肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0830-03

非小细胞肺癌 VEGF-A 的表达与前哨淋巴结新生淋巴管形成及转移的关系

陈 睿,张幸平,袁光波
(重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 40016)

【摘 要】目的:研究非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)血管内皮生长因子(Vasular endothelial growth factor A,VEGF-A)VEGF-A 的表达与前哨淋巴结新生淋巴管形成及转移的关系。方法:应用免疫组化链霉素抗生物素蛋白-过氧化物霉(SP)法检测 65 例 NSCLC。组织中 VEGF-A 的表达,免疫荧光实验方法检测前哨淋巴结中淋巴管内皮透明质酸受体。(Lymphatic vessel endothelial HA receptor 1,LYVE-1)的表达并标记新生淋巴管密度,结合临床病理特征进行统计学相关性分析。结果:65 例 NSCLC 病人中 VEGF-A 的表达率为 72.3%(47/65),VEGF-A 的表达与前哨淋巴结转移(r=0.453,P<0.01),临床分期(r=0.442,P<0.01),前哨淋巴结新生淋巴管密度(r=0.642,P<0.01)呈正相关;与病理分化程度(r=-0.525,P<0.01)呈负相关。结论:NSCLC 中 VEGF-A 的表达与非小细胞肺癌前哨淋巴结新生淋巴管的形成及转移存在明显相关性,可作为判断患者预后的生物指标。

【关键词】血管内皮生长因子;前哨淋巴结;免疫组织化学;免疫荧光
【中国图书分类法分类号】R734.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-08

Expression of VEGF-A and its correlation with the sentinel lympha nodes lymphangiogenesis and metastasis in non-small cell lung cancer

CHEN Rui, et al
(*Department of Onocology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstrast】*Objective*: To investigate the expression of VEGF-A and the correlation with the sentinel lymph nodes lymphangiogenesis and its metastasis in non-small cell lung cancer(NSCLC).*Methods*: The expression of VEGF-A was detected in 65 patients with NSCLC by SP immunohistochemistay. The expression of LYVE-1 was detected by immunofluorescence. The new lymphatic vessel density was counted by LYVE-1 and analyzed with clinicopathologic parameters. *Results*: The positive rate of VEGF-A was 72.3%(47/65),which was positively correlated with sentinel lympha nodes metastasis(r=0.453,P<0.01),clinicalstage(r=0.442,P<0.01),new lymphaticvessel density(r=0.642,P<0.001) and negatively correlated with phathologic differentiation(r=-0.525,P<0.001). *Conclusion*: The expression of VEGF-A is significantly interrelted with sentinel lymph nodes lymphangiogenesis and metastasis in NSCLC,which may serve as a useful target for patients' prognosis.

【Key words】Vasular endothelial growth factor A;Sentinel lymph node;Immunohistochemical;Immunofluorescent

肺癌是当前世界各地最常见的恶性肿瘤之一,发病率在多数国家仍在升高。在肺癌中,非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer,NSCLC)占 75%~80%,总 5 年存活率约 13%,近 20 年未改变。淋巴结转移是影响 NSCLC 临床分期、疗效与预后的最重要因素之一。血管内皮生长因子 A(Vasular endothelial growth factor A,VEGF-A)是强力的促血管生成因子,有报道 VEGF-A 也可诱导肿瘤新生淋巴管的形成而促进转移。本实验应用美蓝染色法检测 65 例 NSCLC 的前哨淋巴结,运用 SP 免疫组化法检测肿瘤组织中 VEGF-A 的表达,用免疫荧光实验方法检测前哨淋巴结(Sentinel lymph node,SLN)中淋巴管内皮透明质酸受体 1(Lymphatic vessel endothelial HA receptor 1,LYVE-1)的表达并标记新生淋巴管密度(Lymphatic vessel density,LVD)。探讨 NSCLC 中 VEGF-A 的表达与前哨淋巴结新生淋巴管形成及

作者介绍:陈 睿(1982-),男,硕士,
研究方向:肺癌的早期诊断与治疗。
通讯作者:张幸平,女,教授,E-mail:Zhangxingpin@163.com。
基金项目:吴阶平医学基金会临床科研专项资助基金(2004-87-F)。

