

文章编号: 1674-8085(2016)03-0087-06

微血管密度与血管内皮生长因子受体-3 在骨髓增生异常综合征患者中的表达及意义

曾俊权¹, 郑永亮¹, *石庆之²

(1. 井冈山大学附属医院, 江西, 吉安 343000; 2. 南昌大学第二附属医院, 江西, 南昌 330003)

摘要:目的 检测骨髓增生异常综合征患者骨髓中微血管密度和血管内皮生长因子受体-3 表达水平并探讨其临床意义。方法 采用免疫组织化学染色检测 54 例骨髓增生异常综合征患者、20 例非恶性血液病患者对照组骨髓组织中微血管密度和血管内皮生长因子受体-3 表达水平, 采用蛋白质印迹法检测上述研究对象骨髓单个核细胞中血管内皮生长因子受体-3 蛋白表达水平, 分析其与临床特征的相关性。结果 骨髓增生异常综合征患者骨髓组织中微血管密度和血管内皮生长因子受体-3 表达水平明显高于非恶性血液病对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而骨髓增生异常综合征低危组、中危组及高危组中微血管密度与血管内皮生长因子受体-3 的表达水平无显著差异 ($P > 0.05$), 经相关性分析微血管密度和血管内皮生长因子受体-3 在骨髓增生异常综合征患者骨髓中表达呈正相关关系。结论 骨髓增生异常综合征患者骨髓存在明显血管新生及血管内皮生长因子受体-3 高表达, 其表达水平可能参与骨髓增生异常综合征发病、发展等过程, 并可能影响骨髓增生异常综合征预后, 通过检测微血管密度和血管内皮生长因子受体-3 的表达可为临床抗血管新生方法治疗骨髓增生异常综合征提供实验依据。

关键词: 骨髓增生异常综合征; 微血管密度; 血管内皮生长因子受体-3

中图分类号: R733.3

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2016.03.017

MICROVESSEL DENSITY AND EXPRESSION OF VEGFR-3 IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROMES AND ITS SIGNIFICANCE

ZENG Jun-quan¹, ZHENG Yong-liang¹, *SHI Qing-zhi²

(1. Affiliated Hospital, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343000, China;

2. The Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract Objective: To investigate the level of MVD and exoression level of VEGFR-3 in the patients with MDS, and to explore the clinical significance. **Methods:** The pathologic specimens of the myeloid tissues were collected from 54 patients with MDS and 20 patients with non-hematologic malignancies, and were processed for routine paraffin embedding. The levels of MVD and the expression of VEGFR-3 were determined by the method of IHC and Western blotting. The correlations between MVD and VEGFR-3, and with clinic characteristics were analyzed. **Results:** The levels of MVD and VEGFR-3 in the patients with MDS were much higher than those in control group ($P < 0.05$). A positive correlation between MVD and VEGFR-3 in the patients with MDS was found. **Conclusion:** Angiogenesis and high expression of VEGFR-3 were founded in the MDS patients. VEGFR-3 may participate in the occurrence progress and prognosis of MDS. Determining the MVD and the expression of VEGFR-3 may provide experimental evidence for anti-angiogenic therapy.

收稿日期: 2016-01-16; 修改日期: 2016-04-02

基金项目: 江西省教育厅科技计划项目(GJJ150765); 江西省卫计委科技计划项目(20165391); 井冈山大学自然科学基金项目(JZ100015)

作者简介: 曾俊权(1981-), 男, 江西吉水人, 主治医师, 讲师, 硕士, 主要从事血液病学诊断及治疗研究(E-mail:commandozjq@tom.com);

郑永亮(1989-), 男, 江西余干人, 医师, 硕士, 主要从事血液病学诊断及治疗研究(E-mail:commandozjq@tom.com);

*石庆之(1957-), 女, 江西南昌人, 教授, 主任医师, 主要从事血液肿瘤、贫血性疾病诊断及治疗研究(E-mail:qingzhis@sohu.com).

