DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.001
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

文章编号:1000-5404(2000)12-1121-05

论著

碱性成纤维细胞生长因子及其受体表达与胶质瘤恶性程度的关系

杜琳琳,卞修武,陈意生,史景泉,陈自强,柳凤轩 (第三军医大学附属西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胶质瘤组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及其受体(FGFR)表达与恶性程度的关系。方法 采用免疫组织化学和图像分析技术观测61例人脑星形细胞肿瘤中bFGF和FGFR的表达规律,并定量检测Ⅷ因子相关抗原(FⅧRAg)以反映内皮细胞数量和微血管密度。结果 ①FⅧRAg阳性细胞总面积和积分光密度随级别增高而显著增大;②bFGF反应强度与FⅧRAg表达呈正相关;bFGF阳性反应强度对患者生存率曲线有明显影响;③各级别肿瘤FGFR阳性反应强度差异无显著性;FGFR表达水平对患者生存率影响无显著性。结论 bFGF及其受体的检测对于判断胶质瘤的恶性程度有意义。

关键词:胶质瘤;血管生成因子;预后
中图法分类号:R394.2;R730.264 文献标识码:A

Expressions of basic fibroblast growth factor and its receptor and their relation to malignancy in glioma

DU Lin-lin, BIAN Xiu-wu, CHEN Yi-sheng, SHI Jing-quan, CHEN Zi-qiang, LIU Feng-xuan (Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expressions of basic fibroblast growth factor (bFGF) and its receptor (FGFR) and the malignancy of glioma. Methods The expressions of bFGF and FGFR in 61 cases of brain glioma were studied with immunohistochemical methods and image analysis technique. Factor Ⅷ related antigen (FⅧRAg) was detected quantitatively for the amount of endothelia and microvessel density in the tumor tissues. Results ①The total area and integral optical density of FⅧRAg reactions were increased along with the tumor grade. ②The reaction intensity of bFGF was positively correlaed to the expression of FⅧRAg and had a significant effect on patients' survival curve. ③No difference was found in FGFR expression levels of different grade tumors. No effect of this receptor on the survival rate was found. Conclusion The detection of bFGF and its receptor might be of significance to analysis the malignancy of human gliomas.

Key words: glioma; angiogenic factors; prognosis

恶性胶质瘤富有新生血管,在实体瘤血管生成的研究中具有特别重要的作用[1~3]。碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)及其受体(FGFR)的表达与肿瘤恶性程度和预后判定上的意义尚有争议[4]。本实验采用免疫组织化学和图像分析技术观测人脑星形细胞肿瘤中bFGF和FGFR的表达规律,探讨其临床病理学意义。

1 材料与方法

1.1 材料来源及标本处理

61例人脑星形细胞肿瘤标本取自我校附属西南医院脑外科手术病例,男36例,女25例,年龄2~64岁,平均32.2岁。其中KernohanⅠ级7例、Ⅱ级14例、Ⅲ级和Ⅳ级各20例;获得明确随访结果者共44例(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ级分别为7、11、11、15例),其中病后生存期最长156月,最短1月,平均33.47月。正常脑和创伤后脑胶质增生各4例做为对照。组织经10%甲醛液常规固定,常规石蜡包埋,连续切片(厚5μm)。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570295)
作者简介:杜琳琳(1969—),女,山西省介休市人,博士,助教,主要从事胶质瘤诱导分化和血管生成方面的研究。电话:(023)68752246
收稿日期:2000-01-15;修回日期:2000-03-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 观测指标与方法

切片脱蜡至水，0.1%胰蛋白酶-0.1%$CaCl_2$溶液消化5 min（bFGF染色无此步）。所用一抗包括兔抗人Ⅷ因子相关抗原（FⅧRAg）多抗（1∶80）、小鼠抗人bFGF单抗（1∶20）和小鼠抗人FGFR-1单抗（1∶40），均为Santa Cruz公司产品；生物素标记的第二抗体（FⅧRAg染色为抗兔二抗，稀释度1∶200；bFGF及FGFR染色均为抗鼠二抗，稀释度1∶200），为Dako公司产品。ABC法染色，1%Harris苏木素或0.1%甲基绿复染；中性树胶封片、光镜观察。

bFGF和FGFR阳性反应强度均以阳性细胞数占整个细胞数的百分比进行半定量。阳性细胞数＞50%者记为强阳性（++），25%～50%者记为中等强阳性（++），5%～25%者记为弱阳性（+），＜5%者属可疑阳性或阴性（±/－）。采用德国Leica公司MD20型真彩色图像分析仪对增生组和星形细胞肿瘤组进行FⅧRAg和FGFR定量检测。物镜放大倍数16，每例切片在血管最密集区（Hot spots）随机测定至少5个视野，分别测定整幅图像内阳性反应细胞的总面积与积分光密度值（IOD）。

