

· 临床研究 ·

# 中期因子与血管内皮生长因子 C 在胰腺肿瘤组织中的表达及其意义

周红兵<sup>1</sup>, 张秀忠<sup>2</sup>, 任泽强<sup>2</sup>

(1. 泰州市人民医院普外科, 江苏泰州 225300; 2. 徐州医学院附属医院普外科, 江苏徐州 221001)

**摘要:**目的 探讨中期因子(MK)与血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在胰腺癌中的表达及其意义。方法 采用免疫组织化学 SP 法,检测 MK 及 VEGF-C 在胰腺癌组织、癌旁组织及慢性胰腺炎组织中的表达情况。采用行×列表进行  $\chi^2$  检验, Spearman 等级相关分析 MK 及 VEGF-C 的表达与患者年龄、性别、肿瘤部位、淋巴结转移、TNM 临床分期等临床病理因素之间的关系。结果 MK 与 VEGF-C 在胰腺癌组织中的阳性表达例数及所占百分比明显高于其在癌旁组织及慢性胰腺炎组织的表达 ( $P < 0.05$ )。在不同 TNM 临床分期以及有无区域淋巴结转移患者的胰腺组织中 MK 及 VEGF-C 表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。胰腺癌组织中 VEGF-C 与 MK 表达正相关 ( $r = 0.68, P < 0.05$ )。结论 MK 及 VEGF-C 可能成为胰腺癌早期诊断、判断肿瘤进展和转移的指标。

**关键词:**胰腺肿瘤; 中期因子; 血管内皮生长因子 C; 淋巴转移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.025

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)17-1725-03

## Expression and significance of Midkine and VEGF-C in pancreatic carcinoma

Zhou Hongbing<sup>1</sup>, Zhang Xiuzhong<sup>2</sup>, Ren Zeqiang<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Taizhou People's Hospital, Taizhou, Jiangsu 225300;

2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221001)

**Abstract:** **Objective** To explore expression and significance of Midkine(MK) and vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) in pancreatic carcinoma. **Methods** Streptavidin-peroxidase (SP) immunohistochemistry was employed to detect expression of MK and VEGF-C in tissues of pancreatic carcinoma, carcinoma adjacent tissues and chronic pancreatitis. A contingency table was created to conduct  $\chi^2$  test and the Spearman Rank Correlation was used to investigate the relationship between the expression of MK and VEGF-C and clinicopathologic factors such as age and gender of patients, size and location of tumor, lymph nodes metastasis and clinical TNM stages. **Results** The positive expressions of MK and VEGF-C in terms of the number and percentage of their specimens in pancreatic carcinoma tissues were notably higher than their expressions in carcinoma adjacent tissues and chronic pancreatitis tissues ( $P < 0.05$ ). The differences in the expression of MK and VEGF-C in pancreatic tissues of patients with different clinical TNM stages, regional or non-regional lymph node metastasis were found to be statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression of VEGF-C in pancreatic carcinoma tissues was observed to have positive correlation with that of MK ( $r = 0.68, P < 0.05$ ). **Conclusion** MK and VEGF-C may be used as indicators for early diagnosis of pancreatic carcinoma, estimating tumor progression and metastasis.

**Key words:** pancreatic neoplasms; midkine; vascular endothelial growth factor-C; lymphatic metastasis

胰腺癌是一种恶性程度高的消化道疾病,近年来随着医疗技术的进步,其早期诊断率及手术切除率有所提高,然而,5 年生存率却未明显改善<sup>[1]</sup>,80%以上患者就诊时已失去根治机会<sup>[2]</sup>。如何提高胰腺癌的早期诊断和治疗水平是当前的研究热点。中期因子(midkine, MK)在多种肿瘤组织中特异表达,可刺激血管内皮细胞增殖,研究表明 MK 可用于肿瘤的早期诊断。血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)是 VEGF 家族的成员,在促肿瘤细胞淋巴转移及血道转移方面发挥重要作用。本研究采用免疫组织化学技术对胰腺癌组织中 MK 和 VEGF-C 的表达进行研究,探讨二者在胰腺肿瘤组织中的表达及其意义。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本实验采用徐州医学院附属医院病理科 2000~2005 年胰腺癌手术患者的胰腺癌组织石蜡包埋标本 33 例作为胰腺癌组,组织类型均为胰腺导管腺癌,患者术前未经过任何治疗;癌旁组及慢性胰腺炎组分别为随机选取的 12 例癌旁组织及 6 例慢性胰腺炎胰腺组织标本。所有标本均有完

