论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2146-04

结肠癌中 VEGF-D 和 uPA 的表达与侵袭转移的关系

李竹林[1],朱明才[1],董蒲江[2] (重庆医科大学附属第一医院:[1]普通外科,[2]重庆市普通外科学重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨血管内皮生长因子-D(endothelial growth factor-D, VEGF-D)和尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)在结肠癌中的表达特点及临床意义。**方法** 选取30例结肠癌组织及同一段肠管距离肿瘤组织5 cm以上的正常组织,分别应用免疫组化S-P法、Western blot方法检测VEGF-D和uPA在结肠癌组织和正常组织中的表达特点,分析它们与临床病理分期之间的关系。**结果** VEGF-D和uPA在结肠癌组织和正常组织中均有表达,主要表达于细胞质,胞核也有表达,并且在肿瘤组织中的表达明显高于正常组织($P<0.01$)。VEGF-D或uPA的表达活性在Dukes C+D期明显高于A+B期($P<0.01$),在有淋巴结转移组和远处转移组的表达也高于相应无转移组($P<0.05$、$P<0.01$),随着肿瘤组织分化程度的增高活性依次降低($P<0.05$)。**结论** VEGF-D和uPA在结肠癌组织中的高表达可能在结肠癌的发生发展过程中扮演重要角色。

关键词: 结肠癌;VEGF-D;uPA;转移

中图法分类号: R73-37;R730.22;R735.35 **文献标识码:** A

Relationship of VEGF-D and uPA with invasion and metastasis of human colon carcinoma

LI Zhu-lin[1], ZHU Ming-cai[1], DONG Pu-jiang[2] ([1]Department of General Surgery, [2]Key Laboratory of General Surgery of Chongqing, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of endothelial growth factor-D (VEGF-D) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) in colon carcinoma and to reveal their correlation with the tumor invasion and metastasis. **Methods** The expressions of VEGF-D and uPA were detected by immunohistochemistry and Western blotting in 30 specimens of colon carcinoma and 30 specimens of normal neighbouring colon tissue 5 cm away from the lesions. **Results** The expressions of VEGF-D and uPA mostly located in endochylema, less in nucleus, of both tumor tissue and normal tissue, and they were significantly higher in tumor tissue than normal tissue ($P<0.01$). The expressions of VEGF-D or uPA were significantly higher in Dukes' stage C+D than in Dukes' stage A+B ($P<0.01$), in the cases with lymph node metastasis or distant metastasis than those without metastasis ($P<0.05$, $P<0.01$), and in poorly differentiated tumor than in well-differentiated tumor ($P<0.05$). **Conclusion** The overexpression of VEGF-D and uPA in colon carcinoma may play an important part in the tumorigenesis and progression of colon carcinoma.

Key words: colonic neoplasms; vascular endothelial growth factor D; urokinase-type plasminogen activator; metastasis

肿瘤的浸润转移是造成肿瘤患者死亡的最终原因,在肿瘤的浸润转移过程中,细胞外基质的降解和新生转移肿瘤内部血管、淋巴管的生长是肿瘤转移过程中的2个重要环节。近年来通过对尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)及血管内皮生长因子-D(endothelial growth factor-D, VEGF-D)的研究发现:uPA是降解细胞外基质的重要因子,而VEGF-D是肿瘤内促进血管、淋巴管生长的重要因子。结肠癌是常见的肿瘤,具有较高的转移率,作者应用免疫组化、Western blot法检测结肠癌中uPA及VEGF-D的表达,探讨它们与肿瘤转移及与临床病理分期之间的意义。

作者简介: 李竹林,男,山东省德州市人,硕士研究生,主要从事胃肠外科治疗方面的研究。E-mail: zhulin2002.5.1@163.com

收稿日期: 2007-12-21;**修回日期:** 2008-03-06

1　材料与方法

1.1　临床标本

选取重庆医科大学第一附属医院普外科 2007 年 4 – 9 月行结肠癌根治术标本 30 例,其中男性 16 例,女性 14 例,男女比例约为 1.1∶1 ,其中低分化的 7 例,中分化的 17 例,高分化的 6 例,术前均未进行抗肿瘤治疗,其中有淋巴结转移的 19 例,无淋巴结转移的 11 例;有远处器官转移的 13 例,无远处器官转移的 17 例。

