

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.007

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.007

## Tc17 细胞在食管鳞状细胞癌患者肿瘤微环境中的表达及其预后的影响

宋丽<sup>1</sup>, 尹海兵<sup>2</sup>, 张珣磊<sup>1</sup>, 许峰<sup>3</sup>, 王燕<sup>1</sup>, 杨磊<sup>1</sup>

(南通市肿瘤医院 1. 肿瘤内科; 2. 病理科; 3. 肿瘤外科, 江苏 南通 226300)

**[摘要]** 目的: 观察CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>淋巴细胞(Tc17细胞)在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者肿瘤微环境中的表达情况及其对预后的影响。方法: 收集69例ESCC患者的癌组织及相应的癌旁组织, 采用免疫组织化学双染色法检测CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞的表达情况, 结合患者临床及随访资料分析其表达水平与患者的临床病理特征的关系及对预后的影响。结果: 与癌旁间质中相比, ESCC癌巢中Tc17细胞表达水平增高( $P < 0.001$ ); Tc17细胞表达水平与患者性别、年龄、肿块大小、发生部位、分化程度、浸润深度、淋巴结迁移及TNM分期无明显相关性( $P > 0.05$ )。生存分析显示Tc17高表达组总体生存期高于低表达组( $P < 0.05$ ), 早期ESCC中Tc17高表达组总体生存期高于低表达组( $P = 0.017$ ), 而在晚期ESCC中Tc17高表达组总体生存期虽高于低表达组, 但差异无统计学意义( $P = 0.0742$ )。结论: Tc17细胞在ESCC癌巢中表达增加, 与预后呈正相关, 尤其是在早期ESCC中, 可作为ESCC潜在的预后分子标志物。

**[关键词]** 食管鳞状细胞癌; Tc17细胞; 微环境

## Expression of Tc17 cells in tumor microenvironment in patients with esophageal squamous cell carcinoma and its effect on prognosis

SONG Li<sup>1</sup>, YIN Haibing<sup>2</sup>, ZHANG Xunlei<sup>1</sup>, XU Feng<sup>3</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Oncology; 2. Department of Pathology; 3. Department of Oncological Surgery, Nantong Tumor Hospital, Nantong Jiangsu 226300, China)

**Abstract** **Objective:** To evaluate the relationship between expression of Tc17 cells in tumor microenvironment and prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** The expression of Tc17 cells were examined by immunohistochemistry in 69 specimens of ESCC tissues. The relationship of expression of Tc17 cells with clinicopathological characteristics and its effect on prognosis were analyzed by combining clinical and follow-up visit data. **Results:** The expression of Tc17 cells in ESCC nests was

收稿日期 (Date of reception): 2018-04-26

通信作者 (Corresponding author): 杨磊, Email: leiyang.53@163.com

基金项目 (Foundation item): 南通市卫生和计划生育委员会青年基金 (WQ2016064)。This work was supported by the Nantong Health and Family Planning Commission Youth Foundation, China (WQ2016064).

significantly higher than that in the paracancerous stroma ( $P < 0.001$ ). But there was no significant correlation between the expression levels of Tc17 cells and patients' gender, age, tumor size, tumor site, tumor differentiation grade, infiltration depth, lymph node metastasis, and TNM stage ( $P > 0.05$ ). The survival analysis demonstrated that patients with higher expression of Tc17 cells were associated with better overall survival ( $P < 0.05$ ). Further analysis showed that patients in early ESCC with higher expression of Tc17 cells was significantly associated with better survival ( $P = 0.017$ ). Although patients in advanced ESCC with higher expression of Tc17 cells displayed better survival, there was no statistically significant ( $P = 0.0742$ ).

**Conclusion:** The expression of Tc17 cells increases in tumor microenvironment and prolongs overall survival of ESCC patients, especially in the early stage, which may be used as a potential predictive molecular marker for ESCC.

