

食管鳞癌预后因素的病理学和免疫组织化学研究

R735.102

王永康 陈景寒[△] 孟龙 刘静 杜德利 邹烨

【摘要】 目的 探讨食管癌组织病理学特征和免疫蛋白表达的预后价值。方法 检测 97 例原发性食管鳞癌手术切除标本,对肿瘤组织病理学特征和免疫蛋白表达与患者生存期的关系进行单因素 Kaplan Meier 分析和多因素 Cox 分析。结果 单因素 Kaplan Meier 分析显示:低分化肿瘤、浸润性生长、肿瘤侵犯外膜、间质无淋巴细胞浸润、淋巴结转移、高 TNM 分期、表皮生长因子受体(EGFR)阳性表达和 nm23 阴性表达与患者生存率降低有关(Log-rank 检验, P 值均小于 0.05)。多因素 Cox 分析显示:肿瘤生长方式($RR = 2.000$)、淋巴细胞浸润的程度($RR = 0.509$)、TNM 分期($RR = 1.733$)、EGFR 表达($RR = 1.812$)和 c-erbB-2 表达($RR = 2.364$)是影响预后的主要因素($P < 0.05$)。结论 在食管鳞癌中,肿瘤生长方式、淋巴细胞浸润的程度、EGFR 和 c-erbB-2 蛋白表达同 TNM 分期一样具有独立的预后价值。综合分析这些指标有助于识别肿瘤不同的生物学特性和准确判断患者的预后。

【关键词】 食管肿瘤; 癌; 鳞状细胞; 预后; 免疫组织化学

食管鳞癌 病理学

A histopathologic and immunohistochemical study of prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma WANG Yongkang, CHEN Jinghan, MENG Long, LIU Jing, DU Deli, ZOU Ye. Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the prognostic value of various histopathological features and expression of immuno-phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** The tumor samples from 97 primary ESCC patients with potentially curative resection were evaluated for the following parameters: tumor size, grade of differentiation, pattern of invasion, depth of invasion, degree of lymphocyte infiltration, lymph node metastasis, TNM stage and p53, EGFR, c-erbB-2, nm23, cathepsin D protein expression. The prognostic impact of these parameters were analyzed by univariate and multivariate survival analyses. **Results** In the univariate Kaplan Meier analysis, poor differentiation, infiltrating growth pattern, invasion reaching adventitia, absent lymphocytic infiltration, lymph node metastasis, high staging, EGFR positive expression and nm23 negative expression were all associated with lower survival rate(Log-rank test, $P < 0.05$, respectively). However, the multivariate Cox analysis demonstrated that only pattern of invasion($RR = 2.000$), degree of lymphocyte infiltration($RR = 0.509$), TNM stage($RR = 1.733$), EGFR expression($RR = 1.812$) and c-erbB-2 expression($RR = 2.364$) were significant prognostic factors($P < 0.05$, respectively). **Conclusion** For ESCC, the pattern of invasion, degree of lymphocyte infiltration, EGFR and c-erbB-2 protein expression had independent prognostic values as well as the TNM stage. Comprehensive analysis of these parameters can be helpful to identify biological behavior of ESCC and predict more accurately the prognosis of patients with ESCC.

【Key words】 Esophageal neoplasms; Carcinoma, squamous cell; Prognosis; Immunohistochemistry

判断患者的预后是术后病理学检查的主要目的之一。根据肿瘤的大小、浸润深度、淋巴结转移和远处转移的情况所制定的 TNM 分期是最主要的预后指标^[1]。但 TNM 分期并不完善,尚不能反映同一 TNM 期别的不同患者预后之间存在的差异。这种差异在很大程度上取决于肿瘤不同的生物学特性和机体的免疫功能^[2,3]。我们通过对具有 5 年以上随

访记录的 97 例食管鳞癌组织病理学和免疫组织化学的综合分析,探讨肿瘤组织病理学特征和免疫蛋白表达的预后价值。

材料与方法

1. 材料:收集本院病理科 1987 ~ 1992 年间外检档案中,经肿瘤根治术加区域淋巴结切除的原发性食管鳞癌 126 例。患者术前均未接受放疗或化疗。删除术后非肿瘤原因死亡和无完整随访记录者,共 97 例纳入本研究。男性 75 例,女性 22 例。平均年

作者单位:250021 济南,山东省立医院病理科(王永康、杜德利、邹烨)、胸外科(陈景寒、孟龙);山东医科大学统计学教研室(刘静)

