

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201606009

· 论著 ·

鼻咽癌组织中 Shh 与微血管密度的表达及其和肿瘤转移的关系

姚利, 聂国辉, 蔡智, 陆兴, 刘凤安

(北京大学深圳医院耳鼻咽喉科, 广东深圳 518036)

摘要: **目的** 分析鼻咽癌组织中 Shh 蛋白的表达以及与微血管密度分布的关系, 探讨其与肿瘤淋巴结转移的关系。**方法** 应用免疫组化 Elivision Plus 二步法, 检测 50 例鼻咽癌和 26 例炎性鼻咽部黏膜组织间质微血管密度(micro vascular density, MVD)的分布, 并检测 Shh 的表达。**结果** ①Shh 在鼻咽癌组织中较鼻咽慢性炎症组织明显呈高表达($P < 0.05$); ②鼻咽癌中 Shh 阳性组 MVD 均值 26.441 ± 6.239 , 高于 Shh 阴性组 15.667 ± 4.899 , 两者之间差异有显著性($P < 0.01$); 肿瘤细胞 Shh 表达与 MVD 相关, 即 MVD 值随着 Shh 表达而增高; ③鼻咽癌组织中 Shh 蛋白表达率与 MVD 均与临床分期, 颈淋巴结转移有密切关系($P < 0.05$)。**结论** Shh 可能促进鼻咽癌间质血管生成, 促进肿瘤的侵袭和转移, Shh 和 MVD 有可能成为判定鼻咽癌生物学行为和预后的重要指标。

关键词: 鼻咽肿瘤; Shh 蛋白; 微血管密度; 免疫组织化学

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)06-0462-05

The relationship of Shh expression and microvessel density with tumor metastasis in nasopharyngeal carcinoma

YAO Li, NIE Guo-hui, CAI Zhi, LU Xing, LIU Feng-an

(Department of Otolaryngology, Shenzhen Hospital of Beijing University, Shenzhen 518036, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the expression of Shh protein and microvessel density in nasopharyngeal carcinoma (NPC), and to explore their relationships with tumor metastasis. **Methods** Immunohistochemical two-step Elivision Plus method was adopted to detect the microvessel density (MVD) distribution and Shh expression in specimens from 5 cases of NPC and 26 patients with inflammation of nasal pharyngeal mucosa. **Results** ①The expression of Shh in NPC was higher than that in chronic nasopharyngitis ($P < 0.05$); ②The mean MVD value in NPC group (26.441 ± 6.239) was higher than that of the nasopharyngitis (15.667 ± 4.899), and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The expression of Shh was positively related with MVD. ③The expression rate of Shh and MVD distribution in NPC tissue were closely related to the clinical stage and lymph node metastasis of this tumor ($P < 0.05$). **Conclusions** Shh may promote the interstitial angiogenesis and facilitate tumor invasion and metastasis in NPC. Shh and MVD may be important indexes to judge the biological behavior and prognosis of NPC.

Key words: Nasopharyngeal neoplasm; Shh protein; Microvessel density; Immunohistochemistry

肿瘤的生长和发展取决于血管生成, 目前证实肿瘤血管生成是实体瘤发生、发展、转移过程中极为关键的步骤。肿瘤血管是肿瘤生长、侵袭和转移的基础, 它的形成是一个多因素、级联、整体、动态的过程, 是多种血管调节因子共同作用的结果^[1]。Sonic

Hedgehog(Shh)信号通路^[2]最初在果蝇中被发现。Shh信号转导途径与胚胎肠腺发育密切相关, 并参与某些胚胎组织的血管重新形成和成年哺乳动物的血管发生。在鼻咽癌发生中, Shh信号是否诱导调节血管形成尚不清楚。本文拟初步探讨鼻咽癌组织中 Sonic Hedgehog 信号通路中 Shh 蛋白表达及微血管密度 microvessel density(MVD)的关系。

基金项目: 广东省深圳市科技计划项目(201302072)。

作者简介: 姚利, 女, 博士, 主任医师。

通信作者: 陆兴, Email: yllp20@tom.com

1 资料与方法

1.1 材料选择

以 2009 年 3 月~2014 年 1 月北京大学深圳医院 50 例鼻咽癌患者的石蜡包埋标本为研究材料(鼻咽癌 NPC 组)。其中,男 38 例,女 12 例;年龄 20~71 岁,平均 40 岁。患者均为鼻咽非角化性癌,病例经 HE 切片再次复检确诊。根据中国“鼻咽癌 2008 年临床分期”的方案^[3],其中 T1 期 10 例,T2 期 21 例,T3 期 14 例,T4 期 5 例。NPC 组又分为颈淋巴结转移组(30 例)和非转移组(20 例)。患者均未进行过放射治疗及化学药物治疗。对照组 26 例慢性鼻咽黏膜来自同期活检鼻咽黏膜炎性组织标本。

