

• 论著 •

食管鳞癌组织中 VEGF-D 表达及其与淋巴管密度和淋巴转移的关系

叶 武 陈 洪 刘鹏飞 刘兵团

摘要:目的 研究食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中血管内皮细胞生长因子 D(VEGF-D)的表达情况及其与淋巴管密度(LVD)的关系,并探讨其与食管癌淋巴结转移的关系。方法 免疫组化 SABC 法检测 55 例手术切除的食管鳞状细胞癌组织、癌旁组织、正常组织中淋巴管密度和 VEGF-D 的表达水平,对结果进行统计分析。结果 (1)食管癌组织内 LVD 为 6.6582 ± 2.0489 个/HPF,显著高于癌旁组织(5.7527 ± 1.4631 个/HPF)及正常组织(5.5782 ± 1.4553 个/HPF)(P 均 < 0.05);(2)食管癌组织中 VEGF-D 阳性表达率为 43.6%,显著高于癌旁组织(16.4%)及正常组织(12.7%)(P 均 < 0.05);(3)食管癌组织中 VEGF-D 表达强度与 LVD 之间呈正相关($r = 0.9985, P < 0.05$);(4)食管癌患者中,淋巴结阳性组中 VEGF-D 阳性率(69.2%)及 LVD(7.9308 ± 2.0055 个/HPF)均显著高于淋巴结阴性组(20.7%, 5.5172 ± 1.2857 个/HPF)(P 均 < 0.05)。结论 (1)食管癌组织中 LVD 增高 VEGF-D 呈高表达,且两者呈正相关,推测 VEGF-D 能诱导食管癌组织中的淋巴管生成;(2)LVD 和 VEGF-D 表达强度检测与食管癌淋巴结转移相关。

关键词:食管鳞状细胞癌;血管内皮生长因子 D;淋巴管密度;淋巴转移;免疫组化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2011.06.015

Expression of VEGF-D in esophageal squamous cell carcinoma and the correlation with lymphatic vessel density and lymphatic metastasis YE Wu, LIU Peng-Fei, LIU Bing-Tuan. Department of Gastroenterology, Jiangyin Hospital, Southeast University, Jiangyin (214400), China; CHEN Hong. Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Jiangyin (210009), China

Abstract: **Objective** To study the expression of vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its correlation with lymphatic vessel density (LVD), and investigate the correlation with lymphatic metastasis of ESCC. **Methods** Fifty-five cases of esophageal squamous cell carcinoma with complete clinical data were included in this study. Immunohistochemical analysis was used to detect the expression of VEGF-D and LVD in carcinoma tissues, adjacent noncancerous tissues and corresponding normal tissues. Then the correlation of the expression of VEGF-D and LVD and lymphatic metastasis was analyzed by statistic methods. **Results** (1) LVD in carcinoma tissues (6.6582 ± 2.0489 /HPF) was significantly higher than that in adjacent noncancerous tissues (5.7527 ± 1.4631 /HPF) and corresponding normal tissues (5.5782 ± 1.4553 /HPF) ($P < 0.05$). (2) The positive rate of VEGF-D in carcinoma tissues (43.6%) was significantly higher than that in adjacent noncancerous tissues (16.4%) and corresponding normal tissues (12.7%) ($P < 0.05$). (3) There was positive correlation between the expression strength of VEGF-D and LVD ($r = 0.9985, P < 0.05$). (4) The positive rate of VEGF-D and LVD in the positive lymph node group were significantly higher than those in the negative lymph node group (69.2% vs 20.7%, 7.9308 ± 2.0055 /HPF vs 5.5172 ± 1.2857 /HPF, $P < 0.05$). **Conclusions** (1) The Expression of VEGF-D and LVD are high in ESCC, and LVD overpress is associated with elevated VEGF-D, it is probably that VEGF-D can lead to lymphangiogenesis of ESCC. (2) LVD and the expression strength of VEGF-D in ESCC could be the important index for lymph node metastasis of ESCC.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; VEGF-D; Lymphatic vessel density; Lymphatic metastasis; Immunohistochemistry

