

文章编号: 1005-8982(2014)M20141938-CZ

趋化因子受体 7 联合 CT 诊断膀胱 移行细胞癌淋巴结转移*

陈金波, 刘龙飞, 崔宇, 唐云华, 李超, 祖雄兵
(中南大学湘雅医院 泌尿外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 研究膀胱移行细胞癌(BTCC)中趋化因子受体 7(CCR7)的表达,并联合 CT 诊断淋巴结转移。方法 研究该院行根治性膀胱全切+盆腔淋巴结清扫的 115 例病例。术前行泌尿系及盆腔 CT 扫描,膀胱癌组织标本行 CCR7 免疫组化染色并记录盆腔淋巴结转移情况。运用统计学方法分析 CCR7 的表达与淋巴结转移的关系,并比较分析 CCR7、CT 及 CCR7 联合 CT 诊断膀胱癌淋巴结转移的敏感性、特异性和精确度。结果 BTCC 组织中的 CCR7 表达与淋巴结转移相关($P < 0.05$)。多因素分析显示 CCR7 的表达是膀胱癌淋巴结转移的独立影响因子($P < 0.05$)。采用 CT 诊断淋巴结转移的敏感度、特异度和精确度分别为 52.4%、79.5%及 69.6%,而 CCR7 联合 CT 诊断淋巴结转移的敏感性、特异性和精确度分别为 92.3%、83.6%及 70.0%。结论 CCR7 是膀胱癌淋巴结转移的独立影响因子,CCR7 联合 CT 可提高 CT 诊断淋巴结转移的敏感度。

关键词: CCR7;膀胱癌;CT;淋巴结转移

中图分类号: R737.14

文献标识码:

Chemokine receptor CCR7 as a predictive biomarker associated with computed tomography diagnosing lymph node metastasis of bladder carcinoma*

Jin-bo CHEN, Long-fei LIU, Yu CUI, Yun-hua TANG, Cha LI, Xiong-bing ZU
(Department of Urology, Xiangya Hospital, Central South University,
Changsha, Hunan 410008, P.R. China)

Abstract: [Objective] To determine whether Chemokine receptor CCR7 expression combined with computed tomography (CT) has a relationship with lymph node metastasis in bladder transitional cell carcinoma (BTCC). [Methods] One hundred and fifteen BTCC cases were studied in our department. Preoperative CT scans of abdomen and pelvis, CCR7 immunohistochemistry expressions in tumor specimens and pathological findings for lymph node metastasis were assessed. We evaluated the sensitivity, specificity and accuracy of CCR7 and CT in diagnosis of lymph node metastasis of BTCC separately and jointly. [Results] The CCR7 expression in BTCC was correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$). Multivariate analysis indicated that CCR7 expression was an independent predictor for lymph node metastasis in BTCC ($P < 0.05$). Sensitivity, specificity and accuracy of CCR7 combined with CT scan in the diagnosis of lymph node metastasis of BTCC were 92.3%, 83.6%, 70.0%, respectively. CT alone were 52.4%, 79.5%, 69.6%, respectively. [Conclusions] Our study showed CCR7 was an independent indicator for lymph node metastasis of BTCC. CCR7 combined with CT can improve the accuracy of lymph node metastasis in BTCC.

Key words: CCR7; bladder carcinoma; computed tomography; lymph node metastasis

收稿日期: 2014-11-24

* 基金项目: 中南大学中央高校基本科研业务费专项资金(No: 72150050586)

