

10.3779/j.issn.1009-3419.2005.01.06

• 临床研究 •

非小细胞肺癌组织中 VEGF-C 表达与淋巴转移的关系

李晓明 杨军 黄国胜 李学兆

【摘要】 背景与目的 肺癌的复发和转移与其血管生成和淋巴管生成密切相关, 而血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 表达与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 组织中血管和淋巴管生成的关系却知之甚少。本研究旨在探讨肺癌组织中 VEGF-C 表达与肿瘤组织中微血管和淋巴管生成及肺癌淋巴转移的关系。方法 采用免疫组化 LSAB 法检测 78 例肺癌组织中 VEGF-C、血管内皮细胞及淋巴管内皮标记物 CD31 和 VEGFR-3, 并计算肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD) 和微淋巴管密度(lymphatic microvessel density, LMVD)。结果 肺癌组织中 VEGF-C 表达的阳性率为 52.6% (41/78); 伴有淋巴结转移的肺癌组织中 VEGF-C 表达(30/43, 69.7%) 显著高于无淋巴结转移者(11/35, 30.3%) ($P < 0.05$); VEGF-C 阴性组的微淋巴管密度(23.4 ± 2.3) 显著低于 VEGF-C 阳性组(43.2 ± 4.1) ($P < 0.05$), 而微血管密度在两组之间差异无统计学意义(31.1 ± 1.8 比 28.1 ± 3.2 , $P > 0.05$); 伴有淋巴结转移的肺癌组织中微淋巴管密度和微血管密度(分别为 33.6 ± 1.1 和 41.3 ± 3.3) 均显著高于不伴有淋巴结转移者(分别为 18.7 ± 1.8 和 25.7 ± 2.1) ($P < 0.05$)。结论 VEGF-C 可能主要通过调节肺癌组织中微淋巴管的生成而影响非小细胞肺癌淋巴转移。

【关键词】 血管内皮生长因子 c 淋巴转移 肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2

A study on the relationship between VEGF C expression and lymphatic metastasis in non small cell lung cancer

LI Xiaoming, YANG Jun, HUANG Guosheng, LI Xuezhao. Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Nanyang Healthy School, Nanyang, Henan 473058, P. R. China

Corresponding author: YANG Jun

【Abstract】 Background and objective It has been known that an intensive relationship exists between the recurrence or metastasis and angiogenesis and lymphangiogenesis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), but it is uncertain whether there is relationship between VEGF-C expression and angiogenesis and lymphangiogenesis in NSCLC tissues. This study is to explore the relationship among VEGF-C expression and angiogenesis and lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in NSCLC tissues. **Methods** The expression of VEGF-C was detected in 78 lung cancer tissues with or without lymphatic metastasis by LSAB methods. Microvessel density (MVD) and lymphatic microvessel density (LMVD) were determined in the same patients by CD31 and VEGFR-3 respectively. **Results** The positive rate of VEGF-C expression was 52.6% (41/78) in NSCLC tissues; VEGF-C expression in lung cancer tissues with lymphatic metastasis (30/43, 69.7%) was significantly higher than that without lymphatic metastasis (11/35, 30.3%) ($P < 0.05$); LMVD in the group without VEGF-C expression (23.4 ± 2.3) was significantly lower than that with VEGF-C expression (43.2 ± 4.1) ($P < 0.05$), there was no significant difference in MVD between the two groups (31.1 ± 1.8 vs 28.1 ± 3.2) ($P > 0.05$); the MVD and LMVD in lung cancer tissues with lymphatic metastasis (33.6 ± 1.1 and 41.3 ± 3.3 respectively) were significantly higher than those without lymphatic metastasis (18.7 ± 1.8 and 25.7 ± 2.1 respectively) ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that VEGF-C may play an important role in the lymphatic metastasis of lung cancer through the regulation of lymphangiogenesis.

