

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.22.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 22-0044-05

临床研究 · 论著

食管癌组织中 VEGF-C 表达量与淋巴管新生及肿瘤组织生长的相关性

李永辉, 李婷婷, 郭强, 王瑞尧, 张标, 刘芳, 王坤
(河北大学附属医院 胸外科, 河北 保定 071000)

摘要: **目的** 研究食管癌组织中血管内皮生长因子 C (VEGF-C) 表达量与淋巴管新生、肿瘤组织生长的相关性。**方法** 选取 2012 年 4 月 -2015 年 10 月在河北大学附属医院手术切除的食管癌组织作为临床标本, 采用免疫组织化学试剂盒对食管癌组织中 VEGF-C、D2-40 进行染色, 判读 VEGF-C 的阳性表达率以及 D2-40 阳性表达的淋巴管密度 (LVD); 采用荧光定量聚合酶链反应试剂盒测定 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量。**结果** 低未分化、TNM III、IV、有淋巴结转移的食管癌组织中 VEGF-C 阳性率、LVD 以及 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量均高于中高分化、TNM I、II 期、无淋巴结转移的食管癌组织; VEGF-C 阳性表达的食管癌组织中 LVD 以及 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量均高于 VEGF-C 阴性表达的食管癌组织。**结论** 食管癌组织中高表达的 VEGF-C 与淋巴管新生以及肿瘤组织生长密切相关。

关键词: 食管癌; 血管内皮生长因子 C; 淋巴管新生; 增殖

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Correlation of VEGF-C expression with lymph vessel regeneration and tumor growth in esophageal carcinoma

Yong-hui Li, Ting-ting Li, Qiang Guo, Rui-yao Wang, Biao Zhang, Fang Liu, Kun Wang
(Department of Thoracic Surgery, Affiliated Hospital of Hebei University,
Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To study the correlation of expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) with lymph vessel regeneration and tumor growth in esophageal carcinoma. **Methods** Esophageal cancer tissues from surgical resection in our hospital from April 2012 to October 2015 were collected as clinical specimens. VEGF-C and D2-40 in the esophageal cancer tissues were stained by immunohistochemical kit, VEGF-C positive expression rate and lymphatic vessel density (LVD) with positive expression of D2-40 were judged. qRT-PCR was applied to determine mRNA content of Ki-67 and cyclin B1. **Results** The VEGF-C positive rate, LVD and mRNA content of Ki-67 and cyclin B1 in the poorly-differentiated and undifferentiated, TNM stages III and IV, lymph node metastatic esophageal cancer tissues were significantly higher than those in the medium- and well-differentiated, TNM stage I and II, no lymph node metastatic esophageal cancer tissues ($P < 0.05$). LVD and mRNA content of Ki-67 and cyclin B1 in the esophageal cancer tissues with positive expression of VEGF-C were significantly higher than those in the esophageal carcinoma tissue with VEGF-C negative expression ($P < 0.05$). **Conclusions** High expression of VEGF-C in esophageal cancer tissues is closely related to lymphatic regeneration and growth of tumor tissues.

Keywords: esophageal carcinoma; vascular endothelial growth factor C; lymphatic regeneration; proliferation

收稿日期: 2017-10-17

[通信作者] 郭强, E-mail: lyhl197110@163.com; Tel: 0312-5981262

食管癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤之一, 早期诊断率较低且预后较差、死亡率较高。淋巴结转移是食管癌重要的转移途径, 区域淋巴结转移是造成肿瘤复发、远处转移的主要原因, 也是导致预后不良的重要因素^[1-2]。局部组织中新生淋巴管生成是造成癌细胞淋巴结转移的关键环节, 但关于食管癌组织中淋巴管新生的调控机制尚未阐明。血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是 VEGF 家族中具有促进淋巴内皮细胞增殖、诱导新生淋巴管生成作用的成员, 已有研究证实食管癌组织中 VEGF-C 的阳性表达率高于癌旁组织及正常组织^[3]。但是, 关于 VEGF-C 与食管癌组织淋巴管新生、病灶生长的关系仍未见明确报道。本研究分析食管癌组织中 VEGF-C 表达量与淋巴管新生、肿瘤组织生长的相关性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 临床标本