[通信作者] 祖雄兵, E-mail: whzuxb@163.com

膀胱移行细胞癌 (bladder transitional cell carcinoma, BTCC) 是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 是当前泌尿外科医师面临的一大难题^[1]。研究表明, 淋巴结转移是影响膀胱癌患者预后的重要因素之一^[2]。临床上螺旋 CT 扫描广泛应用于膀胱癌淋巴结转移的诊断, 但其敏感性并不令人满意^[3]。研究表明, 血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 联合 CT 可提高诊断膀胱癌淋巴结转移的敏感性^[4]。肿瘤趋化因子及其受体家族在肿瘤转移方面有重要作用。趋化因子受体 CCR7 广泛表达于肺癌、胃癌、乳腺癌等组织中, 并与淋巴结转移有重要关系^[5]。本文通过免疫组化方法检测 BTCC 组织中 CCR7 的表达, 探讨其是否能作为膀胱癌淋巴结转移的独立预测因子, 并探讨 CCR7 联合 CT 诊断能否提高 CT 诊断淋巴结转移的敏感性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取中南大学湘雅医院 2009 年 1 月~2012 年 12 月住院行膀胱癌根治 + 盆腔淋巴结清扫术的 115 例 BTCC 组织, 均经病理证实。其中男 62 例, 女 53 例; 年龄 40~78 岁, 平均 61.5 岁。所有患者术前均行泌尿系及盆腔 CT 扫描。膀胱肿瘤组织病理学分级采用 WHO 分级法 I 级 14 例, II 级 42 例, III 级 59 例。临床分期采用 UICC-TNM 分期法, T₁ 期 7 例, T₂ 期 26 例, T₃ 期 58 例, T₄ 期 24 例。

1.2 方法

将收集的 115 例膀胱移行细胞癌组织石蜡标本采用免疫组织化学染色法检测 CCR7 的表达情况。分析术前 CT 判断淋巴结转移情况, 并记录手术清扫的阳性淋巴结位置及数目。淋巴结清扫范围如下: 78 例标准盆腔淋巴结清扫(上界为双侧髂总动脉分叉, 下界为 Cooper 韧带、股管人口处, 外侧界至生殖股神经, 内侧界达膀胱壁, 包括双侧髂内、髂外以及闭孔淋巴结)。37 例因术前和术中评估疑淋巴结转移可能, 故行扩大淋巴结清扫(包括双侧盆腔髂血管周围淋巴结、双侧髂总血管周围淋巴结、骶前淋巴结、腹主动脉和下腔静脉周围淋巴结)。

免疫组化采用链霉菌抗生物素蛋白一过氧化物酶连结 SP(中山金桥生物公司, 编号 SP-9000)一步法进行, 兔抗人 CCR7 多克隆抗体(美国 Abcam 公司, 编号 ab32527)1:200 稀释作为一抗, PBS 代替一抗作为阴性对照, 已知乳腺癌组织切片染色作为阳性对照, 按试剂盒说明书相关步骤操作, 具体如

下:①石蜡切片:收集的石蜡标本 4 μm 连续切片, 于 65℃烤箱中烘烤 30 min;②脱蜡水化:二甲苯 I 与二甲苯 II 依次脱蜡 20 min, 梯度酒精水化(100%乙醇 5 min-95%乙醇 5 min-80%乙醇 5 min-70%乙醇 5 min), PBS 冲洗 5 min X3 次;③抗原热修复:将切片放入 0.01 M 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 中 95℃加热 15 min, 自然冷却至 40℃, PBS 冲洗 5 min × 3 次;④灭活内源性过氧化物酶:加入适量的 3% H₂O₂, 室温孵育 20 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;⑤加入正常山羊血清工作液封闭, 室温孵育 10 min, 弃去多余液体;⑥滴加稀释后的兔抗人 CCR7 多克隆抗体, 40℃孵育过夜, PBS 冲洗 5 min × 3 次;⑦滴加生物素标记羊抗兔 IgG, 室温孵育 40 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;⑧滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 室温孵育 40 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次;⑨DAB 显色, 显微镜下控制反应时间, 自来水洗终止显色过程;⑩苏木素复染, 自来水冲洗, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片;⑪显微镜下观察。

