文章编号:1000-5404(2006)11-1237-03

论著

HMGB1和VEGF-C/D在结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系

李 焱[1],蒋 勇[1],史立群[2],史爱学[2],彭亦良[1],梁后杰[1] (第三军医大学西南医院:[1]肿瘤科,[2]病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨HMGB1和血管内皮生长因子C/D(VEGF-C/D)在人结肠癌组织中的表达及与淋巴结转移之间的关系。**方法** 选择45例结肠癌标本,应用免疫组织化学染色方法,检测HMGB1和VEGF-C/D在人结肠癌组织中的表达,同时对其与临床病理参数的关系进行统计学分析。**结果** HMGB1在结肠癌组织中的阳性表达率为73.3%,其中有淋巴结转移的表达率为85.2%,无淋巴结转移的表达率为55.6%,差异有统计学意义。VEGF-C结肠癌组织中的阳性表达率为60%,其中有淋巴结转移的表达率为74%,无淋巴结转移的表达率为38.9%,二者差异显著。而且,HMGB1表达与VEGF-C表达呈正相关。结肠癌HMGB1和VEGF-C的表达水平与肿瘤细胞淋巴转移相关,而与患者的年龄、性别、分化程度等无相关性。**结论** HMGB1和VEGF-C的表达与结肠癌患者的淋巴结转移相关,可作为判断预后的一个观测指标。

关键词:HMGB1;VEGF-C/D;淋巴道转移;结肠癌
中图法分类号:R73-37;R730.23;R735.35 **文献标识码**:A

Correlation between high mobility group protein 1, VEGF-C/D expressions and lymph node metastasis in colon cancer

LI Yan[1], JIANG Yong[1], SHI Li-qun[2], SHI Ai-xue[2], PENG Yi-liang[1], LIANG Hou-jie[1] ([1]Department of Oncology, [2]Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To discuss the correlation between the expressions of high mobility group protein box 1 (HMGB1), VEGF-C/D and lymph node metastasis in colon cancer. **Methods** Forty-five colon cancer samples were stained by immunohistochemical method for VEGF-C/D, HMGB1. The correlations of VEGF-C/D, HMGB1 expressions and lymph node metastasis were analyzed statistically. **Results** Positive HMGB1 expression was in 33 specimens, lymph node metastasis was in 27 specimens with 23 specimens of positive HMGB1 and non-lymph node metastasis was in 18 specimens with 10 specimens of positive HMGB1. Positive VEGF-C expression was in 27 specimens with 20 in lymph node metastasis. The expression of HMGB1 was consistent with VEGF-C expression, and HMGB1 and VEGF-C expressions were closely correlated with lymph node metastasis, but not with age, sex, cellular differentiation. **Conclusion** HMGB1 and VEGF-C expression may become predictor to the prognosis of colon cancer patients.

Key words: HMGB1; VEGF-C; VEGF-D; lymph node metastasis; colon cancer

侵袭转移是恶性肿瘤的基本特征。淋巴道是大部分癌最常见的转移途径。有无淋巴结转移也是判断患者预后的重要指标。但肿瘤淋巴道转移的具体机制目前仍不十分清楚。近年来文献报道肿瘤细胞可通过自分泌或旁分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor C/D, VEGF-C/D),诱导肿瘤淋巴管生成,并认为增生的淋巴管可引起肿瘤转移几率的增加[1]。

高迁移率族蛋白B1(high mobility group protein box-1,HMGB1),最早发现可作为一种小分子量DNA结合蛋白在转录调节中有重要作用。近年来还发现它在炎症、细胞迁移、分化、肿瘤生成等过程中也有作用。

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,淋巴道转移是其最常见的转移方式。在研究中,我们运用免疫组织化学染色的方法,检测了结肠癌组织中HMGB1和VEGF-C/D的表达,拟对结肠癌发生淋巴道转移的机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集2003-2004年在我院行外科手术切除的结肠癌标本

