

TAMs、VEGF 在高级别人膀胱癌组织中的表达及其相关关系

郭德迎¹, 张新明¹, 罗锦斌¹, 吴洪涛²

1. 深圳市蛇口人民医院泌尿外科 广东 深圳 518067; 2. 中南大学湘雅二医院泌尿外科, 湖南 长沙 410011

摘要: **目的** 探讨肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)、血管内皮生长因子(VEGF)在高级别人膀胱癌组织中的表达特征。**方法** 选取 2014 年 4 月至 2016 年 4 月行全膀胱切除术的 30 例高级别膀胱癌患者作为研究对象。取切除标本的膀胱肿瘤组织和膀胱正常组织,通过免疫组化方法用 CD68 标记巨噬细胞(CD68⁺),用 CD34 标记微血管密度(MVD),进行 VEGF 表达、TAMs 浸润程度、MVD 计数的检测,对比、分析检测结果。**结果** 与正常膀胱黏膜相比,膀胱癌组织的 CD68⁺TAMs 表达等级明显上调($P < 0.01$)。膀胱癌组织的 VEGF 阳性表达率、MVD 计数均显著高于正常膀胱黏膜(P 均 < 0.01)。Pearson 相关性检验显示,膀胱癌组织中 VEGF 表达、MVD 计数分别与 CD68⁺TAMs 表达均呈显著正相关关系($r = 0.896, P < 0.01; r = 0.908, P < 0.01$)。**结论** VEGF 和 TAMs 在高级别人膀胱癌组织中均呈高表达,VEGF 与 TAMs 呈显著正相关,进行 VEGF 和 TAMs 检测能够为临床判定膀胱癌进展情况、预测患者预后提供可靠依据。

关键词: 膀胱癌; 肿瘤相关巨噬细胞; 血管内皮生长因子; 微血管密度; CD68; CD34

中图分类号: R 737.14 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)10-1343-03

既往有研究显示,膀胱癌术后的转移与复发和膀胱癌淋巴管及血管的生成有着密切联系^[1],而血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤微血管密度(MVD)又与肿瘤血管的形成有着密切联系,所以推测 VEGF、MVD 表达与膀胱癌之间存在某种联系。膀胱癌组织含有大量的浸润性免疫细胞,且以巨噬细胞居多,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)在膀胱癌组织的生长、发展中发挥着重要作用,通常 TAMs 浸润密度越高,预示患者预后越差^[2]。本研究旨在了解 TAMs、VEGF 在膀胱癌组织中的表达特征,以期为临床拟定治疗策略、预测膀胱癌患者预后提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 4 月至 2016 年 4 月在我院行全膀胱切除术的 30 例高级别膀胱癌患者作为研究对象,手术病理均明确诊断为膀胱癌。男 20 例,女 10 例;年龄 48 ~ 83 (65.5 ± 4.9) 岁;肿瘤 T 分期: T₁ 期 19 例, T₂ 期 11 例。其中肌层浸润性膀胱癌 7 例,非肌层浸润性膀胱癌 23 例。按照伦理委员会的相关要求,患者均术前签署手术标本用于科研同

意书。

1.2 仪器与试剂 Olympus 公司生产的 CX40 型光学显微镜, Leica RM2245 型全自动切片机,自动双重纯水蒸馏器,电热恒温水浴箱,电子天平;一抗选用武汉博士德生物有限公司生产的鼠抗人 CD68、VEGF、CD34, Envision 二步法试剂盒和二氨基联苯胺显色试剂盒购自北京中山生物技术公司。

1.3 检测方法 术后,取切除标本的膀胱肿瘤组织和膀胱正常组织,组织进行常规石蜡包埋、切片。采用 Envision 二步法进行免疫组化染色检测,用 CD68 标记巨噬细胞(CD68⁺),用 CD34 标记 MVD。严格按照试剂盒说明书进行操作,阳性对照选用扁桃体组织,阴性对照选用磷酸盐缓冲液。检测原理:辣根过氧化物酶与 IgG 分子发生聚合反应,生成聚合物,聚合物与一抗结合从而使抗原抗体结合信号放大。