1.3 结果判定

免疫组化结果由两位独立的病理医生(无相关样本临床资料的信息)分析, 出现结果不一致时重新判片, 直至达成一致意见。在高倍镜下随机观察 3 个视野, 计数细胞总数, 其观察结果采用二维半定量方法进行, 即综合考虑肿瘤细胞的染色阳性率和染色强度。染色阳性率的评分标准为:0 分, 无染色阳性细胞;1 分, <10%染色阳性细胞;2 分, 10%~50%染色阳性细胞;3 分, >50%染色阳性细胞。染色强度评分标准:0 分, 无着色;1 分, 轻度着色(略强于阴性对照);2 分, 中度着色(介于 1 分与 3 分之间);3 分, 重度着色(相当于或强于阳性对照)。将两者评分相加后作为评定标准:0~1 为 I, 2 为 II, 3~4 为 III, 4~6 为 IV。

所有患者术前均行泌尿系及盆腔 64 位多层螺旋 CT (德国西门子 Somatom) 扫描。扫描层厚为 5 mm。115 例患者的 CT 片均通过电子系统调阅, 并由 2 位独立的泌尿外科医师和放射科医生完成, 阅片评估前均不知晓患者淋巴结的病理结果。盆腔淋巴结 >10 mm 作为阳性转移淋巴结的评判标准。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 计数资料用 χ^2 检验, 等级资料用秩和检验 (Mann-Whitney *U* test), 单因素分析用四格表计数分析, 多因素分析用二分类 Logistic 回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 BTCC 组织中 CCR7 的表达与淋巴结转移的关系

115 例 BTCC 患者中,术后病理证实淋巴结转移阳性者为 42 例,淋巴结阴性者为 73 例。淋巴结阳性组中,CCR7 的表达 I 级为 0 例,II 级为 5 例,III 级为 14 例,IV 级为 23 例。而淋巴结阴性组中,CCR7 的表达 I 级为 15 例,II 级为 36 例,III 级为 22 例,IV 级为 0 例。两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),CCR7 的表达与淋巴结转移相关,见表 1。

2.2 BTCC 组织中 CCR7 的表达是淋巴结转移的独立影响因素

单因素分析显示,在 115 例 BTCC 患者中,年龄、性别、肿瘤分期、分级、肿瘤大小、发病次数等 6 个临床参数,仅肿瘤分期、分级与 CCR7 蛋白表达的

阳性率存在具有统计学意义的关系 ($P < 0.05$),其他 3 项临床参数与 CCR7 蛋白的表达并未发现明显的相关性 ($P > 0.05$)。多因素分析显示,仅 CCR7 蛋白表达为淋巴结转移发生的独立影响因素 ($P < 0.001$,OR = 2.93),CCR7 蛋白高表达组发生淋巴结转移的风险约为低表达组的 3 倍,见表 2。

2.3 CCR7 联合 CT 诊断 BTCC 淋巴结转移可提高 CT 诊断的敏感性

将 CCR7 的表达分为 2 组, I、II 为低表达组 (-), III、IV 为高表达组 (+)。CCR7 和淋巴结转移均

表 1 BTCC 组织中 CCR7 的表达与淋巴结转移的关系

组别	例数	CCR7				P 值
		I	II	III	IV	
阳性	42	0	5	14	23	<0.001
阴性	73	15	36	22	0	

(请补充具体 P 值,精确到小数点后 3 位)

表 2 淋巴结转移与各临床参数的单因素和多因素分析

临床特征	比较	单因素分析		多因素分析	
		OR(95%CI)	P 值	OR(95%CI)	P 值
年龄 / 岁	<60 与 ≥60	-	0.212	-	-
肿瘤大小 /cm	<3 与 ≥3	-	0.153	-	-
病理分级	I、II 与 III、IV	0.409(0.061-0.813)	0.038	-	0.090
临床分期	T ₁ -T ₂ 与 T ₃ -T ₄	0.233(0.042-0.671)	0.008	-	0.065
发病次数	初发与复发	-	0.104	-	-
CCR7 表达	I、II 与 III、IV	3.86(1.71-7.59)	0.000	2.93(1.65-6.71)	0.000

