

临床论著

Id-1, VEGF 及微血管密度与脊柱转移瘤术中出血量及肿瘤来源间的关系

刘旭剑¹, 王小玲², 冯建刚¹, 李增怀¹, 刘月平², 王永军²

(1 河北医科大学第四医院骨科; 2 病理科 050011 石家庄市)

【摘要】目的:观察不同来源的脊柱转移肿瘤组织内 Id-1、血管内皮生长因子(VEGF)及微血管密度(MVD)分布情况,探讨其与肿瘤来源及临床术中出血量的关系。**方法:**选取河北医科大学第四医院病理科 2005 年 1 月~2008 年 7 月手术切除并经病理证实为脊柱转移瘤的石蜡包埋标本 32 例,术中出血量以病例实际记录为准,分为低、中、高出血量组,依据脊柱转移瘤来源分为上皮来源组和间叶组织来源组。采用免疫组化方法检测 Id-1、VEGF 和 CD34(微血管标记)在 32 例脊柱转移瘤组织中的表达,分析各指标与手术术中出血量及肿瘤来源的关系。**结果:**Id-1 与肿瘤来源有明显相关性,并与临床术中出血量呈正相关($P<0.05$);不同来源的转移瘤中 VEGF 表达量不同,并与临床术中出血量呈正相关($P<0.05$);MVD 在不同来源的转移瘤中比较没有统计学意义($P>0.05$)。不同来源的脊柱转移瘤术中出血量比较,有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**Id-1、VEGF 在不同来源的脊柱转移瘤中的表达量具有明显区别,且与术中出血量呈正相关;上皮来源的脊柱转移瘤术中出血量大于间叶来源组。不同来源的脊柱转移瘤中,微血管密度无明显不同。

【关键词】脊柱转移瘤; Id-1; VEGF; 微血管密度; 免疫组化

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.08.02

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-08-0678-04

The relationship between Id-1, VEGF as well as microvessel density and blood loss in spinal metastasis surgery and tumor origin/LIU Xujian, WANG Xiaoling, FENG Jiangang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(8): 678-681

【Abstract】 Objectives: To investigate the distributions of Id-1, vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) in metastatic spinal tumor with different origins and their association with intraoperative blood loss. **Methods:** 32 metastases spinal specimens confirmed by pathological method in our hospital from 2005 to 2008 were collected. Based on the amount of blood loss, all cases were divided into low, medium and high blood loss subgroup, and all specimens were divided into epithelial group and mesenchymal derived group based on the origins of metastases. Immunohistochemical staining was used to detect Id-1, VEGF and CD34(microvascular markers) in all specimens. The above-mentioned index, tumor origin and blood loss were analyzed each other. **Results:** Id-1 associated significantly with tumor origin ($P<0.05$), and showed positive relationship with intraoperative blood loss; Metastases from different origins had different expressions of VEGF ($P<0.05$), which were positively correlated with the amount of blood loss; no significant difference was noted between MVD and metastases with different origins ($P>0.05$). Spinal metastases with different origins showed statistical significance with blood loss($P<0.05$). **Conclusions:** Id-1 and VEGF expressions are different as for different metastasis origins, and are positively correlated with blood loss. Microvessel density is not significantly influenced by origin of spinal metastases. The epithelial origin metastases are associated with more blood loss.

【Key words】 Spinal metastasis; Id-1; VEGF; Microvessel density; Immunohistochemistry

【Author's address】 The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Hebei, 050011, China

脊柱是临床上较为常见的肿瘤转移部位,据报道,癌症患者的尸检中,90%患者有脊柱转移,

并有 5%~14%转移癌患者出现脊髓压迫症状^[1],且转移瘤的生长具有明确的血管依赖性^[2]。肿瘤血管生成与肿瘤的生长、浸润、转移及预后关系较为密切^[3]。本研究采用免疫组织化学方法检测 Id-1、血管内皮生长因子(VEGF)及 CD34(标记微血管