整的临床及病理资料。上述 3 组的每例石蜡包埋标本均分别制成 4  $\mu\text{m}$  厚的切片 5 张,其中 1 张 HE 染色,采用双盲法进行组织学分型和分级复诊,其余 4 张免疫组织化学染色。

**1.2 免疫组织化学检测** 采用兔抗人 MK 多克隆抗体、兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体、免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)染色试剂盒及 DAB 显色剂(博士德公司,武汉)进行免疫组织化学检测,实验操作参照说明书。MK 以细胞质内出现清晰的棕黄色颗粒为阳性,光镜下随机取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,按照 Laird 标准,阳性细胞数: $< 5\%$  为阴性; $\geq 5\% \sim 24\%$  为弱阳性(+), $\geq 25\% \sim 50\%$  为阳性(++), $\geq 50\%$  为强阳性(+++)<sup>[3]</sup>。VEGF-C 以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性,按照 Kitadai 标准,每张切片中阳性细胞大于 30% 为阳性,小于 30% 或无阳性细胞为阴性<sup>[4]</sup>。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, MK 和 VEGF-C 表达与胰腺癌各临床病理因素的关系比较采用行×列表进行  $\chi^2$  检验及 Spearman 等级相关分析,检验水准  $\alpha =$

0.05,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MK 及 VEGF-C 在胰腺癌组织、癌旁组织及慢性胰腺炎组织中的表达 在胰腺癌组织中, MK 蛋白反应产物呈浅黄至棕黄色, VEGF-C 蛋白反应产物呈棕黄色, 二者均位于细胞质(封 3 图 1); MK 及 VEGF-C 在胰腺癌组织中阳性表达例数及所占百分比明显高于癌旁组织及慢性胰腺炎组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1; 在癌旁组织及慢性胰腺炎组织中, MK 及 VEGF-C 的阳性表达例数及所占比率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 胰腺癌组织、癌旁组织及慢性胰腺炎组织中 MK 及 VEGF-C 的表达 [ $n(\%)$ ]

组别	<i>n</i>	MK 阳性	VEGF-C 阳性
胰腺癌组	33	19(57.6)*	20(60.6)*
癌旁组	12	1(8.3)	3(25.0)
慢性胰腺炎组	6	1(16.7)	1(16.7)

\*:  $P < 0.05$ , 与癌旁组及慢性胰腺炎组比较。

2.2 MK 及 VEGF-C 与临床病理因素的关系 患者性别、年龄、肿瘤部位、有无远处转移、组织分化程度及糖类抗原-199 (carbohydrate antigen 199, CA-199) 不同分组间的 MK 及 VEGF-C 表达水平的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而在有无区域淋巴结转移、TNM(tumor node metastasis) 临床分期不同分组间的 MK 及 VEGF-C 表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Spearman 等级相关分析, MK 及 VEGF-C 表达水平与区域淋巴结转移呈正相关 ( $r = 0.86, P < 0.05; r = 0.36, P < 0.05$ ); 与 TNM 临床分期呈正相关 ( $r = 0.84, P < 0.05; r = 0.61, P < 0.05$ ), 见表 2。

2.3 MK 及 VEGF-C 在胰腺癌组织中表达的关系 33 例胰腺癌组织中有 13 例 VEGF-C 表达阴性, 其中 MK 表达阳性 3 例, 占 23.1%; 20 例 VEGF-C 表达阳性的胰腺癌组织中 MK 表达阴性 4 例, 占 20%。VEGF-C 不同表达水平间 MK 表达水平差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 10.93, P < 0.05$ )。Spearman 等级相关分析显示 VEGF-C 表达水平与 MK 表达水平呈正相关 ( $r = 0.68, P < 0.05$ )。

