

综上所述,因对接受肾穿刺的患者采用干预护理可有效预防血肿和感染的发生,降低相关并发症的发生率,有助于患者的恢复同时提高患者的生存质量,可在临床中推广使用。

参考文献

[1] 张颖. 护理干预对行肾穿刺活检术患者的影响[J]. 中国实用护理杂志, 2010, 26(13): 25-25.
 [2] 林萍, 卞淑芬, 王丽娟, 等. 临床护理路径在成人肾穿刺活检术中的应用[J]. 中华现代护理杂志, 2012, 18(29): 3511-3513.
 [3] 尹华, 欧阳涵, 王赞. 纽曼系统护理模式对 B 超引导下肾穿刺活检术患者术前焦虑及术后并发症的影响[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(7): 891-892.
 [4] 程光敏. 规范化护理在肾脏穿刺活检术患者中的应用[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(1): 120-121.
 [5] 龚乐为. 术前模拟训练配合床边护理在肾穿刺活检术护理的应用[J]. 吉林医学, 2014, 35(29): 6604-6605.
 [6] 张杰, 张金萍. 渐进性舒适训练对老年肾穿刺术患者的干预研究[J]. 护理管理杂志, 2010, 10(7): 513-514.

[7] 罗晓英, 简讯, 刘静梅. 超声引导下经皮肾穿刺活检术的护理[J]. 护理研究, 2011, 25(29): 2666-2667.
 [8] 范艳华, 李丽华, 夏蓉, 等. 原发性肾病综合征并发特发性急性肾损伤的临床及病理分析[J]. 广西医学, 2013, 35(3): 327-328.
 [9] 蒋毓柏, 李伍荣, 何锦明, 等. 微创经皮肾镜取石术并发症分析[J]. 广西医学, 2013, 35(3): 349-350.
 [10] LORENZ E C, SETHI S, POSHUSTA T L, et al. Renal failure due to combined cast nephropathy, amyloidosis and light-chain deposition disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(4): 1340-1343.
 [11] TSAI S F, WEN M C, CHENG C H, et al. Clinical features of renal amyloidosis; an analysis of 40 patients in a 28-year follow-up [J]. Intern Med, 2011, 50 (21): 2511-2517.
 [12] 张育安. 肾淀粉样变性病的肾脏病理损伤研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2013, 33(2): 264-270.

(收稿日期: 2017-08-24 修回日期: 2017-10-10)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 05. 048

拟血管生成在口腔鳞状细胞癌中的初步研究

闫明¹, 冯红超^{2△}, 许华³, 张伟⁴, 李丽艳⁵

(1. 河北省眼科医院口腔颌面外科, 河北邢台 054000; 2. 贵州省贵阳市口腔医院口腔颌面外科 550000; 河北省眼科医院; 3. 口腔内科; 4. 眼外伤科; 5. 科教科, 河北邢台 054000)

摘要:目的 探讨口腔鳞状细胞癌(OSCC)中是否存在拟血管生成(VM), 以及其临床意义。方法 使用 CD31、过碘酸雪夫染色(PAS)双染技术对 42 例经手术切除的 OSCC 标本进行染色, 观察是否存在 VM 结构, 并描述其形态。结果 CD31 和 PAS 双染结果显示 OSCC 中存在 VM; 在 42 例 OSCC 标本中, 15 例标本 VM 阳性(35.71%)。其在光镜下表现为: 肿瘤细胞构成了管道样结构, 此结构中无血管性内皮细胞参与, 部分管腔与肿瘤细胞之间有一层 PAS 染色阳性的物质。在这些管道中可以找到红细胞。病理分级为 I 级的患者中有 1 例 VM 生成[14.28%(1/7)], II 级患者中有 6 例 VM 生成[30.00%(6/20)]; III 级患者中有 8 例 VM 生成[53.33%(8/15)]。秩和检验结果提示, 病理分级恶性程度越高, VM 阳性率也越高, 差异具有统计学意义($Z=2.193, P=0.028$)。在 16 例颈淋巴结转移患者中, VM 阳性 11 例; 在 27 例无淋巴结转移的患者中, VM 阳性 5 例。OSCC 发生颈淋巴结转移的患者其 VM 阳性率更高, 差异有统计学意义($\chi^2=12.286, P<0.01$)。结论 OSCC 患者中存在 VM, 且 OSCC 中有 VM 的存在更易发生颈淋巴结转移。