龄 53.7 岁(30~76 岁)。生存期计算至患者死亡或未次随访日期(1998 年 5 月),生存中位数 44.3 个月(7~108 个月)。

2. 方法:所有切片经 2 名有经验的病理科医生,在不知随访结果条件下分别对各项指标进行光镜下观察。肿瘤组织学分级采用 1986 年 WHO 分级标准,肿瘤生长方式的分型和间质淋巴细胞浸润程度的分级参照文献[2],稍加修改。肿瘤分期依照 1987 年国际抗癌联盟 TNM 分期标准。免疫组织化学采用 4 μm 厚连续石蜡切片,SP 法染色。鼠抗 p53 抗体、兔抗 c-erbB-2 抗体和兔抗组织蛋白酶 D 抗体为丹麦 DAKO 公司产品,兔抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,兔抗 nm23 抗体为美国 Oncogene Science 公司产品。SP 免疫组织化学试剂盒为美国 Maxim 公司产品。按说明书进行操作,每次实验均设阳性及阴性对照。选择 10 个具有代表性的高倍视野,计数免疫染色标记定位准确的阳性细胞占肿瘤细胞的比例:p53、EGFR、c-erbB-2 阳性细胞 > 10%,nm23、组织蛋白酶 D 阳性细

胞 > 30% 为阳性诊断标准。

3. 统计学处理:各项参数经数量化处理后输入计算机,用 SAS 6.11 统计软件进行统计学处理。各因素之间的相互关系采用 Spearman 等级相关分析;单因素生存率分析采用 Kaplan Meier 法,差异性检验采用 Log-rank 法;多因素分析采用 Cox 比例风险模型。

结 果

1. 肿瘤组织病理学参数和免疫蛋白表达各因素之间的相互关系:97 例食管鳞癌的组织病理学检查结果和免疫蛋白表达情况分别见表 1 和图 1~5。各项观察指标之间的等级相关分析显示:肿瘤的生长方式与分化程度($r_s = 0.328, P = 0.001$)、浸润深度($r_s = 0.339, P = 0.0001$)、淋巴结转移($r_s = 0.337, P = 0.0007$)呈正相关;与淋巴细胞浸润($r_s = -0.356, P = 0.0003$)和 nm23 表达($r_s = -0.3215, P = 0.0013$)呈负相关。间质淋巴细胞浸润的程度与肿瘤分化程度($r_s = -0.275, P = 0.0065$)、浸

