

VEGF-C 在非小细胞肺癌中的表达及与恶性程度关系的研究

王可毅 解基严^{*①} 闫天生 宋金涛 王 通

(北京大学第三医院胸外科,北京 100191)

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)在非小细胞肺癌中的表达,及其与临床病理指标及预后的关系。 **方法** 选取 1999 年 8 月~2007 年 8 月 94 例接受标准肺癌切除手术的非小细胞肺癌,采用免疫组化方法检测 VEGF-C 蛋白在癌组织及癌旁组织中的表达,结合临床病理及预后资料进行分析。 **结果** VEGF-C 蛋白在肺癌组织中的表达明显高于在癌旁组织中的表达($Z = -5.828, P = 0.000$)。Spearman 等级相关显示,VEGF-C 表达与病理类型($r = 0.341, P = 0.001$)、分化程度($r = 0.317, P = 0.002$)、N 分期($r = 0.385, P = 0.000$)、淋巴结转移($r = 0.345, P = 0.001$)呈正相关。单因素分析显示,病理类型($\chi^2 = 12.432, P = 0.002$)、分化程度($\chi^2 = 10.729, P = 0.005$)、N 分期($\chi^2 = 16.412, P = 0.001$)、淋巴结转移($\chi^2 = 10.958, P = 0.001$)与 VEGF-C 蛋白阳性表达有关。logistic 回归分析显示,与肺癌 VEGF-C 蛋白表达的自变量有 3 个,分别是淋巴结转移($\beta = -1.105, P = 0.046$)、病理类型($\beta = -1.905, P = 0.005$)及分化程度($\beta = -2.296, P = 0.023$)。Cox 模型分析显示,年龄($\beta = 0.057, P = 0.025$)、病理类型($\beta = -1.911, P = 0.034$)及 VEGF-C 阳性表达($\beta = -2.711, P = 0.030$)是影响患者术后生存的危险预后因素。 **结论** VEGF-C 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达明显增高。VEGF-C 阳性提示非小细胞肺癌恶性程度高,预后差。

【关键词】 非小细胞肺癌; 血管内皮生长因子 C; 淋巴结转移; 预后
中图分类号: R734.2 **文献标识:** A **文章编号:** 1009-6604(2013)04-0352-05

Relationship between Expression of Vascular Endothelial Growth Factor C and Malignancy of Non-small Cell Lung Cancer
Wang Keyi*, Xie Jiyan, Yan Tiansheng*, et al. * Department of Thoracic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in non-small cell lung cancer (NSCLC), and the relationship between the expression level and clinicopathological characteristics and prognosis of NSCLC. **Methods** We collected the clinical data of 94 cases of NSCLC, who were admitted to our hospital between August 1999 and August 2007. The expression of VEGF-C in the patients was detected by immunohistochemistry in both the carcinoma and para-cancerous tissues of the lung. The relationship between the expression and the clinicopathological features and prognosis of the patients were analyzed. **Results** The expression of VEGF-C in cancer tissues was significantly higher than those in adjacent tissues ($Z = -5.828, P = 0.000$). Spearman rank correlation analysis showed that the expression of VEGF-C correlated to pathological types ($r = 0.341, P = 0.001$), tumor differentiation grade ($r = 0.317, P = 0.002$), N stage ($r = 0.385, P = 0.000$), and lymph node metastasis ($r = 0.345, P = 0.001$). Univariate analysis showed significant correlation between VEGF-C expression and pathological type ($\chi^2 = 12.432, P = 0.002$), level of tumor differentiation ($\chi^2 = 10.729, P = 0.005$), N stage ($\chi^2 = 16.412, P = 0.001$), and lymph nodes metastasis ($\chi^2 = 10.958, P = 0.001$). Logistic regression analysis showed that lymph node metastasis ($\beta = -1.105, P = 0.046$), pathological types ($\beta = -1.905, P = 0.005$) and tumor differentiation grade ($\beta = -2.296, P = 0.023$) were influencing factors of VEGF-C protein expression. Cox's proportional hazard model analysis showed that the factors influencing survival of the patients with NSCLC included age ($\beta = 0.057, P = 0.025$), pathological type ($\beta = -1.911, P = 0.034$) and the expression of VEGF-C ($\beta = -2.711, P = 0.030$). **Conclusions** The expression of VEGF-C in NSCLC tissues is significantly increased. The level of VEGF-C expression indicates the prognosis of NSCLC.

