

口腔鳞癌中 MIF 的表达与巨噬细胞浸润的相关性*

戴泰鸣¹, 宋宇峰^{2**}, 马洪², 冯红超¹, 任晓敏¹

(1. 贵阳市口腔医院 预防科, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵阳医学院附院 口腔颌面外科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)的表达和巨噬细胞的浸润在口腔鳞癌的侵袭和转移中的作用及相互关系。方法: 采用免疫组化 SABC 法分别检测 MIF 和 CD68(标记巨噬细胞)在 42 例口腔鳞癌和 10 例口腔正常组织的表达情况, 观察 MIF 表达与巨噬细胞计数之间的关系, 并观察 MIF 阳性表达率及巨噬细胞计数在口腔鳞癌有无淋巴结转移患者及不同 TNM 分期患者的中的差异。结果: MIF 的表达水平和巨噬细胞计数在口腔鳞癌中均显著高于正常组($P < 0.01$), 肿瘤组织中 MIF 的表达与巨噬细胞计数之间呈正相关关系($r = 0.542, P < 0.01$), MIF 阳性表达率及巨噬细胞计数在口腔鳞癌有无淋巴结转移患者及不同 TNM 分期患者中差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: MIF 和巨噬细胞可能在口腔鳞癌的侵袭及转移中发挥重要作用, 其机制可能与巨噬细胞作用于肿瘤细胞并协助上调肿瘤细胞中 MIF 的表达有关。

[关键词] 口腔肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 巨噬细胞游走抑制因子; 巨噬细胞; 免疫组织化学

[中图分类号] R739.86 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)04-0344-03

Correlation of MIF Expression with Macrophage Infiltration and Their Interaction in Oral Squamous Cell Carcinoma

DAI Taiming¹, SONG Yufeng², MA Hong², FENG Hongchao¹, REN Xiaomin¹

(1. Department of Preventive Dentistry, Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the significance and relationship between the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and infiltration of macrophages in the process of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** The immunohistochemical SABC method was used to detect MIF expression and CD68 (for labeling macrophages) in 42 cases of OSCC and in 10 normal tissues, and so as to observe the relationship between MIF expression and macrophages infiltration, and to observe the variation of MIF expression and macrophages infiltration in OSCC patients with or without lymphnode metastasis, and in patients at different TNM stages. **Results:** MIF expression and macrophage counts in OSCC cases were significantly higher than in normal tissues ($P < 0.01$). There was a positive correlation between MIF expression and macrophage infiltration ($\gamma = 0.542, P < 0.01$). And the expression of MIF and macrophage counts were related to lymphnode metastasis and TNM stages ($P < 0.05$). **Conclusion:** Both MIF and macrophages may play an important role in the process of invasion and metastasis of OSCC, and the cellular activity may relate to macrophages which affect the tumor cells and up-regulate MIF expression

[Key words] mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; macrophage migration inhibitory factors; macrophages; immunohistochemistry

近年来,巨噬细胞对肿瘤的促进和抑制作用的研究正越来越受到关注。在炎症刺激和免疫应答

*[基金项目] 国家自然科学基金(30660200)

** 通信作者 E-mail: syf1962@gmc.edu.cn.

过程中,活化的巨噬细胞会大量分泌 MIF 以参加机体中的炎症反应及免疫调节,同时, MIF 又能使更多的单核/巨噬细胞活化,刺激 T 细胞增殖,直接或间接地促进多种炎症因子的产生^[1-2]。在肿瘤组织中,由于机体环境平衡的失调,MIF 的表达和巨噬细胞的浸润也随之发生了变化^[3-4]。为进一步了解口腔鳞癌中 MIF 的表达和巨噬细胞浸润在口腔鳞癌的侵袭和转移中的意义及相互关系,本研究对口腔鳞癌中的 MIF 及巨噬细胞进行了检测和分析,并对两者在口腔鳞癌中的关系和意义进行探讨。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选取 2004 - 2006 年口腔颌面外科手术切除或活检的口腔颌面部鳞癌标本 42 例,男性 24 例,女性 18 例,年龄 43 ~ 76 岁,平均 56.92 岁,有区域淋巴结转移 15 例。根据 2002 年国际抗癌联盟 (UICC) 制定的口腔癌 TNM 分期标准进行分期, I ~ II 期 13 例, III ~ IV 期 29 例;另取 10 例取自无烟酒嗜好的外伤或拔牙病人的口腔颌面部正常组织作为对照。所有标本均经过病理诊断证实为鳞状细胞癌或正常组织,术前未经任何针对肿瘤的治疗,标本用 10% 中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚连续切片。

