

消化系统疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002028

结直肠癌患者外周血 MDSCs 与 S100A9 水平
及其临床意义探讨黄 茂¹, 陈 露¹, 彭 棋¹, 卢丽君¹, 林 璐¹, 黄逸云¹, 段 亮², 周 兰¹

(1. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010)

【摘要】目的:检测结直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者外周血中髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)含量及血清 S100A9 蛋白的水平, 分析两者之间的相关性, 探讨其在临床诊疗中的潜在应用价值。**方法:**收集 82 例临床外周血样本及相关电子病例, 其中 CRC 患者 52 例, 健康者 30 例。采用流式检测外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中 MDSCs 的频数, 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 S100A9 水平, 用 SPSS 及 Graphpad Prism 进行 Mann-Whitney 检验分析, Spearman 分析和 ROC 曲线分析。**结果:**CRC 患者外周血 MDSCs 以及血清 S100A9 水平均明显高于健康对照组($P<0.01$), 且血清 S100A9 蛋白水平和外周血中 MDSCs 的频数两者之间存在正相关($r=0.38, P=0.01$); 同时相比于 Dukes 分期中的 A/B 期和未发生转移的患者, 处于 C/D 期和伴淋巴结转移 2 组患者血清中的 S100A9 水平及 MDSCs 频数明显升高, 并具有统计学意义($P<0.01$); 并且两者的 ROC 曲线下面积 $AUC>0.7(P<0.01)$, 说明两者对诊断 CRC 以及评估 CRC 患者分期情况和是否发生转移均具有较好的诊断价值。**结论:**CRC 患者外周血 PBMC 中 MDSCs 的频数与血清 S100A9 蛋白均明显升高; 两者均有望成为 CRC 分期和淋巴结转移的标志物。

【关键词】结直肠癌; 髓源性抑制细胞; S100A9**【中图分类号】**R446.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-09-27A study on the correlation between peripheral blood MDSCs and serum
S100A9 level and their clinical significance in patients with colorectal cancerHuang Mao¹, Chen Lu¹, Peng Qi¹, Hu Lijun¹, Lin Lu¹, Huang Yiyun¹, Duan Liang², Zhou Lan¹

(1. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics, Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Laboratory Department, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To measure the frequency of myeloid-derived suppressor cells(MDSCs) in peripheral blood and serum S100A9 level in patients with colorectal cancer(CRC), to analyze the correlation between the two indices, and to investigate their potential application in the clinical diagnosis and treatment. **Methods:** A total of 82 clinical peripheral blood samples (including 52 samples from patients with CRC and 30 samples from healthy subjects[as controls]) and related electronic medical records were collected. The frequency of MDSCs in peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) was measured by flow cytometry. The serum S100A9 level was measured by a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. SPSS and Graphpad Prism were used for the Mann-Whitney test, Spearman R analysis, and receiver operating characteristic(ROC) curve analysis. **Results:** Compared with the controls, the patients with CRC had significantly increased frequency of MDSCs in PBMCs and serum S100A9 level($P<0.01$), with a positive correlation between MDSC frequency and serum S100A9 level($r=0.38, P=0.01$). Compared with the patients who were at Dukes' stage

作者介绍: 黄 茂, Email: hm808@outlook.com,

研究方向: 分子肿瘤与肿瘤分子。

通信作者: 周 兰, Email: zhoulun@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81601837); 重庆市研究生科研创新项目资助项目(编号: CYS17144)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190321.1413.004.html>
(2019-03-22)A/B and without any lymph node metastasis, the patients who were at Dukes' stage C/D and with lymph node metastasis had significantly increased MDSC frequency and serum S100A9 level($P<0.01$); meanwhile, the area under the ROC curve was greater than 0.7 for both of the above indices($P<0.01$), indicating that both indices exhibited a favorable value in the diagnosis of CRC and the evaluation of the stage and metastasis of CRC.

Conclusion: Patients with CRC have a significantly increased frequency of MDSCs in PBMCs and serum S100A9 level; therefore, both indices may be potential biomarkers that can contribute to the staging of CRC and predict the metastasis of CRC.

