

· 临床研究 ·

晚期乳腺癌术前区域性动脉灌注化疗后 微血管密度及微淋巴管密度的变化

马小军 蒲永东 何建苗 赵秀坤

【摘要】 目的 探讨术前区域动脉灌注化疗及全身静脉化疗对晚期乳腺癌微血管密度(MVD)、微淋巴管密度(MLVD)的影响。**方法** 将 76 例晚期乳腺癌患者随机分为 2 组,术前动脉灌注化疗组 35 例,术前全身静脉化疗组 41 例,选其中 25 例化疗前的乳腺癌患者作对照组。采用免疫组化 SP 法,用 CD34、VEGFR3 抗体对 3 组乳腺癌组织标本进行 MVD、MLVD 检测。**结果** 术前动脉灌注化疗组的 MVD 为 36.05 ± 13.64 ,全身静脉化疗组为 49.92 ± 12.90 ,对照组为 60.38 ± 13.54 ,各组间比较($P < 0.01$);术前动脉灌注化疗组的 MLVD 为 6.62 ± 3.70 ,全身静脉化疗组为 9.96 ± 4.57 ,对照组为 11.30 ± 5.32 ,动脉灌注化疗组与对照组比较显著下降($P < 0.01$),与静脉化疗组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),静脉化疗组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 术前区域性动脉灌注化疗比全身静脉化疗更能有效降低肿瘤组织及其周边组织内 MVD 和 MLVD,从而抑制肿瘤细胞生长,减少肿瘤转移的机会。

【关键词】 乳腺癌;动脉灌注化疗;微血管密度;淋巴管密度

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Effect of preoperative regional intra-arterial infusion chemo-therapy on MVD and LMVD in advanced breast cancer MA Xiao-jun, PU Yong-dong, HE Jian-miao, ZHAO Xiu-kun. Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100091, China

【Abstract】 Objective To investigate the different effect between preoperative regional intra-arterial infusion chemotherapy and preoperative intra-venous infusion chemotherapy on microvessel density (MVD) and lymphatic microvessel density (LMVD) in advanced breast cancer. **Methods** Seventy-six breast cancer patients were divided into 2 groups: the preoperative regional intra-arterial infusion chemotherapy group (PIAC group, 35 cases), and the preoperative intra-venous infusion chemotherapy group (PIVC group, 41 cases); and another 25 breast cancer patients without preoperative

chemotherapy were as the control group. Using SP immunostaining method, MVD and LMVD of the samples of breast cancer in the 3 groups were detected with CD34 and VEGFR3. **Results** MVD was 36.05 ± 13.64 in the PIAC group, 49.92 ± 12.90 in the PIVC group and 11.30 ± 5.32 in the control group; there was a significant difference in comparison of the 3 groups ($P < 0.01$). MLVD was 6.62 ± 3.70 in the PIAC group, 9.96 ± 4.57 in the PIVC group and 11.30 ± 5.32 in the control group, it was remarkably decreased in the PIAC group compared with the control group, there was a significant difference between the two groups ($P < 0.01$), the difference between the PIAC group and the PIVC group was statistically significant ($P < 0.05$), while the difference between the PIVC group and the control group was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** PIAC can more effectively reduce MVD and MLVD than PIVC, thus restraining the growth of cancer cells and reducing cancer metastasis.

【Key words】 Breast neoplasms; Intra-arterial infusion chemotherapy; Microvessel density; Microlyphtic vessel density