第一作者简介:男(1981-),主治医师,硕士,研究方向:骨肿瘤

电话:(0311)86095357 E-mail:swsxujian@126.com

通讯作者:冯建刚 E-mail:2006fjg@163.com

密度)在 32 例脊柱转移瘤组织中的表达及分布情况,观察其与术中出血量及肿瘤来源间的关系,总结报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

研究对象为我院病理科 2005 年 1 月~2008 年 7 月手术切除并经病理证实为脊柱转移瘤的石蜡包埋标本。入组标准:通过脊柱 MRI 检查明确病变位置,去除侵及脊柱中柱及后柱病例,所有病变均位于脊柱椎体,即脊柱前柱,且为单椎体病变患者。术前未采取放化疗等措施,未应用止血药物、血管介入等减少术中出血措施者,手术方式均为前路椎体切除、钛网置入内固定术,均有完整的临床病理资料及随访资料。两名病理医师采用双盲法阅片,确认病理结果,最终入组 32 例。其中男 20 例,女 12 例,年龄 23~70 岁,平均 56 岁。临床术中出血量以病例实际记录为准,以 600ml 和 1200ml 为分界点,分为低出血量组、中出血量组和高出血量组(表 1)。来源涵盖了肺癌、肾癌、食管癌、淋巴瘤、甲状腺癌、结肠癌等临床常见转移瘤来源,因此本实验将脊柱转移肿瘤分为上皮来源和间叶组织来源 2 组,间叶来源肿瘤以淋巴瘤为主,本实验选取病例患者均发现浅表淋巴结病变,确定脊柱椎体病变为转移瘤。脊柱占位情况:颈椎 7 例,胸椎 11 例,腰椎 14 例。

1.2 试验试剂

CD34 鼠抗人单克隆抗体、VEGF 鼠抗人多克隆抗体、Id-1 兔抗人多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,DAB 显色试剂盒及通用型二抗购自北京中杉金桥生物科技公司。

1.3 检测方法

采用免疫组织化学 S-P 法(生物素-链霉素卵蛋白过氧化物酶系统),所用载玻片经铬矾明胶处理。

表 1 脊柱转移瘤患者术中出血量分布情况

Table 1 Distribution of blood loss of patients with spinal metastases

出血量 Amount of blood loss	上皮来源(人) Epithelial origin	间叶来源(人) Mesenchymal origin
少量($n \leq 600$) Low	9	5
中量($600 < n \leq 1200$) Middle	7	1
大量($n > 1200$) High	5	5
总数 Total	21	11

1.3.1 MVD 的判定 按 Maeda 等^[4]报道的热点法进行:切片先置于 100 倍光学显微镜下观察,选取被 CD34 染成棕色的最高血管密度区域,然后置于 200 倍光学显微镜下分别选择 3 个不同区域进行微血管计数,然后求其平均值作为 MVD 值。任何被抗体染色的单个细胞或细胞团,不管其是否形成管腔,只要与周围的微血管、肿瘤细胞和其他连接组织成分有一个清楚的分隔,都认为是一个可计数的微血管。肿瘤内硬化区以及与肿瘤交界处软组织内的微血管不计入,有厚平滑肌壁以及管腔直径 >8 个红细胞直径的血管也排除在外。

1.3.2 Id-1 的判定 组织经苏木精复染后,Id-1 阳性着色分布于胞浆及胞核,呈棕黄色颗粒状或者片状。参照 Fromowitz 评分标准,根据整张切片的染色情况,计算阳性细胞数占肿瘤细胞数的比例,其中阳性细胞率 $\leq 25\%$ 记为 0 分,26%~50%记为 1 分,51%~75%记为 2 分, $>75\%$ 记为 3 分;再按照多数阳性细胞呈现的染色强度予以记分:无显色记为 0 分,浅棕黄色记为 1 分,棕黄色记为 2 分,棕褐色记为 3 分。将上述两项得分相加:0 分判为“-”,1~2 分判为“+”,3~4 分判为“++”,5~6 分判为“+++”;按照 Id-1 蛋白表达程度分三两组,高表达组(Id-1 表达+++),中表达组(Id-1 表达++),低表达组(Id-1 表达~+)。