[Key words] colorectal cancer; myeloid-derived suppressor cell; S100A9

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球最常见的消化道疾病之一,其发病率及死亡率分别位于全球恶性肿瘤第3位和第4位^[1]。目前, CRC 的治疗方式主要以手术切除为主,并辅以放疗及靶向治疗。虽然 CRC 的治疗手段在不断完善,但其晚期患者的5年生存率仅10%,依然危害人类健康。因此,开展对 CRC 更广泛、深入的研究具有重要意义。

髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)是一群高度异质性且未分化成熟的骨髓细胞,包括中性粒细胞、巨噬细胞及树突状细胞的前体细胞^[2]。已在多种肿瘤病人的外周血中及肿瘤组织中发现 MDSCs 频数增加^[3]。作为重要的免疫抑制细胞, MDSCs 主要通过抑制局部微环境中的免疫 T 细胞及 NK 细胞功能,从而促进炎症、肿瘤等多种疾病的发展^[4]。尽管 MDSCs 的免疫抑制功能已明确,但与其功能发挥相关的分子及其机制尚待探讨。

S100A9 蛋白是 S100 家族成员,其主要在中性粒细胞中表达,并作为一种分泌型炎症因子参与炎症反应^[5-6]。已知 S100A9 在多种肿瘤中高表达,并促进肿瘤发展^[6];课题组前期研究也证实了 S100A9 在 CRC 组织中高表达,并在体外实验中发现其具有直接促进 CRC 细胞生长及迁移的效应^[7]。同时, S100A9 也被认为是 MDSCs 的一个重要标志物^[8]。因此, CRC 外周血中 S100A9 与 MDSC 的关系及其在 CRC 中的诊治价值值得深入研究。

本文检测了 CRC 患者外周血中 MDSCs 频数及血清 S100A9 的含量,并进一步分析了它们之间的相关性及其的水平变化与 CRC 临床病理参数之间的关系,最后分析其在 CRC 中的诊断价值,以期对 CRC 的临床诊治提供候选的标志物及干预的靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集重庆医科大学附属第二医院从 2015 年 9 月至 2017 年 8 月入院并由病理学确诊为 CRC 的首诊患者资料及标本 52 例,所有患者均未接受化疗、放疗及手术治疗,且排

除其他结直肠肿瘤(如肠恶性淋巴瘤)以及临床数据资料不全者。并同期收集在该院进行健康体检的正常人标本 30 例作为对照组(health control, HC)。在 52 例 CRC 患者中,结肠癌 25 例,直肠癌 27 例;根据 Dukes 分期标准, 52 例中有 24 例在 A 和 B 期, 28 例属 C 和 D 期;根据 CRC 肿瘤临床分级,分为高、中和低级,其中高、中级 22 例,低级 30 例; 52 例中无淋巴结转移 36 例,已有转移 16 例。相关信息参见表 1。所有研究对象全身均无其它肿块及严重器质性病变;两组年龄、男女比例比较,均无统计学差异($P>0.05$)。

表 1 已收集血清样本的临床病理参数(n, %)

参数	HC (n=30)	CRC (n=52)
性别		
男	19 (63.33)	34 (65.38)
女	11 (36.67)	18 (34.62)
年龄		
≤60 岁	14 (46.67)	22 (42.31)
>60 岁	16 (53.33)	30 (57.69)
肿瘤部位		
结肠	NA	25 (48.08)
直肠	NA	27 (51.92)
Dukes 分期		
A/B	NA	24 (46.15)
C/D	NA	28 (53.85)
肿瘤分级		
低级	NA	30 (57.69)
高/中级	NA	22 (42.31)
是否发生淋巴结转移		
是	NA	16 (30.77)
否	NA	36 (69.23)

1.2 方法

在所有志愿者知情同意的前提下,采集空腹外周静脉血 8 mL。其中 4 mL 用淋巴细胞分离液(LiankeBio, 杭州, 中国)提取外周血单个核细胞(PBMC),再通过流式细胞仪(BECKMAN, 日本)检测外周血中的 MDSCs,所用抗体为 HLA-D (eBioscience, 货号:4310370, 美国)、CD33 (eBioscience, 货号:4296343, 美国)和 CD11b (eBioscience, 货号:4291932, 美国)。另外 4 mL 用于获取血清,密封编号并贮存于 -80 ℃,后期采用 ELISA 法检测其中 S100A9 水平(CUSABIO, 武汉, 中国)。

