

胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达及其临床意义

修丽娟¹, 刘 龙², 刘 焯¹, 余嘉惠¹, 宋尚晋¹, 岳小强^{1*}

1. 第二军医大学长征医院中医科, 上海 200003

2. 第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨胃癌原发灶、癌旁及胃周淋巴结组织中血管内皮生长因子 C(VEGF-C)、血管内皮生长因子 D(VEGF-D)、血管内皮生长因子受体 3(VEGFR-3)蛋白表达与各临床参数的关系。**方法** 通过免疫组化方法对 60 例胃癌患者的癌、癌旁及胃周淋巴结组织中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 蛋白水平进行检测,并分析各临床参数包括肿瘤分化程度、Lauren 分型、肿瘤浸润深度、是否有淋巴结转移、幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染与否等对胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达水平的影响。**结果** 胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D 蛋白表达水平高于癌旁组织(2.82 ± 1.66 vs 2.13 ± 1.75 , 4.81 ± 2.30 vs 3.78 ± 1.94 , $n=60$, P 均 < 0.05)。VEGFR-3 蛋白表达水平在胃癌组织和癌旁组织中差异无统计学意义($P > 0.05$)。胃癌转移的淋巴结组织中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 的蛋白表达水平(3.77 ± 2.43 , 2.86 ± 1.95 , 2.55 ± 2.11 , $n=44$)均高于未转移淋巴结组织(2.25 ± 2.01 , 1.98 ± 1.73 , 0.76 ± 1.13 , $n=59$, P 均 < 0.05)。关于各临床参数的分析结果显示 VEGF-C、VEGF-D 的蛋白表达水平在伴有淋巴结转移的胃癌组织中高于未出现淋巴结转移的胃癌组织($P < 0.05$)。H. pylori 感染阳性的胃癌组织中 VEGFR-3 的蛋白表达水平高于 H. pylori 阴性的胃癌组织($P < 0.05$)。**结论** VEGF-C、VEGF-D 蛋白表达水平在胃癌原发灶及转移淋巴结中上调,且与胃癌的淋巴转移有关。

[关键词] 胃肿瘤;淋巴转移;血管内皮生长因子 C;血管内皮生长因子 D;血管内皮生长因子受体 3

[中图分类号] R 735.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)11-1458-04

Expressions of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 proteins in gastric cancer tissues and its clinical significance

XIU Li-juan¹, LIU Long², LIU Xuan¹, YU Jia-hui¹, SONG Shang-jin¹, YUE Xiao-qiang^{1*}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protein expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, VEGF-D and vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) in primary gastric tumor, adjacent non-tumor and perigastric lymph node tissues and their relationships with clinic-pathological features. **Methods** The protein levels of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 in tumor, adjacent non-tumor and perigastric lymph node tissues of 60 patients with gastric cancer were detected by immunohistochemical method. The effects of clinic-pathological features included tumor differentiation, Lauren classification, depth of tumor invasion, lymph node metastasis, and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection on VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 protein levels in gastric cancer tissues were also analyzed. **Results** The expressions of VEGF-C and VEGF-D in gastric cancer tissues were significantly higher than those in adjacent non-tumor tissues (2.82 ± 1.66 vs 2.13 ± 1.75 , 4.81 ± 2.30 vs 3.78 ± 1.94 ; $n=60$; both $P < 0.05$). There was no significant difference in VEGFR-3 protein expression between gastric cancer and adjacent non-tumor tissues ($P > 0.05$). The expression levels of VEGF-C, VEGF-D and VEGFR-3 proteins in lymph nodes with gastric cancer metastasis (3.77 ± 2.43 , 2.86 ± 1.95 , 2.55 ± 2.11 ; $n=44$) were significantly higher than those without gastric cancer

[收稿日期] 2017-05-23 **[接受日期]** 2017-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金(81603434),上海市科学技术委员会项目(15401900600),上海市卫生和计划生育委员会项目(ZY3-CCCX-3-3056)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81603434), Project of Shanghai Science and Technology Commission (15401900600), and Project of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (ZY3-CCCX-3-3056).

