

文章编号:1005-6947(2007)09-0906-04

· 简要论著 ·

淋巴管内皮透明质酸受体-1在直肠癌中的表达及其意义

陈茂根, 陈维荣, 蔡高阳, 庄潮平, 李廷汉, 廖梓群

(汕头大学医学院第二附属医院 普通外科, 广东 汕头 515041)

摘要:为探讨直肠癌中淋巴管内皮透明质酸受体-1(LYVE-1)的表达,以及微淋巴管密度(MLD)与直肠癌淋巴转移的关系。笔者采用免疫组化技术检测60例直肠癌组织和40例癌旁正常直肠组织中LYVE-1的表达及MLD。结果显示,直肠癌组织癌中心区及周边部MLD均显著高于癌旁正常直肠组织;癌周边部的MLD明显高于癌中心区;有淋巴结转移或远处转移组直肠癌中MLD分别比无转移组明显增高($P < 0.01$)。结论:直肠癌组织中存在肿瘤淋巴管的发生,主要位于癌周边部,其可促进肿瘤淋巴道转移。直肠癌组织的MLD可能成为评价肿瘤淋巴管发生及判断直肠癌淋巴转移的一个指标。

[中国普通外科杂志,2007,16(9):906-909]

关键词: 直肠肿瘤/病理学; 肿瘤转移; 淋巴管生成; 微淋巴管密度

中图分类号: R 735.3

文献标识码: B

肿瘤的发生、增长、侵袭及其转移皆伴随着淋巴管的新生,故研究肿瘤的淋巴管生成对了解肿瘤的发生发展有其重要的意义。既往对肿瘤淋巴管生成及转移的研究较少,其主要原因是缺少淋巴管内皮特异性标志物。近年来,随着一些淋巴管内皮标志物的发现,使肿瘤淋巴管的显影和定位技术得到提高,对肿瘤淋巴管生成及转移的研究也逐渐增多。其中,淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(LYVE-1)是淋巴管内皮较特异性的标志物之一。本研究应用LYVE-1来显示直肠癌组织中的微淋巴管,并计数微淋巴管密度(MLD),旨在了解LYVE-1在直肠癌中心区及癌周边部的表达,及探讨MLD与肿瘤临床病理因素的关系。

1 材料和方法

1.1 标本的收集和处理

收集本院普外科2005年4月—2006年10月手术切除且资料完整的60例直肠腺癌,术后均经病理HE染色证实诊断。患者术前均未接受化疗、放疗和免疫治疗。本组男34例,女26例,

男女比例为1.31:1.00;年龄12~82(平均58.2)岁,中位年龄58.5岁。高位直肠癌15例,中位直肠癌21例,低位直肠癌24例;高分化腺癌9例,中分化腺癌37例,低分化腺癌14例;未侵及浆膜层者12例,侵及浆膜层者48例;Dukes分期:A期22例,B期10例,C期16例,D期12例;伴有淋巴结转移者28例;伴有远处转移者12例。另取直肠癌手术切除标本的远癌切缘正常黏膜组织标本(均经病理证实无癌细胞浸润)40例作为对照组。所有标本经4%中性甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,厚度4 μ m,行HE染色和免疫组化染色。

1.2 试剂和方法

兔抗人LYVE-1多克隆抗体购自德国Acris公司,SABC免疫组化试剂盒购自美国Santa Cruz公司。染色步骤按试剂盒说明书进行。LYVE-1抗体稀释度为1:200。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作空白对照,用正常兔免疫前血清代替一抗作阴性对照。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.3 结果判定

1.3.1 微淋巴管染色的阳性判断 LYVE-1主要定位于淋巴管内皮细胞的胞膜和胞浆中;以内皮细胞胞浆显示棕黄色或黄褐色颗粒为阳性染色。

1.3.2 MLD计数方法 计数LYVE-1染色阳性管腔数为MLD。在盲法下进行;每张切片由2名

收稿日期:2007-03-10; 修订日期:2007-09-06。

作者简介:陈茂根,男,江西萍乡人,汕头大学医学院第二附属医院硕士研究生,主要从事直肠癌淋巴道转移方面的研究。

通讯作者:陈维荣 E-mail:chen93662@163.com

病理医师分别计数。若计数差在 10% 以上则重新计数。将 LYVE-1 染色为棕黄色或黄褐色的淋巴管内皮细胞簇或内皮细胞形成的条状、隙状结构及有管腔者计为 1 个微淋巴管。参照 Williams^[1] 和 Koukourakis^[2] 的方法进行计数。先于低倍镜 ($\times 40$ 倍和 $\times 100$ 倍) 下选取直肠癌组织癌周边部(肿瘤浸润边缘最深区)和癌中心区,以及癌旁正常结直肠组织阳性染色脉管最丰富区,确定 3 个淋巴管着色最密集的区域(hot spot, 热点),然后在高倍镜 ($\times 200$ 倍) 下分别计数 3 个视野中的微淋巴管数,取 3 个视野的均值作为 MLD。

