文章编号:1000-5404(2010)10-1109-03

短篇论著

血管内皮生长因子-C 过度表达与临床 I 期非小细胞肺癌淋巴结转移的相关性

王耀鹏[1,2],朱晓峰[1],王 洲[1] (250021 济南,山东大学省立医院胸外科[1],266003 山东 青岛,青岛大学医学院附属医院胸外科[2])

[摘要] **目的** 探讨临床 I 期(cI 期)非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)中血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)过度表达、MLVD 计数、淋巴结转移的关系。**方法** 应用免疫组化 S-P 法检测 67 例 cI 期 NSCLC 患者癌组织、癌旁组织、20 例正常肺组织中 VEGF-C 蛋白表达和计数 D2-40 标记的 MLVD,结合临床病理淋巴结转移情况进行统计学分析。**结果** 在 NSCLC 癌组织中,VEGF-C 过度表达(阳性率 81%),MLVD 计数显著增高(23.4 ± 6.9),均较癌旁组织和正常肺组织有显著差异($P < 0.01$);淋巴结转移 N2 组的癌组织中 VEGF-C 表达(阳性率 100.0%)、MLVD 计数(28.5 ± 3.3)明显高于淋巴结阴性组的癌组织[阳性率 35.7%,(10.6 ± 2.2),$P < 0.01$];另外淋巴结转移数量和程度与 VEGF-C 表达强度成正相关($r_s = 0.62$, $P < 0.01$)。**结论** VEGF-C 在 cI 期 NSCLC 癌组织中过度表达与淋巴结转移密切相关,提示 VEGF-C 过度表达的 cI 期肺癌患者应该强化手术区域淋巴结清扫和术后必要的化疗、放疗等辅助治疗。

[关键词] 非小细胞肺癌;VEGF-C;微淋巴管密度;淋巴结转移
[中图法分类号] R195.4; R734.2; R730.23 **[文献标志码]** A

肺癌发病率逐年增高,其中非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)是其主要类型,淋巴结转移是影响 NSCLC 的主要因素之一[1,2],临床常用的术前影像学检查方法——胸部 CT,对于诊断淋巴结是否转移的敏感性较低。本研究采用免疫组化链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(S-P 法)检测 67 例临床 I 期(cI 期)NSCLC 患者癌组织、癌旁组织和 20 例正常肺组织中血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)蛋白的表达,计数 D2-40 标记的微淋巴管密度(MLVD),分析和探讨其与淋巴结转移的关系,通过术前肿瘤组织活检免疫组化检验而提高淋巴结转移诊断的敏感性,指导手术中淋巴结清扫和手术后辅助治疗。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取青岛大学医学院附属医院胸外科 2008 年 1 - 7 月手术前没有施行放疗和化疗、术前临床分期(结合强化 CT、PET-CT、纵隔镜检查、肿瘤穿刺活检等)为 cI 期、且施行了根治性肺叶切除、系统性淋巴结清扫的 NSCLC 住院患者标本资料 67 例。其中男性 39 例,女性 28 例,平均年龄 59.7(42 ~ 72)岁;手术后病理鳞癌 29 例,腺癌 32 例,其他 6 例;TNM 分期 Ⅰ 期 14 例,Ⅱ 期 33 例,Ⅲ 期 20 例。手术中取癌组织、癌旁正常肺组织(为距肿块边缘 5 cm 以上的正常组织)和同期 20 例行肺大疱切除术患者正常肺组织作为对照,淋巴结清扫范围参考 MD-ATSmap[3] 肺癌区域淋巴结图谱。术中取新鲜标本组织直径约为 0.5 cm,行病理科常规固定石蜡包埋等处理。

1.2 试剂和设备

兔抗人多克隆抗体 VEGF-C(原液 1∶50 稀释)、鼠抗人单克隆抗体 D2-40(原液 1∶50 稀释)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 标本处理和方法

每例标本作 4 μm 厚连续切片,取中间 3 张,1 张行 HE 染色,1 张行 VEGF-C 免疫组化染色,1 张行 D2-40 染色。PBS 取代一抗作为阳性对照。

