

文章编号:1005-6947(2008)03-0280-03

· 文献综述 ·

# 胃癌淋巴管浸润及淋巴管生成的检测及其意义

吴巨钢 综述 俞继卫,姜波健 审校

(上海交通大学医学院附属第三人民医院 普通外科,上海,201900)

**摘要:**淋巴管内皮高度敏感且特异性的标记物 podoplanin 是作为肿瘤细胞的血小板聚集介导因子而发挥作用,能促进肿瘤细胞迁移及增加肿瘤细胞侵袭力。D2-40 是癌胚抗原 M2A 的单克隆抗体,但能检测 podoplanin 的存在。Podoplanin 和 D2-40 与胃癌淋巴结转移、生存期有显著性。笔者对此研究情况作一综述,为明确胃癌淋巴管生成机制,了解前哨淋巴结及腹主动脉周围淋巴结转移情况,理解跳跃式转移机制,为合理术式选择,进而为胃癌基因诊治提供依据。

[中国普通外科杂志,2008,17(3):280-282]

**关键词:** 胃肿瘤; podoplanin; D2-40; 淋巴转移; 综述文献

**中图分类号:** R 735.2

**文献标识码:** A

复发和转移是胃癌的主要死因,淋巴结转移是决定患者预后的主要因素<sup>[1]</sup>。淋巴结转移率即转移淋巴结数与检出淋巴结数的比值,和预后具有显著相关性,比率增高提示预后较差<sup>[2]</sup>。淋巴管是淋巴转移的解剖学基础,新的特异性淋巴管内皮标记物,如 podoplanin 和单克隆抗体 D2-40 的发现,对研究淋巴转移有重要意义。

## 1 Podoplanin

在研究氨基核苷嘌呤霉素肾炎 (puromycin aminonucleoside nephrosis, PAN) 中,发现 podoplanin 表达量下降到 < 30%。因它与肾小球上皮足细胞扁平化有关而得名<sup>[3]</sup>。其是分子量为 43 kD 的 I 型跨膜唾液酸糖蛋白,含胞外区、疏水跨膜区及小胞质尾区。胞外区含有 3 个重复的血小板聚集刺激 (platelet aggregation-stimulating, PLAG) 域,及苏/丝氨酸形成的

O 糖基化位点。胞质尾区含 ERM (ezrin, 埃兹蛋白; radixin, 根蛋白; moesin, 膜突蛋白) 蛋白家族的结合位点和 cAMP 依赖的蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 两个磷酸化位点<sup>[4]</sup>。podoplanin 在细胞表面突起处富集,其胞质尾区上的氨基酸能与埃兹蛋白和膜突蛋白直接作用,可重组细胞骨架蛋白;能参与细胞边缘波动及伸缩活动,介导炎性细胞的粘附,促进上皮细胞间质化,增强肿瘤细胞迁移及侵袭力<sup>[5]</sup>。

podoplanin 是高度敏感的淋巴管内皮细胞特异性标志物,在血管内皮上不表达。免疫组化法标记胃癌组织发现,被其阳性标记的都是典型的薄层管壁细胞组成的淋巴管,管腔内没有红细胞<sup>[6]</sup>。免疫荧光标记法发现,97% 以上淋巴管均特异性地被 podoplanin 和淋巴管内皮透明质酸酯受体 1 (lymphatic vascular endothelium hyaluronate receptor-1, LYVE-1, 一种特异性淋巴管内皮细胞标记物) 同时标记<sup>[7]</sup>。而多种恶性肿瘤和良性淋巴源性肿瘤细胞中都有 podoplanin 高表达<sup>[4,7]</sup>。

作为血小板聚集介导因子而发挥作用<sup>[8-10]</sup>的 podoplanin 表达上调能促进血小板凝集活性及肿瘤转移能力。其胞外区的 3 个串联排列的 PLAG 域是由 EDxxVTPG 组成的保守片段。在牛体内发现,第一个 PLAG 域基因发生单个缺失突变,会使

podoplanin 的血小板凝集活性丧失;第一个和第三个 PLAG 域基因突变对 podoplanin 的活性影响相同,而第二个 PLAG 域突变后的意义则不大<sup>[9]</sup>。糖肽分析发现,PLAG 域中的 Thr52 残基提供了唾液酸化位点,而唾液酸缺陷的 podoplanin 经附加唾液酸化后能恢复其活性。说明 Thr52 残基的唾液酸化可能是 podoplanin 介导血小板聚集的关键<sup>[10]</sup>。而先前的研究已证实血小板聚集与肿瘤转移有关。

