DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.014
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0977-04

论著

血管内皮生长因子C、D在上皮性卵巢癌的表达及与腹股沟和腹膜后淋巴结转移的关系

王玉珍,梁志清,龙 玲,王 丹 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨血管内皮生长因子C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)和血管内皮生长因子D(vascular endothelial growth factor D, VEGF-D)在上皮性卵巢癌组织中的表达及其与腹股沟和腹膜后淋巴结转移之间的关系。方法 采用免疫组化染色,光镜观察结果并确定VEGF-C和VEGF-D在良性、交界性及恶性上皮性卵巢肿瘤组织中的表达,并结合临床病理资料进行分析。结果 在良性、交界性及恶性上皮性卵巢肿瘤组织中皆有VEGF-C和VEGF-D的表达,但卵巢癌组织中的表达明显高于良性及交界性肿瘤,其表达强度与腹膜转移、腹股沟和腹膜后淋巴结转移及临床分期密切相关,与远处转移、病理类型、病理分级、年龄等无关。结论 VEGF-C和VEGF-D在卵巢癌的表达上调有利于淋巴结转移的发生,此过程可能和肿瘤的淋巴管生成有关。

关键词:血管内皮生长因子C;血管内皮生长因子D;免疫组化;卵巢癌;淋巴管生成;淋巴道转移
中图法分类号:R737.31 文献标识码:A

Correlation between the VEGF-C and VEGF-D expressions and the retroperitoneal and inguinal lymph node metastasis in human epithelial ovarian carcinoma

WANG Yu-zhen, LIANG Zhi-qing, LONG Ling, WANG Dan (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between the expressions of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) and the lymph node metastasis of groin and retroperitoneum in human epithelial ovarian carcinoma. **Methods** The expressions of VEGF-C and VEGF-D in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors were detected by immunohistochemistry and light microscopy. **Results** The expressions of VEGF-C and VEGF-D were found in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian tumors. The expressions of VEGF-C and VEGF-D in ovarian carcinomas were significantly higher than those in benign and borderline ovarian tumors. The expression levels of VEGF-C and VEGF-D were correlated with peritoneal metastasis, lymph node metastasis of groin and retroperitoneum, and clinical stage, but not with distant metastasis, histology type, histological grade, and age. **Conclusion** Up-regulation of VEGF-C and VEGF-D in epithelial ovarian carcinoma is advantageous to lymph node metastasis. This process may probably be correlated with lymphangiogenesis in tumors.

Key words: vascular endothelial growth factor C; vascular endothelial growth factor D; immunohistochemistry; ovarian carcinoma; lymphangiogenesis; lymphatic metastasis

淋巴转移是多数上皮性癌最常见的扩散途径,淋巴结受累与否是上皮性癌分期和直接针对引流区淋巴结治疗的基础,也是其重要预后指标。在发生淋巴结转移的肿瘤基质中,常能发现淋巴管的增生和扩张,但其分子机制至今未完全阐明。近年来,相继发现了一些特异作用于淋巴管内皮的生长因子及其受体,为研究肿瘤的淋巴转移开辟了新途径。血管内皮生长因子C/血管内皮生长因子D(vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor D, VEGF-C/VEGF-D)属于血管内皮生长因子/血小板源生长因子家族(VEGF/PDGF)家族成员,其共同的受体为VEGFR-2(KDR)和VEGFR-3(Flt-4),其中VEGFR-3为VEGF-C/VEGF-D的特异性受体,VEGF-C/VEGF-D与淋巴管内皮细胞表面VEGFR-3结合,介导淋巴管内皮细胞的趋

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371484)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371484)
作者简介:王玉珍(1970-),女,甘肃省景泰县人,硕士研究生,主治医师,主要从事卵巢肿瘤方面的研究,发表论文9篇。现在解放军第10医院妇产科。电话:(023)65398623
通信作者:梁志清,电话:(023)68754409
收稿日期:2003-08-26;修回日期:2004-03-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

化性、细胞增殖、分化和淋巴管的增生，是迄今公认的淋巴管生成因子。有关 VEGF-C/VEGF-D 在上皮性卵巢肿瘤组织中的表达及对淋巴管生成作用的研究很少。本研究采用免疫组化方法，检测了 VEGF-C/VEGF-D 在上皮卵巢癌组织的表达，并以它们在良性及交界性卵巢肿瘤中的表达做对照，探讨其与腹股沟及腹膜外淋巴结转移之间的关系，为进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本