关键词: 拟血管生成; 口腔鳞状细胞癌; 双重染色技术

中图法分类号: R780.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)05-0716-04

实体肿瘤在生长和血行转移过程中, 必须有血液供应。有研究者早在 1971 年提出肿瘤的血管生成理论^[1], 此理论认为肿瘤血管的生成是促进肿瘤生长的一个重要因素。随后, 该理论成为一个研究热点, 一直被研究者认为是肿瘤获得血液供应的唯一途径。国外学者在 1999 年研究葡萄膜黑色素瘤时, 发现了一种新的肿瘤供血微循环结构, 此结构由肿瘤细胞围成无内皮细胞参与的管道结构, 此管道功能与血管相

同, 将这种新结构命名为拟血管生成(VM)^[2]。VM 结构与经典的肿瘤血管生成不同, 后经国内外多个研究证实, VM 存在于多种肿瘤中, 例如肝癌、前列腺癌、乳腺癌等^[1], 亦包括口腔鳞状细胞癌(OSCC)。OSCC 是一类严重危害人类健康的恶性肿瘤^[3], 占口腔恶性肿瘤的 80%, 在头颈鳞癌(HNSCC)中也占较大比例, 病死率也较高。当前治疗手段是手术切除病灶, 但其有着较高的术后 5 年复发率^[4], 因此研究 OS-

△ 通信作者, E-mail: hongchaof@126.com.

CC 的血液供应模式,找到有效的抗血管措施就显得尤为重要。OSCC 中是否存在 VM 尚不清楚。本研究使用特殊组织化学和免疫组织化学结合的双重染色技术证实了 OSCC 中存在 VM,并进一步探讨了 VM 的生物学行为及其存在的临床意义,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集贵州医科大学附属医院口腔颌面外科及河北省眼科医院口腔颌面外科 2013 年 2 月至 2016 年 9 月收治的并经病理证实的 42 例 OSCC 患者,同时收集其经手术切除、并经甲醛固定、常规石蜡包埋的组织标本。其中男 34 例,女 8 例;年龄 41~74 岁,中位年龄 53 岁;发生于舌者 26 例,发生于颊部者 9 例,发生于牙龈者 4 例,发生于其他部位者(包括腭、口底)3 例;按病理分级划分,Ⅰ级 7 例,Ⅱ级 20 例,Ⅲ级 15 例;正常黏膜 7 例。

1.2 仪器与试剂 Mouse anti-CD31 鼠抗人 CD31 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,编号:ZM-0044);PV-9000 二步法检测系统(北京中杉金桥生物技术有限公司,编号:PV-9000-3);通用型 SP 系列工作液试剂盒(SP-9000,北京中杉金桥生物技术有限公司);AB-PAS 染色试剂盒(上海源叶生物技术开发有限公司);二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,编号:zsZLI-9031)。

