

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.05.11

抗CD₃₄单克隆抗体标记血管生成在非小细胞肺癌中的表达

朱冰 温剑虎

【摘要】 目的 探讨非小细胞肺癌中抗 CD₃₄单抗标记的血管生成的表达状况。方法 采用免疫组化法检测 81 例手术切除的非小细胞肺癌标本中抗内皮细胞表面抗原 CD₃₄单抗标记的血管生成。结果 CD₃₄以其染色的特异性、敏感性及清晰的背景而易于识别。统计学分析显示微血管密度同肺癌临床分期的进展有密切关系($P < 0.05$),但与淋巴结转移及其它临床病理特征无明显关系($P > 0.05$)。结论 肺癌中微血管密度在肺癌的发生、发展中可能起重要作用。

【关键词】 肺肿瘤 血管生成 免疫组化 微血管密度

【中图分类号】 R734.2 R730.3

Expression of angiogenesis labelled by anti-CD34 monoclonal antibody in non-small cell lung cancer ZHU Bing, WEN Jianhu. Department of Thoracic Surgery, The First Hospital, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, P. R. China

【Abstract】 Objective To determine the expression of angiogenesis labelled by anti-CD34 monoclonal antibody in non-small cell lung cancer. **Methods** Immunohistochemical detection for tumor-associated microvessels was performed to 81 non-small cell lung cancer tissues using anti-CD34 monoclonal antibodies directed against endothelial markers. **Results** Staining of CD34 was easy to identify because of its specificity, sensitivity and clear background. Statistic analysis showed that the microvessel count was significantly related to the TNM staging but not to lymph node metastasis and other clinicopathologic characteristics. **Conclusion** MVD may play an important role in the oncogenesis and development of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Angiogenesis Immunohistochemistry Microvessel density

This work was supported by a grant from Science and Technology Foundation of Chongqing (to WEN Jianhu X No. 98029).

大量研究证实,恶性肿瘤的生长和转移与肿瘤新生血管生成密切相关。肿瘤的血管生成不仅为肿瘤组织的生长提供营养及气体交换,同时也成为肿瘤细胞转移的最直接的门户^[1]。血管生成强度,即组织切片中微血管密度(microvessel density, MVD)或微血管计数,是判断肿瘤生物学行为的有效指标。本研究应用免疫组化 SP 法检测非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中血管内皮细胞膜抗原 CD₃₄的表达状况,对 MVD 进行人工计数和定量分析,以反映肿瘤血管生成状况,探讨原发性肺癌组织中血管生成的临床意义及其变化规律。

1 材料与方

本研究受重庆市科委科技攻关项目(98029)资助

作者单位 400016 重庆医科大学附属第一医院胸外科

1.1 临床资料 选择 1991~1998 年重庆医科大学附属第一医院胸外科手术切除后石蜡包埋组织标本 81 例,病理诊断为原发性 NSCLC,其中腺癌 31 例,鳞癌 50 例,男性 62 例,女性 19 例;年龄 30~78 岁,平均 55.7 岁。肿瘤最大径为 2~8 cm,平均 4.55 cm。病理分期采用 1986 年国际抗癌联盟(UICC)制定的肺癌分期系统及 1997 年第八届国际肺癌大会制定的分期补充标准^[2,3],其中 I 期 13 例,II 期 34 例,III~IV 期 34 例,病理学分级为 G₁ 12 例, G₂ 41 例, G₃ 28 例。

1.2 免疫组化染色主要步骤 全部标本均经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋组织,制成 5 μm 厚切片,切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精至水化;1% 甲醇双氧水浸泡 0.125% 胰酶消化,非免疫性动物血清封闭,免抗人 CD₃₄ 单克隆抗体,室温下孵育 60 分钟;生物素化二抗,37℃ 10 分钟。链亲和素-过氧化物酶溶液室温孵育

10 分钟 ,DAB 镜下控制显色 ,苏木素复染 ,中性树脂胶封片。以上试剂均购自福建迈新公司。

1.3 CD₃₄ 结果判定标准 阳性标准为由内皮细胞形成的条状、隙状等孤立或簇状结构棕黄染色及有管腔者 ,管腔小于 8 个红细胞大小的标记为一条血管 ,相互分离的内皮细胞按 1 条血管计数 ,血管腔大于 8 个红细胞或管壁可见平滑肌者不计入内^[4]。

1.4 计数方法 结果判定在盲法下进行 ,每张切片由两名病理医师分别计数。先于低倍光镜(40 倍和 100 倍)下确定 3 个血管着色最密集的区域 ,然后在 200 倍视野下计数微血管 ,取 3 个视野的均值作为 MVD。两

