

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.012

周细胞覆盖率与胃癌侵袭相关性的分析*

韩伟¹ 翟丽丽² 王正彩³ 吴红梅³ 齐蕾⁴ 周秋锋⁵ 单丽辉⁶ 柴翠翠⁷
王瑞芬⁸ 管雯斌⁸ 王立峰^{8△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 齐齐哈尔市第一医院病理科 黑龙江 齐齐哈尔 161000;
3 哈尔滨医科大学附属第四医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001; 4 河北省邢台市人民医院病理科 河北 邢台 054031;
5 浙江省湖州市安吉县人民医院病理科 浙江 湖州 313000; 6 哈尔滨市第五医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150000;
7 深圳市坪山区人民医院病理科 广东 深圳 518118; 8 上海交通大学医学院附属新华医院病理科 上海 200092)

摘要 目的:探讨周细胞在胃癌血管周围的覆盖率是否可以作为判断胃癌预后的一个指标。**方法:**利用免疫组织化学双染的方法同时标记内皮细胞(抗 CD34 抗体)和周细胞(抗 α -SMA 抗体),检测 48 例胃癌石蜡标本当中微血管壁周细胞覆盖率(microvessel pericyte coverage index, MPI),应用 SPSS11.5 统计软件分析 MPI 与胃癌患者性别、年龄、肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移、临床分期、以及脉管内是否有癌栓等临床病理参数之间的关系。**结果:**MPI 与胃癌的分化程度呈正相关($P=0.002$),与脉管内是否有癌栓呈负相关($P=0.002$),而与患者年龄、性别、肿瘤大小、浸润深度、临床分期、淋巴结转移等无关(P 均 >0.05)。**结论:**利用免疫组织化学双染的方法可以清晰标记胃癌的微血管结构,血管的不成熟即周细胞覆盖率低成为胃癌患者预后差的重要因素。

关键词:胃癌;肿瘤血管发生;周细胞;周细胞覆盖率

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5446-05

Analysis of the Relationships between Microvessel Pericyte Coverage Index and Invasion in Gastric Cancer*

HAN Wei¹, ZHAI Li-li², WANG Zheng-cai³, WU Hong-mei³, QI Lei⁴, ZHOU Qiu-feng⁵, SHAN Li-hui⁶, CHAI Cui-cui⁷,
WANG Rui-fen⁸, GUAN Wen-bin⁸, WANG Li-feng^{8△}

(1 Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province, 150001, China;
2 Department The first hospital of Qiqihar, 161000, China; 3 Department of Pathology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province, 150001, China; 4 Department of Pathology, Xingtai People's Hospital, 054031, China;
5 Department People's hospital of Anji county Huzhou city, Zhejiang province, 313000, China; 6 Department The fifth hospital of haerbin, 150000; 7 Department People's hospital of Pingshan district, Shenzhen city, 518118, China; 8 Department of Pathology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether Microvessel pericyte coverage index whether can be used as an indicator to determine the prognosis of gastric cancer. **Methods:** Forty-eight surgical specimens from our department were used. Double staining of endothelial cells with anti-CD34 antibody and pericytes with anti- α -smooth muscle actin antibody was performed. The microvessel pericyte coverage index (MPI) as an index of microvessel maturation was evaluated. All statistical analyses were performed with SPSS11.5, including MPI relations to the gender, age, size, the depth, lymph node metastasis, clinical stages and cancer embolus in the tube. **Results:** MPI had a positive correlation with the extent of cancer differentiation ($P=0.002$) and a negative correlation with vascular invasion ($P=0.002$). But MPI had nothing to do with other characteristics of pathology, such as gender, age and lymph node metastasis. **Conclusions:** To utilize double-staining with immunohistochemical technology can clearly mark the structure of the microvessels. The immature microvessels, which means low MPI is an important factor to the poor prognosis of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; Tumor angiogenesis; Pericytes; Microvessel pericyte coverage index

Chinese Library Classification(CLC): R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5446-05

