

• 论 著 •

慢性粒细胞白血病患者骨髓中白血病相关巨噬细胞的表达及意义*

宋建新¹, 欧阳红梅¹, 汤一菲¹, 蒋雅先¹, 闻 艳², 梅 芬³, 甸自金¹, 撒亚莲^{3△}
(云南省第一人民医院: 1. 血液病诊断室; 2. 血液科; 3. 临床基础研究所, 昆明 650032)

摘 要:目的 探讨慢性粒细胞白血病(CML)患者骨髓中巨噬细胞的表达及在 CML 发病中的作用, 明确其临床意义。
方法 采用免疫组织化学染色法检测 CML 慢性期(CML-CP 组)30 例、加速期(CML-AP 组)21 例、急变期(CML-BP 组)15 例、经治疗后缓解患者 44 例、未缓解患者 7 例及 30 例非血液系统恶性疾病患者骨髓组织中 CD68、CD163、CD206 的表达变化, 比较骨髓巨噬细胞在 CML 患者不同时期骨髓组织中的表达差异。
结果 CML 各组患者骨髓组织中 CD68、CD163、CD206 的表达明显高于对照组及缓解组, CML-BP 组患者高于 CML-AP 组, CML-AP 组高于 CML-CP 组, 且差异均有统计学意义($P < 0.01$); 缓解组 CD68 虽高于对照组但差异无统计学意义($P > 0.05$), 而 CD163、CD206 仍高于对照组, 且差异均具有统计学意义($P < 0.01$), 未缓解组与 CML-BP 组相比有增高趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 在对照组中 CD163 和 CD206 表达明显低于 CD68 的表达, 且差异具有统计学意义($P < 0.01$), 同时, CML-CP 组、CML-AP 组、CML-BP 组、缓解组、未缓解组中 CD163 与 CD68 阳性细胞数密切相关($P < 0.01$), CD68 的阳性细胞数略高于 CD163, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 而在 CML 疾病的同一时期 CD163、CD206 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。
结论 巨噬细胞在 CML 患者骨髓中具有较高的浸润密度, 并随着病情的进展逐渐向 M2 型极化, 且在 CML 不同时期浸润密度不同, 与 CML 的发生、发展密切相关, 同时也可能是 CML 患者复发的原因之一。而在骨髓组织中 CD163、CD206 均可作为识别 M2 型巨噬细胞的标志物。

关键词:慢性粒细胞白血病; 巨噬细胞; CD68; CD163; CD206

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0004-04

Expression of leukemia-associated macrophage in bone marrow of Chronic Myeloid Leukemia patients and its clinical significance*

SONG Jianxin¹, OUYANG Hongmei¹, TANG Yifei¹, JIANG Yaxian¹,

WEN Yan², MEI Fen³, DIAN Zijin¹, SA Yalian^{3△}

(Yunnan Province First People's Hospital; 1. Hematologic Disease Diagnosis Room; 2. Department of Haematology;
3. Institute of Clinical and Basic Medical Sciences, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of leukemia-associated macrophage, a type of white blood cell that expresses specific proteins such as CD68, CD163, and CD206, in bone marrow of Chronic Myeloid Leukemia (CML) patients, and to investigate the clinical significances of tumor-associated macrophage in CML. **Methods** Bone marrow tissues were collected from 30 patients with CML in chronic phase (CML-CP), 21 patients in accelerated phase (CML-AP), 15 patients in blastic phase (CML-BP), and 44 CML patients who had a remission after treatment and 7 patients who did not. 30 healthy volunteers were recruited as controls. Expression of CD68, CD163, and CD206 was determined by immunohistochemistry staining with specific antibodies. **Results** Compared with patients who did not have a remission after treatment and the controls, the expression levels of CD68, CD163, and CD206 were increased in patients with CML-CP, CML-AP, CML-BP, CML-BP, and who had a remission after treatment, with an order as follows: CML-BP > CML-AP > CML-CP ($P < 0.01$). Tissues from patients who had a remission had higher values than the controls in expression levels of CD163 and CD206 ($P < 0.01$), as well as CD68 ($P > 0.05$), which showed no statistical difference though. In the controls, the expression levels of CD163 and CD206 were lower than CD68 ($P < 0.01$). In addition, the number of positively-stained cells with CD163 correlated with CD68 in group CML-CP, CML-AP, CML-BP, as well as patients who had a remission after treatment and who did not ($P < 0.01$); while for CD68, there were no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Macrophages were distributed in the bone marrow of CML patients with a high density of infiltration, with a trend of transformation to M2 macrophages as the disease progresses. Furthermore, the distribution density of macrophages was different in different stages of CML, closely related to the occurrence and development of CML. In bone marrow tissues, CD206 and CD163 can be used as markers to identify M2 macrophages.

