

表 3 肠黏膜上皮细胞 AI 比较

组别	AI			
	12h	24h	48h	72h
对照组	3.25 ± 0.30 *	3.20 ± 0.25 *	3.30 ± 0.50 *	3.31 ± 0.36 *
SAP 组	28.65 ± 7.32	33.51 ± 9.06	39.83 ± 10.32	45.10 ± 12.51
干细胞组	10.20 ± 2.51 *	25.44 ± 7.61 *	30.80 ± 8.72 *	35.50 ± 9.85 *
动员组	9.41 ± 2.60 *	24.82 ± 6.55 *	31.23 ± 9.76 *	36.14 ± 9.73 *
联合组	8.80 ± 3.53 *	16.40 ± 4.80 * #△	21.12 ± 5.05 * #△	26.30 ± 6.40 * #△

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与干细胞组比较, # $P < 0.05$; 与动员组比较, △ $P < 0.05$

等因素都会引发凋亡上调,伴有促凋亡基因 Bax 的高表达和凋亡抑制基因 Bcl-2 低表达。MSC 对肠黏膜的保护作用可能通过组织细胞增殖修复,调控细胞凋亡和抑制炎症反应实现的^[6]。

本实验通过 2 次腹腔注射 L-精氨酸 2.0g/kg 制备 SAP 模型,经股静脉注入自体 MSC 液 1.2ml,或术前 3 天皮下注射 G-CSF 液 40μg/(kg·d),对比研究了干细胞注射与干细胞动员的作用。结果显示 SAP 组大鼠小肠黏膜上皮细胞病理评分明显高于对照组和各治疗组,Bax 蛋白水平明显高于治疗组,Bcl-2 水平低于治疗组,细胞凋亡指数呈现同趋势变化,说明骨髓间充质干细胞能有效减轻 SAP 术后肠黏膜的病理损伤,抑制正常细胞凋亡反应,为证明骨髓间充质干细胞发挥抗凋亡作用提供有效的依据。但注射治疗组与动员治疗组之间各项数据比较显示不同方法的抗凋亡作用无明显差别。同时本实验设计了联合应用干细胞注射及动员的方法,结果显示联合组大鼠小肠 Chiu 评分最低,凋亡调节作用最为显著,联合治疗组的疗效较单独治疗组理想。因国内外文献无相关报道,故笔者推测一方面可能和 MSC 的剂量效应作用有关,另一方面也可能与造血干细胞的

促协同及免疫调节作用有关,有待进一步深入探讨。本实验证实了 MSC 对肠黏膜上皮细胞的凋亡调节作用,能有效减轻 SAP 导致肠黏膜屏障的损害。

参考文献

1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science,1999,284(5411): 143-147

2 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, *et al.* Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg,1970,101(4):478-483

3 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995,4(1):89-92

4 韩钦, 何东南, 刘艳宁, 等. FFIK-1* 间充质干细胞和 SP 细胞参与肠道损伤修复的比较[J]. 基础医学与临床, 2008,28(6):563-569

5 Brown SL, Riehl TE, Walker MR, *et al.* Myd88-dependent positioning of Ptg2-expressing stromal cells maintains colonic epithelial proliferation during injury[J]. J Clin Invest, 2007,117(1):258-269

6 Hagiwala M, Shen B, Chao L, *et al.* Kallikrein-modified mesenchymal stem cell implantation provides enhanced protection against acute isehemie kidney injury by inhibiting apoptosis and inflammation[J]. Hum Gene Ther, 2008,19(8):807-819

(收稿:2011-11-20)

SDF-1/CXCR4 的表达与喉癌组织 VEGF-C 表达、淋巴管生成及预后的相关性

王莹 李文媛 梁金花 丁利 赵斯达

摘要 目的 探讨趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 在喉癌组织中的表达与喉癌中 VEGF-C 表达、淋巴管生成及预后的相关性。**方法** 应用免疫组化法检测 SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 在 45 例喉癌和 20 例声带息肉组织中的表达,应用 5'-核

基金项目:黑龙江省卫生厅科研基金资助项目(2010243);黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1152G050)

