DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.028
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1580 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)17-1580-04

VEGFR-3在食管鳞癌中的表达及与新生淋巴管形成的关系

马惠文,梁 后杰 (第三军医大学西南医院肿瘤科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨VEGFR-3在食管鳞癌中的表达及其与新生淋巴管形成的关系。方法 对73例食管鳞癌手术标本采用RT-PCR和免疫组化方法检测VEGFR-3的表达,采用免疫组化方法观察淋巴管生成,并探讨VEGFR-3与淋巴管形成的关系。结果 VEGFR-3 mRNA与淋巴结转移密切相关,VEGFR-3阳性管腔计数也与淋巴结转移密切相关($P<0.05$)。结论 VEGFR-3与新生淋巴管的形成有相关性。

关键词:VEGF-C;VEGFR-3;淋巴生成
中图法分类号:R392.3;R730.2;R735.1 文献标识码:A

Relationship between expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 and lymphangiogenesis in esophageal carcinoma

MA Hui-wen, LIANG Hou-jie (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) and lymphangiogenesis in esophageal carcinoma. Methods VEGFR-3 expression in the esophageal carcinoma tissues from 73 cases was detected by RT-PCR and immunobistochemical method. and the relationship between VEGFR-3 and lymphangiogenesis was analyzed. Results There was a statistically positive correlation between VEGFR-3 mRNA expression and lymph node metastasis in primary tumors ($P<0.05$). The number of VEGFR-3-positive lymphatic vessels in the tumor was also closely related to the lymph node metastasis of esophageal carcinoma. Conclusion There is a close relationship between VEGFR-3 and lymphangiogenesis in esophageal carcinoma.

Key words: VEGF-C; VEGFR-3; lymphangiogenesis

血管内皮生长因子受体3(vascular endothlial growth factor 3, VEGFR-3),在早期胚胎血管中广泛表达,但在胚胎后期和出生后仅表达在淋巴管内皮细胞[1,2]。由VEGF-C引起的VEGFR-3的激活可以诱导淋巴管内皮细胞的扩增,而VEGF-C目前被认为是引起淋巴管生成的主要因子之一。目前食管癌的发病机制不完全清楚,部分患者在中晚期才被发现,由于淋巴转移,治疗效果不佳。食管癌早期主要通过淋巴转移,晚期可经血行转移。肿瘤的淋巴转移是影响许多实体肿瘤预后的一个重要因素。本研究应用RT-PCR和免疫组化法检测VEGFR-3在食道鳞癌中的表达,探讨其表达的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

西南医院和新桥医院2003年3—10月经手术治疗的食管鳞癌患者73例,其中男性69例(94.5%),女性4例(5.5%),年龄最大者84岁,最小者43岁,按照UICC(1997)分期标准:Ⅰ期14例,Ⅱ期45例,Ⅲ期14例。肿瘤组织在原发灶取材,避开坏死、炎症区域;癌旁组织取自肿块旁2.0~3.0 cm组织。标本取出后锡箔纸包装并立即置液氮保存备用。

1.2 RT-PCR半定量检测VEGFR-3 mRNA表达

采用一步法分别提取癌组织和癌旁组织的总RNA,并用紫外分光光度计行RNA浓度及纯度测定。用美国Sigma公司的二步法RT-PCR试剂盒对提取的组织总RNA进行扩增,取4 μg总RNA与1 μl Oligo dT 75 ℃孵育10 min,迅速置于冰上5 min,再将RNA模版行逆转录(42 ℃,1 h),cDNA模版95 ℃孵育5 min后加入*Taq*酶再进行扩增,扩增条件为94 ℃ 40 s,49 ℃ 40 s,72 ℃ 40 s,共35个循环后,72 ℃延长10 min,保存在4 ℃环境中。扩增产物行1.0%琼脂糖凝胶电泳分析并GS300扫描吸光度仪进行半定量分析。VEGFR-3引物序列:5′-CTGACACGCTCTTGGTCAAG,5′-CATAGAGCTCGTTGCCTGTG,扩增长度为263 bp;β-actin引物序列:5′-TTGAAGGTAGTTTCGTGGAT,5′-GAAAATCTGGCACCACACCTT,扩增长度为592 bp。