**Keywords** esophageal squamous cell carcinoma; Tc17 cells; microenvironment

食管癌是我国第五大常见肿瘤, 也是我国第四大癌症死亡原因<sup>[1]</sup>。食管腺癌和鳞癌是食管癌两种主要组织学亚型。食管腺癌已成为北美和欧洲食管癌的主要类型, 尤其是男性白种人<sup>[2]</sup>, 而食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是我国的主要亚型(占食管癌总数的90%以上)<sup>[3]</sup>。近期研究<sup>[4-6]</sup>表明: ESCC肿瘤微环境中的浸润淋巴细胞是影响食管癌患者预后的重要因素。白细胞介素-17(interleukin 17, IL-17)是近年新发现的一种重要促炎性细胞因子, 主要由CD4<sup>+</sup>T细胞(Th17)等细胞分泌产生, 在多种炎症相关性肿瘤如肝细胞癌、胃癌和非小细胞肺癌中均表达增加<sup>[7-9]</sup>。最新研究<sup>[10-11]</sup>发现: CD8<sup>+</sup>T细胞中亦存在一群可分泌IL-17的细胞, 并将其命名为CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞(Tc17)。Tc17细胞是一组与经典的CD8<sup>+</sup>T细胞不同的新亚型, 其主要通过释放炎性细胞因子, 如IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ 等, 从而诱发严重的免疫相关性疾病, 例如自身免疫性脑脊髓炎, 同样在肿瘤局部微环境中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。本研究采用免疫组织化学双染色法检测ESCC患者的癌巢及相应的癌旁间质中CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞的表达, 并分析其表达水平与患者的临床病理特征的相关性及其对预后的影响, 初步探讨其在ESCC发生发展中的临床意义。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

选取2012年1至12月在南通市肿瘤医院手术切除并且术后病理证实为ESCC患者的癌组织

和相应癌旁正常组织, 剔除具有自身免疫性疾病和其他肿瘤病史的患者。食管癌病理分型及分期标准按照国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)食管癌分期标准<sup>[13]</sup>执行。食管癌患者共69例, 其中男43例, 女26例, 年龄49~75(中位64)岁; 中、高分化50例, 低分化19例。TNM分期: I期25例, II期25例, III期17例, IV期2例。发病部位: 食管上-中段44例, 食管下段25例。本研究经南通市肿瘤医院伦理委员会审核批准, 患者均签署知情同意书。

### 1.2 方法

对69例ESCC组织标本给予10%中性甲醛固定后, 以石蜡包埋切片, 脱蜡。免疫组织化学染色采用EnVision两步法, 具体操作按DS-0001 Polymer双染试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书进行。

Tc17细胞的判断标准为CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>(兔来源的IL-17抗体购自英国Abcam公司)的淋巴细胞, 细胞形态完整, 结构清晰, CD8<sup>+</sup>(小鼠来源的CD8抗体购自美国Novus Biologicals公司)为黄色或棕黄色颗粒定位细胞膜; IL-17<sup>+</sup>为红色颗粒定位细胞质内。结果判断: 首先在低倍镜(4 $\times$ 10)下选取淋巴细胞分布较均匀的视野, 然后在高倍镜(40 $\times$ 10)下进行CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>淋巴细胞的计数, 取5个视野的平均数为判定结果。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布时采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )描述,

差异比较采用配对样本 $t$ 检验。卡方检验用于评价不同水平的Tc17细胞与临床病理特征的关系。生存分析用Kaplan-Meier法和log-rank检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 癌巢和癌旁间质中 Tc17 细胞水平的比较

在食管癌癌巢内, Tc17细胞的分布多成团聚集( $22.11\pm 6.37$ ; 图1, 2); 在癌旁间质内, Tc17细胞多为散点分布( $3.18\pm 1.25$ ; 图3, 4)。癌巢与癌旁间质中Tc17细胞数目的差异有统计学意义( $P<0.001$ , 图5)。

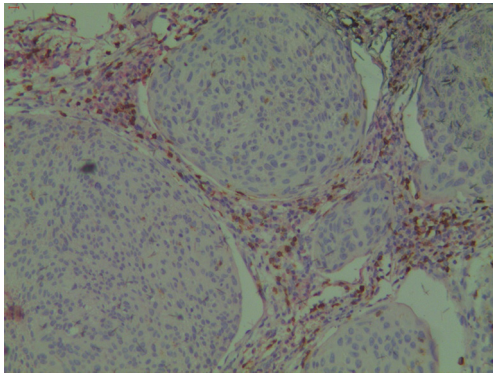


图1 ESCC癌巢中Tc17细胞的表达(EnVision,  $\times 40$ )  
Figure 1 Expression of Tc17 cells in carcinoma nests of ESCC (EnVision,  $\times 40$ )

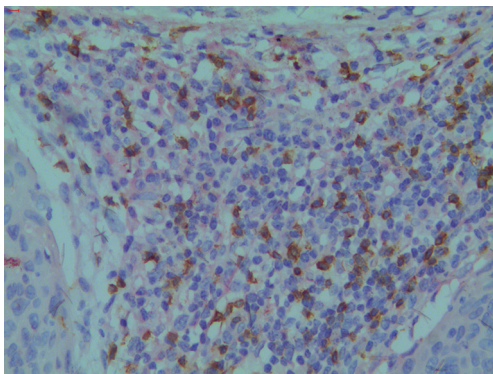


图2 ESCC癌巢中Tc17细胞的表达(EnVision,  $\times 200$ )  
Figure 2 Expression of Tc17 cells in carcinoma nests of ESCC (EnVision,  $\times 200$ )

