

网络出版时间: 2017-7-20 23:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.033.html>

胃癌肿瘤引流淋巴结内 Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的分布

汪礼坤¹, 袁笑¹, 徐阿曼¹, 孟刚², 王岳君²

摘要 采用免疫组织化学方法检测胃癌肿瘤引流淋巴结和第二站淋巴结内调节性 T 细胞 (Treg 细胞) 的分布和细胞数量。结果显示 Foxp3⁺ Treg 细胞弥散地分布于胃癌引流淋巴结的副皮质区和髓质区。胃癌肿瘤引流淋巴结内 Treg 细胞数明显多于第二站淋巴结 ($P < 0.01$)。进展期胃癌肿瘤引流淋巴结内 Treg 细胞数多于早期胃癌 ($P < 0.01$)。Treg 细胞聚集胃癌肿瘤引流淋巴结内可能通过形成免疫耐受环境而促进肿瘤淋巴转移的发生。

关键词 胃癌; 调节性 T 细胞; 肿瘤引流淋巴结; 淋巴转移
中图分类号 R 730.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)09-1403-03
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.033

胃癌是国内常见的消化道肿瘤,近年其发病率呈上升趋势,发生淋巴结转移患者术后 5 年生存率低下^[1]。肿瘤引流淋巴结 (tumor-draining lymph nodes, TDLN) 是直接引流肿瘤的第一站淋巴结 (N1)^[2]。研究已证实,在肿瘤细胞转移到淋巴结之前 TDLN 内结构和功能发生明显改变,调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是维持 TDLN 免疫抑制微环境的关键因素。目前, Treg 细胞在胃癌区域引流淋巴结转移中的作用尚未阐明。该研究采用免疫组织化学方法检测胃癌患者 TDLN 内 Foxp3⁺ Treg 分布特征和细胞数量,初步探讨 Treg 在促进胃癌淋巴结转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2014 年 5 月~2016 年 3 月安徽医科大学第四附属医院普外科收治的 17 例胃癌病例,均行 D2 根治性手术,其中男 12 例,女 5 例,年龄 32~78 岁,中位年龄 63 岁,其中贲门癌 11 例,胃体癌 3 例,胃窦癌 3 例。大体分型:溃疡型 11 例,浅

表凹陷型 4 例 (早期胃癌, II c), 原位癌 2 例;病理分类:高级别上皮内瘤变,伴局部原位癌变 2 例,中分化腺癌 9 例,低分化腺癌 3 例,中-低分化腺癌 1 例,中分化腺癌,伴部分粘液腺癌和粘液细胞癌,伴部分粘液腺癌各 1 例。胃癌病例术后标本受检测淋巴结 9~41 (22.7 ± 7.7) 枚,均无癌转移。

收集淋巴结石蜡标本,每例患者第一站淋巴结 (N1)、第二站淋巴结 (N2) 标本病理检查未发生肿瘤细胞转移,排除术前已放化疗、术中显示腹膜或远处脏器转移以及区域引流淋巴结内已有肿瘤细胞转移等不符合标准的病例。

1.2 Foxp3 免疫组织化学染色 Foxp3 染色所用标本为 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,每例蜡块连续切片数张,厚 4 μm ,1 张备染,其余行 HE 染色,镜下观察有无肿瘤细胞淋巴结转移。组织切片置枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中高压抗原修复 1 min,10 s,室温放置于 3% H_2O_2 中 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,滴加 50 μl I 抗 (purified anti-human Foxp3 antibody, clone:259D, 美国 Biolegend 公司) (稀释度 1:100) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加 50 μl II 抗 (酶标羊抗小鼠 IgG 聚合物) 室温静置孵育 15 min, DAB 显色。PBS 代替 I 抗作阴性对照,5 个高倍显微视野下计数阳性细胞百分数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞数量比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌 TDLN (N1) 内组织学改变和 Foxp3⁺ Treg 细胞的分布 镜下 HE 染色见 TDLN 内淋巴细胞密集,生发中心扩增,淋巴窦扩大,镜下观察无肿瘤细胞淋巴结转移 (图 1A1)。肿瘤改变了 TDLN 的免疫微环境,表现为 Treg 较均匀弥散地分布于 CD4^{+} T 细胞和 CD8^{+} T 细胞聚集的副皮质和髓质区,而生发中心几乎未见 Treg 细胞 (图 1A2、A3)。

2.2 胃癌 TDLN 内 Foxp3⁺ Treg 细胞明显增多 胃癌 TDLN (N1) 内 Treg 细胞数量明显多于非 TDLN

2017-04-20 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2012Z199)