1.2　主要试剂

VEGF-D 单克隆抗体(小鼠抗人)和 uPA 多克隆抗体(兔抗人)分别购自 R&D 公司和武汉博士德公司,S-P 试剂盒、DAB 显色液购自北京中山生物技术有限公司,SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、ECL 化学发光显色试剂盒、HRP 标记二抗(山羊抗小鼠、山羊抗兔)购自南京凯基生物科技发展有限公司,蛋白裂解液(RIPA,PMSF)购自上海申能博彩生物科技公司,兔抗 β-actin(内参)购自北京赛驰生物科技有限公司。

1.3　免疫组织染色

所有标本经 4% 多聚甲醛固定,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正常结肠黏膜染色进行对比。

1.4　凝胶电泳和 Western blot 分析

将标本在手术离体后立即去掉坏死组织、血块,于15 min 内迅速投入 –70 ℃液氮保存。①组织蛋白提取:取新鲜结肠标本 100 mg 于预冷的匀浆器中,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎,加入预冷的细胞裂解液,置于冰上匀浆 30 min,将样品转移到 1.5 ml 离心管中,4 ℃下 12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液于 Eppendorf 管中,用 BCA 方法对所抽提的蛋白质进行蛋白定量,将样品调整为相同蛋白浓度。相同浓度和相同体积的蛋白样品加入 4 × 上样缓冲液,100 ℃煮 5 min。②配制 10% 分离胶和 3.9% 浓缩胶,依次灌胶,每孔加样 20 μl,装入电泳槽,浓缩胶电压 80 V,分离胶电压 100 V,电泳完毕后将蛋白转印于 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭膜后加入 uPA 抗体(抗体稀释度 1∶200)或 VEGF-D 抗体(抗体浓度 10 μg/ml),室温反应 2 h,TBS 洗膜 10 min × 4 次,HRP 标记山羊抗兔 IgG 或山羊抗小鼠 IgG(抗体稀释度均为 1∶3 000)室温反应 1 h,洗膜后 ECL 超敏化学发光法显色,凝胶分析系统分析记录条带光密度。图像分析系统分析,以相应蛋白条带的积分光密度表示检测蛋白相对强度。

1.5　统计学处理

采用 SAS 8.1 统计软件进行 t 检验和 Wilcoxon 秩和检验。

2　结果

2.1　uPA、VEGF-D 的免疫组化检查结果

uPA、VEGF-D 阳性颗粒主要表达于结肠癌组织中,正常组织中亦可见其表达。uPA 阳性物质位于细胞质或细胞核,癌组织中染色主要位于腺上皮细胞质,部分位于细胞核中,呈较均一的棕黄色颗粒(图 1),uPA 在结肠癌组织中多着色较深,范围广,而在正常组织中着色浅,范围小。作为肿瘤转移过程中的重要因子,VEGF-D 同 uPA 相似,阳性物质主要位于上皮细胞细胞质,呈较均一的棕黄色颗粒(图 2),在正常组织及肿瘤组织中均可见其表达,并且同一病例中癌组织着色程度均强于正常大肠黏膜上皮细胞。

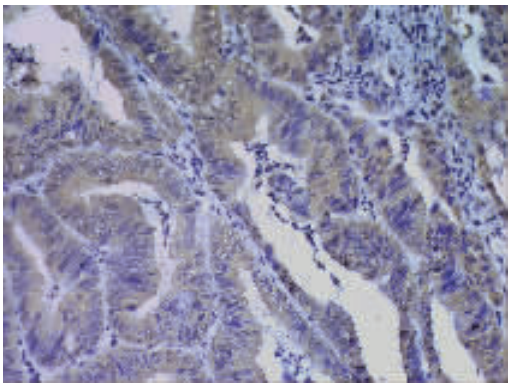


图 1　结肠癌中 VEGF-D 的阳性表达　(S-P ×400)

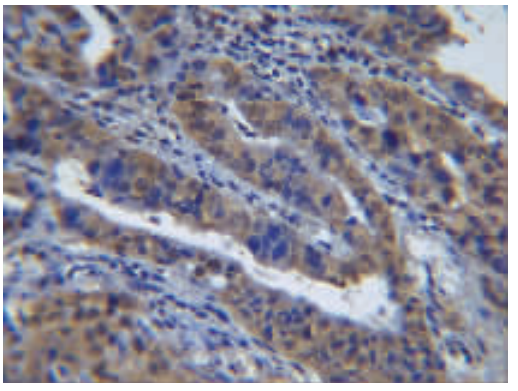
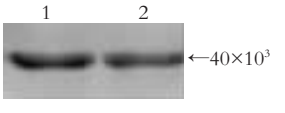