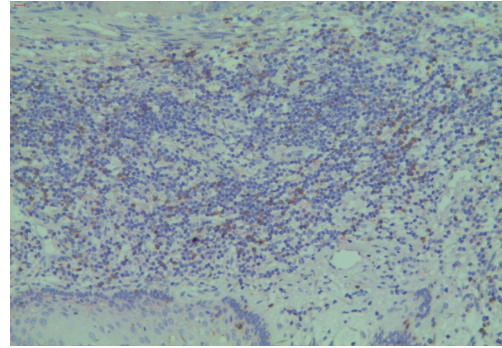


图3 ESCC癌旁间质中Tc17细胞的表达(EnVision,  $\times 40$ )  
Figure 3 Expression of Tc17 cells in paracancerous stroma of ESCC (EnVision,  $\times 40$ )

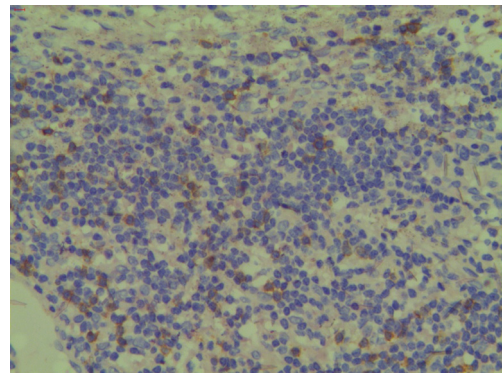


图4 ESCC癌旁间质中Tc17细胞的表达(EnVision,  $\times 200$ )  
Figure 4 Expression of Tc17 cells in paracancerous stroma of ESCC (EnVision,  $\times 200$ )

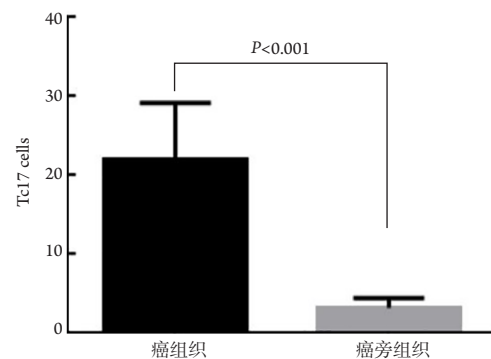


图5 癌巢与癌旁间质中的Tc17细胞水平比较  
Figure 5 Comparison of levels of Tc17 cells in carcinoma nests and paracancerous stroma

## 2.2 Tc17 的表达水平与食管癌患者临床病理特征之间的关系

结合患者的临床病理特征, 进一步分析Tc17的表达水平与食管癌患者临床病理特征之间的关系。以ROC曲线建立的cut off 值定义为临界值, 将Tc17细胞的数量分为高/低表达组。Tc17的表达与患者性别、年龄、肿块长度、发生部位、分化程度、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期差异无统计学意义( $P>0.05$ , 表1)。

## 2.3 Tc17 的表达水平与食管癌患者预后的关系

生存分析显示: Tc17高表达组总体生存期高于低表达组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图6); 进一步分析显示: 在早期ESCC中, Tc17高表达组总体生存期高于低表达组, 差异有统计学意义( $P=0.017$ , 图7), 而在晚期ESCC中, Tc17高表达组总体生存期高于低表达组, 但差异无统计学意义( $P=0.0742$ , 图8)。

表1 Tc17表达与ESCC临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between the expression of Tc17 cells and the clinicopathological characteristics in patients with ESCC

临床病理参数	n	CD8 <sup>+</sup> IL-17 <sup>+</sup>		$\chi^2$	P
		低表达(n=25)	高表达(n=44)		
年龄/岁				0.004	1.000
≤60	19	7	12		
>60	50	18	32		
性别				0.539	0.606
男	43	17	26		
女	26	8	18		
肿块长度/cm				2.860	0.152
<5	59	19	40		
≥5	10	6	4		
发生部位				2.350	0.192
上-中段	44	13	31		
下段	25	12	13		
分化程度				0.391	0.582
中-高分化	50	17	33		
低分化	19	8	11		
T				0.709	0.458
T1+T2	35	11	24		
T3+T4	34	14	20		
淋巴结转移				0.193	0.801
阴性	39	15	24		
阳性	30	10	20		
TNM分期				0.004	1.000
I~II	50	18	32		
III~IV	19	7	12		



