维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0159-04

VEGF-C 表达与微血管和淋巴管的关系及其在胃癌转移中的作用

彭庆弟,朱 鹏,时 德

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨胃癌旁组织中 VEGF-C 的 mRNA 表达与血管、淋巴管密度的关系以及在胃癌转移中的作用。方法:取 62 例胃癌标本的癌旁组织,用 RT-PCR 法检测 VEGF-C 的 mRNA 表达;用免疫组织化学 SP 法检测 CD105 和 VEGFR-3,计算新生微血管和淋巴管的密度。结果:淋巴结转移阳性组中 VEGF-C mRNA 阳性表达 88%,高于阴性组的 21%($P<0.05$);阳性组淋巴管密度 6.15±1.61 也高于阴性组的 3.93±1.76($P<0.05$);新生微血管密度在两组间差异无显著性。VEGF-C mRNA 表达阳性组淋巴管密度 6.03±1.73 高于阴性组的 4.05±1.71($P<0.05$);而新生微血管密度在两组间差异无显著性。结论:VEGF-C 能提高胃癌侵袭力、促进癌旁淋巴管增生,并介导癌细胞主动进入淋巴管,向全身转移。是影响胃癌预后、危害患者生命的重要因素。

【关键词】VEGF-C;微血管密度;淋巴管密度;胃癌转移

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-07-22

Relationship between the expression of VEGF-C and microvessel and lymphatic microvessel density, and their role in the metastasis of gastric carcinoma

PENG Qing-di, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the relationship between the expression of VEGF-C and microvessel density(MVD) and lymphatic microvessel density(LVD), and their role in the metastasis of gastric carcinoma. *Methods*: The expressions of VEGF-C mRNA in 62 gastric carcinoma tissue specimens and 10 normal gastric tissues were determined by RT-PCR. Immunohistochemistry(SP) was used to detect the expression of CD105 and VEGFR-3 in the tissues. MVD and LVD were counted. *Results*: The positive expression rate of VEGF-C in positive lymph node was significantly higher than that in negative lymph node(88% vs 21%, $P<0.05$); Compared with that without lymph node metastasis, LVD in positive lymph node increased significantly(6.15±1.61 vs 3.93±1.76, $P<0.05$), but MVD did not increased significantly. LVD in positive VEGF-C was significantly higher than that in negative VEGF-C(6.03±1.73 vs 4.05±1.71, $P<0.05$), but MVD was not significantly different. *Conclusions*: VEGF-C can promote the invasion of gastric carcinoma and lymphatic proliferation, mediate tumor cells to the lymphatic vessel and further the whole body. It is an important factor influencing the prognosis of gastric carcinoma and threatening patients lives.

【Key words】 VEGF-C; Microvessel density; Lymphatic microvessel density; Metastasis of gastric carcinoma

胃癌的转移和术后复发是影响其治疗效果、危害患者生命的主要因素。血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是促进肿瘤内外脉管生成最强的细胞因子。大量的研究表明[1,2]:VEGF 家族(包括 VEGF-A,B,C,D,E 和 3 种酪氨酸激酶受体 VEGFR-1,VEGFR-2 及 VEGFR-3)中各成员在肿瘤生长和转移中表现的方式和程度不同,每个成员结合不同的受体产生的结果也不同。本实验以胃癌旁组织中 VEGF-C 为研究对象;

作者介绍:彭庆弟(1965-),男,硕士,研究方向:胃肠肿瘤。

通讯作者:时 德,男,教授,E-mail:sdpwqlsl@126.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

用 RT-PCR 法检测 VEGF-C 的 mRNA 表达；用免疫组织化学 SP 法检测血管内皮细胞标记物 CD105 (Cluster of differentiation 105)和血管内皮生长因子受体 -3(Vascular endothelial growth factor receptor -3,VEGFR-3),计数微血管和淋巴管密度:探讨胃癌旁组织中 VEGF-C 与癌旁组织中微血管和淋巴管生长的关系,并进一步探讨 VEGF-C 在胃癌转移中的作用。

