天津肿瘤医院2009年2月至2009年12月间35例乳腺癌根治术的手术切除组织标本,制成单细胞悬液;流式细胞术检测其中MDSCs(Lin⁻CD33⁺CD13⁺CD14⁻CD15⁻)比例,免疫组化法检测同一肿瘤组织中ER、PR、Her-2表达;分析MDSCs比例与患者临床病理特征的关系。结果:乳腺癌患者肿瘤组织中MDSCs比例与临床分期、淋巴结转移有关,Ⅲ期患者MDSCs比例[(11.70±7.85)%]高于Ⅰ/Ⅱ期患者[(5.32±4.59)%],发生3个以上淋巴结转移患者的MDSCs比例[(10.97±7.87)%]高于3个以下(含3个)淋巴结转移的患者[(5.86±5.26)%]($P < 0.05$)。未观察到MDSCs比例高低与患者年龄、病理类型、肿瘤直径、组织学分级,以及ER、PR、Her-2表达有关($P > 0.05$)。结论:乳腺癌患者肿瘤组织中MDSCs比例与患者临床分期、淋巴结转移有关,MDSCs增多可能是乳腺癌患者发生免疫抑制的重要原因之一。

[关键词] 乳腺癌;髓源抑制性细胞;流式细胞术

[中图分类号] R737.9; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)05-0545-04

Clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer tissues

DU Wei-jiao, YU Jin-pu, LI Hui, YANG Li-li, SHEN Chun, YU Wen-wen, XIN Ning, AN Xiu-mei, CAO Shui, REN Xiu-bao[△](Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin; Department of Cancer Biotherapy, Affiliated Tumor Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in breast cancer tissues and their relationship with clinicopathological characteristics of breast cancer. **Methods:** Thirty-five breast cancer samples were obtained from Tianjin Cancer Hospital (from Feb. 2009 to Dec. 2009), and single cell suspensions were prepared. The proportions of MDSCs (Lin⁻CD33⁺CD13⁺CD14⁻CD15⁻) in breast cancer tissues were determined by flow cytometry. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of ER, PR, Her-2 proteins in the same tumor tissues. Then we analyzed the correlation of MDSCs ratio with clinical characteristics of breast cancer. **Results:** The MDSCs ratio in breast cancer tissues was correlated with the clinical stage and metastasis lymph node numbers in breast cancer patients, with the ratio in stage III breast cancer patients ([11.70±7.85]%) being significantly higher than that in stage I/II patients ([5.32±4.59]%). Patients with more than 3 metastasis lymph nodes had a higher MDSCs ratio ([10.97±7.87]%) than patients with less than 3 metastasis lymph nodes ([5.86±5.26]%, $P < 0.05$). MDSCs ratio was not correlated with ages, pathologic types, tumor diameters, histological grades, or expressions of ER, PR and Her-2 of breast cancer patients ($P > 0.05$). **Conclusion:** The MDSCs ratio in breast cancer tissues is correlated with the clinical stage and lymph node metastasis of breast cancer, and the increased MDSCs numbers may be an important reason of immune suppression in breast cancer patients.

[Key words] breast cancer; myeloid-derived suppressor cell; flow cytometry

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(5): 545-548]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30972694);天津市高等学校科技发展基金(No. 20090133)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30972694), and the Science and Technology Foundation in Higher Institutions of Tianjin (No. 20090133)

[作者简介] 杜伟娇(1984-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,主要从事肿瘤生物治疗的基础和临床研究

[通信作者] 曹水(CAO Shui, corresponding author), E-mail: caoshui@yahoo.com; [△]共同通讯作者,任秀宝(REN Xiu-bao, co-corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com