1.3 免疫组化

兔抗人Flt-4单克隆抗体购自武汉博士德公司,产品编号分别为BA0488,工作浓度为1∶200。免疫组化试剂盒为北京中

作者简介:马惠文(1973—),女,安徽省蚌埠市人,硕士研究生,医师,主要从事食管鳞癌中VEGF-C/VEGFR-3的表达及其与淋巴管转移的关系方面的研究。电话:(023)66702595

收稿日期:2004-03-19;修回日期:2004-05-27

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

山公司 S-P 9003。应用 EnVision™法，常规石蜡切片共 4 张，除一张为 HE 常规染色，其余分别是以 PBS 代替抗体作为阴性对照、VEGFR-3 作为一抗和 Podoplanin 标记淋巴内皮细胞，每张制成 3～4 μm；依次二甲苯脱蜡，梯度乙醇水化；切片置于枸橼酸缓冲液（pH 7.1～7.2），微波法（94 ℃）修复抗原 10 min，自然冷却；Tris 缓冲液（PBS）冲洗 3 次；3% 过氧化氢 37 ℃孵育 10 min，蒸馏水和 PBS 顺次冲洗；将切片置入湿盒中，依次滴入封闭液和一抗（VEGFR-3 抗体），37 ℃孵育 3 h，PBS 缓冲液冲洗切片 3 次，每次 3 min；再依次滴入生物素化二抗工作液（IgG/Bio）和生物素标记链霉素卵蛋白素工作液（S-A/HRP），37 ℃孵育 15 min；0.06% DAB-0.03% H_2O_2 室温显微镜下控制显色 2～10 min；水洗，苏木素对比染色，常规脱水，透明，封固。

1.4　淋巴管计数及染色评估方法

VEGFR-3 和 Podoplanin 免疫染色阳性物质呈棕黄色，正常染色主要定位于细胞浆。根据文献[3]将染色记为 0～3 分。阳性细胞未染色为 0 分，染成淡黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，深棕黄色为 3 分。VEGFR-3 和 Podoplanin 染色棕黄色的 4 个内皮细胞或内皮细胞簇为一个淋巴管计数，每例首先在低倍镜下选择淋巴管密度最高的区域，然后在 200 倍光镜下随机计数 5 个视野内淋巴管数，再求其平均值。

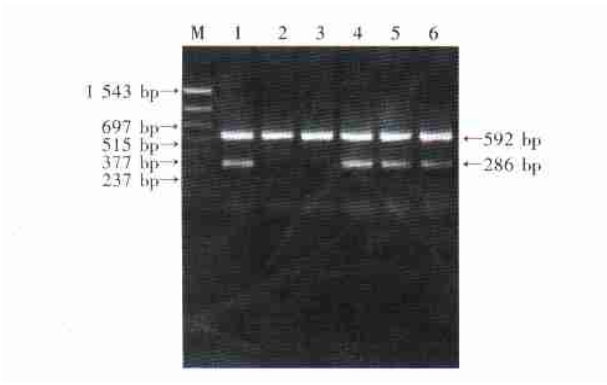
1.5　统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件计量资料数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，两样本均数 t 检验，计数资料 χ^2 检验。

2　结果

2.1　VEGFR-3 mRNA 在食管癌及其癌旁组织中的表达

用 RT-PCR 检测 73 例食管癌组织及其癌旁组织的 mRNA，发现 VEGFR-3 mRNA 阳性 37 例，VEGFR-3 mRNA 阴性 36 例（图 1）。



M: Standard of molecular weight; 1, 4, 5, 6: Tumor samples with an amplified product of VEGFR-3 mRNA; 2, 3: Samples of adjacent tissues with an amplified product of VEGFR-3 mRNA