1.2 免疫组织化学染色

所有组织经常规制片,根据试剂说明行微波加热抗原修复。以免抗人 MIF 多克隆抗体(购于上海迈莎生物科技有限公司,稀释比 1:80)标记 MIF;以鼠抗人 CD68 单克隆抗体(购自北京中杉金桥生物技术有限公司,稀释比 1:100)标记检测组织中的巨噬细胞。以免疫组织化学 SABC 法分别检测 MIF 和 CD68 的表达。浓缩(鼠/兔)通用型 SABC 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(稀释比 1:100)。用已知的结肠癌标本为阳性对照,PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

MIF 的判断标准结合免疫组化染色强度和阳性细胞数两个参数,综合判定 MIF 的阳性染色^[5]。用 BioMias 图像处理系统分别在 400 倍高倍镜下随机选择 5 个上皮或癌变视野(视场面积 443 μm × 268 μm)检测阳性染色的积分光密度值(integral

optical density, IOD)。按 IOD 值的均数行染色强度计分:MIF 的 IOD 值 <28.812 记 0 分,28.812 ~ 35.461 记 1 分,35.461 ~ 42.110 记 2 分,42.110 以上记 3 分;同时据阳性细胞百分比计分:阳性细胞数小于 10% 记 0 分,10% ~ 30% 记 1 分,30% ~ 50% 为记 2 分,>50% 记 3 分。积分之和 ≥3 分判断为免疫组织化学阳性染色。巨噬细胞的评定通过光镜下计数 CD68 染色阳性的细胞完成,巨噬细胞计数参考 Russell D Leek 方法^[6]。首先在低倍镜(10 × 10)下选取癌视野中巨噬细胞最密集的三个区域(热点区),然后在高倍镜(10 × 40)下进行计数,取平均值进行统计分析。

1.4 观察指标

观察口腔鳞癌组织中巨噬细胞计数及 MIF 的表达情况,分析两者之间的关系,并观察二者与口腔鳞癌淋巴结转移及 TNM 分期的关系。

1.5 统计分析

计数资料的统计用行 × 列表的 χ^2 检验,计量资料的统计用单因素方差分析,两组数据的均数比较采用成组 *t* 检验,各指标间关系采用 Spearman 等级相关分析。所有资料均采用 SPSS 14.0 统计软件完成,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIF 在口腔鳞癌中的表达

MIF 阳性表达呈棕黄色,主要分布在细胞的胞膜和胞浆中(见图 1)。口腔鳞癌组织中有大量 MIF 的表达,多见于癌巢边缘及肿瘤细胞集中区域,多呈散在片状分布,亦可见于少量间质细胞及内皮细胞内,MIF 的表达显著高于正常组(*P* < 0.01)。正常口腔黏膜组织中 MIF 表达为阴性或弱阳性,染色明显低于口腔鳞癌组织。口腔鳞癌组织中,MIF 在 III ~ IV 期病例中表达显著高于 I ~ II 期病例(*P* < 0.05),有淋巴结转移组中显著高于无淋巴结转移组(*P* < 0.05,见表 1)。

2.2 巨噬细胞在口腔鳞癌中的计数及分布

CD68 阳性表达呈棕褐色颗粒,主要位于巨噬细胞的胞膜和胞浆中(见图 2)。在口腔鳞癌组织内可见大量巨噬细胞聚集,主要聚集在肿瘤边缘的血管重建区和肿瘤坏死区,呈弥散分布,不同部位分布不均,巨噬细胞计数显著高于正常对照组(*P* < 0.01);正常组织中少见巨噬细胞的浸润。口腔

鳞癌组织中,有淋巴结转移组的巨噬细胞计数显著高于无淋巴结转移组($P < 0.01$),在 TNM 分期的比较中也有显著性差异($P < 0.01$),见表 2。

