

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.014

· 临床研究 ·

肿瘤淋巴管入侵与无淋巴结转移膀胱癌复发及预后的相关性分析*

李 庆¹ 王 莉² 杨树才² 李鑫磊² 马 晶^{2△}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院泌尿外科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学解剖教研室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:分析肿瘤淋巴管入侵与无淋巴结转移膀胱癌复发和预后之间的关系。**方法:**选取临床资料完整的膀胱癌病例 72 例,分为淋巴结转移组(32 例)和无淋巴结转移组(40 例)。采用 Spearman 相关分析探讨淋巴管入侵与膀胱癌复发和预后的相关性,应用 Kaplan-Meier 法描绘生存曲线, Cox 比例危险度模型筛选影响膀胱癌患者预后的因素。**结果:**在 72 例膀胱癌组织中,淋巴管入侵的阳性率是 48.6%(35/72),淋巴管入侵的阳性率随肿瘤分期和分级增加而显著升高($P<0.05$);淋巴结转移组的淋巴管入侵阳性率为 68.8%(22/32),显著高于无淋巴结转移的 32.5%(13/40)。淋巴管入侵与膀胱癌的临床分期、分级、淋巴结转移以及无淋巴结转移膀胱癌复发均显著相关($P<0.05$)。淋巴管入侵阴性的患者的五年总体生存率显著高于淋巴管入侵阳性者,淋巴管入侵是无淋巴结转移膀胱癌复发和预后不良的危险因素。**结论:**肿瘤淋巴管入侵与膀胱癌临床分期和淋巴结转移密切相关,并影响膀胱癌患者的总体生存率,可作为无淋巴结转移膀胱癌复发和预后的预测因素。

关键词:肿瘤淋巴管入侵;膀胱癌;复发;预后

中图分类号:R737.14 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2015)05-854-04

Correlative Analysis of Tumor Lymphatic Invasion with the Recurrence and Prognosis of Bladder Cancer with Negative Lymph Nodes Metastasis*

LI Qing¹, WANG Li², YANG Shu-cai², LI Xin-lei², MA Jing^{2△}

(1 Department of Urology Surgery, the Fourth Clinical Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Anatomy, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the correlations of lymphatic vessel invasion with recurrence and prognosis of bladder cancer with negative lymph node metastasis. **Methods:** Seventy-two paraffin embedded stored specimens from patients of bladder cancer with pathological diagnosis were included in this study and divided into lymph node metastatic group ($n=32$) and non-metastatic group ($n=40$). Spearman correlation analysis was used for statistical correlation analysis between lymphatic vessel invasion and recurrence as well as prognosis of bladder cancer. The overall survival curve was formed by Kaplan-Meier analysis. Analysis of prognostic factors was based on the Cox proportional hazards model. **Results:** There were 35 cases showed positive lymphatic vessel invasion, prevalence of lymphatic vessel invasion increased with higher clinical stage and grade. The positive rate was 68.8%(22/32) in lymph node group and 32.5%(13/40) in non-metastasis group respectively. The tumor lymphatic vessel invasion was related with the clinical stage, grade, lymph node metastasis status and lymph node negative metastasis recurrence as well as prognosis of bladder cancer($P<0.05$). The overall survival with negative lymphatic vessel invasion was significantly higher than that with positive lymphatic vessel invasion by Kaplan-Meier analysis. Tumor lymphatic vessel invasion was the indicator for the recurrence and prognosis of bladder cancer negative lymph node metastasis by multivariate Cox regression analysis. **Conclusion:** Tumor lymphatic vessel invasion was correlated with the clinical stage and lymph node metastasis in bladder cancer, and affected the overall survival of patients with bladder cancer, which could be considered as the predictive factor of recurrence and prognosis of bladder cancer.

Key words: Tumor lymphatic invasion; Bladder cancer; Recurrence; Prognosis

Chinese Library Classification: R737.14 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)05-854-04

前言

肿瘤的侵袭和转移受多种复杂因素的影响。肿瘤的淋巴转

移是肿瘤发展过程中的早期事件及影响预后的关键因素^[1,2]。肿瘤淋巴管生成是肿瘤淋巴结转移的前提条件,血管内皮生长因子家族在肿瘤淋巴管生成中起重要作用。很多动物实验及临床

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201041)

