

文章编号:1005-6947(2007)09-0915-04

· 简要论著 ·

VEGF-C 在胃癌组织中的表达与淋巴管生成及淋巴结转移的相关性研究

钱立元, 魏源水, 张翼, 吴君辉, 李小荣, 陈道瑾

(中南大学湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410013)

摘要:采用免疫组化 S-P 法检测 20 例正常胃组织、44 例无淋巴结转移的胃癌组织和 44 例有淋巴结转移的胃癌组织中 VEGF-C 表达水平, 分析其与微淋巴管密度(LMVD)、淋巴结转移的关系。结果显示, VEGF-C 在胃癌组织组的表达明显高于正常胃组织组($P < 0.01$); 胃癌组织中 VEGF-C 的表达强度与微淋巴管密度(LMVD)有关($P < 0.05$); 有淋巴结转移组胃癌组织的微淋巴管密度(LMVD)明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$); 胃癌组淋巴结转移的数目与 VEGF-C 的表达强度有关($P < 0.05$)。提示: VEGF-C 的表达与胃癌淋巴管生成及淋巴结转移关系密切; VEGF-C 和微淋巴管密度(LMVD)是胃癌淋巴结转移的重要影响因素。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(9): 915-918]

关键词: 胃肿瘤, VEGF-C; VEGFR-3; 淋巴管生成; 淋巴结转移

中图分类号: R 735.2

文献标识码: B

在我国, 胃癌占消化道恶性肿瘤的第 1 位, 全部癌肿的第 3 位。手术切除为其主要治疗手段, 但术后复发及转移率较高。患者主要死于复发和转移, 而淋巴道转移是其最主要的转移方式之一, 因此研究胃癌淋巴结转移对胃癌的治疗具有重要意义。本研究用免疫组化的方法检测正常胃组织、有或无淋巴结转移的胃癌组织中 VEGF-C 的表达及微淋巴管密度(lymphatic microvessel density, LMVD), 以探讨 VEGF-C 与胃癌淋巴管生成和淋巴转移的关系。

1 资料与方法

1.1 病例分组及一般资料

1.1.1 胃癌组 标本取自中南大学湘雅三医院普外科 2003 年 1 月—2005 年 10 月期间收治的胃癌患者, 选择术前未经放疗与化疗、术后肿瘤组织石蜡保存良好的标本 88 例, 其中男 52 例, 女 36 例; 年龄 22~78(平均 54.2 ± 14) 岁。肿瘤分化程度: 高分化腺癌 20 例, 中分化腺癌 30 例, 低分化腺癌 38 例; 肿瘤浸润深度: 黏膜层或黏膜

下层者 4 例, 肌层者 12 例, 浆膜层者 72 例。区域性淋巴结转移(每例胃癌标本检测淋巴结数不低于 13 枚) 阴性者 44 例, 阳性者 44 例。按 UICC 新 TNM 分期: I 期 12 例, II 期 32 例, III 期 36 例, IV 期 8 例。

1.1.2 正常胃组织组 20 例正常胃组织取自 2005 年 1 月—2005 年 12 月在中南大学湘雅三医院普外科手术治疗的胃溃疡患者, 标本取自距病灶 3 cm、病理证实无病变的胃组织。男 12 例, 女 8 例; 年龄 24~79(平均 52.4 ± 15) 岁。

1.2 标本处理及制备

石蜡包埋的标本行 $4\mu\text{m}$ 厚切片, 每例连续作 4 张切片。一张行 HE 染色, 以观察细胞分化程度等病理特征。一张作阴性对照。另 2 张分别行 VEGF-C 和 VEGFR-3 免疫组化染色。病理特征和免疫组化的结果由 2 位病理科医师独立单盲阅片。

1.3 结果判断

VEGF-C 免疫组化阳性表达定位于细胞浆, 呈黄色颗粒, 参考许良中等^[1]的方法, 根据阳性染色程度及染色细胞百分率进行分析评分: 基本不着色者为 0 分, 着色淡者为 1 分, 着色适中者为 2 分, 着色深者为 3 分; 着色细胞占计数细胞百分率 $< 5\%$ 为 0 分, $5 \sim 25\%$ 为 1 分, $26 \sim 50\%$ 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。将每张切片着色程度得分

收稿日期: 2007-04-29; 修订日期: 2007-09-07。

作者简介: 钱立元, 男, 湖南隆回人, 中南大学湘雅三医院副主任医师, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 钱立元 E-mail: qianliyuan@medmail.com.cn