名医师计数差 10% 以上者重新计数。肿瘤内硬化区域和肿瘤细胞稀少区域内的微血管不进行计数^[4]。

1.5 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 *t* 检验进行分析。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 肺癌组织中的微血管染色状况 本研究采用抗 CD₃₄ 单抗对 81 例肺癌组织中微血管密度进行免疫组化染色 ,结果显示癌巢及癌细胞密集区 MVD 显著少于癌周区域及增生活跃区域 ,且癌巢与坏死组织间血管生成较多 ,坏死区血管完全破坏(图 1)。

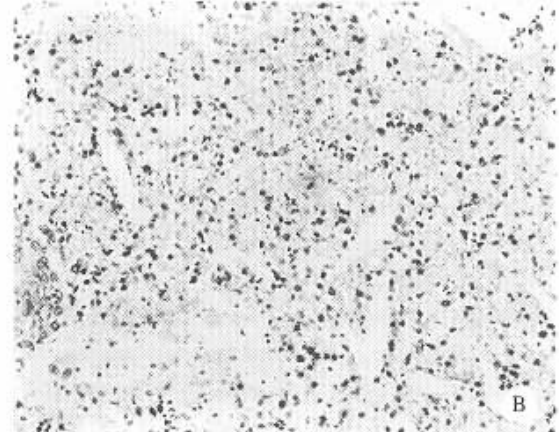
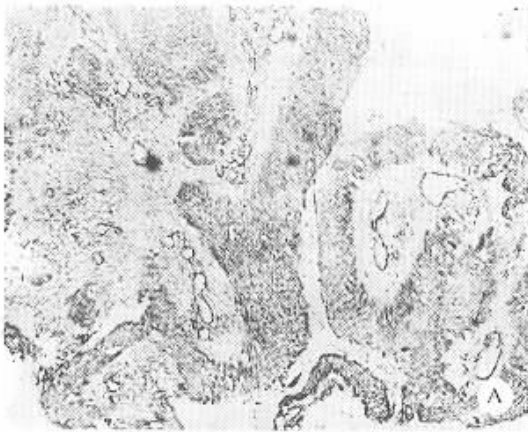


图 1 肺鳞癌组织中 CD₃₄ 抗原的免疫组化染色

A 肿瘤浸润区内血管生成丰富(SP 法 , × 100)

B 肿瘤坏死区血管完全被破坏(SP 法 , × 250)

Fig 1 Immunohistochemical staining for CD34 antigen in human lung squamous cell carcinoma

A There was high microvascular count in the tumor invasive area. (SP method , magnification , × 100)

B Microvascular was disrupted completely in the tumor necrotic area. (SP method , magnification , × 250)

2.2 肺癌组织中微血管计数 全组 81 例标本微血管计数为 19 ~ 96 条 ,平均为(43.75 ± 16.67)条。由表 1 可见 ,本研究未显示微血管计数与年龄、性别、淋巴结转移、组织类型、病理学分级以及肿瘤最大径等因素有明显关系。但在对肿瘤浸润度的研究中发现 ,T₁ 与 T₂₋₄ 组微血管计数存在非常显著差异($P < 0.01$) ,两两比较结果显示 T₁ 和 T₂ 组间存在显著性差异($P = 0.009$) ,I ~ II 期与 III ~ IV 期组间微血管计数的差异亦有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

1971 年 ,Folkman 提出“ 肿瘤的生长与扩散取决于血管生成 ”这一概念。近年来大量实验和临床研究证

实 ,新生肿瘤血管是肿瘤获取代谢营养的形态学基础 ,也是肿瘤细胞迁移游走形成转移的必经之路^[5]。由于肿瘤血管生成机制复杂 ,采用免疫组化方法标记微血管来反映血管生成并提供有价值的信息已被大多数研究所认可。肿瘤相关血管生成的免疫组化研究是用针对血管内皮细胞(EC)标志物的抗体(抗 FV III -RA、CD₃₁、CD₃₄ 等)完成的。尽管许多研究表明不同类型肿瘤中肿瘤相关血管生成同进展及预后相关 ,但由于 MVD 不能精确计数 ,结果也很不稳定。近年来报道 CD₃₄ 抗体对肿瘤内毛细血管、小血管 EC 稳定性及敏感性较强 ,有较强的可重复性^[6] ,故本研究采用抗 CD₃₄ 单抗来研究 NSCLC 中血管生成状况。

表1 NSCLC患者微血管计数与临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between microvessel counts and clinicopathological characteristics in 81 patients with non-small cell lung cancer

