

文章编号 1006-8147(2021)05-0502-10

论 著

肿瘤相关巨噬细胞和幽门螺杆菌感染在各部位Ⅲ期胃腺癌患者预后中的意义

王月洁¹, 魏枫¹, 任秀宝^{1,2}

(天津医科大学肿瘤医院 1. 生物技术研究室; 2. 生物治疗科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室, 天津 300060)

摘要 目的: 分析肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)标志物(抗原 CD68 和 CD163)表达和幽门螺杆菌(Hp)感染对不同部位Ⅲ期胃腺癌患者预后的影响。方法: 收集 2012 年 1 月—2014 年 12 月天津医科大学肿瘤医院胃部肿瘤科 300 例确诊为Ⅲ期胃腺癌患者的病例资料(根据发生部位的不同, 分为胃底贲门癌组、胃体癌组和胃窦癌组, 各 100 例)。比较 3 组患者一般资料; 免疫组化染色法检测患者的肿瘤组织中有无 Hp 感染、CD68⁺TAMs 以及 CD163⁺TAMs 的分布情况; 根据 CD68⁺TAMs 的浸润情况将胃腺癌分为 I 型(癌巢边缘浸润数量多于癌巢)和 II 型(癌巢浸润数量多于癌巢边缘), 利用 Kaplan-Meier 法分析 I 型和 II 型胃腺癌患者预后的关系。然后分析 I 型和 II 型胃腺癌患者的 Hp 阳性表达率以及两组临床病理特征的关系; 分析部位、年龄、饮酒、中性粒细胞、分型和 Hp 感染之间的相关性; 利用 Kaplan-Meier 法分析 I 型和 II 型不同部位胃腺癌患者 Hp 与预后的关系。结果: 胃底贲门癌组患者肿瘤显著大于胃窦癌组和胃体癌组($t=5.972, P<0.05$); 胃窦癌组患者饮酒人数多于胃体癌组($\chi^2=6.742, P<0.05$); CD68⁺和 CD163⁺TAMs 在胃窦癌癌巢的相对表达水平高于癌巢浸润边缘; 在胃底贲门癌癌巢浸润边缘的相对表达高于癌巢; 在胃体癌癌巢浸润边缘的相对表达高于癌巢, 差异均有统计学意义 ($H=136.06, 124.99, 142.17, 91.16$, 均 $P<0.01$); CD68⁺和 CD163⁺TAMs 在癌巢浸润边缘多者预后不良($\chi^2=6.289, 4.153, 5.979$, 均 $P<0.05$); II 型胃腺癌患者累计生存率和无病生存率较 I 型高($\chi^2=4.950, 5.601$, 均 $P<0.05$); 肿瘤大小与年龄、发生部位有关系($r=-0.162, -0.115$, 均 $P<0.05$); 分型与发生部位、中性粒细胞显著相关($r=0.745, 0.231$, 均 $P<0.01$); Hp 与发生部位、分型有关($r=0.141, 0.110$, 均 $P<0.05$); 发生在胃体和胃窦部、肿瘤 <4 cm、无淋巴结转移、中性粒细胞水平高的 II 型胃腺癌患者 Hp 阳性表达率高, 且预后较好($\chi^2=20.168, 2.365, 19.247, 18.972$, 均 $P<0.05$)。结论: TAMs 标志物(抗原 CD68 和 CD163)在癌巢浸润数量多对不同部位的Ⅲ期胃腺癌均是有利因素, 另外, Hp 阳性也是预测胃体癌和胃窦癌的良好指标。

关键词 幽门螺杆菌; 胃肿瘤; 腺癌; 抗原, CD68; 抗原, CD163; 抗原, CD66b

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

The significance of tumor-associated macrophages and Helicobacter pylori infection in the prognosis of patients with stage III gastric adenocarcinoma at various sites

WANG Yue-jie¹, WEI Feng¹, REN Xiu-bao^{1,2}

(1. Department of Immunology; 2. Department of Biotherapy, Tianjin Medical University, Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy, Tianjin 300060, China)

Abstract Objective: To analyze the effects of tumor-associated macrophages (TAMs) markers (antigens CD68 and CD163) expression and Helicobacter pylori (Hp) infection on the prognosis of patients with stage III gastric adenocarcinoma at different locations. **Methods:** From January 2012 to December 2014, 300 cases of patients diagnosed with stage III gastric adenocarcinoma in the Department of Gastric Oncology, Tianjin Medical University Cancer Hospital were collected (they were divided into gastric fundus and cardia cancer group, gastric body cancer group and gastric antrum cancer group, 100 cases in each group). The general information of the three groups of patients were compared; immunohistochemical staining was used to detect the presence or absence of Hp infection, CD68⁺ TAMs and the distribution of CD163⁺ TAMs in the tumor tissues of the patients; according to the infiltration of CD68⁺ TAMs, gastric adenocarcinoma was classified into type I (the number of infiltrates at the edge of cancer nests more than that of cancer nests) and type II (the number of infiltrates in cancer nests more than at the edges of cancer nests). Kaplan-Meier method was used to analyze the relationship between the prognosis of patients with type I and type II gastric adenocarcinoma. Then the positive expression rate of Hp in patients with type I and type II gastric adenocarcinoma and the relationship between the two groups of clinicopathological characteristics were analyzed. The correlation between location, age, alcohol consumption, neutrophils, type and Hp infection were analyzed. Kaplan-Meier method was used

基金项目 国家重点 R&D 计划(2018YFC1313400); 国家重大科技专项“重大新药开发”(2018ZX09201-05)

作者简介 王月洁(1995-), 女, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤的生物治疗; 通信作者: 任秀宝, E-mail: renxiubao@tjmuch.com。

to analyze the relationship between Hp and prognosis in patients with gastric adenocarcinoma at different sites of type I and type II. **Results:** The tumors in the gastric cardia cancer group were significantly larger than those in the gastric antral cancer group and the gastric body cancer group ($t=5.972, P<0.05$); the alcohol consumption of the gastric antral cancer group was more than the gastric body cancer group ($\chi^2=6.742, P<0.05$); the relative expression of CD68⁺ and CD163⁺TAMs in gastric antral cancer nests were higher than the infiltration margins of cancer nests; the relative expression of cancer nest infiltration margin in gastric cardia cancer were higher than those in cancer nest; at the cancer nest infiltration margin of gastric body, the relative expression of were higher than those in cancer nest, the difference was statistically significant ($H=136.06, 124.99, 142.17, 91.16$, all $P<0.01$). CD68⁺ and CD163⁺TAMs at the edge of the cancer nest had a poor prognosis ($\chi^2=6.289, 4.153, 5.979$, all $P<0.05$); the cumulative survival rate and disease-free survival rate of patients with type II gastric adenocarcinoma were higher than those with type I ($\chi^2=4.950, 5.601$, both $P<0.05$); tumor size was related to age and site of occurrence ($r=-0.162, -0.115$, both $P<0.05$); classification was significantly related to site of occurrence and neutrophils ($r=0.745, 0.231$, both $P<0.01$); Hp was related to site and type ($r=0.141, 0.110$, both $P<0.05$). The patients with type II gastric adenocarcinoma occurred in the gastric corpus and antrum, with tumor <4 cm, no lymph node metastasis, high levels of neutrophils had a high positive expression rate of Hp and a good prognosis ($\chi^2=20.168, 2.365, 19.247, 18.972$, all $P<0.05$). **Conclusion:** The large number of TAMs markers (antigens CD68 and CD163) infiltrating cancer nests are favorable factors for stage III gastric adenocarcinoma at different sites. In addition, for gastric body cancer and gastric antrum cancer, Hp positive is also a good predictive indicator.

