

文章编号:1005-6947(2008)03-0246-04

· 基础研究 ·

大鼠胰腺癌和非癌胰腺组织 MV, TAM, MC 计数及意义

杨乐平, 杨竹林, 李青龙, 范文涛

(中南大学湘雅二医院肝胆胰疾病研究室, 湖南长沙 410011)

摘要:目的 探讨大鼠胰腺癌组织和非癌组织中 MV, TAM, MC 三者间的关系及其意义。方法 应用 ABC 免疫组化法测定 17 例大鼠胰腺癌、22 例非肿瘤胰腺组织及 10 例正常胰腺组织石蜡切片标本中 MV, TAM, MC。结果 36 例 SD 大鼠 3~5 个月内二甲苯蒽并诱发的胰腺癌发生率为 47.2%。胰腺癌组织中 MV, TAM, MC 均值分别为 76.56 ± 19.93 , 15.54 ± 5.93 , 14.87 ± 5.19 , 明显高于 10 例正常胰腺组织的 30.63 ± 14.77 , 11.01 ± 4.99 和 11.04 ± 5.03 以及模型组中非癌胰腺组织的 24.42 ± 11.32 , 10.99 ± 4.99 和 9.31 ± 4.64 , 差异均有显著性(均 $P < 0.01$); 且 5 个月组胰腺癌 TAM, MC 计数大于 3~4 个月组($P < 0.01$)。胰腺癌中 MV, TAM, MC 计数之间存在着密切的正相关(MV vs TAM, $r = 0.788$; MV vs MC, $r = 0.832$; TAM vs MC, $r = 0.635$)。结论 二甲苯并蒽置入 SD 大鼠胰腺实质内短期可获得较高的胰腺癌发生率, 大鼠胰腺癌中间质浸润的炎症细胞 TAM 和 MC 具有促进肿瘤血管生成作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(3): 246-249]

关键词: 胰腺肿瘤; 微血管计数; 肿瘤相关巨噬细胞; 肥大细胞; 免疫组织化学

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

Microvessel count (MV), tumor associated macrophage and mast cell count in pancreatic cancer and non-cancerous pancreatic tissues of SD rats

YANG Leping, YANG Zhulin, LI Qinglong, FAN Wentao

(Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To investigate relation of the MV, count of tumor associated macrophage (TAM) and mast cell (MC) in pancreatic cancer tissues and non-cancerous tissues of rats. **Methods** Immunohistochemical method of ABC was used for detecting the MV TAM, MC counts on the routinely paraffin-embedded sections of 17 cases of pancreatic cancer tissues of rats, 22 cases of non-cancerous pancreatic tissues of rats and 10 cases of normal pancreatic tissues of rats. **Results** In 36 rats, 17 cases of pancreatic ductal adenocarcinoma (47.2%) within 3-5 months in 36 rats with implanted DMBA. The mean count of MV, TAM and MC in the 17 cases of pancreatic adenocarcinoma tissues of rats was 76.56 ± 19.93 , 15.54 ± 5.93 and 14.87 ± 5.19 respectively, which was significantly higher than that in the 10 cases of normal pancreatic tissues (30.63 ± 14.77 , 11.01 ± 4.99 and 11.04 ± 5.03), which was also higher than those in the model group of non-cancerous pancreatic tissues (24.42 ± 11.32 , 10.99 ± 4.9 and 9.31 ± 4.64). The counts of TAM and MC of rats of pancreatic cancer within five months were higher than that within 3-4 months ($P < 0.01$). The closely positive correlations were also found among the counts of MV, TAM and

收稿日期: 2007-11-07; 修订日期: 2008-02-17。

作者简介: 杨乐平, 男, 中南大学湘雅二医院副教授, 主要从事肝胆胰临床与基础方面的研究。

通讯作者: 杨竹林 E-mail: yangzhulin8@sina.com

MC (MV vs TAM, $r = 0.788$; MV vs MC, $r = 0.832$; TAM vs MC, $r = 0.635$). **Conclusions** A high incidence of pancreatic cancer can be obtained in a short time by use of DMBA directly implanted into the parenchyma of pancreas in rats. TAM and MC might have important effect on angiogenesis of pancreatic cancer of SD rats.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (3) : 246 - 249]

