

肿瘤组织中 CD105 标记的微血管密度对 II 期结直肠癌预后价值的临床研究

陈松耀¹, 缪娜波², 李展宇¹, 陈创奇¹, 王天宝³

1. 中山大学附属第一医院胃肠外科中心, 广东 广州 510080

2. 中山大学附属第一医院病理科, 广东 广州 510080

3. 中国医学科学院肿瘤医院深圳医院胃肠外科, 广东 深圳 518116

【摘要】 目的 辅助化疗的取舍是 II 期结直肠癌全程管理中的一个重要组成部分, 目前对辅助化疗的生存获益仍存在较多争议。本研究旨在探讨肿瘤组织中 CD105 标记的微血管密度 (Microvessel density, MVD) 对 II 期结直肠癌预后的影响。**材料与方** 回顾性分析中山大学附属第一医院 2004 年 9 月至 2012 年 7 月胃肠外科中心术后病理确诊为 II 期结直肠癌的病例 160 例, 另选取 10 例正常大肠黏膜组织, 免疫组化检测 CD105-MVD, 比较两者 MVD 的差异。用 Kruskal-Wallis 检验 CD105-MVD 与临床病理因素之间的关系。通过 ROC 曲线将病例划分为 CD105-MVD 高低组。采用 Kaplan-Meier 法分析两组之间预后的差异。使用单因素和多因素 Cox 比例风险回归分析影响患者生存的独立风险因素。**结果** 结直肠癌组织中 CD105-MVD 明显高于正常大肠黏膜组织 ($P < 0.01$)。通过 ROC 曲线发现, CD105-MVD 预测 II 期结直肠癌术后复发转移的界值为 19.9。CD105-MVD 低组较高组更容易出现复发转移。CD105-MVD 与 II 期结直肠癌 T 分期、检获淋巴结数目有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。II 期结直肠癌 CD105-MVD 高低组间的肿瘤相关生存时间比较无显著性统计学差异 ($P = 0.132$), 无病生存时间之间比较虽无显著性差异 ($P = 0.074$), 但提示可能存在较大的差别。对 II 期结直肠癌患者 DFS 行多因素 Cox 分析显示, CD105-MVD ≥ 19.9 ($HR = 0.492$, 95% $CI: 0.268-0.904$, $P = 0.022$)。**结论** 本研究发现肿瘤组织中 CD105-MVD 可能是 II 期结直肠癌患者 DFS 的独立预后因素, 未来需要多中心更大样本研究来证实本研究结果。

【关键词】 CD105; 微血管密度; 预后; II 期结直肠癌

Clinical Study on the Prognostic Value of CD105-labeled Tumor Microvessel Density in Stage II Colorectal Cancer

CHEN Song-yao¹, MIU Na-bo², LI Zhan-yu¹, CHEN Chuang-qi¹, WANG Tian-bao³

1. Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

3. Department of Gastrointestinal Surgery, Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen Center, Shenzhen 518116, China

【Abstract】 **Objectives** The choice of adjuvant chemotherapy is an important part of the overall management of stage II colorectal cancer. The survival benefits of adjuvant chemotherapy still controversial. The purpose of this study was to investigate the prognostic value of CD105-labeled tumor microvessel density (MVD) in stage II colorectal cancer. **Materials and Methods** 160 patients undergoing radical resection surgery for pathological TNM stage II colorectal cancer, between September 2004 to July 2012 in the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, were included. CD105-MVD was detected in 10 normal colorectal mucosa tissues. Kruskal-Wallis test was used to compare the difference of CD105-MVD between normal colorectal mucosa and tumor tissue. Kruskal-Wallis was used to examine the relationship

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2013B090500102)

作者简介: 陈松耀, 在读硕士研究生, E-mail: 11sychen2@sina.com

通讯作者: 王天宝, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: wangtianbao1@163.com

between CD105-MVD and clinicopathological factors. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was made to divide the cases into CD105-MVD high and low groups. We used Kaplan-Meier method to show the differences of prognosis between the two groups. Univariate and multivariate Cox proportional hazards models to analyze independent risk factors affecting patient survival. **Results** CD105-MVD in colorectal cancer tissues was significantly different from that in normal colorectal mucosa tissues ($P < 0.01$). There were no significant differences in gender, size of tumors, T stage, general type of tumors, histological type, differentiation degree, intestinal obstruction between two groups ($P > 0.05$). By making ROC curve, it was found that the threshold value of CD105-MVD for predicting recurrence of stage II colorectal cancer was 19.9. Recurrence were more likely in the lower CD105-MVD group than higher CD105-MVD group. CD105-MVD was significantly correlated with T stage and lymph nodes detected in stage II colorectal cancer ($P < 0.05$). There was no significant difference in CSS ($P = 0.132$) between low CD105-MVD group and high CD105-MVD group in stage II colorectal cancer. Although there was also no significant difference in DFS ($P = 0.074$), it may refer a big difference. Multivariate Cox analysis identified CD105-MVD (≥ 19.9) (HR 0.492, 95% CI : 0.268-0.904, $P = 0.022$) as independent prognostic factors for DFS in patients with stage II colorectal cancer. **Conclusions** This study found that CD105-MVD may be an independent prognostic factor for DFS in patients with stage II colorectal cancer. In the future, a larger multicenter sample study is needed to confirm the results of this study.

【Key words】 CD105; Microvessel density; Stage II colorectal cancer; Prognosis

结直肠癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤。我国结直肠癌的防治现状仍然严峻。2019年国家癌症中心数据统计显示,2015年全年结直肠癌在恶性肿瘤发病率中居于第3位,死亡率居于第5位,对国民健康造成重大影响^[1]。多数患者出现症状而就诊时多已属于中晚期,所以,结直肠癌的早诊早治成为有效防治疾病的重要发展方向,也是当前结直肠癌防治研究的热点。

II期结肠癌患者行根治性手术后5年生存率约为75%^[2],但仍有约15%-20%患者术后会出现复发^[3,4],NCCN指南及国内结直肠癌诊治规范中推荐合并高危因素患者行个体化辅助化疗,以提高患者远期获益。尽管如此,在临床实践中对于II期结直肠癌预后判断仍缺乏有效合适的评价指标。