1.4 免疫组化结果判定 结果最终由三名经验丰富的病理科医师独立判断。(1) TAMs 的表达和浸润程度:通过半定量法评估 CD68⁺TAMs 的数量,若可见清晰的棕褐色/黄褐色颗粒则判定为阳性, TAMs 浸润深度通过 200 倍视野下的 CD68⁺表达密度来确定:未见阳性细胞为 0 级;1 ~ 5 个为 1 级(轻度);6 ~ 10 个为 2 级(中度);> 10 个为 3 级(重度)。(2) VEGF 的表达:VEGF 主要表达在细胞质中,在新生血管周围癌细胞的表达明显增强,除肿瘤细胞外,VEGF 在间质中有少量表达,多见于邻近肿瘤的间质,VEGF 阳性

细胞占比超过 10%, 则判定为阳性表达。(3) MVD 计数: 通过 CD34 在血管内皮包膜、胞质中的表达来进行判定, 先在低倍镜下找到血管最丰富的区域, 在 400 倍视野下对 MVD 进行计数, 共计数 3 个视野, 最后取平均值。若血管内皮细胞/细胞簇与邻近微血管之间存在分离的阳性染色, 则将其判定为独立微血管, 结果不相连的分支结构也判定为独立的微血管, 若血管的直径 > 8 个红细胞, 或有较厚的平滑肌, 或有硬化区, 则均不纳入计数范围。

1.5 统计学方法 数据处理用 SPSS 20.0 软件。计数资料以频数和 % 表示; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用成组 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析; 等级资料采用秩和检验; 相关性分析用 Pearson 检验。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 TAMs 的表达 与正常膀胱黏膜相比, 膀胱癌组织的 CD68⁺TAMs 表达等级明显上调 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 VEGF 表达及其与 CD68⁺TAMs 表达的相关性 膀胱癌组织经免疫组化检测, 检出 VEGF 阳性表达 13 例 (43.33%), 阴性表达 17 例 (56.67%)。正常膀胱黏膜组织的 VEGF 阳性表达率为 3.33% (1/30), 阴性表达率为 96.67% (29/30)。膀胱癌组织的 VEGF 阳性表达率显著高于正常膀胱黏膜组织 ($\chi^2 = 44.725, P < 0.01$)。Pearson 相关性检验显示, 膀胱癌组织中 VEGF 与 CD68⁺TAMs 表达呈显著正相关关系 ($r = 0.896, P < 0.01$)。见表 2。

2.3 MVD 计数及其与 CD68⁺TAMs 表达的相关性

MVD 总体平均计数膀胱癌组织为 25.98 ± 13.02 , 正常膀胱黏膜组织为 10.51 ± 4.06 , 膀胱癌组织中的 MVD 计数明显高于正常膀胱黏膜组织 ($t = 6.213$,

表 1 膀胱癌组织与正常膀胱组织的 CD68⁺TAMs 表达比较 [n = 30, 例 (%)]

组别	CD68 ⁺ TAMs 表达分级			
	0 级	1 级	2 级	3 级
正常膀胱黏膜	25 (83.33)	5 (16.67)	0	0
膀胱癌组织	1 (3.33)	6 (20.00)	14 (46.67)	9 (30.00)
<i>P</i> 值	< 0.01			

表 2 膀胱癌组织中 VEGF 与 CD68⁺TAMs 表达的关系 (例)

变量	VEGF 表达		合计
	阳性	阴性	
CD68 ⁺ TAMs 表达			
0 级	1	0	1
1 级	4	2	6
2 级	6	8	14
3 级	2	7	9
合计	13	17	30

表 3 膀胱癌组织中 MVD 计数与 CD68⁺TAMs 表达的关系

CD68 ⁺ TAMs 表达	例数	MVD 计数 ($\bar{x} \pm s$)
0 级	1	11.60 ± 4.24
1 级	6	21.74 ± 11.68
2 级	14	26.49 ± 14.42
3 级	9	35.48 ± 11.94

$P < 0.01$)。膀胱癌组织不同 CD68⁺TAMs 表达级别的 MVD 计数见表 3, 表 3 显示 MVD 计数随着 CD68⁺TAMs 表达级别的升高而升高; Pearson 相关性检验显示, 膀胱癌组织中 MVD 计数与 CD68⁺TAMs 表达具有显著正相关关系 ($r = 0.908, P < 0.01$)。