作者简介:李 焱(1975-),男,四川省成都市人,硕士,医师,主要从事肿瘤侵袭转移方面的研究。电话:(023)65398341,E-mail:msflt@sina.com
通讯作者:梁后杰,电话:(028)68765194,E-mail:lianghoujie@sina.com
收稿日期:2006-02-17;修回日期:2006-03-12

45例，全部为腺癌。均经病理检查证实，术前患者未行任何治疗。其中男性31例，女性14例，年龄34～72岁，平均52.8岁。有淋巴结转移的27例。肿瘤分化程度：高分化17例，中分化21例，低分化7例。另取5例正常结肠组织为对照。标本经常规脱水、4%甲醛固定、石蜡包埋，连续切片（片厚4 μm）。

1.2 试剂

兔抗人VEGF-C多克隆抗体、DAB、S-P免疫组化染色试剂盒均购于北京中杉生物技术有限公司。兔抗人VEGF-D多克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。羊抗人HMGB1多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司。

1.3 方法

采用S-P法进行免疫组织化学染色。主要步骤如下：切片经常规脱蜡、水化，3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶，组织抗原修复10 min（用pH 6.0的0.01 mol/L柠檬酸缓冲液，于微波炉中加热94 ℃，每次5 min，共2次），正常血清封闭，加入一抗后37 ℃孵育30 min，湿盒中4 ℃过夜；次日PBS充分洗涤（5 min×3次），加入生物素标记二抗37 ℃孵育30 min，PBS漂洗（5 min×3次）后加入链亲和素过氧化物酶标记三抗37℃孵育30 min，PBS漂洗之后DAB显色；苏木精复染，透明，中性树脂封片，光镜下观察。PBS代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断

以细胞质内出现淡黄色至棕褐色颗粒，定位明确、染色明显，平均20%以上细胞染色的组织切片视为表达阳性。表达强度的分析采用每个切片采集5个视野，用Image Pro Plus（Media Cybernetics Inc. USA）图像分析系统测算其单位面积平均光密度值。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件进行 χ^2 检验及Spearman相关分析。

2 结果

2.1 HMGB1的表达

HMGB1表达于癌细胞和间质细胞的细胞质，呈淡黄色至棕黄色，在癌组织内及周围的基质内也可见弱染色（图1）。在45例标本中，有33例染色阳性（73.3%）；有淋巴结转移的27例中，HMGB1的阳性表达率85.2%，无淋巴结转移的18例，阳性染色率55.6%。HMGB1的表达与肿瘤病理学参数之间的关系见表1。

2.2 VEGF-C/D的表达

VEGF-C/D表达于癌细胞及间质细胞的细胞质，呈淡黄色至棕黄色，为局灶性或弥散性分布，细胞膜和细胞核不染色。在肿瘤周围正常组织中则基本没有表达（图2、3）。二者中以VEGF-C表达多见，阳性率达60%，有淋巴结转移的27例中VEGF-C阳性的有20例。VEGF-D阳性率为28.9%，淋巴结转移的患者中有8例VEGF-D阳性。VEGF-C/D的表达与肿瘤病理学参数之间的关系见表1。

表1 结肠癌HMGB1、VEGF-C/D表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	VEGF-C 阳性率	*P*值	VEGF-D 阳性率	*P*值	HMGB1 阳性率	*P*值
性别						
男	61.3%（19/31）	0.793	35.5%（11/31）	0.146	77.4%（24/31）	0.356
女	57.1%（8/14）		14.3%（2/14）		64.3%（9/14）	
年龄（岁）						
≥60	63.6%（7/11）	0.777	36.4%（4/11）	0.529	72.7%（8/11）	0.958
<60	58.8%（20/34）		26.5%（9/34）		73.5%（25/34）	
分化程度						
高	58.8%（10/17）	0.415	35.3%（6/17）	0.258	76.5%（13/17）	0.337
中	71.4%（15/21）		19%（4/21）		61.9%（13/21）	
低	28.6%（2/7）		42.9%（3/7）		100%（7/7）	
淋巴结转移						
有	74.1%（20/27）	0.018	29.6%（8/27）	0.893	85.2%（23/27）	0.028
无	38.9%（7/18）		27.8%（5/18）		55.6%（10/18）	