[作者简介] 修丽娟,博士,讲师、主治医师。E-mail: xiaoxiu@126.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885472, E-mail: yuexiaoqiang@163.com

metastasis (2.25 ± 2.01 , 1.98 ± 1.73 , 0.76 ± 1.13 ; $n=59$; all $P < 0.05$). Statistical analysis results showed that the expression levels of VEGF-C and VEGF-D proteins in gastric cancer tissues with lymph node metastasis were significantly higher than those without lymphatic metastasis (both $P < 0.05$), and the VEGFR-3 expression in *H. pylori*-positive gastric cancer tissues was significantly higher than that in *H. pylori*-negative tissues ($P < 0.05$).

Conclusion VEGF-C and VEGF-D protein expressions are upregulated in primary gastric cancer tissues and related metastatic lymph node, which are correlated with lymph node metastasis of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasms; lymphatic metastasis; vascular endothelial growth factor C; vascular endothelial growth factor D; vascular endothelial growth factor receptor 3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(11): 1458-1461]

胃癌是我国高发的恶性肿瘤之一,死亡率居全球恶性肿瘤的第 2 位^[1]。淋巴转移是影响胃癌不良预后的重要因素之一^[2],研究表明 20% 的黏膜下癌存在淋巴转移^[3],但关于淋巴转移的具体机制尚不清楚。本研究通过检测胃癌、癌旁及胃周淋巴结组织中与淋巴管生成相关的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)-C、VEGF-D 及血管内皮生长因子受体 3(vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3)的蛋白表达水平,并分析其临床意义,为进一步研究胃癌的淋巴转移机制奠定基础。

1 资料和方法

1.1 一般资料 标本来自 2016 年 1 月至 2016 年 6 月于第二军医大学长征医院行手术治疗的胃癌患者,患者术前均未接受放射治疗、化学治疗、靶向治疗等抗肿瘤治疗。收集同一患者的胃癌原发灶、癌旁组织(距离原发灶边缘 ≥ 5 cm,切缘阴性)、淋巴结组织。共收集 60 例,其中男性 44 例,女性 16 例,平均年龄(62.21 ± 11.89)岁。

1.2 免疫组化染色 标本采用甲醛固定后用石蜡包埋。石蜡标本切片后进行免疫组化 SP 法染色。抗 VEGF-C、抗 VEGF-D、抗 VEGFR-3 抗体订购自英国 Abcam 公司。根据 Reset 细胞和染色强度综合评分法^[4]将细胞着色评分与着色细胞数评分相乘,所得综合评分分为 4 个等级:阴性为 0~1 分,弱阳性为 2~3 分,阳性为 4~6 分,强阳性为 >6 分。

1.3 胃癌组织幽门螺杆菌(*H. pylori*)检测 采用硼酸亚甲蓝染色方法^[5]检测 *H. pylori*。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料的比较采用 *t* 检验或方差分析。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 胃癌和癌旁组织中 VEGF-C、VEGF-D 和 VEGFR-3 蛋白表达水平 如图 1 所示,胃癌组织中

VEGF-C、VEGF-D 蛋白表达水平高于癌旁组织(2.82 ± 1.66 vs 2.13 ± 1.75 , 4.81 ± 2.30 vs 3.78 ± 1.94 ; P 均 < 0.05)。VEGFR-3 蛋白表达水平在胃癌组织和癌旁组织中差异无统计学意义(3.54 ± 3.39 vs 3.38 ± 2.19 , $P > 0.05$)。