图 1　RT-PCR 检测 VEGFR-3 mRNA 的表达结果

Fig 1　VEGFR-3 expression detected by RT-PCR

2.2　VEGFR-3 mRNA 的表达与临床分期的关系

在 73 例食管癌组织中 VEGFR-3 mRNA 的表达与肿瘤的分化程度无显著性差异（$P>0.05$），但与肿瘤的临床分期有显著性差异（$P<0.05$）（表 1）。

表 1　VEGFR-3 mRNA 在 73 例食管癌组织中的表达与临床分期的关系

Tab 1　Relationship between VEGFR-3 mRNA expression in esophageal carcinoma and clinical grades

Group	n	Expression of VEGFR-3 mRNA		χ^2	P
		+	−		
Grading					
Grade Ⅰ	13	7	6		
Grade Ⅱ	36	21	15		
Grade Ⅲ	24	9	15	2.564	>0.05
Clinical stage					
Stage Ⅰ	14	1	13		
Stage Ⅱ	45	25	20		
Stage Ⅲ	14	11	3	15.402	<0.05

2.3　VEGFR-3 mRNA 的表达与淋巴结转移的关系

在 73 例食管癌组织中 VEGFR-3 mRNA 的表达与肿瘤的淋巴结转移有显著性差异（$P>0.05$），在淋巴结转移阳性的食管癌 57 例中 VEGFR-3 mRNA 表达阳性的有 47 例，但在淋巴结转移阴性的食管癌 16 例中 VEGFR-3 mRNA 表达阳性仅有 3 例（$\chi^2=9.267$，$P<0.05$）。

2.4　VEGFR-3 蛋白在食管癌组织中的表达

标本连续切片，一张行 HE 染色，一张行 Podoplanin 免疫组织化学染色，由此确定淋巴管，另外 1 张行 VEGFR-3 免疫组织化学染色。结果显示 VEGFR-3 与 Podoplanin 染色一致，在 73 例食管鳞癌组织中，VEGFR-3 在粘膜层和粘膜下层中淋巴管管腔的内皮细胞胞浆中表达（图 2、3），淋巴管内皮细胞呈梭形，细胞核呈椭圆形，位于细胞中央，由垂直切面看，细胞很薄，细胞核突向管腔。癌组织中 VEGFR-3 阳性的管腔为新生的淋巴管。在扩张的 VEGFR-3 呈阳性的淋巴管腔中可发现肿瘤栓子。×200 光镜下计数：癌组织中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔是（4.67±5.91）个/视野，癌旁组织中 VEGFR-3 阳性的淋巴管腔是（2.44±1.59）个/视野，存在显著性差异（$P<0.01$）。VEGF-C mRNA 阳性的肿瘤组织中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔为（6.84±5.98）个/视野，而在 VEGF-C mRNA 阴性的肿瘤组织中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔的表达率为（2.15±1.97）个/视野，存在显著性差异（$t=4.5727$，$P<0.01$）。

