

## 胃癌组织中 D2-40 标记的微淋巴管密度 与幽门螺杆菌 L 型感染的关系研究

田 甜, 于东红

**[摘要] 目的:** 探讨人胃癌组织中 D2-40 标记的微淋巴管密度 (lymphatic microvessel density, LMVD) 与幽门螺杆菌 L 型 (*Helicobacter pylori* L-form, Hp-L 型) 感染的关系。**方法:** 采用免疫组织化学 S-P 法检测 100 例胃癌、50 例对应癌旁及 30 例切缘正常对照组织 D2-40 和 Hp-L 型抗原的表达; 采用革兰染色法检测上述组织的 Hp-L 型的感染情况。**结果:** 胃癌癌中心区 LMVD 为每 100 倍视野  $12.61 \pm 4.20$  个, 切缘正常对照组 LMVD 为每 100 倍视野  $9.23 \pm 5.62$  个, 癌旁组织 LMVD 为每 100 倍视野  $31.20 \pm 3.73$  个, 癌旁组的 LMVD 均显著高于胃癌癌中心区和切缘正常对照组 ( $P < 0.01$ ), 且与胃癌淋巴结转移数目及 Hp-L 型的检出率有一定的关系 ( $P < 0.01$ )。**结论:** 胃癌组织中 D2-40 单抗标记的 LMVD 与 Hp-L 感染有密切关系。

**[关键词]** 胃肿瘤; 微淋巴管密度; 幽门螺杆菌; 细菌 L 型

**[中国图书资料分类法分类号]** R 735.2 **[文献标识码]** A

### Correlation between lymphatic microvessel densities marked by monoclonal antibody D2-40 and *helicobacter pylori* L-form infection in gastric carcinoma

TIAN Tian, YU Dong-hong

(Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the relationship between lymphatic microvessel density marked by monoclonal antibody D2-40 and *Helicobacter pylori* L-form (Hp-L) infection in gastric cancer. **Methods:** The expression of D2-40 and Hp-L in the tissue samples of 100 cases of gastric cancer, 50 cases of peritumoral tissues and 30 normal gastric tissues were detected by S-P immunohistochemistry; and Hp-L infection of the above tissues was calculated by Gram stain. **Results:** The LMVD was  $12.61 \pm 4.20$  per 100 visual field in the central area of the tumor; and the LMVD was  $31.20 \pm 3.73$  per 100 visual field in the peritumoral tissues, which was significantly higher than that in the central area of the tumor and the normal gastric tissues  $9.23 \pm 5.62$  per 100 visual field ( $P < 0.01$ ); the number of LMVD was significantly correlated with that of metastatic lymph nodes and Hp-L infection ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** The lymphatic microvessel density marked by monoclonal antibody D2-40 is correlated with Hp-L infection.

**[Key words]** stomach neoplasms; microvessel density; *helicobacter pylori*; L forms

胃癌严重威胁人类生命健康, 肿瘤的侵袭和转移是胃癌患者病死的重要原因之一, 胃癌早期以淋巴道转移为主, 淋巴道转移是决定胃癌预后的关键因素。目前, 新生淋巴管与胃癌淋巴转移的相关性研究越来越受到重视。D2-40 是新近发现的淋巴管内皮细胞特异性的标志物<sup>[1]</sup>, 其发现为深入淋巴管转移机制的研究提供了可能。幽门螺杆菌 L 型 (*helicobacter pylori* L-form, Hp-L 型) 是 Hp 的细胞壁缺陷型<sup>[2]</sup>, 即球形 Hp, 它与胃癌的发生密切相关<sup>[2]</sup>, 但与胃癌淋巴道转移之间关系的研究较少。

为此我们应用免疫组织化学及革兰染色等方法, 检测用 D2-40 标记的淋巴管密度 (lymphatic microvessel density, LMVD) 和 Hp-L 型感染的情况, 旨在探讨胃癌组织中 D2-40 标记的 LMVD 和 Hp-L 型感染的关系。