作者单位:安徽医科大学第四附属医院¹ 普外科、² 病理科,合肥 230022

作者简介:汪礼坤,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,
E-mail: wlk72@126.com

(N2) 中 Treg 数量 ($19.6\% \pm 3.3\%$ vs $11.0\% \pm 1.7\%$ $P < 0.01$) ,提示 Treg 首先在 TDLN 内扩增聚集。进展期胃癌 TDLN 内 Treg 细胞数多于早期胃癌 ($21.3\% \pm 2.6\%$ vs $16.2\% \pm 1.1\%$ $P < 0.01$) 。

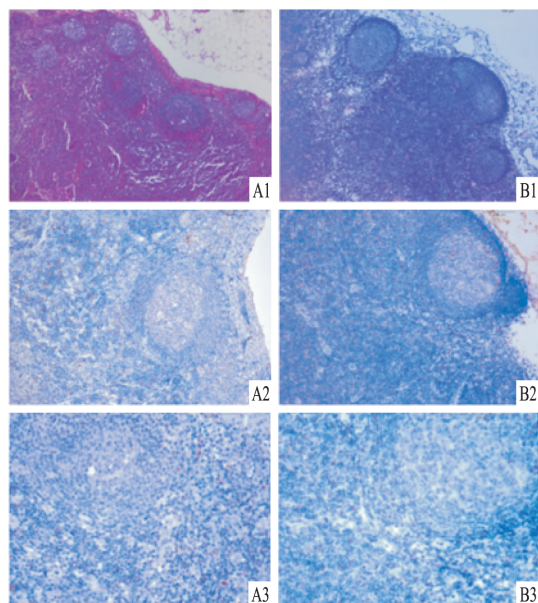


图1 N1、N2 组织学结构

A: N1; B: N2; 1: HE 染色 $\times 100$; 2: Foxp3 免疫组织化学染色 $\times 200$; 3: Foxp3 免疫组织化学染色 $\times 400$

3 讨论

TDLN 是胃癌的主要转移途径,肿瘤细胞淋巴结转移通常是循序由第一站逐步向第二站转移。动物实验^[3-5]已证实肿瘤可以使 TDLN 内高内皮静脉被重构改造成血管、淋巴窦增多并扩张和淋巴液增加等结构和功能改变,而本研究显示,胃癌患者 TDLN 内主要表现为淋巴细胞密集,生发中心扩增,淋巴窦扩大,这些改变符合肿瘤反应性淋巴增生现象。

研究^[6]显示胃癌患者已发生转移的淋巴结中 $CD4^+$ T 细胞亚群发生改变, Treg 明显增多,但是转移性淋巴结内可能包含肿瘤浸润性 Treg 细胞,因而本研究选用无转移的 TDLN。本研究显示,胃癌 TDLN 内 Treg 弥散地分布于 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞聚集的副皮质和髓质区,而生发中心几乎未见 Treg 细胞,与实验动物^[7-8] TDLN 内 Treg 的分布特征一致。这种弥散的空间分布模式有利于 Treg 细

胞通过与 $CD11c^+$ 树突状细胞、 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞相互直接接触^[8]或局部分泌 TGF- β 等细胞因子,抑制效应性 T 细胞和抗原提呈细胞的功能。

TDLN 内微环境的改变导致免疫细胞类型变化和异常分布,促进免疫抑制发生和肿瘤进展^[9]。胃癌患者 TDLN (N1) 内 Treg 细胞数量明显多于非 TDLN (N2),提示 Treg 首先在 TDLN 内扩增聚集,数量明显增加,通过抑制效应性 T 细胞发挥免疫抑制功能,改变免疫微环境。本研究显示,进展期胃癌 TDLN 内 Treg 细胞数量多于早期胃癌,进一步表明随着胃癌进展, Treg 细胞通过维持 TDLN 内免疫耐受微环境,为肿瘤细胞转移到淋巴结准备合适的“土壤”。