1.3 统计学处理

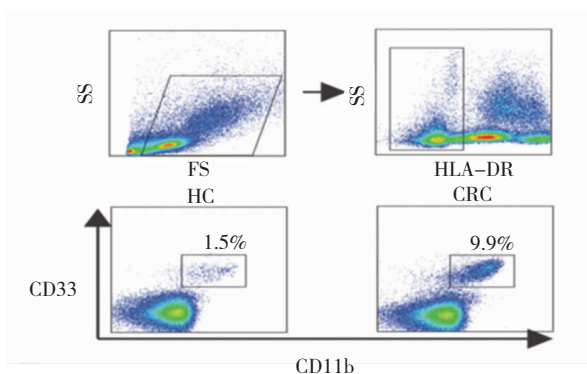
所有数据用 SPSS 20.0 和 Graphpad Prism6 软件统计分

析。Mann-Whitney 检验分析 CRC 患者与健康对照组外周血 PBMC 中 MDSCs 频数及血清 S100A9 的水平差异以及这两个指标在不同 CRC 临床病理参数中表达水平的差异; Spearman r 相关统计法分析血清 MDSCs 频数与 S100A9 水平之间的相关性; 并根据 ROC 曲线标准公式计算 AUC、灵敏度和特异度以评估这两个指标分别用于鉴别 CRC 患者的诊断效能以及对 CRC 患者进行分期和发生转移情况时的评估; 两项指标的联合检测采用平行试验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

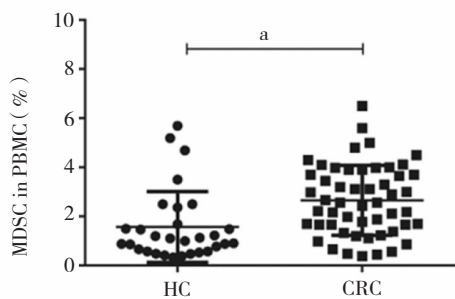
2 结果

2.1 CRC 患者外周血 PBMC 中 MDSCs 频数升高

采用流式细胞术分选出对照组及 CRC 患者外周血中的 MDSCs, 图 1A 为其代表性流式图, 分析 CRC 患者外周血 PBMC 中 MDSCs 频数为 $(2.66 \pm 1.43)\%$, 对照组为 $(1.57 \pm 1.44)\%$, 2 组的差异有统计学意义 ($U=400.000, P=0.000$), 如图 1B 所示。



A. 健康对照组 (HC) 与 CRC 患者组外周血中 MDSCs 流式检测的代表图



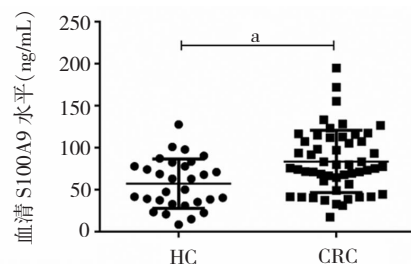
注: a, $P < 0.001$

B. 健康对照组 (HC, $n=30$) 与 CRC 患者组 ($n=52$) 的 MDSCs 频数比较

图 1 MDSCs 频数的比较 (流式细胞术)

2.2 CRC 患者血清 S100A9 水平明显升高

通过 ELISA 检测发现对照组血清 S100A9 为 (57.4 ± 29.3) ng/mL, CRC 患者血清 S100A9 则高达 (83.6 ± 37.2) ng/mL, 差异有统计学意义 ($U=460.000, P=0.002$), 如图 2 所示。



注: a, CRC 患者组 ($n=52$) 与健康对照组 ($n=30$) 血清 S100A9 水平的比较, $P < 0.01$

图 2 CRC 组与健康对照组血清 S100A9 的表达 (ELISA)

2.3 CRC 患者外周血 PBMC 中 MDSCs 频数与血清 S100A9 水平成正相关

已知 CRC 患者血液中的 MDSCs 与 S100A9 均呈高水平, 本研究采用 Spearman 相关分析这两者之间的相关性, 发现在 MDSCs 的频数与血清 S100A9 的含量呈正相关 ($r_s=0.380, P=0.010$), 如图 3 所示。