#### 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2007 年 1 月至 2008 年 6 月我科存档的 100 例胃癌手术切除的蜡块及相关临床病例资料, 患者术前未进行任何抗癌治疗。男 72 例, 女 28 例; 年龄 36 ~ 83 岁。高分化腺癌 9 例, 中分化腺癌 54 例, 低分化腺癌 37 例。随机取癌旁 (正常与癌交界处) 组织 50 例 (癌旁组), 切缘正常组织 30 例 (对照组)。所有标本经 10% 甲醛固定, 做 4  $\mu$ m 连续切片, 苏木精 - 伊红染色、革兰染色和免疫组织化学染色。

1.2 主要试剂 浓缩型鼠抗人 D2-40 单克隆抗体 (编号 ZM-0465), 即用型兔抗人 CD31 单克隆抗体

[收稿日期] 2010-04-15

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学研究重点资助项目 (KJ2007A098); 安徽省蚌埠市科技局自然科学研究资助项目 (200903023)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 病理科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 田 甜 (1982 -), 女, 硕士研究生 (现在南京金陵司法鉴定所工作)。

[通讯作者] 于东红, 硕士研究生导师, 教授。

(编号 MAB-0031), 均购自福州迈新生物技术开发有限公司; 兔抗人 Hp-L 型多克隆抗体, 由蚌埠医学院微生物学教研室制备。

### 1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色及结果判定 每例标本均应用 D2-40 单抗、CD31 单抗行免疫组织化学(S-P 法)染色, 其中 D2-40 工作浓度均为 1:100, CD31 为即用型。D2-40 另取扁桃体标本作为阳性对照; CD31 用已知阳性片作为对照; 两者均用 PBS 替代一抗为阴性对照。操作方法严格按照试剂说明书进行。结果判定: D2-40、CD31 表达阳性均为胞质和(或)胞膜有棕黄色颗粒样着色。其中 D2-40 标记于 CD31 表达阴性的淋巴管内皮细胞, 其管壁较薄且不规则, 管腔内无红细胞。分别对胃癌组织肿瘤边缘区(正常胃组织与肿瘤交界区)、中心区(实体肿瘤内部)及正常切缘组织进行微淋巴管计数。D2-40 标记 LMVD 参照 Ohno 等<sup>[3]</sup>方法进行计数, 在低倍镜下选取 LMVD 最高的区域, 然后在高倍镜下分别计数肿瘤中心及肿瘤边缘的微淋巴管数, 取 5 个不同视野的平均值作为该例的 LMVD 值。

1.3.2 Hp-L 型的检测及结果判定 组织切片脱蜡后进行革兰染色, 油镜下观察并计数; 每例随机观察 8~10 个不同视野, 取平均数。Hp-L 型菌数  $\geq 20$  个为阳性,  $< 20$  个或未查见则为阴性。Hp-L 型革兰染色若呈红色为革兰染色阴性; 若呈紫色则为革兰染色阳性。每例同时用抗 Hp-L 型抗体进行免疫组织化学染色(S-P 法), 一抗工作浓度为 1:90, 用已知 Hp-L 型阳性切片作为阳性对照, 用 PBS 替代一抗为阴性对照, 操作方法严格按照 S-P 试剂盒说明书进行。其阳性结果判定标准为: 胃癌细胞、正常胃

黏膜上皮细胞及间质巨噬细胞的胞质或胞膜着棕黄色细颗粒为 Hp-L 型抗原表达阳性。革兰染色 L 型检出和免疫组织化学 Hp-L 型抗原表达同时阳性者定为 Hp-L 型感染阳性。

