



· 论 著 ·

结直肠癌中LC3与不同表型肿瘤相关巨噬细胞的相关性及其临床意义

范守仁^{1,2}, 吴淑华³, 李扬扬³, 许晓阳³, 何 双³, 温菲菲³, 刘 柳³, 郭宁杰³, 贾真真³

1. 滨州医学院临床医学院, 山东 烟台 264003;
2. 滨州市第二人民医院病理科, 山东 滨州 256800;
3. 滨州医学院附属医院病理科, 山东 滨州 256600

[摘要] 背景与目的: 肿瘤免疫逃逸成为免疫治疗的难点, 而结直肠癌中过度自噬可引起肿瘤微环境中抗原物质的增加, 进而诱导抗肿瘤免疫。通过检测自噬相关因子LC3、不同表型肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 及其分泌产物在结直肠癌中的表达, 探讨其相关性及其临床意义。方法: 采用免疫组织化学EnVision法检测滨州医学院附属医院病理科及滨州市第二人民医院病理科2013年1月—2014年12月存档的结直肠癌样本中LC3、CD16、CD163、IL-1、IL-10、TNF- α 、TGF- β 的表达, 计数CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞及CD68⁺、CD16⁺、CD163⁺巨噬细胞, 并分析其与临床病理学特征及预后的相关性。结果: 自噬相关因子LC3、CD16、CD163在结直肠癌组织中的表达均高于癌旁正常黏膜组织 ($P<0.05$)。LC3与M1型TAM及其在巨噬细胞中的占比均呈正相关, 而与M2型TAM及其在巨噬细胞中的占比均呈负相关 ($P<0.05$)。LC3、M1型TAM与IL-1、TNF- α 的表达及CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞的浸润量呈正相关; 而M2型TAM与IL-10、TGF- β 的表达呈正相关, 而与CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞的浸润量呈负相关 ($P<0.05$)。LC3、CD16、CD163与肿瘤直径、浸润深度及淋巴结转移密切相关 ($P<0.05$)。Kaplan-Meier及COX回归模型分析显示, LC3、CD16、CD163及淋巴结转移与结直肠癌患者预后密切相关, 是结直肠癌预后的独立危险因素。结论: 结直肠癌中LC3的表达增加与M1型TAM极化、肿瘤进展密切相关, 提示患者预后不良。结直肠癌中自噬水平的增高可诱导巨噬细胞募集并向M1型TAM极化, 进而诱导免疫细胞聚集, 因此调控自噬可成为诱导结直肠癌中TAM极化、增强抗肿瘤免疫的新思路。

[关键词] 结直肠癌; 自噬; 肿瘤相关巨噬细胞; LC3; 肿瘤微环境

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.11.001

中图分类号: R735.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)11-0849-09

The correlation between LC3 and tumor-associated macrophages in colorectal cancer and its clinical significance

FAN Shouren^{1,2}, WU Shuhua³, LI Yangyang³, XU Xiaoyang³, HE Shuang³, WEN Feifei³, LIU Liu³, GUO Ningjie³, JIA Zhenzhen³ (1. Clinical College, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong Province, China; 2. Department of Pathology, Binzhou Second People's Hospital, Binzhou 256800, Shandong Province, China; 3. Department of Pathology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong Province, China)

Correspondence to: WU Shuhua E-mail: wsh6108@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Tumor immune escape has become the difficulty of immunotherapy. In colorectal cancer, active autophagy can increase antigen in tumor microcirculation and then induce anti-tumor immunity. This study aimed to detect the expressions of LC3, tumor-associated macrophage (TAM) and their products in colorectal cancer, and to explore the influence of LC3 on tumor microenvironment and its clinical significance. **Methods:** Immunohistochemical analysis was used to detect the expressions of LC3, CD16, CD163, CD4, CD8, CD20, CD68, IL-1, IL-10, TNF- α and TGF- β in colorectal cancer samples archived in the department of pathology, Binzhou Medical University Hospital and department of pathology, Binzhou Second People's Hospital from Jan. 2013 to Dec. 2014, and their correlations with clinicopathological features and prognosis were analyzed. **Results:** The expressions of LC3, CD16 and CD163 were higher in colorectal cancer than in adjacent normal colon tissues ($P<0.05$). The expression of LC3 was positively correlated with the infiltration of M1 TAM, but negatively correlated with the infiltration of M2 TAM ($P<0.05$). The expressions of LC3 and M1 TAM were positively correlated with IL-1, TNF- α and the infiltration of CD4⁺, CD8⁺

基金项目: 国家自然科学基金 (81772637)。

通信作者: 吴淑华 E-mail: wsh6108@126.com

and CD20⁺ lymphocytes, while the expression of M2 TAM was positively correlated with IL-10 and TGF- β , but negatively correlated with the infiltration of CD4⁺, CD8⁺ and CD20⁺ lymphocytes ($P < 0.05$). The expressions of LC3, CD16 and CD163 were closely related to tumor size, invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). Kaplan-Meier and COX regression model analyses showed that the expression levels of LC3, CD16 and CD163 and lymph node metastasis were closely related to the prognosis of colorectal cancer patients, and were independent risk factors for the prognosis of colorectal cancer. **Conclusion:** The increase of autophagy in colorectal cancer can induce macrophage recruitment and polarization of TAM into M1 phenotype, and then induces immune cell aggregation. Regulating autophagy can be a new way to induce polarization of TAM and enhance anti-tumor immunity in colorectal cancer.

