

PTTG 和 VEGF-C 在喉癌组织中的表达及其与微淋巴管生成的关系

高珊¹, 卢国友², 王竹君^{1△}, 徐勤¹, 辛国华¹, 刘吉娜¹, 黄越燕¹

(1. 承德医学院附属医院耳鼻喉科, 河北承德 067000; 2. 河北省承德市口腔医院综合科 067000)

摘要:目的 探讨垂体肿瘤转化基因(PTTG)和血管内皮生长因子-C(VEGF-C)在喉癌组织中表达的相关性以及喉癌发展的关系。方法 应用免疫组织化学 SP 法分别检测 60 例喉癌组织和 32 例癌旁组织中 PTTG 和 VEGF-C 两种蛋白的表达情况,并用 D2-40 阳性产物定位淋巴管内皮细胞细胞质及细胞膜,计数微淋巴管密度(LMVD)。结果 喉癌组织中 PTTG 和 VEGF-C 表达水平均显著高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);二者表达量与喉癌的分化程度、有无淋巴结转移及临床分期差异均有统计学意义($P < 0.05$),与临床分型、有无吸烟史、肿瘤大小、性别及年龄方面的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。喉癌组织中 LMVD 表达水平明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),与淋巴结转移显著相关($P < 0.05$),与分化程度、临床分期、临床分型、有无吸烟史、肿瘤大小、性别及年龄不相关($P > 0.05$)。PTTG 和 VEGF-C 在喉癌组织中表达呈显著正相关($P < 0.05$)。LMVD 分别与喉鳞癌组织中 PTTG 和 VEGF-C 蛋白表达正相关($P < 0.05$)。结论 PTTG 和 VEGF-C 在喉癌的发展中起重要作用,二者的检测可作为喉癌转移及预后的预判指标,有望成为新的基因治疗靶点。

关键词:血管内皮生长因子-C;喉肿瘤;微淋巴管密度;垂体肿瘤转化基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)04-0434-03

The expression of PTTG, VEGF-C and LMVD in laryngeal carcinoma and the relationship among them

Gao Shan¹, Lu Guoyou², Wang ZhuJun^{1△}, Xu Qin¹, Xin Guohua¹, Liu Jina¹, Huang Yueyan¹

(1. Department of Otolaryngology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China;

2. Department of Comprehensive, Chengde Stomatological Hospital, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of PTTG and VEGF-C in laryngeal carcinoma and the effect of angiogenesis. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of PTTG, VEGF-C and LMVD in 60 cases of laryngeal carcinoma and 32 cases of para-carcinoma tissue. D2 40 positive products was used to locate lymphatic endothelial cell cytoplasm and cell membrane, and count lymphatic microvessel density(LMVD). **Results** The expression of PTTG and VEGF-C in laryngeal carcinoma was significantly higher than that in para-carcinoma tissue($P < 0.05$). In laryngeal carcinoma, the expression of PTTG and VEGF-C were associated with differentiation, lymph node metastasis and clinical stage($P < 0.05$), but independent of clinical classification, smoking history, tumor size, sex and gender($P > 0.05$). The expression of LMVD in laryngeal carcinoma was significantly higher than that in para-carcinoma tissue($P < 0.05$). The expression of LMVD was associated with lymph node metastasis($P < 0.05$), but independent of differentiation, clinical classification, clinical stage smoking history, tumor size, sex and gender($P > 0.05$). A significantly positive relation was found between PTTG and VEGF-C($P < 0.05$). And there were positive relation between PTTG and LMVD, VEGF-C and LMVD($P < 0.05$). **Conclusion** PTTG and VEGF-C might play an important role in the carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma. PTTG and VEGF-C could be a prognostic factor of colorectal cancer and a new target of gene therapy.

