

· 论 著 ·

血管内皮生长因子-C 及其受体在宫颈鳞癌中的表达及意义

周铁军¹, 向 丽², 龚 莉^{1△}, 刘 俊¹

(泸州医学院: 1. 病理学教研室; 2. 病原生物学教研室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 研究血管内皮生长因子-C(VEGF-C)及其血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)在宫颈鳞癌组织中的表达及在淋巴道转移中的作用。方法 采用免疫组化法检测 62 例宫颈鳞癌及宫颈上皮内瘤变组织中 VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达, AE1/AE3 检测盆腔淋巴结微转移。结果 免疫组化 AE1/AE3 检测淋巴结转移检出率显著高于 HE 染色检出率; 宫颈鳞癌中 VEGF-C 的阳性表达率与宫颈上皮内瘤变(CIN) I、CIN II 的阳性表达率差异有统计学意义($P < 0.05$), 与 CIN III 无明显差异; VEGFR-3 阳性淋巴管数显著高于宫颈上皮内瘤变; VEGF-C 表达与 VEGFR-3 阳性淋巴管数呈明显正相关; VEGF-C 及 VEGFR-3 均与淋巴结的转移有关。结论 AE1/AE3 检查有利于发现淋巴结微转移; VEGF-C 可能通过促进淋巴管的生成, 从而利于宫颈鳞癌的浸润转移。

关键词: 宫颈鳞癌; 血管内皮生长因子-C; 血管内皮生长因子受体-3; 淋巴道转移

中图分类号: R737.33; R730.43

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)05-0533-03

Expressions of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in cervical squamous cell carcinoma and their role in lymph metastasis

ZHOU Tie-jun¹, XIANG Li², GONG Li^{1△}, et al.

(1. Department of Pathology, 2. Department of Medical Microbiology and Parasitology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective To study the expressions of VEGF-C and its receptor VEGFR-3 in cervical squamous cell carcinoma tissues, as well as their roles in lymph metastasis. **Methods** Sixty-two cases of cervical squamous cell carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia were detected by immunohistochemical staining (S-P) for the expressions of VEGF-C, VEGFR-3 and tested the expression of AE1/AE3 in lymph node to explore lymph metastasis. **Results** The positive rates of AE1/AE3 by immunohistochemical staining in lymph nodes of cervical carcinoma were all more than those of routine H-E staining. The difference of positive expressive rate of VEGF-C between the cervical squamous cell carcinoma and CIN I, CIN II was statistically significant, but not to CIN III. The difference between the cervical squamous cell carcinoma and cervical intraepithelial neoplasia in VEGFR-3 expression was statistically significant. The expression level of VEGF-C in cervical squamous cell carcinoma was positively correlated with the positive number of lymphatic vessels stained by VEGFR-3. VEGF-C and VEGFR-3 were all related to lymph node metastasis. **Conclusion** The detection of AE1/AE3 may be much easier to find out the LN with micrometastasis; VEGF-C facilitates invasion and metastasis in cervical squamous cell carcinoma by promoting lymphangiogenesis.

Key words: cervical squamous cell carcinoma; VEGF-C; VEGFR-3; Lymph metastasis

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 主要通过淋巴道转移。淋巴结的转移是影响宫颈癌患者预后的重要指标。因此, 探讨宫颈癌淋巴道转移的机制, 对判断预后及提高治疗效果具有重要的意义。血管内皮生长因子-C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是重要的淋巴管生长因子, 可通过调节血管内皮生长因子受体-3 (vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3) 的表达, 促进淋巴管生成。但宫颈鳞癌及宫颈上皮内瘤变 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 组织中是否有新生淋巴管形成及其功能尚存在分歧。本研究拟通过检测宫颈鳞癌及 CIN 组织标本中 VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达情况及与淋巴结转移的关系, 探讨其与宫颈鳞癌淋巴结转移的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集泸州医学院附属医院病理科 2008 年 1~12 月行宫颈鳞癌活检及手术切除的 62 例 (38 例为根治标本) 患者存档石蜡标本, 选取 55 例宫颈上皮内瘤变组织的石蜡标本 (其中 CIN I 15 例、CIN II 15 例、CIN III 25 例)。资料保存完整, 所有病例均为首次发病, 术前均未接受放疗、化疗。患者年

