

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.006

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.006>

M2 型肿瘤相关巨噬细胞在非小细胞肺癌中的作用及临床意义

齐诗雨¹, 周磊², 韩伟³, 杜雪梅³, 黄维清²

(1. 青岛大学附属青岛市市立医院, 山东 青岛 266000; 2. 青岛市市立医院病理科, 山东 青岛 266000;
3. 青岛市市立医院呼吸与危重症医学二科, 山东 青岛 266000)

[摘要] 目的: 通过评估CD68和CD206在肿瘤间质及癌巢中的表达, 探讨M2型肿瘤相关巨噬细胞在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的作用及临床意义。方法: 收集115例NSCLC标本, 通过免疫组织化学染色检测CD68、CD206的表达并计算其数量, 分析不同部位的M2型肿瘤相关巨噬细胞与肿瘤临床特征的相关性; 同时结合肿瘤EGFR基因突变检测, 分析M2型肿瘤相关巨噬细胞与基因突变状态的相关性。结果: 癌巢和间质内CD68和CD206的表达均高于周围正常组织, 且在肿瘤间质内的表达显著高于癌巢。癌巢内CD68与肿瘤大小、TNM分期呈负相关, 肿瘤间质内CD68与肿瘤远处转移呈负相关。癌巢CD206的表达在女性患者中显著高于男性患者, 且与肿瘤大小及分期呈负相关; 肿瘤间质中CD206的表达在男性患者中显著高于女性患者, 且与肿瘤大小呈正相关。女性NSCLC患者癌巢的CD206与肿瘤大小、临床分期及远处转移呈负相关。腺癌中癌巢与间质CD206与肿瘤进展呈负相关。男性患者癌巢CD206的表达与EGFR突变相关。结论: M2型肿瘤相关巨噬细胞的数量与NSCLC的肿瘤进展密切相关, 其在不同的组织学类型、不同性别及肿瘤不同位置中对肿瘤的发生发展作用具有差异性, 该研究结果为以M2型肿瘤细胞为靶点的靶向药物的研发提供新的证据及思路。

[关键词] 非小细胞肺癌; 肿瘤炎症微环境; 肿瘤相关巨噬细胞

Effects and clinical significance of M2 tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer

QI Shiyu¹, ZHOU Lei², HAN Wei³, DU Xuemei³, HUANG Weiqing²

(1. Qingdao Municipal Hospital Affiliated to College of Qingdao University, Qingdao Shandong 266000; 2. Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong 266000; 3. Second Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong 266000, China)

Abstract **Objective:** To explore the effects and clinical significance of M2 tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer (NSCLC) through evaluating the expressions of CD68 and CD206 in tumor stroma and cancer nests. **Methods:** A total of 115 NSCLC specimens were collected. Immunohistochemical staining was performed to detect the expression and calculate the number of CD68 and CD206. The correlation between M2 tumor-associated macrophages and tumor clinicopathological features at different locations was analyzed. At the same

收稿日期 (Date of reception): 2020-11-23

通信作者 (Corresponding author): 黄维清, Email: 18678900607@163.com

基金项目 (Foundation item): 山东省卫健委课题(2017wj309)。This work was supported by Shandong Provincial Health Commission, China (2017wj309).

time, the correlation between M2 tumor-associated macrophages and gene mutation status was also analyzed in combination with *EGFR* gene mutation detection. **Results:** The expressions of CD68 and CD206 were higher in both cancer nests and tumor stroma than those in the corresponding normal tissues. The expressions in tumor stroma were significantly higher than those in cancer nests. CD68 expressions in cancer nests was negatively correlated with tumor size and TNM stage. CD68 in tumor stroma was negatively correlated with distant metastasis of tumors. The expression of CD206 in cancer nests was significantly higher in female patients than that in male patients, and was negatively correlated with tumor size and stage. The expression of CD206 in tumor stroma was significantly higher in male patients than that in female patients and positively correlated with tumor size. In female NSCLC patients, CD206 in cancer nests was negatively correlated with tumor size, TNM stage and distant metastasis. The expressions of CD206 in adenocarcinoma were negatively associated with tumor development. The expressions of CD206 in tumor nests were associated with *EGFR* mutations in male but not in female. **Conclusion:** The number of M2 tumor-associated macrophages is closely related to the tumor progression of NSCLC. M2 tumor-associated macrophages have different effects on the initiation and development of NSCLC tumors in different histological types, different genders, and different locations of the tumor. The results of this study provide new evidence and ideas for the development of therapeutic drugs targeting M2 tumor cells.