1 材料和方法

1.1 一般资料

胃癌标本取自重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 2005 年 6 月 ~2006 年 4 月收治的 62 例患者的胃癌根治术切除标本。男 42 例,女 20 例。年龄 32~75 岁,中位年龄 55 岁。肿瘤≥5cm 25 例,<5cm 37 例。T_1+T_2 侵润 30 例,T_3+T_4 侵润 32 例。低分化癌(包括黏液癌和印戒细胞癌)46 例,中、高分化癌 16 例。有淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 28 例。有肝肺等远处转移 5 例(其中 3 例为 N_0,2 例为 N_1),无远处转移 57 例。手术切除后立即取材。取癌块与正常组织交界处 0.5cm × 0.5cm 全层胃组织 2 块。一块用锡铂纸包裹,立即投入液氮中冷冻,备用于逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 VEGF-C 的 mRNA 表达;另一块用 10%甲醛溶液固定,用于免疫组织化学 SP 法检测新生微血管密度和淋巴管密度。用同法另取 10 例非胃癌疾病切除的胃标本正常组织作为对照组。62 例标本符合下列条件:(1)术后病理证实为腺癌;(2) 组织块 HE 染色必须见到胞核粗大的癌细胞巢与胞核较小且均匀的正常组织混杂。

1.2 研究方法

1.2.1 RT-PCR 法检测 VEGF-C 的 mRNA 表达 VEGF-C 引物序列为 UP 5'-AAAGAACCTGCCCCAGAAAT-3',DOWN 5'-AAGAGGCCTTTTGCTGATGA-3';产物 472bp。

先提取组织总 RNA。电泳检测 RNA 完整性。分光光度仪检测 RNA 浓度及纯度。RT 和 PCR 扩增按 RT-PCR 试剂盒说明书操作。

1.2.2 免疫组织化学 SP 法检测新生微血管和淋巴管密度 石蜡包埋的癌旁组织切片,HE 染色,镜下找到癌细胞,以确保组织来自癌块与正常组织交界处。按试剂盒说明书操作检测 CD105 和 VEGFR-3,计算新生微血管和淋巴管的密度。

判断标准:CD105 主要表达在血管内皮细胞(Vascular endothelial cell,VEC)的细胞膜和细胞浆,染色出现棕黄色颗粒。阳性细胞以单个或多个细胞团排列为条索状,有的无明显管腔形成;有管腔形成的血管管壁薄,仅有 1 层内皮细胞,无平滑肌组织。先于 100 倍视野下确定 4 个血管密集区域,然后在 200 倍视野下计数其 4 个区域的新生微血管数,取其平均数作为该标本新生微血管密度。

VEGFR-3 阳性染色淋巴管和血管胞浆均出现棕黄色颗粒,位于肿瘤组织间质。淋巴管管壁细胞多呈裂隙状,内无红细胞。对有平滑肌组织包绕者视为血管;区别细小血管和淋巴管的方法参照 CD105 染色,以排除小血管。计数法同微血管。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学分析。新生微血管和淋巴管密度以均数 ± 标准差表示,显著性采用 t 检验。VEGF-C mRNA 表达定性资料用 χ^2 检验。检验水准均为 0.05。

2 结 果

2.1 VEGF-C mRNA 的表达

取 PCR 扩增产物,在 1%琼脂糖凝胶上电泳,同时加入 Marker 对照。电泳结果在紫外分析仪下对 DNA 条带进行观测,在 400~500bp 处出现亮带为 VEGF-C 阳性,不出现则为阴性(图 1)。

