文章编号:1000-5404(2005)11-1145-03

论著

VEGF-C及其受体Flt4在非小细胞肺癌转移中的作用

彭正银,陈寿松,肖同浩,陈昕薇,梁励玮 (广州军区武汉总医院病理科,武汉 430070)

提 要:目的 探讨VEGF-C/VEGFR-3(Flt4)在非小细胞肺癌转移中的作用及意义。**方法** 应用免疫组化S-P法,检测75例临床病理资料完整的非小细胞肺癌癌组织中VEGF-C及Flt4的表达。**结果** 75例非小细胞肺癌癌组织中VEGF-C阳性率为77.3%(58/75),Flt4阳性率为46.7%(35/75);且VEGF-C与Flt4的表达呈正相关($r=0.721$, $P<0.01$)。VEGF-C阳性指数在转移组(54.65±13.23)高于未转移组(32.45±10.12)($P<0.05$)。随着癌细胞VEGF-C表达的强度增加,Flt4阳性脉管数也随之增加,各组间差异均有显著性($P<0.01$)。非小细胞肺癌中Flt4阳性脉管数在淋巴结转移组(14.58±3.24)高于未转移组(10.51±2.32)($P<0.05$)。**结论** 非小细胞肺癌高水平表达VEGF-C、Flt4,两者表达呈正相关。Flt4阳性脉管数与淋巴结转移密切相关。

关键词: 非小细胞肺癌;血管内皮细胞生长因子-C;血管内皮细胞生长因子受体-3;淋巴结转移
中图法分类号: R392.11; R73-37; R734.2 **文献标识码:** A

Predictive role of VEGF-C and its receptor Flt4 in non-small cell lung cancer metastasis

PENG Zheng-yin, CHEN Shou-song, XIAO Tong-hao, CHEN Xin-wei, LIANG Li-wei (Department of Pathology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command Area, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To investigate the role and significance of VEGF-C/Flt4 expression in metastasis of non-small cell lung cancer. **Methods** S-P immunohistochemical staining was used to detect the expression of VEGF-C and its receptor Flt4 in 75 cases of non-small cell lung cancer. **Results** Among 75 cases, the positive rates of VEGF-C and Flt4 of cancer cells were 77.3% and 46.7% respectively. The expression of VEGF-C was in positive correlation with that of Flt4. The index of VEGF-C in lymph node metastasis group (54.65±13.23) was significantly higher than that of non-lymph node metastasis group (32.45±10.12) ($P<0.05$). With the increase of VEGF-C protein level, the number of Flt4 positive vessels increased and there was a significant difference among these groups ($P<0.01$). The number of Flt4 positive vessels in lymph node metastasis group (14.58±3.24) was significantly higher than that of non-lymph node metastasis group (10.51±2.32) ($P<0.05$). **Conclusion** There is a positive correlation between VEGF-C and Flt4 over-expression in non-small cell lung cancer. The number of Flt4 positive vessels is related to lymph node metastasis.

Key words: non-small cell lung cancer; vascular endothelial growth factor-C; vascular endothelial growth factor receptor-3; lymph node metastasis

目前,肺癌的发生率成明显的上升趋势,其淋巴结转移是影响患者预后的重要因素之一[1]。近年来,随着一些特异作用于淋巴管内皮的生长因子及受体的发现,为研究淋巴转移开辟了新的途径。VEGF-C/Flt4系统是目前发现的惟一调节胚胎淋巴管生成和成熟个体淋巴管生理功能的调节因子,与肿瘤细胞的淋巴转移关系密切[2]。本研究旨在探讨VEGF-C/Flt4系统在非小细胞肺癌转移中的作用。