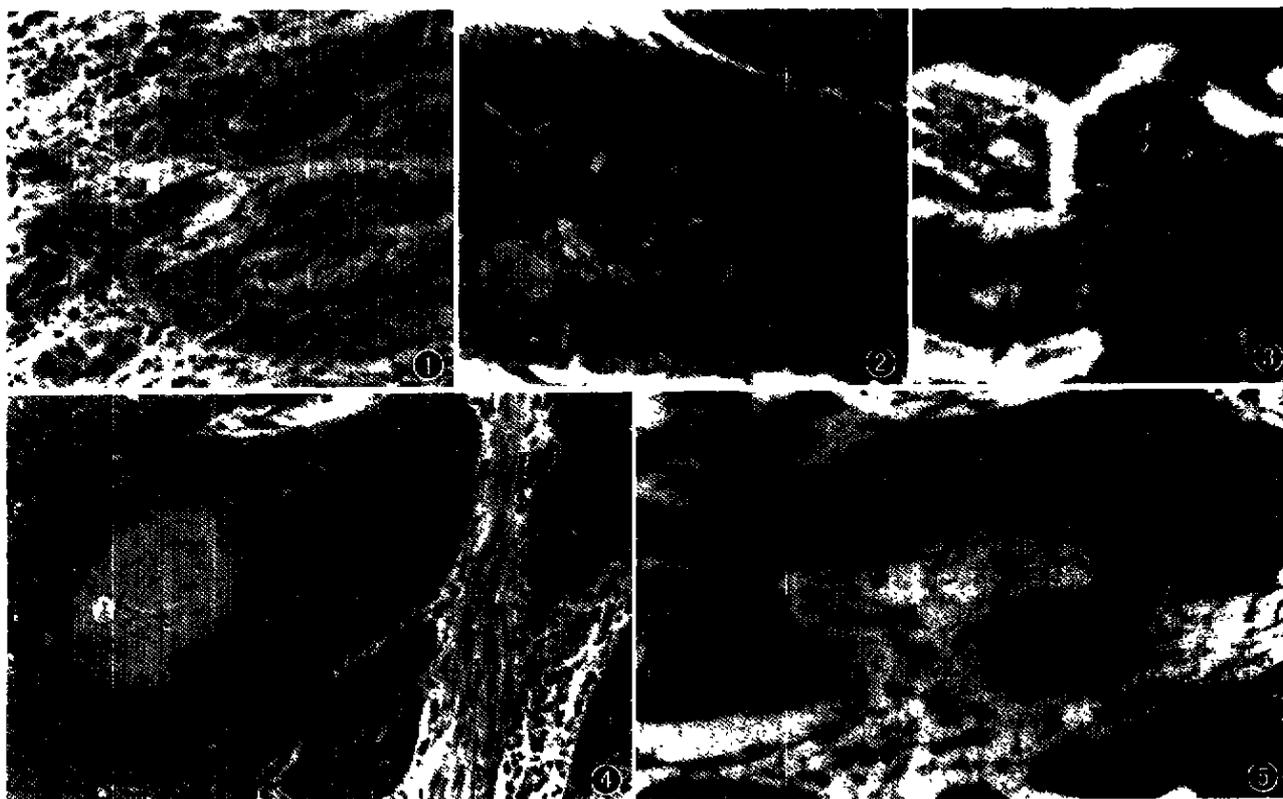


图 1 食管鳞癌,Ⅲ级,肿瘤呈索状及弥散性浸润性生长,肿瘤细胞核 p53 阳性表达 SP 法 $\times 100$ 图 2 食管鳞癌,Ⅰ级,肿瘤呈团块状膨胀型生长,肿瘤细胞膜及部分胞质 EGFR 阳性表达 SP 法 $\times 200$ 图 3 食管鳞癌,Ⅲ级,肿瘤呈片状及索状混合型生长,肿瘤细胞膜 c-erbB-2 阳性表达 SP 法 $\times 200$ 图 4 食管鳞癌,Ⅱ级,肿瘤呈小片状及巢状混合型生长,胞质 nm23 阳性表达,瘤巢中央角化区 nm23 阴性表达 SP 法 $\times 200$ 图 5 食管鳞癌,Ⅱ级,肿瘤呈索状及小巢状混合型生长,肿瘤细胞质组织蛋白酶 D 阳性表达 SP 法 $\times 200$

润深度($r_s = -0.307, P = 0.0022$)、淋巴结转移($r_s = -0.396, P = 0.0001$)呈负相关。TNM 分期增高与肿瘤直径($r_s = 0.277, P = 0.006$)、生长方式($r_s = 0.374, P = 0.0003$)、p53($r_s = 0.378, P = 0.0001$)、c-erbB-2($r_s = 0.4765, P = 0.0001$)和组织蛋白酶 D 表达($r_s = 0.313, P = 0.0018$)呈正相关;与淋巴细胞浸润($r_s = -0.4636, P = 0.0001$)和 nm23 表达($r_s = -0.672, P = 0.0001$)呈负相关。

EGFR 表达与其他因素之间未见明显相关性。

2. 各种因素与患者术后生存期的关系: 单因素分析结果显示(表 1), 肿瘤分化程度低, 浸润型生长, 侵及外膜, 无淋巴细胞浸润, 淋巴结转移, TNM 分期高, EGFR 阳性表达和 nm23 阴性表达与患者术后的生存率降低有关。随着组织蛋白酶 D 阳性表达率的增高患者生存率也有降低的趋势, 但未见明显的统计学意义($P = 0.063$)。

