

临床研究 ·

舌癌颈淋巴结微转移灶的免疫组化检测

李伟忠 赵彤 张进华 殷学民 薛宏宇 王天舒

摘要 目的:探讨免疫组织化学 S-P 微波法对阴性淋巴结微转移灶的检出率。方法:采用 S-P 微波法,对 30 例舌鳞状细胞癌患者既往报告为阴性的 152 个淋巴结的石蜡标本再作切片,并作免疫组织化学染色。取阳性淋巴结作为对照。结果:30 例患者 152 个阴性淋巴结,经 CK(AE1/AE3)单克隆抗体标记后,在 4 例 (13.3%) 患者中共 7 个淋巴结 (4.6%) 内 CK(AE1/AE3)单克隆抗体呈阳性反应。癌细胞呈单个或呈簇状散在于淋巴结内,淋巴结结构完好。检出的 4 例患者,高分化及低分化鳞状细胞癌各 2 例,其中 2 例术前已发现颈部有肿大淋巴结,7 个微转移之淋巴结中,颌下区 2,颈深上 4,颈深中 1。正常淋巴结呈阴性反应。结论:舌癌患者的阴性淋巴结中,仍有一定数量的微转移灶发生,采用免疫组化的方法,对发现与诊断微转移灶具有一定的可靠性和应用前景。

关键词 舌鳞状细胞癌 微转移灶 淋巴结

Immunohistochemical Detection of Micrometastases in Cervical Lymph Nodes from Squamous Cell Carcinoma of Tongue in Neck Dissection Specimens

Li Weizhong, Zhao Tong, Zhang Jinhua, et al

Nanfang Hospital, the first Military Medical University

Abstract

Objective: The purpose of this study was to explore a feasible method to detect the micrometastases. **Methods:** Totally 152 cases of negative cervical lymph nodes (CLNs) from 30 patients with squamous cell carcinoma in tongue were included in this study. The HE-stained slices of the CLN were reexamined by two experienced pathologists and, conformed that no carcinoma cells were found. Two slices were made from each paraffin specimen and, the slices were stained with the microwave immunohistochemical technique with monoclonal antibody CK (AE1/AE3) (DAKO Co. Denmark, 1:100). **Results:** Among these 152 cases 7 (4.6%) positive lymph nodes were found in 4 (13.3%) patients, and CLN metastases were found in all the patients before the surgical treatment. Most of the micro-metastatic nodes appeared in the upper deep cervical area, except that one of them was found in the submandibular triangle. **Conclusion:** The results suggest that micrometastases frequently occurred in negative lymph nodes. The present method may be useful in detecting the micrometastases of lymph nodes and in evaluating clinical stages of patients with oral cancers.

Key words: squamous cell carcinoma of tongue micrometastases lymph nodes

舌癌是目前口腔较常见的恶性肿瘤之一,由于其早期颈淋巴结转移的发生率较高,特别是当颈部淋巴结尚未完全被肿瘤组织所替代、淋巴结形态大小与正常淋巴结相似时,临床一般极难发现,且一般将这类淋巴结误认为未发生颈淋巴结转移,特别是近年来微转移灶概念的提出,对癌症转移的临床病理特征又有了更进一步的认识¹。为进一步研究舌癌患者颈淋巴结微转移的发生与发展。笔者

采用免疫组化的方法,对舌癌颈淋巴结清扫术后的阴性淋巴结进行研究分析。

1 材料和方法

1.1 临床标本

本研究的 30 例舌鳞状细胞癌患者均为第一军医大学南方医院口腔颌面外科的手术患者,其中高分化鳞癌 23 例,低分化鳞癌 7 例。其中 8 例患者术前诊断已发生颈淋巴结转移。将所有既往报告为阴性的 152 个淋巴结重新切片,由 2 位病理医师重新阅片,证实未发现癌细胞组织。将

这些阴性淋巴结石蜡标本再作切片,并作免疫组织化学染色。取阳性淋巴结作为对照。

1.2 方法

本研究免疫组织化学方法采用 S-P 微波法,染色步骤如下:切片经二甲苯 3 次脱蜡后,经梯度乙醇至水;切片置 3% H₂O₂ 冰盒内,微波(MW) 5 档(输出功率 850 W) 2 min; 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 洗 3 min,共 3 次,擦去玻片周围多余的液体;置 10 mmol/L (pH 6.0) 柠檬酸缓冲液中, MW 5 档 15 min,室温冷却 5 min; 加非免疫血清于冰盒内, MW 5 档 2 min; 滴加一抗 CK(AE1/AE3) 单克隆抗体(DAKO,丹麦)于冰盒内 MW 5 档 2 min,洗涤同; 滴加生物素标记的二抗于冰盒内 MW 5 档 2 min,洗涤同; 滴加 S-P 复合物于冰盒内 MW 5 档 2 min,洗涤同; 切片滴加 100 μl 新鲜配置的 DAB 溶液,镜下控制显色; 苏木青复染,常规脱水透明,中性树脂胶封固。