Key words Helicobacter pylori; stomach neoplasms; adenocarcinoma; antigens, CD68; antigens, CD163; antigens, CD66b

胃癌是世界上第五大常见癌症和全球第三大癌症死亡原因^[1],腺癌占胃恶性肿瘤的95%以上^[2],进展期患者的5年生存率仅为7%~27%^[3],其中胃底贲门癌处于胃食管交界部,近年来较胃体癌和胃窦癌发生率有所上升^[4],且术后复发相对较多,患者预后差,严重影响患者的生活质量^[5]。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是胃癌肿瘤微环境的重要组成部分。越来越多的研究关注胃癌的炎性微环境在胃癌发生、发展中的作用^[6]。研究发现TAMs与不良预后密切相关,但亦有研究表明TAMs与预后呈正相关^[7]。也有研究显示,幽门螺杆菌(Helicobacter pylori, Hp)相关Tip α 蛋白经激活核因子 κ B,诱导巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 α 等炎症因子,促进肿瘤的发生、发展^[8],同时Hp感染在胃癌中可调控TAMs极化^[9]。然而, Hp感染和TAMs结合起来讨论与不同部位胃腺癌的预后关系尚未阐明。因此,本研究旨在分析不同部位Ⅲ期胃腺癌组织中的TAMs相关标志物(CD68和CD163)和是否感染Hp,以探讨Hp感染和TAMs与不同部位的Ⅲ期胃腺癌患者预后的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取2012年1月—2014年12月就诊于天津医科大学肿瘤医院胃部肿瘤科经病理确诊为Ⅲ期胃腺癌的病理组织石蜡标本。其中男223例,女77例;年龄范围27~83岁,平均(59.78 \pm 11.04)岁。分期采用最新的国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)和美国抗癌联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)第8版TNM分期。纳入标准:(1)年龄20~85岁。(2)无远处

转移。(3)手术切缘镜下阴性。(4)诊断确切。(5)临床分期为Ⅲ期。(6)病例信息完备。排除标准:(1)术前接受除手术外的抗癌治疗者。(2)合并第二原发性肿瘤者。(3)失访者。共收集到符合要求的研究对象300例。其中胃底贲门癌100例、胃体癌100例和胃窦癌100例。本研究得到天津医科大学肿瘤医院伦理委员会批准,标本取材经家属知情同意并签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 鼠源单克隆抗CD68抗体购于美国Thermo Fisher公司;兔源单克隆抗CD163抗体购于美国Abcam公司;鼠源单克隆抗CD66b抗体购于美国BioLegend公司;鼠源单克隆抗Hp抗体购于迈新生物技术开发有限公司;DAB显色试剂盒购于北京中衫金桥生物有限公司;二抗即酶标羊抗鼠/兔IgG聚合物购于迈新生物技术开发有限公司;生物显微镜(型号BX51TRF)购自日本Olympus公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化染色 所有组织标本均经10%福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m厚连续切片,组织切片70℃烤箱烘烤1 h后,常规脱蜡,去离子水中浸泡复水15 min,用枸橼酸盐缓冲液高温高压修复3 min,自然晾至室温,3% H_2O_2 封闭30 min, PBS冲洗5 min \times 3遍,加入稀释比例分别为CD68(1:400)、CD163(1:200)、CD66b(1:100)、Hp(1:100)于4℃冰箱孵育过夜。PBS洗5 min \times 3遍后,于室温孵育二抗(即用型免疫组化Elivision plus试剂)30 min,经DAB显色3~5 min,镜下(100 \times)观察染色情况,充分水洗,苏木素液染核,脱水、透明、中性树胶封片。免疫组化阳性标准:根据染色强度分为无棕黄色(阴性)、淡

棕黄色(弱阳性)、棕黄色(阳性)、棕褐色(强阳性)。

1.3.2 免疫组化检测结果判定 所有指标的结果均由2位病理主治医师经双盲法判定。CD68和CD163阳性细胞计数:低倍(100×)下观察切片,选择阳性细胞分布最高密度区即“热点”,然后高倍(400×)下分别在癌巢(center of cancer tissues, CT)和癌巢浸润边缘(infiltrating edge of cancer nests, CI)计数5个视野的阳性细胞数,取其平均值为该例的CD68和CD163阳性细胞值,然后以中位数为截断值,分为高表达组和低表达组。将CD68阳性细胞在胃腺癌癌巢浸润边缘数量多于癌巢者定义为I型胃腺癌,反之则为II型胃腺癌。CD66b阳性细胞计数:低倍(10×)下观察切片,选择中性粒细胞阳性细胞分布最高密度区,然后高倍(400×)下计数5个视野的阳性细胞数,取其平均值。然后以中位数为截断值,分为高表达组和低表达组。Hp结果判定:高倍(400×)下观察胃黏膜表面上皮与黏膜层之间和胃小凹,若观察到粗杆状、海鸥状菌体,部分呈颗粒和团块状,染色无棕黄色,则为阴性。

1.3.3 观察指标 计算患者CD68、CD163和CD66b阳性细胞数和Hp菌体数,观察其表达水平与临床病理特征的相关性以及有无病生存期(disease-free survival, DFS)、总生存期(overall survival, OS)的关系。

1.3.4 随访 随访开始于手术日,截止于2019年12月31日,以电话联系及定期复诊形式进行,中位随访时间为48个月,随访内容包括患者体重、精神状

态、饮食、大小便的变化等。其中DFS定义为从手术日期到肿瘤复发或者是到最后1次随访的间隔时间。OS是指从手术日期到患者因肿瘤死亡或者是到最后1次随访的间隔时间。

1.4 统计学处理 采用SPSS20.0、GraphPad Prism8进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;不符合正态分布则以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用Kruskal-Wallis H 检验;计数资料以 $n(\%)$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用Spearman相关。绘制Kaplan-Meier生存曲线,截断值为中位数,采用Log-rank法比较生存率。Cox比例风险模型进行单因素和多因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 300例胃腺癌患者按照发病部位分为3组,3组的性别、年龄、癌胚抗原(CEA)、体重指数(BMI)、吸烟和淋巴结转移差异均无统计学意义。与胃体癌组比较,胃窦癌组饮酒者较多($t=6.742$, $P < 0.05$);与胃底贲门癌组比较,胃窦癌组和胃体癌组肿瘤较小($\chi^2=5.972$, $P < 0.05$),见表1。