1.3 方法 病理切片的脱蜡、水化、抗原修复:将切片置于柠檬酸缓冲溶液(0.01 mol/L, pH=6.0)热修复专用容器中,高压锅中放水煮沸,后喷雾 2 min 取出。每张标本切片滴加 1 滴一抗(anti-CD31, 1:100),置于 4 °C 冰箱过夜孵育。次日将孵育完成的切片取出,冷却至室温,磷酸盐缓冲液(PBS)对每个切片冲洗 3 次,每次 3 min。每张标本切片滴加 1 滴聚合物增强剂,37 °C 孵育 20 min;再用 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。每张标本切片滴加 1 滴辣根酶标记的羊抗兔/小鼠 IgG 聚合物,37 °C 孵育 30 min,之后用 PBS 液冲洗 3 次,每次 3 min。DAB 显色约 5~8 min,显微镜下观察到血管内皮显色后,立即使用自来水冲洗 3 min 终止显色反应。使用 0.5% 的过碘酸溶液将切片浸泡还原 8~10 min。使用流水冲洗 3 min,将其置入 Schiff 液中,避光进行反应约 13 min。之后用蒸馏水反复冲洗 3 次,每次 1 min,再用自来水冲洗 5 min。苏木素浅染细胞核 1~2 min,再次使用自来水冲洗终止染色反应。盐酸酒精分化后,自来水返蓝。常规酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶将标本封片。严格控制所用试剂应用条件,采用肾脏组织切片作为过碘酸雪夫染色(PAS)阳性片,PBS 为阴性对照;采用已知的 OSCC 作为 CD31 的阳性片,PBS 为阴性对照。

1.4 结果判定

1.4.1 阳性结果判定 CD31 阳性结果为相应部位呈棕黄色颗粒着色,主要位于细胞膜;PAS 阳性部位

为基底膜,相应部位呈淡粉色着色。

1.4.2 肿瘤微血管密度(MVD)计数标准与方法 MVD 参考文献[5]的方法:棕黄或棕褐色的内皮细胞团、如分界清楚则作为一个血管计数。10×10 倍视野下扫视整个切片,寻找 3 个高血管密度区,换成 10×40 倍视野,计微血管个数。取平均数,计算 MVD 值(个/单位面积),反映新血管生成密度。

1.4.3 VM 的判断标准 参考文献[2]的方法。VM 的形态学和生理特征:(1)肿瘤细胞组成了管壁;(2)管壁结构无内皮细胞,PAS 染色阳性物质将管壁结构与其余肿瘤组织分开;(3)管腔内有红细胞;(4)VM 周围肿瘤坏死现象很少见到;(5)免疫组织化学染色的内皮特异标记(CD31、CD34 等)呈阴性反应;(6)良性肿瘤及低侵袭性肿瘤中少见,主要被发现于高侵袭性肿瘤中。

1.5 统计学处理 使用 SPSS19.0 统计学软件包对数据进行分析。计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。等级资料的组间比较采用非参数的秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色结果 经过了 CD31、PAS 双染的 42 例 OSCC 患者石蜡切片,经光镜观察,其中有 15 例(35.71%)中存在典型的 VM。内皮构成的血管在光镜下显示为:由 CD31 染色阳性的内皮围成管腔样或网状结构,PAS 染色的基质存在于肿瘤与管壁间。与典型的内皮血管不同的是,VM 直接由肿瘤细胞围成管道样结构,管道中可见红细胞。CD31 染色阳性的物质不存在于此结构中,这说明了此结构无内皮细胞参与构成。PAS 阳性物质可连续或者不连续的存在于红细胞与肿瘤细胞之间。VM 的另一种结构方式也可在本研究中观察到:PAS 染色阳性的物质呈条索状或网状。在 VM 结构周围无坏死肿瘤细胞、炎性细胞。其中,另外一种重要的阳性管道结构——淋巴管的显微镜下形态特点是管腔较大,很不规则,由连续的单层内皮细胞围成。内皮细胞外无基底膜,偶见有内皮细胞连接处。