前言

大量的基础及临床研究表明,肿瘤细胞通过新生血管提供氧气及营养物质来促进自身的增殖并侵入血管实现远处转移,

既往对肿瘤微血管的研究主要集中于微血管的组成成分之一 -- 内皮细胞,而对另一组成成分 -- 周细胞的研究甚少。本研究利用免疫组织化学双染的方法,清晰展示胃癌血管壁的内皮细胞和周细胞,并分析周细胞覆盖率(MPI)与胃癌临床病理特征

* 基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题(2010-029)

作者简介:韩伟(1977-),女,硕士,副主任医师,主要研究方向:肿瘤病理学,作者所在

科室为国家临床重点专科, E-mail: mingmei_77@163.com

△ 通讯作者:王立峰,电话:15021779369, E-mail:wlf6009@163.com

(收稿日期:2014-02-14 接受日期:2014-03-12)

之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集哈尔滨医科大学附属第四医院病理科 2008 年 1 月~2009 年 6 月病理诊断为胃癌的石蜡标本 48 例,其中男性 39 例,女性 9 例;年龄 35~77 岁,中位年龄 59 岁;<2 cm 者 8 例,2 cm≤肿瘤大小<5 cm 者 24 例,肿瘤大小≥5 cm 者 16 例;按 1965 年 Lauren 分型,肠型 32 例,弥漫型 16 例;WHO 2010 年分级标准,高分化和中分化者 25 例,低分化和未分化 23 例;临床 I 期 8 例,II 期 9 例,III 期 10 例,IV 期 21 例;肿瘤浸润未达浆膜者 14 例,达浆膜者 34 例;有淋巴结转移者 38 例,无淋巴结转移者 10 例;脉管内见癌栓者 8 例,未见癌栓者 40 例。患者术前未经过任何放化疗及其他辅助治疗。

1.2 主要试剂

DouSP™免疫组化双染试剂盒,一抗分别为即用型鼠抗人单克隆抗体 CD34(克隆号 QBEnd/10)标记内皮细胞,鼠抗人单克隆抗体 α -SMA(克隆号 1A4,1:100 稀释)标记周细胞,上述

试剂均购自福州迈新生物技术开发公司。

1.3 方法

所有组织标本均经 10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片,然后用免疫组织化学双染方法行内皮细胞和周细胞染色。预处理均为柠檬酸(pH6.0)高温高压修复, α -SMA 采用 BCIP/NBT 显色,以胞浆中出现紫黑色颗粒为阳性,CD34 采用 AEC 显色,以胞膜和胞浆呈现深红色为阳性,免疫组化操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。以 PBS 代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。

1.4 结果判定

镜下观察,CD34 标记的内皮细胞形成一独立管腔即为一血管,与 CD34 阳性标记的内皮细胞相连的 α -SMA 阳性的细胞即为周细胞。于低倍镜下找到五个高血管区,高倍镜下计数相应血管数及周细胞覆盖血管数,并求其平均值,统计 MPI。

1.5 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析。MPI 以表示,应用方差分析和 The Mann-Whitney U test 来分析 MPI 与临床病理特征之间的关系, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