由于食管壁没有浆膜层而且淋巴引流丰富,淋巴管引流至区域性淋巴结直接进入胸导管,所以淋

巴结早期广泛转移是食管癌的临床特点。因此,淋巴结转移是决定食管癌预后的一个主要因素。探索食管癌淋巴转移的机制,在此基础上寻找可能的治疗手段是提高食管癌疗效的关键。我们对食管鳞癌组织中血管内皮细胞生长因子 D(VEGF-D)的

表达进行检测,以探讨 VEGF-D 与淋巴管密度(LVD)的关系,同时探讨 VEGF-D 及 LVD 在食管鳞癌的淋巴转移中的作用,为食管癌淋巴转移的早期诊断提供新的线索,并为食管癌的治疗提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

东南大学医学院附属江阴医院有完整临床及病理资料的食管鳞状细胞癌根治术标本共 55 例。所有病例术前均未进行放射及化学治疗,其中男 38 例,女 17 例,年龄 45~75 岁,中位年龄 60 岁。食管癌组织中 26 例有淋巴结转移,29 例无淋巴结转移;高分化 12 例,中分化 28 例,低分化 15 例;浸润深度 T₁13 例,T₂15 例,T₃21 例,T₄6 例。所有标本均经 10% 中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,并经病理组织学证实。具体取材方法:(1)食管癌组织:癌灶边缘向内取材;(2)癌旁组织:癌灶边缘向外 2 cm 取材;(3)正常组织:距癌灶边缘 5 cm 以上的切缘取材。兔抗人 VEGF-D、Podoplanin 多克隆抗体及即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

切片常规脱蜡,微波抗原修复。VEGF-D 及 Podoplanin 多克隆抗体按 1:200 稀释,然后按试剂说明的步骤进行操作,最后 DAB 显色,常规复染封片。以 PBS 液代替一抗作阴性对照,博士德生物工程有限公司提供的阳性片为阳性对照。(1)VEGF-D 免疫组化结果的判断:根据文献^[1]方法进行。高倍镜(×200)下,每张切片随机观察 5 个视野,首先以胞质内出现特异性染色的深浅程度进行评分:基本不着色 0 分,淡黄色 1 分,黄色 2 分,棕褐色 3 分;再将染色细胞所占计数细胞的百分比打分:染色细胞数<1%为 0 分,染色细胞数 1%~10%为 1 分,染色细胞数 11%~50%为 2 分,染色细胞数>50%为 3 分。两项乘积即为该视野免疫组化得分,5 个视野的平均分为该例免疫组化得分。其中 0~2 分为(-),3~4 分为(+),5~7 分为(++),8~9 分为(+++)。(2)淋巴管密度的判断:根据文献^[2]的方法进行。将 Podoplanin 染色阳性的脉管数作为淋巴管密度(光镜下 Podoplanin 染色阳性的棕褐色的管腔样结构为淋巴管)。先在低倍镜(×100)下确定脉管着色最密集区(热区),然后在高倍镜(×200)下计数 5 个高倍视野中阳性脉管数,取均数

作为该切片的淋巴管密度。

1.3 统计学处理

数据的统计处理应用 SPSS11.5 统计软件包进行。两或多个独立样本计数资料率的比较采用卡方检验;计量资料结果以均数±标准差表示,两个独立样本均数比较采用 *t* 检验,多个样本均数比较采用方差分析;两个变量相关性分析采用双变量相关分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 三种组织中淋巴管密度的检测结果