Characteristics	n	Microvessel counts		P value
		Mean	Range	
Age(years)				0.21
< 60	48	45.64 ± 18.09	19 ~ 96	
≥60	33	41.06 ± 14.25	21 ~ 81	
Sex				0.48
Male	62	43.10 ± 17.13	19 ~ 89	
Female	19	46.11 ± 15.65	29 ~ 96	
Histological type				0.86
Squamous cell carcinoma	50	44.02 ± 16.46	19 ~ 89	
Adenocarcinoma	31	43.32 ± 17.30	23 ~ 96	
Pathological grade				
G1	12	39.08 ± 18.34	20 ~ 79	0.44 ^①
G2	41	43.65 ± 14.60	19 ~ 89	0.60 ^②
G3	28	45.89 ± 18.82	23 ~ 96	0.33 ^③
Tumor size(cm)				0.89
≤3	28	44.40 ± 20.47	21 ~ 96	
> 3	53	43.60 ± 15.85	19 ~ 89	
Lymph node metastasis				0.77
Negative	28	43.04 ± 15.49	19 ~ 79	
Positive	53	44.13 ± 17.41	20 ~ 96	
TNM stage				0.04
I ~ II	47	40.51 ± 15.75	19 ~ 79	
III ~ IV	34	48.36 ± 17.10	28 ~ 96	
T-status				0.005 ^④
T1	28	37.07 ± 14.06	20 ~ 74	
T2	45	46.78 ± 16.10	19 ~ 89	0.009 ^⑤
T3-4	8	51.00 ± 23.04	29 ~ 96	

①G1 vs G2 ②G2 vs G3 ③G1 vs G3 ④T1 vs T2-4 ⑤T1 vs T2

研究表明,在许多实体瘤中,包括胃肠道肿瘤、子宫颈癌、鼻咽癌、乳腺癌等,都存在着活跃的血管形成,并发现其血管生成的活跃程度同这些肿瘤的发生、发展及预后相关。本组资料显示81例肺癌组织平均MVD为 43.75 ± 16.67 ,肿瘤周边与正常组织交界处的浸润区域、增生活跃区域的间质中存在着显著高于肿瘤中心的血管生成。随着肺癌的分期进展,I~II期与III~IV期组间血管生成存在显著性差异。微血管计数随浸润程度的进展也有类似倾向,T₁组与T₂₋₄组间的显著性差异提示肺癌进展过程中血管生成的增加起到了一定的促进作用。近来研究报道在胃癌及黑色素瘤中,肿瘤血管生成与血行转移相关,但与淋巴结转移无关^[7,8]。另有报道NSCLC中淋巴结转移与远处转移均与血管生成显著相关,但该研究是采用抗FVⅢ-RA进行标记的^[9]。本研究中淋巴结转移资料为术后获取,并用抗CD₃₄单抗来标记微血管生成。研究结果未能显示肿瘤血管生成同淋巴结转移有明显关系。我们认为,尽管NSCLC患者术后5年的复发率为20%~

40%,但通常I期NSCLC患者仅单独行手术治疗。Macchiarini等^[10]报道NSCLC中MVD与转移性疾患显著相关,但没有确切证据表明MVD与独立转移模型有关。因此进一步观测早期NSCLC患者血管生成状况与术后复发、转移及预后的关系,对于那些期望单独手术治愈的早期癌症患者的疗法选择具有潜在的指导意义^[11-13]。

肺癌的转移是一个复杂的过程,与血管生成之间的关系并不十分明了,但血管生成确实为肺癌的浸润、转移提供理想通道,因此,通过抑制肺癌血管生成进而抑制肺部肿瘤的浸润转移将为临床治疗提供良好的支持。而微血管计数作为血管生成活性或强度的定量指标之一,对于血管抑制药物的疗效检测十分有用,又与正性或负性血管生成因子存在密切关系。因此,MVD与肺癌的生长和复发、转移之间存在必然的、内在的规律性。通过对MVD的测定,将揭示研究肺癌生长和扩散规律的新的方向。

参 考 文 献

- 1 Gurdi AJ , Fischer L , Harris JR , et al. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* ,1994 ,86(8): 614-619.
- 2 Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* ,1997 ,111(6):1710-1717.
- 3 Mountain CF , Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* ,1997 ,111(6):1718-1723.
- 4 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* ,1995 ,36(1):169-173.
- 5 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent ?*J Natl Cancer Inst* ,1990 ,82(1):4-6.
- 6 Traweek ST , Kandalaf PL , Mehta P , et al. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD₃₄) in vascular neoplasia. *Am J Clin Pathol* , 1991 ,96(1):25-31.
- 7 Weidner N , Carroll PR , Tlax J , et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* ,1993 ,143(2):401-409.
- 8 Tanigawa N , Amaya H , Matsumura M , et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* ,1997 ,57 (6):1043-1046.
- 9 Fontanini G , Bigini D , Vignati S , et al. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. *J Pathol* , 1995 ,177(1):57-63.
- 10 Macchiarini P , Fontanini G , Hardin MJ , et al. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet* , 1992 ,340(8812):145-146.
- 11 Nesbitt JC , Putnam JB , Walsh GL , et al. Survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* ,1995 ,60(2):466-472.
- 12 Ginsberg RJ , Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1N0 non-small cell lung cancer study group. *Ann Thorac Surg* ,1995 ,60(3):615-623.
- 13 Martini N , Bains MS , Butt ME , et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* ,1995 ,109(1):120-129.

(收稿 :1999-06-02 修回 2000-01-17)

(本文编辑 李蓓兰)