

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.12.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.12.006>

M2 型肿瘤相关巨噬细胞在甲状腺乳头状癌合并桥本甲状腺炎时表达及临床意义

欧亮¹, 赵志泓¹, 王坤¹, 史圆圆², 袁娜娜³

(江苏大学附属医院 1. 甲乳外科; 2. 病理科; 3. 重症医学科, 江苏 镇江 212000)

[摘要] 目的: 探讨M2型肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的表达与甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)合并桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)时的相关性及其临床意义。方法: 收集120例甲状腺组织临床样本, 包含20例结节性甲状腺肿(nodular goiter, NG)组织、20例HT组织、38例PTC和42例PTC合并HT组织。运用免疫组织化学法检测甲状腺标本组织切片中的CD68⁺及CD163⁺巨噬细胞的表达水平, 并对检测结果与临床数据进行统计学分析。结果: CD68⁺及CD163⁺巨噬细胞的表达量随着HT向PTC演变而增多, 且相关性分析示两者呈正相关($P<0.001$)。单纯PTC CD163⁺细胞表达分数与CD68⁺细胞表达分数的比值(50/55), 明显高于PTC合并HT(76/94)。CD68⁺巨噬细胞的表达量与甲状腺癌的淋巴结转移情况相关($P<0.001$); CD163⁺巨噬细胞的表达量与甲状腺癌的肿块包膜侵犯及淋巴结转移情况相关($P=0.036$, $P<0.001$)。结论: M2型TAMs在PTC合并HT肿瘤侵袭进展及淋巴结转移的过程中发挥了重要作用。

[关键词] 甲状腺乳头状癌; 桥本甲状腺炎; 肿瘤相关巨噬细胞; CD163; CD68

Expression and clinical significance of M2 tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis

OU Liang¹, ZHAO Zhihong¹, WANG Kun¹, SHI Yuanyuan², YUAN Nana³

(1. Department of Thyroid and Breast Surgery; 2. Department of Pathology; 3. Department of Intensive Care Unit, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the correlation between the expression of M2 tumor-associated macrophages (TAMs) and development of papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis and its clinical significance. **Methods:** A total of 120 cases of thyroid tissue were collected, including 20 nodular goiter tissues, 20 Hashimoto's

收稿日期 (Date of reception): 2019-11-24

通信作者 (Corresponding author): 赵志泓, Email: zhaozhsoochow@163.com

基金项目 (Foundation item): 镇江市科技创新资金 (重点研发计划 - 社会发展) 项目 (SH2016030). This work was supported by the Science and Technology Innovation project Foundation (Key R & D plan-social development) of Zhenjiang, China (SH2016030).

thyroiditis tissues, 38 papillary thyroid carcinomas and 42 papillary thyroid carcinomas with Hashimoto's thyroiditis tissues. The expression of CD68⁺ and CD163⁺ macrophages in the thyroid tissue was detected by immunohistochemical method, and the results were analyzed in relation with the clinical data of the patients.

Results: Immunohistochemical analysis showed that the expression of CD68⁺ and CD163⁺ macrophages increased with the development of Hashimoto's thyroiditis to papillary thyroid cancer, and the correlation analysis showed that there was a positive correlation between them ($P < 0.001$). The expression ratio of CD163⁺ cell with CD68⁺ cell in simple thyroid papillary carcinoma (50/55) was significantly higher than that in papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis (76/94). Clinical data showed that the expression of CD68⁺ macrophages was correlated with lymph node metastasis ($P < 0.001$); the expression of CD163⁺ macrophages was correlated with the invasion of the capsule invasion and lymph node metastasis ($P = 0.036$, $P < 0.001$).

Conclusion: The expression of M2 TAMs in papillary thyroid cancer with Hashimoto's thyroiditis are related to invasion and lymphangiogenesis.

Keywords papillary thyroid carcinoma; Hashimoto's thyroiditis; tumor-associated macrophages; CD163; CD68

甲状腺癌是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤, 在过去的10年期间其发病率迅速上升, 已经成为发病率上升最快的实体肿瘤^[1]。其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)约占甲状腺癌90%; 同时大部分PTC都合并有桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis, HT)^[2]。巨噬细胞参与人体固有免疫系统的重要细胞组成, 既往多认为它具有吞噬病原微生物、提呈抗原、介导炎症反应和杀伤肿瘤细胞的作用; 浸润到肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)没有起到杀伤肿瘤细胞的作用, 而是参与了肿瘤的生长、侵袭、转移等过程^[3]。多数研究者以CD68标记TAMs来研究, 用CD163标记M2型TAMs则较少, 本研究采用免疫组织化学的方法, 检测肿瘤组织中CD68和CD163的表达, 并分析其与临床病理参数间的关系以及两者表达量的差异, 探讨M2型TAMs与PTC合并HT时之间的相关性及其临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