肿瘤血管生成在肿瘤进展过程中起重要作用,早在1971年,Flokman学者研究已发现肿瘤生长和血管生成的关系:当肿瘤直径达1-2 mm时,肿瘤的进一步生长、浸润,甚至转移取决于肿瘤血管的生成^[5]。CD105是一种新的血管内皮标志物,在肿瘤组织中优先与在肿瘤生长密切相关的血管内皮细胞结合,来进一步调节下游信号通路,来影响肿瘤细胞的生物学行为,因此,CD105在扩增状态下肿瘤血管内皮上强表达,而正常的血管内皮上则基本不表达,具有良好的特异性。CD105促进血管生成机制可能与激活TGF- β 通路有关,激活的TGF- β 信号通路在激活肿瘤相关成纤维细胞

(Cancer-associated Fibroblasts, CAFs)中体现出至为重要的影响^[6]。Romero的一项研究发现在前列腺癌小鼠模型中,CAF_s表达CD105影响肿瘤细胞的生长及转移^[7]。另外,激活的TGF- β 可与T β RII结合,并募集和转磷酸化T β RI(即ALK-5)。TGF- β /ALK-1和TGF- β /ALK-5信号在血管生成中发挥关键功能^[8]。目前CD105与II期结直肠癌的之间的预后关系的相关研究较少,在其标志的微血管密度的预后价值在II期结直肠癌的研究仍有争议且尚需深入研究了解。

本研究通过免疫组化方法检测肿瘤血管内皮标志物CD105标记的MVD表达情况,探讨CD105-MVD对II期结直肠癌预后的影响,预测肿瘤复发转移的倾向,提供一定的预后信息,以期发现潜在高危因素或在高危II期结直肠癌中进一步分层,使更多的高危II期结直肠癌患者在辅助化疗中获益,并密切随访,从而提高患者生存质量,改善预后。

1 资料与方法

1.1 资料

标本来源 2004年9月至2012年7月期间中山大学附属第一医院结直肠癌数据库登记接受根治性外科手术治疗且术后病理分期为TNM II期结直肠癌患者826例(采取第八版UICC发布的恶性肿瘤的TNM分期)。另外,在10例健康志愿者

身上通过电子内窥镜收集正常的大肠黏膜组织作为对照。纳入标准为:(1)就诊于中山大学附属第一医院胃肠外科中心并行根治性外科手术治疗者;(2)术后病理证实为 TNM II 期结直肠癌;(3)术后未出现复发转移者随访时间 ≥ 5 年;(4)临床资料及随访资料完整。排除标准为:(1)术前已接受新辅助化疗;(2)同时性多源癌或合并有其他癌症病史;(3)姑息性切除或局部切除者;(4)非肿瘤相关性死亡。

经纳入标准及排除标准筛选后,术后出现复发转移患者 72 例,选取术后未出现复发转移患者 88 例。所有病理标本均查阅中山大学附属第一医院病理科病理组织标本库查找,挑选肿瘤组织的蜡块并重新制作白片,用以做免疫组化。对照组为 10 例正常的大肠黏膜组织在 HE 染色完成确定无恶变后再行免疫组化检测。

1.2 方法

实验流程:免疫组化方法检测结直肠组织中的 CD105 的微血管密度^[9]。

(1)10 例志愿者大肠黏膜新鲜标本通过常规的病理组织固定、脱水、包埋过程制备蜡块,切片后经 HE 染色后观察显微镜证实为正常的大肠黏膜组织。结直肠癌组织则通过查阅我院病理标本组织库,首先通过病理号找到原手术后制作的玻片,使用显微镜观察原玻片,证实为肿瘤组织并记录玻片编码,再找出原先手术肿瘤组织的蜡块,用以制备白片。

(2)将制备好的白片室温脱蜡、水化,热抗原修复,封闭, Anti-CD105 抗体 EPR10145-12 (ab169545)作为一抗孵育(浓度为 1:200);山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体作为二抗孵育,显色,复染,脱水,透明,中性树胶封片。

结果判读:

CD105 主要在增殖活跃的血管内皮细胞中表达,被染成棕黄色,与背景形成明显对比,阳性细胞在肿瘤组织中分布不均匀,血管腔结构不明显,可见少数菲薄的血管腔结构,部分阳性细胞聚集明显较其他部位多,可视为一个“热点”(hotspot)。MVD 的计算按照 Weidner 法^[10],即一个微血管记为被染成棕黄色的一个内皮细胞或细胞簇,每例标本先于低倍镜(即 100 倍光镜)观察,选择密度高区域(热点),再于 MVD 最高的视野于高倍镜(即 400 倍光镜)下随机计算 5 个视野内的微血管

数目,然后计算其平均数。

1.3 统计学方法 所有数据采用 SPSS 24.0 统计软件分析包分析处理,其中分类资料采用频数表示,定量资料采用均数 \pm 标准差表示($\bar{x}\pm s$),组间比较根据是否符合正态性检验及方差齐性采取 t 检验或 Kruskal-Wallis 检验,无序的分类资料组间差异的比较采用卡方检验(χ^2 检验)。采用 Kaplan-Meier 法分析生存情况, long-rank test 法检验生存率的差异。以术后出现复发转移视作状态变量,制作 ROC 曲线,其中最大 Youden 指数相应 CD105-MVD 值作为 cut-off 值,将 CD105-MVD 低于此临界点定义为低组,将 CD105-MVD 高于临界点定义为高组。将纳入 Cox 回归分析的变量应假定风险比(Hazard Ratio, HR)不随时间变化,即满足比例风险假定(Proportional hazards assumption, PH 假定),将符合要求的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、大体类型、组织学分型、分化程度、T 分期、获检淋巴结数目、是否肠梗阻、CD105-MVD 分组共 11 项变量纳入单因素 Cox 分析中,并把 $P<0.10$ 的因素纳入多因素 Cox 回归分析。检验水准设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

本研究从中山大学附属第一医院胃肠外科中心的数据库中选取 2004 年 9 月至 2012 年 7 月 II 期结直肠癌患者 826 例,经纳入标准及排除标准筛选后共有 160 例纳入本研究。对照组为 10 正常未发生癌变的大肠黏膜组织。