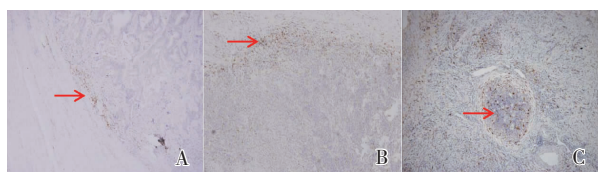
2.2 CD68⁺TAMs和CD163⁺TAMs在不同部位胃腺癌组织中的表达情况 CD68蛋白在巨噬细胞胞浆和胞膜呈阳性表达,呈棕褐色(图1)。CD163蛋白在M2型巨噬细胞胞浆和胞膜呈阳性表达,呈棕褐色(图2)。3个部位胃腺癌的TAMs空间分布不同,多在胃底贲门癌和胃体癌的癌巢浸润边缘和胃窦癌

表1 3组患者一般资料比较[n(%), $\bar{x} \pm s$, $M(IQR)$]

Tab 1 Comparison of basic characteristics among the three groups[n(%), $\bar{x} \pm s$, $M(IQR)$]

组别	例数	男性	年龄(岁)	CEA($\mu\text{g/L}$)	肿瘤直径(cm)	BMI(kg/m^2)	吸烟	饮酒	淋巴结转移
胃底贲门癌组	100	76(76.0)	61.08 \pm 10.72	5.79 \pm 0.98	4.40(2.40)	25.71 \pm 7.85	65(65.0)	40(40.0)	97(97.0)
胃体癌组	100	69(69.0)	58.12 \pm 10.85	5.62 \pm 2.45	5.40(3.25) ^a	26.69 \pm 4.52	74(74.0)	32(32.0)	98(98.0)
胃窦癌组	100	78(78.0)	60.13 \pm 11.43	5.88 \pm 1.69	5.30(2.70) ^a	27.21 \pm 5.66	65(65.0)	50(50.0) ^b	97(97.0)
t 或 χ^2		2.341	2.865	1.254	5.972	1.984	2.482	6.742	0.946
P		0.125	0.096	0.237	0.041	0.168	0.117	0.036	0.347

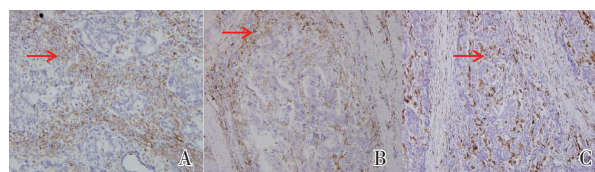
注:与胃底贲门癌组比较,^a $P < 0.05$;与胃体癌组比较,^b $P < 0.05$;CEA:癌胚抗原;BMI:体重指数



注:A:胃底贲门癌;B:胃体癌,CD68⁺TAMs多在癌巢浸润边缘表达;C:胃窦癌,在癌巢多可见大量CD68⁺TAMs浸润

图1 不同部位胃腺癌组织标本中CD68的表达情况(免疫组化染色,100×)

Fig 1 The expression of CD68 in gastric adenocarcinoma tissues at various positions (IHC, 100×)



注:A:胃底贲门癌;B:胃体癌,CD163⁺TAMs多在癌巢浸润边缘表达;C:胃窦癌,在癌巢多可见大量CD163⁺TAMs浸润

图2 不同部位胃腺癌组织标本中CD163的表达情况(免疫组化染色,200×)

Fig 2 The expression of CD163 in gastric adenocarcinoma tissues at various positions(IHC, 200×)

的癌巢分布。

2.3 CD68⁺TAMs 和 CD163⁺TAMs 在不同部位胃腺癌组织中表达水平比较 CD68⁺和 CD163⁺TAMs 在胃窦癌癌巢的相对表达水平高于癌巢浸润边缘;在胃底贲门癌癌巢浸润边缘的相对表达水平高于癌巢;在胃体癌癌巢浸润边缘的相对表达水平高于癌巢,差异有统计学意义(均 $P<0.01$),见表 2。

2.4 CD68⁺TAMs 与预后的相关性 300 例患者随访期均为 5 年,随访率为 100%。CD68⁺TAMs 在胃底贲门癌癌巢的浸润与预后呈正相关($r_s=0.674, P=0.023$),高计数组 OS 明显长于低计数组,差异有统计学意义,其他两个部位未见明显差别,CD68⁺TAMs 高计数组在 3 个部位癌巢的 5 年累计总生存率分别为 52.6%、44.1%和 54.3%,5 年累计无病生存率分别为 25.7%、39.4%和 44.9%;低计数组在 3 个部位癌巢的 5 年累计总生存率分别为 33.3%、39.4%和

36.7%,5 年累计无病生存率分别为 25.7%、29.6%和 36.7%,见图 3。CD68⁺TAMs 在 3 个部位胃腺癌癌巢浸润边缘的浸润与预后呈负相关,低计数组 OS 均明显长于高计数组,在胃体癌癌巢浸润边缘低计数组 DFS 长于高计数组,差异有统计学意义,其他两个部位未见明显差异,CD68⁺TAMs 高计数组在 3 个部位癌巢浸润边缘的 5 年累计总生存率分别为 26.3%、34.7%和 28.8%,5 年累计无病生存率分别为 25.0%、25.0%和 34.6%;低计数组在 3 个部位癌巢的 5 年累计总生存率分别为 55.6%、48.7%和 45.1%,5 年累计无病生存率分别为 32.5%、42.5%和 47.1%,见图 4。

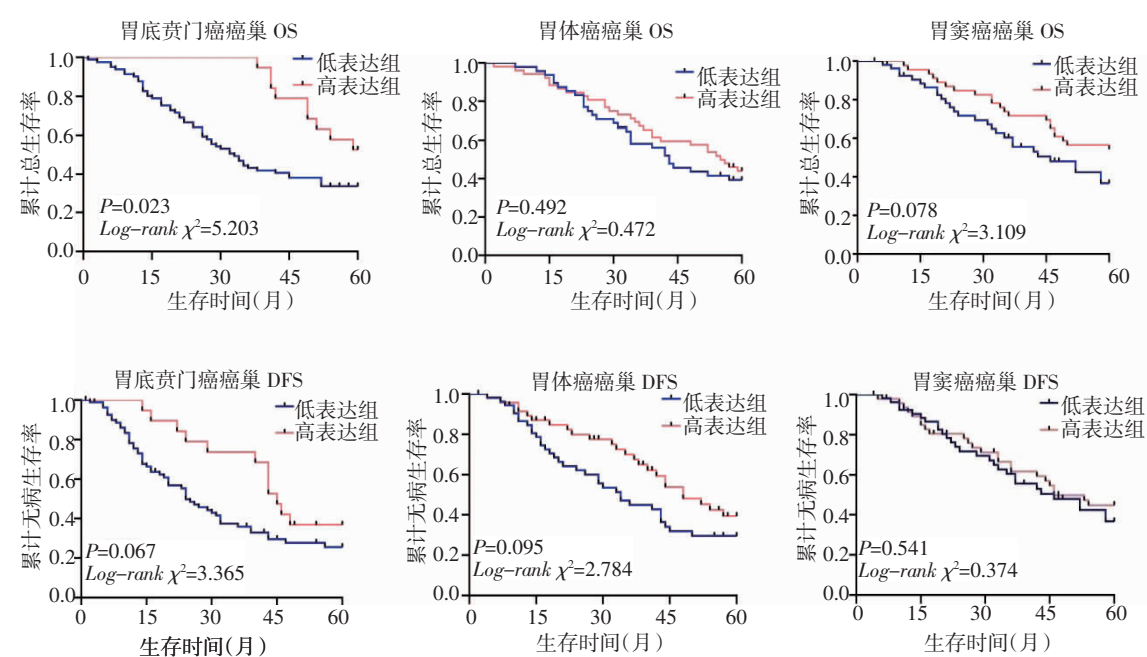
2.5 CD163⁺TAMs 与预后的相关性 CD163⁺TAMs 在胃体癌癌巢的浸润与预后呈正相关,高计数组 DFS 明显好于低计数组,差异有统计学意义,其他两个部位未见明显差别,CD163⁺TAMs 高计数组在 3 个部位癌巢的 5 年累计总生存率分别为 39.0%、42.

