论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1090-03

定量分析人脑星形细胞肿瘤组织芯片中血管生成与肿瘤微血管结构

吴晋蓉,曾发贵,王清良,卞修武 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 定量检测人脑星形细胞肿瘤组织芯片中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达及微血管结构参数及其意义。**方法** 采用组织微阵列技术构建包含正常人脑组织、弥漫型星形细胞瘤(WHO Ⅱ级)、间变型星形细胞瘤(WHO Ⅲ级)、胶质母细胞瘤(WHO Ⅳ级)及阳性对照的168点阵的石蜡组织芯片。用免疫组织化学双重染色法标记组织芯片中的VEGF及CD34的表达。采用图像分析软件对组织芯片上VEGF的表达强度以及微血管结构参数(包括血管数、血管平均周长)进行定量测试。**结果** 星形细胞肿瘤各级别之间除VEGF阳性单位(positive unit, PU)值、血管平均周长在Ⅲ级与Ⅳ级之间没有差异外,其他级别之间的差异都有显著性差异($P<0.05$)。**结论** 星形细胞肿瘤中VEGF PU值与微血管结构参数可作为星形细胞肿瘤分级和血管生成程度的重要指标。

关键词: 星形细胞肿瘤;血管生成;组织芯片;定量分析

中图法分类号: R446.8;R730.23;R730.264 **文献标识码:** A

Quantitative analysis of angiogenesis and tumor microvascular architecture in microarray of human astrocytoma

WU Jin-rong, ZENG Fa-gui, WANG Qing-liang, BIAN Xiu-wu (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the parameters of the microvascular architecture in human astrocytomas. **Methods** A tissue microarray with 168 points including diffuse astrocytoma (WHO grade Ⅱ), anaplastic astrocytoma (WHO grade Ⅲ), glioblastoma (WHO grade Ⅳ) and control tissues was constructed. The expression of VEGF and CD34 was detected by double-labeling immunohistochemistry on tissue microarray. The expression intensity of VEGF and microvascular architecture parameters including vessel number and vessel mean perimeter were analyzed with Image Pro Plus5.0. **Results** The positive unit (PU) of VEGF has a positive correlation with vessel mean perimeter in diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma and glioblastoma. Significant differences ($P<0.05$) were found in each grade of astrocytoma except PU and vessel mean perimeter between anaplastic astrocytoma and glioblastoma. **Conclusion** VEGF PU and microvascular architecture parameters can be used as an important indicator for assessing the grade and angiogenesis extent of human astrocytomas.

Key words: astrocytoma; angiogenesis; tissue microarray; quantitative analysis

血管生成(angiogenesis)一直是肿瘤研究的一个热点。在以往对血管生成因子与血管生成之间的关系的研究中多是在1张切片上对1例病例及1种蛋白表达进行标定,并采用定性或半定量的方式对结果进行分析[1],故人为因素较大。本研究应用组织芯片技术、免疫组织化学双重染色技术及免疫组织化学定量测试技术通过1张切片同时对不同级别和不同血管形态的人脑星形细胞肿瘤中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达与微血管结构参数的特点进行检测及定量分析,不仅提高了效率,同时也避免了相对误差及人为因素,使结果更具可靠性、客观性及真实性,可能对临床诊断、分级和疗效的评估有重要的临床价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源

从第三军医大学西南医院病理科1998-2005年存档的人脑星形胶质细胞肿瘤手术标本中抽取80例。标本均用4%甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,2位高年资病理医师重新阅片,根据2000年世界卫生组织制定的神经系统肿瘤分类分级标准重新进行分类和分级,分为弥漫型星形细胞瘤(WHO

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370552)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370552)

作者简介: 吴晋蓉(1980-),女,四川省崇州市人,硕士研究生,医师,主要从事胶质瘤血管生成方面的研究。电话:(023)65399070, E-mail: ronger68@sina.com

通讯作者: 卞修武,电话:(023)68752247

收稿日期: 2006-02-27;**修回日期:** 2006-03-13

Ⅱ级）、间变型星形细胞瘤（WHO Ⅲ级）、胶质母细胞瘤（WHO Ⅳ级）。位点选取标准为：根据 HE 切片，20 倍物镜下避开出血坏死区域，在切片上的血管热点区选取，并在对应的蜡块的对应位置做上记号，以便组织芯片的制作。正常成人脑组织取自非神经系统死亡尸检标本，选取 5 点。阳性对照为结肠癌标本（肿瘤实质部分选取 3 个点）。