Keywords non-small cell lung cancer; tumor inflammatory microenvironment; tumor-associated macrophages

虽然随着靶向治疗和免疫治疗的普及, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗取得了非常大的进展, 但仍然是病死率最高的恶性肿瘤, 5年生存率维持约为15%^[1], 因此发现新的肿瘤发生、发展通路是寻找有效药物靶点、提高肿瘤治疗效能的重要方法。近年来研究^[2]表明: 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境的重要组成部分, 在NSCLC肿瘤进展、血管生成及远处转移中具有重要作用, 是患者预后的重要因素, 对TAMs的深入研究有望通过改造和重塑肿瘤基质的微环境, 从而提高药物的治疗效果。

肿瘤微环境由肿瘤相关成纤维细胞、内皮细胞、免疫细胞、巨噬细胞及细胞间因子、细胞外基质等共同组成。TAMs是其重要组成部分, 可以与肿瘤细胞相互作用来促进肿瘤的侵袭和转移^[3]。巨噬细胞的表型可分为M1和M2两种类型。M1(经典活化)型TAMs在肿瘤发生及早期阶段占优势, 由脂蛋白、细胞因子(如干扰素)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等诱导激活, 其特点是通过分泌细胞因子激活T细胞免疫应答从而抑制肿瘤生长。M2(选择激活)型TAMs的激活是由巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)、白细胞介素、肿瘤生长因子 β (tumor growth factor- β , TGF- β)等诱导的, 其功能包括清除碎片、促进血管生成、组织重塑和修复, 一旦肿瘤建立, M2型TAMs可以创造一种有利于血管生成、肿瘤生

长和存活的微环境^[4-6], 是促肿瘤生长及转移的重要因素。研究^[7]表明: 肿瘤间质M2型TAMs密度越高, 肿瘤越具有侵袭性, 且与病理分期和无病生存期(disease-free survival, DFS)、总体生存期(overall survival, OS)的降低相关。

已有研究^[7-8]表明: M2型TAMs与NSCLC的肿瘤分期、淋巴结转移及胸膜侵犯密切相关, 肿瘤间质中高密度M2型TAMs浸润是肿瘤预后不良的重要因素。Ohtaki等^[9]研究证实: 肿瘤间质内CD204标记的M2型TAMs密度高患者OS显著低于低表达人群。另一研究^[7]也证实肿瘤间质M2型TAMs高密度的NSCLC患者OS及DFS均明显降低。然而, 目前对于NSCLC中M2型TAMs的研究仍不完善, 部分结果还存在较大的争议。例如, M2型TAMs在肺腺癌中与性别及吸烟密切相关, 而在鳞癌中与两者均无相关性^[9-10]。有研究^[11]证明: NSCLC中肿瘤间质M2型TAMs仅与吸烟相关, 与肿瘤分期、淋巴结转移及远处转移均无相关性。与之相反, 其他研究^[7]则表明NSCLC中肿瘤间质M2型TAMs与吸烟无关, 而与淋巴结转移、肿瘤分型及肿瘤分期具有相关性。

目前TAMs的相关靶向药物已进入研发阶段, 对TAMs的深入研究有助于我们为NSCLC的个体化治疗提供新的依据。TAMs在肿瘤中的作用具有可塑性, 不同肿瘤部位内浸润的TAMs生物学功能有很大的差异^[7,12]。为进一步明确M2型TAMs在NSCLC中的作用, 本研究收集115例NSCLC患者的

手术标本及临床病理资料, 通过免疫组织化学方法检测CD68和CD206的表达, 分析其与临床病理资料的相关性, 阐述不同肿瘤部位(癌巢与间质)中M2型TAMs与NSCLC发生发展的关系, 同时结合肿瘤EGFR基因突变检测, 分析M2型肿瘤相关巨噬细胞与基因突变状态的相关性。

1 材料与方法

1.1 组织标本及临床病例资料获取

收集2018年7月1日至2019年6月30日青岛市市立医院胸外科NSCLC的手术切除标本115例, 其中男72例, 女43例, 年龄45~82(中位数64)岁; 鳞状细胞癌38例, 浸润性腺癌77例。以上标本均经病理诊断结果证实, 患者术前未经任何放化疗。通过检索临床病例数据库, 获得包括性别、年龄、肿瘤大小、TNM分期、病理类型及有无淋巴结转移等信息。标本均常规脱水、固定、石蜡包埋及HE染色, 病理结果经两名高年资病理诊断医师盲评。本研究经青岛市市立医院医学伦理委员会的批准。

1.2 免疫组织化学染色

将3~5 μm 组织切片置于二甲苯中脱蜡, 梯度乙醇脱水, 并进行抗原高压热修复, 置于3%过氧化氢中10 min, 去除内源性过氧化物酶。用PBS洗涤3次后, 用2%羊血清白蛋白封闭20 min, 之后分别滴加一抗CD68(1:100, kit-0026, 福州迈新生物技术开发有限公司)、CD206(1:300, #91992S, 美国CST公司), 在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育60 min, PBS洗涤后加入二抗(酶标羊抗小鼠/兔IgG复合物, 北京中杉金桥生物技术有限公司)15 min, 之后进行DAB显色5 min, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化、返蓝后, 自来水冲洗1 min, 再经梯度乙醇脱水, 最后封片。全程按照说明书进行操作, 严格控制时间及温度, 每次染色均设阳性及阴性对照。

本研究采用扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)对NSCLC样本行EGFR基因检测, 项目包括外显子19上的缺失突变、外显子21上L858R的点突变、外显子21的L861Q突变、外显子20上T790M突变以及外显子18上G719X突变(包括G719A、G719S、G719C)。

1.3 结果判定

选择CD68和CD206来标记M2巨噬细胞, CD68和CD206阳性反应部位在巨噬细胞的细胞膜

和细胞质。从每张切片中选择5个TAMs数量热点区的高倍视野(图1), 根据TAMs在癌巢、间质和周围正常组织中的浸润分别计数, 其中癌巢TAMs指渗入肿瘤细胞巢中的TAMs, 间质TAMs指肿瘤相关基质中的TAMs, 并计算平均数。