[Key words] Colorectal cancer; Autophagy; Tumor-associated macrophage; LC3; Tumor microenvironment

肿瘤的发生、发展与其所在的微环境密切相关, 肿瘤免疫微环境的改变可通过调控细胞因子释放、改变肿瘤血管生成等多种途径影响肿瘤的发生、发展、浸润及转移等^[1]。肿瘤微环境是由多种细胞及基质等相互作用形成的网络性生态系统^[2]。其中, 免疫细胞是免疫微环境中极为重要的部分, 免疫细胞的类型、浸润位置及密度在很大程度上反映肿瘤的免疫状态。在众多的免疫细胞中肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 及其产物在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要作用。研究显示, TAM的数量和功能因肿瘤细胞或间质细胞的改变而极化为不同的表型, 从而发挥不同作用^[3]。因此, 有效募集TAM并诱导其向具有抗肿瘤能力的TAM极化有可能成为增强肿瘤免疫的新思路。近期研究表明, 自噬在维持肿瘤细胞能量代谢、促进肿瘤细胞休眠和免疫逃逸、调控基质细胞分化等方面发挥重要作用^[4]。本课题组前期研究显示, 结直肠癌中的自噬水平与肿瘤相关抗原及周围淋巴细胞、CD68阳性巨噬细胞浸润量有关^[5]。本研究通过检测自噬相关因子LC3、M1型TAM标志物CD16及其分泌物IL-1、TNF- α 以及M2型TAM标志物CD163及其分泌物IL-10、TGF- β 的表达, 计数肿瘤微环境中CD16⁺、CD163⁺、CD68⁺细胞及CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞的数量, 探讨自噬水平与不同表型TAM及免疫细胞的关系及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

收集滨州医学院附属医院病理科及滨州市第二人民医院病理科2013年1月—2014年12月存

档的具有完整随访资料的结直肠癌标本。入选标准: 根据2019版世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 消化系统肿瘤分类标准, 诊断为原发性结直肠癌; 首次手术治疗; 术前未进行任何放化疗。排除标准: 术前合并溃疡性结肠炎、克罗恩病或其他炎性肠病; 患有系统性红斑狼疮等自身免疫疾病或长期口服免疫抑制剂; 术后30 d内死亡及非肿瘤性死亡。每年进行电话或门诊随访, 直至2019年12月或患者死亡, 失访者不予入组。

1.1.2 试剂

LC3、CD16、CD163、CD4、CD8、CD20、CD68、IL-1、IL-10、TNF- α 及TGF- β 抗体均购自美国Abcam公司, 羊抗兔/鼠二抗及免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 H-E切片初筛

调取滨州医学院附属医院病理科存档入选标本的所有H-E切片, 由两名资深病理科医师采用双盲法重新阅片诊断。每例患者的肿瘤组织切片为4~6张, 选取淋巴细胞浸润最多的相应石蜡组织进行连续切片。

1.2.2 免疫组织化学

按照免疫组织化学EnVision法染色: 将切片脱蜡至水, 高压热修复抗原, 3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶, 根据美国Abcam公司推荐浓度稀释并加入一抗, 4 $^{\circ}C$ 过夜, 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗涤后加二抗37 $^{\circ}C$ 温育30 min, 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 苏木精复染, 分化, 脱水透明, 中性树胶封片。采用美国Abcam公司提供的阳性组织作为阳性对照, 用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 免疫组织化学结果判定标准

LC3主要表达于肿瘤细胞的细胞膜或细胞质，以出现黄色或棕黄色颗粒为阳性标志。选取10个阳性细胞数最多的高倍镜视野，根据细胞染色强度和阳性细胞比例判定实验结果：细胞无染色为0分，淡黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为3分；阳性细胞数≤5%为0分，6%~25%为1分，26%~50%为2分，51%~75%为3分，>75%为4分。将两项评分结果相乘，≥4分判为阳性。

CD16、CD163及CD68主要表达于巨噬细胞的细胞膜和(或)细胞质，CD4、CD8、CD20主要表达于淋巴细胞的细胞膜和(或)细胞质，以细胞膜出现棕黄色和(或)细胞质内出现棕黄色为阳性标志。IL-1、IL-10、TNF-α及TGF-β表达于间质细胞的细胞膜和细胞质，以细胞质或细胞膜内出现棕黄色为阳性标志，肿瘤细胞阳性不计入阳性细胞数。400倍镜下选取阳性密度最高的5个视野，计数阳性细胞数，取平均值。计数高

