短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1424-03

淋巴管侵犯与鼻咽癌患者淋巴结转移的关系

邓 恋[1],刘陶文[2],屈元姣[2],曹轶林[2],陈 熙[2],彭丽芳[2] (541004 广西 桂林,广西壮族自治区桂林医学院[1];541002 广西桂林,南溪山医院肿瘤科[2])

[摘要] **目的** 探讨鼻咽癌组织中淋巴管侵犯(LVI)与淋巴结转移之间的关系。**方法** 用单克隆抗体D2-40及CKpan免疫组化染色检测66例鼻咽癌患者蜡块组织标本的LVI阳性率及淋巴管密度,分析LVI与LVD、淋巴结转移及临床病理特征之间的关系。**结果** 66例NPC组织的瘤周LVD明显高于瘤内LVD,差异有显著性意义($P<0.01$);其中LVI阳性率为63.6%(42/66),LVI与瘤周LVD呈正相关($r=0.349$,$P<0.05$),与瘤内LVD无明显关系($r=-0.340$,$P>0.05$);淋巴结转移组LVI阳性率高于未转移组,差异有统计学意义($P<0.01$);LVI预测NPC淋巴结转移的敏感性为74.5%;特异性为90.9%;阳性预测值为97.8%;阴性预测值为58.3%。LVI阳性率与N分期呈正相关,且与T分期及临床分期有关($P<0.05$),而与年龄、性别及肿瘤远处转移无关($P>0.05$)。**结论** 淋巴管侵犯可作为判断鼻咽癌发生颈部淋巴结转移的重要参考指标。

[关键词] 鼻咽癌;淋巴管侵犯;淋巴管密度;淋巴结转移
[中图法分类号] R322.26; R73-37; R739.6 [文献标志码] A

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是常见的头颈部恶性肿瘤之一,早期易出现颈部淋巴结转移及远处转移[1]。肿瘤细胞侵犯淋巴管又称淋巴管侵犯(lymphovascular invasion,LVI),淋巴管密度(lymphatic vessel density,LVD)是评估肿瘤淋巴管生成的重要指标。近年来,在非小细胞肺癌、乳腺癌及恶性黑色素瘤等研究中发现肿瘤组织中淋巴管的侵犯与淋巴结转移及其预后有关[2-4]。但是,关于鼻咽癌组织中淋巴管侵犯与淋巴结转移的关系尚不清楚,对于淋巴管内的细胞或细胞团是否为肿瘤细胞也未行鉴别。本研究应用单克隆抗体D2-40及细胞角蛋白(广谱)(CK pan)分别对鼻咽癌蜡块组织标本中的淋巴管及肿瘤细胞进行免疫组织化学染色,以探讨LVI与患者临床病理特征,尤其是淋巴结转移间的关系。

1 资料与方法

1.1 标本及临床资料

标本收集:2011年10月至2012年10月期间入住广西壮族自治区南溪山医院肿瘤科,并由该院病理科确诊为鼻咽癌患者的存档蜡块标本66例,均为低分化鳞状细胞癌,具有完整的相关临床资料及病理资料;患者均为初治且取组织标本前未接受放化疗;排除存在明显炎症、坏死及严重出血的组织标本。其中男性51例,女性15例,年龄19~77岁,中位年龄48.5岁。按照我国鼻咽癌2008分期[5](福州2008分期)标准分期:Ⅰ期1例,Ⅱ期6例,Ⅲ期26例,Ⅳa期27例,Ⅳb期6例;其中T1期2例,T2期11例,T3期31例,T4期22例,N0期11例,N1a期6例,N1b期12例,N2期22例,N3期15例,M0期60例,M1期6例。