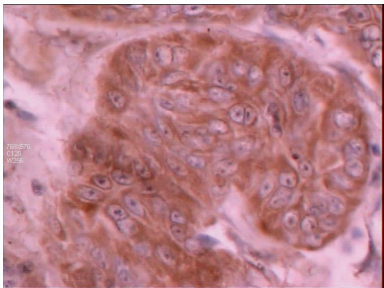


图 1 MIF 在口腔鳞癌中的表达(SABC, ×400)
Fig. 1 Expression of MIF in OSCC

表 1 MIF 在正常口腔黏膜组、口腔鳞癌组、有无转移组及不同分期组中的阳性表达率
Tab. 1 Positive MIF expression rates in normal oral mucosa and in OSCC patients of different stages

分组	n	MIF 表达		χ^2	P
		阳性	表达率(%)		
正常黏膜	10	2	20.00	10.076	0.01
口腔鳞癌	42	31	73.81		
鳞癌无转移	27	17	62.96	4.601	0.05
鳞癌有转移	15	14	93.33		
鳞癌 I ~ II 期	13	7	53.85	3.882	0.05
鳞癌 III ~ IV 期	29	24	82.76		

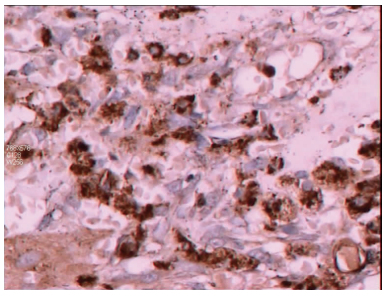


图 2 CD68 在口腔鳞癌中的表达(SABC, ×400)
Fig. 2 Expression of CD68 in OSCC

2.3 口腔鳞癌中 MIF 的表达巨噬细胞计数之间的关系

在口腔肿瘤中,通过在 MIF 表达阳性和阴性病例组中巨噬细胞计数的均数比较发现,MIF 阳性组中的巨噬细胞计数显著高于阴性组($P < 0.01$)(见表 3)。MIF 的表达与巨噬细胞计数之间的相关分析显示,Spearman 相关系数为 $r = 0.542$ ($P < 0.01$),MIF 的表达与巨噬细胞计数之间存在正相关关系。

表 2 正常口腔黏膜组、口腔鳞癌组、鳞癌有无转移组及不同分期组巨噬细胞计数($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The mean macrophage counts in normal oral mucosa and in OSCC patients of different stages

分组	n	巨噬细胞计数(个)	t	P
正常黏膜	10	7.10 ± 1.197	-28.536	0.01
口腔鳞癌	42	42.05 ± 7.548		
鳞癌有转移	15	48.67 ± 8.415	4.872	0.01
鳞癌无转移	27	38.41 ± 3.544		
鳞癌 I ~ II 期	13	37.46 ± 5.190	-2.857	0.01
鳞癌 III ~ IV 期	29	44.10 ± 7.599		

表 3 口腔鳞癌中 MIF 的表达与 MVD 和巨噬细胞计数之间的关系($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The relationship between MIF expression and average macrophage counts in OSCC cases

MIF 的表达	n	巨噬细胞计数(个)	t	P
阳性	31	44.00 ± 7.611	3.094	0.01
阴性	11	36.55 ± 3.830		

3 讨论

研究发现,MIF 主要来源于机体活化的巨噬细胞,具有活化单核/巨噬细胞、刺激 T 细胞增殖、促进炎症细胞因子产生等作用^[1-2]。本课题组检测口腔鳞癌中 MIF 的表达和巨噬细胞的浸润情况后发现,MIF 的高表达主要集中于肿瘤细胞的胞膜和胞浆中,而巨噬细胞则主要在肿瘤边缘血管重建区的基质和肿瘤坏死区内大量浸润,提示口腔鳞癌中高表达的 MIF 主要来源于肿瘤细胞而非巨噬细胞。本课题组以前的研究结果也显示,在炎症组织、肿瘤组织和肿瘤的淋巴结转移灶中的巨噬细胞计数是有显著性差异的^[4,7]。说明肿瘤组织中某些巨噬细胞的功能相对于在炎症环境中可能发生了一些变化,肿瘤组织中 MIF 的分泌机制可能有别于在炎症反应和免疫调节中的情况。