在肿瘤组织边缘可见 Podoplanin 染色阳性的淋巴管,着色部位位于内皮细胞的细胞膜上,主要表达于由单层内皮细胞构成、管壁较薄、外周无周细胞、无平滑肌的脉管,管腔内无红细胞,有的管腔内可见絮状物,有的管腔内则见癌栓。以每个高倍视野(×200)中 Podoplanin 染色阳性的脉管数为淋巴管密度(LVD),结果发现,食管癌组织中的淋巴管密度为 6.6582±2.0489 个/HPF,与癌旁组织(5.7527±1.4631 个/HPF)、正常组织(5.5782±1.4553 个/HPF)相比差异有统计学意义(*P*<0.05,见表 1),而在癌旁组织与正常组织间未见统计学差异(*P*>0.05)。提示食管癌组织中淋巴管生成增加。

表 1 三种组织中淋巴管密度检测结果

组别	淋巴管密度(个/HPF)	<i>F</i>	<i>P</i>
食管癌组织	6.6582±2.0489 ^a		
癌旁组织	5.7527±1.4631 ^b	6.56	0.0018
正常组织	5.5782±1.4553 ^c		

注:^a与^b比较:*t*=2.6673,*P*=0.0088;^a与^c比较:*t*=3.1870,*P*=0.0019;^b与^c比较:*t*=0.6271,*P*=0.5319

2.2 VEGF-D 在三种组织中的表达情况

检测结果表明,VEGF-D 在食管癌组织、癌旁组织及正常组织中均有不同程度的表达,免疫组织化学染色的阳性物质主要位于肿瘤细胞或正常上皮细胞质内,呈淡黄色至棕黄色颗粒状。VEGF-D 在食管癌组织中的阳性(+~+++)表达率为 43.6%,较其在癌旁组织(16.4%)、正常组织(12.7%)差异有统计学意义(*P*<0.05),VEGF-D 在癌旁组织与正常组织中的表达未见差异有统计学意义(*P*>0.05)。VEGF-D 在三组中的强阳性(+++)及中等阳性(++)表达率分别为 14.6%、1.8%、1.8%和 20.0%、5.5%、3.6%,食管癌组织和癌旁组织或正常组织相比差异有统计学意义(*P*<0.05),癌旁组织和正常组织相比则

差异无统计学意义($P>0.05$); VEGF-D 在三组中的弱阳性(+)表达率分别为 9.1%、9.1%、7.3%,三组间两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示 VEGF-D 在食管癌组织中高表达,且表达强度(中等阳性及强阳性)高于癌旁组织及正常组织。见表 2。

表 2 VEGF-D 在三种组织中的表达情况

组别	-	+	++	+++	阳性率(%)
食管癌组织	31	5	11	8	43.6 ^a
癌旁组织	46	5	3	1	16.4 ^b
正常组织	48	4	2	1	12.7 ^c

注:^a与^b比较: $t=9.7403, P=0.0018$; ^a与^c比较: $t=12.9808, P=0.0003$; ^b与^c比较: $t=0.2926, P=0.5886$

2.3 VEGF-D 表达强度与淋巴管密度关系

根据食管癌组织中 VEGF-D 表达强度将所有病例分为四组(-、+、++、+++),统计各组的淋巴管密度(LVD)。结果发现随着 VEGF-D 表达强度的增强,淋巴管密度有增加的趋势,两者呈正相关($r=0.9985, P<0.05$),见表 3。提示 VEGF-D 与食管癌组织中淋巴管的生成相关。

表 4 VEGF-D、淋巴管密度与淋巴结转移、TNM 分期的关系

临床病理参数	例数	VEGF-D 阳性(%)	χ^2	P	淋巴管密度(个/HPF)	t	P
淋巴结转移							
有	26	18(69.2)	13.1335	0.0003 ^a	7.9308 ± 2.0055	5.3688	0.0000 ^a
无	29	6(20.7)			5.5172 ± 1.2857		
TNM 分期							
I - II	38	11(28.9)	10.7853	0.0010 ^a	5.8895 ± 1.7477	4.8559	0.0000 ^a
III -IV	17	13(76.5)			8.3294 ± 1.6612		