龄 27~76 岁。38 例根治标本中有淋巴结转移 17 例, 无淋巴结转移 21 例。所有标本均经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 连续切片。选取常规 HE 染色检测阴性的盆腔淋巴结, 检测肿瘤微转移情况。

1.2 试剂及方法 采用免疫组化 SP 法, 即用型兔抗人多克隆抗 VEGF-C 抗体、兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体、鼠抗人单克隆广谱细胞角蛋白 AE1/AE3 抗体、SP 试剂盒、DAB 显色剂均购自北京中杉公司。严格按试剂盒说明书方法染色, 所有切片染色均在相同条件下进行。用 PBS 液代替一抗做阴性对照, 用已知阳性结肠癌组织切片做 VEGF-C 阳性对照, 乳腺癌组织做 VEGFR-3 阳性对照, 宫颈鳞癌组织做 AE1/AE3 阳性对照。

1.3 结果判断 所有免疫组化染色结果均由两位病理医师在不知病例资料的情况下盲法阅片判断。VEGF-C 的阳性表达位于胞浆或胞膜染呈淡黄色至棕褐色。按染色着色深浅打分: 无显色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。按阳性细胞率打分: 阴性为 0 分, 阳性细胞率小于或等于 10% 为 1 分, 11%~50% 为 2 分, $\geq 51\%$ 为 3 分。染色强度与阳性

△ 通讯作者, E-mail: scgongli@sina.com。

细胞率的乘积:0~2 分为(-),3~4 分为(+),5~7 分为(++),8~9 分为(+++). VEGFR-3 阳性淋巴管判断标准及计数方法:低倍镜下寻找 VEGFR-3 阳性淋巴管密集区,即“热区”,100 倍视野计数 10 个热区中 VEGFR-3 阳性淋巴管数,取平均值.肿瘤区内单个或成丛的内皮细胞,不管成腔与否均视为淋巴管并计数,凡伴有肌层的淋巴管不予计数. AE1/AE3 主要定位于细胞浆和细胞膜,出现清楚的棕褐色颗粒者为阳性细胞.

1.4 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件进行分析. 根据不同的数据类型选择不同的统计方法:计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料两组间比较采用两样本间 *t* 检验;计数资料组间采用 χ^2 检验;两个变量相关性采用 Spearman's 等级相关分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 VEGF-C 及 VEGFR-3 在不同组织中的表达情况

VEGF-C 主要表达于癌细胞胞浆中,呈黄色或棕黄色(图 1),在少数病例中间质细胞也有少量表达. 从 CIN I、CIN II、CIN III 到宫颈鳞癌组织,VEGF-C 的表达强度和表达率逐渐升高,其表达率分别为 33.33%、40.00%、56.00% 和 69.35%. VEGF-C 在 CIN I、CIN II 的表达率分别与宫颈鳞癌比较差异有统计学意义($\chi^2 = 6.675, P = 0.010; \chi^2 = 4.498, P = 0.034$);而 CIN III 与宫颈鳞癌比较差异无统计学意义($P > 0.05$);CIN I、CIN II、CIN III 之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$). VEGFR-3 阳性染色为胞浆或胞膜呈明显的棕黄或棕褐色,主要位于上皮下的淋巴管内皮细胞,管腔多为单层,壁薄,腔内偶见血细胞,肿瘤细胞偶见弱阳性反应,在癌周组织中,阳性反应较强,染色管腔增加,呈局灶性或散在分布(图 2). 从 CIN I、CIN II、CIN III 到宫颈鳞癌组织,VEGFR-3 阳性表达的淋巴管数逐渐升高,分别为 $2.93 \pm 1.39, 3.47 \pm 1.68, 4.04 \pm 1.95$ 和 5.26 ± 2.39 . VEGFR-3 在 CIN I、CIN II、CIN III 的表达分别与宫颈鳞癌比较差异有统计学意义($t = 3.614, P = 0.001; t = 2.739, P = 0.008; t = 2.263, P = 0.026$). 其他各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1.