1.2 免疫组化染色方法

免疫组化方法:兔抗人多克隆抗体 Shh 购自美国 Santa Cruz 公司,工作浓度为 1:100。鼠抗人 CD34 单克隆抗体,CD34 工作浓度为 1:100,Elivision Plus 试剂盒、DAB 显色剂购自福州迈新公司。所有的组织标本经石蜡包埋切片,连续切片,每张厚约 5 μm 。采用免疫组化染 Elivision Plus 二步法,免疫组化染色程序按试剂盒说明书进行。采用肺癌组织作为阳性对照,用 PBS 代替一抗和二抗作阴性对照。

1.3 结果判断

CD34 阳性染色微血管呈棕黄色至深棕色。MVD 计数方法采用 weidner^[4]方法:先在 $\times 100$ 低倍镜下挑选微血管热点区,然后在 $\times 200$ 倍镜下计算 10 个视野,取其平均值,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。凡是染成棕色内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数。凡管腔大于 8 个红细胞,带较厚肌层的血管均不计数,其中微血管的判断不以红细胞的出现来确定是否是血管,也不以是否出现管腔来计数。采用双盲法,显微镜下观察,行半定量^[5]计算肿瘤未着色或着色 $< 10\%$ 为阴性(-),肿瘤细胞着色在 $10\% \sim 25\%$ 为阳性(+), $26\% \sim 50\%$ 为(++), $> 51\%$ 为(+++)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,计数资料组间比较采用卡方检验,两样本均数比较采用 t 检验,多个样本均数比较采用方差检验。蛋白表达相关关系采用 spearman 等级相关分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Shh 及 MVD 在不同鼻咽组织中的表达

Shh 阳性表达率为 58%,Shh 阳性表达主要在细胞浆内,阳性细胞胞浆或胞膜呈棕黄色,阳性颗粒粗细不等。阴性细胞胞浆、胞膜不着色,胞核呈紫蓝色。在癌组织中其阳性表达为 58%,Shh 蛋白染色癌细胞呈巢状分布、伴颈淋巴结转移的肿瘤细胞胞膜及胞浆,阳性表达强,肿瘤间质细胞无染色,随着肿瘤临床分期的进展其阳性表达有增强的趋势。而在本研究 26 例慢性炎性鼻咽黏膜中仅有 5 例弱阳性表达,表达阳性率为 19.2%。CD34 在 NPC 的血管内皮细胞胞质着色,微血管形态不规则,癌灶边缘血管最密集且多位于肿瘤浸润的前缘。鼻咽黏膜组织中分布较少而均匀,其 MVD 在癌区组织中的分布明显高于鼻咽黏膜组织。在伴颈部淋巴结转移鼻咽癌组织中可见在肿瘤巢边缘间质内有多量 CD34 阳性微血管分布(图 1~6)。

2.2 NPC 中 Shh 及 MVD 的分布与临床因素的关系

Shh 蛋白的表达及 MVD 的分布均与患者年龄性别无关。Shh 在 NPC 临床 T 分期中 T3、T4 期的阳性表达高于 T1、T2 期($P < 0.05$),Shh 在有淋巴结转移组中的阳性表达明显高于无淋巴结转移组,MVD 的表达与 NPC 组织临床 T 分期、淋巴结转移密切相关($P < 0.05$),见表 1。

2.3 NPC 癌 Shh 表达与 MVD 表达的关系

鼻咽癌 Shh 阳性组 MVD 均值 26.441 ± 6.239 ,高于 Shh 阴性组 15.667 ± 4.899 ,两者之间差异有显著性($P < 0.01$);肿瘤细胞 Shh 表达与 MVD 相关,即 MVD 值随着 Shh 表达而增高,采用 spearman 等级相关分析,提示 Shh 与 MVD 显著正相关($r_s = 0.566, P < 0.01$)。