研究^[1-5]发现, 荷瘤宿主体内存在具有免疫抑制功能的髓源抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)。MDSCs 通过高表达精氨酸酶 1 (ARG1)、可诱导的一氧化氮合酶(iNOS)及释放一氧化氮、活化氧自由基等抑制 T 细胞功能, 还通过产生 MMP9 及分化成内皮细胞等促进肿瘤血管生成和肿瘤转移。目前 MDSCs 与肿瘤患者有关的临床研究尚少。Diaz-Montero 等^[1]研究认为, 肿瘤患者体内 MDSCs(Lin⁻ CD33⁺ HLA-DR⁻ CD11b⁺)的含量与患者肿瘤临床分期有关, IV 期伴有远处转移肿瘤的患者外周血中 MDSCs 比例明显增高。乳腺癌是危害女性健康的常见恶性肿瘤, 乳腺癌患者肿瘤源性 MDSCs 的研究尚未见报道。本课题前期研究^[2]发现, 在乳腺癌患者肿瘤组织中存在一群标志为 Lin⁻ CD33⁺ CD13⁺ CD14⁻ CD15⁻ 的 MDSCs, 乳腺癌患者外周血和肿瘤单细胞悬液中 MDSCs 比例与正常人外周血相比显著升高($P < 0.05$); 免疫功能实验显示, 这群细胞显著抑制自体淋巴细胞增殖、促进其凋亡, 并显著抑制其 IFN- γ 分泌, 促进 TGF- β 、IL-10 释放。本研究检测 35 例乳腺癌患者肿瘤组织来源的 MDSCs, 分析其与临床病理特点的关系, 进一步探讨乳腺癌患者 MDSCs 的临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2009 年 2 月至 2009 年 12 月在天津肿瘤医院接受乳腺癌根治术的 35 例乳腺癌患者的新鲜肿瘤组织。患者均为女性, 中位年龄 52 岁(30 ~ 68 岁)。术后肿瘤标本石蜡包埋切片由病理科鉴定, 非特殊型浸润型导管癌 26 例(组织学分级: I 级 2 例, II 级 20 例, III 级 4 例)、浸润性小叶癌 3 例、浸润性乳头状癌 2 例、浸润型导管癌以导管内成分为主 1 例、导管内癌 1 例、微浸润性癌 1 例、导管内癌 1 例(WHO 2003 年分类标准)。其中 I 期 9 例、II 期 15 例、III 期 11 例(美国肿瘤联合会第 6 版分期标准)。

1.2 主要材料与试剂

细胞培养液 RPMI 1640 购自美国 Invitrogen 公司, 流式抗体(Percp-Cy5 标记的抗人 CD45、FITC 标记的抗人 CD13 和 CD33、PE 标记的抗人 CD14 和 CD15 及相应的同型对照)购自美国 BD Pharmingen 公司, ER、PR、Her-2 免疫组化抗体购自北京中杉金桥公司, 二氨基联苯胺(DAB)显色剂购自福州迈新生物技术公司。

1.3 制备肿瘤单细胞悬液

取新鲜肿瘤组织, 去除肿瘤标本中的脂肪和坏死组织后剪碎混匀, 放入用 RPMI 1640 培养液配制的消化酶溶液中(胰蛋白酶 0.5 mg/ml、胶原蛋白酶 1 mg/ml、透明质酸酶 80 U/ml), 37 °C 温箱孵育 1 ~ 2 h, 200 目筛网过滤, PBS 清洗细胞 2 次, 显微镜进行细胞计数, 锥虫蓝染色计数活细胞率在 90% 以上。

1.4 流式细胞术检测细胞表型

肿瘤单细胞悬液混匀后加入流式管中(细胞数为 1×10^6 个/管), 离心后弃上清留细胞沉淀, 加入 Percp-Cy5 标记的抗人 CD45、FITC 标记的抗人 CD13 和 CD33、PE 标记的抗人 CD14 和 CD15, 同时标记同型对照, 混匀后避光 4 °C 孵育 30 min, PBS 清洗, 1% 多聚甲醛固定, 流式细胞仪检测。

1.5 免疫组化检测乳腺癌组织 ER、PR、Her-2 表达

取乳腺肿瘤组织, 用 10% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 制成厚 4 μ m 的切片, 采用 SP 法进行 ER、PR、Her-2 蛋白的免疫组化染色。免疫组化染色按试剂盒的操作说明进行, 以枸橼酸盐高压锅加热法行抗原修复, 用 PBS 代替一抗做阴性对照。ER、PR 阳性定位于胞核, Her-2 阳性定位于细胞膜。每张切片先在低倍镜($\times 10$)下观察整体染色情况, 选取 2 个代表区, 在高倍镜($\times 200$)下每区随机计数 500 个细胞, 共 1 000 个细胞, 计算阳性细胞染色指数[阳性细胞染色指数(%) = 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$]。ER、PR 阳性: 细胞染色指数 $\geq 15\%$; Her-2 阳性: 细胞染色指数 $\geq 10\%$ 。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组定量资料的比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

流式细胞术检测 35 例乳腺癌患者肿瘤单细胞悬液中 MDSCs 比例(指其在 CD45⁺ 细胞中所占比例), 观察到该比例与临床分期、淋巴结转移有关, III 期患者 MDSCs 比例[(11.70 ± 7.85)%]高于 I / II 期患者[(5.32 ± 4.59)%](图 1); 3 个以上淋巴结转移患者的 MDSCs 比例[(10.97 ± 7.87)%]高于 3 个以下(含 3 个)淋巴结转移的患者[(5.86 ± 5.26)%], 差别均具有统计学意义($P < 0.05$)。此外, 未观察到 MDSCs 比例高低与患者年龄、病理类型、肿瘤直径、组织学分级、ER 和 PR 及 Her-2 表达有关($P > 0.05$, 表 1)。

