

食管癌组织 HLA-I 类抗原及相关分子的表达及意义

缪凤琴¹, 张建琼¹, 单军¹, 蒋芹², 陈昊², 李淑锋¹, 张建民³, 谢维¹

(1. 东南大学医学院遗传学研究中心、南京“HLA 表达与肿瘤”国际参考实验室, 210009, 江苏, 南京)

(2. 江苏省连云港市第一人民医院, 222000, 江苏, 连云港)

(3. 东南大学附属中大医院病理科, 210009, 江苏, 南京)

[摘要] 为探讨 HLA 抗原及相关分子在食管癌中的表达水平及其与病理学分型的关系, 应用了 5 种 HLA 抗原及相关分子单抗, 采用免疫组织化学方法(ABC 法)对江苏省 83 例食管癌组织石蜡切片进行检测并结合肿瘤的临床病理资料综合分析. 得出结果: HLA-B/C、HLA-A、 β_2m 、LMP2、calnexin 各分子的下调率分别为 12%、25.3%、15.7%、19.3%、20.8%; 丢失率分别为 29%、33.7%、49.3%、24.1%、41.5%. 其中 LMP2 位点的表达与肿瘤分型相关. 随着食管癌分化程度降低, 下调率增加. 27 例病例有淋巴结转移, 但统计学分析各分子的表达与转移均无明显相关性. 研究表明, 食管癌中有明显的 HLA-I 类分子表达下调或缺失. 这种改变不利于 T 细胞依赖性的免疫治疗.

[关键词] 食管癌, HLA, 免疫组织化学方法

[中图分类号] R735.7, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2004)04-0076-04

人类白细胞抗原(HLA)是免疫系统中的重要分子. 它参与机体递呈抗原, 决定免疫细胞对肿瘤的识别和杀伤. 它与肿瘤的关系一直受到关注. 食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率居各种恶性肿瘤第三位. 食管癌的发病是多因素多环节作用的结果. 机体的免疫监视功能在其中起重要作用. 本研究通过免疫组化染色, 探讨食管癌中 HLA-I 类抗原及相关分子的表达情况以及它与病理学分型的关系, 为食管癌的发生机制及免疫治疗研究提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 临床标本

83 例原发性食管癌标本取自东南大学附属中大医院及连云港市第一人民医院 1999 年至 2003 年手术切除标本, 其中男性 67 例, 女性 16 例, 年龄 44~81 岁, 中位年龄 56 岁. 常规石蜡包埋, 切片, 按 Duke's 标准对肿瘤进行病理分型. 83 例组织全部为食管鳞癌, 但发病部位有所不同. 病理分型高分化 31 例, 中分化 35 例, 低分化 17 例, 其中 27 例有淋巴结转移.

1.2 材料

ABC 试剂盒和生物素化抗小鼠均为美国 Vector 公司产品, 鼠单抗为美国 S. Ferrone 博士惠赠. 其中 HC10(抗 HLA-B/C), HCA(抗 HLA-A), 工作浓度均为 1:100; L368(抗 β_2m), calnexin(抗 calnexin)工作浓度均为 1:50; 和 SY-1(抗 LMP2)工作浓度为 1:500. 切片机为 Leica 公司出品的 RM2245.

1.3 方法

1.3.1 免疫组化染色法

采用 ABC 法.

1.3.2 主要步骤如下

4~5 μm 厚切片脱蜡至水, 加 0.3% H_2O_2 以灭活内源性过氧化物酶. 微波抗原修复, 正常马血清封闭, 再依次加一抗、生物素化二抗、ABC 复合物, 37℃ 孵育, DAB 显色, 苏木精复染, 光学显微镜观察. 用 PBS 代替一抗作空白对照, 无关抗体 MK2-2(工作浓度 1:100)作阴性对照.

1.3.3 判断标准

用 DAB 显色, 阳性为棕黄色或棕褐色. 每张切片随机选取 10 等倍视野($\times 400$ 倍), 计数着色细胞数和

收稿日期: 2004-07-22.

基金项目: 国家杰出青年基金(编号 30325017), 东南大学科学基金(编号 9223001158)资助项目.

作者简介: 缪凤琴, 女, 1970-, 东南大学医学院遗传学研究中心助教, 主要从事 HLA 在肿瘤中的表达的研究. E-mail: wei.xie@seu.edu.cn

通讯联系人: 谢维, 1963-, 博士, 东南大学医学院遗传学研究中心教授, 主要从事遗传学的教学与研究.