1.2　人脑星形细胞肿瘤组织芯片的制作

运用组织芯片仪（购自美国 Beecher Instruments 公司）将所选取的点按正常成人脑组织（5 点）、弥漫型星形细胞瘤（52 点）、间变型星形细胞瘤（67 点）、胶质母细胞瘤（41 点）、阳性对照（3 点）的顺序，在 1 个空白蜡块内制作成含 168 点（15 × 11 + 3）矩阵的组织芯片蜡块。

1.3　免疫组织化学双重染色

一抗分别为内皮血管标志物 CD34（1∶100）和 VEGF（1∶50）鼠抗人单克隆抗体，分别购自北京中杉金桥生物技术有限公司和英国 B. D. 公司。双染试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司，即用型。组织芯片蜡块连续切片，厚度 3 μm，常规脱蜡至水，染色方法及步骤参照说明书进行。CD34 采用 BCIP/NBT 显色，VEGF 采用 AEC 显色。抗原修复运用水浴修复法修复 20 min。PBS 取代一抗做阴性对照。

1.4　免疫组化的结果判定及 VEGF、CD34 的定量测试

根据阳性及阴性对照的显色情况，在确定无假阳性及假阴性的情况下以内皮细胞质染成蓝紫色和肿瘤细胞质染成红色为阳性。应用 Olympus BX60 和 Olympus DP70 显微成像系统，在 10 倍物镜下，以独立 1 个点占据采像框为标准进行采图，所有图像在相同条件下完成。将所有的图片在 Image Pro Plus 5.0软件中进行图像分析，得出每个芯片点的血管数，并根据文献[2]中的公式，计算 VEGF 阳性细胞的阳性单位（positive unit，PU）值。公式如下。

$$PU = \frac{|G_A - G_\beta|}{AA_\alpha} \times Gmax \times 100 \quad (1)$$

$$= \frac{|G_\alpha - G_A|}{1 - AA_\alpha} \times Gmax \times 100 \quad (2)$$

本研究运用公式（2），其中 G_A、G_α 分别为不考虑灰度设定但在相同灰度设定方法时测得的整个芯片点所在区域及整个芯片点所在区域中 VEGF 阳性反应产物的灰度级，AA_α 为 VEGF 在整个芯片点所在区域中的面积密度，Gmax 为仪器的最大灰度分级。

1.5　统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计分析软件包行单因素方差分析。

2　结果

2.1　临床资料

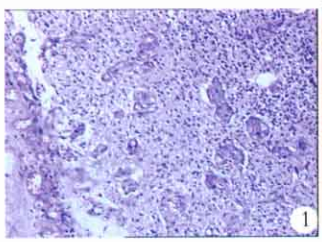
80 例星形细胞肿瘤中，弥漫型星形细胞瘤（WHO Ⅱ级）31 例，间变型星形细胞瘤（WHO Ⅲ级）32 例，胶质母细胞瘤（WHO Ⅳ级）17 例。男性 56 例，女性 24 例。年龄 5 ~ 75 岁，平均 42.98 岁，20 ~ 59 岁 67 例，占 83.75%，显示星形细胞肿瘤好发于中青年。患者多以颅内压增高为表现，如头痛、呕吐、视力减退等为首诊原因，后通过辅助诊断发现肿块。治疗以手术切除为主。

2.2　镜下观察

肿瘤细胞异型性随着肿瘤级别的增高而变大，细胞密度逐渐增高，细胞突起及细胞质逐渐变少，弥漫型星形细胞瘤中细胞核多为圆形或椭圆形，染色质较疏松，细胞多突起，胞质较丰富，为嗜酸性，以纤维型为主，少数肿瘤为原浆型。而间变型星形细胞瘤和胶质母细胞瘤，细胞核形态多样且出现病理性核分裂像，细胞核嗜碱性增强，细胞质逐渐减少，核质比增大，细胞突起减少甚至没有突起。肿瘤血管随着肿瘤级别的增高，血管数逐渐增多，管腔逐渐减小，管壁逐渐增厚，甚至形成团块样结构。在弥漫型星形细胞瘤中血管数目少，血管壁多以单层细胞构成，血管呈枝管状或窦状，管腔较大。胶质母细胞瘤中血管数目大大增多，血管增生明显，尤以坏死周围区域最为明显。血管形态多样，包括枝管状、窦状、肾小球样等，血管壁或由单个内皮细胞构成，或由多层细胞构成，有的血管壁细胞聚集成团，形成所谓的“肾小球样结构”。而间变型星形细胞瘤介于两者之间，血管有增生，但不如胶质母细胞瘤明显；血管管壁有增厚，但不形成肾小球样结构（图 1）。