表 1 不同组织中 VEGF-C、VEGFR-3 的表达情况

组别	n	VEGF-C 表达(n)				阳性率 (%)	VEGFR-3 阳性淋巴管数($\bar{x} \pm s$)
		-	+	++	+++		
CIN I	15	10	5	0	0	33.33	2.93 ± 1.39
CIN II	15	9	4	2	0	40.00	3.47 ± 1.68
CIN III	25	11	7	5	2	56.00	4.04 ± 1.95
宫颈鳞癌	62	19	9	21	13	69.35	5.26 ± 2.39

2.2 AE1/AE3 的表达及淋巴结转移情况 AE1/AE3 阳性部位主要在细胞浆,微转移灶表现为单个散在和 2~3 个及数个聚集成小团状的癌细胞呈较强的胞浆着色(图 3). 38 例患者共检出淋巴结 263 枚,常规 HE 染色发现淋巴结转移癌 29 枚,占所检淋巴结 12.17%;阴性淋巴结经免疫组化 AE1/AE3 复检发现微转移癌 16 枚,占阴性淋巴结 6.84%;淋巴结转移检出率提高到 17.11%,二者之间的差异有统计学意义($\chi^2 = 4.026, P = 0.045$).

2.3 VEGF-C、VEGFR-3 的表达与淋巴结转移的关系 在宫颈鳞癌组织中 VEGF-C 的表达与盆腔淋巴结转移密切相关,有淋巴结转移组 VEGF-C 的表达阳性率为 82.35%,无淋巴结转移组为 47.62%,两组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 4.871,$

$P = 0.027$); VEGFR-3 在宫颈鳞癌组织中的阳性淋巴管数与淋巴结转移有关,有淋巴结转移组淋巴管数量明显高于无淋巴结转移组,分别为 5.81 ± 2.69 和 4.17 ± 1.74 ,差异有统计学意义($t = -2.518, P = 0.038$),见表 2.

表 2 VEGF-C、VEGFR-3 的表达与淋巴结转移的关系

组别	VEGF-C 表达(n)				阳性率 (100%)	VEGFR-3 阳性淋巴管数($\bar{x} \pm s$)
	-	+	++	+++		
有淋巴结	3	2	8	4	82.35	5.81 ± 2.69
无淋巴结	11	5	3	2	47.62	4.17 ± 1.74

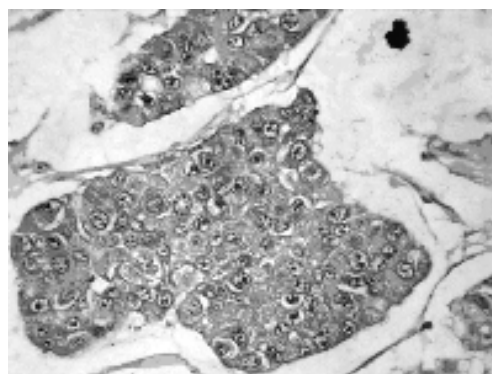


图 1 VEGF-C 在宫颈鳞癌中的表达(SP×200)

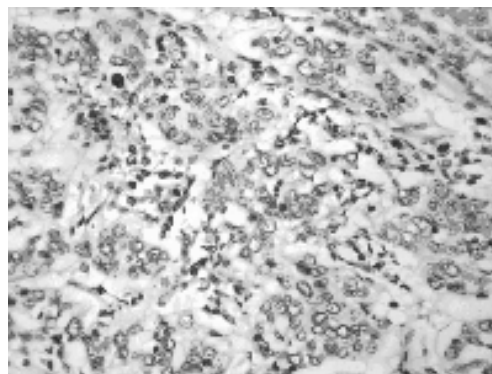


图 2 VEGFR-3 在宫颈鳞癌中的表达(SP×200)