1.4 统计学处理

使用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。CD68、CD206在NSCLC患者的癌巢、间质和周围正常组织中分布的相关性, 与NSCLC患者临床特征的相关性, 以及与EGFR之间表达的相关性均使用Spearman相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者情况

在115例NSCLC患者中, 年龄 ≤ 60 岁的43例(37.4%), > 60 岁的72例(62.6%); 肿瘤最大径 ≤ 3 cm的86例(74.8%), > 3 cm的29例(25.2%); 淋巴结转移的30例(26.1%), 无淋巴结转移的85例(73.9%); TNM分期(采用第八版国际肺癌TNM分期标准)I期65例(56.5%), II期15例(13.0%), III期13例(11.3%), IV期22例(19.2%)。

2.2 TAMs在NSCLC癌巢与间质中的表达

观察CD68、CD206在NSCLC的癌巢、间质和周围正常组织的表达情况并计数, 结果表明: 癌巢和间质内TAMs表达均显著高于周围正常组织, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 且肿瘤间质中的TAMs的表达显著高于癌巢($P < 0.01$, 图2A)。M2型TAMs与TAMs表达结果一致, 癌巢及间质内的表达均显著高于周围正常组织($P < 0.01$), 癌巢内TAMs的表达显著低于肿瘤间质($P < 0.01$, 图2B)。

2.3 TAMs与NSCLC患者临床特征的相关性

癌巢TAMs的CD68(CD68-T)的表达与肿瘤大小、TNM分期负相关(分别 $P = 0.012$, $P = 0.013$); 存在于肿瘤间质中TAMs的CD68(CD68-S)的表达与肿瘤的远处转移呈负相关($P = 0.039$)。CD68-S与肿瘤组织学分型及患者性别均具有相关性($P < 0.001$); 鳞癌中CD68-S的表达显著高于腺癌(40.74 ± 16.45 vs 29.81 ± 15.61 , $P < 0.001$); 男性NSCLC患者CD68-S的数量高于女性(37.31 ± 16.66 vs 26.53 ± 14.56 , $P < 0.001$)。CD68在NSCLC中的表达与临床特征的相关性见表1。

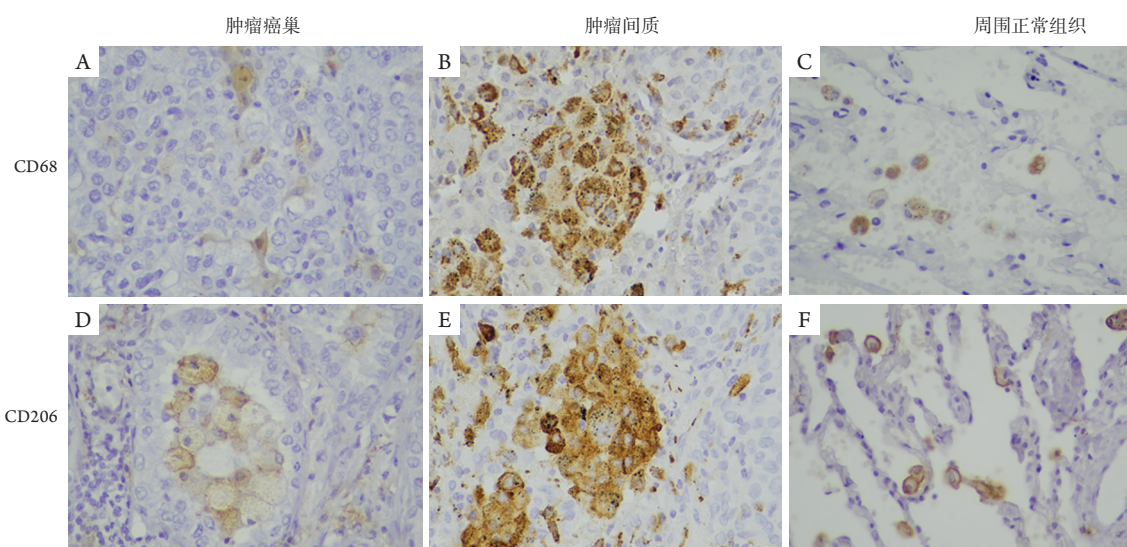


图1 NSCLC的IHC染色($\times 400$)

Figure 1 Immunohistochemical staining of NSCLC ($\times 400$)

(A~C)CD68分别在NSCLC的癌巢、间质和周围正常组织中的表达；(D~E)CD206分别在NSCLC的癌巢、间质和周围正常组织中的表达。

(A~C) The expression of CD68 in the cancer nest, tumor stroma, and corresponding normal tissues of NSCLC, respectively; (D~E) The expression of CD206 in the cancer nest, tumor stroma, and corresponding normal tissues of NSCLC, respectively.