2.1 CD105-MVD 在大肠癌组织与正常大肠组织中的差异比较 在 10 例正常大肠组织中,CD105-MVD 只在间质部分血管内皮中染色,CD105-MVD 为 6.76 ± 0.75 。在 160 例大肠癌组织中 CD105-MVD 在肿瘤间质内的血管内皮上染色较多,且多数细胞簇被染色,CD105-MVD 为 21.54 ± 4.39 。所以,在大肠癌组织中 CD105-MVD 与正常大肠组织中 CD105-MVD 相比,两者有显著性差异($P<0.01$)。(详见图 1、图 2)

2.2 术后无复发转移组与复发转移组的基线资料之间的比较 通过对术后无复发转移组与复发转移组的基线资料之间的比较。我们发现本组资料 II 期结直肠癌的复发转移与性别($P=0.171$)、肿瘤大小($P=0.909$)、T 分期($P=0.212$)、肿瘤的大体类别($P=0.238$)、组织学分型($P=0.694$)、分化程度($P=0.455$)、是否肠梗阻($P=0.398$)无明显统计学

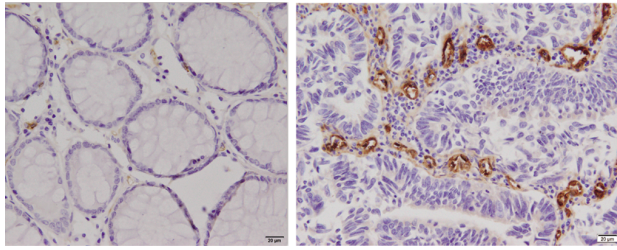


图1 CD105在正常大肠黏膜组织中的表达(400X)

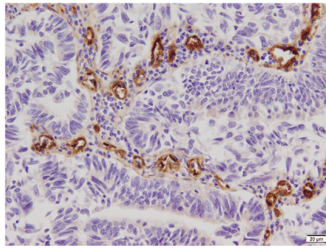


图2 CD105在结直肠癌组织中的表达(400X)

差异,但与年龄、肿瘤部位、淋巴结获检数目、是否高危方面有统计学差异($P<0.05$)。(详见表1)

可见,曲线下面积(Area Under Curve, AUC)=0.601, $P=0.028$,最大约登指数为:0.213(特异性=0.727; 敏感度=0.486, 相对应 CD105-MVD 值为19.9)。因此,将 CD105-MVD 高于 19.9 定义为高组,将 CD105-MVD 低于 19.9 定义为低组。

2.3 CD105-MVD 与临床病理因素之间的关系 通过对 CD105-MVD 与总体资料的基线资料之间的比较。我们发现 CD105-MVD 的高低与性别 ($P=0.219$)、年龄($P=0.099$)、肿瘤部位($P=0.642$)、肿瘤大小($P=0.144$)、肿瘤的大体类别($P=0.618$)、组织学分型($P=0.855$)、分化程度($P=0.861$)、是否肠梗阻($P=0.223$)、是否高危($P=0.134$)方面无明显统计学差异($P>0.05$),但与 T 分期、淋巴结获检数目方面有显著性统计学差异($P<0.05$)。(详见表2)

2.4 CD105-MVD 对患者预后的影响 CD105-MVD 高低组对 II 期结直肠癌患者术后生存的影响使用 Kaplan-Meier 生存分析表示(详见图4)。CD105-MVD 高组患者的 5 年 CSS 与 CD105-MVD 低组患者无显著性统计学差异(77.7% vs. 64.7%, $P=0.132$)。同样,在 CD105-MVD 高组患者的 5 年 DFS 与 CD105-MVD 低组患者相比无显著性统计学差异(75.5% vs. 61.1%, $P=0.074$)。

2.5 CD105-MVD 对高危 II 期结直肠癌预后的影响 在 高危亚组中,CD105-MVD 高组患者与 CD105-MVD 低组患者的 5 年 CSS 无显著性统计学差异(74.6% vs. 58.7%, $P=0.124$)(详见图2), CD105-MVD 高组患者与 CD105-MVD 低组患者的 DFS 无显著性统计学差异(71.2% vs. 53.8%, $P=0.084$)(详见图5)。

2.6 CD105-MVD 对低危 II 期结直肠癌预后的影响 在低危亚组中,CD105-MVD 高组患者与 CD105-MVD 低组患者的 5 年 CSS 无统计学差异

表1 160例II期结直肠癌患者术后复发转移情况的临床资料比较

基线资料	无复发组 (n=88)	复发组 (n=72)	P 值
性别			0.171
男	43	43	
女	45	29	
年龄			0.034
>60岁	62	39	
≤60岁	26	33	
肿瘤部位			0.003
左半结肠	33	25	
右半结肠	35	14	
直肠	20	33	
肿瘤大小			0.909
≤5cm	53	44	
>5cm	35	28	
T 分期			0.212
T3	72	53	
T4	16	19	
淋巴结获检数目			<0.001
<12	23	41	
≥12	65	31	
大体类别			0.238
肿块型	37	22	
浸润型	42	38	
溃疡型	9	12	
组织学分型			0.694
绒毛状腺瘤/管状腺瘤	81	65	
粘液腺癌	7	7	
分化程度			0.455
低级别	77	60	
高级别	11	12	
是否肠梗阻			0.398
是	18	11	
否	70	61	
是否高危*			0.004
是	55	60	
否	33	12	
CD105-MVD 平均值	22.17±4.21	20.77±4.52	0.028

* 高危指合并低级别、T4、淋巴结获检数不足(少于12枚)、肠梗阻其中之一者。

(87.5% vs. 75.9%, $P=0.372$)(详见图3), CD105-MVD 高组患者与 CD105-MVD 低组患者的 5 年 DFS 也无统计学差异(87.5% vs. 74.1%, $P=0.298$)(详见图6)。