Key words: chronic myeloid leukemia; macrophage; CD68; CD163; CD206

巨噬细胞是一类广泛分布于体内, 动态的、非均质的、具有迁移性的免疫细胞, 是机体免疫系统的重要组成部分; 在不同微环境作用下, 巨噬细胞可极化为具有不同分子特征和功能特

征的亚群, 即 M1 或 M2 型, 两种亚群对肿瘤发生、发展起着截然相反的作用^[1]。M1 型巨噬细胞具有抗原提呈和吞噬肿瘤细胞等细胞毒性效应, 而 M2 型巨噬细胞参与肿瘤细胞的恶性

* 基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项应用基础研究资助项目(2014FZ070)。

作者简介: 宋建新, 男, 副主任技师, 主要从事血液病诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: sayalian@126.com。

增殖、抵抗凋亡,侵袭和转移,故又被称为肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)。已有研究表明,CD68 是人源巨噬细胞的泛标志物(M1 型+M2 型),CD163 是识别 M2 型的标志物^[1-2];此外,M2 型巨噬细胞高表达甘露糖受体(MMR)(又名 CD206),亦为 M2 型巨噬细胞的特异性标志分子^[3]。既往对巨噬细胞与恶性肿瘤发生、发展及预后关系的研究主要集中于实体瘤、淋巴瘤等方面^[3-5],而在慢性粒细胞白血病(CML)患者中的研究鲜见报道。本文采用免疫组织化学的方法检测 CML 患者骨髓组织中巨噬细胞表面分子标志 CD68、CD163 和 CD206,以明确其在 CML 发生、发展中的变化及 CD68、CD163、CD206 的表达差异;探讨巨噬细胞在 CML 发病中的作用,为阐明 CML 发病机制提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 66 例患者均来自本院血液科门诊及住院患者,经骨髓细胞形态、细胞遗传学及分子生物学检查,符合 CML 各期的诊断标准^[6]。其中,慢性髓性白血病慢性期(CML-CP)30 例,慢性髓性白血病加速期(CML-AP)21 例,慢性髓性白血病急变期(CML-BP) 15 例(其中 6 例为急淋变,9 例为急粒变),男 42 例,女 24 例,年龄 18~78 岁,中位年龄 56.0 岁;经治疗后缓解 44 例,未缓解 7 例。其中 CML-CP 组除 8 例失访外,其余全部缓解;21 例 CML-AP 组患者中,缓解 14 例,未缓解 3 例,4 例转外院治疗而失访;CML-BP 组缓解 8 例,未缓解 4 例,治疗中 1 例死亡,2 例转外院失访。30 例缺铁性贫血患者作为对照组,其中,男 18 例,女 12 例;年龄 18~76 岁,中位年龄 54.5 岁。本研究获本院伦理委员会批准,并征得所有受试者知情同意。

1.2 试剂 鼠抗人 CD68(ab955)、CD163(ab87099)、CD206(ab64693)抗体,SP 免疫组化试剂盒(Histostain-Plus Mouse Primary)购自美国 Abcam 公司。

