文章编号:1000-5404(2006)10-1095-03

论著

膀胱移行细胞癌 VEGFR-2 表达与血管生成的研究

梁培禾,靳风烁,张克勤,聂志林,叶 锦 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth receptor 2, VEGFR-2)表达与血管新生在膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)中的意义。**方法** 应用免疫组化技术检测72例BTCC标本VEGFR-2的表达,并标记CD31阳性细胞计算微血管密度(microvessel density, MVD)。**结果** 72例BTCC中VEGFR-2表达阳性率为56.94%,不同分级、分期、体积的肿瘤之间表达无明显差异。G_3级肿瘤MVD高于G_1、G_2级($P=0.002\ 91$、$0.007\ 37$),浸润型肿瘤高于浅表型($P=0.010\ 13$),直径3 cm以上肿瘤高于较小肿瘤($d\leqslant 1$ cm:$P=0.030\ 76$;1 cm $<d<$ 3 cm, $P=0.047\ 69$)。多发与单发、初发与复发肿瘤之间VEGFR-2表达和MVD均未见显著差异;VEGFR-2表达阴性和阳性患者MVD无明显差异。**结论** 不同生物学特征BTCC中VEGFR-2表达差异不明显,而血管新生存在差异,可能与肿瘤细胞异质性及血管新生途径的多样化有关。VEGF-VEGFR-2相互作用在刺激膀胱肿瘤细胞增殖中作用可能有限,而MVD对判断膀胱肿瘤恶性程度和预后有一定价值。

关键词:血管新生;微血管密度;血管内皮生长因子受体
中图法分类号:R730.23;R737.14;R977 **文献标识码**:A

VEGFR-2 expression and microvessel density in bladder transitional cell carcinoma

LIANG Pei-he, JIN Feng-shuo, ZHANG Ke-qin, NIE Zhi-lin, YE Jin (Department of Urinary Surgery, Institute of Surgery Reseatch, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the role of vascular endothelial growth receptor 2 (VEGFR-2) expression and angiogenesis in bladder transitional cell carcinoma (BTCC). **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of VEGFR-2 and CD31 in the specimens from 72 cases of BTCC, and then the microvessel density (MVD) was measured in the tumors. **Results** Among the 72 cases, the positive rate of VEGFR-2 was 56.94%. There was no significant difference among the expression of VEGFR-2 in the specimen of BTCC with different grade, stage, and size. The MVD was significantly higher in grade Ⅲ, infiltrating tumors, and comparatively large ($\geqslant$3 cm) tumors than in grades Ⅰ and Ⅱ ($P=0.002\ 91$ and $0.007\ 37$ respectively), superficial ($P=0.010\ 13$) and comparatively small tumors ($d\leqslant 1$ cm and $1<d<3$, $P=0.030\ 76$ and $0.047\ 69$ respectively). There was no significant difference in MVD in the cases of positive and negative expression of VEGFR-2. **Conclusion** MVD may provide important information in evaluating malignant degree and prognosis of BTCC. The expression of VEGFR-2 has no definite relation with the biological behavior of BTCC, of which the cause may be that many different angiogenesis pathway can be switched on due to the heterogeneity of tumor cells and VEGF-VEGFR-2 interaction on the proliferation of tumor cells may be limited.

Key words: angiogenesis; microvessel density; vascular endothelial growth receptor

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与其受体(VEGF receptor, VEGFR)间的作用在促进恶性肿瘤新生血管化中发挥了关键作用,与肿瘤进展关系密切。但有研究显示肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)只在部分肿瘤中与预后不良有一定相关性[1],肿瘤VEGFR-2的表达文献报道也有不一致之处,为此,我们利用免疫组化技术研究了膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)VEGFR-2的表达及血管新生情况。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集我院1999年11月至2003年6月因BTCC手术切除的肿瘤组织标本72例,男性61例,女性11例,年龄17~81岁,平均56.6岁。按TNM分期:浅表性癌(T_a~T_1)55例,浸润性

