

· 论 著 ·

非小细胞肺癌中 VEGF-C、VEGFR-3 mRNA 表达对淋巴结转移和预后的研究

元宪银¹, 李大宏¹, 徐林浩²

(1. 山东省莱芜市人民医院胸外科 271100; 2. 青岛大学医学院附属医院胸外科, 山东青岛 266021)

摘要:目的 血管内皮生长因子-C(VEGF-C)和血管内皮生长因子受体-3 mRNA 是促进恶性肿瘤淋巴管形成的重要因子, 通过研究 VEGF-C、VEGFR-3 mRNA 在非小细胞肺癌中的表达, 试图找到肺癌淋巴结转移和预后的规律。方法 采用 RT-PCR 法分析 60 例新鲜肺癌组织、癌旁正常肺组织及肺门、纵隔淋巴结标本中 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 的表达, 并分析其与临床病理特点之间的关系。结果 肺癌组织中 VEGF-C mRNA 表达阳性率为 68.33%(41/60), 其中 34 例 VEGFR-3 mRNA 阳性, VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达密切相关($P < 0.01$)。VEGF-C mRNA 的表达与肺癌的淋巴结转移、分化程度及 TNM 分期显著相关($P < 0.05$), 但与患者年龄、肿瘤大小及病理类型无关。正常肺组织中未见 VEGF-C/VEGFR-3 mRNA 表达。结论 VEGF-C/VEGFR-3 mRNA 表达与肺癌淋巴结转移及其预后密切相关。

关键词: 肺肿瘤; 血管内皮生长因子 C; 血管内皮生长因子受体 3; 淋巴结转移; 预后

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)15-1478-03

Expression of VEGF-C, VEGFR-3 mRNA and its predictive study on lymph node metastasis and prognosis of non-small cell lung carcinoma

Qi Xianyin¹, Li Dahong¹, Xu Linhao²

(1. Department of Thoracic Surgery, People's Hospital of Laiwu City, Laiwu, Shandong 271100, China;

2. Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China)

Abstract: **Objective** Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) play important roles in lymphangiogenesis of malignant tumors. This study was designed to investigate the expression of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA in non-small cell lung carcinoma, then try to find the rule of lymphatic metastasis and prognosis of lung cancer. **Methods** The expression of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA was examined by RT-PCR in 60 cases of the fresh non-small-cell lung cancer tissues and normal lung tissues, followed by the further analysis on the relationship between VEGF-C/VEGFR-3 mRNA expression and clinical-pathological characters. **Results** VEGF-C mRNA was detected in 41 of 60 (68.33%) lung cancer tissues, and VEGFR-3 mRNA expressed in 34 cases of the VEGF-C mRNA positive tissues. There was a statistically positive correlation between the incidence of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA ($P < 0.01$). The expression of VEGF-C mRNA was significantly associated with the lymph node metastasis, differentiation and TNM stages ($P < 0.05$), but not to the patientage, tumor size and pathologic type. The expression of VEGF-C/VEGFR-3 mRNA in normal lung tissues was under detectable level. **Conclusion** The expression of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA are closely related to lymphatic metastasis and prognosis of lung cancer.

Key words: lung neoplasm; vascular endothelial growth factor C; vascular endothelial growth factor receptor-3; lymphatic metastasis; prognosis

本课题通过研究血管内皮生长因子 C(VEGF-C)mRNA、血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3) mRNA 在非小细胞肺癌中的表达, 试图找到肺癌淋巴结转移和预后的规律, 为将来通过阻断 VEGF-C/VEGFR-3 信号传导通路, 达到抑制肺癌淋巴结转移的目的提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自青岛大学医学院附属医院胸外科 2007 年 7 月至 2007 年 12 月经手术切除的新鲜非小细胞肺癌组织 60 例, 以及癌旁 6 cm 以上正常肺组织、肺门及纵隔淋巴结组织, 切取后立即置于液氮中 30 min, 然后 -70°C 低温冰箱中保存, 冷冻切片, 片厚 $6\ \mu\text{m}$ 。所有标本均经临床及病理组织学检查确诊, 患者术前未行化、放疗。60 例非小细胞肺癌按国际抗癌联盟(UICC)1997 年修订的 P-TNM 分期标准进行 TNM 分期, I 期 18 例, II 期 11 例, III 期 25 例, IV 期 6 例; 腺癌 39 例, 鳞癌 18 例, 大细胞癌 3 例; 低分化 29 例, 中分化 26 例, 高分化 5 例; 男 50 例, 女 10 例; 年龄 38~76 岁, 平均 52 岁。其中有淋巴结转移 32 例, 无淋巴结转移 28 例。