乳腺癌是女性中发病率最高的主要恶性肿瘤之一。目前对乳腺癌的治疗主要是以手术为主的综合性治疗。术前区域性动脉灌注化疗,具有明显缩小肿瘤原发灶,降低肿瘤分期,从而提高手术切除率,并能抑制手术后残留癌细胞生长和增殖的优点。术前区域性动脉灌注化疗较全身静脉化疗具有更小的毒副作用,还可反复多次给药,现已广泛地应用于实体肿瘤的治疗。本研究对 35 例晚期乳腺癌患者行术前动脉灌注化疗以了解其对乳腺癌微血管密度(microvessel density, MVD)、微淋巴管密度(microlyphtic vessel density, MLVD)的影响,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 76 例为本科 2003 年 6 月至 2006 年 6 月收治的晚期乳腺癌患者,全部为女性,年龄 32 ~ 79 岁(平均 45.5 岁)。病灶位于左侧乳腺 41 例,右侧乳腺 35 例,其中外上象限 39 例,内上象限 21 例,外下象限 9 例,乳晕区 7 例。肿瘤直径 5.2 ~ 10.6 cm(平均 6.8 cm)。本组有 62 例同侧腋窝淋巴结肿大,且部分融合成团;36 例胸肌及皮肤受侵犯,活动度差;8 例皮肤破溃;2 例出现胸腔积液(其中 1 例合并心包积液);6 例出现肝、肺转移。全部病例按 TNM 分期:Ⅲ期 59 例,Ⅳ期 17 例。病理类型:浸润性导管癌 37 例,腺癌 14 例,乳头状癌 9 例,单纯癌 8 例,硬癌 6 例,湿疹样癌 2 例。所有病例随机分为 2 组:术前动脉灌注化疗组 35 例,术前全身静脉化疗组 41 例。两组病例临床资料具有可比性(表 1)。治疗前,选取

其中 25 例穿刺所取的乳腺癌标本作对照。

表 1 两组病例临床一般资料对比

临床因素	静脉化疗组	动脉化疗组	P 值
病理类型			0.487 0
浸润性导管癌(例)	17	20	
腺癌(例)	8	6	
乳头状癌(例)	5	4	
单纯癌(例)	6	2	
硬癌(例)	4	2	
湿疹样癌(例)	1	1	
TNM 分期			0.466 8
Ⅲ期(例)	33	26	
Ⅳ期(例)	8	9	
年龄/岁	57.4 ± 8.7	54.9 ± 10.8	0.346 3
化疗后肿瘤平均直径/cm	3.3 ± 1.4	3.4 ± 1.3	0.768 9
术后淋巴结转移数	4.2 ± 3.3	4.9 ± 6.1	0.627 8

1.2 置泵及化疗方法

术前动脉灌注化疗组,患者取平卧位,常规消毒患侧腋窝,局麻,取胸大肌外侧缘中点至腋窝顶斜行切口,切开皮肤、皮下长约 4 cm,寻找到胸外侧动脉,动脉远端结扎,近端逆行插入化疗泵导管。插入深度因人而异,一般插至胸锁关节附近,插管成功后用 1% 亚甲蓝 10 ml 从导管内注入,同时压迫远端腋动脉,观察肿瘤区域及腋窝染色满意后,固定并保留导管,连接泵体,并将泵体留置皮下。化疗方案为氟尿嘧啶脱氧核苷(FLO)0.5 g + 吡柔比星(EPI)30 mg 泵内注入,隔日 1 次,5 次为 1 疗程,休息 2 周后重复,共 2 ~ 3 疗程。动脉内灌注给药时,在患侧上臂最高处用血压袖带加压至收缩压以上,以防药物进入上肢远端。静脉化疗组,不行上述插管置泵,化疗方案(药物、剂量、疗程)与术前动脉灌注化疗组相同,给药途径为外周静脉内滴入。以上两组患者均于化疗结束后 4 ~ 5 d,行乳腺癌改良根治术或姑息性切除术。所有切除的肿瘤组织标本常规送病理学检查和免疫组化检测。

1.3 组织标本的处理和免疫组化染色

手术切除的肿瘤组织标本经 10% 的中性甲醛固定,石蜡包埋后,制成 4 ~ 5 μm 的连续切片,选择典型切片用于免疫组化染色。所用抗体包括抗 CD34 单克隆抗体(ZM-0046,北京中杉公司,稀释度 1:100),抗血管内皮生长因子受体 3(VEGFR 3)多克隆抗体(兔源,ZA0267,北京中杉公司,工作液)。切片行微波抗原修复,按 SP 法进行染色,DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。用已知阳性

