

· 论著 ·

CD31 标记的微血管密度在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床意义

张文进 李云涛 陈鑫 刘月平 耿翠芝

【摘要】 目的 探讨 CD31 标记的微血管密度(MVD-CD31)在乳腺浸润性导管癌组织中表达的临床意义。**方法** 应用 SP 免疫组织化学法分别检测 2012 年 5~10 月河北医科大学第四医院乳腺中心诊治的乳腺浸润性导管癌 120 例及乳腺纤维腺瘤 30 例组织标本中的 MVD-CD31 的表达,并应用 t 检验和方差分析研究乳腺浸润性导管癌组织中 MVD-CD31 与临床生物学特征和 Ki67 的关系。**结果** 乳腺浸润性导管癌组织中的 MVD-CD31 高于纤维腺瘤组织 (16.586 ± 9.528 比 10.403 ± 3.052 , $t = 3.724$, $P = 0.005$)。乳腺浸润性导管癌组织中 MVD-CD31 的表达与肿瘤直径、TNM 分期有关($t = 3.761$, $P = 0.000$; $F = 2.983$, $P = 0.032$),与月经、有无淋巴结转移、有无脉管瘤栓、ER、PR、HER-2 表达及组织学分级无关($t = 0.754$, -0.533 , 1.633 , 1.853 , 1.040 , 0.276 , $F = 1.937$; $P > 0.05$)。三阴性乳腺浸润性导管癌组中 MVD-CD31 表达明显高于非三阴性组($t = 2.078$, $P = 0.043$)。乳腺浸润性导管癌患者 Ki67>14% 组的 MVD-CD31 表达显著高于 Ki67≤14% 组($t = -2.287$, $P = 0.030$), MVD-CD31 和 Ki67 表达呈正相关($r = 0.356$, $P = 0.011$)。**结论** MVD-CD31 可以反映乳腺浸润性导管癌的生物学行为,其检测结果对乳腺癌患者的病情评估、判断预后具有重要意义。

【关键词】 癌, 导管, 乳腺; 免疫组织化学; 微血管; 抗原, CD31

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A

Density of microvessels marked by CD31 in breast invasive ductal carcinoma and its clinical significance

Zhang Wenjin, Li Yuntao, Chen Xin, Liu Yueping, Geng Cuizhi. Breast Disease Center, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding author: Geng Cuizhi, Email: gengcuizhi@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the density of microvessels indicated by CD31 (MVD-CD31) in breast invasive ductal carcinoma and explore its clinical significance. **Methods** We detected MVD-CD31 by SP immunohistochemical method in tissue samples from 120 cases of breast invasive ductal carcinoma and 30 cases of breast fibroadenoma in Breast Disease Center, the Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University from May to October in 2012. t test and variance analysis were used to analyze the correlation of MVD-CD31 with clinical biological characteristics and Ki67 level. **Results** MVD-CD31 in breast invasive ductal carcinoma was significantly higher than that in breast fibroadenoma (16.586 ± 9.528 vs 10.403 ± 3.052 , $t = 3.724$, $P = 0.005$). In breast invasive ductal carcinoma, MVD-CD31 was correlated with tumor diameter and TNM staging ($t = 3.761$, $P = 0.000$; $F = 2.983$, $P = 0.032$), but not correlated with menstruation, lymph node metastasis, vascular invasion, ER, PR and HER-2 expression and histological grade ($t = 0.754$, -0.533 , 1.633 , 1.853 , 1.040 , 0.276 , $F = 1.937$; $P > 0.05$). In triple negative breast invasive ductal carcinoma, MVD-CD31 was significantly higher than that in non-triple-negative group ($t = 2.078$, $P = 0.043$). MVD-CD31 in the patients with Ki67>14% was significantly higher than that in the patients with Ki67≤14% ($t = 2.287$, $P = 0.030$); There was a positive correlation between MVD-CD31 and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma

($r=0.356$, $P=0.011$). **Conclusion** MVD-CD31 can reflect the biological behaviors of breast invasive ductal carcinoma, which is helpful to assess general condition and predict the prognosis of breast cancer patients.

