

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201502009

· 论著 ·

喉咽鳞癌中 CD34与 CD105标记的微血管密度及其临床意义

甘卫刚¹, 洪育明², 严达忠¹, 梁振源², 向宇³

(1. 川北医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川南充 637000; 2. 福建医科大学附属第二医院耳鼻咽喉科, 福建泉州 362000; 3. 川北医学院形态学研究所, 四川南充 637000)

摘要: **目的** 研究 CD34和 CD105标记的微血管密度在喉咽鳞状细胞癌中的表达差异, 分析其与肿瘤临床特性的关系。**方法** 采用免疫组化 PV-9000 二步法, 分别对 68 例喉咽鳞状细胞癌组织及 32 例正常喉咽黏膜组织进行 CD34和 CD105标记染色, 并对其微血管密度进行检测和对比。**结果** CD34和 CD105标记的微血管密度在喉咽鳞癌组织中显著高于正常组织 ($P = 0.002$), CD105标记的微血管密度与喉咽鳞癌的临床特征具有相关性, 且 MVD-CD34与 MVD-CD105具有差异性。**结论** 喉咽鳞癌组织中, CD105标记的微血管密度较之 CD34更具敏感性和准确性, 可以较好地作为肿瘤新生血管的标记物, 对基础和临床研究具有重要意义。

关键词: 喉咽肿瘤; CD34; CD105; 微血管密度

中图分类号: Q786; R739.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2015)02-0116-04

Densities of microvessels marked with CD34 and CD105 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and their clinical significance

GAN Wei-gang, HONG Yu-ming, YAN Da-zhong, LIANG Zhen-yuan, XIANG Yu

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China)

Abstract: **Objective** To compare the microvascular densities (MVD) marked by CD34 and CD105 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC), and to explore their association with clinicopathological characteristics of HSCC. **Methods** Immunohistochemical PV-9000 two-step method was used for detecting the MVD marked by CD34 and CD105 in 68 specimens of HSCC and 32 ones of normal hypopharyngeal tissue. **Results** The MVDs marked by CD34 and CD105 in HSCC were significantly higher than those in the normal hypopharyngeal tissue ($P = 0.002$). And MVD marked by CD105 was correlated with the clinical characteristics of HSCC. The difference between MVD-CD105 and MVD-CD34 was statistically significant. **Conclusions** In HSCC, the sensitivity and accuracy of MVD-CD105 detection are better than those of MVD-CD34. Therefore, CD105 may be a good marker for neovasculature in HSCC, which is significant in basic and clinical research of this tumor.

Key words: Hypopharyngeal neoplasms; CD34; CD105; Microvascular density

喉咽癌作为耳鼻咽喉头颈外科中一种较为常见的恶性肿瘤, 肿瘤生长部位隐蔽, 早期多无特异性症状, 临床就诊常较晚, 手术及修复难度较大, 预后不甚理想, 给患者及家属带来巨大痛苦和损失, 早期诊断、早期治疗是目前针对该疾病研究的一个重要方向。微血管密度 (microvessel density, MVD) 作为肿瘤新生血管计量描述的金标准, 与肿瘤发生、发展及

预后密切相关。而作为喉咽鳞癌新生血管研究系列实验的一部分, 我们将 CD34和 CD105标记的微血管密度进行对比, 从而明确两者在喉咽鳞癌组织中的差异性, 比较两者的特异性和可靠性, 以便在进一步研究中寻找针对喉咽鳞癌较为理想的新生血管标记物。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2001 年 1 月 ~ 2013 年 12 月川北医学院附

基金项目: 四川省科技创新苗子工程资助项目 (2012ZZ010); 川北医学院 2014 年科研发展计划项目 (CBY12-A-QN25)。
作者简介: 甘卫刚, 男, 硕士研究生, 主治医师。
通信作者: 洪育明, Email: hongym666@sina.com

属医院和福建医科大学第二附属医院喉咽鳞状细胞癌(图1)的手术标本68例(术前均未采取放、化疗),其中男63例,女5例;年龄45~78岁,平均年龄55.6岁。按肿瘤原发部位可分为:梨状窝区49例,下咽后壁区11例,环后区8例;临床分期参照国际抗癌协会(UICC,2002年)TNM分级标准:T1 5例,T2 21例,T3 32例,T4 10例;肿瘤组织学分化程度:低分化鳞癌7例、中分化鳞癌43例、高分化鳞癌18例;颈部淋巴结转移情况:颈淋巴结转移阴性者11例,颈淋巴结转移阳性者57例。

同期选取喉全切除术患者的梨状窝、环后区(超过肿瘤切缘2~3 cm以上)正常黏膜或者癌旁组织标本32例作为对照组,均在显微镜下观察无癌细胞生长。所有患者及正常对照均签署知情同意书并经本院伦理委员会论证批准。

