

弥漫大 B 细胞淋巴瘤微环境中 CD68 表达与微血管密度的关系及意义

吴金锐¹ 马树沛² 孙玲玲³ 林梅¹

[摘要] 目的:探讨弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)微环境中 CD68 表达与微血管密度(MVD)的关系及意义。方法:通过免疫组织化学方法检测 77 例 DLBCL 组织中 CD68 与 CD34 的表达,分析肿瘤相关巨噬细胞、MVD 与患者临床病理指标的关系及二者的相关性。结果:CD68 与患者年龄($P=0.016$)及国际预后指数(IPI)有关($P=0.002$),MVD 与肿瘤原发部位($P=0.002$)及 IPI 有关($P=0.030$),且 MVD 与肿瘤微环境中 CD68 的表达呈正相关($r=0.290, P=0.010$)。结论:肿瘤相关巨噬细胞与 DLBCL 肿瘤血管生成有关,CD68 与 MVD 的高表达均提示患者预后较差。

[关键词] 弥漫大 B 细胞淋巴瘤;肿瘤相关巨噬细胞;微血管密度;预后

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2019.03.008

[中图分类号] R733.4 **[文献标志码]** A

Relationship and significance of CD68 expression and microvessel density in microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma

WU Jinkun¹ MA Shupai² SUN Lingling³ LIN Mei¹

(¹Department of Pathology, School of Basic Medicine, Medical College, Qingdao University, Qingdao, 266071, China; ²Department of Hematology, Qingdao Municipal Hospital; ³Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Qingdao University)

Corresponding author: LIN Mei, E-mail: linmei70@hotmail.com

Abstract Objective: To investigate the relationship and significance of CD68 expression and microvessel density (MVD) in microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **Method:** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of CD68 and CD34 in DLBCL patients ($n=77$) to analyze the relationship between tumor-associated macrophage and MVD and their correlations with clinicopathological parameters. **Result:** CD68 was associated with patient's age ($P=0.016$) and international prognostic index (IPI) ($P=0.002$). MVD was associated with primary site ($P=0.002$) and IPI ($P=0.030$). MVD was positively correlated with CD68 expression ($r=0.290, P=0.010$). **Conclusion:** Tumor-associated macrophage is associated with tumor angiogenesis in DLBCL. Both high expression of CD68 and high MVD indicate adverse prognosis of DLBCL patients.

Key words diffuse large B-cell lymphoma; tumor-associated macrophages; microvessel density; prognosis

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)是起源于 B 细胞的侵袭性的淋巴造血系统恶性肿瘤。DLBCL 是非霍奇金淋巴瘤中最常见的类型,在我国,DLBCL 占成人非霍奇金淋巴瘤的 35%~50%^[1]。目前,随着利妥昔单抗的使用,DLBCL 患者的预后得到了明显改善^[2],但仍只有 60% 的患者可达到长期缓解^[3]。因此,寻找新的生物标记物对患者进行危险分层并更加全面地评估预后显得尤为重要。巨噬细胞在机体消灭病原体以及维持内环境稳定中发挥了关键作用,在肿瘤微环境中,浸润的巨噬细胞又被称为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)。

TAM 一方面促进了肿瘤微环境中的炎症反应,另一方面又可以产生各种促血管生成因子与细胞外基质调节因子从而促进肿瘤的生长和演进^[4]。CD68 是目前广泛应用的巨噬细胞经典通用型标记物,已有大量研究根据 CD68 的表达来评估肿瘤微环境中的 TAM 水平。有研究表明,在成人经典霍奇金淋巴瘤中,TAM 与患者预后呈显著负相关^[5]。而在 DLBCL 中,TAM 与患者的预后关系目前仍存在争议^[6]。肿瘤血管生成在肿瘤的发生、演进和转移过程中起重要作用^[7]。CD34 是一种被广泛应用的血管内皮细胞的标记物,研究者们通过计数 CD34 阳性表达的内皮细胞而判定微血管密度(microvessel density, MVD),从而评估肿瘤血管生成的程度。然而在 DLBCL 中,TAM 与 MVD 之间关系的研究目前仍鲜有报道。本研究通过免疫组织化学染色法观察 CD68、CD34 在 DLBCL 中的表

¹ 青岛大学基础医学院病理系(山东青岛,266071)