万方数据

染色强度(两人单独计数) :整张切片中着色癌细胞的百分数 > 75%、75% ~ 25%、< 25% 分别判为阳性、弱阳性和阴性. 染色强度分为强、弱和无,两种计分结果相加综合打分为正常(+)、下调(±)和丢失(-). 相邻正常结构(如淋巴和内皮细胞)的染色情况一方面用以质控染色结果、另一方面可作为内对照来评价细胞的染色强度. 坏死及角化的癌细胞不计数.(注 :按照第 12 届国际组织相容性大会上确定的统一标准^[1].)

1.4 统计学方法

采用 SAS 软件对全部数据进行统计处理. 计数资料相关分析用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 HLA 各分子位点的表达模式

所有组织切片中淋巴细胞都表达 HLA-I 类分子、 β_2m 、LMP2 及 calnexin,成为本实验良好的内参照. HLA-I 类分子重链(HLA-A 和 HLA-B/C 位点)多表达于细胞膜上, β_2m 分子表达在细胞质及细胞膜表面,以膜为主. 而 LMP2 和 calnexin 主要是在细胞质表达. 如图 1 ~ 图 4 所示 :

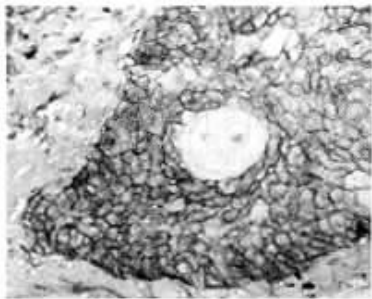


图 1 食管癌 HLA-A 抗原阳性染色膜型 ABC 法(× 400)

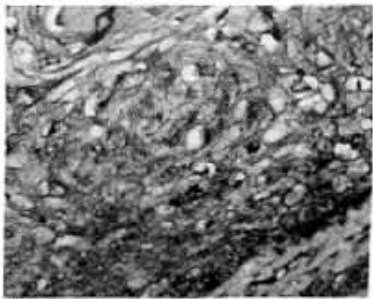


图 2 食管癌 β_2m 抗原阳性染色膜浆型 ABC 法(× 400)

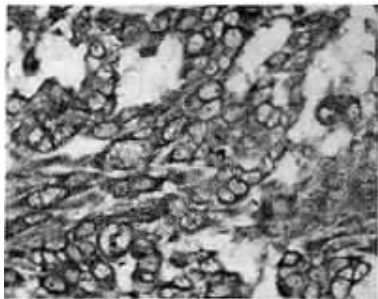


图 3 食管癌 Calnexin 抗原阳性染色浆型 ABC 法(× 400)

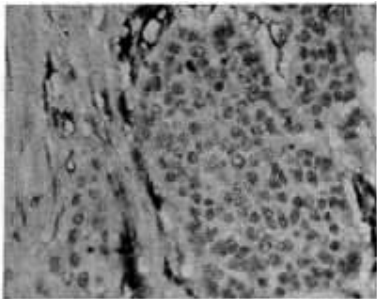


图 4 食管癌 HLA-B/C 抗原阴性染色(间质阳性)ABC 法(× 400)

2.2 HLA 各分子位点的表达情况

按照前述判断标准对染色切片进行阅片,评分,统计(结果见表 1). 在食管癌组织中,HLA-I 类分子有明显的表达下调或丢失,A 位点最显著. calnexin、 β_2m 和 LMP2 也有表达下调或丢失,且 LMP2 分子的下调或丢失与 HLA-A 位点的表达有统计学意义($X^2 = 4.0501$, $P = 0.0442$). HLA-B/C、HLA-A、 β_2m 、LMP2、calnexin 各分子的下调率分别是 12%、25.3%、15.7%、19.3%、20.8% ; HLA-B/C、HLA-A、 β_2m 、LMP2、calnexin 各分子的丢失率分别是 29%、33.7%、49.3%、24.1%、41.5% .

表 1 HLA 分子各位点的表达情况

Score	LMP2	HLA-B/C	HLA-A	β_2m	calnexin
+	47*(56.6%)	49(59%)	34(41%)	29(35%)	20(37.7%)
±	16(19.3%)	10(12%)	21(25.3%)	13(15.7%)	11(20.8%)
-	20(24.1%)	24(29%)	28*(33.7%)	41(49.3%)	22(41.5%)
Total	83	83	83	83	53

备注 :+、±、- 分别代表正常、下调、丢失 ;* 表示 LMP2 分子的下调或丢失与 HLA-A 位点表达有统计学意义($P < 0.05$)

2.3 HLA 各分子位点表达与肿瘤病理分型的关系

LMP2 位点的表达下调与病理学分型相关. 低分化癌的下调率和丢失率显著高于高分化癌($X^2 =$ 万方数据

7.703 0, $P = 0.000\ 1$). HLA-I 类分子、 $\beta 2m$ 、calnexin 在高分化癌中表达率高于中分化癌及低分化癌,但统计分析无显著性差异(表 2).在有转移的病例中,各分子的下调率和丢失率均高于无转移的病例,但无统计学意义(表 3).