1.2 主要试剂

鼠抗人单克隆抗体CD34(浓缩型,ZM0046);鼠抗人单克隆抗体CD105(即用型,ZM-0297);免疫组化(PV-9000 二步法)专用试剂盒、DAB显色试剂盒等均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 试验方法

取相邻的两张连续切片作为实验组,分别以CD34和CD105作为一抗进行实验,按照(PV-9000)免疫组化二步法进行免疫组化染色。阳性对照采用血管肉瘤组织,阴性对照采用PBS代替一抗进行。

1.4 结果判定标准

CD34阳性表达呈棕黄色,主要位于血管内皮细胞质;CD105阳性表达呈棕黄色,主要在血管内皮细胞质。微血管密度参照Weidner等^[1]的计数标准进

行计算,取着色的单个内皮细胞或内皮细胞群作为一个计数,须满足其与周围组织有明显界限这一要求,先用低倍镜下($\times 40$)选择5个MVD最高区(热点),然后换高倍镜下($\times 400$)计数,取5个视野的微血管数平均值作为MVD,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.5 统计学分析

CD34和CD105标记的MVD计数组间比较采用 t 检验,两者与临床特征之间的关系采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MVD-CD34、MVD-CD105在喉咽鳞癌及正常喉咽黏膜中的表达情况

CD34蛋白表达阳性信号主要定位于血管内皮细胞细胞质,呈棕黄色粒状,CD105蛋白表达阳性信号主要定位于血管内皮细胞细胞质,呈棕黄色粒状(图1~3),利用CD34、CD105分别标记的MVD计数在喉咽鳞癌组织中平均为 35.23 ± 7.37 和 19.03 ± 4.13 ,而在正常下咽黏膜组织中MVD计数平均为 8.70 ± 3.34 和 6.10 ± 2.85 ,实验组MVD-CD34、MVD-CD105均高于对照组,差异比较具有统计学意义(t 值分别为3.427和2.913, P 均 < 0.05),具体结果见表1。表明下咽鳞癌组织中MVD-CD34、MVD-CD105计数明显高于正常下咽黏膜组织。喉咽鳞癌组织中,MVD-CD34计数显著高于MVD-CD105计数,两者比较差异具有统计学意义($t = 2.343$, $P < 0.05$)。

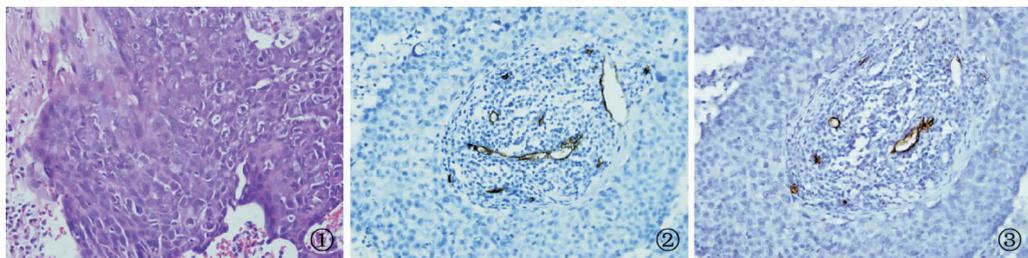


图1 喉咽鳞癌(HE $\times 40$) 图2 喉咽鳞癌组织中MVD-CD34的阳性表达(PV-9000 二步法 $\times 20$) 图3 喉咽鳞癌组织中MVD-CD105的阳性表达(PV-9000 二步法 $\times 20$)

2.2 喉咽鳞癌组织中MVD-CD34与临床病理学指标的关系

MVD-CD34在喉咽鳞癌组织中的表达与癌组织的临床分期、组织学分级及淋巴结转移无相关性,表

达差异无统计学意义(P 均 > 0.05);年龄、性别、吸烟史及肿瘤原发部位不同的组别,MVD-CD34计数差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表1。

2.3 喉咽鳞癌组织中 MVD-CD105与临床病理学指标的关系

CD105在喉咽鳞癌组织中标记的微血管密度计数与癌组织的临床指标具有相关性,表达差异具有统计学意义(P 均 <0.05)。表现为:喉咽鳞癌组织中,MVD-CD105计数在伴淋巴结转移组显著高于无淋巴结转移组,高分化组显著低于中、低分化组,T3、T4组显著高于T1、T2组(P 均 <0.05)。年龄、性别、吸烟史及肿瘤原发部位不同的组别中,患者MVD-CD105计数差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表1。