转移的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

本实验收集 2006 年 2 月至 2007 年 2 月间重庆医科大学附属第一医院胸外科具备完整临床资料的手术治疗 NSCLC 65 例，其中男性 39 例、女性 26 例，年龄 42~70 岁，平均年龄54.3 岁。病理类型：鳞癌 32 例、腺癌 24 例、腺鳞癌 9 例。病理分化程度：高分化 3 例，中分化 24 例，低分化 38 例。按照国际抗癌联盟（UICC）1997 年修订的 pTNM 分期标准分为Ⅰ期 15 例，Ⅱ期 16 例，ⅢA 期 34 例。

1.2 手术方式及前哨淋巴测定

手术采用全身麻醉，探查病变情况确定可以手术切除后将 4 ml 美蓝注射于肿瘤周围（肿瘤前、后、左、右各 1 ml）。5 min 后观察肺内和纵隔淋巴结有无蓝染，并确定前哨淋巴结。如果同一组淋巴结中有多个蓝染，则均认为是前哨淋巴结，如果多组淋巴结蓝染且不能判断蓝染先后，则以距原发癌最近的一组为前哨淋巴结。并根据淋巴结蓝染情况常规行肺叶切除及淋巴结清扫术。术后送病理检查，明确肿瘤病理类型、分化程度及是否有淋巴结转移。

1.3 切片制作及实验方法

1.3.1 主要试剂 VEGF-A 兔抗人多克隆抗体，SP 试剂盒，DAB 显色剂，DAPI 荧光染料均购于北京中杉生物技术有限公司，LYVE-1 鼠抗人多克隆抗体购于上海力业生物科技有限公司。

1.3.2 切片制备 手术切除的 NSCLC 组织及前哨淋巴结经固定、脱水、透明、脱蜡、染色、脱水、封片等步骤，制成 5 μm 厚切片供免疫组化及免疫荧光染色用。实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 免疫组化 按照链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶（SP）法试剂盒说明书步骤进行。PBS 缓冲液代替 VEGF-A 作阴性对照，VEGF-A 阳性对照为公司提供乳腺癌阳性对照片。

1.3.4 免疫荧光 热抗原修复预处理，DAPI 荧光染色，室温避光 2 h，缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察。LYVE-1 特异荧光强度用“+”表示：（-）无荧光；（±）极弱的可疑荧光；（+）荧光较弱，但清楚可见；（++）荧光明亮；（+++ ~++++）荧光闪亮。待检标本特异性荧光染色强度达“++”以上，即可判定为阳性，阳性对照由公司提供。

1.3.5 结果判定 VEGF-A：以胞浆或胞膜中出现棕黄色颗粒为阳性细胞（见图 1），高倍镜下随机选择 5 个视野，每个视野计数不少于 200 个细胞。阳性细胞数≥10% 为表达阳性，<10% 为表达阴性。

LYVE-1 标记淋巴管：染色为蓝绿色的内皮细胞形成的条状、隙状结构及有管腔者为新生淋巴管（见图 2）。计数标准：先于低倍镜（40/100）下确定 3 个着色密集区（Hot pot），然后在 200 倍光镜下分别计数淋巴管个数，取其均值为 LVD[1]。

1.4 统计学处理

计量资料间比较采用独立样本 t 检验，计数资料间比较用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率计算法，相关分析采用 Spearman 相关分析。所有数据应用 SPSS12.0 软件包处理。按 $\alpha=0.05$ 为检验水准，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

