

论著 • 临床研究

# 肿瘤相关巨噬细胞在慢性淋巴细胞白血病患者骨髓中的水平及意义<sup>\*</sup>

苏 琼<sup>1</sup>, 欧阳红梅<sup>2</sup>, 宋建新<sup>2△</sup>

(1. 云南省楚雄市人民医院检验科, 云南楚雄 675000; 2. 云南省第一人民医院检验科, 云南昆明 650032)

**摘要:**目的 探讨慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者骨髓中巨噬细胞的水平及在 CLL 发病中的作用。方法 选取初诊 CLL 患者 58 例, 其中 Binet A 期 24 例, Binet B 期 19 例, Binet C 期 15 例; 20 例缺铁性贫血患者作为对照组。采用免疫组织化学染色法检测 CLL 各组患者骨髓组织中巨噬细胞的标志物 CD68<sup>+</sup> (M1+M2 型)、CD163 (M2 型) 的表达变化, 比较其不同分期 CLL 患者骨髓组织中的水平差异。结果 CLL 各组患者骨髓组织中 CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup> 细胞水平均明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 Binet C 期患者高于 Binet B 期 ( $P < 0.05$ ), Binet B 期组高于 Binet A 期组 ( $P < 0.05$ ); CLL 病情进展与 CD163<sup>+</sup> 细胞浸润密度呈正相关 ( $P < 0.05$ )。结论 巨噬细胞在 CLL 患者骨髓中具有较高密度的浸润, 且在 CLL 不同时期浸润密度不同, 随着病情的进展浸润到骨髓组织中的巨噬细胞逐渐向 M2 型极化, 与 CLL 的病程进展具有相关性。

**关键词:**慢性淋巴细胞白血病; 巨噬细胞; CD68; CD163

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.11.013

中图分类号:R446.6;R557+.4

文章编号:1673-4130(2018)11-1326-03

文献标识码:A

## Expression and significance of tumor-associated macrophages in bone marrow of chronic lymphocytic leukemia<sup>\*</sup>

SU Qiong<sup>1</sup>, OUYANG Hongmei<sup>2</sup>, SONG Jianxin<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Chuxiong People's Hospital of Yunnan Province, Chuxiong, Yunnan 675000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression of macrophages in the bone marrow of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients and its clinical significance in the pathogenesis of CLL. **Methods** Fifty-eight patients with newly diagnosed CLL were selected, including 24 cases of Binet A, 19 cases of Binet B, 15 cases of Binet C, and 20 patients with iron deficiency anemia were selected as control group. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CD68<sup>+</sup> (M1+M2 type) and CD163 (M2 type) in CLL patients. The expression differences in bone marrow tissues of CLL patients at different stages were compared. **Results** The numbers of CD68<sup>+</sup> and CD163<sup>+</sup> cells in CLL group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ), while those in Binet C stage patients were higher than in Binet B stage patients ( $P < 0.05$ ) and those in Binet B stage patients were higher than in Binet A stage patients ( $P < 0.05$ ). The progression of CLL was positively correlated with the infiltration density of CD163<sup>+</sup> cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Macrophages have a high density of infiltration in the bone marrow of CLL patients, and the infiltration density varies in different periods of CLL. With the progresses of the disease, macrophages infiltrated into bone marrow gradually polarize to M2 type, which is relevant with the course of CLL progress.

**Key words:** chronic lymphocytic leukemia; macrophages; CD68; CD163

慢性淋巴细胞白血病(CLL)是以成熟 B 淋巴细胞在外周血、骨髓、脾脏和淋巴结中克隆性增殖且凋亡受阻为特征的异质性恶性疾病<sup>[1]</sup>。CLL 病因学目前仍不清楚,但在其发生、发展过程中,机体免疫功能的紊乱是原因之一。巨噬细胞是一类广泛分布于体内、动态的、具有迁移性的异质细胞群体,是机体免疫系统的重要组成部分<sup>[2-3]</sup>。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 M1 型或 M2 型。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增殖、抵抗凋亡及侵袭和转移,故又被称为肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs)<sup>[4]</sup>。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<sup>[2,5]</sup>。前期对巨噬细胞