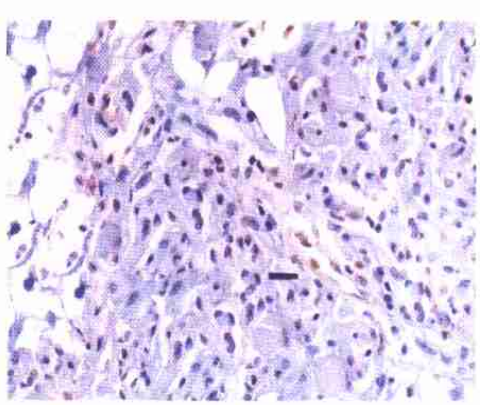
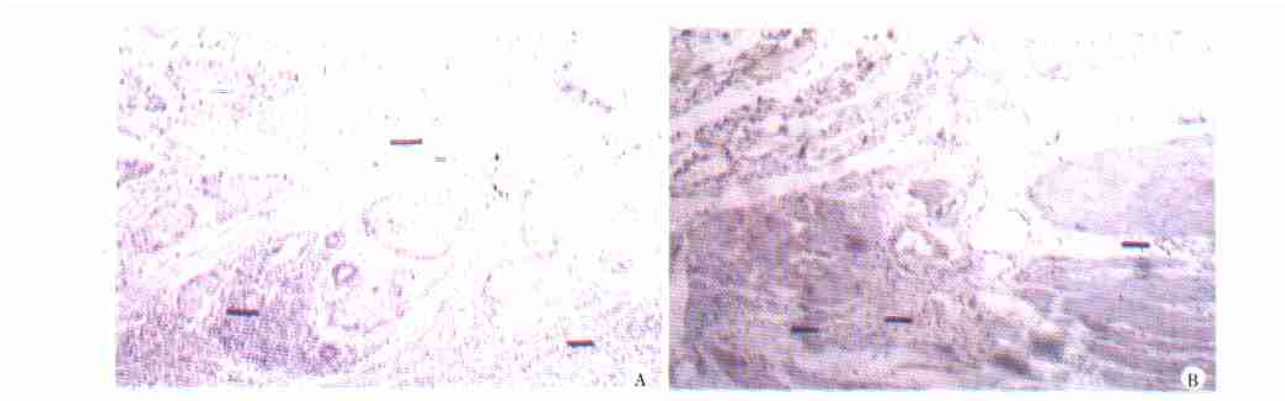


图 2　食管鳞癌组织中 VEGFR-3 在淋巴管内皮细胞胞浆中表达（S-P× 200）

Fig 2　VEGFR-3 protein expression in cytoplasm of esophageal carcinoma tissues（S-P× 200）

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



A: VEGFR-3-positive lymphatic vessels in esophageal carcinoma; B: VEGFR-3-positive lymphatic vessels in adjacent tissues

图 3 VEGFR-3 阳性淋巴管的表达 (S-P× 100)

Fig 3 VEGFR-3-positive lymphatic vessels (S-P× 100)

2.5 VEGFR-3 蛋白在食管癌组织中的表达与淋巴结转移的关系

在淋巴结转移阳性的 57 例标本中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔计数为(5.66±5.67)(个/视野),在淋巴结转移阴性的 16 例标本中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔计数为(2.89±1.96)(个/视野),存在显著性差异(t= 3.089 0, P< 0.05)。

3 讨论

VEGFR-3 是 VEGF-C 的两个受体之一,VEGF-C 目前被认为是引起淋巴生成的主要因子之一,VEGF-C 作为淋巴生成因子通过激活 VEGFR-3 刺激淋巴管内皮细胞的有丝分裂[4],因此,VEGFR-3 与淋巴管生成有关[5]。

在鸟绒毛膜[6]和 VEGF-C 转基因小鼠[7]实验已经证实 VEGF-C 可以导致淋巴管的增生,人类重组体 VEGF-C 在鸟绒毛膜可诱导淋巴管的过度增生,当受角蛋白-14 启动子驱动的 VEGF-C 在转基因小鼠的皮肤中过度表达时,它可诱导真皮中淋巴管增生、扩张[7]。由此可见 VEGF-C /VEGFR-3 信号通路在淋巴生成中起重要作用。

在胚胎期内皮细胞通过 VEGF-C /VEGFR-2 信号通路增生,但是在淋巴管出现前 VEGFR-3 对心血管系统的形成起到及其重要的作用,在 VEGFR-3 表达阳性的中肾管静脉和前心静脉的静脉囊中,内皮细胞中以出芽方式生长形成胚胎期淋巴管,在成人组织中淋巴生成仅在炎症和肿瘤中出现[8]。

