论著

文章编号:1000-5404(2010)18-1936-05

应用组织芯片技术研究胃癌组织MVD、MLD和PTEN的表达及其意义

邹绍静[1,2],周永宁[1],姬 瑞[1],路 红[1],郭庆红[1],王娟霞[1],任涛文[1],陈兆峰[1],黄珊珊[1],张俐花[1],赵 越[1] (730000 兰州,兰州大学第一临床医学院消化内科[1];223100 江苏 洪泽,洪泽县人民医院消化科[2])

【摘要】 **目的** 探讨PTEN在胃癌、癌旁组织中表达及微血管密度(microvessel density,MVD)、微淋巴管密度(microlymphatic density,MLD),分析其表达水平与临床病理特征和生存期的关系。**方法** 用组织芯片和免疫组化的方法检测189例胃癌组织、54例癌旁组织、32例正常胃黏膜中PTEN的表达及微血管密度、微淋巴管密度。**结果** 胃癌、癌旁和正常胃黏膜组织PTEN阳性表达率分别是50.8%(96/189)、85.2%(46/54)和96.9%(31/32),胃癌组织PTEN阳性表达率显著低于癌旁和正常胃黏膜组织($\chi^2=19.330$,$P=0.000$;$\chi^2=22.830$,$P=0.000$)。PTEN阳性表达与有无淋巴结转移、分化程度和Lauren分型有关($P<0.05$)。胃癌组织MVD和MLD分别显著高于癌旁组织和正常胃黏膜组织[MVD:(28.84±14.17)*vs*(17.02±8.54)、(16.69±7.21);MLD:(8.55±4.98)*vs*(4.05±2.48)、(3.99±1.56);$P<0.01$]。微血管密度与分化程度、Lauren分型及浸润深度密切相关($P<0.01$);微淋巴管密度则与分化程度、Lauren分型及淋巴结转移密切相关($P<0.05$);微血管密度、微淋巴管密度在PTEN阴性表达组显著高于阳性表达组[MVD:(31.37±15.14) *vs* (26.86±13.29),$P=0.031$;MLD:(9.37±4.23) *vs* (7.61±5.29),$P=0.012$]。PTEN的表达和MVD($r=-0.168$,$P=0.021$)、MLD($r=-0.283$,$P=0.000$)呈负相关关系。生存分析显示:低MVD较高MVD具有生存优势($\chi^2=4.224$,$P=0.040$),MLD与生存无相关性($\chi^2=1.044$,$P=0.307$),PTEN阳性表达具有显著的生存优势($P<0.05$),是独立于胃癌分期、分级和分型的生存期预测因子。**结论** PTEN低表达参与胃癌的发生、发展和浸润转移,是胃癌发生的晚期事件。失表达的PTEN可增加胃癌组织MVD、MLD。PTEN的表达可以作为胃癌预后的独立指标。

【关键词】 胃肿瘤;基因,肿瘤抑制;微血管密度;微淋巴管密度

【中图法分类号】 R446.9;R730.23;R735.2 **【文献标志码】** A

Significances of microvessel density, microlymphatic density and PTEN protein expressions in gastric cancer by tissue microarray

Zou Shaojing[1,2], Zhou Yongning[1], Ji Rui[1], Lu Hong[1], Guo Qinghong[1], Wang Juanxia[1], Ren Taowen[1], Chen Zhaofeng[1], Huang Shanshan[1], Zhang Lihua[1], Zhao Yue[1] ([1] Department of Gastroenterology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2] Department of Gastroenterology, People's Hospital of Hongze County, Hongze, Jiangsu Province, 223100, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the expressions of PTEN (gene for phophatase and tensin homolog deletedon chromosome ten), and changes of microvessel density (MVD) and microlymphatic density (MLD) in gastric cancer, para-cancerous and normal tissues, and analyze their relationship with tumor clinicopathological features and patient survival. **Methods** Tissue microarrays containing gastric normal gastric mucosa ($n=32$), para-cancerous tissue ($n=54$) and gastric cancer ($n=189$) were prepared and the expression of PTEN was detected by immunohistochemistry. Moreover, MVD and MLD were evaluated within the microarrays by double immunohistrchemistry staining with Ⅷ factor polyclonal antibodies and a D2-40 antibody, respectively. Clinical data were retrospectively analyzed. **Results** The positive rates for PTEN of the gastric carcinoma, para-cancerous and normal tissues were respectively 50.8% (96/189), 85.2% (46/54) and 96.9% (31/32). The positive rate of PTEN was lowest in the gastric carcinoma among the 3 groups (Chi square = 19.330, $P=0.000$; Chi square = 22.830, $P=0.000$). In gastric cancer tissues, the positive rates of PTEN protein were significantly associated with differentiation, lymph node metastasis, Lauren's classification