Key words: vascular endothelial growth factor C; laryngeal neoplasm; density of microvessels; PTTG

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,主要病理类型为鳞状细胞癌,其发病率逐年上升,癌细胞转移成为影响其预后的主要原因。垂体肿瘤转化基因(PTTG)是从垂体瘤组织中分离出的原癌基因,其高表达在促进细胞增殖转化以及体内肿瘤形成中有重要作用。血管内皮生长因子-C(VEGF-C)是目前发现的惟一可调节胚胎组织淋巴管生成的因子,是 PTTG 反式激活靶基因之一,可作为 PTTG 介导微淋巴管生成的效应剂。本研究检测 PTTG 和 VEGF-C 在 60 例喉鳞癌组织中的表达及其与微淋巴管生成的关系,探讨二者对喉癌发生、发展的作用及意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 60 例喉癌组织及 32 例喉癌相应癌旁组织(距离肿瘤切缘至少大于 0.5 cm^[1])取自 2005 年 6 月至 2011 年 12 月于承德医学院附属医院耳鼻咽喉科住院手术 60 例原

发喉鳞癌患者。术前均未接受放、化疗,标本为手术切除后 1 h 内获得,标本获得后经 10% 甲醛固定、石蜡包埋、4 μm 厚度连续切片。所有标本均经过病理学检查确诊。60 例喉鳞癌患者中,男 52 例,女 8 例;年龄 42~74 岁,中位年龄 60 岁, <60 岁 33 例, ≥60 岁 27 例;采用 2010 年国际抗癌协会(UICC)公布的 TNM 分类分期标准, I、II 期 36 例, III、IV 期 24 例。有淋巴结转移 22 例,无淋巴结转移 38 例(有无淋巴结转移根据术后病理而定);声门上型 30 例,声门型 30 例;发病前吸烟史 20 年以上(每日大于 20 支)者 48 例为吸烟组,其余 12 例为对照组;肿瘤小于 3 cm 者 40 例,肿瘤大于或等于 3 cm 者 20 例;高分化(G₁ 级)35 例,中低分化(G₂~G₃ 级)25 例。

1.2 试剂和仪器耗材 兔抗人 PTTG、VEGF-C 多克隆抗体及鼠抗人 D2-40 单克隆抗体均购自北京中杉金桥公司。

1.3 方法 采用免疫组织化学 SP 法,每例标本解冻后经甲

作者简介:高珊(1979—),主治医师,硕士,主要从事耳鼻咽喉头颈外科方向研究。△ 通讯作者, Tel:13722368983; E-mail: xuqin4463@

醛固定 24 h 内行石蜡包埋,连续切取切片 3 张,分别进行 PT-TG、VEGF-C 和 D2-40 染色石蜡切片(5 μm),常规脱蜡至水,3%过氧化氢室温孵育 10 min,抗原修复 15 min,室温放置 40 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,小牛血清封闭 10 min,滴加一抗 50 μL(1:100 工作液)4℃过夜,PBS 冲洗,加二抗,室温孵育 15 min,PBS 冲洗,DAB 显色 5 min,终止显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,透明,封片,镜检。

1.4 结果判定 PTTG、VEGF-C 主要表达于细胞质或细胞核(多数在细胞质),以出现棕黄色颗粒为阳性反应。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知喉癌阳性组织切片为阳性对照。采用 Volm 双评分法进行判定在染色均匀的肿瘤区,选取 5 个高倍镜视野(×200):(1)按染色阳性细胞百分率(A 值)评分,阴性为 0 分,<25%为 1 分,25%~50%为 2 分,>50%为 3 分;(2)按染色强度(B 值)评分,不着色为 0 分,浅棕色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。综合 A、B 值判断结果,阴性:0 分,阳性:1~6 分。

微淋巴管密度(LMVD)判定:采用 D2-40 染色微淋巴管内皮,阳性的微淋巴管内皮细胞胞质呈棕黄色颗粒。微淋巴管计数根据 Weidener 法,先用 100 倍镜扫视整个切片,寻找肿瘤组织内微淋巴管最丰富的区域即“热点”,然后在 200 倍镜下计数每一热点的微淋巴管数目(忽略管径大于 8 个红细胞或管壁有平滑肌存在的脉管),由两人采用双盲法进行计数。结果采用 2 个热点、5 个 200 倍视野下微血管数目的平均值作为 LMVD。以上结果的判定均由两位不知患者临床病理资料的病理科医师进行。