1.3 统计学处理

所有计量数据均以$\bar{x}\pm s$表示，并进行均数间显著性t检验；计数资料以二维列联表法进行分析。随访资料采用Kaplan-Meier生存率曲线法统计，并进行时序检验。

2 结果

2.1 血管内皮细胞FⅧRAg检测结果

FⅧRAg阳性定位于所有血管内皮细胞胞浆，有的血管由单层内皮细胞组成，有的由几个内皮细胞构成簇状，管腔不明显，呈原始的血管，见图1。Ⅲ、Ⅳ级肿瘤里血管有多层内皮细胞，形成阳性的厚壁血管，有些内皮细胞增生非常明显，呈多层阳性细胞使管腔闭塞。有的内皮细胞插入血管壁的平滑肌之间，使管壁中呈现散在的阳性细胞。胶质增生和各级星形细胞肿瘤组织中FⅧRAg阳性血管内皮细胞面积和积分光密度参数值见表1。

表1 各组内皮细胞FⅧRAg表达的图像分析结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Image analysis of FⅧRAg expression in endothelial cells（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Microscopic fields determined	Total areas *（μm^2）	IOD△
Control	8	24	14.432±6.202	26.321±12.190
Grade Ⅰ	5	25	49.357±32.636	72.550±39.006
Grade Ⅱ	14	56	1 057.254±850.531	1 954.453±1 457.121
Grade Ⅲ	22	88	1 294.469±934.088	2 189.027±1 245.652
Grade Ⅳ	20	94	1 465.454±829.527	2 512.723±1 198.001

*：$P<0.05$ Controls *vs* grade Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ or Ⅳ；Grade Ⅰ *vs* Ⅱ，Ⅲ or Ⅳ and grade Ⅱ *vs* Ⅳ

△：$P<0.05$ Grade Ⅰ *vs* control，grade Ⅱ，Ⅲ，or Ⅳ；Grade Ⅱ *vs* Ⅳ

2.2 bFGF免疫组化染色观察结果

正常脑星形细胞呈弱阳性或阴性。胶质增生中部分星形细胞呈阳性。星形细胞肿瘤组织中血管内皮细胞和瘤细胞胞浆可见阳性着色，肥胖细胞和瘤巨细胞一般着色最强，纤维型星形细胞着色强弱不定，较小的间变细胞一般为阴性，而较大的、分布在血管周围的瘤细胞几乎均为阳性。肿瘤中的内皮细胞为阳性，远离肿瘤的组织内血管内皮不着色。较大的血管壁平滑肌显示阳性，见图2、3。bFGF反应强度与星形细胞肿瘤分级有显著相关（$P=0.03244287$），见表2。

表2 星形细胞肿瘤bFGF反应强度

Tab 2 Reaction intensities of bFGF in astrocytoma

Grade of tumor	n	bFGF		
		++～++	+	±/－
Ⅰ～Ⅱ	19	4	8	
Ⅲ～Ⅳ	42	23	11	8
Total	61	27	18	16

不同的bFGF反应强度组FⅧRAg血管内皮细胞面积及积分光密度值见表3。

表3 不同程度bFGF和FGFR-1表达组FⅧRAg测定参数值（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 The parameters of FⅧRAg in different intensities of bFGF and FGFR-1 expressions（$\bar{x}\pm s$）