于平均值者为阳性，低于平均值者为阴性。

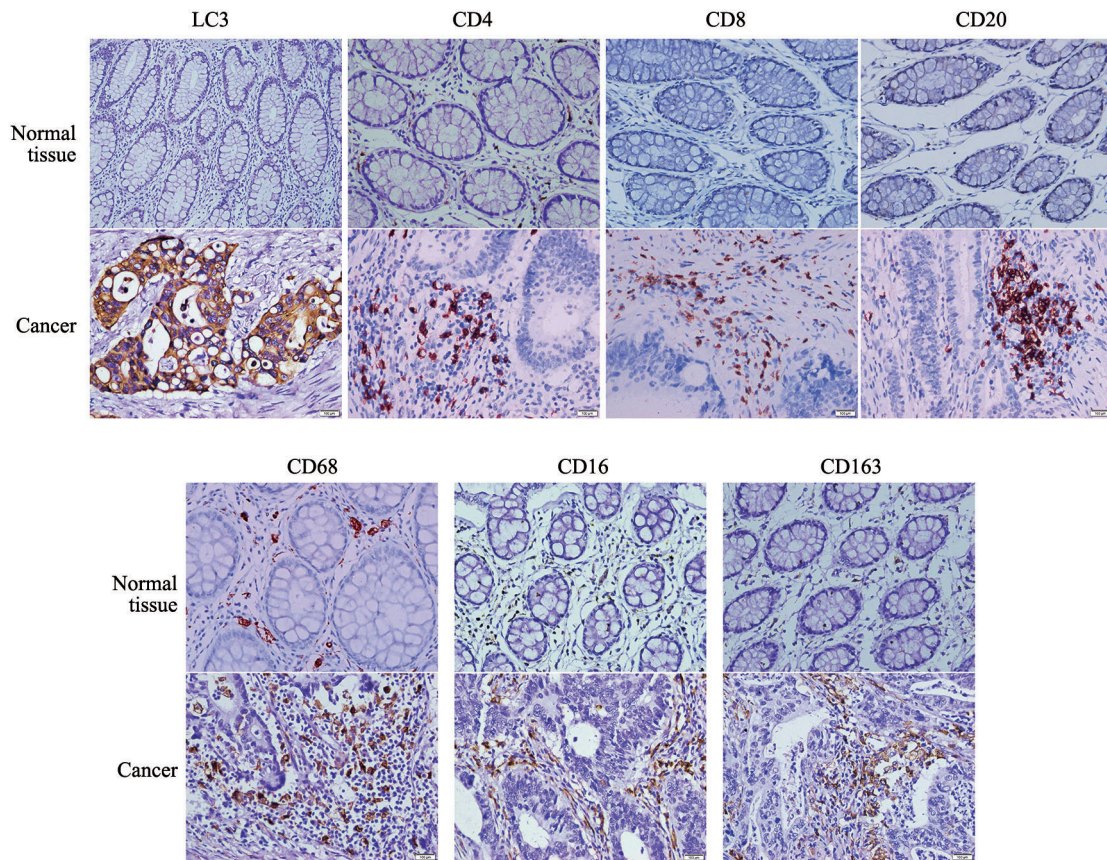
1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0软件进行数据分析。组间比较及蛋白表达与临床病理学参数之间的相关性采用χ²检验；蛋白表达的相关性用Spearman相关性分析；生存分析采用Kaplan-Meier法，并以log-rank法检验；采用COX比例风险回归模型进行多因素生存分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌与正常黏膜中各因子的表达情况

免疫组织化学检测结果显示，自噬相关因子LC3、M1型TAM标志物CD16及M2型TAM标志物CD163在结直肠癌组织中的表达均高于正常黏膜组织；结直肠癌组织中CD4+、CD8+、CD20+淋巴细胞及CD68+巨噬细胞的浸润量明显高于正常黏膜，差异均有统计学意义(P均<0.05, 图1, 表1)。



(Immunohistochemistry, ×400)

图1 结直肠癌中各因子的表达情况

Fig. 1 The expression of marker in colorectal cancer

表 1 结直肠癌与正常黏膜中各因子表达的情况

Tab. 1 The expression of marker in colorectal cancer and normal tissue

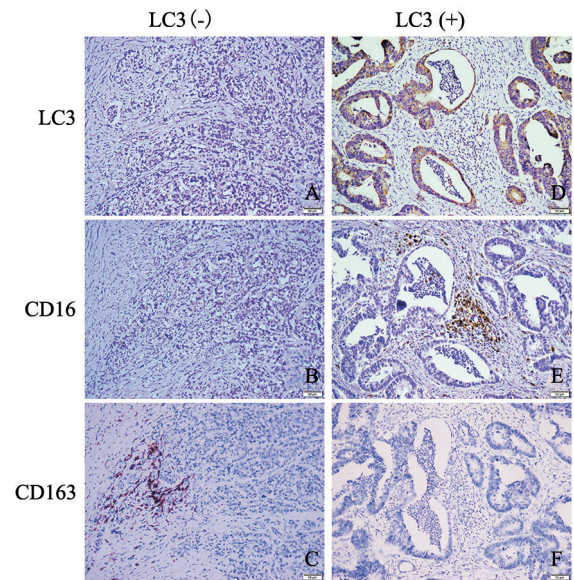
Item	n	[n (%)]						
		LC3	CD4	CD8	CD20	CD68	CD16	CD163
Normal	133	35 (26.3)	21 (15.8)	24 (18.0)	27 (20.3)	18 (13.5)	21 (15.8)	13 (9.8)
Tumor	133	87 (65.4)*	74 (55.6)*	72 (54.1)*	78 (58.6)*	87 (65.4)*	39 (29.3)*	86 (64.7)*