与着色细胞百分率得分各自相乘,为其最后得分。得0~1分为阴性(-),得2~3分为弱阳性(+),得4~6分为中等阳性(++),6分以上为强阳性(+++)。

VEGFR-3免疫组化阳性表达定位于细胞间质,呈黄色颗粒;微淋巴管密度(LMVD)计数:参照Weidner等^[2]推荐的方法,凡染成黄色(VEGFR-3表达阳性),管道为单层内皮样细胞构成,周围没有明显的基底膜及平滑肌细胞,管腔内没有红细胞,即确认为淋巴管,先在低倍显微镜($\times 20$ 倍)下观察全切片的淋巴管分布情况后,选择淋巴管最密集的区域,即热区(hot spot),然后在高倍显微镜($\times 40$ 倍)下计数每个视野的淋巴管数,取5个视野的平均值作为每个标本的淋巴管密度。

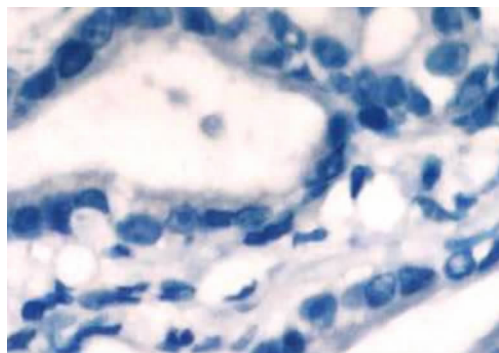


图1 VEGF-C在胃癌组织中的阴性表达(S-P $\times 400$)

1.4 统计学处理

计数资料用阳性例数和阳性率来表示,分组变量间用Fishers精确概率法,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS12.0统计软件包对所得数据进行方差分析和t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF-C在正常胃组织和胃癌组织中的表达

VEGF-C主要表达于细胞的胞浆中,在间质细胞中也有少量表达(图1-2)。20例正常胃组织VEGF-C表达,16例(-),4例(+),阳性率为20.00%;88例胃癌组织VEGF-C表达,10例(-),18例(+),44例(++),16例(+++),阳性率为88.64%,两者比较差异存在显著性($P < 0.01$)(表1)。

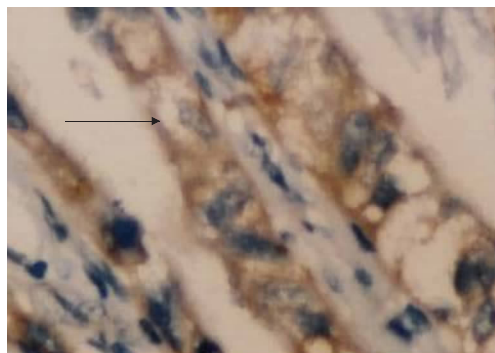


图2 VEGF-C在胃癌组织中的阳性表达(S-P $\times 400$)

表1 VEGF-C在正常胃组织,胃癌组织中的表达

组织类别	例数	VEGF-C				阳性率(%)	χ^2	P值
		(-)	(+)	(++)	(+++)			
正常胃组织	20	16	4	0	0	20.00	21	0.000
胃癌组织	88	10	18	44	16	88.64		

2.2 VEGF-C在胃癌组织中的表达与微淋巴管密度(LMVD)的关系

在胃癌组织内部有少量条状、管腔较小的

VEGFR-3阳性的淋巴管,癌组织周边淋巴管数目较多,有的呈扩张状(图3-4)。胃癌组织中VEGF-C表达阴性者,微淋巴管密度是(2.52 ± 0.77)个/视野;而VEGF-C表达阳性者,微淋巴管密度是(5.48 ± 2.02)个/视野,两者比较差异存在显著($P < 0.05$)。随着VEGF-C表达强度的增加,微淋巴管密度也明显增加($P < 0.01$)(表2)。

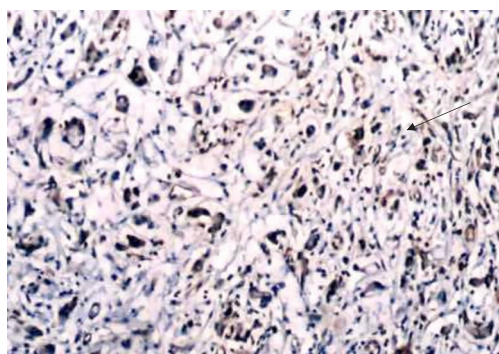


图3 VEGFR-3在胃癌组织中的阳性表达(S-P $\times 200$)