2.7 II 期结直肠癌患者的 CSS 单因素和多因素 Cox 分析 上述统计显示,CD105-MVD 对 II 期结直肠癌患者的 CSS 无统计学意义($P=0.132$)。进一

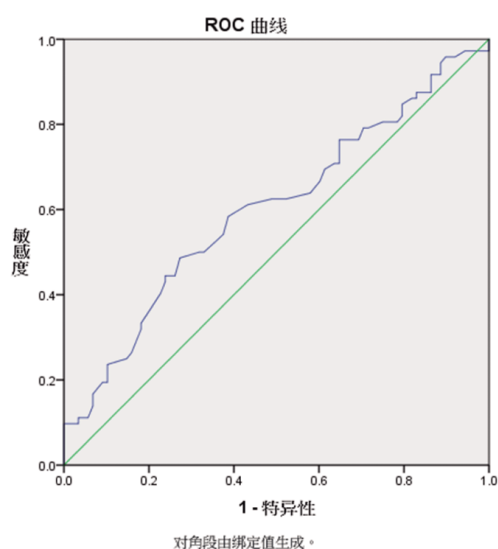


图3 以 CD105-MVD 预测出现复发转移作为状态变量绘制 ROC 曲线

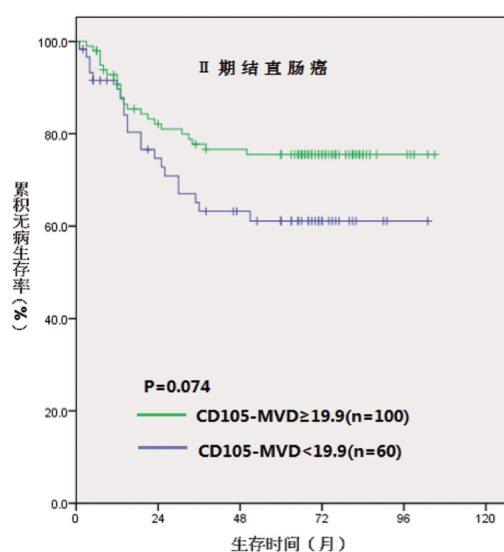
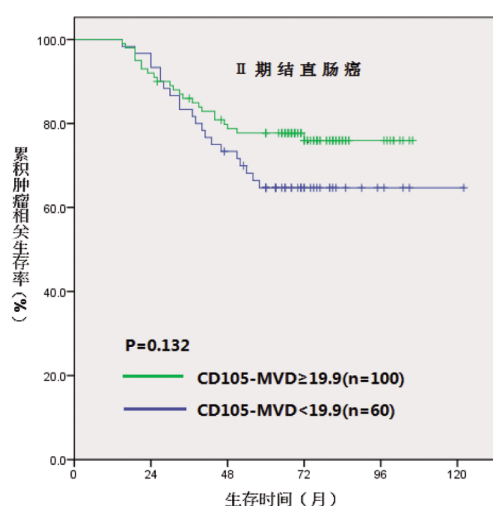


图4 CD105-MVD 对 II 期结直肠癌 CSS(左图)和 DFS(右图)的差异比较

表2 160例结直肠癌患者 CD105-MVD 与临床病理因素之间的关系

基线资料	CD105-MVD 低组 (n=60)	CD105-MVD 高组 (n=100)	P 值
性别			0.219
男	36	50	
女	24	50	
年龄			0.099
>60 岁	33	68	
≤60 岁	27	32	
肿瘤部位			0.642
左半结肠	20	38	
右半结肠	21	28	
直肠	19	34	
肿瘤大小			0.144
≤5 cm	32	65	
>5 cm	28	35	
T 分期			0.002
T3	39	86	
T4	21	14	
淋巴结获检数目			0.020
<12	17	47	
≥12	43	53	
大体类别			0.618
肿块型	20	39	
浸润型	33	47	
溃疡型	7	14	
组织分型			0.885
绒毛状腺癌/管状腺癌	55	91	
粘液腺癌	5	9	
分化程度			0.861
低级别	51	86	
高级别	9	14	
是否肠梗阻			0.223
是	8	21	
否	52	79	
是否高危			0.134
是	39	76	
否	21	24	

步行单因素 Cox 分析提示, 与 CSS 相关的因素有肿瘤部位 ($P < 0.05$), 而淋巴结数目 ($P = 0.063$) 则非预后因素, 但满足 $P < 0.10$, 也将其纳入至 CSS 的多因素 Cox 回归分析中。

多因素 Cox 回归分析显示, 影响 DFS 的独立预后因素有淋巴结数目 ≥ 12 个 ($HR = 0.466, 95\% CI: 0.256 \sim 0.846, P = 0.012$), 直肠部位肿瘤 ($HR = 2.569, 95\% CI: 1.047 \sim 6.300, P = 0.039$), (详见表 3)。

