

## 胆囊良恶性病变组织中肿瘤相关巨噬细胞 及微血管和淋巴管计数

李清龙, 杨竹林, 杨晓静, 罗鑫, 付汐, 苗雄鹰  
(中南大学湘雅二医院肝胆外科, 湖南长沙 410011)

**摘要:**【目的】研究胆囊良恶性病变组织中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、微血管(MV)和淋巴管计数(LV),探讨其临床病理意义及在胆囊腺癌中相互关系。【方法】108例胆囊腺癌、46例癌旁组织、15例腺瘤性息肉和35例慢性胆囊炎手术切除标本常规制作石蜡包埋切片,TAM、MV和LV染色均为SP免疫组化法,高倍光镜下随机计数10个视野。【结果】胆囊腺癌TAM、MV和LV计数明显地高于癌旁组织、腺瘤性息肉和慢性胆囊炎( $P < 0.01$ );腺瘤癌变或高分化腺癌、肿块最大径 $\leq 2$ cm、无淋巴结转移及周围组织未侵犯病例TAM、MV和LV计数明显低于低分化腺癌、肿块最大径 $> 2$ cm、淋巴结转移及侵犯周围组织病例( $P < 0.05$ );胆囊腺癌中TAM计数与MV和LV计数均存在高度密切正相关(TAM与MV, $r=0.65$ , $P < 0.01$ ; TAM与LV, $r=0.58$ , $P < 0.01$ ; MV与LV, $r = 0.32$ , $P < 0.05$ )。【结论】TAM、MV和LV计数可能是反映胆囊癌发生、进展、生物学行为、转移或侵袭潜力及预后的重要生物学标记物,TAM浸润可能与肿瘤血管和淋巴管生成有关。

**关键词:** 胆囊肿瘤; 腺瘤性息肉; 慢性胆囊炎; 肿瘤相关巨噬细胞; 血管生成; 淋巴管生成; 免疫组织化学

中图分类号:R73

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)04-0465-04

### Counts of Tumor-associated Macrophage, Microvessel and Lymph Vessel in Benign and Malignant Lesions of Gallbladder

LI Qing-long, YANG Zhu-ling, YANG Xiao-jing, LUO Xing, FU Xi, MIAO Xiong-ying  
(Research Lab of Hepatobiliary Diseases, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the counts of tumor-associated macrophage (TAM), microvessel (MV) and lymph vessel (LV) in gallbladder adenocarcinoma, peritumoral tissues, adenomatous polyp and chronic cholecystitis with regard to their diagnostic and prognostic value from a clinicopathological perspective. 【Methods】 SP immunohistochemistry method was used for the stain of TAM, MV, and LV in routinely paraffin-embedded sections from the samples of gallbladder adenocarcinoma ( $n=108$ ), peritumoral tissues ( $n=46$ ), adenomatous polyp ( $n=15$ ), and chronic cholecystitis ( $n=35$ ), followed by positive-counting on 10 random field under high power microscope. 【Results】 The counts of TAM, MV, and LV were significantly higher in the gallbladder adenocarcinoma than those in the peritumoral tissues, adenomatous polyp, and chronic cholecystitis ( $P < 0.01$ ). The counts of TAM, MV, and LV were significantly lowered when the tumor were cancerate from adenomatous polyp, or well-differentiated, or less than 2 cm in the maximal diameter, or negative in lymphatic involvement and peritumoral infiltration ( $P < 0.05$ ). Significant positive-correlation were found among the counts of TAM and MV and LV in gallbladder adenocarcinoma (correlation coefficient: TAM vs MV,  $r=0.65$ ,  $P < 0.01$ ; TAM vs LV,  $r=0.58$ ,  $P < 0.01$ ; MV vs LV,  $r=0.32$ ,  $P < 0.05$ ). 【Conclusions】 The counts of TAM, MV, or LV presented as important

收稿日期:2008-01-02

作者简介:李清龙(1963-),男,湖南武岗人,医学博士,副教授,E-mail:liqinglonga@sina.com;杨竹林,通讯作者,E-mail:yangzhu  
lin8@sina.com

factors associated with carcinogenesis, advancement, biological behavior, metastasis, invasive potential and prognosis of gallbladder carcinoma, TAM deposit might indicating the angiogenesis and lymphoangiogenesis of gallbladder adenocarcinoma.