[Key words] Carcinoma, ductal, breast; Immunohistochemistry; Microvessels; Antigens, CD31

乳腺肿瘤组织新生血管形成是导致肿瘤生长及转移的重要因素,因此,准确检测肿瘤组织中微血管密度(microvascular density, MVD)对于获知肿瘤的生物学特性,采用针对性地治疗具有重要的临床价值。血小板内皮细胞黏附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1, 又称 CD31)是黏附分子免疫球蛋白超家族成员,可能参与肿瘤细胞黏附于内皮细胞并促进肿瘤血管形成的过程^[1]。研究认为,CD31 标记的微血管密度(MVD-CD31)能精确反映肿瘤微血管数量^[2]。本研究采用免疫组织化学方法检测乳腺浸润性导管癌和纤维腺瘤组织中的 MVD-CD31 表达,并探讨其与细胞增殖指数 Ki67 和临床病理生物学指标的相关性。

1 资料和方法

1.1 病例选择

以 2012 年 5~10 月河北医科大学第四医院乳腺中心收治的 120 例原发性乳腺癌为研究对象,均为女性。同时收集其他 30 例乳腺纤维腺瘤组织标本,作为对照组。乳腺癌患者年龄 31~79 岁,中位年龄 55 岁,无其他肿瘤病史,术前均未接受化疗、放射治疗及内分泌治疗,术后病理证实为乳腺浸润性导管癌,按照 UICC/AJCC 第 6 版乳腺癌 TNM 分期标准:Ⅰ期 34 例,Ⅱ期 65 例,Ⅲ期 21 例;肿瘤直径>2 cm 60 例,≤2 cm 60 例;采用 Bloom-Richardson(Elston 和 Ellis 改良)半定量组织学分级法^[3]:Ⅰ级 12 例,Ⅱ级 79 例,Ⅲ级 29 例。淋巴结无转移者 63 例,有转移者 57 例;无脉管瘤栓 92 例,有脉管瘤栓 28 例;ER 阳性 89 例,阴性 31 例;PR 阳性 74 例,阴性 46 例;HER-2 阳性 22 例,阴性 98 例。三阴性乳腺癌 24 例,非三阴性 96 例。Ki67≤14% 29 例, Ki67>14% 91 例。乳腺纤维腺瘤患者年龄 20~53 岁,中位年龄 38 岁。肿瘤组织经 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,5 μm 厚连续切片,分别进行常规 HE 染色和 SP 法免疫组织化学检测。

1.2 免疫组织化学

CD31 抗体(ZM-0044,工作浓度 1:100)及

SP 免疫组织化学一抗 Ki67(ZM-0186)、HER-2(ZM0065)、ER(ZA0120)、PR(ZA0255)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。染色步骤按操作说明书进行,DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,相同条件下已知阳性片作为阳性对照。由两位高年资乳腺病理科医师双盲阅片。MVD-CD31 的判定标准:参照 Weidner 校正方法^[4],CD31 的阳性染色均为棕(黄)色,均在血管内皮细胞质中表达,任何被 CD31 抗体染色的单个内皮细胞或细胞团,不管是否形成管腔,只要与周围的微血管、肿瘤细胞和其他连接组织有清楚界限,都认为是一个可计数的微血管。肿瘤内硬化区及肿瘤交界处软组织内的微血管不计数,有平滑肌及管腔直径大于 8 个红细胞直径的血管也排除在外。每一个标本先在低倍镜下(×10)选 3 个微血管数量最多的区域,即“热点”,在高倍镜下(×200)计数每一个区域中的微血管数,取其平均值为 MVD-CD31 的值(图 1、2)。

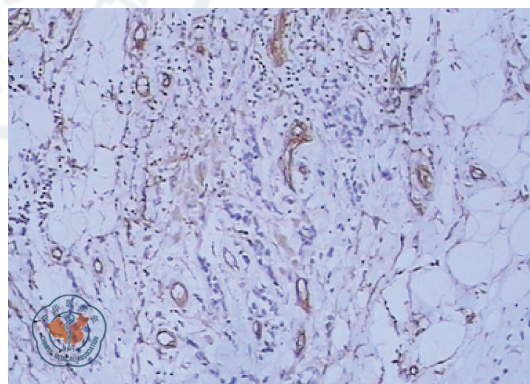


图 1 CD31 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达(DAB ×200)

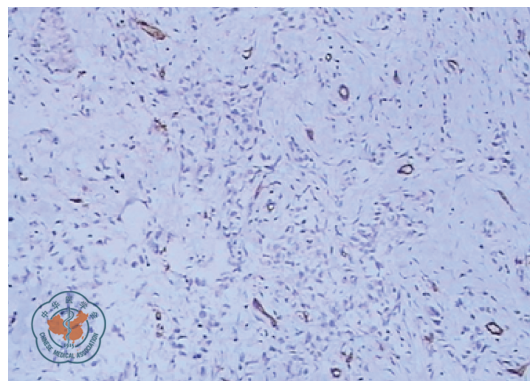


图 2 CD31 在乳腺纤维腺瘤组织中的表达(DAB ×200)