【Key words】 VEGF C Lymphatic metastasis Lung neoplasms

肺癌的侵袭和转移是患者治疗失败和死亡的主要原因, 而血管生成和淋巴管生成是肺癌侵袭和转移的病理学基础, 血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 表达与肺癌侵袭和转移密切相关。

al growth factor C, VEGF-C) 及其受体血管内皮细胞生长因子受体-3 (vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3) 在促进肿瘤微血管与微淋巴管生成中起着关键作用。许多肿瘤组织中 VEGF-C 的高表达与肿瘤的淋巴转移密切相关。本研究采用免疫组化 LSAB 法检测 78 例非小细胞肺癌组织中 VEGF-C 含量, 计算肺癌组织内微血管密度 (microvessel density, MVD) 与微淋巴管密度 (lymphatic microvessel density, LMVD), 以探讨肺癌组织中 VEGF-C 表达与血管、淋巴管生成及淋巴转移的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本 78 例肺癌手术切除标本均来自自我科 2002 年 1 月至 2004 年 4 月接受手术治疗的非小细胞肺癌患者, 均有明确的病理学诊断。其中男性 50 例, 女性 28 例, 平均年龄 54.25 ± 9.12 岁; 腺癌 30 例, 鳞癌 38 例, 腺鳞癌 10 例; 低分化癌 31 例, 中分化癌 33 例, 高分化癌 14 例; P-TNM 分期 (国际 UICC1999 分期标准), I 期 19 例, II 期 37 例, III 期 16 例, IV 期 6 例。患者术前均未接受化疗及放疗, 其中伴有淋巴结转移者 43 例, 无淋巴结转移者 35 例。

1.2 LSAB 法免疫组化染色

1.2.1 主要试剂 兔抗人 VEGF-C 抗体, VEGFR-3 抗体和鼠抗人 CD31 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, SP 免疫组化试剂盒, DAB 显色系统购自北京中山生物公司。

1.2.2 LSAB 法染色 将 $5 \mu\text{m}$ 厚的石蜡切片常规脱蜡, 逐级水化, 先经 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶, 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液行抗原修复, 然后依次加入正常小牛血清 (1:10), VEGF-C (1:100), CD31 (1:100), VEGFR-3 (1:200), 生物素化羊抗鼠抗体 (1:200), SP 复合物 (1:200)。以上各步之间均经 37°C 恒温箱孵育 30 min, PBS 冲洗 (小牛血清除外), 最后 DAB 染色, 苏木素复染, 树脂封片。选用已知阳性组织平滑肌细胞作为阳性对照, 用 PBS 代替 CD31 及 VEGFR-3 抗体作为空白对照。

1.2.3 结果判定 肿瘤细胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。200 倍光镜下随机选取 5 个视野, 以定位明确、染色明显, 平均 20% 以上细胞染色的组织切片视为 VEGF-C 阳性, 而染色弱或完全不染色者为 VEGF-C 阴性。肿瘤中微血管计数采用 Weidner 等^[1] 的方法, 即选取 3 个血管与淋巴管最多 (hot spot) 的视野, 计算每 200 倍镜 (0.723 mm^2) 下的微血管或微淋巴管数。

1.3 统计学方法 采用 F 检验、卡方分析和直线相关分析, 在 SPSS10.0 软件上进行数据处理。

2 结果

2.1 肺癌组织中 VEGF-C 蛋白表达 VEGF-C 定位于细胞浆, 78 例肺癌组织中 VEGF-C 阳性表达 41 例, 阳性率为 52.6%。VEGF-C 蛋白表达与肺癌组织的分化程度、组织学类型均无关 ($P > 0.05$) (图 1)。

