

肥大细胞及类胰蛋白酶在人甲状腺肿瘤组织中的表达 及其与微血管密度的关系*

金东岭 王 蕾 时志民 王广邑 席 丰

(河北工程大学医学院病理教研室 河北 邯郸 056002)

摘要 目的 探讨肥大细胞(mast cell, MC)及类胰蛋白酶(tryptase)与甲状腺肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)的相关性及其对甲状腺癌发生发展的影响。方法 采用甲苯胺蓝组织化学染色和 PV 免疫组织化学染色对 116 例甲状腺癌、56 例甲状腺腺瘤和 10 例正常甲状腺组织中 MC 和 tryptase 及其 CD31 的表达进行了检测 对 MC 和 tryptase 与 MVD 的关系进行了统计学分析。结果 甲状腺肿瘤中 MC 的数量和 tryptase 阳性表达高于正常甲状腺, 而且与肿瘤的类型有关($P < 0.01$) ; Spearman 等级相关分析显示各组甲状腺组织 MC 数量和 tryptase 表达与 MVD 呈正相关($r=0.900, r=0.636, P < 0.05$)。结论 MC 及其分泌的 tryptase 有促进血管新生的作用, 因而可促进甲状腺肿瘤的浸润和转移。

关键词 甲状腺肿瘤 肥大细胞 类胰蛋白酶 微血管密度

中图分类号 R736.1 文献标识码 A 文章编号 1673-6273 (2012) 19-3639-03

Correlation between Mast Cell and Tryptase Expression and Microvessel Density in Human Thyroid Tumor*

JIN Dong-ling, WANG Lei, SHI Zhi-min, WANG Guang-yi, XI Feng

(Department of Pathology, Medical College of Hebei Engineering University, Handan, Hebei, 056002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlation between the expression of mast cell (MC) as well as tryptase and microvessel density (MVD) in human thyroid tumor. **Methods:** Compare with and study the expression of MC, tryptase and CD31 which were examined by histochemistry and PV immunohistochemistry in 116 cases of thyroid carcinoma, 56 cases of thyroid adenoma, 10 cases of normal thyroid tissues; and analyzed the correlation of the MC, tryptase expressions and the MVD. **Results:** The number of MC and the expression of tryptase in thyroid tumor tissues were higher than that in normal thyroid, and the number of MC and the expression of tryptase was correlated with the type of tumor ($P < 0.01$). Spearman rank correlation analysis showed that the number of MC was positively correlated with the MVD in the thyroid tissues ($r=0.900, r=0.636, P < 0.05$). **Conclusions:** The MC and tryptase may promote to the angiogenesis of thyroid tumor, and so may promote invasion and metastasis of the thyroid tumor.

Key words: Mhyroid neoplasms; Mast cell; Tryptase; Microvessel density

Chinese Library Classification(CLC): R736.1 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)19-3639-03

众所周知,血管新生与肿瘤的生长密切相关。近年来的研究表明,人类肥大细胞(mast cell, MC)和类胰蛋白酶(tryptase)都能诱导血管内皮细胞形成管状结构,这种作用具剂量相关性,并能被其抑制剂所抑制^[1]。但国内外尚未见甲状腺癌组织类胰蛋白酶和 MC 数量与微血管密度 (microvessel density, MVD)关系的文献报道。CD31 是一种新型的微血管标记物,在显示血管内皮细胞时其特异性优于内皮细胞的其他标记物^[2]。本研究旨在通过对甲状腺癌和甲状腺腺瘤组织中肥大细胞组织化学和 tryptase、CD31 的免疫组化检测,探讨肥大细胞及类胰蛋白酶与甲状腺癌微血管密度的相关性及其对甲状腺癌发生发展的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

研究标本为河北工程大学医学院病理教研室 2004 年 1 月

-2009 年 12 月临床资料完整的甲状腺肿瘤存档蜡块 172 例。其中甲状腺癌 116 例;甲状腺腺瘤 56 例(男 15 例,女 41 例;年龄 23-72 岁,平均年龄 39.64 岁);另取腺瘤旁经病理证实的正常甲状腺组织 10 例为正常对照组。标本常规石蜡切片,HE 染色,由两位高年资病理医师明确诊断并作组织病理分型:甲状腺癌中乳头状腺癌(PTC) 59 例(男性 13 例,女性 46 例,年龄 24-69 岁,平均年龄 40.55 岁;伴淋巴结转移 20 例,无淋巴结转移 39 例);滤泡状腺癌(FTC) 48 例(男 11 例,女 37 例,年龄 27-73 岁,平均年龄 52.25 岁;伴淋巴结转移 18 例,无淋巴结转移 28 例);未分化癌(UTC) 9 例(男性 4 例,女性 5 例,年龄 38-69 岁,平均年龄 56.43 岁;伴淋巴结转移 7 例,无淋巴结转移 2 例)。全部病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。56 例甲状腺腺瘤均为滤泡状腺瘤。