(+) 的有 37 例,CCR7(+) 而淋巴结转移(-) 的有 22 例,CCR7(-) 和淋巴结转移均(-) 的有 51 例,CCR7(-) 而淋巴结转移(+) 的有 5 例。CCR7 单独评估淋巴结转移的敏感度、特异度和精确度分别为 88.1%、69.9% 及 76.5%。115 例患者中,CT 诊断淋巴结阳性的有 37 例,阳性率为 32.2%(37/115)。其中,CT 评估与淋巴结均(+) 的有 22 例,CT(+) 而淋巴结转移(-) 的有 15 例,CT 与淋巴结均(-) 的有 58 例,CT(-) 而淋巴结转移(+) 的有 20 例。CT 单独评估淋巴结转移的敏感度、特异度和精确度分别为 52.4%、79.5% 及 69.6%。当 CCR7 联合 CT 诊断淋巴结转移时,敏感度、特异度和精确度分别为 92.3%(39/42)、83.6%(61/73) 及 70.0%(100/115),见表 3。

表 3 CCR7、CT 及 CCR7 联合 CT 诊断淋巴结转移的敏感度、特异度和精确度

变量	淋巴结转移 / 例		敏感度 / %	特异度 / %	精确度 / %
	+	-			
CCR7					
+	37	22	88.1	69.9	76.5
-	5	51			
CT					
+	22	15	52.4	79.5	69.6
-	20	58			
CCR7 联合 CT					
+	39	12	92.3	83.6	70.0
-	3	61			

3 讨论

膀胱癌是最见的泌尿系统肿瘤,其发病率和死亡率均较高。据统计,2012年美国新发膀胱癌患者73 510例,病死人数达14 880例^[6]。膀胱癌具有反复复发、局部浸润以及远处转移的生物学特征,这些过程贯穿发生,最终可导致患者的死亡。如何监测以及抑制膀胱癌转移,是目前膀胱癌研究的重点之一。研究表明,淋巴结转移是影响膀胱癌预后的重要因素,出现淋巴结转移的膀胱癌患者往往预后不佳^[7]。

趋化因子及其受体家族在肿瘤的发生、发展和转移中起着重要作用。趋化因子受体7既往认为是孤儿受体,近期研究发现其配体为CCL12和CCL19。目前发现在许多癌组织中,如乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌等均有较高表达^[8]。并且高表达的CCR7是影响这些肿瘤淋巴结转移的一项独立影响因素^[9]。YATES等^[10]发现膀胱癌细胞中的CCR7表达促进癌细胞的增殖和侵袭的信号转导通路。国内学者侯恺林等^[11]也发现,CCR7蛋白高表达与膀胱移行细胞癌的恶性程度及预后相关。本研究发现淋巴结阳性组与阴性组的CCR7表达差异存在统计学意义($P < 0.05$),证实CCR7的表达与盆腔淋巴结转移相关。对淋巴结转移的单因素分析显示,肿瘤病理分级、临床分期及CCR7蛋白表达是淋巴结转移的影响因素。而进一步多因素回归分析显示,CCR7的表达是膀胱癌淋巴结转移的一项独立影响因素($P < 0.05$, OR=2.93),CCR7蛋白高表达组发生淋巴结转移的风险约为低表达组的3倍。由此推测可能是CCR7蛋白的高表达对肿瘤的分期与分级产生一定的影响,从而进一步影响淋巴结的阳性率。