表 2 3 组患者 CD68 和 CD163 蛋白的表达[M(P₂₅,P₇₅)]

Tab 2 Expressions of CD68 and CD163 proteins in three groups[M(P₂₅,P₇₅)]

组别	例数	CD68		CD163	
		CT	CI	CT	CI
胃底贲门癌组	100	8.00(5.00,12.75)	57.00(43.25,79.75)	6.00(4.00,10.00)	40.00(22.00,60.00)
胃体癌组	100	17.00(9.00,26.00) ^a	59.50(36.00,83.75)	11.00(6.00,16.00) ^a	33.00(17.00,62.75)
胃窦癌组	100	34.00(21.25,49.00) ^{ab}	17.50(13.00,30.00) ^{ab}	27.50(16.00,37.00) ^{ab}	11.00(8.00,19.00) ^{ab}
H		136.06	124.99	142.17	91.16
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

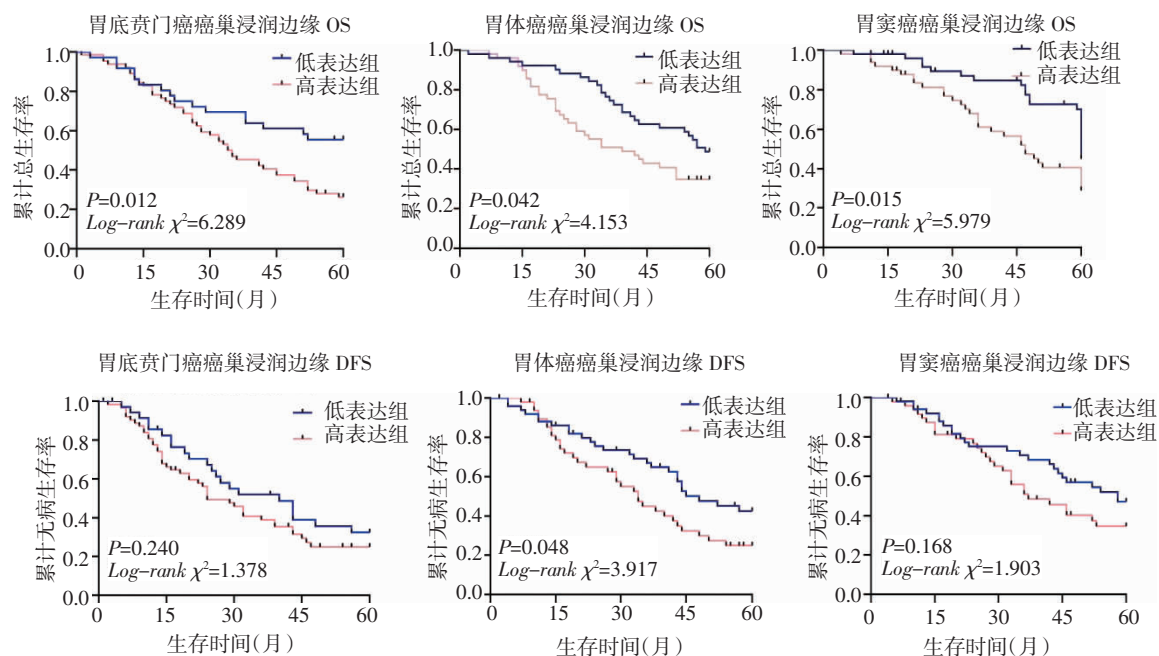
注:CT:癌巢;CI:癌巢浸润边缘;与胃底贲门癌组比较,^a $P<0.05$;与胃体癌组比较,^b $P<0.05$



注:OS:总生存期;DFS:无病生存期

图 3 不同部位胃腺癌癌巢的 CD68 蛋白表达与预后的关系

Fig 3 Relationship between expression of CD68 protein in gastric adenocarcinoma nests at various sites and prognosis



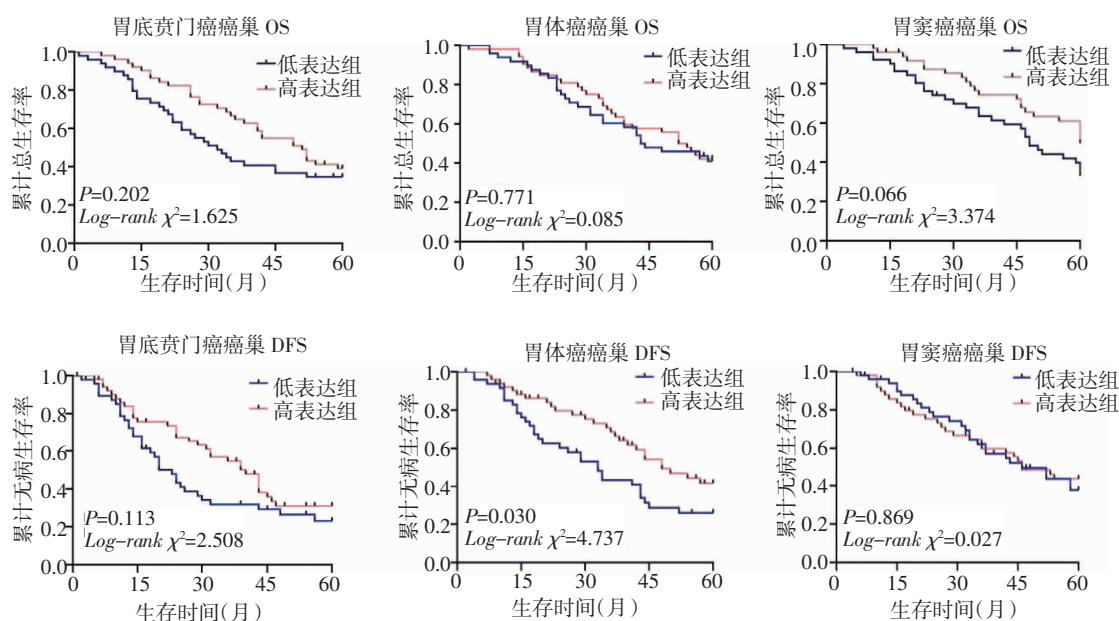
注: OS: 总生存期; DFS: 无病生存期

图 4 不同部位胃腺癌巢浸润边缘的 CD68 蛋白表达与预后的关系

Fig 4 Relationship between expression of CD68 protein at the edge of gastric adenocarcinoma nest at the various sites and prognosis