作者简介:梁培禾(1972-),男,山西省平遥县人,博士研究生,主治医师,主要从事泌尿生殖系统肿瘤和泌尿系统创伤方面的研究。电话:(023)66319944
通讯作者:靳风烁,电话:(023)68757364
收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-24

癌(T_2~T_4)17例;按WHO标准分级:高分化癌(G_1)29例,中分化(G_2)31例,低分化(G_3)12例。根据临床特点进行分类:最大瘤体直径(d)≤1 cm 15例,1 cm<d<3 cm 31例,d≥3 cm 26例;单发48例,多发24例;初发52例,复发20例。

1.2 实验方法

蜡块进行4 μm切片,行HE染色及CD31、VEGFR-2免疫组化染色,HE切片由病理医师阅片确认诊断。免疫组化采用美国GBI公司推出的二步法,一抗为兔抗CD31、VEGFR-2多克隆抗体,购自博士德公司,Poly Detection System染色试剂盒购自中杉公司。步骤如下:切片脱蜡,水化,1% H_2O_2甲醇封闭30 min,枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复后加一抗(1∶100),4 ℃过夜,依次滴加试剂1(Polymer Helper)、试剂2(polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG),分别在37 ℃孵育20、30 min后DAB溶液显色,苏木精复染后常规脱水,透明,中性树胶封片。

1.3 结果判定

1.3.1 VEGFR-2表达 阳性结果为细胞膜和细胞质呈棕黄色,按照阳性细胞比例(<25%为0分,25%~50%为1分,51%~75%为2分,>75%为3分)和染色深度(不着色为0分,浅棕色、略高于背景为1分,棕黄色中度着色、明显高于背景为2分,深棕色、强染为3分)两项计分之和将染色结果分为:-(0~1分)、+(2分)、++(3~4分)、+++(5~6分)[2]。

1.3.2 肿瘤微血管计数 进行CD31免疫组化染色标记血管内皮细胞后,选择5个血管密度大的"热点"(hot spot)区域,高倍镜(×200)下计数微血管数量,取平均数作为MVD。

1.4 统计学处理

采用Excel 2000软件对计数资料和计量资料分别进行χ^2检验及t检验。

2 结果

2.1 VEGFR-2的表达

VEGFR-2主要表达在间质微血管内皮细胞,肿瘤细胞也有表达,但表达程度相对较低,主要是呈色反应较浅,但内皮细胞和肿瘤细胞并不能截然区分,因此未根据其染色结果进行血管计数。VEGFR-2表达的详细情况见表1,经统计学处理显示其在不同病理分级、分期,以及不同大小、单发与多发、初发与复发的BTCC中无明显差异($P>0.05$)。

表1 不同生物学行为特征BTCC表达VEGFR-2的情况

参数		n	VEGFR-2表达情况			
			-	+	++	+++
病理分级	G_1	29	13	5	7	4
	G_2	31	12	7	8	4
	G_3	12	6	2	3	1
病理分期	浅表型(T_a~T_1)	55	25	12	12	6
	浸润型(T_2~T_4)	17	6	2	6	3
肿瘤大小	d≤1 cm	15	8	4	2	1
	1 cm<d<3 cm	31	12	4	9	6
	d≥3 cm	26	11	6	7	2
肿瘤数目	单发	48	21	8	11	8
	多发	24	10	6	7	1
预后	初发	52	23	9	13	7
	复发	20	8	5	5	2

2.2 膀胱肿瘤血管新生情况

根据CD31标记阳性内皮细胞进行血管计数,可见72例BTCC中MVD值G_3级高于G_1、G_2级,浸润型高于浅表型,体积较大者(d≥3 cm)高于体积较小者;但单发和多发肿瘤之间、原发和复发肿瘤之间无明显差异。此外,将患者分为肿瘤细胞VEGFR-2表达阴性与阳性两组,MVD未见明显差异($P>0.05$)。见表2、3。

表2 不同生物学行为特征膀胱肿瘤的MVD($\bar{x}\pm s$)