表 2 MK 及 VEGF-C 表达与临床病理因素的关系

病理因素	<i>n</i>	MK 阳性 [ $n(\%)$ ]	<i>P</i>	VEGF-C 阳性 [ $n(\%)$ ]	<i>P</i>
性别					
男	21	12(57.1)		13(61.9)	
女	12	7(58.3)	0.619	7(58.3)	0.564
年龄					
≤45 岁	9	3(33.3)		5(55.6)	
>45 岁	24	16(66.7)	0.092	15(62.5)	0.509
肿瘤部位					
胰头	27	17(62.9)		18(66.7)	
胰体尾	6	2(33.3)	0.192	2(33.3)	0.147
原发肿瘤(T)					
T <sub>1</sub>	20	9(45.0)		9(45.0)	

续表 2 MK 及 VEGF-C 表达与临床病理因素的关系

病理因素	<i>n</i>	MK 阳性 [ $n(\%)$ ]	<i>P</i>	VEGF-C 阳性 [ $n(\%)$ ]	<i>P</i>
T <sub>2</sub>	10	8(80.0)		9(90.0)	
T <sub>3</sub>	3	2(66.7)	0.180	2(66.7)	0.039
区域淋巴结转移(N)					
N <sub>0</sub>	18	4(22.2)		6(33.3)	
N <sub>1</sub>	15	15(100.0)	0.000	14(93.3)	0.001
远处转移(M)					
M <sub>0</sub>	30	16(53.3)		17(56.7)	
M <sub>1</sub>	3	3(100.0)	0.178	3(100.0)	0.209
TNM 临床分期					
I~II 期	18	3(27.8)		6(33.3)	
III~IV 期	15	15(100.0)	0.000	14(93.3)	0.001
组织分化程度					
高分化	9	5(55.6)		7(77.8)	
中分化	20	11(55.0)		10(50.0)	
低分化	4	3(75.0)	0.780	3(75.0)	0.395
CA-199					
<111	9	4(44.4)		5(55.6)	
≥111~500	15	10(66.7)		11(73.3)	
≥500	9	5(55.6)	0.607	4(44.4)	0.361

3 讨 论

本实验表明 MK 及 VEGF-C 在胰腺癌组织中阳性表达例数及所占百分比明显高于癌旁组织及慢性胰腺炎组织, 这与国内外相关报道一致; 在有无区域淋巴结转移、不同 TNM 临床分期组间的 MK 及 VEGF-C 表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且 Spearman 等级相关分析呈正相关。

MK 是 1988 年发现的的肝素结合生长因子, 是一种重要的血管生成诱导因子, 对肿瘤新生血管的形成具有明显的调控作用。MK 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 外显子和内含子之间序列高度保守<sup>[5]</sup>。MK 在多种人类恶性肿瘤组织中过度表达<sup>[6]</sup>, 而在正常组织中不表达或低表达<sup>[7-8]</sup>。Ikematsu 等<sup>[9]</sup>报道胃癌、直肠癌、肝癌、胆管癌及胰腺癌等肿瘤患者尿液中的 MK 含量显著增高, II 期胃癌和直肠癌的阳性率高于 I 期。因此, 结合本实验结果, 通过检测血清或尿液中 MK 的水平进行临床肿瘤诊断和分期是可行的。淋巴管生成在胰腺癌的淋巴转移过程中起着至关重要的作用。VEGF-C 是 VEGF 家族成员之一, VEGF-C 与 VEGFR-3(血管内皮生长因子受体 3) 结合后, 通过活化诱导生存与增殖信号分子, 从而促进淋巴内皮细胞的增殖和迁移, 发挥促淋巴管新生作用, 促进肿瘤的淋巴转移<sup>[10]</sup>。近年来发现许多表达 VEGF-C 的肿瘤细胞具有较高的区域淋巴结转移率<sup>[11-12]</sup>, 同时部分研究显示 VEGF-C 表达与肿瘤淋巴管浸润有关<sup>[13-14]</sup>, 这与本研究中胰腺癌组织的 VEGF-C 表达增强且与区域淋巴结转移相关基本一致。本研究还发现 TNM III~IV 期病例组织标本的 VEGF-C 阳性表达率为 93.3%, 明显高于 I~II 期的 33.3% ( $P < 0.05$ ), 且呈正相关。因此, VEGF-C 的表达水平可能有助于判断胰腺癌的进