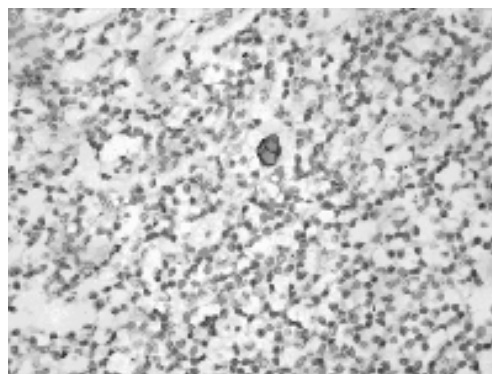


图 3 AE1/AE3 淋巴结中的表达(SP×200)

表 3 VEGF-C 的表达与淋巴管生成的相关性

组别	n	VEGFR-3 阳性淋巴管数($\bar{x} \pm s$)
VEGF-C 表达阳性	43	5.93 ± 2.39
VEGF-C 表达阴性	19	3.74 ± 1.56

2.4 VEGF-C 的表达与淋巴管生成的相关性 在宫颈鳞癌组织中,随着 VEGF-C 表达水平增高,VEGFR-3 阳性淋巴管数也明显增加,而 VEGF-C 表达阴性者,VEGFR-3 阳性淋巴管数明显减少,Spearman's 相关分析发现,二者之间呈明显正相关($r=0.432, P=0.000$),见表 3。

3 讨 论

淋巴结微转移是指直径小于 2 mm 的癌转移灶,在常规 HE 切片中不易发现^[1]。近年研究表明,即使常规病理检查无淋巴结转移的宫颈癌患者,仍有约 10% 的患者术后较快出现复发和淋巴结转移,这可能与癌细胞微转移有关^[2]。广谱细胞角蛋白 AE1/AE3 广泛表达于上皮组织中。本研究中,AE1/AE3 染色总共检测到微转移淋巴结 16 枚,占阴性淋巴结的 6.84%,转移淋巴结的检出率由 HE 染色的 12.17% 提高到 AE1/AE3 染色的 17.11%,二者间差异有统计学意义($\chi^2=4.026, P=0.045$),说明运用免疫组化技术检测淋巴结中 AE1/AE3 的表达有利于提高宫颈鳞癌淋巴结转移检出率。

肿瘤治疗失败的一个重要原因是肿瘤细胞易从原发部位通过血管、淋巴管向其他器官扩散,从而导致患者死亡,因此肿瘤转移是恶性肿瘤的重要生物学特性。多数上皮源性的恶性肿瘤主要以淋巴道转移为主,而淋巴结转移是一个极其复杂、连续的过程,其中淋巴管和微血管在肿瘤生长转移过程中起着重要作用。VEGF-C 是近年来第一个被发现的具有淋巴管生成作用的 VEGF 家族新成员,又称淋巴管生长因子,在人类基因中定位于染色体 4q34。它通过产生特异性的新生淋巴管刺激因子,具有刺激血管和淋巴管生成的双重作用;通过与其特异性受体结合,引起一系列的信号转导,在多种肿瘤的生长、发展及转移中起着重要的调节作用^[3-4]。

VEGFR-3 属于酪氨酸激酶超家族成员,是一种高度糖基化的单链跨膜镶嵌蛋白,是胚胎血管形成的必要因素,在血管、淋巴管内皮细胞都有分布,在胚胎后期,VEGFR-3 分布逐渐限于淋巴管,血管中几乎不表达,其主要参与淋巴管的形成。成人 VEGFR-3 主要分布于淋巴管内皮细胞,因此认为其是淋巴管内皮特异性标志物。VEGFR-3 与配体结合可引起内皮细胞增殖和迁移、调控血管和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重要作用。VEGFR-3 在淋巴管内皮上的表达程度可反映肿瘤间质中淋巴管增生的程度^[5]。