**Key words:** gallbladder neoplasms; adenomatous polyp; chronic cholecystitis; tumor-associated macrophage; angiogenesis; lymphoangiogenesis; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(4):465-468]

近年研究发现恶性肿瘤内浸润的巨噬细胞分化成肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM),其数量与恶性肿瘤进展、血管生成及转移发生的预后密切相关。大量文献证实肿瘤微血管(microvessel, MV)生成密度与恶性肿瘤进展、转移或复发密切相关,在许多恶性肿瘤内被认为是一个仅次于淋巴结转移的预后预测因子<sup>[1,4]</sup>。D2-40 为新近发现标记淋巴管的特异性和敏感性均高的单克隆抗体,它不标记血管内皮细胞,故可用于淋巴管(lymph vessel, LV)计数<sup>[5]</sup>。近年研究显示 LV 计数与恶性肿瘤进展、转移及预后也密切相关<sup>[5-9]</sup>。新近国外学者发现一些恶性肿瘤中 TAM 通过旁分泌和自分泌途径具有促进 MV 和 LV 生成作用<sup>[1,2,4]</sup>,但国内外尚未见胆囊癌方面研究的文献报道。作者应用 SP 免疫组化法研究 108 例胆囊腺癌、46 例癌旁组织、15 例腺瘤性息肉和 35 例慢性胆囊炎组织中 TAM、MV 和 LV 计数,探讨他们的临床病理意义及其在胆囊腺癌中的相互关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 标本及其临床病理资料

收集中南大学湘雅二医院、湘雅医院和湖南省人民医院 1996 年 6 月至 2006 年 6 月胆囊癌手术切除标本 108 例,男性 31 例(28.7%),女性 77 例(71.3%)。病理类型均为腺癌,其中腺瘤癌变 9 例(8.2%),高分化腺癌 29 例(26.9%),中分化腺癌 29 例(26.9%),低分化腺癌 30 例(27.8%),黏液腺癌 11 例(10.2%);术中 发现侵犯胆囊外周围组织器官 59 例(54.6%);共有 59 例发生区域淋巴结转移(54.6%);58 例伴有胆囊结石(53.7%);手术方式包括根治性切除 34 例(31.5%),姑息手术 48 例(44.4%)和因广泛转移不能手术 26 例(24.1%)。从以上 108 例胆囊腺癌中选择 46 例癌旁组织(距癌组织  $\geq 3$  mm),病理证实其中正常 10 例、轻度

不典型增生 10 例、中度不典型增生 12 例和重度不典型增生 14 例。收集中南大学湘雅二医院 1996 年 6 月至 2006 年胆囊腺瘤性息肉手术切除标本 15 例,男性 5 例(33.3%),女性 10 例(66.7%),年龄范围 42 ~ 60 岁,平均 51.8( $S=11.6$ )岁,病理息肉大小为 0.08 ~ 15 mm;病理证实均为腺瘤性息肉,其中中至重度不典型增生 5 例(33.3%)。另收集 35 例慢性胆囊炎组织标本(单纯慢性胆囊炎 15 例、慢性胆囊炎伴胆囊结石 20 例)作为对照,其中正常胆囊黏膜 11 例、轻度不典型增生 12 例、中度不典型增生 7 例及重度不典型增生 5 例。以上标本经 40 g/L 甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片,切片厚 4  $\mu\text{m}$ 。

### 1.2 主要试剂

鼠抗人 CD68、CD34 和 D2-40 单克隆抗体,鼠 SP 试剂盒, DAB-HCL 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术公司。

### 1.3 方 法

TAM、MV 和 LV 染色方法均为常规 SP 免疫组化法(染色步骤略)。TAM、MV 和 LV 计数方法:在低倍镜下随机选择 TAM、MV 和 LV 分布丰富的 10 个区域,在高倍镜下计数 10 个区域内 TAM、MV 和 LV 数,取其均值为该病例计数值。