由表1可看出，结肠癌HMGB1和VEGF-C/D的表达水平在患者的年龄、性别、分化程度等方面差异不显著（$P>0.05$）。

2.3 HMGB1与VEGF-C/D表达的相关性

通过Spearman相关分析，发现HMGB1与VEGF-C表达存在相关性，相关系数 $r=0.321$，$P=0.042$。HMGB1与VEGF-D的相关性不明显。

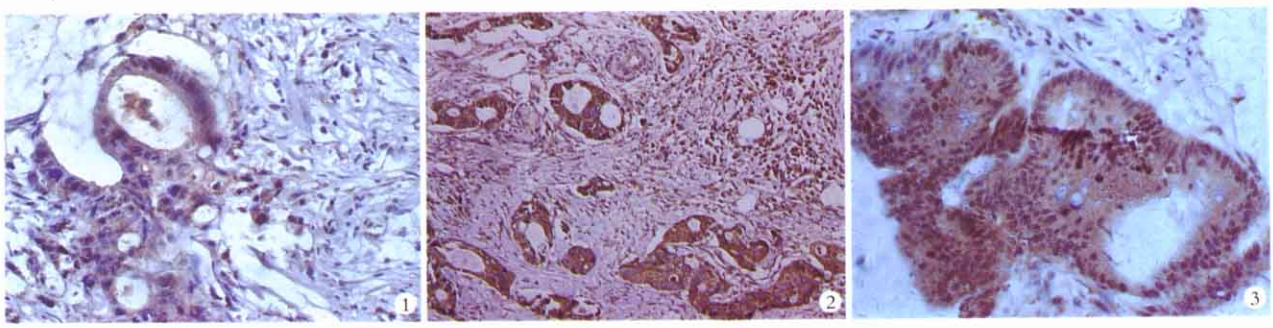


图1 结肠癌组织中HMGB1的表达 （S-P×400）

图2 结肠癌组织中VEGF-C的表达 （S-P×200）

图3 结肠癌组织中VEGF-D的表达 （S-P×400）

3　讨论

转移和复发是恶性肿瘤的主要生物学特征，是肿瘤患者致死的主要原因。结肠癌作为常见的消化道恶性肿瘤，局部淋巴结转移十分常见，常导致患者的治疗效果不佳。虽然目前肿瘤淋巴道转移的机制并不清楚，但普遍认为肿瘤淋巴管的生成有助于癌细胞的转移。

VEGF-C/D 作为目前比较明确的淋巴管生成因子，在肿瘤淋巴道转移中的作用引起研究人员越来越多的兴趣。它们的受体主要是 VEGFR2 和 VEGFR3。在成人，VEGFR3 主要表达于淋巴管内皮细胞，是淋巴管生成的特异性调节因子，VEGF-C/D 与 VEGFR3 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[2]。许多实体瘤均能合成 VEGF-C/D，不同类型的肿瘤表达能力不同，且其表达强度与肿瘤发生淋巴转移的程度有关。目前，对 VEGF-C 可增加肿瘤淋巴结转移机制的普遍认识是，它可通过激活淋巴管内皮，刺激淋巴管增生或扩张，这些新生或扩张的淋巴管，为肿瘤细胞的淋巴转移增加了机会。同时，激活的淋巴管内皮细胞可能分泌某些细胞因子，对肿瘤细胞的定向迁移产生趋化作用[3]。我们的研究中也检测了 VEGF-C/D 的表达与肿瘤淋巴结转移的关系。实验结果中，有淋巴结转移情况的，其 VEGF-C 表达也较多，这与国内外研究结果相似[4]