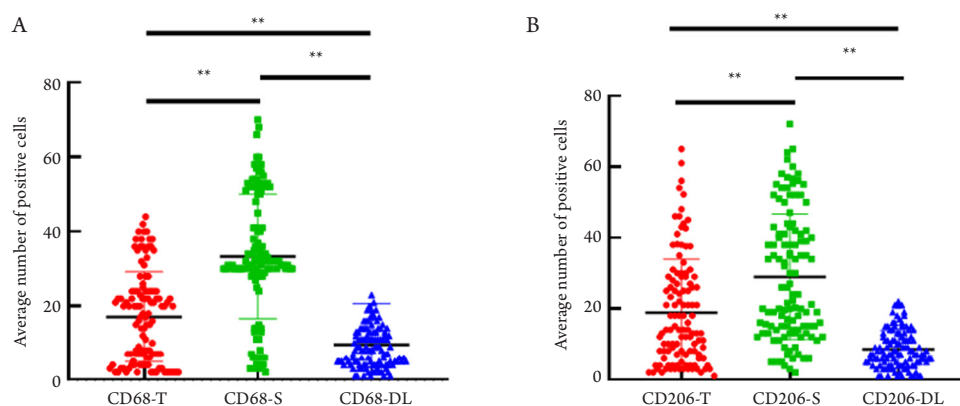


图2 CD68及CD206在NSCLC中的表达

Figure 2 Expression of CD68 and CD206 in NSCLC

(A)CD68在NSCLC的癌巢(T)、间质(S)和周围肺组织(DL)中的表达；(B)CD206在NSCLC的癌巢(T)、间质(S)和周围肺组织(DL)中的表达情况。 $**P<0.01$ 。

(A) The expression of CD68 in the cancer nest (T), tumor stroma (S), and corresponding normal tissues (DL) of NSCLC; (B) the expression of CD206 in the cancer nest (T), tumor stroma (S), and corresponding normal tissues (DL) of NSCLC. $**P<0.01$.

癌巢内的CD206(CD206-T)与肿瘤大小及TNM分期呈负相关($P=0.024$, $P=0.046$), 存在于肿瘤间质中的CD206(CD206-S)与肿瘤大小呈正相关($P=0.006$)。与CD68相似, CD206-T及CD206-S与肿瘤组织学分型及患者性别均具有相关性。鳞癌中CD206-T的表达显著低于腺癌(9.63 ± 9.13 vs 23.53 ± 15.52 , $P<0.001$); 鳞癌中CD206-S的表

达显著高于腺癌(37.83 ± 17.94 vs 24.16 ± 15.54 , $P<0.001$); 男性NSCLC患者CD206-S的数量显著高于女性(33.41 ± 17.63 vs 21.49 ± 15.13 , $P=0.001$); 而女性NSCLC患者CD206-T的数量显著高于男性(25.15 ± 14.46 vs 15.19 ± 14.34 , $P<0.001$)。CD206在NSCLC中的表达与临床特征的相关性见表2。

表1 CD68在NSCLC中的表达与临床特征的关系

Table 1 Relationship between the expression of CD68 in NSCLC and clinical characteristics

临床特征	例数(%)	癌巢		间质	
		CD68	P	CD68	P
性别			0.608		<0.001
男	72 (62.6)	16.59 ± 11.78		37.31 ± 16.66	
女	43 (37.4)	17.97 ± 12.76		26.53 ± 14.56	
年龄/岁			0.723		0.455
≤60	43 (37.4)	18.33 ± 14.06		33.08 ± 14.79	
>60	72 (62.6)	16.39 ± 10.85		33.40 ± 17.82	
肿瘤大小/cm			0.012		0.069
≤3	86 (74.8)	18.65 ± 12.37		31.64 ± 15.68	
>3	29 (25.2)	12.55 ± 10.23		38.14 ± 18.83	
组织学类型			0.611		<0.001
鳞癌	38 (33.1)	15.79 ± 10.65		40.74 ± 16.45	
腺癌	77 (66.9)	17.91 ± 12.82		29.81 ± 15.61	
淋巴结转移			0.242		0.152
有	30 (26.1)	14.93 ± 12.72		36.74 ± 16.35	
无	85 (73.9)	17.88 ± 11.88		32.06 ± 16.72	
临床分期			0.013		0.430
I	65 (56.5)	19.70 ± 11.83		33.70 ± 16.59	
II	15 (13.0)	13.00 ± 12.34		36.48 ± 13.71	
III	13 (11.3)	14.00 ± 11.62		39.23 ± 17.56	
IV	22 (19.2)	14.09 ± 11.98		26.31 ± 17.03	
TNM分期					
T期			0.057		0.893
T1	63 (54.8)	18.92 ± 12.04		33.79 ± 15.42	
T2	45 (39.1)	15.00 ± 12.45		31.60 ± 18.13	
T3	3 (2.6)	11.00 ± 11.53		36.33 ± 28.04	
T4	4 (3.5)	17.00 ± 7.07		41.75 ± 12.41	
N期			0.131		0.145
N0	87 (75.6)	17.96 ± 11.75		32.04 ± 17.09	
N1	17 (14.8)	15.82 ± 13.90		37.37 ± 13.27	
N2	11 (9.6)	12.36 ± 11.94		36.72 ± 18.03	
M期			0.174		0.039
M0	93 (80.9)	17.82 ± 12.10		34.93 ± 16.26	
M1	22 (19.1)	14.09 ± 11.98		26.31 ± 17.03	

临床分期采用中华医学会肺癌临床诊疗指南(2018版)。

The Chinese Medical Association Guidelines for Clinical Diagnosis and Treatment of Lung Cancer (2018 edition) were adopted for clinical staging.