2.8 高危 II 期结直肠癌患者的 CSS 单因素和多因素 Cox 分析 上述统计显示, CD105-MVD 对高

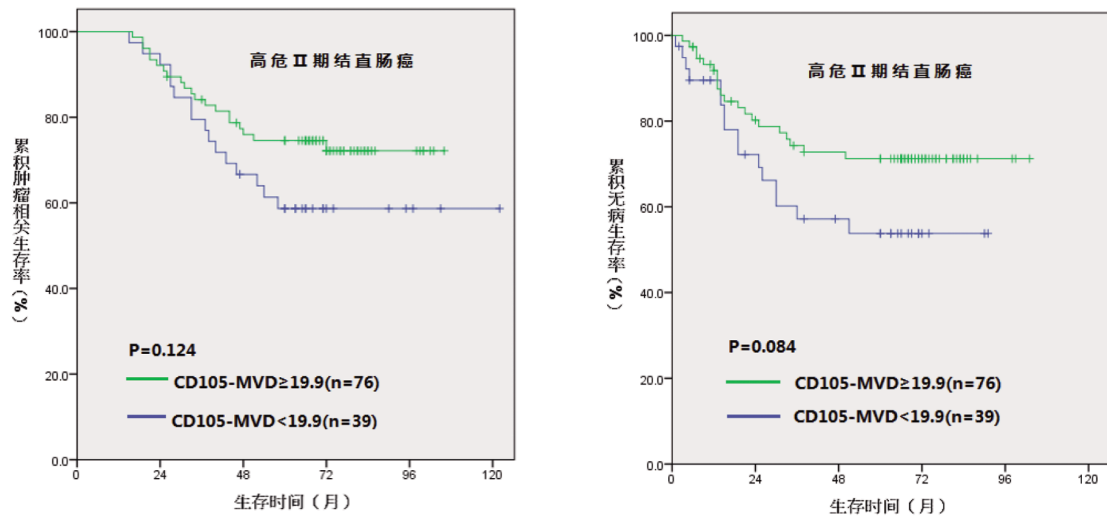


图5 CD105-MVD对高危II期结直肠癌CSS(左图)和DFS(右图)的差异比较

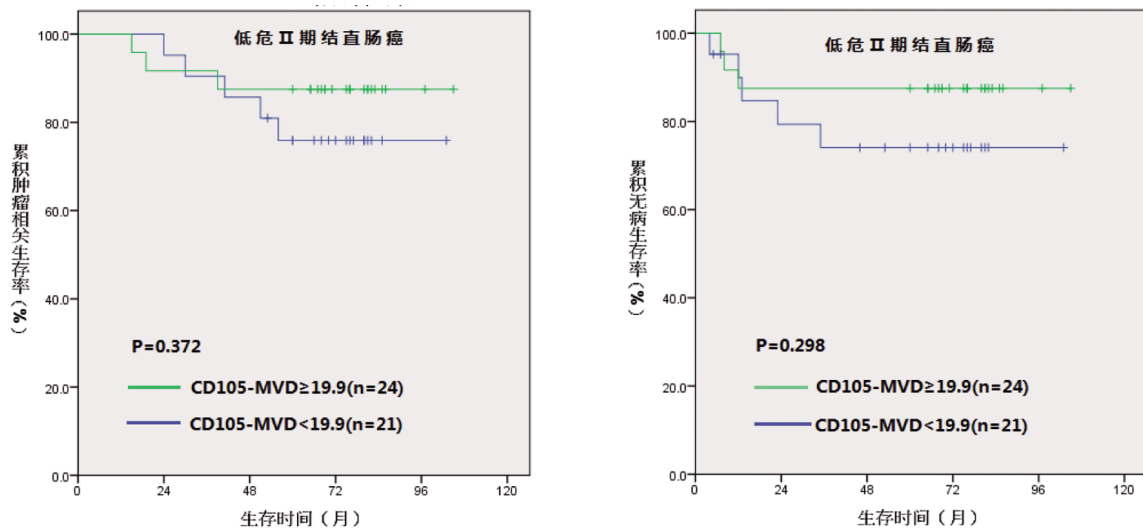


图6 CD105-MVD对低危II期结直肠癌CSS(左图)和DFS(右图)的差异比较

危II期结直肠癌患者的CSS无统计学意义($P=0.124$)。进一步行单因素Cox分析提示,并无与高危II期结直肠癌CSS相关的因素(均 >0.10)。故未做进一步多因素Cox分析(详见表4)。

2.9 II期结直肠癌和高危II期结直肠癌患者DFS的单因素及多因素Cox分析 上述统计显示,CD105-MVD对II期结直肠癌患者和高危II期结直肠癌患者的DFS无显著性统计学差异(分别为 $P=0.074$, $P=0.084$)。进一步行单因素Cox分析提示,与DFS相关的因素有肿瘤部位、淋巴结获检数目($P<0.05$),而大体类型($P=0.098$)和CD105-MVD($P=0.070$)则非预后因素,但考虑到上述4个变量均满足 $P<0.10$,因而都纳入到DFS的多因素Cox回归中;在低危II期结直肠癌DFS相关的因

素是大体类型($P=0.039$),而淋巴结获检数目($P=0.063$)虽非预后因素,但满足 $P<0.10$,亦将其纳入多因素Cox回归中。

多因素Cox回归分析显示,影响II期结直肠癌DFS的独立预后因素有淋巴结获检数目 ≥ 12 个($HR=0.495$, $95\%CI: 0.258\sim 0.948$, $P=0.034$),CD105-MVD ≥ 19.9 ($HR=0.492$, $95\%CI: 0.268\sim 0.904$, $P=0.022$), (详见表5)。

在高危II期结直肠癌DFS方面,影响期预后的独立因素是淋巴结获检数目 ≥ 12 个($HR=0.465$, $95\%CI: 0.228\sim 0.946$, $P=0.035$)。(详见表6)。

3 讨论

虽然外科根治性切除是II期结直肠癌的有效

表3 II期结直肠癌患者CSS的影响因素分析(n=160)

变量	单因素 Cox 分析		多因素 Cox 分析	
	HR (95%CI)	P 值 [#]	HR (95%CI)	P 值 [#]
性别	男	-		
	女	0.598(0.309-1.154)	0.125	
年龄	>60岁	-		
	≤60岁	1.009(0.535-1.904)	0.978	
肿瘤部位	右半结肠	-		
	左半结肠	1.962(0.773-4.980)	0.103	-
	直肠	2.791(1.081-7.193)	0.156	2.025(0.828-4.955)
肿瘤大小	≤5cm	-		
	>5cm	1.047(0.540-2.031)	0.034	2.569(1.047-6.300)
T 分期	T3	-		
	T4	0.986(0.464-2.096)	0.986	
淋巴结获检数目	<12个	-		
	≥12个	0.536(0.278-1.034)	0.063	-
大体类型	肿块型	-		
	浸润型	1.582(0.747-3.349)	0.375	
	溃疡型	1.874(0.713-4.925)	0.231	
组织学分型	绒毛状腺/管状癌	-		
	粘液腺癌	1.395(0.307-6.335)	0.203	
分化程度	高/中分化	-		
	低分化	1.291(0.385-4.334)	0.667	
肠梗阻	无	-		
	有	1.443(0.635-3.279)	0.381	
CD105-MVD	<19.9	-		
	≥19.9	0.597(0.308-1.160)	0.128	0.466(0.256-0.846)

[#] P<0.05 视为具有统计学差异; 单因素 Cox 回归分析纳入的变量均满足比例风险假定, 多因素 Cox 回归分析仅纳入单因素分析 P<0.10 的变量

的治疗方法之一, 但早期识别 II 期高危复发转移患者显得尤为重要。影响恶性肿瘤患者术后近远期生存的主要原因是肿瘤出现复发或转移, 但 II 期结直肠癌术后出现复发转移的机制至今尚未充分明确。

CD105(Endoglin)作为一种新型的细胞黏附分子, 参与 TGF-β 特异性结合, 完成内皮-间质的信号通路传导, 参与肿瘤新生血管的生成^[11]。CD105 标记肿瘤新生血管内皮细胞增殖能力活跃, CD105-MVD 可以反映肿瘤的增殖活性。近年来, CD105 标记的 MVD 的意义在消化道肿瘤中已被广泛研究^[12-15]。Saad RS 等研究也表明, CD105 标记的 MVD 数量与血管淋巴浸润、淋巴结转移、肝转移呈正相关, 是结直肠癌的一个重要预后因素^[16]。CD105 标记肿瘤新生血管相比传统的血管内皮标志物(如 CD31、CD34、vWF、VEGF)的预后价值要高^[17-19]。然而, 国内外文献有关 CD105-MVD 与 II 期结直肠癌的预后关系未充分阐明。我们的研究