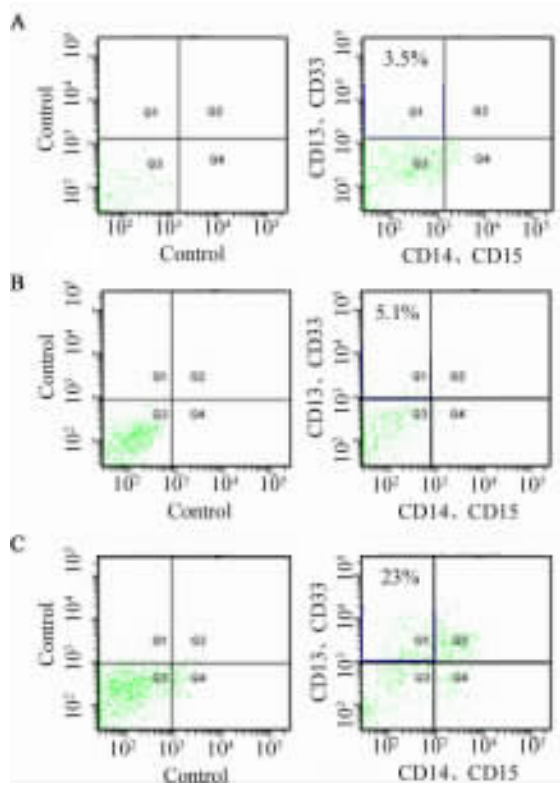


图1 各期乳腺癌患者肿瘤组织中 MDSCs 比例
 Fig.1 Proportion of MDSCs in breast cancer tissues of different stages as detected by flow cytometry
 A: Stage I ;B: Stage II ;C: Stage III

3 讨论

研究^[3]显示,肿瘤免疫治疗只对部分肿瘤患者有效,对部分患者疗效不明显。肿瘤免疫治疗效果不显著的主要原因是肿瘤存在免疫逃逸现象。近年来,MDSCs 已经成为备受关注的参与肿瘤免疫逃逸和免疫耐受形成的重要机制之一。研究^[1-5]证实,荷瘤小鼠及多种类型肿瘤患者体内(如恶性黑色素瘤、肺癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺肿瘤、脑膜瘤、膀胱癌、前列腺癌等)均有 MDSCs 存在。MDSCs 共有的特点是:髓系来源、不成熟状态,具有明显抑制 T 细胞应答的功能,在肿瘤及其他疾病中起免疫负调节作用^[6-7]。小鼠 MDSCs 表型为 CD11b⁺ Gr1⁺,而肿瘤患者 MDSCs 并非一群表型确定的细胞,而是一组生物学功能相同但表型具有明显异质性的细胞^[8-9]。人 MDSCs 表达髓系共同抗原 CD33,但缺乏成熟髓系细胞的标志^[5]。Ko 等^[10]报道,肾癌患者外周血中 MDSCs 可分为两群:CD33⁺ HLA-DR⁻ CD15⁻ 和 CD33⁺ HLA-DR⁻ CD15⁺,前者单核细胞居多,后者多型核粒细胞居多。研究^[10]发现,黑色素瘤

患者和肝癌患者体内存在一群表型为 HLA-DR⁻ CD14⁺ 的细胞有免疫抑制作用。

表1 乳腺癌组织中 MDSC 比例与临床病理特征的关系
 Tab.1 Correlation of MDSC ratio in breast cancer tissues with clinicopathologic characteristics of breast cancer

Characteristic	n	MDSCs ($\bar{x} \pm s, \%$)	P value
Age(year)			
≤50	16	6.18 ± 5.77	0.341
>50	19	8.29 ± 6.96	
Tumor diameter(d/cm)			
≤2	10	7.39 ± 5.77	0.970
>2	25	7.30 ± 6.80	
TDLNs metastasis			
≤3 lymph nodes	25	5.86 ± 5.26	0.032
>3 lymph nodes	10	10.97 ± 7.87	
Clinical stage			
I / II	24	5.32 ± 4.59	0.026
III	11	11.70 ± 7.85	
Histological grade			
I / II	22	6.57 ± 4.99	0.410
III	4	12.78 ± 12.94	
Pathological type			
Invasive ductal carcinoma	26	7.52 ± 6.80	0.760
others	9	6.74 ± 5.58	
ER status			
(-)	12	5.28 ± 3.95	0.111
(+)	23	8.39 ± 7.27	
PR status			
(-)	9	8.48 ± 7.33	0.540
(+)	26	6.92 ± 6.21	
Her-2 status			
(-)	13	5.38 ± 5.18	0.175
(+)	22	8.47 ± 6.93	