2.2 OSCC 中 VM 与临床病理资料的关系 OSCC 中 VM 与性别、年龄、肿瘤部位等无明显相关性($P > 0.05$),肿瘤直径 ≥ 1.5 cm 的 VM 阳性率(38.23%)高于肿瘤直径 < 1.5 cm 组的阳性率(25.00%),但差异无统计学意义($P > 0.05$);无坏死组 VM 阳性率(41.37%)虽然高于有坏死组阳性率(23.07%),但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 OSCC 中 VM 与病理分级的关系 病理分级为Ⅰ级的患者中有 1 例 VM 生成[14.28%(1/7)],Ⅱ级患者中有 6 例 VM 生成[30.00%(6/20)];Ⅲ级患者中有 8 例 VM 生成[53.33%(8/15)]。秩和检验结果提示,病理分级恶性程度越高,VM 阳性率也越高,差异具有统计学意义($Z = 2.193, P = 0.028$)。

2.4 OSCC 中 VM 与颈淋巴结转移的关系 在 16 例颈淋巴结转移患者中, VM 阳性 11 例; 在 27 例无淋巴结转移的患者中, VM 阳性 5 例。经过统计学分析, OSCC 发生颈淋巴结转移的患者其 VM 阳性率更高, 差异有统计学意义($\chi^2 = 12.286, P < 0.01$)。

表 1 OSCC 中 VM 与临床病理资料的关系(n)

项目	n	VM 阳性	VM 阴性	χ^2	P
性别				1.239	0.266
男	34	14	20		
女	8	1	7		
年龄(岁)				0.000	1.000
≥50	32	11	21		
<50	10	4	6		
肿瘤部位				0.315	0.957
舌	26	10	16		
颊	9	3	6		
牙龈	4	1	3		
其他	3	1	2		
肿瘤直径(cm)				0.086	0.770
≥1.5	34	13	21		
<1.5	8	2	6		
坏死				0.634	0.426
有	13	3	10		
无	29	12	17		

2.5 OSCC 中 VM 与 MVD 的关系 OSCC 中 VM 阳性组的 MVD 值(44.20 ± 11.42) 高于 VM 阴性组的 MVD 值(36.25 ± 9.27), 但差异无统计学意义(P=0.333)。

3 讨论

3.1 OSCC 的临床病理特征 42 例 OSCC 患者中男:女为 4.25:1, 与大多数文献报道的男性发病率高于女性符合^[4]。发生部位以舌多见, 其次为颊、牙龈, 其他部位亦有发病者, 例如腭、口底, 但均少见; OSCC 患者易发生颈淋巴结转移, 42 例中有 16 例发生颈淋巴结转移; 其与临床病理特征及免疫组织化学染色结果与文献^[5]报道一致。

3.2 OSCC 中 VM 的形态特征 经过 CD31、PAS 双染后, 光镜下可见肿瘤细胞组成了管道样结构存在于 OSCC 标本中, 此结构无内皮细胞参与, 管腔与内皮性血管相通, 红细胞存在于此结构中。CD31 即血小板-内皮细胞黏附分子-1(PECAM-1), 是一种表达于血管内皮的连接分子, 其在免疫组织化学中的作用是标记血管, 是内皮依赖性血管存在的标志。VM 结构无内皮参与, CD31 染色阴性, 为了鉴别 VM 与内皮性血管, 其在本研究中用来标记肿瘤内皮性血管。结合 HE 染色镜下观察, 本研究发现, 在部分 OSCC 中存在

PAS 阳性, 而构成这些管道的细胞 anti-CD31 抗体染色阴性, 部分管道内有红细胞的存在, 说明构成这种管道样结构的非内皮细胞而可能是口腔鳞癌细胞, 光镜下观察符合定义的 VM 结构^[6], 与文献^[7-8]在晚期卵巢恶性肿瘤组织及在前列腺癌中发现的 VM 结构一致。这表明 OSCC 中也存在 VM。

PAS 主要表达于纤维结缔组织, VM 结构中其作用是分隔肿瘤细胞与红细胞, 在正常内皮性血管中则构成基底。本研究发现, PAS 阳性物质是 VM 组成的一部分, 且 VM 腔内也发现有 PAS 染色阳性物质, 其来源可能是肿瘤细胞分泌。