作者单位:157011 牡丹江医学院解剖教研室(王莹、李文媛、丁利、赵斯达);牡丹江医学院红旗医院检验科(梁金花)

通讯作者:李文媛,电子邮箱:yuanyuan19800413@163.com

苷酸酶染色法(5'-Nase)计数淋巴管密度,并结合临床病理特征进行相关分析,应用 Kaplan-Meier 法评估 SDF-1 和 CXCR4 表达对喉癌预后的影响。**结果** 喉癌组织中 SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 表达较声带息肉组显著增加($P < 0.05$),SDF-1、CXCR4 表达与 TNM 分期、淋巴结转移、淋巴管浸润相关($P < 0.05$),VEGF-C 表达与淋巴结转移、淋巴管浸润相关($P < 0.05$)。SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 表达呈正相关($P < 0.05$),三者均与瘤内和瘤周淋巴管密度相关($P < 0.05$)。SDF-1 阳性表达生存率显著低于阴性表达($P < 0.05$)。**结论** SDF-1/CXCR4 生物轴可能通过上调 VEGF-C 表达促进喉癌淋巴管生成和淋巴结转移,SDF-1 高表达是喉癌预后不良的重要指标。

关键词 趋化因子基质细胞衍生因子 1 CXCR4 趋化因子受体 血管内皮生长因子 -C 喉癌

Correlation between SDF-1, CXCR4 and VEGF-C, Lymphangiogenesis, Prognosis in Laryngeal Carcinoma. Wang Ying, Li Wen-nyuan, Liang Jinhua, Ding Li, Zhao Sida. Department of Anatomy Mudanjiang Medical College, Heilongjiang 157011, China

Abstract Objective To investigate the relationship between the expression of SDF-1, CXCR4 and VEGF-C, lymphangiogenesis, prognosis significance in patients with laryngeal cancer. **Methods** The expressions of SDF-1, CXCR4 and VEGF-C in 45 specimens of the laryngeal cancer and 20 specimens of polyp of vocal cord tissues were observed by immunohistochemistry. Lymphatic microvessel density (LVD) was evaluated by 5'-Nase staining, and the correlation analysis was made between SDF-1, CXCR4 and VEGF-C, clinical characteristics, and judged SDF-1 and CXCR4 roles in laryngeal cancer prognosis by using Kaplan-Meier method. **Results** The expression of SDF-1, CXCR4, VEGF-C protein were higher in laryngeal cancer tissue than in the polyp of vocal cord tissue. The expression of SDF-1 and CXCR4 were significantly correlated with TNM stage, lymph node metastasis, lymphovascular invasion. VEGF-C was correlated with lymph node metastasis, lymphovascular invasion. The expression of the SDF-1, CXCR4 and VEGF-C protein in laryngeal cancer has directly correlation. SDF-1, CXCR4, VEGF-C were significantly correlated with peritumoral and intratumoral LVD. The expression of SDF-1 had effect on survival ratio. **Conclusion** SDF-1/CXCR4 axis might stimulate VEGF-C up-regulation and promote lymphangiogenesis, lymphatic metastasis in laryngeal cell carcinoma. The expression of SDF-1 may be helpful for judging prognosis in laryngeal cancer.

Key words Stromal-derived factor-1; CXCR4 chemokine receptor 4; Vessel endothelium growth factor C; Laryngeal cancer

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,占耳鼻咽喉科恶性肿瘤 7.9%~15.0%,近年来发生率呈显著增长趋势^[1,2]。目前趋化因子受体(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)及其配体趋化因子基质细胞衍生因子-1(stromal-derived factor-1, SDF-1)相互作用形成的生物轴 SDF-1/CXCR4 在肿瘤转移中的作用越来越受到人们的关注,研究发现 SDF-1/CXCR4 在乳腺癌、胃癌、食管癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、子宫颈癌和口腔癌等多种恶性肿瘤的转移中发挥重要作用,能够促进肿瘤的血管生成,已成为肿瘤血管生成治疗的一个新靶点,但关于 SDF-1/CXCR4 对肿瘤淋巴管生成的作用尚不明确^[3]。血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)是目前最具代表性的淋巴管生成因子,通过激活淋巴管内皮细胞上的受体 VEGFR-3 可促进淋巴管内皮细胞增殖分化并诱导淋巴管生成。为此,本研究探讨了 SDF-1/CXCR4 的表达与喉癌中 VEGF-C 表达、淋巴管生成和预后的关系,为喉癌的诊治研究提供新的思路。