1.2 方法

1.2.1 试剂及引物 RT-PCR 法检测 VEGF-C 及 VEGFR-3 表达。TRIzol 试剂盒(Gibco BRL 公司产品), RT-PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司产品), VEGF-C、VEGFR-3 及 β -actin 的 RT-PCR 特异引物序列均由上海生物工程有限公司提供。反应条件及引物序列见表 1。

1.2.2 多重 RT-PCR 将 60 例标本分别取 50~100 mg 冰冻组织放入匀浆器中, 加入 1 mL TRIzol RNA 提取液迅速制备成组织匀浆后移入 1.5 mL Eppendorf 管中, 用 TRIzol 试剂一步法(按 TRIzol 操作说明书步骤)提取细胞总 RNA, $4\ \mu\text{g}$ mRNA 进入逆转录体系, 42°C 30 min, 然后取逆转录产物 $2.5\ \mu\text{L}$ 进入 PCR 体系, 在同一体系中同时扩增 VEGF-C、VEGFR-3、 β -actin 的 3 对引物。PCR 循环参数为: 94°C 变性 60 s, 55°C 退火 60 s, 72°C 延伸 90 s, 共 35 个循环, 最后延伸 72°C 10 min 以获得更多的扩增产物。以试剂盒提供之对照 RNA 样品及其特异性引物的扩增产物为阳性对照, 以反应系统中不加模板 RNA 的扩增产物为阴性对照, 以 β -actin 为内对照。PCR 反应

表 1 靶基因引物序列及 PCR 反应条件

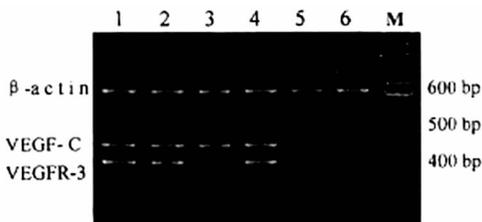
靶基因	引物序列	退火温度 T(°C)	循环次数	产物(bp)
VEGF-C	上游 5'-AGA CTC AAT GCA TGC CAC G-3'	55	35	435
	下游 5'-TTG AGT CAT CTC CAG CAT CC-3'			
VEGFR-3	上游 5'-AGT CGC TGG AGC TGC TGG TA-3'	55	35	400
	下游 5'-CCC GGA CAG TGC CTT TCC A-3'			
β-actin	上游 5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3'	55	35	610
	下游 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG-3			

产物采用 1.5%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)电泳,凝胶扫描仪进行 DNA 条带和光量子强度分析,以 VEGF-C、VEGFR-3 与 β-actin 的相对积分光密度(即所测积分光密度之比)代表目的基因的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,所有样本及临床病理学资料采用 χ^2 检验,相关性采用 Pearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 在非小细胞肺癌组织中的表达 60 例非小细胞肺癌标本中 41 例 VEGF-C mRNA 阳性表达(68.33%),相对表达量为 1.04 ± 0.30 ;41 例 VEGF-C mRNA 阳性标本中,34 例 VEGFR-3 mRNA 表达阳性(82.93%),相对表达量为 0.88 ± 0.21 ;而在 19 例 VEGF-C mRNA 阴性标本中均未检测到 VEGFR-3 mRNA 表达,在正常肺组织中也未检测到 VEGF-C mRNA 及 VEGFR-3 mRNA 的表达,二者差异有统计学意义($P < 0.01$)。VEGF-C mRNA 和 VEGFR-3 mRNA 在非小细胞肺癌中的表达有显著相关性($P < 0.01$),见图 1。已转移淋巴结的 VEGF-C mRNA 及 VEGFR-3 mRNA 的相对表达量分别为 1.02 ± 0.26 ;未转移淋巴结中有 12 例 VEGF-C mRNA 阳性表达(0.68 ± 0.11),无 VEGFR-3 mRNA 表达。



M:DNA 标志物;1,2,3,4:非小细胞肺癌组织;5,6:正常肺组织。

图 1 非小细胞肺癌组织与正常肺组织中 VEGF-C 与 VEGFR-3 mRNA 的表达(RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳)