1.4 结果判定

全部标本均由 3 位有经验的病理科医师独立单盲阅片,结果差距超过 30% 者,重新组织交换阅片,取其平均值。对于 VEGF-C,基本不着色为 0 分,着淡黄色为 1 分,着色适中为 2 分,着色深黄为 3 分;着色细胞占总细胞数 <5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,>50% 为 3 分。将每张切片着色程度得分和着色细胞数得分相乘为最后得分。0 ~ 1 分为阴性(-),2 ~ 3 分为弱阳性(+),4 ~ 5 分为阳性(++),6 ~ 9 分为强阳性(+++)。对于 D2-40,凡染成棕黄色颗粒状管样形态,管壁由单层内皮细胞构成,管腔内没有红细胞的确认为淋巴管。在 ×40 倍镜下选取 3 个不同染色密集区域,×200 镜下视野内淋巴管总数作为 MLVD 计数。

1.5 统计学处理

在 SPSS 10.0 软件上对数据行数据分析,不同组间表达强度比较采用秩和检验,多组计量资料组间比较采用单因素方差分析,两组计量组间比较采用 t 检验。

[通信作者] 王 洲,E-mail: wz620226@hotmail.com

2 结果

2.1 不同组织标本中 VEGF-C 表达和 MLVD 计数的关系

VEGF-C 和 D2-40 的阳性免疫产物均是位于细胞质内的棕黄色颗粒(图1,2),表1结果显示,各种组织中 VEGF-C 均可有表达,不同组织标本中 VEGF-C 表达强度有显著差异(秩和检验 Hc=96.423 5,$P<0.01$),癌组织中 VEGF-C 的表达最强,与癌旁组织和正常组织比较差别有显著性(Q=13.307 0, 31.541 7,$P<0.01$)。各种组织中都可能找到 D2-40 染色的微淋巴管,但是 MLVD 计数不同组间比较差异具有显著性(方差分析 F=82.856 6,$P<0.01$),其中癌组织的计数明显高于癌旁组织和正常肺组织(Q=17.106 6,10.901 4,$P<0.01$)。

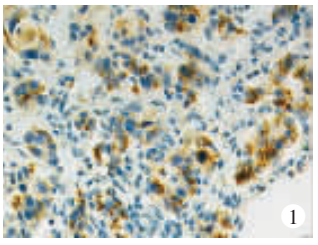


图1 免疫组化检测 VEGF-C 阳性表达(S-P ×200)

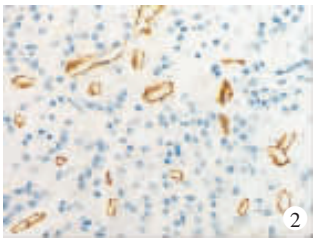


图2 免疫组化检测 D2-40 阳性表达 (S-P ×200)

表1 不同组织标本中 VEGF-C 表达和 MLVD 计数的关系

标本类型	例数	VEGF 表达				阳性率(%)	MLVD
		−	+	++	+++		
癌组织	67	12	10	25	20	81%	23.4±6.9
癌旁组织	67	51	13	2	1	23%	12.8±5.7
正常组织	20	17	2	1	0	15%	11.7±4.6
统计结果						Hc=90.423 5	F=82.856 6
P						0.000	0.000

2.2 癌组织中 VEGF-C 表达、MLVD 计数和淋巴结转移的关系

数据显示不同组间 VEGF-C 表达差别有显著性(Hc=44.525 7,$P<0.01$);淋巴结阳性组 VEGF-C 表达明显强于淋巴结阴性组,淋巴结转移 N2 组的 VEGF-C 表达强度明显高于其他3组(Q=9.322 1,19.440 8,11.636 2,$P<0.01$)(表2)。相关性分析结果显示,淋巴结转移数量和程度与 VEGF-C 表达成正相关(r_s=0.621 0,t=7.84,$P<0.001$)。不同组 MLVD 计数比较差别有显著性,淋巴结阳性组 MLVD 计数明显高于淋巴结阴性组。

2.3 不同组织 VEGF-C 表达与 MLVD 计数的关系

癌组织中 VEGF 表达的 MLVD 计数高于 VEGF 阴性组(t=10.053 3,P=0.000 0),癌旁组织 VEGF 阳性组的 MLVD 计数高于阴性组,两组比较差异有显著性(t'=13.965 8,P=0.000 0),正常组织中 VEGF 阳性组的 MLVD 计数与阴性组比较差异无显著性(t'=0.655 9,P=0.521 2)(表3)。