在 VEGF-C/D 来源问题上，目前已发现多种细胞可在适当的刺激因子下表达分泌这两种因子，有文献报道纤维母细胞、成纤维细胞、脐静脉内皮细胞等都可表达 VEGF-C/D[5]。还有研究者观察到某些肿瘤细胞在体外培养时并不表达 VEGF-C/D，在接种到动物体内后两者表达明显上调，并且是肿瘤病灶外周细胞高于肿瘤中心处的细胞[6]。在肿瘤局部微环境中，细胞种类众多，存在的各种刺激因子也不在少数，这些为刺激 VEGF-C/D 的生成准备了足够的条件。

HMGB1 最初发现时是一种广泛存在的 DNA 结合蛋白，它参与 DNA 的转录、复制、修复以及细胞运动等。随着研究的深入，发现 HMGB1 可作为一种细胞因子，在巨噬细胞、单核细胞受内毒素、IL-1、TNF 刺激后均能释放。HMGB1 还可由受损或坏死细胞释放。在肿瘤的发生、发展研究方面，已发现 HMGB1 与多种肿瘤的侵袭和转移有关[7]，在我们的研究中也看到有淋巴结转移的患者其 HMGB1 阳性率较高。此外有文献报道它可引起肿瘤的血管生成[8]。那么在淋巴管生成方面，HMGB1 是否也有类似作用呢？

我们的研究结果显示，结肠癌组织中肿瘤细胞、间质细胞均可表达 HMGB1，并且伴有淋巴结转移的结肠癌，其 HMGB1 阳性表达高于无淋巴结转移者，提示 HMGB1 阳性表达与结肠癌细胞的淋巴结转移有关系。检测 HMGB1 和 VEGF-C 的表达可作为评估结肠癌患者预后的一个观测指标。本实验结果统计分析提示，HMGB1 表达与 VEGF-C 表达具有相关性，说明结肠癌环境中存在的 HMGB1 可能与 VEGF-C/D 在促进结肠癌的淋巴结转移方面存在相互作用。有研究表明在与其受体 RAGE 结合后，HMGB1 可激活 MAPK、NF-KB 等途径[9]。而这些信号通路在部分肿瘤细胞中已证明都与 VEGF-C/D 的表达调节有关[10]。在结肠癌中是否也存在类似机制还有待于进一步实验研究。

参考文献：

[1] PADERA T P, KADAMBI A, DI-TOMASO E, *et al*. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics[J]. Science, 2002, 296(5574): 1883 - 1886.

[2] AMIOKA T, KITADAI Y, TANAKA S, *et al*. Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(10): 1413 - 1419.

[3] 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.

[4] KAJITA T, OHTA Y, KIMURA K, *et al*. The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancer, 2001, 85(2): 255 - 260.

[5] TROMPEZINSKI S, BERTHIER-VERGNES O, DENIS A, *et al*. Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D, by normal human keratinocytes and fibroblasts[J]. Exp Dermatol, 2004, 13(2): 98 - 105.

[6] ONOGAWA S, KITADAI Y, TANAKA S, *et al*. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D expression by the organ microenvironment in human colon carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(10): 1604 - 1609.

[7] XU Y, SUMTER T F, BHATTACHARYA R, *et al*. The HMG-I oncogene causes highly penetrant, aggressive lymphoid malignancy in transgenic mice and is overexpressed in human leukemia[J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3371 - 3375.

[8] SCHLUETER C, WEBER H, MEYER B, *et al*. Angiogenetic signaling through hypoxia HMGB1: an angiogenetic switch molecule[J]. Am J Pathol, 2005, 166(4): 1259 - 1263.

[9] HEISH C Y, CHEN C A, CHOU C H, *et al*. Overexpression of Her-2/NEU in epithelial ovarian carcinoma induces vascular endothelial growth factor C by activating NF-kappa B: implications for malignant ascites formation and tumor lymphangiogenesis[J]. J Biomed Sci, 2004, 11(2): 249 - 259.

[10] SU J L, SHIH J Y, YEN M L, *et al*. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(2): 554 - 564.

（编辑　栾　嘉）