3 讨论

膀胱癌是临床较为常见的一种泌尿系统肿瘤, 目前, 手术仍是治疗膀胱癌的主要手段, 但是膀胱癌术后有较高的转移和复发风险, 临床治疗难度较大^[3]。统计资料显示, 肌层浸润膀胱癌患者行膀胱癌根治术后的转移率超过 50%, 5 年生存率还不足 55%^[4]。虽然临床常在膀胱癌根治术前后联合放疗、化疗手段, 但取得的效果仍较为有限。

研究显示, 癌症的发生、发展、转移及预后均与浸润恶性肿瘤组织的 TAMs 数量有着密切联系, TAMs 数量越多, 病情发展越严重, 预后效果越差^[5]。巨噬细胞是肿瘤间质炎性细胞浸润的关键性成分, 由癌间质内的单核吞噬细胞分化而来, 在形态结构上虽与原巨噬细胞相同, 但在功能上却有明显区别。TAMs 与肿瘤血管的生成有着密切联系, 其能有效促进肿瘤血管生成。既往已有不少文献显示, TAMs 不仅与肿瘤血管生成有着密切联系, 还与癌症的进展、转移及患者预后密切相关^[6], 其数量越多, 病情越迅速, 转移、侵袭风险越高, 患者预后越差, 故临床认为可将其作为预测恶性肿瘤患者预后的一个有效指标。本研究结果显示: 与正常膀胱黏膜相比, 膀胱癌组织的 CD68⁺TAMs 表达等级明显上调。正常膀胱黏膜绝大部分都为 0 级, 少数为 1 级, 而膀胱癌组织绝大部分都为 2~3 级, 极少数为 0~1 级。CD68⁺TAMs 浸润在 0 级以上, 提示该黏膜组织并不正常, 即便未确诊为膀胱癌, 也有可能发生了癌前病变, 临床需加强观察。

研究显示, VEGF 是肿瘤血管生长不可或缺的细胞因子, 其在膀胱癌组织中的表达可促进内皮细胞增殖, 刺激肿瘤血管生成, 加快肿瘤生长^[7-8]。测定 VEGF 表达水平, 并对 MVD 进行计数, 能为临床判定肿瘤血管生成活性, 预估肿瘤生长、转移、浸润等提供

- [2] Arrabal-Polo MA, Arrabal-Martin M, Garrido-Gomez J. Calcium renal lithiasis; metabolic diagnosis and medical treatment [J]. Sao Paulo Med J, 2013, 131 (1): 46 - 53.
- [3] Fulgham PF, Assimos DG, Pearle MS, et al. Clinical effectiveness protocols for imaging in the management of ureteral calculous disease; AUA technology assessment [J]. J Urol, 2013, 189 (4): 1203.
- [4] 夏术阶, 仲晨. 输尿管三段四分法及其在输尿管结石微创治疗中的应用 [J]. 中华医学杂志, 2010, 90(4): 285 - 287.
- [5] Bader MJ, Brian E, Porpiglia F, et al. Contemporary management of ureteral stones [J]. Eur Urol, 2012, 61(4): 764 - 772.
- [6] Cha WH, Choi JD, Kim KH, et al. Comparison and efficacy of low-dose and standard-dose tamsulosin and alfuzosin in medical expulsive therapy for lower ureteral calculi; prospective, randomized, comparative study [J]. Korean J Urol, 2012, 53(5): 349 - 354.
- [7] 叶章群, 邓耀良, 董诚, 等. 泌尿系结石 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 115 - 196.
- [8] Philippou P, Lamrani D, Moraitis K, et al. Is shock wave lithotripsy efficient for the elderly stone formers? Results of a matched-pair analysis [J]. Urol Res, 2012, 40 (4): 299 - 304.
- [9] Lingeman JE, McAteer JA, Gnessin E, et al. Shock wave lithotripsy: advances in technology and technique [J]. Nat Rev Urol, 2009, 6 (12): 660 - 670.
- [10] Danuser H, Müller R, Descocudres B, et al. Extracorporeal shock wave lithotripsy of lower calyx calculi; how much is treatment outcome influenced by the anatomy of the collecting system? [J]. Eur Urol, 2007, 52 (2): 539 - 546.
- [11] Ji C, Gan W, Gu H, et al. A prospective trial on ureteral stenting combined with secondary ureteroscopy after an initial failed procedure [J]. Urol Res, 2012, 40 (5): 593 - 598.
- [12] Multescu R, Geavlete B, Georgescu D, et al. Conventional fiberoptic flexible ureteroscope versus fourth generation digital flexible ureteroscope; a critical comparison [J]. J Endourol, 2010, 24(1): 17 - 21.
- [13] Cohen J, Cohen S, Grasso M. Ureteropyeloscopic treatment of large, complex intrarenal and proximal ureteral calculi [J]. BJU Int, 2013, 111(3 Pt B): E127 - E131.
- [14] 吴忠, 丁强, 姜昊文, 等. 输尿管肾镜钬激光碎石术治疗输尿管结石 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26 (1): 27 - 29.
- [15] 徐谊朝, 褚靖, 郭泽雄, 等. 输尿管镜治疗输尿管下段结石后常规放置支架管的必要性研究 [J]. 广东医学, 2007, 28(9): 1389.
- 收稿日期: 2016 - 06 - 05 修回日期: 2016 - 06 - 30 编辑: 王国品