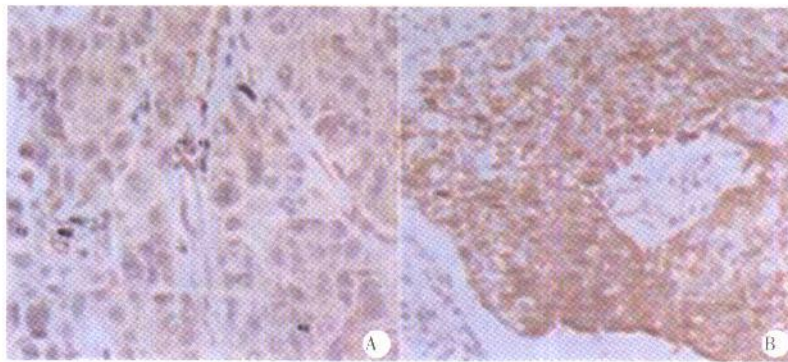


图 1 肺鳞癌组织中 VEGF-C 表达 (LSAB 法)

A: VEGF-C 阴性 ($\times 200$) (部分癌细胞呈阳性表达, 但阳性率 $< 20\%$); B: VEGF-C 阳性 ($\times 175$)

Fig 1 Expression of VEGF-C in squamous cell carcinoma of the lung (LSAB method)

A: VEGF-C negative ($\times 200$) (some tumor cells were stained, but the rate was less than 20%); B: VEGF-C positive ($\times 175$)

2.2 肺癌组织中 MVD 与 LMVD 肺癌组织内部可见 CD31 标记的呈棕褐黄色的阳性内皮细胞, 单个的呈棕褐色微淋巴管内皮细胞, 多为条索状 (图 2 的 A、B); 在肿瘤的边缘可见 VEGFR-3 标记的呈棕褐色微淋巴管内皮细胞, 多为条索状 (图 2 的 C、D)。内皮细胞也计数为一条血管, 多数为管腔状或条索状。

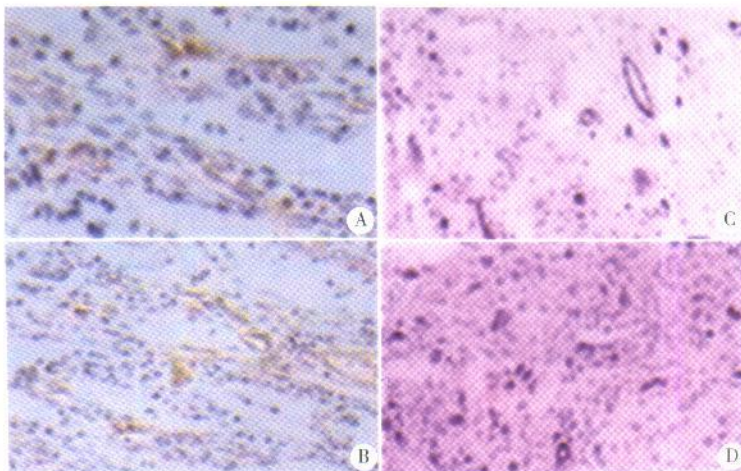


图 2 肺鳞癌淋巴结转移与 MVD、LMVD 的关系(LSAB 法 × 100)

淋巴结转移阴性组 MVD(A) 和 LMVD(C) 显著低于阳性组(分别为 B 和 D)

Fig 2 Relationship between lymphatic metastasis and MVD and LMVD in squamous cell carcinoma of the lung (LSAB method × 100) MVD (A) and LMVD (C) in group without lymphatic metastasis were significantly less than those with lymphatic metastasis (B and D)

2.3 肺癌组织中 VEGF-C 表达与肺癌淋巴结转移的关系 伴有淋巴结转移的肺癌组织 VEGF-C 表达 (30/43, 69.7%) 显著高于不伴有淋巴结转移组 (13/43, 30.3%) ($P=0.021$)。肺癌组织中 VEGF-C 表达与肺癌淋巴结转移呈正相关 ($R=0.878, P<0.05$), VEGF-C 表达增高, 则肺癌容易发生淋巴结转移(表 1)。

2.4 肺癌组织中 LMVD 及 MVD 与 VEGF-C 表达、肺癌淋巴结转移的关系 LMVD 在 VEGF-C 阳性组 (43.2 ± 4.1) 显著高于 VEGF-C 阴性组 (23.4 ± 2.3)