作者简介:李庆(1970-),男,主治医师,主要研究方向:膀胱癌淋巴结转移机制,电话:13603642786, E-mail:1701336@qq.com

△ 通讯作者:马晶, E-mail:jingma2009@aliyun.com

(收稿日期:2014-08-06 接受日期:2014-08-30)

病理实验中已经证实,肿瘤淋巴管的生成与肿瘤淋巴结转移呈显著正相关^[3-5]。15%-30%的膀胱癌患者在诊断确诊时已属于肌层浸润型膀胱癌,膀胱癌根治术仍是其金标准治疗的"金标准方法"^[6],但大约40%的患者术后发生局部复发,一旦发生转移,膀胱癌根治术和术后系统化疗亦无法提高患者的生存率^[7,8]。

研究已证实临床分期、淋巴结转移、肿瘤大小、血肌酐增高和肿瘤血管入侵是膀胱癌复发的风险因素^[9,10],临床分期和淋巴结转移是影响患者生存率的独立预后因素^[11]。肿瘤淋巴管入侵是指在肿瘤组织内观察到肿瘤细胞位于新生的淋巴管腔内,是肿瘤细胞发生淋巴结转移的第一阶段。淋巴管入侵是否是影响肿瘤进展、复发和生存率的风险因素尚存在争论。有研究表明肿瘤淋巴管入侵是影响膀胱癌患者预后的风险因子^[12,13]。也有研究认为只有肿瘤血管入侵是判断膀胱癌复发和预后的风险因子,而淋巴管入侵与膀胱癌复发和预后无关^[10]。为明确肿瘤淋巴管入侵与膀胱癌临床病理参数和预后之间的关系,本研究应用免疫组化法观察肿瘤淋巴管的入侵情况,旨在分析淋巴管入侵与膀胱癌复发和预后之间的关系,为临床膀胱癌术后制定系统的化疗方案提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

标本取自哈尔滨医科大学附属第一医院确诊为膀胱癌患者的存档蜡块72例,临床病理资料见表1。鼠抗人D2-40抗体购自博士德生物公司,PV-6001免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 免疫组化染色

取4 μm 厚的组织切片,常规脱蜡至水,0.3%过氧化氢孵育30 min,以阻断内源性过氧化物酶。0.01MPBS冲洗5 min $\times$

3次,高压抗原修复:将切片浸入0.01 M 柠檬酸盐抗原修复液(pH6.0),高压2min,自然冷却至室温。0.01MPBS冲洗5 min $\times$ 3次,滴加一抗(D2-40的工作浓度是1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。0.01MPBS冲洗5 min $\times$ 3次,滴加生物素标记的二抗,室温孵育30 min。0.01MPBS冲洗5 min $\times$ 3次,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片,光镜观察。PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 图像分析

肿瘤淋巴管入侵的判断标准:在高倍镜下,寻找D2-40标记的肿瘤组织内淋巴管,D2-40阳性标记的淋巴管腔内有癌细胞即可判断此病例发生肿瘤淋巴管入侵。

1.4 统计学分析

应用SPSS 16.0软件对各组间计量资料采用等方差双样本t检验,相关性分析采用Spearman相关分析。采用Kaplan-Meier法描绘生存曲线,对数秩检验(Log-Rank Test)比较其差别。Cox比例危险度回归模型筛选影响膀胱癌患者预后的因素,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤淋巴管入侵与膀胱癌淋巴结转移的相关性

肿瘤淋巴管入侵是指在肿瘤组织内的淋巴管腔内见到入侵的肿瘤细胞。在72例膀胱癌组织中,淋巴管入侵的阳性率为48.6%(35/72)。其中,淋巴结转移的32例膀胱癌病例中,淋巴管入侵的阳性率为68.8%(22/32);无淋巴结转移的40例标本中,淋巴管入侵的阳性率32.5%(13/40)。淋巴结转移组和无淋巴结转移组淋巴管入侵的阳性率比较具有显著差异($r=0.360$, $P=0.002$),表明肿瘤淋巴管入侵与膀胱癌淋巴结转移显著相关(图1)。

