DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.048
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0109-03

论著

儿童髓母细胞瘤中 VEGFR-2 的表达

陈礼刚[1],李开慧[1],张伶俐[2],秦 山[2],朴永旭[1],曾凡俊[1],程 林[1] ([1]成都军区总医院神经外科,成都 610083;[2]华西医科大学 成都 610041)

提 要:目的 探讨血管内皮生长因子受体 VEGFR-2 在儿童髓母细胞瘤中的表达及临床意义。方法 采用免疫组化 LSAB 法检测 84 例获随访的儿童髓母细胞瘤中的 VEGFR-2 表达,按术后生存期 3、5、10 年分为 A、B、C 三组。使用 Cox 回归统计分析。结果 84 例儿童髓母细胞瘤中,VEGFR-2 阳性表达 74 例(88.09%),A、B、C 三组间 VEGFR-2 阳性表达分别为 100%,88.89%,55.33%,($P<0.01$),Cox 回归分析显示 VEGFR-2 是影响生存时间的一个独立的预后因子,它与预后存在负相关关系。结论 VEGFR-2 表达水平可作为儿童髓母细胞瘤的预后指标之一。

关键词:儿童;髓母细胞瘤;血管内皮生长因子细胞受体;预后
中图法分类号:R392.11;R739.4 文献标识码:A

Expression of VEGFR-2 in medulloblastoma of children

CHEN Li-gang, LI Kai-hui, ZHANG Ling-li, QIN Shan, PIAO Yong-xu, ZENG Fan-jun, CHENG Lin (Department of Neurosurgery, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083)

Abstract Objective To study the expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) in medulloblastoma of children. Methods A total of 84 children with pathologically proved medulloblastoma and having sound radio-chemotherapy and follow-up after operation were subjected and divided into group A, B and C by their survival rate of 3, 5 and 10 years. The expression of VEGFR-2 in the 84 resected samples was studied with labelled strepatavilin biotin method (LSAB). The data were analyzed with Cox's proportional hazard regression model. Results The positive rate of VEGFR-2 expression was 88.09% in the 84 children, and 100%, 88.89% and 55.33% respectively in group A, B and C ($P<0.01$). Cox regression analysis showed that VEGFR-2 was an independent prognostic factor affecting survival rate and had a negative correlation with the prognosis of medulloblastoma. Conclusion VEGFR-2 expression can be one of the predictors for the prognosis of children medulloblastoma.

Key words children; medulloblastoma; vascular endothelia growth factor receptor; prognosis

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是内皮细胞的特异性有丝分裂原,也是一种有效的血管形成和血管通透性诱导因子,它在促进儿童髓母细胞瘤生长的同时,也促进了肿瘤的浸润和转移[1]。VEGF 的种种生物学功能又是通过与各种受体结合而起作用的。VEGF 受体-1(VEGF receptor-1, VEGFR-1)和 VEGF 受体-2(VEGF receptor-2, VEGFR-2)是近年研究最多,最深入的两个高亲和受体,尽管目前对于 VEGFR-1 和 VEGFR-2 所介导生物学效应尚有争议,但大多数研究表明 VEGF 可以强烈地诱导 VEGFR-2 的酪氨酸自动磷酸化,通过一系列底物活化而产生各种生物效应[2]。对于 VEGF 在脑肿瘤细胞本身的表达以及 VEGF/VEGRF 对脑肿瘤本身的影响的研究很少[3],而有关 VEGFR-2 在儿童髓母细胞瘤中的表达及其与预后的关系则未见报道。本实验用免疫组化方法,研究 VEGFR-2 在儿童髓母细胞瘤中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 1980-1990 年间经手术及病理证实的儿童髓母细胞瘤手术标本,对其中在显微手术全切的基础上且术后有系统的放、化疗并有随访资料完整的 84 例标本(男 46 例,女 8 例,年龄 6~12 岁)进行 VEGFR-2 免疫组化检查。按生存期 3、5、10 年分为 A、B、C 三组。同时对 A、B、C 三组患儿年龄、性别、病情、肿瘤部位、体积及病理类型与生存期作 Person 相关性(Person Correlation)分析。统计处理发现,生存期与上述参数无统计意义($P>0.05$)。标本经常规 40 $g\cdot L^{-1}$ 甲醛固定,石蜡包埋。常规切片及 HE 染色。取正常小脑组织 10 例作对照。