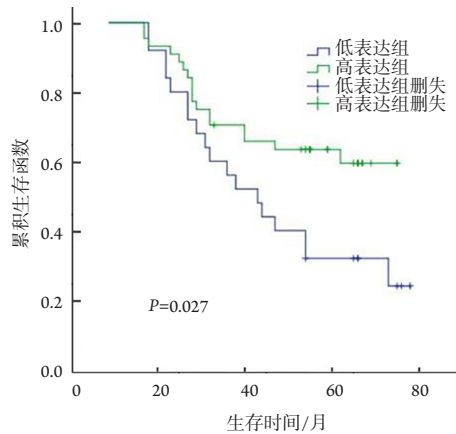


图6 ESCC癌巢中不同水平Tc17的生存曲线

Figure 6 Survival curves of different expression levels of Tc17 cells in ESCC carcinoma nests

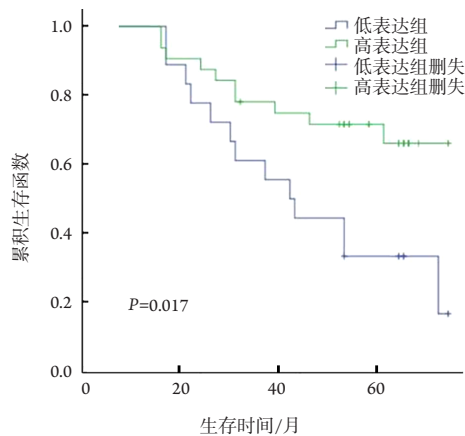


图7 早期(I-II期)ESCC癌巢中不同水平Tc17的生存曲线

Figure 7 Survival curves of different expression levels of Tc17 cells in early stage (I-II) ESCC carcinoma nests

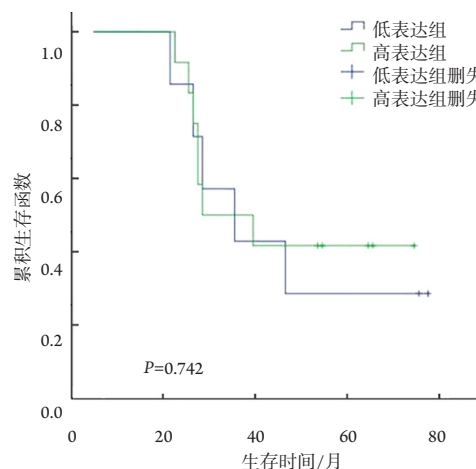


图8 晚期(III-IV期)ESCC癌巢中不同水平Tc17的生存曲线

Figure 8 Survival curves of different expression levels of Tc17 cells in advanced stage (III-IV) ESCC carcinoma nests

### 3 讨论

肿瘤微环境是一个错综复杂的系统,有别于人体正常内环境,主要由肿瘤细胞、免疫细胞、肿瘤血管、成纤维细胞、细胞外基质等多种成分组成<sup>[14]</sup>。T淋巴细胞是肿瘤局部微环境中免疫细胞的重要组成部分。近些年来一些可以产生IL-17的T淋巴细胞,尤其是Tc17, Th17细胞成为近年的研究热点。Tc17细胞是一种新型的细胞毒性T细胞的亚型,其与自身免疫疾病、肿瘤、感染及其他炎症性疾病的发生、发展密切相关<sup>[15-16]</sup>。

为观察Tc17细胞在ESCC患者肿瘤微环境中的表达情况,本研究采用免疫组织化学双染色技术,检测ESCC患者癌巢中Tc17细胞的表达水平,结果显示:在ESCC患者癌巢中,Tc17细胞的表达水平显著高于癌旁间质,表明Tc17细胞与ESCC的发生、发展相关,可能在肿瘤微环境中发挥一定的作用。有研究<sup>[17]</sup>表明分泌IL-17的淋巴细胞及IL-17具有明显的抗肿瘤效应。也有学者<sup>[18]</sup>认为IL-17的抗肿瘤机制可能为IL-17与IFN- $\gamma$ 协同刺激趋化因子9(chemokine cc-motif ligand 9, CXCL9)CXCL9和CXCL10的产生,继而促进细胞毒性T细胞(cytotoxic T cells, CTL)的抗肿瘤作用。本研究结果显示:Tc17细胞表达水平与ESCC患者的临床病理特征无明显相关性;进一步生存分析提示Tc17高表达组总体生存期高于低表达组,尤其在早期ESCC患者中更为显著。

