

乳腺癌患者淋巴细胞功能相关抗原表达水平的临床研究

张 瑾¹ 吴咸中² 黄建英¹ 于士柱³ 左联富⁴

内容提要 目的:探讨乳腺癌患者血、癌组织、引流淋巴结中淋巴细胞功能相关抗原 CD11a、CD18、CD54 蛋白表达水平及化疗和中药益气养血冲剂对其表达水平的影响。方法:免疫组化法和流式细胞术检测乳腺癌患者血、癌组织、引流淋巴结中 CD11a、CD18、CD54 蛋白表达水平在化疗前、后和化疗加服益气养血冲剂后的改变。结果:乳腺癌患者血中 CD54 水平与良性对照组比较明显增高,癌组织淋巴细胞 CD11a、CD18、CD54 水平明显增高,乳腺癌细胞 CD54 表达阳性率 100%,阴性淋巴结 CD11a、CD18、CD54 表达水平明显高于阳性淋巴结。结论:乳腺癌患者粘附分子水平明显异常,免疫粘附功能障碍,化疗在杀伤癌细胞的同时,对机体免疫功能产生不良影响,益气养血冲剂能够改善化疗后乳腺癌患者淋巴细胞粘附功能等细胞免疫功能。

关键词 乳腺癌 粘附分子 化疗 益气养血冲剂

Clinical Study on the Expression Level of Lymphocyte Function Related Antigen of Breast Cancer Patients

ZHANG Jin, WU Xianzhong, HUANG Jianying, et al The Affiliated Tumor Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin (300060)

Objective: To explore the protein expression level of the lymphocyte function-related antigen CD11a, CD18, CD54 of breast cancer patients' blood, cancer tissue and drainage lymph node, and the effect of chemotherapy as well as Yiqi Yangxue Granule on its expression level. **Methods:** The immunohistochemical assay and flow cytometry were used to determine the change of the protein expression level of CD11a, CD18, CD54 on the lymphocyte of blood, cancer tissue and lymph node between before and after chemotherapy and chemotherapy plus Yiqi Yangxue Granule in 72 patients suffering from breast cancer. **Results:** In breast cancer patients, the level of CD54 was increased more obviously than that of control group, the CD11a, CD18, CD54 of lymphocytes in cancer tissue increased remarkably, while the CD54 expression positive rate reached 100%, the expression level of CD11a, CD18, CD54 which increased significantly in negative lymph node obviously higher than that of positive lymph node. **Conclusion:** The level of adherence cell was markedly abnormal in breast cancer patients, whose immune adherence function disturbed. Although chemotherapy kills the tumor cells, it damages the immune adherence function, Yiqi Yangxue Granule could improve the immune function and enhance the anti-cancer effect of patients.

Key words breast cancer, adherence molecule, chemotherapy, Yiqi Yangxue Granule

淋巴细胞功能相关抗原(lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)是一种膜蛋白分子,是由 α (CD11a, 180 KD) 和 β (CD18, 95 KD) 两条多肽链组成的异二聚体⁽¹⁾。CD54 亦称细胞间粘附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)为单链糖蛋白,是 LFA-1 的配基。它们共同构成整合蛋白的重要组成部分,与肿瘤免疫密切相关,但其在乳腺癌发生、发展中发挥了

怎样的作用,药物治疗对其有何影响,目前尚不清楚,本研究就这些问题进行了初步探讨。

资料和方法

1 临床资料 本研究选择天津医科大学附属肿瘤医院乳腺科收治的 72 例乳腺疾病患者,皆为女性,均经切除及病理检查证实。在全部病例中有乳腺癌 64 例,年龄 36~68 岁,中位年龄 47 岁;病理类型均为浸润性非特殊型癌,且伴腋淋巴结转移,其中单纯手术组 18 例,年龄 38~68 岁,中位年龄 49 岁;术前无化疗

1. 天津医科大学附属肿瘤医院(天津 300060);2. 天津医科大学;
3. 天津医科大学第一附属医院;4. 河北医科大学第四医院

和中药治疗;化疗组 16 例,年龄 38~65 岁,中位年龄 45 岁;先 CMF 方案化疗 4 周后再手术;化疗加服中药组 30 例,年龄 36~68 岁,中位年龄 46 岁;先化疗同时服中药 4 周后再手术;良性对照组 8 例,年龄 37~58 岁,中位年龄 44 岁;单纯行乳腺局部切除术。