参数		n	MVD
病理分级	G_1	29	17.31±3.05
	G_2	31	17.83±3.02
	G_3	12	21.33±4.96[a]
病理分期	浅表型(T_a~T_1)	55	17.60±3.41
	浸润型(T_2~T_4)	17	20.18±3.83[b]
肿瘤大小	d≤1 cm	15	17.00±3.40
	1 cm<d<3 cm	31	17.65±3.55
	d≥3 cm	26	19.58±3.62[c]
肿瘤数目	单发	48	17.93±4.01
	多发	24	18.75±2.81
预后	初发	52	17.83±3.56
	复发	20	19.20±3.82

a:$P<0.01$,与G_1和G_2组比较;b:$P<0.05$,与浅表型比较;c:$P<0.05$,与d≤1 cm和1 cm<d<3 cm比较

表3 BEGFR-2表达不同时膀胱肿瘤的MVD($\bar{x}\pm s$)

VEGFR-2表达	n	MVD
阳性	41	18.16±3.77
阴性	31	18.24±3.62

3 讨论

肿瘤的发生、发展是其自身恶性增殖特性的表现,但还有赖于从宿主机体汲取营养,早期可通过简单扩散进行,但随着肿瘤的生长,血液运输逐渐成为占主导地位的方式和肿瘤生长的必要条件。研究显示,当肿瘤体积达到1~2 mm^3时如没有新生血管形成,将会停止生长;新生血管化(neovascularization)的强度也决定了肿瘤生长速率,并对浸润、转移及复发等生物学行为发挥了重要作用[3]。正常生理条件下血管新生受到抑制和诱导因子间平衡的严格调控,而恶性肿瘤则具有与胚胎组织相似的诱导构建自身脉管系统的能力[4],其基础是肿瘤细胞自身产生,或作用于临近组织后产生多种血管新生相关因子,打破了原有平衡状态[5]。数10种促血管新生因子中,迄今发现的诱导内皮细胞增殖作用最强、特异性最高者是VEGF。目前克隆的VEGFR有VEGFR-1(flt-1)、VEGFR-2(flk-1/KDR)和VEGFR-3(flt-4),只有VEGFR-2主要发挥了传递细胞增殖信号的作用,在血管新生过程发挥了不可替代的作用,是目前研究的热点[6]。以往研究显示VEGFR-2只特异表达于肿瘤内皮细胞,但近年有研究

表明也表达于各种肿瘤细胞[7]。本研究显示，VEGFR-2主要表达在肿瘤血管内皮细胞，肿瘤细胞上也有一定程度表达，提示肿瘤细胞产生 VEGF 除刺激血管内皮细胞增殖形成新生血管外，还可能通过自分泌方式作用于肿瘤细胞，刺激增殖。

目前文献报道 VEGF 的表达在大多肿瘤中与分级、预后等特征相关，而 VEGFR-2 的文献报道则不一致，如文献[8]报道 VEGFR-2 在低分化及晚期肿瘤中表达升高，在 BTCC 中则随分级增高表达下降[9]。本实验显示，肿瘤细胞 VEGFR-2 表达相对较弱，不同特征肿瘤之间未发现明显差异，提示 VEGF-VEGFR-2 相互作用在刺激肿瘤细胞增殖中作用可能有限。

目前研究显示 MVD 与实体肿瘤的临床病理分级、预后判断关系密切，可作为独立的预后判断因素[10]。计算 MVD 需对内皮细胞进行标记，标记指标有多种，常用的有Ⅷ因子相关抗原、CD31 等，还有利用植物血凝素与内皮细胞特异性结合的特性进行染色标记者。本实验中则是对 CD31 抗原进行免疫组化染色后计数微血管，结果显示 MVD 与 BTCC 分级、分期、体积等有一定关系，G_3 级、浸润型，及体积较大者 MVD 也较高，与文献报道一致，提示 MVD 与 BTCC 浸润能力、分化程度等关系密切；体积较大的肿瘤显然更需要血管新生的支持，可能通过中心缺氧等机制诱导血管新生。总之，血管新生是肿瘤生长浸润的重要步骤，MVD 对评估肿瘤恶性程度和预后有一定价值。本实验未显示 MVD 在原发和复发、单发和多发 BTCC 之间有差异，推测原因可能是：①病例仍偏少，不足以说明生物学特征多样的肿瘤之间的差别；②复发和多发受环境、职业、饮食等多种因素影响；③目前肿瘤复发和多发的机制不明，与初发和单发在诱导血管新生机制上的差别也不明确；④有些患者本次就诊虽为初发，但肿瘤内在生物学特性却可能属于“复发”。

