

自然杀伤细胞在胃癌组织中的表达及临床意义

程 贵, 蒋敬庭, 鲁常青, 吴 骏, 季 枚, 吴昌平 (苏州大学第三附属医院肿瘤生物诊疗中心, 江苏常州 213003)

【摘要】 目的 分析自然杀伤(NK)细胞在胃癌组织中的表达及其与胃癌临床病理特征和预后的关系。**方法** 采用免疫组织化学染色法检测 107 例胃癌患者手术标本中 NK 细胞的表达, 采用 SAS 9.12 统计软件包进行资料分析。**结果** 在胃癌、胃炎及胃息肉组织中均可见 NK 细胞的表达, 但胃癌组 NK 细胞的表达 $[(31.74 \pm 15.93)$ 个/HPF]明显高于慢性胃炎组 $[(5.02 \pm 2.55)$ 个/HPF]和胃息肉组 $[(4.84 \pm 1.55)$ 个/HPF], 差异有统计学意义($P < 0.01$)。NK 细胞的表达与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、淋巴结转移、复发、病理分级、组织学类型和浸润深度均无统计学意义($P > 0.05$), 但 TNM 分期越高, NK 细胞表达水平有明显下降的趋势, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 NK 细胞低表达组相比, NK 细胞高表达组胃癌患者中位生存时间延长 14 个月, 两组生存曲线差异无统计学意义($\chi^2 = 2.888, P > 0.05$)。多因素 COX 模型分析显示, 与 NK 细胞低表达组相比, 高表达组有降低胃癌死亡风险的趋势($RR = 0.68, 95\% CI = 0.41 \sim 1.23$)。**结论** NK 细胞的高表达与胃癌患者的生存时间呈正相关, 可作为预测胃癌生存期的指标。

【关键词】 胃癌; 自然杀伤细胞; 免疫组织化学染色法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1195-03

Clinical significance of NK cells in gastric carcinoma tissues CHENG Gui, JIANG Jing-ting, LU Chang-qing, WU Jun, JI Mei, WU Chang-ping (Department of Tumor Biological Treatment, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou, Soochow 213003, Jiangsu)

【Abstract】 Objective To analyze the relationship between the expression of NK cells and the clinical pathologic characteristics in gastric carcinoma tissues and its association with the prognosis of gastric carcinoma. **Methods** The expression of NK cells in 107 surgical specimens of gastric cancer tissues was detected by using immunohistochemistry assay, and the data was analyzed by using SAS 9.12. **Results** NK cells were expressed both in gastric carcinoma, gastritis and gastric polyp tissues, but the numbers of NK cells in gastric carcinoma tissues $[(31.74 \pm 15.93)/\text{HPF}]$ was significantly higher than that in gastritis tissues $[(5.02 \pm 2.55)/\text{HPF}]$ and polyp tissues $[(4.84 \pm 1.55)/\text{HPF}]$ ($P < 0.01$). No correlation was found between NK cells count with gender, age, tumor location, tumor size, lymph node metastasis, tumor relapse, pathological grade, histological type and invasive depth ($P > 0.05$). But the proportion of NK cell is obvious lower when tumor TNM staging is higher ($P < 0.05$). The median survival time of gastric cancer patients with NK cells high expression was 14 months longer than those with low expression, but the difference of survivorship curve was not statistically significant ($\chi^2 = 2.888, P > 0.05$). Multi factor COX model analysis demonstrated that the risk of death in gastric cancer patients was lower in the NK cells high expression group than that in the low expression group ($RR = 0.68, 95\% CI = 0.41 \sim 1.23$). **Conclusion** There is a positive correlation between the high expression of NK cells and the survival time of gastric cancer patients, which may suggest that NK cells may be considered as a predictive index of gastric cancer patients.