### 1.4 统计学处理

将所得数据输入 SPSS11.0 统计软件包,病理类型组内均值之间行  $F$  检验,两组均值之间行  $t$  检验,两组数值之间相关分析采用 Spearman's 等级相关分析法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 胆囊良恶性病变 TAM、MV 和 LV 计数情况

TAM 免疫组化反应产物定位于胞浆,部分胞核着色, TAM 分布癌周间质和癌组织内(图 1A)。MV 和 LV 免疫组化产物定位于内皮细胞胞浆,阳性表达的 MV 和 LV 多呈类圆形或条索状,均计数

为一个 MV 和 LV(图 1B、C)。胆囊腺癌 TAM, MV 和 LV 计数均值均明显地高于癌旁组织,腺瘤性息肉和慢性胆囊炎组织,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ;表 1)。

表 1 胆囊良恶性病变组织中 TAM、MV 和 LV 计数情况

Table 1 The counts of TAM, MV and LV in benign and malignant lesions

( $\bar{x} \pm s$ )

Lesions	n	TAM	t	P	MV	t	P	LV	t	P
Adenocarcinoma	108	20.9 ± 8.4			64.2 ± 11.6			11.4 ± 5.2		
Peritumoral tissues	46	13.6 ± 7.8	5.07	< 0.01	28.2 ± 12.4	17.16	< 0.01	6.8 ± 6.2	3.89	< 0.01
Adenomatous polyp	15	11.8 ± 6.9	6.84	< 0.01	32.4 ± 11.8	9.94	< 0.01	5.6 ± 2.9	4.17	< 0.01
Chronic cholecystitis	35	8.1 ± 5.8	8.42	< 0.01	22.2 ± 11.3	18.26	< 0.01	5.1 ± 3.6	6.63	< 0.01

All  $t, P$  were calculated through  $vs$  Adenocarcinoma

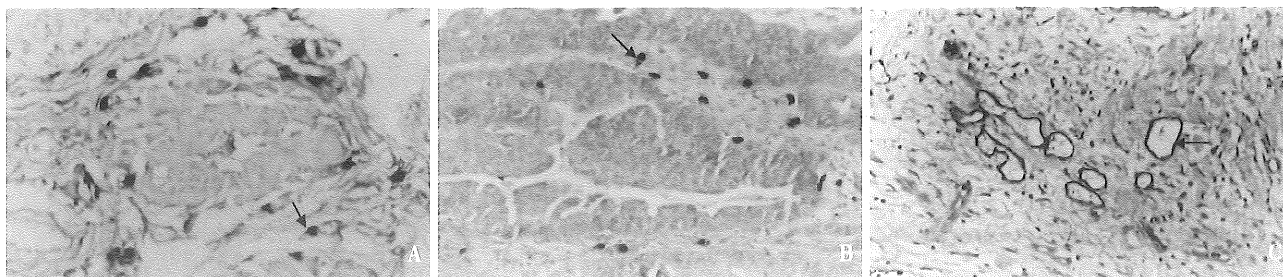


图 1 胆囊中分化腺癌的 TAM、MC 和 LV 计数

Fig.1 Counts of TAM, MC and LV of moderately-differentiated adenocarcinoma

A: TAM, 14/HP; B: MC, 15/HP; C: LV, 11/HP; SP immunohistochemistry,  $\times 200$

## 2.2 TAM, MV 和 LV 计数与胆囊腺癌临床病理特征的关系

胆囊腺癌变或高分化腺癌,肿块最大径  $\leq 2$  cm, 无淋巴结转移及未侵犯周围组织病例 TAM, MV 和 LV 计数明显低于低分化腺癌, 肿块最大径  $> 2$  cm, 淋巴结转移及侵犯周围组织病例, 差异均有显著或高度显著性( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 见表 2。三者计数均与性别、年龄及有无胆囊结石等临床特征无明显关系( $P > 0.05$ )。

2.3 TAM、MV 和 LV 计数在胆囊腺癌中相互关系  
经 Spearman's 等级相关分析, TAM 计数与 MV 和 LV 计数均呈高度密切正相关(MV:  $r = 0.65$ ,  $P < 0.01$ ; LV:  $r = 0.58$ ,  $P < 0.01$ ); 同样 MV 计数与 LV 计数之间也存在密切正相关( $r = 0.32$ ,  $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