表2 CD206在NSCLC中的表达与临床特征的关系

Table 2 Relationship between CD206 expression in NSCLC and clinical characteristics

临床特征	例数(%)	癌巢		间质	
		CD206	P	CD206	P
性别			<0.001		0.001
男	72 (62.6)	15.19 ± 14.34		33.41 ± 17.63	
女	43 (37.4)	25.15 ± 14.46		21.49 ± 15.13	
年龄/岁			0.136		0.239
≤60	43 (37.4)	22.27 ± 15.06		26.15 ± 15.85	
>60	72 (62.6)	16.91 ± 14.89		30.63 ± 18.55	
肿瘤大小/cm			0.024		0.006
≤3	86 (74.8)	20.88 ± 16.01		26.10 ± 16.46	
>3	29 (25.2)	13.10 ± 10.29		37.42 ± 18.62	
组织学类型			<0.001		<0.001
鳞癌	38 (33.1)	9.63 ± 9.13		37.83 ± 17.94	
腺癌	77 (66.9)	23.53 ± 15.52		24.16 ± 15.54	
淋巴结转移			0.537		0.353
有	30 (26.1)	18.28 ± 16.12		31.58 ± 18.45	
无	85 (73.9)	19.14 ± 14.84		28.03 ± 17.37	
临床分期			0.317		0.661
I	65 (56.5)	20.06 ± 15.34		27.39 ± 17.05	
II	15 (13.0)	18.24 ± 14.83		38.33 ± 17.73	
III	13 (11.3)	14.53 ± 14.93		32.20 ± 18.74	
IV	22 (19.2)	18.58 ± 15.27		25.27 ± 17.43	
TNM分期					
T期			0.046		0.061
T1	63 (54.8)	21.44 ± 16.28		26.06 ± 16.38	
T2	45 (39.1)	16.50 ± 13.47		32.12 ± 18.96	
T3	3 (2.6)	16.00 ± 12.12		39.00 ± 24.26	
T4	4 (3.5)	8.50 ± 8.73		31.50 ± 13.77	
N期					
N0	87 (75.6)	19.05 ± 14.75	0.492	28.04 ± 17.64	0.355
N1	17 (14.8)	20.74 ± 16.99		33.82 ± 17.56	
N2	11 (9.6)	15.00 ± 15.80		28.69 ± 18.26	
M期			0.854		0.321
M0	93 (80.9)	18.99 ± 15.16		29.83 ± 17.68	
M1	22 (19.1)	18.58 ± 15.27		25.27 ± 17.43	

2.4 TAMs 在不同性别 NSCLC 患者中与临床特征的相关性

为进一步阐述性别对TAMs的影响,我们在男性及女性NSCLC患者中分别探讨了TAMs与临床特征的关系,结果显示:在72例NSCLC男性患者中,年龄 ≤ 60 岁的24例(33.3%), >60 岁的48例(66.7%);淋巴结转移的21例(29.2%),无淋巴结转移的51例(70.8%);肿瘤最大径 ≤ 3 cm的48例(66.7%), >3 cm的24例(33.3%);TNM分期I期42例(58.3%),II期9例(12.5%),III期

11例(15.3%),IV期10例(13.9%)。TAMs与NSCLC男性患者的临床特征的相关性见表3。在43例NSCLC女性患者中,年龄 ≤ 60 岁的19例(44.2%), >60 岁的24例(55.8%);淋巴结转移的9例(20.9%),无淋巴结转移的34例(79.1%);肿瘤最大径 ≤ 3 cm的38例(88.4%), >3 cm的5例(11.6%);TNM分期I期23例(53.5%),II期6例(13.9%),III期2例(4.7%),IV期12例(27.9%)。TAMs与NSCLC女性患者的临床特征的相关性见表4。

表3 CD68和CD206在男性NSCLC中的表达与临床特征的关系

Table 3 Relationship between the expression of CD68 and CD206 in male NSCLC and clinical characteristics

临床特征	n	癌巢CD68		间质CD68		癌巢CD206		间质CD206	
		r	P	r	P	r	P	r	P
年龄/岁									
≤ 60	24								
>60	48	0.05	0.678	0.135	0.258	-0.274	0.020	0.126	0.293
肿瘤大小/cm									
≤ 3	48								
>3	24	-0.244	0.039	0.127	0.289	-0.014	0.910	0.178	0.135
淋巴结转移									
有	21								
无	51	0.218	0.066	-0.097	0.416	0.067	0.576	-0.046	0.669
临床分期									
I	42								
II	9								
III	11								
IV	10	-0.175	0.142	0.083	0.489	-0.066	0.581	0.091	0.449
TNM分期									
T期									
T1	37								
T2	28								
T3	3								
T4	4	-0.172	0.149	0.093	0.436	-0.051	0.673	0.147	0.219
N期									
N0	51								
N1	12								
N2	9	-0.233	0.049	0.104	0.384	-0.086	0.472	0.037	0.756
M期									
M0	62								
M1	10	0.009	0.939	-0.021	0.859	0.105	0.378	-0.002	0.987