组织作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 免疫组化结果判断

CD34 结果判定以血管内皮细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒者为阳性,不着色者为阴性。在低倍视野下于肿瘤细胞浸润区域选取微血管内皮细胞染色清晰,背景对照良好,数量最密集的 3 个视野,在 200 倍视野范围分别计算所有染色的微血管,单个内皮细胞着色亦作为一个计数单位,不论是否形成血管腔或管腔内有无红细胞。取 3 个视野的平均值作为 MVD 值。VEGFR3 阳性脉管判断标准及记数方法:低倍镜下寻找 VEGFR3 阳性脉管密集区,即“热区”,100 倍视野计数 10 个热区中 VEGFR3(+)脉管数,取平均值作为 MLVD 值。肿瘤区内单个或成丛的内皮细胞,不管成腔与否均视为脉管并计数,凡伴有肌层的脉管不予计数。

1.5 统计学分析

本组所有数据均采用 CHISS 2004 版统计软件处理,计量资料以均数 \pm 标准差表示;计量资料两组间比较采用两样本间 t 检验,多个样本间的两两比较采用方差分析;计数资料组间采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效

术前动脉灌注化疗组和静脉全身化疗组经化疗后,肿块明显缩小变软,腋窝淋巴结缩小或消失。采用 1981 年全国抗癌药物会议制定的标准。总有效率 93.4% (71/76),完全缓解(CR)18 例,占 23.7%,部分缓解(PR)53 例,占 69.7%,稳定(SD)5 例,占 6.6%。两组患者临床疗效的差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2),但术前动脉灌注化疗组肿块缩小度比全身静脉化疗组更明显(分别为 2.758 ± 0.932 , 2.212 ± 0.839),两组间的差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 两组患者术前化疗后临床疗效对比

组别	完全缓解(例)	部分缓解(例)	稳定(例)
动脉灌注化疗组 ^a	12	21	2
全身静脉化疗组	6	32	3

a: $P > 0.05$,与全身静脉化疗组比较

2.2 化疗并发症

术前动脉灌注化疗组和静脉全身化疗组患者化疗中出现的并发症主要有消化道症状、骨髓抑制、脱发、其他(置泵侧上肢疼痛、静脉炎等),见表 3。出现并发症病例均给予升白细胞治疗、延长化疗间隔时间、对症等处理后顺利完成全部化疗疗程。

表 3 两组患者化疗并发症对比

并发症	动脉灌注化疗组(例)	全身静脉化疗组(例)	P 值
消化道症状	5	8	0.075 7
脱发	4	12	0.000 9
骨髓抑制	3	9	0.039 5
其他	5	3	0.278 9

2.3 动脉灌注化疗对 MDV、MLDV 的影响

CD34 主要表达在血管内皮细胞,其阳性时呈现棕黄色颗粒,染色程度均匀一致,微血管分别呈异质性,微血管多位于肿瘤细胞浸润的前缘部位(图 1)。动脉灌注化疗组血管生长受到明显抑制,MDV 为 36.05 ± 13.64 ,静脉化疗组肿瘤的 MVD 为 49.92 ± 12.90 ,对照组为 60.38 ± 13.54 ,各组间两两比较差异均有显著统计学意义(表 4)。VEGFR3 阳性染色为胞质或胞膜呈明显的棕黄或棕褐色,主要位于上皮下的脉管内皮细胞,管腔多为单层,壁薄,腔内偶见血细胞,在肿瘤组织实质内反应较弱,主要定位于肿瘤的间质内(图 2)。动脉灌注化疗组肿瘤的 MLVD 为 6.62 ± 3.70 ,静脉化疗组为 9.96 ± 4.57 ,对照组为 11.30 ± 5.32 。动脉灌注化疗组与对照组、静脉化疗组比较显著下降,差异均有统计学意义,而静脉化疗组与对照组比较,差异无统计学意义(表 4)。