Key words: Pancreatic Neoplasms; MV; TAM; MC; Immunohistochemistry

CLC number: R 735.9

Document code: A

肿瘤的微血管计数 (microvessel, MV) 可以直接反映肿瘤血管生成的程度, 与肿瘤进展、浸润和转移以及患者的预后有密切关系^[1-3]。浸润至肿瘤部位的巨噬细胞分化为肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophage, TAM), 对肿瘤的血管生成、生长速度、基质形成及溶解有着诸多影响^[4-6]。胰腺癌基质中还分布着一定数量的肥大细胞 (mast cell, MC), 可以分泌多种生长因子和细胞因子, 对肿瘤的血管生成和肿瘤进展预后也有明显协同促进作用^[6-8]。笔者应用二甲基苯并蒽 (DMBA) 置入 SD 大鼠胰腺实质内建立胰腺癌模型, 建模后检测胰腺癌和非癌组织中 MV, TAM, MC, 并探讨三者的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型

SD 大鼠 50 只, 由湘雅二医院实验动物中心提供, 体重 150 ~ 200 g, 雌雄不分, 随机分为 2 组: 胰腺癌模型组 (40 只) 和空白对照组 (10 只)。动物术前禁食 24 h, 不禁水。2 % 戊巴比妥钠 1.5 mL/kg 腹腔内注入麻醉, 经上腹正中切口 2 cm 进腹。胰癌组在暴露胰腺后, 于体尾部切开胰腺被膜及部分实质, 深 1 mm, 置入 9 mg DMBA, 缝合胰腺被膜, 关腹后在普通环境中饲养。对照组仅行胰腺被膜及实质切开和胰腺被膜缝合。每日观察动物的精神、饮食及活动情况, 动物自然死亡或处死后, 立即进行尸检。在第 3, 4, 5 个月分别随机处死胰癌组大鼠 7, 9 和 20 只。对照组大鼠于第 5 个月全部处死。

1.2 病理学观察

(1) 大体观察胰腺及全身主要脏器的肉眼改变; (2) 大鼠处死后取胰腺全部及肝、胆囊、胆总管、胃、肠、肺组织置入 10 % 福尔马林固定 16 ~ 18 h, 常规石蜡包埋, 苏木素 - 伊红 (HE) 染色, 镜下观察各脏器病理学改变。

1.3 免疫组化检测 MV, TAM, MC

兔抗人第 VIII 因子相关抗原多克隆抗体, 鼠抗

巨噬细胞 CD68 单克隆抗体, 鼠抗色胺酶 (typtase, TA) 单克隆抗体, 生物素标记羊抗兔 IgG, 生物素标记羊抗鼠 IgG, ABC 试剂以及 DAB-HCL 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。

MV, TAM, MC 染色方法均为常规 ABC 免疫组化法 (步骤略)。以培养的血管内皮细胞作为 MV 染色的阳性对照, 以博士德公司提供的阳性切片作为 CD68, MC 染色的阳性对照, 以 0.01 M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为 MV, TAM, MC 每次染色的阴性或替代对照。由 2 名病理科医师盲法阅片。MV 的判断: 任何被染成棕黄色孤立的内皮细胞或细胞团, 只要能与邻近的 MV、肿瘤细胞或其它结缔组织分开, 即将它们作为 1 个 MV, 不相连分支血管也作 1 个 MV 计数。TAM 和 MC 判断: TAM 相关的 CD68 阳性颗粒和 MC 阳性颗粒多呈棕黄褐色, 分别定位于 TAM 或 MC 胞浆及胞核中, 细胞形态多样, 体积较大, 胞浆丰富, 外形呈卵圆形或多边形, 偶见融合的多核巨噬细胞。MV 计数参照 Weidner 法^[8], 即高倍镜 (200 倍) 下计数 10 个癌组织视野内 MV 数, 以其平均值为该病例 MV 值。TAM 和 MC 计数参照 Molin 法^[9], 即高倍镜下观察 5 个视野内 TAM, MC 数, 求其均值为该病例计数。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行分析。MV, TAM, MC 计数值属于正态资料, 采用成组样本的 t 检验, 它们与临床病理特征的关系采用单因素方差分析; 相关性采用 Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $\alpha = 0.01$ 。

2 结果

2.1 成模情况

模型组有 2 只大鼠在术后 1 个月内自然死亡, 1 只在术后 2 个月内自然死亡, 另有 1 只在第 5 个月内胰腺发生纤维肉瘤, 上述 4 只不列入统计范围, 故模型组动物数为 36 只。在模型制作术后 3 ~ 5 个月期间, 模型组 36 只大鼠有 17 只胰腺

形成肿块(47.2%),其中3个月有2只(2/7, 28.6%),4个月有4只(4/10, 40.0%),5个月有11只(11/20, 55.0%)发生胰腺导管癌(图1);对照组均无肿瘤形成,病理证实均为正常胰腺组织;模型组非癌胰腺组织可见导管上皮不典型增生等病理改变(15/19, 78.9%)(图2)。模型组胰腺外主要脏器均未见肿瘤形成和明显的病理学改变。