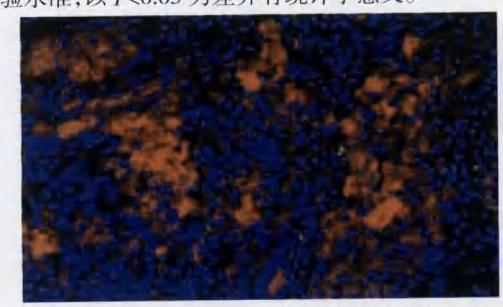


图 1 SNCLC 中 VEGF-A 的阳性表达（DAB，×40）

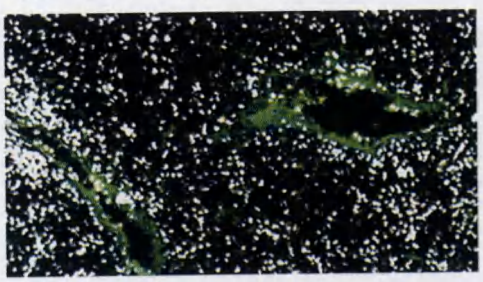


图 2 前哨淋巴结中 LYVE-1 标记的新生淋巴管（DAPI，×100）

2 结 果

2.1 NSCLC 中 VEGF-A 的表达与 SLN 转移的关系

VEGF-A 在非小细胞肺癌组织中的表达见图 1。其表达率为 72.3%（47/65），在 41 例前哨淋巴结转移阳性病例中，VEGF-A 的表达率为 87.8%（36/41），而在 24 例前哨淋巴结阴性病例中，VEGF-A 的表达率为 45.8%（11/24）。前哨淋巴结转移阳性病例中 VEGF-A 的表达率明显高于阴性病例（$P<0.01$），VEGF-A 的的表达与前哨淋巴结转移呈正相关（$r=0.453$，$P<0.01$）（表 1）。

2.2 VEGF-A 的表达与 NSCLC 病理分期、分化程度的关系

在Ⅰ~Ⅱ期病例中，VEGF-A 表达率为 51.6%（16/31），ⅢA 期病例中 VEGF-A 的表达率为 91.2%（31/34），ⅢA 期病例 VEGF-A 的表达率明显高于Ⅰ~Ⅱ期病例（$P<0.01$）。中高分化病例 VEGF-A 的表达率为 44.4%（12/27），低分化病例 VEGF-A 的表达率为 92.1%（35/38），说明低分化癌 VEGF-A 的表达率明显高于中高分化癌（$P<0.01$）。VEGF-A 的表达与临床分期呈正相关（$r=0.442$，$P<0.01$），与肿瘤病理分化程度呈负相关（$r=-0.525$，$P<0.01$）（表 1）。

2.3 LVD 与前哨淋巴结新生淋巴管形成及转移的关系

SLN 中 LYVE-1 标记的新生淋巴管见图 2。LVD 范围为 13.63~44.25 个/HP，平均（61±8）个/HP。LVD 与前哨淋巴结淋巴结转移（$r=0.466$，$P<0.01$），病理分期（$r=0.351$，$P<0.01$），VEGF-A 表达（$r=0.506$，$P<0.01$）呈正相关。与病理分化程度（$r=-0.474$，$P<0.01$）呈负相关（表 1）。

表 1 NSCLC 中 VEGF-A 的表达与 SLN 新生淋巴管形成及转移的关系

观察指标		例数	VEGF-A		Fisher's 精确 P 值	LVD		Fisher's 精确 P 值
			PN	P		$\bar{x} \pm s$	P	
SLN	阳性	41	36	<0.01	0.453	29 ± 8	<0.01	0.466
	阴性	24	11			22 ± 5		
CS	Ⅰ~Ⅱ	31	16	<0.01	0.442	24 ± 8	<0.016	0.351
	ⅢA	34	31			29 ± 8		
PD	中高	27	12	<0.01		22 ± 7	<0.01	-0.474
	低	38	35	<0.01	-0.525	30 ± 8		
VEGF-A	阳性	47				29 ± 8	<0.01	0.506
	阴性	18				20 ± 5		