<sup>\*</sup> 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项目资助(2014FZ070、2014FB099)。

作者简介:苏琼,女,主管技师,主要从事免疫生化研究。△ 通信作者, E-mail: songjianxin8@126.com。

本文引用格式:苏琼,欧阳红梅,宋建新. 肿瘤相关巨噬细胞在慢性淋巴细胞白血病患者骨髓中的水平及意义[J]. 国际检验医学杂志,

在骨髓增生异常综合征(MDS)及慢性粒细胞白血病(CML)患者骨髓中的表达进行了研究<sup>[6-7]</sup>,发现 M2 型巨噬细胞在 MDS 及 CML 患者骨髓中浸润密度与疾病的发生、发展有关。为探讨肿瘤相关巨噬细胞在 CLL 患者骨髓中的变化,本研究采用免疫组织化学的方法检测了不同分期 CLL 患者骨髓组织中巨噬细胞的表面分子标志 CD68、CD163 来明确其在 CLL 发生、发展中的变化,旨在探讨巨噬细胞在 CLL 发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 一般资料 58 例 CLL 患者为 2014 年 12 月至 2017 年 4 月本院血液科门诊及住院收治患者,其中男 35 例,女 23 例;年龄 49~84 岁,平均 62.9 岁。根据 Binet 分期将病例组分为 A 期 24 例,B 期 19 例,C 期 15 例。20 例缺铁性贫血患者作为对照组,其中,男 11 例,女 9 例;年龄 48~76 岁,平均 60.5 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 主要试剂 鼠抗人 CD68、CD163 抗体,SP 免疫组织化学试剂盒购自美国 Abcam 公司。

1.3 方法 常规骨髓穿刺取骨髓组织,置于 10% 福尔马林固定液中进行脱水、石蜡包埋处理;取骨髓活检组织的石蜡块,切 3~4 μm 厚的切片;采用 SP 免疫组织化学染色检测 CD68、CD163 的表达。对照组用 PBS 替代一抗。免疫组织化学染色结果判定:免疫组织化学染色结果由 2 位病理医生各自独立判断,结果相同者为最终检验结果,若有异议,由上级医生进行最终判断。在细胞膜或细胞质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。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)计数阳性细胞个数(个/HP)<sup>[8]</sup>,取其平均值作统计学分析。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组中 CD68、CD163 阳性表达率采用 *t* 检验,应用 Pearson 相关对 CD68 与 CD163 的相关性进行分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

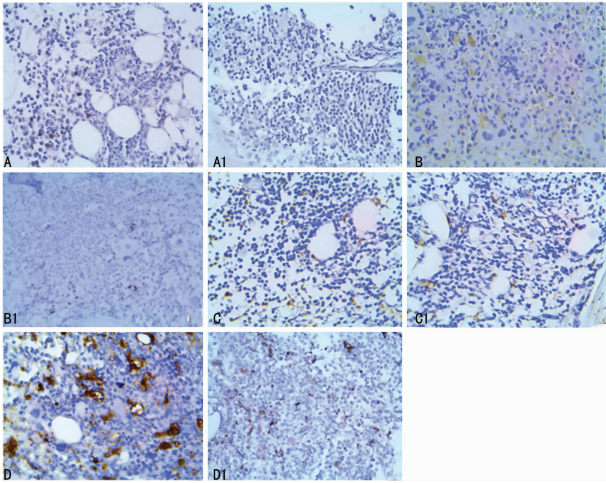
2.1 细胞免疫组织化学染色结果判定 本组所有病例的骨髓组织中均可见巨噬细胞浸润,在骨髓组织中均可见胞质着色为棕色的 CD68<sup>+</sup>巨噬细胞及细胞膜和(或)细胞质着色的 CD163<sup>+</sup>巨噬细胞浸润。对照组骨髓中可见巨噬细胞的散在浸润,数量少。见图 1。