1.2 方法

* 基金项目 河北省科技支撑项目 (11276103D-31)

作者简介:金东岭 (1956-),男,教授,主要研究方向 肿瘤病理学,电话:13091132692, E-mail: jdl9862@sina.com

(收稿日期 2011-11-10 接受日期 2011-12-06)

所有标本均经 4% 的中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,连续 4 μm 切片,分别作 HE、甲苯胺蓝组织化学染色和 PV 法(非生物素法)免疫组织化学染色。兔源性 tryptase 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,(克隆号 Rs-2268R,工作浓度为 1:100)。鼠抗人 CD31 单抗、PV 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PV 染色按试剂盒说明操作,以 3% H_2O_2 室温孵育 5-10 分钟除去内源性过氧化物酶的活性,抗原热修复,常规免疫组化标记,DAB 显色,苏木素衬染,中性树胶封片,显微镜观察。对照实验:用过敏性鼻炎组织切片作为 MC 甲苯胺蓝染色和 tryptase 表达阳性对照,用 PBS 代替一抗作空白对照。

1.3 阳性结果判断及 MC 和 Tryptase 定量

甲苯胺蓝染色切片 MC 计数方法:高倍镜(10 $\times$ 40)下随机选取肿瘤 10 个视野,进行计数,计算每例标本每 10 个高倍视野 MC 的均数及标准差,并对计数结果进行显著性 t 检验。Tryptase 定量:切片中棕黄色颗粒为阳性,免疫组化染色结果显示阳性细胞外,尚存在着大量阳性颗粒,呈散在分布。但总的数量分布与上述甲苯胺蓝染色的结果相一致。在 40 倍物镜下,随机选取肿瘤上、下、左、右和中央 5 个视野,进行计数。取其平均数(颗粒数/视野)作为该例相对数量的估计值。

1.4 微血管密度(MVD)计数

CD31 以血管内皮细胞呈现棕黄色为阳性标准。参照 Takahashi 等^[3]的方法,先在低倍镜(10 $\times$ 10)下全面观察切片以确定瘤内血管密度最高处,即热点(hot point),再在高倍镜(10 $\times$ 40)下以与周围肿瘤细胞和结缔组织成分明显区别的一个棕黄色染色的内皮细胞丛作为一个血管计数。记录 5 个视野内的微血管数,取其平均数作为该病例的 MVD 值,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.5 统计学分析

所有数据应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析;计量资料采用 t 检验,相关性检验采用 Spearman 等级相关分析。假设 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组甲状腺组织中 MC 及 tryptase 分布和组化、免疫组化特征

光镜观察甲苯胺蓝染色标本,正常甲状腺组织中 MC 主要分布在甲状腺滤泡间隔及被膜的结缔组织中,MC 常沿小血管和淋巴管分布,一般为圆形或椭圆形,细胞内充满异染性紫蓝色颗粒,只有极少数细胞有脱颗粒现象。在甲状腺肿瘤中,MC 主要分布于与肿瘤实质交界处的间质中,且其形态不规则,多为梭形,大小也不一致,多数细胞有脱颗粒现象,颗粒散布于细胞外。有的细胞破碎,核不清楚,只见成堆的颗粒散在于间质中。甲苯胺蓝染色显示甲状腺肿瘤中 MC 的数量均高于正常甲状腺,而且与肿瘤的类型有关,甲状腺癌 MC 的数量高于甲状腺腺瘤,其中 UTC 高于 PTC 和 FTC ($P < 0.01$),Tryptase 抗体免疫组化染色除显示阳性细胞外,尚存在着大量 tryptase 阳性颗粒,呈散在分布,总的数量分布与上述甲苯胺蓝染色的结果相一致(表 1)。甲苯胺蓝染色和 tryptase 的免疫组化染色均显示甲状腺癌肥大细胞的数量与肿瘤有无淋巴结转移有关 ($P < 0.01$)。