作者简介: 彭正银(1966-),男,湖北省仙桃市人,主治医师,主要从事临床病理诊断方面的研究。电话:(027)68878655

收稿日期: 2005-01-05; **修回日期:** 2005-03-14

1 材料与方法

1.1 临床资料

所有材料取自1999年8月至2004年4月在我院心胸外科行肺癌根治术切除的75例非小细胞肺癌标本的存档蜡块。全部病例术前均未接受化疗、放疗。术后均经病理明确诊断。其中男性48例,女性27例,年龄38~82岁,中位年龄52.4岁,腺癌32例,鳞癌31例,腺鳞癌12例;高分化癌20例,中分化癌32例,低分化癌23例。P-TNM分期按1997年国际抗癌联盟(UICC)修订的分期标准分为Ⅰ期35例,Ⅱ期10例,Ⅲ期24例,Ⅳ期6例。淋巴结转移组45例,无淋巴结转移组30例。

1.2 方法

肿瘤组织标本用10%甲醛固定,石蜡包埋,5 μm厚连续切

片,HE及免疫组化染色,免疫组化采用S-P法,按试剂盒说明书进行。免疫组化试剂盒及抗体(一抗兔抗人单克隆抗体VEGF-C工作浓度1:100,胰酶消化15 min,兔抗人Flt4多克隆抗体工作浓度1:200,胰酶消化20 min)均购自北京中山公司。

1.3 免疫组化结果判断

癌细胞、脉管内皮细胞胞质呈棕黄色为VEGF-C、Flt4染色阳性细胞。

1.4 癌细胞VEGF-C(+)、Flt4(+)指数测定方法

低倍镜下分别选取VEGF-C(+)癌细胞和Flt4(+)癌细胞最密集区,然后在100倍视野下计数5个视野中的1 000个肿瘤细胞,以阳性细胞占肿瘤细胞的百分率来表示[3]。

1.5 肺癌细胞VEGF-C表达强度

按癌细胞免疫组化染色着色深浅计分:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。按阳性细胞数所占百分比打分:阴性为0分,阳性细胞数<10%为1分,阳性细胞数11%~50%为2分,阳性细胞数>51%为3分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积:0~2分为-,3~4分为+,5~7分为++,8~9分为+++[3]。

1.6 Flt4(+)脉管判断标准及计数方法

在低倍镜下寻找Flt4脉管密集区,即"热点区",100个视野下计数10个热点区中Flt4(+)脉管数,取其平均值。肿瘤区内单个或成丛的内皮细胞,不管成腔与否均视为脉管计数,凡伴有肌层的脉管均不予计数[4]。

1.7 统计学分析

实验数据均用$\bar{x} \pm s$表示,用SPSS 9.0统计软件,行单因素分析、t检验、双变量相关分析、χ^2检验。

2 结果

2.1 非小细胞肺癌细胞中VEGF-C、Flt4的表达及分布特点

75例非小细胞肺癌组织中VEGF-C阳性表达者58例(77.3%)(图1),Flt4阳性者35例(46.7%)(图2)。连续切片可见Flt4阳性的细胞其VEGF-C染色亦均为阳性,检测两者的阳性指数表达的相关性,显示呈正相关($r=0.721$, $P<0.01$)。对VEGF-C表达与淋巴结转移关系的研究显示,VEGF-C阳性指数在非小细胞肺癌转移组高于未转移组,差异有显著性($P<0.01$,表1)。

表1 非小细胞肺癌VEGF-C阳性指数与淋巴结转移的关系($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Relationship between positive index of VEGF-C and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Positive index of VEGF-C
Lymph node metastasis	40	54.65±14.87*
Non-lymph node metastasis	35	35.45±15.12

*: $P<0.05$, *vs* non-lymph node metastasis group

2.2 非小细胞肺癌中脉管内皮细胞VEGF-C、Flt4的表达特点

在75例非小细胞肺癌肿瘤间质脉管内皮细胞VEGF-C呈阳性表达者18例,Flt4阳性表达34例。VEGF-C表达强度存在一定差异,随着VEGF-C表达强度增加,Flt4阳性脉管数也增加(表2)。Flt4阳性脉管数在淋巴结转移组(23/40,57.5%)高于淋巴结未转移组(11/35,30.3%)($P<0.05$)。