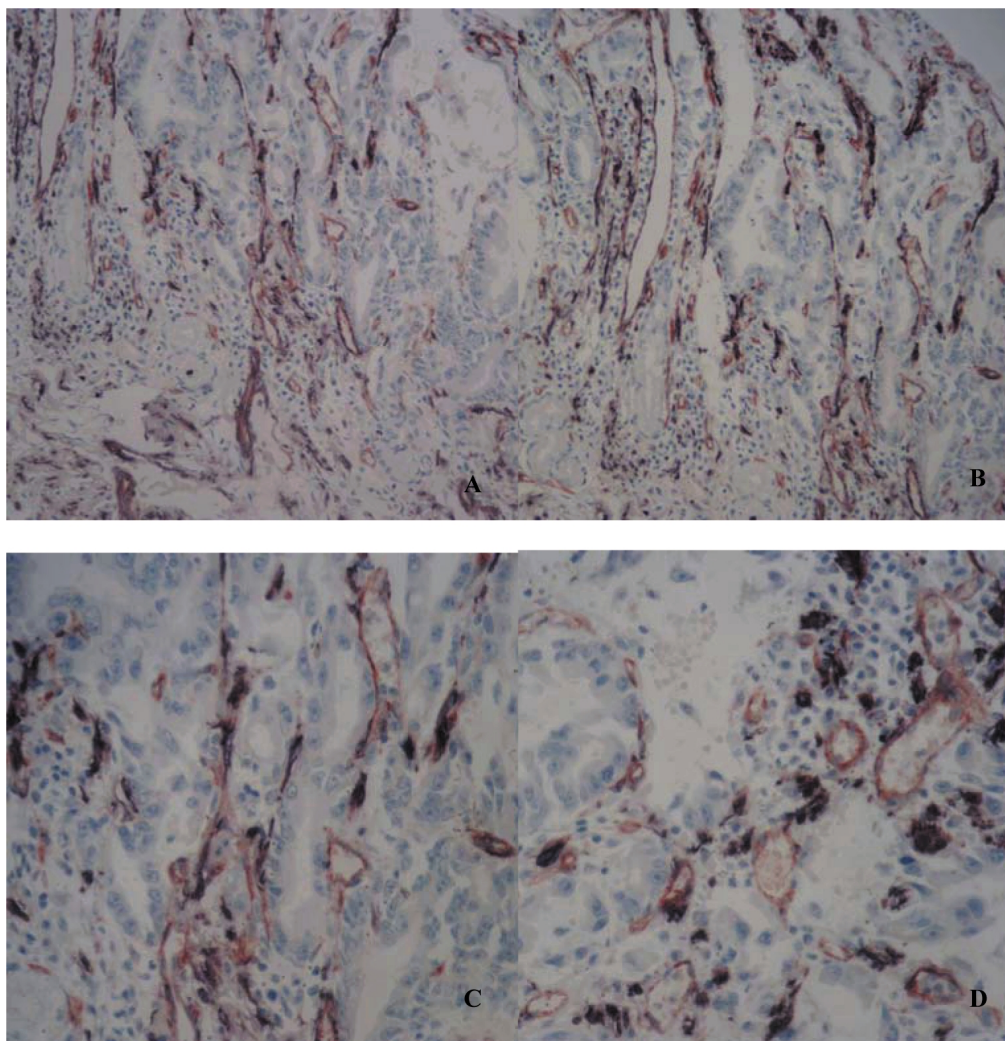


图 1 免疫组织化学双染 α -SMA(紫黑色)、CD34(深红色)。图 A、B 200 倍放大,图 C、D 400 倍放大。部分毛细血管周围内皮细胞外侧有周细胞覆盖,而有些毛细血管仅见内皮细胞单独构成一独立管腔

Fig.1 Immunohistochemical double staining of α -SMA (purple), CD34 (dark red). Figure A, B were 200-fold magnification, Figure C, D were 400-fold magnification. Pericytes closed to endothelial cells, and located in the lateral. Some capillaries only were constituted separate lumen by endothelial cells alone

2 结果

2.1 周细胞的识别(图 1)

胃癌石蜡标本经连续切片,脱水,应用抗 α -SMA、CD34 两个第一抗体分别标记同一张切片上的周细胞与内皮细胞,其中内皮细胞胞浆及胞膜染成深红色,周细胞胞浆出现紫黑色颗粒沉积,有些血管的管壁只由一层内皮细胞覆盖,而无周细胞;而有些血管有两层细胞:周细胞在内皮细胞外侧,紧贴内皮细胞。

2.2 MPI 与胃癌临床病理参数的关系(表 1)

MPI 在胃癌组织当中的表达为 5.66~86.84/100×HPF,中

位数 39/100×HPF,平均数为 43.28/100×HPF,MPI 与胃癌的分化程度呈正相关($P=0.002$),与脉管内是否有癌栓呈负相关($P=0.002$),与患者的其他临床病理特征无关(P 均 >0.05)。

3 讨论

胃癌是起源于胃粘膜上皮的最常见消化道恶性肿瘤之一,转移是导致胃癌治疗失败以及引起患者死亡的关键环节。胃癌的发生发展除了其本身的因素外,胃癌生长的微环境也对其产生重要影响^[1],其中胃癌组织微血管生成成为决定胃癌发展、转移的关键因素之一。微血管由内皮细胞和周细胞组成,周细胞

表 1 MPI 与临床病理特征之间的关系
Table1 The correlations between the MPI and clinicopathologic factors

