维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0540－04

VEGF－C 表达和淋巴管生成与胰腺癌淋巴道转移的关系

陈元文,钱学华

(重庆医科大学基础医学院解剖学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨人胰腺癌组织中血管内皮生长因子 C(VEGF－C)及其受体 VEGFR－3 的表达与淋巴管生成及淋巴道转移之间的关系。方法:用免疫组织化学技术检测了 VEGF－C 及 VEGFR－3 在胰腺癌的表达,免疫组织化学双染技术显示并计数了毛细淋巴管密度(LVD),分析比较了胰腺癌有淋巴结转移组和无淋巴结转移组 VEGF－C、VEGFR－3 表达和 LVD。结果:VEGF－C 阳性表达产物主要见于癌细胞胞浆,而 VEGFR－3 阳性表达产物主要位于癌周组织的淋巴管和微血管内皮细胞胞浆。有淋巴结转移组癌组织 VEGF－C、癌周组织 VEGFR－3 的表达率和 LVD 高于无淋巴结转移组,VEGF－C、VEGFR－3 的表达与 LVD 相关。结论:胰腺癌 VEGF－C 与 VEGFR－3 表达增高,具有促进胰腺癌的淋巴管增生的作用。VEGF－C、VEGFR－3 和 LVD 都与胰腺癌淋巴道转移有关,都可以作为检测胰腺癌有无淋巴结转移的重要指标,选择性阻断 VEGF－C 或 VEGFR－3 的作用,对控制胰腺癌的淋巴道转移可能是一个有效的选择。

【关键词】胰腺癌;VEGF－C;VEGFR－3;LVD;淋巴道转移

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－11－01

The relationship between the expression of VEGF－C and lymph angiogenesis in pancreatic carcinomas and lymphatic metastasis

CHEN Yuanwen, et al

(*Department of Anatomy, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine vascular endothelial growth factor C (VEGF－C) and its receptor VEGFR－3 expression in pancreatic carcinomas and the relationship of the expression of VEGF－C and VEGFR－3 with lymph angiogenesis and lymphatic metastasis. *Methods*: Specimens of pancreatic carcinoma were immunohistochemically stained for VEGF－C and VEGFR－3. Lymphatic vessels were displayed by immunohistochemical double staining. And lymphatic vessel density (LVD) were counted. The correlations among VEGF－C expression, VEGFR－3 expression and LVD in tumors with or without lymph node metastasis were statistically analyzed. *Results*: VEGF－C expression was observed in the cytoplasm of carcinoma cell, and VEGFR－3 expression was observed in the cytoplasm of endothelial cell of lymphatic and micro vessel. The VEGF－C expression rate, VEGFR－3 expression rate and LVD of tumors with lymph node metastasis were higher than those of tumors without lymph node metastasis. LVD correlated with the expression of VEGF－C and VEGFR－3. *Conclusion*: The high expressions of VEGF－C and VEGFR3 in pancreatic carcinomas suggest their involvement in lymph angiogenesis. VEGF－C, VEGFR－3 and LVD are associated with lymphatic metastasis and may besignificant prognostic factors for lymphatic metastasis in pancreatic carcinomas. This implies that it is an effective option to control lymphatic metastasis of pancreatic carcinomas to inhibit the effect of VEGF－C or VEGFR－3.

【Key words】Pancreatic carcinomas; VEGF－C; VEGFR－3; LVD; Lymphatic metastasis

淋巴道转移是胰腺癌转移的重要方式。肿瘤转移能力的强弱也与之诱生淋巴管有关。近年来,人们发现,血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C, VEGF－C)与其受体 VEGFR－3 (vascular endothelial growth factor receptor－3)相互作用,表现出特异性诱导淋巴管内皮细胞扩增,促进淋巴管生成的作用。因此,推测 VEGF－C 可能通过诱导淋巴管生成为肿瘤的转移提供一条重要的通道,促进肿瘤的淋巴道转移。对乳腺癌[1]、甲状腺癌[2]、胃癌[3]等的研究证实 VEGF－C 与肿瘤淋巴道转移关系密切。但 VEGF－C 在胰腺癌中的表达及与胰腺癌转移的关系尚不清楚。为此,我们研究了 VEGF－C 和 VEGFR－3 在胰腺癌组织的表达,

作者介绍:陈元文(1973－),男,讲师,硕士,
主要研究方向:应用解剖学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

并检测了胰腺组织的毛细淋巴管密度(lymphatic vessel density,LVD),分析了 VEGF－C、VEGFR－3 的表达对淋巴管生成的作用及与淋巴道转移的关系。