【Key words】 Gastric cancer; Natural Killer cell; Immunohistochemistry

自然杀伤(NK)细胞具有非特异性杀伤细胞作用, 在肿瘤细胞免疫方面起重要调节作用, 与一些恶性肿瘤的发生、发展及预后密切相关。大量研究显示, NK 细胞是机体天然免疫的主要免疫细胞, 是机体抗肿瘤的第一道防线^[1]。作者的前期研究发现, 肿瘤微环境对胃癌患者的生存期有重要的影响^[2-4]。本研究采用免疫组织化学技术对 107 例胃癌组织内浸润性 NK 细胞进行了分析, 旨在探讨 NK 细胞在胃癌组织中的表达及其与胃癌临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本来自 1998 年 1 月 1 日至 2010 年 12 月 31 日常州市第一人民医院胃肠外科手术的 107 例胃癌患者, 均经术后病理确诊。男 86 例, 女 21 例, 男性平均年龄(60.5 土

10.2)岁, 女性平均年龄(53.6 土 9.5)岁。所有患者术前未接受化疗或放疗。10 例胃炎与 10 例胃息肉标本取自 2008 年 11 月门诊患者, 其中胃炎男 7 例, 女 3 例, 年龄(62.2 土 11.2)岁; 胃息肉男 4 例, 女 6 例, 年龄(52.5 土 10.9)岁。组织病理学分级按 Kloppel 标准, 其中高分化型腺癌 35 例, 低分化型腺癌 68 例, 有 4 例缺失。根据 TNM 分期: I 期 8 例、II 期 18 例、III 期 71 例、IV 期 10 例。

1.2 免疫组化染色及评估 应用 Elivision™ Plus 免疫组织化学染色法, 一抗为鼠抗人 CD57 单克隆抗体, 切片经 DAB 显色, 苏木精复染, 光镜观察。选择组织结构清晰且染色均匀的切片进行定量分析, 由 2 位经验丰富的病理专家采用双盲法进行结果判定。

1.3 NK 细胞计数标准 以细胞膜和胞浆内出现棕黄染色为阳性细胞。低倍视野下在癌灶部位选取 5 个淋巴细胞浸润最丰富的部位,然后在高倍镜($\times 200$)下进行计数(个/HPF),取这 5 个视野的均值进行统计分析。本研究确立胃癌组织中 NK 细胞数小于 18.4 个/HPF 为弱阳性(低表达),大于等于 18.4 个/HPF 作为阳性(高表达),免疫组织化学图片采用 Leica 显微镜拍摄(Leica DM2500)。

1.4 统计学方法 采用 SAS 9.12 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验和 One-way ANOVA 检验,检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。生存资料分析采用 Kaplan-Meier 法及 Log-rank 检验,多因素分析用 COX 风险模型分析。

2 结 果

2.1 NK 细胞在胃炎、胃息肉和胃癌组织中的表达 经细胞免疫组织化学分析显示,在胃炎、胃息肉及胃癌组织中均可见 NK 细胞的表达,免疫阳性反应主要位于淋巴细胞的细胞膜和胞浆,呈强或中等程度的棕黄着色。但胃癌组 NK 细胞的表达 $[(31.74 \pm 15.93)$ 个/HPF] 明显高于慢性胃炎组 $[(5.02 \pm 2.55)$ 个/HPF] 和胃息肉组 $[(4.84 \pm 1.55)$ 个/HPF], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 NK 细胞的表达与胃癌临床病理的关系

临床特征	n	NK 细胞表达($\bar{x} \pm s$)	t/F	P
性别 男	86	31.8 \pm 16.2	0.10	0.920 4
女	21	31.4 \pm 15.0		
年龄(岁) ≤ 45	10	29.0 \pm 14.1	1.84	0.164 7
46~60	51	34.8 \pm 18.8		
>60	46	28.9 \pm 12.0		
部位 贲门部	41	34.8 \pm 15.0	1.42	0.247 5
胃体部	38	28.8 \pm 17.1		
胃窦部	28	31.2 \pm 15.4		
肿瘤大小(cm) < 5	44	33.2 \pm 15.5	1.44	0.154 8
≥ 5	42	28.9 \pm 13.4		
组织学类型 高分化型	35	32.0 \pm 15.3	0.44	0.660 5
低分化型	68	30.6 \pm 14.2		
浸润深度 未浸及深肌层	12	37.7 \pm 14.8	1.45	0.150 3
浸及深肌层	78	30.7 \pm 15.7		
淋巴结转移 阴性	23	32.5 \pm 19.7	0.31	0.758 0
阳性	67	31.1 \pm 14.0		
复发 有	62	29.9 \pm 14.4	1.40	0.164 4
无	45	34.3 \pm 17.7		
病理分级 1~2 级	15	33.1 \pm 20.2	0.10	0.909 2
3 级	66	31.8 \pm 16.1		
4 级	26	30.8 \pm 13.2		
TNM 分期 I 期	8	35.5 \pm 19.0	2.81	0.043 3
II 期	18	38.9 \pm 14.3		
III 期	71	30.9 \pm 16.0		
IV 期	10	22.0 \pm 8.3b		