材料与方法

1. 临床资料:选取中国医科大学附属第一医院耳鼻咽喉

科 2004 年 1 月~2009 年 3 月首次经手术治疗的原发性喉癌患者 45 例。女性 43 例,男性 2 例,平均年龄 63.5 岁。喉癌位于声门上者 17 例,声门者 23 例,声门下者 5 例。按国际抗癌协会(UICC)1997 年 TNM 分期标准,T1N0M0 6 例,T2N0M0 6 例,T2N1M0 2 例,T3N0M0 14 例,T3N1M0 9 例,T4N0M0 4 例,T4N1M0 3 例,T4N2M0 1 例。有颈淋巴结转移 15 例,淋巴管浸润 8 例。随访至 2009 年 6 月 1 日,随访时间为 3~71 个月,平均 31 个月。死亡 10 例,其中呼吸困难 2 例,远处转移 4 例,其他疾病 3 例,原因不明 1 例。对照组 20 例,均为声带息肉手术切除病例。

2. 主要试剂:二甲胍酸钠,腺苷-5'-磷酸钠,萘酚 AS-MX 磷酸钠,左旋咪唑,固蓝 BB 盐,二甲基甲酰胺(DMF)均购自美国 SIGMA 公司。SDF-1、CXCR4、VEGF-C 抗体及 SP 试剂盒均购自北京中杉公司技术有限公司。Trizol 试剂、Superscript II 反转录酶、dNTPs 购自 Invitrogen 公司,TaqDNA 聚合酶、DL2000DNA 标志物购自 Takara 公司,SDF-1、CXCR4、VEGF-C 和 β -actin 引物由大连宝生物合成。

3. 免疫组织化学染色:严格按照免疫组化试剂盒说明的步骤进行,其中一抗浓度 SDF-1(1:100)、CXCR4(1:150)、VEGF-C(1:100)。以 PBS 代替一抗做阴性对照。评分标准按照细胞着色强度(无,0 分;弱,1 分;中,2 分;强,3 分)和切片中阳性细胞率评分($\leq 5\%$,0 分;6%~10%,1 分;11%~20%,2 分;21%~50%,3 分;51%~100%,4 分)之和为该病例评分

值,将评分值 ≤ 2 分定为阴性, ≥ 3 分定为阳性。

4. 酶组化染色方法:采用王莹等^[4]报道方法进行酶组化染色方法(5'-Nase法)。淋巴管密度(lymphatic microvessel density, LVD)定量分析:先在低倍镜下选择淋巴管最丰富区域,在高倍镜下计数5个视野淋巴管数,取其均值作为该切片淋巴管数。

5. 统计学方法:应用SPSS 11.5统计软件进行处理。计数资料采用 χ^2 检验,相关分析采用Spearman检验,两组间LVD比较采用 t 检验,Kaplan-Meier法绘制生存曲线, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 的表达情况: SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 阳性表达位于细胞质和胞膜内,呈棕黄色颗粒状(图1~图3)。SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 在喉癌组织中的阳性表达率分别为53.3%、35.5%和37.7%,在对照组中的阳性表达率分别为15%、10%和15%,均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

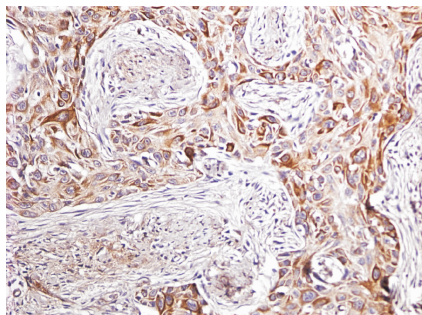


图1 喉癌组织中 SDF-1 的阳性表达(SP, $\times 400$)