## 2 D2-40

在研究胎儿睾丸生殖细胞肿瘤表面表达的癌胚抗原 M2A 时发现单克隆抗体 D2-40<sup>[11]</sup>。随后发现 D2-40 也能特异性地标记淋巴管内皮细胞,但不标记邻近的毛细血管,更不标记血管内皮。被 D2-40 标记的单层内皮细胞形成扁平的管道或腔隙,其内可发现淋巴细胞<sup>[12]</sup>。正常胃黏膜内 D2-40 标记的淋巴管密度 (lymph vessel density, LVD) 在黏膜肌层分布最多,而黏膜下层、黏膜上皮层和肌层的淋巴管分布无显著差异<sup>[13]</sup>。这与胃黏膜超微结构观察的结果相一致。

## 3 Podoplanin 与 D2-40 的关系

Schacht 等<sup>[14]</sup>认为 D2-40 是 podoplanin 的特异性抗体。将人 podoplanin 过表达载体转染大鼠肌原细胞后,经

**基金项目:**上海市卫生局科研基金资助项目(034086)。

**收稿日期:**2007-08-14;

**修订日期:**2007-09-03。

**作者简介:**吴巨钢,男,上海交通大学医学院附属第三人民医院硕士研究生,主要从事胃肺肿瘤外科及基础方面的研究。

**通讯作者:**姜波健 E-mail: jiang\_md@hotmail.com

免疫荧光技术发现,D2-40能明显地标记转染 podoplanin 细胞的胞浆,而未转染 podoplanin 的细胞则无阳性标记。应用 western blot 技术发现,D2-40能特异性地检测人 podoplanin-Fc 融合蛋白,而不能检测其它特异性的淋巴管标志物(LYVE-1)的融合蛋白。酶标免疫吸附测定证实,D2-40能特异性地和 podoplanin-Fc 融合蛋白结合,结合部位是含 O 相关碳水化合物结构的糖基化唾液酸糖蛋白。但与 LYVE-1-Fc 融合蛋白低度非特异性地结合。用两种不同的 siRNA (small interfere RNA) 寡核苷酸(R1、R2)分别敲除人淋巴管内皮细胞中 podoplanin 表达,发现被 D2-40 检测到的量显著降至对照组的 66% 和 36%。这种表达下降的蛋白质分子量为 40 kD,和 M2A 的分子量一样。另有发现:podoplanin 与 M2A 具有同一性<sup>[12,15-16]</sup>,podoplanin 表达的组织中,M2A 也阳性表达。两者的分子结构中都含有 O 糖基化位点的唾液酸蛋白,并都选择性分布在淋巴管内皮细胞上。因此推断它们可能是同一种物质。但目前报道 podoplanin 的分子量与 M2A 不一致,且未证实它们分子结构的相同。故 podoplanin 与 M2A 和 D2-40 的相互关系需予探讨。

#### 4 podoplanin 和 D2-40 与胃癌淋巴浸润

淋巴管浸润(lymph vessel invasion, LVI)是胃癌淋巴转移的重要检测指标。常规病理判断标准是 HE 染色后观察单层内皮细胞组成的管腔间隙中有无癌栓。但无法精确分辨淋巴管壁和毛细血管壁,也难确定是否真正的癌栓,故致假阳性率和假阴性率均较高。117 例胃癌标本研究发现,HE 染色和 podoplanin 染色能检测到的 LVI 分别为 29 例和 42 例。73 例 T1 早期胃癌,podoplanin 标记和 HE 染色 LVI 分别为 14 例和 2 例。而 LVI 与淋巴管转移显著有关。LVI 阳性者比 LVI 阴性者生存期长<sup>[6]</sup>。

D2-40 已用于检测胃癌的 LVI<sup>[13,17-18]</sup>。78 例原发胃癌研究中,HE 染色检测出 LVI 阳性率是 27% (21/78),假阴性率为 21.8% (17/78),假阳性率为 5.1% (4/78)。