($P<0.05$), MVD 在 VEGF-C 阳性组 (28.1 ± 3.2) 与阴性组 (31.1 ± 1.8) 之间差异无统计学意义 ($P>0.05$); 而 LMVD 和 MVD 在肺癌淋巴结转移组(分别为 33.6 ± 1.1 和 41.3 ± 3.3) 均显著高于不伴有淋巴结转移组(分别为 18.7 ± 1.8 和 25.7 ± 2.1) ($P<0.05$)。肺癌淋巴结转移与肿瘤组织内 LMVD 和 MVD 成正相关(R 值分别为 0.408 和 0.336, P 值均 <0.05)。VEGF-C 的表达与 LMVD 呈正相关 ($R=0.456, P<0.05$), 而与 MVD 无明显相关性 ($R=0.212, P<0.05$)。

表 1 肺癌组织中 VEGF-C 表达和淋巴结转移的相关性

Tab 1 The relative between VEGF C expression and lymphatic metastasis

Group	No.	VEGF C(+)	VEGF C(-)	P value
Lymphatic metastasis(+)	43	69.7% (30/43)	30.3% (13/43)	0.021
Lymphatic metastasis(-)	35	31.4% (11/35)	68.6% (24/35)	0.019

$R=0.878, P<0.05$

表 2 肺癌组织中 MVD、LMVD 与 VEGF-C 表达及肺癌淋巴结转移的关系

Tab 2 The relationship between LMVD, MVD and VEGF C expression, lymphatic metastasis in lung cancer tissue

Group	VEGF C(+)	VEGF C(-)	P value	Lymphatic metastasis(+)	Lymphatic metastasis(-)	P value
LMVD	43.2 ± 4.1	23.4 ± 2.3	0.034	33.6 ± 1.1	18.7 ± 1.8	0.037
MVD	28.1 ± 3.2	31.1 ± 1.8	0.082	41.3 ± 3.3	25.7 ± 2.1	0.023

3 讨论

VEGF-C 作为 VEGF 家族的新成员和淋巴管生成因子, 是一种针对淋巴管内皮细胞的有丝分裂原, 其高表达被认为可促进淋巴管生成, 并与肿瘤细胞向区

域淋巴结转移相关^[2]。许多恶性肿瘤如甲状腺癌、前列腺癌、大肠癌、胃癌中的 VEGF-C 表达与区域淋巴结转移显著相关^[3-6]。Hashimoto 等^[7]应用 RT-PCR 方法检测浸润型宫颈癌组织中的 VEGF-C mRNA 表达, 结果显示 VEGF-C 在有深间质浸润、盆腔淋巴结

转移和淋巴和血管间隙侵犯的肿瘤中表达明显增加。本研究表明,伴有淋巴结转移的肺癌组织中 VEGF-C 表达显著高于不伴有淋巴结转移的肺癌组织。Furudoi 等^[8]用免疫组化法分析大肠癌 VEGF-C 与 MVD 的临床意义后发现,VEGF-C 表达阳性与肿瘤组织学分期、淋巴管侵犯转移、静脉侵犯、肝转移、Duke's 分期和血管生成密切相关。但 Akagi 等^[9]报道,大肠癌 VEGF-C 表达与微脉管计数无关,这可能是对肿瘤异质性的分析方法不同所致。本组在肺癌中的研究结果也发现 VEGF-C 的表达与肿瘤组织内 LMVD 呈正相关,而与 MVD 无关。