选取 2012 年 4 月 -2015 年 10 月在河北大学附属医院接受手术切除的食管癌组织作为临床标本, 共 86 例。其中, 男性 47 例, 女性 39 例; 年龄 (62.89 ± 7.93) 岁; 根治性手术 63 例, 姑息性手术 23 例; 中高分化 47 例, 低未分化 39 例; TNM I、II 期 44 例, TNM III、IV 期 42 例; 有淋巴结转移 49 例、无淋巴结转移 37 例。所有患者术前均未接受过放化疗, 手术后经病理切片确诊为食管癌。术后将手术切除的食管癌标本分为 2 份, 一份用石蜡包埋、另一份用液氮冷冻。

1.2 免疫组织化学染色结果判读方法

选择石蜡包埋的食管癌组织, 制作石蜡切片后采用武汉博士德生物有限公司 SP 法免疫组织化学染色试剂盒进行实验, 脱蜡至水后滴加 3% 过氧化氢、37℃、5 min, 清洗 2 ~ 3 次后将切片浸入枸橼酸缓冲液并进行抗原热修复 15 min, 而后分别加入 VEGF-C、淋巴管特异性标志物 D2-40 的第一抗体, 37℃ 孵育 1 h 后清洗, 滴加第二抗体后 37℃ 孵育 30 min, DAB 显色、苏木精复染, 最后进行脱水以及中性树脂封片。

1.3 免疫组织化学结果判读方法

VEGF-C 定位于胞浆中、镜下呈棕黄色判断为阳性, 随机观察 5 个高倍视野并计算阳性细胞所占比例, 将染色明显、定位明确且阳性细胞 >20% 的组织切片判断为 VEGF-C 阳性; D2-40 定位于毛细淋巴管内皮

细胞的胞浆, 在低倍镜下观察并选取淋巴管最丰富的区域, 转换为高倍视野并对 D2-40 阳性染色的淋巴管数目进行计数。

1.4 荧光定量聚合酶链反应检测

选择液氮冷冻的食管癌组织, 采用动物组织总 RNA 抽提试剂盒和 cDNA 第一链合成试剂盒进行实验, 抽提食管癌组织中的 RNA 并逆转录为 cDNA。取 cDNA 样本, 设计细胞增殖标志物 Ki-67 和细胞周期素 B1 (Cyclin B1) 的特异性引物并进行荧光定量聚合酶链反应, 根据荧光定量聚合酶链反应的扩增曲线计算 Ki-67 和 Cyclin B1 的 mRNA 含量。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验, 计数资料以例 (%) 表示, 用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同临床病理特征食管癌组织中的 VEGF-C 表达量及淋巴管密度

不同性别、年龄食管癌组织中 VEGF-C 的阳性率及淋巴管密度 (lymphatic vessel density, LVD) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 低未分化食管癌组织中 VEGF-C 的阳性率及 LVD 与中高分化比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 低未分化均高于中高分化; TNM III、IV 期食管癌组织中 VEGF-C 的阳性率及 LVD 与 TNM I、II 期比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TNM III、IV 期均高于 TNM I、II 期; 有淋巴结转移的食管癌组织中 VEGF-C 的阳性率及 LVD 与无淋巴结转移比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 有淋巴结转移均高于无淋巴转移的食管癌组织。见表 1。

2.2 不同临床病理特征食管癌组织中的增殖分子表达量

不同性别、年龄食管癌组织中 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 低未分化食管癌组织中 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量与中高分化比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 低未分化均高于中高分化; TNM III、IV 期食管癌组织中 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量与 TNM I、II 期比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TNM III、IV 期均

表 1 不同临床病理特征食管癌组织中的 VEGF-C 表达量及 LVD

临床病理特征	例数	VEGF-C 例 (%)	χ^2 值	P 值	LVD/ ($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
年龄							
≥ 60 岁	38	18 (47.37)	2.064	0.151	7.85 ± 0.94	0.382	0.185
<60 岁	48	25 (52.08)			7.72 ± 0.81		
性别							
男	47	24 (51.06)	0.047	0.829	7.90 ± 0.98	0.194	0.127
女	39	19 (48.72)			7.68 ± 0.78		
分化程度							
高中分化	47	16 (34.04)	10.556	0.001	6.03 ± 0.74	8.273	0.009
低未分化	39	27 (69.23)			10.42 ± 1.85		
TNM 分期							
I、II	44	13 (29.55)	16.850	0.000	5.87 ± 0.69	11.382	0.004
III、IV	42	31 (73.81)			11.38 ± 1.94		
淋巴结转移							
无	49	15 (30.61)	17.124	0.000	5.29 ± 0.63	13.419	0.002
有	37	28 (75.68)			12.31 ± 2.03		