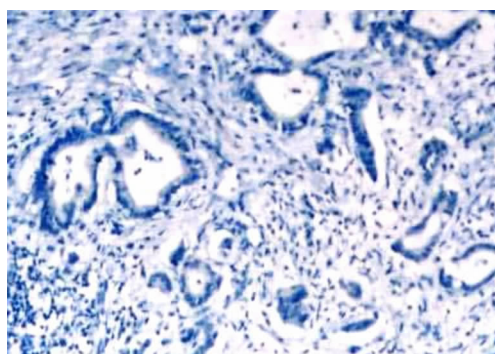


图4 VEGFR-3在胃癌组织中的阴性表达(S-P $\times 200$)

表2 VEGF-C在胃癌组织中的表达与微淋巴管密度(LMVD)的关系

VEGF-C	例数	微淋巴管密度(个/视野)
(-)	10	2.52 ± 0.77
(+)	18	3.42 ± 1.10 ¹⁾
(++)	44	5.55 ± 0.89 ²⁾
(+++)	16	6.53 ± 0.78 ³⁾

注1)与(-)组比较, $P=0.001$;2)与(+)组比较, $P<0.001$;3)与(++)组比较, $P<0.001$

2.3 微淋巴管密度(LMVD)与胃癌淋巴结转移的关系

在88例胃癌标本中,其中44例有淋巴结转移的微淋巴管密度是(5.91 ± 0.93)个/视野,44例无淋巴结转移的微淋巴管密度是(3.99 ± 1.58)个/视野,两者比较差异存在显著性($P<0.01$)(表3)。

表3 胃癌组织的微淋巴管密度与淋巴结转移的关系

组别	例数	淋巴管密度(个/视野)	t值	P值
无淋巴结转移	44	3.99 ± 1.58	-10.95	0.000
有淋巴结转移	44	5.91 ± 0.93		

2.4 胃癌组织中VEGF-C的表达与转移淋巴结数目的关系

在44例有淋巴结转移的胃癌标本中,总共转移淋巴结总数为308枚,其中转移最少的为1枚,最多的为12枚,随着VEGF-C表达强度的增加,淋巴结转移数目也明显增加($P<0.05$)(表4)。

表4 胃癌组织中VEGF-C的表达与转移淋巴结数目的关系

VEGF-C	例数	淋巴结数目(个)
(-)或(+)	16	4.00 ± 1.00
(++)	48	7.00 ± 1.13 ¹⁾
(+++)	24	9.50 ± 1.87 ¹⁾²⁾

注:1)与(-)或(+)组比较, $P<0.001$;2)与(++)组比较, $P=0.003$

3 讨论

长期以来,由于缺乏淋巴管特异的标记物,使肿瘤淋巴管转移的研究受到阻碍。近年来,陆续发现一些仅在淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cell, LEC)上表达的特异性标记分子,如血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)等,使得这一领域的研究逐渐成为热点。淋巴道转移是胃癌转移的主

要途径之一,且发生较早,淋巴结转移情况是评估预后和制定治疗策略的重要生物学指标^[3]。因此研究胃癌淋巴结转移对胃癌的治疗具有重要意义。

血管内皮生长因子-C(VEGF-C)属于VEGF和血小板生长因子(PDGF)家族,由Joukov等^[4]于1996年从人前列腺PC-3细胞系中分离纯化得出,是首个发现的具有刺激淋巴管内皮细胞分裂增殖、诱导淋巴管生长的生长因子,又称淋巴管生长因子。VEGF-C受体有VEGFR-2和VEGFR-3,VEGF-C通过旁分泌方式与受体结合后,使受体自身磷酸化,通过细胞质内信号传递,使DNA有丝分裂增加,导致淋巴细胞增殖^[5]。目前认为,VEGF-C与VEGFR-2结合促进血管内皮细胞增殖、迁移和血管生成;VEGF-C与VEGFR-3结合,促进淋巴管内皮细胞增殖和淋巴管增生^[6]。王天宝等^[7]发现在胃癌组织中VEGF-C阳性率高于胃良性病变($P=0.000$)。本实验研究显示:在88例胃癌组织中,78例VEGF-C阳性,阳性率为88.64%,VEGF-C主要表达于癌细胞的胞浆中,而正常胃组织中仅4例VEGF-C阳性,阳性率为20%,两者差异有显著性($P<0.01$),提示胃癌细胞可能有分泌VEGF-C的功能。

长期以来,对实性肿瘤内是否存在淋巴管一直是一个争论性问题。早期多数学者认为由于肿瘤细胞的高速增殖,瘤内间隙压太大,阻碍了肿瘤内淋巴管的生长,所以肿瘤内部缺乏淋巴管,无有效的淋巴循环^[8]。许多学者在大量小鼠移植瘤和人肿瘤标本中通过不同的淋巴内皮标记物检测均发现瘤内存在染色阳性的淋巴管^[9]。本研究发现在胃癌组织内部有少量条状、管腔较小的淋巴管,癌组织周边淋巴管数目明显增多,有的呈扩张状,这与大多数学者的研究结果一致。

