

胃癌组织中 Tenascin、MVD、Ki-67 的表达及其临床意义 *

韩 伟¹ 刘 杨² 齐 蕾¹ 单丽辉¹ 柴翠翠¹ 王立峰^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一临床医院病理科 黑龙江 哈尔滨 150001 2 黑龙江大庆市人民医院病理科 黑龙江 大庆 163000)

摘要 目的:探讨胃癌组织中 Tenascin 蛋白、微血管密度(microvascular density, MVD)、Ki-67 的表达及其与临床病理特征的关系。方法:采用免疫组化 Elivision 法检测 70 例胃癌组织和 20 例癌旁正常组织中 Tenascin、CD34 和 Ki-67 的表达。结果:①正常胃黏膜上皮 Tenascin 阴性,胃癌中的 Tenascin 主要表达于肿瘤相关纤维母细胞的胞质中,且与胃癌的 Lauren 分型、分化程度、临床分期、淋巴结转移显著相关($P<0.05$);②胃癌中 MVD 和 Ki-67-LI(标记指数)均高于正常胃黏膜($P<0.001$),且均与胃癌的临床分期、浸润深度、淋巴结转移显著相关($P<0.05$)。结论:胃癌组织中 Tenascin 可抑制胃癌的演进,MVD 及 Ki-67 可作为胃癌患者预后的预测指标,联合检测胃癌组织 Tenascin、MVD、Ki-67 的表达情况,对于进一步了解胃癌的生物学行为和判断预后具有一定的临床价值与意义。

关键词:胃癌;Tenascin;微血管密度;Ki-67;免疫组织化学

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)19-3767-04

Expression of Tenascin, MVD, Ki-67 in Gastric Adenocarcinoma and Their Clinical Significance*

HAN Wei¹, LIU Yang², QI Lei¹, SHAN Li-hui¹, CHAI Cui-cui¹, WANG Li-feng^{1△}

(1 Department of Pathology, the First Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin, China;

2 Department of Pathology, Daqing People's Hospital, 163000, Daqing, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of Tenascin, microvascular density (MVD), Ki-67 in gastric carcinoma and their relationship with clinicopathologic features. **Methods:** The expression of Tenascin, CD34 and Ki-67 in 70 cases of gastric carcinoma and 20 cases of normal gastric tissue was detected by immunohistochemistry. **Results:** ① Tenascin was mainly expressed in tumor associated fibroblasts and the level of its expression was associated with Lauren classification, differentiation degree, TNM tumour stage and lymph node metastases ($P<0.05$); ② The expression of MVD and Ki-67-LI was significantly higher in gastric cancer than in normal gastric tissue ($P<0.001$), both of them were respectively correlated with the TNM tumour stage, the depth of tumour invasion and lymph node metastases ($P<0.05$). **Conclusions:** Tenascin may inhibit the development of gastric cancer. Quantitation of MVD and Ki-67 were useful prognostic marker for gastric cancer patients. Therefore, the detection of tenascin, MVD and Ki-67 may be valuable to evaluate biological behavior for patients with gastric cancer during clinical treatment.

Key words: Gastric Adenocarcinoma; Tenascin; Microvascular Density; Ki-67; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R735.2 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)19-3767-04

前言

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤,具有转移早、预后差、复发率高等特点。近年来,人们发现细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与肿瘤生长转移的关系密切。Tenascin (TN)是 ECM 中一种具有独特六臂体结构的高分子糖蛋白,实验证实 TN 可表达于人类多种恶性肿瘤中,且与肿瘤细胞增殖和血管生成关系密切^[1,2]。CD34 是目前公认的血管标记物,计数 MVD 能够较准确的反映出肿瘤组织中微血管的增生情况。Ki-67 是一种与细胞周期相关的增殖细胞核蛋白,是检测细胞增殖的标记物之一。目前 CD34 和 Ki-67 已广泛用于常规病理研究,但