D2-40 标记后的阳性率为 44% (34/78)。从淋巴结阳性转移的胃癌中检测 LVI 的敏感性,D2-40 标记为 89% (24/27),HE 为 55% (15/27),两者有显著性差异存在<sup>[17]</sup>。48 例肠型胃癌中发现,D2-40 检测的 LVI 敏感性为 33% (2/4)、特异性 100% (42/42)。这比 HE 检测的精确性高(敏感性为 25%;特异性 98%)。83 例弥漫型胃癌中,LVI 检测的敏感性为 67% (6/9),特异性为 87% (64/74),精确性与 HE 检测的无明显差异<sup>[13]</sup>。80 例 pN0 胃癌研究发现,D2-40 标记的 LVI 阳性率为 23.8% (19/80)。免疫组化和 RT-PCR 检测淋巴结微转移阳性率分别为 11.3% (9/80) 和 31.3% (25/80),胃癌淋巴结微转移与 LVI 表达呈显著正相关( $P < 0.0001$ )<sup>[18]</sup>。

#### 5 podoplanin 和 D2-40 与胃癌淋巴管生成

淋巴管生成(lymphangiogenesis)是淋巴管转移的基础之一,影响肿瘤侵袭和预后<sup>[19]</sup>。胃癌的淋巴管主要集中在肿瘤地带的外周,即热点地区(hot spots)<sup>[17]</sup>。这是由于肿瘤中心较高的组织间隙压导致了淋巴系统的塌陷及淋巴管破坏,而使淋巴管数量减少。LVD 可反映淋巴管生成。计数热点地区被 podoplanin 抗体标记的毛细淋巴管而得 LVD 值。淋巴管转移阳性的胃癌组织中,每高倍视野( $\times 200$ )的 LVD 平均为  $(14.9 \pm 1.4)$  个。而淋巴管转移阴性的平均为  $(4.2 \pm 0.83)$  个,两者间差异有显著性( $P < 0.01$ ),说明 LVD 与胃癌淋巴管转移有关<sup>[19]</sup>。117 例原发胃癌研究发现,所有病例 LVD 平均为 11.6 个。其中 LVI 阳性组 42 例,平均 16.24 个;阴性组 75 例,LVD 平均 8.97 个,两者间差异显著( $P < 0.001$ ),说明 LVI 阳性患者的 LVD 值高,淋巴管生成明显<sup>[6]</sup>。研究发现,pT1 组 73 例,LVD 平均 11.10 个;pT2 组 11 例,LVD 平均 14.28 个;pT3-4 组 33 例,LVD 平均 11.76 个,3 组间的 LVD 值不相同( $P = 0.0026$ )。pT1-2 和 pT3-4 间有显著差异( $P = 0.00118$ )。对其生存期进行随访,高 LVD 组( $> 12$  个/高倍视野)病死率为 30% (15/

50),低 LVD 组( $< 12$  个/高倍视野)病死率为 11.9% (8/67) ( $P = 0.018$ )。还发现,LVD 与 TNM 分期有显著相关性( $P = 0.0492$ )。多因素分析,高 LVD 是胃癌肿瘤浸润深度、TNM 分期和生存期的独立影响因素。在早期胃癌中,这些指标间的差异更具显著性意义<sup>[6]</sup>。应用 RT-PCR 技术发现,淋巴管转移阳性的胃癌组织中,podoplanin mRNA 含量较高<sup>[19]</sup>。

#### 6 podoplanin 和 D2-40 的研究前景

##### 6.1 淋巴管生成机制

淋巴管在维持组织同质性及输送免疫细胞中起重要作用,也是恶性肿瘤细胞转移到区域淋巴结的原始通道<sup>[14]</sup>。新生淋巴管来源可能有:瘤内静脉如同胚胎时期以出芽方式形成,源于已存在的淋巴管<sup>[20]</sup>,间充质细胞分化而来,甚或由骨髓淋巴内皮细胞分化而来<sup>[21]</sup>。新生淋巴管在肿瘤发展、转移中的作用研究显示肿瘤内部的淋巴管是一些无功能性的淋巴管样结构,与肿瘤转移无关。瘤周增生的功能性淋巴管因增加了肿瘤细胞与淋巴管接触的面积,可促进肿瘤的淋巴转移<sup>[22]</sup>。淋巴管生成增加了淋巴道转移发生的机会,肿瘤细胞通过黏附、迁移等过程侵入毛细淋巴管,然后聚集形成癌栓进入下一级淋巴管和局部淋巴结<sup>[23]</sup>。肿瘤侵袭淋巴系统,是通过介导新的淋巴管生成,还是浸润肿瘤周围已有淋巴管,及肿瘤内外的新生淋巴管程度是否为肿瘤进展的一个指标等<sup>[14]</sup>,仍须探讨。