1.3 方法 常规骨髓穿刺取骨髓组织,置于福尔马林固定液中进行脱水、石蜡包埋处理。

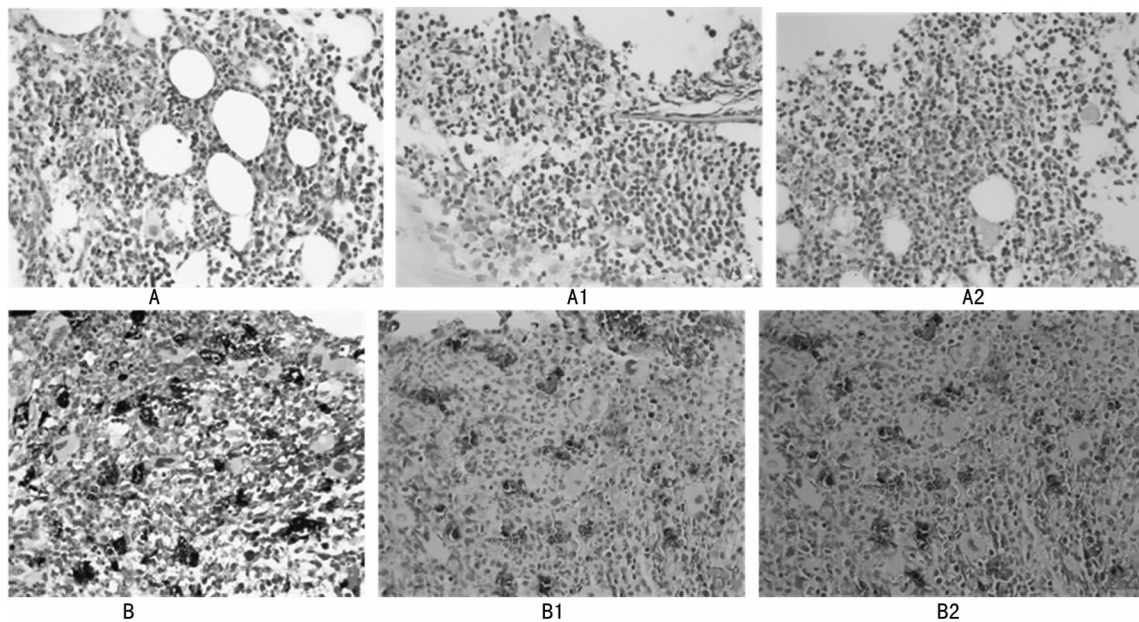
1.4 免疫组化检测 CD68、CD163、CD206 在骨髓组织中的表达 取骨髓活检组织的石蜡块,切 3~4 μm 厚的切片;采用 S-P 免疫组化染色检测 CD68、CD163、CD206 的表达。对照组用 PBS 替代一抗。

1.5 免疫组化染色结果判定 免疫组化染色结果由 2 位病理医师各自独立判断,结果相同者为最终检验结果,若有异议,由上级医师进行最终判断。在细胞膜或细胞浆有黄褐色或棕黄染色沉着物为阳性。巨噬细胞体积较大,形态多样,呈类圆形或不规则形,偶见有多核细胞。先在低倍镜(100 倍)下选取 5 个染色较好的视野,后在高倍镜下(400 倍)计数阳性细胞^[7],取其平均值作统计学分析。

1.6 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组中 CD68、CD163、CD206 阳性表达率的比较用 *t* 检验。应用 Pearson 相关分析 CD68 与 CD163 的相关性,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD68、CD163、CD206 免疫组化染色结果判定 本组所有病例的骨髓组织中均可见巨噬细胞浸润,在骨髓组织中均可见胞浆着色为棕色的 CD68 巨噬细胞及细胞膜和(或)细胞浆着色的 CD163 及 CD206 的巨噬细胞浸润。对照组骨髓中可见巨噬细胞稀疏散在浸润,数量少。见图 1。



注:A、A1、A2 分别为 CD68、CD163、CD206 在正常骨髓组织中表达;B、B1、B2 分别为 CD68、CD163、CD206 在 CML 骨髓组织中表达。

图 1 CD68、CD163、CD206 免疫组化染色结果判定(×400)

2.2 CD68、CD163、CD206 在各组中的表达 CD68、CD163、CD206 在对照组、CML-CP 组、CML-AP 组、CML-BP 组、缓解组、未缓解组中均有不同程度的浸润。经统计学分析,CD68、CD163、CD206 在 CML 各期中的表达明显高于在对照组的表达,且差异均具有统计学意义(*P*<0.05);而 CML-BP 患者 CD68、CD163、CD206 表达高于 CML-AP 组,CML-AP 组高于

