文章编号:1000-5404(2005)08-0789-04

论著

大肠癌 VEGF-C 和 VEGF-D 的表达及其相关性的研究

牟江洪[1],阎晓初[1],王 东[2],李增鹏[2],段光杰[1],向德兵[2] (第三军医大学:[1]西南医院病理科,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨血管内皮生长因子-C和-D(VEGF-C和-D)在大肠癌组织中的表达特点及其临床意义。**方法** 应用免疫组化S-P法检测96例大肠癌及正常大肠组织中VEGF-C和-D的表达,并分析其与大肠癌临床病理参数及预后的关系。**结果** 大肠癌组织VEGF-C和-D阳性率明显高于正常大肠组织($P<0.01$),而且两项指标间表达率呈显著正相关($r=0.466$, $P<0.01$)。大肠癌VEGF-C或-D表达率在大肠癌分化程度、Dukes分期、淋巴结转移及患者预后间差异显著。($P<0.01$, $P<0.05$)。大肠癌原发灶与淋巴结转移灶中VEGF-C和-D表达相一致($P<0.01$, $r=0.429$ 和 $P<0.01$, $r=0.511$)。**结论** 大肠癌VEGF-C和-D高表达可能在肿瘤发生中起一定作用,并且可以作为判断大肠癌淋巴结转移和评估患者预后的重要参考指标。

关键词: 大肠癌;VEGF-C;VEGF-D;转移;预后
中图法分类号: R730.23; R735.34 **文献标识码:** A

Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factors C and D in carcinomas of large intestine

MOU Jiang-hong[1], YAN Xiao-chu[1], WANG Dong[2], LI Zeng-peng[2], DUAN Guang-jie[1], XIANG De-bing[2] ([1]Department of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression of endothelial growth factors C and D (VEGF-C and -D) in carcinomas of large intestine and its clinical significance. **Methods** The expression of VEGF-C and -D in 96 cases with carcinomas of large intestine were detected by SP immunohistochemical technique and its relationship with clinicopathological features and prognosis was analyzed. **Results** The expression of VEGF-C or -D was significantly higher in tumor tissue than that in normal mucosa ($P<0.01$). The expression of VEGF-C had significantly positive correlation with that of VEGF-D ($r=0.466$, $P<0.01$). VEGF-C and -D positive expression was significantly correlated with tumor differentiation, Dukes' stage, lymph node metastasis and prognosis in 96 cases with carcinomas of large intestine ($P<0.05$), but their relationship with age and gender of the patients, size, site and depth of tumor invasion and distant organ metastasis was not significant ($P>0.05$). The expression of VEGF-C and -D in metastatic lymph nodes was consistent with that in the primary tumor ($r=0.429$, $P<0.01$ and $r=0.511$, $P<0.01$). **Conclusion** VEGF-C and -D might be of great importance in colorectal carcinogenesis because of their overexpression in carcinoma of large intestine, and they may serve as useful markers to predict lymph node metastasis and to evaluate prognosis of patients with CRC.

Key words: colorectal neoplasm; endothelial growth factors C; endothelial growth factors D; metastasis; prognosis

肿瘤血管生成是当今肿瘤研究的热点之一,但是肿瘤淋巴管生成却因为种种原因一直被忽视。新近认识的血管内皮生长因子-C和-D(VEGF-C和-D)是主要的淋巴管生成因子,其可能与肿瘤发生、发展有关,尤其是促进肿瘤淋巴管生成和淋巴结转移的潜在作用已越来越引起人们的重视。大肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,并具有较高的淋巴结转移率。VEGF-C和-D在大肠癌中的表达及意义还不十分清楚,我们应用免疫组化方法检测人大肠癌组织中VEGF-C和-D的表达,旨在探讨其与临床病理参数及预后之间的关系。

1 材料与方法

1.1 临床材料

选取大坪医院1996-1998年间大肠癌根治术石蜡标本96例,其中男性50例,女性46例,男女比例约为1:1;年龄22~83岁,平均年龄53岁,中位年龄57岁;术前均未进行抗肿瘤治疗。

作者简介:牟江洪(1973-),男,四川省荣县人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68757374
通讯作者:阎晓初,电话:(023)68754432, E-mail: yxchwq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-02-05;修回日期:2004-11-18

其中有淋巴结转移的41例，无淋巴结转移的55例；有远处器官转移的14例，无远处器官转移的82例。所有患者均获得随访结果，随访时间3～83个月，总体5年生存率61.46%。术后1个月内死亡的病例不在本研究之列。

