

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.15.015

乳腺癌微血管生成与中医证型的相关性

王 奇, 李 涛, 姜建伟*, 章红燕

(浙江省肿瘤医院, 浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号, 310022)

摘要 目的 探讨中医辨证分型与乳腺癌微血管生长的相关性。方法 根据中医辨证分型将 96 例乳腺癌患者分为痰瘀互结型 38 例、肝郁气滞型 32 例、冲任失调型 26 例, 采用免疫组化法测定不同中医分型及病理分级患者血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 水平以及微血管密度 (MVD)。结果 痰瘀互结型 VEGF、bFGF 阳性表达率及 MVD 值明显高于肝郁气滞型及冲任失调型 ($P < 0.05$)。随着患者病理分级增加, II 级、III 级 EGF、bFGF 阳性表达率及 MVD 值明显高于 I 级 ($P < 0.05$), III 级 MVD 值明显高于 II 级 ($P < 0.05$)。结论 乳腺癌微血管生成与中医分型具有一定的关系, VEGF、bFGF 表达及 MVD 水平可作为乳腺癌中医辨证分型及临床病理分级的客观化评定指标。

关键词 乳腺癌; 微血管病变; 肝郁气滞型; 痰瘀互结型; 冲任失调型

研究表明, 肿瘤微血管病变在乳腺癌发生及进展过程中起到重要的作用, 通过测定肿瘤微血管生长状况对患者病情发展起到重要的预测作用^[1]。乳腺癌形成与冲任失调、肝郁气滞有密切关系, 气滞血瘀是该病发生的重要病理机理^[2]。本研究通过对乳腺癌患者中医辨证分型与肿瘤微血管生成特点的相关性进行分析, 旨在为临床治疗、阻断及逆转乳腺癌疾病提供依据。

1 临床资料

1.1 一般资料

选取浙江省肿瘤医院 2010 年 1 月至 2013 年 1 月收治的原发性乳腺癌女性患者 96 例, 年龄 21 ~ 78 岁, 平均年龄 (48.6 ± 3.8) 岁; 肿瘤大小 0.8 ~ 5.9 cm, 平均 (3.9 ± 1.4) cm。其中左侧病灶 38 例, 右侧病灶 42 例, 双侧病灶 16 例; 中医辨证分为痰瘀互结型 38 例、肝郁气滞型 32 例、冲任失调型 26 例; 病理分级 I 级 28 例, II 级 38 例, III 级 30 例。

1.2 诊断标准及病理分级标准

参考《中医外科学》^[3] 中乳腺癌诊断标准及乳腺癌病理分级^[4]: I 级为高分化; II 级为中分化; III 级为低分化。

1.3 中医辨证分型

参照《现代中医乳房病学》^[5], 肝郁气滞型:

情志抑郁, 或性情急躁、胸闷胁胀、或伴经前乳房作胀或少腹作胀, 乳房部肿块皮色不变, 苔薄, 脉弦。痰瘀互结型: 乳房肿块多样性, 呈结节或条索样等, 质韧硬, 边界欠清, 活动度较差, 双乳刺痛, 乳房疼痛和肿块与情绪不甚相关, 月经延期, 行经不畅或伴有血块, 舌暗红或青紫或舌边尖有瘀斑, 或舌下脉络粗胀、青紫。冲任失调型: 月经紊乱, 经前期乳房胀痛, 或婚后从未生育, 或多次流产史, 舌质淡, 苔薄, 脉弦细。

1.4 纳入标准

符合上述诊断标准及辨证标准者; 行手术治疗且术前未接受放疗、化疗; 经影像学及病理组织学证实为原发性乳腺癌; 患者签署知情同意书。

1.5 排除标准

肝肾功能不全、高泌乳症、全身感染性疾病、内分泌异常患者。

2 观察指标与方法

2.1 微血管密度 (MVD) 表达水平测定

凡经染色后呈棕色且与周围内皮细胞簇或内皮细胞明显可视视为单个微血管。采用低倍镜观察血管腔, 凡血管腔直径 $> 50 \mu\text{m}$, 且血管出现明显硬化或较厚肌层时不进行计数。采用奥林巴斯生物显微镜在低倍视野下观察组织切片中血管分布情况, 并选择微血管密集的区域采用 400 倍显微镜对血管数进行计数, 同时选取 4 个区域平均值测定微血管数。