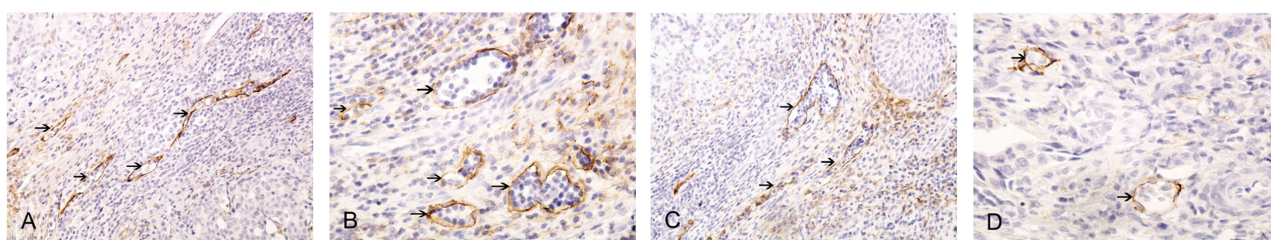


图1 膀胱癌组织内D2-40的表达。A,B:淋巴结转移组内D2-40的表达(A: $\times 200$, B: $\times 400$); C,D:无淋巴结转移组内D2-40的表达(C: $\times 200$, D: $\times 400$)

Fig.1 Detection of tumor lymphatic vessel invasions in bladder cancer by immunostaining with D2-40(arrow). A,B: Lymphatic vessel invasions in lymph node metastatic group(A: $\times 200$, B: $\times 400$); Lymphatic vessel invasions in nonmetastatic group(C: $\times 200$, D: $\times 400$)

2.2 肿瘤淋巴管入侵与膀胱癌临床病理参数的相关性

淋巴管入侵的阳性率随膀胱癌临床分期和临床分级的进展表现为增高的趋势($P<0.05$);有淋巴结转移的膀胱癌组织淋巴管入侵的阳性率高于无淋巴结转移膀胱癌组织淋巴管入侵的阳性率($\chi^2=9.352$, $P=0.002$);淋巴管入侵的阳性率与患者年龄、性别、肿瘤大小和复发均无关(表1)。

2.3 淋巴管入侵与无淋巴结转移膀胱癌患者复发和预后的关系

在40例无淋巴结转移的膀胱癌病例中,淋巴管入侵阳性13例,复发12例,其中8例淋巴管入侵阳性发生复发。统计结

果显示,淋巴管入侵与无淋巴结转移膀胱癌复发显著相关($r=0.478$, $P=0.002$)(表2)。

应用Kaplan-Meier法分析淋巴管入侵对无淋巴结转移膀胱癌患者的五年总体生存率的影响。淋巴管入侵阴性患者的五年总体生存时间是(47.658 $\pm$ 2.592)月,淋巴管入侵阳性患者的五年总体生存时间是(37.625 $\pm$ 3.510)月,淋巴管入侵阴性患者的五年总体生存时间明显长于淋巴管入侵阳性者($\chi^2=7.384$, $P=0.007$)(图2)。Cox比例危险度回归模型分析表明,淋巴管入侵是无淋巴结转移膀胱癌患者预后的危险因素(Hazard Ratio=2.756, $P=0.01$)。

表 1 淋巴管入侵与膀胱癌临床病理参数的相关性

Table 1 Correlation of lymphatic vessel invasion with the clinical characteristics of bladder cancer

参数 Parameter	例数 No.	淋巴管入侵阳性 Positive	淋巴管入侵阴性 Negative	χ^2	P
年龄 Age					
≤ 58	31	16	15	0.196	0.658
>58	41	19	22		
性别 Gender					
男 Male	50	23	27	0.447	0.504
女 Female	22	12	10		
临床分期 Stage					
T1-T2	45	17	28	5.638	0.018
T3-T4	27	18	9		
分级 Grade					
1	24	8	16	6.216	0.045
2	38	19	19		
3	10	8	2		
肿瘤大小 Size					
≤ 3cm	38	17	21	0.484	0.487
>3cm	34	18	16		
复发 Recurrence					
无 No	44	24	20	1.595	0.207
有 Yes	28	11	17		
淋巴结转移 Lymph node metastasis					
无 No	40	13	27	9.352	0.002
有 Yes	32	22	10		

表 2 淋巴管入侵与无淋巴结转移膀胱癌复发的关系

Table 2 Correlation of lymphatic vessel invasion with the recurrence of bladder cancer with negative lymph node metastasis

淋巴管入侵 Lymphatic vessel invasion	复发 Recurrence		r	P
	+	-		
+	8	5	0.478	0.002
-	4	23		