(上接第 1344 页)

可靠依据, 具有重要的临床应用价值^[9-10]。本研究结果显示, 膀胱癌组织的 VEGF 阳性表达率、MVD 表达水平均显著高于正常膀胱黏膜; 且 VEGF 表达、MVD 计数与 CD68⁺ TAMs 表达均呈显著正相关, 提示 VEGF、TAMs、MVD 三者可发挥协同作用, 共同促进膀胱癌细胞的生长、浸润与转移。

综上所述, VEGF 和 TAMs 在高级别人膀胱癌组织中均呈高表达, VEGF 与 TAMs 呈显著正相关, 进行 VEGF 和 TAMs 检测能够为临床判定膀胱癌进展情况、预测患者预后提供可靠依据。

参考文献

- [1] 邵剑锋, 周洪益, 周志毅, 等. CD163 + M2 型肿瘤相关巨噬细胞在预测非肌层浸润性膀胱癌初次复发中的价值 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(5): 1175 - 1178.
- [2] 邵剑锋, 周洪益, 周志毅, 等. 肿瘤相关巨噬细胞浸润、肿瘤微血管密度和血管内皮生长因子在膀胱癌中的表达 [J]. 江苏医药, 2015, 41(21): 2562 - 2564.
- [3] 黄启成, 李鑫磊, 杨树才, 等. 血管内皮生长因子 C 和趋化因子受体 CCR7 的表达与膀胱癌淋巴结转移之间的关系 [J]. 解剖科学进展, 2011, 17(5): 468 - 471.
- [4] 费夏玮, 刘光香, 祝帅, 等. p53、VEGF、COX-2 和 EGFR 在膀胱癌组织中表达的相关性及临床意义 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2013, 18(3): 249 - 253.
- [5] Henríquez-Hernández LA, Navarro P, Luzardo OP, et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase μ and θ , MDR1 and VEGF genes as risk factors of bladder cancer: A case-control study [J]. Urol Oncol, 2012, 30(5): 660 - 665.
- [6] Zhang HH, Qi F, Shi YR, et al. RNA interference-mediated vascular endothelial growth factor-C reduction suppresses malignant progression and enhances mitomycin C sensitivity of bladder cancer T₂4 cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2012, 27(5): 291 - 298.
- [7] 王泽民, 杨惠祥, 于满. p53、PCNA、VEGF 蛋白表达对膀胱癌术后复发的影响 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2012, 6(2): 366 - 369.
- [8] 徐松涛, 邵雪峰, 王竟, 等. OPN 及 VEGF 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(26): 3276 - 3278, 3283.
- [9] 况南珍, 傅颖媛, 黄红卫, 等. VEGF、PCNA 及 Survivin 与膀胱癌病理分级、临床分期的关系 [J]. 重庆医学, 2012, 41(7): 651 - 653, 封 3.
- [10] 廖勇, 邱明星, 刘竞, 等. TGF- β 1 基因沉默对 VEGF 在人膀胱癌细胞株中表达的影响 [J]. 中华医学杂志, 2014, 94(16): 1274.
- 收稿日期: 2016 - 06 - 19 修回日期: 2016 - 06 - 30 编辑: 王国品