TN 在胃癌中的研究仍鲜见报道。因此,本研究运用免疫组化联合检测 TN、CD34 和 Ki-67 在胃癌中的表达及其临床意义,进一步探讨它们与胃癌侵袭转移的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集哈尔滨医科大学第一临床医学院病理科 2007 年 8 月~2008 年 6 月病理诊断为胃癌的石蜡标本 70 例,其中男性 56 例,女性 14 例,年龄 28~86 岁,中位年龄 58 岁。按 1965 年 Lauren 分型,肠型 39 例,弥漫型 31 例;按 WHO(2000 年)标准,组织学分级高、中分化者 40 例,低分化和未分化者 30 例;

* 基金项目 哈尔滨市科技创新人才专项资金项目(RC2010XK004048)

作者简介 韩伟(1977-)女,硕士,主治医师,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:Tel:13604805297 E-mail: hljwlf@yahoo.cn

(收稿日期 2011-06-18 接受日期 2011-07-15)

临床分期 ~ 期 32 例, ~ 期 38 例;无淋巴结转移者 29 例,有淋巴结转移者 41 例。同时收集 20 例相应的癌旁正常胃黏膜组织(距肿瘤切缘>5cm)作为对照组。所有病例术前均未进行放疗和化疗。

1.2 试剂与方法

浓缩型鼠抗人 TN 单克隆抗体(克隆号 BC-24)购自武汉博士德生物工程有限公司,工作浓度为 1 200。即用型鼠抗人 CD34 单克隆抗体(克隆号 QBEnd/10)、鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体(克隆号 SP6)及 Elivision 试剂盒均购自福州迈新公司。所有组织标本均经 10%甲醛固定,石蜡包埋,4μm 厚连续切片及 HE 和 Elivision 染色法。免疫组化步骤严格按照试剂盒说明书进行。预处理:TN 采用胰蛋白酶消化法,CD34 与 Ki-67 采用枸橼酸盐缓冲液(0.01 mol/L pH6.0)高温高压修复法。DAB 显色,苏木精复染,盐酸酒精分化,氨水返蓝,脱水,透明,封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判定

所有指标的结果均由 2 位病理主治医师经双盲法独立评估。当癌细胞周围的间质无 TN 阳性染色时属阴性表达,若出现线状、带状或网格状分布的棕褐色染色为 TN 阳性。阳性定位在细胞的胞浆,呈强度不等的棕色或棕黄色。染色强度判断方法:ECM 中 TN 无表达为 0 分,局部断线状表达为 1 分,连续线状表达为 2 分,网格状表达为 3 分。细胞阳性表达计分方法为:每张切片随机观察 5 个不同的高倍视野,无阳性细胞记为 0 分,阳性细胞率 1%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%以上为 3 分。染色强度与阳性细胞率之和 ≤ 2 分为 TN 低表达,≥2 分为高表达。

MVD 按照 Goddard 等人^[3]的评判标准,计数肿瘤内着色的毛细血管和微小血管。即每个染成棕黄色的,可与周围血管、肿瘤细胞和其他结缔组织区分开的内皮细胞或内皮细胞簇,不论管腔和红细胞出现与否,均作为一个单一的、可计数的微血管。先于低倍(× 40)下观察切片,选择微血管分布最高密度区即“热点”,然后在高倍(× 400,每个视野面积为 0.37mm²)下计数 5 个视野的微血管数,取其平均值为该例的 MVD 值。分辨不清或染色模糊的细胞、管腔面积>8 个红细胞直径、有较厚肌层的微血管不计数在内。

Ki-67 阳性染色为瘤细胞的胞核呈棕黄色颗粒。随机选择 5 个高倍视野,计数 100 个肿瘤细胞中阳性细胞所占百分比数为 Ki-67-LI(标记指数)。坏死区、血管内皮细胞不计算在内。

1.4 统计方法

采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析。MVD 以表示,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TN、CD34、Ki-67 在正常胃黏膜及胃癌组织中的表达情况

在癌旁正常的胃黏膜中,TN 蛋白只分布于黏膜肌层、固有肌层及血管壁,基底膜区域呈一条细线状分布,其余部位均呈阴性;而在胃癌组织中,ECM 尤其紧邻癌巢的间质细胞,可见明显的条索状或网格状棕褐色染色区(如图 1、2)。分析后得出:TN 蛋白在癌旁正常的胃黏膜中均呈阴性表达,在胃癌中阳性率为 57.1%(40/70)。