2.2 MV, TAM, MC 计数

胰腺癌组的 MV, TAM, MC 计数值均高于正常胰腺组和非癌模型组胰腺,差异均有高度显著性($P < 0.01$)(表1)。

表1 正常对照组和胰腺癌组 MV, TAM, MC 计数

项目	例数	MV	TAM	MC
正常胰腺组织	10	24.81 ± 5.41 ¹⁾	11.01 ± 4.99 ¹⁾	11.04 ± 5.03 ¹⁾
非癌胰腺组织	19	24.42 ± 11.32 ¹⁾	10.99 ± 4.99 ¹⁾	9.31 ± 4.64 ¹⁾
胰腺癌组织	17	76.52 ± 19.92	17.42 ± 5.82	14.87 ± 5.19

注:1)与胰腺癌组织比较, $P < 0.01$

2.3 MV, TAM, MC 计数与致癌时间的关系

置入后 DMBA 后 3~4 个月与 5 个月两时段胰腺癌组比较,除 MV 外,5 个月胰腺癌组的 TAM ~ MC 计数值均大于 3~4 个月组,差异均有高度显著性($P < 0.01$)(表2)(图3-5)。

表2 胰腺癌组 MV, TAM, MC 计数与临床病理特征的关系

制模时间(月)	例数	MV	TAM	MC
3~4	6	81.85 ± 28.04	9.33 ± 4.46	8.87 ± 3.04
5	11	73.51 ± 18.72	19.02 ± 4.42	18.14 ± 2.73
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

2.4 大鼠胰腺癌组织中 MV, TAM, MC 计数之间的相互关系

Pearson 相关分析显示,胰腺癌组中 MV 与 TAM 计数之间($r = 0.788, P < 0.01$), MV 与 MC 计数之间($r = 0.832, P < 0.01$)存在着密切正相关和 TAM 计数与 MC 计数之间($r = 0.635$)均存在明显正相关。

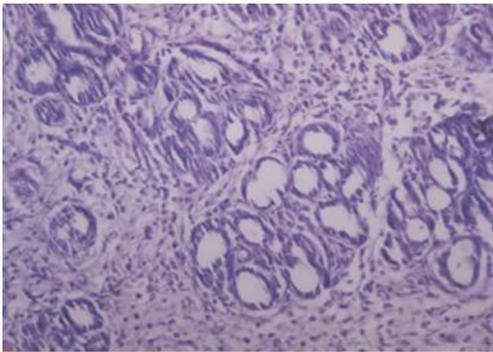


图1 高分化胰腺导管癌,模型组(HE × 200)

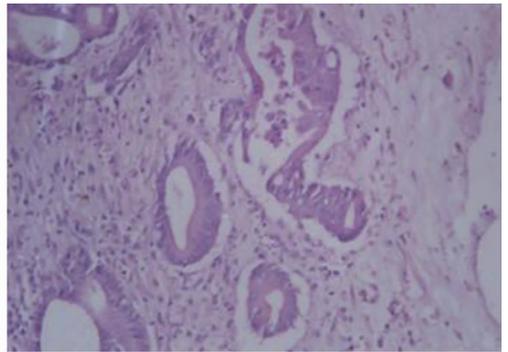


图2 胰腺导管重度不典型增生,模型组(HE × 200)

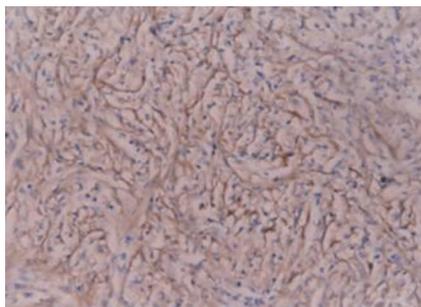


图3 MV 计数 110 个/HP, 中分化胰腺导管癌,模型组(ABC 免疫组化法 × 200)

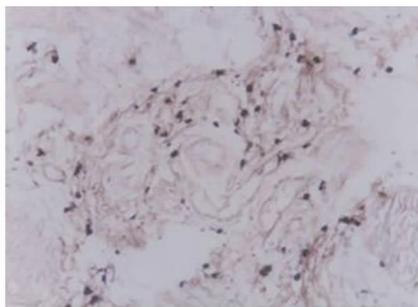


图4 TAM 计数 38 个/HP, 中分化胰腺导管癌,模型组(ABC 免疫组化法 × 200)