【Key Words】 Non-small cell lung cancer; Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C); Lymph node metastasis; Prognosis

* 通讯作者, E-mail: xiejijian@163.com
① 心脏外科

80% 的肺癌为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 经淋巴管播散是其重要转移途径, 因此, 淋巴结转移是影响患者预后的主要因素之一, 但肺癌淋巴转移的分子生物学机制尚未阐明。血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 可调节淋巴管内皮细胞增殖淋巴管增生, 促进肿瘤淋巴转移, 称为淋巴管生成因子^[1]。我们采用免疫组化 Envision 二步法染色, 检测 VEGF-C 在 NSCLC 组织中的表达, 探讨其与恶性程度淋巴结转移及预后的关系。

1 临床资料与方法

1.1 一般资料

选择北京大学第三医院胸外科 1999 年 8 月 ~ 2007 年 8 月接受手术的肺癌 94 例。入组标准: ①接受标准肺癌切除手术; ②术后病理证实为 NSCLC; ③术前未放化疗, 术后采用紫杉醇或诺维本联合顺铂方案, 化疗 3 ~ 4 个周期; ④有完整的术后 5 年随访、生存资料及组织标本。

本组 94 例, 男 61 例, 女 33 例。年龄 28 ~ 80 岁, 平均 62.7 岁。肿瘤均为单发, 中央型 21 例, 周围型 73 例。左肺 33 例, 右肺 61 例; 上叶 45 例, 中叶 7 例, 下叶 42 例。肿瘤直径 1.2 ~ 7 cm, 平均 3.2 cm。肿瘤 T 分期: T₁ 23 例, T₂ 52 例, T₃ 15 例, T₄ 4 例。有淋巴结转移 41 例, 无淋巴结转移 53 例; 肿瘤 N 分期: N₀ 53 例, N₁ 16 例, N₂ 21 例, N₃ 4 例。肿瘤分期: I 期 48 例, II 期 19 例, III 期 27 例。病理类型: 鳞癌 45 例, 腺癌 38 例, 腺鳞癌 11 例。分化程度: 高分化 14 例, 中分化 60 例, 低分化 20 例。

1.2 方法

1.2.1 标本的获取与保存 手术切除完整肺叶经福尔马林固定后送病理科, 测量肿瘤大小, 分别切取肿瘤组织及距肿瘤边缘 5 cm 的肺组织, 注意不要挤压。组织标本经石蜡包埋保存。

1.2.2 免疫组织化学 石蜡切片脱蜡和重新水化后, 用枸橼酸缓冲液抗原修复。VEGF-C 抗体为英国 Abcam 公司产品, 采用 Envision 二步法染色。主要染色步骤参照二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒说明书进行。DAB 染色, 苏木素复染细胞核, 然后水洗、蓝化、脱水、中性树胶封片。

1.2.3 VEGF-C 表达的评分方法和标准 应用显微镜对切片进行观察, VEGF-C 在癌细胞内的表达显示胞浆或细胞膜上有黄色或棕黄色颗粒。每张切片在显微镜高倍镜视野下 (×400) 下随机选取 10 个视野观察, 计数其中的阳性细胞数, 然后取平均值。免疫组化染色评分标准^[2]: 根据阳性细胞的比例和染色强度评分。病灶 VEGF-C 表达阳性细胞数

所占百分比计分方法: 无阳性细胞数为 0 分; 阳性细胞数 1% ~ 25% 为 1 分; 阳性细胞数 26% ~ 50% 为 2 分; 阳性细胞数 51% ~ 75% 为 3 分; 阳性细胞数 76% ~ 100% 为 4 分。病灶 VEGF-C 表达阳性细胞染色强度计分: 无色为 0 分阴性; 淡黄色为 1 分弱阳性 (+); 棕黄色为 2 分中度阳性 (2+); 棕褐色为 3 分强阳性 (3+)。以上述百分比计分与染色强度计分的乘积获得 VEGF-C 表达的等级: 0 ~ 2 分为 (-), 3 ~ 4 分为 (+), 5 ~ 7 分为 (2+), 8 ~ 9 分为 (3+)。