1.4 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件对数据进行统计学处理。计量资料采用 t 检验、单因素方差分析(one-way ANOVA) 和 q 检验。显著性水准 α 为 0.05。

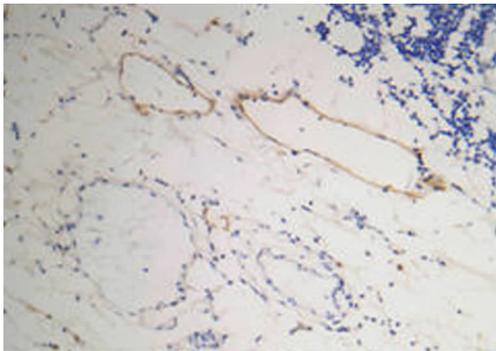


图1 直肠癌组织中 LYVE-1 染色淋巴管阳性,血管染色阴性 ($\times 200$)

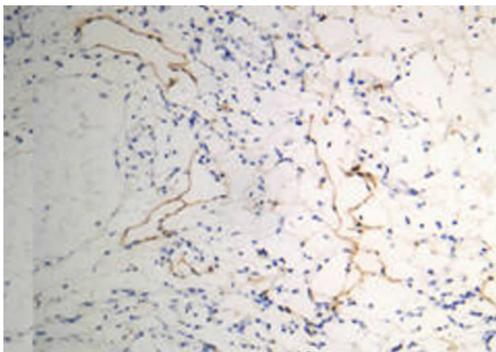


图3 直肠癌周边部 LYVE-1 阳性淋巴管较密集,管腔多呈扩张状 ($\times 200$)

2 结果

2.1 LYVE-1 在癌旁正常组织(对照组)及肿瘤组织中的表达

LYVE-1 阳性表达在淋巴管内皮细胞中,而在血管中未见表达(图 1),肿瘤细胞上亦未见其表达。对照组结直肠黏膜 LYVE-1 阳性染色淋巴管多位于黏膜下,形态大小不一,壁较薄,少数位于黏膜层腺管区(图 2)。在癌周边部可见到较多管腔扩张的淋巴管(图 3);而在癌中心区的实质中阳性淋巴管较少,多为闭锁的条索状或隙状(图 4),甚至未见阳性染色的淋巴管存在。本组结果显示癌周边部 MLD 与肿瘤中心区 MLD 间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);而且癌周边部及癌中心区 MLD 均显著高于远癌正常组织 ($P < 0.01$)(表 1)。

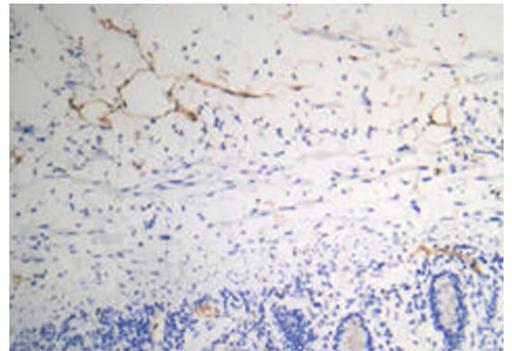


图2 正常直肠黏膜下 LYVE-1 阳性淋巴管 ($\times 200$)

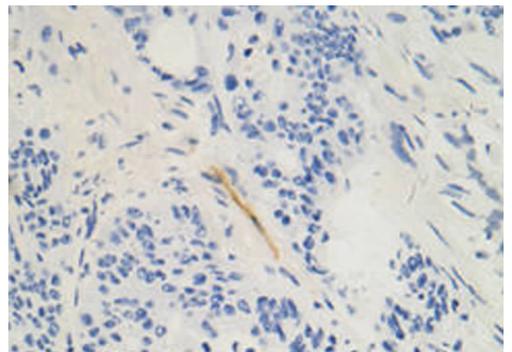


图4 直肠癌中心区 LYVE-1 阳性淋巴管较稀疏,管腔多呈闭锁状 ($\times 400$)

表1 直肠癌组和对照组 LYVE-1 阳性 MLD 的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	MLD	t 值	P 值
对照组(a)	1.733 \pm 0.600	20.078(a vs · b)	<0.01
直肠癌组			
癌周边部(b)	5.272 \pm 1.151	18.121(b vs · c)	<0.01
癌中心区(c)	2.250 \pm 0.588	4.271(c vs · a)	<0.01