中显示 II 期结直肠癌中的 CD105-MVD 比正常大肠组织高, 两者存在统计学差异 (P<0.001), 说明 CD105 是评估结直肠癌新生血管的一个有效标志物; 并且本研究显示 160 例 II 期结直肠癌术后复发转移组的 CD105-MVD 平均值与无复发转移组相比有统计学差异 (20.77±4.52 vs. 22.17±4.21, P=0.028), 因此本研究认为 CD105-MVD 与 II 期结直肠癌术后出现复发转移相关。

使用 CD105-MVD 预测 II 期结直肠癌术后复发转移, 本研究中得出的截点为 19.9, 并且发现低于 19.9 患者更容易出现复发转移, 此时的 AUC=0.601, P=0.028, 最大约登指数为: 0.213 (特异性=0.727; 敏感度=0.486)。既往文献回顾中, 也报道过 CD105-MVD 高低与患者的复发转移呈负相关的情况。Martinović Ž 等人研究在 CD105-MVD 与 II 期直肠癌关系时发现, CD105-MVD 低组的总体生存率显著低于 CD105-MVD 高组^[20], CD105-MVD 低组术后复发率明显高于 CD105-MVD 高

表4 高危Ⅱ期结直肠癌 CSS 的影响因素分析($n=115$)

变量	单因素 Cox 分析		多因素 Cox 分析	
	HR (95%CI)	P 值 [#]	HR (95%CI)	P 值 [#]
性别	男	-		0.248
	女	0.651(0.315-1.349)		
年龄	>60 岁	-		0.543
	≤60 岁	1.240(0.621-2.475)		
肿瘤部位	右半结肠	-		0.262
	左半结肠	2.381(0.803-7.059)		0.118
	直肠	2.352(0.761-7.262)		0.137
肿瘤大小	≤5cm	-		0.696
	>5cm	0.858(0.398-1.851)		
T 分期	T3	-		0.866
	T4	0.932(0.408-2.126)		
淋巴结获检数目	<12 个	-		0.204
	≥12 个	0.574(0.244-1.351)		
大体类型	肿块型	-	-	0.288
	浸润型	1.927(0.798-4.653)		0.145
	溃疡型	2.166(0.716-6.556)		0.171
组织学分型	绒毛状腺/管状癌	-		0.655
	粘液腺癌	1.427(0.300-6.780)		
分化程度	高/中分化	-		0.569
	低分化	1.443(0.409-5.082)		
肠梗阻	无	-		0.645
	有	1.225(0.517-2.906)		
CD105-MVD	<19.9	-		0.227
	≥19.9	0.633(0.302-1.329)		

[#] $P<0.05$ 视为具有统计学差异; 单因素 Cox 回归分析纳入的变量均满足比例风险假定, 多因素 Cox 回归分析仅纳入单因素分析 $P<0.10$ 的变量

组, 与本研究结果相似^[21]。类似地, Uribarrena A 等人的研究显示, 在 Dukes A 期和 Dukes B 期结直肠癌中, 在 CD34-MVD 高者与患者预后较好相关, 但 CD34-MVD 与肿瘤的进展无统计学意义^[22]。但陈映波等人研究结果发现直肠癌肿瘤组织中 MVD 越高, 其术后出现复发转移的风险越高^[23]。一些研究得出的结论也显示, CD105-MVD 是结直肠癌肿瘤进展的一个促进因素^[24,25]。有关 CD105-MVD 对Ⅱ期结直肠癌预后价值目前尚存在争议, 而本研究结果显示, CD105-MVD 低组的Ⅱ期结直肠癌术后更容易出现复发转移。这或许可以从先前的研究中得到启示。在 CS Craft 等人的研究中表明, CD105 通过激活 ALK2-Smad1 通路抑制前列腺癌细胞的活动能力, CD105 的表达缺失则会促进癌细胞侵袭和转移^[26]。另外也有研究表明, CD105 的表达缺失可能会削弱内皮细胞屏障, 使肿瘤细胞更容易发生扩散和转移, 导致肿瘤进展^[27]。CD105 是 TGF- β 蛋白受体超家族成员之一, 可与

Ⅱ型 TGF- β 受体和 I 型 TGF- β 受体结合, 激活下游信号转导通路, 进一步激活 ALK, 进而磷酸化 Smad 蛋白, 参与调节血管内皮细胞的增殖、迁徙和血管管腔形成过程。本研究有待从 CD105 导致Ⅱ期结直肠癌术后出现进展机制方面进一步深入, 从而探究Ⅱ期结直肠癌的生物学特性。

本研究通过比较 CD105-MVD 与本组资料的临床病理因素的关系, 我们发现 CD105-MVD 与 T 分期及淋巴结检出数目显著相关。Goldiş DS 等人的研究结果亦提示 CD105-MVD 与 T 分期及淋巴结数目密切相关^[28]。T 分期显示肿瘤浸润的深度, T3、T4 区别于有无浆膜外浸润, 我们的统计结果显示, T3 分期的病人相比 T4 的病人肿瘤组织中的 CD105-MVD 平均值要高, 但并不能完全解释这两者中 CD105 表达差异的原因。对于Ⅱ期结直肠癌的 CD105-MVD 在 T3、T4 表达差异的研究相对较少。Hansen TF^[29] 等人研究Ⅱ期结直肠癌 CD105-MVD 时发现, T3、T4 两组患者中的 CD105-

表5 II期结直肠癌患者DFS的影响因素分析($n=160$)