目前有关 VEGF-C 调节血管和淋巴管的机制尚不清楚。认为 VEGF-C 是以配体的形式与两个酪氨酸激酶受体 VEGFR-2 和 VEGFR-3 结合发挥作用,前者主要分布于血管内皮细胞上,后者在血管及淋巴管内皮细胞都有分布。有研究发现 VEGF-C 能提高血管的通透性,结合并激活 VEGFR-3,通过蛋白激酶 C 依赖的 P42/44 促分裂原活性蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)和磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)/丝-苏氨酸激酶(Akt)信号传导通路促进淋巴管内皮的存活与增殖^[6],甚至 VEGF-C 信号仅单独由 VEGFR-3 传递就足以造成淋巴管的增生。

本研究表明,从 CIN I、CIN II、CIN III 到宫颈鳞癌,VEGF-C 表达逐渐增强,差异有统计学意义($P<0.05$),这与 Van Trappen 等^[7]的研究基本一致。而且在宫颈鳞癌的发生中,淋巴管发生表型改变可在宫颈上皮内瘤变中出现。超过 50% 的 CIN III 级的病例中在其基底膜下有 VEGF-C 及其受体的高表达。相反,在 CIN I 和 CIN II 中没有或很少有 VEGF-C 的表达。结果提示 VEGF-C 可以通过激活其受体 VEGFR-3 诱导肿瘤附近淋巴管生成从而促进局部淋巴结转移,而 VEGF-C

表达的关键取决于 CIN III 是否向侵袭性疾病进一步发展,一旦发生浸润性癌将诱导肿瘤早期向淋巴结转移。

从 CIN I、CIN II、CIN III 到宫颈鳞癌,随着 VEGF-C 表达的增强,VEGFR-3 阳性表达的淋巴管数也逐渐增强,二者呈明显正相关关系($r=0.432, P=0.000$)。这与杨增周等^[8]在食管鳞癌中的研究基本一致。超过 50% 的 CIN III 病变中出现淋巴管,然而在 CIN I、CIN II 病变中这种现象并未出现。在宫颈鳞癌中,肿瘤附近出现的淋巴管更加明显,且在肿瘤中出现中至高 VEGF-C 的表达,这就可以解释为什么早期宫颈鳞癌有淋巴结微转移。同时本研究发现,VEGF-C 在淋巴结转移组的阳性率明显高于无转移组;VEGFR-3 阳性淋巴管数在淋巴结转移组较无转移组明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。而且淋巴结转移数越多 VEGF-C 的表达越强,肿瘤附近的淋巴管也越多,这与王金卫和张筱骅^[9]在甲状腺乳头状癌中的研究一致。提示 VEGF-C 可能通过其刺激受体 VEGFR-3 的表达,促进肿瘤淋巴管的生成来利于肿瘤的转移。

在本研究中发现肿瘤附近的血管少部分也表达 VEGFR-3,说明 VEGFR-3 在标记淋巴管时不具有特异性,这可能是本研究和其他研究不一致的原因。同时本研究发现在部分肿瘤细胞中也表达了 VEGFR-3,其具体机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 沈樑,黄颖烽,梁柳森,等. 甲状腺癌前哨淋巴结微转移分子检测及其临床意义[J]. 临床医学,2008,28(11):98.
- [2] Stolze IP, Mole DR, Ratcliffe PJ. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases[J]. Novartis Found Symp,2006,272(1):15.
- [3] Takahashi M, Yoshimoto T, Kubo H. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis[J]. Int J Hematol,2004,80(1):29.
- [4] Su JL, Yen CJ, Chen PS, et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression[J]. Br J Cancer,2007,96(4):541.
- [5] Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, et al. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways [J]. Blood,2005,106(10):3423.
- [6] Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3 [J]. EMBO J,2001,20(17):4762.
- [7] 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]. J Pathol,2003,201(4):544.
- [8] 杨增周,席鸿钧,侯进荣. 血管内皮生长因子-C 及血管内皮生长因子受体-3 在高发区食管鳞癌淋巴结转移中的作用[J]. 新乡医学院学报,2008,25(1):15.
- [9] 王金卫,张筱骅. 甲状腺乳头状癌淋巴管生成与淋巴结转移、血管内皮生长因子-C 表达的关系[J]. 浙江医学,2008,30(6):548.