

## 血液疾患骨髓微血管密度的研究

高武\*, 宋艳秋, 李薇, 王冠军

吉林大学第一医院血液-肿瘤科, 长春 130021

**摘要** 为了探讨血液系统疾病骨髓血管新生的状态及意义, 采用改良的乙二醇-甲基丙烯酸酯 (GMA) 塑料包埋骨髓病理切片和免疫组织化学染色检测贫血、急性髓细胞白血病 (AML)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓细胞白血病 (CML) 患者的骨髓微血管密度 (MVD)。结果显示, 初诊的恶性血液病患者在治疗前骨髓 MVD 明显增加; 急性白血病化疗完全缓解后骨髓 MVD 降至正常水平, 未缓解者下降程度小, 复发者再次升高至化疗前水平; 贫血患者骨髓 MVD 也比对照组明显增高, 但远不如急性白血病骨髓 MVD 增高的幅度大。结论: 骨髓血管新生在急性白血病发生过程中有着重要的作用, 抗血管新生治疗可能成为治疗白血病的新策略。

**关键词** 恶性血液病; 骨髓微血管; 微血管密度; 白血病

**中图分类号** R552; R733

**文献标识码** A

### Study on Bone Marrow Microvascular Density in Hematological Diseases

GAO Wu, SONG Yan-Qiu, LI Wei, WANG Guan-Jun

Department of Hematology and Oncology, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China

**Abstract** To investigate the state and significance of bone marrow angiogenesis in hematological diseases, bone marrow microvascular density (BM-MVD) in plastic-embedded section was examined using acetone-fixed bone marrow tissues embedded in glycol-methacrylate (GMA) resin and by the method of immunohistochemistry. The results showed that bone marrow MVD increased greatly in newly diagnosed hematological malignancies before treatment. BM-MVD in patients with acute leukemia decreased down to the normal range as the controls at the time of complete remission. In the non-remission group, BM-MVD decreased less, but when relapsed it increased again up to the same range as the newly diagnosed hematological malignancies, significant increase of BM-MVD was found in patients with anemia, but in less degree than that in hematological malignancies. It is concluded that bone marrow angiogenesis plays a key role in the pathogenesis and development of hematological malignancy. Antiangiogenic therapy may be able to constitute a novel strategy for the treatment of hematological malignancies including leukemia.

**Key words** hematological malignancy; bone marrow microvessel; microvascular density; leukemia

*J Exp Hematol* 2004; 12(6):852 - 854

研究表明, 多种血液系统肿瘤存在明显的骨髓血管新生现象<sup>1-4</sup>, 为进一步探讨血液系统疾病骨髓血管新生的状态及其意义, 本研究应用改良的 GMA 塑料包埋骨髓病理切片, 进行免疫组织化学染色, 检测了贫血、AML、ALL、CML 等血液系统疾病骨髓微血管密度 (microvascular density, MVD) 的变化。

### 材料与方 法

#### 研究对象

检测骨髓 MVD 的 71 例骨髓组织活检标本均来自 2002 年 8 月至 2003 年 3 月吉林大学第一医院血液肿瘤科住院病人, 其中缺铁性贫血 7 例, 巨幼细胞性贫血 3 例, 淋巴瘤无骨髓浸润 8 例, AML 39 例, ALL 9 例, CML 5 例。将上述病例分为良性贫血

组、淋巴瘤无骨髓浸润对照组、初诊的恶性血液病组及化疗后处于不同状态的急性白血病症。淋巴瘤无骨髓浸润对照组均为初诊病例, 其血像、骨髓像和骨髓病理形态学正常。年龄最小 16 岁, 最大 66 岁, 各组间年龄和性别分布均无明显差异。

诊断及分型标准参照《血液病诊断及疗效标准》<sup>5</sup>。AML 除 M<sub>3</sub> 采用 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导缓解外, 其他类型均应用 DA 方案化疗, ALL 应用 VDCP 方案。化疗后标本是化疗结束后间歇 30 天留取的。完全缓解标准定义为骨髓各系列造血细胞形态比例正常, 原幼细胞小于 5%, 外周血中性粒细胞至少 1.5

基金项目: 本课题为吉林省科技厅科研基金资助项目, 编号 20030546  
通讯作者: 宋艳秋, 副教授、硕士。电话: (0431) 5612742。传真: (0431) 8526281。E-mail: songyanqiu@cscs.org.cn