高于 TNM I、II 期；有淋巴结转移的食管癌组织中 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量与无淋巴结转移的比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，有淋巴结转移均高于无淋巴结转移的食管癌组织。见表 2。

2.3 不同 VEGF-C 表达量食管癌组织中的 LVD 及增殖分子表达量

VEGF-C 阳性表达的食管癌组织的 LVD 以及 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量与 VEGF-C 阴性表

表 2 不同临床病理特征食管癌组织中的增殖分子表达量 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	例数	Ki-67	t 值	P 值	Cyclin B1	t 值	P 值
年龄							
≥ 60 岁	38	1.07 ± 0.14	0.492	0.108	1.03 ± 0.12	0.374	0.142
<60 岁	48	0.97 ± 0.11			0.96 ± 0.11		
性别							
男	47	1.05 ± 0.12	0.227	0.227	1.06 ± 0.14	0.315	0.193
女	39	0.98 ± 0.13			0.94 ± 0.10		
分化程度							
高中分化	47	0.65 ± 0.08	11.941	0.003	0.57 ± 0.07	14.585	0.002
低未分化	39	1.39 ± 0.23			1.49 ± 0.18		
TNM 分期							
I、II	44	0.61 ± 0.07	13.422	0.001	0.65 ± 0.08	9.384	0.007
III、IV	42	1.45 ± 0.26			1.37 ± 0.16		
淋巴结转移							
无	49	0.57 ± 0.07	18.769	0.000	0.46 ± 0.06	22.627	0.000
有	37	1.60 ± 0.27			1.79 ± 0.22		

达的食管癌组织比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), VEGF-C 阳性表达均高于 VEGF-C 阴性表达。见表 3。

表 3 不同 VEGF-C 表达量食管癌组织中的 LVD 及增殖分子表达量 ($\bar{x} \pm s$)

VEGF-C 表达	LVD	Ki-67	Cyclin B1
VEGF-C 阳性 ($n=48$)	11.96 ± 1.78	1.66 ± 0.22	1.57 ± 0.18
VEGF-C 阴性 ($n=38$)	5.29 ± 0.76	0.53 ± 0.07	0.61 ± 0.08
<i>t</i> 值	12.328	19.769	15.527
<i>P</i> 值	0.003	0.001	0.002

3 讨论

淋巴结转移是食管癌最常见和最主要的转移途径, 它直接决定肿瘤的分期, 影响患者的预后。研究淋巴结转移的发生机制和调控因素对食管癌的早期诊断和判断预后有着重要意义^[4-5]。VEGF-C 是近年来新发现的 VEGF 家族成员之一, 不仅能够促进血管内皮细胞的增殖、诱导新生血管的生成, 还能够作用于淋巴管内皮细胞并促进其增殖, 进而增加局部组织中新生淋巴管的数目^[6-7]。近年来, VEGF-C 促进淋巴管新生的作用受到了越来越多的关注, 已有研究报道^[8-9]食管癌组织中 VEGF-C 的阳性表达率高于癌旁组织以及正常食管组织且 VEGF-C 的表达量与肿瘤的临床病理分期有关。本研究中对不同临床病理特征食管癌组织中 VEGF-C 的表达量进行分析, 所得结果与国内学者毛广显^[8]以及李幼梅^[9]相一致: 食管癌的 TNM 分期越高、分化程度越低, VEGF-C 的阳性表达率越高, 且发生淋巴结转移的食管癌组织中 VEGF-C 的阳性表达率高于未发生淋巴结转移的食管癌组织。

食管癌组织中新生淋巴管的生成能够为癌细胞的区域淋巴结转移提供直接通路, 淋巴管新生过程越旺盛、肿瘤的进展越迅速。VEGF-C 在食管癌中呈高表达的趋势已经得到一致认可, 但 VEGF-C 是否靶向调节食管癌病灶内淋巴管的新生却仍未阐明。为了明确食管癌组织中高表达的 VEGF-C 对淋巴管新生的调控作用, 本研究采用 D2-40 单克隆抗体对淋巴管内皮细胞进行标记并对肿瘤组织中淋巴管进行计数, 由不同临床病理特征食管癌组织中 LVD 的比较可知: 食管癌的 TNM 分期越高、分化程度越低, LVD 越高, 且发生淋巴结转移的食管癌组织中 LVD 高于未发生淋巴结转移的食管癌组织。这就说明肿瘤病灶内的淋巴管新生参与肿瘤的进展、分化和转移过程。进一