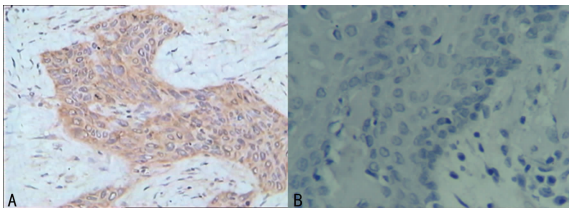
1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。采用 Spearman 等级相关分析蛋白,LMVD 表达的相关性。计数资料采用 χ^2 检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PTTG、VEGF-C 蛋白在喉癌组织、癌旁组织中均有表达 在 60 例喉癌组织标本中,PTTG 蛋白表达的阳性率为 70.0%,在癌旁组织表达的阳性率 37.5%,PTTG 蛋白在喉癌组织的表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义(*P*<0.05)。VEGF-C 在喉癌组织中阳性表达率为 68.33%,在癌旁组织中阳性表达率 12.5%,VEGF-C 蛋白在喉癌组织的表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1,图 1、2。

表 1 喉癌组织、癌旁组织中 PTTG、VEGF-C 蛋白表达的比较[n(%)]			
组织	<i>n</i>	PTTGL 阳性	VEGF-C 阳性
喉癌组织	60	42(70.0)*	41(68.33)*
癌旁组织	32	12(37.5)	4(12.5)

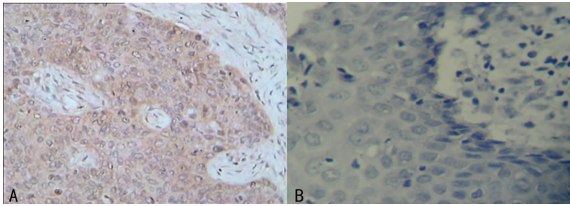
*: *P*<0.05,与癌旁组织比较。



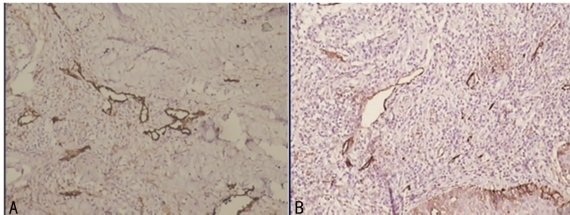
A: 高表达;B: 低表达。
图 1 PTTG 蛋白在喉癌组织中表达(SP×400)

2.2 LMVD 在喉癌组织、癌旁组织中的表达 喉癌组织 LM-

VD 值在高倍视野下为(23.08±3.14),明显高于癌旁组织(14.71±2.50),差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 3。



A: 高表达;B: 低表达。
图 2 VEGF-C 蛋白在喉癌组织中的表达(SP×400)



A: 喉癌组织;B: 癌旁组织。
图 3 D2-40 在组织中表达(SP×200)

2.3 PTTG、VEGF-C 的表达与喉癌组织中的淋巴结转移、临床分期、分化程度的关系 PTTG、VEGF-C 的表达均与喉癌组织中的淋巴结转移、临床分期、分化程度相关(*P*<0.05),与喉癌组织中的肿瘤大小、吸烟量、年龄及性别无相关性(*P*>0.05)。LMVD 与淋巴结转移有相关性(*P*<0.05),与临床分期、分化程度、肿瘤大小、吸烟量、年龄及性别无相关性(*P*>0.05)。

2.4 PTTG、VEGF-C 在喉癌组织表达的相关性 PTTG 表达阳性的 42 例喉癌组织中,VEGF-C 阳性 31 例(73.81%);VEGF-C 表达阳性的 41 例喉癌组织中,PTTG 阴性 34 例(82.93%)。PTTG 与 VEGF-C 在喉癌组织中表达呈正相关,差异有统计学意义(*r*=0.67,*P*<0.05)。

2.5 喉癌组织中 PTTG、VEGF-C 表达各组的 LMVD 值比较 喉癌组织中 VEGF-C 表达阳性组 LMVD 值(27.83±4.03),显著高于 VEGF-C 阴性表达组 LMVD 值(23.53±3.40),差异有统计学意义(*P*<0.05)。PTTG 表达阳性组 LMVD 值(27.63±4.81),高于 PTTG 表达阴性组 LMVD 值(24.59±4.09),差异有统计学意义(*P*<0.05)。