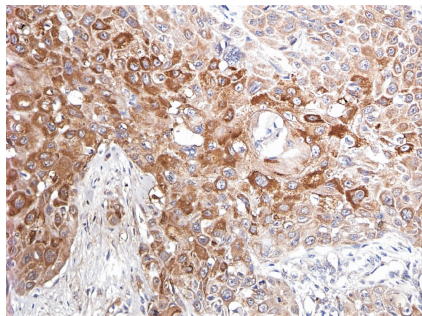


图2 喉癌组织中 CXCR4 的阳性表达(SP, $\times 400$)

2. SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 与临床病理特征的关系及相关性分析:在各种临床因素中,SDF-1 和 CXCR4 蛋白表达均与 TNM 分期、淋巴结转移、淋巴管浸润密切相关($P < 0.05$),而与年龄、性别、肿瘤部位及肿瘤分化程度无相关性($P > 0.05$)。VEGF-C 蛋白表达与淋巴结转移及淋巴管浸润密切相关($P <$

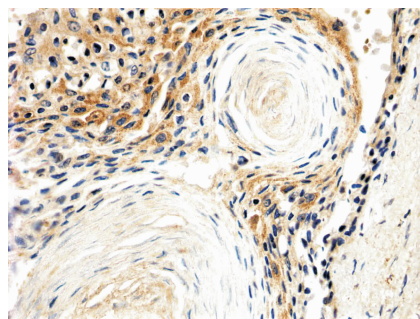


图3 喉癌组织中 VEGF-C 的阳性表达(SP, $\times 400$)

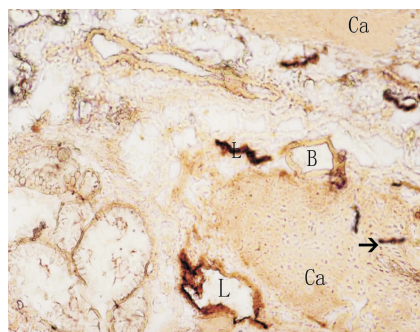


图4 喉癌组织淋巴管(L)呈棕色,毛细血管(B)淡染或不着色,瘤内淋巴管(→)呈条索状(5'-Nase, $\times 400$)

0.05),但与年龄、性别、肿瘤部位、TNM 分期及肿瘤分化程度无相关性($P > 0.05$)(表1)。SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 三者蛋白表达呈正相关($P < 0.05$)(表2)。

3. SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 与 LVD 的关系:5'-Nase 特异性地表达在喉癌组织中毛细淋巴管内皮细胞,在光镜下可见呈棕黄色的点状(横切面)或条状(纵切面,图4),SDF-1、CXCR4 和 VEGF-C 表达均与瘤内和瘤周 LVD 密切相关($P < 0.05$,表3)。

4. 生存率分析:按 SDF-1、CXCR4 表达的不同将喉癌患者分为两组,[-]为阴性,[+]为阳性],Kaplan-Meier 生存分析绘出喉癌患者整体生存曲线,CXCR4 阳性表达平均生存时间为(52.8 ± 6.1)个月,阴性表达组平均生存时间为(55.1 ± 4.3)个月,Log rank 检验表明 CXCR4 阳性表达与生存率不相关($\chi^2 = 0.284, P = 0.498$)。SDF-1 阳性表达平均生存时间为(28.5 ± 4.8)个月,阴性表达组平均生存时间为(62.8 ± 3.7)个月,Log rank 检验表明 SDF-1 阳性表达生存率显著低于阴性表达($\chi^2 = 11.175, P = 0.001$)(图5)。