2 治疗方法 化疗治疗方案:采用 CMF 方案,环磷酰胺(CTX)600 mg,氟尿嘧啶(5-FU)500 mg,氨甲喋呤(MTX)20 mg,3 药联合,每周 1 次,加在 5%葡萄糖注射液中静脉滴注,共 4 周。中药治疗方案:益气养血方剂组成:黄芪 30g 党参 20g 当归 20g 女贞子 20g 丹参 20g 山茱萸 15g 仙灵脾 15g,制成颗粒冲剂,每日 3 次,每次 1 袋,每袋 9g,连续服药 4 周。

3 测定项目和检测方法

3.1 标本采集 手术当日清晨采集患者全血 5 ml,分离淋巴细胞,置 4%甲醛中备用;同时术中取患者癌组织和引流淋巴结,癌组织立即置液氮中备用;引流淋巴结立即分离淋巴细胞,置 4%甲醛中备用。在对各组引流淋巴结的检测研究时,根据病理腋淋巴结转移与否,将单纯手术组的同一患者引流淋巴结分为有转移淋巴结(阳性)和无转移淋巴结(阴性)两组分别进行研究,以便对比。而对于化疗组和化疗加中药组则只选择有转移淋巴结进行研究。

3.2 血和引流淋巴结淋巴细胞 CD11a、CD18、CD54 流式细胞术(FCM)检测 抗体购自法国国际免疫试剂公司(IMMUNOTECH)。首先分离血、引流淋巴结淋巴细胞,然后采用免疫荧光直接标记法制备抗原。FCM 检测方法:使用美国 BD 公司生产的 FACS 420 型流式细胞仪,测量数据输入 HP-300 Consort30 计算机,并用免疫系统软件程序进行资料处理,检测速度为每秒钟 1000 个细胞,以鸡红细胞作为标准样品,调整仪器 CV 值为 5.0%以内。

3.3 癌组织淋巴细胞 CD11a、CD18、CD54 免疫组化检测 冰冻标本切 4 μ m 厚片,ABC 法染色,CD11a、CD54 单抗购自 ZYMED 公司,CD18 单抗购自军事医学科学院,II 抗和 ABC 复合物购自 Vector 公司。观察方法:(1)在装有目镜网格测微尺(80 $\times$ 80 μ m)的 400 倍视野下计数每例切片淋巴细胞的阳性细胞密度(细胞数/0.05 mm²)。(2)在装有目镜网格测微尺(同上)的 400 倍视野下随机计数 8 个网格内的阳性细胞和阴性细胞数,按阳性细胞数/总细胞数 $\times$ 100%计算出每例切片中阳性细胞百分比,并将其分为 4 个等级:-:无阳性细胞;+:阳性细胞<30%;++:阳性细胞 30%~60%;+++ :阳性细胞>60%。

4 统计学处理 应用 SAS 统计软件进行 χ^2 检

验、t 检验、方差分析和直线相关分析。

结 果

1 各组患者血中 CD11a、CD18、CD54 检测结果见表 1。乳腺癌患者血中 CD11a、CD18 水平与良性对照组比较无显著性差异($P>0.05$);乳腺癌患者血中 CD54 水平明显高于良性对照组($P<0.05$);化疗后患者血中 CD11a、CD18、CD54 水平与单纯手术组比较均明显降低,化疗加中药治疗组患者血中 CD11a、CD18、CD54 水平均明显高于化疗组($P<0.05$)。

表 1 各组患者血淋巴细胞中 CD11a、CD18 及 CD54 检测结果 (道数, $\bar{x}\pm s$)

组 别	例数	CD11a	CD18	CD54
良性对照	8	151.98 $\pm$ 19.34	162.34 $\pm$ 29.10	127.52 $\pm$ 21.19
单纯手术	18	154.55 $\pm$ 10.67	166.69 $\pm$ 20.89	148.97 $\pm$ 24.99*
化 疗	16	144.21 $\pm$ 19.83	149.06 $\pm$ 14.74	130.56 $\pm$ 14.08
化疗加中药	30	168.84 $\pm$ 17.35 [△]	170.07 $\pm$ 22.96 [△]	151.74 $\pm$ 11.57 [△]