【基金项目】 国家自然科学基金(30872478)

【通信作者】 周永宁,电话:(0931)8625200-6872,E-mail:yongningzhou@sina.com

($P<0.05$), and not associated with sex, age, invasion, and tumor size ($P>0.05$). MVD and MLD were significantly higher in gastric carcinoma than in para-cancerous as well as normal tissues (MVD: 28.84 ± 14.17 *vs* 17.02 ± 8.54 and 16.69 ± 7.21; MLD: 8.55 ± 4.98 *vs* 4.05 ± 2.48 and 3.99 ± 1.56, $P<0.01$). MVD was significantly correlated with tumor differentiation, Lauren's classification and invasion ($P<0.01$). Meanwhile, MLD was significantly correlated with tumor differentiation, Lauren's classification and lymph node metastasis ($P<0.05$). MVD and MLD were significantly lower in PTEN-positive tumors compared with PTEN-negative tumors (MVD: 31.37 ± 15.14 *vs* 26.86 ± 13.29, $P=0.031$; MLD: 9.37 ± 4.23 *vs* 7.61 ± 5.29, $P=0.012$). The positive rate of PTEN in the gastric carcinoma were negative correlated with MVD and MLD ($r=-0.168$, $P=0.021$; $r=-0.283$, $P=0.000$). A survival advantage were noted in the patients with PTEN-positive tumors and lower MVD tumors ($P<0.05$), but MLD had no such correlation (Chi square = 1.044, $P=0.307$). The positive rates of PTEN protein was an independent prognostic index of type, grade, and stage of the disease ($P<0.05$). **Conclusion** The lower-expression of PTEN is involved in the incidence, development, differentiation, invasion, and metastasis of gastric cancer, and a late incident in gastric cancer. The lower-expression of PTEN can enhance MVD and MLD in gastric cancer. PTEN may be a novel prognostic marker of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasma; genes, tumor suppressor; microvessel density; microlymphatic density

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30872478). Corresponding author: Zhou Yongning, Tel: 86-931-8625200-6872, E-mail: yongningzhou@sina.com

10 号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源体基因(gene for phophatase and tensin homolog deletedon chromosome ten, PTEN)是迄今发现的第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,它在调控细胞生长及维持细胞的增殖、分化和凋亡、浸润转移中有重要作用[1]。本研究利用组织芯片和免疫组化技术检测 PTEN 在胃癌组织、癌旁组织及正常胃黏膜的表达,同时采用Ⅷ因子多克隆抗体和 D2-40 单克隆抗体分别标记计数 3 种组织中微血管密度(microvascular density, MVD)和微淋巴管密度(microlymphaticvessel density, MLD),探讨 PTEN 与胃癌临床病理特征、生存期及其与肿瘤微血管和微淋巴管生成的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择甘肃省武威市肿瘤医院普外科 1999 - 2004 年间临床资料完整且保存完好的胃癌术后石蜡标本作为研究对象,其中癌组织 189 例,癌旁组织 54 例(距癌组织边缘≥6 cm,经 HE 染色证实均无癌细胞)。189 例胃癌中,男性 145 例,女性 44 例,男女比例为3.3∶1。年龄 30 ~ 73 岁,中位年龄为 55 岁。浸润深度在黏膜层(T1)7 例,达肌层(T2)39 例,达浆膜层(T3)86 例,浆膜层以外(T4)57 例。有淋巴结转移 116 例,无淋巴结转移 73 例。按照 WHO 分型低分化型 100 例,中分化型 44 例,高分化型 45 例。按照 Lauren 分型肠型 97 例,弥漫型 85 例,混合型 7 例。119 例肿瘤直径≥5 cm,70 例肿瘤直径 <5 cm。所有患者术前没有接受过放化疗。32 例胃镜活检正常胃黏膜作为对照。