Clinicopathological features	n	MPI(%)	P
		$\bar{X} \pm S$	
Gender	39	45.34± 23.33	0.868
Male	9	46.35± 23.85	
Female			
Age	10	43.78± 25.80	0.463
< 50	38	45.99± 22.79	
≥ 50			
Tumor size(cm)	8	40.28± 17.47	0.612
< 2	24	48.97± 24.19	
2≤ tumor size< 5	16	42.99± 24.55	
≥ 5			
Lauren classification	32	48.44± 23.94	0.280
Intestinal type	16	39.70± 21.06	
Diffuse type			
Histological grade	25	54.97± 21.94	0.002
High-moderate	23	35.27± 20.28	
Low-undifferentiation			
Depth of invasion	14	49.63± 20.45	0.437
Not to serosa	34	43.84± 24.29	
To serosa			
Lymph node metastasis	10	37.37± 21.66	0.215
Negative	38	47.67± 23.35	
Positive			
Cancer embolus	8	56.76± 17.71	0.002
Positive	40	29.94± 18.30	
Negative			
Clinical stage			0.420
I	8	42.86± 20.91	
II	9	49.10± 23.44	
III	10	34.60± 27.54	
IV	21	83.08± 28.22	

与内皮细胞通过结构上的直接接触以及功能上的相互作用,形成一稳定的微血管。然而,在肿瘤组织当中,新形成的肿瘤微血管扭曲、扩张、动静脉短路以及渗透性增加,结构不完整^[23]。什么原因导致肿瘤微血管结构发生改变以及这种结构的改变与不同的肿瘤临床病理特征之间有何相关性至今尚不清楚。

胃癌的血管生成是一个多因素、级联、整体、动态的过程。过去对胃癌血管的研究主要偏重于毛细血管的数量以及其组成成分之一——内皮细胞,而对于血管的成熟度以及毛细血管壁周细胞的研究却很少。本研究立足于微血管的两种组成成分:内皮细胞和周细胞,清晰标记不同级别的胃癌标本当中血管的结构,通过计数 MPI 并运用统计软件分析其与临床病理特征之间的联系。研究结果发现 MPI 与胃癌的分化程度呈正相关($P=0.002$),这与 Kinouchi T^[4]等人在肾癌中的研究结果相一致,即高分化的胃癌组织血管成熟度较高,而低分化胃癌组织血管的成熟度较低。血管的这一结构变化可能因为:随着胃癌恶性程度的增加,胃癌细胞的生长增殖能力增强,所需营养物质相对增加,那么就要求有足够的血管供应癌细胞生长所需的养分,而新生血管首先是由内皮细胞出芽形成,此时形成的血管较稚嫩,调节血管形成、稳定和功能的关键因素——周细胞还没有募集到内皮细胞外表面。另外,胃癌恶性程度的增加及 MPI 的下降,也为胃癌细胞的血道转移提供了条件。所以,对于肿瘤恶性程度的判定, MPI 可能是个很好的预测指标。

通过电镜研究发现内皮细胞与周细胞之间的接触方式有三种:①缝隙连接^[5-7];②紧密连接^[5-7];③ peg-socket 盒^[8]:一种突触样连接,内皮细胞形成钉槽,包裹周细胞所形成的钉突。大量实验证实两种细胞间存在五种信号传导通路:① TGF- β 信号通路;② Angiopoietin-Tie2 信号通路;③ PDGF-B/ PDGFR- β 信号通路;④ S1P/Edg 信号通路;⑤ Notch 信号通路。周细胞与内皮细胞之间通过以上联系对血管的形成、稳定以及渗透性方面起到了至关重要的作用,若失去其中任何一种成分对于血管的形态以及稳定一定会产生影响。本研究结果表明 MPI 与脉管内是否有癌栓呈负相关($P=0.002$),即脉管内有癌栓组 MPI 较低,而脉管内无癌栓组 MPI 较高。这与 K Wele^[9]等通过对前列腺癌的研究指出 MPI 减少对于癌细胞侵入到血管内起到了重要的作用相一致。原因可能是由于正常血管是由内皮细胞和周细胞两种细胞成分组成,而缺少了周细胞的覆盖,一方面癌细胞只需穿透一种细胞成分即内皮细胞就可侵入到血管内,另一方面使周细胞和内皮细胞间的连接和信号传导通路遭到破坏,进而影响血管的稳定性,从而为癌细胞的血道转移提供了有利条件。