\*高武, 现在复旦大学附属上海市第五人民医院任职  
2003 - 11 - 07 收稿; 2004 - 09 - 01 接受

$\times 10^9/L$ ,血小板数至少  $100 \times 10^9/L^3$ 。所有入选病例均无肝肾功能异常。

### 主要材料

改良 GMA 包埋剂购自上海市第六人民医院,丙酮溶液购自开原市化工试剂厂,兔抗人 vWF 多克隆抗体、S-P 超敏试剂盒均购自福建迈新生物技术公司。

### 标本的处理

骨髓标本取出后立即放入纯丙酮液中于  $-20^\circ C$  冰箱中固定、脱水 2 小时,随后按包埋程序给予低温浸透、包埋,制备骨髓病理切片。

### 检测方法

采用 vWF 作为骨髓血管内皮细胞的标记抗原,一抗为兔抗人 vWF 多克隆抗体,血管内皮细胞的免疫组织化学染色参照 S-P 超敏试剂盒的说明书进行。

### 骨髓 MVD 计数方法

参照文献 3、6 提出的骨髓微血管计数方案对每张切片进行 MVD 计数。在不知任何病理和诊断情况下,在低倍镜(100 $\times$ )下进行逐个视野的检查,至少选出血管最丰富的 3 个不相连区域(hot spot),然后在高倍镜下(400 $\times$ )计数微血管,共计数 3 次,取其平均值表示 MVD。任何呈棕黄色阳性的内皮细胞或内皮细胞簇且与邻近血管和骨小梁清楚分开者为 1 个能够计数的血管,不以是否有管腔或管腔中是否有红细胞为判断标准,骨小梁内或与骨小梁相连的血管被排除在外。

### 统计学处理

采用成组设计的两样本均数比较的  $t$  检验和  $F$  检验、方差分析、秩和检验,以双侧检验  $P = 0.05$  为存在统计学差异。

## 结 果

### 良性贫血组与对照组骨髓 MVD 的比较

淋巴瘤无骨髓浸润患者做为对照组,其骨髓 MVD 的中位数(median)及波动范围(range)为 7.41(5.45 - 10.65),而贫血病人骨髓 MVD 的则为 10.72(5.31 - 17.7),贫血病人的骨髓 MVD 高于对照组,经统计学处理  $P = 0.0316$ (表 1)。

### 初诊的恶性血液病组与对照组骨髓 MVD 的比较

AML 骨髓 MVD 的 median(range)为 20.41(7.35 - 38.12),ALL 骨髓 MVD 的为 16.39(12.32 -

23.41),CML 骨髓 MVD 为 23.35(19.34 - 30.2),AML、ALL、CML 各组的骨髓 MVD 均比对照组明显升高,AML、ALL、CML 各组间的差异无统计学意义(表 1)。AML 各个亚型之间的差异也无统计学差异(表 2)。

Table 1. Bone marrow MVD in blood disorders

Group	n	Mean $\pm$ SD	P	P <sup>#</sup>	P <sup>*</sup>
AML	21	21.58 $\pm$ 1.53	0.00013	0.00001	0.388
ALL	5	17.37 $\pm$ 1.99	0.0066	0.035	
CML	5	23.15 $\pm$ 2.48	0.0074	0.0164	
anemia	10	11.29 $\pm$ 1.21	0.0316		
control	8	8.02 $\pm$ 0.65			

P : compared with control group, P<sup>#</sup> : compared with anemia group, P<sup>\*</sup> : analysis value of variance among hematologic malignancies (F = 1.044)

Table 2. Bone marrow MVD in AML subtypes

Type	n	Mean $\pm$ SD	Median(range)	P <sup>*</sup>
M <sub>1</sub>	4	18.39 $\pm$ 1.08	17.91(16.51 - 21.22)	0.625
M <sub>2</sub>	6	22.36 $\pm$ 4.26	20.78(7.35 - 38.12)	
M <sub>3</sub>	4	23.70 $\pm$ 0.82	23.68(21.75 - 25.70)	
M <sub>4</sub>	3	24.75 $\pm$ 7.07	25.52(12.15 - 36.59)	
M <sub>5</sub>	2	19.33 $\pm$ 0.87	19.33(18.45 - 20.20)	
M <sub>6</sub>	2	18.91 $\pm$ 1.50	18.91(17.41 - 20.41)	

P<sup>\*</sup>-value: analysis value of rank sum test among AML subtypes (H = 4.2965)

### 处于不同状态的急性白血病骨髓 MVD 的比较

化疗后完全缓解者骨髓 MVD 的平均值是 9.39,未缓解者为 15.82,复发者为 22.28。经统计学处理,完全缓解者骨髓 MVD 下降至正常水平,未缓解者骨髓 MVD 下降程度较小,仍明显高于对照组与缓解组,而与治疗前组均无明显差异,复发者骨髓 MVD 再次升高至治疗前组水平,明显高于对照组和完全缓解组(表 3)。