1 材料与方法

1.1 标本的收集

本实验收集 1990～2003 年存档手术切除胰腺癌(包含相应的癌周组织,距癌组织边缘 2cm 以内组织作为癌周组织)病理标本 37 例。所有病例术前未作化疗、放疗。标本均经 10%中性甲醛液固定,常规石蜡包埋,常规 HE 染色,病理确诊。其中有淋巴结转移 15 例,无淋巴结转移 22 例。切片厚 4～5μm。

1.2 主要试剂及试剂盒

兔抗人 VEGF－C 多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司);兔抗人 VEGFR－3 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗人第Ⅷ因子相关抗原多克隆抗体(北京中山生物技术有限公司);鼠抗人Ⅳ型胶原单克隆抗体(北京中山生物技术有限公司);免疫组化双染试剂盒(北京中山生物技术有限公司,Zymed 公司生产);即用型 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 实验方法

VEGF－C 与 VEGFR－3 的表达分别以 VEGF－C 多克隆抗体和 VEGFR－3 多克隆抗体为一抗,DAB 显色,用免疫组织化学技术 SABC 法分别检测;微血管与毛细淋巴管的显示与鉴别采用第Ⅷ因子相关抗原抗体和Ⅳ型胶原抗体作一抗,分别标记内皮细胞和内皮周围的基膜,并用双重染色,以 BCIP,AEC 分别对脉管内皮细胞和基膜进行显色,从而显示并区分毛细淋巴管和微血管。

1.4 结果判断标准

VEGF－C/VEGFR－3 的表达:表达阳性标准参照许良中[4]的报道。先将染色强度评分(a),无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;再按阳性细胞所占的百分比评分(b),阳性细胞比例 10%以下记作 0 分,10%－50%为 1 分,50%以上为 2 分。a＋b＜3 分计为阴性,≥3 分为阳性。

微血管与毛细淋巴管的鉴别:毛细淋巴管仅有一层上皮细胞(呈紫褐色),而毛细血管的上皮细胞周围还有一层基膜(呈红色)。凡染色呈内层红色外层黑色的双层结构,与周围的微血管、肿瘤细胞和结缔组织明显分开的内皮细胞或内皮细胞簇均视为单个微血管,但管腔直径大于 8 个红细胞直径者,不作为微血管。只有一层红色内皮样细胞,没有明显的基底膜及平滑肌细胞,管腔内未见红细胞,均确定为毛细淋巴管,部分染成红色的内皮细胞簇而未形成管腔结构不作为淋巴管计数。

毛细淋巴管的记数:参照 Weidner 等[5]报道的方法,先在低倍视野下(10×10)全面观察切片,选取癌周毛细淋巴管数量最丰富的区域,在 200 倍视野下记数 5 个视野毛细淋巴管数,取其平均值。

1.5 统计学分析

定性资料采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率检验。组间 MVD、LVD 均数定量资料比较采用独立样本的 t 检验。所有分析皆应用 SPSS 统计软件处理。

2 结 果

2.1 VEGF－C 与 VEGFR－3 的表达

VEGF－C 主要表达于癌细胞胞浆,胞膜也有不同程度表达,呈浅黄至棕黄色(图 1、2)。VEGFR－3 阳性表达主要存在于癌周组织淋巴管和微血管内皮细胞胞浆中,呈浅黄至棕黄色,细胞间质也有微弱表达(图 3),而癌组织却未见表达。癌组织中可见成簇的微血管,以边缘区最为密集,管腔不规则。淋巴管主要分布在癌周组织,管腔较大,数量多,肿瘤内部未见成形的淋巴管样结构(图 4)。

2.2 VEGF－C 与 VEGFR－3 的表达关系

全组 37 例标本中,癌组织 VEGF－C 表达阳性 24 例,癌周组织 VEGFR－3 表达阳性 21 例。24 例癌组织 VEGF－C 表达阳性病例,其相应的癌周组织 VEGFR－3 表达阳性 17 例;13 例癌组织 VEGF－C 表达阴性病例,相应的癌周组织 VEGFR－3 阳性 4 例(表 1)。经 Fisher's 精确检验:癌组织 VEGF－C 表达阳性组和阴性组,相应的癌周组织 VEGFR－3 的表达有显著性差异($P=0.036$)。