*: $P < 0.05$

2.2 结直肠癌中自噬相关因子LC3与肿瘤微环境中TAM的数量及占比的关系

根据LC3的免疫组织化学检测结果将结直肠癌分为LC3⁺组和LC3⁻组。结果显示, LC3⁺组中CD16的表达均高于LC3⁻组, 而CD163在LC3⁺组中的表达均低于LC3⁻组 ($P < 0.05$)。Spearman相关分析显示, LC3表达水平与M1型TAM呈正相关, 而与M2型TAM呈负相关 ($P < 0.05$, 图2, 表2)。

本研究在LC3⁺组及LC3⁻组中分别计数CD68⁺巨噬细胞、CD16⁺M1型TAM、CD163⁺M2型TAM阳性细胞数, 计算不同表型TAM在巨噬细胞中的占比。结果显示, LC3⁺组中M1型TAM在巨噬细胞中的占比为58.5% (62/106), 高于M2型TAM (39/106, 36.8%), 而LC3⁻组中M1型TAM在巨噬细胞中的占比为15.1% (11/73), 低于M2型TAM (58/73, 79.5%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



(Immunohistochemistry, ×200)

图 2 结直肠癌中自噬相关因子LC3及不同表型TAM的关系

Fig. 2 The relationship of LC3 and TAM with different phenotypes in colorectal cancer

A-B: LC3 and CD16 were negative in LC3⁻ group; C: CD163 was positive in LC3⁻ group; D-E: LC3 and CD16 were positive in LC3⁺ group; F: CD163 was negative in LC3⁺ group

表 2 结直肠癌组织中自噬相关因子LC3与不同表型TAM的相关性

Tab. 2 Correlation between LC3 and TAM in colorectal cancer

Item	n	CD16		r value	P value	CD163		r value	P value
		-	+			-	+		
LC3				0.364				-0.471	0.001*
-	46	43	3			2	44		
+	87	51	36			45	42		

*: $P < 0.05$

2.3 结直肠癌中自噬相关因子LC3及不同表型TAM与IL-1、TNF- α 、IL-10、TGF- β 的相关性

进一步根据CD16、CD163免疫组织化学检测的结果, 将其分为阳性组与阴性组。结果显示, LC3⁺组和CD16⁺组中IL-1、TNF- α 的表达水平均高于LC3⁻组和CD16⁻组, 而CD163⁺组中IL-

10、TGF- β 的表达水平高于CD163⁻组, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。Spearman相关分析显示, LC3、CD16均与IL-1、TNF- α 的表达呈正相关; CD163则与IL-10、TGF- β 的表达呈正相关 ($P < 0.05$); 而LC3与IL-10、TGF- β 的表达无显著相关性 ($P > 0.05$, 表3)。

表3 结直肠癌中自噬相关因子LC3、不同表型TAM与其产物的相关性

Tab. 3 Correlation of LC3, TAM with different phenotypes and their products in colorectal cancer

Item	n	IL-1		r value	P value	IL-10		r value	P value	TNF-α		r value	P value	TGF-β		r value	P value
		-	+			-	+			-	+			-	+		
LC3				0.238	0.006*			0.100	0.252			0.248	0.004*			0.091	0.299
-	46	36	10			20	26			36	10			15	31		
+	87	47	40			29	58			46	41			21	66		
CD16				0.489	0.001*			-0.056	0.532			0.443	0.001*			-0.165	0.057
-	94	73	21			33	61			71	23			21	73		
+	39	10	29			16	23			11	28			15	24		
CD163				-0.141	0.106			0.185	0.033*			-0.161	0.064			0.293	0.001*
-	47	25	22			23	24			24	23			21	26		
+	86	58	28			26	60			58	28			15	71		

*: P<0.05

2.4 结直肠癌中不同表型TAM与CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞浸润的相关性

CD16⁺组中CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞浸润阳性率高于CD16⁻组，CD163⁺组中CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞浸润阳性率低于于CD163⁻

组，差异有统计学意义（P<0.05，表4）。Spearman相关分析显示，M1型TAM的表达与CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞浸润均呈正相关，而M2型TAM的表达与CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞浸润均呈负相关（P<0.05，表4）。

表4 结直肠癌中不同表型TAM与CD4⁺、CD8⁺及CD20⁺淋巴细胞浸润的相关性

Tab. 4 Correlation of TAM with CD4⁺, CD8⁺ and CD20⁺ lymphocyte infiltration in colorectal cancer

Item	n	CD4 ⁺	r value	P value	CD8 ⁺	r value	P value	CD20 ⁺	r value	P value	[n(%)]
CD16			0.176	0.042*		0.195	0.024*		0.206	0.018*	
-	94	47 (50.0)			45 (47.9)			49 (52.1)			
+	39	27 (69.2)			27 (69.2)			29 (74.4)			
CD163			-0.185	0.033*		-0.175	0.043*		-0.238	0.006*	
-	47	32 (68.1)			31 (66.0)			35 (74.5)			
+	86	42 (48.8)			41 (47.7)			43 (50.0)			