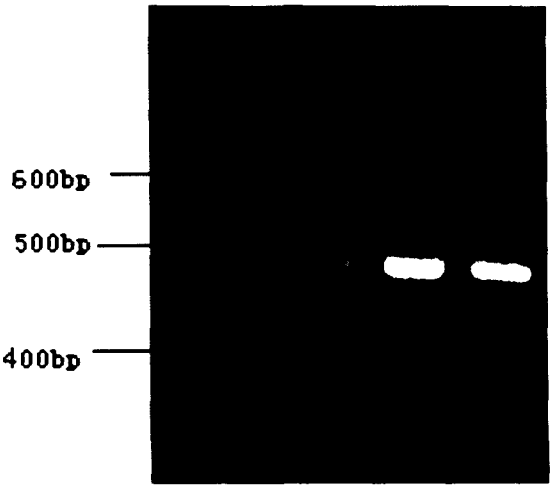


图 1 DNA 电泳图

VEGF-C mRNA 在癌旁组织的表达阳性 36 例,占 58%,而正常胃组织全为阴性。T_1+T_2 组阳性 6 例,阴性 19 例,阳性率 24%;T_3+T_4 组阳性 31 例,阴性 6 例,阳性率 84%($P<0.05$)。有淋巴结转移组阳性 30 例,阴性 4 例,阳性率 88%;无淋巴结转移组阳性 6 例,阴性 22 例,阳性率 21%($P<0.05$)。5 例有远处脏器转移病例中 2 例为阳性,3 例为阴性;57 例无远处脏器转移病例中 34 例为阳性,23 例为阴性(因分组太偏,未进行统计学分析)。

2.2 新生微血管密度

癌旁组织中有大量新生血管(图 2),而正常胃

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 癌巢周围有大量微血管(SP×200)

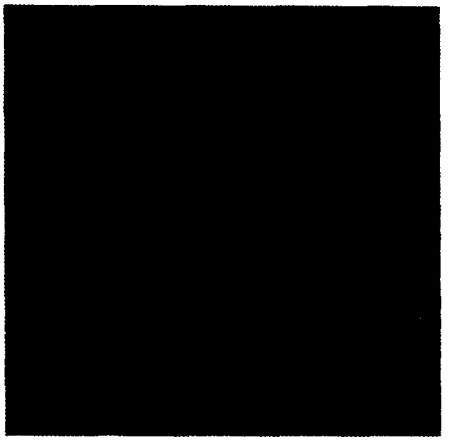


图 3 癌巢周围有大量淋巴管(SP×200)

组织中未见到新生血管。癌块≥5cm 组新生血管密度为 22.24 ± 4.41，<5cm 组为 19.41 ± 4.76($P<0.05$)。T_1+T_2 组新生血管密度为 18.48 ± 4.96，T_3+T_4 组为 22.03 ± 4.12($P<0.05$)。VEGF-C mRNA 表达阳性组新生血管密度为 21.37 ± 4.53，阴性组为 19.54 ± 4.98($P>0.05$)。淋巴结转移组新生微血管密度为 21.17 ± 4.73，无淋巴结转移组为 19.91 ± 4.82($P>0.05$)。远处脏器转移组为 25.75 ± 1.12，无远处转移组为 20.15 ± 4.70。

2.3 淋巴管密度

癌旁组织中有大量淋巴管(图 3)，淋巴管密度为 5.20 ± 1.97，明显高于正常胃组织的 1.98 ± 0.58($P<0.05$)。有淋巴结转移组淋巴管密度为 6.15 ± 1.61，无淋巴结转移组为 3.93 ± 1.76($P<0.05$)。VEGF-C mRNA 表达阳性组淋巴管密度为 6.03 ± 1.73，阴性组为 4.05 ± 1.71($P<0.05$)。

3 讨 论

VEGF-C 最初由 Joukov 等在 PC-3 前列腺腺癌细胞的上清液中发现。人 VEGF-C 基因定位于 4q34，其 cDNA 开放阅读框编码的蛋白质含 419 个氨基酸残基。VEGF-C 具有特异性促进脉管内皮细胞增生和迁移、增加脉管通透性的作用，对肿瘤生长与转移具有重要意义。