淋巴管是比较薄弱的管道,其内皮通常只有一层内皮细胞,有较大的细胞间隙。淋巴管的生成是在已有淋巴管的基础上,以出芽方式生长的,新生淋巴管与新生微血管相比比较稳定,出芽少,相互吻合少,不易回缩,并且在大小和形式上也变化少。虽然淋巴管损伤后局部有暂时的水肿,但经淋巴管自发性再生后,症状消失。在损伤愈合的急、慢性炎症中可见广泛的淋巴管再生。在既往的研究中,一般认为肿瘤组织中不存在淋巴管,此种情况难以解释肿瘤的淋巴道转移。最近的研究表明,在肿瘤组织及肿瘤周围包膜区存在集束状或分散的淋巴管,这种淋巴管的分布比正常皮肤的淋巴管密[9,10]。VEGF-C 通过 VEGFR-3 作用,刺激肿瘤组织的淋巴管增生,在转 VEGF-C 基因鼠肿瘤中,可见许多小的淋巴管分布于肿瘤组织中,而对照的鼠肿瘤中则只见淋巴管仅深入肿瘤约 2 mm,前者淋巴管密度大约是后者的 4.6 倍,VEGFR-3 的表达也相应的增多,并且这种增生的淋巴管中常包含肿瘤细胞。VEGFR-3 受体能够刺激淋巴管形成,在淋巴管的形成及生长中起重要。

我们采用免疫组化方法对 VEGFR-3 表达及淋巴管的生成进行了对比观察。研究表明 VEGFR-3 表达在淋巴管内皮细胞胞浆中,呈棕黄色颗粒状。癌组织中有新生的淋巴管的增生,癌组织中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔是(4.67±5.91)个/视野,癌旁组织中 VEGFR-3 阳性的淋巴管腔是(2.44±1.59)个/视野,差异存在显著性(P< 0.01)。VEGF-C mRNA 阳性的肿瘤组织中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔为(6.84±5.98)个/视野,而在 VEGF-C mRNA 阴性的肿瘤组织中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔的表达率为(2.15±1.97)个/视野,存在显著性差异(P< 0.05)。VEGFR-3 蛋白在高分化鳞癌、中分化鳞癌和低分化鳞癌中的表达率分别为 61.5%、52.8%和 41.7%;VEGFR-3 蛋白在Ⅰ期鳞癌、Ⅱ期鳞癌和Ⅲ期鳞癌中的表达率分别为 14.3%、53.3%和 78.6%。结果表明 VEGFR-3 的表达与食管鳞癌的分化之间无显著性差异,与肿瘤的临床分期之间存在显著性差异

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

（$P<0.05$）。在淋巴结转移阳性的 57 例标本中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔计数为（5.66±5.67）个/视野，在淋巴结转移阴性的 16 例标本中 VEGFR-3 阳性淋巴管腔计数为（2.89±1.96）个/视野，存在显著性差异（$P<0.05$）。检测的 VEGFR-3 表达和 VEGF-C mRNA 表达结果一致。研究提示从肿瘤细胞中产生的 VEGFR-3 的表达，可能通过诱导淋巴管的生成以促进肿瘤细胞的淋巴道转移，从而影响患者的临床分期和预后。

综上所述，VEGFR-3 与淋巴生成在食管癌中密切相关。VEGF-C 产生的肿瘤细胞能通过激活表达在淋巴管内皮细胞上的 VEGFR-3 诱导间质中淋巴生成。随后，肿瘤细胞与扩增的淋巴管接触并侵入淋巴管导致淋巴转移。

参考文献：

[1] Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, *et al*. Current biology of VEGF-B and VEGF-C[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(6): 528－535.

[2] Veikkola T, Karkkainen M, Ciaesson-Welsh L, *et al*. Regulation of angiogenesis *via* vascular endothelial growth factor receptors[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 203－212.

[3] Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, *et al*. Vascular endotheelial growth factor-C expression predicts invading the submucosa[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(10): 1413－1419.

[4] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *et al*. A novel vascular endothelial growth factor VEGF-C, is a ligands for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases[J]. EMBO J, 1996, 15(7): 1751.

[5] Dumont D J, Jussila L, Taipale J. Cardiovascular failure in mouse embryo deficient in VEGF receptor-3[J]. Science, 1998, 282(5390): 946－949.

