

· 基础研究 ·

Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌中的表达与 鼻咽癌淋巴管密度的相关性研究

吴 平, 胡可锦, 何 剑, 米日喀米力, 王苏甫, 廖玲凤, 赵素萍, 唐瑶云

(中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科, 耳鼻咽喉科重大疾病研究湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410008)

摘 要: **目的** 研究 Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌组织中的表达情况与鼻咽癌淋巴管密度的相关性。**方法** 用免疫组化法检测 Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌组织及鼻咽部慢性炎症中的表达情况, 用单克隆抗体 D2-40 标记鼻咽癌瘤内及瘤周微淋巴管。分析 Ang-1、Ang-2 与鼻咽癌临床病理参数与微淋巴管密度之间的关系。**结果** Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌组织中阳性表达率分别为 46.15% (24/52)、63.5% (33/52), 明显高于鼻咽部炎性组织 25.0% (3/12)、33.3% (4/12) ($P < 0.05$)。Ang-1 在鼻咽癌组织中的表达与性别、年龄、T 分级及临床分期、有无淋巴结转移等因素均无明显差异; Ang-2 在鼻咽癌组织中的表达与性别、年龄、T 分级及临床分期等因素无明显差异, 但在淋巴结转移组中的表达率 83.9% (26/31) 明显高于无淋巴结转移组 33.3% (7/21) ($P < 0.01$)。D2-40 标记鼻咽癌微淋巴管阳性表达率达 92.31% (48/52), 并且在淋巴结转移组中瘤内及瘤周微淋巴管密度均高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$)。联合 Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌组织中的表达与瘤内及瘤周微淋巴管密度均成正相关。**结论** Ang-2 与鼻咽癌淋巴结转移密切相关, 微淋巴管密度可作为判断淋巴结有无转移的重要指标之一。

关 键 词: 鼻咽癌; Ang-1; Ang-2; 淋巴管密度

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

文章编号: 1007-1520(2012)06-0421-06

Expressions of Ang-1 and Ang-2 in nasopharyngeal carcinoma and their relationship with nasopharyngeal lymphatic vessel density

WU Ping, HU Ke-jin, HE Jian, et al.

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Key Laboratory of Otolaryngology Major Disease Research of Hunan Province, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To study the expressions of Ang-1 and Ang-2 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and their relationship with nasopharyngeal lymphatic vessel density. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect the expressions of Ang-1 and Ang-2 in NPC and chronic inflammatory tissue of nasopharynx. The intratumoral and peritumoral micro-lymphatic vessels in NPC specimens were marked with monoclonal antibody D2-40. And the relationship between the expressions of Ang-1 and Ang-2 with clinicopathological parameters and lymphatic microvessel density in NPC was analyzed. **Results** The positive expression rates of Ang-1 and Ang-2 in NPC were 46.15% (24/52) and 63.5% (33/52), which were significantly higher than those in the inflammatory tissues (25.0%, 33.3%) ($P < 0.05$). The expression of Ang-1 had no significant relationship with patients' gender, age, and T stage, clinical staging and lymph node metastasis of the tumor. The expression of Ang-2 had neither significant relationship with gender, age, T stage and clinical staging, but its expression rate in the lymph node metastasis group (83.9%, 26/31) was significantly higher than that without lymph node metastasis

基金项目:湖南省自然科学基金项目(12JJ5049)。

作者简介:吴 平,男,博士研究生。

通讯作者:唐瑶云, Email: shiw888@yahoo.com.cn.

(33.3%, 7/21) ($P < 0.001$). D2-40 labeling displayed a positive expression rate of 92.31% (48/52) in lymphatic microvessels of NPC. The intratumoral and peritumoral lymphatic vessel densities of the lymph node metastasis group were higher than those of the group without lymph node metastasis respectively ($P < 0.05$). Combined expressions of Ang-1 and Ang-2 were positively related with intratumoral and peritumoral lymphatic vessel densities in NPC. **Conclusion** Ang-2 is closely related with lymph node metastasis in NPC, and lymphatic vessel density is an important indicator to estimate lymph node metastasis of this tumor.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm; Ang-1; Ang-2; Lymphatic vessel density