*: P<0.05

2.5 结直肠癌中LC3、CD16、CD163的表达与临床病理学特征的相关性

LC3、CD16、CD163的表达与肿瘤直径、浸润深度及淋巴结转移密切相关。其中LC3与肿瘤直径呈正相关，LC3、CD16均与肿瘤浸润深度、淋巴结转移呈负相关，CD163与肿瘤浸润深度及淋巴结转移呈正相关，差异均有统计学意义（P<0.05，表5）。

2.6 LC3、CD16、CD163与结肠癌患者预后的相关性分析

133例结直肠癌患者的中位生存时间为60个

月，平均5年生存率为62.11%。Kaplan-Meier分析显示，LC3、CD16、CD163、TNF-α、IL-1及淋巴结转移与结直肠癌患者预后密切相关（P<0.05，图3）。CD163表达阳性患者5年生存率为34.61%，明显低于阴性患者（65.51%），而LC3、CD16表达阳性患者5年生存率分别为65.13%、66.67%，明显高于阴性患者（29.49%、30.85%，P<0.05，图3）。COX回归模型分析显示，LC3、CD16、CD163及淋巴结转移是结直肠癌预后的独立危险因素（P<0.05，表6）。

表 5 LC3、CD16及CD163的表达与结直肠癌临床病理学特征的相关性

Tab. 5 Correlation between the expressions of LC3, CD16 and CD163 and clinicopathological features in colorectal cancer

Variables	n	LC3			CD16			CD163		
		+	r value	P value	+	r value	P value	+	r value	P value
Age/year			-0.055	0.527		0.008	0.923		-0.013	0.885
<60	52	38			15			14		
≥60	81	55			24			63		
Gender			0.008	0.923		0.010	0.909		0.078	0.369
Male	74	52			22			60		
Female	59	41			17			44		
Tumor size D/cm			0.248	0.004*		0.105	0.228		-0.037	0.673
<5	55	31			13			44		
≥5	78	62			26			60		
Differentiation			0.043	0.603		0.136	0.102		-0.036	0.668
Well	19	12			4			17		
Moderately	79	56			21			59		
Poorly	35	25			14			28		
Pathological pattern			0.106	0.225		0.113	0.195		-0.072	0.407
Tubular adenocarcinoma	108	73			29			86		
Mucinous adenocarcinoma	25	20			10			18		
Infiltration			-0.201	0.021*		-0.324	0.001*		0.223	0.010*
T _{is} -T ₁	10	7			4			7		
T ₂	44	35			22			20		
T ₃	79	45			13			59		
Lymph node metastasis			-0.194	0.025*		-0.371	0.001*		0.264	0.002*
No	64	48			30			33		
Yes	69	39			9			53		