	Immuno-staining intensities	n	Fields determined	FⅧRAg total area *（μm^2）	FⅧRAg IOD△
bFGF	++	4	20	1 983.750±1 282.547	3 458.887±1 433.580
	++	23	105	861.007±762.244	2 514.220±1 103.228
	+	18	100	1 123.697±826.712	2 043.114±1 013.124
	±/－	16	80	657.505±455.678	1 278.587±864.009
FGFR-1	++	22	110	799.855±576.231	2 283.545±1 488.259
	++	21	105	736.541±653.352	2 000.223±1 499.887
	+	14	70	790.966±624.540	2 433.124±1 422.009
	±/－	4	20	629.741±541.021	1 465.214±1 136.545

bFGF *，△：$P<0.05$ *vs* different reaction groups

FGFR-1 *：$P>0.05$ compared different FGFR reactions；△：$P<0.05$ + *vs* ±/－

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

±/－组患者最长生存期 156 月,＋组最长 134 月, ＋＋~ ＋＋组最长仅为 46 月。统计结果发现±/－组病后生存期显著长于＋组和＋＋~ ＋＋组($P<0.01$)。

2.3　FGFR 免疫组化染色观测结果

正常脑组织中神经元和胶质细胞 FGFR 反应强度不一, 部分明显阳性, 部分弱阳性或阴性; 毛细血管内皮细胞反应亦不甚一致。受检的大部分星形细胞肿瘤瘤细胞均显示 FGFR 阳性, 定位于细胞浆及胞突内。与纤维型星形细胞瘤相比, 肥胖细胞型瘤细胞阳性较强, 胶质母细胞瘤中的瘤巨细胞亦为强阳性, 见图 4。与肿瘤组织边缘紧邻的小血管和大血管外周有多数阳性瘤细胞, 肿瘤组织中血管内皮细胞呈强阳性表达。

不同级别星形细胞肿瘤 FGFR 阳性细胞总面积均值之间差异非常显著($P<0.01$), IOD 之间差异亦非常显著($P<0.01$), 见表 4。不同 FGFR 反应强度组 FⅧRAg 阳性细胞总面积和 IOD 值见表 3。

表 4　各组 **FGFR-1** 免疫染色结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　The results of FGFR-1 immunostaining in the control tissues and astrocytomas ($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	Fields examined	FGFR-1	
			Total areas *(μm^2)	IOD △
Control	8	24	569.886±362.534	887.950±520.181
Grade Ⅰ	5	25	1 058.704±299.911	1 784.087±509.497
Grade Ⅱ	14	56	5 084.928±2 167.582	8 722.455±3 379.221
Grade Ⅲ	22	88	12 699.352±6 703.558	17 996.277±8 809.554
Grade Ⅳ	20	94	14 372.052±9 546.663	20 045.231±9 198.971

*, △: $P<0.05$ comparison between two of the groups except grade Ⅲ *vs* Ⅳ

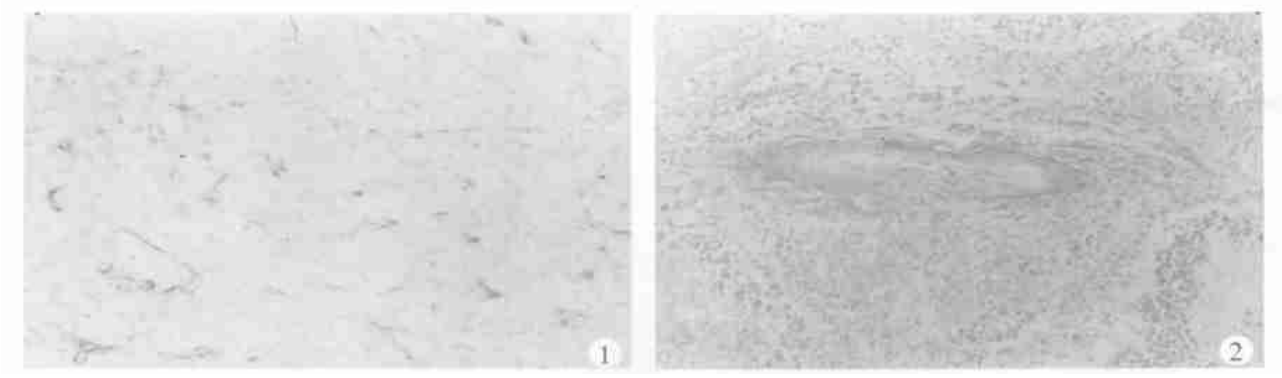


图 **1**　星形细胞瘤Ⅳ级, 瘤组织中有较多的微血管, 内皮细胞呈 **FⅧRAg** 阳性, 有的呈原始血管结构　(ABC 法, 苏木素复染　×200)