1%和 49.7%, 5 年累计无病生存率分别为 31.1%、41.9%和 43.5%;低计数组在 3 个部位癌巢的 5 年累计总生存率分别为 34.7%、42.1%和 33.1%, 5 年累计无病生存率分别为 23.1%、26.1%和 37.8%, 见图 5。CD163⁺TAMs 在 3 个部位胃腺癌巢浸润边缘的浸润与预后呈负相关, 低计数组 OS 均明显好于高计数组, 在胃窦癌巢浸润边缘低计数组 DFS 好

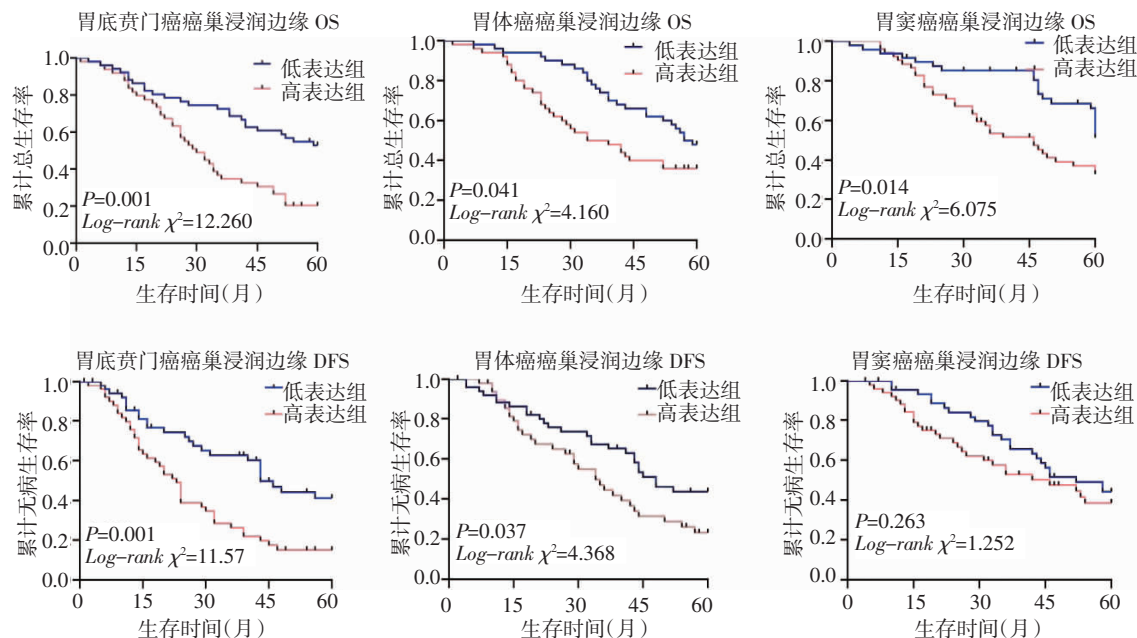
于高计数组, 差异有统计学意义, 其他两个部位未见明显差异, CD163⁺TAMs 高计数组在 3 个部位癌巢浸润边缘的 5 年累计总生存率分别为 20.4%、36.0%和 33.1%, 5 年累计无病生存率分别为 15.1%、23.2%和 38.6%;低计数组在 3 个部位癌巢浸润边缘的 5 年累计总生存率分别为 52.9%、48.0%和 51.5%, 5 年累计无病生存率分别为 41.2%、43.7%和 44.2%, 见图 6。



注: OS: 总生存期; DFS: 无病生存期

图 5 不同部位胃腺癌巢的 CD163 蛋白表达与预后的关系

Fig 5 Relationship between expression of CD163 protein in gastric adenocarcinoma nest at various sites and prognosis



注:OS:总生存期;DFS:无病生存期

图6 不同部位胃腺癌癌巢浸润边缘的CD163蛋白表达与预后的关系

Fig 6 Relationship between expression of CD163 protein at the edge of gastric adenocarcinoma nest at the various sites and prognosis

2.6 验证Ⅰ型和Ⅱ型胃腺癌与预后的相关性 不同部位的Ⅰ型和Ⅱ型胃腺癌的构成比例,见图7。Ⅱ型胃腺癌累计OS和DFS率明显高于Ⅰ型,差异有统计学意义,见图8。

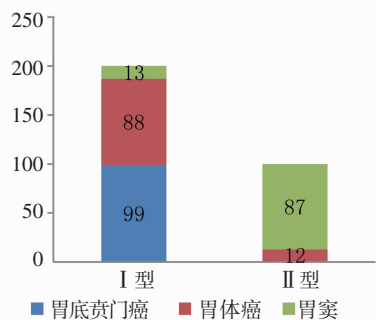


图7 不同部位Ⅰ型和Ⅱ型胃腺癌构成比例

Fig 7 Proportion of type I and type II gastric adenocarcinoma at various sites

2.7 Ⅰ型和Ⅱ型胃腺癌患者Hp的分布情况和CD66b蛋白的表达 Hp主要分布在胃黏膜表面上皮与黏膜层之间,贴近黏膜表面上皮细胞,可进入癌巢,胃小凹和黏膜浅层腺腔内亦可见Hp,免疫组化染色呈棕褐色,粗杆状、海鸥状,部分呈颗粒和团块状。CD66b阳性细胞染色呈棕褐色,多分布在癌巢间质,癌巢内也可见(图9)。Ⅰ型较Ⅱ型胃腺癌患者Hp阳性表达率低,差异有统计学意义(表3)。

2.8 Ⅰ型和Ⅱ型Hp阳性胃腺癌患者临床病理特点的分析 Ⅰ型胃腺癌患者Hp阳性率与发生部位有

关,胃底贍门和胃体部阳性率更高($\chi^2=6.352, P<0.05$),而与性别、年龄、BMI、有无吸烟饮酒、肿瘤大小、CEA、淋巴结转移无关;Ⅱ型胃腺癌患者Hp的阳性率在不饮酒者中更高($\chi^2=4.996, P<0.05$),而与发生部位、性别、年龄、BMI、有无吸烟、肿瘤大小、CEA和淋巴结转移无关,见表4。

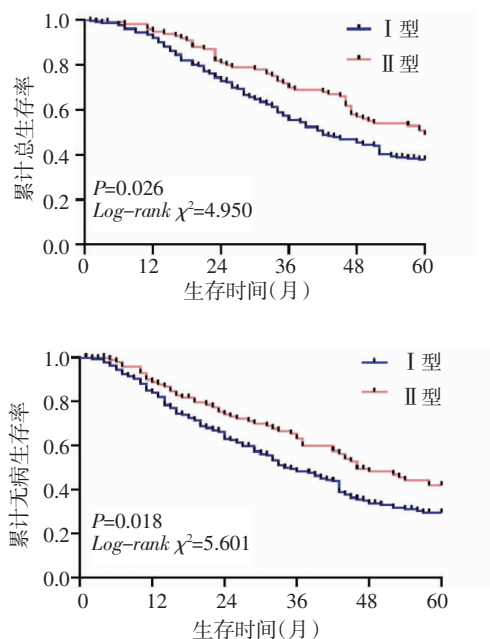
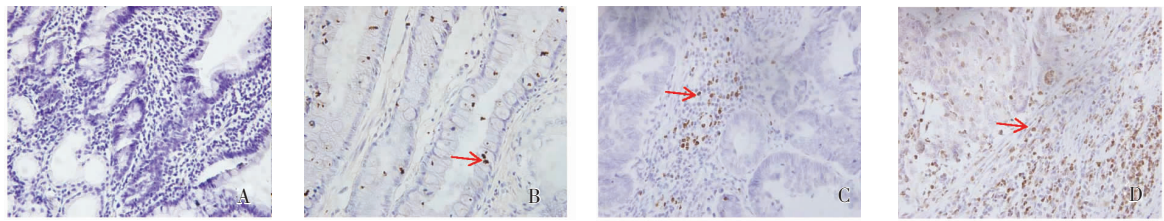