1.2 免疫组化

采用 LSAB 法(Labelled streptavidin biotin method)。其中 VEGFR-2 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司产品);生物素标记的二抗抗鼠 IgG,酶一链亲和素一复合物(三抗)均购于北京中山生物技术有限公司。

1.3 结果评定及统计学分析

由有经验的病理科医师对染色结果进行评定。光镜下,以胞浆呈棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,计数 10 个高倍视野下(×400)肿瘤细胞的阳性细胞数与肿瘤细胞总数(总数不少于 500 个),计算各例标本肿瘤细胞 VEGFR-2 表达阳性率。Cox 比例风险模型(Cox's Proportional hazard regression model)用于 Cox 回归分析,SPSS 8.0 软件做统计学分析。

2 结果

2.1 VEGFR-2 染色结果

10 例正常小脑组织标本无 VEGFR-2 表达,见图 1。

在 84 例儿童髓母细胞瘤中,阳性表达 74 例(88.09%),见

作者简介:陈礼刚(1966-),男,四川省叙永县人,博士,副主任医师,主要从事中枢神经系统损伤的再生与修复、儿童颅内肿瘤方面的研究,发表论文 50 余篇。电话:(028)6570523
收稿日期:2001-01-25;修回日期:2001-05-15

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

图 2。并发现以高阳性为主，阳性染色主要位于肿瘤细胞，仅少数间质血管内皮细胞为中、强染色。多数内皮细胞无或仅轻微着色。A、B、C 三组间 VEGFR-2 阳性率分别为：100%（42/42），88.89%（24/27），55.33%（8/15），有非常显著性差异（$P<0.01$）。



图 1 正常小脑组织中无 **VEGFR-2** 表达 （LSAB× 350）

Fig 1 No VEGFR-2 expression in normal cerebellum tissue （LSAB × 350）



图 2 儿童髓母细胞瘤组织中大量细胞及血管内皮细胞呈 **VEGFR-2** 阳性表达 （LSAB× 350）

Fig 2 Significant positive expression of VEGFR-2 in tumor cells and vascular endothelial cells in medulloblastoma of children （LSAB× 350）

2.2 Cox 回归分析

单因素分析结果表明，对于生存时间，VEGFR-2 与预后相关（$P<0.01$）。VEGFR-2 表达越强，复发和死亡的风险性也越大。年龄、性别、病程、肿瘤体积与预后无明显相关（$P>0.05$）。多因素分析结果表明，对于生存时间，VEGFR-2 是一个独立的预后因子（$P<0.01$），其参数为正值，说明是一个危险因子。VEGFR-2 表达越强，生存期越短，见表 1。

表 1 单因素/多因素 **Cox** 模型分析结果

Tab 1 Outcomes of single/multiple factors of Cox's model

Factors	Parameter	Standard error	Probability	Relative Risk
Sex	0.233±−0.113	0.376±0.381	0.887±0.572	1.262±0.986
Age	−1.145±−0.012	0.021±0.034	0.537±0.872	0.987±0.997
Course	−0.140±−0.052	0.104±0.087	0.693±0.924	0.984±0.996
Volume	−0.0006±−0.047	0.045±0.046	0.155±0.522	0.983±0.997
VEGFR-2	1.335±0.5205	0.335±0.5205	0.001±0.001	7.790±7.539

3 讨论

VEGF 是 1989 年 Ferrara 等在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的糖蛋白，它是内皮细胞的特异性有丝分裂原，也是有效的血管形成和血管通透性诱导因子[4]。Chen 等[3] 在退行性星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤中发现，VEGF 及其受体 VEGFR-1，VEGFR-2 的表达与肿瘤的恶性程度、血管密度及坏死有显著相关。用免疫组化方法对多种不同来源的肿瘤组织中 VEGFR-2 的表达进行比较研究发现，不同来源的肿瘤细胞表达存在明显差异[5]。本研究对 10 例正常小脑组织标本进行染色，无 VEGFR-2 表达，而在 84 例儿童髓母细胞瘤标本中，平均阳性率达 88.09%，且以高阳性率为主。并发现阳性染色主要位于肿瘤细胞，仅少数间质血管内皮细胞为中、强染色。多数内皮细胞无或轻微着色。本实验提示，VEGFR-2 作为 VEGFR 的一种受体，不仅表达于血管内皮细胞，且更主要表达于髓母细胞瘤本身。结合既往的研究[1,2]，我们认为 VEGF 除作用于儿童髓母细胞血管内皮细胞，促进血管生成外，还可以通过作用于其肿瘤细胞中的 VEGFR-2，直接产生生物学效应。