收集江苏大学附属医院甲乳外科2016年11月至2018年10月期间120例患者甲状腺手术标本。其中PTC80例(合并HT42例, 未合并HT38例; 男21例, 女59例, 年龄20~76岁), 单纯HT20例(男6例, 女14例, 年龄28~69岁), 结节性甲状腺肿(nodular goiter, NG)20例(男10例, 女10例, 年龄28~80岁)代替正常甲状腺组织。排除手术前接受过放射治疗与化疗等非手术治疗患者, 排除甲状腺功能亢进、类风湿、糖尿病等疾病患者。患者

临床病理资料(包括性别、年龄、肿瘤大小、包膜侵犯及淋巴结转移情况)来源于江苏大学附属医院甲乳外科。病理资料均由病理科主任医师审核。所有患者知情同意, 经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

采用免疫组织化学检测CD163⁺及CD68⁺巨噬细胞在组织中的表达情况: 应用免疫组织化学EnVision法检测CD68, CD163蛋白。CD163及CD68兔抗人多克隆抗体购自英国Abcam公司。稀释一抗(1:200), 使用已知阳性切片作阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照。即用型非生物素免疫组织化学检测试剂盒与DAB显色试剂盒购于福州迈新生物技术有限公司, 按照试剂盒说明书进行操作。

1.3 结果判断

CD163⁺及CD68⁺巨噬细胞的计数与表达量评分由两名经验丰富的病理医生进行双盲阅片。CD68和CD163均表达于巨噬细胞细胞质内, CD163还表达在巨噬细胞细胞膜, 出现黄褐色或棕色颗粒为阳性, 每个样本以低倍镜($\times 100$)进行筛选, 选择细胞呈棕黄色的细胞最密集的区域进行进一步分析, 在高倍镜($\times 200$)下随机计算采用5个视野的巨噬细胞的平均数量, 根据棕黄色的细胞所占比例, 对阳性巨噬细胞的表达量进行0~3的评分: 0分<5%, 1分5%~20%, 2分20%~50%, 3分>50%, 0~1分为低水平表达, 2~3分为高水平表达。

1.4 统计学处理

采用SPSS19.0软件进行统计学分析。计量资料

以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用*t*检验; 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验。使用Spearman秩和检验评估各分类变量之间的相关性。所有检验为双向检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD68⁺及CD163⁺巨噬细胞在结节性甲状腺肿、HT、单纯PTC及PTC合并HT组织中的表达

CD68⁺巨噬细胞在结节性甲状腺肿、HT、单纯PTC及PTC合并HT的表达分数分别为0.55±1.00, 1.6±0.88, 1.45±1.01及2.12±0.80, 各组之间差异有统计学意义($P<0.001$); CD68⁺巨

噬细胞的表达量与HT向PTC演变过程呈正相关($P<0.001$)。CD163⁺巨噬细胞在结节性甲状腺肿、HT、单纯PTC及PTC合并HT的表达分数分别为0.60±1.05, 1.45±0.76, 1.32±1.12及1.98±0.81; 各组之间差异有统计学意义($P<0.001$), CD163阳性巨噬细胞的表达量与HT向PTC演变过程呈正相关($P<0.001$)。PTC中CD68⁺细胞表达分数为1.8±0.96; CD163⁺细胞表达分数为1.66±1.02($P=0.027$), 两者之间存在明显的统计学差异(表1, 图1)。单纯PTC CD163⁺细胞表达分数与CD68⁺细胞表达分数的比值(50/55), 明显高于PTC合并HT CD163⁺细胞表达分数与CD68⁺细胞表达分数的比值(76/94; 图2)。

表1 各组组织中CD68及CD163的阳性表达分数
Table 1 Positive expression scores of CD68 and CD163 in tissues of each group

组别	<i>n</i>	CD68 +	总分数	CD163 +	总分数
NG	20	0.55 ± 1.00	11	0.60 ± 1.05	12
HT	20	1.60 ± 0.88	32	1.45 ± 0.76	29
PTC	38	1.45 ± 1.01	55	1.32 ± 1.12	50
PTC + HT	42	2.12 ± 0.80	94	1.98 ± 0.81	76

