文章编号:1000-5404(2007)02-0157-03

论著

结肠癌组织肿瘤相关巨噬细胞 VEGF-C/D 的表达及与淋巴结转移的关系

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 了解结肠癌肿瘤相关巨噬细胞中 VEGF-C/D 的表达,探讨其对结肠癌淋巴结转移的影响及可能机制。**方法** 采用特异的巨噬细胞标记物 CD68 等抗体以免疫组化染色的方法,并用双染、连续切片对比等对 45 例结肠癌标本中巨噬细胞 VEGF-C/D 的表达进行检测,同时行巨噬细胞计数,并统计分析两者间存在的关系。**结果** 在结肠癌相关巨噬细胞中检测到两种淋巴管生成因子的表达。统计分析显示 VEGF-C 表达与巨噬细胞计数具有相关性。有淋巴结转移者 VEGF-C 阳性细胞率高于无转移组。**结论** 结肠癌肿瘤组织中,不仅肿瘤细胞可分泌表达 VEGF-C/D,肿瘤相关巨噬细胞也可表达 VEGF-C/D。肿瘤相关巨噬细胞可通过诱导结肠癌局部淋巴管生成,对肿瘤的转移可起到一定的作用。

关键词: VEGF-C; VEGF-D; 肿瘤相关巨噬细胞; 结肠癌

中图法分类号: R392.2; R73-37; R735.35 **文献标识码:** A

Correlation between VEGF-C/D expressions in tumor associated macrophages 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, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To discuss the correlation between the VEGF-C/D expressions in tumor associated macrophage (TAM) and lymph node metastasis in colon cancer. **Methods** Forty-five colon cancer samples proven pathologically to be adenocarcinoma were stained by immunohistochemical method for VEGF-C/D and CD68. The correlation of VEGF-C/D expressions, macrophage counting and lymph node metastasis were analyzed statistically. **Results** The expressions of VEGF-C/D were detected in TAMs. VEGF-C expression was obviously higher in the samples with lymphatic metastasis. VEGF-C expression in colon cancer was related to the number of TAMs. **Conclusion** TAMs are important in the lymph node metastasis, because they can express VEGF-C/D and affect the lymphangiogenesis of colon cancer.

Key words: VEGF-C; VEGF-D; tumor associated macrophage; colon cancer

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,淋巴道转移是其最常见的转移方式。虽然肿瘤淋巴道转移的具体机制目前仍不十分清楚,但有报道肿瘤内浸润的巨噬细胞即肿瘤相关巨噬细胞对肿瘤的转移有一定影响[1]。在本研究中,我们运用免疫组织化学的方法,检测了结肠癌组织中淋巴管生成因子 VEGF-C/D 在肿瘤相关巨噬细胞中的表达,探讨肿瘤相关巨噬细胞在结肠癌淋巴道转移中的作用及其机制。

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:msf1t@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

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2003-2004 年在西南医院普通外科行外科手术切除的结肠癌标本 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、10% 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、鼠抗人 CD68 单克隆抗体,DAB 显色试剂盒,S-P9000 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。双染试

剂盒购于北京中杉生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 巨噬细胞分布、计数 采用巨噬细胞特异抗体 CD68 进行染色，巨噬细胞计数采用盲法进行，参考 Schoppmann 等[2] 的方法。低倍镜下选取染色最密集的视野，高倍镜下进行计数，每例计数 3 个视野，并求平均值。分别计数肿瘤边缘区域和中心区域的巨噬细胞。

1.3.2 VEGF-C/D 表达的检测 VEGF-C/D 单染采用常规 S-P 法进行，表达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[2,3]。巨噬细胞表达 VEGF-C 采用 LAB-SA 双染法，行 CD68 和 VEGF-C 染色。VEGF-C 显色呈紫色，CD68 显色呈红色。巨噬细胞表达 VEGF-D 采用连续切片分别染色 CD68 与 VEGF-D 抗体，并在同一位置进行对比，判断巨噬细胞是否表达 VEGF-D。染色操作均按抗体及试剂盒说明书严格进行。苏木精复染，脱水透明，中性树胶封闭。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件。VEGF-C/D 表达情况用 χ^2 检验。VEGF-C/D 表达与巨噬细胞计数间的关系采用 Spearman 相关分析。

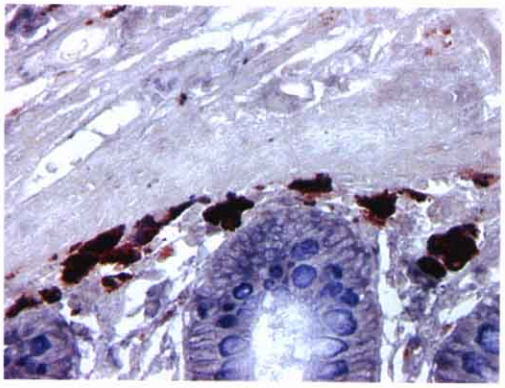
2 结果

2.1 肿瘤相关巨噬细胞分布及计数

以巨噬细胞表面标志 CD68 作为标记物检测其在肿瘤中的分布并计数，CD68 阳性呈棕黄色，位于细胞质和细胞膜。在各肿瘤组织周围和内部均可看到大量巨噬细胞浸润，以肿瘤周围浸润较明显。

