

关于食管癌组织浸润淋巴细胞的研究

I T淋巴细胞及其酯酶活性

河北医学院

王润田 张金钟 张玉芬 翟端巧 王蕙芬

河北省医院

王拯民 兰凤贺

河北省结核病院

窦秉钺 章嘉正

内容提要 本文研究了食管癌组织中浸润的淋巴细胞类型及酯酶染色反应。共取22例外科手术切除的食管癌标本,测定其中淋巴细胞的自然E玫瑰花成花率,结果E玫瑰花阳性细胞平均占总淋巴细胞的60%以上。酯酶染色结果显示 $81.5 \pm 10.9\%$ 酯酶阳性淋巴细胞形成E玫瑰花,但E玫瑰花阳性细胞中仅 $44.0 \pm 14.3\%$ 为酯酶阳性。说明酯酶阳性淋巴细胞绝大多数是T细胞,但癌组织中的T细胞仅部分为酯酶阳性,所以癌组织中的酯酶阳性细胞不能代表全部T淋巴细胞。

在评价机体抗肿瘤的细胞免疫水平时,常以E玫瑰花试验测定外周血中T细胞的比例做为指标,关于癌组织局部淋巴细胞类型的研究报告较少。近年来曾有人观察了乳癌病理切片中T、B淋巴细胞的分布^(1、2)关于食管癌局部淋巴细胞的分析尚未见报道。

众所周知,T细胞具有酯酶活性^(3、4),因此常有人用酯酶染色阳性细胞代表T淋巴细胞,并以酯酶染色法检测细胞群体中的T细胞数。但大家也都承认酯酶阳性细胞与E玫瑰花成花细胞虽有很高比例的交叉,但二者并不完全一致,在病理情况下这种差别表现的可能更明显。那么在食管癌组织中酯酶染色反应能否做为检测T细胞的标准呢?

为了观察食管癌局部的细胞免疫状况和了解局部T细胞的酯酶染色反应,本文用E玫瑰花试验研究了癌组织浸润淋巴细胞中的T细胞比例,并以非特异性 α -醋酸萘酯酶(ANAE)染色法研究了T细胞的酯酶活性。

病例与实验方法

病例: 经病理确诊的食管癌病人22例,男15例,女7例,年龄33~69岁。于手术切除肿瘤时,取部分癌组织做淋巴细胞分离。

食管癌组织中浸润淋巴细胞的分离: 取手术切除的食管癌组织,经无菌Hanks液冲洗后,剪碎,用Hanks液制成细胞悬液,去粗块后在蔗糖糖——泛影葡胺分离液(比重1.077)上进行密度梯度离心,分离单个核细胞,洗涤后制成 3×10^6 细胞/毫升的细胞悬液,各做玫瑰花试验用。

E—玫瑰花试验: 按Kaplan等氏⁽⁵⁾方法制备AET处理的绵羊红细胞(AET—E)

悬液(1.8×10^8 细胞/毫升),按统一流程法⁽⁶⁾与如上制备的癌组织中单个核细胞做E玫瑰花试验,湿片计数,同时摊片晾干酯酶染色后计数。凡粘附3个以上红细胞者算做一个成花细胞(E—RFC)。

α -醋酸萘酯酶(ANAE)染色: 基本按Meuller氏⁽⁷⁾法略加改进。涂片自然干燥,冷丙酮—甲醛液固定,置ANAE染色液内12小时,水洗后甲基绿复染,油镜观察,按湿片同样标准计成花细胞数,并计成花与不成花细胞中酯酶阳性细胞百分率。湿片每份标本计200个淋巴细胞,干片计300个。

结 果

癌组织浸润淋巴细胞中T细胞的比例: 按上法自每份新鲜癌组织中分离单个核细胞,做E玫瑰花试验,共检测食管癌标本22份,结果见表1。湿片和干片计数结果一致,癌组织浸润淋巴细胞多数为T细胞。

表1 食管癌组织浸润淋巴细胞中T细胞(E—RFC)所占比例

计数方法	例数	E—RFC% (均值±标准差)	检验
湿片计数	22	61.9 ± 11.9	P>0.05
干片计数	20	69.6 ± 13.6	

癌组织浸润淋巴细胞的ANAE反应: 癌组织中分离的淋巴细胞涂片酯酶染色后,油镜下观察,淋巴细胞与非淋巴细胞易于区分。淋巴细胞核着绿色,ANAE阳性细胞胞浆内含有一至数个致密的暗红色点或块;有的胞浆内含弥漫的淡红色片状,界限模糊,为可疑反应;胞浆清晰完全无红色者为阴性。阳性反应细胞,按胞浆中红色点块数量

的多少,分为含1、2、3、4及5个以上五种情况统计。每份标本计数300个淋巴细胞,共检测食管癌标本19份,结果见表2和表3。

表2 19例食管癌组织浸润淋巴细胞的ANAE反应(%)