2.2 CD68<sup>+</sup>细胞在 CLL 各组中的表达 CD68<sup>+</sup>细胞在对照组、Binet A 期、Binet B 期、Binet C 期中的浸润密度分别为(12.59 ± 2.59)、(20.15 ± 3.21)、(30.24 ± 4.24)、(40.25 ± 6.37)个/HP。经统计学分析,CD68<sup>+</sup>细胞在 CLL 各期中的表达明显高于对照组(*P* < 0.05);而 Binet C 期患者表达高于 Binet B 期、Binet B 期高于 Binet A 期(*P* < 0.05)。见表 1。

2.3 CD163<sup>+</sup>细胞在 CLL 各组中表达 CD163<sup>+</sup>细胞

在对照组、Binet A 期、Binet B 期、Binet C 期中浸润密度分别为(2.74 ± 0.77)、(8.10 ± 1.88)、(17.06 ± 3.17)、(29.67 ± 5.49)个/HP,经统计学分析,CD163<sup>+</sup>细胞在 CLL 各期中的表达明显高于对照组(*P* < 0.05),Binet C 期患者表达高于 Binet B 期、Binet B 期明显高于 Binet A 期(*P* < 0.05)。见表 1。

2.4 CD163<sup>+</sup>细胞与 CD68<sup>+</sup>细胞在 CLL 各期中的相关性 在 Binet A 期、Binet B 期、Binet C 期中 CD163<sup>+</sup>细胞与 CD68<sup>+</sup>细胞数均呈明显正相关(*r* = 0.714、0.820、0.905, *P* < 0.001)。见表 1。



注:A、A1 分别为 CD68、CD163 在对照组骨髓组织中表达;B、B1 分别为 CD68、CD163 在 Binet A 期骨髓组织中表达;C、C1 分别为 CD68、CD163 在 Binet B 期骨髓组织中表达;D、D1 分别为 CD68、CD163 在 Binet C 期骨髓组织中表达

图 1 CD68、CD163 巨噬细胞免疫组织化学染色结果判定(×400)

表 1 CLL 患者不同分期骨髓组织中 CD163<sup>+</sup>与 CD68<sup>+</sup>细胞数的关系( $\bar{x} \pm s$ , 个/HP)

组别	<i>n</i>	CD68 <sup>+</sup> 细胞	CD163 <sup>+</sup> 细胞	<i>r</i>	<i>P</i>
对照组	20	12.59 ± 2.59	2.74 ± 0.77		
Binet A 期	24	20.15 ± 3.21*	8.10 ± 1.88*	0.714	<0.001
Binet B 期	19	30.24 ± 4.24*▲	17.06 ± 3.17*▲	0.820	<0.001
Binet C 期	15	40.25 ± 6.37*#	29.67 ± 5.49*#	0.905	<0.001

注:与对照组相比,\**P* < 0.05;与 Binet B 期组比较,#*P* < 0.05;与 Binet A 期组比较,▲*P* < 0.05

3 讨 论

CLL 是具有高度异质性的恶性疾病,同为 CLL 的患者,由于分期不同,其预后也不尽相同<sup>[9-10]</sup>。这与 CLL 细胞生存的微环境密切相关。TAMs 在肿瘤微环境中发挥多项功能,包括分泌金属基质蛋白酶消化细胞外基质促进肿瘤细胞浸润迁移,分泌多种生长因子及血管生成因子促进肿瘤增殖,分泌抑制性细胞因子抑制机体肿瘤免疫等,同时可以通过 CXC 趋化因子配体(CXCL)1 到 CXCL8,多种趋化因子发挥血管生成的效应,这些趋化因子共同作用于 CXCR4 发挥作用<sup>[11]</sup>。有研究表明,TAMs 通过分泌促炎性细胞因子,如肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-6 和 IL-11 激活核因子 κB(NF-κB)和信号传导与转录激活

因子 3(STAT3)的抗凋亡效应,促进肝癌、胃癌和肺癌细胞的增殖<sup>[12-13]</sup>。

本研究结果显示,在 CLL 患者骨髓组织中,CD68<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞数明显高于对照组,而在 CLL 患者不同分期中,Binet C 期表达高于 Binet B 期、Binet B 期高于 Binet C 期,且 CD163<sup>+</sup> 细胞的增高与 CD68<sup>+</sup> 细胞的浸润密度增高呈正相关。由此可见,CLL 患者骨髓组织中浸润的巨噬细胞数量随着病情发生、发展而增加,并逐渐向 M2 型巨噬细胞极化,参与淋巴细胞的恶性增殖、抵抗凋亡以及侵袭和转移<sup>[14]</sup>,提示 M2 型巨噬细胞可能在 CLL 的发生、发展中起着重要作用。