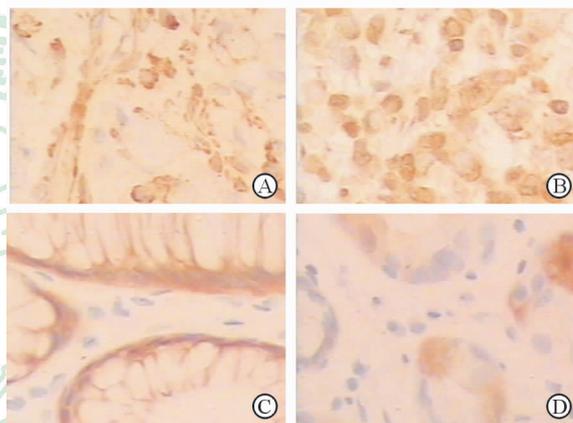


图 1 胃癌(A、B)及癌旁组织(C、D)中 VEGF-C(A、C)与 VEGF-D(B、D)的蛋白表达

VEGF: 血管内皮生长因子。免疫组化 SP 法染色。Original magnification: $\times 200$

2.2 胃癌转移淋巴结与未转移淋巴结中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达水平 胃癌转移的淋巴结组织中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 的蛋白表达水平分别为 3.77 ± 2.43 、 2.86 ± 1.95 、 2.55 ± 2.11 ($n=44$),均高于未转移淋巴结中的蛋白表达水平(2.25 ± 2.01 、 1.98 ± 1.73 、 0.76 ± 1.13 , $n=59$, P 均 < 0.05)。见图 2。

2.3 各临床参数与胃癌组织 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达水平的关系 如表 1 所示,不同性别、年龄、肿瘤分化程度、Lauren 分型以及肿瘤的浸润深度对 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 表达水平均无明显影响,组间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。但在淋巴结转移参数方面,伴有淋巴结转移的胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D 的蛋白表达水平高于无淋巴结转移的胃癌组织(P 均 < 0.05);在

*H. pylori*阳性的胃癌组织中 VEGFR-3 的蛋白表达水平高于 *H. pylori* 阴性的胃癌组织($P < 0.05$)。

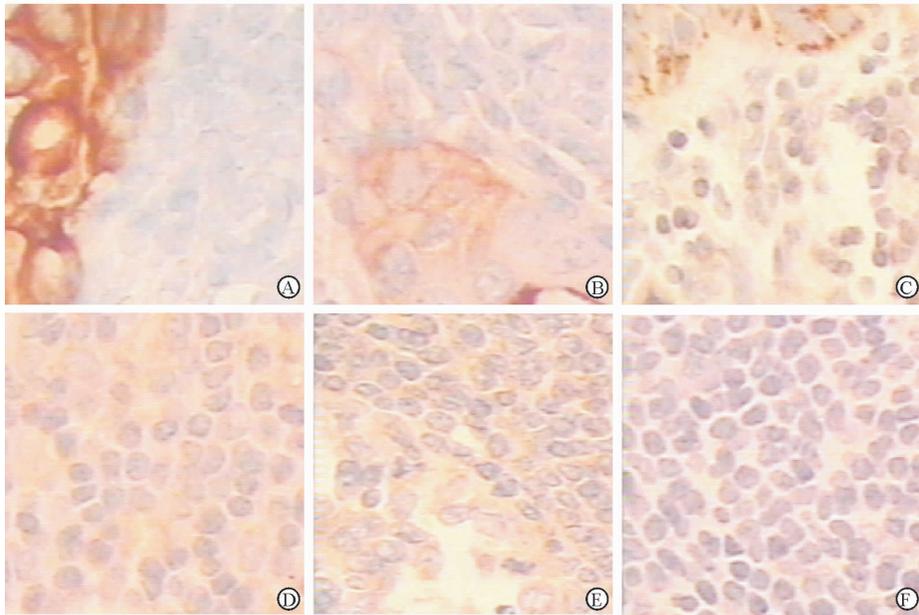


图2 转移淋巴结(A~C)与未转移淋巴结组织(D~F)中 VEGF-C(A、D)、VEGF-D(B、E)、VEGFR-3(C、F)的蛋白表达
VEGF: 血管内皮生长因子; VEGFR: 血管内皮生长因子受体, 免疫组化 SP 法染色。Original magnification: $\times 200$