2.2 VEGF-C mRNA 的表达和临床病理之间的关系 阳性表达率与患者年龄、肿瘤大小、病理类型无关($P > 0.05$),而与肿瘤分化程度、P-TNM 分期及淋巴结转移有关,即分化程度为低分化的非小细胞肺癌组织中 VEGF-C mRNA、VEGFR-3 mRNA 的阳性表达率明显高于中、高分化的非小细胞肺癌组织($P < 0.05$);P-TNM 分期 III、IV 期的非小细胞肺癌组织中 VEGF-C mRNA、VEGFR-3 mRNA 的阳性表达率明显高于 I、II 期的非小细胞肺癌组织($P < 0.05$);发生淋巴结转移的

非小细胞肺癌组织中,二者的阳性表达率明显高于未发生淋巴结转移的非小细胞肺癌组织($P < 0.05$),见表 2。

表 2 非小细胞肺癌组织中 VEGF-C mRNA、VEGFR-3 mRNA 的表达与临床病理因素之间的关系

参数	n	VEGF-C mRNA	P	VEGFR-3 mRNA	P
年龄(岁)					
≥52	31	1.03 ± 0.26	>0.05	0.86 ± 0.16	>0.05
<52	29	1.05 ± 0.27		0.89 ± 0.21	
肿瘤大小(cm)					
≥5	30	0.99 ± 0.19	>0.05	0.89 ± 0.17	>0.05
<5	30	1.08 ± 0.30		0.86 ± 0.16	
病理类型					
鳞癌	18	1.05 ± 0.25	>0.05	0.93 ± 0.15	>0.05
腺癌	39	0.99 ± 0.19		0.90 ± 0.14	
大细胞癌	3	1.01 ± 0.17		0.85 ± 0.17	
分化程度					
高分化	5	0.79 ± 0.20	<0.05	0.73 ± 0.19	<0.05
中分化	26	0.81 ± 0.18		0.75 ± 0.18	
低分化	29	1.12 ± 0.27		1.16 ± 0.29	
P-TNM 分期					
I + II	29	0.77 ± 0.14	<0.05	0.70 ± 0.13	<0.05
III + IV	31	1.16 ± 0.21		1.00 ± 0.19	
淋巴结转移					
有	32	1.29 ± 0.29	<0.01	1.09 ± 0.20	<0.05
无	28	0.68 ± 0.11		0.71 ± 0.13	

3 讨 论

肺癌的生长与转移依赖肿瘤相关血管、淋巴管提供营养、氧气和转移通道,肿瘤血管、淋巴管生成受肿瘤细胞和宿主细胞产生和释放的多种血管、淋巴管生成因子和生成抑制因子共同调控。VEGF-C 是迄今为止惟一的血管、淋巴管内皮细胞刺激因子^[1],通过其受体 2(KDR)及受体 3(Flt-4)分别作用于血管和淋巴管上皮,促进肿瘤的生长和转移。目前对 VEGF-C 和 KDR 在肺癌血管生成中的作用研究较多,而关于 VEGF-C mRNA 和 VEGFR-3 mRNA 在肺癌淋巴管生成中的作用及与淋巴结转移和预后的关系研究较少。

3.1 VEGF-C 及 VEGFR-3 mRNA 的协同作用 VEGF-C 主要通过作用于酪氨酸激酶 *flt-4*/VEGFR-3 受体介导肿瘤淋巴管生成^[2]。研究表明 VEGF-C 及 VEGFR-3 mRNA 表达增加在上皮恶性肿瘤淋巴结转移、扩散中起重要作用^[3]。目前发现部分恶性肿瘤组织表达 VEGF-C,而且表达 VEGF-C 的肿瘤细胞具有较高的局部淋巴结转移率^[4-6]。VEGFR-3 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,许多肿瘤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。此外,VEGFR-3 的表达与 VEGF-C 呈正相关性。有学者发现,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。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。

3.2 VEGF-C mRNA 的表达与临床病理因素之间的关系

本实验发现,分化程度为低分化的肺癌组织中 VEGF-C mRNA 的阳性表达率及量,明显高于中、高分化的肺癌组织,提示分化越差的肿瘤,表达 VEGF-C mRNA 的能力越强,更容易诱导淋巴管内皮细胞增殖、新生淋巴管形成和肿瘤的淋巴道转移。