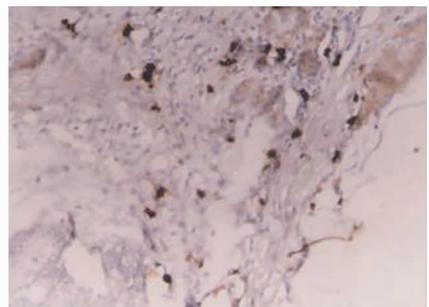


图5 MC 计数 18 个/HP, 中分化胰腺导管癌,模型组(ABC 免疫组化法 × 200)

3 讨论

胰腺癌生物学行为复杂,易浸润转移和易复发。近年来通过对肿瘤血管生成的研究,认识到处于血管期生长的肿瘤能够表现出无控制地加速增长,进一步体现其浸润、转移、复发的潜能^[1-3]。有研究表明,在乳腺癌、大肠癌等恶性肿瘤中,MV的高低差异对预后具有显著意义^[9,11-12]。胰腺癌的MV和其他肿瘤一样,能够很好地反映肿瘤血管生成的程度,对肿瘤的分期、转移、预后等指标有着较为肯定的相关。本研究显示,模型组胰腺癌MV明显高于正常胰腺和非癌胰腺组织,表明胰腺肿瘤的血管生成参与了胰腺癌的发生、发展过程,与国内外的研究基本一致^[3,7]。

在恶性肿瘤的间质内有数量不等的炎症细胞浸润,包括巨噬细胞、肥大细胞及中性粒细胞,推测它们在介导局部免疫过程的同时,对肿瘤的生长及肿瘤微环境的构建也发挥极其重要的作用^[7,8]。随着研究的深入,巨噬细胞和肥大细胞对血管生成的促进作用进一步得到证实。文献报道,癌间质中TAM,MC量与肿瘤MV呈正相关,且能诱导和表达多种生成因子和细胞因子,如白介素8(IL-8),单核细胞趋化蛋白1(MCP-1),巨噬细胞炎症蛋白1(MIP-1)等,并可促进肿瘤血管生成^[5-8,14]。本研究结果显示,SD大鼠胰腺癌TAM,MC计数明显高于正常胰腺组织和非癌胰腺组织,而且随着致瘤因素作用时间的延长,浸润在癌组织中的TAM和MC数量也有相对增多的趋势,可见其与胰腺癌的临床病理变化有一定的关系。

本实验结果显示,胰腺癌间质内浸润的TAM和MC均和癌组织的MV有密切关系,且随着胰腺癌临床病理的变化,两者间的密切关系依然存在($P < 0.01$),表明胰腺癌间质内TAM,MC和胰腺癌的血管生成存在关联性。与国外类似研究的结论一致的。故认为,本资料结论可能为胰腺肿瘤的临床治疗手段和手术方式的选择,以及预后判断提供一定的实验基础和参考。

参考文献:

- [1] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. [J] Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [2] 李春海,李克勤. 肿瘤微血管生成的机制与肿瘤的侵袭和转移[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3): 181-183.
- [3] 汤志刚,孙振阳,许戈良,等. TFP1-2对胰腺癌细胞增殖及血管新生的抑制作用[J]. 中国普通外杂志, 2007, 16(10): 959-961.
- [4] Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, et al. Monocyte/macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis [J]. In Vivo, 2002, 16(6): 471-477.
- [5] Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas [J]. Int J Oncol, 2003, 22(4): 773-778.
- [6] Peng SH, Deng H, Yang JF, et al. Significance and relationship between infiltrating inflammatory cell and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma tissues [J]. World J Gastroenterol., 2005, 11(41): 6521-6524.
- [7] Acikalin MF, Oner U, Topcu I, et al. Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas [J]. Dig Liver Dis, 2005, 37(3): 162-169.
- [8] Esposito I, Menicagli M, Funel N, et al. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Clin Pathol, 2004, 57(6): 630-636.
- [9] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J] Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.
- [10] Molin D, Edstrom A, Glimelius I, et al. Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkins lymphoma [J]. Br J Haematol, 2002, 119(1): 122-124.
- [11] 陈维荣,王宇红,郑志超,等. 97例直肠癌微血管计数与远端扩散长度的关系研究[J]. 中华普通外科杂志. 2003, 18(5): 290-292.
- [12] 李艳萍,徐惠绵,张斌. 微血管计数与乳腺癌临床病理因素及预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, (6): 798-499.
- [13] Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, et al. Association of mast cells with tumor angiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Dis Esophagus, 2001, 14(2): 135-138.
- [14] 王绪雷,董胜国,杨德安. 膀胱移行细胞癌中巨噬细胞分布的免疫组织化学研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2002, 23(7): 412.