1.3.3 VEGF 的判定^[5] 先将染色强度打分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。再将阳性细胞所占百分比打分:无阳性细胞计为 0 分,阳性细胞数低于 25%计为 1 分,阳性细胞数 25%~50%计为 2 分,阳性细胞数超过 50%计为 3 分。每张切片染色强度与阳性细胞百分比分值的乘积作为最后评分,染色强度与阳性细胞百分比分值乘积 ≥ 3 分为免疫组织化学结果阳性, $6 > n > 3$ 分为免疫组织化学结果中度阳性, ≥ 6 分为免疫组织化学结果强阳性。

1.4 统计方法

计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 13.0 进行统计分析。所得数据采用用秩和检验,应用 Spearman 相关性分析 3 个指标与术中出血量之间的关系,设 $P < 0.05$ 差异有意义。

2 结果

2.1 Id-1 蛋白的表达

Id-1 蛋白阳性表达于胞浆、胞核,呈棕黄色颗粒。32 例不同来源脊柱肿瘤中 Id-1 均有不同

程度的阳性表达(图 1)。通过统计分析,上皮来源与间叶来源的肿瘤组织中,Id-1 的表达具有相关性($P<0.05$,表 2)。Id-1 的表达与临床术中出血量呈正相关($r_s=0.230,P<0.05$)。而 Id-1 的表达与性别、年龄,以及发病椎体没有相关性。

2.2 VEGF 的表达

VEGF定位于细胞浆内和(或)胞膜,呈棕黄色表达(图 2),显色愈浓代表阳性表达愈强。不同来源与 VEGF 的表达有关($P<0.05$,表 2)。VEGF 的表达与临床术中出血量经过 spearman 相关性分析两者呈正相关($r_s=0.322,P<0.05$)。VEGF 的表达与性别、年龄及发病椎体没有相关性。

2.3 CD34 的表达

CD34 阳性反应物为浅棕色至深棕色颗粒,分布在血管内皮细胞。CD34 在上皮来源及间叶来源的脊柱转移瘤中均有表达(图 3),但两者间没有明显差别($P>0.05$,表 3)。不同来源的转移瘤中,上皮来源的脊柱转移瘤术中出血量较大($P<0.05$,表 4)。

表 2 上皮来源与间叶来源组间 Id-1 和 VEGF 表达量
Table 2 Id-1 and VEGF expression between epithelial and mesenchymal origin groups (n=32)

来源 Origin	Id-1			VEGF		
	+	++	+++	+	++	+++
上皮来源 Epithelial	5	11	5	4	8	9
间叶来源 Mesenchymal	5	4	2	5	3	3

注:两组间比较 $P<0.05$
Note: Compared between the two groups, $P<0.05$

表 3 上皮来源与间叶来源组微血管密度比较
Table 3 Microvessel density between epithelial and mesenchymal origin groups ($\bar{x}\pm s, n=32$)

	分组 Group	例数(例) Number	血管计数(根) Vessel count
微血管数 Microvessel count	上皮来源 Epithelial	21	62.36±10.22
	间叶来源 Mesenchymal	11	42.66±8.63