*: P<0.05

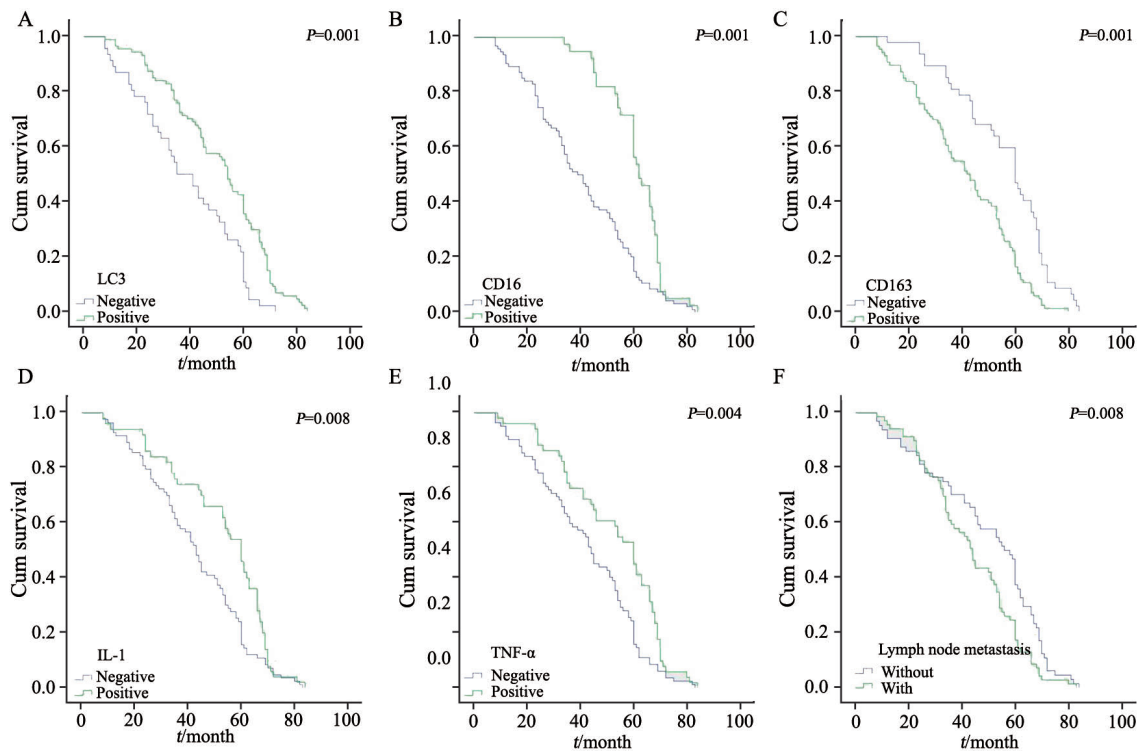


图 3 结直肠癌患者预后生存曲线

Fig. 3 Survival curve in colorectal cancer patients

表6 影响结直肠癌患者预后多因素生存分析

Tab. 6 Multivariate analysis of prognosis in patients with colorectal cancer

Item	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>df</i>	Exp (<i>B</i>)	95.0% CI		<i>P</i> value
						Lower	Upper	
LC3	-0.851	0.365	5.421	1	0.427	0.209	0.874	0.020*
CD16	-0.693	0.231	8.974	1	0.500	0.318	0.787	0.003*
CD163	0.821	0.264	9.650	1	2.274	1.354	3.818	0.002*
CD68	0.507	0.274	3.432	1	1.661	0.971	2.842	0.064
IL-1	0.098	0.322	0.093	1	1.103	0.587	2.074	0.761
IL-10	0.182	0.213	0.732	1	1.200	0.790	1.823	0.392
TNF- α	-0.138	0.337	0.167	1	0.871	0.450	1.686	0.683
TGF- β	-0.065	0.245	0.070	1	0.791	0.937	0.580	1.514
Age	-0.124	0.202	0.378	1	0.883	0.594	1.312	0.539
Gender	0.021	0.201	0.011	1	1.021	0.689	1.513	0.917
Tumor size	0.049	0.202	0.060	1	1.051	0.707	1.561	0.807
Differentiation	0.031	0.181	0.029	1	1.031	0.723	1.470	0.866
Pathological pattern	0.242	0.277	0.758	1	1.273	0.739	2.193	0.384
Infiltration	-0.103	0.157	0.427	1	0.902	0.663	1.228	0.514
Lymph node metastasis	0.597	0.215	7.707	1	1.817	0.450	1.686	0.005*

*: $P < 0.05$

3 讨 论

TAM是肿瘤局部免疫微环境的重要组成部分,是一种平均寿命短且不能在肿瘤组织中增殖的细胞,需在肿瘤生长和进展过程中持续募集补充^[3]。TAM具有极化不稳定性,能被肿瘤细胞募集、调控而极化为不同表型。TAM的前体细胞为肿瘤组织中的巨噬细胞,经不同的细胞因子诱导极化为经典活化的巨噬细胞(M1型)和替代性活化的巨噬细胞(M2型)。M1型TAM负责提呈肿瘤特异性抗原,同时增强抗肿瘤免疫反应^[6],而M2型TAM抗原提呈能力较弱,并可通过多种途径促进肿瘤的生长、侵袭和转移^[7]。Zhou等^[8]的研究证明,降低胶质母细胞瘤中的M2型TAM表达,可抑制肿瘤生长。近年来多项研究表明,结直肠癌中M2型TAM明显增高,预后较差,在结肠癌细胞株中诱导TAM向M1型极化从而发挥抗癌作用^[9-10]。本研究显示,结直肠癌中TAM的浸润量高于正常黏膜组织,其中M2型TAM的浸润量高于M1型TAM,且与患者预后呈负相关,而M1型TAM的高表达有利于患者预后。这与既往的研究一致,提示结直肠癌中的TAM以M2型极化为主,不同表型TAM

在肿瘤中的浸润量可能成为影响患者预后的危险因素。然而,有关肿瘤细胞及周围微环境对TAM极化的影响及其效应尚缺乏进一步研究。因此,深入研究影响TAM极化的相关因素,有效募集巨噬细胞并诱导巨噬细胞向M1型巨噬细胞极化,可能成为增强肿瘤免疫及肿瘤靶向治疗的新途径。

近期有研究表明,M1型与M2型TAM之间可相互转化^[11-12]。而激活PI3K/mTOR信号转导通路可促进巨噬细胞向M2型极化,抑制PI3K/mTOR通路则致使其向M1型极化^[13-14]。众所周知,PI3K/mTOR是细胞生长增殖的重要信号转导通路,也是调控自噬的主要通路^[15]。自噬是广泛发生于真核细胞内的重要生物学现象,近年来研究发现,在胃癌^[16]、肺癌^[17]及子宫内膜癌^[18]等多种实体肿瘤中存在自噬的异常激活现象。本课题组的前期研究表明,结直肠癌中的自噬水平不仅与肿瘤发生、发展密切相关,也与肿瘤相关抗原及周围CD4⁺、CD8⁺、CD68⁺淋巴细胞浸润量有关^[5, 19]。由此可见,在肿瘤细胞和肿瘤微环境(如基质细胞、内皮细胞和免疫细胞)中自噬的作用极其复杂。然而,有关肿瘤自噬水平与肿瘤微环境中不同免疫表型TAM的关系,尤其是对巨噬细胞极化的影响报道罕见。本研究