对于肿瘤血管结构变化发生的机制,目前还不是很清楚。Simon P. Robinson 等^[10]通过 MRI 成像技术证实肿瘤源性的血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 在肿瘤血管的形态以及功能上所起的作用。Bababegy SR 等通过研究骨髓源性周细胞在脑肿瘤组织当中表型上的变化,发现在血管形成初期,周细胞主要表达神经胶质细胞抗原 2 (neuro/glial cell 2 chondroitin sulfate proteoglycan, NG2)、血小板源性生长因子受体 2 (platelet-derived growth factor- β , PDGFR- β),而在成熟血管, α -SMA 的阳性表达率增加^[11]。Yvonne Reiss^[12]等通过运用鼠腺癌模型证明了血管生成素 (angiopoietin-2) 在血管形态改变方面所起的作用。对于周细胞在内皮细胞外表面覆盖

的情况以及周细胞在癌症当中所起的作用学者们也做了研究,如 Xiaojie Xian 等^[13]通过对转基因胰岛瘤模型 Rip1Tag2(RT)以及 Pdgfbret/rety 遗传小鼠的研究,表明 RT 癌细胞通过对周细胞的干扰,影响周细胞与内皮细胞之间的作用,从而引起癌细胞的血道转移。Guo P^[14]等利用胶质瘤细胞系在体外证明 PDGF-B 通过血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导内皮细胞出芽以及周细胞的募集,从而促进胶质瘤血管的形成。然而,以上研究者的研究只是片面的对某一组织、某一因子的探讨,肿瘤血管结构的改变是一个多因素参与、复杂的过程,所以前路漫漫,有待深入研究。

在本实验当中,应用 CD34 标记内皮细胞,而不应用 CD31,因为 CD31 在标记血管内皮的同时,亦标记淋巴管内皮。但在血管计数时,一定要计数 CD34 阳性标记微血管管腔记为血管,而其他 CD34 阳性部位不应计数在内,因为在一些非特异性的免疫细胞以及炎性细胞, CD34 也可能为阳性^[15,16]。 α -SMA 为平滑肌肌动蛋白,主要表达于间质,其亦表达于周细胞^[17,18],所以本实验应用抗 α -SMA 抗体标记周细胞,计数时以与 CD34 阳性标记的内皮细胞相连的 α -SMA 阳性的细胞计为周细胞。国内有学者亦通过运用抗 α -SMA 抗体来研究乳腺癌中的周细胞^[19,20]。

本实验利用免疫组织化学双染的方法,成功标记了胃癌微血管的组成成分——内皮细胞和周细胞,清晰的呈现了胃癌血管的形态结构。同时,通过探讨 MPI 与胃癌临床病理特征之间的关系,证实 MPI 的多少对胃癌的病情评估起到重要的作用, MPI 低可以作为胃癌患者预后差的重要因素。

参考文献(References)

- [1] 齐蕾,单丽辉,柴翠翠,等. 胃癌中肿瘤微环境转移的价值[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(2): 1037-1040
- [2] Qi Lei, Shan Li-hui, Chai Cui-cui, et al. The value of tumor microenvironment of metastasis in gastric cancer[J]. J Clin Exp Pathol, 2012, 28(2):1037-1040
- [3] Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients[J]. Oncology, 2005,69(2):159-66
- [4] Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, et al. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors[J]. Am J Pathol, 2002, 160(3):985-1000
- [5] Kinouchi T, Mano M, Matsuoka I, et al. Immature tumor angiogenesis in high-grade and high-stage renal cell carcinoma [J]. Urology, 2003, 62:765-770
- [6] Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, et al. Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries [J]. Anat Embryol, 1984, 170:155-159
- [7] Gerhardt H, Wolburg H, Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken [J]. Dev Dyn, 2000, 218:472-479
- [8] Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis[J]. Cell Tissue Res, 2003,22:15-23
- [9] Caruso RA, Fedele F, Finocchiaro G, et al. Ultrastructural Descriptions of Pericyte/endothelium Peg-socket Interdigitations in the Microvascu-