本研究 A、B、C 三组 Person 相关性分析，其生存期与患儿的年龄、性别、病情、肿瘤部位、体积等参数无关。VEGFR-2 在 A、B、C 三组间阳性率分别为 100%，88.09%，55.33%，呈显著性差异。说明，VEGFR-2 与预后存在负相关系。在 Cox 回归分析中，同样未发现上述参数与生存时间有关，这和 David 等[6] 的研究相似。多因素 Cox 模型显示，VEGFR-2 作为一个指标最终进入模型，结合单因素分析结果，VEGFR-2 可作为预测儿童髓母细胞瘤的预后指标之一。Carroll 等[7] 利用一种特殊抗体检测 VEGFR 的活性强度，发现其与胶质瘤恶性程度有关，如在胶质母细胞瘤为 71%，间变性星形胶质瘤为 15%，Ⅱ级星形细胞瘤为 0%。根据上述 VEGFR-2 在儿童髓母细胞瘤中的表达特点及我们前有的研究[1]，可以推测，VEGFR 通过作用于儿童髓母细胞瘤血管内皮细胞及肿瘤细胞本身的 VEGFR，一方面诱导肿瘤血管生成，提高血管通透性，另一方面直接刺激肿瘤细胞增殖，从而促进儿童髓母细胞瘤的生长，浸润和转移。

我们认为儿童髓母细胞瘤患儿的预后与多种因素有关，如病儿的一般情况，治疗方法，肿瘤的生物学特性等[1~8]，而各种因素所起的作用大小，方式及途径尚有待于进一步研究。根据本实验 VEGFR-2 表达同儿童髓母细胞瘤预后的关系，我们可以根据免疫组化检测 VEGFR-2 的表达水平预测高危患儿，从而积极给予各种治疗，以提高患儿的生存率[8]；Millauer[9] 将 C_6 胶质母细胞瘤转入裸鼠皮下，同时转染 VEGFR-1 阴性的突变基因（Flk-1TM），3 周后观察肿瘤生长情况。发现，与对照组相比，处理组的肿瘤体积小、组织灰白、中心坏死且缺少血管形成。故我们还可通过干扰 VEGF/

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

VEGFR 通路达到以抑制肿瘤生长的目的, 如转染缺陷基因或转染编码抗体的基因片段; 或利用杂交瘤技术产生抗体, 直接注入体内。这或许是儿童髓母细胞瘤治疗的一个努力方向。

参考文献:

[1] 陈礼刚, 朴永旭, 张伶俐, 等. 儿童髓母细胞瘤的生物学特性[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(9): 1 146.

[2] Landgren b, Schiller P, Cao Y, *et al*. Placenta growth factor stimulate s MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migratoon of endothelial cells expressing Flt 1[J]. Oncogene, 1998, 16(3): 359－367.

[3] Chan A S, Leung S Y, Wong M P, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma[J]. Am J Surg Pathol, 1998, 22(7): 816－826.

[4] Ferrara N, Henzel W J. Pituitary follicular cells secrete a novel hepar inbinding growth factor specific for vascular endothlia cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 161(2): 851－858.

[5] 宋述梅, 曾　莉, 吴　健. VEGF 受体 KDR 胞外Ⅴ-Ⅶ区的克隆、单抗制备及 KDR 在不同来源肿瘤组织中的表达[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21(2): 96－98.

[6] David K M, Casey A T, Hayward R D, *et al*. Medulloblastoma: the 5-year survival rate improving[J]. J Neurosurg, 1997, 86(1): 13－21.

[7] Carroll R S, Zhang J, Bello L, *et al*. KDR activation in astrocytic neoplasms[J]. Cancer, 1999, 86(7): 1 335－1 341.

[8] 陈礼刚, 曾凡俊, 卢　敏, 等. 儿童髓母细胞瘤及其显微外科治疗[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 388－390.

[9] Millauer B, Shawver L K, Plate K H, *et al*. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant[J]. Nature, 1994, 367(6 463): 576－579.