图 2　结肠癌中 uPA 的阳性表达　(S-P ×400)

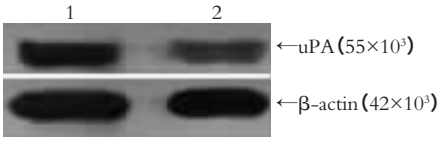
2.2　VEGF-D、uPA 的 Western blot 结果

结果见图 3、4。与正常组织相比,结肠癌组织中 VEGF-D 和 uPA 的活性显著升高($\chi^2 = 19.5421$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 17.5310$, $P < 0.01$)。在结肠癌组织中,VEGF-D 和 uPA 的活性与结肠癌 Dukes 分期、分化程度、淋巴结转移及远处转移密切相关,其中,Dukes C + D 期活性明显高于 Dukes A + B 期($\chi^2 = 8.7057$, $P = 0.0032$; $\chi^2 = 8.0249$, $P = 0.0041$),19 例有淋巴结转移的病例中 VEGF-D 和 uPA 的活性高于无淋巴结转移病例($\chi^2 = 12.6061$, $P = 0.0004$; $\chi^2 = 10.3130$, $P = 0.0011$),13 例有远处转移的病例中 VEGF-D 和 uPA 活性也升高($t = 4.38$, $P < 0.01$; $t = 2.19$, $P < 0.01$),随着肿瘤组织分化程度的增高,VEGF-D 和 uPA 的活性依次降低(两两比较采用 SNK-q 检验),但是 VEGF-D 和 uPA 的活性与患者的年龄、性别无关(表 1)。



1:结肠癌组织; 2:正常结肠组织

图 3　Western blot 显示在正常组织和结肠癌组织中 VEGF-D 的表达差异



1:结肠癌组织; 2:正常结肠组织

图4 Western blot 显示在正常组织和结肠癌组织中 uPA 的表达差异

表1 结肠癌 uPA 和 VEGF-D 与临床病理指标之间的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	临床病理特点	n	uPA	VEGF-D
组别	正常组织	30	4 717 ±2 803	4 816 ±2 865
	肿瘤组织	30	11 140 ±5 945[a]	12 072 ±6 201[a]
性别	男	16	12 389 ±5 230	9 652 ±3 537
	女	14	9 712 ±3 737	8 752 ±5 230
年龄	≤60	16	10 536 ±3 848	9 625 ±3 532
	>60	14	11 830 ±5 620	10 024 ±5 021
肿瘤分化	低分化	7	16 402 ±4 505	15 204 ±4 012
	中分化	17	10 794 ±2 780[b]	10 126 ±2 650[b]
	高分化	6	5 980 ±2 970[bc]	6 072 ±3 005[bc]
Duke's 分期	A + B 期	13	8 222 ±3 958	8 005 ±3 804
	C + D 期	17	13 371 ±4 045[d]	13 021 ±3 867[d]
淋巴结转移	有	19	13 312 ±3 899[f]	11 100 ±3 956[e]
	无	11	7 388 ±3 566	5 900 ±2 810
远处器官转移	有	13	14 520 ±4 190[g]	12 506 ±4 012[g]
	无	17	8 555 ±3 282	8 014 ±2 957

a: $P<0.01$,与正常组织比较;b: $P<0.05$,与低分化的患者比较;c: $P<0.05$,与中分化的患者比较;d: $P<0.01$,与 A + B 组患者比较;e: $P<0.05$, f: $P<0.01$, 与无淋巴结转移组比较; g: $P<0.01$,与无远处器官转移组比较