表2 NSCLC 癌组织中 VEGF-C 表达、MLVD 计数和淋巴结转移的关系

淋巴结	例数	VEGF 表达				MLVD
		−	+	++	+++	
N0	14	9	3	2	0	10.6±2.2
N1a	22	5	7	9	1	20.0±4.8
N1b	24	3	4	8	9	26.8±3.2
N2	20	0	1	10	9	28.5±3.3
统计结果			Hc=44.525 7			F=43.112 6
P			0.000			0.000

N0:没有淋巴结转移;N1a:第1站淋巴结转移,转移淋巴结数为1个;N1b:第1站淋巴结转移,转移淋巴结数为2个及更多;N2:第2站淋巴结转移

表3 不同组织 VEGF-C 表达与 MLVD 计数的关系

标本类型		MLVD
癌组织	VEGF 阴性	13.2±5.6
	VEGF 阳性	25.7±4.7
癌旁组织	VEGF 阴性	10.1±2.7
	VEGF 阳性	21.7±3.7
正常组织	VEGF 阴性	11.3±4.4
	VEGF 阳性	12.0±0.0

3 讨论

肺癌发病率逐年增高,已经跃居为恶性肿瘤第1位,其中非小细胞肺癌是其主要类型,常由于早期症状不典型,发现时多为中晚期,以手术为主的综合治疗效果较差。区域性淋巴结转移是 NSCLC 的重要转移途径,而淋巴结转移与否及转移程度是影响 NSCLC 病理分期和预后的主要因素之一;淋巴管生成是肿瘤发生淋巴结转移的步骤与先决条件,早期发现、早期诊断和早期抑制及干预淋巴转移是改善 NSCLC 治疗效果的理想途径。由于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor receptor-3,VEGFR-3)也表达于血管内皮,甚至 VEGFR-3 表达者多数是血管内皮而不是淋巴管内皮[4]。D2-40 是新发现的特异性淋巴管内皮标记物,D2-40 仅仅表达在淋巴管内皮细胞,具有较好的敏感性和特异性[5]。Takanami 等[6]研究认为,以 D2-40 标记的 MLVD 是淋巴结转移的独立预测因子。

VEGF-C 主要作用是促进淋巴管新生,其作用是通过与特异性表达于淋巴管内皮的受体结合,介导和启动受体酪氨酸激酶信号系统,调节肿瘤血管新生和淋巴管生成,促进肿瘤细胞进入淋巴管,通过淋巴系统向全身转移和扩散[7,8]。现已明确,肿瘤细胞可以通过表达淋巴管生成的调控因子 VEGF-C 诱导淋巴管生成,人工诱导淋巴管生成能促进肿瘤淋巴结转移[9]。He 等[10]研究表明 VEGF-C 可使淋巴内皮在肿瘤细胞密集区内大量增生,并促进淋巴管扩张,且新生的微淋

巴管结构并不完善,处于高渗漏状态,有利于肿瘤细胞进入淋巴管发生转移。Ishii 等[11]在 2004 年对肺癌小鼠进行转基因实验,证实 VEGF-C 具有有别于其他 VEGF 家族成员的促肺癌淋巴转移特性。尹秋伟[12]、王振东[13]、刘杏娥等[14]报道 VEGF-C 蛋白阳性表达率随着 NSCLC 淋巴结转移程度上升而升高,张惠忠等[15]研究证实 VEGF-C 蛋白高表达提示肺癌患者容易出现淋巴结转移和预后不良,指出 VEGF-C 是非小细胞肺癌一个重要的预后因子。