1.3 统计学处理

统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件包。等级资料的分析采用秩和检验及 Spearman 等级相关性检验, 率或构成比分析采用 χ^2 检验。多因素分析采用 logistic 回归分析, 生存分析采用 Cox 回归模型, 筛选自变量采用向前法。P < 0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 VEGF-C 蛋白的表达

阳性产物为棕黄色颗粒, 位于肺癌细胞胞质内 (图 1)。VEGF-C 蛋白在癌旁组织均为阴性表达, 肺癌组织中的表达率为 30.8% (29/94), 明显高于在癌旁组织中的表达 (表 1)。

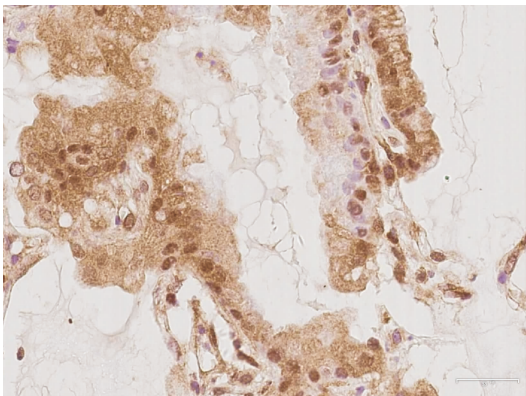


图 1 免疫组织化学 NSCLC 癌组织中 VEGF-C 蛋白阳性的表达 DAB 染色 ×400

表 1 94 例癌组织及癌旁组织中 VEGF-C 蛋白表达评分的比较

组别	-	+	2+	3+
癌组织组 (n = 94)	65	24	1	4
癌旁组织组 (n = 94)	94	0	0	0
Z 值	-5.828			
P 值	0.000			

2.2 VEGF-C 蛋白阳性表达与临床病理指标的关系

肺癌 VEGF-C 表达与临床病理指标的 Spearman 等级相关性检验显示,病理类型、分化程度、N 分期、淋巴结转移与 VEGF-C 蛋白表达呈正相关($P < 0.05$),见表 2。

表 2 VEGF-C 蛋白在肺癌组织中的表达及与临床病理指标的相关性

指标	VEGF-C 蛋白表达
性别	$r = 0.145, P = 0.164$
年龄	$r = -0.117, P = 0.260$
淋巴结转移	$r = 0.345, P = 0.001$
T 分期	$r = -0.056, P = 0.594$
N 分期	$r = 0.385, P = 0.000$
肿瘤分期	$r = 0.162, P = 0.118$
病理类型	$r = 0.341, P = 0.001$
分化程度	$r = 0.317, P = 0.002$

单因素分析显示病理类型、分化程度、N 分期、淋巴结转移与 VEGF-C 蛋白阳性表达有关($P < 0.05$),性别、年龄、T 分期、肿瘤分期与 VEGF-C 蛋白阳性表达无关($P > 0.05$),见表 3。

在单因素分析基础上,设肺癌 VEGF-C 表达阳性/阴性为因变量,病理类型、分化程度、N 分期、淋巴结转移为自变量,进行 logistic 回归分析。logistic 回归分析显示,与肺癌 VEGF-C 蛋白表达相关的自变量有 3 个,分别是淋巴结转移、病理类型及分化程度(表 4)。

2.3 VEGF-C 阳性表达与 NSCLC 预后的关系

采用 Cox 回归模型对患者性别、年龄、淋巴结转移、T 分期、N 分期、肿瘤分期、病理类型、分化程度、VEGF-C 表达进行多因素分析,结果显示年龄、病理类型、VEGF-C 阳性表达是影响患者术后生存的危险因素(表 5)。