1.2 试剂及免疫组化方法

即用型免疫组化EliVision™ super试剂盒(鼠/兔)、即用型D2-40鼠抗人单克隆抗体、鼠抗人细胞角蛋白(广谱)免疫组化单克隆抗体及DAB显色试剂盒均购于福州迈新生物技术开发有限公司。石蜡标本经2μm连续切片,采用免疫组化Elivison二步法,严格按照说明书进行染色。阴性对照组用PBS液代替一抗,以已知阳性反应片作阳性对照。

1.3 结果判断

D2-40免疫组化染色以细胞胞浆或包膜呈黄色或棕黄色颗粒为染色阳性,LVD采用Weidner等[6]报道的方法,以D2-40染色阳性的单层扁平上皮且管腔内无红细胞聚集的脉管视为淋巴管,D2-40染色阳性的单个内皮细胞或内皮细胞簇同样视为1个淋巴管。瘤周区域为癌细胞团块周围2 mm范围以内的组织区域。先在低倍镜下(×10)分别找到瘤内及瘤周区域阳性脉管的集中区,即"热点",再在高倍镜下(×200)计数3个视野的淋巴管数量,然后取均值即为LVD。CKpan免疫组化染色以细胞胞浆内呈棕黄色颗粒染色为阳性染色,结合细胞的形态、大小及位置判定是否为肿瘤细胞。LVI的判定:D2-40染色阳性的淋巴管管腔内存在细胞聚集,且管腔内的细胞经CKpan染色为阳性,即判定为LVI。

1.4 统计学方法

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 16.0统计软件,计量资料采用t检验;计数资料采用χ^2检验或Fisher's Exact检验;计数资料的多个独立样本间的比较采用Kruskal Wallis H检验;采用spearman等级相关分析。

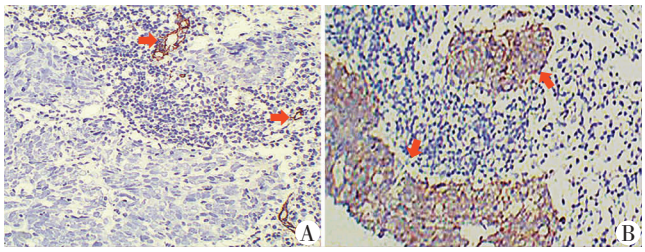
2 结果

2.1 鼻咽癌组织中D2-40免疫组化染色的淋巴管形态特征及淋巴管侵犯

66例NPC组织标本中D2-40均为阳性表达。D2-40染色

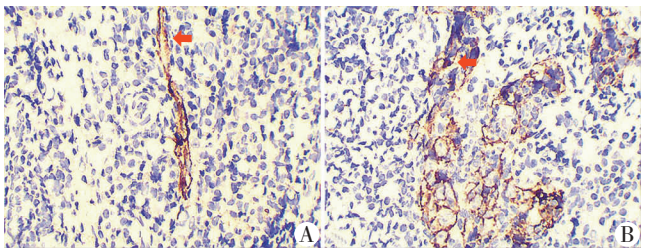
[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻0322025-4);桂林市科学研究与技术开发计划项目(20080403)
[通信作者] 刘陶文,E-mail:liu80838689@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1705.001.html(2013-01-31)

标记的淋巴管主要分布于肿瘤组织周围,尤其是癌组织与正常组织交界处。瘤周淋巴管管腔呈扩张状态,形状和大小不规则,壁薄,管壁无平滑肌,由单层内皮细胞构成(图 1)。瘤内淋巴管分布较少或缺如,多呈塌陷或闭塞状态(图 2)。



A:D2-40 标记的淋巴管(→示);B:CKpan 标记的相应位置的 NPC 肿瘤细胞(→示) 肿瘤细胞胞浆内呈棕黄色

图 1 免疫组化染色观察鼻咽癌组织周围淋巴管的形态变化 (×100)