1.3 结果判断

切片采用 Olympus BX40 显微镜观察,CK(AE1/AE3) 单克隆抗体在癌细胞内为阳性反应,呈棕黄色,均定位胞浆内,淋巴结内固有成分不着色。

2 结 果

30 例患者 152 个阴性淋巴结,经 CK(AE1/AE3) 单克隆抗体标记后,有 4 例共 7 个淋巴结内 CK(AE1/AE3) 单克隆抗体呈阳性反应。癌细胞呈单个(图 1)或呈簇状(图 2)散在于淋巴结内,淋巴结结构完好。检出的 4 例患者,高分化及低分化鳞状细胞癌各 2 例,其中 2 例术前已发现颈部有肿大淋巴结。7 个微转移之淋巴结中,颌下区 2 个,颈深上 4 个,颈深中 1 个。正常淋巴结呈阴性反应。

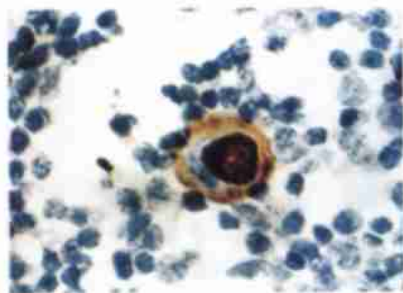


图 1 淋巴结内单个散在的转移癌细胞 CK(AE1/AE3) 单克隆抗体 S-P 微波法染色 ×400

Fig 1 A single metastasis carcinoma cell appeared in a lymph node S-P microwave staining with CK(AE1/AE3) monoclonal antibody ×400

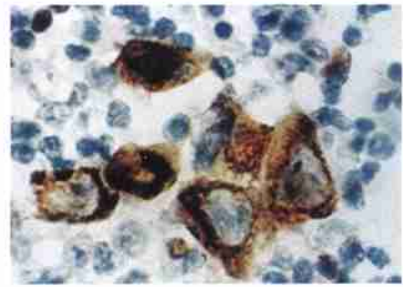


图 2 淋巴结内呈簇状分布的转移癌细胞 CK(AE1/AE3) 单克隆抗体 S-P 微波法染色 ×400

Fig 2 Several metastasis carcinoma cells appeared as a cluster in a lymph node S-P microwave staining with CK(AE1/AE3) monoclonal antibody ×400

3 讨 论

口腔癌特别是舌癌,是口腔颌面部常见的恶性肿瘤。癌转移是患者复发及死亡的主要原因。判断口腔癌有无颈淋巴结转移、其转移的途径及范围等,对于临床选择合理的治疗方案,预测预后具有重要意义。对于明显淋巴结肿大的患者,临床一般不容易忽略,而对于淋巴结刚受到侵犯,临床上与正常淋巴结不易区别的转移淋巴结,往往由于未彻底清除而导致复发。

随着对癌症淋巴结转移的深入研究,淋巴结微转移灶的发现日益受到重视。一般认为,淋巴结微转移应符合以下 3 点: 小的癌细胞团仅限于淋巴结内; 淋巴结的结构未受到明显破坏或被癌细胞替代; 任何方向切片转移灶的直径不超过 3 mm^{1,2}。Woolgar 等³ 采用常规病理的方法,分析了 178 例口腔和口咽鳞癌颈淋巴清扫术后的标本,其中发生颈淋巴结转移的有 72 例(40%)而发生微转移的有 14 例(8%),且发生微转移的患者往往较临床明显转移的患者年轻。同时有微转移的患者与临床明显淋巴结转移的患者间在原发灶大小、临床分期及性别方面没有明显的差异,其常规病理学检测方法对仅有个别癌细胞的淋巴结往往不易发现。随着免疫学及分子生物学技术的进步,对常规病理学方法难以诊断的淋巴结、血液、骨髓等各脏器内的微转移灶转移癌细胞的诊断成为可能。Noguchi 等⁴ 采取 RT-PCR 法,用细胞角蛋白(cytokeratin, CK)作为肿瘤特异性标志物用于淋巴结内微小转移灶的检测,大大提高了淋巴结转移的检出