临床病理学研究^[10]证实,实体瘤最早发生的是区域性淋巴结播散,播散最早的途径是淋巴道。这与淋巴管的特殊解剖结构有关,通常毛细淋巴管的管腔相对较大且不规则,管壁较薄,仅由单层内皮细胞和极薄的结缔组织构成^[11]。另外淋巴液的流速较慢,液压较低^[12]。本实验发现,无淋巴结转移的44例胃癌标本的平均微淋巴管密度是(3.99 ± 1.58)个/视野,而有淋巴结转移的44例胃癌标本的平均淋巴管密度是(5.91 ± 0.93)个/视野,两者比较差异具有显著性($P<0.01$),这说明LMVD是胃癌淋巴结转移

的重要影响因素, LMVD 的增加有利于胃癌淋巴结转移的发生。其原因可能是淋巴管数目的增多, 增大了肿瘤细胞与淋巴管内皮接触的表面积, 从而促使肿瘤细胞更容易进入淋巴管而发生淋巴结转移。

Jeltsch 等^[13], Mandriota 等^[14] 利用转基因技术对 VEGF-C 与淋巴管的关系进行了研究, 结果发现经过转 VEGF-C 基因的实验鼠皮下出现了大量的淋巴管, 说明 VEGF-C 可能介导了淋巴管的生成。本实验发现, 在 VEGF-C 表达阳性的胃癌组织中微淋巴管密度为 (5.48 ± 2.02) 个/视野, 而 VEGF-C 表达阴性的胃癌组织中微淋巴管密度为 (2.52 ± 0.77) 个/视野, 前者明显高于后者 ($P < 0.01$), 并且随着 VEGF-C 表达强度的增强, 微淋巴管密度也增加 ($P < 0.01$), 这说明 VEGF-C 与胃癌的淋巴管生成可能有关。

胃癌淋巴结转移的数目是影响其分期和预后的重要指标。本实验发现, VEGF-C(+) 组转移淋巴结数目是 (4.00 ± 1.00) 个; VEGF-C(++) 组转移淋巴结数目是 (7.00 ± 1.13) 个; 而 VEGF-C(+++) 组转移淋巴结数目是 (9.50 ± 1.87) 个, 统计分析差异具有显著性 ($P < 0.05$), 说明 VEGF-C 的表达强度与胃癌淋巴结转移的数目有关。因此可以推测 VEGF-C 对促进胃癌淋巴结转移起一定作用。提示 VEGF-C 可能为胃癌淋巴道转移研究提供一条新途径, 通过抑制胃癌细胞分泌 VEGF-C 或阻断 VEGF-C 与受体 VEGFR-3 结合, 抑制胃癌淋巴管的形成, 进而抑制胃癌的淋巴转移, 有望成为胃癌治疗的一个新靶点。

参考文献:

[1] 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, 5(4): 229 - 231.
 [2] Weidner N, Folkman J, Pozza F, *et al.* Tumor angiogenesis: a new carcinoma [J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84

(24): 1875 - 1887.

- [3] Adachi Y, Suemat su T, Shiraishi N, *et al.* Perigastric lymph node status as a prognostic indicator in patient s with gastric cancer [J]. Br J Surg, 1998, 85(9): 1281 - 1284.
 [4] Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, *et al.* A novel vascular endothelial growthfactor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases [J]. The EMBO Jouma1, 1996, 15(2): 290 - 298.
 [5] Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signal via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3 [J]. EMBO J, 2001, 20(17): 4762 - 4773.
 [6] Kiojima H, Shi jubo N, Yamada G, *et al.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in patients with T1 lung adenocarcinoma [J]. Cancer, 2005, 104(8): 1668 - 1677.
 [7] 王天宝, 董文广, 李兆亭. 血管内皮生长因子-C 在胃癌中表达的意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(9): 701 - 702.
 [8] Carmeliet P, Jain RK, *et al.* Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, 2000, 407(6801): 249 - 257.
 [9] Karpane T, Egeblad M, Karkkaine MJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth [J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 1786 - 1790.
 [10] He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1654(1): 3 - 12.
 [11] Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin v, *et al.* Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? [J]. Microsc Res Tech, 2001, 55(2): 61 - 69.
 [12] Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(3): 462 - 468.
 [13] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, *et al.* Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C trans-genic mice [J]. Science, 1997, 276(5317): 1423 - 1425.
 [14] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis [J]. EMBO J, 2001, 20(4): 672 - 682.