表1 MVD-CD34和 MVD-CD105在喉咽鳞癌中的表达与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床特征	例数	CD34		CD105	
		MVD值	$t(F)$	MVD值	$t(F)$
年龄(岁)					
≥58	21	34.05 ± 8.12	0.757	18.23 ± 3.99	0.729
<58	47	35.25 ± 6.48		19.37 ± 4.12	
性别					
男	63	36.95 ± 8.02	1.117	19.21 ± 5.02	1.308
女	5	34.33 ± 7.72		17.58 ± 4.72	
吸烟史					
有	57	36.81 ± 6.70	0.845	18.81 ± 5.70	0.935
无	11	33.64 ± 7.52		19.64 ± 4.92	
TNM 分级					
T1、T2	28	34.20 ± 6.46	1.684	16.20 ± 5.46	2.781
T3、T4	40	35.61 ± 7.13		21.03 ± 4.13	
淋巴转移					
阳性	58	36.14 ± 6.87	1.012	20.69 ± 3.87	2.002
阴性	10	34.37 ± 7.23		15.97 ± 5.23	
原发部位*					
梨状窝区	49	35.76 ± 7.67	(2.13)	18.76 ± 4.67	(2.51)
下咽后壁区	11	34.93 ± 6.82		19.37 ± 5.23	
环后区	8	36.48 ± 7.38		17.839 ± 4.87	
组织学分级					
高分化	20	35.13 ± 7.05	0.981	19.83 ± 5.05	3.109
中、低分化	48	34.74 ± 7.24		15.27 ± 4.24	

注:* :根据肿瘤原发部位不同进行分组,不同组间的MVD-CD34和MVD-CD105表达水平差异采用 F 检验,按 $\alpha = 0.05$ 水准, P 均 > 0.05 。

3 讨论

微血管密度代表了血管生成途径的最终效应器,MVD被认为是能反映肿瘤血管生成程度的金指标。当前,评价肿瘤血管最常用的直接方法是运用免疫组化法染色测定MVD,研究表明,实体肿瘤中MVD越高,肿瘤侵袭性越大^[2]。有研究表明头颈肿

瘤中MVD的增加明显缩短患者的生存,与淋巴结转移及临床分期相关^[3]。

CD34分子是钙黏蛋白家族成员,是相对分子量为115 000~120 000的单体表面蛋白,碳链的主架相对分子量一般仅40 000,与目前所知的其他蛋白没有序列同源性^[4]。CD34主要由胞外段、胞浆段及跨膜段组成,其中胞外段发挥主要生理作用。CD34在组织学工程中具有不小的贡献,其不仅参与造血干细胞的识别、转运,还通过趋化作用,促使炎症细胞聚集、穿越血管内皮,向病灶部位移行。另外,CD34分子被蛋白激酶C磷酸化后,可与L-选择素作用,促进淋巴细胞的归巢活动,参与淋巴循环^[5]。

本实验发现,喉咽鳞癌组织中CD34标记的微血管密度明显高于正常喉咽黏膜组织,提示CD34,可以作为喉咽部良恶性疾病的鉴别指标之一;而阅片可见,CD34大量表达在新生血管及较小非新生血管内皮细胞中,且CD34与临床分期、组织学分级和淋巴转移等相关特征无明显相关性($P > 0.05$),提示CD34标记的微血管密度不宜作为喉咽鳞癌转移及预后的独立判断指标,与国内其他学者结论一致^[6]。

1985年,Quackenbush等^[7]应用杂交瘤技术获得的Mab在急性淋巴细胞性白血病细胞系HOON表面上发现了39组完全不同的膜抗原。其中第IV组膜抗原是由Mab44G4检测出,且主要定位于各组织的血管EC上,即CD105,又名Endoglin。CD105是血管内皮细胞上可以结合转化生长因子 β (TGF- β)的受体蛋白,是由2个相对分子质量约为9.5万的单体聚合而成。CD105整个细胞外部分含有16个半胱氨酸残基,而胞浆内部分则只含有一个半胱氨酸残基。这些半胱氨酸中的一部分形成了CD105的双肽链结构。经过大量实验表明,CD105是一种构成胞膜整体所必需的蛋白质,主要表达于人类的内皮细胞表面和足月胎盘的合体滋养层细胞表面。研究表明,CD105的主要功能:①对TGF- β 的调节作用^[8];②内皮细胞增殖及新生血管形成的标志;③参与血管生成。研究表明,它在肿瘤边缘及新生组织的血管内皮细胞中表达增高,对新生血管,尤其是肿瘤特异血管具有较高特异性。

本实验研究表明,喉咽鳞癌组织中CD34标记的微血管密度明显高于正常喉咽黏膜组织。CD34与临床分期、组织学分级和淋巴转移等相关特征无明显相关性($P > 0.05$),提示CD34标记的微血管密

(下转第123页)