有研究发现, 很多黑色素瘤体积很大, 却并没有出现坏死现象^[2]。LUO 等^[2] 研究卵巢癌时发现, 有 VM 结构的肿瘤组织坏死很少或者没有坏死, 而没有 VM 结构的则有明显坏死。本研究只得出了有 VM 组坏死率低于无 VM 组, 但差异无统计学意义(P > 0.05), 可能因为 VM 为肿瘤组织提供了血供, 使肿瘤发生坏死的可能性降低。亦有可能是样本量不足, 异质性大所造成, 此方面本课题组将在今后做深入研究。

有研究者发现使用微循环注射荧光染料进管腔后, 染料播散至整个肿瘤组织^[9-10], FRANCESCONE 等^[6] 构建的 WIBC-9 荷瘤鼠模型都证明了 VM 是具有功能的管道, 其作用是联通内皮性血管, 为肿瘤供血。本研究使用了 MVD 计数方法, 按照有无 VM 分为两组, 两组结果的表达差异无统计学意义(P > 0.05), 这可能与样本数量少有关, 无法证明 VM 为一种功能性管道。

3.3 OSCC 中 VM 的生物学意义 本次研究发现 VM 管腔内有红细胞。姚伶俐等^[11] 在人前列腺癌中发现 VM 结构存在红细胞, 表明 VM 作为一种特殊的微循环结构为肿瘤提供血供。肿瘤的生长需要血液供应, 当发生缺氧时可以诱导 VM, 否则肿瘤细胞会因为缺血缺氧发生坏死。这也解释了 VM 中的肿瘤内少有坏死现象的出现。本研究同时发现, VM 为 OSCC 的颈淋巴结转移提供了途径, 有颈淋巴结转移患者 VM 阳性率高于无淋巴结转移患者(P < 0.05)。因此 VM 的存在对 OSCC 是否发生颈淋巴结转移有着重要意义。

综上所述, 肿瘤中有无 VM 结构, 对肿瘤的治疗效果影响较大。当前对 VM 的诊断无金标准, 只能通过双染观察其是否符合 VM 特征, 因此在普通病理学检查上通过 PAS、CD31 双染进行检测其结构, 可制订出针对肿瘤治疗更详尽的策略及更准确的预后评估, 并对选择手术切除和(或)血管栓塞治疗的适应证提供客观依据。

参考文献

[1] MYERS A L, WILLIAMS R F, NG C Y, et al. Bevacizum-

ab-induced tumor vessel remodeling in rhabdomyosarcoma xenografts increases the effectiveness of adjuvant ionizing radiation[J]. J Pediatr Surg, 2010, 45(6):1080-1085.

[2] LUO F, YANG K, LIU R L, et al. Formation of vasculogenic mimicry in bone metastasis of prostate cancer: correlation with cell apoptosis and senescence regulation pathways[J]. Pathol Res Pract, 2014, 210(5):291-295.

[3] RAI A, CROSS J C. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry[J]. Dev Biol, 2014, 387(2):131-141.

[4] VARTANIAN A A. Signaling pathways in tumor vasculogenic mimicry [J]. Biochemistry, 2012, 77(9):1044-1055.

[5] LARSON A R, LEE C W, LEZCANO C, et al. Melanoma spheroid formation involves laminin-associated vasculogenic mimicry[J]. Am J Pathol, 2014, 184(1):71-78.

[6] FRANCESCONI R, SCULLY S, BENTLEY B, et al. Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation [J]. J Biol Chem, 2012, 287(29):24821-24831.

[7] CHUNG H J, MAHALINGAM M. Angiogenesis, vasculogenic mimicry and vascular invasion in cutaneous malignant melanoma-implications for therapeutic strategies and targeted therapies[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2014, 14(5):621-639.

[8] 杨文德, 潘运龙. TSP-1 抗肿瘤血管生成的临床研究现状[J]. 广东医学, 2016, 37(24):3772-3775.