Fig 1　Positive expression of FⅧRAg in endothelia of grade Ⅳ astrocytoma　(ABC× 200, counterstained with hematoxylin)

图 **2**　星形细胞瘤Ⅲ级, 血管周瘤细胞及血管壁均呈 **bFGF** 阳性反应　(ABC 法, 苏木素复染　×100)

Fig 2　Strong expression of bFGF in tumor cells and microvessels of grade Ⅲ astrocytoma
(ABC× 100, counterstained with hematoxylin)

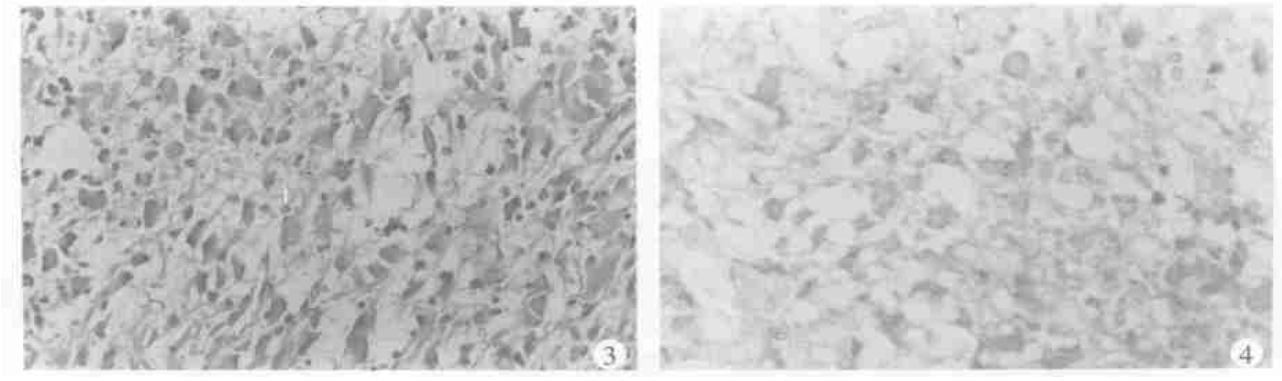


图 **3**　星形细胞瘤Ⅳ级, 瘤巨细胞呈明显 **bFGF** 阳性反应　(ABC 法, 苏木素复染　×200)

Fig 3　Strong expression of bFGF in giant neoplasmic astrocytes of grade Ⅳ astrocytoma
(ABC× 200, counterstained with hematoxylin)

图 **4**　星形细胞瘤Ⅲ级, **FGFR** 表达于瘤细胞胞浆及突起中, 瘤巨细胞呈强阳性反应　(ABC 法, 甲基绿复染　×200)

Fig 4　Strongly positive expression of FGFR in cytoplasm and processes, strong positive reaction in giant neoplasmic astrocytes of grade Ⅲ astrocytoma　(ABC× 200, counterstained with methyl green)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

将FGFR反应按强度分为++~+++和+、±/-3组，++组最长生存期56月，++组最长生存期156月，+、±/-组最长生存期83月。不同反应强度病后生存率曲线差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 FⅧRAg检测在判断肿瘤血管内皮细胞增殖和血管密度上的作用

Weidner[5]采用在显微镜下肉眼计数FⅧRAg标记的微血管的方法对血管密度做定量测试，发现肿瘤内血管密度与实体肿瘤的恶性进展和预后都有显著正相关，如果正确地应用，FⅧRAg不失为最特异的内皮细胞标记物。本实验FⅧRAg免疫组化图像分析测定结果显示，血管内皮细胞总面积与星形细胞瘤的级别密切相关，随级别增高，面积逐渐增大。特别是在良、恶性星形细胞瘤之间差异显著，表明FⅧRAg免疫组化联合图像分析可以做为观测胶质瘤内血管生成情况的特异性指标。