结果显示, LC3⁺组中M1型TAM的数量高于M2型TAM, 而在LC3⁻组中, M1型TAM的数量低于M2型TAM。同时, 本研究结果显示, 结直肠癌的自噬水平不同, 不同表型的TAM占比不同, 提示肿瘤自噬水平与TAM的极化具有相关性。结合前期研究我们推测, 结直肠癌自噬水平的升高, 可引起肿瘤细胞表面及周围微环境中抗原物质的增加, 进而招募巨噬细胞聚集并向M1型TAM极化, 参与抗原提呈, 募集淋巴细胞, 以增强抗肿瘤免疫反应。同时, 本实验中LC3⁺组中M1型TAM所占巨噬细胞比例高于M2型TAM所占比例的结果提示, 自噬异常激活时可引起M2型向M1型TAM的再极化, 使肿瘤微环境中M1型TAM所占巨噬细胞比例升高, 从而进一步增强抗肿瘤免疫反应。因此, 结直肠癌的自噬水平及肿瘤微环境中不同极化表型的TAM占比, 在一定程度上影响患者的预后。积极促进肿瘤微环境中TAM向M1型极化、募集和再极化, 对于增强肿瘤免疫反应, 抑制肿瘤进展可能具有重要的临床意义。

肿瘤免疫包括机体对肿瘤的非特异性免疫和特异性免疫两方面, 其中细胞免疫是肿瘤特异性免疫的重要部分。T淋巴细胞、NK细胞和巨噬细胞等对肿瘤细胞均具杀伤作用, 其主要通过所产生的细胞因子发挥作用。研究表明, M1型TAM高表达MHC-I类和MHC-II类分子, 提呈抗原的同时可分泌促炎因子, 如IL-1、IL-12、IL-23、TNF- α 等细胞因子, 进而促进抗肿瘤免疫^[7, 20]。Wu等^[21]研究发现, IL-1 β 参与乳腺癌抗肿瘤免疫反应, 并抑制乳腺癌转移。Ray等^[22]的研究表明, IL-1 β 和TNF- α 的产生参与小鼠结直肠癌的生长、侵袭和转移。M2型TAM则可释放TGF- β 、IL-10等免疫抑制因子, 通过抑制T细胞、B细胞的增殖, 参与调节肿瘤免疫逃逸^[23]。Martínez-Campos等^[24]研究发现, 胃癌中TGF- β 、IL-10高表达可降低肿瘤细胞中的MHC-I类抗原, 并降低细胞毒性T淋巴细胞介导的免疫应答。然而, 有关肿瘤微环境中自噬水平改变能否影响不同表型TAM所产生的细胞因子及其效应尚未见报道。本研究结果显示, 结直肠癌中LC3的表达水平及M1型TAM均与IL-1、TNF- α 及CD4⁺、CD8⁺、CD20⁺淋巴细胞浸润呈正相关,

M2型TAM则与其分泌产物IL-10、TGF- β 呈正相关, 而与淋巴细胞浸润呈负相关。提示结直肠癌中自噬水平不仅可影响不同表型TAM的极化, 同时可影响其分泌产物的表达, 在肿瘤特异性免疫方面发挥重要作用。推测异常激活的自噬不仅可增加M1型TAM的极化及抗原提呈能力, 同时其产物IL-1及TNF- α 可刺激CD4⁺、CD8⁺T细胞活化, 促进CD20⁺B细胞增殖和分泌抗体, 增强抗肿瘤细胞的免疫作用。反之, 低水平自噬环境中, M2型TAM增加, 其分泌产物IL-10及TGF- β 则可抑制细胞免疫功能, 促进肿瘤免疫逃逸。因此, 有效地调节肿瘤细胞自噬水平可能成为激活肿瘤免疫反应的新途径。

近年来, TAM与肿瘤的生物行为及预后的关系成为新的关注点。Chen等^[25]的研究表明, 肿瘤组织中M2型巨噬细胞高表达胰腺癌患者较低表达患者的生存率更低。Qiu等^[26]的研究表明, 乳腺肿瘤中M2型TAM高浸润量与患者预后不良相关, 其可能的机制是由于M2型TAM抑制CD8⁺T细胞功能、降解细胞外基质、促进血管生成并抑制吞噬功能。M2型TAM高表达还与肿瘤耐药及预后不良相关^[27]。本研究结果显示, LC3、CD16、CD163的表达与肿瘤直径、浸润深度及淋巴结转移密切相关。Kaplan-Meier及COX回归模型分析表明, LC3、CD16及CD163是结直肠癌预后的独立危险因素。提示结直肠癌中自噬活性改变了肿瘤相关巨噬的极化状态, 促进了M1型TAM的募集, 可增加对肿瘤性抗原的提呈作用, 同时促进其分泌IL-1、TNF- α 等促炎因子, 进而诱导淋巴细胞聚集, 诱发抗肿瘤免疫效应, 在一定程度上抑制肿瘤的进展, 延长肿瘤患者存活时间。而M2型TAM大量聚集则促进肿瘤免疫逃逸, 影响患者预后。因此, 检测结直肠癌中自噬相关因子及不同表型TAM标志物对判断结直肠癌患者的预后具有重要参考价值, 可作为评估结直肠癌患者预后的潜在分子标志物。