2.2 甲状腺组织肥大细胞数与 MVD 的相关性

表 1 显示:肿瘤组织中的微血管数目显著高于正常甲状腺,甲状腺癌的微血管数目高于甲状腺腺瘤,且随着肿瘤恶性程度的增加有增多的趋势($P < 0.01$)。Spearman 等级相关分析显示各组甲状腺组织 MC 数量和 Tryptase 的表达与 MVD 呈正相关($r=0.900, r=0.636, P < 0.05$)。

表 1 各组甲状腺组织肥大细胞数与 MVD 的关系($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Association of MC and tryptase with MVD in varieties of thyroid tissues($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MC(n/HP)	t	Tryptase(n/HP)	t	MVD	t
Normal group	10	6.8 $\pm$ 2.4 ^a	4.211	21.4 $\pm$ 8.4 ^a	7.495	15.3 $\pm$ 08.21 ^a	4.815
Adenoma group	56	13.1 $\pm$ 4.6 ^b	8.569	52.3 $\pm$ 12.5 ^b	6.539	37.6 $\pm$ 14.17 ^b	3.983
Cancer group	116	18.1 $\pm$ 4.1 ^c	7.199	91.3 $\pm$ 33.6 ^c	8.399	56.8 $\pm$ 32.75 ^c	4.197
PTC	59	18.8 $\pm$ 5.2 ^d	2.714	92.6 $\pm$ 20.7 ^d	2.777	51.3 $\pm$ 20.42 ^d	2.408
FTC	48	16.3 $\pm$ 4.1 ^e	5.007	84.2 $\pm$ 16.4 ^e	5.651	60.4 $\pm$ 18.16 ^e	1.925
UTC	9	23.5 $\pm$ 3.0 ^f	2.635	124.7 $\pm$ 36.6 ^f	3.864	74.4 $\pm$ 28.63 ^f	2.991
Metastasis (+)	47	16.2 $\pm$ 6.3		80.3 $\pm$ 24.2		66.1 $\pm$ 24.16	
Metastasis (-)	69	19.4 $\pm$ 3.9 ^g	3.378	107.4 $\pm$ 29.8 ^g	5.177	48.7 $\pm$ 27.34 ^g	3.524

Note: * $P > .005$ VS UTC; $P < 0.001$ a VS adenoma group; b VS Cancer group; c VS normal group;

d VS FTC; e VS UTC; f VS PTC; g VS metastasis (+).

3 讨论

MC 常沿小血管和淋巴管分布,其胞浆内充满甲苯胺兰染的嗜碱性颗粒。MC 可分泌 40 余种生物活性物质,包括血管活性物质、趋化性物质、活化酶及蛋白聚糖等,这些活性物质可

引起一系列生理病理作用。近年国外学者的研究发现 MC 高的恶性肿瘤多分化差、易发生转移、侵袭能力强和预后差,认为与浸润的 MC 具有强烈促血管生成效应及诱导癌细胞及癌间质细胞分泌一些效应物质有关^[4-6]。但也有文献表明了不同的意见,认为 MC 对肿瘤细胞增殖有抑制作用^[7,8]。本研究结果显示

与正常甲状腺以及良性肿瘤相比,甲状腺癌组织中肥大细胞浸润显著增强。恶性程度高的 UTC 与恶性程度低的 PTC 和 FTC 也有明显差别。而且在正常情况下一般呈静止状态,而在肿瘤组织中多有脱颗粒现象。tryptase 的免疫组化染色显示随肿瘤的恶性程度和转移性的增加明显增多,说明肥大细胞及其释放的 tryptase 与肿瘤的恶性程度相关。提示 MC 计数可能是反映甲状腺癌进展、转移及预后的重要指标。这与国外最近多数研究结果一致^[9,10]。