CD34 主要定位于血管内皮细胞的胞膜,在正常胃黏膜组织中的表达较少,MVD 的平均值为 27.56 ± 8.39 。在胃癌组织间质和癌巢中均可见到明显增多的微血管,尤其是肿瘤浸润的边缘最为密集(如图 4),MVD 的平均值为 38.65 ± 14.38 ,二者的差异较显著($t=6.453$, $P<0.001$)。

Ki-67 定位于肿瘤细胞的细胞核,呈棕黄色或棕黑色(如图 3),在癌细胞向间质浸润的部位其表达明显增强。胃癌细胞中 Ki-67 为 23.79 ± 11.02 ,癌旁正常胃黏膜中的 Ki-67 为 6.20 ± 3.68 ,二者的差异有统计学意义($t=13.357$, $P<0.001$)。

2.2 TN、MVD、Ki-67 与胃癌临床病理特征的关系(表 1)

TN 的高表达与胃癌的 Lauren 分型、分化程度、临床分期、淋巴结转移相关(P 均 <0.05),而与患者的性别、年龄和浸润深度无关(P 均 >0.05)。即 TN 在肠型胃癌的表达强度显著高于弥漫型胃癌,且胃癌组织的分化程度越高、临床病理分期越早、淋巴结还未出现转移时,TN 的表达越强。

MVD 与 Ki-67 均与胃癌的临床分期、浸润深度、淋巴结转移相关(P 均 <0.05),而与患者的年龄、性别、分化程度、Lauren 分型无关(P 均 >0.05)。即胃癌组织的临床分期越晚、浸润越深、淋巴结出现转移时,MVD 与 Ki-67 值显著增加。

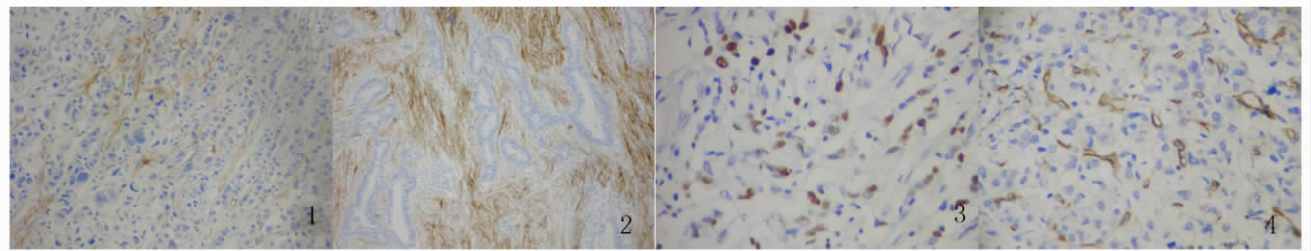


图 1 弥漫型胃癌,TN 呈断线状分布于 ECM 中的成纤维细胞 Elivision 法 200× ;

图 2 肠型胃癌,TN 呈网格状分布于 ECM 中 Elivision 法 200× ;

图 3 Ki-67 在胃癌癌细胞的细胞核中阳性表达 Elivision 法 400× ;

图 4 胃癌间质中 CD34 的表达 EliVision 法 400×

Fig. 1 Diffuse type,TN was mainly distributed in the fibroblasts like broken string EliVision 200× ;

Fig.2 Intestinal type,TN was distributed in ECM like grid EliVision 200× ;

Fig.3 The positive expression of Ki-67 was in the cell nucleus of gastric adenocarcinoma cells EliVision 400× ;

Fig.4 The expression of CD34 in gastric adenocacinoma EliVision 400×

表 1 TN、CD34 及 Ki67 的表达与 70 例胃癌临床病理特征的关系

Table 1 The expression of TN, CD34 and Ki-67 in 70 cases of gastric carcinoma and their relationship with clinicopathologic features