3.2 星形细胞肿瘤中bFGF的表达及其病理学意义

bFGF是多种细胞的有丝分裂原，具有强烈的血管生成作用[6]。这种多功能肽在许多组织和器官里都有表达，包括心肌、内皮细胞及皮肤汗腺等多种细胞。本实验结果显示，正常脑星形细胞中bFGF表达不明显。反应性胶质细胞有少量bFGF表达，胶质瘤中bFGF表达率则很高，且表达水平随胶质瘤组织学分级增高而增高，提示瘤细胞bFGF的自分泌作用在胶质瘤生长上具有正性调节作用。此结果与体外培养的胶质瘤细胞研究结果一致[7]。我们观察到血管周瘤细胞bFGF反应较强，说明该因子在维持瘤细胞生存上有重要作用。结果还显示，bFGF反应愈强，患者生存期愈短，表明bFGF检测具有预后判断上的意义。

内皮细胞产生的bFGF也可通过旁分泌机制作用于瘤细胞，使之增殖。本实验观察到肿瘤组织内大部分血管内皮细胞都表达有明显的bFGF。bFGF表达较强的瘤组织内皮细胞面积较大，表明bFGF作为生长因子不仅通过自分泌作用刺激瘤细胞本身的增殖，而且通过旁分泌机制作用于内皮细胞，使之显著增生及血管生成，导致恶性胶质瘤中微血管如此丰富。由此可见，如果能抑制肿瘤内bFGF的产生或阻断其作用途径将可以阻止星形细胞瘤的生长，从而达到有效治疗的目的。

3.3 FGFR在人星形细胞肿瘤恶性转化中的意义

bFGF的生物学作用是通过与其特异性的细胞表面受体FGFRs结合而介导实现的[8,9]。已经识别4种FGFR，包括FGFR-1(flg)、FGFR-2(Bek)，FGFR-3和FGFR-4。FGFR-1在bFGF/FGFR系统中的作用最大。正常脑神经元和胶质细胞中FGFR-1的表达呈现明显的异质性，即组织中有些细胞呈现FGFR-1阳性，有些则显示阴性；血管内皮细胞亦是如此。已有作者证明人脑胶质瘤从良性到恶性表型进展过程中有受体表达变化，正常脑白质和低级别星形细胞肿瘤里表达的主要是FGFR-2，而FGFR-2在恶性星形胶质肿瘤缺乏表达；相反，FGFR-1在正常脑白质不表达，在恶性星形胶质细胞瘤里则有非常显著的升高表达[10]。

本实验中所用FGFR抗体系特异性地结合FGFR-1。已有研究显示，FGFR-1在脑中的表达呈明显的异质性。正常星形细胞多为阴性表达，在神经元多为阳性表达。FGFR的反应强度半定量与星形细胞肿瘤的分级无显著关系。但图像分析结果发现阳性细胞总面积和积分光密度随肿瘤级别的升高而呈现增大趋势，上述结果的不一致性是由于半定量分级依据阳性细胞百分比，而图像分析中总面积和IOD结果除此因素外，尚由单位面积内阳性细胞总数(细胞密度)决定。此外，FGFR-1的反应强度与血管内皮细胞增殖程度无显著相关性，其反应强度与患者预后生存期也无显著相关性。可以推论，FGFR对胶质瘤的发展所起的作用不及bFGF关键。

参考文献：

[1] Abdulrauf S I, Edvardsen K, Ho K L, *et al*. Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patients with low-grade astrocytoma[J]. J Neurosurg, 1998, 88(3): 513-520.

[2] Brattstrom D, Bergqvist M, Larsson A, *et al*. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera from non-small cell lung cancer patients[J]. Anticancer Res, 1998, 18(2A): 1 123-1 127.

[3] 卞修武，史景泉. 血管内皮生长因子及其受体在肿瘤血管生成中的作用与抗血管生成研究进展[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(4): 248-250.

[4] Guddo F, Fontanini G, Reina C, *et al*. The expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in tumor-associated stromal cells and vessels is inversely correlated with non-small cell lung cancer progression[J]. Hum Pathol, 1999, 30(7): 788-794.

[5] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[6] Burke D, Wilkes D, Blundell T L, *et al*. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes[J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23(2): 59—62.

[7] 卞修武, 陈自强, 郭德玉, 等. 人脑胶质母细胞瘤细胞系 SHG-44 中血管生成因子和细胞周期调控因子的表达[J]. 中华病理学杂志, 1999, 28(3): 178—181.

[8] Keegan K, Johnson D E, Williams K T, *et al*. Isolation of an additional member of the FGFR family, FGFR-3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(8): 1 095—1 099.