表 1 VEGF－C 与 VEGFR－3 的表达关系

VEGFR－3	VEGF－C		P 值
	阳性(24)	阴性(13)	
阳性	17	4	0.036
阴性	7	9	

Fisher's 精确检验,P 值＜0.05 有统计学意义。

表 2 胰腺癌 VEGF－C 的表达与 LVD 的关系

VEGF－C	例数(N)	LVD($\bar{x}\pm s$)	P 值
阳性	24	18.71±5.29	0.002
阴性	13	12.08±6.58	

独立样本 t 检验,P 值＜0.05 有统计学意义

表 3 胰腺癌 VEGFR－3 的表达与 LVD 的关系

VEGFR－3	例数(N)	LVD($\bar{x}\pm s$)	P 值
阳性	21	18.76±4.94	0.009
阴性	16	13.25±7.16	

独立样本 t 检验,P 值＜0.05 有统计学意义

维普资讯 http://www.cqvip.com

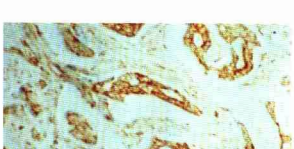


图 1 VEGF－C 在胰腺癌组织有明显表达

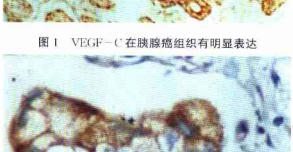


图 2 VEGF－C 主要表达于胰腺癌癌细胞胞浆



图 3 VEGFR－3 主要表达于癌周毛细淋巴管和微血管的内皮细胞胞浆

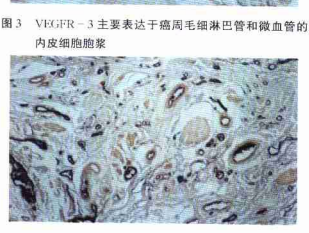


图 4 微血管(▲所示),呈内层紫褐色(为内皮细胞层,第Ⅷ因子相关抗原抗体标记,DCIP 显色)外层红色(为基膜,Ⅳ型胶原抗体标记,AEC 显色)的双层结构和毛细淋巴管(△所示),呈紫褐色的单▲层结构(为内皮细胞层,第Ⅷ因子相关抗原抗体标记,DCIP 显色)

2.3 VEGF－C 的表达与 LVD 的关系

VEGF－C 表达阳性组的 LVD 为 18.71±5.29,而 VEGF－C 表达阴性组的 LVD 为 12.08±6.58。经独立样本 t 检验,VEGF－C 表达阳性组 LVD 高于阴性组($P=0.002$),见表 2。

2.4 VEGFR－3 的表达与 LVD 的关系

VEGFR－3 表达阳性组的 LVD 为 18.76±4.94,而 VEGFR－3 表达阴性组,LVD 为 13.25±7.16。经独立样本 t 检验,VEGFR－3 表达阳性组的 LVD 高于 VEGF－C 表达阴性组($P=0.009$)。见表 3。

2.5 VEGF－C,VEGFR－3 表达及 LVD 与淋巴结转移的关系

15 例有淋巴结转移病例,癌组织 VEGF－C 及癌周组织 VEGFR－3 的表达率高于无淋巴结转移病例,有淋巴结转移病例 LVD 也高于无淋巴结转移病例,见表 4。

表 4 VEGF－C,VEGFR－3 及 LVD 与淋巴结转移关系

	淋巴结转移		P 值
	阳性(15)	阴性(22)	
VEGF－C	13	11	0.035
VEGFR－3	12	9	0.041
LVD($\bar{x}\pm s$)	20.27±5.12	13.73±6.11	0.002

卡方检验,独立样本 t 检验,P 值<0.05 有统计学意义

3 讨 论

肿瘤淋巴管生成主要发生在癌周组织,这一过程是由 VEGF－C 和 VEGFR－3 共同作用完成的。VEGF－C 是血管内皮生长因子家族(VEGFs)的新成员,在人体正常组织主要表达于心脏、血小板、骨骼肌、卵巢及小肠,具有 VEGFs 的一些共性,通过与细胞表面的受体 VEGFR－2、VEGFR－3 结合而分别介导血管和淋巴管生成。但 VEGF－C 对 VEGFR－3 的亲和力更强,因此体内低浓度的 VEGF－C 主要与 VEGFR－3 结合介导淋巴管。另外,VEGF－C 还可能是肿瘤细胞自分泌的一种肿瘤细胞活性调节因子[6]。VEGFR－3,又称 Flt－4,是受体型酪氨酸蛋白激酶家族成员,在胚胎期表达于所有胚胎脉管内皮,但在成年人组织中表达仅限于淋巴管内皮。VEGFR－3 与 VEGF－C 结合后,可诱导细胞内酪氨酸残基自动磷酸化[7],启动表达有 VEGFR－3 的细胞扩增、迁移及生长。VEGF－C 和 VEGFR－3 对淋巴管生成的调节作用是相互依赖的,阻断两者中的任何一方都会影响淋巴管生成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验观察到 VEGF－C 和 VEGFR－3 分别表达于癌组织和癌周组织淋巴管内皮细胞，由于"配体－受体"，因此 VEGF－C 可能作为一种趋化因子，引导表达有 VEGF－C 的癌细胞向表达有 VEGFR－3 的淋巴管内皮细胞移动，促进淋巴道转移。在癌组织 VEGF－C 表达阳性组，相应癌周组织 VEGFR－3 表达率和 LVD 均高于阴性组，癌周组织 VEGFR－3 表达阳性组的 LVD 也高于相应阴性组，提示 VEGFR－3 和 VEGF－C 都有促胰腺癌淋巴管增生作用，且 VEGF－C 可能具有上调 VEGFR－3 表达的作用。有淋巴结转移组的癌组织 VEGF－C、癌周组织 VEGFR－3 表达率和 LVD 均高于无淋巴结转移组，提示三者都与胰腺癌淋巴道转移密切相关，因此都可作为检测胰腺癌有无淋巴结转移的重要指标。对判断胰腺癌有无转移及早诊断、早治疗有重要意义。