注:SLN:前哨淋巴结;CS:临床分期;PD:病理分化;PN:阳性例数;LVD:新生淋巴管密度

3 讨 论

淋巴结转移是影响 NSCLC 病理分期、疗效及预后的最重要因素之一。淋巴结转移作为肿瘤转移的重要途径,是一个包含了增殖的肿瘤细胞从原发肿瘤浸润至邻近淋巴管,通过淋巴管转移至区域淋巴结及在区域淋巴结生长与转移的复杂过程。过去对新生淋巴管系统的研究落后于血管系统,原因是缺乏特异性的淋巴管记物,随着 LYVE-1 等一系列特异性标记物的发现,使得对新生淋巴管系统的研究取得了一定进展。SLN 是指最早接受肿瘤淋巴引流的淋巴结,也是最早发生转移的淋巴结。Cabanas[2]于 1977 年首先提出并应用了 SLN 测图技术。近十余年来,这项技术已经被广法泛应用于乳腺癌和黑素瘤的治疗中,它已经成为避免不必要的腋窝和腹股沟淋巴结清扫术的有效方法。1999 年,Little[3]将这一技术引入非小细胞肺癌的研究中,国外多采用亲脂的异舒泛蓝(Iosulfan blue),但这种染料不易获得。美蓝容易获得且价格低廉,据报道其前哨淋巴结检出率约为 92%,证明美蓝染色法前哨淋巴结测图技术可以成功地应用于非小细胞肺癌的研究[4],故本研究采用美蓝染色法来检测 65 例 NSCLC 病人的 SLN。前哨淋巴结作为肿瘤淋巴结转移的第一站,其在判定非小细胞肺癌的病理分期、疗效及预后中起着重要作用。

VEFG-A 是强有力的促肿瘤生长因子,过去认为 VEFG-A 通过结合血管内皮生长因子受体 1/2 (Vascular endothelial growth factor receptor1/2, VEGFR1/2)主要在新生血管的形成中发挥作用,近来一些研究表明 VEFG-A 也可引起非小细胞肺癌新生淋巴管的形成而促进转移。Whitehurst B 等[5]利用老鼠肠系膜淋巴管细胞(RLMEC,其可强势表达 Prox-1、LYVE-1 及 VEGFR-3)建立 VEGF-A, VEGF-C 剂量依赖性细胞表达模型,他们通过可溶性 Tie-2 融合蛋白阻止 VEGF-C 表达后,发现 Prox-1, LYVE-1 及 VEGFR-3 的表达与 VEGF-A 呈正相关。表明新生淋巴管的形成可能与 VEGF-A 的表达具有相关性。在表达 VEGF-A 的角膜肿瘤中,甚至形成了与 VEGF-A 相关的贯穿整个肿瘤组织的蜂房样新生淋巴管网[6]。Hirakawa S 等[7]报道,非小细胞肺癌 VEGF-A 的表达可以诱导肿瘤组织和前哨淋巴结新生淋巴管的形成而促进转移。本研究也表明 VEFG-A 在非小细胞肺癌组织中呈明显表达。VEGF-A 的表达与前哨淋巴结转移、新生淋巴管密度、临床分期呈正相关,与病理分化程度呈负相关。表明 VEGF-A 的表达与非小细胞肺癌前哨淋巴结新生淋巴管的形成及转移存在明显相关性。VEGF-A 可考虑作为判断患者预后的生物学指标而应用于临床。

参 考 文 献

[1] Bjrndahl M, Cao R, Burton J, et al. Vascular endothelial growth factor-A promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis [J]. Cancer Research, 2005, 65(2): 9261-9268.

[2] Cabanas R M. An approach for the treatment of penile carcinoma[J]. Cancer, 1977, 39(2): 456-466.

[3] Linle A G, DeHoyos A, Kirgan D M, et al. Intraoperative lymphatic mapping for non-small cell lung cancer: the sentinel node technique[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 117(2): 220-234.

[4] 马良贺,周 伟,伍硕允,等.术中前哨淋巴结测图在非小细胞肺癌中的应用[J].中国基层医药,2006,13(1):3-4.

[5] Whitehurst B, Eversgerde, Flister Ⅲ, et al. Molecular profile and proliferative responses of rat lymphatic endothelial cells in culture[J]. Lymphat Res Biol, 2006, 4(3): 119-142.

[6] Rui C J. Lymphatics endothelial cells tumor lymphangiogenesis and metastasis: new insights into intratumoral and peritumoral lymphatics[J]. Cancer Research, 2006, 65: 9787-9798.

[7] Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lympha node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis[J]. Exp Med, 2005, 2(1): 1089-1099.

(责任编辑:冉明会)