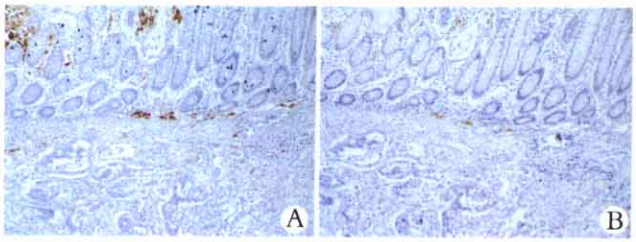
2.2 VEGF-C/D 表达与巨噬细胞计数的关系

VEGF-C/D 阳性染色位于细胞质中。不仅肿瘤细胞表达 VEGF-C、D，间质细胞也有表达，在肿瘤周围正常组织中则基本没有表达。二者中以 VEGF-C 表达多见，阳性率达 60%，VEGF-D 阳性率为 28.9%。而且可以从 VEGF-C 和 CD68 的双染图像(图 1)及连续切片的对比(图 2)中看出，肿瘤相关巨噬细胞可表达 VEGF-C/D。



CD 呈红色位于细胞质及细胞膜，VEGF-C 呈紫色位于细胞质

图 1 结肠癌肿瘤相关巨噬细胞中 VEGF-C 的表达
(S-P×400)



A：结肠癌标本连续切片中巨噬细胞分布；B：结肠癌标本中连续切片中 VEGF-D 的分布

图 2 结肠癌肿瘤相关巨噬细胞 VEGF-D 的表达 (S-P×200)

在检测的结肠癌标本中，经 Spearman 统计分析，VEGF-C 表达与巨噬细胞计数正相关($r=0.418$，$P=0.043$)。巨噬细胞浸润明显的肿瘤中 VEGF-D 表达也较多，但 VEGF-D 表达与巨噬细胞计数相关性不显著($P>0.05$)。

3 讨论

VEGF-C/D 作为目前比较明确的淋巴管生成因子，其在肿瘤淋巴道转移中的作用已有不少文献报道。通过与其受体 VEGFR3 的结合，可以促进淋巴管内皮细胞的增殖、增生，诱导淋巴管的生成。而肿瘤组织中的淋巴管生成，必然可以增加肿瘤细胞进入淋巴管的几率，从而影响到肿瘤的淋巴结转移及预后。我们前期的研究结果显示结肠癌组织中 VEGF-C/D 表达较正常组织增加，有淋巴结转移的病例中，其 VEGF-C 表达也较多[4]，这与国内外研究结果相似[5]。

在 VEGF-C/D 表达细胞种类上，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[6,7]。在肿瘤局部微环境中，不仅细胞种类多，而且存在多种生物活性因子，其中巨噬细胞作为一种重要的炎症反应细胞，在肿瘤所处微环境中也是比较常见的细胞种类，可达到肿瘤组织细胞总数的一半[8]，而且本身也可以表达多样的活性因子，因此它在肿瘤局部所起作用是不能忽视的。但其在淋巴管生成方面的作用，近年来的相关发现并不多。

Cursiefen 等[9] 在利用动物角膜模型研究 VEGF-A 对血管、淋巴管生成作用时，发现 VEGF-A 可诱导巨噬细胞在角膜聚集，并测得巨噬细胞可分泌 VEGF-C，从而诱导角膜内淋巴管生成。当去掉局部单核细胞、巨噬细胞后，淋巴管生成现象消失。Schoppmann 等[2] 在研究人宫颈癌时，也发现部分肿瘤相关巨噬细胞可表达 VEGF-C/D 及其受体 VEGFR3，其密度与肿瘤局部淋巴管密度显著相关。国内冯红超等[10] 也发现在口腔鳞癌中，不仅肿瘤细胞，而且肿瘤相关巨噬细胞也可分泌 VEGF-C，并认为肿瘤相关巨噬细胞在瘤周的淋巴管生成和淋巴结转移中可能起到重要作用。

本实验结果,经统计分析也显示 VEGF-C 表达与巨噬细胞计数相关。同时通过双染及图像对比等方法,也证实结肠癌组织中的巨噬细胞有 VEGF-C/D 的表达。肿瘤大多存在炎症反应,肿瘤周围更明显。IL-1β、TNF-α 等炎症前期细胞因子可刺激 VEGF-C 的表达,而巨噬细胞作为一种重要的炎症反应细胞,它可以分泌大量、多种的炎症因子。因此它在肿瘤周边的大量浸润及分泌,必然可以通过自分泌或旁分泌刺激自身、肿瘤细胞产生淋巴管生成因子,而且是肿瘤周边高于内部。

本实验结果中,VEGF-D 在表达量、阳性细胞比率都比较低,统计学分析表明 VEGF-D 和淋巴结转移等因素无明确关系,但不能由此否定其在淋巴管生成中的作用,因为毕竟存在实验样本量偏少、假阴性等因素的干扰。因此对于它在肿瘤局部微环境中所起的作用还需要进一步的研究。

总之,实验显示结肠癌肿瘤相关巨噬细胞可分泌表达 VEGF-C、D,加之可通过自身分泌的其他因子影响到肿瘤细胞淋巴管生成因子的表达,对结肠癌局部淋巴管生成及转移可起到重要的作用。

参考文献:

[1] 冯红超,宋宇峰. 口腔鳞癌中肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)和血管生成与淋巴结转移的关系[J]. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(3): 135 - 137.