虽然血管新生是肿瘤生长的必要条件，但 MVD 并不能完全反映肿瘤生长情况，有研究显示 MVD 只在部分血管新生强度较高的肿瘤中与预后相关，而在不同分级、分期的 BTCC 中无显著差异，与预后不良相关性也不明显[1]。可能的解释是人类肿瘤由变异细胞形成发展至临床可诊断水平经历时间较长，基因突变及积累几率高；因此，分级、分期等特征相同的肿瘤，甚至同一肿瘤内也易分化出现生物学特征不同的异质细胞群，耐受缺血缺氧的能力不同，产生的血管新生因子和诱导血管新生的能力也有差异。例如，乳腺癌约 50% 的初诊病例只产生单一的 VEGF，但发展至晚期则可产生 FGF-2，PlGF，PD-ECGF 等多种因子[11]；血管周围分布的肿瘤细胞对血供依赖较强[12]。临床常见肿瘤 MVD 下降但病情恶化的现象[13]，很多抗血管新生治疗在动物实验中效果良好，但用于人体后却不尽如人意；这些可能正是人类肿瘤生物学特征多变造成的。VEGF、VEGFR-2 之间的作用在诱导血管新生中具有重要意义，但本实验观察到 VEGFR-2 在分级、大小、生长方式等特点不同的肿瘤中表达无明显变化，其表达阳性与阴性时 MVD 也无明显差异，而 MVD 则与肿瘤生物学特点有一定关联，原因可能也在于此，即由于肿瘤细胞生物学特性的“多样性”，诱导血管新生的途径也呈现出“多样性”。因此，只有对肿瘤诱导血管新生的机制进行深入研究，才能找到更好的具有针对性的治疗方法。

参考文献：

[1] SHARMA S, SHARMA M C, SARKAR C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis[J]. Histopathology, 2005, 46(5): 481-489.

[2] 陶文惠，邓长生，朱尤庆. 一氧化氮合酶和微血管生成与胃癌发展的关系[J]. 中华消化杂志，2004，24(1)：11-13.

[3] BOEHM T, FOLKMAN J, BROWDER T, *et al*. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. Nature, 1997, 390(6658): 404-407.

[4] RAK J, YU J L. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular “supply” and vascular “demand”[J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(2): 93-104.

[5] NYBERG P, XIE L, KALLURI R. Endogenous inhibitors of angiogenesis[J]. Cancer Res, 2005, 65(10): 3967-3979.

[6] FERRARA N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(10): 795-803.

[7] HEROLD-MENDE C, STEINER H H, ANDL T, *et al*. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells[J]. Lab Invest, 1999, 79(12): 1573-1582.

[8] 杨绍波，孔垂泽. 血管内皮生长因子受体在肾细胞癌组织中的表达[J]. 中国医科大学学报，2004，33(4)：352-353.

[9] 方　全，唐孝达，武文森. 血管内皮生长因子受体在膀胱癌中的表达及与血管生成的关系[J]. 肿瘤，2001，21(4)：300-302.

[10] SINGHAL S, VACHANI A, ANTIN-OZERKIS D, *et al*. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(11): 3974-3986.

[11] RELF M, LEJEUNE S, SCOTT P A, *et al*. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis[J]. Cancer Res, 1997, 57(5): 963-969.

[12] YU J L, RAK J W, CARMELIET P, *et al*. Heterogeneous vascular dependence of tumor cell populations[J]. Am J Pathol, 2001, 158(4): 1325-1334.

[13] ABDALLA S A, BEHZAD F, BSHARAH S, *et al*. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours[J]. Oncol Rep, 1999, 6(4): 839-842.

（编辑　张大春）