VEGF-C mRNA 阳性表达率与患者 P-TNM 分期有密切的相关性。I ~ II 期患者 29 例,其肺癌组织中 12 例 VEGF-C mRNA 阳性表达,阳性表达率为 41.38%; III ~ IV 期患者 31 例,其肺癌组织中 29 例 VEGF-C mRNA 阳性表达,阳性表达率 93.55%。提示随着肺癌的不断进展,VEGF-C mRNA 表达增高,VEGF-C mRNA 的检出率也逐渐提高。

本组资料显示 VEGF-C mRNA 的表达与淋巴结转移密切相关。张胜辉^[7]等的研究也证实 VEGF 高表达患者发生淋巴结转移明显增加。同时,本研究发现 VEGF-C mRNA 和 VEGFR-3 mRNA 在非小细胞肺癌中的表达有显著相关性($P < 0.01$),这提示 VEGF-C 可能通过激活肺淋巴管内皮细胞膜上的 VEGFR-3 引起肿瘤周围淋巴管增生,或诱导肿瘤内淋巴管形成,从而使肿瘤细胞通过淋巴管进行转移扩散的概率增大。

本实验中,在未发生淋巴结转移组中有 12 例 VEGF-C mRNA 表达阳性,考虑可能的原因是:肿瘤细胞的淋巴结转移是通过常规组织病理学检查确定的,有研究证实,此种方法不能检测出肿瘤细胞的淋巴结微转移,因此对于这 12 例 VEGF-C mRNA 表达阳性的病例,尚不能排除是否已经发生了肿瘤

细胞的淋巴结微转移。Chta 等^[8]通过对 122 例 I 期非小细胞肺癌淋巴结微转移的研究发现,在淋巴结微转移组 VEGF-C 的阳性表达率显著高于无淋巴结微转移组,同样说明了 VEGF-C 与淋巴结转移的密切相关性。

淋巴道转移的发生是一个多因素参与的复杂过程和多因素协同作用的结果。本研究仅从非小细胞肺癌 VEGF-C 及 VEGFR-3 mRNA 这一相关因子观察,其结果不能全面反映导致肿瘤区淋巴管变化及转移的原因,但是 VEGF-C 及 VEGFR-3 mRNA 与淋巴结转移关系的研究对解释肿瘤发展与产生转移的机制有重要参考价值。由于不同肿瘤可能有不同的淋巴转移机制,准确机制的阐述仍需要进一步的临床及基础实验的证实。

参考文献:

- [1] Kar K, Kainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Oncogene*, 2000, 19(49): 5598-5605.
- [2] 陈公琰, 洪璇. 血管内皮生长因子与肺癌的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2005, 27(8): 449-451.
- [3] Duff SE, Li C, Renehan AO, et al. Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(2): 339-343.
- [4] 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[J]. *Int J Mol Med*, 2004, 14(3): 389-395.
- [5] Fujimoto J, Toyoki H, Sato E, et al. Clinical implication of expression of vascular endothelial growth factor-C in metastatic lymph nodes of uterine cervical cancers [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(3): 466-469.
- [6] 李中信, 贾滴涛, 崔宏伟, 等. 大肠癌 VEGF-C Flt-4 表达在淋巴管生成及淋巴结转移中的意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(6): 319-321.
- [7] 张胜辉, 王轶灵, 王明松, 等. 血管内皮生长因子表达与肺癌预后的关系[J]. *重庆医学*, 2010, 16(39): 2157-2158.
- [8] Ohta Y, Nozawa H, Tanaka Y, et al. Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-c and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymphnodes in stage I non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119(4Pt1): 804-813.

(收稿日期: 2010-04-26 修回日期: 2010-10-14)

(上接第 1477 页)

下小切口内心直视手术 298 例[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2007, 14(1): 77-77.

- [11] 张德奎, 单清华, 樊键, 等. 右腋下小切口胸骨下段小切口与胸骨正中切口的对比研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(2): 250-251.
- [12] 王东进, 吴清玉. 右腋下直切口在体外循环心脏直视手术中的应用[J]. *中国胸心血管外科杂志*, 2007, 14(6): 468-469.

- [13] Liu YL, Zhang HJ, Zhu XD, et al. Repair of cardiac defects through a shorter right lateral thoracotomy in children[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(9): 738-41.

- [14] Prêtre R, Kadner A, Dave H, et al. Right axillary incision: a cosmetically superior approach to repair a wide range of congenital cardiac defects[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 130(8): 277-281.

(收稿日期: 2011-04-01)