##### 6.2 研究与胃癌淋巴微转移的关系

淋巴管微转移是指常规病理检查难以发现的  $< 2$  mm 的癌转移灶。淋巴管转移诊断的遗漏直接影响临床诊治,故淋巴管微转移检测对合理治疗方案的选择、术后复发及预后具有重要意义。传统 D2 胃癌根治术已受挑战。缩小术式<sup>[24]</sup>和腹主动脉周围淋巴廓清的扩大术式<sup>[25]</sup>已渐被广泛接受。而内镜下黏膜切除术,前哨淋巴管活检及腹腔镜辅助胃癌根治术需评估术式的肿瘤根治度,而微转移是重要指标之一。

podoplanin 和 D2-40 阳性标记从结构上证实了肿瘤淋巴结的微转移,

并且LVI和淋巴管生成是微转移的危险因素。对此研究有助于阐明淋巴管微转移的发生机制,判断前哨淋巴管微转移和跳跃式转移机制及明确腹主动脉周围淋巴管转移存在与否,在最小创伤程度下获更为理想的手术效果。

#### 参考文献:

- [1] 王昭,詹文华,何裕隆,等. 胃癌患者N2淋巴结转移和腹膜扩散的相关因素和预后分析[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(9):645-649.
- [2] Nitti D, Marchet A, Olivieri M, *et al.* Ratio between metastatic and examined lymph nodes is an independent prognostic factor after D2 resection for gastric cancer: analysis of a large European monoinstitutional experience [J]. *Ann Surg Oncol*, 2003, 10(9):1077-1085.
- [3] Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, *et al.* Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis [J]. *Am J Pathol*, 1997, 151(4):1141-1152.
- [4] Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, *et al.* Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(6):899-910.
- [5] Martin-Villar E, Megias D, Castel S, *et al.* Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Cell Science*, 2006, 119(21):4541-4553.
- [6] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, *et al.* Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59(1):77-82.
- [7] Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, *et al.* Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer [J]. *Ann Surg*, 2004, 240(2):306-312.
- [8] Kato Y, Kaneko M, Sata M, *et al.* Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2005, 26(4):195-200.
- [9] Kaneko MK, Kato Y, Kitano T, *et al.* Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor [J]. *Gene*, 2006, 378(1):52-57.
- [10] Kaneko MK, Kato Y, Kameyama A, *et al.* Functional glycosylation of human podoplanin: glycan structure of platelet aggregation-inducing factor [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(2):331-336.
- [11] Marks A, Sutherland DR, Bailey D, *et al.* Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(3/4):569-578.
- [12] Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours [J]. *Histopathology*, 2005, 46(4):396-402.
- [13] Sako A, Kitayama J, Ishikawa M, *et al.* Impact of immunohistochemically identified lymphatic invasion on nodal metastasis in early gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2006, 9(4):295-302.
- [14] Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, *et al.* Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors [J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(3):913-921.
- [15] Huse JT, Pasha TL, Zhang PJ. D2-40 functions as an effective chondroid marker distinguishing true chondroid tumors from chordoma [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 113(1):87-94.
- [16] Sonne SB, Herlihy AS, Hoei-Hansen CE, *et al.* Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours [J]. *Virchows Arch*, 2006, 449(2):200-206.
- [17] Yonemura Y, Endou Y, Tabachi K, *et al.* Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40 [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(9):1193-1199.
- [18] Arigami T, Natsugoe S, Uenosono Y, *et al.* Lymphatic invasion using D2-40 monoclonal antibody and its relationship to lymph node micrometastasis in pN0 gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(6):688-693.
- [19] Kitadai Y, Kodama M, Cho S, *et al.* Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes [J]. *Int J Cancer*, 2005, 115(3):388-392.
- [20] He Y, Rajantie I, Hmonen M, *et al.* Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11):3737-3740.
- [21] Religa P, Cao R, Bjorndah IM, *et al.* Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels [J]. *Blood*, 2005, 106(13):4184-4190.
- [22] Padera TP, Kadambi A, Carreira CM, *et al.* Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics [J]. *Science*, 2002, 296(5574):1883-1886.
- [23] McCarter MD, Clarke JH, Harken AH. Lymphangiogenesis is pivotal to the trials of a successful cancer metastasis [J]. *Surgery*, 2004, 135(2):121-124.
- [24] 林浩,姜波健,孙荣勋,等. 早期胃癌淋巴管转移的影响因素和缩小型手术治疗 [J]. 中国普通外科杂志, 1999, 8(4):253-255.
- [25] 姜波健. 胃癌外科临床研究的若干热点问题 [J]. 国际外科学杂志, 2007, 34(3):167-171.