表4 CD68和CD206在女性NSCLC中的表达与临床特征的关系

Table 4 Relationship between the expression of CD68 and CD206 in female NSCLC and clinical characteristics

临床特征	n	癌巢CD68		间质CD68		癌巢CD206		间质CD206	
		r	P	r	P	r	P	r	P
年龄/岁									
≤60	19								
>60	24	-0.159	0.309	-0.244	0.114	-0.028	0.857	-0.033	0.837
肿瘤大小/cm									
≤3	38								
>3	5	-0.182	0.244	0.111	0.478	-0.331	0.030	0.187	0.229
淋巴结转移									
有									
无		-0.099	0.526	-0.073	0.640	-0.021	0.895	0.005	0.977
临床分期									
I	23								
II	6								
III	2								
IV	12	-0.312	0.042	-0.344	0.024	-0.485	0.007	0.085	0.654
TNM分期									
T期									
T1	26								
T2	17								
T3	0								
T4	0	-0.163	0.295	-0.313	0.041	-0.397	0.008	0.075	0.634
N期									
N0	36								
N1	5								
N2	2	0.064	0.684	0.065	0.677	0.140	0.371	-0.013	0.935
M期									
M0	31								
M1	12	-0.371	0.014	-0.427	0.004	-0.310	0.043	-0.077	0.622

男性NSCLC患者的CD68-T表达与肿瘤大小、淋巴结转移呈负相关($P=0.039$, $P=0.049$), CD206-T表达仅与年龄有相关性, 与肿瘤分期、淋巴结转移及远处转移均无相关性。CD68-S及CD206-S表达与临床特征均无相关性。而在女性NSCLC患者, CD68-T、CD68-S及CD206-T表达与

肿瘤分期($P=0.042$, $P=0.024$, $P=0.007$)及远处转移($P=0.014$, $P=0.004$, $P=0.043$)均呈负相关, 差异有统计学意义。此外, CD206-T表达与肿瘤大小呈负相关($P=0.03$), CD68-S及CD206-T表达与肿瘤T分期呈负相关($P=0.041$, $P=0.008$), 未观察到CD206-S表达与临床特征的相关性。

在115例NSCLC患者中, 腺癌77例[年龄45~82(平均63.5)岁], 其中女40例(51.9%), 男37例(48.1%), 肿瘤大小0.8~7 cm, 最大径 \leq 3 cm的63例(81.8%), $>$ 3 cm的14例(18.2%), 有淋巴结转

移者19例(24.7%), 无淋巴结转移者58例(75.3%), TNM分期I期41例(53.2%), II期7例(9.1%), III期7例(9.1%), IV期22例(28.6%)。CD68和CD206在腺癌中的表达与临床特征的相关性见表6。

表6 CD68和CD206在腺癌中的表达与临床特征的关系

Table 6 Relationship between the expression of CD68 and CD206 in adenocarcinoma and clinical characteristics

临床特征	<i>n</i>	癌巢CD68		间质CD68		癌巢CD206		间质CD206	
		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
年龄/岁									
\leq 60	35								
$>$ 60	42	-0.043	0.711	-0.087	0.450	-0.045	0.696	-0.018	0.875
性别									
男	37								
女	40	0.023	0.844	-0.331	0.003	0.184	0.110	-0.335	0.003
肿瘤大小/cm									
\leq 3	63								
$>$ 3	14	-0.345	0.002	0.169	0.142	-0.349	0.002	0.255	0.025
淋巴结转移									
有	19								
无	58	0.098	0.397	-0.240	0.035	0.005	0.967	-0.123	0.285
临床分期									
I	41								
II	7								
III	7								
IV	22	0.281	0.013	0.004	0.968	0.168	0.129	-0.372	0.001
TNM分期									
T期									
T1	44								
T2	31								
T3	2								
T4	0	-0.247	0.025	-0.108	0.330	-0.356	0.001	0.040	0.723
N期									
N0	59								
N1	11								
N2	7	-0.175	0.113	0.186	0.093	-0.057	0.610	0.061	0.582
M期									
M0	55								
M1	22	-0.210	0.056	-0.155	0.161	-0.259	0.018	-0.076	0.496

在鳞状细胞癌中, CD206-T的表达与患者性别具有相关性($P=0.036$), 与其他临床特征均无相关性, 而CD68-T、CD68-S以及CD206-S的表达与所有临床特征均无相关性。腺癌中CD68-T的表达与肿瘤大小和临床分期呈负相关($P=0.002$, $P=0.025$), CD68-S的表达与淋巴结转移呈负相关($P=0.035$); CD206-T的表达与肿瘤大小、临床分期及远处转移呈负相关($P=0.002$, $P=0.001$, $P=0.018$), CD206-S的表达与肿瘤大小呈正相关($P=0.025$), 与临床分期呈负相关($P=0.001$)。CD68-S与CD206-S的表达均与性别具有相关性。

表7 NSCLC中EGFR与TAMs的关系

Table 7 Relationship between EGFR and TAMs in NSCLC

EGFR突变	n	癌巢CD68		间质CD68		癌巢CD206		间质CD206	
		r	P	r	P	r	P	r	P
总计									
有	28								
无	60	-0.047	0.662	-0.319	0.002	0.292	0.006	-0.239	0.025
男									
有	9								
无	49	0.068	0.610	-0.184	0.167	0.344	0.008	-0.148	0.268
女									
有	19								
无	12	-0.168	0.207	-0.052	0.699	-0.013	0.920	-0.067	0.617