注:两组间比较 $P>0.05$
Note: Compared between the two groups, $P>0.05$

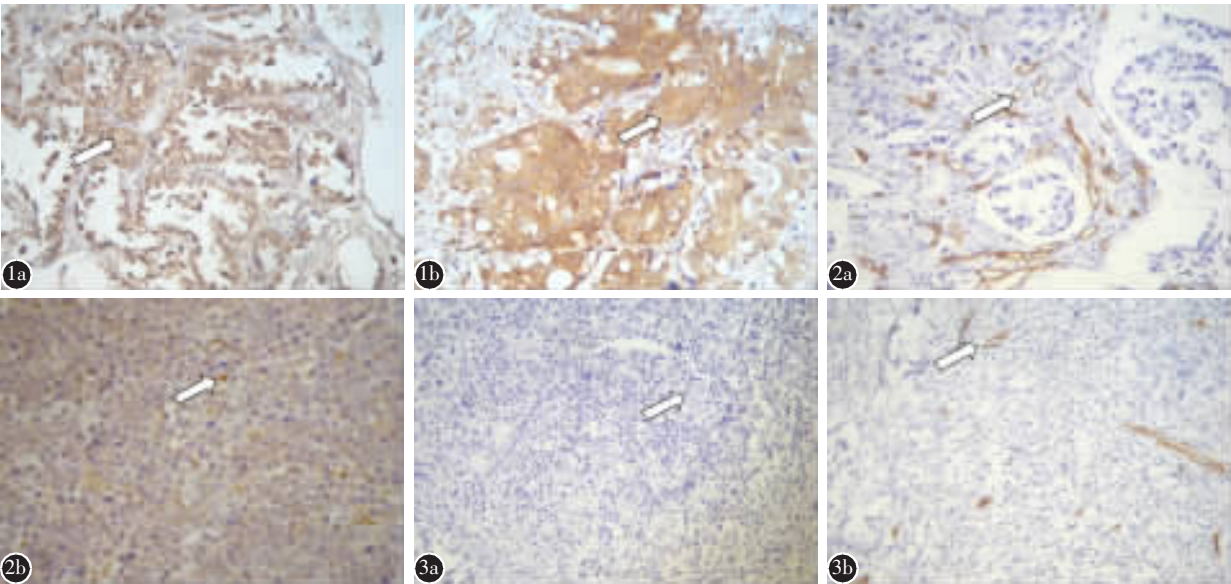


图 1 Id-1 棕黄色阳性颗粒沉着分布于胞浆及胞核 (SP 40×) a 箭头示 Id-1 在腺癌脊柱转移中的表达 b 箭头示 Id-1 在淋巴瘤脊柱转移中的表达 图 2 VEGF 棕黄色颗粒沉着于细胞浆内(SP 40×) a 箭头示 VEGF 在腺癌脊柱转移中的表达 b 箭头示 VEGF 在淋巴瘤脊柱转移中的表达 图 3 CD34 阳性反应物为浅棕色至深棕色颗粒,分布在血管内皮细胞(SP 40×) a 箭头示 CD34 在腺癌脊柱转移中的表达 b 箭头示 CD34 在淋巴瘤脊柱转移中的表达
Figure 1 a The expression of Id-1 in adenocarcinoma metastatic spinal (SP 40×) b The expression of Id-1 in lymphoma metastatic spinal(SP 40×). Id-1 positive staining distributed in the cytoplasm and nucleus, Brownish yellow granules or flakes Figure 2 a The expression of VEGF in adenocarcinoma spine metastatic (SP 40×) b The expression of VEGF in lymphoma spine metastatic (SP 40×). VEGF located in the cytoplasm and(or) membrane, brownish yellow expression, the more concentrated color to express on behalf of the stronger positive Figure 3 a The expression of CD34 in adenocarcinoma spine metastatic(SP 40×) b The expression of CD34 in lymphoma spine metastatic(SP 40×). CD34 positive reaction to light brown to dark brown granules, located in vascular endothelial cells

表 4 不同来源的脊柱转移瘤术中出血量比较

Table 4 Amount of blood loss between spinal metastases from different sources ($\bar{x} \pm s, n=32$)

	分组 Group	例数(例) Number	术中出血量 Blood loss(ml)
微血管数 Microvessel count	上皮来源 Epithelial	21	827.26 $\pm$ 82.27
	间叶来源 Mesenchymal	11	536.85 $\pm$ 64.58

注:两组间比较 $P<0.05$ Note: Compared between the two groups, $P<0.05$

3 讨论

肿瘤已成为导致人类死亡的重要疾病之一,而脊柱肿瘤的治疗一直是医学研究的重点,因为其发病位置特殊且进展快,且随着病情的发展,都会压迫脊髓,产生相应神经受压症状,常需手术彻底切除。由于其位置特殊,术中出血量大是困扰临床医师的难题,故术前预测术中出血量,进行适当的术前准备,是大家普遍关注的问题。