Key words: myelodysplastic syndromes; microvessel density; VEGFR-3

骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 是一组造血异常的异质性疾病, 多发于老年人, 总体发病率约4/10万, 但在70岁以上人群中发病率上升至30/10万以上。目前认为造成MDS患者血液学异常的病理过程包括以下两方面: (1)过强的细胞凋亡导致无效造血及外周血细胞减少; (2)转变成急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)。虽然这些病理过程之间的确切关系尚不明确, 但了解其中关系对设计针对其中之一或二者都包括的治疗新策略具有重要意义^[1]。当前, MDS患者骨髓生长环境与其预后之间关系已成为研究热点。本研究采用免疫组化法检测MDS患者骨髓活组织切片中微血管密度 (microvessel density, MVD) 和血管内皮生长因子受体-3 (Vascular endothelial growth factor receptor -3, VEGFR-3) 的表达水平, 采用蛋白质印迹法检测骨髓单个核细胞中VEGFR-3蛋白表达水平, 分析其表达水平与MDS发生、发展及预后之间的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

所有纳入研究对象选自2006年9月~2013年10月期间在井冈山大学附属医院血液科住院的54例MDS患者, 对照组选取同期住院的20例非恶性血液病患者 (缺铁性贫血13例, 巨幼细胞性贫血7例)。骨髓增生异常综合征根据张之南主编2007版《血液病诊断及疗效标准》进行诊断。54例MDS患者均为初发, 其中低危组14例, 中危组23例, 高危组17例; 男31例, 女23例; 年龄47~73岁, 平均年龄为 (54.7 ± 18.5) 岁。对照组: 男8例, 女12例; 年龄28~70岁, 平均年龄为 (58.2 ± 16.7) 岁。本研究经过我院伦理道德委员会的批准, 所有参与对象均提供书面知情同意书。

1.2 MDS预后分组标准

根据国际预后评分系统 (IPSS) 进行危险度评估, 危险度根据原始细胞百分比、血细胞减少的系别数和骨髓的细胞遗传学特征进行分级。低危组0分; 中危组-1 0.5~1分; 中危组-2 1.5~2.0分; 高

危组 ≥ 2.5分。

1.3 标本采集、制备

常规消毒铺巾, 在2%利多卡因局部麻醉下, 于髂后上棘进行穿刺抽取骨髓液5 mL进行密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞, 同时获取试验组和对照组的骨髓组织1~1.5 cm, 立即用4%多聚甲醛进行固定、再经脱钙处理后, 常规石蜡包埋、切片, 切片厚度4 μm, 贴于APES胶处理的载玻片上待用。

1.4 IHC法检测骨髓组织vWF和VEGFR-3表达

人血管性血友病 (von willebrand factor, vWF) 相关抗原抗体、VEGFR-3多抗、兔抗人抗体及正常山羊血清购自北京中杉金桥生物技术有限公司, EnVision免疫组化试剂盒购自Dako公司, APES胶为Sigma公司产品。vWF和VEGFR-3表达水平检测采用免疫组化二步法染色, 按试剂盒说明书步骤进行操作。

1.5 IHC染色结果判断

MVD采用vWF表达进行表示, 其定位于内皮细胞的胞质, 阳性染色为棕褐色颗粒样着色。参照Igreja C等^[2]研究进行MVD计数, 结构清晰可辨的被染成棕褐色阳性的内皮细胞或内皮细胞簇可作为一个能计数的微血管。VEGFR-3阳性染色定位于包括瘤细胞和内皮细胞的胞质中, 也为呈棕褐色颗粒样着色。上述检测由二位经验丰富的病理科专家进行判定, 先低倍视野(×100)定位, 后高倍视野(×400)计数, 取中位值。

1.6 Western blot检测骨髓单个核细胞VEGFR-3蛋白表达

取分离好的骨髓单个核细胞, RIPA与PMSF混合液裂解细胞30 min, 4℃, 12000×g离心15 min取上清为细胞总蛋白; 采用BCA法进行蛋白定量; 取50 μg蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以预染蛋白分子量标准为标记切胶, 随后进行转膜, 5%脱脂奶粉封闭后相继孵育一抗和二抗, 最后在暗室曝光并在紫外灯下进行照片和灰度值扫描。