## 讨 论

骨髓血管新生在各种恶性血液系统疾病发生发展中的作用日益受到重视,一些临床研究报告证实多数恶性血液系统疾病骨髓 MVD 增加<sup>1-4</sup>。体外细胞培养的结果证实,不同种类的血液恶性细胞系均能分泌 VEGF,通过自分泌与旁分泌作用途径,刺激自身的增殖与生存,VEGF 还与骨髓组织的内皮细胞

**Table 3. Bone marrow MVD in different stages of acute leukemias**

Acute leukemia stages	n	mean ±SD	P	P <sup>#</sup>	P <sup>*</sup>
Complete remission	11	9.39 ±1.47	0.407		
Unremission	6	15.82 ±2.12	0.042	0.048	0.056
Relapse	5	22.28 ±3.57	0.017	0.021	0.707
Pre-therapy	26	20.77 ±1.32		0.00001	
Control	8	8.02 ±0.65			

P<sup>#</sup>: compared with remission group, P: compared with control group; P<sup>\*</sup>: compared with pre-therapy

表达的 VEGF 的受体结合,刺激内皮细胞的增殖及微血管生成,从而导致骨髓微血管密度增高<sup>7,8</sup>。

本研究应用丙酮固定骨髓组织,改良的 GMA 塑料包埋切片,然后进行骨髓 MVD 的检测,发现初诊未治疗的 AML、ALL、CML 骨髓 MVD 均比对照组明显增加,急性白血病化疗缓解后骨髓 MVD 降至正常水平,未缓解者骨髓 MVD 下降水平较小,复发者骨髓 MVD 再次升高至化疗前水平,说明骨髓血管新生在疾病发生发展过程中有着重要的作用,阻断骨髓肿瘤细胞与 VEGF 的相互作用,从而抑制骨髓血管新生有可能成为治疗急性白血病的新策略。

本研究发现,贫血患者的骨髓 MVD 明显高于对照组,说明贫血患者的骨髓也存在明显的血管新生现象,是贫血导致的机体缺氧状态诱导骨髓血管新生所致<sup>9</sup>。贫血病人骨髓微血管生成增多的意义在于增加血液供应,以弥补贫血导致的造血微环境的缺氧状态,这一点可以从贫血患者微血管形态学上得到部分证实:贫血患者的骨髓微血管绝大多数结构正常、形态规则,均有管腔形成,有管腔形成才能有血液供应,而恶性血液病的骨髓微血管多为结构紊乱、形态迂曲、无管腔的微血管;但贫血患者骨髓血管新生明显是否具有其他病理生理学意义,尚待进一步观察。

从表 1 可见,贫血病人骨髓 MVD 虽然比对照组增高,但远不如恶性血液病骨髓 MVD 增高的幅度大,这可能反映了在血管新生的调节上机体有序控制和恶性细胞无序扩张的差别。血液恶性细胞起源于骨髓,恶性细胞高表达的包括 VEGF 在内的促血管新生因子直接表达于骨髓微环境中,只要恶性克隆不被清除,这种异常表达就会持续下去。癌基因活化使抑制血管新生因子的表达下调<sup>10</sup>,机体丧失了反馈抑制血管新生途径,结果导致骨髓血管明显新生。良性血液系统疾病因为贫血导致机体各系统、器官缺氧,从而诱导多种正常组织已经分化的细胞表达 VEGF<sup>11</sup>,促进各脏器血管新生,增加血液

供应以弥补血红蛋白降低导致的机体缺氧状态。但此时机体正常调控血管新生的能力尚未丧失,即使多种组织的细胞分泌 VEGF,导致血液循环中 VEGF 水平很高,包括骨髓在内的组织血管新生的程度也是有限的。

## 参 考 文 献

- Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, *et al.* Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*, 1997; 150: 815 - 821
- Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2000; 95: 309 - 313
- Padro T, Ruiz S, Bieker R, *et al.* Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2000; 95: 2637 - 2644
- Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, *et al.* Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2000; 96: 2240 - 2245
- 张之南主编. 血液病诊断及疗效标准. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 168 - 193
- Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 1995; 36: 169 - 180
- Dias S, Hattori K, Zhu P, *et al.* Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest*. 2000; 106: 511 - 521
- Dias S, Hattori K, Heissig B, *et al.* Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 10857 - 10862
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, *et al.* Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992; 359: 843 - 845
- Moehler TM, Ho AD, Goldschmidt H, *et al.* Angiogenesis in hematologic malignancies. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*. 2003; 45: 227 - 244
- 钱朝南, 闵庆华. 血管内皮生长因子的研究进展. *中国病理生理杂志*, 1999; 15: 855 - 859