变量	单因素 Cox 分析		多因素 Cox 分析	
	HR (95%CI)	P 值 [#]	HR (95%CI)	P 值 [#]
性别	男	-		
	女	0.627(0.325-1.211)	0.165	
年龄	>60岁	-		
	≤60岁	1.195(0.629-2.272)	0.586	
肿瘤部位	右半结肠	-	-	0.097
	左半结肠	1.868(0.734-4.752)	0.190	1.835(0.735-4.580)
	直肠	2.918(1.117-7.623)	0.029	2.708(1.078-6.801)
肿瘤大小	≤5cm	-		
	>5cm	1.033(0.538-1.983)	0.923	
T 分期	T3	-		
	T4	0.949(0.452-1.994)	0.890	
淋巴结获检数目	<12个	-	-	0.034
	≥12个	0.490(0.254-0.946)	0.495(0.258-0.948)	
大体类型	肿块型	-	-	0.310
	浸润型	1.893(0.854-4.195)	0.116	1.504(0.746-3.036)
	溃疡型	2.276(0.860-6.021)	0.098	1.969(0.796-4.870)
组织学分型	绒毛状腺/管状癌	-		0.855
	粘液腺癌	1.147(0.263-4.997)		
分化程度	高/中分化	-		0.402
	低分化	1.689(0.496-5.752)		
肠梗阻	无	-		0.460
	有	1.361(0.602-3.077)		
CD105-MVD	<19.9	-	-	0.022
	≥19.9	0.545(0.283-1.051)	0.492(0.268-0.904)	

[#] $P<0.05$ 视为具有统计学差异; 单因素 Cox 回归分析纳入的变量均满足比例风险假定, 多因素 Cox 回归分析仅纳入单因素分析 $P<0.10$ 的变量

MVD 的中位数无显著性差异(10.3(10.0-11.3) vs. 10.3(10.0-10.7), $P=0.59$)。本研究结果显示淋巴结数目≥12患者中 CD105-MVD 比淋巴结数目<12患者低, 对术后淋巴结检出情况而言, 检出数目越多, 术后病理分期越准确。我们的结果可能提示淋巴结检出数目<12患者中, 部分实际上可能是Ⅲ期患者。

在本研究中, CD105-MVD 高低差异在患者的肿瘤相关生存时间上均无显著性统计学差异 ($P=0.132$)。CD105-MVD 高低在 DFS 上亦无显著性统计学差异 ($P=0.074$), 但 P 值小于 0.1, 提示两者 DFS 可能存在较大差别。与本研究结果类似的, Hansen TF 等人的研究发现 CD105-MVD 对 II 期结直肠癌患者的总体生存及肿瘤相关生存时间并无影响^[29]。肿瘤的进展是一个复杂、动态的过程, 某一时点的肿瘤血管数量虽可在一定程度上反映肿瘤血管状况, 对预后有一定的预判价值, 但不能完全反映驱动肿瘤进展的实际原因及进展后的

肿瘤内血管数量变化情况。本研究结果显示, CD105-MVD 低组患者的临床结局更差, 提示从 CD105 角度着手干预 II 期结直肠癌患者有可能有助于改善患者临床结局。进一步亚组分析提示, 高危 II 期结直肠癌的 CD105-MVD 高低组的 CSS 及 DFS 均无统计学差异(分别为 $P=0.124$, $P=0.084$)。同样, CD105-MVD 高低在高危 II 期 DFS 比较亦未显示出显著性差异, 但 P 值小于 0.1, 提示两者 DFS 可能存在较大差别。由于本研究是单中心回顾性研究, 存在一定的选择偏倚, 且样本量偏少, 使得 CD105-MVD 与 DFS 间比较中未有显著性统计学差异, 但提示 CD105-MVD 高低可能导致两者 DFS 存在较大差别, 行单因素及多因素 Cox 分析显示, CD105-MVD 低组是可能 DFS 的独立危险因素, 但不是高危患者的预后的独立危险因素。

本研究通过对术后复发转移组患者的生存分析显示, 高危患者和低危患者的肿瘤相关生存时间、无病生存时间均无显著性差异。进一步分层分

表6 高危Ⅱ期结直肠癌 DFS 的影响因素分析($n=115$)

变量	单因素 Cox 分析		多因素 Cox 分析	
	HR (95%CI)	P 值 [#]	HR (95%CI)	P 值 [#]
性别	男	-		0.298
	女	0.681(0.331-1.404)		
年龄	>60 岁	-		0.264
	≤60 岁	1.496(0.739-3.029)		
肿瘤部位	右半结肠	-		0.332
	左半结肠	2.102(0.701-6.307)		0.185
	直肠	2.374(0.752-7.492)		0.140
肿瘤大小	≤5cm	-		0.636
	>5cm	0.833(0.390-1.778)		
T 分期	T3	-		0.980
	T4	0.990(0.436-2.248)		
淋巴结获检数目	<12 个	-		0.063
	≥12 个	0.445(0.190-1.046)	0.465(0.228-0.946)	0.035
大体类型	肿块型	-		0.129
	浸润型	2.773(1.055-7.284)	1.974(0.873-4.466)	0.102
	溃疡型	3.089(0.986-9.676)	2.709(0.980-7.488)	0.055
组织学分型	绒毛状腺/管状癌	-		0.821
	粘液腺癌	1.188(0.267-5.293)		
分化程度	高/中分化	-		0.224
	低分化	2.255(0.267-5.293)		
肠梗阻	无	-		0.724
	有	1.167(0.495-2.752)		
CD105-MVD	<19.9	-		0.215
	≥19.9	0.623(0.295-1.315)		

[#] $P<0.05$ 视为具有统计学差异; 单因素 Cox 回归分析纳入的变量均满足比例风险假定, 多因素 Cox 回归分析仅纳入单因素分析 $P<0.10$ 的变量

析显示, 高危患者中, CD105-MVD 高低差异对患者的肿瘤相关生存和无病生存无显著性差异。结果提示, 本组资料中, 复发转移组患者高危、低危患者两者生存无显著差异, 反映辅助化疗在本组病人中无显著获益; 高危因素联合 CD105-MVD 考虑并不能改善病人的远期预后。这可能是由于原始资料本身差异导致。这与 Booth CM 的大样本(共 2488 例)研究结果相似^[30]。Loree JM 的研究结果显示高危Ⅱ期结直肠癌患者辅助化疗仅能在其中一部分人群中获益^[31]。

本研究得出 CD105-MVD 与 T 分期、获检淋巴结数目相关, 且 CD105-MVD 低组患者更容易出现复发转移。这可能需要从 CD105 的功能及导致肿瘤进展的机制上进一步解释, 且Ⅱ期结直肠癌术后出现复发转移的生物学特性未充分阐明, 这为后续Ⅱ期结直肠癌与 CD105 的研究提供指导方向。NCCN 和 ESMO 指南上定义的高危Ⅱ期结直肠癌在临床实践中发现并不能准确预测患者的