CT扫描是诊断膀胱癌和评估分期的重要手段,然而其敏感度并不令人满意^[12]。FICARRA等^[13]研究发现,45例淋巴结阳性的膀胱癌患者,术前CT只诊断出了19例,敏感度为42.25%。一般认为CT显示直径至少 >0.5 cm的淋巴结才考虑是阳性转移淋巴结可能。本研究中,CT单独评估淋巴结转移的敏感度、特异度和精确度分别为52.4%、79.5%及69.6%,说明CT诊断淋巴结转移的局限性,如何提高其诊断的敏感度尤为重要。CCR7单独诊断淋巴结转移时,敏感度、特异度和精确度分别为88.1%、69.9%及76.5%。CCR7诊断的敏感度高于CT,但特异度偏低。当CCR7联合CT诊断淋巴结转移时,敏感度、特异度和精确度分别为92.3%、83.6%及70.0%。因

此,CCR7联合CT诊断膀胱癌淋巴结转移可提高其敏感度,弥补CT的不足。

CCR7是膀胱癌淋巴结转移的独立影响因子,是预测淋巴结转移的可靠指标。CCR7联合CT诊断淋巴结转移能提高CT诊断的敏感度,则可对盆腔淋巴结的清扫范围提供更详细的评估,同时对患者术后的化疗也可能有一定的参考价值。近来,对趋化因子的小分子拮抗剂的研究已有进展,若能存在有效拮抗CCR7受体的药物产生,可能会对肿瘤的转移产生抑制,提供肿瘤辅助治疗的新思路,并改善手术患者的预后。

参 考 文 献:

- [1] KAUFMAN DS, SHIPLEY WU, FELDMAN AS. Bladder cancer [J]. *Lancet*, 2009, 374(9685): 239-249.
- [2] HERR HW. Superiority of ratio based lymph node staging for bladder cancer[J]. *Urology*, 2003, 169(3): 943-945.
- [3] BALTACI S, RESORLU B, YAGCI C, et al. Computerized tomography for detecting perivesical infiltration and lymph node metastasis in invasive bladder carcinoma[J]. *Urol Int*, 2008, 81(4): 399-402.
- [4] LI Z, QI F, MIAO J, et al. Vascular endothelial growth factor-C associated with computed tomography used in the diagnosis of lymph node metastasis of bladder carcinoma[J]. *Arch Med Res*, 2010, 41(8): 606-610.
- [5] CASSIER PA, TREILLEUX I, BACHELOT T, et al. Prognostic value of the expression of C-chemokine receptor 6 and 7 and their ligands in nonmetastatic breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 213.
- [6] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.
- [7] TURKOLMEZ K, TOKGOZ H, RESORLU B, et al. Muscle-invasive bladder cancer: predictive factors and prognostic difference between primary and progressive tumors[J]. *Urology*, 2007, 70(3): 477-481.
- [8] IRINO T, TAKEUCHI H, MATSUDA S, et al. CC-Chemokine receptor CCR7: a key molecule for lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 291.
- [9] ZHOU S, SHEN Z, WANG Y, et al. CCR7 expression and intratumoral FOXP3 + regulatory T cells are correlated with overall survival and lymph node metastasis in gastric cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74430.
- [10] YATES TJ, KNAPP J, GOSALBEZ M, et al. C-X-C chemokine receptor 7: a functionally associated molecular marker for bladder cancer[J]. *Cancer*, 2013, 119(1): 61-71.
- [11] HOU KL, ZHANG LH, BO JJ, et al. Expression of CXCR7 protein in human bladder cancer and its clinical significance[J].

Chin J Urol. 2011, 32(1): 42-46. Chinese

[11] 侯恺林,张连华,薄隽杰,等.趋化因子受体7在膀胱癌组织中的表达及其临床意义[J].中华泌尿外科杂志,2011,32(1):42-46.

[12] BALTAC S, RESORLU B, YAGCI C, et al. Computerized tomography for detecting perivesical infiltration and lymph node metastasis in invasive bladder carcinoma[J]. Urol Int, 2008, 81(4):

399-402.

[13] FICARRA V, DALPIAZ O, ALRABI N, et al. Correlation between clinical and pathological staging in a series of radical cystectomies for bladder carcinoma[J]. BJU Int, 2005, 95(6): 786-790.