（编辑　陈聪连）

（上接 108 页）

2　结果

内异症轻度组和重度组 NK 细胞活性均显著低于对照组（$P<0.01$），重度组显著低于轻度组（$P<0.01$），腹腔液组显著低于外周血组（$P<0.01$），见表 1。

内异症轻度组和重度组 IL-6、IL-8 及 TNF-α 水平均显著高于对照组（$P<0.01$），重度组显著高于轻度组（$P<0.01$），腹腔液组显著高于外周血组（$P<0.01$），见表 1。

表 1　3 组患者外周血及腹腔液中 IL-6、IL-8 及 TNF-α 水平及 NK 细胞活性比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	外周血				腹腔液			
		IL-6 ($\times10^{-3}$ng/L)	IL-8 ($\times10^{-3}$ng/L)	TNFα ($\times10^{-3}$ng/L)	NK 细胞活性(%, $\bar{x}\pm s$)	IL-6 ($\times10^{-3}$ng/L)	IL-8 ($\times10^{-3}$ng/L)	TNFα ($\times10^{-3}$ng/L)	NK 细胞活性(%, $\bar{x}\pm s$)
对照组	19	31±11	57±13	164±42	38.9±3.1	63±28	78±20	243±50	24.6±2.8
轻度组	13	54±22	79±18	212±57	20.7±2.6	89±37	104±22	299±66	12.5±1.8
重度组	19	85±35	108±26	290±63	6.9±1.1	124±39	136±32	381±81	3.7±0.6

3　讨论

3.1　NK 细胞活性与宫内膜异位症发生的关系

研究表明, 宫内膜异位症发病与维持自身稳定的免疫监视及防御功能缺陷有关[2], 而 NK 细胞的主要功能为免疫监视及防御。本研究结果显示, 内异症患者外用血及腹腔液中 NK 细胞活性均显著降低, 且疾病分期越晚, NK 细胞活性越低。此与 Oosterlynck 等[3] 的研究一致。由于 NK 细胞活性降低, 致使异位在腹腔内的有活性的子宫内膜细胞不能被彻底清除而发病。

3.2　患者外周血及腹腔液内 IL-6、IL-8、TNF-α 的水平

IL-6、IL-8、TNF-α 等主要是由单核巨噬细胞合成和分泌的一类介导炎症和免疫反应的多肽类蛋白。由于腹腔中存在血液细胞碎片、子宫内膜碎片、精子、卵泡液和卵泡细胞, 使腹腔巨噬细胞增多, 成为腹腔液白细胞中的优势细胞。本研究发现, 宫内膜异位症患者外周血及腹腔液巨噬细胞产生的 IL-6、IL-8、TNF-α 水平明显增高, 且随宫内膜异位症临床期别的增加而升高, 与文献[4] 报道一致。它们作为炎症介质, 使局部发生炎症反应, 如白细胞积聚、血管通透性增加、纤维蛋白沉积、促进成纤维细胞增殖等一系列非细菌性炎症反应, 介导内异症的发生和发展。研究表明, 新生血管的形成参与了宫内膜异位症的发生。而 IL-6、IL-8、TNF-α 都是新生血管生成的潜在诱导剂, 通过促进异位病灶周围新生血管的形成, 使异位子宫内膜得以生长、增生、分化。

3.3　患者腹腔内免疫环境改变的意义

目前研究认为, 腹腔环境的改变对宫内膜异位症的发生起着至关重要的作用[5]。有研究证实, 患者腹腔液中存在大量免疫活性细胞, 其中巨噬细胞占 90%以上, 且产生的细胞因子含量也高于非宫内膜异位症患者。本研究结果显示, 患者腹腔液 IL-6、IL-8、TNF-α 水平明显高于外周血。提示腹腔内免疫环境的改变比外周血具有更重要的临床意义。

关键词: 子宫内膜异位症; 自然杀伤细胞; IL-6; IL-8; TNF-α
中图法分类号: R711.710.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Brawn D P, Rotman C, Munana A, *et al*. Monocyte-mediatedenhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 1994, 61: 78－84.

[2] Dmoski W P, Gebel H M, Brawn D P. The role of cell-mediated immnnity in pathogenesis of endometriosis[J]. Acta Obstet Gynecal Scand, 1994, 159: 7－10.

[3] Oosterlynck D J, Vandiputte M, Meuleman G, *et al*. The naturnal Killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 1992, 58: 290－294.

[4] Brawn D P, Rana N, Gebel H, *et al*. Spontaneous and induced synthesis of cytokines by peripheral blood monocytes in Patients with endmetriosis[J]. Fertil Steril, 1996, 65: 1 125－1 129.

[5] Mclaren J, Dealtry G, Prentice A, *et al*. Decreased levels of the potent regulator of monocyte/macrophage activation, interleukin-13, in the peritoneal fluid of patients with endometriosis[J]. Hum Reprod, 1997, 12: 1 307－1 310.

（编辑　汪勤俭）

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