表 1 SDF - 1、CXCR4 和 VEGF - C 表达与喉癌临床病理学特征的关系

临床参数	n	SDF - 1			CXCR4			VEGF - C		
		阳性(n)	阳性率(%)	P	阳性(n)	阳性率(%)	P	阳性(n)	阳性率(%)	P
年龄(岁)										
>60	27	13	48.1	0.292	8	29.6	0.242	7	24	0.063
≤60	18	11	61.1		8	44.4		10	90.9	
性别										
男性	43	22	51.1	0.491	15	34.8	1	16	37.2	1
女性	2	2	100		1	50		1	50	
分型										
声门	23	10	43.5	0.393	9	39.1	0.798	9	39.1	0.964
声门上	17	11	64.7		5	29.4		6	35.2	
声门下	5	3	60		2	40.0		2	40.0	
分化程度										
高	29	14	48.3	0.146	10	34.8	0.817	10	34.5	0.274
中	12	9	75		4	33.3		4	33.3	
低	4	1	50		2	50		3	75	
TNM 分期										
I ~ II	14	3	21.4	0.009	9	64.2	0.016	4	28.6	0.513
Ⅲ ~ Ⅳ	31	21	67.7		7	22.5		13	41.9	
淋巴结转移										
有	15	14	93.3	0	11	73.3	0	10	66.7	0.008
无	30	10	33.3		5	16.6		7	23.3	
淋巴管浸润										
有	8	7	87.5	0.037	1	12.5	0.017	7	87.5	0.003
无	37	17	45.9		10	27		10	27	

表 2 喉癌组织中 SDF - 1、CXCR4 和 VEGF - C 表达的关系

项目		SDF - 1				CXCR4			
		阳性	阴性	r	P	阳性	阴性	r	P
CXCR - 4									
阳性	16	15	1	0.602	0.000				
阴性	29	9	20						
VEGF - C									
阳性	17	14	3	0.453	0.002	14	3	0.765	0.000
阴性	28	10	18			2	27		

表 3 喉癌组织中 SDF - 1、CXCR4 和 VEGF - C 表达与 LVD 表达的关系

参数	n	SDF - 1			CXCR4			VEGF - C		
		阳性表达量	t	P	阳性表达量	t	P	阳性表达量	t	P
LVD										
瘤周	45	17.18 ± 0.61	5.75	0.005	19.75 ± 1.69	4.02	0.016	19.55 ± 0.44	4.391	0.012
瘤内	45	10.05 ± 1.47	3.891		10.23 ± 1.05	5.405		8.86 ± 2.03	2.924	

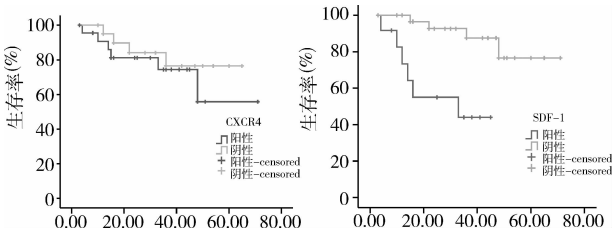


图 5 喉癌患者整体生存曲线

Kaplan - Meier 法绘出喉癌患者整体生存曲线,根据 CXCR4 表达两组曲线无显著差异(log rank $P=0.498$),根据 SDF - 1 表达两组曲线有显著差异(log rank $P=0.001$)

讨 论

SDF - 1 是骨髓基质细胞和成骨细胞所产生的 CXC 类趋化蛋白,CXCR4 是目前已知 SDF - 1 唯一的受体,近年来研究发现 SDF - 1/CXCR4 在乳腺癌、胃癌、食管癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、卵巢癌、子宫颈癌和口腔癌中均能诱导高表达,其高表达与肿瘤细胞存活率和局部淋巴结转移的增强及患者生存率降低有关^[3]。本研究结果显示 SDF - 1 和 CXCR4 的蛋白在喉癌组织中表达显著高于对照组,两者表达均

与 TNM 病理分期、淋巴结转移、淋巴管浸润密切相关。以上结果提示 SDF-1/CXCR4 生物轴能够促进喉癌的发生发展及淋巴结转移。Stephan Paget 提出了“种子-泥土”假说,指出器官内在的特异性性状与肿瘤的选择性转移有关^[5]。因此我们推测, CXCR4 阳性喉癌细胞(种子)可以有效地诱导 SDF-1 高表达的肿瘤微环境,进而诱导喉癌细胞淋巴管浸润(泥土),促进喉癌细胞的转移。