VEGFR-3 是一种新发现的与 VEGF-1 同源的 VEGFR,能与其配体 VEGF-C 及 VEGF-D 特异性地结合,可诱导内皮细胞的增殖及迁移,调控血管及淋巴管内皮细胞的新生,对胚胎发育及肿瘤的生长和转移起着重要的调节作用^[10]。VEGFR-3 在胚胎早期是血管形成的必需因素,在血管及淋巴管内皮细胞都有表达,胚胎后期 VEGFR-3 逐渐限于淋巴管,血管中几乎不表达^[11]。许多肿瘤如淋巴瘤、乳癌周围组织内均可检测到 VEGFR-3 不同程度的表达。不仅如此,在肿瘤邻近的转移淋巴结中,VEGFR-3 mRNA 常可被检测到^[12]。此外,VEGFR-3 的分布与 VEGFR-C 呈正相关性。VEGF-C 高表达的肿瘤细胞,其周围 VEGFR-3 阳性管腔高度生长^[13]。Clarijs 等发现,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,而 VEGFR-3 阳性血管的密度,在转移淋巴结却仅为未转移淋巴结的 1/2,可见肿瘤的淋巴结转移是经 VEGFR-3 阳性淋巴管形成的^[14]。由于 VEGFR-3 调节生成的肿瘤淋巴管具有特殊结构,淋巴管内皮细胞通透性上升,肿瘤细胞就易于侵入淋巴管并形成远处淋巴结的转移。

应用抗血管内皮细胞标记物抗体 CD31 和抗淋巴管内皮标记物抗体 VEGFR-3 进行的免疫组化结果显示,肿瘤内 LMVD 和 MVD 与肿瘤是否发生淋巴结转移成正相关。因此,可以认为,在肺癌中淋巴结转移的发生与肿瘤细胞中 VEGF-C 的过表达有关。由于 VEGF-C 在肿瘤组织中的大量存在,通过与其受体 VEGFR-3 的作用,可诱导癌周微淋巴管的增生,LMVD 的增高将直接导致肿瘤细胞经淋巴管的转移。在 VEGF-C 的作用下,淋巴管内皮细胞局部释放旁分泌因子,会影响肿瘤细胞粘附、迁移、侵袭等的改变,从而促进转移的发生;也可以通过与其受体 VEGFR-2/3 的结合,提高微血管、微淋巴管内皮的通透性,进而便于肿瘤细胞转移的发生。在本实验中,VEGF-C 的表达与肺癌微血管的增生无显著相关性,而肺癌淋巴结转移的发生却与 MVD 成正相关。但是 VEGF-C 的过

表达没有诱导肺癌微血管的增生,这正好说明 VEGF-C 可能主要通过调节肺癌组织中微淋巴管的生成而影响非小细胞肺癌淋巴结转移。

参 考 文 献

- Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1992, 84(24): 1875-1887.
- Saharinen P, Petrova TV. Molecular regulation of lymphangiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014: 76-87.
- Tanigaki Y, Nagashima Y, Kitamura Y, et al. The expression of vascular endothelial growth factor A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med*, 2004, 14(3): 389-395.
- Zeng Y, Opeskin K, Baldwin ME, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15): 5137-5144.
- Kazama S, Kitayama J, Watanabe T, et al. Expression pattern of vascular endothelial growth factor-C in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51(56): 391-395.
- Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K, et al. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci*, 2004, 95(4): 328-333.
- Hashimoto I, Kodama J, Seki N, et al. Vascular endothelial growth factor C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer*, 2001, 85(1): 93-97.
- Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology*, 2002, 62(2): 157-166.
- Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y, et al. Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery*, 2002, 131(1 Suppl): S109-113.
- Takahashi M, Yoshimoto T, Kubo H. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis. *Int J Hematol*, 2004, 80(1): 29-34.
- Tille JC, Nisato R, Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Novartis Found Symp*, 2004, 256: 112-131; discussion 132-136, 259-269.
- Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, et al. The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma carcinoma sequence during colorectal cancer progression. *J Pathol*, 2003, 200(2): 183-194.
- Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. *J Pathol*, 2003, 201(4): 544-554.
- Clarijs R, Schalkwijk L, Hofmann UB, et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 7059-7065.

(收稿: 2004-09-06 修回: 2004-11-25)

(本文编辑 张世雯)