CML-CP 组,且差异有统计学意义(*P*<0.05),CD68 缓解组虽高于对照组,但差异无统计学意义(*P*>0.05),CD163、CD206 缓解组明显高于对照组,且差异具有统计学意义(*P*<0.05);CD68、CD163、CD206 在未缓解组与 CML-BP 组相比有增高趋势,但差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.3 CD68、CD163 和 CD206 在各组中表达比较 在对照组

中,CD163 和 CD206 表达明显低于 CD68,且差异具有统计学意义($t=26.58,24.36,P<0.05$),在 CML-CP 组、CML-AP 组、CML-BP 组、缓解组、未缓解组中 CD163 与 CD68 阳性细胞数均呈明显正相关($r=0.640,0.867,0.933,0.576,0.569,P<0.01$);CD163 和 CD206 在各组中的表达差异无统计学意义($t=1.17,0.58,1.76,2.34,1.74,1.36,P>0.05$)。见表 1。

表 1 CD68、CD163、CD206 在各组 CML 骨髓组织中的表达(个/HP, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	CD68	CD163	CD206
对照组	30	12.39±2.17	2.71±0.82	2.94±0.79
CML-CP 组	30	27.03±3.90*	19.91±3.33*	20.71±3.47*
CML-AP 组	21	44.64±4.84*	37.26±4.70*	38.57±5.12*
CML-BP 组	15	66.98±6.28*△	59.97±6.79*△	61.51±6.48*△
缓解组	44	19.73±3.43*	8.73±2.00*	9.03±2.01*
未缓解组	7	69.91±9.96#	60.11±8.99#	59.64±8.92#

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 CML-AP 组、CDL-CP 组比较,△ $P<0.05$;与 CML-BP 组比较,# $P>0.05$ 。

3 讨 论

骨髓微环境是由基质细胞、辅助细胞(T 淋巴细胞和单核/巨噬细胞)、细胞外基质和细胞因子组成的一个有序的复杂结构。其不仅提供造血细胞赖以生存、发育及分化的场所,同时骨髓微环境的改变也为血液系统恶性肿瘤提供了一个合适的生存空间。巨噬细胞作为骨髓微环境的一个重要组成部分,在炎症组织中主要参与组织重建、炎症和免疫,保护机体对抗感染及损伤;而在某些特定的细胞因子作用下可活化为 M2 型巨噬细胞即肿瘤相关巨噬细胞(TAMs),参与肿瘤的生存、增殖、浸润、转移并与预后不良相关^[1-5]。目前已知活化的巨噬细胞主要包括两种类型:即在 Th1 细胞因子如肿瘤坏死因子- γ (INF- γ)或细菌产物刺激下,经典活化的 M1 型巨噬细胞和在 Th2 细胞因子如白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-13(IL-13)等刺激经替代性活化的 M2 巨噬细胞^[6-8]。M1 型巨噬细胞高表达白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-23(IL-23)、特异性组织抗原(MHC II)和 B7 分子,低表达白细胞介素-10(IL-10);分泌较多肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-12、NO、活性氧(ROS)以及多种炎症因子,而参与 Th1 型免疫应答,作为诱导细胞和杀伤细胞参与杀伤病原体 and 肿瘤细胞^[9]。M2 型巨噬细胞高表达 IL-10、转化生长因子- β (TGF- β)、甘露糖受体(MMR)(又名 CD206)和清道夫受体(SR-A),低表达 IL-12、TNF- α ,抗原提呈能力较差,主要参与 Th2 免疫调控,通过抑制 T 细胞的增殖活性而抑制适应性免疫反应,对肿瘤细胞的生存和生长起促进作用^[10]。有研究认为 TAMs 主要为 M2 型巨噬细胞^[11]。