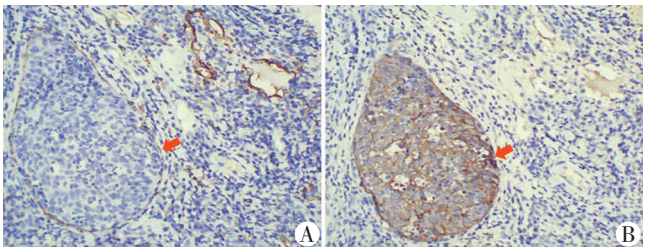


A:D2-40 标记的瘤内淋巴管(→示);B:CKpan 标记的相应位置的 NPC 肿瘤细胞(→示)

图 2 免疫组化染色观察鼻咽癌组织中淋巴管的形态变化 (×200)

66 例 NPC 瘤周 LVD 值的中位数为 6.33(1.33 ~ 15.67),均数为 7.08,瘤内 LVD 值的中位数为 3.67(0.67 ~ 8.00),均数为 3.76,瘤周 LVD 明显高于瘤内 LVD($P<0.01$)。

66 例 NPC 组织标本中有 42 例标本可见癌细胞侵犯淋巴管,主要表现为 D2-40 标记的淋巴管管腔内有单个、多个或成簇的癌细胞聚集。LVI 阳性率为 63.6%(42/66)。D2-40 染色阳性的淋巴管管腔内存在癌细胞,显示为 CKpan 免疫染色阳性(图 3)。



A:D2-40 标记的淋巴管(→示) 其管腔内可见细胞聚集;B:CKpan 标记的相应淋巴管管腔内的肿瘤细胞(→示)

图 3 免疫组化染色观察鼻咽癌组织中淋巴管的侵犯 (×100)

2.2 鼻咽癌组织中淋巴管侵犯与淋巴管密度之间的关系

淋巴管侵犯与瘤周淋巴管密度显著呈正相关($r=0.349$, $P=0.004$),与瘤内 LVD 无显著相关($r=-0.340$, $P=0.751$)。

2.3 淋巴管侵犯与鼻咽癌淋巴结转移的关系

淋巴结转移组 LVI 阳性率显著高于未转移组(9.1% *vs* 74.5%, $P<0.01$)。LVI 预测 NPC 淋巴结转移的敏感性为 74.5%;其特异性为 90.9%;阳性预测值为 97.8%;阴性预测值为 58.3%。

2.4 淋巴管侵犯与鼻咽癌临床病理特征的关系

LVI 阳性率与年龄、性别及 M 分期无关($P>0.05$);与临床分期、T 分期、N 分期有关($P<0.05$)。见表 1。

表 1 淋巴管侵犯与临床及病理特征之间的关系

特征	例数	LVI		P
		阳性数	阳性率	
年龄(岁)				1.000
<49	33	21	63.6%	
≥49	33	21	63.6%	
性别				0.345
男	51	34	66.7%	
女	15	8	53.3%	
临床分期				0.008
Ⅰ + Ⅱ	7	1	14.3%	
Ⅲ + Ⅳ	59	41	69.5%	
T 分期				0.010
T1 + T2	13	4	30.8%	
T3 + T4	53	38	71.7%	
N 分期				0.000
N0	11	1	9.10%	
N1a + N1b	18	9	50.0%	
N2	22	18	81.8%	
N3	15	14	93.3%	
M 分期				0.404
M0	60	37	61.7%	
M1	6	5	83.3%	