展情况和严重程度。

肿瘤新生血管形成是恶性肿瘤生长、浸润转移过程中的关键因素之一。Muramaki 等<sup>[15]</sup>将 MK 基因导入膀胱癌细胞中,发现 MK 的高表达可促进血管内皮细胞的生长,刺激血管的生成活性。VEGF-C 具有促淋巴管生成和血管生成的双重功能,Padera 等<sup>[16]</sup>发现,VEGF-C 可诱导淋巴管间及淋巴管与血管相互融合,增加肿瘤与血管的接触面积,增加血管通透性,促进淋巴转移及血道转移。

本实验中 VEGF-C 表达与 MK 表达呈正相关( $r=0.68$ )。VEGF-C 与 MK 均参与肿瘤血管的生成,并促进肿瘤的生长和转移,推测胰腺癌组织中 MK 的高表达可能协同 VEGF-C 的表达增强,进而促进胰腺癌的淋巴转移及血道转移,二者之间的相互作用还需进一步的研究证实,MK 及 VEGF-C 可能成为胰腺癌早期诊断、判断肿瘤进展和转移的重要指标。

#### 参考文献:

- [1] Andrén-Sandberg A, Neoptolemos JP. Resection for pancreatic cancer in the new millennium[J]. *Pancreatol*, 2002, 5(5):431-439.
- [2] 张太平, 赵玉沛. 胰腺癌基因治疗的现状与展望[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2007, 13(3):148-151.
- [3] Laird DW, Fistouris P, Batist G, et al. Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(16):4104-4110.
- [4] Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2001, 93(5):662-666.
- [5] Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis[J]. *J Biochem*, 2002, 132(3):359-371.
- [6] Kato M, Shinozawa T, Kato S, et al. Increased midkine expression in intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and in situ hybridization analyses [J]. *Liver*, 2000, 20(3):216-221.
- [7] Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2004, 204(2):127-143.

- [8] Moon HS, Park WI, Sung SH, et al. Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2003, 88(3):289-297.
- [9] Ikematsu S, Okamoto K, Yoshida Y, et al. High levels of urinary midkine in various cancer patients[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(2):329-332.
- [10] 罗景玉, 杨长征, 李道堂, 等. 非小细胞肺癌组织中 VEGFR-3 的表达及临床意义[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2006, 13(15):1178-1179.
- [11] Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck[J]. *Head Neck*, 2003, 25(6):464-474.
- [12] Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and D (VEGF-C and -D) is an important risk factor for lymphatic metastasis in undifferentiated early gastric carcinoma [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2003, 33(1):21-27.
- [13] O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis[J]. *Cancer*, 2001, 92(3):556-568.
- [14] Kajita T, Ohta Y, Kimura K, et al. The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(2):255-260.
- [15] Muramaki M, Miyake H, Hara I, et al. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14):5152-5160.
- [16] Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics[J]. *Science*, 2002, 296(5574):1883-1886.

(收稿日期:2010-11-25 修回日期:2011-02-13)

(上接第 1724 页)

- Dis, 2002, 34(2):104-109.
- [9] Shah VA, Chong CY, Chan KP, et al. Clinical characteristics of an outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore[J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2003, 32(3):381-387.
- [10] 吴艳. 1 359 例手足口病流行病学分析[J]. *中国热带医学*, 2006, 6(4):607.
- [11] 王晓华, 刘维婵. 小儿手足口病并暴发性心肌炎 4 例报告[J]. *临床儿科杂志*, 2003, 21(1):9.
- [12] Huang CC, Liu CC, Chang YC, et al. Neurologic compli-

cations in children with enterovirus 71 infection[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(13):936-942.

- [13] 蔡栩栩, 尚云龙, 赵永. 机械通气在重症手足口病并发神经源性肺水肿患儿中的临床应用[J]. *中国小儿急救医学*, 2009, 16(2):166-168.
- [14] 张笃, 向伟. 手足口病并神经源性肺水肿的机械通气辅助治疗[J]. *重庆医学*, 2009, 38(23):3003-3005.
- [15] 杨文升. 手足口病三例死亡病例报告[J]. *右江医学*, 2010, 38(2):244-246.

(收稿日期:2010-11-04 修回日期:2011-03-09)