率。CK广泛存在于上皮细胞,而间叶组织缺乏角蛋白,在细胞恶性转化和肿瘤发生过程中,角蛋白继续存在于上皮性肿瘤内,间叶细胞恶变后仍不表达角蛋白,这为应用角蛋白检测淋巴结转移提供了理论依据。本研究采取免疫组化的方法,采用CK(AE1/AE3)单克隆抗体检测舌癌患者颈淋巴结清扫术后阴性淋巴结的标本,30例患者的152个阴性淋巴结标本中,有4例(13.3%)患者共7个淋巴结(4.6%)发现了微转移灶,CK阳性表达的癌细胞呈单个或呈簇状散在分布于淋巴结中,而淋巴结固有成分则均未着色,说明该法检测转移灶的敏感性,为临床评估肿瘤的性质与预后提供有效的手段。

参考文献

- 1 Woolgar JA, Beirne JC, Vaughan ED, et al. Correlation of histopathologic findings with clinical and radiologic assessments of cervical lymph-node metastases in oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1995, 24(1): 30 ~ 37
- 2 van den Brekel MWM, Stel HV, van der Valk P, et al. Micrometastases from squamous cell carcinoma in neck dissection specimens. *Eur Arch Otolaryngol*, 1992, 249(6): 349 ~ 353
- 3 Woolgar JA. Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: incidence, histopathological features and clinical implications. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 37(3): 181 ~ 186
- 4 Noguchi S, Aihara T, Motomura K, et al. Detection of breast cancer micrometastasis in axillary lymph nodes by means of reverse transcription-polymerase chain reaction comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol*, 1996, 148(2): 649 ~ 656

(2001-07-06 收稿)

(本文编辑 邓本姿)

(上接第174页)

盐沉积骨化渐成熟,但因成骨量较少,有可能是术中骨屑散落种植所致,更可能是锶磷灰石诱导未分化细胞生成骨细胞并导致该现象,尚待进一步研究后才能确定,但术中曾用大量生理盐水冲洗创口,骨屑种植的可能性很小,故初步推测锶磷灰石可能有一定程度的骨诱导性。

3.2 锶磷灰石的骨修复能力

X线片和病理切片反映,术后早期锶磷灰石组材料—骨边界及材料内部已有大量骨岛形成,随时间延长在量和成熟度上均比羟磷灰石组要高,界面处骨和锶磷灰石相互渗透,骨小梁交错存在,材料与骨结合得更为紧密,内部锶磷灰石早期降解,为新生骨提供了大量的长入空间,新生骨小梁相互连接并与材料有机结合,从而达到较为理想的修复效果,与羟磷灰石组相比,锶磷灰石组的新生骨修复缺损速度快而程度高。核素扫描结果显示,3月时锶磷灰石组与羟磷灰石组或自身修复组的核素浓聚程度之比均高于1.2,认为有较大差异,反映出术后3月时锶磷灰石组远较其他两组的骨代谢程度高,亦即新生骨生长活跃;6月时各组比值基本接近,表明迟至6个月后,锶磷灰石组仍与其他两组有相似的骨代谢活跃程度,由此可推断出,锶磷灰石对骨缺损的修复不但速度快、程度高,而且维持的时间长,这与以上所推断出的锶磷灰石良好的

生物学特性相符,结合以上分析,有理由认为锶磷灰石较羟磷灰石有更好的骨缺损修复效果。

羟磷灰石作为目前较优秀的生物材料在应用中也显示出其不足之处,许多学者通过各种途径试图完善该材料^{5,6},以锶替代羟磷灰石中的钙制成锶磷灰石便是其中一种方法,希望能够在离子水平提高该材料的生物学性能。

参考文献

- 1 Gedalia D. Effects of strontium and fluoride uptakes on the solubility of powdered enamel. *Caries Res*, 1997, 11(2): 287 ~ 292
- 2 Sun J, Xue M, Kikuchi M, et al. Effects of Sr-hydroxyapatite microcrystal on cultured cell. *Biomed Mater Eng*, 1994, 4(7): 503 ~ 512
- 3 Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N, et al. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone*, 1997, 20(1): 47 ~ 54
- 4 Okayama S, Akao M, Nakamura S, et al. The mechanical properties and solubility of strontium-substituted hydroxyapatite. *Biomed Mater Eng*, 1991, 1(1): 11 ~ 17
- 5 刘义荣,顾国珍,薛森,等. EH型复合人工骨材料动物体内植入研究. *口腔材料器械杂志*, 1995, 4(3): 104 ~ 106
- 6 罗磊,李声伟,毛祖彝,等. 羟基磷灰石—胶原复合材料动物实验的钙磷元素定量分析和扫描电镜研究. *临床口腔医学杂志*, 1997, 13(2): 74 ~ 76

(2000-08-21 收稿, 2001-11-30 修回)

(本文编辑 王晴)