表 1 组织病理学特征和免疫蛋白表达与食管癌患者生存期关系的单因素分析结果

变量及分级	例数	食管癌生存率(%), $\bar{x} \pm s_x$		生存期中位数 (月)	χ^2 值	P 值
		2 年	5 年			
肿瘤直径(cm)						
<3	23	78.3±8.6	41.9±10.5	51	2.470	0.291
3~5	40	84.7±5.8	32.8±8.1	37		
>5	34	69.3±8.1	32.0±8.6	29		
分化程度						
I 级	18	83.3±8.8	35.3±12.0	49	7.434	0.024
II 级	52	76.7±5.9	43.6±7.1	45		
III 级	27	72.0±9.0	4.2±7.5	29		
生长方式						
膨胀性	23	91.3±5.9	64.7±10.1	72	30.340	0.0001
混合性	27	82.1±8.1	46.2±10.8	61		
浸润性	47	66.0±6.9	9.6±5.0	28		
浸润深度						
肌层以下	43	83.7±5.6	48.0±7.7	61	5.717	0.017
超过肌层	54	72.9±6.2	25.1±6.7	32		
淋巴细胞浸润						
无	63	68.3±5.9	17.4±5.2	29	29.420	0.0001
轻度	19	90.6±8.3	64.2±13.1	84		
重度	15	100.0	73.3±11.4	84		
淋巴结转移						
无	41	85.0±5.7	60.9±8.0	67	14.418	0.007
有	56	66.2±7.6	20.2±6.8	28		
TNM 分期						
I + II a 期	41	85.0±5.7	60.9±8.0	67	20.611	0.0001
II b + III 期	42	72.9±7.0	21.1±6.8	32		
IV 期	14	63.5±13.1	—	28		
p53 表达						
(-)	38	72.6±7.4	41.1±8.3	48	1.826	0.177
(+)	59	80.2±5.3	32.3±6.6	33		
EGFR 表达						
(-)	37	91.7±4.5	59.5±8.4	65	10.664	0.001
(+)	60	69.2±6.0	21.3±5.7	30		
c-erbB-2 表达						
(-)	69	75.9±5.3	43.3±6.3	48	1.186	0.276
(+)	28	80.3±7.8	17.9±7.9	33		
nm23 表达						
(-)	56	72.5±6.1	14.1±5.2	30	14.516	0.0001
(+)	41	85.1±5.6	59.2±7.9	72		
组织蛋白酶 D 表达						
(-)	42	78.6±6.3	45.6±7.9	49	3.455	0.063
(+)	55	77.2±5.8	25.7±6.4	32		

表 2 影响食管鳞癌生存期的多因素分析结果

观察指标	回归系数 (β)	β 的标准误 (s_{β})	χ^2 值	P 值	相对危险度 (RR)	95% CI
生长方式	0.693	0.167	17.200	0.000 1	2.000	1.441 ~ 2.778
淋巴细胞浸润	-0.675	0.201	11.283	0.000 8	0.509	0.344 ~ 0.755
TNM 分期	0.550	0.220	6.250	0.012 4	1.733	1.126 ~ 2.667
EGFR 阳性	0.595	0.249	5.695	0.017 0	1.812	1.112 ~ 2.954
c-erbB-2 阳性	0.860	0.293	8.589	0.003 4	2.364	1.330 ~ 4.202

3. 影响患者预后的多因素 Cox 模型分析: 将上述观察指标进行多因素 Cox 分析。结果显示, 生长方式、淋巴细胞浸润、TNM 分期、EGFR 和 c-erbB-2 蛋白表达 5 种因素选入 Cox 模型(表 2)。表明肿瘤生长方式、淋巴细胞浸润程度、EGFR 和 c-erbB-2 蛋白表达同 TNM 分期一样, 都具有独立的预后价值。其中, 间质淋巴细胞浸润的 β 值为负值, 表示随着肿瘤间质淋巴细胞浸润程度的增加, 患者的死亡危险度 (RR) 相对减小。

讨 论

我们通过对 97 例食管鳞癌组织病理学和免疫组织化学的综合分析发现, 影响患者预后的各种因素之间存在着错综复杂的关系。单因素分析显示, 肿瘤分化程度低、浸润性生长、侵及外膜、间质无淋巴细胞浸润、淋巴结转移、高 TNM 分期、EGFR 阳性表达和 nm23 阴性表达等因素与患者术后生存率降低有关。多因素分析显示, 肿瘤的生长方式、淋巴细胞浸润、TNM 分期、EGFR 和 c-erbB-2 蛋白表达是影响预后的主要因素。

本研究中, 肿瘤呈浸润性生长与分化程度低、无淋巴细胞浸润、nm23 阴性表达、淋巴结转移和远处转移率增高有关, 患者相对死亡危险度明显高于膨胀性生长者。结果同以往的研究相符, 表明肿瘤浸润生长的方式反映了肿瘤不同的生物学特性^[2,4]。

肿瘤边缘和癌巢周围的间质中大量淋巴单核细胞浸润被认为是一种局部免疫反应的组织学表现, 间接地反映了宿主的免疫状态和对肿瘤的抗御能力^[5]。机体主要通过活化的 T 淋巴细胞、NK 细胞和巨噬细胞的免疫反应攻击肿瘤细胞, 使之增殖和浸润转移的能力降低, 抑制肿瘤的发生和发展^[6]。本资料中, 肿瘤间质淋巴细胞浸润的程度与肿瘤的分化程度、生长方式、浸润深度和淋巴结转移呈负相关。伴有显著炎性反应患者术后死亡危险度明显低于无炎性反应者。随着 TNM 分期的增高, 肿瘤间质炎性反应逐渐降低, 患者生存率也有所降低。