通过上门或电话进行问卷随访,最终得到 101 例有效随访结果(排除术后 4 周内死亡患者),随访期为 2 ~ 79 个月。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的制备 应用组织芯片仪制作 42 个位点的组织芯片,每个芯片行 HE 染色对照观察。

1.2.2 免疫组化染色 小鼠抗人 PTEN 单克隆抗体,D2-40 单克隆抗体,Ⅷ因子多克隆抗体, S-P 免疫组化试剂盒均购自北京中杉生物制品有限责任公司。S-P 免疫组化染色法检测标本中 PTEN 表达,免疫组化双染法检测组织 MVD 及 MLD。北京中杉生物制品有限责任公司提供的阳性片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。严格按说明书操作。

1.2.3 免疫组化染色结果评分 PTEN 染色评分按半定量评分方法计算如下:根据肿瘤细胞的染色范围,阳性细胞数 <5%,5% ~25%,>25% ~50%,>50% 分别标记为 0、1、2、3 分;对每张切片阳性细胞的染色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别标记为 0、1、2、3 分,根据两项评分之和判断结果,大于或等于 3 分者为阳性,低于 3 分者为阴性。

依据文献[2]进行 MVD、MLD 计数:在免疫组化双染的结果中,兔抗人多克隆Ⅷ因子抗体染色阳性呈红色,它标记的脉管为毛细血管,鼠抗人单克隆抗体 D2-40 染色阳性呈棕黄色,它标记的脉管为微淋巴管。低倍光镜视野下全面观察切片,分别确定每张切片中毛细血管和微淋巴管的最高区域;高倍视野(40 ×10)分别计数 3 个视野的毛细血管数和微淋巴管数,取其平均值,分别作为该张切片的 MVD 和 MLD。结果判定由 2 名病理医师独立评分。

1.2.4 胃癌组织 PTEN 表达、MVD 与生存分析 对 101 例

胃癌患者生存资料进行Cox回归分析,应变量是随访患者的生存时间,协变量为PTEN(分阴、阳性2组),浸润深度(分浸润深度未及浆膜层、浸润深度达浆膜及浆膜以外2组)、淋巴结转移(分有、无2组)、分化程度(分高/中、低2组)、肿瘤大小(分<5 cm和≥5 cm 2组),生存状态中截尾值定义为0,完整值定义为1。因为单因素生存分析显示年龄、性别和Lauren分型与患者生存期无相关关系,故未引入多因素预后分析模型。采用向前逐步法筛选协变量,检验引入协变量的标准是$\alpha=0.05$,剔出标准是$\alpha=0.10$。