注:^a表示差异有统计学意义

3 讨论

Podoplanin 是 1999 年在肾小球足突细胞上发现的一种膜蛋白^[3],目前已成为一种新的淋巴管内皮标志物。目前多数研究将其作为鉴别淋巴管和精确评估淋巴管密度有价值的标志物^[4]。本研究发现 podoplanin 作为淋巴管标志物有较好的特异性,表达于淋巴管内皮细胞膜上,染色清晰,背景干净,未发现在红细胞填充的血管有表达。本研究显示食管鳞状细胞癌组织中的 LVD 与癌旁组织及正常组织相比差异有统计学意义($P<0.05$),而在癌旁组织与正常组织间的 LVD 则差异无统计学意义($P>0.05$)。食管癌有淋巴结转移组和无淋巴结转移组中淋巴管密度分别为 7.9308 ± 2.0055 个/HPF 和 5.5172 ± 1.2857 个/HPF,两者之间差异有统计学意义($P<0.05$),提示食管癌组织中淋巴管生成增加。已有研究^[5]提示,癌组织中高淋巴管密度可促进癌细胞的淋巴结转移,其机制可能为癌组

表 3 食管癌中 VEGF-D 表达强度与 LVD 的相互关系

VEGF-D	例数	LVD(个/HPF)
-	31	5.3097 ± 1.1110
+	5	6.6000 ± 1.2728
++	11	8.1818 ± 0.9485
+++	8	9.8250 ± 1.3112

注: $r=0.9985, P<0.05$

2.4 食管癌 VEGF-D 表达及淋巴管密度与食管癌淋巴结转移、TNM 分期的关系

食管癌有淋巴结转移组和无淋巴结转移组中淋巴管密度分别为 7.9308 ± 2.0055 个/HPF 和 5.5172 ± 1.2857 个/HPF,两者之间差异有统计学意义($P<0.05$),提示高淋巴管密度与食管癌组织中淋巴管的生成相关。食管癌中 VEGF-D 在有淋巴结转移组和无淋巴结转移组中的阳性表达率分别为 69.2%和 20.7%,两者之间差异有统计学意义($P<0.05$),提示 VEGF-D 的高表达与食管癌组织中淋巴管的生成相关。另外,食管癌 VEGF-D 的阳性表达率及淋巴管密度与食管癌的 TNM 分期差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

织中淋巴管数目增多,增大了癌细胞与淋巴管内皮接触的机会,另外淋巴管仅由单层内皮细胞构成、基底膜缺乏或不连续、内皮细胞间没有紧密连接、没有周细胞,癌细胞易于进入淋巴管;淋巴管中的压力与组织液近似,且淋巴管中没有血液快速流动时的剪切力,这些特点使得癌细胞进入淋巴管后生存率高。

VEGF-D 首先是由 Orlandini 等^[6]从鼠的成纤维细胞中克隆提取的一种受 C-FOS 基因诱导表达的分泌型二聚体糖蛋白,并被命名为 FIGF。1998 年由 Achen 等^[7]在核酸数据库中通过基于计算机的同源性搜索,确认为 VEGF 家族中的新成员,并将其命名为 VEGF-D。有关 VEGF-D 在食管癌中的表达偶有报道,主要是 VEGF-D 与食管癌发生关系方面的研究,VEGF-D 与食管癌淋巴转移的研究很少有报道,且未有明确的结论。本研究采用免疫组织化学的方法对食管鳞癌、癌旁组织和食管正常组织