3 讨论

经淋巴道转移是恶性肿瘤转移的重要途径之一。既往的研究由于缺乏淋巴管内皮细胞标志物,很难区分肿瘤组织中的血管和淋巴管[7]。随着淋巴管内皮细胞标志物如 VEGFR-3、LYVE-1、Prox-1、podoplanin 及 D2-40 等的发现,近年肿瘤组织中淋巴管生成及淋巴管侵犯的研究备受关注。用单克隆抗体 D2-40 免疫染色淋巴管与传统 HE 染色相比,可提高检测肿瘤淋巴管侵犯的准确性和特异性,更有助于判断肿瘤发生淋巴结转移的状况[4]。广谱细胞角蛋白(pan-cytokeratin, CK pan)是一种相对分子质量为(40 ~ 68) × 10^3 的蛋白,它组成细胞骨架,在上皮组织中广泛分布。CKpan 作为一种上皮及上皮细胞来源的肿瘤的标志物,已广泛应用于肿瘤临床病理诊断[8-9]。肿瘤细胞通过肿瘤组织周围的淋巴管播散至区域淋巴结通常被认为是肿瘤发生淋巴道转移的第一步。淋巴结分期是肿瘤临床分期的重要组成要素之一,LVI 可客观评价是否发生肿瘤细胞侵犯肿瘤组织中的淋巴管。非小细胞肺癌、乳腺癌及恶性黑色素瘤等肿瘤组织中 LVI 阳性率与淋巴结转移有关,是肿瘤患者复发及不良预后的独立因素之一[2-4]。有国内学者报道甲状腺癌、口腔癌等肿瘤组织中淋巴管密度与淋巴结转移有关,但尚未见关于头颈部恶性肿瘤淋巴管侵犯的研究报道[10-11]。

本研究显示 NPC 组织中淋巴管主要分布于肿瘤

组织与正常组织的交界处,呈开放状态,管腔形状不规则,瘤内淋巴管较少,常呈闭塞或塌陷状。本观察结果中LVI阳性率与瘤周LVD呈正相关,LVI阳性率与淋巴结转移相关,且其LVI阳性率与N分期呈一致性。随着瘤周LVD的增加,肿瘤细胞与淋巴管接触面积增大,其侵犯淋巴管的可能性也增大。瘤细胞侵犯肿瘤组织中的淋巴管后随之进入淋巴系统,从而易于向区域淋巴结转移,LVI可能在淋巴结转移之前或者淋巴结转移的同时发生。Jung等[12]应用D2-40免疫组化染色技术检测80例乳腺浸润性导管癌组织中的LVI,研究结果显示LVI与乳腺癌淋巴结转移之间呈正相关,该学者还认为检测淋巴管侵犯比检测血管侵犯对判断乳腺癌患者肿瘤复发及无瘤生存率更具有预测意义。Firouzeh等[13]以96例已行前哨淋巴结(Sentinel lymph node,SLN)穿刺活检的原发性黑色素瘤患者为研究对象,应用D2-40对其肿瘤组织进行免疫组化染色,结果显示23例SLN阳性患者中有15例LVI阳性,73例SLN阴性患者中56例LVI阴性,其LVI对SLN的阳性预测为46.9%,阴性预测值为87.5%,LVI与淋巴结转移有关,是该病的独立不良预后因素,并认为LVI可作为SLN转移的独立预测因子,结合其他临床病理特征可以取代SLN活检。本研究观察到LVI预测NPC淋巴结转移的敏感性为74.5%;其特异性为90.9%;阳性预测值为97.8%;阴性预测值为58.3%,表明LVI对预测NPC发生淋巴结转移的特异性及灵敏度较高,可作为判断NPC发生淋巴结转移的指标。但是,LVI预测肿瘤淋巴结转移的价值尚存一定的争议,例如Kyung小组[14]研究显示在鳞状细胞型非小细胞肺癌中瘤周LVD与LVI无相关性。此外,Matthew等[15]回顾性分析,在27例恶性黑色素瘤中LVI与前哨淋巴结转移无明显关系,但是,27例恶性黑色素瘤中有10例LVI为阳性,而且无SLN转移恶性黑色素瘤中的LVI阳性率更高。这些研究结果的差异可能与肿瘤来源、免疫组化染色技术、研究例数的原因有关。本实验结果还显示NPC组织LVI阳性率随着NPC的进展而升高,这表明LVI阳性率与NPC病情的严重程度相关,这与其他关于实体瘤的文献报道一致[2-4,16]。因此,LVI与NPC淋巴结转移有关,可能成为判断NPC预后的指标之一。