ER、PR、HER-2、Ki67 的判读标准参照 2010 年 ASCO 指南^[5]。ER、PR 判读: $\geq 1\%$ 的肿瘤细胞核任何强度着色时即判读为阳性; $< 1\%$ 的肿瘤细胞核着色时即判读为阴性。HER-2 的判读: 细胞膜棕黄染色为阳性。无细胞染色或 $< 10\%$ 的细胞膜较弱染色为(-); $> 10\%$ 的细胞膜部分较弱染色为(+); $> 10\%$ 的细胞膜完全较弱到中等染色为(++); $> 10\%$ 的细胞膜完全强染色为(+++)。HER-2(++) 的病例进行 FISH 检测, 本研究将检查结果(-~+) 及 FISH 阴性定为阴性, (++) 及 FISH 阳性定义为阳性。Ki67 的判读: 阳性染色定位于细胞核, 按视野中阳性细胞所占的比例进行计数, 以任意 5 个高倍镜视野中阳性细胞所占比例的平均值定义为阳性细胞百分比, 并作为评定依据。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件, 数据经过方差齐性检验均符合正态分布, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验, 3 组间均数比较用方差分析, 两两比较用 LSD 法。相关性分析使用 Spearman 秩相关。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MVD-CD31

乳腺浸润性导管癌中 MVD-CD31 值为 16.586 ± 9.528 , 高于乳腺纤维腺瘤 (10.403 ± 3.052), 差异有统计学意义 ($t = 3.724$, $P = 0.005$)。

2.2 MVD-CD31 与临床生物学特征的关系。

在乳腺浸润性导管癌患者中, MVD-CD31 表达在肿瘤组织 > 2 cm 组中增高, 且随着临床分期的增高、其表达增高, 差异有统计学意义, 与患者月经状况、是否有淋巴结转移、组织学分级、有无脉管瘤栓无关 (具体统计数值见表 1)。

2.3 MVD-CD31 与 Ki67 的关系

本研究中浸润性导管癌组织中 Ki67 $\leq 14\%$ 29 例, MVD-CD31 为 11.714 ± 5.757 , Ki67 $> 14\%$ 91 例, MVD-CD31 为 18.023 ± 10.297 , 差异有统计学意义 ($t = -2.287$, $P = 0.030$)。随着 Ki67 表达的增高, MVD-CD31 表达明显增高, 呈正相关 ($r = 0.356$, $P = 0.011$)。

3 讨论

肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖是乳腺癌发生和转移的两个关键性因素, 要遏制乳腺癌组织的发展需要准确了解肿瘤的生物学行为, 包括肿瘤

表 1 乳腺浸润性导管癌组织中 MVD-CD31 与临床生物学特征的关系

生物学特征	例数	MVD-CD31	检验值	P 值
月经状况				
绝经后	62	17.600 ± 11.169	0.754 ^a	0.455
绝经前	58	15.560 ± 7.644		
肿瘤直径				
≤ 2 cm	60	12.080 ± 7.455	3.761 ^a	0.000
> 2 cm	60	21.080 ± 9.358		
淋巴结转移				
无	63	15.885 ± 10.152	-0.533 ^a	0.596
有	57	17.333 ± 8.957		
脉管瘤栓				
无	92	15.297 ± 8.966	1.633 ^a	0.109
有	28	20.231 ± 10.489		
TNM 分期				
I	34	7.995 ± 2.137	2.983 ^b	0.032
II	65	16.222 ± 9.920^c		
III	21	23.667 ± 7.566^{de}		
组织学分级				
I	12	10.200 ± 1.304	1.937 ^b	0.156
II	79	18.242 ± 10.846		
III	29	14.667 ± 5.549		
ER				
阳性	89	15.135 ± 8.948	1.853 ^a	0.070
阴性	31	20.692 ± 10.283		
PR				
阳性	74	15.484 ± 9.106	1.040 ^a	0.304
阴性	46	18.368 ± 10.172		
HER-2				
阳性	22	15.778 ± 8.090	0.276 ^a	0.784
阴性	98	16.756 ± 9.896		
三阴性				
否	96	15.225 ± 8.937	2.078 ^a	0.043
是	24	22.000 ± 10.360		

a: 采用 t 检验; b: 采用方差分析; c: $P = 0.001$, 与 I 期比较; d: $P = 0.026$, 与 I 期比较; e: $P = 0.026$, 与 II 期比较

血管的生成状况。实验证据支持 MVD-CD31 可作为结肠癌、非小细胞肺癌等多种肿瘤生物学行为的重要指标, 与淋巴结转移、远处转移、分化程度及临床分期有关^[6]。但它在乳腺癌中的情况及其与细胞增殖状况的关系少见报道。