2.2 NK 细胞的表达与胃癌临床病理变量指标之间的关系

见表 1。由表 1 可见, NK 细胞的表达与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、淋巴结转移、复发、病理分级、组织学类型和浸润深度差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。TNM 分期越高, NK 表达水平有明显下降的趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 NK 细胞的表达对胃癌患者生存时间及生存曲线的影响

NK 细胞高表达组 (≥ 18.4) 与低表达组比较 (< 18.4), 中位生存时间(个月)及 95% CI 分别为 38.0 (95% CI: 32.0 ~ 55.0)、24.0 (95% CI: 12.0 ~ 61.0), NK 细胞高表达组胃癌患者生存时间延长 14 个月, 两组生存曲线差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.888, P > 0.05$), 见图 1。

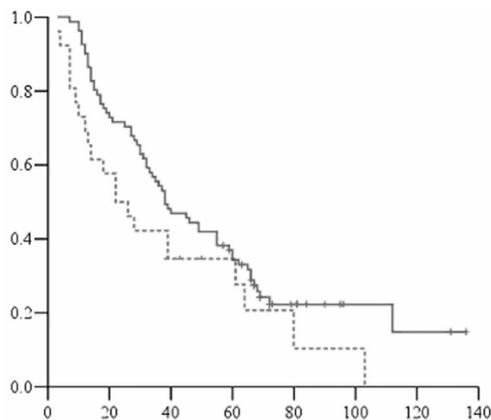


图 1 NK 细胞高表达与低表达胃癌患者的生存曲线图

2.4 NK 细胞的高表达对胃癌患者预后多因素 COX 模型分析 见表 2。在调整了性别、年龄、肿瘤分期后, 与 NK 细胞低表达组相比, NK 细胞高表达组胃癌死亡风险有降低趋势 ($RR = 0.68, 95\% CI = 0.41 \sim 1.23$)。

表 2 NK 细胞高表达对胃癌病人预后多因素 COX 模型分析 (n=107)

变量	n	RR	95%CI
NK 细胞 低表达(< 18.4)	26	1.00	—
高表达(≥ 18.4)	81	0.68	0.41~1.23
性别 男	86	1.00	—
女	21	1.36	0.75~2.46
年龄(岁) ≤ 45	10	1.00	—
46~60	51	1.09	0.47~2.50
>60	46	1.54	0.65~3.66
肿瘤 早期(I+II)	26	1.00	—
晚期(III+IV)	81	1.85	1.04~3.31

注:—表示无数据。

3 讨 论

肿瘤微环境中调控免疫性 T 细胞发挥功能的免疫细胞和免疫分子成了人们关注的热点。在抗肿瘤免疫中细胞免疫起主要作用, 抗肿瘤的免疫活性细胞包括 T 细胞、NK 细胞、巨噬细胞、树突状细胞等, 其中 T 细胞和 NK 细胞起主要作用。NK 细胞来源于骨髓, 主要存在于血液和淋巴器官中, 占淋巴细胞总数的 5%~10%, 不依赖抗体与补体, 也不受主要组织相容性复合物的限制, 能快速识别与溶解癌细胞, 在机体早期抗肿瘤和免疫监视中具有重要作用^[5]。

本研究证实,在胃炎、胃息肉及胃癌组织中均可见 NK 细胞表达,但胃癌组 NK 细胞的表达明显高于慢性胃炎组和胃息肉组。胃癌患者 NK 细胞数量增加的机制尚不清楚,可能是由于癌细胞存在 MHC-I 类抗原表达缺陷,被 NK 细胞所识别并与其结合而在局部聚集,导致肿瘤组织中 NK 细胞数量增多。本研究结果显示,NK 细胞的表达与胃癌患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、淋巴结转移、复发、病理分级、组织学类型和浸润深度差异均无统计学意义($P>0.05$),随着胃癌恶性程度增高,NK 细胞表达均有下降趋势,故考虑可能与本研究样本量较少有关。SNK 检验显示,TNM 分期越高,NK 表达水平有明显下降的趋势,差异有统计学意义($P<0.05$),这与 Ishigami 等^[6]研究结果基本一致。