3 讨论

uPA 是一种丝氨酸蛋白酶,由多种肿瘤细胞或其他细胞分泌,通过与细胞膜上的特异性受体结合后,激活纤溶酶原变成纤溶酶,直接降解大多数的细胞外基质,还激活金属蛋白酶,间接参与细胞外基质成分的降解作用[1,2]。uPA 还可激活某些生长因子,如剪切 VEGFs,使之更具有活性,以发挥促新血管生成的作用[3]。有研究发现,在胃癌的血管生成过程中,uPA 扮演着关键作用,它能降解血管基底膜,在血管生成的早期阶段促进内皮细胞的迁移,从而为肿瘤细胞的血道转移和肿瘤的新生血管形成提供条件[4]。另外,uPA 与其受体结合后激活内皮内信号传导系统和促有丝分裂原蛋白激酶,促进内皮细胞迁移和内皮小管形成。Tanaka 等[5]通过对比胃癌、结肠癌的癌中心、癌边缘及相应正常组织发现,uPA 的活性逐渐降低,并且以癌中心部位含量最高,uPA 似乎是一种恶性进行性的指标。此外,近年来通过对胰腺癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌等的研究,发现 uPA 在多种恶性肿瘤中的表达均高于正常组织,证实了 uPA 在肿瘤侵袭转移中扮演了重要角色。在本实验中通过免疫组化的定性定位观察和 Western blot 的定量检测,显示 uPA 免疫阳性细胞主要表达于癌组织,正常组织也有表达,主要定位于腺上皮细胞质中,另外,免疫组化还显示血管内皮细胞阳性染色,提示在肿瘤进展和新血管生成过程中 uPA 系统起着重要作用。就表达活性而言,结肠癌组织表达明显高于在正常组织中的表达($P<0.01$),并且活性程度的高低与肿瘤的病理分期、淋巴结转移、分化程度等因素相关,而与年龄、性别等因素无关,这说明肿瘤浸润程度和深度的增加与 uPA 活性的增加是一致的,Okusa 等[6]通过对比胃癌的 uPA 活性与肿瘤浸润深度和转移的关系也得出相同的结论。

VEGF-D 是 VEGF 系统的新成员,是 Achen[7]在核酸数据库中进行同源性搜索时发现的,它通过与其相应受体 VEGFR-2、VEGFR-3 结合后,形成二聚体,受体酪氨酸激酶激活,促使底物磷酸化而产生化学趋化性、促进细胞分裂、毛细血管扩张、淋巴内皮细胞活性增加、内皮细胞增殖、提高血管淋巴管通透性的作用[8,9]。血管内皮细胞在酪氨酸激酶作用下分裂增生形成新的毛细血管,在肿瘤血管的生成过程中,肿瘤也完成了扩展、侵袭和转移[10,11],活性增加的淋巴内皮细胞与肿瘤细胞相互作用,促使淋巴管体积增大,通透性增大,淋巴管数目增加[12],而淋巴管密度的增加与淋巴结转移密切相关,是促进肿瘤发生淋巴结转移的重要原因[13]。同时,随着毛细血管的扩张,内皮之间的细胞间隙会不断增大,破坏了血管基底膜的完整性,导致管液外漏,为肿瘤细胞的生长和新生血管形成提供营养,但是,也有人认为血管内皮细胞超微结构的改变和囊泡的运输在由 VEGF 诱导的急性血浆蛋白渗出中的作用可能更大[14]。与此同时,由于 VEGF-D 能增加淋巴管道系统的通透性,使肿瘤组织间液压力增加,促使肿瘤细胞进入淋巴管,进入淋巴管中的肿瘤细胞通过胸导管又扩散到血管系统中,从而间接促进肿瘤的血道转移。总之,VEGF-D 通过与内皮细胞上的 VEGFR-2、VEGFR-3 的结合并使之激活,产生脉管系统的增生,促进肿瘤的转移。在本实验中,我们发现 VEGF-D 在肿瘤组织和正常组织中均有表达,但主要表达于肿瘤组织,主要定位于细胞质,也见于胞核,通过比较光密度值我们发现 VEGF-D 在结肠癌组织中的表达明显高于正常组织($P<0.01$),表达活性的高低与肿瘤的病理分期、分化程度、有无转移等因素有关,而与年龄、性别等因素无关。

由此可见,VEGF-D 是促进血管、淋巴管生成的重要因子,它在发挥促血管、淋巴管生成的同时也完成了肿瘤转移,uPA 除了作为降解细胞外基质的重要因子

外,还可以激活 VEGFs。VEGF-D 和 uPA 系统在肿瘤的血管生成中可能起着协同作用,他们在肿瘤的发生发展和浸润转移过程中起着重要作用,因此,采用 uPA 拮抗剂及血管生成抑制剂可能会对肿瘤的浸润和转移起到抑制作用。

参考文献:

[1] Li P, Gao Y, Ji Z, *et al*. Role of urokinase plasminogen activator and its receptor in metastasis and invasion of neuroblastoma [J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(10): 1512 - 1519.

[2] Konno H, Abe J, Kaneko T, *et al*. Urokinase receptor and vascular endothelial growth factor are synergistically associated with the liver metastasis of colorectal cancer [J]. Jpn J Cancer Res, 2001, 92(5): 516 - 523.