图8 Ⅰ型和Ⅱ型胃腺癌患者生存曲线

Fig 8 Survival curves of patients with type I and type II gastric adenocarcinoma



注:A:胃腺癌组织中无Hp,呈阴性;B:Hp散在分布于胃小凹,呈阳性,显棕褐色;C、D:CD66b阳性细胞多分布于癌巢浸润边缘

图 9 胃腺癌组织中 Hp 和 CD66b 蛋白的表达(免疫组化染色,400×)

Fig 9 Expressions of Hp and CD66b protein in gastric adenocarcinoma tissues(IHC,400×)

表 3 I 型和 II 型胃腺癌患者 Hp 的阳性表达率[n(%)]

Tab 3 Hp positive rate of patients with type I and type II gastric adenocarcinoma[n(%)]

组别	合计	Hp 阴性	Hp 阳性	χ^2	P
I 型	200	58(29.0)	142(71.0)	4.265	0.039
II 型	100	18(18.0)	82(82.0)		

2.9 I 型和 II 型不同部位的 Hp 阳性胃腺癌患者与预后的相关性 肿瘤大小与年龄、发生部位有关系;分型与发生部位、中性粒细胞显著相关;Hp 与发生部位、分型有关,见表 5。单因素分析显示,在不同性别、年龄是否大于 50 岁、不同 BMI、有无吸烟饮酒史、不同 CEA、淋巴结是否转移、中性粒细胞不

表 4 I 型和 II 型胃腺癌患者 Hp 阳性表达率与临床病理特点的关系[n(%)]

Tab 4 The relationship between the positive rate of Hp and clinical parameters of patients with type I and type II gastric adenocarcinoma[n(%)]

临床病理特点		例数	I 型 Hp ⁺	χ^2	II 型 Hp ⁺	χ^2
部位	胃底贲门	100	65(65.0)	6.352*	1(1.0)	5.324
	胃体	100	70(70.0)		7(7.0)	
	胃窦	100	7(7.0)		74(74.0)	
性别	男	223	101(45.3)	0.185	63(28.3)	1.294
	女	77	41(53.2)		19(24.7)	
年龄(岁)	<50	49	20(40.8)	0.322	17(34.7)	0.888
	≥50	251	122(48.6)		65(25.9)	
BMI(kg/m ²)	<18.5	80	28(35.0)	1.767	34(42.5)	6.034
	18.5~23.9	104	54(51.9)		23(22.1)	
	24~27.9	79	37(46.8)		20(25.3)	
	≥28	37	23(62.2)		5(13.5)	
吸烟史	有	204	97(47.5)	0.109	52(25.5)	1.357
	无	96	45(46.9)		30(31.3)	
饮酒史	有	122	50(41.0)	1.616	40(22.5)	4.996*
	无	178	92(51.7)		42(34.4)	
肿瘤直径(cm)	<4	135	54(40.0)	0.000	51(37.8)	1.923
	≥4	165	88(53.3)		31(18.8)	
CEA(μg/L)	<5	77	38(49.4)	0.017	21(27.3)	0.647
	≥5	223	104(46.6)		61(27.4)	
淋巴结转移	有	292	136(46.6)	2.526	80(27.4)	0.448
	无	8	6(75.0)		2(2.5)	

注:*P<0.05;CEA:癌胚抗原;BMI:体重指数;Hp:幽门螺杆菌

表 5 各临床病理特征之间的相关性(r)

Tab 5 Correlation between each clinical parameters(r)

特征	年龄	肿瘤大小	饮酒史	中性粒细胞	分型	Hp
部位	0.044	-0.115*	0.083	0.082	0.745**	0.141*
年龄		-0.162**	-0.054	0.102	0.051	0.009
肿瘤直径			-0.015	-0.093	-0.199**	-0.065
饮酒史				0.087	0.077	0.014
中性粒细胞					0.231**	0.211**
分型						0.110*

注:*P<0.05,**P<0.01

同水平间中位 DFS 差异无统计学,而发生部位在胃体和胃窦部、肿瘤直径<4 cm、II 型、Hp 阳性者中位 DFS 较长,生存质量较好(P<0.05);在发生部位、不同性别、年龄是否大于 50 岁、不同 BMI、有无吸烟饮酒史、不同 CEA 间中位 OS 差异无统计学意义,而肿瘤直径<4 cm、无淋巴结转移、II 型、Hp 阳性、中性粒细胞高水平者的中位 OS 较长,生存质量较好(P<0.05),见表 6。多因素分析显示肿瘤大小、分型、

表 6 300 例胃腺癌患者生存资料单因素分析

Tab 6 Univariate analysis of prognosis factors in 300 patients with gastric adenocarcinoma

因素	Log-rank χ^2
部位(胃底贲门/胃体/胃窦)	2.493
性别(男/女)	0.001
年龄(<50 岁/ \geq 50 岁)	1.139
BMI(<24 kg/m ² / \geq 24kg/m ²)	2.071
吸烟史(有/无)	0.690
饮酒史(有/无)	0.989
肿瘤直径(<4 cm/ \geq 4 cm)	33.127*
CEA(<5 μ g/L/ \geq 5 μ g/L)	0.945
淋巴结转移(有/无)	5.095*
分型(Ⅰ型/Ⅱ型)	4.868*
Hp(阴性/阳性)	26.501*
中性粒细胞(低计数组/高计数组)	5.285*