与肿瘤发生相关的巨噬细胞又称肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs),TAMs 在肿瘤微环境中既能分泌血管生成因子,促进肿瘤细胞周围血管的形成,为肿瘤细胞提供营养并为肿瘤细胞向细胞外基质侵袭提供通道,还能抑制 T-细胞的免疫应答,并释放因子降低局部促炎抗癌反应,促进肿瘤细胞的出逃并最终转移^[8]。

(下转第 350 页)

- [9] Smith MA, Makino S, Kim, SY, et al. Stress increases brain- derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary[J]. *Endocrinology*, 1995(1):37-43.
- [10] 费慧芝,王涵,胡小娅,等. 帕罗西汀抗抑郁作用涉及改善氧化应激状态、HPA 轴功能和海马脑源性神经营养因子表达[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012

(10):1137-1142.

- [11] Becker A, Grecksch G, Schwegler H, et al. Expression of mRNA of neurotrophic factors and their receptors are significantly altered after subchronic ketamine treatment [J]. *Med Chem*, 2008(3):256-263.

(2013-05-23 收稿, 2013-07-09 修回)

编辑:文箴颖

(上接第 346 页)

耶鲁大学医学院的研究者还发现, MIF 能通过活化 ERK-1/2 和 AKT 路径, 调节 JAB1, p53, SCF 泛蛋白连接酶(SCF ubiquitin ligases) 和 HIF-1 等途径参与肿瘤的生长调节、细胞凋亡和细胞周期控制, 在多个已报道的体外和体内肿瘤模型中, MIF 的量与肿瘤的侵袭和转移能力呈正相关^[9]。由此可见, 肿瘤组织中巨噬细胞的浸润和肿瘤细胞中的 MIF 的高表达在促进肿瘤细胞的侵袭性上都起到较为重要的作用。

本课题通过在 42 例人体口腔肿瘤组织中 MIF 的表达和巨噬细胞浸润的研究发现, 在口腔鳞癌组中 MIF 的表达及巨噬细胞计数均显著高于正常对照组, 统计学显示两者之间呈正相关关系, 而且两者在口腔鳞癌中有淋巴结转移组均显著高于无淋巴结转移组, III ~ IV 期病例也显著高于 I ~ II 期病例。因此推测口腔鳞癌内大量浸润的巨噬细胞, 可能与肿瘤细胞存在着某种相互作用, 增强了肿瘤细胞分泌 MIF 的活性, 同时也可能因此大幅提高其肿瘤的侵袭性, 为肿瘤进一步的侵袭和转移创造了条件。

4 参考文献

- [1] Paiva CN, Arras RH, Magalhães ES, et al. Migration inhibitory factor (MIF) released by macrophages upon recognition of immune complexes is critical to inflammation in Arthus reaction[J]. *J Leukoc Biol*, 2009(5):855-861.

- [2] Lue H, Dewor M, Leng L, et al. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74[J]. *Cell Signal*, 2011(1):135-144.
- [3] 戴泰鸣, 马洪, 宋宇峰, 等. 口腔鳞癌中巨噬细胞移动抑制因子的表达及意义[J]. *贵阳医学院学报*, 2007(4):337-340.
- [4] 戴泰鸣, 马洪, 宋宇峰, 等. 口腔鳞癌原发灶及淋巴结转移灶中巨噬细胞的检测及意义[J]. *口腔医学研究*, 2010(3):371-373.
- [5] Wang M, Wang T, Liu S, et al. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades[J]. *Brain Tumor Pathol*, 2003(2):65-72.
- [6] Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1996(20):4625-4629.
- [7] 冯红超, 宋宇峰. 口腔鳞癌中肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和血管生成与颈淋巴结转移的关系[J]. *临床口腔医学杂志*, 2003(3):135-137.
- [8] Obeid E, Nanda R, Fu YX, et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2013(1):5-12.
- [9] Bifulco C, McDaniel K, Leng L, et al. Tumorgrowth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor [J]. *Curr Pharm Des*, 2008(36):3790-801.

(2013-04-19 收稿, 2013-06-09 修回)

编辑:潘 娅