- lature of Human Gastric Carcinomas[J]. Anticancer Res, 2009, 29: 449-454
- [9] K Welén, K Jennbacken, T Tesánn et al. Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2009, 12: 41-46
- [10] Simon P. Robinson, Christian Ludwig, Janna Paulsson. The effects of tumor-derived platelet-derived growth factor on vascular morphology and function in vivo revealed by susceptibility MRI [J]. Int J Cancer, 2008, 122: 1548-1556
- [11] Bababeygy SR, Cheshier SH., Hou LC, et al. Hematopoietic Stem Cell-Derived Pericytic Cells in Brain Tumor Angio-Architecture[J]. Stem cells and development, 2008, 17: 11-18
- [12] Yvonne Reiss, Anette Knedla, Andrea O Tal, et al. Switching of vascular phenotypes within a murine breast cancer model induced by angiopoietin-2[J]. J Pathol, 2009, 217: 571-580
- [13] Xian X, Håkansson J, Ståhlberg A, et al. Pericytes limit tumor cell metastasis[J]. J. Clin. Invest, 2006, 116(3): 642-51
- [14] Guo P, Hu B, Gu W, et al. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment[J]. AJP, 2003, 162, (4): 1083-1093
- [15] Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, et al. Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer[J]. Cancer, 1996, 77: 1722-1728
- [16] Jackson DG, Prevo R, Clasper S, et al. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis[J]. Trends Immunol, 2001, 22: 317-321
- [17] 周敏, 翟丽丽, 齐蕾, 等. 周细胞的原代培养[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(1): 36-38
- Zhou Min, Zhai Li-li, Qi Lei, et al. The Primary Culture of pericytes [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(1): 36-38
- [18] Cao Y, Zhang ZL, Zhou M, et al. Pericyte coverage of differentiated vessels inside tumor vasculature is an independent unfavorable prognostic factor for patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2013, 119(2): 313-324
- [19] 王医术, 李玉林, 朱桂彬, 等. 乳腺癌间质新生血管周细胞的形态学特点及其意义[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(3): 176-179
- Wang Yi-shu, Li Yu-lin, Zhu Gui-bin, et al. Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of pericytes during neovascularization in breast carcinoma[J]. Chin J Pathol, 2000, 29(3): 176-179
- [20] 翟丽丽, 杨述玲, 李争艳, 等. 周细胞的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(8): 1672-1675
- Zhai Li-li, Yang Mi-ling, Li Zheng-yan, et al. The latest research progress of pericyte[J]. Modern oncology, 2011, 19(8): 1672-1675
- (上接第 5418 页)
- Ruan Zhi-peng, Han Dong, Yuan Mei. Determination of scutellarin and its pharmacokinetics study in rat by high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. Journal of Changzhi Medical College, 2004, 18(4): 247-249
- [19] 杨炳华. 野黄芩苷的药物动力学及代谢研究 [D]. 沈阳药科大学, 2004: 1-141
- Yang Bing-hua. Study on pharmacokinetics and metabolism of scutellarin[D]. Shenyang Pharmaceutical University, 2004: 1-141
- [20] 葛庆华, 周臻, 支晓瑾, 等. 灯盏花素在犬体内的药动学和绝对生物利用度研究[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(12): 28-30
- Ge Qing-hua, Zhou Zhen, Zhi Xiao-jin, et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of breviscapine in Beagle dogs [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2003, 34(12): 28-30
- [21] Rui Shi, Shi Qiao, De Qing-yu, et al. Simultaneous determination of five flavonoids from scutellariabarabata extract in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study [J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(19): 1625-1632
- [22] 沈群, 罗佳波. 中药复方药代动力学研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2004, 21(6): 457-460
- Shen Qun, Luo Jia-bo. Progress on pharmacokinetics of compound prescriptions of TCM [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2004, 21(6): 457-460
- [23] 陈雄, 申锦林, 邹岳萍. 灯盏生脉胶囊的临床应用研究进展[J]. 中药导报, 2011, 17(9): 93-95
- Chen Qiong, Shen Jin-lin, Zou Yue-ping. The research progress on Dengzhan Shengmai Capsule [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2011, 17(9): 93-95