收集 2000 年 2 月至 2003 年 5 月我院病理科上皮性卵巢肿瘤手术切除标本蜡块 87 例，连续切片，片厚 4～5 μm。上皮性卵巢癌 44 例，患者平均年龄 49 岁，其中浆液性囊腺癌 25 例，粘液性囊腺癌 6 例，子宫内膜样癌 7 例，透明细胞癌 2 例，未明确型 4 例。按 FIGO 分期标准，I 期和II期归入早期，共 10 例（其中I 期 9 例，II期 1 例），III期和IV期归入晚期，共 34 例（其中III期 30 例，IV期 4 例）。交界性卵巢肿瘤 11 例，患者平均年龄 51 岁，其中交界性浆液性囊腺瘤 7 例，交界性粘液性囊腺瘤 4 例。卵巢囊腺瘤 32 例，患者平均年龄 40 岁，其中浆液性囊腺瘤 18 例，粘液性囊腺瘤 14 例。所有患者术前均未行任何治疗。

1.2 免疫组织化学染色

参照 S-P kit 使用说明书进行，使用微波炉抗原热修复，3‰ triton×-100（PBS 稀释）以提高细胞膜通透性，各步骤间严格控制时间和温度，每次染色设置阳性和阴性对照，具体步骤从略。兔 VEGF-C 多抗（武汉博士德公司产品）工作浓度为 1∶100，兔 VEGF-D 多抗（Santa Cruz 产品）工作浓度为 1∶200。

1.3 结果判定标准

采用 AB 值法判定。A：按显色比例评分。显色细胞占实质细胞总数的 1/3 以下为 1 分，1/3～2/3 阳性显色细胞为 2 分，2/3 以上阳性显色细胞为 3 分。B：按切片中细胞显色评分。0 分为无着色，1 分浅黄色，2 分棕黄色，3 分棕褐色。AB 值法积分：阴性（－）：0 分；弱阳性（＋）：1～3 分；阳性（＋＋）：4～6 分；强阳性（＋＋＋）：大于 6 分。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 10.0 统计软件。等级计量资料用 Mann-Whitney U 检验及 Spearman 等级相关分析。计数资料用 χ^2 检验和校正 χ^2 检验。

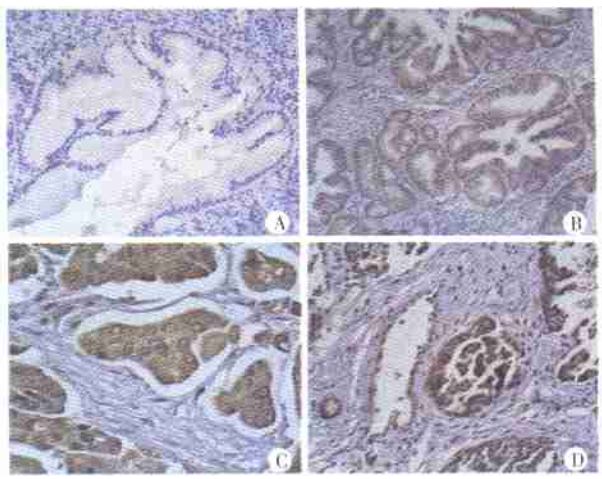
2 结果

2.1 VEGF-C、VEGF-D 的表达及分布形式

VEGF-C、VEGF-D 的阳性染色均为棕黄色，分布相似，主要位于肿瘤细胞的胞浆，为局灶性或弥散性分布。在强阳性染色的癌组织附近可见淋巴管内皮着色（图 1）。

2.2 VEGF-C、VEGF-D 在上皮性卵巢肿瘤中的表达（表 1）

由表 1 可看出，VEGF-C 和 VEGF-D 在上皮性卵巢癌多为＋和＋＋级阳性表达，少数为＋＋＋级阳性表达和阴性表达，在交界性和良性卵巢肿瘤则多阴性和＋级阳性表达，无＋＋＋级阳性表达，其中良性肿瘤中无＋＋级阳性表达。VEGF-C 和 VEGF-D 在卵巢癌组织中的表达明显高于在交界性和良性肿瘤中的表达，均具有显著性差异（Mann-Whitney U 检验，分别为 $P=0.043$ 和 $P=0.000$ 及 $P=0.023$ 和 $P=0.000$），VEGF-C 和 VEGF-D 在交界性和良性肿瘤中的表达相似，无显著性差异（Mann-Whitney U 检验，分别为 $P=0.091$ 及 $P=0.399$）。VEGF-C 和 VEGF-D 在恶性、交界性及良性卵巢肿瘤的表达呈正相关（Spearman 等级相关分析，分别为 $r=0.674$，$P<0.01$；$r=0.683$，$P<0.05$；$r=0.703$，$P<0.01$）。