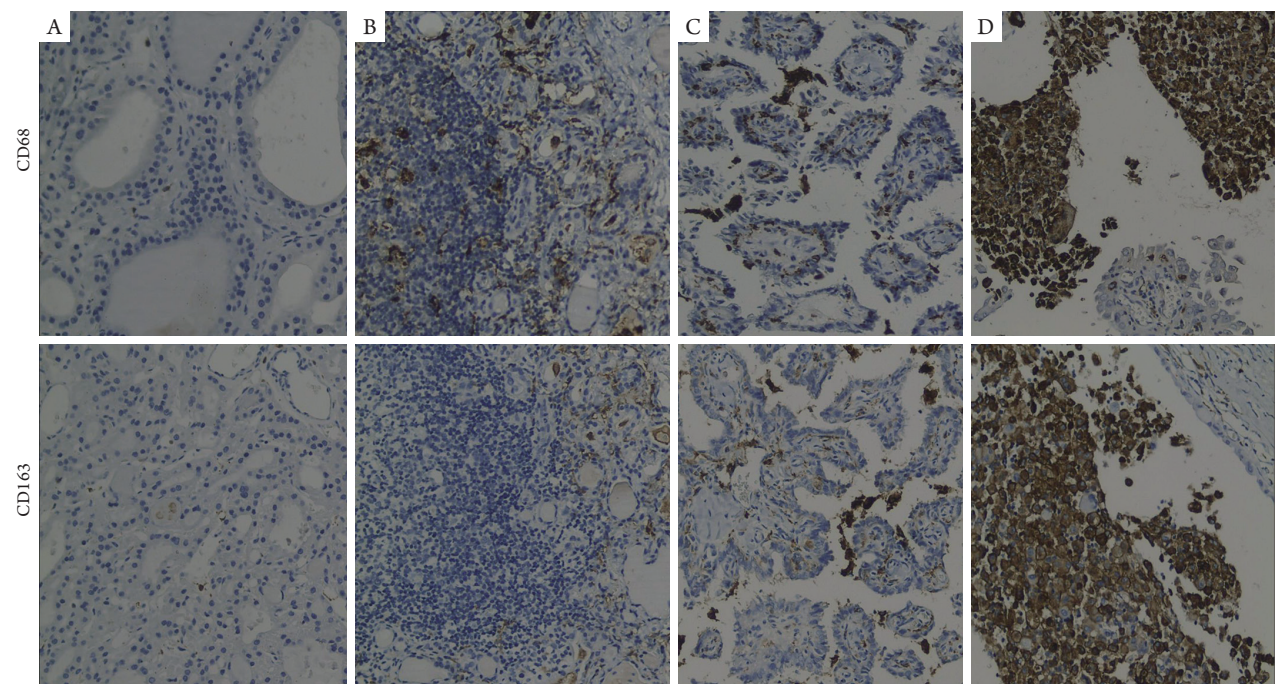


图1 CD68⁺细胞及CD163⁺细胞在各组甲状腺组织中的表达(IHC, ×200)
Figure 1 Expression of CD68⁺ cells and CD163⁺ cells in each thyroid tissues (IHC, ×200)
(A) 结节性甲状腺肿; (B) 桥本甲状腺炎; (C) 甲状腺乳头状癌; (D) 甲状腺乳头状癌合并桥本甲状腺炎。
(A) Nodular goiter; (B) Hashimoto's thyroiditis; (C) Papillary thyroid carcinoma; (D) Papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis.

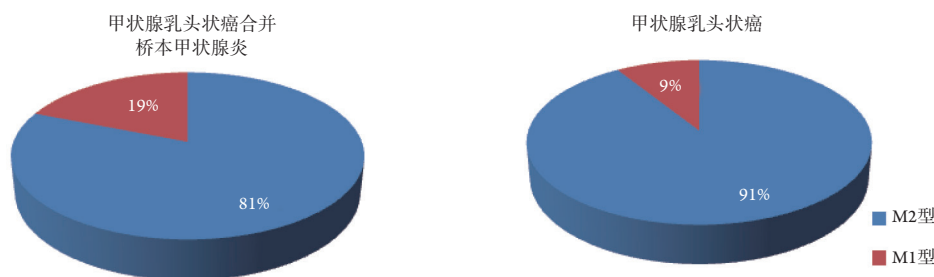


图2 M1型及M2型肿瘤相关巨噬细胞在PTC亚组中比例

Figure 2 Proportion of M1 and M2 tumor-associated macrophages in subgroups of papillary thyroid carcinoma