[9] Liekens S, Leali D, Neyts J, *et al*. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, signaling, and mitogenic activity by heparin-mimicking polysulfonated compounds[J]. Mol Pharmacol, 1999, 56(1): 204—213.

[10] Yamaguchi F, Saya H, Bruner J M, *et al*. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(2): 484—488.

（编辑 薛国文）

文章编号: 1000-5404(2000)12-1125-01

经验与短篇

婴幼儿心内直视手术体外循环管理体会

Experience on the management of extracorporeal circulation during open heart surgery in infants

刘 梅, 肖颖彬, 彭 莉, 胡 卫, 王慧春, 廖晓娅 （第三军医大学附属新桥医院心血管外科, 重庆 400037）

我院自 1996 年 11 月至 1999 年 10 月共施行 10 kg 以内婴幼儿心内直视手术 59 例。现将我们体外循环(Extracorporeal circulation, ECC)管理体会报告如下。

1 临床资料

一般情况: 本组患儿男 34 例, 女 25 例, 年龄 3 d 至 36 个月, 平均(19.1±9.6)月, 体重 4.5～10 kg, 平均(8.3±1.6) kg。包括法乐氏四联症 11 例, 室间隔缺损 35 例, 房间隔缺损 7 例, 心上型全肺静脉异位引流 1 例, 三尖瓣闭锁 1 例, 动脉导管未闭 1 例, 大动脉转位 1 例, 肺动脉瓣狭窄 1 例, 同时伴动脉导管未闭及房间隔缺损 1 例。

体外循环方法: 全组病例均在气管插管静脉复合麻醉下手术。常规建立 ECC。使用 Sarns-8000、Jostra 和 Ploysten 体外循环机。使用膜式氧合器 44 例, 鼓泡式氧合器 15 例。预充液以林格氏液为主, 酌情加入全血、血浆及白蛋白, 使晶体与胶体之比为(0.5～0.6)∶1, 稀释后血细胞压积保持在 0.25～0.28, 同时在预充液中加入5%碳酸氢钠3～4mmol/kg, 硫酸镁0.375g/kg, 氯化钾 0.06～0.08 g/kg, 甘露醇 0.5 g/kg, 地塞米松 2～4 mg/kg, 10%氯化钙 0.2～0.5 g, 使酸碱度和电解质维持在生理范围。在 ECC 期间常规监测平均桡动脉压、中心静脉压、鼻温、肛温、尿量, 并在转前、转中、停机时测血气、血钾。心肌保护采用主动脉根部冷血持续灌注, 血与冷灌液比例为 4∶1, 同时在心包腔放置冰水以降低心脏局部温度。

2 结果

全组病例均顺利完成 ECC 和心内直视手术。术后死亡 5 例, 死亡率 8.5%。1 例法乐氏四联症患者术后因呼吸功能衰竭死亡, 2 例因术后家属喂养不当而误吸死亡, 2 例术后出现严重低心排出量而死亡。术中未出现转流意外和与心肺转流相关的并发症。术后心包引流为 20～135 ml, 平均(70±32) ml。其余患者病情平稳, 顺利康复出院。

3 讨论

为提高 ECC 灌注质量, 保障手术成功, 对婴幼儿 ECC 我们有以下几点体会。

维持重要脏器血供: 由于婴幼儿代谢高, 耗氧量大, 在 ECC 期间采用高流量灌注才能满足重要脏器的血供。对婴幼儿强调灌注流量要比强调灌注压更有意义[1], 所以我们在 ECC 期间给予 140～160 ml/kg 高流量灌注。

电解质和酸碱平衡: 电解质和酸碱平衡是 ECC 中极其重要的一个方面。转中血钾维持在较高浓度有利于心脏的复苏, 因此本组病例均严格计算预充液中钾的用量, 按 0.07～0.08 g/kg 给予, 使转中血钾维持在 4.0～5.0 mmol/L, 平均(4.7±1.2) mmol/L, 术毕无严重的心律失常或室颤发生。同时在 ECC 期间

（下转 1128 页）

作者简介: 刘 梅(1963—), 女, 重庆市人, 主管技师, 主要从事体外循环的病理生理方面的研究, 发表论文 7 篇。电话: (023)68755000-74607

收稿日期: 2000-01-23; 修回日期: 2000-05-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net