2.3　组织芯片中 VEGF 表达及血管计数

成功构建了含有 168 个点的人脑星形细胞肿瘤组织的微阵列蜡块，并由此连续切片得到人脑星形细胞肿瘤微血管组织芯片。该芯片各点排列整齐，有部分点缺失。在正常脑组织中胶质细胞无明显表达 VEGF，在星形细胞胶质瘤中 VEGF 表达于肿瘤细胞（图 2），且 PU 值随肿瘤级别的增高而显著增大（$F = 11.764$，$P < 0.01$，表 1），及 VEGF 的表达随肿瘤级别增高而增强，但间变型星形细胞瘤与胶质母细胞瘤之间的差异性不大。CD34 表达于血管内皮细胞。血管数也随着肿瘤级别的增高而增大（$F = 5.058$，$P < 0.05$），血管平均周长随着肿瘤级别的增高而减小（$F = 8.940$，$P < 0.01$）。



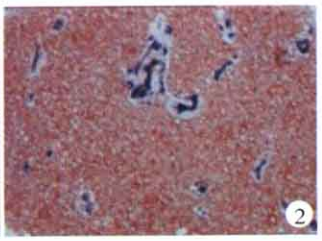


图 1　间变型星形细胞瘤中的厚壁血管　（HE × 200）

图 2　组织芯片中的一点为间变型星形细胞瘤　可见血管周围无着色区，血管周围 VEGF 阳性瘤细胞中 VEGF 表达较强（免疫双标记 × 200）

表 1　不同级别星形细胞肿瘤血管参数与 VEGF PU 值之间的比较（$\bar{x} \pm s$）

分类	点数	管数（个）	血管平均周长（μm）	VEGF PU 值
弥漫型星形细胞瘤	38	33.5 ± 34.7	107.82 ± 48.04	7.13 ± 3.09
间变型星形细胞瘤	46	50.9 ± 44.0[a]	80.08 ± 36.11[a]	9.04 ± 2.46[a]
胶质母细胞瘤	26	75.4 ± 78.7[ab]	78.38 ± 26.81[a]	10.55 ± 3.03[a]
F 值		5.058	8.940	11.764

a：$P < 0.05$，与弥漫型星形细胞瘤比较；b：$P < 0.05$，与间变型星形细胞瘤比较

3　讨论

血管生成指在宿主本身的微血管床上由芽生的方

式形成新的微血管的过程，是肿瘤血管新生化的1种主要方式。这一过程主要是肿瘤因缺氧因素的刺激并在这一基础上诱发血管生成因子与抑血管生成因子动态平衡失衡而导致的内皮细胞的增殖、分化、迁移并管型形成的结果。在众多血管生成因子中以VEGF的作用最为明显且确切。有研究表明，VEGF在胶质瘤血管生成中起着重要的作用，在胶质瘤细胞中可检测到VEGF蛋白且与肿瘤的微血管密度呈正相关，它的表达水平在恶性程度高的胶质瘤中高于恶性程度低的胶质瘤，相应的患者的预后也就较差，因而VEGF水平被看作为判断胶质瘤预后的标志[1,3]。但在以往的研究中多是以变性方式辨别VEGF表达的强弱，带有较大的主观性。PU定量方法是由申洪[2]提出的用于免疫组织化学显色反应强度定量的一个新概念，它是在排除了切片或涂片本底因素后，将纯免疫组化显色反应程度按灰度图像分析的结果分为0(白)到100(黑)个等级，其中每1个等级就定义为1个阳性单位。PU值的大小与阳性反应程度成正比。以往也运用积分光密度(integral optical density，IOD)等参数对免疫组织化学结果进行半定量分析，但IOD值是阳性反应区域的每个像素点的光密度值的总和，其在测量过程中将切片等的光密度值也统计在内，使得IOD值均偏高，而PU值这一概念将背景对免疫组化结果判定的影响减小到了最小，因而较科学性而言，PU值更胜一筹。PU值在近年内医学各个领域得到广泛应用，如Zhu等[4]测定p16基因在正常唾液腺泡、唾液腺瘤及其他恶性肿瘤中的表达；金海燕等[5]测定VEGF在正常子宫内膜月经期不同时期和子宫内膜异位症中的表达；李玲等[6]测定尿激酶型纤溶酶原激活物及其抑制物-1在脑缺血再灌注模型中不同时期的表达。本实验中运用PU这一概念对胶质瘤组织中VEGF的表达量进行量化，且得出VEGF的PU值随着肿瘤级别的增高而增大，与以往的实验结果相符合，说明PU值能作为量化指标代替表达强弱的定性指标用于病理诊断或实验中。