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinom, NPC)是一类常见淋巴结转移的恶性肿瘤。血管生成素(angiotensin, Ang)被认为是一类较为重要的淋巴管生成因子,其中以 Ang-1、Ang-2 尤为关键,两者均已在动物肿瘤模型及多种恶性肿瘤中证实与淋巴结的转移率成正相关^[1-4],但与 NPC 淋巴结转移的关系未见报道。D2-40 是一种新的、敏感度和特异性都较高的淋巴管标记物,目前已广泛用于各种恶性肿瘤的研究,研究发现肿瘤微淋巴管在胃癌、大肠癌、乳腺癌、NPC 等淋巴转移显著的恶性肿瘤的发生、发展中起重要作用^[5-7]。本研究检测鼻咽癌中 Ang-1、Ang-2 的表达及标记显示微淋巴管,以研究 Ang-1、Ang-2 与鼻咽癌淋巴结转移及淋巴管密度的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

收集 2008 年 7 月 ~ 2008 年 12 月中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科门诊鼻咽癌患者活检组织 52 例,经病理证实均为低分化鳞癌,另外收集疑鼻咽癌患者鼻咽部活检组织 12 例作为对照,切片经病理证实为慢性炎性组织,以上患者的临床病理资料均完善。其中男 31 例,女 21 例;年龄 33 ~ 76 岁,平均年龄 38 岁。对照组 12 例,男 8 例,女 4 例;年龄 22 ~ 52 岁,平均年龄 40 岁。根据 2002 年第 6 版美国癌症联合委员会(AJCC)肿瘤分级方案进行临床分级,详细临床资料见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化 先将石蜡切片脱蜡、水化, PBS 洗 2 次每次 5 min,用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H_2O_2 ,室温封闭 5 ~ 10 min,蒸馏水洗 3 次,行抗原修复, PBS 洗 5 min,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,滴加 I 抗,4℃ 过夜或者 37℃ 1 h(4℃ 过夜后在

37℃ 复温 45 min), PBS 洗 3 次每次 2 min,滴加生物素化二抗,20℃ ~ 37℃ 20 min, PBC 洗 3 次每次 2 min,滴加试剂 SABC,20℃ ~ 37℃ 20 min, PBS 洗 4 次每次 5 min, DAB 显色试剂盒显色(镜下掌握显色程度),蒸馏水洗。苏木素复染 2 min、盐酸酒精分化,最后脱水、透明、封片、镜检。

1.2.2 Ang-1、Ang-2 阳性结果判定 先在低倍镜下($\times 100$)选择具有代表性区域,转至高倍镜下($\times 400$)观察 5 个视野,每个视野计算 100 个细胞,使用评分法进行半定量评估,阳性分级:①以阳性细胞所占百分比分为四级计分:阳性细胞率 $\leq 5\%$ 以下为 0 分;阳性细胞率 6% ~ 25% 为 1 分;阳性细胞率 26% ~ 50% 为 2 分;阳性细胞率 $\geq 51\%$ 为 3 分。②按着色细胞染色强弱分:不着色 0 分,黄色 1 分,棕黄色 2 分,黄褐色 3 分。两种评分相加,0 ~ 1 分为阴性,2 分为弱阳性,3 ~ 4 分为阳性,5 ~ 6 分为强阳性,其中 2 分以上者均视为阳性表达。

1.2.3 淋巴管密度(LMVD)的计算方法 先在低倍镜($\times 100$)观察瘤周、瘤内及相应远端正常切缘,选择淋巴管高密度区即“热点”(hotspots)作为测量区域,然后在高倍镜下($\times 400$)随机取 10 个视野计数,单个内皮细胞明显着色也作为一个计数单位,分辨不清或染色模糊的细胞不计入计数结果,结果以均数表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。Ang-1、Ang-2 与临床病例参数之间的比较采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法检验,两个独立样本之间均数的比较采用 t 检验, LMVD 与临床资料参数之间的比较采用 Wilcoxon 秩和检验,联合 Ang-1、Ang-2 与 LMVD 的相关分析采用 Kruskal-Wallis H 检验(两两比较采用 Nemenyi 法)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang-1、Ang-2 阳性表达及其与临床病理参数之间的关系

Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌组织中的主要表达于胞浆(图 1a,b)。Ang-1、Ang-2 阳性表达率分别为 46.15% (24/52)、63.5% (33/52),明显高于在鼻咽部炎性组织中的表达 25.0% (3/12)、33.3% (4/12) ($P < 0.05$)。Ang-1 在鼻咽癌组织中的表达与性别、年龄、T 分级及临床分期、有无淋巴结转移等因素均无明显差异;而 Ang-2 在鼻咽癌组织中的表达虽与性别、年龄、T 分级及临床分期等因素无明显差异,但在淋巴结转移组中的表达率 83.9% (26/31) 明显高于无淋巴结转移组 33.3% (7/21) ($P < 0.01$),见表 1。进一步两两比较发现,Ang-1、Ang-2 在鼻咽癌组织中均呈阳性表达时发生淋巴结转移率最高,单纯 Ang-2 阳性次之,单纯 Ang-1 阳性或两者均为阴性时则无明显差别,见表 2。

2.2 D2-40 标记的微淋巴管与临床资料参数

之间的关系

D2-40 成功地用于标记 NPC 瘤内及瘤周微淋巴管,阳性表达率高达 92.31% (48/52),表现为淋巴管内皮细胞胞浆棕黄色染色,可清晰判断淋巴管的形态和管腔个数,由于血管内皮细胞不被染色,可排除微血管干扰造成的假阳性,见图 1c,d。进一步比较发现在淋巴结转移组中瘤内及瘤周微 LMVD 均高于无淋巴结转移组 ($P < 0.05$),见表 3。

2.3 Ang-1、Ang-2 在 NPC 组织中的表达与 LMVD 之间的关系

联合 Ang-1、Ang-2 在 NPC 组织中的阳性表达与 LMVD 的分析说明,两者的不同表达状态与 LMVD 存在差异,两两比较采用 Kruskal-Wallis H 检验显示,两者同时呈阳性表达时 Ang-1 (+)/Ang-2 (+),LMVD 明显高于 Ang-1 (+)/Ang-2 (-)、Ang-1 (-)/Ang-2 (+) 及 Ang-1 (-)/Ang-2 (-) 组 ($P < 0.05$);而 Ang-1 (-)/Ang-2 (+) 的 LMVD 也高于 Ang-1 (+)/Ang-2 (-) 及 Ang-1 (-)/Ang-2 (-) 组 ($P < 0.05$),见表 4。

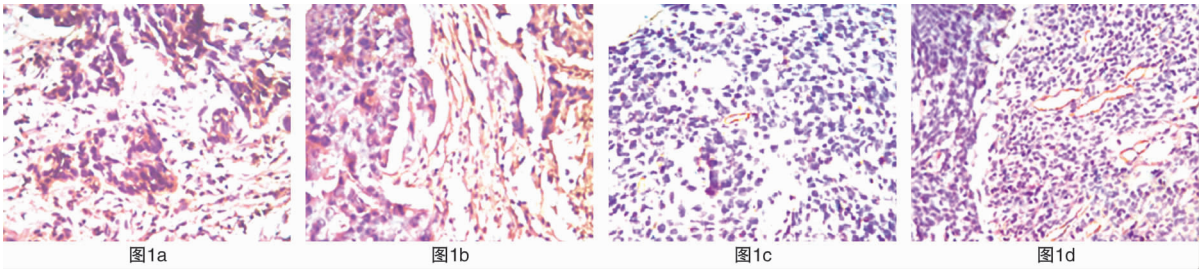


图1 Ang-1、Ang-2 在 NPC 组织与 D2-40 标记瘤内及瘤周淋巴管中的表达(免疫组化×400) a: Ang-1 在 NPC 组织中的表达; b: Ang-2 在 NPC 组织中的表达; c: D2-40 标记瘤内微淋巴管; d: D2-40 标记瘤周微淋巴管

表1 Ang-1、Ang-2 蛋白在 NPC 组织中表达与患者临床资料之间的关系

因素	例数	Ang-1			Ang-2		
		(+)	(-)	P	(+)	(-)	P
性别							
男	31	14	17	0.862	19	12	0.693
女	21	10	11		14	7	
年龄							
≥50 岁	30	14	16	0.931	17	13	0.235
<50 岁	22	10	12		16	6	
T 分级							
T1、2	46	18	28	0.05	26	18	0.282
T3、4	6	6	0		5	1	