1.2 免疫组化染色与结果判定

所有标本经10%中性甲醛液固定，常规石蜡包埋，4 μm切片，水化后行免疫组化S-P法染色，切片均采用胰酶消化和微波抗原修复，其余步骤参照试剂盒说明进行。每例标本均对癌组织和相应正常大肠黏膜染色，有淋巴结转移或远处器官转移的病例同时进行转移灶染色。抗人VEGF-C和-D多克隆抗体购自Santa Cruz，S-P试剂盒购自北京中山生物技术公司。VEGF-C和-D表达采用半定量计分法判定[1]，细胞着色强弱分为四级：不着色=0，弱着色=1，中等着色=2，强着色=3；着色细胞比例也分为四级：无细胞着色=0，着色细胞比例<25%=1，着色细胞比例25%～50%=2，着色细胞比例>50%=3，着色细胞比例>75%=4。细胞着色强弱和着色细胞比例二者乘积≤2为阴性表达，>2为阳性表达。

1.3 统计学处理

应用SPSS10.0统计软件对大肠癌VEGF-C和-D表达率与临床病理参数之间的关系采用χ^2或Fisher精确检验；大肠癌VEGF-C和-D表达的相关性采用Spearman秩相关分析；生存率采用Kaplan-Meier法计算，组间差异用Log-rank检验。

2 结果

2.1 大肠癌VEGF-C和-D表达

VEGF-C和-D阳性物质呈棕黄色细颗粒状，主要定位于大肠癌癌细胞胞浆，偶见于癌组织间质脉管内皮细胞。大肠癌组织VEGF-C和-D阳性率分别为43.75%和38.54%均显著高于各自在正常大肠组织的表达率19.79%和13.54%（$P<0.01$），同1病例中癌细胞着色程度均强于正常大肠粘膜上皮细胞，而癌组织VEGF-C或VEGF-D阴性病例，其正常大肠粘膜无VEGF-C和-D表达（图1,2）。41例转移至淋巴结的癌组织与原发部位癌组织VEGF-C和-D表达程度相一致（$r=0.429$，$P<0.01$和$r=0.511$，$P<0.01$）。

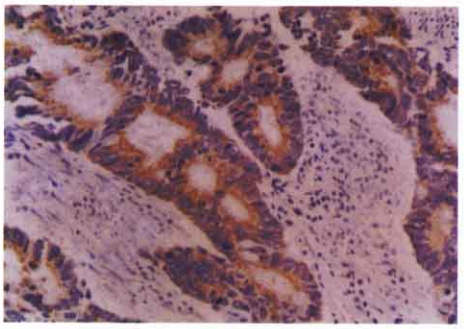


图1 大肠癌VEGF-C阳性表达 （S-P×100）

Fig 1 Positive expression of VEGF-C in large intestine carcinomas （S-P×100）

2.2 大肠癌VEGF-C和-D表达相关性分析

我们发现大肠癌组织中VEGF-C和-D共同阳性或共同阴性的病例很多，其中VEGF-C(+)/VEGF-D(+)27例、VEGF-C(+)/VEGF-D(−)15例、VEGF-C(−)/VEGF-D(+)10例、VEGF-C(−)/VEGF-D(−)44例，Spearman秩相关分析表明二者表达有显著的正相关性（$r=0.466$，$P<0.01$）。

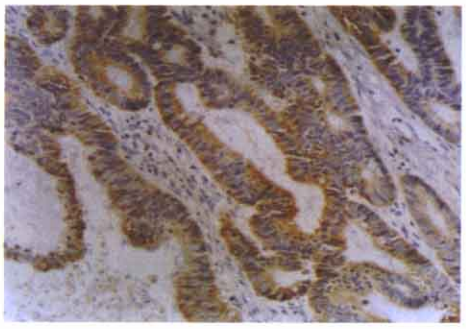


图2 大肠癌VEGF-D阳性表达 （S-P×100）

Fig 2 Positive expression of VEGF-D in large intestine carcinomas （S-P×100）

2.3 大肠癌VEGF-C和-D表达率与临床病理参数的关系

经χ^2检验VEGF-C或-D表达率均与大肠癌分化程度、Dukes分期及淋巴结转移密切相关。低分化大肠腺癌VEGF-C和-D阳性率分别为16.67%和8.33%均低于高分化腺癌（51.85%，$P=0.58$；48.15%，$P=0.02$），其中VEGF-D差异显著；Dukes分期的C和D期VEGF-C和-D阳性率（63.04%，54.35%）明显高于A和B期（26%，24%）（$P<0.01$）；41例有淋巴结转移的病例VEGF-C和-D阳性率（65.85%，56.10%）显著高于无淋巴结转移病例（27.27%，25.45%）（$P<0.01$）。但是VEGF-C和-D表达率与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位、浸润深度以及远处器官转移没有关系（$P>0.05$）（表1）。