[9] 李江, 范绍翀, 叶浩昕, 等. 血管生成拟态和上皮-间质转化相关标志物在鼻咽癌中的表达及与淋巴结转移的关系[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2016, 23(11):637-640.

[10] KHAJEELAK C, KRIENGSACK L, SIRIPORN K, et al. Curcumin suppresses vasculogenic mimicry capacity of hepatocellular carcinoma cells through STAT3 and PI3K/AKT inhibition. [J]. Anticancer Res, 2014, 34(4):1857-1864.

[11] 姚伶俐, 张丹芳, 赵秀兰, 等. DKK1 促进非小细胞肺癌线性程序性坏死和血管生成拟态形成[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(18):797-803.

(收稿日期:2017-08-16 修回日期:2017-10-02)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.05.049

BTX-A 辅助常规康复功能锻炼对合并腓肠肌痉挛脑瘫患儿痉挛程度、肌张力及粗大神经功能的影响

童 鹏, 王林中[△]

(湖北省鄂州市中心医院儿科 436000)

摘要:目的 探讨 A 型肉毒毒素(BTX-A)辅助常规康复功能锻炼对合并腓肠肌痉挛脑瘫患儿痉挛程度、肌张力及粗大神经功能的影响。**方法** 选择 2014 年 1 月至 2015 年 12 月在该院接受治疗的 104 例痉挛型脑瘫患儿。用随机数字表法分为对照组和观察组, 每组 52 例, 对照组患儿进行常规康复功能训练, 观察组患儿在对照组的基础上注射 BTX-A。比较两组患儿的痉挛程度、肌张力及粗大神经功能。**结果** 治疗前两组患儿的肌张力、跟腱反射、踝痉挛和综合痉挛量表(CSS)总分差异无统计学意义($P>0.05$), 治疗后两组患儿的痉挛状况明显改善, 观察组患儿的肌张力、跟腱反射、踝痉挛和 CSS 总分低于对照组($P<0.05$)。治疗 1 个月、治疗 3 个月和治疗 6 个月后, 两组患儿的修订 Ashworth 量表(MAS)评分明显改善, 观察组患儿各时间点的 MAS 评分均低于对照组($P<0.05$)。治疗后两组患儿的粗大运动功能测试量表(GMFm)评分明显提高, 观察组患儿 D 区和 E 区的 GMFM 评分高于对照组($P<0.05$)。**结论** BTX-A 辅助常规康复功能锻炼可以明显改善合并腓肠肌痉挛脑瘫患儿的痉挛程度, 降低肌张力, 提高运动功能, 值得在临床推广应用。

关键词: A 型肉毒毒素; 腓肠肌痉挛; 脑瘫

中图分类号: R725

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)05-0719-03

脑瘫是指患儿在分娩前后因非进行性脑损伤, 出现持续性运动和姿势发育异常、活动受限等症状, 患儿主要为痉挛型脑瘫, 对其生活质量和生命健康影响较大^[1]。患儿大脑在生长发育的过程中还具有可塑性, 因此如果早发现、早治疗, 受损的大脑功能可以得到有效的代偿, 促进脑功能正常发育。痉挛型脑瘫主要采用物理治疗和作业治疗, 我国常规采用康复治

疗。康复训练可以抑制患儿的肌肉痉挛, 帮助肌肉正常的舒张和收缩, 纠正异常姿势, 但是由于患儿年龄较小, 身体健康状况较差, 因此康复训练的效果较差。A 型肉毒毒素(BTX-A)属于神经毒药物, 在缓解痉挛方面应用广泛, 尤其在脑瘫患儿的痉挛治疗中疗效显著^[2]。本文旨在探讨 BTX-A 辅助常规康复功能锻炼对合并腓肠肌痉挛脑瘫患儿痉挛程度、肌张力及粗大

[△] 通信作者, E-mail: 15608688960@163.com.