表1 各临床参数与 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达的关系

临床参数	<i>n</i>	VEGFR-3	VEGF-C	VEGF-D
性别				$\bar{x} \pm s$
男	44	2.63 \pm 1.42	3.20 \pm 2.01	4.84 \pm 2.25
女	16	3.31 \pm 2.18	4.44 \pm 2.66	4.75 \pm 2.52
年龄				
≥ 55 岁	43	3.40 \pm 2.01	2.72 \pm 1.68	4.91 \pm 2.19
< 55 岁	17	3.89 \pm 2.80	3.05 \pm 1.63	4.59 \pm 2.62
分化程度				
中-低分化	36	3.59 \pm 2.27	2.78 \pm 1.62	4.53 \pm 2.34
低分化或印戒细胞癌	24	3.22 \pm 1.95	2.87 \pm 1.79	5.30 \pm 2.44
Lauren 分型				
肠型	32	3.81 \pm 2.29	2.66 \pm 1.43	4.93 \pm 2.33
弥漫型	16	3.37 \pm 2.09	2.94 \pm 2.11	4.75 \pm 2.41
混合型	12	3.00 \pm 2.41	3.08 \pm 1.68	4.58 \pm 2.27
肿瘤浸润程度				
T1~T2	13	4.17 \pm 3.38	3.08 \pm 1.98	4.42 \pm 2.54
T3~T4	47	3.38 \pm 2.24	2.75 \pm 1.59	4.91 \pm 2.26
淋巴结转移				
有	39	4.00 \pm 2.25	3.00 \pm 2.00*	5.59 \pm 2.06*
无	21	3.28 \pm 2.22	1.95 \pm 3.43	4.10 \pm 2.07
<i>H. pylori</i> 感染				
阳性	16	4.56 \pm 2.71 Δ	2.25 \pm 1.00	4.06 \pm 2.32
阴性	44	3.16 \pm 1.95	3.02 \pm 1.81	5.09 \pm 2.26

VEGF: 血管内皮生长因子; VEGFR: 血管内皮生长因子受体; *H. pylori*: 幽门螺杆菌。* $P < 0.05$ 与无淋巴结转移组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 *H. pylori*感染阴性组比较

3 讨论

淋巴转移是包括胃癌在内的多种恶性肿瘤转移的重要途径之一。VEGF 是肿瘤血管生成的重要调控因子,参与肿瘤的血管生成及侵袭转移等恶性生

物学行为^[6]。随着研究的不断深入,有研究者发现 VEGF 还与淋巴管的生成存在密切联系^[7]。

VEGF-C、VEGF-D 是 VEGF 家族成员,与淋巴管的生成关系密切^[8]。抑制肿瘤细胞分泌 VEGF-C 可以抑制肿瘤的淋巴管生成^[9], VEGF-C、VEGF-D

可能会成为治疗肿瘤淋巴转移的靶点^[10-11]。VEGFR-3 是 VEGF-C、VEGF-D 的受体, 在正常成人组织中 VEGFR-3 主要局限在淋巴管内皮细胞, 然而在多种恶性肿瘤患者中可伴有 VEGFR-3 的异常升高^[12-13]。VEGF-C、VEGF-D 与 VEGFR-3 结合后可促进淋巴管的形成, 从而促进肿瘤的淋巴转移。

本研究表明, 在转移的淋巴结组织中 VEGF-C 及 VEGF-D、VEGFR-3 的蛋白表达水平均高于未转移的淋巴结, 在胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D 高于癌旁组织; 进一步的临床参数分析结果显示, 伴有淋巴结转移的胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D 的蛋白表达水平高于未伴有淋巴结转移的胃癌组织, 表明 VEGF-C 及 VEGF-D 参与胃癌的淋巴转移, 其异常高表达是促进胃癌淋巴转移的重要因素。在本研究中 VEGFR-3 在胃癌组织中并未与 VEGF-C、VEGF-D 一样高于癌旁组织, 这表明除了与 VEGFR-3 结合外, VEGF-C、VEGF-D 可能还通过其他途径参与淋巴转移。