本研究提示随着N分期的升高,LVI阳性率增高,对于未行颈部淋巴结活检以确定是否有颈部淋巴结转移的NPC患者,LVI可能成为判断其是否有淋巴结转移的有效指标之一,有助于NPC预后的判断。NPC的N分期中N0、N1a、N1b的界定一直存在争议,LVI可望成为确定其N分期的重要因素之一,这对制订治疗方案,如放疗靶区的设定甚为重要。对于LVI与NPC患者的复发、预后等尚有待研究。

参考文献:

[1] Luo D H, Zhou C W, Li E N, *et al*. Post-radiation CT changes and recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(10): 916-922.

[2] Higgins K A, Chino J P, Ready N, *et al*. Lymphovascular invasion in non-small-cell lung cancer: implications for staging and adjuvant therapy[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(7): 1141-1147.

[3] Laser J, Cangiarella J, Singh B, *et al*. Invasive lobular carcinoma of the breast: role of endothelial lymphatic marker D2-40[J]. Ann Clin Lab Sci, 2008, 38(2): 99-104.

[4] Rose A E, Christos P J, Lackaye D, *et al*. Clinical relevance of detection of lymphovascular invasion in primary melanoma using endothelial markers D2-40 and CD34[J]. Am J Surg Pathol, 2011, 35(10): 1441-1449.

[5] 陈韵彬, 梁碧玲. 鼻咽癌2008分期方案解读[J]. 中华放射学杂志, 2009, 43(10): 1119-1120.

[6] Zhang S Q, Yu H, Zhang L L. Clinical implications of increased lymph vessel density in the lymphatic metastasis of early-stage invasive cervical carcinoma: a clinical immunohistochemical method study[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 64.

[7] Holopainen T, Bry M, Alitalo K, *et al*. Perspectives on lymphangiogenesis and angiogenesis in cancer[J]. J Surg Oncol, 2011, 103(6): 484-488.

[8] Reckamp K L, Figlin R A, Burdick M D, *et al*. CXCR4 expression on circulating pan-cytokeratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 213-221.

[9] Zhou Z Y, Sun R C, Yang G Y, *et al*. Giant-cell anaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells of the chest cavity: a distinctive form of thymic carcinoma? [J]. Int J Surg Pathol, 2010, 18(5): 363-368.

[10] 吴勇军, 唐仪, 李振丰, 等. HIF-1α、VEGF-C及D2-40在甲状腺乳头状癌中的表达及意义[J]. 中国医学工程, 2011, 19(6): 11-14.

[11] 冯正虎, 李春青, 杨兰, 等. 口腔鳞癌中D2-40表达的特点及临床意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18(6): 701-704.

[12] Lee J A, Bae J W, Woo S U, *et al*. D2-40, Podoplanin, and CD31 as a Prognostic Predictor in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast [J]. J Breast Cancer, 2011, 14(2): 104-111.

[13] Niakosari F, Kahn H J, McCready D, *et al*. Lymphatic invasion identified by monoclonal antibody D2-40, younger age, and ulceration: predictors of sentinel lymph node involvement in primary cutaneous melanoma[J]. Arch Dermatol, 2008, 144(4): 462-467.

[14] Min K H, Park S J, Lee K S, *et al*. Clinical usefulness of D2-40 in non-small cell lung cancer[J]. Lung, 2011, 189(1): 57-63.

[15] Petitt M, Allison A, Shimoni T, *et al*. Lymphatic invasion detected by D2-40/S-100 dual immunohistochemistry does not predict sentinel lymph node status in melanoma[J]. J Am Acad Dermatol, 2009, 61(5): 819-828.

[16] Braun M, Flucke U, Debald M, *et al*. Detection of lymphovascular invasion in early breast cancer by D2-40 (podoplanin): a clinically useful predictor for axillary lymph node metastases[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 112(3): 503-511.

(**收稿**:2013-01-11;**修回**:2013-01-24)

(编辑 汪勤俭)