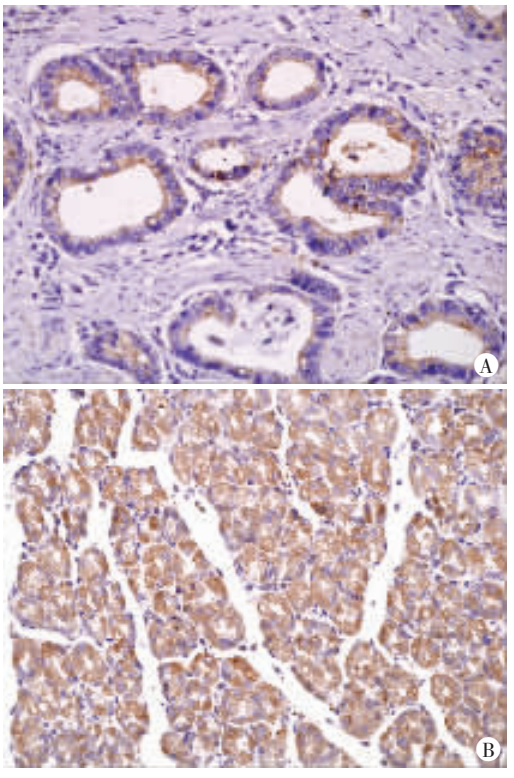
1.3 统计学分析

采用SPSS 15.0统计软件进行统计处理,计量资料采用t检验,并进行Spearman等级相关分析。计数资料采用χ^2检验。单因素生存分析采用Kaplan-Meier曲线,Log-rank检验,生存期预测相关性采用Cox回归分析。

2 结果

2.1 各组PTEN蛋白的表达

PTEN蛋白在细胞质和细胞核中均有表达,表现为棕黄色或棕褐色染色颗粒。结果显示,PTEN在胃癌组织(图1A)、癌旁组织(图1B)及正常对照组的阳性表达率分别是50.8%(96/189)、85.2%(46/54)和96.9%(31/32)。胃癌组织与癌旁组织($\chi^2=19.330$,$P=0.000$)及正常胃黏膜组织($\chi^2=22.830$,$P=0.000$)相比,PTEN阳性表达率具有显著性差异,而癌旁组织和正常胃黏膜组织比较,PTEN阳性表达率的差异无显著性($\chi^2=1.816$,$P=0.178$)。



A:胃癌组织;B:癌旁组织

图1 免疫组化检测癌旁组织PTEN蛋白表达 (S-P ×400)

2.2 各组MVD、MLD

经免疫组化双染:微血管呈红色,微淋巴管呈棕黄色(图2)。结果显示:胃癌组织MVD为(28.84±14.17),与癌旁组织(17.02±8.54)和正常组织(16.69±7.21)相比,差异均具有显著性($t=4.03$,$P=0.000$;$t=5.01$,$P=0.000$);癌旁组织与正常胃黏膜组织的MVD比较差异无显著性($t=0.034$,$P=0.820$)。胃癌组织的MLD为(8.55±4.98),与癌旁组织(4.05±2.48)和正常胃黏膜组织(3.99±1.56)比较,差异均具有显著性($t=9.300$,$P=0.000$;$t=10.32$,$P=0.000$);癌旁组织和正常胃黏膜组织的MLD比较差异无显著性($t=0.042$,$P=0.760$)。

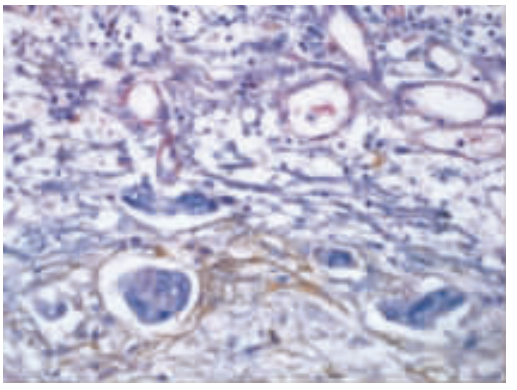


图2 免疫组化检测胃癌组织微血管染色(红色)、微淋巴管(棕色)染色 (S-P ×400)

2.3 胃癌组织PTEN表达与MVD、MLD相关性分析

胃癌组织PTEN阳性组MVD为(26.86±13.29),阴性组为(31.37±15.14),二者相比差异具有显著性($t=-2.175$,$P=0.031$)。PTEN阳性组MLD为(7.61±5.29),阴性组为(9.37±4.23),二者相比差异亦有显著性($t=-2.527$,$P=0.012$)。

Spearman等级相关性分析显示,胃癌组织中PTEN和MVD($r=-0.168$,$P=0.021$)、MLD($r=-0.283$,$P=0.000$)均呈负相关关系。