[6] Oh S J, Jeltsch M M, Birkenhager R, *et al*. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane[J]. Dev Biol, 1997, 188(1): 96－109.

[7] Terman B I, Dougher-Vermazen M, Carrion M E, *et al*. Identification of the KDR tyrosine kinase as receptor for vascular endothelial cell growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 187(3): 1579－1586.

[8] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana C D, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with bascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55(18): 3964－3968.

[9] Mihaela S, Thomas H, David G J, *et al*. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 192－198.

[10] Veikkola T, Jussila L, Makinen T, *et al*. Signalling *via* vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphagiogenesis in transgenic mice[J]. EMBO J, 2001, 20(6): 1223－1231.

（编辑　陈聪连）

（上接 1579 页）

出血量计量方法：吸引器储液瓶血量＋纱布吸血量（干纱布称重法）。

统计学处理：数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2　结果

住院时间：治疗组 3～14 d，平均（8.7±2.4）d，对照组 4～15 d，平均（9.1±2.7）d，差别无显著性意义（$P>0.05$）。手术时间：治疗组 40～105 min，平均（76±10.7）min，对照组 60～155 min，平均（107±23.7）min，差异非常显著（$P<0.01$）。出血量：治疗组 20～100 ml，平均（74±15.9）ml，对照组 70～260 ml，平均（185±52.4）ml，差异非常显著（$P<0.01$）。治疗组切口小，愈合后几乎看不出，对照组小腿多个切口，长 3～8 cm。两组切口均甲级愈合。随访 1～47 个月，随访率 86.2%（56/65），治疗组、对照组各有 1 例分别于术后 3 个月、11 个月复发，为小腿内侧再发少许蚓状静脉，予医用弹力袜保守治疗，余均治愈。

3　讨论

冷冻剥脱原理[2]：高压 CO_2 通过血管探针头端小孔迅速膨胀产生急剧降温，达－80 ℃，头端迅速结成冰球并与血管壁粘结，达到将静脉结扎于远端剥离子的效果，避免了远端切口。

新术式优点：采用新术式冷冻加点式剥脱术，避免了远端剥离子切口，特别对肥胖患者，有时其远端剥离子不易找到，冷冻剥脱优势更明显[3]。新术式先驱血，小腿曲张静脉团采用 0.5～1 cm 小切口点式抽剥，几乎不出血，且避免过多分离缝合步骤，缩短手术时间，切口小，愈合后无明显疤痕，外形美观。

采用冷冻加点式抽剥术应注意：①开始冷冻 5 s 后即往外抽剥，切忌探针头端在一处停留时间过长，以免造成静脉外周组织、皮肤损伤。抽剥过程一直保持冷冻开关开启，匀速缓慢抽剥，避免拉断静脉。②作好曲张静脉标记，因驱血后将看不到曲张静脉，全靠标记定位，标记不全将使曲张静脉残留、复发。③驱血要彻底，止血带要完全阻断动静脉血流，否则抽剥过程中仍不免出血，影响操作。点式抽剥时用力要均匀，每抽出 1～2 cm 左右即用血管钳紧贴皮肤将其夹住，如此反复抽剥，尽可能通过一个切口抽剥出尽量多的静脉。

经初步应用显示冷冻加点式抽剥术治疗大隐静脉曲张出血少、手术时间短，较传统术式有一定优越性。

关键词：大隐静脉曲张；手术治疗；冷冻外科

中图法分类号：R615　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 陆家齐，黎沾良. 大隐静脉高位结扎、抽除或曲张静脉切除术[A]. 见：黎介寿，吴孟超，黄志强 主编. 手术学全集，普通外科卷[M]. 北京：人民军医出版社，1996. 1129－1133.

[2] Cheatle T R, Kayombo B, Perrin M. Cryostripping the long and short saphenous veins[J]. Br J Surg, 1993, 80(10): 1283.

[3] Breuninger H. Cryostripping of the long saphenous vein with a percutaneously guided probe[J]. Dermatol Surg, 2001, 27(6): 545－548.

（编辑　张大春）

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