3 讨论

近年来研究^[13]表明: TAMs表型复杂, 其生物学功能的多样性是肿瘤发生发展的重要机制。在恶性肿瘤的发生阶段, TAMs通过激活宿主免疫应答及免疫监视来抑制肿瘤生长; 而恶性肿瘤形成后, TAMs则通过分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)促进血管生成, 上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)降解细胞外基质等方式重塑肿瘤微环境, 加快肿瘤的发展和转移。此外, TAMs可以激活肿瘤细胞内抗凋亡机制, 降低化疗药物的治疗效果; TAMs的Fc受体可以与抗PD-1药物结合减弱免疫治疗的药物疗效^[14]。由于TAMs的功能具有组织特异性, 甚至在同一肿瘤的不同部位作用不尽相同,

2.6 TAMs与EGFR基因突变的相关性

因部分病例未进行EGFR检测, 经临床数据库查找, 最终收集到EGFR分子结果89例, 其中无突变61例(68.5%), 有突变28例(31.5%), 包括19-Del突变(12例)、20-Ins突变(2例)、G719X突变(3例)、L858R突变(10例)、L861Q突变(1例); 男性EGFR突变者9例(15.5%), 无突变者49例(84.5%); 女性EGFR突变者19例(61.3%), 无突变者12例(38.7%)。NSCLC中EGFR与TAMs的表达相关性见表7。表明无论男性还是女性NSCLC患者, CD68-S及CD68-T的表达与EGFR突变状态均无相关性, 而男性患者的CD206-T表达与EGFR突变呈正相关($P=0.008$)。

因此对TAMs的深入研究可以为靶向药物的研发提供更加精准的科学依据。

TAMs的浸润与肿瘤患者的总生存率呈负相关, 因此可作为评估肿瘤恶性程度指标之一, 成为肿瘤侵袭和患者预后的潜在生物标志物。癌巢、间质均可作为肺癌患者的预后指标之一。肺癌中癌巢TAMs越高, 患者生存率越高; 相反, 癌间质TAMs越高, 患者生存率越低^[15]。M1及M2是TAMs极化的2种终端表型, 代表了TAMs在肿瘤的发生发展中的双向作用。CD68是一种广谱巨噬细胞标志物, 无法将M1和M2巨噬细胞区别开来^[16], CD206即C型甘露糖受体1, 通常用于M2巨噬细胞标志^[4]。与之前研究结果类似, 本研究结果表明: CD68与NSCLC肿瘤进展呈负相关, 而CD206在肿瘤中的不同位置的表达与肿瘤进展的关系有所差

异。癌巢中CD206与肿瘤进展呈负相关, 间质中CD206与肿瘤进展呈正相关。TAMs在肿瘤不同位置中作用不同, 例如癌巢中M1型TAMs与NSCLC预后相关, 而间质中M1型TAMs与预后无关; 间质M2型TAMs在吸烟人群中表达数量明显增加, 而癌巢中M2型巨噬细胞与吸烟不具备相关性^[11]。本研究结果同样也证实了M2型TAMs在肿瘤组织中浸润的不同部位在NSCLC的发生发展中的作用不同, 其在间质中有促肿瘤的作用, 而在癌巢中可能在抑制肿瘤生长中的作用。

M2型TAMs的表达具有性别和组织学类型特异性, 间质CD206在鳞癌中的表达均高于腺癌, 男性表达均高于女性, 而癌巢中CD206的表达存在完全相反的结果。因此, 除浸润部位外、患者性别及肿瘤组织学类型是影响TAMs在肿瘤中作用的重要因素。我们还研究了在不同性别中TAMs与临床特征的相关性, 结果表明: 男性患者中CD206与肿瘤进展(肿瘤大小、肿瘤分期、淋巴结转移及远处转移)均不具有相关性, 而在女性NSCLC患者中, 癌巢的CD206与肿瘤的进展呈负相关; CD206与鳞状细胞癌的进展不具有相关性, 而与腺癌进展呈负相关。

在本研究中, M2型TAMs在NSCLC的肿瘤进展中的作用具有性别差异, 女性患者可能受此影响更深, 推测这是因为性激素在TAMs的浸润机制中作用程度不同。过敏性哮喘中巨噬细胞的M2极化与疾病的严重程度和性别有关, 青春期前女性患哮喘的概率大于青春期前男性, 成年女性大于男性。研究^[17]发现: 尽管男女的性激素均可增强M2巨噬细胞的极化, 但雌激素却是比雄激素更强的增敏剂。也有学者^[18]推测: 巨噬细胞的M2极化的女性优势可能与女性人群中自身免疫疾病的发生率高有关。本研究结果也同样提示女性NSCLC患者中TAMs在肿瘤进展中的作用大于男性, 相关机制有待于进一步研究和证实。研究^[9-10]证明: M2型TAMs在NSCLC不同组织学类型中与性别和吸烟的相关性也不相同, 腺癌中具有相关性, 而在鳞癌中未观察到相关性。本研究结果也同样表明TAMs在腺癌中对肿瘤进展的作用大于鳞癌。