2.4 胃癌组织MVD、MLD和PTEN的表达及其与临床病理特征的关系

胃癌组织PTEN表达与淋巴结转移、分化程度和Lauren分型密切相关,而与肿瘤大小、浸润深度无关。MVD表达与分化程度、Lauren分型及浸润深度密切相关,而与肿瘤大小及淋巴结转移无显著性差异。MLD表达与分化程度、Lauren分型及淋巴结转移密切相关,而与肿瘤大小、浸润深度无显著性差异。具体见表1。

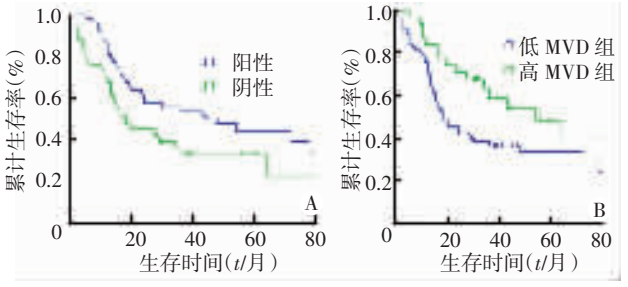
2.5 胃癌组织PTEN表达、MVD、MLD与生存分析

应用Kaplan-Meier生存曲线分析显示:得到随访的101例胃癌手术患者的半数生存期为28(2~79)个月,3年生存率为44.2%,5年生存率为39.6%。101例胃癌组织中,PTEN阳性表达52例,其半数生存期为48个月,阴性表达49例,其半数生存期是18个月,PTEN阳性表达和阴性表达与胃癌患者的生存期密切相关(图3A)($\chi^2=4.174$,$P=0.041$)。MVD和MLD分别以平均值为界分为高(≥30个/高倍视野)、低(<30个/高倍

表 1 胃癌组织中 MVD、MLD 和 PTEN 表达及其与临床病理特征的关系

病理参数	PTEN 表达阳性[例(%)]	χ^2	*P*	MVD	*t*	*P*	MLD	*t*	*P*
肿瘤直径									
<5 cm	39/70(55.7)	1.077	0.299	28.88±14.97	0.03	0.973	9.07±5.41	1.74	0.082
≥5 cm	57/119(47.9)			28.81±13.70			7.82±4.00		
淋巴结转移									
无	46/73(63.0)	0.008	7.106	29.61±14.19	0.95	0.340	10.02±5.00	6.37	0.000
有	50/116(43.1)			27.64±14.14			6.18±3.35		
分化程度									
高/中分化	54/89(60.7)	0.010	6.570	31.84±15.91	3.27	0.001	9.38±5.16	2.42	0.016
低分化	42/100(42.0)			25.53±11.14			7.71±4.54		
浸润深度									
T1+T2	23/46(50.0)	0.901	0.015	21.81±9.10	5.41	0.000	8.00±4.70	0.99	0.378
T3+T4	73/143(51.0)			31.31±14.81			8.70±5.10		
Lauren 分型									
弥漫型	34/85(40.0)	0.008	7.101	31.20±15.24	2.64	0.009	9.52±5.00	3.83	0.005
肠型	58/97(60.0)			25.88±12.35			7.59±4.32		

视野)MVD 组(57/44)和高、低 MLD 组(61/40)进行生存分析,结果显示:高 MVD 组半数生存期为 18 个月,低 MVD 组为 54 个月,低 MVD 组较高 MVD 组具有生存优势(图 3B)(χ^2 = 4.224,*P* = 0.040);高 MLD 组半数生存期为 24 个月,低 MLD 组半数生存期为 43 个月,尽管低 MLD 组较高 MLD 组具有生存优势的倾向,但 2 组差异无显著性(χ^2 = 1.044,*P* = 0.307)。



A:PTEN 表达与生存分析;B:MVD 与生存分析

图 3 胃癌组织中 PTEN 的表达、MVD 与生存分析

Cox 回归分析显示:最终保留在模型中的协变量是 PTEN、淋巴结转移、浸润深度。协变量 PTEN 的 RR 值为 0.513,小于 1,提示 PTEN 是一个保护因素,可增加患者生存时间,协变量淋巴结转移、浸润深度相对危险度(relative risk,RR)值分别是 3.082、4.476,均大于 1,提示他们是危险因素,有减少患者生存时间的危险。PTEN 可作为胃癌预后的独立预测因子。