本研究选择临床 I 期患者,能更好的说明研究目的。研究发现,在正常肺组织中可以检测到少量的 VEGF-C 的表达,但是在癌组织中过度表达;在癌旁正常组织中的表达也高于正常肺组织,且淋巴结阳性组表达明显高于淋巴结阴性组,提示肿瘤的转移和浸润可能与 VEGF-C 过度表达有关。经过相关性分析,NSCLC 淋巴结转移与 VEGF-C 过度表达呈正相关,VEGF-C 过度表达与 MLVD 呈显著性相关,相比正常组织,在癌旁组织中 VEGF-C 表达增强较 MLVD 更明显,VEGF-C 过度表达和 MLVD 计数与淋巴结转移有关。因此可以推测 VEGF-C 在 NSCLC 癌细胞中过度表达,通过一系列信号转导等作用,诱导肺癌微淋巴管生成;同时增生的淋巴管又增加了 NSCLC 癌转移发生的几率,为癌细胞向淋巴管转移提供了条件,从而促进肺癌淋巴结转移。结果提示我们,对于 VEGF-C 过度表达的 cI 期 NSCLC 患者,淋巴结发生转移或者微转移的可能性更大,区域淋巴结清扫中淋巴结阳性率更高,清扫的意义更强,发生淋巴结转移的时间更早,转移更快,预后也就较差,提示我们对于 VEGF-C 过度表达的 cI 期 NSCLC 患者,术后进行早期纵隔放疗,可以选择的有效抑制纵隔淋巴结的转移,可以获得更好的治疗效果。随着肺癌外科治疗的发展,肺癌患者术前诊断技术的提高,CT 定位穿刺、纵隔镜、等检查可以提供肿瘤或淋巴结术前组织学检查,在外科手术治疗前取得肿瘤组织并行 VEGF-C 表达的检测成为可能并可以广泛应用,可以有效指导手术淋巴结清扫范围等指导手术治疗。

非小细胞肺癌的血管靶向治疗已经广泛应用于临床,并取得较好的效果,肺癌的淋巴管生成、淋巴结转移机制是一个多因素参与的复杂过程和多因素协同作用的结果,分析肺癌淋巴转移和淋巴管生成的关系,研究淋巴管生成能否成为抗肺癌治疗的靶点,为肺癌抗淋巴管生成治疗、抑制淋巴途径转移药物和靶向药物的研究提供理论依据和指导。

参考文献:

[1] 陈寿松,肖同浩,陈昕薇,等. EGFR、COX-2 及 P63 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7): 628 -630.

[2] 唐春兰,杨和平,卞修武,等. 应用组织芯片技术研究非小细胞肺 MMP-2、MMP-9 的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(6): 518 -521.

[3] Mountain C F, Dresler C M. Regional lymph node classification for lung cancer staging[J]. Chest, 1997, 111(6): 1718 -1723.

[4] Bono P, Wasenius V M, Heikkila P, *et al*. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(21): 7144 -7149.

[5] Van-den-Eynden G G, Van-der-Auwera I, Van-Laere S J, *et al*. Distinguishing blood and lymph vessel invasion in breast cancer: a prospective immunohistochemical study[J]. Br J Cancer, 2006, 94(11): 1643 -1649.

[6] Takanami I. Lymphatic microvessel density using D2-40 is associated with nodal metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 15(2): 437 -442.

[7] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen M J, *et al*. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 1786 -1790.

[8] 吕志强, 李海刚, 谢德荣, 等. 非小细胞肺癌组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达及其临床意义[J]. 癌症, 2005, 24(9): 1132 -1135.

[9] 王艳, 朱波, 叶明福, 等. 非小细胞肺癌 VEGF-C 表达与淋巴管生成和淋巴转移关系的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(2): 182 -186.

[10] He Y, Rajantie I, Pajusola K, *et al*. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4739 -4746.

[11] Ishii H, Yazawa T, Sato H, *et al*. Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs)[J]. Lung Cancer, 2004, 45(3): 325 -337.

[12] 尹秋伟, 郭旭峰, 胡国强, 等. PTTG、VEGF-C 的表达及微淋巴管密度与非小细胞肺癌临床病理特征的关系[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(14): 1362 -1366.

[13] 王振东, 王平, 陈新隆, 等. 非小细胞肺癌淋巴管生成因子表达与淋巴结转移关系的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(6): 516 -518.

[14] 刘杏娥, 毛伟敏. VEGF-C 和 FLT-4 在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义[J]. 实用癌症杂志, 2007, 22(1): 44 -46.

[15] 张惠忠, 华平, 李海刚, 等. 非小细胞肺癌血管内皮生长因子-C 和环氧合酶-2 蛋白的表达及其对预后的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(12): 734 -737.

(**收稿**:2009-12-24;**修回**:2010-03-19)

(编辑 汪勤俭)