CD34作为造血祖细胞的标志物，在成人或胚胎的内皮细胞中依然有表达，常用于血管生成的研究中标记幼稚的微血管。以往研究中，对血管的分析多通过在显微镜下从3个方面手动计数，包括血管密度、血管平均数以及血管容积。这些方法也常用于各种实体瘤的研究中，其中也包括星形细胞瘤。但Wild等[7]通过计算机辅助数字图像分析技术对小鼠皮下注射人结肠癌(LS174T)移植瘤模型中对物治疗与否的肿瘤微血管进行分析，得出在微血管参数中，运用微血管总血管数、长度、分枝数等参数优于Weidner等[8]提出的微血管密度(MVD)。研究也表明肿瘤血管生成是肿瘤发生远处转移的一个重要条件[9]。肿瘤血管生成后结构会随着肿瘤的发展而发生改变以适应肿瘤生物学特性的需要。Uehara等[10]通过对肺腺癌不同区域的血管的三维分析发现，有的血管管壁由于血流供应的减少而塌陷，但是有的血管管壁却由于血流供应的增加而扩张。本实验结果显示，肿瘤中微血管的数目是随着肿瘤级别的增高而增大，而血管平均周长则是随着肿瘤恶性程度的增高而减小。提示肿瘤血管随着肿瘤恶性程度的增高，增生越明显，幼稚血管增多而血管周长减小。同时，血管周长越大，可能血管管腔就越大，在相同供血条件下，周长小的血管血流压就可能较周长大的血管大，因而对管壁的冲击力就较大。而恶性程度高的胶质瘤因幼稚血管增生管壁欠完整，所以在血流冲击作用下，血液向间质的渗出就变大，这可能与瘤周水肿有关，同时推测这更有利于血管的增生以及肿瘤的血行转移。血管数及血管平均周长可作为定量指标与PU值一起用于胶质瘤以及其他实体瘤的诊断、分级以及判断预后等。

参考文献：

[1] 卞修武，杜琳琳，陈自强，等. 星形细胞肿瘤血管生成活性和血管内皮生长因子与诱生型一氧化氮合酶表达的定量研究[J]. 中华病理学杂志，2001，30(1)：23-26.

[2] 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.

[3] SCHMIDT N O，WESTPHAL M，HAGEL C，*et al*. Levels of vascular endothelial growth factor，hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis[J]. Int J Cancer，1999，84(1)：10-18.

[4] ZHU S，WANG X，SHAO L，*et al*. Quantitative study on expression of p16 multiple tumor suppressor gene in salivary gland neoplasm[J]. J Tongji Med Univ，1999，19(2)：155-157.

[5] 金海燕，王自能，卢凤昕，等. 血管内皮生长因子在子宫内膜异位症发病中的作用[J]. 基础医学与临床，2005，25(3)：257-260.

[6] 李 玲，陶玉倩，李 扬，等. 尿激酶型纤溶酶原激活物及其抑制物A-1表达与脑微血管改变的实验研究[J]. 中华老年医学杂志，2005，24(6)：453-456.

[7] WILD R，RAMAKRISHNAN S，SEDGEWICK J，*et al*. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis：effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density [J]. Microvasc Res，2000，59(3)：368-376.

[8] WEIDNER N，SEMPLE J P，WELCH W R，*et al*. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med，1991，324(1)：1-8.

[9] SCHOR A M，PAZOUKI S，MORRIS J，*et al*. Heterogeneity in microvascular density in lung tumours：comparison with normal bronchus [J]. Br J Cancer，1998，77(6)：946-951.

[10] UEHARA T，HONDA T，SANO K，*et al*. A three-dimensional analysis of blood vessels in bronchioloalveolar carcinoma[J]. Lung，2004，182(6)：343-353.

(编辑 王小宴)