A: Positive expression of VEGF-D in the mucinous cystadenoma (S-P× 200); B: Weak positive expression of VEGF-C in the borderline serous cystadenoma (S-P× 200); C: Positive expression of VEGF-C in the ovarian carcinoma (S-P × 400); D: Strong positive expression of VEGF-D in the ovarian carcinoma: a dilated lymphatic vessel with VEGF-D positive staining of endothelial cells(S-P× 200)

图 1 VEGF-C 和 VEGF-D 在上皮性卵巢肿瘤组织中的表达

Fig 1 Expressions of VEGF-C and VEGF-D in the epithelial ovarian tumor tissues

表 1 VEGF-C、VEGF-D 在上皮性卵巢肿瘤的表达

Tab 1 Expressions of VEGF-C and VEGF-D in epithelial ovarian tumors

Tissue	*n*	VEGF-C detection				VEGF-D detection			
		－	＋	＋＋	＋＋＋	－	＋	＋＋	＋＋＋
Carcinoma	44	8	14	15	7	9	15	14	6
Borderline tumor	11	4	5	2	0	6	3	2	0
Benign tumor	32	19	13	0	0	20	12	0	0

2.3 VEGF-C、VEGF-D 在上皮性卵巢癌中的表达与临床病理指标的关系（表 2）

由表 2 可看出，在各临床病理学指标中，VEGF-C 和 VEGF-D 在有淋巴结转移组的阳性表达明显高于无淋巴结转移组，二者有显著性差异（$P<0.05$）；在有腹膜转移组的表达高于和无腹膜转移组，二者有显著性差异（$P<0.05$ 及 $P<0.01$），并与临床分期显著相关（$P<0.05$）。VEGF-C 和 VEGF-D 的表达与患者年龄、远处转移、病理类型及病理分级无关。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　VEGF-C、VEGF-D 在上皮性卵巢癌中的阳性表达与临床病理指标的关系

Tab 2　Positive expressions of VEGF-C and VEGF-D in epithelial ovarian carcinomas and the correlation with clinical pathological indexes

Factor	*n*	VEGF-C(%)	*P*	VEGF-D(%)	*P*
Peritoneal metastasis out the pelvis					
＋	19	26(92.9)	0.035	27(96.4)	0.001
－	25	10(62.5)		8(50.0)	
Lymph node metastasis					
＋	17	17(100.0)	0.038	17(100.0)	0.022
－	27	19(70.4)		18(66.7)	
Distant metastasis					
＋	4	3(75.0)	1.000	3(75.0)	1.000
－	40	33(82.3)		32(80.0)	
Age (year)					
≤50	23	18 (78.3)	0.803	17 (73.9)	0.552
＞50	21	18(85.7)		18(85.7)	
Histological type					
Serous	25	21(84.0)	0.971	21(84.0)	0.643
Nonserous	19	15(78.9)		14(73.7)	
Histological grade					
Well	9	7(77.8)	0.682	6(66.7)	0.419
Moderate	18	14(77.8)		14(77.8)	
Poor	17	15(88.2)		15(88.2)	
Clinical stage					
Earlier period (Ⅰ＋Ⅱ)	10	5(50.0)	0.012	5(50.0)	0.029
Late period (Ⅲ＋Ⅳ)	34	31(91.1)		30(88.2)	

3　讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要生物学特征, 也是肿瘤患者致死的主要原因。在肿瘤的侵袭转移中, 脉管系统发挥着重要作用。对肿瘤血管生成的研究已比较深入, 一些抗新生血管的疗法也已应运而生。近年来, 随着对 VEGF-C、VEGF-D 及其受体 VEGFR-3 研究的深入, 以及淋巴管内皮细胞特异性标志物淋巴管内皮细胞透明质酸受体(LYVE)-1、转录因子 Prox1 及细胞表面蛋白 podolanin 等的发现, 肿瘤淋巴管生成的研究目前已成为肿瘤研究的又一热点。