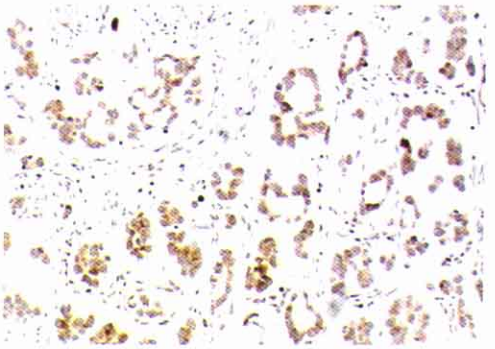


图1 VEGF-C在肿瘤细胞胞浆中的表达 (S-P×100)

Fig 1 Positive staining for vascular endothelial growth factor-C in cytoplasm of cancer cells (S-P×100)



图2 Flt4在肿瘤细胞及邻近脉管内皮细胞中的表达 (S-P×100)

Fig 2 Fms-like tyrosine kinase-4 expression in cytoplasm of adjacent vessels of lung cancer cells and endothelial cells (S-P×100)

表2 癌细胞VEGF-C表达强度与癌组织内Flt4阳性脉管数的关系($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Relationship between VEGF-C expression and the number of Flt4 positive vessels in cancer tissue ($\bar{x} \pm s$)

Expression of VEGF-C	n	Number of Flt4 positive vessels(piece/100 times)
-	5	2.13±0.05
+	9	4.75±2.03**
++	17	8.26±3.21**
+++	44	12.35±5.80**

**: $P<0.01$, *vs* negative expression of VEGF-C

3 讨论

目前已研究证明VEGF-C是相对特异的淋巴管内皮生长因子,属于VEGF-C家族,是VEGFR-3的配体,与其结合后通过MEK/ERK和PI3-激酶/Akt途径引起淋巴管内皮细胞增生,VEGF-C蛋白水解后的成熟形式

还可结合并激活 VEGFR-2，作用于血管、淋巴管内皮细胞[5]。许多研究证明 VEGF-C 在多种肿瘤细胞中有表达。其受体 Flt4 在胚胎发生的初始阶段存在于所有的内皮细胞，随后定位于小静脉和淋巴管，是成熟淋巴管内皮细胞的特异性标志物。在肿瘤组织中可见肿瘤周边的新生淋巴管、扩张的淋巴管、有癌栓的淋巴管的内皮细胞 Flt4 呈高表达，提示 VEGF-C/Flt4 调控系统可调节肿瘤间质血管网的形成和淋巴管的生成[6,7]。本实验在研究 VEGF-C 及其受体 Flt4 在肿瘤间质脉管内皮细胞中的表达情况时，发现非小细胞肺癌也有 VEGF-C/Flt4 的表达。免疫组化检测结果表明 75 例非小细胞肺癌中有 58 例表达 VEGF-C 蛋白，35 例癌细胞同时表达 Flt4 蛋白，统计学分析显示两者表达正相关，结果与在甲状腺癌、结直肠癌、胃癌中 VEGF-C mRNA 和 Flt4 mRNA 检测结果相同[8]，提示在小细胞肺癌中 VEGF-C 上调 Flt4 的表达。

研究显示，75 例非小细胞肺癌中有 42 例 Flt4 阳性脉管，半定量检测非小细胞肺癌 VEGFC 表达强度与癌组织内 Flt4 阳性脉管数的关系，发现随着 VEGF-C 表达的增强，Flt4 阳性脉管数也明显增加。而在 VEGF-C 阴性组，Flt4 阳性脉管数也很少，此结果与董昕等[9]报道的结果一致。