最近有报道表明, SDF-1 与 CXCR4 结合能够上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达,诱导肿瘤血管生成^[6]。但 SDF-1/CXCR4 轴是否促进肿瘤淋巴管生成尚不清楚。许多研究报道已证实 VEGF-C 是目前最具代表性的淋巴管生成因子,其表达与多种人类肿瘤淋巴管转移关系密切。本实验发现, SDF-1/CXCR4 与 VEGF-C 在喉癌组织中有过度表达,又都与淋巴管密度、淋巴结转移和淋巴管浸润等生物学特性相关,而且 SDF-1/CXCR4 与 VEGF-C 表达之间显著正相关。由此推测 SDF-1/CXCR4 能够通过诱导 VEGF-C 表达上调,促进喉癌淋巴管生成和淋巴管转移,但其具体作用机制有待于进一步研究。

目前关于 SDF-1 和 CXCR4 表达对肿瘤预后影响的相关报道尚不多见,且争议较多。Liu 等^[3]研究发现乳腺癌中 CXCR4 阳性表达与生存率相关,但 Clatot 等^[7]研究发现 SDF-1 与头颈部鳞状细胞癌生

存率密切相关,而 CXCR4 与生存率不相关。本实验结果表明 CXCR4 阳性表达与生存曲线不相关,但 SDF-1 阳性表达生存率显著低于阴性表达,与 Clatot 等观察结果相一致。因此,检测喉癌患者 SDF-1 蛋白表达将有望成为判断喉癌预后的一个新指标。

参考文献

- 1 常玮,王斌全. RECK 和 MMP-9 在喉鳞癌中的表达及其临床意义[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(4): 73-76
- 2 王莹,李文媛,孙平,等. ET-1 和 VEGF-D 的表达与喉癌组织淋巴管生成及预后关系[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2011, 18(11): 575-579
- 3 Liu F, Lang R, Wei J, *et al.* Increased expression of SDF-1/CXCR4 is associated with lymph node metastasis of invasive micropapillary carcinoma of the breast [J]. *Histopathology*, 2009, 54(6): 741-750
- 4 王莹,李文媛,富泽龙,等. 喉淋巴管的几种组织化学显色法比较观察[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(1): 70-73
- 5 Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, *et al.* Nodal lymphangiogenesis and metastasis: role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5): 2235-2248
- 6 Shen X, Wang S, Wang H, *et al.* The role of SDF-1/CXCR4 axis in ovarian cancer metastasis [J]. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(3): 363-367
- 7 Clatot F, Picquenot JM, Choussy J, *et al.* Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(11): 1062-1068

(收稿: 2011-07-17)

(修回: 2011-12-05)

5 种乳腺癌相关指标血清检测的临床价值分析

董学君 金龙金 吕建新

摘要 目的 了解 hMAM、NF- κ B、CA153、OPN 和 MMP-13 5 种血清指标诊断乳腺癌的临床价值。方法 ELISA 法检测 hMAM、NF- κ B、OPN 和 MMP-13, 雅培 i2000 全自动发光仪检测 CA153, 比较乳腺癌组(59 例)和正常对照组(35 例)外周血中 5 种指标的表达特点, 验证其临床价值。结果 与正常对照组比较, hMAM、NF- κ B、CA153 和 OPN 在乳腺癌中高表达, 且差异有统计学意义; 对乳腺癌的诊断价值, 从高到低分别为: hMAM、NF- κ B、CA153 和 OPN。不同病理分期中, CA153 和 OPN 在乳腺癌晚期显著升高。结论 hMAM、NF- κ B、CA153 和 OPN 对乳腺癌诊断具有一定的价值, 其中 hMAM 更好; 当 CA153 和 OPN 明显升高, 可能提示乳腺已进入中晚期。

关键词 乳腺癌 hMAM NF- κ B CA153 OPN MMP-13 诊断

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(2009A208); 浙江省科技厅公益类项目(2010C33010); 浙江省重点科技创新团队经费(2010R50048); 绍兴市科技计划项目(2009A23005)

作者单位: 325035 温州医学院检验医学院、生命科学院(董学君、金龙金、吕建新); 浙江省绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院分子医学中心(董学君)