Id-1 过表达可以直接促进肿瘤的发生,并可以通过 ras 等多种癌基因的活化,抑制多种抑癌基因在肿瘤细胞中的表达,且在肿瘤细胞的增殖、细胞周期的调控、肿瘤的侵袭及肿瘤血管发生中发挥作用,促进肿瘤生长^[6-8]。利用反义核酸技术将 Id 蛋白导入肿瘤患者体内可能起到抑制肿瘤生长、发展和转移的作用^[9]。但 Id-1 在脊柱转移瘤中的表达及与临床术中出血量的关系不清楚。本研究显示 Id-1 蛋白在各脊柱转移瘤中均有不同程度的表达,在上皮来源的脊柱转移瘤中表达量明显增高,与术中出血量呈正相关,提示随着 Id-1 的表达量增高,术中出血量呈增大趋势。

血管内皮生长因子(VEGF)是反应肿瘤血管生成的重要分子生物学指标,可特异性促进血管内皮细胞分裂增殖并增加血管通透性^[9],与恶性肿瘤的侵袭及转移关系密切^[10]。本研究各标本中 VEGF 均有不同程度的表达,在上皮来源肿瘤中呈现高表达,其与出血量呈正相关,提示上皮来源的脊柱转移瘤 VEGF 表达较高,促进了血管的生成,随着细胞内血管生成量的增加,临床术中出血量也逐渐增大。

微血管密度(MVD)是评价肿瘤血管生成的金标准,并与肿瘤的生长及预后有关。Wang^[11]等报道 68 例胃肠道间质瘤中 MVD 与胃肠道间质瘤的复发、转移有关,且影响预后。本研究显示上皮来源的肿瘤出血量明显高于间叶来源的转移

瘤。一般情况下,血运丰富的组织,MVD 应该更高,但在本研究中两组间 MVD 没有差别,可能的原因:(1)样本量不足致误差大,样本不呈正态分布。(2)CD34 是一个通用指标,特异性较差。故本研究有待于进一步大样本多中心研究结果论证。

综上,VEGF、Id-1 及 MVD 与脊柱转移瘤术中出血量呈正相关,参与了脊柱肿瘤的血管增生机制。VEGF、Id-1 只与脊柱转移瘤的来源有关,与患者的年龄、性别等没有相关性。上皮来源组的脊柱转移瘤术中出血量大于间叶来源组,临床手术前,对已明确脊柱转移瘤为上皮来源者,需采取积极止血措施。

4 参考文献

- 肖建如,贾连顺. 脊柱转移瘤的外科治疗策略[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(1): 14-18.
- Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis[J]. Anticancer Res, 2005, 25(5): 3327-3333.
- Kwee RM, Kwee TC. Imaging in local staging of gastric cancer: a systematic review [J]. Clinical, 2007, 25(15): 2107-2116.
- Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma[J]. Cancer, 1996, 77(5): 858-863.
- Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(7): 2803-2807.
- Lee JY, Kang MB, Jang SH, et al. Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27 (Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition[J]. Oncogene, 2009, 28(6): 824-831.
- 张涛,江普查. 分化抑制因子 Id-1 与恶性肿瘤血管生成的研究进展[J]. 邵阳医学院学报, 2009, 28(1): 98-101.
- Ling MT, Lau TC, Zhou C, et al. Overexpression of Id-1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor(VEGF)[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(10): 1668-1676.
- 李志雄,林杰成,林建生. Id 蛋白与肿瘤及肿瘤性血管生成关系[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(1): 151-153.
- Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors[J]. Microcirculation, 2008, 15(8): 715-738.
- Wang TB, Qiu WS, Wei B, et al. Serum vascular endothelial growth factor and angiogenesis are related to the prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumors [J]. Ir J Med Sci, 2009, 178(3): 315-320.

(收稿日期:2011-08-17 修回日期:2011-09-27)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 刘彦)