基因蛋白表达、细胞表面粘附分子表达在胆囊癌的形成、淋巴结转移和病程进展等方面研究相对较多<sup>[10, 11]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞与胆囊癌的形成及生物学行为方面研究国内外尚未见文献报道。巨噬细胞是单核巨噬细胞系统内某个时期的

表 2 TAM、MV、LV 计数与胆囊癌临床病理特征的关系  
Table 2 The counts of TAM, MV, and LV and their correlation with clinicopathologic features of gallbladder adenocarcinoma

( $\bar{x} \pm s$ )

Clinicopathologic Features	n	TAM	MV	LV
Sex		(0.98, > 0.05)	(1.78, > 0.05)	(2.59, > 0.05)
Male	31	22.1 ± 9.0	61.2 ± 7.9	9.9 ± 5.2
Female	77	20.4 ± 7.8	65.4 ± 12.2	12.6 ± 4.8
Age		(1.38, > 0.05)	(1.94, < 0.05)	(1.49, > 0.05)
≤ 45 years old	24	18.9 ± 5.7	60.4 ± 8.9	10.4 ± 5.7
> 45 years old	84	21.5 ± 8.7	65.3 ± 11.4	12.2 ± 5.2
Pathological type		(8.85(F), < 0.01)	(9.94(F), < 0.01)	(11.6(F), < 0.01)
Adenomatous canceration	9	13.3 ± 1.3	48.8 ± 7.8	7.9 ± 5.1
Well-differentiated	29	19.9 ± 8.4	53.9 ± 10.4	8.8 ± 5.4
Moderately-differentiated	29	18.8 ± 5.0	62.2 ± 11.2	10.9 ± 5.3
Poorly-differentiated	30	27.2 ± 8.9	82.5 ± 10.5	17.7 ± 4.7
Mucinous adenocarcinoma	11	18.2 ± 3.2	55.2 ± 9.2	9.0 ± 4.8
Maximal diameter of mass		(3.23, < 0.01)	(6.26, < 0.01)	(3.30, < 0.01)
≤ 2 cm	31	17.2 ± 8.8	54.8 ± 10.3	8.9 ± 5.2
> 2 cm	77	22.4 ± 7.2	67.9 ± 9.6	12.4 ± 4.9
Lymphatic metastasis		(6.74, < 0.01)	(13.45, < 0.01)	(6.47, < 0.01)
No	49	16.6 ± 4.7	49.9 ± 10.8	7.8 ± 5.2
Yes	59	24.5 ± 8.0	76.1 ± 9.5	14.4 ± 5.4
Peritumoral infiltration		(5.01, < 0.01)	(10.48, < 0.01)	(5.51, < 0.01)
No	49	17.1 ± 6.7	52.3 ± 11.4	8.2 ± 4.9
Yes	59	24.1 ± 7.9	74.1 ± 10.2	14.1 ± 5.5
Gallstones		(0.26, > 0.05)	(1.65, > 0.05)	(1.84, > 0.05)
No	50	21.1 ± 7.8	62.4 ± 9.9	10.2 ± 5.3
Yes	58	20.7 ± 8.5	65.8 ± 11.4	12.4 ± 5.2

Data in "( )" were statistics formed as  $t, P$

分化类型,是肿瘤间质中炎性细胞浸润的一个关键成分,单核巨噬细胞在癌间质内通常分化为 TAM,与肿瘤血管生成关系密切。最近,一些文献报道恶性肿瘤中 TAM 计数高者进展快、易发生转移及预后差,TAM 可作为恶性肿瘤预后评估的客观指标<sup>[1-4]</sup>。其机理可能与 TAM 通过自分泌途径分泌许多生长刺激因子和抑制细胞因子及蛋白水解酶有关,也可能通过旁分泌机制与癌细胞相互作用有关,其确切机制仍不清楚<sup>[1-4]</sup>。肿瘤的生长和转移均需血管生成。近年大量文献证实肿瘤 MV 生成与恶性肿瘤转移和预后密切相关,MV 定量高者易发生转移和预后差,MV 计数是一个仅次于区域淋巴结转移的重要预后预测因子<sup>[1,4]</sup>。