VEGF-C 和 VEGF-D 是促进肿瘤淋巴管生成的重要因子。人类 VEGF-C 基因定位于染色体 4q34, 分子量 21×10^3。Joukov 等[1] 利用受体亲合色谱法从 PC-3 前列腺癌细胞中首次分离提纯出 VEGF-C cDNA。VEGF-D 也是 VEGF 家族新成员, 又称 c-fos 诱导的生长因子, 在成人心、肺、骨骼肌、肠道中有表达, 与 VEGF-C 有 48%的序列相同, 二者具有相似的的 N-端和 C-端扩展区, 这也是它们区别于 VEGF 家族其他成员而具有相同的受体和相似的生物学特性的重要分子机制[2]。VEGF-C 和 VEGF-D 与 VEGFR-2 结合, 具有促血管生成效应。近年来, 人们更多地关注到 VEGF-C 和 VEGF-D 促淋巴管生成效应及在肿瘤淋巴结转移中的作用。用 LYVE-1 多克隆抗体标记淋巴管内皮, 对转基因动物模型和异种肿瘤种植模型的研究表明, VEGF-C/VEGF-D 的过表达能诱导肿瘤的淋巴管生成, 与淋巴浸润及淋巴结转移有关[3~5]。

在人类原发性甲状腺癌、前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤, 也存在 VEGF-C/VEGF-D 的表达或表达上调, 并与区域淋巴结转移密切相关[6~8]。

本研究结果显示, VEGF-C 与 VEGF-D 在上皮性卵巢癌中的表达显著高于交界性及良性卵巢肿瘤, 且与腹股沟和腹膜后淋巴结转移明显相关, 推测卵巢癌可能存在有淋巴管的生成, 新生微淋巴管促进了肿瘤经淋巴道的转移。VEGF-C 与 VEGF-D 与主要表达于淋巴管内皮细胞的 VEGFR-3 结合, 诱导 VEGFR-3 酪氨酸激酶磷酸化, 导致淋巴管生成、增生或扩张。VEGF-C、VEGF-D 有协同作用, 它们在上皮性卵巢癌组织表达的相关性提示其表达可能受同一基因的调控。另外, 在强阳性染色癌巢附近发现有 VEGF-C 和 VEGF-D 阳性的淋巴管, 并呈扩张状。根据 Salven 等[9] 对头颈癌原位杂交显示仅在肿瘤细胞发现 VEGF-C mRNA 的表达, 而淋巴管内皮细胞未见表达, 因此认为在淋巴管内皮表达的是与其受体 VEGFR-3 结合的 VEGF-C 和 VEGF-D, 而不是由淋巴管内皮细胞所分泌的, 此乃 VEGF-C 与 VEGF-D 的旁分泌作用。受 VEGF-C 与 VEGF-D 的作用, 肿瘤周围这些增生或扩张的淋巴管, 为癌细胞的淋巴转移增加了机会。

研究还显示, VEGF-C、VEGF-D 与上皮性卵巢癌的腹膜转移及临床分期有关, 认为其原因仍然与 VEGF-C、VEGF-D 介导的淋巴管生成有关。卵巢癌的淋巴结转移与腹膜种植转移之间有密切关系, 其淋巴引流扩散与腹腔种植扩散几乎同时发生, 是卵巢癌患者死亡的主要原因, 淋巴结转移与临床分期有直接关系。

综上所述, 本研究对探讨上皮性卵巢癌的淋巴道转移机制有重要价值, 并有望作为检测卵巢癌淋巴结转移及判断预后的指标之一。对 VEGF-C、VEGF-D/VEGFR-3 信号通路的阻滞研究可望成为抗肿瘤淋巴道转移治疗新的有效手段。

参考文献:

[1] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *et al*. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4(VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases[J]. EMBO J, 1996, 15(2): 290—298.

[2] Achen M G, Jeltsch M, Kukk E, *et al*. Vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(2): 548—553.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[3] Mandriota S J, Jussila L, Jeltsch M, *et al*. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis[J]. EMBO J, 2001, 20(4): 672—682.

[4] Skobe M, Hawighorst T, Jackson D G, *et al*. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192—198.

[5] Stacker S A, Caesar C, Baldwin M E, *et al*. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 186—191.

[6] Bunone G, Vigneri P, Mariani L, *et al*. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features[J]. Am J Pathol, 1999, 155(6): 1967—1976.

[7] Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, *et al*. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis[J]. Br J Cancer, 1999, 80(1—2): 309—313.

[8] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, *et al*. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2): 716—721.

[9] Salven P, Lymboussaki A, Heikkila, *et al*. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors[J]. Am J Pathol, 1998, 153(1): 103—108.