表 2 HLA-I 类分子及相关分子表达与食管癌分型的关系

		LMP2			HLA-B/C			HLA-A			$\beta 2m$			calnexin		
		+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	±	-
病理分型	鳞癌高分化	22	3	6	20	3	8	15	6	10	15	2	14	3	3	8
	鳞癌中分化	23	7	5	19	5	11	13	9	13	11	5	19	10	6	7
	鳞癌低分化	2	6	9	10	2	5	6	6	5	3	6	8	7	2	7
<i>P</i>		0.000 1			0.700 5			0.564 5			0.086 6			0.225 4		

表 3 HLA-I 类分子及相关分子表达与食管癌转移的关系

		LMP2	HLA-B/C	HLA-A	$\beta 2m$	calnexin
		±、-	±、-	±、-	±、-	±、-
转移与否	有	44.4%	51.9%	66.7%	70.1%	66.7%
	无	42.8%	35.7%	55.4%	64.3%	62.5%

3 讨论

HLA-I 类分子表达下调是一个普遍的肿瘤生物学现象,从 20 世纪 80 年代后期开始,有文献陆续报道了各种肿瘤组织中 HLA 分子的表达情况及其与病理学分型、临床预后的关系.第十二届国际组织相容性抗原会议(IHWG)成立了“HLA 表达与肿瘤”工作组,组织有关实验室利用一套标准的试剂和方法以研究各型肿瘤的 HLA 抗原的改变频率,并通过肿瘤的组织病理学特征、病程和 HLA 抗原的表达水平的关系来评价各型肿瘤原发灶和转移灶 HLA 抗原改变的临床意义^[2].本实验室利用 IHWG 提供的标准方法和试剂对食管癌高发的江苏省 83 例食管癌患者的术后石蜡标本进行免疫组化染色,探讨食管癌中 HLA-I 抗原及相关分子的表达情况以及它与病理学分型的关系.

近十年来关于 HLA-I 类分子在食管癌中表达情况的报道甚少.Hosch^[3]等曾在冰冻切片上进行 HLA-I 类分子的表达研究,结果显示其异常表达率高达 45%,且表达水平与病人预后、淋巴浸润正相关;Rockett^[4]等于 1995 年也报道认为食管癌中存在很高比例的异常:37 例病人中下调的有 20 人(54%),丢失的有 15 人(41%),只有两例表达正常,并认为这一异常表达状况与食管癌的高侵袭性有关.本实验结果显示在 83 例食管癌组织中,HLA-I 类分子有明显的表达下调或缺失,HLA-B/C、HLA-A 下调率为 12%、25.3%;丢失率为 29%、33.7%.且 HLA-I 类分子的异常表达在高分化癌、中分化癌及低分化癌中是逐渐增高的.但由于缺乏完整的预后及临床资料,未能就表达水平与病人预后、淋巴浸润和侵袭性进行统计学分析.

细胞表面的完整 HLA-I 类分子由重链、轻链和抗原肽组成,这三种分子的表达异常或 I 类分子依赖的抗原加工递呈缺陷也是导致 I 类抗原表达下调或缺失的重要原因之一.关于食管癌 HLA-I 类分子下调的分子机制未见报道,本实验检测显示 $\beta 2m$ 、LMP2、calnexin 各分子的下调率分别是 15.7%、19.3%、20.8%;丢失率分别是 49.3%、24.1%、41.5%.除了 LMP2 分子,其他两种分子与 I 类分子的下调或丢失无统计学意义.LMP2 为一种抗原加工分子,主要作用是将抗原蛋白加工成适合与 HLA-I 类抗原结合的多肽.在本实验中,一方面,LMP2 分子的表达与 HLA-I 类重链的 A 位点的下调或丢失有统计学上的联系,随着 LAMP2 的下调和缺失的增高,HLA-A 的下调和缺失也增高.另一方面,LMP2 的表达在肿瘤的不同分型有显著性差异.随着肿瘤组织分化程度减低,下调和丢失有逐渐增高的趋势.关于 LMP2 分子在 HLA-I 类复合物表达中的作用,目前尚无定论,Johnsen^[5]等认为免疫蛋白酶体亚单位如 LMP2 的表达与肿瘤的发生发展无相关性,而另一个研究小组^[6]却发现肾细胞癌病人如果缺乏 LMP2 分子,会导致肿瘤抗原的加工递呈途径的障碍,从而不利于机体的抗肿瘤免疫应答,最终导致免疫逃逸且病人预后极差.本实验结果虽然显示 LAMP2 的下调和缺失和 HLA-A 的下调和缺失以及临床病理分型呈正相关,但这种缺失是发生在基因水平还是转录水平,本实验室正在研究当中.此外由于肿瘤的复杂性,还存在其它导致 HLA-I 类分子异常表达的机制,且不同个体的机制也各异,在食管癌中是否存在这种情况尚需进一步的研究.