总之, 结直肠癌中过度自噬可引起肿瘤微环境中抗原物质的增加, 进而引起巨噬细胞募集并向M1型TAM极化, 从而诱导淋巴细胞浸润以增强抗肿瘤免疫反应。同时过度自噬可减少M2型TAM极化, 进一步避免肿瘤免疫逃逸, 以增强抗

肿瘤免疫治疗的效果。因此,深入研究自噬水平的改变与不同表型TAM的相关性及其分子机制,对于判断肿瘤预后以及探索结直肠癌免疫治疗新靶点具有重要意义。然而,本研究仅对各因子蛋白水平的变化及相关性进行了初步探讨,仍需增加样本量并进一步开展体外实验及动物实验,以揭示其功能及分子机制。

[参 考 文 献]

- [1] RUFFELL B, COUSSENS L M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 462–472.
- [2] DI CARO G, CASTINO G F, BERGOMAS F, et al. Tertiary lymphoid tissue in the tumor microenvironment: from its occurrence to immunotherapeutic implications [J]. *Int Rev Immunol*, 2015, 34(2): 123–133.
- [3] CORTEZ R V, ETZRODT M, NEWTON A, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(7): 2491–2496.
- [4] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528–542.
- [5] 刘梦瑶, 吴淑华, 温菲菲, 等. 结直肠癌中LC3与CD4⁺、CD8⁺、CD68⁺免疫细胞浸润的相关性及其临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2018, 34(2): 124–131.
LIU M Y, WU S H, WEN F F, et al. Correlation of LC3 and CD4⁺, CD8⁺ and CD68⁺ cell infiltration in colorectal cancer and its clinical significance [J]. *Chin J Clin Exp Pathol*, 2018, 34(2): 124–131.
- [6] VERRECK F A, DE BOER T, LANGENBERG D M, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(13): 4560–4565.
- [7] SOUSA S, MÄÄTTÄ J. The role of tumour-associated macrophages in bone metastasis [J]. *J Bone Oncol*, 2016, 5(3): 135–138.
- [8] ZHOU W C, KE S Q, HUANG Z, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(2): 170–182.
- [9] HUANG Y J, YANG C K, WEI P L, et al. Ovatodiolide suppresses colon tumorigenesis and prevents polarization of M2 tumor-associated macrophages through YAP oncogenic pathways [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 60.
- [10] CHENG Y, ZHU Y, XU W F, et al. PKC α in colon cancer cells promotes M1 macrophage polarization via MKK3/6–P38 MAPK pathway [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(8): 1017–1029.
- [11] LAVIRON M, BOISSONNAS A. Ontogeny of tumor-associated macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1799.
- [12] YUAN R F, LI S F, GENG H, et al. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 30–37.
- [13] CHEN W, MA T, SHEN X N, et al. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2–mTOR pathway [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6): 1363–1372.
- [14] SOUZA-MOREIRA L, SOARES V C, DIAS S D S G, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate lipid metabolism and lipid droplet biogenesis via AKT/mTOR–PPAR γ signalling in macrophages [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 20304.
- [15] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407: 153–189.
- [16] QIAN H R, YANG Y. Functional role of autophagy in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 17641–17651.
- [17] LIU G B, PEI F, YANG F Q, et al. Role of autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): E367.
- [18] ERITJA N, CHEN B J, RODRÍGUEZ-BARRUECO R, et al. Autophagy orchestrates adaptive responses to targeted therapy in endometrial cancer [J]. *Autophagy*, 2017, 13(3): 608–624.
- [19] WU S H, SUN C B, LI Y Y, et al. Autophagy-related genes Raptor, Rictor, and Beclin1 expression and relationship with multidrug resistance in colorectal carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2015, 46(11): 1752–1759.
- [20] WANG F L, ZHANG S, JEON R, et al. Interferon gamma induces reversible metabolic reprogramming of M1 macrophages to sustain cell viability and pro-inflammatory activity [J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 303–316.
- [21] WU T C, XU K L, MARTINEK J, et al. IL1 receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(18): 5243–5258.
- [22] RAY A L, BERGGREN K L, RESTREPO CRUZ S, et al. Inhibition of MK2 suppresses IL-1 β , IL-6, and TNF- α -dependent colorectal cancer growth [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(8): 1702–1711.
- [23] JANJI B, VIRY E, MOUSSAY E, et al. The multifaceted role of autophagy in tumor evasion from immune surveillance [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 17591–17607.
- [24] MARTÍNEZ-CAMPOS C, TORRES-POVEDA K, CAMORLINGA-PONCE M, et al. Polymorphisms in IL-10 and TGF- β gene promoter are associated with lower risk to gastric cancer in a Mexican population [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 453.
- [25] CHEN S J, ZHANG Q B, ZENG L J, et al. Distribution and clinical significance of tumour-associated macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma: a retrospective analysis in China [J]. *Curr Oncol*, 2015, 22(1): e11–e19.
- [26] QIU S Q, WAAIJER S J H, ZWAGER M C, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: innocent bystander or important player? [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 70: 178–189.
- [27] 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.

(收稿日期: 2020-07-13 修回日期: 2020-09-07)