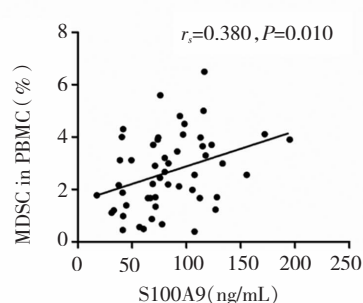


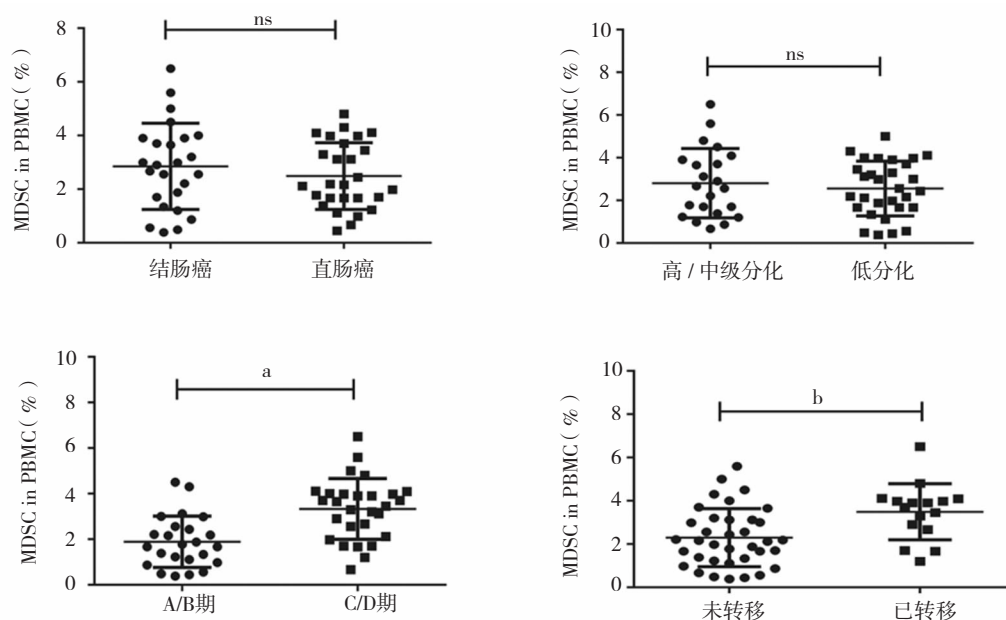
图 3 CRC 患者 ($n=52$) 外周血 PBMC 中 MDSCs 频数与血清 S100A9 水平

2.4 外周血 MDSCs 频数在 C/D 期及淋巴结转移的 CRC 患者中明显增加

结合电子病历分析实验结果, 本研究发现在结肠癌患者和直肠癌患者外周血 PBMC 中 MDSCs 频数无明显差异 ($U=300.000, P=0.498$), 同时 CRC 患者低分化组与高/中分化组中 MDSCs 频数程度也无明显差异 ($U=312.000, P=0.744$); 但是, Dukes 分期为 C/D 期和已有淋巴结转移患者的 MDSCs 频数则明显高于 A/B 期 ($U=138.000, P=0.000$) 及尚未发生淋巴结转移 ($U=148.000, P=0.005$) 的患者。结果如图 4 所示。

