论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2180-03

VEGF 和 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中表达及临床意义

于冬梅,阎晓初,郭德玉,柳凤轩,刘丽梅 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 VEGF 和 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达及其与肿瘤微血管密度(MVD)和侵袭转移的关系。**方法** 应用免疫组织化学技术检测 55 例膀胱移行细胞癌 VEGF、nm23 和 CD34 蛋白的表达,并根据 CD34 染色结果计算肿瘤的微血管密度。**结果** 55 例膀胱移行细胞癌中,VEGF 蛋白表达阳性率 47.3%,其表达与脉管侵袭及其预后有显著性差异($P<0.05$),VEGF 阳性组 MVD 显著高于阴性组($P<0.01$);nm23 蛋白表达阳性率 63.3%,其表达与脉管侵袭及其预后有显著性差异($P<0.05$)。nm23 阳性组 MVD 低于阴性组($P<0.05$);VEGF 与 nm23 的表达强度呈负相关($r=-0.647$, $P<0.01$),VEGF 阳性表达伴 nm23 阴性表达者易发生转移。**结论** VEGF 可能是膀胱癌的主要促血管生成因子,和肿瘤的生成、发展及预后相关。联合检测 VEGF 和 nm23 蛋白可以作为预测膀胱癌转移及其预后的参考指标。

关键词: 膀胱癌;血管内皮生长因子;nm23 蛋白;微血管密度

中图法分类号: R341; R730.23; R737.14 **文献标识码:** A

Expressions of VEGF and nm23 protein in transitional cell carcinoma of the bladder and their clinical significance

YU Dong-mei, YAN Xiao-chu, GUO De-yu, LIU Feng-xuan, LIU Li-mei (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), nm23 protein and intratumoral microvascular density(MVD) in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder and their correlation with metastasis and invasion. Methods The clinical data of 55 cases of TCC of the bladder from 1978 to 1992 were collected. Six specimens of normal bladder mucosa served as controls. The expressions of VEGF, nm23 and CD34 protein in TCC tissues and normal bladder mucosa were detected by immunohistochemistry. MVD was determined according to the result of CD34 protein staining. Results The positive rate of VEGF protein expression in TCC was 47.3%. VEGF expression was correlated to invasion, metastasis and prognosis of TCC. MVD in VEGF-positive cases was significantly higher than that of VEGF-negative cases ($P<0.01$). The positive rate of nm23 protein expression in TCC was 63.6%. The positive rate of nm23 in TCC was of significant difference between the cases with vessel invasion and without. MVD of nm23-positive cases was significantly lower than that of nm23-negative cases ($P<0.05$). The correlation analysis showed that VEGF expression was negatively related to nm23 expression in TCC($r=0.647$, $P<0.01$). The cases with positive VEGF expression and negative nm23 expression were easy to develop metastasis. Conclusion VEGF may be one of main angiogenesis factors and was correlated with development, metastasis and prognosis of TCC. The combined detection of VEGF and nm23 may be a predictor for metastasis and prognosis of TCC.

Key words: bladder cancer; VEGF; nm23 protein; intratumoral microvascular density

肿瘤的生长是血管形成依赖性的,其生长、浸润和转移取决于血管供应的范围及其程度。目前认为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在新生血管形成中起关键作用[1],可促进肿瘤血管生成。nm23 蛋白是一种与肿瘤转移抑制有关的基因,有研究表明它可能有抑制肿瘤血管形成的作用[2]。本研究应用免疫组化的方法检测肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)、VEGF 及 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达,旨在探讨三者在膀胱移行细胞癌中关系及其在膀胱移行细胞癌侵袭转移中的作用。