大量研究表明, 肿瘤基因异常或蛋白产物的异常表达可导致细胞的恶性增殖和高侵袭转移潜能的表达。其中, 抑癌基因 p53、癌基因 EGFR、c-erbB-2、肿瘤转移基因 nm23 以及组织蛋白酶 D 的蛋白产物的异常表达, 在许多肿瘤中可以作为识别肿瘤不同生物学特性和预后的分子生物学指标^[3,7]。我们的研究结果显示: 在食管鳞癌中, p53、c-erbB-2、组织蛋白酶 D 阳性表达和 nm23 阴性表达者与肿瘤具有较高浸润和转移的生物学特性有关, 在促进肿瘤的进展中起重要作用。然而, 目前对基因异常表达作为分子生物学标记物的预后价值结论颇不一致^[8]。本研究单因素分析显示, 食管鳞癌 EGFR 阳性表达和 nm23 阴性表达与患者生存率降低有关。随着组织蛋白酶 D 阳性表达率的增高患者生存率也有降低的趋势。而多因素分析表明, EGFR 和 c-erbB-2 蛋白表达对预后具有独立的影响作用, 结果与以往的研究相符^[9,10]。

综上所述, 患者的预后取决于肿瘤不同的生物学特性、机体的免疫状态以及疾病的进程等诸多因素的综合影响。通过多因素 Cox 模型分析, 可有效地控制混杂因素的影响。根据对预后影响的密切程度和作用方向的不同, 各种因素交互作用的结果有可能使某些因素取代了另外一些因素的作用, 而显示其独立的预后作用。我们的研究表明, 食管鳞癌的生长方式、淋巴细胞浸润的程度、EGFR 和 c-erbB-2 蛋白表达同 TNM 分期一样, 具有独立的预后价值。在实际工作中, 将这些指标进行综合分析有助于识别肿瘤不同的生物学特性和准确判断患者的预后, 为临床选择更合理的治疗方案提供可靠的依据。

参 考 文 献

- 1 Kato H, Tachumori Y, Watanabe H, et al. Evaluation of the new (1987) TNM classification for thoracic esophageal tumors. *Int J Cancer*, 1993, 53:220-223.
- 2 Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, et al. Prognostic value of histopathologic parameters of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 1995, 76:922-927.

- 3 Shiroko T, Saji S, Kawaguchi Y, et al. A study on the relationship between clinicopathological findings of gastric cancer and its biological behavior such as DNA ploidy pattern and immunohistochemical staining of PCNA, laminin, p53, and nm23. Gan To Kagaku Ryoho, 1995, 22:118-123.
- 4 Cabbert HE, Meier S, Gerharz CD, et al. Tumor-cell dissociation at the invasion front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients. Int J Cancer, 1992, 50:202-207.
- 5 Songun I, van de Velde CJ, Hermans J, et al. Expression of oncoproteins and the amount of eosinophilic and lymphocytic infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer Dutch Gastric Cancer Group. Br J Cancer, 1996, 74:1783-1788.
- 6 Horst HA, Horny HP. Tumor-infiltrating lymphoreticular cells. Histologic and immunohistologic investigations performed on metastasizing squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer, 1991, 68:2397-2402.
- 7 Gohring UJ, Scharl A, Ahr A. Value of immunohistochemical determination of receptors, tissue proteases, tumor suppressor proteins and proliferation markers as prognostic indicators in primary breast carcinoma. Geburtshilfe Frauenheilkd, 1996, 56:177-183.
- 8 Schonborn I, Minguillon C, Lichtenegger W, et al. C-erbB-2, EGF receptor, p53 and PCNA. The prognostic significance of recent tumor markers for lymph node negative breast cancer. Geburtshilfe Frauenheilkd, 1995, 55:566-571.
- 9 Itakura Y, Sasano H, Shiga C, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression in esophageal carcinoma. An immunohistochemical study correlated with clinicopathologic findings and DNA amplification. Cancer, 1994, 74:795-804.
- 10 Sjogren S, Inganas M, Lundgren A, et al. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers J Clin Oncol, 1998, 16:462-469.