CLL 患者骨髓微环境中 M2 型巨噬细胞的增多,可能是由于 CLL 细胞在趋化因子如 CCL2、CCL3、CCL4 等作用下归巢至骨髓的同时,也介导单核/巨噬细胞大量进入骨髓微环境<sup>[15]</sup>,后者随着疾病的进展被逐渐极化为 M2 型巨噬细胞,即 LAMs<sup>[16]</sup>。

总之,CLL 患者骨髓巨噬细胞被大量募集并逐渐向 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,有利于淋巴细胞的生存和增殖分化,推动 CLL 的发生、发展。

## 参考文献

- [1] HOJJAT-FARSANGI M, JEDDI-TEHRANI M, RAZAVI S M, et al. Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage and mutational status of the leukemic B cells in Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 2346-2353.
- [2] CAO W, PETERS J H, 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.
- [3] SCHULTZE J L, SCHMIEDER A, GOERDT S. Macrophage activation in human diseases[J]. *Semin Immunol*, 2015, 27(4): 249-256.
- [4] TANG X, MO C, WANG Y, et al. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages[J]. *Immunology*, 2013, 138(2): 93-104.
- [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] 宋建新,欧阳红梅,甸自金,等. 肿瘤相关巨噬细胞在骨髓增生异常综合征患者中的表达研究[J]. *重庆医学*, 2017, 46(2): 228-230.
- [7] 宋建新,欧阳红梅,汤一菲,等. 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[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(1): 4-6.
- [8] KIM D W, MIN H S, LEE K H, 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.
- [9] XU W, LI J Y. The biological characteristics and prognosis of chronic lymphocytic leukemia[J]. *Clin Hematol J*, 2014, 27(9): 729-732.
- [10] HALLEK M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment[J]. *Am J Hematol*, 2015, 90(5): 446-460.
- [11] CHAWLA A. Macrophage biology in development, homeostasis and disease[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 445-455.
- [12] PUTOCZKI T L, THIEM S, LOVING A, et al. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(2): 257-271.
- [13] MITTAL A K, CHATURVEDI N K, RAI K J, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells in a lymph node microenvironment depict molecular signature associated with an aggressive disease[J]. *Mol Med*, 2014, 20: 290-301.
- [14] 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): 450-445.
- [15] BURGER J A, QUIROGA M P, HARTMANN E, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurse-like cell cocultures and after BCR stimulation[J]. *Blood*, 2009, 113(13): 3050-3058.
- [16] 赵阳,赵勇. 单核-巨噬细胞起源及发育分化的特征与分子调控[J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(1): 126-132.

(收稿日期:2017-12-12 修回日期:2018-02-22)

(上接第 1325 页)

- 断价值分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(12): 1372-1374.
- [13] GHOSH I, BHATTACHARJEE D, DAS A K. Diagnostic role of tumour markers CEA, CA15-3, CA19-9 and CA125 in lung cancer[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2013, 28(1): 24-29.
- [14] 何淑娟,裴素莉. 联合检测血清肿瘤标志物对肺癌诊治的临床价值[J]. *实用临床医学杂志*, 2011, 15(21): 140-142.
- [15] 左江华,李宗良,任宏涛. 血清 CEA、CA125、CA19-9 联合检测在肺癌诊断中的应用价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(6): 668-671.

- [16] 姜婧,邹红云,杨玲,等. CEA、CA125、CA19-9 联合检测在肺癌诊断中的临床意义[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2015, 23(2): 8-9.
- [17] HANLEY J A, MCNEIL B J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve[J]. *Radiology*, 1982, 143(1): 29-36.
- [18] 吴艳涛,兰潇. 血清肿瘤标志物对晚期原发性肺癌老年患者放疗疗效的评估价值[J]. *癌症进展*, 2015, 13(2): 209-212.

(收稿日期:2017-12-10 修回日期:2018-02-20)