* 通讯作者: wxlp113@163.com, 13757196021

2.2 血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 表达检测

采用免疫组化法测定 VEGF、bFGF 表达水平。将样本组织剪碎后采用 D - Hank' s 试剂液 (美国 Gibco 公司, 批号 918023) 进行冲洗, 并加入 1 mg/ml 的 DNaseI 以及 2.5 g/L 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号 25200057) 混合液, 在 37℃ 中孵化 40 ~ 60 min, 并在 DMEM (美国 Gibco 公司, 批号 NWJ0473) 培养基中终止消化。样液反复吹打后过滤弃上清液, 并用 D - Hank' s 试剂洗涤 2 次, 3000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 留置沉淀物, 加入 DMEM。将悬浮液浓度为 2×10^6 个/ml 的细胞悬液, 并置于 37℃ 中避光放置, 并采用流式细胞仪检测其荧光强度。随机选取 5 个视野, 采用显微镜 ($\times 400$ 倍) 分别对 5 个视野进行观察, 每个视野进行细胞计数, 并计算细胞的阳性百分比 (以 500 个细胞作为一组计算单位)。细胞阳性百分率^[9]: 根据显微镜下细胞着色程度由轻至重分别计为 1、2、3 分, 细胞阳性百分率 $< 10\%$ 为 1 分, $10\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 100\%$ 为 3 分, 两项评分乘积 > 3 分为阳性, ≤ 3 分为阴性。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 进行数据处理, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间计量资料均值的比较采用 t 检验, 组间计数资料率的比较采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 不同中医证型患者 VEGF、bFGF、MVD 表达情况比较

表 1 示, 痰瘀互结型患者 VEGF、bFGF 阳性表达率及 MVD 值显著高于肝郁气滞型及冲任失调型 ($P < 0.05$)。

表 1 不同证型原发性乳腺癌患者 VEGF、bFGF 表达及 MVD 水平比较

中医证型	例数	VEGF 表达 (例)				bFGF 表达 (例)				MVD (支, $\bar{x} \pm s$)
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	
痰瘀互结型	38	8	12	8	10	10	9	10	9	19.458 $\pm$ 4.996*#
肝郁气滞型	32	25	4	3	0	24	5	3	0	12.996 $\pm$ 5.337
冲任失调型	26	22	3	1	0	23	3	0	0	11.786 $\pm$ 6.007

注: 与肝郁气滞型比较, * $P < 0.05$; 与冲任失调型比较, # $P < 0.05$

表 2 不同病理分级原发性乳腺癌患者 VEGF、bFGF 表达及 MVD 水平比较

病理分级	例数	VEGF 表达 (例)				bFGF 表达 (例)				MVD (支, $\bar{x} \pm s$)
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	
I 级	28	20	5	2	1	22	4	2	0	11.932 $\pm$ 4.367
II 级	38	17	10	7	4	16	8	8	6	17.556 $\pm$ 5.087*
III 级	30	10	3	8	9	5	8	10	7	30.651 $\pm$ 7.125*#

注: 与 I 级比较, * $P < 0.05$; 与 II 级比较, # $P < 0.05$

3.2 不同病理分级患者 VEGF、bFGF、MVD 表达比较

表 2 示, 随着患者病理分级增加, II 级、III 级患者 EGF、bFGF 阳性表达率及 MVD 值明显高于 I 级 ($P < 0.05$); III 级患者 MVD 值明显高于 II 级 ($P < 0.05$)。

4 讨论

乳腺癌是极具转移性的肿瘤, 易于向淋巴结、肝、肺等组织转移, 患者预后效果较差。研究表明, 血管生成与乳腺癌的形成、发展、转移及预后有密切的关系^[9]。认为在肿瘤形成之前可通过测定血管生成预测肿瘤恶性病变的风险^[9], 而血管生成能力可作为乳腺癌进展的预测指标^[9]。

VEGF 是内皮细胞生长促进因子, 可由机体多种细胞分泌, 是诱导血管生成的重要调控因子, 其在血管生成过程中起到重要的调控作用, 且能促进血管内皮细胞进行有丝分裂。目前在绝大多数肿瘤中可发现 VEGF 存在较强的表达, 且其表达过程是由多因素共同调控完成的。