作者简介:于冬梅(1950-),女,山东省青岛市人,硕士,主任医师,教授,主要从事肿瘤病理方面的研究,发表论文 30 余篇。电话:(023)68754432

收稿日期:2006-03-03;修回日期:2006-09-15

1　材料与方法

1.1　材料

收集我院 1978－1992 年手术切除膀胱移行细胞癌 55 例，收集全部临床资料并进行了随访。膀胱正常黏膜 6 例作对照，标本均经 10% 甲醛溶液固定，石蜡包埋，连续切片厚 4 μm。55 例膀胱移行细胞癌中，男性 44 例，女性 11 例，平均年龄 56.67 岁。随访时间术后 1～15 年，均获得随访结果。所用多克隆抗体 nm23，VEGF、CD34 及 S-P 试剂盒均购自福州迈新公司。

1.2　免疫组化染色

染色方法参照试剂盒说明进行。采用 S-P 法，一抗 VEGF、nm23 及 CD34 为即用型。以 PBS 代替第一抗体为阴性对照，以已知阳性切片作阳性对照。

1.3　结果判定

VEGF 阳性表达位于细胞膜和细胞质，nm23 阳性表达位于细胞质内，阳性染色为棕黄色颗粒状。（+）阳性细胞数 < 20%、（++）阳性细胞数 20% ～50%，（+++）阳性细胞数 > 50%。肿瘤内微血管密度（MVD）计数应用 CMIAS 真彩色图像分析系统测定[3]。对 CD34 染色切片在低倍镜下选取肿瘤微血管数量丰富的区域，在高倍镜下计数 3 个视野的微血管密度，取平均值作为 MVD 值。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件进行 χ^2 检验、t 检验和相关分析。

2　结果

2.1　VEGF 和 nm23 表达与膀胱 TCC 脉管侵袭的关系

VEGF 在正常黏膜上皮呈阴性表达，nm23 蛋白在正常黏膜上皮呈阳性表达。55 例膀胱移行细胞癌中，VEGF 和 nm23 蛋白均呈不同程度的阳性表达（图 1、2），VEGF 阳性率 47.3%（26/55），nm23 蛋白阳性率 63.6%（35/55）。VEGF 在膀胱移行细胞癌有脉管侵袭组中表达（80.0 %）显著高于无侵袭组（40.0%）（$P<0.05$）。nm23 在膀胱移行细胞癌脉管侵袭组中的表达（30.0%）低于无侵袭组（71.1%）（$P<0.05$）。在对膀胱癌有脉管侵袭病例比较时发现，VEGF 阳性、nm23 阴性表达的 18 例中 5 例存在脉管受侵，侵袭率 27.8%（5/18），VEGF 阴性，nm23 阳性表达的 17 例中仅 1 例伴有脉管受侵，侵袭率为 5.9 %（1/17），两者比较有显著性差异（$P<0.05$）。

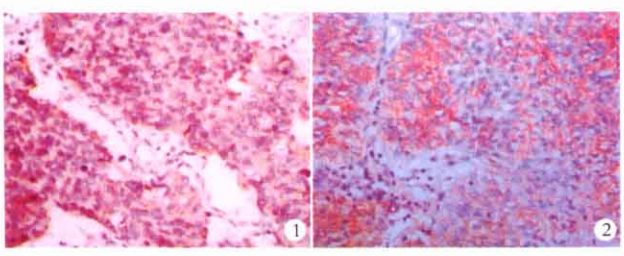


图 1　膀胱移行细胞癌Ⅱ级 VEGF 染色阳性　（S-P×400）

图 2　膀胱移行细胞癌Ⅱ级 nm23 染色阳性　（S-P×400）

2.2　VEGF 和 nm23 蛋白表达与 MVD 的关系

VEGF 和 nm23 蛋白在 TCC 肿瘤细胞中的表达与 MVD 的关系见表 1，可见 VEGF 阳性组 MVD 显著高于阴性组（$P<0.01$），nm23 阳性组 MVD 低于阴性组（$P<0.05$），提示 VEGF 和 nm23 蛋白表达与 MVD 之间存在密切关系。

表 1　VEGF 和 nm23 蛋白表达与 MVD 的关系

项目	例数	MVD	P 值
VEGF			
阳性	26	36.5 ± 9.4	<0.01
阴性	29	23.2 ± 11.2	
nm23			
阳性	35	26.8 ± 8.6	<0.05
阴性	20	34.0 ± 10.6	