临床结局。随着肿瘤血管生成有关的研究逐渐增多, 肿瘤血管生成影响肿瘤的生物行为的神秘面纱也逐渐被揭开。本研究 CD105-MVD 可为Ⅱ期结直肠癌术后复发转移倾向提供参考价值及提供研究方向。本研究发现肿瘤组织中 CD105-MVD 可能是Ⅱ期结直肠癌患者 DFS 的独立预后因素, 未来需要多中心更大的样本研究来证实本研究的结果。

Ⅱ期结直肠癌属中期结直肠癌, 以手术治疗、辅助化疗为首的综合治疗措施是最重要的组成部分, 以多学科团队(Multidisciplinary Team, MDT)诊疗模式的开展对结直肠癌的诊疗质量严格把控。尽管指南上建议合并高危因素者推荐行辅助化疗, 但总体来说获益人群不超过 5%, 目前总体上仍缺乏有效、准确的预测因子, 盲目地对其行辅助化疗不仅增加国家及患者家庭的经济负担, 而且使患者蒙受不必要的化疗副反应。随着科技及医学技术的发展, 循证医学证据被广泛的应用, 临

床因素、病理类型及分子基因三结合将会引导Ⅱ期结直肠癌向更精准的治疗方向发展。

参考文献

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41: 19-28
- [2] Dotan E, Cohen SJ. Challenges in the management of stage II colon cancer[J]. Semin Oncol, 2011, 38(4): 511-520.
- [3] O'Connor ES, Greenblatt DY, LoConte NK, et al. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(25): 3381-3388.
- [4] 陈创奇, 方乐堃, 马晋平, 等. 结直肠癌 2042 例临床病理特点及预后回归分析[J]. 中华医学杂志, 2010, 90: 1804-1807.
- [5] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [6] De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion[J]. J Pathol, 2003, 200(4): 429-447.
- [7] Romero D, O'Neill C, Terzic A, et al. Endoglin Regulates Cancer-Stromal Cell Interactions in Prostate Tumors[J]. Cancer Research, 2011, 71(10): 3482-3493.
- [8] Massague J, Gomis RR. The logic of TGF beta signaling[J]. Febs Letters, 2006, 580(12): 2811-2820.
- [9] Cates JM, Troutman KA, Jr. Quality Management of the Immunohistochemistry Laboratory: A Practical Guide [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015, 23(7): 471-480.
- [10] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.
- [11] Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy [J]. Anticancer Res, 2011, 31(6): 2283-2290.
- [12] Numakura S, Uozaki H, Kikuchi Y, et al. Mesenchymal Stem Cell Marker Expression in Gastric Cancer Stroma [J]. Anticancer Res, 2019, 39(1): 387-393.
- [13] Kimura Y, Morohashi S, Yoshizawa T, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor, thymidine phosphorylase and microvessel density in colorectal cancer[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1551-1557.
- [14] 任红, 樊静, 康文喜, 等. 大肠癌组织中 CD105、CD146 的表达及转移的研究 [J]. 中国医刊, 2011, 46: 57-59
- [15] 李颖超, 张观宇, 许立莉. CD105 和 VEGF 在大肠癌中的表达及意义 [J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(36): 8878-8878.
- [16] Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer[J]. Mod Pathol, 2004, 17(2): 197-203.
- [17] Miyata Y, Sagara Y, Watanabe S, et al. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34 [J]. Virchows Archiv, 2013, 463(5): 673-679.
- [18] Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, et al. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance [J]. World Journal of Gastroenterology, 2003, 9(12): 2866-2869.
- [19] Rau KM, Huang CC, Chiu TJ, et al. Neovascularization evaluated by CD105 correlates well with prognostic factors in breast cancers [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2012, 4(2): 231-236.
- [20] Martinovic Z, Kovac D, Martinovic M. Prognostic Significance of Microvessel Density Determining by Endoglin in Stage II Rectal Carcinoma: A Retrospective Analysis [J]. Gastroenterol Res Pract, 2015, 2015: 504179.
- [21] Martinovic Z, Kovac D, Martinovic C. Recurrences in stage II rectal carcinoma after curative resection alone: from the viewpoint of angiogenesis[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14: 122.
- [22] Uribarrena AR, Ortego J, Fuentes J, et al. Prognostic value of microvascular density in dukes a and B (t1-t4, n0, m0) colorectal carcinomas[J]. Gastroenterol Res Pract, 2009, 2009: 679830.
- [23] 陈映波, 万德森, 詹友庆, 等. 直肠癌微血管密度与转移、复发的关系 [J]. 癌症, 2004, 23: 1203-1206
- [24] Deliu IC, Neagoe CD, Bezna M, et al. Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma [J]. Rom J Morphol Embryol, 2016, 57 (3): 1025-1030.
- [25] Mohamed SY, Mohammed HL, Ibrahim HM, et al. Role of VEGF, CD105, and CD31 in the Prognosis of Colorectal Cancer Cases[J]. J Gastrointest Cancer, 2017.
- [26] Craft CS, Romero D, Vary CPH, et al. Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway[J]. Oncogene, 2007, 26(51): 7240-7250.
- [27] Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination[J]. J Exp Med, 2013, 210(3): 563-579.
- [28] Goldis DS, Sferdian MF, Tarta C, et al. Comparative analysis of microvessel density quantified through the immunohistochemistry expression of CD34 and CD105 in rectal cancer [J]. Rom J Morphol Embryol, 2015, 56(2): 419-424.
- [29] Hansen TF, Kjaer-Frifeldt S, Morgenthaler S, et al. The prognostic value of microRNA-126 and microvessel density in patients with stage II colon cancer: results from a population cohort[J]. J Transl Med, 2014, 12: 254.
- [30] Booth CM, Nanji S, Wei X, et al. Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer: Practice Patterns and Effectiveness in the General Population[J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2017, 29(1): e29-e38.
- [31] Loree JM, Kennecke HF, Renouf DJ, et al. Effect of Adjuvant Chemotherapy on Stage II Rectal Cancer Outcomes After Preoperative Short-Course Radiotherapy [J]. Clin Colorectal Cancer, 2016, 15(4): 352-359 e351.