有实验[8]发现随着移植瘤的生长，癌周淋巴管不断扩张，管壁结构出现缺损，肿瘤细胞主要通过这些管壁缺损和正常管壁开放间隙进入管腔。因此 VEGF－C 和 VEGFR－3 的相互作用，不仅诱导毛细淋巴管生成，引起毛细淋巴管数量的改变，而且通过诱导淋巴管内皮细胞连接的开放而致结构改变，再加上癌组织对淋巴管内皮细胞的破坏溶解作用，为癌细胞进入淋巴管提供了更加便利的通道。

长期以来，缺乏一种有效的方法将微血管和毛细淋巴管两者区分开来。常用的以 CD31 或Ⅷ因子抗体免疫组化检测微血管技术，只能显示脉管内皮细胞，所显示出来的所谓"微血管"，实际上还包含有毛细淋巴管。VEGFR－3 被认为是淋巴管的特异性调节因子，可作为淋巴管内皮细胞的特异性标记物，但在肿瘤组织中还可表达于毛细血管上皮细胞，也不能用来鉴别肿瘤的淋巴管和微血管。虽然，用 podoplanin 显示淋巴管效果不错，但国内订购较困难。同毛细血管相比，毛细淋巴管缺乏完整基膜，本实验根据这一特点，用第Ⅷ因子相关抗原抗体、Ⅳ型胶原抗体分别标记脉管内皮细胞和基膜，并以 BCIP，AEC 对脉管内皮细胞和基膜分别显色，较好地鉴别了二者。肿瘤内是否有完整的淋巴管一直存在争论，近年由于显色技术的提高，发现肿瘤内不仅存在淋巴管，而且即使在瘤内高组织压下尚能增生[9]。我们收集的标本是近几年的存档标本，无法用特异性更高的 5'－单核苷酸酶－碱性磷酸酶双重染色显示，虽然未见到肿瘤内有淋巴管，但并不能排除淋巴管的存在。我们实验的意义是比较癌周组织淋巴管密度，因此并不影响实验结果。

根据实验结果，我们推测 VEGF－C 促进胰腺癌淋巴道转移机制是：胰腺癌癌细胞分泌的 VEGF－C，作为促淋巴管增生的始动因素，上调癌周组织淋巴管内皮细胞膜上 VEGFR－3 的表达。二者相互作用，诱导淋巴管生成，管壁结构通透性增加，为癌细胞的进入提供便利通道；VEGF－C 还作为趋化因子，引导表达有 VEGF－C 的癌细胞向表达有 VEGFR－3 的淋巴管内皮细胞移动，促进癌细胞粘附并进入毛细淋巴管，促进胰腺癌淋巴道转移。因此，选择性阻断 VEGF－C 或 VEGFR－3 的作用，对控制胰腺癌的淋巴道转移可能是一个有效的选择。

参 考 文 献

[1] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor－C in breast carcinoma with long－term follow－up[J]. Mod－Pathol, 2003; 16(4): 309－314.

[2] Hung CJ, Ginzinger DG, Zarnegar R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor－C in benign and malignant thyroid tumors[J]. J－Clin－Endocrinol－Metab, 2003; 88(8): 3694－3699.

[3] Kamei S, Kono K, Amemiya H, et al. Evaluation of VEGF and VEGF－C expression in gastric cancer cells producing alpha－fetoprotein[J]. J－Gastroenterol, 2003; 38(6): 540－547.

[4] 许良中，杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志，1996; 6: 229－231.

[5] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am－J－Pathol, 1995; 147(1): 9－19.

[6] Lalla RV, Boisoneau DS, Spiro JD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Arch－Otolaryngol－Head－Neck－Surg, 2003; 129(8): 882－888.

[7] Hughes DC. Alternative splicing of the human VEGFGR－3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus[J]. J Mol Evol, 2001; 53(2): 77－79.

[8] 宣 鸣，温玉明，王昌美，等. U14 细胞接种昆明小鼠舌体后癌周淋巴管的改变及其与淋巴道转移的研究[J]. 华西口腔医学杂志，2000; 18(1): 5－8.

[9] Beasley N, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer[J]. Cancer Res, 2002; 62: 1315－1320.