一般认为 CD31 参与介导肿瘤细胞黏附于内皮细胞, 当肿瘤细胞与血小板结合后, 血小板可通过 CD31 与内皮细胞的连接来促进肿瘤细胞对内皮细胞的接触, 稳定肿瘤细胞对内皮细胞的黏附^[7]。本研究中, 乳腺浸润性导管癌组织中 MVD-CD31 表达明显高于纤维腺瘤组, 这表明血

小板介导的肿瘤细胞黏附作用在乳腺癌的发生、发展中起重要作用。

CD31 作为内皮细胞标志物,在非成熟的肿瘤血管及成熟血管中均有表达,与其他内皮标志物比较,CD31 能更精确、稳定地反映肿瘤微血管数量^[2]。文献报道 MVD-CD31 可以反映肝癌的增殖状态^[8]。张永胜等^[9]发现 MVD-CD31 在胰腺癌组织中明显高于正常胰腺组织,且与胰腺癌的临床分期和淋巴结转移有关。本研究中 CD31 表达与肿瘤直径及 TNM 分期有关,与患者月经状况、淋巴结是否转移、组织学分级、有无脉管瘤栓、ER、PR、HER-2 表达无关,三阴性乳腺癌中 CD31 表达高于非三阴性乳腺癌。这提示肿瘤的增大及进展需要大量的血管生成为其提供营养支持,因此,肿瘤越大,分期越晚,MVD-CD31 越高。三阴性乳腺癌具有特殊的生物学行为和临床特征,临床表现为一种侵袭性病程,易发生局部复发和远处转移,预后较其他类型乳腺癌差。三阴性乳腺癌之所以较早出现转移、复发,与新生血管的生成密切相关,因此,MVD-CD31 在三阴性乳腺癌中高表达。

Ki67 是 1983 年 Gerdes 等^[10]发现的一种在增殖细胞中表达的核抗原。由于其半衰期短,脱离细胞周期后迅速降解,已成为目前检测肿瘤增殖细胞活性最可靠的指标之一^[11]。2011 年 St. Gallen 共识中以 Ki67 阳性指数的高低来区分 ER 和(或)PR 阳性、HER-2 阴性的 Luminal A 型和 Luminal B 型,并对二者推荐不同的治疗方案^[12]。本研究中 Ki67 ≤ 14% 的乳腺癌患者 MVD-CD31 表达明显低于 Ki67 > 14 的患者,随着 Ki67 指数的增高,MVD-CD31 的表达也增高,MVD-CD31 表达与 Ki67 指数成正相关($r = 0.356$ 、 $P = 0.011$)。恶性肿瘤的无限制增长需要建立密集的新生血管来保障肿瘤组织的给养和生长,本研究结果也证实了这一点。

总之,在乳腺浸润性导管癌中,肿瘤血管生成与肿瘤细胞增殖是两个相互依赖、互相促进的因素,MVD-CD31 表达可以预测乳腺癌组织的生物学行为,对乳腺癌患者的病情评估、个体化治疗、判断预后具有重要意义。

张文进,李云涛,陈鑫,等. CD31 标记的微血管密度在乳腺浸润性导管癌中的表达及其临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2014,8(1):22-25.

参 考 文 献

- [1] Tang DG, Chen YQ, Newman PJ, et al. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium [J]. J Biol Chem, 1993, 268(30):22883-22894.
- [2] Sumpio BE, Yun S, Cordova AC, et al. MAPKs (ERK1/2, p38) and AKT can be phosphorylated by shear stress independently of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in vascular endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12):11185-11191.
- [3] Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up [J]. Histopathology, 2002, 41(3A):151-152.
- [4] 黄小娟,齐文慧,王立,等. CD31 和 CD105 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及临床病理意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2012, 21(6):544-550.
- [5] Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(16):2784-2795.
- [6] Gulubova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(7):1265-1275.
- [7] 程继荣,徐斌,王淑琴,等. 肺癌组织 CD31、CD34 及 CD105 标记的微血管密度的临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(8):638-640.
- [8] 崔晓楠,候力. 组织微阵列方法检测 CD31、CD105、v-WF、PCNA 在肝癌组织中的表达[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(10):801-804.
- [9] 张永胜,徐龙江,李峰,等. 胰腺癌组织中 EGFR 和 CD31 的表达和临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(10):1117-1119.
- [10] Gerdes J, Schaub V, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody relative with cell proliferation [J]. Int Cancer, 1983, 31(1):13-20.
- [11] 周晓聪,张筱骅,王珣晨,等. Ki-67 在三阴性乳腺癌组织中的表达[J]. 中华普通外科杂志,2012, 27(10):848-849.
- [12] Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group [J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(22):1656-1664.

(收稿日期:2014-01-06)

(本文编辑:刘军兰)