3.1 VEGF-C 协同 Ang-2 促进肿瘤血管增生

血管生成是指从已存在的毛细血管和毛细血管后微静脉的 VEC 分化而形成的新血管。正常生理状态下，除女性月经期外，VEC 基本处于不增生状态，更新周期达 3 年以上。当肿瘤突破基底膜，原组织中的血管已不能满足肿瘤的血供时，需要不断增生新的血管以提供肿瘤生长所需物质。文献[3,4]报导，Ang-2 是促进 VEC 增生的主要细胞因子。但 Ang-2 对血管的作用与 VEGF 密切相关。当 VEGF 不存在时，Ang-2 的表达主要使血管发生退化，内皮细胞凋亡，血管数量减少；而在 VEGF 存在时 Ang-2 与受体 Tie-2 结合，可竞争性阻断 Ang-1 的效应，抑制支持细胞的聚集，导致内皮细胞之间、内皮细胞与支持细胞之间、内皮细胞与基质之间的相互作用减弱，破坏血管结构的稳定性；由此引起毛细血管出芽，形成新生血管。新生血管数量多，而且管壁不完整、无平滑肌，仅由有孔的内皮细胞和片状的基膜构成；其通透性强，血管内物质渗出增多，使肿瘤细胞获得更多的氧和营养物质，从而加速肿瘤的生长。同时，通透性的增加也有利于癌细胞的转移。

本实验显示：癌旁组织中可见大量新生微血管，而正常胃组织中未见到新生微血管；癌旁组织中新生微血管密度在患者性别、年龄以及胃癌分化程度等分组间差异无显著性；在肿瘤大小和侵润深度分组间 $P<0.05$；有远处脏器转移病例的新生微血管密度虽因病例太少，无统计学意义，但从结果上看，阳性组仍明显高于阴性组。说明新生血管既是癌块生存、生长的需要，同时也增强了癌组织向周围侵袭和向远处转移的可能性；是影响患者预后的重要因素。本实验结果还显示：在 VEGF-C 阴阳性和有无淋巴结转移分组间微血管密度差异无显著性。这表明，VEGF-C 促进癌旁组织新生血管生成的作用不明显。

3.2 VEGF-C 特异性促进淋巴管生成

淋巴管生成是新生淋巴管的形成和生长，可发生于正常发育的组织，也可出现在病理过程中，如

维普资讯 http://www.cqvip.com

炎症、损伤、淋巴水肿和肿瘤。VEGF-C 是 1 个特异性促进淋巴管生成因子。VEGFR-3 是 VEGF-C 的受体之一。在胚胎早期 VEGFR-3 可表达于 VEC，至后期和出生后则仅表达于淋巴管内皮细胞；它既是淋巴管特异性标记物也是淋巴管发生的调节因子。完全加工的 VEGF-C 对 VEGFR-3 的亲和力是其他 VEGF 类物质的 400 倍。VEGF-C 以旁分泌的形式作用于 VEGFR-3，诱导淋巴管内皮细胞增殖、迁徙，促进淋巴管增生。VEGF-C 还调控肿瘤细胞周围原发淋巴管内皮细胞之间相互旁分泌的关系，使原有淋巴管增生、扩张并与新生淋巴管连接、再通，使肿瘤细胞易于侵入淋巴管，向外扩散。有研究发现[4]在转移淋巴结的周围，VEGFR-3 阳性淋巴管密度较高，约为未转移淋巴结的 4 倍；提示肿瘤淋巴结转移是经 VEGFR-3 阳性淋巴管形成的。因此认为，VEGF-C/VEGFR-3 信号转导系统在淋巴转移的发生中起着重要作用。

本实验显示：癌旁组织淋巴管密度明显高于正常胃组织；癌旁组织中淋巴管密度在患者性别、年龄以及癌块大小、侵润深度、分化程度等分组间差异无显著性；有淋巴结转移组淋巴管密度明显高于无淋巴结转移组（$P<0.05$）；VEGF-C mRNA 阳性表达组淋巴管密度高于阴性组（$P<0.05$）。提示 VEGF-C 促进癌旁组织中淋巴管大量增生；由于淋巴管管壁缺乏紧密连接，基底膜不连续，缺少阻碍胃癌细胞进入新生淋巴管的有效屏障，因此淋巴管数量增加给癌细胞的淋巴结转移提供了有利条件。此外，本组病例的淋巴结转移占 55%，远高于 8%的经血道远处脏器转移。说明淋巴转移是胃癌转移的主要方式，淋巴结转移是影响患者预后的主要因素。

