

非小细胞肺癌的脉管内侵犯与微转移、微血管密度关系的研究

张静渊¹, 尹 荣², 徐新宇^{1*}

(¹南京医科大学附属江苏省肿瘤医院病理科, ²胸外科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:研究非小细胞肺癌微转移与微血管密度的特点,分析肿瘤的脉管内侵犯与微转移、微血管密度之间的关系。方法:采用免疫组化染色方法应用 CD34 单抗检测 47 例肿瘤组织的脉管内侵犯及微血管密度;采用 RT-PCR 技术检测 47 例患者外周血中 CK19 mRNA 的表达。结果:47 例患者中 18 例有脉管内侵犯,其平均微血管密度为 29.3 ± 3.3 ,高于非脉管内侵犯的平均微血管密度 25.2 ± 4.7 ($P < 0.05$);18 例有脉管内侵犯病例中,有 13 例 CK19 mRNA 阳性,5 例阴性,29 例无脉管内侵犯病例中,9 例 CK19 mRNA 阳性,20 例阴性,具有显著差异性 ($P < 0.05$)。脉管内侵犯与年龄、肿瘤大小、分化程度无关 ($P > 0.05$),而与肿瘤的胸膜浸润、淋巴结转移及远处转移密切相关 ($P < 0.05$)。结论:非小细胞肺癌的脉管内侵犯与微转移、微血管密度之间的关系密切,是评估肿瘤生物学行为的重要临床病理特征。

[关键词] 非小细胞肺癌;脉管内侵犯;RT-PCR;微血管密度;微转移

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-887-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130706

Microvessel density and micrometastasis in patients with vascular-invaded non-small cell lung cancer

Zhang Jingyuan¹, Yin Rong², Xu Xinyu^{1*}

(¹Department of Pathology, ²Department of Thoracic Surgery, Jiangsu Province Cancer Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210009, China)

[Abstract] Objective: To detect the clinicopathologic characters of micrometastasis and microvessel density (MVD) occur in non-small cell lung cancer (NSCLC), and to explore the correlation among the former factors and those cases with vascular invasion. **Methods:** Vascular invasion and MVD was recorded by immunohistochemistry staining to CD34. Blood samples from 47 patients were examined for CK19 mRNA expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. **Results:** Serum CK19 mRNA positive was recorded in 13/18 cases with vascular invasion versus 9/29 in cases without invasion, with statistically difference. The average MVD in the invasion group was (29.3 ± 3.3), higher than the non-invasion group (25.2 ± 4.7). **Conclusion:** CK19 mRNA positive, pleura invasion, lymphnode state, metastasis and MVD are significantly correlated with vascular invasion in NSCLC patients, and these factors could be used to assess biological behavior of NSCLC.

[Key words] NSCLC; vascular invasion; RT-PCR; microvessel density; micrometastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7):887-891]

脉管内侵犯是非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 临床常见的病理学特征, Roberts 等^[1]的研究结果更进一步证实了脉管内侵犯是影响患者生存率的重要因素,但是其具体机制尚待研究。1989 年 PCR 技术的发明使针对肿瘤微

转移的研究有了更精确的方法^[2]。近期研究表明,外周血中 CK19 mRNA 可作为 NSCLC 的微转移检测最重要的参考指标之一^[3-5]。本研究检测了 47 例患者外周血中循环肿瘤细胞 (circulating tumor cells, CTCs)^[6] 的 CK19 mRNA 表达情况以及肿瘤组织中微血管的分布情况,分析肿瘤的脉管内侵犯与微转移、微血管密度 (microvessel density, MVD) 之间的关系,探寻脉管内侵犯与 NSCLC 转移相关的临床病理学特征之间的关系。

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(81201830)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: Redxy@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

收集南京医科大学附属江苏省肿瘤医院 2012 年 4 月~2012 年 12 月 47 例 NSCLC 患者外周血和手术切除标本。男 25 例,女 22 例;年龄 39~78 岁,术前无放疗、化疗。所有病例均经病理证实,同时依据患者年龄、肿瘤大小、分化程度、组织学类型、浸润胸膜、淋巴结转移及远处转移进行分组。

TRIzol 试剂盒、总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒(美国 Gibco 公司),*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 及 DNA Marker (上海生工生物技术有限公司),CD34 单克隆抗体(北京中杉金桥公司)。主要仪器有 Biofuge 15R 台式高速低温离心机、PCR 仪、电泳仪和 TMXRS 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),CliniBio 128D RNA/DNA/蛋白浓度检测仪(奥地利 ASYS-Hitech 公司)。