本实验结果还显示在有转移的病例中,各分子的下调率和丢失率均高于无转移的病例.虽然统计分析

这种差异无显著性.但有趋势说明在机体的免疫选择作用下,HLA 分子表达下调或丢失的肿瘤更容易逃避免疫攻击,发生远处转移.

近年来体外诱导特异性的 T 淋巴细胞回输给肿瘤患者是肿瘤的免疫治疗领域的一个热点^[7].但本实验的研究及其他报导均证实食管癌中有明显的 HLA-I 类分子表达下调或缺失,是一类免疫原性较弱的肿瘤,对 T 细胞依赖性的免疫治疗效果差.因此,在对这类病人的免疫治疗前,通过免疫组化等方法选择 HLA 分子表达阳性,对 T 细胞依赖性免疫治疗敏感的病例是非常必要的.其次,对于食管癌中大量存在的 HLA 分子表达下调或丢失的机制进行研究,在分子水平寻找提高其表达的方法,对于 HLA 分子缺陷肿瘤患者的治疗也是必需的.

致谢 本实验用的所有单克隆抗体均由美国 S. Ferrone 博士(Department of Immunology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA)惠赠,在此表示感谢!

[参考文献]

- [1] Kurokohchi K, Carrington M, Mann D L, *et al.* Expression of HLA class I molecules and the transporter associated with antigen processing in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1996, 23(5):1181—8.
- [2] Ferrone S, HLA class I antigen downregulation in human cancers :T-cell immunotherapy revives an old story[J]. Mol Med Today, 1999, 5 :178—1860.
- [3] Hosch S B, Meyer A J, Schneider C, *et al.* Expression and Prognostic Significance of HLA Class I, ICAM-1, and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophageal Cancer[J]. J Gastrointest Surg, 1997, 1(4) 316—323.
- [4] Rockett J C, Darnton S J, Crocker J, *et al.* Expression of HLA-ABC, HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 in oesophageal carcinoma[J]. J Clin Pathol, 1995, 48(6) 539—44.
- [5] Johnsen K A, France J, Nagy N, *et al.* Systemic deficits in transporter for antigen presentation(TAP) or proteasome subunit LMP2 have little or no effect on tumor incidence[J]. Int J Cancer, 2001, 91(4) 366—369.
- [6] Murakami Y, Kanda K, Yokota K Y, *et al.* Prognostic significance of immuno-proteasome subunit expression in patients with Renal-cell carcinoma : a preliminary study[J]. Molecular Urology, 2001, 5(3):113—116.
- [7] 邵莹,徐琪,李慧,等. MAGE3-HLA-A2 肽疫苗诱导胃癌患者自体 CTL 的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, 7(4): 294—295.

The Relationship Between the Expression of HLA Molecules and Clinicopathological Significance in Oesophageal Carcinoma

Miao Fengqin¹, Zhang Jianqiong¹, Shan Jun¹, Jiang Qin², Chen Hao²,
Li Shufeng¹, Zhang Jianmin³, Xie Wei¹

(1. Department of Genetics and Developmental Biology, Southeast University Medical School, International " HLA Expression in Cancer " Reference Laboratory, 210009, Nanjing, China)
(2. The First Peoples 's Hospital of Lianyungang, 222000, Lianyungang, China)
(3. Department of Pathology, Zhong Da Hospital, Southeast University, 210009, Nanjing, China)

Abstract To study the relationship between the expression of HLA molecule and clinicopathological significance in oesophageal carcinoma. Using 5 monoclonal antibodies(mAbs) by meanings of ABC immunohistochemical method, 83 formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues were tested. The percentage of downregulation of HLA class I heavy-chain(B/C locus and A2 locus) β_2 m- and calnexin was 12%、25.3%、15.7%、19.3% and 20.8% respectively ; the percentage of lost of HLA class I heavy-chain(B/C locus and A2 locus) β_2 m- and calnexin was 29%、33.7%、49.3%、24.1% and 41.5% respectively ; and the downregulated expression of LMP2 locus is significantly associated with pathological grade ($p < 0.05$). There are 27 lymphnode metastatic cases, but the abnormal expression is no significantly associated with metastatic. HLA class I antigens are obviously downregulated in oesophageal carcinoma. This abnormal expression will provide the tumor cells with a way to avoid immunological recognition and it is not benefit for T-cell based treat of tumor.

Key words oesophageal carcinoma, HLA, immunohistochemistry assay

[责任编辑 孙德泉]