注:1)与 b 组比 $P < 0.01$; 2)与 c 组比 $P < 0.01$; 3)与 a 组比 $P < 0.01$

2.2 LYVE-1 表达及 MLD 与直肠癌临床病理因素的关系

在直肠癌中心区,各因素分组之间差异无统计学意义;但在直肠癌周边部,MLD 均值与 Dukes 分期、淋巴结转移及远处转移有关;伴淋巴结转移或远处转移组,其癌周边部 MLD 较无转移组显

著增高 ($P < 0.01$) ; Dukes 分期为 C, D 组癌周边部 MLD 也显著高于 Dukes 分期为 A, B 组 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 2 直肠癌肿瘤周边部 MLD 与临床病理参数的关系

临床病理因素	例数	MLD ($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别				
女	26	5.590 ± 1.140	1.911	>0.05
男	34	5.029 ± 1.114		
年龄				
≤58	30	5.222 ± 1.142	-0.334	>0.05
>58	30	5.322 ± 1.176		
肿瘤直径				
≤4cm	35	5.410 ± 1.205	1.096	>0.05
>4cm	25	5.080 ± 1.064		
肿瘤部位				
高位	15	5.000 ± 1.284	0.551 [†]	>0.05
中位	21	5.365 ± 1.048		
低位	24	5.361 ± 1.171		
肿瘤分化程度				
高	9	5.370 ± 1.594	0.066 [†]	>0.05
中	37	5.279 ± 1.084		
低	14	5.194 ± 1.084		
肿瘤浸润深度				
未及浆膜	12	5.222 ± 1.452	-0.167	>0.05
浆膜及以外	48	5.285 ± 1.081		
淋巴结转移				
有	28	5.940 ± 0.903	4.988	<0.01
无	32	4.687 ± 1.026		
远处转移				
有	12	6.111 ± 0.757	3.011	<0.01
无	48	5.062 ± 1.142		
Dukes 分期				
A + B	32	4.687 ± 1.026	-4.988	<0.01
C + D	28	5.940 ± 0.903		

注:† 计算 *F* 值

3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤的基本生物学特征,是临床上绝大多数肿瘤患者的致死因素。临床和病理研究已证实淋巴道转移是恶性肿瘤重要的转移途径之一^[3-4]。因此检测肿瘤中新生微淋巴管的浸润情况对评估肿瘤的恶性程度具有非常重要的意义。LYVE-1 是 I 类整合膜糖蛋白家族成员,主要表达于淋巴管内皮细胞,而很少表达在血管内皮^[5],因此能很好地区分肿瘤组织中的血管和淋巴管。

Petri 等^[6] 研究发现,瘤周边淋巴管数量与淋

巴结转移及远期无病生存率显著相关,而瘤内淋巴管数量与淋巴结转移及远期生存率无关。目前多数专家认为,肿瘤生长所产生的高组织间隙压会破坏肿瘤淋巴管^[7]。本研究也观察到癌中心区 LYVE-1 阳性的淋巴管染色,且都受到癌组织的挤压,使得这些淋巴管管腔狭窄甚至形成条索状或隙状。而在癌周边部,LYVE-1 阳性淋巴管数量较肿瘤中心区明显增多,且管腔多扩张。在癌周边部和中心区的 MLD 均值明显高于正常直肠组织。表明肿瘤淋巴管的发生主要位于癌周边部;而在癌中心区亦存在淋巴管发生,但由于组织间隙压高,使得这些新生淋巴管的管腔变形而不能存活下来,甚至形成线状、退化或消失。但最近关于乳腺癌、前列腺癌的研究显示肿瘤内并无淋巴管存在,甚至在有强烈血管发生的区域也未观察到淋巴管增生^[8-9]。淋巴管发生和正常淋巴管整合进肿瘤脉管网络都不会在肿瘤瘤体内发生。事实上,既往的研究也显示瘤体内脉管的存活是被质疑的,在距浸润性肿瘤边缘区约 4~6mm 的肿瘤表面脉管的密度也在快速地减少^[10]。