[3] Cavallaro U, Tenan M, Castelli V, *et al*. Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: Relevance to the regulation of angiogenesis [J]. J Cell Biochem, 2001, 82(4): 619 - 633.

[4] Kaneko T, Konno H, Baba M, *et al*. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer[J]. Cancer Sci, 2003, 94(1): 43 - 49.

[5] Tanaka N, Fukao H, Ueshima S, *et al*. Plasminogen activator inhibitor 1 in human carcinoma tissues[J]. Int J Cancer, 1991, 48(4): 481 - 484.

[6] Okusa Y, Ichikura T, Mochizuki H. Prognostic impact of stromal cell-derived urokinase-type plasminogen activator in gastric carcinoma [J]. Cancer, 1999, 85(5): 1033 - 1038.

[7] Achen M G, Jeltsch M, Kukk E, *et al*. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(2): 548 - 553.

[8] Cross M J, Dixelius J, Mastsumoto A, *et al*. VEGF-receptor signal transduction [J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(9): 488 - 494.

[9] Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, *et al*. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 18040 - 18045.

[10] Maeda K, Chung Y S, Ogawa Y, *et al*. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma [J]. Cancer, 1996, 77(5): 858 - 863.

[11] Kimura H, Konishi K, Nukui T, *et al*. Prognostic significance of expression of thymidine phosphorylase and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2001, 76(1): 31 - 36.

[12] Rissanen T T, Markkanen J E, Gruchala M, *et al*. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle *via* adenoviruses [J]. Circ Res, 2003, 92(10): 1098 - 1106.

[13] Van-der-Auwera I, Van-den-Eynden G G, Colpaert C G, *et al*. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(21): 7637 - 7642.

[14] Rissanen T T, Markkanen J E, Arve K, *et al*. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis, and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model [J]. FASEB J, 2003, 17(1): 100 - 102.

(编辑　王小寒)

(上接 2145 页)

术后 6 ~ 12 个月,取出环抱器,无氧化、分解现象。患者基本恢复了伤前的劳动能力及运动量。

3　讨论

以往肋骨骨折多采用非手术治疗,传统的胸带固定、巾钳重力牵引、胶布固定及外固定牵引等方法,往往给患者带来痛苦,恢复时间长,对连枷胸的固定效果不明显,尤其对 ARDS 患者,多数需气管切开呼吸机内固定治疗,而且巾钳重力牵引、胸部胶布固定、外固定牵引等方法对患者体位要求较高,并要求严格卧床,影响咳嗽、排痰,容易引起坠积性肺炎、褥疮、血栓形成等后期并发症。目前,采用内固定器械进行手术内固定已成为趋势[1],并越来越倾向于操作简单和微创化[2]。

连枷胸是肋骨骨折环抱器内固定的适应证,我们体会术中需注意以下问题:①使用前必须对肋骨环抱器进行高温高压消毒处理。②器械必须在 0 ~ 5 ℃消毒冰水中充分冷却后才能进行变形使用,变形量不宜过大,以免破坏记忆功能,影响固定效果[3]。③术前根据 X 线片判断肋骨直径大小及骨折类型,选择合适的环抱器,环抱器内径比患者骨内径小 10% ~ 20%,避免规格不符影响手术效果[4]。④术中不必要求所有骨折都要固定,重点固定引起连枷胸区域的肋骨,以恢复胸壁稳定及原有形态,消除反常呼吸为目的,减少胸壁损伤。

应用镍钛记忆合金肋骨环抱器治疗连枷胸具有操作简便、创伤小、组织相容性好、固定可靠安全、促进骨折愈合及并发症少等优点,尤其对于伴有肺挫伤较重的患者可预防 ARDS 发生,是一种治疗连枷胸较好的方法,值得推广。

关键词: 连枷胸;记忆合金肋骨环抱器;内固定

中图法分类号: R561.05　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 费　军, 余洪俊, 黄显凯, 等. 连枷胸手术内固定器械的选择和意义[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5(4): 310 - 311, 306.

[2] Carbognani P, Cattelani L, Bellini G, *et al*. A technical proposal for the complex flail chest[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(1): 342 - 343.

[3] 左　伟, 梁宪军, 刘建国. 记忆合金环抱钢板巧取除术. 中国骨与关节损伤杂志, 2005, 20(11): 723.

[4] 张世强, 王鹏程, 李　衡, 等. 镍钛形状记忆合金环抱接骨板治疗桡骨近端 1/3 骨折[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(3): 272 - 275.

(编辑　吴培红)