1.2 方法

1.2.1 脉管内侵犯的判断

肺大体切除标本经 10%中性福尔马林溶液固定后病理取材,石蜡包埋,分别进行 HE 和免疫组化染色,观察肿瘤组织中脉管内侵犯的情况。HE 染色判断阳性参照 Hyung 的标准^[7];血管内皮层或平滑肌层中出现肿瘤细胞,或管腔中的肿瘤细胞周围存在纤维蛋白血凝块或红细胞判为脉管内侵犯;免疫组化染色阳性判断参照 Peter Bimer 的标准^[8];CD34 标记出的内皮细胞管腔内出现肿瘤细胞即判为脉管内侵犯,不一定要周围一定要有血凝块或红细胞存在。47 例标本中只要有 1 种方法检测出脉管内侵

犯即认为脉管内侵犯阳性。

1.2.2 血循环微转移的检测

所有患者术前抽取外周血 5 ml,常规 EDTA K2 抗凝。CK19 mRNA 的检测:①采用 Ficoll 梯度离心法分离出血标本中的单个核细胞,抽提总 RNA 参照 TRIzol Reagent 试剂盒说明书操作;②逆转录合成 cDNA 逆转录反应体系 A 液:Oligo(dT)3 μ l(终浓度 0.01 g/L),RNA 2 μ l(终浓度 1 g/L),补 DEPC 处理过的水至 14 μ l,70 $^{\circ}$ C 反应 5 min,反应结束后迅速置冰上,3 min 后离心。再加入 B 液:5 \times 逆转录缓冲液 6 μ l(终浓度 1 \times),dNTPs 1.5 μ l(终浓度 0.05 mmol/L),Rnasin 25 U,M-MLV 200U,补 DEPC 处理过的水至 16 μ l,混匀、离心。42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,95 $^{\circ}$ C 反应 5 min 灭活逆转录酶,-80 $^{\circ}$ C 低温保存;③PCR 反应体系:模板 cDNA 2 μ l,*Taq* DNA 聚合酶 25 U,10 \times buffer 5 μ l,终浓度为 1.5 μ mol/L 的 MgCl₂ 3 μ l,终浓度为 0.2 mmol/L 的 dNTPs 1 μ l,终浓度为 0.5 mmol/L 的上下游引物(上海生工生物技术工程技术有限公司合成)各 1 μ l(表 1),补 DEPC 处理过的水至总体积 50 μ l,反应在 PTC-150 型热循环仪上进行,98 $^{\circ}$ C 反应 5 min 蛋白变性后加入 *Taq* DNA 聚合酶,进入热循环。反应条件为:CK19 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环; β -actin 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 32 个循环。④琼脂糖凝胶电泳及荧光分析,3 μ l PCR 产物及 1 μ l DNA(150 bp)标准参照物加样于 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化已锭染色,紫外灯下检测扩增产物,摄片保存。

1.2.3 微血管密度的检测

表 1 CK19 mRNA 及内参照 β -actin 的引物序列

Table 1 The primers of CK19 mRNA and the internal control β -actin

cDNA	引物	序列	产物长度(bp)
CK19	Outer sense	5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCAACGACCGC-3'	1 069
	Inner sense	5'-TTATTGGCAGGTCAGGAGAAGAGCC-3'	
β -actin	Outer sense	5'-TCATCACCATTTGGCAATGAG-3'	200
	Inner sense	5'-CACTGTGTGGCGTACAGGT-3'	

选取 47 例患者手术切除标本中的癌组织,中性福尔马林固定,石蜡包埋组织切片 4 μ m,免疫组织化学染色采用 EnVision 法。MVD 判断标准及计数参照 Weidner 报道的方法^[9];以镜下胞质内有棕黄色颗粒为血管内皮细胞阳性判断标准,肿瘤区域内单个或呈丛的内皮细胞,无论成腔与否均视为单个微血管,凡管径大于 8 个红细胞或有肌层的血管不

予计数。先在低倍镜($\times 40$, $\times 100$)下浏览切片全貌,定位血管密度最高处,即热点(hot spot)。再在高倍镜($\times 400$)下计数 5 个热点视野中微血管数目,取其平均数作为该患者的 MVD 值。遇到管腔很大的特殊类型的微血管,其单位面积内的血管数相对较少,则采用由 Tanigawa 等^[10]报道的改良法计算,即计数区域每 40 μ m 宽度的 MVD 值记为 1。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,定量资料的描述采用均数和标准差($\bar{x} \pm s$),定性资料的描述采用构成比,脉管内侵犯阳性和阴性患者间 CK19 mRNA 表达情况以及其与临床病理特征之间的比较采用 χ^2 检验;脉管内侵犯阳性和阴性患者间肿瘤组织 MVD 的比较采用 t 检验;HE 染色和免疫组化染色间的比较采用确切概率法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色和免疫组化染色发现脉管内侵犯