1.7 随访

研究对象出院后, 通过复诊 (如患者在外院就医则通过电话随访方式), 对患者的生存质量及血生化结果及骨髓检查结果等内容进行随访, 随访过

程中如果患者死亡则自动中止随访，随访截止时间至2013年10月。

1.8 统计学处理

采用SPSS14.0统计软件进行数据分析，计数资料采用非参数Mann-Whitney和Krusal-Wallis统计方法，相关性分析采用Spearman秩相关检验，Ksplan-Meier法进行生存性分析，检验水准以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 研究对象一般性治疗比较

表1 实验组与对照组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 General data of the experimental groups and control group

IPSS	MDS低危组	MDS中危组	MDS高危组	对照组
男/女(例)	7/7	13/10	11/6	8/12
年龄(岁)	53.3 ± 14.9	57.6 ± 21.3	61.5 ± 17.7	58.2 ± 16.7
原始非红比<5%(例)	4	2	0	20
原始非红比5~10%(例)	8	13	2	0
原始非红比11~20%(例)	2	8	15	0
核型 好(例)	10	18	7	20
核型 中(例)	4	5	5	0
核型 差(例)	0	0	5	0
血细胞减少0或1系(例)	9	8	2	20
血细胞减少2或3系(例)	5	15	15	0

注：MDS组一般资料比较， $P > 0.05$ ，与对照组比较 $P < 0.05$

2.2 IHC法检测MVD的表达及MVD计数

在光学显微镜下，vWF 抗体标记的内皮细胞胞浆呈棕黄色。在 MDS 患者骨髓标本中微血管数量增加，微血管腔隙大小不等或无腔隙。而在正常对照标本中，微血管稀少(图 1d)。在 MDS 低危组(图 1a)、中危组(图 1b)及高危组(图 1c)中 vWF 抗体表达阳性细胞并无显著差异。采取高倍镜下每个视野数取 vWF 表达阳性细胞对 MVD 进行计数，分别随机选取 5 个不同的视野进行统计，MDS 低危组 MVD 数 (18.77 ± 7.47)，中危组为 (18.98 ± 5.38)，高危组为 (19.45 ± 7.26)，与对照组 (10.52 ± 4.36) 比较均具有统计学差异 ($P < 0.05$)；而分别对 MDS 低危组、

根据纳入研究对象住院病例资料及实验室检查结果获得如下一般资料，根据国际预后评分系统 (IPSS) 进行危险度评估，危险度根据原始细胞百分比、血细胞减少的系别数和骨髓的细胞遗传学特征进行分级。低危组0分；中危组0.5~2.0分；高危组 ≥ 2.5 分。年龄比较采用两个独立样本t检验方式进行统计，其余比较采用卡方检验进行统计，经 SPSS 18.0统计软件分析，MDS组与对照组性别、年龄 ($P > 0.05$)，骨髓原始细胞比例、核型及血细胞减少系数之间比较有统计学意义 ($P < 0.05$)；而 MDS低危组、中危组及高危组一般资料比较均无显著性差异 ($P > 0.05$) (结果见表1)。

中危组及高危组进行比较并未见三组之间有显著差异 ($P > 0.05$)。

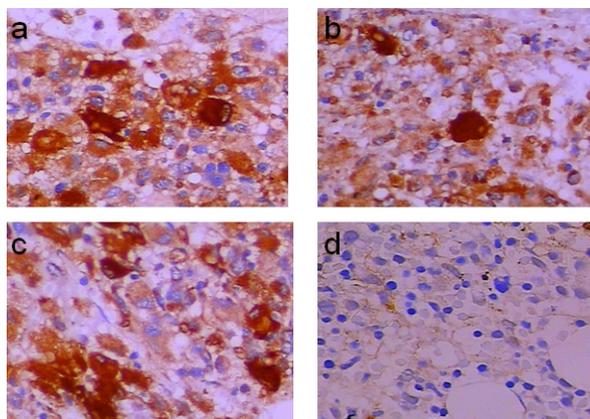


图1 vWF标记的骨髓微血管免疫组化图

Fig.1 vWF markers of MVD immunohistochemistry

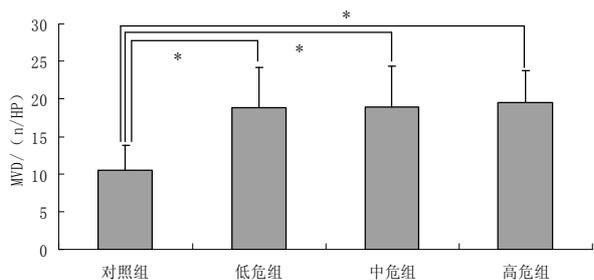


图2 MDS组及对照组MVD计数比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$
Fig.2 MVD count in MDS groups and control group