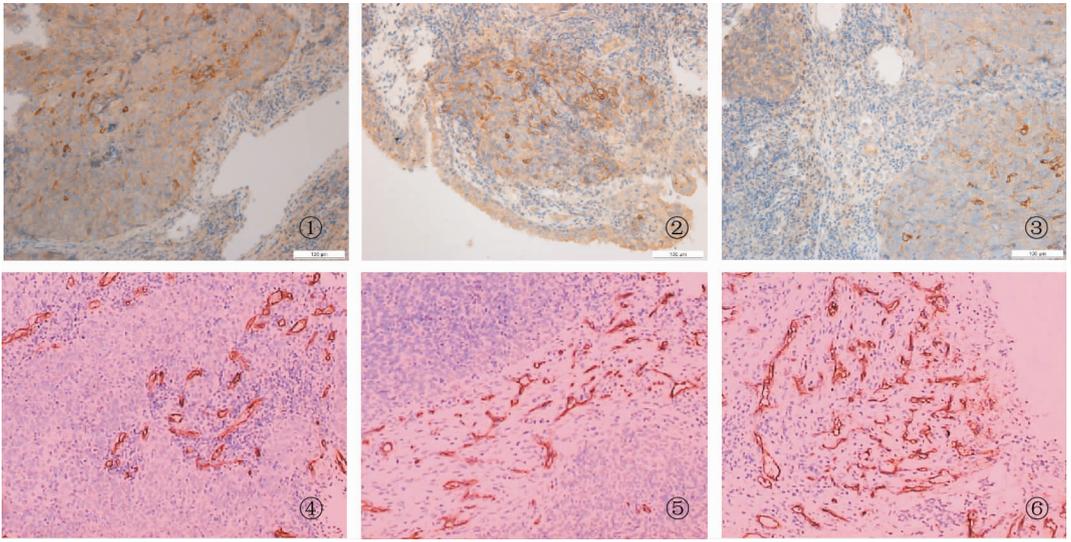


图1 Shh 蛋白表达于鼻咽癌细胞浆,呈棕黄色着色(Elivision 二步法 $\times 400$) 图2 Shh 蛋白染色癌细胞呈巢状分布、伴颈淋巴结转移的肿瘤细胞胞膜及胞浆,阳性表达强,肿瘤间质细胞无染色(Elivision 二步法 $\times 200$) 图3 Shh 蛋白在不伴淋巴结转移的鼻咽癌组织中阳性表达的癌细胞散在分布(Elivision 二步法 $\times 200$) 图4 鼻咽癌组织中间质中有 CD34 阳性表达微血管分布,形态不规则(Elivision 二步法 $\times 200$) 图5 伴颈部淋巴结转移鼻咽癌组织中可见在肿瘤巢边缘间质内有多量 CD34 阳性微血管分布(Elivision 二步法 $\times 200$) 图6 鼻咽癌基底膜邻近的肿瘤组织中 CD34 阳性微血管呈簇状较密集,基底膜已降解(Elivision 二步法 $\times 200$)

表1 Shh 和 MVD 在鼻咽组织中的表达和分布及其与临床的关系

组别	例数	Shh		χ^2	P	MVD		
		阴性	阳性			$\bar{x} \pm s$	t	p
鼻咽癌	50	21	29			21.916 \pm 7.804		
炎性组织	26	21	5	10.399	0.001	9.231 \pm 2.058	10.795	<0.001
临床分期								
T1、T2	31	18	13			18.855 \pm 6.646		
T3、T4	19	3	16	8.642	0.003	26.911 \pm 7.050	4.066	<0.001
颈部淋巴结转移								
有	30	8	22			25.250 \pm 6.319		
无	20	13	7	7.239	0.007	16.915 \pm 7.228	4.314	<0.001

3 讨论

自1984年Civin等^[6]首先发现CD34抗原以来,CD34已是检测微血管的较好方法,是目前血管内皮细胞最可靠的标记。因其不需向血管内灌注填充剂等,保持了微血管的自然状态和管径大小,因此,是目前检验微血管构筑的最好方法。

CD34基因产物CD34抗原是一个分子量为105-20KD的跨膜细胞表面糖蛋白。基因定位于1q32区域,由8个外显子构成。由于其在新生血管内皮细胞表达远大于非新生血管内皮,提示其作用可能与血管生成有关。这就为免疫组化定量研究组织内血管生成提供了依据。

本研究结果显示,鼻咽癌组织中MVD平均为(21.92 \pm 7.80)个/HP,而炎性鼻咽黏膜组织MVD平均为(9.23 \pm 2.05)个/HP,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。临床中晚期(T3、T4期)、比临床早期(T1、T2期)明显增高,差异具有统计学意义($P < 0.01$),颈部淋巴结转移组MVD明显高于无颈部淋巴结转移组的MVD($P < 0.01$)。已有研究^[7]在喉癌中发现在不同T分期组织中微血管密度存在显著差异,T1、T2期中癌微血管密度显著低于T3、T4期,认为随癌的发展微血管密度有逐渐增大的趋势。本研究发现在鼻咽癌临床分期的进展中MVD与鼻咽癌的侵袭明显相关,这也于朱正华^[8],Wakisaka等^[9]的研究结果一致。研究发现鼻咽癌基底膜邻近的肿瘤组织中CD34阳性微血管呈簇状较密集,