步分析不同 VEGF-C 表达情况对 LVD 的影响可知: VEGF-C 阳性表达能够增加食管癌组织的 LVD。这就说明食管癌组织中 VEGF-C 对淋巴管新生具有调控作用, VEGF-C 表达越高、淋巴管数目越多。

在食管癌病情的进展过程中, 局部新生的淋巴管不仅能够为癌细胞的淋巴结转移提供通路, 还能够为肿瘤组织的生长提供所需的营养成分、促进癌细胞的增殖。Ki-67 是细胞增殖相关的核抗原, 是反映细胞增殖活力的常用指标, 其表达量越高、细胞增殖越旺盛; Cyclin B1 是调节细胞周期的重要蛋白质, 与 CDK1 结合后能够加速细胞周期的发展、促进细胞的增殖^[10-12]。本研究对食管癌组织中 Ki-67、Cyclin B1 表达量的分析来反映肿瘤病灶内细胞增殖的状态, 结果显示, 食管癌的 TNM 分期越高、分化程度越低, Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量越高, 且发生淋巴结转移的食管癌组织中 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量高于未发生淋巴结转移的食管癌组织。进一步分析不同 VEGF-C 表达情况对 Ki-67、Cyclin B1 表达的影响可知: VEGF-C 阳性表达能够增加食管癌组织的 Ki-67、Cyclin B1 的 mRNA 含量。这就说明食管癌组织中 VEGF-C 对细胞增殖具有调控作用, VEGF-C 表达越高、Ki-67 和 Cyclin B1 的表达量越高、细胞增殖越活跃。

综上所述, 食管癌组织中高表达的 VEGF-C 与淋巴管新生以及肿瘤组织生长密切相关, VEGF-C 能够促进新生淋巴管的形成以及肿瘤组织内细胞的增殖。

参 考 文 献:

- [1] SCHIEFER A I, SCHOPPMANN S F, BIRNER P. Lymphovascular invasion of tumor cells in lymph node metastases has a negative impact on survival in esophageal cancer[J]. *Surgery*, 2016, 160(2): 331-340.
- [2] NINOMIYA I, OKAMOTO K, TSUKADA T, et al. Recurrence patterns and risk factors following thoroscopic esophagectomy with radical lymph node dissection for thoracic esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Mol Clin Oncol*, 2016, 4(2): 278-284.
- [3] YANG Z, WANG Y G, SU K. VEGF-C and VEGF-D expression and its correlation with lymph node metastasis in esophageal squamous cell cancer tissue[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(1): 271-274.
- [4] YANG X, ZHAI N, SUN M, et al. Influence of lymphatic endothelial cells on proliferation and invasiveness of esophageal carcinoma cells in vitro and lymphangiogenesis in vivo[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(8): 222.
- [5] 王亚敏, 向正国, 马上吉, 等. 中期因子在食管鳞状细胞癌中的表达及生物学功能研究[J]. *海南医学院学报*, 2015, 21(5): 588-591.

- [6] OMOTO I, MATSUMOTO M, OKUMURA H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor-3 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(4): 1027-1032.
- [7] 樊善继, 徐海帆, 胡泽成, 等. 大肠癌患者组织多项基质金属蛋白、VEGF-C、VEGF-D、Ets-1、CD44v6 及 VEGFR-3 的变化[J]. *海南医学院学报*, 2014, 20(2): 177-179.
- [8] 毛广显, 谢远财, 牟志民, 等. 食管癌中血管内皮生长因子 -C、趋化因子受体 CXCR4 和环氧化酶 -2 的表达及其在淋巴结转移中的作用[J]. *广东医学*, 2016, 37(10): 1528-1530.
- [9] 李幼梅, 祝淑钗, 沈文斌, 等. 食管癌组织 VEGF-C SDF-1/ CXCR4 的表达及其与淋巴结转移关系的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(11): 643-647.
- [10] SUNPAWERAVONG S, PUTTAWIBUL P, SUNPAWERAVONG P, et al. Correlation between serum SCCA and CYFRA 2 1-1, tissue Ki-67, and clinicopathological factors in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *J Med Assoc Thai*, 2016, 99(3): 331-337.
- [11] 李丽, 李雪婷, 张振华, 等. 食管癌变过程中 CyclinB1、CDK1 及细胞周期调控因子 p53、Rb 的表达及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(31): 4968-4974.
- [12] SANTALA S, TALVENSAAARI-MATTILA A, SOINI Y, et al. Prognostic value of cyclin B in endometrial endometrioid adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 953-957.

(张蕾 编辑)