HE 染色发现脉管内侵犯 9 例,免疫组化染色发现脉管内侵犯 18 例,两者之间差异显著 ($P < 0.01$,表 2),显示免疫组化染色组癌栓检出率明显高于 HE 染色组。

2.2 免疫组化 CD34 染色发现脉管内侵犯与肿瘤微血管密度的关系

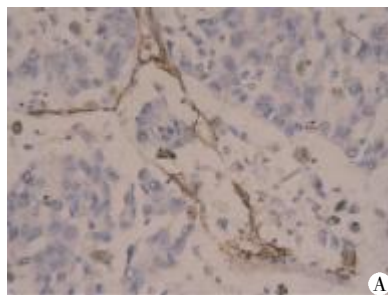


表 2 HE 染色和免疫组化染色发现脉管内侵犯的比较

Table 2 The comparison of method between HE staining and immunochemistry staining (n)

免疫组化染色	HE 染色		P 值
	阳性	阴性	
阳性	9	9	< 0.01
阴性	0	29	

2 种染色方法的比较采用配对四格表确切概率法。

47 例患者中发现脉管内侵犯阳性 18 例(图 1),阴性 29 例,两组之间肿瘤 MVD 差异有统计学意义($P < 0.05$,表 3),显示脉管内侵犯与肿瘤 MVD 相关。

2.3 脉管内侵犯与外周血 CK19 mRNA 阳性的关系

47 例患者中外周血 CK19 mRNA 阳性者 22 例,阴性者 25 例。外周血 CK19 mRNA 检测阳性者在脉管内侵犯阳性患者中表达为 13/18,明显高于脉管内侵犯阴性患者的表达 9/29($P < 0.05$,表 4)。



A:CD34 显示脉管内癌栓(EnVision,×400);B:低倍镜下选取肿瘤“热点”区域进行 MVD 计数(EnVision,×100)。

图 1 CD34 判定脉管侵犯和“热点”区域 MVD 计数

Figure 1 Immunohistochemistry result of CD34 showed the vascular invasion and the hot spot area

表 3 脉管内侵犯与肿瘤微血管密度的比较

Table 3 The correlation of vascular invasion and MVD value ($\bar{x} \pm s$)

脉管内侵犯	n	MVD	t 值	P 值
阳性	18	29.2 ± 3.3	2.987	$P < 0.05$
阴性	29	25.2 ± 4.7		

表 4 脉管内侵犯和外周血 CK19 mRNA 的比较

Table 4 The correlation of vascular invasion and serum CK19 mRNA expression

CK19 mRNA 的表达	n	脉管内侵犯		构成比(%)	χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			
阳性	22	13	9	59.1	7.567	< 0.05
阴性	25	5	20	20.0		

2.4 脉管内侵犯与临床病理特征的关系

脉管内侵犯与患者的年龄、肿瘤大小、分化程度、组织学类型无关($P > 0.05$),而与肿瘤的胸膜浸润、淋巴结状态和远处转移的情况相关($P < 0.05$,表 5)。

3 讨论

肺癌的转移是患者预后不佳的重要原因之一^[11],

在肺癌的发展过程中,微转移、微血管侵犯是肿瘤发生转移的关键步骤,因此寻找更有效的评价肺癌转移的标准是医学工作者们关注的热点。但目前为止,未发生远处转移的 NSCLC 病例,除了在病理诊断中发现瘤周或淋巴结脉管内侵犯是最直接的早期转移证据以外,其他更早阶段的微转移、微血管侵犯很难被及时发现。本研究尝试将免疫组化标记寻找脉管

表5 脉管内侵犯和 NSCLC 临床病理特征的比较

Table 5 The comparison among various clinicopathologic characters of NSCLC and vascular invasion

临床病理特征	n	脉管内侵犯		构成比(%)	χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			
年龄(岁)						
< 50	15	5	10	33.3		
≥ 50	32	13	19	40.6	0.230	> 0.05
肿瘤大小(cm)						
< 5	26	11	15	42.3		
≥ 5	21	7	14	33.3	0.396	> 0.05
分化程度						
高分化	12	3	9	25.0		
中分化	20	8	12	40.0		
低分化	15	7	8	46.7	2.353	> 0.05
组织学类型						
鳞癌	12	3	9	25.0		
腺癌	25	12	13	48.0		
腺鳞癌	2	1	1	50.0		
梭形细胞癌	1	0	1	0		
伴神经内分泌分化癌	7	2	5	28.6	1.653	> 0.05
浸润胸膜						
有	33	16	17	48.5		
无	14	2	12	14.3	4.765	< 0.05
淋巴结转移						
有	28	14	14	50.0		
无	19	4	15	21.1	4.137	< 0.05
远处转移						
有	9	9	0	100.0		
无	38	9	29	23.7	18.630	< 0.05