肿瘤的浸润和转移与其周围血管增生的速度和密度关系密切。目前,通过抗肿瘤血管生成治疗肿瘤已成为最活跃的研究领域之一。微血管密度(MVD)是反映肿瘤诱导血管生成能力的主要指标,对肿瘤的发生、发展、转移和预后具有重要价值^[11]。肿瘤中血管新生的影响因素很多,而肥大细胞与肿瘤血管新生的关系近年才受到关注^[12]。已证实肥大细胞在新生毛细血管出芽附近聚集,推测肥大细胞有促进血管新生的作用^[13]。本研究结果显示肿瘤组织中的微血管数目显著高于正常甲状腺,甲状腺癌的微血管数目高于甲状腺腺瘤,且随着肿瘤恶性程度的增加有增多的趋势,恶性程度高的 UTC 与恶性程度低的 PTC 和 FTC 也有明显差别,且与肿瘤淋巴结转移有关。Spearman 等级相关分析显示,甲状腺癌 MC 的数量和 tryptase 表达水平与 MVD 存在显著正相关,提示肥大细胞浸润有利于肿瘤的血管新生和转移。肥大细胞与血管新生关系密切是与其分泌的 tryptase 的作用分不开的^[14]。Tryptase 是由肥大细胞分泌的一种丝氨酸蛋白酶,其刺激肿瘤血管新生的环节可能有:(1)激活基质金属蛋白酶和纤维蛋白溶解酶原激活剂,促进细胞外基质的降解和内皮细胞迁移,同时促进恶性肿瘤细胞的转移;(2)血管内皮细胞的有丝分裂原促进内皮细胞增殖^[15]。综上所述,甲状腺肿瘤间质中肥大细胞及其分泌的 tryptase 有促进血管新生的作用,因而可促进甲状腺肿瘤的浸润和转移,从而影响肿瘤的预后。

参考文献(References)

- [1] Blair R J, Meng H, Marchese M J, et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation-tryptase is a novel, potent angiogenic factor [J]. J Clin Invest,1997,99(11):2691-2700
- [2] Cristina C, Perez-Millan MI, Luque G, et al. VEGF and CD31 association in pituitary adenomas [J]. Endocrine Pathology,2010,21(3):154-160
- [3] Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer [J]. Clin Cancer Res,1996,2(10):1679-1684
- [4] Ribatti D, Ermas MG, Vacca A, et al. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlated with a poor prognosis in melanoma[J]. Eur J Clin Invest,2003,33(5):420-425
- [5] Aoki M, Pawankar R, Niimi Y, et al. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and Rantes[J]. Int Arch Allergy Immunol,2003,130(3):216-223
- [6] Estofotele CF, Botelho-Machado C, Taboga SR, et al. Effects of myenteric denervation on extracellular matrix fibers and mast cell distribution in normal stomach and gastric lesions [J]. Cancer Cell International,2010,(6):18
- [7] Ching S, Sullivan M, Yuan L, et al. Mast cells dysregulate apoptotic and cell cycle genes in mucosal squamous cell carcinoma [J]. Cancer Cell International,2006,2006(12):28-28
- [8] 黄闻,何韶衡,李明才,等. 应用双重免疫组化技术研究肥大细胞亚型与食管癌的相关性[J]. 中国肿瘤临床,2008,35(15):881-883
Huang T, He SH, Li MC, et al. Determination of the correlation between mast cell subtypes and esophageal carcinoma using double labeling immunohistochemistry [J]. Chinese journal of clinical oncology,2008,35(15):881-883
- [9] 顾漪萍,向萌,陆超,等. 肥大细胞类胰蛋白酶促进人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435 的跨膜侵袭[J]. 复旦学报(医学版),2008,35(3):407-410
Gu YP, Xiang M, Lu C, et al. Mast cell tryptase promotes the invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-435 [J]. Fudan Univ J Med Sci,2008,35(3):407-410
- [10] Furukawa H, Kitazawa H, Kaneko I, et al. Mast cells inhibit CD8⁺ T cell-mediated rejection of a malignant fibrous histiocytoma-like tumor: Involvement of fas-fas ligand axis[J]. American Journal of Immunology,5(3):89-97
- [11] Sharma B, Sriram G, Saraswathi T, et al. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma [J]. Indian Journal of Dental Research, 2010,21(2): 260-265
- [12] Wimazal F, Jordan JH, Sperr WR, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with systemic mastocytosis [J]. Am J Pathol, 2002,160(5):1639-1645
- [13] Dilek FH, Öztürk F, Aktepe F, et al. Mast cells and angiogenesis in primary and recurrent pterygia[J]. Türk Patoloji Dergisi,23(3):132-136
- [14] Vahabi S, Rezazadeh F. Correlation of mast cell numbers and different periodontal diseases[J]. Research Journal of Biological Sciences, 2010, 5(4):340-344
- [15] Ammendola M, Patruno R, Di Lecce V, et al. Mast cells positive to tryptase correlates with protease-activated receptor-2 expression and microvascular density in breast cancer patients[J]. BMC Geriatrics,2010,10(1):A114