2.3　VEGF 蛋白表达和 nm23 蛋白表达的关系

在 nm23 表达阳性的 35 例 TCC 中，VEGF 阳性表达为 8 例（23%）。在 nm23 表达阴性的 20 例 TCC 中，VEGF 阳性表达为 18 例（90%），提示 nm23 表达与 VEGF 表达呈显著负相关（$r=-0.647$，$P<0.01$）。

2.4　VEGF 和 nm23 表达与膀胱 TCC 预后的关系

本组 55 例膀胱癌经随访观察，5 年内肿瘤复发率为 23.6%（13/55），13 例复发的膀胱癌中，VEGF 阳性表达率为 84.6%，与未复发的 42 例膀胱癌的阳性率 35.7% 相比较有显著差异性（$P<0.05$）。nm23 阳性表达率为 53.9%，与未复发的 42 例膀胱癌的阳性率 66.7% 相比较无显著差异性（$P>0.05$）。表明是 VEGF 而非 nm23 的表达与肿瘤的复发有密切关系。55 例膀胱癌中 5 年生存率为 78.2%（43/55）。5 年内死亡 12 例，死亡率为 21.8%（12/55）。12 例死亡膀胱癌中，VEGF 和 nm23 阳性表达率分别为 83.3% 和 33.3%，与生存组 43 例膀胱癌的两种蛋白阳性率相比较均有显著差异性（$P<0.05$）。表明 VEGF 和 nm23 蛋白的表达与肿瘤的预后有密切关系。

3　讨论

肿瘤的血管生成，是一个有局部微环境、癌基因与抑癌基因等因素共同参与，最后通过影响血管生成正负因子之间的平衡状态进行调节的复杂的病理生理过程。血管内皮生长因子（VEGF）也称血管通透因子（VPF）[4]，是目前已知作用最强的促血管生成因子，能特异性地直接作用血管内皮细胞，引起血管内皮细胞增殖，促进血管形成。研究表明 VEGF 在胃肠道癌、肾癌、膀胱癌和黑色素瘤中呈高表达。Santin 等[5]研究发现低分化恶性卵巢肿瘤的 VEGF 表达量明显高于高分化者，提示 VEGF 表达与卵巢癌的分级、分化和进展有关。我们对 55 例膀胱移行细胞癌进行 VEGF 蛋白检测结果表明：VEGF 阳性表达率 47.3%（26/55），而正常黏膜上皮中不表达。且 VEGF 表达与肿瘤的血管

侵犯、转移和复发有关，表明 VEGF 表达与膀胱癌演进、浸润及转移有密切关系。

许多实体肿瘤组织和细胞分泌大量 VEGF，促进内皮细胞移动和血管生成，丰富的血管可持续不断向肿瘤提供营养，排除代谢产物，为其发生、发展提供条件，有利于肿瘤细胞脱落进入血管或向邻近基质扩散，为肿瘤浸润转移创造条件。Hicklin 等[6]研究发现，激活 VEGF 受体途径能促发血管形成，促进内皮细胞增生、迁徙和从已在血管中获得营养而存活。在胃癌、肾透明细胞癌[7]、前列腺癌和软组织肉瘤等多种实体瘤中研究表明，VEGF 表达与肿瘤的微血管密度以及早期复发和转移密切相关。我们研究结果显示：VEGF 阳性组 MVD 显著高于阴性组（$P<0.01$），提示 VEGF 蛋白表达与 MVD 之间存在密切关系，VEGF 的表达能够反映肿瘤的血管化状态。