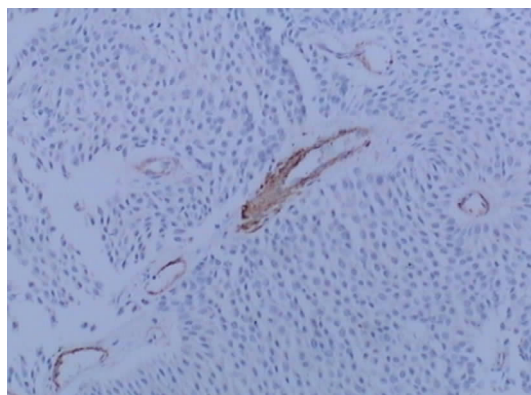
图 1 乳腺癌组织 CD34 阳性表达 (S-P 法 $\times 100$)

表 4 动脉灌注化疗对乳腺癌 MVD、MLVD 的影响

组别	n	MVD	MLVD
动脉灌注化疗组	35	$36.05 \pm 13.64^{a,b}$	$6.62 \pm 3.70^{a,c}$
全身静脉化疗组	41	49.92 ± 12.90^a	9.96 ± 4.57^d
对照组	25	60.38 ± 13.54	11.30 ± 5.32

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与静脉化疗组比较;

c: $P < 0.05$, 与静脉化疗组比较; d: $P > 0.05$, 与对照组比较

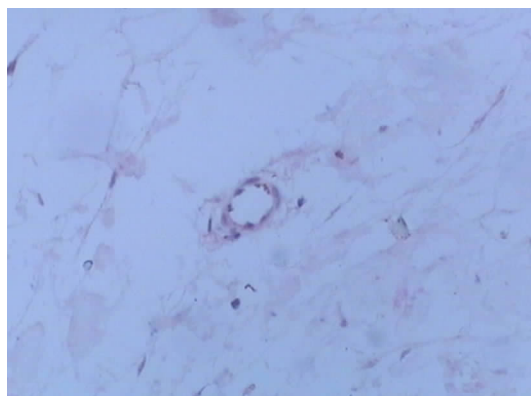


图 2 动脉化疗组 VEGFR3 阳性表达 (S-P 法 $\times 100$)

3 讨论

术前新辅助化疗因具有降低肿瘤分期,提高手术成功率,消灭微小转移灶,减低肿瘤细胞活力,减少远处播散机会,防止耐药细胞株的形成,了解肿瘤对化疗的敏感性,以及指导术后辅助化疗方案的选择等优点^[1]而被广泛应用于临床。术前区域性动脉灌注化疗通过选择性滋养动脉内给药,使肿瘤组织被“浸泡”在高浓度的药物中,起到直接靶向地杀灭肿瘤细胞的作用。因其具有明显缩小肿瘤原发灶,降低肿瘤分期,从而提高手术切除率,并能抑制手术后残留癌细胞的生长和增殖以及全身毒副作用小等优势而受到研究者的广泛关注^[2]。目前国内外有应用 DSA 插管至锁骨下动脉给药行晚期乳腺癌术前化疗的研究报道^[3,4],但该方法操作复杂、不能反复给药。而术前选择性动脉内置泵灌注化疗具有操作相对方便、置管更准确,留置导管可反复多次经泵体注入给药等优势^[5]。术前选择性动脉灌注化疗在肿瘤滋养血管未受到手术破坏前,以高浓度化疗药物进入肿瘤内部,可使药物与肿瘤细胞充分接触,导致肿瘤细胞大量死亡。本研究中病理学检查发现动脉灌注化疗组病例标本中有大量的癌细胞核固缩碎裂,胞质凝固,细胞间质水肿,细胞坏死;炎性细胞浸润、纤维组织增生;血管内膜增生,血栓形成;而静脉化疗组出现上述现象较少。本研究发现术前选择性动脉灌注化疗比全身静脉化疗能更明显缩小肿块的体积,化疗并发症更少。