Clinicopathological features	n	TN		P	MVD ($\bar{x} \pm s$)	P	Ki-67-LI(%)	P
		Low expression	High expression					
Age								
<50	19	11	8	0.121	35.22± 11.00	0.226	22.37± 11.47	0.515
≥ 50	51	19	32		39.93± 15.36		24.31± 10.91	
Gender								
Man	56	23	33	0.546	38.64± 14.39	0.988	23.84± 10.53	0.936
Female	14	7	7		38.71± 14.92		23.57± 13.21	
Lauren classification								
Intestinal type	39	6	33	P<0.001	38.28± 14.38	0.810	23.08± 10.36	0.550
Diffuse type	31	24	7		39.12± 14.48		24.68± 11.90	
Histological grade								
High-moderate	40	6	34	P<0.001	38.25± 14.68	0.788	23.50± 10.57	0.804
Low-undifferentiation	30	24	6		39.19± 14.22		24.17± 11.75	
clinical stage								
-	32	9	23	0.022	33.59± 12.72	0.006	20.16± 11.03	0.010
-	38	21	17		42.92± 14.47		26.84± 10.16	
Depth of invasion								
Not to serosa	21	8	13	0.598	32.03± 13.28	0.011	18.81± 11.17	0.012
To serosa	49	22	27		41.49± 14.02		25.92± 10.34	
Lymph node metastasis								
Negative	29	7	22	0.008	34.32± 13.21	0.033	20.34± 10.93	0.027
positive	41	23	18		41.72± 14.54		26.22± 10.53	

3 讨论

肿瘤的浸润转移是一个多步骤、多因素参与的复杂的生物学过程，肿瘤间质在这一过程中的作用与地位已经得到人们的广泛重视。TN 作为 ECM 重要的组成部分之一，在肿瘤中的作用亦成为研究热点之一。

TN 是一种广泛分布于 ECM 中具有独特的六臂体结构的寡聚糖蛋白。目前已经报道的 TN 亚型有 5 种，即 TNC、TNR、TNW、TNX 和 TNY^[4]。目前研究较为深入的是 TNC。在胚胎时期，TN 表达于多种组织中，随着机体的发育与成熟，TN 的表达逐渐减少甚至消失。但在创伤的修复、炎症及瘤样增生等生理过程中，TN 的表达可明显增强。但 TN 在肿瘤中的作用目前尚未定论。有研究表明 TN 的产生可形成一层致密的屏障包绕癌细胞，从而阻止癌细胞的侵袭^[5]。通过研究我们发现：处于临床分期早期的胃癌患者，其间质中 TN 表达强度显著高于临床分期较晚的患者，这一结论与 Wiksten 等人在胃癌中的研究结果一致^[6]。表明间质中 TN 表达增强对于癌细胞的侵袭与转移具有抑制效应。而镜下见到癌巢周边与间质交界的部分染色强度明显增强，也提示我们覆盖于间质中 TN 的聚集是抑制癌细胞转移的重要防御因素，这一结论已经在宫颈癌、结直肠癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤的研究中得到证实^[7-8]。

然而近年来，随着对 TN 研究的不断深入，人们发现在肺癌、恶性黑色素瘤、肝细胞癌、乳腺癌、食管癌、膀胱癌等多种恶

性肿瘤组织的间质中，TN 的表达对于肿瘤组织的侵袭转移能力还具有促进作用^[9]。Nagaharu K 等人研究发现 TNC 可能通过 SRC 诱导 FAK(focal adhesion kinase)磷酸化，进而诱导上皮向间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，促进乳腺癌细胞的迁移，这一过程可与转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 协同完成，但不依赖 TGF-β^[10]。Sivasankaran B 等人指出在胶质瘤中 TNC 可通过 Noth2/RBPJk /TNC 这一信号通路促进癌细胞的迁移^[11]。这些作用与 TN 独特的结构特征是分不开的。TN 具有呈放射状排列的六臂体结构，每条臂都包括四个功能结构域：疏水的氨基末端，表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)的重复片段，型纤维连蛋白的重复片段，以及一个类似纤维蛋白结构的羧基末端^[12]。其中 EGF 重复片段可通过激活邻近细胞的 EGF 受体，诱导上皮细胞与内皮细胞的增殖从而达到促进肿瘤组织生长并转移的目的。此外，TN 还是整合素(Integrin)的重要配体，可协助 Integrin 促肿瘤细胞通过 ECM 向间质浸润。