（编辑 刘洪娥）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)11-0980-01

6例急性四乙基铅中毒临床表现分析

Clinical analysis of acute tetraethyl lead in 6 cases

成戎川，李黔宁，刘 勇，周竹娟，龚自力，何 涛 （第三军医大学新桥医院神经内科，重庆 400037）

四乙基铅是无色透明易挥发性液体，曾经作为汽油抗爆剂广泛使用，因其毒性作用现已较少使用。但现国产90#以下汽油中仍含有该物质。某些特殊机械加工过程及工业废物处理不当，均有可能导致人员中毒[1]。现报告6例急性四乙基铅中毒。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本组患者均在同一建筑工地深井作业时接触工业废弃物后中毒，经重庆市疾病控制中心鉴定，现场挥发气体主要为四乙基铅。现场有26名作业工人，有20人仅出现球结膜、呼吸道粘膜等轻度刺激症状经观察症状消失。其余6名因接触毒物时间长中毒较重于2003年9月至2004年2月在我院住院，均为男性，年龄32～47岁。轻度中毒4例，重度中毒2例。

1.2 病程特点

症状表现呈阶段性特征。根据其临床症状发展可分为三个阶段：第一阶段：嗅到芳香气体后数小时内出现球结合膜、呼吸道粘膜刺激症状。如球结膜充血、畏光、眼痛、流泪、流涕等。未住院的20名患者上述症状持续数小时到数天后消失。第二阶段：1～2 d内出现神经衰弱症候群为主的症状。如心慌、胸闷、气促、恶心、四肢无力、睡眠差，多梦，记忆力减退，出汗多、唾液多、食欲不振等非特异性症状。4例轻度中毒患者第二阶段症状持续3～4个月经非特异性排毒及对症处理后，症状消失。第三阶段：1～2周潜伏期后出现精神运动性兴奋症状，如谵妄、言语增多、躁动不安、思维联想障碍、肌肉强直阵挛，并伴随幻视、幻听、被害妄想症状。严重者可导致多器官衰竭死亡。1例重度中毒患者于第5天症状加重，第15天死亡；另1例于第15天症状明显加重，经促进排毒及对症治疗，症状于5～6个月逐渐恢复。

1.3 实验室检查

以尿铅、肌酶谱异常增高和脑电图异常为主要表现。6例患者尿铅均明显升高：1.16～9.18 μmol/L（正常：＜0.34 μmol/L）。驱铅后尿铅为2.13～4.35 μmol/L。肌酶谱异常4例重症患者显著升高：CPK：206～21200 IU/L，LDH：303～1465 IU/L，CK-MB：27～279 IU/L。肌酸激酶同工酶电泳分析：CKBB：3.5%，CKMB：3.5%，CKMM：92%，提示脑、心、骨骼肌等器官损害。血红蛋白减少3例91～119 g/L。肝功能异常3例：ALT：51～234 IU/L，AST：52～706 IU/L。肾功能异常2例：UREA：8.96～14.34 mmol/L。心电图异常6例：表现为窦性心动过缓，心率48～58次/min。脑电图异常6例：轻度异常3例，中-重度异常3例。以低波幅快活动为主，α活动减少或消失，调节调幅差。可出现广泛性低幅不规则θ波5～7次/s活动，中等量低幅不规则δ波2～3次/s。少量中高幅尖波。电压20 μV以下低平波为主；视觉诱发试验见α抑制不完全和过度呼吸诱发θ波增多。其它辅助检查：骨髓穿刺检查示增生性骨髓象，脑脊液、头颅CT无明显异常。

2 讨论

急性四乙基铅中毒最严重为中枢神经系统如丘脑-丘脑下部、小脑、前额皮层及海马损害。四乙基铅在肝微粒体转化成三乙基铅，其毒性比四乙基铅高100倍，与脑组织有较高的亲和力。三乙基铅进入细胞后可与三羧酸循环中的硫辛酰脱氢酶的巯基结合，抑制其功能，使脑内葡萄糖和丙酮酸氧化代谢受阻，脑细胞能量缺乏，引起脑组织缺氧；从而导致弥漫性脑损伤，脑组织出现水肿、充血、神经细胞肿胀、萎缩、空泡变[2]。四

（下转983页）

作者简介：成戎川(1973—)，女，四川省合江县人，硕士研究生，医师，主要从事神经内科临床诊治方面的研究。电话：(023)66594559

收稿日期：2004-02-05；修回日期：2004-04-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net