鉴定 TAMs 的活化表型目前多应用 CD68 联用 CD163、CD206 或 CD204 进行鉴定。文献^[11]研究认为,CD68 是全巨噬细胞标志物(M1 型+M2 型),CD163 是识别 M2 型的标志物^[1-5,12];鉴于 CD206 在 M2 上高表达,本研究应用 CD68、CD163 和 CD206 对 CML 不同时期骨髓组织及对照组中巨噬细胞进行标记发现,在 CML 各期中 CD68 与 CD163 阳性细胞数均呈明显正相关,CD68 在 CML 各期及对对照组中的阳性细胞数均多于 CD163,但差异无统计学意义($P>0.05$),而 CD163 和 CD206 在各组中的表达差异均无统计学意义($P>$

0.05)。说明 CML 患者骨髓微环境中存在着 2 群不同的巨噬细胞,以 CD163 或 CD206 表达为主的 M2 型巨噬细胞即 TAMs 和以 CD68 表达而 CD163 或 CD206 不表达的 M1 型巨噬细胞。因此结合文献的研究结果,CD163 和 CD206 均可作为骨髓微环境中识别 M2 型巨噬细胞的标志物。在此,本研究将与白血病相关的 M2 型巨噬细胞称为白血病相关巨噬细胞(LAMs)。

本研究结果显示,在 CML-CP 组患者骨髓组织中,表达 CD68、CD163 和 CD206 的巨噬细胞数明显高于对照组,而 CML-AP 组表达明显高于 CML-CP 组,CML-BP 组又明显高于 CML-AP 组;以此推测,在 CML 患者骨髓微环境中存在 1 个巨噬细胞的扩增环,在白血病细胞来源的趋化因子如趋化因子(CCL2)、血管内皮生长因子(VEGF)等细胞因子的作用下,将外周血单核细胞大量招募进入骨髓微环境而分化为巨噬细胞而极化为 M2 型巨噬细胞,即 LAMs。而 LAMs 本身也能分泌大量的 CCL2、IL-10 和 VEGF,进一步促进巨噬细胞的招募与极化。LAMs 巨噬细胞通过与白血病细胞的接触与非接触机制,可能促进白血病细胞的生存、遗传的不稳定性及白血病细胞的克隆演变,从而促进白血病细胞的增殖而导致疾病发生、发展。但鉴于 CML 发病的特殊性和巨噬细胞调节机制的复杂性,CML 骨髓微环境中的巨噬细胞来是源于外周血还是其他组织或是骨髓源性的还有待进一步研究。由于骨髓微环境中的巨噬细胞被大量极化为 M2 型,使骨髓微环境发生变化,一方面导致大量的细胞因子如 IL-10、VEGF 等的生成,使抗原呈递能力降低,限制了 LAMs 向 T 细胞呈递肿瘤相关抗原的能力,同时由于 IL-12 分泌减少,使 T 细胞和 NK 细胞的抗肿瘤活性降低;另一方面由于 NO、ROS 等杀伤分子分泌减少,对白血病干细胞(LSC)的杀伤能力下降。结果还显示,缓解组患者骨髓组织中的 M2 型巨噬细胞还明显高于对照组,说明 CML 患者骨髓虽然达到形态学和基因水平上的暂时缓解,但是促进白血病细胞生存、分化、增殖的因素还没完全消除,这也可能是 CML 最终复发的原因之一。有研究认为,M1 和 M2 型巨噬细胞在肿瘤微环境中共存,两者之间可发生相互转化^[13],因此恢复造血细胞与骨髓微环境之间的关系是今后值得研究的方向。

总之,CML 患者骨髓巨噬细胞的大量募集并逐渐向 M2 型极化,改变了骨髓微环境,使其更适合培育细胞恶性生物学行为,有利于白血病细胞的生存和增殖分化,从而介导 CML 的发生、发展。

参考文献

[1]

Yang C, He L, He P, et al. Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway[J]. Med Oncol, 2015,32(2):352-356.

[2]

Schultze JL, Schmieder A, Goerdts S. Macrophage activation in human diseases[J]. Semin Immunol, 2015,27(4):249-256.

[3]

Allavena P, Sica A, Garlanda C, et al. The Yin Yan of tumor-associated macrophages in neoplastic pro-gression and immune surveillance[J]. Immunol REV, 2008,222:155-161.