2.2 CD68⁺及CD163⁺巨噬细胞表达量与PTC临床资料的相关性

CD68⁺及CD163⁺巨噬细胞与PTC患者的性别、年龄及肿瘤大小无关(均 $P>0.05$), CD68⁺巨

噬细胞的表达量与患者的淋巴结转移情况相关($P<0.001$); CD163⁺巨噬细胞的表达量与患者的肿块包膜侵犯及淋巴结转移情况相关($P=0.036$, $P<0.001$; 表2)。

表2 CD68⁺巨噬细胞表达量及CD163⁺巨噬细胞表达量与PTC患者临床资料的相关性

Table 2 Correlation between CD68⁺ macrophage expression, CD163⁺ macrophage expression and clinical data of patients with thyroid papillary carcinoma

临床参数	n	CD68 ⁺ /例		P	CD163 ⁺ /例		P
		低表达	高表达		低表达	高表达	
性别	80			0.459		51	0.383
男	21	8	13		8	13	
女	59	28	31		29	30	
年龄/岁				0.360			0.326
≥55	7	2	5		2	5	
<55	73	34	39		35	38	
肿瘤大小/cm				0.079			0.052
≥1	33	11	22		11	22	
<1	47	25	22		26	21	
包膜侵犯				0.144			0.036
有	22	7	15		6	16	
无	58	29	29		31	27	
淋巴结转移				<0.001			<0.001
有	4	10	30		9	31	
无	40	26	14		28	12	

3 讨论

HT和甲状腺癌患病率近年来均呈上升趋势, 且HT合并甲状腺癌的患者逐年增多, 两者是否存在相关性或因果关系引起了学者的广泛关注, 并

存在较大争议。Dailey等^[4]于1955年首先提出甲状腺癌是由HT演变而来的观点, 但两者之间的关系至今尚未研究清楚。肿瘤微环境在癌症的起源、发生及进展中起至关重要的作用; 合并HT的甲状腺乳头癌的肿瘤微环境包含炎症及肿瘤, 其情况

更为复杂;在组成肿瘤微环境的各种成分当中,巨噬细胞占了很大比重,且具有重要作用。随着微环境的不断改变,巨噬细胞游走至肿瘤组织,因此也称为TAMs^[3]。TAMs通过分泌一系列细胞因子,参与肿瘤基质重塑、免疫抑制、血管生成,并且与癌症转移、侵袭以及化疗药物抵抗相关。TAMs对肿瘤的影响是多方面的,不仅能通过血管内皮生长因子C促进脉管生成,同时能够增强肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的能力。因此TAMs可能成为肿瘤治疗靶点及临床预后监测指标^[5-7]。

CD68蛋白作为TAMs的重要标志物^[8],本研究发现CD68⁺巨噬细胞在PTC中的表达量明显高于良性肿瘤,说明TAMs与PTC的发生、发展可能相关;结节性甲状腺肿组织、HT组织及HT合并PTC组织中CD68⁺巨噬细胞的表达量呈明显递增趋势,说明TAMs在HT向PTC演变过程中可能起重要作用。TAMs表达量与肿瘤淋巴结转移、淋巴结密度、肿瘤分期等密切相关,表明肿瘤组织中TAMs数量增多提示疾病预后不良^[9]。TAMs能够促进PTC生长,对肿瘤的侵袭和转移发挥促进作用^[10]。本研究同样发现TAMs在甲状腺癌中的表达增多与淋巴结转移和包膜侵犯有关;其可能机制是TGF- β 抑制了TAMs的抗肿瘤功能,增强了迁移性,刺激其向肿瘤区域募集,通过激活CXCL8-CXCR1/2信号通路来促进肿瘤进展^[11-12]。

CD163目前被广泛作为M2型TAMs的标志物^[13]。在肿瘤发生发展的过程中,TAMs不仅具有强大的重塑性及多样性,而且在不同的细胞因子、炎症因子及趋化因子的刺激下能够发生改变,从而表现出不同的极性及表型。其主要表型:M1型和M2型。M1型和M2型TAMs均存在于肿瘤的各个阶段;早期以M1型为主,中晚期以M2型为主。随着肿瘤的进展,M1型逐渐向M2型极化,M2型TAMs数量的增多也提示着预后不良。对M2型TAMs进行有效调节,能逆转M1型TAMs向M2型TAMs的极化过程;促使M2型TAMs向M1型TAMs的极化,可以有效地抑制肿瘤的发生和发展^[14]。本研究发现在所有PTC组织中,CD68⁺的总TAMs明显多于CD163⁺的TAMs的表达,说明甲状腺癌中也存在M1型和M2型TAMs的共同表达,但比例不一样;单纯PTC中CD163⁺细胞表达分数与CD68⁺细胞表达分数的比值(50/55),明显高于PTC合并HT,表明在PTC合并HT时虽然也有大量的TAMs,但可能M2型比例减少,M1型比例增加。PTC合并HT时有较好的临床预后和不易向外侵犯,说明自身免疫反应虽然是甲状腺癌发生、