肿瘤胚胎性抗原 M<sub>2</sub>A 是一种 40 ku 的唾液酸糖蛋白,在成年个体,淋巴管内皮细胞表达 M<sub>2</sub>A,但血管内皮细胞不表达该抗原。D<sub>2</sub>-40 可识别 M<sub>2</sub>A 的一个固定抗原表位,在实验研究中可用来标记淋巴管内皮,以区别于血管内皮,被认为是最具有特异性淋巴管标记物<sup>[5]</sup>。肿瘤诱导的淋巴管生成是肿瘤淋巴管转移的重要步骤<sup>[6,7]</sup>。新生淋巴管仅由单层细胞组成,无基底层,细胞间紧密连接少,有许多潜在腔隙等因素都有利于肿瘤细胞进入淋巴管。肿瘤淋巴管生成造成淋巴管密度增加,使肿瘤细胞有更多的机会侵入毛细淋巴管进入区域淋巴结,形成淋巴道转移<sup>[2,5-9]</sup>。且进一步发现 LV 除与淋巴道转移有关外,也与恶性肿瘤进展、血道转移及预后密切相关,LV 计数高者进展快,易发生血道转移及预后差<sup>[2,5-9]</sup>。

本组资料发现,胆囊腺癌 TAM、MV 和 LV 计数明显高于癌旁组织、腺瘤性息肉和慢性胆囊炎组织。腺瘤癌变或高分化腺癌、肿块最大径 ≤ 2 cm,无淋巴结转移和未侵犯周围组织病例 TAM、MV 和 LV 计数明显低于低分化腺癌、肿块最大径 > 2 cm、淋巴结转移和侵犯周围组织病例。其结果与国外文献报道较一致,说明 TAM、MV 和 LV 计数与胆囊腺癌进展、转移及侵袭潜力有密切关系,TAM、MV 和 LV 可能是反映胆囊腺癌预后的重要客观指标。

研究发现 TAM 通过自分泌和旁分泌途径在肿瘤血管生成中的级联反应中起重要作用,除产生 VEGF、bFGF、PDGF 及 IL-8 等化学超化因子外,可提高 VEGF 和 bFGF 在血管内皮中表达水平,从而促进肿瘤血管生成<sup>[1,3,4]</sup>。新近国外学者发现

TAM 除促进血管生成外,通过其自分泌的 VEGF-C 及影响肿瘤细胞分泌 VEGF-C 和 VEGF-D 的作用途径,具有明显促肿瘤淋巴管生成作用<sup>[2,3,6]</sup>。本组资料发现胆囊腺癌中 TAM 计数与 MV 计数、LV 计数呈密切正相关,说明胆囊腺癌中浸润的 TAM 可能具有促肿瘤血管和淋巴管生成作用,其机制尚需更深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Lamagna C, Aurrand-lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(4): 705-713.
- [2] Schoppmarn SF, Fenzl A, Nagy K, et al. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymphnode positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival[J]. *Surgery*, 2006, 139(6): 839-846.
- [3] Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 605-612.
- [4] Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, et al. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14 (2): 425-431.
- [5] Kaiserling E. Immunohistochemical identification of lymph vessels with D<sub>2</sub>-40 in diagnostic pathology [J]. *Pathologie*, 2004, 25(5): 362-374.
- [6] Von Marschall Z, Scholz A, Stacker SA, et al. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic Cancer[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27(3): 669-679.
- [7] Delatorre NG, Buley I, Wass JA, et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumor behaviors [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13(3): 934-944.
- [8] Walgenbach-Bruenagel G, Tolba RH, Varnai AD, et al. Detection of lymphatic invasion in early stage primary colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40[J]. *Eur surg Res*, 2006, 38(5): 438-444.
- [9] Sleeman JP. The relationship between tumors and the lymphatics: what more there to know[J]. *Lymphology*, 2006, 39(2): 62-68
- [10] 金晓凌,邓宗鋋. P53 蛋白及 C-erb-2 蛋白在胆囊癌中的表达[J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(2): 124-126.
- [11] 黄开红,李海刚,沈溪明,等. 胆囊癌组织中 CD44vb 和 nm23 表达的意义[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21 (5): 358-359, 375.