1.4 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验、 $t$ (或  $t'$ ) 检验和  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 不同组织中微淋巴管的形态和分布特点 通过与 CD31 标记的微血管相比较发现, D2-40 单抗标记阳性脉管的特点是: 管壁薄无肌层, 形态不规则, 腔内无红细胞, 符合微淋巴管形态(见图 1)。在胃癌旁组织中 D2-40 标记阳性的微淋巴管数目较多且多为扩张状态, 管腔大小不一; 而在胃癌组织的中心区 D2-40 标记阳性的微淋巴管数量较少且多为细小腔隙或条形闭锁状(见图 2、3)。对照组 D2-40 标记阳性的微淋巴管分布稀疏且大都位于黏膜下层和浆膜层。癌旁组织的 LMVD 均显著高于胃癌组织中心区和对照组( $P < 0.01$ ), 而癌中心区 LMVD 也明显高于对照组( $P < 0.01$ )。有淋巴结转移的胃癌旁组织 LMVD 高于无淋巴结转移者( $P < 0.01$ )(见表 1、2)。

2.2 Hp-L 型的检测结果及分布 胃癌组、癌旁组中 Hp-L 型阳性率均高于对照组( $P < 0.05$ ), 胃癌组与癌旁组的 Hp-L 型阳性率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 3)。观察革兰染色切片发现, Hp-L 型大部分是革兰染色阴性, 呈圆球形, 可在癌巢、癌间质或黏膜层聚集成堆, 也可散在分布于其中, 也可见到 L 型黏附于癌细胞表面的现象(见图 4)。

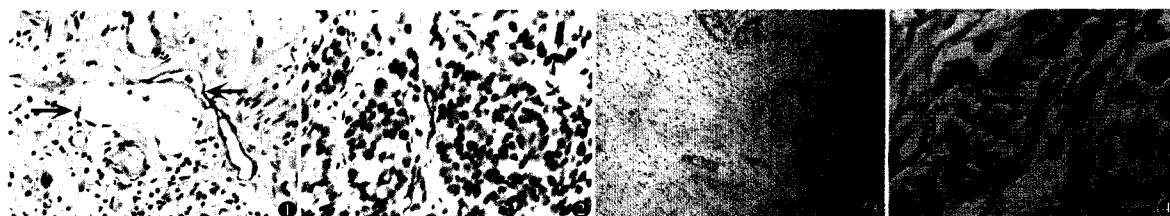


图 1 胃癌组织中 D2-40 表达阳性的微淋巴管(黑箭头)与微血管(内含红细胞)(红箭头)(S-P 法) 图 2 D2-40 在癌间质内表达(S-P 法)  
图 3 D2-40 在癌间质内的表达(S-P 法) 图 4 胃癌癌细胞间 Hp-L 型圆球体及原生小体(革兰染色)

表 1 不同组织中 D2-40 标记 LMVD 的检测结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	LMVD(个/100 倍视野)	F	P	MS <sub>组内</sub>
胃癌组	100	12.61 ± 4.20			
癌旁组	50	31.20 ± 3.73 **	365.55	<0.01	18.893
对照组	30	9.23 ± 5.62 ΔΔ			

$q$  检验: 与胃癌组比较 \* \*  $P < 0.01$ , 与癌旁组比较 Δ Δ  $P < 0.01$

表 2 胃癌淋巴结转移与癌旁组织 LMVD 的关系比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

淋巴结转移	n	LMVD	t	P
有	37	36.83 ± 2.42		
无	13	26.15 ± 2.35	13.79	<0.01

2.3 胃癌中 Hp-L 型感染与 LMVD 之间的关系 胃癌癌旁组 Hp-L 型阳性组的 LMVD 明显高于 Hp-L

型阴性组 ( $P < 0.01$ ); 而癌中心区 Hp-L 型阳性组与阴性组的 LMVD 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 4)。

表 3 不同组织中的 Hp-L 型的检测结果比较 ( $n$ )

分组	$n$	Hp-L 型		阳性率 (%)	$\chi^2$	$P$
		+	-			
胃癌组	100	67	33	67.0**		
癌旁组	50	29	21	58.0**	17.99	<0.01
对照组	30	7	23	23.3		