续上表

因素	例数	Ang-1			Ang-2		
		(+)	(-)	<i>P</i>	(+)	(-)	<i>P</i>
N 分级							
N ₀	21	5	16	0.08	7	14	<0.001
N ₁₋₃	31	19	12		26	5	
临床分期							
I 、II	41	29	12	0.17	30	11	0.053
Ⅲ 、Ⅳ	11	10	1		11	0	

表 2 联合 Ang-1、Ang-2 在 NPC 组织中的表达与淋巴结转移之间的关系						
N 分级	例数	Ang-1(+)/Ang-2(+)	Ang-1(+)/Ang-2(-)	Ang-1(-)/Ang-2(+)	Ang-1(-)/Ang-2(-)	
N ₀	21	3	4	6	8	
N ₁₋₃	31	15	3	11	2	

表 3 D2-40 标记的瘤内微淋巴管密度(iLMVD)、瘤周微淋巴管密度(pLMVD) 与患者临床资料之间关系 ($\bar{x} \pm s$)						
因素	例数	iLMVD	<i>P</i>	pLMVD	<i>P</i>	<i>P</i>
性别						
男	31	5.2 ± 1.8	0.746	9.9 ± 3.1	0.832	<0.01▲
女	21	5.5 ± 2.5		10.7 ± 3.6		0.01▲
年龄						
<50 岁	30	5.0 ± 1.6	0.023 *	9.5 ± 2.5	0.769	<0.01▲
≥50 岁	22	5.8 ± 2.1		11.3 ± 4.0		0.02▲
T 分级						
T1、2	46	5.1 ± 1.9	0.016 *	9.9 ± 2.8	0.011 *	<0.01▲
T3、4	6	7.1 ± 4.3		14.3 ± 4.3		0.065
N 分级						
N0	21	4.4 ± 1.3	0.03 *	8.4 ± 1.9	<0.01 *	<0.01▲
N1-3	31	6.0 ± 2.1		11.6 ± 3.4		<0.01▲
临床分期						
I 、II	41	5.0 ± 1.6	0.046 *	9.6 ± 2.3	0.859	<0.01▲
Ⅲ 、Ⅳ	11	6.7 ± 2.3		13.1 ± 5.0		0.27

注：* :iLMVD 或 pLMVD 组内分析,采用两个独立样本的秩和检验, $P < 0.05$;▲ :iLMVD 和 pLMVD 组间分析,采用配对秩和检验, $P < 0.05$

表 4 联合 Ang-1、Ang-2 表达分别分析与瘤内微淋巴管密度(iLMVD) 及瘤周微淋巴管密度(pLMVD) 之间的关系 ($\bar{x} \pm s$)			
因素	例数	iLMVD	pLMVD
Ang-1(+)/Ang-2(+)	17	6.9 ± 2.6 *	13.1 ± 3.3 *
Ang-1(+)/Ang-2(-)	7	4.3 ± 1.3	8.1 ± 1.8
Ang-1(-)/Ang-2(+)	16	4.7 ± 1.7	9.4 ± 2.9
Ang-1(-)/Ang-2(-)	12	4.5 ± 0.9	8.7 ± 1.0

注：* Ang-1(+)/Ang-2(+)时 LMVD 明显高于其他三组, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义

3 讨论

颈淋巴结转移及潜在的远处转移风险严重影响NPC患者的预后。关于淋巴转移机制的研究一直是NPC基础研究的重点。众多研究者一直希望了解肿瘤新生淋巴管与NPC发生淋巴结(道)转移到底有何联系,不过由于缺乏理想的淋巴管标记物,这方面的研究还较少。