VEGF-D 表达情况进行检测分析,结果显示 VEGF-D 在食管鳞癌、癌旁组织和正常组织均有不同程度的表达,阳性反应部位位于细胞质。VEGF-D 阳性表达率依正常组织、癌旁组织、癌组织的顺序逐渐增高(分别为 12.7%,16.4%,43.6%),癌组织中 VEGF-D 的阳性表达率与癌旁组织及正常组织相比差异有统计学意义($P<0.05$),而在癌旁组织与正常组织间的阳性表达率则差异无统计学意义($P>0.05$)。VEGF-D 在三组中的强阳性(+++)及中等阳性(++)表达率分别为 14.6%、1.8%、1.8%和 20.0%、5.5%、3.6%,食管癌组织和癌旁组织或正常组织相比差异有统计学意义($P<0.05$),癌旁组织和正常组织相比则差异未见统计学意义($P>0.05$);VEGF-D 在三组中的弱阳性(+)表达率分别为 9.1%、9.1%、7.3%,三组间两两比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示 VEGF-D 在食管癌组织中高表达,且表达强度(中等阳性及强阳性)高于癌旁组织及正常组织。VEGF-D 在食管癌有淋巴结转移组和无淋巴结转移组中的阳性表达率分别为 69.2%和 20.7%,两者之间差异有统计学意义($P<0.05$),提示 VEGF-D 的高表达可能与食管癌的淋巴结转移有关。

本研究通过对 VEGF-D 与 podoplanin 联合检测,并以 podoplanin 标记的阳性脉管数计数 LVD,结果显示:食管鳞癌组织中两者呈现明显高表达,且与食管鳞癌的淋巴结转移及 TNM 分期相比差异有统计学意义($P<0.05$)。VEGF-D 表达强度与 LVD 的相关性分析显示二者呈正相关($r=0.9985$, $P<0.05$),即随着 VEGF-D 表达强度的增强,LVD 有增加的趋势,提示食管鳞癌组织中 VEGF-D 的高

表达可能与食管淋巴管的生成及癌细胞的淋巴结转移有关,可作为食管癌淋巴结转移的参考指标。临床上则表现为与 TNM 分期相关。

参 考 文 献

- 1 杨杨,张国新,施瑞华,等. 人宫颈癌基因蛋白在人肝细胞癌中的表达及其临床意义. 中华肝脏病杂志, 2007, 15: 223-224.
- 2 Ohno M, Nakamura T, Kunitomo Y, et al. Lymphogenesis correlates with expression of vascular endothelial growth factor-C in colorectal cancer. Oncol Rep, 2003, 10: 939-943.
- 3 Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, et al. Podoplanin, a novel 43 KD membrane protein of glomerular epithelial cells, is down regulated in puromycin nephrosis. AM J Pathol, 1997, 151: 1141-1152.
- 4 Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. Breast Cancer Res Treat, 2005, 91: 125-132.
- 5 Kaneko L, Tanaka S, Oka S, et al. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. Dis Colon Rectum, 2007, 50: 13-21.
- 6 Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, et al. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 11675-11680.
- 7 Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 548-553.

(收稿日期:2011-06-20)

(本文编辑:周骏)

《国际消化病杂志》(双月刊)征订启事

《国际消化病杂志》是由上海市卫生局主管,上海市医学科学技术情报研究所主办的国家级学术期刊。自 1963 年创刊以来,相继入选中国学术期刊统计源期刊、中国期刊全文数据库收录期刊、美国化学文摘(CA)、波兰哥白尼索引(IC)、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)等国内外知名数据库。

本刊为消化系疾病专业性刊物,以消化内、外科临床医生和其他专业人员为读者对象,及时介绍国内外有关消化系专业的新进展、新动态、新技术和新成就。本刊学术内容涵盖消化系疾病各领域,包括食管、胃肠、肝、胆、胰腺、脾、内镜、介入治疗及基因技术等相关研究。本刊栏目丰富,包括论著、综述、述评、临床研究、病例报告、文摘等。

本刊单价为 9 元,全年定价¥54 元(邮发代号:4-299)。热忱欢迎本学科及相关学科的临床、教学及科研工作者投稿和订阅本刊。

本刊联系地址:200031 上海市建国西路 602 号《国际消化病杂志》编辑部

Tel:021-33262058 Email:xiaohuafence@sina.com.cn