3 讨论

PTEN(10 号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源体基因),又名 MMAC1 基因,于 1997 年由 Li 等发现并命名。PTEN 被公认为是一种抑癌基因。目前认为,PTEN 蛋白主要通过以下 3 条途径发挥作用:①三磷酸酰肌醇激酶途径(PI3K/Akt 途径)[3]:催化磷脂酰肌醇三磷酸(PI3,4,5P_3)使其 D-3 位去磷酸化,从而拮抗 PI3K,而阻断 PKB 活化,从而抑制肿瘤细胞的生长和增殖。②有丝分裂原激活的蛋白激酶途径(MAPK 途径)[4]。通过抑制 Grb2、Gab1、IRS21/Grb2/Sos 复合物最终下调 MAPK 通路,控制细胞增殖与分化。③局部黏附性激酶途径(FAK 途径)[5]。抑制 FAK/P130Cas 磷酸化,负调控整合素信号的转导,削弱局部黏附作用及细胞骨架的形成,抑制肿瘤的增殖、黏附、侵袭、转移和扩散。研究认为,PTEN 基因的异常甲基化[6]、突变、缺失、尤其是蛋白表达下调可能在胃癌的发生、发展进程中发挥重要作用[7]。

本研究结果显示 PTEN 在胃癌组织中表达显著下调,PTEN 蛋白产物表达下调或丢失可能为胃癌发生的复杂网络中的一种信号,表明 PTEN 可能参与胃癌的发生与发展,导入野生型 PTEN 基因有可能对胃癌产生抑制[8]。尽管 PTEN 在胃癌组织表达下调,但癌旁组织和正常胃黏膜中 PTEN 的表达无统计学差异,表明 PTEN 在胃癌的发生、发展中可能是一个晚期分子事件。

本研究结果显示低分化胃癌组织 PTEN 阳性表达率显著低于高/中分化胃癌组织,这与 Zheng 等[9]的结果一致,PTEN 参与胃癌的分化转移。MVD、MLD 对胃癌细胞的分化亦有影响,其机制可能与低 PTEN 蛋白表达促进 VEGF 和 MMP-9 的表达[10]和 MAPK 通路上调[4]有关。有学者[11]发现弥漫型胃癌组织 PTEN 阳性表达率显著低于肠型胃癌组织,我们亦发现相同结果,起源不同,PTEN 的阳性表达率亦有差异。这给胃癌的临床个体化治疗提供了理论依据。

MVD、MLD 反映肿瘤血管、淋巴管的新生能

力[12,13]。本研究结果显示,胃癌组织 MVD 和 MLD 显著增高,表明在胃癌发生和发展中存在着大量微血管和微淋巴管不断形成的过程。同时,PTEN 表达与 MVD、MLD 呈现负相关关系,PTEN 失表达的胃癌组织中,MVD 和 MLD 显著增高,提示 PTEN 失表达参与了 MVD、MLD 形成过程。可能与 PTEN 失表达引起 PI3K/AKT 激活,间接激活 VEGF 表达有关[14]。

肿瘤的侵袭和转移是癌症患者死亡的重要原因之一,血液和淋巴转移是癌细胞形成远处转移的主要途径。胃癌新生血管和淋巴管是肿瘤侵袭转移机制中重要的一环。本研究显示 PTEN 表达在有淋巴结转移胃癌患者显著下调,MLD 在有淋巴结转移的胃癌患者升高。肿瘤细胞可以通过表达淋巴管生成调控因子 VEGF-C 和 VEGF-D 诱导微淋巴管生成,进而促使肿瘤细胞的淋巴道转移[15],失活的 PTEN 也可通过调节细胞的聚集黏附作用影响肿瘤细胞的浸润和转移[5]。间接激活 VEGF 诱导 MLD 生成增加促进转移。我们观察到 MVD 随着浸润深度的增加而升高,PTEN 与胃癌浸润深度无相关关系,PTEN 间接通过 MVD 影响肿瘤的浸润深度。