² 青岛市市立医院血液科

³ 青岛大学附属医院病理科

通信作者:林梅, E-mail: linmei70@hotmail.com

达,以探讨 TAM 和 MVD 与患者临床病理指标的关系及二者的相关性。

1 资料与方法

1.1 资料

收集 2010-01—2017-12 在青岛大学附属医院手术切除,经病理证实的原发性 DLBCL 标本 77 例。其中原发于淋巴结内 17 例,淋巴结外 60 例。所有 DLBCL 患者术前均未接受放射治疗及化学药物治疗等治疗措施,均无人类免疫缺陷病毒感染史、器官移植史及自身免疫病病史。每例患者均已登记临床资料,包括年龄、性别、就诊时有无 B 症状、Ann Arbor 分期、血清乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)及国际预后指数(international prognostic index,IPI)。患者中位年龄 59(30~81)岁;男 44 例,女 33 例。根据 Hans 分类法,将标本分为 37 例生发中心 B 细胞样淋巴瘤组(germinal center B-cell lymphoma,GCB)与 40 例非生发中心 B 细胞样淋巴瘤组(non germinal center B-cell lymphoma,non-GCB)。

1.2 免疫组织化学染色

CD68 单克隆抗体购自圣克鲁斯生物技术有限公司,工作浓度均为 1:200;CD34 多克隆抗体购自博士德生物工程有限公司,工作浓度为 1:400。二抗购自福州迈新生物技术开发有限公司。将切

片浸入 0.01 mol/L(pH 6.0)柠檬酸盐缓冲液中进行高温高压修复,修复时间 2 min,免疫组织化学染色的步骤严格按照 Envision 二步法进行。

1.3 结果判读

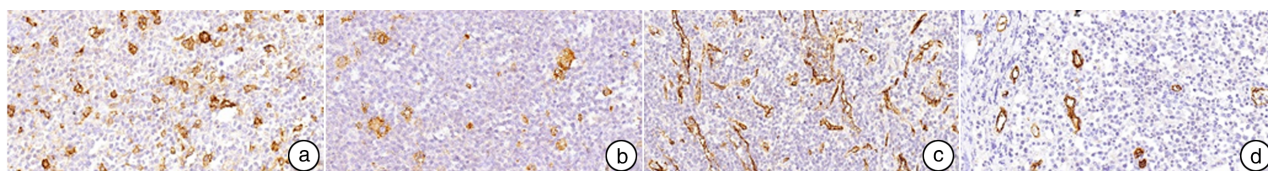
CD68 阳性表现为巨噬细胞的胞质内出现棕褐色或棕黄色颗粒。首先在低倍视野下(100×)选取着色理想的区域,然后连续计数 5 个高倍视野(400×)中阳性的巨噬细胞数,取平均值作为最终 CD68 计数结果^[8]。CD34 阳性表达定位于血管内皮细胞的胞质或胞膜。根据 CD34 染色结果计数 MVD,即低倍视野下(100×)浏览整张切片,选取 3 个血管生成最明显的区域作为“热点”,然后切换高倍视野(400×)计数每个“热点”中的着色血管数,取平均值作为最终 MVD^[9]。着色的血管内皮细胞或内皮细胞簇,无论是否形成管腔,只要与附近的微血管、肿瘤细胞或其他结缔组织成分分开,就视为一个微血管来计算。

1.4 统计学处理

数据分析使用 SPSS22 统计软件。采用 χ^2 检验分析 CD68、MVD 与临床病理指标的关系;采用 Spearman 秩相关分析 CD68 与 MVD 之间的相关性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

DLBCL 中 CD68 与 CD34 的表达见图 1。



a:CD68 高表达;b:CD68 低表达;c:CD34 高表达;d:CD34 低表达。

图 1 DLBCL 组织中 CD68 与 CD34 的表达(400×)

分别以 CD68 与 MVD 中位数为阈值,将 DLBCL 患者分为高表达组与低表达组(表 1)。CD68 表达水平与患者年龄($P=0.016$)及 IPI 有关($P=0.002$),而与性别、免疫表型、LDH、有无 B 症状及 Ann Arbor 分期无关(均 $P>0.05$)。MVD 水平与患者的肿瘤原发部位($P=0.002$)及 IPI($P=0.030$)有关,而与年龄、性别、免疫表型、LDH、有无 B 症状及 Ann Arbor 分期无关(均 $P>0.05$)。对 CD68 与 MVD 的表达进行相关性分析,结果表明 CD68 与 MVD 的表达呈显著正相关($r=0.290$, $P=0.010$)。