有学者^[11] 对肿瘤淋巴道转移作出了解释,认为肿瘤细胞可能通过肿瘤新生淋巴旁路引流入远处淋巴结,或通过肿瘤周边组织产生的淋巴液引流入远处的淋巴管,进而到达周围淋巴结甚至发生远处转移。在肿瘤浸润边缘淋巴管发生活跃的区域,肿瘤细胞还可通过非淋巴管网而转移至远处淋巴结。本研究显示,直肠癌不同区域 MLD 与淋巴结转移的关系有所差异,癌中心区 MLD 与转移之间无关,但癌周边部 MLD 增加与 Dukes 分期、淋巴结转移和远处转移有关。说明检测肿瘤 MLD 可能成为判定肿瘤良恶性程度及检测肿瘤转移的一个手段。直肠癌组织癌周边部 MLD 明显高于癌中心区。提示直肠癌中存在着淋巴管发生,且淋巴管发生主要位于癌周边部。这些新生淋巴管很可能起到促进肿瘤转移的作用。由于新生淋巴管管壁不完善,缺少阻碍癌细胞进入淋巴管的有效屏障,因此新生淋巴管数目的增多有利于肿瘤细胞经淋巴道转移,从而促进直肠癌病期进展。Koukourakis 等^[11] 亦认为肿瘤新生淋巴管网的形成可极大地促进肿瘤生长,因为通过淋巴管可排泄新陈代谢产物并能促进肿瘤细胞的淋巴管扩散。

综上所述,通过 LYVE-1 特异性免疫组化染色研究,可以在直肠癌组织中观察到肿瘤淋巴管

发生,且主要位于癌周边部,它可促进肿瘤淋巴道转移。对肿瘤 MLD 的检测可能成为评价肿瘤淋巴管发生及判断肿瘤转移的手段。

参考文献:

- [1] Williams CS, Leek RD, Robson AM, *et al.* Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer[J]. *J Pathol*, 2003, 200(2): 195-206.
- [2] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, *et al.* LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(2): 202-206.
- [3] Stacker SA, Achen MG, Jussila L, *et al.* Lymphangiogenesis and cancer metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 573-583.
- [4] He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1645(1): 3-12.
- [5] Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types [J]. *J Cell Biol*, 1989, 109(2): 927-937.
- [6] Bono P, Wasenius VM, Heikkila, P, *et al.* High LYVE-1-

- positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21): 7144-7149.
- [7] Jackson DG, Prevo R, Clasper S, *et al.* LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis [J]. *TRENDS Immunol*, 2001, 22(6): 317-321.
- [8] Williams CS, Leek RD, Robson AM, *et al.* Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer [J]. *J Pathol*, 2003, 200(2): 195-206.
- [9] Trojan L, Michel MS, Rensch F, *et al.* Lymph and blood vessel architecture in benign and malignant prostatic tissue: lack of lymphangiogenesis in prostate carcinoma assessed with novel lymphatic marker lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1) [J]. *J Urol*, 2004, 172(1): 103-107.
- [10] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, *et al.* Invading edge vs. inner (edvin) patterns of vascularization: an interplay between angiogenic and vascular survival factors defines the clinical behaviour of non-small cell lung cancer [J]. *J Pathol*, 2000, 192(2): 140-149.
- [11] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, *et al.* LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58(2): 202-206.

欢迎订阅 2008 年《中国现代普通外科进展》

《中国现代普通外科进展》是教育部主管、山东大学主办,山东大学齐鲁医院编辑出版的学术性刊物,国内外公开发行,以从事普通外科的临床工作者、科研人员和研究生为主要读者对象,报道普通外科领域内的最新学术动态与进展、临床实践经验和原创性科研成果,以及与临床密切结合的基础理论研究。

本刊贯彻我刊顾问、中科院院士裘法祖教授为我刊提出的“在‘现代’中获得启迪,读‘进展’后有所创新”的办刊方向,坚持以“现代”、“进展”为导向,启迪读者,以提高广大普通外科工作者的业务水平与科研技能。

本刊展示了现代普通外科的国内外进展与研究动态,坚持“百家争鸣”、“百花齐放”,广开学术言路,提倡不同学术流派学术争鸣,内容新颖,版面活泼。并且与剑桥大学、哈佛大学等国外 16 所大学建立资料交换。

本刊编委会涵盖了全国个省市、自治区的主要普外专家,包括 7 名院士,还有美、日、法、澳等国家专家,充分体现了编委会的国际性、权威性,是本刊高学术水平的重要保证。本刊已被国际六大检索刊物中的美国《CA》、俄罗斯《AJ》收录,被国内中国科技论文统计与分析数据库等 19 个数据库和检索类刊物收入,并被确立为中国科技核心期刊(统计源期刊)、外科学类、肿瘤学类、和医药卫生类核心期刊,在国内期刊评奖中多次获奖。

本刊为双月刊,每年 6 期。定价:10 元/册,60 元/年。

订阅方法:(1)通过各地邮局订阅(邮发代号:24-190) (2)直接向编辑部订阅 地址:山东省济南市文化西路 107 号(250012) 电话:(0531)82169203 (传真):(0531)82169243 E-mail:puwai@sdu.edu.cn; puwaijinzhan@126.com 联系人:王秀娟