3 讨 论

PTTG 作为原癌基因,在大多数正常组织中不表达,除在垂体肿瘤中有高表达外,其他的恶性肿瘤细胞中也高表达^[1-3]。PTTG 高表达在肿瘤发生中的作用机制可能有:(1)PTTG 通过激活转染细胞中的 C-myc 原癌基因从而发挥转录因子的作用^[4];(2)PTTG 在肿瘤组织中的高表达可以促进 bFGF 转录和分泌,导致细胞转化,从而促进肿瘤中出现有丝分裂、血管生成、调控激素分泌^[5];(3)PTTG 蛋白抑制姊妹染色体单体分离,破坏细胞分裂导致染色体稳定性破坏,非整倍体形成,赋予其成瘤活性^[6];(4)PTTG 通过反式激活作用激活原癌基因、生长因子等间接致癌;(5)PTTG 基因调控区的突变引起其调控失常,导致其高表达,引起肿瘤细胞转化;(6)PTTG 具有细胞凋亡和染色体非整倍体性的双重作用。以上决定了 PTTG 与恶性肿瘤发生、发展及预后关系密切。

目前,对于肿瘤淋巴管生成的研究已成为热点,VEGF-C 被认为是已知最具特异性的淋巴管内皮生长刺激因子,其高表达可促进淋巴管增生及淋巴道转移^[7]。VEGF-C 是具有高度

特异性的血管内皮分裂原,可诱导血管新生增加新生血管的通透性。VEGF-C 可能通过促进淋巴管形成并增生,从而增加淋巴管与肿瘤细胞接触面积使之利于出现转移,同时通过淋巴管数目的增加及接触面积的加大产生挤压现象使淋巴管通透性和肿瘤间质间的压力增加,更利于肿瘤细胞进入淋巴管及静脉血管^[8]。Wiericnkx 等^[1]研究发现,肿瘤边缘区 LMVD 增加与淋巴结转移密切相关。王璟璐等^[9]发现,VEGF-C 不仅与肿瘤浸润深度、淋巴结转移以及 Duke's 分期相关,还与癌组织中 LMVD 密切相关。Tes 等^[10]在喉鳞癌组织中通过免疫组织化学检测到 VEGF-C 高表达。大量研究证实,PTTG 可以上调 DNA 结合抑制蛋白-3(ID3),而 VEGF-C 介导血管发生的最重要介质就是 ID3,PTTG 促进 VEGF-KDR-ID3 自分泌途径,促进癌细胞生长及转移^[11-12],这与本实验结果中 PTTG 与 VEGF-C 显著正相关相印证。本研究还显示,随着 PTTG 表达的增高,VEGF-C 与 LMVD 表达亦增强,且喉癌组中 VEGF-C 表达明显高于癌旁组,且 PTTG、VEGF-C 及 LMVD 与喉鳞癌组织的淋巴结转移、临床分期、分化程度密切相关。提示在喉癌发生、发展过程中 PTTG、VEGF-C 发挥了重要作用,笔者推测该机制可能是 PTTG 高表达后通过上调生长因子受体从而诱导 VEGF-C 表达增高,即正性调节,而 VEGF-C 表达增高又通过刺激淋巴管内皮细胞数目和面积增生,从而挤压迁移促进癌组织中肿瘤微淋巴管大量生成及肿瘤淋巴道转移。PTTG 诱导 VEGF-C 表达的作用机制可能为:MAPK 级联活化增强 PTTG 反式激活作用,促进 PTTG 转移入核内,PTTG 入核后结合于 VEGF-C 转录起始位点,继而激活 VEGF-C 转录、翻译,促进肿瘤微血管淋巴管生成^[13]。