采用 Kaplan-Meier 曲线对 101 例随访患者的生存分析显示,PTEN 表达方式与患者的生存期密切,PTEN 表达上调具有显著生存优势,这与赵雪峰等[16]的研究结果一致。同时,微血管密度与患者生存期密切相关[17]。尽管微淋巴管密度是预后的危险因素,但本研究的生存分析显示 MLD 与生存期无相关关系。究其原因,我们认为可能与组织芯片制作过程中的取材有关(主要考虑选取癌细胞集中区域,无法全部兼顾癌边缘)。Cox 多元回归分析显示 PTEN 的异常表达可以作为影响胃癌预后的独立因素。

综上所述,我们使用高通量的组织芯片和免疫组化技术证实了 PTEN 蛋白在胃癌组织中低表达,参与了胃癌的发生、发展、浸润、转移等生物学行为,PTEN 表达可能是胃癌发生的晚期分子事件。失表达的 PTEN 可增加胃癌组织 MVD、MLD。PTEN 可作为胃癌患者生存的预测蛋白。

志谢 感谢甘肃省武威市肿瘤医院消化科张志镒主任在收集标本时给予的帮助

参考文献:

[1] Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy[J]. Oncogene, 2008, 27(41): 5477-5485.

[2] Zhang B, Zhao W H, Zhou W Y, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factors-C and -D correlate with evidence of lymphangiogenesis and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Detect Prev, 2007, 31(6): 436-442.

[3] Yuan T L, Cantley L C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme[J]. Oncogene, 2008, 27(41): 5497-5510.

[4] Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer[J]. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3003-3006.

[5] Chatzizacharias N A, Kouraklis G P, Theocharis S E. Focal adhesion kinase: a promising target for anticancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(10): 1315-1328.

[6] 刘芬, 于皆平, 于红刚. 胃癌中抑癌基因 PTEN 甲基化状态的检测[J]. 中华消化杂志, 2006, 28(8): 551-552.

[7] Guo C Y, Xu X F, Wu J Y, *et al*. PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(24): 3804-3811.

[8] 乔宝民, 孙光, 汤洋, 等. 野生型 PTEN 基因高表达对膀胱移行细胞癌 EJ 细胞的抑癌作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(4): 262-265.

[9] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, *et al*. Low expression of FHIT and PTEN correlates with malignancy of gastric carcinomas: tissue-array findings[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2007, 15(4): 432-440.

[10] 贺荣芳, 胡忠良, 文继舫. PTEN 基因对胃癌细胞株 SGC7901 生物学行为及血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 2 及 9 表达的影响[J]. 中华病理学杂志, 2007, 36(5): 324-328.

[11] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, *et al*. Pathobiological characteristics of intestinal and diffuse-type gastric carcinoma in Japan: an immunostaining study on the tissue microarray[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(3): 273-277.

[12] Pang R W, Poon R T. Clinical implications of angiogenesis in cancers[J]. Vasc Health Risk Manag, 2006, 2(2): 97-108.

[13] Ali M A. Lymphatic microvessel density and the expression of lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma[J]. Med Princ Pract, 2008, 17(6): 486-492.

[14] Jiang B H, Liu L Z. AKT signaling in regulating angiogenesis[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(1): 19-26.

[15] Duff S E, Jeziorska M, Kumar S, *et al*. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2007, 9(9): 793-800.

[16] 赵雪峰, 焦志凯, 李勇, 等. 胃癌中 PTEN、IGF-1、IGF-1R 蛋白表达及其预后意义评价[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(12): 1197-1199.

[17] Kato T, Steers G, Campo L, *et al*. Prognostic significance of microvessel density and other variables in Japanese and British patients with primary invasive breast cancer[J]. Br J Cancer, 2007, 97(9): 1277-1286.

(收稿 2010-05-04 修回 2010-06-30)

(编辑 王 红)