(下转第 9 页)

性地详细检查,有效缩短疟疾诊断实验室标本周转时间,达到快速诊断的目的。

从 ROC 曲线下面积来看,平行诊断试验线下面积为 0.930,超过了厚血涂片法线下面积 0.814 和 RDT 法的 0.847。说明平行诊断试验的使用较两个组分方法的单独使用,可提高准确度。不可否认这一平行诊断试验的应用并不能达到对疟疾患者或疟原虫感染者进行分型的要求。

总之,厚血涂片和 RDT 组成的平行试验可以有效提高对疟疾流行区归国人员疟原虫感染者监测敏感度和准确度,值得推广应用。

参考文献

- [1] Hviid L. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria in Africa[J]. Acta Trop, 2005, 95(3): 270-275.
- [2] 张少森,夏志贵,尹建海,等. 2012 年全国寄生虫病防治技术竞赛成绩分析报告: I. 疟原虫检测能力考评结果分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(2): 131-134.
- [3] 张进顺,高兴政. 临床寄生虫检验学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009.
- [4] 田斌,段绩辉,徐明忠,等. 三例输入性卵形疟的实验室诊断[J]. 检验医学, 2014, 29(8): 851-855.
- [5] 李雪迎. 应用联合试验优化诊断能力[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2012, 20(4): 184.
- [6] 董莹,陈梦妮,徐艳春. 免疫快速诊断卡检出疟原虫感染的准确性荟萃分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(4): 353-358.

- [7] 王艳琴,朱韩武,陈婕. 镜检、RDT 和 Nest-PCR 诊断疟疾的应用比较研究[J]. 社区医学杂志, 2016, 14(12): 4-6.
- [8] 营雅茹,李卫东,张滔,等. 快速检测试剂条、镜检和 PCR 在疟疾诊断中的应用研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(2): 163-165.
- [9] 王钊,马云祥,车立刚,等. 疟疾学[M]. 青岛:青岛海洋大学出版社,1992:1058.
- [10] Fransisca L, Kusnanto JH, Satoto TB, et al. Comparison of rapid diagnostic test Plasmodium Malaria-3, microscopy, and quantitative real-time PCR for diagnoses of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in Mimika Regency, Papua, Indonesia[J]. Malar J, 2015, 14(1): 103.
- [11] 李卫东,张滔,姜静静,等. 国产试剂 RDT 诊断疟疾效果评价[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(12): 1099-1101.
- [12] Tiono AB, Diarra A, Sanon S, et al. Low specificity of a malaria rapid diagnostic test during an integrated community case management trial[J]. Infect Dis Ther, 2013, 2(1): 27-36.
- [13] Meatherall B, Preston K, Pillai R. False positive malaria rapid diagnostic test in returning traveler with typhoid fever[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 1-4.
- [14] Chong Kyu, Cho Yun, Na Kuk, et al. Evaluation of the accuracy of the EasyTest? malaria Pf/Pan Ag, a rapid diagnostic test, in Uganda[J]. Korean J Parasitol, 2014, 52(5): 501-505.

(收稿日期:2016-07-30 修回日期:2016-10-20)

(上接第 6 页)

- [4] Cao W, Peters JH, Nieman D, et al. Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro[J]. Br J Cancer, 2015, 113(5): 738-746.
- [5] 徐原林,王华庆,钱正子,等. M2 型巨噬细胞和调节性 T 细胞在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤组织中的含量及其与患者预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2013, 35(6): 450-455.
- [6] 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997.
- [7] Kim DW, Min HS, Lee KH, et al. High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with EGFR mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 98(6): 1118-1124.
- [8] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5: 953-964.
- [9] Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, et al. Biochemical

- and functional characterization of three activated macrophage populations[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1298-1307.
- [10] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. Immunity, 2010, 32(5): 593-604.
- [11] Ohri CM, Shikotra A, Green RH, et al. Macrophages within NSCLC tumour islets are pre-dominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival[J]. Eur Respir J, 2009, 33(1): 118-126.
- [12] 李海涛,谭超,田书梅,等. 肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤微环境中的作用新进展[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(11): 1165-1168.
- [13] Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression[J]. Semin Cancer Biol, 2008, 18(5): 349-355.

(收稿日期:2016-08-11 修回日期:2016-10-30)