本研究采用免疫组织化学检测喉癌组织中 PTTG、VEGF-C 的表达以及肿瘤微淋巴管密度关系,结果显示,PTTG、VEGF-C 在喉癌组织中呈显著正相关表达关系,二者表达与喉癌的淋巴结转移、临床分期、肿瘤分化程度密切相关。同时,PTTG、VEGF-C 高表达的喉癌组织中 LMVD 也高的结果说明该喉癌组织内存在大量微淋巴管增生现象,且多位于肿瘤间质,LMVD 与喉癌转移、复发及预后密切相关。

综上所述,PTTG、VEGF-C 可作为喉癌转移及预后的评判标准。如能通过某种途径抑制 PTTG 表达可降低喉癌的侵袭力及抑制 VEGF-C 过度表达,从而减少癌细胞通过淋巴道转移的概率。以上或能为喉癌基因靶点治疗研究提供一定的思路。

参考文献:

- [1] Wiericnkx A, Auger C, Devauchelle P, et al. A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2007, 14(3):887-900.
- [2] Genkai N, Homma J, Sano M, et al. Increased expression of pituitary tumor transforming gene(PTTG)-1 is corre-

lated with poor prognosis in glioma patients[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(6):1569-1574.

- [3] Rehfeld N, Geddert H, Atamna A, et al. The influence of the pituitary tumor transforming gene-1 (PTTG-1) on survival of patients with small cell lung cancer and non-small cell lung cancer[J]. *J Carcinog*, 2006, 20(5):4.
- [4] Yu R, Heaney AP, Lu W, et al. Pituitary tumor transforming gene causes aneuploidy p53-independent apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(47):36502-36505.
- [5] Chen L, Puri R, Lefkowitz EJ, et al. Identification of the human pituitary tumor transforming gene(hPTTG) family: molecular structure, expression, and chromosomal localization[J]. *Gene*, 2000, 248(1/2):41-50.
- [6] Kim D, Pemberton H, Stratford AL, et al. Pituitary tumor transforming gene(PTTG) induce genetic instability in thyroid cell[J]. *Oncogene*, 2005, 24(30):4861-4867.
- [7] Latham AM, Molina-Paris C, Homer-Vanniasinkam S, et al. An integrative model for vascular endothelial growth factor A as a tumour biomarker[J]. *Integr Biol(Camb)*, 2010, 2(9):397-407.
- [8] Yuan HQ, Kong F, Wang XL, et al. Inhibitory effect of a-cetyl-11-keto-beta-boswellic acid on androgen receptor by interference of Spl binding activity in prostate cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75(11):2112-2121.
- [9] 王璟璐, 邢丽娜. VEGF-C 和 VEGFR-3 在人结肠癌组织中的表达及意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(16):910-913.
- [10] Tes GM, Chan AW, Yu KH, et al. Strong immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor predicts overall survival in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(12):3558-3565.
- [11] Akino K, Akita S, Mizuguchi T, et al. A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration[J]. *J Surg Res*, 2005, 129(1):142-146.
- [12] Kim DS, Franklyn JA, Boelaert K, et al. Pituitary tumor transforming gene(PTTG) stimulates thyroid cell proliferation via a vascular endothelial growth factor/kinase insert domain receptor/inhibitor of DNA binding-3 autocrine pathway[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(11):4603-4611.
- [13] Chien W, Pei L. A novel binding factor facilitates nuclear translocation and transcriptional activation function of the pituitary tumor-transforming gene product[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(25):19422-19427.

(收稿日期:2013-08-27 修回日期:2013-10-30)

(上接第 433 页)

- [11] Ferreira AA, Bunn-Moreno MM, Sant'Anna CC, et al. BCG vaccination in low birth weight newborns; analysis of lymphocyte proliferation, IL-2 generation and intradermal reaction to PPD[J]. *Tuber Lung Dis*, 1996, 77(5):476-481.
- [12] Hennessy B. Is tuberculin testing before BCG vaccination necessary for children over three months of age[J]. *Ir*

Med J, 2008, 101(3):72-74.

- [13] Soares AP, Kwong Chung CK, Choice T, et al. Longitudinal changes in CD4(+) T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns[J]. *J Infect Dis*, 2013, 207(7):1084-1094.

(收稿日期:2013-09-15 修回日期:2013-11-07)