3 讨论

确定淋巴管入侵的标准方法是应用淋巴管内皮标记因子确定组织内的淋巴管,被标记的淋巴管管腔内可观察到侵入淋巴管的成簇的肿瘤细胞。在特异性淋巴管内皮标记物被发现之前,检测淋巴管入侵多采用标记血管内皮和 HE 染色方法,观察淋巴管管腔内成簇的肿瘤细胞,综合判断淋巴管入侵的情况^[14],但这样观察淋巴管入侵具有一定的局限性。首先,如果肿瘤细胞完全充满淋巴管腔,而淋巴管内皮菲薄,就会很难与肿瘤间质入侵区别。其次,在组织固定处理过程中会发生回缩现象,形成人为造成的空间,也造成错误判定淋巴管入侵状态。本研究应用淋巴管内皮特异标记物 D2-40 标记肿瘤组织内的淋巴管,利于正确判定淋巴管入侵的状态,增加实验结果的可靠性。Widodo^[15]和 Lee^[16]在关于乳腺癌的研究中发现,肿瘤细胞淋巴

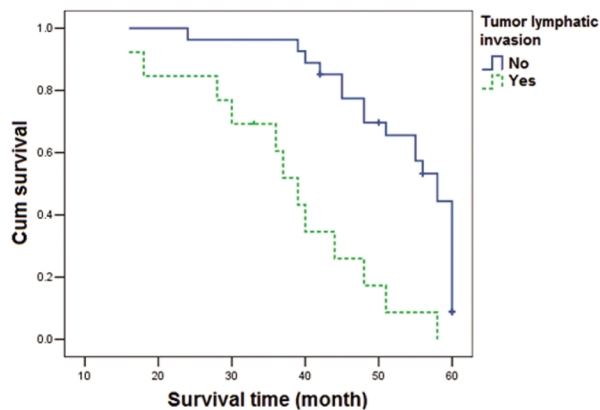


图 2 肿瘤淋巴管入侵对无淋巴结转移膀胱癌患者总体生存率的影响
Fig.2 Effect of tumor lymphatic vessel invasion on the overall survival of bladder cancer patients with negative lymph node metastasis

管入侵可以预测淋巴结转移,是乳腺癌淋巴结转移的预测因子;同时,淋巴管入侵亦是无瘤生存率和总体生存率的预后因素。关于恶性黑色素瘤、胃癌和结肠癌的研究也得到相同的结论^[17,18]。本研究观察了 72 例膀胱癌组织内淋巴管入侵的情况,其中 35 例膀胱癌组织内观察到有淋巴管入侵,淋巴管入侵在淋巴结转移组的发生率明显高于其在无淋巴结转移组的发生率,表明淋巴管入侵与淋巴结转移之间具有显著的相关性,与上述研究的结论一致。

在多种肿瘤中,淋巴结转移是影响肿瘤患者预后的重要因素。然而,对肿瘤体积小、未发生淋巴结转移的肿瘤患者的预后情况很难判断。因此,检测肿瘤早期发生淋巴结转移的预测因子将非常有助于判断患者的预后和指导制定治疗方案。关于胃癌、食管癌的研究证实有淋巴管入侵的患者发生淋巴结微转移的检出率明显高于无淋巴管入侵者,表明淋巴管入侵与淋巴结转移的最初始阶段有关,淋巴管的数量和淋巴管入侵的检测是淋巴结转移预后预测的重要因素^[9]。在恶性黑色素瘤、胃癌和结肠癌的研究中亦得到相同的结论,肿瘤淋巴管入侵还能够预测无淋巴结转移患者的预后^[18]。Huguet^[9]检测了膀胱癌根治术后肿瘤淋巴管入侵的发生率,单因素分析表明淋巴管入侵与膀胱癌的总生存率有关,多因素分析表明淋巴管入侵是膀胱癌患者的独立预后因子,而临床分期和淋巴结转移仅与患者的生存率相关,并不是影响膀胱癌的独立预后因素。Ennis^[7]对 85 例膀胱癌淋巴管入侵的研究证实,淋巴管入侵与膀胱癌的复发无明显关系,Hara^[11]的研究中得到与 Ennis 相似的结论。Leisser^[10]的研究表明肿瘤血管入侵是膀胱癌复发的预测因子,而肿瘤淋巴管入侵不能预测膀胱癌复发。本研究的结论与 Lotan^[20]一致,膀胱癌淋巴管入侵的状态与临床分期、分级和淋巴结转移相关,并与无淋巴结转移膀胱癌的复发和预后有关,是判断无淋巴结转移膀胱癌预后的因素。这些结论支持肿瘤淋巴管入侵发生在淋巴结转移之前或与淋巴结转移同时发生,一旦肿瘤已经发生淋巴结转移,淋巴管入侵可能不再是患者生存率和复发的预测因素,而在无淋巴结转移膀胱患者术后或淋巴结清扫术后,淋巴管入侵的状态是影响生存率和复发的重要预测因素。有肿瘤淋巴管入侵的患者可能已经发生淋巴结微转移,这种微转移在临床病理观察中不易被观察到,被认为是淋巴结转移阴性患者。因此,存在肿瘤淋巴管入侵的患者复发的风险较大,术后应给予系统的药物辅助治疗。