2.3 IHC法检测VEGFR-3表达

VEGFR-3的表达主要分布于MDS患者及对照的骨髓原始细胞、早幼粒细胞、中幼粒细胞、单核细胞及部分成红细胞、淋巴样细胞及浆细胞的细胞胞浆中。14例MDS低危组患者中VEGFR-3表达阳性者10例,阳性率为71.43%; 23例中危患者中16例患者VEGFR-3表达阳性,阳性率为69.57%; 17例高危患者有12例表达阳性,阳性率为70.59%;卡方检验显示与对照组(图3)20%的阳性率比较均具有统计学差异($P < 0.05$)。VEGFR-3在MDS低危组(图3a)、中危组(图3b)及高危组(图3c)中表达并无显著差异($P > 0.05$)。

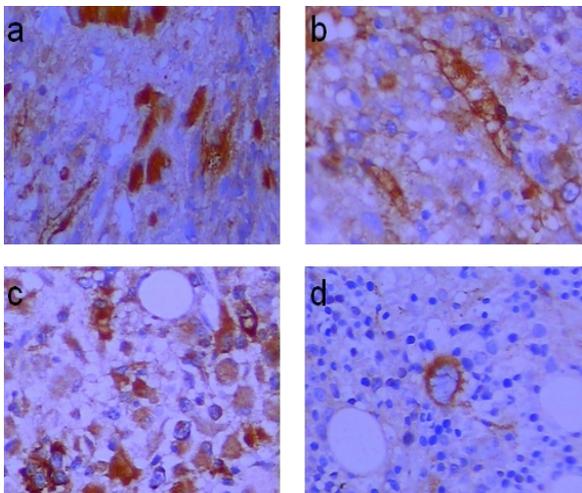


图3 VEGFR-3免疫组化图
Fig.3 VEGFR-3 immunohistochemical map

2.4 Western blot检测VEGFR-3蛋白表达

MDS患者骨髓单个核细胞中VEGFR-3蛋白表达水平显著高于非恶性血液病对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);低危组MDS、中危组MDS及高危组MDS患者骨髓单个核细胞中的VEGFR-3蛋白表达水平无显著性差异($P > 0.05$)。

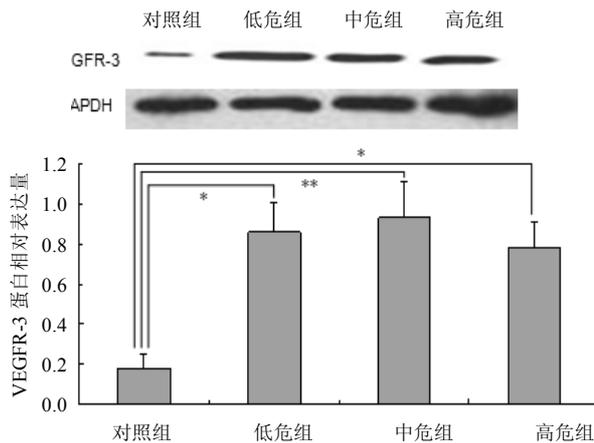


图4 骨髓单个核细胞VEGFR-3蛋白表达水平
(上图为Western blot产物条带,下图为灰度扫描后定量分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图4 骨髓单个核细胞VEGFR-3蛋白表达水平
Fig.4 The expression level of VEGFR-3 protein in bone marrow mononuclear cells

2.5 VEGFR-3的表达与MVD的相关性

54例MDS患者中,VEGFR-3表达阳性患者38例、阴性16例,VEGFR-3表达阳性患者与阴性患者之间MVD计数差异具有统计学意义($P < 0.005$),经Spearman秩相关检验,MVD和VEGFR-3的表达呈正相关关系,相关系数为($r = 0.276, p = 0.044$)。MVD和VEGFR-3相关性分析散点图(结果见图5)。