NK 细胞是天然免疫的一类重要细胞,在抗肿瘤免疫应答中发挥着重要作用^[7]。NK 细胞不仅能直接杀伤肿瘤细胞,而且能通过释放细胞因子活化和调节其他效应细胞间接发挥抗肿瘤作用。NK 细胞通过释放细胞因子(如干扰素- γ)的产生,有助于树突状细胞的成熟和迁移到淋巴结,并且有助于 Th1 细胞分化,而 Th1 细胞能够有效起到抗肿瘤细胞的作用^[8]。本研究发现,与 NK 细胞低表达组相比,NK 细胞高表达组胃癌患者中位生存时间延长 14 个月,两组生存曲线差异无统计学意义($\chi^2=2.888, P>0.05$)。在调整了性别、年龄、肿瘤分期后,多因素 COX 模型分析显示,与 NK 细胞低表达组相比,高表达组有降低胃癌死亡风险的趋势($RR=0.68, 95\% CI=0.41\sim 1.23$),该研究结果与国外文献^[6,9]报道相符。NK 杀伤肿瘤细胞的作用主要是通过识别靶细胞表面分子的活化受体和抑制性受体,其效应功能取决于活化信号与抑制信号的综合,只有当活化性信号优于抑制性信号时 NK 细胞才具有杀伤靶细胞的功能^[10]。有研究表明,NK 细胞在多种实体肿瘤组织中广泛表达^[6,11-12]。因此,NK 细胞可以作为反映胃癌患者免疫状态和预后的一项指标。

胃癌组织中 NK 细胞的表达与胃癌患者的预后有关,在参与肿瘤免疫应答过程中发挥重要的作用。因此,NK 细胞可作为胃癌预后判断的潜在指标之一。

参考文献

[1] Caligiuri MA. Human natural killer cells[J]. Blood, 2008, 112(3):461-469.

[2] 蒋敬庭,吴昌平,沈月平,等. 共刺激分子 B7-H4 在胃癌组织中表达及其与预后的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2009, 26(9):1155-1158.

(上接第 1194 页)

7(4):238-243.

[3] 姚毅,严谦,严仔敦,等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(3):566-577.

[4] 陶智,王艳,齐金海. 医院感染金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(17):2689-2690.

[5] 姚冬梅,胡晖. 肠球菌临床感染及其耐药性分析[J]. 临床

[3] 牛海玉,蒋敬庭,吴昌平. 转录因子 T-bet 在胃癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(3):358-360.

[4] 石红兵,蒋敬庭,吴昌平. CD8⁺T 细胞在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(3):361-363.

[5] 林洪启,孟凡民,张加强,等. 小剂量高渗氯化钠羟乙基淀粉 40 对自然杀伤细胞和血小板 CD41 的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(6):827-828.

[6] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(3):577-583.

[7] Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease[J]. Clin Immunol, 2006, 118(1):1-10.

[8] De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56 (dim)CD16⁺ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(2):728-732.

[9] Carrega P, Morandi B, Costa R, et al. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells[J]. Cancer, 2008, 112(4):863-875.

[10] Holmes TD, El-Sherbiny YM, Davison A, et al. A human NK cell activation/inhibition threshold allows small changes in the target cell surface phenotype to dramatically alter susceptibility to NK cells[J]. J Immunol, 2011, 186(3):1538-1545.

[11] Takanami I, Takeuchi K, Giga M. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 121(6):1058-1063.

[12] McGilvray RW, Eagle RA, Watson NF, et al. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoeediting[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(22):6993-7002.

(收稿日期:2011-12-25)

检验杂志, 2009, 27(9):393.

[6] 苏扬. 2009 年我院常见病病原菌分布及耐药性分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(2):117-120.

[7] 方玲,陈江华,顾向明,等. 临床常见病病原菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(4):210-211.

(收稿日期:2012-01-11)