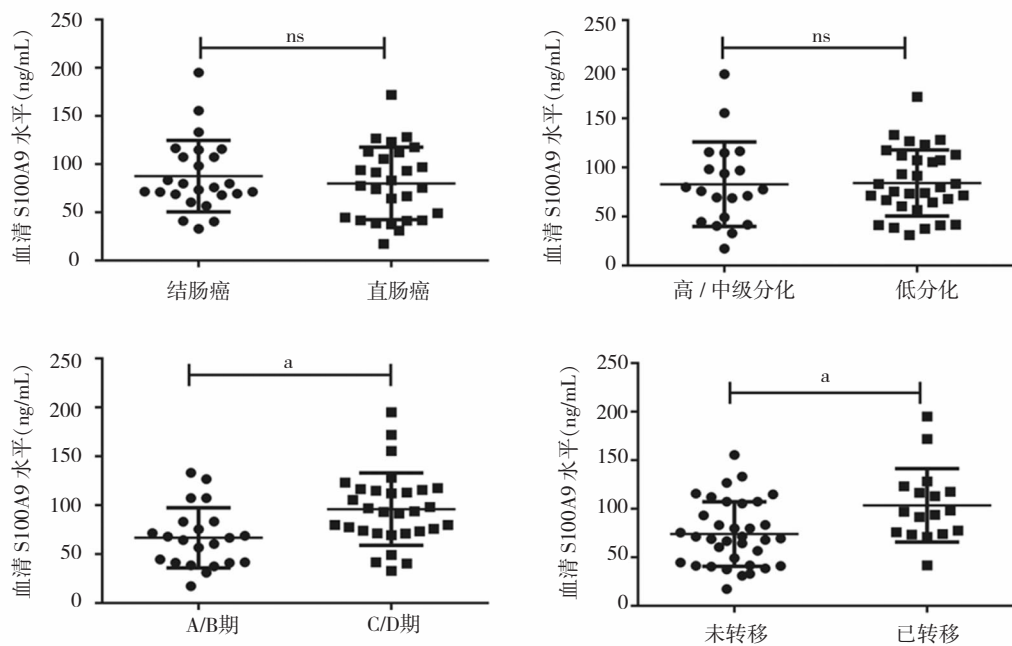
2.5 血清 S100A9 水平在 C/D 期及淋巴结转移的 CRC 患者中明显增加

通过电子病历和实验结果分析发现在结肠癌患者和直肠癌患者中, 血清 S100A9 蛋白水平无明显差异 ($U=310.000, P=0.621$), 并且 CRC 患者低分化组与高/中分化组中血清 S100A9 水平也无明显差异 ($U=216.000, P=0.053$)。但是, C/D 期患者的血清 S100A9 则显著性高于 A/B 期 ($U=169.000, P=0.003$); 同样, 相对于未发生淋巴结转移的患者, 已发生转移患者的 S100A9 水平也明显增高 ($U=155.000, P=0.005$), 如图 5 所示。



注: ns, 结肠癌患者组($n=25$)和直肠癌患者组($n=27$)以及高/中分化组($n=22$)与低分化组($n=30$)外周血 MDSCs 频数的比较, $P>0.05$
a: A/B 期患者($n=24$)与 C/D 期患者($n=28$)外周血 MDSCs 频数的比较, $P<0.001$; b: 转移组($n=16$)与未转移组患者($n=36$)外周血 MDSCs 频数的比较, $P<0.01$

图 4 临床病理参数不同的 CRC 患者外周血 PBMC 中 MDSCs 频数的比较



注: ns, 结肠癌患者组($n=25$)和直肠癌患者组($n=27$)以及高/中分化组($n=22$)与低分化组($n=30$)血清 S100A9 的比较, $P>0.05$
a: A/B 期患者($n=24$)与 C/D 期患者($n=28$)以及转移组($n=16$)与未转移组($n=36$)血清 S100A9 的比较, $P<0.01$

图 5 临床病理参数不同的 CRC 患者血清 S100A9 含量的比较

2.6 外周血 MDSCs 及血清 S100A9 水平对 CRC 的诊断价值
采用 SPSS.20 软件和 Graphpad Prism 6.01 软件进行 ROC 曲线分析发现外周血 MDSCs 及血清 S100A9 对 CRC 的诊断、Dukes 分期及是否有淋巴结转移均有一定的诊断价值

($AUC>0.500$, $P<0.010$), 结果见图 6。并且联合检测两者, 对 CRC 的 Dukes 分期及转移情况的分析具有一定的参考意义, 见表 2。