此外，TN 的功能可能与其来源不同有关。TN 广泛分布于肿瘤的间质，主要表达于肿瘤相关纤维母细胞，但也可表达于肿瘤细胞。将致癌基因 Ha-Ras 转染到小鼠乳腺上皮细胞系(EPH4)所形成的癌细胞，其胞浆 TN 过表达。当发生 EMT 时，这些胞浆呈 TN 阳性的癌细胞则会分泌大量的 TN 进入培养基中^[13]。说明 TN 也可由癌细胞生成并分泌。另外，Martina 等人采用免疫荧光双染的方法证实 TN 可表达于血管周围，且 TNC

的分布与周细胞较密切,TNW 则与内皮细胞较密切,这就表明这两种蛋白的来源不同:TNC 由周细胞分泌,而 TNW 由内皮细胞分泌^[14]。不同表达部位的 TN 发挥着不同的功能,表达于间质的 TN,根据周围环境的不同,通过抗粘附效应来抑制或促进肿瘤细胞的侵袭和转移;由肿瘤细胞分泌到肿瘤周围的 TN 可促进细胞的生长,而位于血管周围 TN,可促进内皮细胞的增殖或血管生成^[15]。但亦有学者指出,肿瘤新生血管周围 TN 高表达的原因和意义尚不清楚,究竟 TN 高表达是直接促进了新生血管的形成,还只是肿瘤新生血管的一种表现,尚有待进一步研究^[16]。由上所述,我们推测由于 TN 结构的特殊性以及表达部位的不特异性,可能是导致 TN 作用多样化的重要原因。因此不论是从临床还是科研的角度,都需要我们结合多方面的因素进行综合分析。

高增殖的肿瘤细胞生长需要血管为其提供所需的营养、氧等,若没有足够的血管供应,则肿瘤生长超不过 1-2mm³。肿瘤诱导的血管生成是一个复杂的多步骤过程,这一过程受许多促血管生成和抑制血管生成因子的调节。血管生成与肿瘤细胞的增殖活动是肿瘤组织生长与转移的基础,MVD 及 Ki-67-LI 不仅可以反映肿瘤自身的营养状态,还能够反映肿瘤组织浸润和转移的能力。研究表明,MVD 及 Ki-67-LI 与皮肤恶性黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌等大部分肿瘤组织的发展、转移显著相关,是临床预测患者预后的重要指标^[17]。这在本次的实验结果中也有一定的体现,胃癌中 MVD 和 Ki-67-LI 均高于正常胃黏膜,且均与胃癌的临床分期、浸润深度、淋巴结转移呈显著正相关。表明 MVD 和 Ki-67 可以作为临床预测胃癌预后很好的指标。最近有研究表明 TN 在肿瘤细胞的增殖、血管生成等方面也具有重要作用。关于 TN 在肿瘤血管新生及细胞增殖方面的作用机理可能包括:①TN 作为一种 ECM 蛋白直接参与肿瘤血管的生成;②通过对肿瘤血管内皮细胞和平滑肌细胞的调节而影响血管生成^[18];③通过调节肿瘤细胞生长和分化,协同其他细胞因子发挥作用。但肿瘤-间质间的相互作用是一个复杂的有机整体,血管生成亦受许多因素的调节,虽然有研究表明 TN 有促血管生成的功能,但证据仍不充分,尤其在胃癌中的作用更是不确定,仍需要深入的研究。

综上所述,TN、MVD、Ki-67-LI 在胃癌的发生、发展以及转移中都具有重要作用。随着对肿瘤细胞增殖及血管生成研究的逐渐深入,我们有望将 TN 与 MVD 及 Ki-67LI 的指标结合起来,对胃癌术后的评估或转移提供帮助。同时,通过进一步探讨 TN、MVD、Ki-67-LI 在胃癌生长转移中的作用机制,可为肿瘤的治疗提供新的思路,通过阻断肿瘤血管新生或抑制肿瘤细胞的恶性增殖,达到阻止肿瘤生长转移的治疗目的。