注:与良性对照组比较,* $P<0.05$;与化疗组比较,[△] $P<0.05$

2 各组患者引流淋巴结中 CD11a、CD18、CD54 检测结果 见表 2。引流淋巴结中 CD11a、CD18、CD54 水平阴性淋巴结明显高于阳性淋巴结($P<0.05$);化疗后乳腺癌患者引流淋巴结中淋巴细胞 CD11a、CD54 水平与单纯手术组比较均有所降低,化疗加中药组患者引流淋巴结淋巴细胞 CD11a、CD54 水平明显高于化疗组($P<0.05$);CD18 水平与化疗组比较无明显差异。

表 2 各组患者引流淋巴结淋巴细胞中 CD11a、CD18 及 CD54 检测结果 (道数, $\bar{x}\pm s$)

组 别	例数	CD11a	CD18	CD54
单纯手术阴性	18	160.79 $\pm$ 8.78	163.67 $\pm$ 15.21	173.14 $\pm$ 23.08
阳性	18	150.55 $\pm$ 7.78*	154.26 $\pm$ 14.09*	161.66 $\pm$ 22.28*
化 疗	16	141.81 $\pm$ 12.30	150.00 $\pm$ 17.11	141.14 $\pm$ 18.80
化疗加中药	30	155.91 $\pm$ 11.92 [△]	156.27 $\pm$ 12.89	180.28 $\pm$ 14.53 [△]

注:与单纯手术组阴性淋巴结者比较,* $P<0.05$;与化疗组比较,[△] $P<0.05$

3 乳腺癌组织中 CD11a、CD18、CD54 检测结果见表 3。癌组织淋巴细胞中 CD11a、CD18、CD54 水平明显高于良性对照组($P<0.05$);乳腺癌细胞无 CD11a、CD18 表达;乳腺癌细胞表达 CD54,表达阳性率为 100%,其中 + 占 11.11%,++ 占 55.56%,+++ 占 33.33%;良性乳腺组织无 CD54 表达;肿瘤组织中 CD54 水平与阳性淋巴结淋巴细胞 CD54 水平明显正相关($r=0.40$, $P<0.05$),与血中 CD54 水平明显正相关($r=0.26$, $P<0.05$);化疗后乳腺癌患者癌组织淋巴细胞 CD11a、CD54 水平与单纯手术组比较明显降低;CD18 水平与单纯手术组比较无明显差异;乳腺

癌细胞 CD54 水平在化疗前后无明显变化;化疗加中药组乳腺癌患者癌组织淋巴细胞中 CD11a、CD18、CD54 水平明显高于化疗组($P < 0.05$),癌细胞 CD54 水平也明显增高。

表 3 各组患者癌组织淋巴细胞中 CD11a、CD18 及 CD54 检测结果 (细胞数/ 0.05 mm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD11a	CD18	CD54
良性对照	8	89.63 $\pm$ 27.22	53.13 $\pm$ 18.39	8.48 $\pm$ 5.72
单纯手术	18	125.37 $\pm$ 50.12 [*]	75.00 $\pm$ 25.20 [*]	11.87 $\pm$ 8.42 [*]
化疗	16	62.80 $\pm$ 20.43	72.70 $\pm$ 20.91	7.25 $\pm$ 7.41
化疗加中药	30	132.80 $\pm$ 26.43 [△]	97.30 $\pm$ 37.32 [△]	12.20 $\pm$ 6.32 [△]

注:与良性对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与化疗组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

LFA-1 在 T、B 细胞、NK 细胞和单核细胞表面均有表达,且相对稳定,是整合蛋白的重要组成部分,称 β_2 整合蛋白。在 ICAM-1 分子结构中,其膜外的 NH_2 一端为 LFA-1 的结合部位^(1,2)。LFA-1 与其配基 ICAM-1 的结合在白细胞与内皮细胞被活化之后会得到加强,它们和内皮细胞可能在癌细胞迁移和血源性传播过程中起重要作用。那么是否已有证据表明整合蛋白特别是 β_2 整合蛋白也参与肿瘤细胞的转移扩散呢?实验证明肿瘤细胞确实带有多数类型的整合蛋白,在肿瘤发展过程中有一些整合蛋白会丢失,而另一些则表达上调^(3,4)。大部分整合蛋白的功能是在研究了一些合成肽的作用之后推测出来的,根据对一些配体分子模仿出来的并有可能使某种粘连分子饱和的小分子合成肽的研究,在动物实验中确曾发现 β_2 整合蛋白能阻止癌细胞的血源性转移。