	阳性	可疑	阴性
均值	37.9	6.4	55.7
标准差	13.4	5.3	14.2

注:阴性=清晰点,块状反应;可疑=弥漫红色反应;阳性=红色无反应

表3 酯酶阳性细胞中各类反应的比例(%) (19例结果)

	1点	2点	3点	4点	5点
均值	64.9	19.4	9.8	4.0	1.9
标准差	7.7	4.9	3.9	2.6	2.2

癌组织浸润淋巴细胞中E玫瑰花形成细胞与ANAE反应的关系:将所分离的癌组织中浸润的淋巴细胞做E花后,进行ANAE染色,镜下观察形成和不形成E玫瑰花淋巴细胞的ANAE反应,每份标本计数300个淋巴细胞,分别计算出E⁺ANAE⁺、E⁻ANAE⁺、E⁺ANAE⁻和E⁻ANAE⁻四种细胞各自所占的百分比。测定19例食管癌标本的结果列于表4。由表4可见E-RFC中仅44%ANAE阳性,但ANAE阳性细胞大部分(81.5%)为E花形成细胞。

表4 19例食管癌组织中淋巴细胞双标记结果

	ANAE ⁺ (均值±标准差)		ANAE ⁻ (均值±标准差)	
	E花 ⁺	E花 ⁻	E花 ⁺	E花 ⁻
占总淋巴细胞%	30.4±10.2	7.6±5.9	40.0±16.4	22.0±10.8
占E花 ⁺ 细胞%	44.0±14.3	—	56.0±14.3	—
占ANAE ⁺ 细胞%	81.5±10.9	18.5±10.9	—	—

讨 论

虽然癌周组织中有淋巴细胞浸润这一现象,早已在病理切片中被发现,但对其在肿瘤免疫中的意义,直到近年才进行探索^(8,9),1982年Shimokawara等⁽²⁾在人类乳癌的病理组织切片上,用免疫酶的方法证明癌周浸润淋巴细胞多数是T细胞, B细胞较少。并发现T细胞浸润与肿瘤型别和病期有关,在恶性度较低的乳头管型癌和淋巴结无转移的患者, T细胞浸润较多,作者认为T细胞可能起到了免疫监视作用。本文用分离的癌组织中浸润淋巴细胞进行自然E玫瑰花试

验、检测了22例食管癌组织,证明其中60%以上为T淋巴细胞,与上述在乳腺癌切片中的发现相吻合。这一现象可能与机体对肿瘤的局部免疫反应有关。

关于人类淋巴细胞的非特异性酯酶活性曾有许多研究报道^(3,4),多数认为酯酶阳性细胞基本上是T淋巴细胞,本文用酯酶和自然E玫瑰花双标记的方法观察了食管癌组织中浸润的淋巴细胞反应,发现癌组织中ANAE⁺细胞平均只占37.9%,而E花阳性细胞达60%以上,二者相差悬殊,为了检验在涂片干燥过程中是否有散花现象,我们对每个标本都做了湿片和干片计数对比,二者结果一致,干片尚略高于湿片结果,证明制片过程并未影响成花。双标记实验显示,80%以上ANAE⁺细胞为E花阳性,属于T细胞,说明在肿瘤组织中酯酶活性亦主要见于T细胞中,这和一般外周血的试验报告相一致。但E花阳性细胞中仅44%为酯酶阳性,而大多数T细胞是酯酶阴性的,且酯酶阳性细胞中多数为胞浆内1~2个酯酶点,3点以上者很少,显然其酯酶活性也是比较低的。Knowles等⁽¹⁰⁾指出,大的点块状酯酶反应主要见于静止的或成熟的T细胞,随着T细胞的被激活,酯酶反应渐变成细小、分散的小颗粒状,当激活的T细胞变成母细胞后,则酯酶活性丧失。本实验中也曾见到有部分淋巴细胞内有弥漫的红色反应,这或许反应了酯酶随淋巴细胞激活而变化的过程。本文所见食管癌组织中T淋巴细胞酯酶活性的降低,是否由于被癌组织抗原激活的结果呢?还是由于某种原因而使酯酶活性受到了抑制?这一现象在肿瘤的发展和转归中的意义如何?尚待进一步研究(1983年11月14日收稿)

参 考 文 献

1. Schoorl R et al, Amer J Pathol 84:529, 1976.
2. Shimokawara I et al, Cancer 49:1456, 1982
3. Kulenkampf J et al, Br J Haematol 38: 231, 1977.
4. Manconi PE et al, Scand J Immunol 9:99 1979.
5. Kapian ME et al, J Immunol Methods 5: 131, 1974.
6. 淋巴细胞E玫瑰花试验统一流程, 实验细胞免疫学进展, 第一集, 谢少文主编 1980年, 第158页。
7. Meuller J et al, Eur J Immunol 5:270, 1975
8. Bennet SH et al, Cancer 28:1255, 1971.
9. Lander I, Br J Cancer 26:321, 1972.
10. Knowles DM et al, Cellular Immunol 35: 112, 1978.