率的两两比较: 与对照组比较 \* \*  $P < 0.05$

表 4 胃癌中 Hp-L 型感染与 LMVD 值之间的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

Hp-L	$n$	癌中心区 LMVD	$n$	癌旁 LMVD
阴性	67	10.60 $\pm$ 3.04	29	28.28 $\pm$ 4.56
阳性	33	10.78 $\pm$ 2.11	21	37.87 $\pm$ 1.60
$t'$	—	0.34	—	10.47
$P$	—	>0.05	—	<0.01

### 3 讨论

肿瘤淋巴道转移机制与肿瘤新生淋巴管研究成为继血管生成机制研究的前沿领域。以往对肿瘤淋巴管生成的研究因为缺乏淋巴管内皮细胞的特异性标志物而相对滞后于肿瘤新生血管的研究。近年来, 由于淋巴管内皮细胞中特异性表达分子的被发现, 使得更准确、更简单地识别淋巴管成为可能。D2-40 是新近发现的一种相对分子质量为 40 000、能特异性标记肿瘤组织中淋巴管内皮细胞的单克隆抗体<sup>[4]</sup>。由 Marks 等<sup>[5]</sup>在 1999 年为研究胚胎睾丸精原细胞瘤中癌胚抗原 M2A 的特征和分布时制备而成, 当时发现它能够识别存在于胚胎睾丸生殖细胞肿瘤中一种相对分子质量为  $4 \times 10^4$  的糖蛋白, 且能够和石蜡包埋的组织反应。Fukunaga 等<sup>[6]</sup>在研究 D2-40 与 Kaposi 肉瘤、血管肉瘤的关系时发现, D2-40 可以检测出分布在淋巴管内皮细胞内的唾液糖蛋白携带的抗原决定簇, 是淋巴管内皮细胞的特异标记物。本研究结果显示, 由 D2-40 标记的微淋巴管具有一定的分布特点, 在癌旁组织中微淋巴管丰富且管腔较大, 在癌中心区仅能见到少量的裂隙状或条索状微淋巴管结构, 在正常组织中微淋巴管稀疏分布于黏膜下层和浆膜层。胃癌癌旁组织的 LMVD 均显著高于胃癌组织中心区和对照组 ( $P < 0.01$ ), 而癌中心区 LMVD 也明显高于正常切缘对照组 ( $P < 0.05$ ), 有淋巴结转移的胃癌组织 LMVD 也高于无淋巴结转移者 ( $P < 0.01$ ), 提示在肿瘤淋巴管转移中位于肿瘤边缘的新生淋巴管更为重要,

这一结果与文献<sup>[7-8]</sup>报道相符。Padera 等<sup>[9]</sup>发现, 虽然肿瘤内部的淋巴管呈塌陷状态或因充满肿瘤细胞而缺乏功能, 但是瘤体边缘的功能性淋巴管仍以引起淋巴转移。