(收稿日期:2000-02-27)

(本文编辑:常秀青)

· 病例报告 ·

子宫脂肪瘤合并多发性子宫平滑肌瘤粘液变性一例

张希彦 张盛忠 刘秀荣

患者女, 56 岁。15 年前于当地医院体检时发现子宫壁间多发性平滑肌瘤, 无不适主诉及阴道出血等。6 年前绝经, 绝经后无阴道出血及排液。半年前, 妇科检查时发现, 患者子宫如孕 3 个月大小, B 超示: 多发性子宫壁间平滑肌瘤。于 1999 年 4 月 21 日入北京同仁医院, 临床诊断: 子宫平滑肌瘤。行子宫全切除术。

病理检查: 全切子宫, 宫体变形, 其大小为 7.0 cm × 6.5 cm × 5.0 cm。沿前壁剖开子宫, 可见肌壁间多个肌瘤结节, 最大者约 3.0 cm × 2.5 cm × 2.5 cm, 切面瓷白色编织状, 质韧, 与周围组织边界清晰, 并可见灶状粘液胶冻状物(图 1)。光镜观察: 结节由平滑肌瘤细胞组成, 呈束状或栅栏状, 肌瘤细胞间, 可见灶状无细胞结构的絮状物, 进行 PAS 染色加苏

木精复染, 絮状结构呈淡蓝色, 其中散在残存平滑肌瘤细胞, 阿辛蓝(Alcian blue)染色亦呈淡蓝色絮状结构, 在同一层面, 子宫左侧壁间还可见一黄色脂肪组织结节(图 1), 约 2.5 cm × 2.0 cm × 1.8 cm 大小, 切面细腻, 分叶状, 胞膜菲薄, 与周围组织边界清, 结节易于从肌壁间剥离。镜下观察: 瘤细胞为分化成熟的成片的脂肪细胞, 间质为少量纤维结缔组织, 小血管略显丰富。

病理诊断: 子宫脂肪瘤合并多发性平滑肌瘤粘液变性

讨论: 本例在平滑肌瘤中, 未见脂肪细胞的成分, 在脂肪瘤中, 仅见少许纤维结缔组织而无平滑肌细胞的成分, 且瘤体有完整而非薄的纤维胞膜, 两者为互不相连、彼此独立存在之肿瘤。子宫脂肪瘤同时合并子宫多发性平滑肌瘤是非常罕见的, 它是子宫良性间叶源性肿瘤。其组织发生主要有下列 3 种学说: (1) 子宫血管旁脂肪组织发生: 即从子宫旁进入子宫壁的血管周围脂肪组织, 是脂肪瘤发生的来源; (2) 化生说: 由子宫平滑肌细胞化生转变而成的脂肪细胞发生; (3) 胚胎细胞残余异位说: 主张子宫内胚胎脂肪细胞的残余是子宫脂肪瘤的发生来源。子宫平滑肌瘤可发生多种变性, 其中粘液变性比较少见, 在阴道部及外阴部较多见, 在宫体部很少见, 发生于妊娠期的为多, 而发生于绝经 6 年后者甚少。子宫肌瘤粘液变性, 过去常与水肿变性混在一起, 常规 HE 染色中不易区别, 粘液样组织为无细胞物质的积聚, 富有酸性粘液, PAS 染色弱阳性, 用苏木复染成淡蓝色絮状物, 阿辛蓝染色呈阳性, 因此本例可确定为平滑肌瘤粘液变性。有粘液变性的肿瘤要多注意它的边缘部, 本例未见浸润现象。

(收稿日期: 1999-08-23)

(本文编辑: 蔡振国)

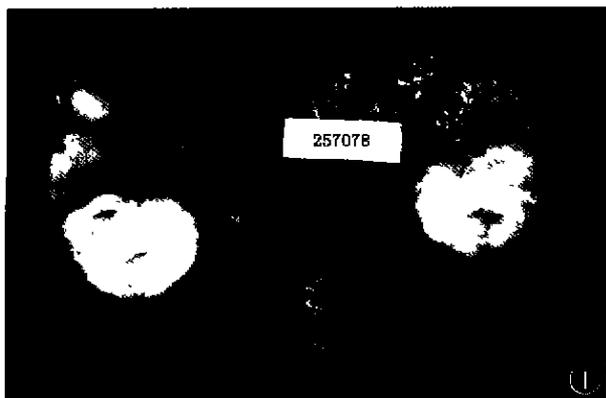


图 1 左侧壁间分叶状脂肪结节及肌瘤结节

作者单位: 100730 北京同仁医院[张希彦(现在唐山市眼科医院病理科, 063000)、张盛忠]; 唐山市妇幼保健院妇产科(刘秀荣)