参考文献(References)

- [1] Behrem S, Žarkovic K, Eskinja N, et al. Distribution pattern of Tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation [J]. Pathology Oncology Research, 2005,11 (4): 229-235
- [2] 李兴睿,廖晓峰,郭悦青,易继林.固生蛋白 tenascin 对肝细胞癌血管生成及浸润转移的影响[J].中华普通外科杂志,2005,20(4):213-215
- Li Xing-rui, Liao Xiao-feng, Guo Yue-qing, et al. The effect of tenascin on the angiogenesis, invasion and metastasis of hepatocellu-

- lar carcinoma[J]. Chin J Gen Surg,2005,20 (4):213 - 215(In Chinese)
- [3] Goddard JC, Sutton CD, Furness PN, et al. Microvessel density at presentation predicts subsequent muscle invasion in superficial bladder cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003,9:2583-2586
- [4] Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function and regulation during embryonic development and tissue remodeling[J]. Dev Dyn, 2000, 218 (2) : 235-259
- [5] Gazzaniga P, Cigna E, Vincenzi B, et al. Tenascin C: A defensive role in sentinel lymph nodes of melanoma patients [J]? Journal of Dermatological Science, 2009 53: 222-243
- [6] Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, et al. Tenascin-C expression correlates with prognosis in gastric cancer [J]. Oncology, 2003, 64:245-250
- [7] Tomas D, Ulamec M, Hudolin T, et al. Myofibroblastic stromal reaction and expression of tenascin-C and laminin in prostate adenocarcinoma [J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2006, 9: 414 - 419
- [8] Tsunoda T, Inada H, Kalembeiy I, et al. Involvement of Large Tenascin-C Splice Variants in Breast Cancer Progression [J]. American Journal of Pathology, 2003, 162(6):1857-1867
- [9] Sedele M, Karaveli S, Pes?tereli HE, et al. Tenascin Expression in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium [J]. Int J Gynecol Pathol., 2002,21 (2): 161-166
- [10] Nagaharu K, Zhang XH, Yoshida T, et al. Tenascin C Induces Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Change Accompanied by SRC Activation and Focal Adhesion Kinase Phosphorylation in Human Breast Cancer Cells[J]. Am J Pathol, 2011,178:754-763
- [11] Sivasankaran B, Degen M, Ghaffari A, et al. Tenascin-C Is a Novel RBPJk - Induced Target Gene for Notch Signaling in Gliomas [J]. Cancer Res, 2009, 69 (2): 458-465
- [12] Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling [J]. Developmental Dynamics, 2000, 218 (2): 235-259
- [13] Maschler S, Grunert S, Danielopol A, et al. Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF- β -induced progression of mammary tumor cells[J]. Oncogene, 2004(23):3622-3633
- [14] Martina E, Degen M, Ruegg C, et al. Tenascin-W is a specific marker of glioma-associated blood vessels and stimulates angiogenesis in vitro [J]. FASEB J, 2010,24,778-787
- [15] Ohno Y, Izumi M, Yoshioka K, et al. Prognostic significance of tenascin-C expression in clear cell renal cell carcinoma [J]. Oncology reports, 2008, 20: 511- 516
- [16] 韩旭,张苏宁. tenascin 对食管鳞癌浸润转移及血管生成的影响[J]. 实用肿瘤杂志,2008,23 (5):435-437
- Han Xu, Zhang Su-ning. Effect of tenascin on invasion, metastasis and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. Journal of Practical Oncology, 2008,23(5):435-437
- [17] Sharma S, Sharma MC, Sarkar C, et al. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis [J]. Histopathology,2005,46(5): 481-489
- [18] Tomas D, Ulamec M, Hudolin T, et al. Myofibroblastic stromal reaction and expression of tenascin-C and laminin in prostate adenocarcinoma[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2006,9: 414-419