肿瘤转移抑制基因 nm23 在细胞信号传递，细胞增殖和细胞分化的调节过程中起主要作用[8]。其蛋白产物为 17×10^3 的核苷二磷酸激酶（NDPK），此酶通过调节 G 蛋白介导的细胞信号传导反应，影响微丝、微管、细胞骨架蛋白的生物活性，改变细胞的粘着力和迁移力[9]，抑制肿瘤转移，因而被认为是转移抑制基因。多项研究表明[9,10]，nm23 蛋白表达与多种肿瘤的分化程度、预后密切相关。本研究结果显示，膀胱移行细胞癌中，有脉管受侵的患者 nm23 表达低于无脉管受侵患者，表明了 nm23 表达与膀胱移行细胞癌脉管侵袭密切相关，提示 nm23 低表达者的膀胱移行细胞癌转移的危险性高。这与国外研究结果相一致[11]。体外培养显示 nm23 的高表达与肿瘤细胞的增生呈负相关，提示 nm23 基因表达在微血管密度对肿瘤群体细胞反应调节中起着重要的作用。本组结果表明 nm23 表达与 MVD 呈显著负相关，而且 nm23 阳性组生存率显著高于 nm23 阴性组，这与国外有关的研究结果是一致的[12]。

因此，VEGF 和 nm23 蛋白的表达与膀胱移行细胞癌发展密切相关，可作为预测膀胱癌浸润转移的重要参考指标[13]。此外本研究结果亦显示，且 VEGF 阳性伴 nm23 阴性表达的患者发生脉管侵袭的可能性大，同时发现，nm23 表达与 VEGF 表达明显呈负相关，nm23 低表达可能促进 VEGF 高表达，二者协同作用，导致肿瘤血管生成，促进肿瘤进展和转移。

肿瘤恶性程度、血管生成活性以及侵袭性的增强势必影响肿瘤患者的预后，缩短患者存活期。目前尚无有效指标客观评价膀胱癌恶性及预后指标。我们通过研究 VEGF、nm23 蛋白与 TCC 预后的关系，结果显示 VEGF 表达与患者复发、转移及预后密切相关，VEGF 蛋白表达的上调伴随着患者的总体生存时间的缩短，同时发现 nm23 蛋白表达与肿瘤的复发无关，而与肿瘤的转移及预后密切相关，提示联合检测 VEGF 和 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达可能对预测预后有一定价值。

参考文献：

[1] FOLKMAN J, KLAGSBRUN M. Angiogenic factors[J]. Science, 1987, 235(4787): 442-447.

[2] YAMAGUCHI A, URANO T, GOI T, *et al*. Expression of human nm23-H1 and nm23-H2 proteins in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 1994, 73(9): 2280-2284.

[3] HOLLINGSWORTH H C, KOHN E C, STEINBERG S M, *et al*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 33-41.

[4] DVORAK H F, BROWN L F, DETMAR M, *et al*. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1029-1039.

[5] SANTIN A D, HERMONAT P L, RAVAGGI A, *et al*. Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 1999, 20(3): 177-181.

[6] HICKLIN D J, ELLIS L M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5):1011-1027.

[7] EDGREN M, LENNERNAS B, LARSSON A, *et al*. Serum concentrations of VEGF and b-FGF in renal cell, prostate and urinary bladder carcinomas[J]. Anticancer Res, 1999,19(1B): 869-873.

[8] MUNIER A, SERRES C, KANN M L, *et al*. Nm23/NDP kinases in human male germ cells: role in spermiogenesis and sperm motility?[J]. Exp Cell Res, 2003, 289(2): 295-306.

[9] WEI S J, TREMPUS C S, ALI R C, *et al*. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and UV radiation-induced nucleoside diphosphate protein kinase B mediates neoplastic transformation of epidermal cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 5993-6004.

[10] FOURNIER H N, ALBIGES-RIZO C, BLOCK M R. New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration[J]. J Bioenerg Biomembr, 2003, 35(1): 81-87.

[11] SPIESS P E, CZERNIAK B. Dual-track pathway of carcinogenesis: practical implications[J]. Arch Parhol Lab Med, 2006, 130(6): 844-852.

[12] HEIMANN R, FERGUSON D J, HELLMAN S. The relationship between nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58(13):2766-2771.

[13] 徐培元，赵 华. 浅表性膀胱移行细胞癌组织中 Survivin 的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(4)：659-661.

（编辑 王 红）