表1 大肠癌VEGF-C和VEGF-D与临床病理指标之间的关系

Tab 1 Relationship between expression of VEGF-C and VEGF-D and clinicopathological features in large intestine carcinomas

Clinicopathological features		n	VEGF-C		VEGF-D		P
			(+)	(−)	(+)	(−)	
Gender	Female	46	19	27	16	30	>0.05
	Male	50	23	27	21	29	
Age	≤57	48	23	25	22	26	>0.05
	>57	48	19	29	15	33	
Size of tumor	≤4 cm	43	16	27	13	30	>0.05
	>4 cm	53	26	27	24	29	
Site of tumor	colon	35	15	20	13	22	>0.05
	rectum	61	27	34	24	37	
Tumor grade	Well	54	28	26	26	28	<0.05
	Moderate	30	12	18	10	20	
	Poor	12	2	10	1*	11	
Depth of invasion	Chorion not involved	30	9	21	8	22	>0.05
	Chorion involved	66	33	33	29	37	
Lymph node metastasis	Positive	41	27	14	23	18	<0.01
	Negative	55	15	40	14	41	
Organ metastasis	Positive	14	8	6	7	7	>0.05
	Negative	82	34	48	30	52	
Dukes' stage	A and B	50	13	37	12	38	<0.01
	C and D	46	29	17	25	21	

*：$P<0.05$，*vs* well differentiated carcinomas

2.4　大肠癌 VEGF-C 和 VEGF-D 与预后的关系

96 例大肠癌患者术后生存 5 年及以上者 59 例，总体 5 年生存率 61.46%。经 Log-rank 检验，大肠癌 VEGF-C 和-D 表达与患者预后显著相关（$r_C = 0.418$，$r_D = 0.482$，$P < 0.05$），VEGF-C 和-D 阳性病例的 5 年生存率分别为 50%和 48.65%明显低于阴性病例 70.37%和 69.49%的 5 年生存率，预后不良。

3　讨论

最近认识的 VEGF-C 和-D 是主要的淋巴管生成因子，它们具有两个不同的受体 VEGFR-2 和-3。VEGF-C 和-D 蛋白前体通过蛋白水解处理，既可激活 VEGFR-2，诱导血管生成，也可结合并激活 VEGFR-3，诱导淋巴管生成。研究表明 VEGF-C 和-D 在体内经蛋白水解处理后，由于其结构改变，使其与 VEGFR-3 的亲和力比 VEGFR-2 要高的多[2]，并在体内相对低浓度的条件下 VEGF-C 和-D 就可刺激淋巴管内皮细胞增殖、迁移，从而诱导淋巴管生成[3]。目前，关于大肠肿瘤中 VEGF-C 和-D 的表达频率文献报道不一，最近 Hanrahan 等[4]对大肠癌、腺瘤和正常粘膜的几种 VEGFs 表达检测发现 VEGF-C 在大肠癌组织中表达显著高于正常组织，VEGF-C mRNA 在癌组织也较腺瘤显著增高，而 VEGF-D mRNA 在正常组织较腺瘤和癌表达显著增高。提出 VEGF-C 对进展期大肠癌的转移起主要作用，而 VEGF-D 在原发癌远端相对正常粘膜表达增高提示与肿瘤周围环境改变有关，也许可能提高肿瘤细胞的后期播散。然而 Parr 等[5]对大肠癌研究发现 VEGF-D 在癌组织中的表达较正常组织显著增高，VEGF-C 及其受体 VEGFR-2 在癌组织和正常组织中表达无显著性差异，但其受体 VEGFR-3 在癌组织表达显著高于正常组织。本实验中 96 例大肠癌组织 VEGF-C 和-D 阳性率都非常显著地高于正常组织（$P < 0.01$），同一病例中癌细胞着色都强于正常粘膜上皮细胞，而大肠癌组织 VEGF-C 和-D 阴性病例的相应正常粘膜也无 VEGF-C 和-D 表达，这表明 VEGF-C 和-D 在大肠癌发生、发展中可能具有重要的作用。同时本实验结果还显示 VEGF-C 和-D 表达有显著的正相关性（$P < 0.01$，$r = 0.466$），提示它们可能有相似的诱发因素或者彼此之间有协调作用。