中医学认为, 乳腺癌的发生与肝、肾、冲任等脏腑经络功能紊乱有关, 肝主疏泄, 肝气舒畅而条达, 情志不畅者, 郁久伤肝, 可导致气机郁滞, 经脉阻塞不通, 蕴结于胃络乳房, 导致经脉不通畅, 久而久之引起乳房疼痛。肝气郁久可导致血流失调, 气滞瘀凝血并聚集成块状, 结滞乳中形成乳癖。根据中医辨证分型将乳腺癌分为痰瘀互结型、肝郁气滞型、冲任失调型。本研究中不同中医证型患者, VEGF、bFGF 阳性表达情况存在差异, 与肝郁气滞型及冲任失调型相比, 痰瘀互结型患者 VEGF、bFGF 阳性表达率较高, 提示 VEGF、bFGF 阳性表达与中医辨证分型存在一定的关系。不同中

医证型患者 MVD 存在差异, 其中痰瘀互结型患者 MVD 水平最高, 提示乳腺癌微血管密度与中医辨证分型具有密切的关系, MVD 水平增加预示着患者病情的进展及恶化。随着患者病理分级增加, 患者 VEGF、bFGF 阳性表达率较高, MVD 值升高, 提示 VEGF、bFGF、MVD 表达强度随着患者病情的恶化而增强, 因此, 可作为乳腺癌患者病情进展的预测指标。

综上所述, 乳腺癌微血管生成与中医分型具有一定的关系, VEGF、bFGF、MVD 的表达情况可作为乳腺癌中医辨证分型及临床病理分级的客观化评定指标。

参考文献

- [1] 王琳, 杜晶, 方华, 等. 乳腺癌超声造影增强特征与肿块大小的相关性研究 [J]. 中国超声医学杂志, 2011, 27 (1): 19-22.
- [2] 余佑林. 乳腺癌中医证候与肿瘤微血管生成特点的关系 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9 (8): 105-106.
- [3] 陆德铭. 中医外科学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社,

1997: 14-116.

- [4] 林毅, 唐汉钧. 现代中医乳房病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 300-351.
- [5] Li C, Li R, Song H, et al. Significance of AEG-1 expression in correlation with VEGF, microvessel density and clinicopathological characteristics in triple-negative breast cancer [J]. J Surg Oncol, 2011, 103 (2): 184-192.
- [6] Syed Khaja AS, Dizayi N, Koppurapu PK, et al. Cyclin A1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor and promotes hormone-dependent growth and angiogenesis of breast cancer [J]. PLoS One, 2013, 8 (8): e72210.
- [7] Georgiou GK, Igglezou M, Sainis I, et al. Impact of breast cancer surgery on angiogenesis circulating biomarkers: a prospective longitudinal study [J]. World J Surg Oncol, 2013, 27 (11): 213-215.
- [8] Wallace JA, Li F, Balakrishnan S. Ets2 in tumor fibroblasts promotes angiogenesis in breast cancer [J]. PLoS One, 2013, 16 (8): 632-634.

The Relevance of Angiogenesis of Breast Cancer to TCM Syndrome Types

WANG Qi, LI Tao, JIANG Jianwei, ZHANG Hongyan

(Zhejiang Cancer Hospital, Zhejiang Province 310022)

ABSTRACT Objective To research the relevance of angiogenesis of breast cancer to TCM syndromes. **Methods**

Totally 96 patients with breast cancer were divided into 38 patients with phlegm-stasis binding together syndrome, 32 patients with liver depression qi stagnation syndrome and 26 patients with thoroughfare-controlling disharmony syndrome. The levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and microvessel density (MVD) in patients with different pathological grades and TCM syndromes were detected by immunohistochemical method. **Results** The positive expression rates of VEGF and bFGF and MVD in patients with phlegm-stasis binding together syndrome were significantly higher than those in patients with liver depression qi stagnation syndrome or thoroughfare-controlling disharmony syndrome ($P < 0.05$). The positive expression rates of VEGF and bFGF and MVD in patients with pathological grade II and III were significantly higher than those in patients with pathological grade I ($P < 0.05$). The positive expression rates of VEGF and bFGF and MVD in patients with pathological grade III were significantly higher than those in patients with pathological grade II ($P < 0.05$). **Conclusion**

The angiogenesis of breast cancer has a certain relationship with TCM syndromes. The expressions of VEGF and bFGF and MVD can be used as the objective assessment indicators for TCM syndrome differentiation and pathological grading of breast cancer.

Keywords breast cancer; microvascular disease; phlegm-stasis binding together syndrome; liver depression qi stagnation syndrome; thoroughfare-controlling disharmony syndrome

(收稿日期: 2014-01-06; 修回日期: 2014-03-10)

编辑: 侯建春