[2] Schoppmann S F, Birner P, Stockl J, *et al*. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis[J]. Am J Pathol, 2002, 161(3): 947 - 956.

[3] 逄小红, 田　铮, 刘执玉, 等. VEGF-C 在食管鳞癌和神经胶质瘤中的表达及其意义[J]. 癌症, 2003, 22(11): 1166 - 1169.

[4] 李　焱,蒋　勇,史立群,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1237 - 1239.

[5] 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.

[6] 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.

[7] Orlandini M, Oliviero S. In fibroblasts Vegf-D expression is induced by cell-cell contact mediated by cadherin-11[J]. J Biol Chem, 2001, 276(9): 6576 - 6581.

[8] Collingridge D R, Hill S A, Chaplin D J. Proportion of infiltrating IgG-binding immune cells predict for tumour hypoxia[J]. Br J Cancer, 2001, 84(5): 626 - 630.

[9] Cursiefen C, Chen L, Borges L P, *et al*. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization *via* macrophage recruitment[J]. J Clin Invest, 2004, 113(7): 1040 - 1050.

[10] 冯红超, 宋宇峰, 温玉明. 口腔癌组织中血管内皮生长因子-C 在肿瘤相关巨噬细胞内的表达及与淋巴结转移的关系[J]. 癌症, 2004, 23(3): 278-281.

(编辑　栾　嘉)

(上接 156 页)

导管并到一起经鼻插入到可疑支气管,球囊充气,阻断气流。对于破裂口较大者,在纤维支气管镜引导下将球囊导管推向段或亚段支气管,对支气管进行超选定位;对于破裂口较小者,宜采用经导管充气测压方法。即在体外经导管向球囊阻断的气道内注气,使其远端气道的压力达 30 cmH_2O,观察压力的变化,如在不断补充气体的同时,压力不断下降,不断有气体经引流瓶排出,可确定肺破裂所属的支气管。

1.3.3　肺破裂口所属支气管粘堵方法　经纤维支气管镜活检孔插入专用的双腔医用生物蛋白胶注射导管,由支气管远端同时缓慢注入液态生物蛋白胶 A 和 B,蛋白胶用量应完全封堵段或亚段支气管为宜,1 ~ 3 支,观察引流管气体排出情况。

1.3.4　疗效判断　术后引流管气体消失,胸片肺复张,观察 5 d 气胸无复发为支气管粘堵成功,否则进行下次粘堵。

2　结果

7 例患者用 10 ~ 35 min(平均 15 min)顺利置入球囊导管,完成测压和粘堵术,患者胸腔气体引流立即停止。6 例一次粘堵成功,1 例患者二次粘堵成功。观察 3 个月,无同一部位复发。

3　讨论

顽固性气胸的治疗多采用胸腔镜或开胸手术,心肺功能较差的患者难以接受。本组患者采用双腔球囊漂浮导管纤维支气管镜并行气道内置入,将球囊导管准确送到段或亚段支气管,用胸腔负压吸引或肺段充气测压的方法准确判断肺破裂所属的段或亚段支气管——此方法寻找气胸破裂口简单、快捷,患者无明显不良反应,具有较好的安全性。

医用生物蛋白胶以纤维蛋白为主要成分,分为 A、B 两种,当同时将 A、B 胶注入到段或亚段支气管时,二者混合后马上变成固态胶状,填充和封闭支气管,阻断气流,3 ~ 6 d 后液化,被吸收或咳出体外,段支气管再通。医用生物蛋白胶与人体组织相容性好,具有促进肉芽组织增生和毛细血管生长的作用,有利于肺破裂口的愈合[2]。

本研究证实,该方法治疗气胸是一种安全有效的新方法,其操作简单,成本低,特别适用于顽固性气胸,或年老、体弱、有心肺疾患不宜手术的患者。

关键词: 漂浮导管; 生物蛋白胶; 顽固性气胸
中图法分类号: R561.4　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 郑新玲. 医用生物蛋白胶(FG)使用时应注意的问题[J]. 医疗装备, 2002, 15(9): 11.

[2] 程宏宁,陈永祥,罗美娟,等. 经纤维支气管镜局部注入医用生物蛋白胶治疗支气管残端胸膜瘘 4 例分析[J]. 海南医学, 2003, 14(6): 7 - 8.

(编辑　陈聪连)