基底膜已降解,这可能是瘤组织中微血管的无序增生,诱发基底膜的破坏,以利瘤细胞的扩展和转移。

Shh 属于 SonicHedgehog (Shh) 信号家族,对多种器官的形态发生分化起重要作用,其活性信号分子可分泌至细胞外,不仅影响紧邻分泌细胞的靶细胞的基因表达,而且还影响距离较远的靶细胞的基因表达,具有短距离和长距离信号传递功能。Shh 信号在血管发生(内皮细胞形成新生血管)和血管生成(血管的改造成型)中起重要作用,其中 Shh 信号与血管发生密切相关^[10],它可直接作用于内皮细胞或刺激血管支持细胞产生血管生长因子。Shh 信号在成长的胚胎器官血管生成的级联过程中起中枢作用,而这种胚胎器官血管生成与肿瘤的血管生成相似。

本研究结果显示炎性鼻咽黏膜组织 Shh 多为阴性表达,有 5 例弱阳性。NPC 组织 Shh 表达阳性率(58%)明显高于炎性组织(19.2%)($P < 0.05$),说明在炎性鼻咽组织中也可能有 Shh 信号通路的存在,由于它的表达明显低于鼻咽癌组织中的表达,提示此通路可能处于静止状态,该通路在胚胎发育和成熟组织起着重要作用,可能在正常鼻咽组织中起着维持稳态的作用。而鼻咽癌组织中 Shh 蛋白表达与炎性组织存在显著差异,提示在鼻咽癌组织中可能存在着此信号通路的过度激活。同时研究也显示 NPC 中 Shh 表达在有淋巴结转移者高于无淋巴结转移者($P < 0.01$),T3、T4 期高于 T1、T2 期($P < 0.05$)。刘森林等^[11]在对 68 例胃癌组织标本研究中也发现 Shh 阳性表达 45 例,阳性表达率为 66.8%,Shh 的阳性表达与癌组织浸润的深度,淋巴结转移情况、TNM 分期等密切相关。这提示 Shh 为鼻咽癌上调的表达蛋白,其表达升高可能通过激活某种机制而参与了鼻咽癌的发生。Shh 蛋白在干细胞的分裂、分化、死亡等过程中起着重要作用,并且根据 Shh 表达的差异,影响正常黏膜上皮细胞的分化,使其停止在不同的肿瘤分期^[12],因此,Shh 表达的差异有可能引发鼻咽黏膜上皮发生癌变的重要因素。提示在 NPC 的发展过程中,肿瘤细胞分泌 Shh 蛋白越多,其浸润和转移能力越强。本研究中 Shh 蛋白表达位于癌巢肿瘤细胞着色尤为明显,这提示具有转移潜能的癌细胞多位于癌巢的周边,有利于肿瘤细胞脱离原发灶向远处转移。

我们在鼻咽癌组织中检测有 7 例淋巴结转移的鼻咽癌组织中 Shh 蛋白为高表达,但与低表达之间无统计学意义($P > 0.05$),希望以后能通过 RT-PCR

方法^[13]来进行准确定量分析。

研究中鼻咽癌 Shh 阳性组 MVD 均值 26.441 ± 6.239 ,高于 Shh 阴性组 15.667 ± 4.899 ,两者之间差异有显著性($P < 0.01$);肿瘤细胞 Shh 表达与 MVD 相关,即 MVD 值随着 Shh 表达而增高。Shh 与 MVD 显著正相关($r_s = 0.566, P < 0.01$)。结果可能间接提示在鼻咽癌微血管形成过程中确实有 Shh 信号通路的激活,Shh 促进了微血管的生长增殖。体外实验观察^[14]到 Shh 信号通过诱导血管周围基质细胞 VEGF 的表达而增加大肠癌血管新生,并且它可以通过激活癌细胞 Gli1、Gli2 的表达上调血管紧张素(Ang)、胰岛素样生长因子(IGF-1)的表达,间接诱导骨髓细胞中的血管生成前体细胞激活,从而促进血管的新生;也有学者研究^[15]认为,Shh 调节血管生成是直接通过调节内皮细胞中 Rho/ROCK 信号通路,并且引发下游靶基因如金属蛋白酶和骨调素的表达。另外有学者^[16]发现 Shh 可通过快速激活 PI3-激酶通道和转录调节途径来诱导内皮细胞生成毛细血管,应用 Shh 通路阻滞剂可抑制这种血管生成作用。推测 Shh 信号通路促进血管形成的作用机制主要是 Shh 蛋白对相关因子的激活并与其他促进血管形成和新生的信号通路信号途径发生级联反应实现的,诱导鼻咽癌组织中 MVD 明显增高,导致癌组织中存在着活跃的新生微血管生成,而新生的微血管由于基底膜不完整,为肿瘤细胞的侵袭和转移提供了机会。鼻咽癌组织中癌细胞容易侵入其周围微血管,并随微血管的增生向癌旁及周围浸润,发生鼻咽癌的侵袭和转移。从而促进肿瘤的发生、发展。