表 3 VEGF-C 蛋白在肺癌组织中的表达及与临床病理指标的关系

指标		n	VEGF-C 蛋白		χ^2 值	P 值
			阴性	阳性		
性别	男	61	45	16	1.740	0.187
	女	33	20	13		
年龄	<60 岁	32	19	13	2.173	0.140
	≥60 岁	62	46	16		
淋巴结转移	否	53	44	9	10.958	0.001
	是	41	21	20		
T 分期	T ₁	23	15	8	2.638	0.451
	T ₂	52	37	15		
	T ₃	15	9	6		
	T ₄	4	4	0		
N 分期	N ₀	53	44	9	16.412	0.001
	N ₁	16	9	7		
	N ₂	21	12	9		
	N ₃	4	0	4		
肿瘤分期	I 期	48	38	10	5.172	0.075
	II 期	19	10	9		
	III 期	27	17	10		
病理类型	鳞癌	45	39	6	12.432	0.002
	腺癌	38	20	18		
	腺鳞癌	11	6	5		
分化程度	高分化	14	12	2	10.729	0.005
	中分化	60	45	15		
	低分化	20	8	12		

表 4 影响 VEGF-C 蛋白阳性表达相关因素的 logistic 回归分析

变量	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	OR 值
分化程度	-2.296	1.013	5.14	0.023	0.101
淋巴结转移	-1.105	0.555	3.968	0.046	0.331
病理类型	-1.905	1.091	3.047	0.005	0.149

表 5 影响非小细胞肺癌患者生存危险因素的 Cox 回归分析

变量	回归系数	标准误	Wald 值	P 值	OR 值
性别	-0.130	0.449	0.083	0.773	0.878
年龄	0.057	0.025	4.990	0.025	1.058
淋巴结转移	-11.189	55.027	0.041	0.839	0.000
T 分期	-25.603	129.385	0.039	0.843	0.000
N 分期	-12.370	55.037	0.051	0.822	0.000
肿瘤分期	22.919	129.380	0.031	0.859	8.987
病理类型	-1.911	0.903	4.475	0.034	0.148
分化程度	0.437	0.710	0.379	0.538	1.548
VEGF-C 阳性表达	-2.711	1.250	4.708	0.030	0.066

3 讨论

淋巴转移是肺癌的重要扩散途径,影响患者的预后。淋巴转移的第 1 站就是局部淋巴结^[3]。长期以来,淋巴结转移被认为是一个被动过程,脱落的肿瘤细胞通过原有的局部淋巴管引流到淋巴结。现在我们认识到淋巴管生成是造成肿瘤淋巴结转移的重要原因^[4]。

1996 年 Joukov 等^[5]首次克隆并分离出 VEGF-C。VEGF-C 是第 1 个被发现的淋巴管生长因子,可与受体 VEGFR-3 结合,促进淋巴细胞增生,形成新生的淋巴管^[1]。肿瘤细胞可以通过表达 VEGF-C 诱导淋巴管生成而促进肿瘤淋巴结转移,已在动物实验及临床研究中得到证实^[6,7]。抑制 VEGF-C 的表达可以抑制肿瘤淋巴结转移,改善肿瘤治疗预后^[8],进一步证明了 VEGF-C 在淋巴管生成及肿瘤淋巴转移中的作用。VEGF-C 一方面与 VEGFR-3 结合,通过促进淋巴管内皮细胞增生,使淋巴管数目增多,增大瘤细胞与淋巴管内皮的接触面积及淋巴管的通透性;另一方面,可作为一种趋化因子活化淋巴管,诱导淋巴内皮细胞分泌趋化因子及类似物,趋化肿瘤细胞进入淋巴管,有利于肿瘤细胞通过间质液的流动被动转运到淋巴管,发生淋巴转移^[9]。

本研究显示 VEGF-C 蛋白在肺癌组织中的表达明显高于癌旁组织,证实非小细胞肺癌细胞可以表达、分泌 VEGF-C,与其他临床研究^[10]的结论相同。4 例 N₃ 分期 VEGF-C 蛋白表达均为阳性,VEGF-C 蛋白阳性表达在低分化 NSCLC 中占 60.0% (12/20),腺鳞癌中占 45.4% (5/11)。这些病例在本组比例较低,N₃ 分期占 4.2% (4/94),低分化肺癌占 21.3% (20/94),腺鳞癌占 11.7% (11/94),这可能是本组资料中 VEGF-C 蛋白在肺癌组织中表达率较低(30.8%,29/94)的原因,表明肿瘤的生物学