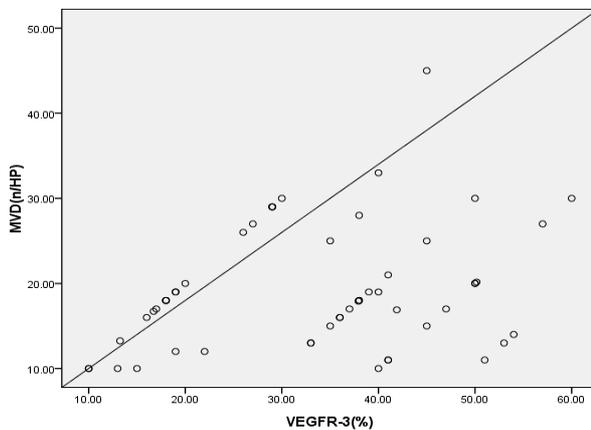


图5 MVD和VEGFR-3相关性分析散点图
Fig.5 MVD and VEGFR-3 correlation analysis scatter diagram

2.6 VEGFR-3、MVD的表达与MDS患者预后之间的关系

54例MDS患者中,可随访病例48例(88.89%),6例失访,随访截止时间为2013年10月,随访时间为5~85月,中位随访时间为28月。48例可随访患者中VEGFR-3表达阳性患者32例、阴性16例,VEGFR-3表达阳性患者总生存时间(23.19 ± 17.02)

月, 与VEGFR-3表达阴性患者(39.56 ± 27.01)月相比较, 差异具有统计学意义($P = 0.038$); MVD计数 >20个/HP患者35例, 总生存时间(24.49 ± 18.40)月与MVD ≤ 20个/HP患者13例(41.15 ± 26.17)月之间比较, 差异具有统计学意义($P = 0.017$)。

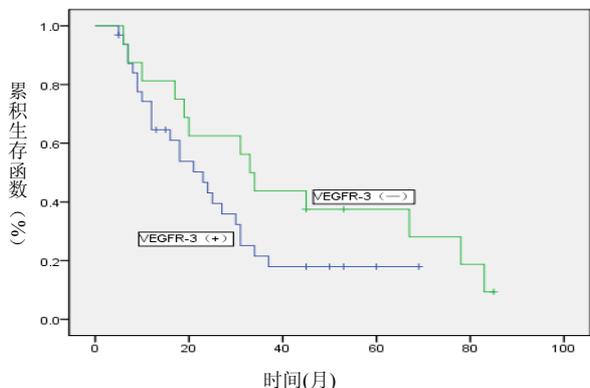


图6 VEGFR-3表达阳性及阴性MDS患者总生存期比较 ($P < 0.05$)

Fig.6 VEGFR-3 positive and negative MDS patients overall survival comparison

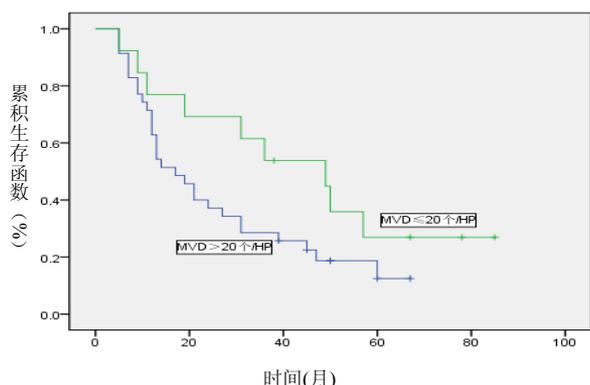


图7 MVD>20个/HP与MVD≤20个/HP的MDS患者总生存期比较($P<0.05$)

Fig.7 MVD>20/HP and MVD ≤ 20/HP MDS patients overall survival comparison

3 讨论

肿瘤血管生成被认为在肿瘤的发生和进展中起到重要作用, 已有新的证据表明在血液恶性肿瘤中, 微血管密度和血管内皮生长因子的表达增加, 它们通过激活血管内皮生长因子受体1及受体2而促进恶性血液病的进展^[3]。近年来对淋巴管发生的分子机制以及在正常和疾病状态下淋巴管生成的研究已获得了一些新认识, 关键应归结于淋巴管生成因子 VEGF-C 和 VEGF-D 及其受体 VEGFR-3