3 讨论

TAM 作为肿瘤微环境中的重要成分,促进了肿瘤的生长与进展,近年来已成为肿瘤研究的热点。在实体肿瘤如乳腺癌中,Zhao 等^[10]发现患者 CD68 的高表达与较差的预后有关。在淋巴造血系

统恶性肿瘤,有研究发现成人经典霍奇金淋巴瘤中,较高的 CD68 表达水平与患者较高的临床分期及 IPI 有关且提示患者预后较差^[5]。而在 DLBCL 中,CD68 的表达水平与患者预后的关系目前仍存在争议。本研究发现年龄大于 60 岁的 DLBCL 患者,其 CD68 表达水平低于 60 岁以下的患者。有研究显示衰老会影响巨噬细胞的募集、抗原呈递、吞噬作用和细胞因子的生成^[11]。因此,我们推测 60 岁以上患者 CD68 表达低于 60 岁以下组可能与免疫功能随年龄的增加而降低有关。此外,我们发现患者 CD68 表达水平与 IPI 存在显著正相关,与李延莉^[12]的研究结果一致,表明 CD68 高表达可提示 DLBCL 患者较差的预后。

肿瘤的发生和演进与血管生成密切相关,肿瘤血管生成一方面可为肿瘤细胞提供营养成分并排除代谢产物,另一方面可以为肿瘤的转移创造条

表 1 MVD、CD68 与 DLBCL 患者临床病理指标的关系

因素	MVD		P	CD68		P
	高表达/例	低表达/例		高表达/例	低表达/例	
年龄/岁						
≤60	18	24	0.212	26	16	0.016
>60	20	15		12	23	
性别						
男	21	23	0.742	21	23	0.742
女	17	16		17	16	
部位						
结内	14	3	0.002	7	10	0.445
结外	24	36		31	29	
免疫分型						
GCB	17	20	0.565	19	18	0.736
non-GCB	21	19		19	21	
IPI 评分						
0~1	14	24	0.030	12	26	0.002
2~5	24	15		26	13	
LDH						
正常	30	34	0.335	31	33	0.722
升高	8	5		7	6	
B 症状						
无	32	37	0.246	34	35	1.000
有	6	2		4	4	
分期						
I~II	32	35	0.702	34	33	0.768
III~IV	6	4		4	6	

件^[13]。在肿瘤血管生成的研究中,CD34 与Ⅷ因子及 CD31 相比,对肿瘤微环境中微血管的着色更清晰稳定,因此 CD34 作为血管内皮细胞的标记物已被普遍应用^[14]。在实体肿瘤如胃癌、食管癌和子宫内膜癌中,已有研究证实 MVD 升高与患者较高的临床分期与较差的预后有关^[14-16]。但在 DLBCL 中,MVD 与患者临床病理指标及预后的关系目前仍有争议。本研究表明 MVD 水平与肿瘤的原发部位有关,原发于结内的 DLBCL 患者其 MVD 表达水平显著高于原发于结外的患者,与吴静怡等^[17]的研究结果一致,提示相对于原发于结外的 DLBCL,抗血管生成治疗可能对原发于结内的 DLBCL 患者更有效。本研究中 MVD 高表达的患者 IPI 更高,提示高 MVD 可能与 DLBCL 患者较差的预后有关,这与 Cardesa-Salzmnn 等^[18]的研究结果一致。

随着对肿瘤血管生成研究的不断深入,研究者们发现肿瘤微环境中的 TAM 在肿瘤血管生成过程中发挥重要作用。Wu 等^[19]证实在胃癌中,TAM 可以促进肿瘤血管生成,从而促进肿瘤的生长和转移。然而在 DLBCL 中,TAM 与肿瘤血管生成之间的相关性至今鲜有报道。通过相关性分析,我们发现本研究中 CD68 与 MVD 呈正相关,提

示在 DLBCL 中 TAM 可以促进肿瘤血管生成。由于肿瘤间质低氧环境的诱导作用,肿瘤微环境中的 TAM 可以通过产生一氧化氮以及各种促血管生成因子,如血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子 2 等促进肿瘤血管生成^[20]。

总之,本研究表明 CD68 与年龄及 IPI 有关,MVD 与肿瘤原发部位及 IPI 有关,且 CD68 表达与 MVD 呈正相关。因此,TAM 可促进 DLBCL 的血管生成,CD68 与 MVD 的高表达均提示患者预后较差。

参考文献

[1] 朱明霞,万文丽,洪韫,等. CD43 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及临床意义[J]. 临床血液学杂志,2018,31(5):343-347.