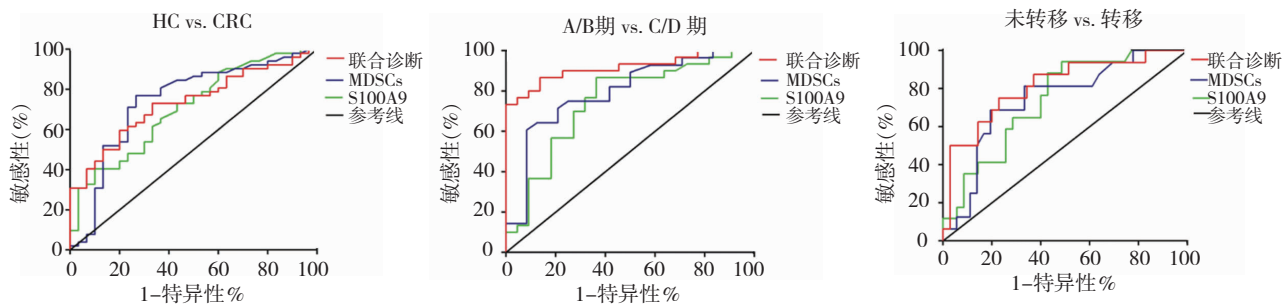


图 6 外周血 MDSCs 及血清 S100A9 在 CRC 中的诊断效能分析

表 2 血清 S100A9 及 MDSCs 频数两者检测指标的效能分析

	HC vs. CRC			A/B 期 vs. C/D 期			转移 vs. 未转移		
	S100A9	MDSCs	联合诊断	S100A9	MDSCs	联合诊断	S100A9	MDSCs	联合诊断
AUC	0.705	0.743	0.732	0.745	0.864	0.915	0.724	0.741	0.814
95%CI	0.590~0.820	0.624~0.862	0.625~0.839	0.604~0.885	0.767~0.961	0.837~0.993	0.584~0.865	0.597~0.886	0.684~0.944
临界值	90.97(ng/mL)		90.97(ng/mL)	69.16(ng/mL)		69.16(ng/mL)	70.24(ng/mL)		70.24(ng/mL)
		1.59%	或 1.59%		3.06%	或 3.06%		3.25%	或 3.25%
敏感性(%)	73.1	73.3	66.7	86.7	73.3	86.7	93.8	68.8	75.0
特异性(%)	56.1	76.9	73.1	63.6	81.8	86.4	51.4	80.0	77.1
P 值	0.002	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.011	0.006	0.000

3 讨论

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,但由于尚无特殊有效的诊治方法,以致其发病率和死亡率居高不下。深入研究其发病机制、寻找新的诊断标志物和治疗靶点,可为改善其临床诊治效果提供新的依据和线索。

MDSCs是重要的免疫抑制细胞,在病理状态下,MDSCs 的分化停滞,并分泌大量的活性分子如精氨酸酶 1(Arg1)、诱导型 NO 合酶(iNOS)和活性氧(ROS)等^[9-12],以下调 TCR(T cell receptor)上的 α 、 β 链及 CD3 ζ 链的表达,同时也抑制 T 细胞 IL-2 受体下游的信号级联,从而使 T 细胞失活,导致机体的细胞免疫耐受。由此可见 MDSCs 在机体的免疫调节和内环境自稳调节中发挥着至关重要的作用,而 MDSCs 在组织或外周血中的含量增加成为肿瘤、败血症、自身免疫性疾病、病毒及寄生虫感染等疾病的共同特征^[13-16],这使得 MDSCs 可能成为诊断及检测多种疾病潜在的标志物。

Mantovani^[17]在 2011 年揭示了慢性炎症与肿瘤的关系,而作为中性粒细胞趋化因子的 S100A9 在

小鼠原位 CRC 模型和临床标本中的肿瘤细胞中高表达^[18],而本课题组前期研究表明 S100A9 能在体外通过 Wnt/ β -catenin 信号通路直接促进 CRC 细胞的存活及转移^[7],这些数据表明 S100A9 可直接参与 CRC 的发展。已有文章建议可将 S100A 作为 CRC 血清标志物的候选^[19],因此,本文进一步研究了 S100A9 与 CRC 疾病进程之间的关系及其诊断价值。

本研究发现 CRC 患者外周血中的 MDSCs 及血清中的 S100A9 含量均明显高于正常对照组,其差异具有统计学意义,验证了以前研究的结论。此外, S100A9 是中性粒细胞强有力的趋化因子,并以 Mac-1 依赖的方式诱导中性粒细胞与纤维蛋白原的黏附^[20-21]。在 CRC 中,高水平的 S100A9 蛋白是否与 MDSCs 存在相关性? 本研究通过 Spearman 相关分析发现两者之间存在正相关,由此说明 S100A9 可能是介导 CRC 肿瘤微环境中 MDSCs 累积的因素之一,但 S100A9 对 MDSCs 的具体调控机制有待在未来的工作中进一步证实。