Hp 是公认的胃癌重要的环境因子之一, 目前 WHO 已将 Hp 列入一级致癌因子。几乎所有细菌在不利于自身生长的环境下都不可避免地发生细胞壁的缺陷而形成相应的细菌 L 型, Hp 也不例外, 在胃液、胆汁、溶菌酶、抗生素、环境中氧浓度改变等条件下易发生细胞壁缺陷而形成 Hp-L 型<sup>[10]</sup>, 即它的变异型。Hp-L 型对环境抵抗力强, 对抗生素等具有较强的抵抗力<sup>[10]</sup>, 是 Hp 适应外界不良条件的一种自我保护形式。因此, Hp-L 型比 Hp 更具有潜伏性、侵袭性和难消除性。Hp-L 型由于细胞壁缺陷, 其表面电荷改变, 对宿主细胞表面的黏附性增强, 使其易于在宿主细胞内定植, 不断造成组织损伤, 引起慢性炎症。炎症时炎性细胞, 尤其是巨噬细胞, 产生包括血管内皮生长因子在内的一类血管生长因子以及炎症介质等多种因素可直接刺激血管内皮细胞和淋巴管内皮细胞增生, 诱导淋巴管生成。新生的微淋巴管由于发育不成熟, 管壁仅为了一层常有裂隙的内皮细胞, 缺乏基膜, 加上内皮细胞分泌的胶原降解酶、尿激酶和纤维蛋白酶原激活剂等, 使肿瘤细胞容易进入微淋巴管和穿透其邻近的基质和结缔组织包膜, 促进肿瘤的浸润和转移。此外, 肿瘤生长和淋巴组织增生, 对肿瘤间质压产生重大影响。间质压的增加, 也是肿瘤细胞侵入淋巴系统的一个重要因素。本实验结果显示, 癌旁组 Hp-L 型阳性组的 LMVD 明显高于 Hp-L 型阴性组 ( $P < 0.01$ ), Hp-L 型感染与 LMVD 显著相关, 表明 Hp-L 型可能通过炎症反应, 诱导淋巴管生成而增加胃癌侵袭和转移的机会。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Yang Q, Nakamura M, Nakamura Y, et al. Two-hit inactivation of FHIT by loss of heterozygosity and hypermethylation in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2890-2893.
- [2] 于东红, 罗彦丽, 王萍, 等. 幽门螺杆菌 L 型感染与胃癌血管形成的关系[J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20(5): 359-362.
- [3] Ohno M, Nakamura T, Kunimoto Y, et al. Lymphagenesis correlates with expression of vascular endothelial growth factor-C in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 939-943.
- [4] Roy S, Chu A, Trojanowaki JQ, et al. Brain expression and diagnostic utility of monoclonal antibody D2-40, a marker of lymphatic endothelium[J]. Am Assoc Neuropathol, 2004, 7: 24-27.
- [5] Marks A, Sutherland DR, Bailey D, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours[J]. Br J Cancer, 1999, 80(3/4): 569-578.

(下转第 1219 页)

表 3 4 组实验大鼠肝线粒体纹状体 GSH-PX 活性与 OH· 变化的比较 ( $n_i = 6; \bar{x} \pm s$ )

分组	OH· (U/mg pro)	GSH-PX(U)
对照组	170.36 ± 24.15	224.24 ± 15.01
MnCl <sub>2</sub>	262.42 ± 25.41**	107.94 ± 18.04**
Tau + MnCl <sub>2</sub>	181.58 ± 20.57 $\Delta\Delta$	147.10 ± 13.76 $\Delta\Delta$ *
CSA + MnCl <sub>2</sub>	231.18 ± 29.23 $\Delta\Delta$ *	187.93 ± 17.70 $\Delta\Delta$ *
F	17.77	57.71
P	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	626.62	263.342

q 检验:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 MnCl<sub>2</sub> 组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与 Tau + MnCl<sub>2</sub> 组比较 #  $P < 0.05$

细胞膜的稳定性<sup>[13]</sup>。目前临床上已将其用于治疗充血性心力衰竭、癫痫等疾病,用于治疗急慢性肝炎也被证明很有价值。Tau 可抑制细胞内钙离子超载升高,起到保护细胞的作用。细胞色素 C 被认为是细胞凋亡的重要启动促进剂,激发 caspases 的活化,引起细胞凋亡。Tau 参与膜主要成分磷脂代谢,保护膜磷脂免受降解,具有直接膜稳定作用,并调节膜对离子通透性<sup>[14]</sup>。作为一种安全可靠的细胞保护剂和抗氧化剂,在与自由基损伤有关疾病的防治上可能具有广阔的应用前景。Centonze 等<sup>[15]</sup>报道, Mn 通过过度激活皮质-纹状体通路神经元,引起兴奋性传递,导致纹状体神经元的兴奋性毒性。