因此,Shh 可能促进鼻咽癌间质血管生成,促进肿瘤的侵袭和转移,Shh 和 MVD 有可能成为判定鼻咽癌生物学行为和预后的重要指标。鼻咽癌组织中 Shh 信号通路可能成为基于针对肿瘤血管新生治疗肿瘤的新途径。

参考文献:

- [1] 崔发强,魏正强. Shh、Gli1 和 VEGF 蛋白在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 生命科学研究,2010,14(4):344-349.
- [2] Arakat MT, Humke EW, Scott MP. Learning from Jekyll to control hyde Hedgehog signaling in development and cancer[J]. Trends Moll Med,2010, 16(8):337-348.
- [3] 中国鼻咽癌临床分期工作委员会. 鼻咽癌 92 分期修订工作报告[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2009,18(1):2-6.
- [4] Weidner N. Intratumormicrovessel density as a prognostic factor in

- cancer[J]. Am J Pathol,1995,147(1):9-12.
- [5] 陆兴,姚利,胡洪义,等. 基质金属蛋白2及其组织抑制物在鼻咽癌中表达[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,14(8):483-486.
- [6] Civin CI, Strass L, Broval LC, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis; III. A hematopoietic progenitor cells surface antigen defined by monoclonal antibody raised against KG 1 a cells[J]. J Immunol,1984,133(1):157-165.
- [7] 张光平,王希军,宋顺江. 喉鳞癌微血管密度与颈部淋巴结转移及病理临床分期的相关性研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2000,6(1):40-42.
- [8] 朱正华,董频,於子卫,等. VEGF, P DGF 和 MVD 在喉癌中的表达及临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2003,9(4):227-230.
- [9] Wakisaka N, Wen QH, Yoshizaki T, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Laryngoscope, 1999, 109(5):810-814.
- [10] 赵华,张凯. Shh 基因与消化道肿瘤的关系[J]. 医学综述, 2013,19(2):234-236.
- [11] 刘森林,谭卫泽,龙剑斌. SHH 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 中外医疗,2012,13(1):7-9.
- [12] 冯亚光,魏正强. Shh, Gli1, Foxm1 蛋白在胃癌中的表达及临床意义[J]. 广东医学,2011,32(19):2536-2538.
- [13] 罗均利,肖健云,田勇泉,等. 鼻咽癌细胞中 MDM2 mRNA 表达的逆转录多聚酶链反应半定量检测方法的建立[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1998,4(1):60-61.
- [14] 崔发强,魏正强. Shh, Gli1 和 VEGF 蛋白在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 生命科学研究,2010,14(4):345-349.
- [15] 夏含笑,刘陶文. Hedgehog 信号通路对肿瘤脉管新生调控的研究进展[J]. 实用医学杂志,2015,31(3):496-498.
- [16] Schuller HM. Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis[J]. Prog Exp Tumor Res, 2007,39(1):45-63.

(收稿日期:2016-04-13)

· 消息 ·

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》2017年征订启事

《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》是中华人民共和国教育部主管、中南大学及中南大学湘雅医院主办、国内外公开发行的医学学术性期刊,是中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)。本刊以耳鼻咽喉颅底外科工作者为主要读者对象,重点报道耳鼻咽喉颅底外科领域内领先的科研成果、基础理论研究及先进的临床诊疗经验。本刊设有专家论坛、专家笔谈、述评、论著、短篇论著、临床报道、临床交流、病案报道、技术与方法、教学园地、综述等栏目。本刊为双月刊,定价12.00元,全年72.00元,全国各地邮局均可订阅,邮发代号42-171。本刊编辑部可免费为读者代办邮购。通讯地址:湖南省长沙市湘雅路87号中南大学湘雅医院《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》编辑部(湘雅医院内),邮编:410008,投稿网址:<http://www.xyosbs.com>, Email: xyent@126.com, 电话:0731-84327469;0731-84327210。欢迎踊跃投稿、积极订阅。