针对EGFR突变的酪氨酸激酶抑制剂是NSCLC靶向治疗的重要进展。EGFR属于酪氨酸激酶家族, 当其受到刺激时, 跨膜受体触发一系列的细胞内信号转导, 进而影响细胞增殖、细胞凋亡和血管生成。相关研究^[19]表明: 肿瘤细胞EGFR通路可以通过分泌相应的细胞因子调控TAMs的极

化。高表达EGFR的结直肠癌细胞培养上清可上调M2型TAMs诱导因子IL-4、IL-10的表达, 敲除EGFR表达后, 可逆转M2型TAMs的极化。EGFR靶向药物cetuximab可在有效控制EGFR通路的同时活化M2型TAMs^[20]。本研究结果表明: 在男性患者中, EGFR基因突变状态与M2型TAMs的活化密切相关, 而在女性患者中未观察到两者具有相关性。在本研究中, 部分患者未进行EGFR检测, 入组病例数较少可能会对结果产生影响, 有待于在大样本队列研究中证实。

TAMs是肿瘤微环境的重要组成部分, 与其他免疫细胞和炎症因子等共同作用调节肿瘤的生长, 肿瘤微环境的重塑对于抑制肿瘤、提高传统药物治疗以及靶向治疗的效果具有重要作用。目前以巨噬细胞为靶点的治疗主要包括抑制TAMs的招募, 将TAMs的M2型转化为M1表型, 清除肿瘤内TAMs等多种方法, 因此理解TAMs在不同肿瘤以及肿瘤相关类型中的作用是药物治疗的重要生物学基础。本研究结果证实: M2型TAMs在间质中具有促进肿瘤发生发展的作用, 而在癌巢中具有抑制肿瘤生长的作用, M2型TAMs在女性及腺癌中对肿瘤发生发展的促进作用更加明显。虽然该结果还需要增大样本量来进一步验证, 但提示我们在针对TAMs的靶向药物应用过程中, 患者性别及肿瘤的组织学类型可能成为影响治疗效果的重要因素。

参考文献

1. Conway EM, Pikor LA, Kung SH, et al. Macrophages, inflammation, and lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(2): 116-130.
2. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(2): 605-612.
3. Mei JD, Xiao ZL, Guo CL, et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34217-34228.
4. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 816460.
5. Yuan JP, He HH, Chen C, et al. Combined high expression of CD47 and CD68 is a novel prognostic factor for breast cancer patients[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 238.
6. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 462-472.

7. Sumitomo R, Hirai T, Fujita M, et al. M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4490-4498.
8. Mei J, Xiao Z, Guo C, et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34217-34228.
9. Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, et al. Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(10): 1507-1515.
10. Hirayama S, Ishii G, Nagai K, et al. Prognostic impact of CD204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma possible contribution of CD204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment[J]. *J Thorac Oncol*, 2012, 7(12): 1790-1797.
11. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, et al. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer[J]. *Bmc Immunology*, 2018, 19(1): 3.
12. Gronbaek H, Kreutzfeldt M, Kazankov K, et al. Single-centre experience of the macrophage activation marker soluble (s)CD163 - associations with disease activity and treatment response in patients with autoimmune hepatitis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 44(10): 1062-1070.
13. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2012, 4(4): 376-389.
14. Belgiovine C, Digifico E, Anfray C, et al. Targeting tumor-associated macrophages in anti-cancer therapies: convincing the traitors to do the right thing[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(10): 3226.
15. 王丽飞, 陈刚, 王东昌, 等. 肿瘤相关巨噬细胞在肺癌中的研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2016, 36(22): 1735-1739.
WANG Lifei, CHEN Gang, WANG Dongchang, et al. Progress of tumor associated macrophages in lung cancer[J]. *International Journal of Respiration*, 2016, 36(22): 1735-1739.
16. Rakae M, Busund LTR, Jamaly S, et al. Prognostic value of macrophage phenotypes in resectable non-small cell lung cancer assessed by multiplex immunohistochemistry[J]. *Neoplasia*, 2019, 21(3): 282-293.
17. Becerra-Diaz M, Strickland AB, Keselman A, et al. Androgen and androgen receptor as enhancers of M2 macrophage polarization in allergic lung inflammation[J]. *J Immunol*, 2018, 201(10): 2923-2933.
18. Kouketsu A, Sato I, Oikawa M, et al. Regulatory T cells and M2-polarized tumour-associated macrophages are associated with the oncogenesis and progression of oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 48(10): 1279-1288.
19. Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by mutations: the predictive value of mutation subtype in EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(4): 612-623.
20. 张伟娜. 结直肠癌癌细胞EGFR信号通路调节巨噬细胞极性的机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
ZHANG Weina. A study on EGFR signaling of colorectal cancer modulating macrophage polarization[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2016.

本文引用: 齐诗雨, 周磊, 韩伟, 杜雪梅, 黄维清. M2型肿瘤相关巨噬细胞在非小细胞肺癌中的作用及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(3): 558-570. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.006

Cite this article as: QI Shiyu, ZHOU Lei, HAN Wei, DU Xuemei, HUANG Weiqing. Effects and clinical significance of M2 tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2022, 42(3): 558-570. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.03.006