目前已发现人体大约半数以上的肿瘤组织有 VEGF-C 表达，其中胃癌、食管癌、甲状腺癌、前列腺癌、头颈部癌和肺癌等肿瘤细胞 VEGF-C 水平增高与其淋巴结转移相关[6]。在实验性乳腺癌中，也证实肿瘤细胞 VEGF-C 转基因过度表达可选择性诱导肿瘤内淋巴管生成，导致肿瘤淋巴结转移增加，而无明显的血管生成效应[7]。但在结直肠癌研究结论不一，有研究表明伴淋巴结转移的结直肠癌具有高水平的 VEGF 表达，但 VEGF-C 和-D 表达与癌细胞淋巴管播散无关[8]。也有研究表明结直肠癌 VEGF-C mRNA 表达与淋巴管受累、淋巴结转移以及浸润深度相关，而与静脉受累和肝转移无关；VEGF-D 表达与癌细胞淋巴管浸润相关，与肿瘤微血管密度和癌细胞血管浸润间未发现相关性，并认为 VEGF-D 表达是结直肠癌一种独立的预后判断标志[9]。本实验结果显示，VEGF-C 和-D 阳性组淋巴结转移率均显著高于阴性组（$P < 0.01$），且多数病例中原发灶与淋巴结转移灶两种细胞因子表达相一致，进一步证实 VEGF-C 和-D 过度表达与大肠癌淋巴结转移相关。推测结直肠癌中 VEGF-C 和-D 可能并非扮演血管生成因子的角色，而是在肿瘤淋巴管生成及其功能调节上起重要作用。但我们也发现存在少数病例出现原发灶表达率低，而转移灶表达率高的现象，分析原因可能是癌细胞转移后，由于其异质性改变也许导致 VEGF-C 或-D 表达上调引起。

肿瘤可以通过淋巴道或血道转移至远处器官，那么 VEGF-C 和-D 表达与大肠癌远处器官转移有无关系呢？文献[9～11]报道不一。本实验显示 VEGF-C 或-D 阳性病例远处器官转移率虽然较 VEGF-C 或-D 阴性组增高，但经统计学处理无显著性差异（$P > 0.05$）。同时，分析 VEGF-C 和-D 表达与其他临床病理参数的关系，显示大肠癌 VEGF-C 和-D 表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位无关（$P > 0.05$）。但本研究表明两种细胞因子表达与肿瘤浸润深度无关，并且低分化大肠腺癌中 VEGF-C 和 VEGF-D 表达率明显低于高分化（$p < 0.05$），这与 Furudoi 等[11]报道有所差异，但是在 Akagi[10]和 Kawakami 等[12]的研究中低分化大肠腺癌 VEGF-C 表达似乎有下降的趋势。提示在大肠低分化腺癌的转移过程中 VEGF-C 和-D 可能并非一个主要因素。VEGF-C 或-D 高表达在一些肿瘤中与淋巴结转移呈正相关，但是在另外一些肿瘤中呈负相关或无关，其原因可能是不同肿瘤中 VEGF-C 或-D 前体蛋白水解程度和受体在脉管表达方式不同；或者还有其他未知的类似于血管抑素的淋巴管抑素表达[13]。

胃肠道癌 VEGF-C 和-D 中表达与患者预后的关系，文献报道有所不一，Duff 等[13]研究发现胃癌中 VEGF-C 和-D 表达增高其患者 5 年生存率显著降低，而大肠癌中 VEGF-C 和-D 表达程度与患者预后无关，但最近发现结直肠癌组织中 VEGF-C 和 -D 表达阳性的肿瘤患者，其生存时间较阴性者显著缩短[14]。本实验也显示大肠癌 VEGF-C 和-D 表达与患者预后显著相关（$P < 0.05$），VEGF-C 或 VEGF-D 阳性患者的 5 年生存率明显低于阴性患者，预后不良，提示 VEGF-C 和-D 可能是大肠癌患者独立的重要的预后因素。因此大肠

癌组织中 VEGF-C 和-D 检测可作为判断淋巴结转移和预后的有效参考指标。

参考文献：

[1] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(6): 1459 – 1463.

[2] 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.

[3] Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, *et al*. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(17): 9671 – 9676.

[4] Hanrahan V, Currie M J, Gunningham S P, *et al*. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression[J]. J Pathol, 2003, 200(2): 183 – 194.

[5] Parr C, Jiang W G. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers in human colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2003, 23(2): 533 – 539.

[6] Stacker S A, Achen M G, Jussila L, *et al*. Lymphangiogenesis and cancer metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 573 – 583.

[7] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, *et al*. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192 – 198.

[8] George M L, Tutton M G, Janssen F, *et al*. VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression[J]. Neoplasia, 2001, 3(5): 420 – 427.