本研究结果显示, Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体膜损伤有保护作用,大鼠单纯染 Mn 30 天后,与对照组比较线粒体膜肿胀度光密度降低, PT 孔、线粒体膜电位光密度明显降低, Tau + MnCl<sub>2</sub> 组 PT 孔、线粒体膜肿胀度、线粒体膜电位光密度升高, CSA + MnCl<sub>2</sub> 组 PT 孔、线粒体膜电位光密度明显升高,线粒体膜肿胀度光密度无明显变化。Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体呼吸链的影响可知, MnCl<sub>2</sub> 组纹状体 SDH 活性降低,细胞色素 C 含量升高; Tau 和 CSA 对 Mn 致大鼠肝线粒体氧化应激功能影响可知, MnCl<sub>2</sub> 组纹状体 GSH-PX 活性降低, OH· 含量升高。证实 Tau 能减轻 Mn 对线粒体的损伤,从而保护线粒体结构和功能的相对稳定;特异性抑制 PT 孔的开放、减轻 MPT 作用引起的细胞损伤可能是 CSA 发挥细胞保护性作用的重要机制;

CSA 可能是通过特异性地与 Cyclophilin D 结合抑制 PT 孔的开放,是目前发现的 PT 孔开放的最强有力的抑制剂<sup>[14]</sup>。

## [参 考 文 献]

- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Kalaiselvi P, et al. Combined effects of ammonia and manganese on astrocytes in culture[J]. *Neurochem Res*, 2004, 29(11): 2051-2056.
- Zhang S, Zhou Z, Fu J. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats[J]. *Environ Res*, 2003, 93(2): 149-157.
- 周玉宽. Tau 膜稳定作用的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 1997, 13(3): 277.
- 喻道军, 徐兆发, 王雨, 等.  $\alpha$ -硫辛酸和 Tau 对急性镉氧化损伤影响的实验研究[J]. *中国工业医学杂志*, 2005, 18(4): 199-201.
- Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38): 34793-34799.
- Clark JB. The metabolism of rat brain mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 1970, 245(18): 4724-4731.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- 钱涛, 高维娟, 丛斌, 等. 益肾降浊汤对小鼠脑缺血再灌注后线粒体功能的改善作用[J]. *山东医药*, 2005, 45(10): 16-18.
- Kristal BS, Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(33): 23169-23175.
- Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver-mitochondrial spectral and metabolic properties[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 850(3): 436-448.
- 陈月开, 黄登宇, 强玉丰, 等. 细胞色素 C 的快速测定研究[J]. *山西大学学报*, 2003, 26(1): 64-66.
- 沈立, 沈伏, 薛雅静, 等. 杏花雨对外源性高钙致大鼠脑线粒体损伤的保护作用[J]. *河北医药*, 2006(4): 249-251.
- 葛健, 项行, 徐建敏, 等. 不同浓度牛磺酸对兔角膜内皮细胞的影响[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2009, 29(7): 825-827.
- 秦建伟, 别平, 朱瑾. 环孢素 A 对大鼠肝脏缺血再灌注后线粒体细胞色素 C 释放及肝细胞凋亡的影响[J]. *消化外科*, 2005, 4(6): 416-420.
- Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, et al. Impaired excitatory transmission in the striatum of rats chronically intoxicated with manganese[J]. *Exp Neurol*, 2001, 172(2): 469-476.
- 其临床病理意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(7): 512-523.
- Padera TP, Kadambi A, Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intra tumor lymphatics[J]. *Science*, 2008, 296: 1883-1886.
- 雷平光, 罗彦丽, 于东红, 等. 胃癌幽门螺杆菌 L 型感染与血管内皮生长因子表达及血管形成的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2009, 31(2): 126-127.

(上接第 1216 页)

- Fukunaga M. Expression of D2-40 in lymphatic endothelium of normal tissues and in vascular tumours[J]. *Histopathology*, 2005, 46(4): 396-402.
- 张梅娟, 张丽华. 免疫标记物 D2-40 在病理诊断中应用和意义[J]. *诊断学理论与实践*, 2007, 6(3): 277-280.
- 孙微, 周晓军, 马恒辉, 等. 胃腺癌组织中微淋巴管密度的检测及