血管生成素(angiotensinogen, Ang)是一类与淋巴管生成具有密切关系的细胞因子,包括Ang-1、Ang-2、Ang-3和Ang-4,与其共同受体酪氨酸激酶Tie2结合可以引起生理性或病理性的血管生成,但以Ang-1和Ang-2相对重要。之前最受关注的是它们在肿瘤血管生成中的作用,而在淋巴管生成方面还未引起特别注意。Ang-2表达与肿瘤淋巴结转移及生存时间相关,研究发现高表达Ang-2患者多出现淋巴结转移、生存时间缩短,已在胃癌^[8,9]、乳腺癌^[10]、结直肠癌^[11]、神经母细胞瘤^[12]、非小细胞肺癌^[13]和膀胱癌^[14]中得到证实。而Ang-1与淋巴结转移之间的关系还不明确。本研究中我们发现Ang-1和(或)Ang-2阳性表达均与NPC淋巴结转移成正相关,进一步比较发现,Ang-1、Ang-2均呈阳性表达时发生淋巴结转移率最高,单纯Ang-2阳性次之,Ang-1阳性或两者均为阴性时则无明显差别,提示Ang-2在促使淋巴结转移可能起到更大的作用。在进行Ang-1、Ang-2与LMVD的相关性分析后,提示两者可能是通过参与淋巴管的生成进而影响NPC发生淋巴转移的。

Ang-1、Ang-2在淋巴管生成中的作用和机制尚不明了。有学者等^[15]发现剔除Ang-2基因的小鼠发生淋巴管发育缺陷,出现乳糜腹水,说明Ang/Tie2系统对淋巴管的发育和生长有重要影响。而由Ang-2缺陷所致的淋巴系统表型可以被Ang-1所改善,揭示了两者在淋巴系统发育方面的作用。最新研究发现Ang-1和Ang-2均可使牛肠系膜LECs的Tie2受体磷酸化,引起淋巴管内皮细胞(LECs)的增殖和淋巴管增生,其中Ang-2促增殖作用较Ang-1明显,而Ang-1促进LECs迁移作用较Ang-2显著^[16]。这些研究结果至少说明Ang-1、Ang-2

淋巴管形成过程中具有缺一不可的作用。肿瘤细胞和间质细胞均能分泌淋巴管生长因子,是肿瘤细胞和宿主细胞相互作用的结果,因此局部微环境能显著影响上述因子的表达^[17]。

D2-40目前已成功用于标记各类恶性肿瘤的新生淋巴管,并且表现出良好的敏感度和特异性^[18-19]。国内学者王胜资等^[20]首次使用D2-40标记NPC组织标本(140例)中的微淋巴管,阳性率达到100%,笔者也成功地对48例(92.31%)组织标本的肿瘤微淋巴管进行了标记和计数。结果提示肿瘤LMVD与早期发生淋巴结转移的风险成正相关,并且发现pLMVD显著高于iLMVD,提示pLMVD在早期淋巴转移可能起到更重要的作用。上述结果与王等人的研究相近。

通过本研究发现Ang-2与鼻咽癌淋巴结转移密切相关,Ang-1、Ang-2可能在鼻咽癌淋巴管生成中起到了重要作用,微淋巴管密度可作为判断淋巴结有无转移的重要指标之一。

参考文献:

- [1] Stacker SA, Williams RA, Achen MG. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis [J]. APMIS, 2004, 112(7-8): 539-549.
- [2] Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1131: 225-234.
- [3] Yihai Cao. Why and how do tumors stimulate lymphangiogenesis [J]. 2008, 6(3-4): 145-148.
- [4] 吴平, 柴琳, 章华, 等. POT1蛋白在人鼻咽癌细胞系及鼻咽癌组织中的表达及临床意义 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2011, 17(1): 1-5.
- [5] Yonemura Y, Endou Y, Tabuchi K, et al. Evaluation of lymphatic invasion in primary gastric cancer by a new monoclonal antibody, D2-40 [J]. Hum Pathol, 2006, 37(9): 1193-1199.
- [6] 谢晓东, 屈淑贤, 郑振东, 等. 人乳腺癌中D2-40标记的微淋巴管密度与淋巴结转移关系的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(14): 810-813.
- [7] 李珀, 何常, 徐恒天, 等. p21^{WAF1}/ETS-1、血管内皮生长因子-C蛋白在鼻咽癌组织中的表达及鼻咽癌内微淋巴管、微血管密度的临床病理意义 [J]. 实用肿瘤杂志, 2008, 5(6): 438-442.
- [8] Jo MJ, Lee JH, Nam BH, et al. Preoperative Serum Angiotensinogen-2 Levels Correlate with Lymph Node Status in Patients with Early Gastric Cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2009, 16(7): 2052-2057.

(下转第430页)