以及淋巴管特异性分子标志物的发现, 已成为继肿瘤血管生成后所开辟的又一肿瘤脉管研究的领域^[4]。国内外多个研究已证实, MVD 与 VEGFR 高表达于多种肿瘤, 包括口腔鳞状细胞癌^[5]、肝癌^[6]、大肠癌^[7]以及白血病^[8]等。亦有证据表明通过抑制 VEGF 及其受体的表达, 减少 MVD 在抗白血病等血液恶性肿瘤治疗中的作用至关重要^[9]。MVD 是检测肿瘤血管生成的指标, 可用于衡量肿瘤血管生成的活跃度^[6]。VEGFR-3 是第一个被发现的淋巴管特异性生长因子受体, 它在人体中几乎只表达于淋巴管内皮细胞。早在 2004 年 Bairey 等便发现, 初治慢性淋巴细胞白血病患者中 VEGFR-3 表达阳性率高达 96%, 并且通过长期随访发现 VEGFR-3 的表达与慢性淋巴细胞白血病患者的临床分期、疗效和预后均密切相关^[10]。此后, Klasa-Mazurkiewicz 等^[11]研究也证实上述观点, 他们研究发现 VEGFR-3 在卵巢肿瘤中的表达显著高于非肿瘤组织, 并且其表达水平与肿瘤进展程度呈正相关关系, 故而推测 VEGFR-3 可用于衡量肿瘤转移程度。

本研究发现, 在 MDS 患者骨髓组织中存在明显血管新生及 VEGFR-3 的过表达, 并且通过相关性分析发现 MVD 与 VEGFR-3 表达水平呈正相关。通过长期随访及观察发现, MVD 及 VEGFR-3 的表达水平与 MDS 患者预后密切相关, 但并未发现 MVD 及 VEGFR-3 的表达水平与 MDS 患者危险度分级有相关性。综上所述, 本研究结果表明 MVD 和 VEGFR-3 表达水平与 MDS 发生、发展及预后均有相关性, 其检测为临床应用抗脉管新生方法治疗 MDS 提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 陈鑫基, 胡建达. 成人骨髓增生异常综合征诊断和治疗指南[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 2004, 27(3): 193-199.
- [2] Igreja C, Courinha M, Cachaço A S, et al. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients[J]. Haematologica, 2007, 92(4): 469-477.
- [3] Medinger P D D M, Passweg J. Angiogenesis in myeloproliferative neoplasms, new markers and future directions[J]. memo-Magazine of European Medical Oncology, 2014, 7(4): 206-210.

- [4] Saharinen P, Petrova T V. Molecular regulation of lymphangiogenesis[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, 1014(1): 76-87.
- [5] Li C, Fan J, Song X, et al. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor receptor-3 correlates with lymphangiogenesis and angiogenesis and affects survival of oral squamous cell carcinoma[J]. *PloS one*, 2013, 8(9): 75388.
- [6] Zhuang P Y, Shen J, Zhu X D, et al. Prognostic Roles of Cross-Talk between Peritumoral Hepatocytes and Stromal Cells in Hepatocellular Carcinoma Involving Peritumoral VEGF-C, VEGFR-1 and VEGFR-3[J]. *PloS one*, 2013, 8(5): 64598.
- [7] 刘新兰,段瑜,魏建敏. VEGFR-2, MVD 在大肠癌组织的表达及其临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(5): 1059-1062.
- [8] Song G, Li Y, Jiang G. Role of VEGF/VEGFR in the pathogenesis of leukemias and as treatment targets (Review)[J]. *Oncology reports*, 2012, 28(6): 1935-1944.
- [9] 翟欣辉,魏绪仓,王一,等. 沙利度胺治疗急性白血病的临床疗效及抗血管形成的观察[J]. *实用医学杂志*, 2012, 27(23): 4277-4279.
- [10] Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, et al. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells[J]. *Leukemia research*, 2004, 28(3): 243-248.
- [11] Klasa-Mazurkiewicz D, Jarzab M, Milczek T, et al. Clinical significance of VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in ovarian cancer patients[J]. *Pol J Pathol*, 2011, 62(1): 31-40.