淋巴转移过程会受到多种因素的影响。由于 *H. pylori* 感染被列为胃癌的 I 类致癌因素, 为了明确 *H. pylori* 感染是否对胃癌的淋巴转移有影响, 本研究进一步分析了 *H. pylori* 阳性胃癌组织与 *H. pylori* 阴性胃癌组织中 VEGFR-3、VEGF-C 及 VEGF-D 的蛋白表达水平。结果显示, *H. pylori* 感染仅对胃癌组织的 VEGFR-3 蛋白表达水平有促进作用, 还不能认为 *H. pylori* 感染与胃癌淋巴转移有关。此外, 性别、年龄、肿瘤分化程度等临床参数对胃癌组织中 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 的蛋白表达水平未见明显影响。

综上, VEGF-C、VEGF-D 蛋白表达水平在胃癌原发灶和转移淋巴结中增高, 且与胃癌的淋巴转移有关。

[参考文献]

[1] HUNT R H, CAMILLERI M, CROWE S E, EL-OMAR E M, FOX J G, KUIPERS E J, et al. The stomach in health and disease[J]. *Gut*, 2015, 64: 1650-1668.

[2] ZHANG J, ZHU Z, SHENG J, YU Z, YAO B, HUANG K, et al. miR-509-3-5P inhibits the invasion and lymphatic metastasis by targeting PODXL and serves as a novel prognostic indicator for gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 34867-34883.

[3] COBURN N G. Lymph nodes and gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2009, 99: 199-206.

[4] NISHIZAWA T, SUZUKI H. Gastric carcinogenesis and underlying molecular mechanisms: helicobacter pylori and novel targeted therapy[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 794378. doi: 10.1155/2015/794378.

[5] 殷正进, 李桂梅, 曹晓卉. 幽门螺杆菌三种检测方法的比较[J]. *诊断病理学杂志*, 2015, 22: 647-648.

[6] BALLA M M, DESAI S, PURWAR P, KUMAR A, BHANDARKAR P, SHEJUL Y K, et al. Differential diagnosis of lung cancer, its metastasis and chronic obstructive pulmonary disease based on serum VEGF, IL-8 and MMP-9[J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36065. doi: 10.1038/srep36065.

[7] MORFOISSE F, RENAUD E, HANTELYS F, PRATS A C, GARMY-SUSINI B. Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis[J/OL]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2: e1024821. doi: 10.1080/23723556.2015.1024821.

[8] BUI H M, ENIS D, ROBCIUC M R, MURMI H J, COHEN J, CHEN M, et al. Proteolytic activation defines distinct lymphangiogenic mechanisms for VEGFC and VEGFD[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126: 2167-2180.

[9] LEI Y, LI B, TONG S, QI L, HU X, CUI Y, et al. miR-101 suppresses vascular endothelial growth factor C that inhibits migration and invasion and enhances cisplatin chemosensitivity of bladder cancer cells[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10: e0117809. doi: 10.1371/journal.pone.0117809.

[10] WANG C A, JEDLICKA P, PATRICK A N, MICALIZZI D S, LEMMER K C, DEITSCH E, et al. SIX1 induces lymphangiogenesis and metastasis via upregulation of VEGF-C in mouse models of breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 1895-1906.

[11] ACHEN M G, MANN G B, STACKER S A. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94: 1355-1360.

[12] KURENOVA E V, HUNT D L, HE D, FU A D, MASSOLL N A, GOLUBOVSKAYA V M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-3 promotes breast cancer cell proliferation, motility and survival *in vitro* and tumor formation *in vivo* [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8: 2266-2280.

[13] LI C, FAN J, SONG X, ZHANG B, CHEN Y, LI C, et al. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor receptor-3 correlates with lymphangiogenesis and angiogenesis and affects survival of oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e75388. doi: 10.1371/journal.pone.0075388.