Tc17细胞属于CD8<sup>+</sup>T细胞中一类特殊的亚群,虽然在多种肿瘤中被检测到,但其对肿瘤的作用依然存在争议。有研究<sup>[19]</sup>显示:Tc17细胞不具有经典的CD8<sup>+</sup>T细胞杀死靶细胞的作用,而是主要通过释放促炎因子(IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-22等)来发挥其强大的促进炎症作用,从而在肿瘤微环境中起重要作用。炎症反应在恶性肿瘤的转移和消退中具有重要作用,一项流行病学研究<sup>[20]</sup>证实炎症与肿瘤进展有关。促炎细胞因子IL-17不仅可通过促进血管生成促进肿瘤生长<sup>[21-22]</sup>,还可以募集和活化髓源抑制性细胞到达肿瘤的局部阻碍抗肿瘤免疫应答,从而促进肿瘤生长<sup>[23-24]</sup>。

综上所述,本研究首次发现ESCC患者癌巢中Tc17细胞的表达水平升高,且高表达Tc17组预后较好,尤其在早期ESCC中,属保护性因素,提示Tc17细胞可作为早期ESCC潜在的预后分子标志物。由于肿瘤微环境中的免疫细胞与肿瘤细胞之

间存在复杂的关系, 未来仍需深入了解Tc17细胞在食管癌中的作用, 以期为临床进行抗肿瘤免疫治疗提供一定的实验依据。

## 参考文献

1. Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. *Ann Transl Med*, 2014, 2(7): 61.
2. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(23): 2241-2252.
3. Zhao J, He YT, Zheng RS, et al. Analysis of esophageal cancer time trends in China, 1989—2008[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(9): 4613-4617.
4. Chen L, Deng H, Lu M, et al. B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9): 6015-6023.
5. Lin EW, Karakasheva TA, Hicks PD, et al. The tumor microenvironment in esophageal cancer[J]. *Oncogene*, 2016, 35(41): 5337-5349.
6. Vacchelli E, Semeraro M, Enot DP, et al. Negative prognostic impact of regulatory T cell infiltration in surgically resected esophageal cancer post-radiochemotherapy[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 20840-20850.
7. Liao R, Sun J, Wu H, et al. High expression of IL-17 and IL-17RE associate with poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32: 3.
8. Liu T, Peng L, Yu P, et al. Increased circulating Th22 and Th17 cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer[J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(6): 1332-1339.
9. Yamada Y, Saito H, Ikeguchi M. Prevalence and clinical relevance of Th17 cells in patients with gastric cancer[J]. *J Surg Res*, 2012, 178(2): 685-691.
10. Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge[J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3469-3481.
11. Huber M, Heink S, Grothe H, et al. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(7): 1716-1725.
12. Kuang DM, Peng C, Zhao Q, et al. Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8+ T cells in hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1544-1549.
13. Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: esophagus and esophagogastric junction[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(7): 1721-1724.
14. Brown JM. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1(5): 453-458.
15. Zhang Y, Hou F, Liu X, et al. Tc17 cells in patients with uterine cervical cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e86812.
16. Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, et al. CD8(+) T cells that produce interleukin-17 regulate myeloid-derived suppressor cells and are associated with survival time of patients with gastric cancer[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(4): 951-962.
17. Garcia-Hernandez Mde L, Hamada H, Reome JB, et al. Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells control the growth of B16 melanoma in mice[J]. *J Immunol*, 2010, 184(8): 4215-4227.
18. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(4): 248-256.
19. Kondo T, Takata H, Matsuki F, et al. Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells producing IL-17[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 1794-1798.
20. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 431-436.
21. Liu J, Duan Y, Cheng X, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(2): 348-354.
22. Wakita D, Sumida K, Iwakura Y, et al. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(7): 1927-1937.
23. Ma S, Cheng Q, Cai Y, et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(7): 1969-1982.
24. He D, Li H, Yusuf N, et al. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells[J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2281-2288.

**本文引用:** 宋丽, 尹海兵, 张珣磊, 许峰, 王燕, 杨磊. Tc17细胞在食管鳞状细胞癌患者肿瘤微环境中的表达及其预后的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(7): 1418-1423. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.007

**Cite this article as:** SONG Li, YIN Haibing, ZHANG Xunlei, XU Feng, WANG Yan, YANG Lei. Expression of Tc17 cells in tumor microenvironment in patients with esophageal squamous cell carcinoma and its effect on prognosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(7): 1418-1423. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.07.007