[9] White J D, Hewett P W, Kosuge D, *et al*. Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(6): 1669 – 1675.

[10] Akagi K, Ikeda Y, Miyazaki M. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues[J]. Br J Cancer, 2000, 83(7): 887 – 891.

[11] Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, *et al*. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma[J]. Oncology, 2002, 62(2): 157 – 166.

[12] Kawakami M, Furuhata T, Kimura Y, *et al*. Quantification of vascular endothelial growth factor C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer[J]. Surgery, 2003, 133(3): 300 – 308.

[13] Duff S E, Li C, Jeziorska M, *et al*. Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy[J]. Br J Cancer, 2003, 89(3): 426 – 430.

[14] Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, *et al*. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma[J]. Cancer Sci, 2004, 95(1): 32 – 39.

（编辑 王 红）

（上接 788 页）

汇。影响椎基底动脉系统最常见的血管病变是动脉粥样硬化，其斑块可造成大血管狭窄和闭塞[1]。起自 PCA 的穿支动脉供应中脑和丘脑，枕叶皮质由 PCA 供血。PCA 狭窄、闭塞最常见的临床表现为枕叶梗死引起的对侧偏盲伴黄斑回避，且临床症状因闭塞部位不同而有很大差异。

PCA 是后循环最远端的血管，路径最长。由于椎基底动脉的迂曲，使得实施 PTCAS 非常困难。术中当支架通过椎动脉与基底动脉连接处时，出现基底动脉严重痉挛(spasm)，基底动脉远端造影剂不显影，经指引导管内给予罂粟碱 6 mg，痉挛立即解除。由于支架通过弯曲后易造成指引导管"前跳"现象，我们则采用支架伴随跟踪指引导丝技术，即指引导丝不要放置过深，以免导丝前跳损伤远端脑血管。由于 PCA 与基底动脉成角常常较大，故支架通过时一定要轻柔，多采用旋转技术。释放支架前最好采用造影证实支架位置，而不宜用路径图方法。由于支架推送过程中，常伴指引导丝后退，故退支架输送球囊时，务必应首先后撤指引导丝一部分，再支架输送球囊与指引导丝一同回撤。由于患者双侧椎动脉管径不一致，故我们建议应通过优势侧椎动脉行 PCA 的 PTCAS。

我们认为小口径 PCA 行血管成形和支架植入对处理 PCA P1 段狭窄是可行的，可以防止 PCA 所支配区域的脑组织梗塞。单纯 PCA 球囊扩张成形术易造成 PCA 内膜撕裂，急性闭塞；远期血管弹性回缩(recoil)易造成再狭窄，所以我们则采用球囊扩张成形和支架植入。临床上把直径小于 2.70 mm 的血管通常称为小血管，Arthos[Pico] 小血管支架是采用新型支架材料钴铬合金，经激光镂刻制造的管状支架，有着极好的柔韧性和血管顺应性，可以通过任何角度到达任何病变部位。同时由于钴铬合金比单纯的不锈钢支架有着很好的血管生物相容性，又不含有镍、钼离子，Arthos[Pico] 小血管支架与血管壁的接触面积很小，只有 13%，故对人体过敏反应非常之小[1]。钴铬合金支架 Arthos[Pico] 的最优秀之处还在于其支架壁厚仅为普通不锈钢支架壁厚的一半为 65 μm，植入后的血管剖面图更直观、更简洁地说明了支架壁厚对血管腔径的影响。Arthos[Pico] 小血管支架的径向支撑力是普通不锈钢支架的 2 倍，平均值达 2.070 mN。关于血管支架的壁厚及径向支撑力对于再狭窄的影响认为：支架壁越薄，支架植入后的再狭窄率越低；径向支撑力越大越能使支架术更完善，成形血管更完美，从而降低再狭窄率。

关键词：大脑后动脉；狭窄；支架；成形术

中图法分类号：R743.405 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张临洪，王 娟，闻立斗. 椎基底动脉系统卒中[J]. 国外医学脑血管疾病分册，2004，12(5)：391 – 399.

[2] Koenigsberg R A, McCormick D, Thomas G, *et al*. Vertigo secondary to isolated PICA insufficiency: successful treatment with balloon angioplasty [J]. Surg Neurol, 2003, 60(4): 306 – 310.

[3] Korkmaz M E, Tayfun E, Muderrisoglu H, *et al*. Carbon coating of stents has no effect on inflammatory response to primary stent deployment[J]. Angiology, 2002, 53(5): 563 – 568.

（编辑 薛国文）