[2] 陈艳欣,郑晓云,刘庭波,等. 利妥昔单抗联合 CHOP 与单用 CHOP 方案治疗初治弥漫大 B 细胞淋巴瘤疗效及安全性对比[J]. 临床血液学杂志,2015,28(9):760-763.

[3] 金静霞,郑翠苹,陈丽雅,等. PD-1、PD-L1 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤组织中的差异性表达及其临床意义[J]. 临床血液学杂志,2018,31(1):34-37.

[4] Cai QC, Liao H, Lin SX, et al. High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lympho-

- ma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29: 2317—2322.
- [5] Guo B, Cen H, Tan X, et al. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma[J]. *BMC Med*, 2016, 14: 159.
- [6] Komohara Y, Niino D, Ohnishi K, et al. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies[J]. *Pathol Int*, 2015, 65: 170—176.
- [7] Ronca R, Benkheil M, Mitola S, et al. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications[J]. *Med Res Rev*, 2017, 37: 1231—1274.
- [8] Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22: 231—237.
- [9] Jelacic J, Balint MT, Jovanovic MP, et al. The role of lymphocyte to monocyte ratio, microvessel density and high CD44 tumor cell expression in non Hodgkin lymphomas[J]. *Pathol Oncol Res*, 2016, 22: 567—577.
- [10] Zhao X, Qu J, Sun Y, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature[J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 30576—30586.
- [11] Jackaman C, Tomay F, Duong L, et al. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils[J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 36: 105—116.
- [12] 李延莉. 单核巨噬细胞系统在弥漫大 B 细胞淋巴瘤发生发展中作用的临床和实验研究[D]. 安徽医科大学, 2015.
- [13] Krishna Priya S, Nagare RP, Sneha VS, et al. Tumour angiogenesis-origin of blood vessels[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139: 729—735.
- [14] Jian ZW, Yu JX, Man GCW, et al. Clinicopathological and prognostic significance of blood microvessel density in endometrial cancer: a meta-analysis and subgroup analysis[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297 (Suppl 4): 1—10.
- [15] Hong WG, Ko YS, Pyo JS. Clinicopathological significance and prognostic role of microvessel density in gastric cancer: A meta-analysis[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213: 1459—1463.
- [16] Ma G, Zhang J, Jiang H, et al. Microvessel density as a prognostic factor in esophageal squamous cell cancer patients: A meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96: e7600.
- [17] 吴静怡, 曹阳, 孙立石, 等. 非霍奇金淋巴瘤组织中 FGFR3 和 VEGF 的表达及其与血管生成的相关性[J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(3): 225—228.
- [18] Cardesa-Salzmänn TM, Colomo L, Gutierrez G, et al. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy[J]. *Haematologica*, 2011, 96: 996—1001.
- [19] Wu H, Xu J, He Y, et al. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 106: 462—468.
- [20] 智敏. 肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤发展中的作用[J]. *中外医疗*, 2012, 31(12): 186—187.

(收稿日期: 2018-12-28)

(上接第 192 页)

- 免疫机制研究进展[J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(9): 725—728.
- [2] Quach ME, Dragovich MA, Chen W, et al. Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets[J]. *Blood*, 2018, 131: 787—796.
- [3] McKenzie CG, Guo L, Freedman J, et al. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. *Br J Haematol*, 2016, 163: 10—23.
- [4] Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2010, 115: 168—186.
- [5] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 172—176.
- [6] Moulis G, Palmaro A, Montastruc JL, et al. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia—a nationwide population-based study in France [J]. *Blood*, 2014, 124: 3308—3315.
- [7] Rodeghiero F, Michel M, Gernsheimer T, et al. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group[J]. *Blood*, 2013, 121: 2596—2606.

(收稿日期: 2018-07-01)