性状越恶,VEGF-C 蛋白的表达率越高。

从 VEGF-C 蛋白在肺癌组织中的表达与临床病理指标的相关分析中可以看到,VEGF-C 蛋白表达水平不仅与淋巴结转移呈正相关,与 N 分期也呈正相关,可作为预测 NSCLC 淋巴结转移的相关指标^[10]。肺癌组织的分化程度与 VEGF-C 蛋白的表达呈正相关,提示分化越差的肿瘤表达 VEGF-C 蛋白的能力越强,更容易诱导淋巴管内皮细胞的增殖、新生淋巴管形成和肿瘤的淋巴道转移,这与分化越差的肿瘤预后越差是相符的。病理分化程度是肿瘤生物学特性和恶性程度的衡量指标之一,因而推测 VEGF-C 是反映肿瘤生物学特性的指标之一^[11]。不同病理类型的 NSCLC 组织与 VEGF-C 蛋白阳性表达相关,这可能是各种类型肺癌预后不同的原因之一,代学利等^[12]的研究得到类似的结论。

logistic 回归分析结果显示,分化程度、淋巴结转移及病理类型是影响 VEGF-C 蛋白阳性表达的相关因素。VEGF-C 蛋白阳性表达预示着淋巴结转移的可能性,淋巴转移是影响肿瘤患者预后的重要因素,这已在肺癌淋巴结清扫的研究中得到证实^[13]。此结果部分反映了不同病理类型及分化程度的肿瘤预后不同的原因。

Cox 回归模型分析显示年龄、病理类型、VEGF-C 阳性表达是影响患者术后生存的相关预后因素。肿瘤患者的预后主要决定于肿瘤的转移与复发,是多因素共同作用的结果,同时这些因素之间存在复杂的关系,VEGF-C 表达正是其中的一个环节。VEGF-C 通过促进淋巴管增生及诱导淋巴内皮细胞分泌趋化因子等机制促进肿瘤的淋巴转移^[9]。淋巴系统与血循环系统并不是完全独立的,两者间相互交通,VEGF-C 很可能还增加血行转移的可能,对预后产生更加负面的影响。VEGF-C 的表达对预后的不利影响,得到许多临床研究的证实^[10-12],VEGF-C 表达可以作为预测患者预后的

重要参考指标。

参考文献

- 1 陶绍霖,谭群友. VEGF-C/VEGF-D-VEGFR-3 信号通路在淋巴管生成及肺癌淋巴转移中作用机制的研究进展. 中华临床医师杂志(电子版),2011,5(3):796-799.
- 2 Huang M, Wang J, Lee P, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*,1995,5(17):3847-3853.
- 3 童向东,曲家骥,李敬龙,等. CK 在 I 期非小细胞肺癌患者淋巴结中的表达及其临床意义. 中国胸心血管外科临床杂志,2007,14(5):345-349.
- 4 Kozłowski M, Kowalczyk O, Milewski R, et al. Serum vascular endothelial growth factors C and D in patients with oesophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*,2010,38:260-267.
- 5 Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBOJ*,1996,15:290-298.
- 6 Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Med*,2001,7(2):192-198.
- 7 Ko YH, Jung CK, Lee MA, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res Treat*,2008,40(3):133-140.
- 8 Shibata MA, Morimoto J, Shibata E, et al. Combination therapy with short interfering RNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *Cancer Gene Ther*,2008,15(12):776-786.
- 9 Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*,2003,98(2):413-423.
- 10 李杰,李宝兰,张海青,等. 非小细胞肺癌中血管内皮生长因子 C 表达与淋巴结转移关系的研究. 中华医学杂志,2008,88(42):2982-2985.
- 11 王耀鹏,王明钊,罗宜人,等. 血管内皮生长因子 C 与细胞角蛋白 19 检测在 I 期非小细胞肺癌中的临床研究. 中国胸心血管外科临床杂志,2012,19(4):385-389.
- 12 代学利,王文利,申屠阳,等. 肺腺癌和鳞癌中 VEGF-C 和新生淋巴管表达的预后价值. 中国肺癌杂志,2011,14(10):774-779.
- 13 张铁娃,禹亮,姜久仰,等. 全胸腔镜下非小细胞肺癌淋巴结清扫的临床研究. 中国微创外科杂志,2009,9(8):696-699.

(收稿日期:2013-02-16)

(修回日期:2013-03-24)

(责任编辑:李贺琼)