关于肿瘤淋巴管入侵的状态能否作为判断肿瘤复发的预测因子和指导术后辅助化疗还需进一步研究。一些研究已经明确了膀胱癌术后复发和转移的预测因素^[20],术前血 E-Cadherin、Interleukin-6 和 TGF- β 1 是膀胱癌术后临床分期、淋巴结转移和肿瘤淋巴管入侵的预测因子。因此,术前血中预测因子的检测和术后肿瘤淋巴管入侵联合检测可能是制定术后辅助治疗方案的有效预测因素。

参考文献(References)

- [1] Miyata Y, Sagara Y, Watanabe S, et al. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34 [J]. *Virchows Arch*, 2013, 463(5): 673-679
- [2] Von Hardenberg J, Martini T, Knauer A, et al. Expression and predictive value of lymph-specific markers in urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(1): 54.e9-17
- [3] Deguchi K, Ichikawa D, Soga K, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factors C and D and chemokine receptor CCR7 in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(6): 2361-2366
- [4] Li L, Liu B, Li X, et al. Vascular endothelial growth factor D and intratumoral lymphatics as independent prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma[J]. *The Anat Rec*, 2009, 292(4): 562-569
- [5] Zhou M, He L, Zu X, et al. Lymphatic vessel density as a predictor of lymph node metastasis and its relationship with prognosis in urothelial carcinoma of the bladder[J]. *BJU Int*, 2011, 107(12): 1930-1935
- [6] Tarin TV, Power NE, Ehdaie B, et al. Lymph node-positive bladder cancer treated with radical cystectomy and lymphadenectomy: effect of the level of node positivity[J]. *Eur Urol*, 2012, 61(5):1025-1030
- [7] Ennis RD, Petrylak DP, Singh P, et al. The effect of cystectomy, and perioperative methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin chemotherapy on the risk and pattern of relapse in patients with muscle invasive bladder cancer[J]. *J Urol*, 2000, 163(5): 1413-1418
- [8] Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, et al. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management [J]. *Cancer Pract*, 2002, 10(6): 311-322
- [9] Huguet J. Follow-up after radical cystectomy based on patterns of tumour recurrence and its risk factors [J]. *Actas Urol Esp*, 2013, 37(6): 376-382
- [10] Leissner J, Koeppen C, Wolf HK. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in urothelial bladder cancer treated with radical cystectomy[J]. *J Urol*, 2003, 169(3): 955-960
- [11] Hara S, Miyake H, Fujisawa M, et al. Prognostic variables in patients who have undergone radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2001, 31(8): 399-402
- [12] Chalasani V, Chin JL, Izawa JJ. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer[J]. *Can Urol Assoc J*, 2009, 3(6 Suppl 4): S193-198
- [13] Ma Y, Hou Y, Liu B, et al. Intratumoral lymphatics and lymphatic vessel invasion detected by D2-40 are essential for lymph node metastasis in bladder transitional cell carcinoma [J]. *The Anat Rec*, 2010, 293(11): 1847-1854
- [14] Alexander-Sefre F, Singh N, Ayhan A, et al. Detection of tumour lymphovascular space invasion using dual cytokeratin and CD31 immunohistochemistry[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(10): 786-788
- [15] Widodo I, Ferronika P, Harijadi A, et al. Clinicopathological significance of lymphangiogenesis and tumor lymphovascular invasion in Indonesian breast cancers [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(2): 997-1001
- [16] Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, et al. Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(3): 357-362
- [17] Birner P, Obermair A, Schindl M, et al. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(1): 93-97
- [18] Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere SJ, et al. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study [J]. *Br J Cancer*, 2006, 94 (11): 1643-1649
- [19] Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumors[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(12): 1611-1625
- [20] Lotan Y, Gupta A, Shariat SF, et al. Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(27): 6533-6539