肿瘤间质血管和淋巴管在为肿瘤细胞生长提供养分的同时，也为肿瘤转移创造条件。研究表明，癌巢和间质内 Flt4 阳性脉管数与非小细胞肺癌的淋巴结转移密切相关，提示 Flt4 阳性脉管可能是肿瘤发生侵袭转移的主要通路。特别是 Flt4 阳性的淋巴管，内皮之间的连接可因功能需要从复杂型向简单型转变。合理的解释是当肿瘤间质液压升高及肿瘤周围微环境改变时，毛细淋巴管扩张，形成开放性内皮通道，使肿瘤细胞易于进入淋巴管产生转移。此外我们在癌间质中发现一些静脉的平滑肌细胞、大的淋巴管内皮细胞、有癌栓的淋巴管内皮细胞也有 Flt4 的表达，其表达的意义可能是通过增强脉管内皮细胞平滑肌对 NO 及酸碱度的敏感性而增加脉管的直径，利于癌细胞的侵入[10]。

综上所述，VEGF-C/Flt4 调控系统主要与非小细胞肺癌的淋巴管增生和淋巴结转移密切相关。临床非小细胞肺癌化疗敏感性较差[11,12]，如果抑制肿瘤淋巴管的形成，就减少了肿瘤转移的机会，将极大地提高患者的生成率。实验证明抑制 Flt4 的表达，可抑制肿瘤脉管系统特别是淋巴管的形成、分化、生长，同时也抑制肿瘤的转移，使抗肿瘤淋巴管形成的治疗成为可能。Makinen 等[13]就已发现可溶性 VEGFR-3 可抑制 VEGF-C 信号传递作用而抑制淋巴管新生，并能使已形成的淋巴管消退，为防治非小细胞肺癌经淋巴道转移带来了希望。

参考文献：

[1] 谢南英，韩耀光，杨慈英. 肺癌常见误诊原因探讨[J]. 华南国防医学杂志，2000，14(4)：61－64.

[2] Kaipainen A，Korhonen J，Mustonen T，*et al*. Expression of the fmslike tyrosine kinase Flt-4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1995，92(8)：3566－3570.

[3] Tang R F，Itakura J，Aikawa T，*et al*. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer[J]. Pancreas，2001，22(3)：285－292.

[4] Weidner N，Folkman J，Pozza F，*et al*. Tumor angiogenesis：a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Invst，1992，84(24)：1875－1886.

[5] Karkkainen M J，Makinen T，Alitalo K. Lymphatic endothelium：a new frontier of metastasis research[J]. Nat Cell Boil，2002，4(1)：E2－E5.

[6] Joukov V，Pajusola K，Kaipainen A，*et al*. A novel vascular endothelial growth factor，VEGF-C is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR(VEGFR-2) receptor tyrosine kinases[J]. EMBO J，1996，15(2)：290－298.

[7] Joukov V，Sorsa T，Kumar V，*et al*. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C[J]. EMBO J，1997，16(13)：3898－3911.

[8] Yonemura Y，Fushida S，Bando E，*et al*. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor(VEGFR)-3 in gastric cancer[J]. Eur J Cancer，2001，37(7)：918－923.

[9] 董　昕，邱雪杉，王恩华，等. 血管内皮生长因子 C 及其受体 3 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 中华病理学杂志，2003，32(2)：128－132.

[10] Saaristo A，Partanen T A，Arata J，*et al*. Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in the nasal mucosa and in nasopharyngeal tumors[J]. Am J Pathol，2000，157(1)：7－14.

[11] 高建飞，杜光祖，章必成. HMVP 与 HVP 方案治疗晚期非小细胞肺癌前瞻研究[J]. 华南国防医学杂志，2004，18(4)：8－11.

[12] 吴拥军，吴逸明，王丽萍，等. 肿瘤标志物联合检测及模式识别技术在肺癌患者组织分型中的应用价值[J]. 河南医科大学学报，2000，35(3)：214－217.

[13] Makinen T，Jussila L，Veikkola T，*et al*. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3[J]. Nat Med，2001，7(2)：199－205.

（编辑　龙　亮）