发展的一个危险因素,却也能抑制疾病的进一步发展^[15]。分化型甲状腺癌(滤泡状癌、乳头状癌)合并HT时比不合并HT的甲状腺癌有更好的临床分期,更低的复发率和病死率。肿瘤大小、远处转移和再发风险前者都比后者更好,随访20年的病死率为0^[16]。在体外细胞实验中使用低剂量博来霉素诱导M2型TAMs向M1型转化对PTC产生抑制作用^[17],猜测TAMs类型的变化可能是PTC合并HT的患者要较单纯PTC预后好的一个原因。

综上,PTC合并HT时,M2型TAMs在肿瘤侵袭进展及淋巴结转移的过程中发挥了重要作用。对于M2型TAMs在PTC合并HT中的表型变化机制,有无其他炎症细胞或因子的影响都需待进一步研究阐明。

参考文献

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. *Inter J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953.
2. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, et al. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013[J]. *JAMA*, 2017, 317(13): 1338-1348.
3. Nabeshima A, Matsumoto Y, Fukushima J, et al. Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via the HB-EGF-EGFRPI3K/Akt pathways[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(3): 547-55.
4. Dailey ME, Lindsay S, Skahen R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland[J]. *AMA Arch Surg*, 1955, 70: 291-297.
5. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, et al. An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cell*, 2017, 169(4): 736-749.
6. Dick SA, Macklin JA, Nejat S, et al. Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(1): 29-39.
7. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1423-1437.
8. Arts RJW, Plantinga TS, Tuit S, et al. Transcriptional and metabolic reprogramming induce an inflammatory phenotype in non-medullary thyroid carcinoma-induced macrophages[J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(12): e1229725.
9. Kirsten K, Ayub TH, Weber SK, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in endometrial adenocarcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 1335(2): 176-183.
10. 程枫, 王伟斌, 朱磊. 肿瘤相关巨噬细胞在PTC中的表达及临床

- 意义[J]. 中国现代医生, 2015, 53(34): 11-13.
- CHENG Feng, WANG Weibin, ZHU Lei. The expression and clinical significance of tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma[J]. China Modern Doctor, 2015, 53(34): 11-13.
11. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JC, et al. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2008, 15(4): 1069-1074.
 13. Ivanova K, Manolova I, Ignatova MM, et al. Immunohistochemical expression of TGF-B1, SMAD4, SMAD7, TGFβRII and CD68-positive TAM densities in papillary thyroid cancer[J]. Open Access Maced J Med Sci, 2018, 6(3): 435-441.
 14. Jin SS, He DQ, Luo D, et al. A biomimetic hierarchical nanointerface orchestrates macrophage polarization and mesenchymal stem cell recruitment to promote endogenous bone regeneration[J]. ACS Nano, 2019, 13(6): 6581-6595.
 15. Herwig MC, Bergstrom C, Wells JR, et al. M2/MI ratio of tumor associated macrophages and PPAR-gamma expression in uveal melanomas with class 1 and class 2 molecular profiles[J]. Exp Eye Res, 2013, 107(4): 52-58.
 16. Lun Y, Wu X, Xia Q, et al. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor of papillary thyroid cancer may improve cancer prognosis[J]. Otolaryngol Head Neck Surg 2013, 148(3): 396-402.
 17. Huang BY, Hseuh C, Chao TC, et al. Well-differentiated thyroid carcinoma with concomitant Hashimoto's thyroiditis present with less aggressive clinical stage and low recurrence[J]. Endocr Pathol, 2011, 22: 144-149.
 18. Liu H, Dong H, Jiang L, et al. Bleomycin inhibits proliferation and induces apoptosis in TPC-1 cells through reversing M2-macrophages polarization[J]. Oncol Lett, 2018, 16(3): 3858-3866.

本文引用: 欧亮, 赵志泓, 王坤, 史圆圆, 袁娜娜. M2型肿瘤相关巨噬细胞在甲状腺乳头状癌合并桥本甲状腺炎时表达及临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(12): 3121-3126. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.12.006

Cite this article as: OU Liang, ZHAO Zhihong, WANG Kun, SHI Yuanyuan, YUAN Nana. Expression and clinical significance of M2 tumor-associated macrophages in papillary thyroid carcinoma with Hashimoto's thyroiditis[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(12): 3121-3126. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.12.006