参考文献

- [1] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388 (10060): 2654 - 64.
- [2] Munn D H, Mellor A L. The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site [J]. *Immunol Rev*, 2006, 213: 146 - 58.
- [3] Qian C N, Berghuis B, Tsarfaty G, et al. Preparing the “soil”: the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (21): 10365 - 76.
- [4] Harrell M I, Iritani B M, Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170 (2): 774 - 86.
- [5] Ruddell A, Kirschbaum S B, Ganti S N, et al. Tumor-induced alterations in lymph node lymph drainage identified by contrast-enhanced MRI [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2015, 42 (1): 145 - 52.
- [6] Okita Y, Ohira M, Tanaka H, et al. Alteration of $CD4^+$ T cell subsets in metastatic lymph nodes of human gastric cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34 (2): 639 - 47.
- [7] Wang L K, Kuang M, Hua Y P, et al. Profile of regulatory T cells and interferon γ secretion in the tumor-draining lymph node from mouse Hepa1-6 cells [J]. *J Surg Res*, 2013, 183 (2): 900 - 6.
- [8] Hontsu S, Yoneyama H, Ueha S, et al. Visualization of naturally occurring Foxp3 $^+$ regulatory T cells in normal and tumor-bearing mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2004, 4 (14): 1785 - 93.
- [9] Riedel A, Shorthouse D, Haas L, et al. Tumor-induced stromal reprogramming drives lymph node transformation [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17 (9): 1118 - 27.

网络出版时间: 2017-7-20 23:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.034.html>

钛表面碱酸热处理的体外实验研究

刘 春¹ 夏 荣¹ 孙 磊¹ 闵 曦² 徐基亮¹ 孙子环¹ 章 辉¹ 朱一铭¹

摘要 通过碱、稀酸、热处理在纯钛表面构建纳米级网状生物活性层,采用场发射电镜和 X 射线能量色散谱仪观察三组试件表面微观形貌和元素组成。小鼠骨髓间充质干细胞与三组试件共培养,体外评价试件表面的生物活性。结果表明碱酸热处理组试件表面仍呈现精细的网状结构,碱酸热处理可以脱除试件表面钠元素。体外细胞培养结果表明,碱酸热处理表面具有良好的生物活性。

关键词 二氧化钛;纳米网状结构;生物活性

中图分类号 R 783.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)09-1405-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.034

钛具有优越的生物相容性,但其生物活性差、骨诱导能力缺乏。为了改善钛种植体的表面性能,形成有利于细胞黏附、分化的良好环境,需要对钛表面进行各种改性处理^[1],理化处理就是其中一种方

法。通过改性处理形成的均匀一致的微观形貌能更好地诱导骨形成。该研究采用碱、酸、热处理在纯钛表面构建纳米网状结构,观察形成的纳米结构形貌并探讨表面网状结构对细胞活性的影响,为钛表面改性提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 直径 12 mm、厚 0.25 mm 圆形纯钛片(纯度 99.99%,北京中金研新材料科技有限公司);Sirion200 型扫描电子显微镜(美国 FEI 公司);SX-4-10 型箱式电阻炉(天津泰斯特仪器有限公司);SW 型电热恒温水槽(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);氢氧化钠、盐酸(国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 试件制备与检测

1.2.1 钛片表面预处理 纯钛片 72 枚,800 目至 7000 目砂纸逐级将钛片表面打磨抛光,试件依次在丙酮、无水乙醇、去离子水中超声荡洗各 20 min,干燥备用。制备好的试件称为光滑(pure Titanium, PT)组试件。

1.2.2 碱酸热处理 随机从 PT 组中选取 48 枚试件,浸泡于 60 °C、5 mol/L NaOH 水溶液中 24 h 后取出、去离子水冲洗、干燥。随机从经 NaOH 处理的

2017-03-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH156);安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助项目(编号:2014H030)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院口腔科,合肥 230601

²安徽医学高等专科学校口腔系,合肥 230601

作者简介:刘 春 男 硕士研究生;

夏 荣 男 主任医师 硕士生导师 责任作者 E-mail: xiarongqh@aliyun.com

Distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells in tumor-draining lymph nodes of human gastric cancer

Wang Likun, Yuan Xiao, Xu Aman, et al

(Dept of General Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract To compare the number and distribution of Foxp3⁺ regulatory T cells (Treg) in tumor-draining lymph nodes (TDLN, N1) and N2 to assess whether Treg may contribute to the lymphatic metastasis in human gastric cancer. Foxp3⁺ regulatory T cells in N1 and N2 were detected by immunohistochemical staining. Foxp3⁺ Treg showed diffuse distribution in paracortex and medulla. TDLN tended to be enriched in Foxp3⁺ Treg compared with N2 ($P < 0.01$). Foxp3⁺ regulatory T cells in TDLN from advanced gastric cancer were significantly higher than that from early gastric cancer ($P < 0.01$). Foxp3⁺ regulatory T cells exhibit increased recruitment to TDLN, which could facilitate the immune tolerance and contribute to lymphatic metastasis of tumor cells.

Key words gastric carcinoma; regulatory T cell; tumor-draining lymph node; lymphatic metastasis