注: * $P<0.05$; CEA: 癌胚抗原; BMI: 体重指数; Hp: 幽门螺杆菌

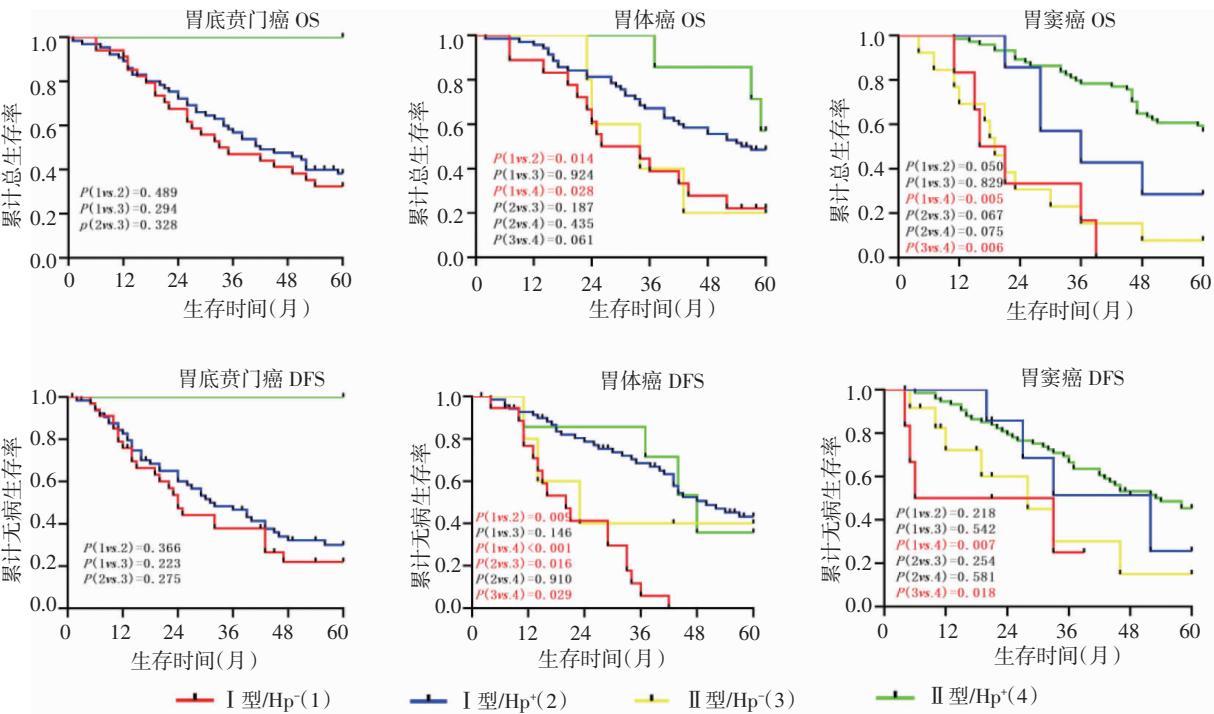
Hp 和中性粒细胞水平是胃腺癌的独立预后因素 ($P<0.05$), 见表 7。Ⅱ型 Hp 阳性胃体癌和胃窦癌患者的 5 年累积总生存率和无病生存率明显高于Ⅰ型 Hp 阴性 ($P<0.05$), 见图 10。

表 7 300 例胃腺癌患者生存资料的多因素分析

Tab 7 Multivariate analysis of prognosis factors in 300 patients with gastric adenocarcinoma

因素	β	SE	Wald χ^2	P	HR	95%CI
肿瘤直径	1.982	0.632	20.168	<0.001	2.479	1.801~4.762
淋巴结转移	0.378	0.491	0.245	0.276	1.652	0.723~3.411
分型	0.636	0.396	2.365	0.044	2.602	1.825~3.473
Hp	1.933	0.720	19.247	<0.001	2.265	1.650~3.108
中性粒细胞计数	1.957	0.432	18.972	<0.001	0.507	0.372~0.691

注: Hp: 幽门螺杆菌



注: OS: 总生存期; DFS: 无病生存期

图 10 4 组不同部位胃腺癌患者预后的分析

Fig 10 Analysis on prognosis of gastric adenocarcinoma patients at various sites in four groups

3 讨论

宿主遭受损伤、炎症、感染和恶性肿瘤时,单核细胞从血液循环中招募出来,分化为组织巨噬细胞^[10]。既往研究表明,CD68 和 CD163 蛋白是最常见的 TAMs 标志物^[11]。CD68 作为泛巨噬细胞,CD163 作为 M2 型巨噬细胞标志物,常被用于 TAMs 的评估和分类。但 CD68⁺和 CD163⁺TAMs 在肿瘤微环境中的意义仍存在争议。CD68⁺和 CD163⁺TAMs 的浸润与食管癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌以及卵巢癌患者预后不良有关^[12-16]。本研究行免疫组化染色示 CD68⁺和 CD163⁺TAMs 在不同部位胃腺癌的表达并进行生存

分析,发现 CD68⁺和 CD163⁺TAMs 多在胃底贲门癌、胃体癌癌巢浸润边缘和胃窦癌癌巢表达,且它们在不同部位胃腺癌癌巢浸润边缘的表达水平与预后呈负相关,与上述研究结果一致。还发现各部位的Ⅱ型胃腺癌患者预后普遍好于Ⅰ型,上述结论得到验证。CD68⁺和 CD163⁺TAMs 在胃腺癌癌巢的高表达与预后呈正相关,虽然这一结果没有达到统计学差异,但可能预示着 TAMs 只有进入癌巢才能更好发挥吞噬肿瘤细胞的作用,今后需要扩大纳入病例对预后进行深入研究。

本研究结果显示Ⅱ型胃腺癌里胃窦癌占 87%,

猜想可能是 Hp 引起的这种现象, Hp 破坏线粒体转录基因的调控, 影响胃黏膜上皮细胞癌基因的转录平衡, 但对 T 淋巴细胞的免疫平衡无影响。Hp 定植于人的胃黏膜表面, 机体对细菌产生免疫反应, 导致免疫或炎症组织损伤。因此, 人体内的免疫系统通过细菌与上皮的黏附而被激活, 从而有效地将 Hp 抗原呈递给 T 细胞和 B 细胞, 进而产生针对 Hp 的特异性细胞和体液免疫^[17]。正常情况下, 人体内的免疫系统具有完善的免疫监视功能。其中, 抗原提呈细胞可识别、捕获、加工和呈递内源和外源抗原, 诱导机体产生特异性的抗肿瘤和抗炎免疫反应, 同时具有免疫调节功能。此外, 还受到局部巨噬细胞、细胞因子和内毒素的影响和调节, 与消化道炎症和肿瘤密切相关。这些结果表明, 上述免疫功能改变在胃癌的发生、发展中起重要作用, 但其潜在机制尚需进一步研究。

既往研究认为 Hp 感染可能会加速胃癌的进展^[18]。笔者行免疫组化法染色 Hp 菌体并计数, 发现 II 型胃腺癌 Hp 阳性表达率高于 I 型 ($P=0.039$), 单因素回归分析发现 Hp 阳性患者中位 OS、DFS 长于阴性且胃体癌和胃窦癌 II 型胃腺癌 Hp 阳性患者预后最好, 提示 Hp 感染可能通过影响 TAMs 浸润癌巢来改善肿瘤发展, 此结果与杜金耀^[9]不同, 原因可能是本研究区分不同部位且严格控制同一临床分期, 避免出现由于早期、晚期患者数量不均和不同部位胃腺癌患者预后本身存在差异。另外, 胃底贲门癌的 II 型患者太少无法进行预后分析, 后期需要进一步扩大样本。

本研究还发现 I 型胃腺癌患者感染 Hp 的数量与发生部位有关, 胃底贲门和胃体部阳性率更高, 可能原因: I 型胃窦癌为少数; Hp 定植部位上移。II 型胃腺癌患者 Hp 的阳性表达率在不饮酒者中更高 ($P<0.05$), 是因为酒精有抵抗 Hp 的作用^[19]。单因素回归分析发现肿瘤体积较小, 中位 OS、DFS 较长, 因为肿瘤体积的增加会压迫周围血管、神经, 继而诱发其他病变, 影响患者的生存时间。中性粒细胞高水平者的中位 OS 较长, 这一结论与 Zhang 等^[20]的观点一致。本研究发现 II 型 Hp 阳性胃体癌和胃窦癌患者的生存时间明显高于 I 型 Hp 阴性, 推测可能是胃内 Hp 的感染促进 TAMs 向癌巢内浸润进而杀伤肿瘤细胞。