内侵犯,与检测患者外周血中 CTCs 的微转移相关分子生物学标志相结合,可能会对评价 NSCLC 转移的相关性研究有新的提示。

原发肿瘤发生转移通常经历 4 步^[12]:①微量肿瘤细胞自原发灶脱离,形成 CTCs;②适应新环境,逃避机体免疫;③侵袭远处组织;④在新组织中新生血管形成,肿瘤生长。而肿瘤侵犯微血管、淋巴管是第一步发生的基础,进而发生微转移,最终进展为淋巴结转移或远处转移。本研究中采用 RT-PCR 法检测 47 例非小细胞肺癌患者外周血中循环肿瘤细胞 CK19 mRNA 的表达,结果显示 18 例侵犯脉管的患者中 13 例外周血 CK19 mRNA 阳性,而 29 例无侵犯组中 CK19 mRNA 阳性者仅 9 例,两者差异显著;且脉管内侵犯阳性组的平均 MVD 明显高于无侵犯组。因此证实了 NSCLC 患者中肿瘤对脉管的侵犯与微转移、MVD 之间关系密切,可能是影响到这部分病例进展为淋巴道转移或远处转移的重要因素。本实验还通过与其他临床病理特征的比较发现,脉管

内侵犯和 NSCLC 是否发生浸润胸膜、淋巴结状态及远处转移相关,而上述因素已被证实可以影响患者的远期生存率。本组中 9 例外周血 CK19 mRNA 阳性但传统检测手段却未检出脉管内侵犯,提示可能已发生了微转移,随着现代分子生物学检测技术的不断发展和完善,可能为 NSCLC 患者个体化治疗方案提供更有价值的参考依据。

肿瘤的生长、扩散与肿瘤血管生成密切相关。在大多数人类肿瘤中,侵袭性的发展与其形成新生血管能力的进展联系紧密^[13]。本研究采用 CD34 标记肿瘤组织中的血管内皮细胞,并计数肿瘤的 MVD,结果显示脉管内侵犯组较无侵犯组有更高的 MVD 值,差异有统计学意义。其成因可能有:①丰富的新生血管为快速生长的肿瘤提供了充分的营养支持;②血管数量的增多增加了肿瘤侵犯脉管的几率;③恶性肿瘤迅速生长的同时,可能通过自分泌或旁分泌进一步生成血管,两者相互影响进而改变微环境,不断促进肿瘤进展。

总之,免疫组化染色检测 NSCLC 患者的脉管内侵犯和 PCR 检测患者外周血 CK19 mRNA 是较易推广的有效检查手段。虽然诊断中可能会存在一些假阳性和假阴性,但对 NSCLC 患者较早发生转移的确认和指导治疗有很重要的临床意义。

[参考文献]

- [1] Roberts TE, Hasleton PS, Musgrove C, et al. Vascular invasion in non-small cell lung carcinoma[J]. J Clin Pathol, 1992, 45(7):591-593
- [2] Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction[J]. Ann Biol Clin, 1990, 48(8):579-582
- [3] 陈廷锋, 蒋国梁, 张宜勤, 等. 非小细胞肺癌根治性化疗前后外周血微转移的检测及其预后[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(5):365-368
- [4] 牛中喜, 周清华, 孙芝琳, 等. 检测 CK19 mRNA 和 MUC1 mRNA 诊断非小细胞肺癌淋巴结微转移[J]. 中国肺癌杂志, 2004, 7(3):209-213
- [5] 王潍博, 崔言刚, 姚舒洋. 肺特异性 X 蛋白角蛋白 19 及癌胚抗原基因在非小细胞肺癌淋巴结转移中的比较[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(2):121-124
- [6] 崇梅红, 王水, 查小明, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞的临床价值[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2012, 32(2):220-225
- [7] Woo JH, Jun HL. Prognostic impact of lymphatic and/or blood vessel invasion in patients with node-negative advanced gastric carcinoma[J]. Annals Of Surg Onco, 2002, 9(6):562-567
- [8] Birner P, Obermair A, Schindl M, et al. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer[J]. Clin Canc Res, 2001, 7(1):93-97
- [9] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasion breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1):1-8
- [10] Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, et al. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma; its clinical and prognostic significance[J]. Hepatology, 1997, 26(5):1216-1223
- [11] 冯蕾, 饶秋, 刘标, 等. TK1, Ki-67 在非小细胞肺癌组织中的表达及预后意义[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2012, 32(7):983-988
- [12] Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors[J]. Cancer, 1998, 82(8):1419-1442
- [13] Fan YZ, Sun W. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in tumors and potential tumor-target therapy[J]. World J Gastrointest Surg, 2010, 2(4):117-127

[收稿日期] 2013-01-17

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。