目前 MDSCs 的研究大多使用小鼠荷瘤模型^[3,5]。由于肿瘤患者 MDSCs 表型不确定,开展人 MDSCs 的研究相对较困难,与肿瘤患者有关的临床研究尚少。本课题前期研究^[2]发现,在乳腺癌患者

肿瘤单细胞悬液中存在一群表型为 Lin⁻ CD33⁺ CD13⁺ CD14⁻ CD15⁻ 的 MDSCs, 这群细胞在乳腺癌患者外周血和肿瘤单细胞悬液中与正常人外周血相比显著升高 ($P < 0.05$), 乳腺癌组织中分离到的这群细胞呈现出髓系前体细胞的形态; MTT、ELISA 等功能实验结果显示, 这群细胞具有免疫抑制作用, 如显著抑制自体淋巴细胞增殖、促进其凋亡, 并显著抑制其 IFN- γ 分泌、促进 TGF- β 、IL-10 释放等。

为深入探讨 MDSCs 的临床意义, 本研究收集 35 例乳腺癌患者肿瘤标本, 检测其单细胞悬液中 MDSCs 比例, 观察该比例与临床病理特征的关系。结果观察到乳腺癌患者肿瘤组织中 MDSCs 比例高低与临床分期、淋巴结转移有关, III 期患者 MDSCs 比例显著高于 I/II 期患者, 发生 3 个以上淋巴结转移的患者也显著高于 3 个以下(含 3 个)淋巴结转移的患者; 而组织学分级 III 级患者的 MDSCs 比例和 I/II 级患者无统计学意义, 可能与病例较少有关。未观察到 MDSCs 比例与患者年龄、病理类型、肿瘤直径大小及 ER、PR、Her-2 表达有关。Diaz-Montero 等^[1] 收集 106 例肿瘤患者(包括食管癌、肺癌、胰腺癌等多种实体肿瘤)的外周血, 检测发现患者体内 MDSCs(Lin⁻/LoHLA DR⁻ CD33⁺ CD11b⁺) 的含量与临床分期有关, 分期越晚 MDSCs 比例越高, IV 期伴有远处转移的肿瘤患者体内 MDSCs 比例最高。

本实验结果表明, 乳腺癌患者肿瘤组织中的 MDSCs 对临床分期有一定的指导意义, MDSCs 增多可能是晚期乳腺癌患者免疫抑制的重要原因之一, 针对 MDSCs 的治疗可能抑制乳腺癌生长、转移。研究^[12] 表明, 荷瘤小鼠应用吉西他滨后, MDSCs 数量急剧下降, 同时免疫治疗诱导的抗肿瘤活性明显增强^[12]。肾癌患者应用全反式维甲酸后, 可以促进 MDSCs 分化为抗原提呈前体细胞, 并改善 T 细胞功能及消除 MDSCs 免疫抑制作用^[5]。应用 VEGF 特异性阻断抗体, 如 avastin, 可以降低外周血 MDSCs 比例^[13]。另有报道^[8], 肾癌患者应用 sunitinib 后, 可以逆转 MDSCs 介导的免疫抑制作用。下一步研究将观察乳腺癌患者 MDSCs 数量与化疗、靶向药物治疗的关系, 以期进一步明确两者间的相关性。

[参 考 文 献]

[1] Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy [J].

Cancer Immunol Immunother, 2009, 58(1): 49-59.

[2] 沈 春, 于津浦, 李 慧, 曹 水, 刘俊田, 孙敬岩, 等. 乳腺癌患者髓系来源抑制性细胞的鉴定与免疫抑制作用研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(17): 1010-1015.

[3] Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer [J]. J Immunol, 2009, 182 (8): 4499-4506.

[4] Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, et al. Population alterations of L: -arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b(+)/CD14 (-)/CD15(+)/CD33 (+) myeloid-derived suppressor cells and CD8 (+) T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, [2010-03-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

[5] Kusmartsev S, Su Z, Heiser A, Dannull J, Eruslanov E, Kübler H, et al. Reversal of myeloid cell-mediated immunosuppression in patients with metastatic renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(24): 8270-8278.

[6] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9 (3): 162-174.

[7] 刘秋燕, 曹雪涛. MDSCs 与肿瘤免疫逃逸 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(4): 319-324.

[8] Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity [J]. Blood, 2008, 111(8): 4233-4244.

[9] Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI, et al. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice [J]. J Immunol, 2008, 181(8): 5791-5802.

[10] Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6): 2148-2157.

[11] Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(18): 2546-2553.

[12] Suzuki, Kapoor, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(18): 6713-6721.

[13] Kusmartsev S, Eruslanov E, Kübler H, Tseng T, Sakai Y, Su Z, et al. Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: Link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma [J]. J Immunol, 2008, 181(1): 346-353.

[收稿日期] 2010 - 07 - 18 [修回日期] 2010 - 08 - 27
[本文编辑] 韩 丹