总之, 本研究提示了肿瘤大小、TAMs 的浸润分型和 Hp 是否感染可能是 III 期胃腺癌的独立预后因素, 不同部位的 II 型胃腺癌的 Hp 感染可能促进 TAMs 的癌巢浸润, 抑制肿瘤的发展速度, 缓解患者的生

存压力, 但是具体机制需要后期更加深入的基础研究和临床研究来探讨 Hp 和 TAMs 之间的关系, 为胃腺癌的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4): 524
- [2] HORTON K M, FISHMAN E K. Current role of CT in imaging of the stomach[J]. Radiographics, 2003, 23(1): 75
- [3] SHEN Y, KANG H K, JEONG Y Y, et al. Evaluation of early gastric cancer at multidetector CT with multiplanar reformation and virtual endoscopy[J]. Radiographics, 2011, 31(1): 189
- [4] HENSON D E, DITTUS C, YOUNES M, et al. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type [J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(7): 765
- [5] XU Y D, SHANG J, LI M, et al. LncRNA DANCER accelerates the development of multidrug resistance of gastric cancer[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 2794
- [6] ZHENG H, LI J, WANG M, et al. Exhausting tumor associated macrophages with sialic acid-polyethyleneimine-cholesterol modified liposomal doxorubicin for enhancing sarcoma chemotherapy[J]. Int J Pharm, 2019, 558: 187
- [7] ZHOU Q, PENG R Q, WU X J, et al. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer[J]. J Transl Med, 2010, 8: 13
- [8] 李杰, 熊礼杭, 严洁. 幽门螺杆菌 Tipα 蛋白经激活 NF-κB 对巨噬细胞分泌细胞因子诱导机制分析[J]. 智慧健康, 2020, 6(9): 7
- [9] 杜金耀. 肿瘤相关性巨噬细胞浸润在幽门螺杆菌感染胃癌中的作用研究[D]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2015
- [10] ATANASOV G, HAU H M, DIETEL C, et al. Prognostic significance of macrophage invasion in hilar cholangiocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 790
- [11] ELLIOTT L A, DOHERTY G A, SHEAHAN K, et al. Human tumor-infiltrating myeloid cells: phenotypic and functional diversity[J]. Front Immunol, 2017, 8: 86
- [12] SUGIMURA K, MIYATA H, TANAKA K, et al. High infiltration of tumor-associated macrophages is associated with a poor response to chemotherapy and poor prognosis of patients undergoing neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer[J]. J Surg Oncol, 2015, 111(6): 752
- [13] ATANASOV G, DINO K, SCHIERLE K, et al. Immunologic cellular characteristics of the tumour microenvironment of hepatocellular carcinoma drive patient outcomes[J]. World J Surg Oncol, 2019, 17(1): 97
- [14] NI C, YANG L, XU Q, et al. CD68- and CD163-positive tumor infiltrating macrophages in non-metastatic breast cancer: a retrospective study and meta-analysis[J]. J Cancer, 2019, 10(19): 4463
- [15] WU S Q, XU R, LI X F, et al. Prognostic roles of tumor associated

(下转第 553 页)

- [25] 黄元夕. 2020 年美国临床肿瘤学会年会乳腺癌内分泌治疗重要内容解读[J]. 医学研究杂志, 2020, 49(10): 7
- [26] JURIC D, ISMAIL-KHAN R, CAMPONE M, et al. Abstract P3-14-01: Phase Ib/II study of ribociclib and alpelisib and letrozole in ER+, HER2-breast cancer; safety, preliminary efficacy and molecular analysis [J]. Cancer Res, 2016, 76 (4 Suppl): DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS15-P3-14-01
- [27] JONES R H, CASBARD A, CARUCCI M, et al. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial [J]. Lancet Oncol, 2020, 21(3): 345
- [28] PATEL H K, TAO N, LEE K M, et al. Elacestrant (RAD1901) exhibits anti-tumor activity in multiple ER+ breast cancer models resistant to CDK4/6 inhibitors [J]. Breast Cancer Res, 2019, 21(1): 146
- [29] DENG J, WANG E S, JENKINS R W, et al. CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T-cell activation [J]. Cancer Discov, 2018, 8(2): 216
- (2020-12-22 收稿)

(上接第 510 页)

- macrophages in bladder cancer: a system review and meta-analysis [J]. Oncotarget, 2018, 9(38): 25294
- [16] BARNARD M E, HECHT J L, RICE M S, et al. Anti-Inflammatory drug use and ovarian cancer risk by COX1/COX2 expression and infiltration of tumor-associated macrophages [J]. Cancer Epid Biom Prev, 2018, 27(12): 1509
- [17] ZHANG B, WANG Z, WU L, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57114
- [18] WALDUM H L, REHFELD J F. Gastric cancer and gastrin; on the interaction of Helicobacter pylori gastritis and acid inhibitory induced hypergastrinemia [J]. Scand J Gastroenterol, 2019, 54(9): 1118
- [19] XIA M, CHEN H, LIU S. The synergy of resveratrol and alcohol against Helicobacter pylori and underlying anti-Helicobacter pylori mechanism of resveratrol [J]. J Appl Microbiol, 2020, 128(4): 1179
- [20] ZHANG H, LIU H, SHEN Z, et al. Tumor-infiltrating neutrophils is prognostic and predictive for postoperative adjuvant chemotherapy benefit in patients with gastric cancer [J]. Ann Surg, 2018, 267(2): 311
- (2021-01-23 收稿)

(上接第 544 页)

- [41] CHEN Y, FU L L, WEN X, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(2): e1047
- [42] ZENG R, WANG X, ZHOU Q, et al. Icaritin protects rotenone-induced neurotoxicity through induction of SIRT3 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 379: 114639
- [43] GERTZ M, FISCHER F, NGUYEN G T, et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(30): E2772
- [44] ALHAZZAZI T Y, KAMARAJAN P, XU Y, et al. A novel sirtuin-3 inhibitor, LC-0296, inhibits cell survival and proliferation, and promotes apoptosis of head and neck cancer cells [J]. Anticancer Res, 2016, 36(1): 49
- [45] CHEN M L, ZHU X H, RAN L, et al. Trimethylamine-N-Oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway [J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(11): e002238
- [46] WANG L J, YC L, HUANG C H, et al. Non-mitotic effect of albendazole triggers apoptosis of human leukemia cells via SIRT3/ROS/p38 MAPK/TTP axis-mediated TNF- α upregulation [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 162: 154
- [47] GORSKA-PONIKOWSKA M, KUBAN-JANKOWSKA A, Eisler S, et al. 2-Methoxyestradiol affects mitochondrial biogenesis pathway and succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit a in osteosarcoma cancer cells [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2018, 15(1): 73
- (2020-11-14 收稿)