3.3 VEGF-C 介导癌细胞的转移

传统观点认为肿瘤的转移是一个被动过程，在此过程中，肿瘤细胞通过业已存在的局部脉管转移至区域淋巴结和远处器官，而脉管内皮细胞在肿瘤的转移过程中扮演着被动角色。然而近年来的研究发现[4-6]：原发性恶性肿瘤早期即有肿瘤细胞播散入血液淋巴循环。其可能的机制是：(1)高表达 VEGF-C 的胃癌细胞与淋巴管内皮细胞具有亲和作用，可促使胃癌细胞向淋巴管内皮细胞移动；(2) 淋巴管内皮细胞局部释放旁分泌因子影响胃癌细胞侵袭性及与细胞外基质的黏附性，有利于胃癌细胞向淋巴管内渗透、转移；(3) 胃癌细胞通过 VEGF-C 与 VEGFR-3 相互作用，可调节自身生长、促进增殖、抑制凋亡，从而具有更高的增殖活性及侵润性；(4) VEGF-C 也可通过与 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的结合，提高微脉管的通透性，便于肿瘤细胞转移的发生。因此，肿瘤转移是在 VEGF-C 介导下的主动转移而非被动。

本实验显示：VEGF-C 的 mRNA 在癌旁组织表达阳性 36 例，占 58%，而正常胃组织全为阴性；癌旁组织的 VEGF-C mRNA 表达在患者性别、年龄及癌块的大小、分化程度分组间差异无显著性；VEGF-C mRNA 阳性表达组的 T_3+T_4 侵润占 84%、淋巴结转移占 83%、淋巴管密度 6.03 ± 1.73 均高于阴性组的 24%、15%、4.05 ± 1.71（$P<0.05$）。而侵润深度又与胃癌的直接侵润和腹腔种植转移有关。有文献报道[7]，在浆膜侵犯的胃癌病例中，淋巴结转移明显的病例腹膜转移的发生率较高，提示腹膜转移与淋巴结转移有关。因此 VEGF-C 能提高胃癌组织的侵袭力和转移力，进而增强其向周围直接侵润和腹腔种植转移的能力。

总之，VEGF-C 是胃癌生长和转移中一种重要的细胞因子。它能提高胃癌侵袭力、促进胃癌淋巴管增生、促进胃癌淋巴结转移。是影响胃癌预后、危害患者生命的重要因素。

参 考 文 献

[1] 冯润华，朱正刚. VEGF 及其受体与胃癌的关系[J]. 国外医学肿瘤学分册，2005；32(2)：138-140.

[2] 贡海兵.大肠癌中 VEGF 促淋巴生成作用的研究进展[J]. 中国普通外科杂志，2006；15(9)：705-706.

[3] 左朝辉，谌忠友，肖斌生，等. 环氧合酶-2 表达上调与人肝细胞癌新生血管生成的关系[J]. 中国普通外科杂志，2006；15(1)：40-44.

[4] Dadras SS，Detmar M. Angiogenesis and lymphangiogenesis of skin cancers[J]. Hematol Oncol Clin North Am，2004；18：1059-1070.

[5] Hirakawa S，Kodama S，Kunstfeld R，et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis[J]. Exp Med，2005；201：1089-1099.

[6] Dadras SS，Lange-Asschenfeldt B，Velasco P，et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes [J]. Mod Pathol，2005；18：1232-1242.

[7] 何 涛，杨志明，伍晓汀. 胃癌腹膜播散转移机理的研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志，2005；12(1)：43-45.

（责任编辑：关蕴良）