肿瘤的生长、浸润、转移及复发与肿瘤的血管、淋巴管形成密切相关,肿瘤 MVD 是衡量肿瘤血管形成程度的标志,肿瘤的生长依赖于肿瘤的新生血管提供营养,抑制肿瘤血管的形成不但能造成肿瘤细胞的坏死,而且可抑制肿瘤生长以及经血液途径转移。MLVD 是衡量肿瘤淋巴管形成的标志,肿瘤的新生淋巴管在肿瘤的淋巴转移中具有举足轻重的作用,抑制乳腺癌新生淋巴管的生成,可有效抑制乳腺癌特别是晚期乳腺癌的淋巴转移。VEGFR-3 是第一个被克隆的淋巴管内皮细胞标记物。通过检测 VEGFR3 可区分肿瘤中的微血管及微淋巴管,阳性染色作为计算 MLVD 的依据,其与 MVD 一样是有重要意义的指标。最近的研究发现,实体肿瘤胃癌、乳腺癌、肠癌、胰腺癌、甲状腺癌等肿瘤细胞能产生多种血管

内皮生长因子(VEGF 家族),通过与血管内皮受体(VEGFR2/flk1)或淋巴管内皮受体(VEGFR3/flt4)结合,以旁分泌的方式刺激肿瘤血管、淋巴管生成及通透性增加,促进肿瘤细胞进入血管、淋巴管,增加转移的可能性^[6,7]。术前化疗能使肿瘤细胞大量死亡,减低肿瘤细胞活力,大大减少肿瘤细胞产生的各种血管内皮生长因子,从而有效地降低肿瘤组织的 MVD、MLVD,是抑制肿瘤转移的机制之一^[8]。术前动脉灌注化疗以其药物直接作用于肿瘤细胞,高药物浓度持续作用等特性,一方面更有效地抑制乳腺癌细胞增殖,减少肿瘤组织的耗氧量,改善组织局部缺氧,从而抑制各种促血管生长因子及淋巴管生长因子的分泌和表达,使肿瘤组织及其周边组织新生淋巴管形成减少,淋巴管密度降低。另一方面,高浓度化疗药物的“浸泡”造成肿瘤细胞大量坏死的同时也引起血管内皮细胞、淋巴管内皮细胞的坏死脱落,造成肿瘤组织内原有血管和淋巴管的进一步减少,使淋巴管密度降低。

参考文献

- [1] Kitagawa K, Yamakado K, Nakatsuka A, *et al.* Preoperative transcatheter arterial infusion chemotherapy for locally advanced breast cancer(stage IIIb) for down-staging and increase of resectability. *Eur J Radiol*, 2002, 43:31-36.
- [2] 徐工学,李志霞,陈佛来,等. 术前区域性动脉灌注化疗对大肠癌细胞凋亡之相关基因的影响. *中华外科杂志*, 2001, 39: 436-439.
- [3] Fiorentini G, Tsetis D, Bernardeschi P, *et al.* First-line intra-arterial chemotherapy (IAC) with epirubicin and mitoxantrone in locally advanced breast cancer. *Anticancer Res*, 2003, 23:4 339.
- [4] 甘长清,苏新良,杨光伦,等. 经尺动脉介入化疗治疗局部晚期乳腺癌 27 例临床分析. *重庆医学*, 2005, 34:407-408.
- [5] 何建苗,蒲永东,曹志宇,等. 晚期乳腺癌术前局部灌注化疗的疗效观察. *中国普通外科杂志*, 2003, 12:329-331.
- [6] Witte D, Thomaas A, Ali N, *et al.* Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3(VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2002, 22: 1463-1466.
- [7] Shushanov S, Bronstein M, Adelaide J, *et al.* VEGF-C and VEGFR-3 expression in human thyroid pathologies. *Int J Cancer*, 2000, 86: 47-52.
- [8] 陈珊,金伟,闵平,等. 血管内皮生长因子家族及其受体与肿瘤血管生成研究进展. *生命科学*, 2004, 16:19-23.

(收稿日期:2007-03-12)

(本文编辑:张毅)