本研究表明,乳腺癌患者癌组织淋巴细胞的整合蛋白 LFA-1 及 ICAM-1 表达与良性对照组比较均明显上调,免疫组化显示乳腺癌组织无 CD11a 和 CD18 表达;并且在患者血中变化不明显,阴性淋巴结淋巴细胞的表达水平高于阳性淋巴结,3 种指标在 3 种组织中表达水平出现了不一致的变化,说明乳腺癌患者体内淋巴细胞功能尚处于正常状态,但局部淋巴细胞粘附分子被癌细胞刺激并激活而表达增高,这是机体免疫防御的一种表现,有利于防止癌细胞的迁徙和转移。细胞间粘附分子 CD54 是白细胞积聚和 LFA-1 依赖 T 细胞活化不可缺少的分子,对机体免疫功能的调节具有重要意义。细胞间粘附分子 CD54 在癌细胞表达增高,而在良性肿瘤组织中无表达,这一研究结果说明与其他恶性肿瘤一样,癌细胞 CD54 表达水平增高

与乳腺细胞恶变有关,而且其表达水平与细胞恶性程度有关。虽然 CD54 是 LFA-1 的配体,但表达水平与 LFA-1 出现不一致,提示机体存在免疫粘附方面的不平衡,癌细胞 CD54 表达水平增高的同时,淋巴细胞 CD54 水平也明显高于良性对照组,并显示出一定的相关性,说明乳腺癌患者白细胞聚集活性增强,淋巴细胞 CD54 与 LFA-1 相互调节,促进 T 细胞活化,使 LFA-1 活性增强,表达水平增高。但是,淋巴细胞 CD54 表达水平增高与癌组织表达水平增高的一致性也同样提示了 CD54 在调节免疫功能的同时,可能同样参与了肿瘤的淋巴转移,也说明了整合蛋白参与肿瘤免疫过程的不同阶段,并且所起的作用是不相同的,肿瘤细胞在疾病发展的过程中与淋巴细胞同时利用了整合蛋白。癌细胞 CD54 表达水平能否作为乳腺癌预后的标志,还有待进一步研究。

化疗后机体抗肿瘤的粘附机制受到损伤,粘附分子 CD11a、CD18、CD54 在乳腺癌患者血中、癌组织淋巴细胞中水平明显降低,在引流淋巴结中 CD11a、CD54 水平明显降低,CD18 变化不明显。表明淋巴细胞抗肿瘤的粘附功能在化疗后降低,化疗在一定程度上影响了淋巴细胞激活和功能的正常发挥。益气养血冲剂能够明显提高乳腺癌患者血中和癌组织淋巴细胞中 CD11a、CD18、CD54 水平,提高引流淋巴结中 CD11a、CD54 水平。说明益气养血冲剂有明显提高 T 淋巴细胞粘附功能的作用,这种作用对于拮抗化疗的免疫损伤,抑制肿瘤细胞的淋巴转移和血行播散,提高机体免疫防御能力均具有重要意义。

参 考 文 献

1. Haverstick M, Gray LS. Lymphocyte adhesion mediated by lymphocyte function-associated antigen-1. The Journal of Immunology 1992;149: 389—396.
2. Robinson MK, Andrew D, Rosen H. Antibody against the leucocyte adhesion molecule-1 (CD18) promotes both LFA-1 and CR3-dependent adhesion events. The Journal of Immunology 1991;148: 1080—1085.
3. Fine JS, Kruisbeek AM. The role of LFA-1/ICAM-1 interactions during murine T lymphocyte development. The Journal of Immunology 1991;147: 2852—2859.
4. Voraberger G, Schafer R, Stratoma CH. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5' regulatory region. The Journal of Immunology 1991;147: 2777—2786.

(收稿:1999-02-12 修回:1999-05-20)