为研究两者与 CRC 疾病进展的关系,本研究根据肿瘤部位、是否转移、Dukes 分期及临床分级进行分组,发现 MDSCs 及 S100A9 水平在 C/D 期或伴有淋巴结转移的 CRC 患者中显著增加,而与肿瘤发生

部位和临床分级无关。最后,采用 ROC 曲线下面积 AUC 评估 MDSCs 和 S100A9 对 CRC 的诊断效能,测出 AUC 均大于 0.7,并且联合两者检测更有利于 CRC 患者中晚期或伴有淋巴结转移的患者的检出。这些结果说明血清 S100A9 与 MDSCs 潜在的作为血清标志物诊断及评估 CRC 的临床价值。

综上所述,在 CRC 中,血清 S100A9 的水平显著增加,同时伴有外周血 MDSCs 的频数增加,并对 CRC 的转移及 Dukes 分期的诊断分析具有较大的作用。这为分析 CRC 是否转移及 Dukes 分期提供了一项简单快捷的诊断方式,也为研究 CRC 发展机制提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Amado NG, Predes D, Moreno MM, et al. Flavonoids and Wnt/ β -catenin signaling: potential role in colorectal cancer therapies[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(7): 12094–12106.
- [2] Ko JS, Bukowski RM, Fincke JH. Myeloid-derived suppressor cells: a novel therapeutic target[J]. Current Oncology Reports, 2009, 11(2): 87–93.
- [3] Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, et al. The role of myeloid-derived suppressor cells(MDSC) in cancer progression[J]. Vaccines, 2016, 4(4): 36.
- [4] Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system[J]. Nature Reviews Immunology, 2009, 9(3): 162–174.
- [5] Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy[J]. J Innate Immun, 2012, 4(1): 31–40.
- [6] Markowitz J, Carson WE. Review of S100A9 biology and its role in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1835(1): 100–109.
- [7] Duan L, Wu R, Ye L, et al. S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/ β -catenin pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62092.
- [8] Zhao F, Hoechst B, Duffy A, et al. S100A9 a new marker for monocytic human myeloid-derived suppressor cells[J]. Immunology, 2012, 136(2): 176–183.
- [9] Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours[J]. Nature Reviews Immunology, 2012, 12(4): 253–268.
- [10] Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism[J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5(8): 641–654.
- [11] Schmielau J, Nalesnik MA, Finn OJ. Suppressed T-Cell receptor ζ chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients[J]. Clinical Cancer Research, 2001, 7(3S): 933–939.
- [12] Otsuji M, Kimura Y, Aoe T, et al. Oxidative stress by tumor-derived macrophages suppresses the expression of CD3 ζ chain of T-cell receptor complex and antigen-specific T-cell responses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(23): 13119–13124.
- [13] Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis[J]. Journal of Experimental Medicine, 2007, 204(6): 1463–1474.
- [14] Norris BA, Uebelhoer L, Nakaya H, et al. Chronic but not acute virus infection induces sustained expansion of myeloid suppressor cell numbers that inhibit viral-specific T cell immunity[J]. Immunity, 2013, 38(2): 309–321.
- [15] Crook KR, Jin M, Weeks MF, et al. Myeloid-derived suppressor cells regulate T cell and B cell responses during autoimmune disease[J]. J Leukoc Biol, 2015, 97(3): 573–582.
- [16] Sanctis FD, Solito S, Ugel S, et al. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets[J]. BBA-Reviews on Cancer, 2016, 1865(1): 35–48.
- [17] Mantovani A. Cancer: inflaming metastasis[J]. Nature, 2009, 457(7225): 36–37.
- [18] 张 滕, 巴彩霞, 田建虎. S100A9 的生物学效应及在肿瘤表达中的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2016, 32(3): 160–162.
- [19] Kim HJ, Kang HJ, Lee H, et al. Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer[J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(3): 1368–1379.
- [20] Newton RA, Hogg N. The human S100 protein MRP-14 Is a novel activator of the β 2 integrin Mac-1 on neutrophils[J]. Journal of Immunology, 1998, 160(3): 1427–1435.
- [21] Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, et al. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion[J]. Journal of Immunology, 2003, 170(6): 3233–3242.

(责任编辑:唐秋姗)