

VEGF-C 和 VEGFR-3 在胃癌组织中的表达及临床意义

苏川妮¹ 李 青¹ 彭建中¹ 魏建华²

(湖南师范大学附属湘东医院 :1 消化科 2 病理科 湖南 长沙 412200)

摘要 目的 探讨胃癌患者血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C 及血管内皮生长因子受体 -3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)在胃癌组织中的表达,从而确定胃癌预后的分子标志物。方法 搜集整理临床资料,采用 Real-time PCR 及 ELISA 法检测 43 例胃癌组织 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达。结果 43 例胃癌组织中均有不同程度的 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达,Real-time PCR 结果显示胃癌组织淋巴结转移组和非转移组 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达分别为 0.07 ± 0.01 和 0.12 ± 0.01 , 0.03 ± 0.01 和 0.06 ± 0.02 ,与正常对照组相比,差异有显著性($p < 0.05$)。ELISA 检测显示,与正常胃组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的蛋白表达相比,胃癌无淋巴结转移组及胃癌并发淋巴结转移组中 VEGF-C 和 VEGFR-3 均明显增加。结论 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达与胃癌淋巴结转移密切相关,提示胃癌标本 VEGF-C 和 VEGFR-3 的检测可作为胃癌预后的分子标志物。

关键词 胃癌;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体;淋巴结转移

中图分类号 R735.2 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)07-1340-03

Expression of VEGF-C and VEGFR-3 in gastric carcinoma and its significance

SU Chuan-ni¹, LI Qing¹, PENG Jian-zhong¹, WEI Jian-hua²

(The affiliated Xiangdong hospital of Hunan Normal University, 1 department of digestion, department of pathology 412200, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and Vascular endothelial growth factor receptor -3 (VEGFR-3) in gastric cancer, so that to determine the molecular markers in prognosis of gastric cancer.

Methods: Collecting clinical data methods, Real-time PCR and ELISA were used to detect the expression of VEGF-C and VEGFR-3 in 43 cases of gastric cancer. **Results:** 43 cases of gastric cancer have different levels of VEGF-C and VEGFR-3. Real-time PCR results showed the VEGF-C and VEGFR-3 expression were 0.07 ± 0.01 and 0.12 ± 0.01 , 0.03 ± 0.01 and 0.06 ± 0.02 respectively in lymph node metastasis group and non- metastasis group in gastric cancer., the difference was statistically significant when compared with the control group ($p < 0.05$). ELISA examination demonstrated that expressions of VEGF-C and VEGFR-3 protein in the gastric cancer group without lymph node metastasis and the gastric cancer group complicated by lymph node metastasis were obviously increased when compared with that in normal gastric tissue. **Conclusions:** VEGF-C and VEGFR-3 expression were closely related with lymph node metastasis, indicating that VEGF-C and VEGFR-3 detection can be used as molecular markers in prognosis of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; Vascular endothelial growth factor; Vascular endothelial growth factor receptor; Lymph node metastasis

Chinese Library Classification: R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1340-03

前言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,胃癌的淋巴途径转移是胃癌转移的一个重要途径,是判断患者预后和确定治疗方案的重要依据。新近的研究发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)可以通过与其受体 VEGFR-3 的结合,促进实体瘤内淋巴管的新生,并促进肿瘤细胞的淋巴结转移^[1],提示 VEGF-C/VEGFR-3 系统参与了这个过程,而且可能是胃癌预后的分子标志物。本研究通过检测胃癌组织中 VEGF-C/VEGFR-3 的表达,并根据患者的临床分期,按照多因素回归分析确定胃癌的预后标志物,为临床治疗胃癌提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集我院 2009 年 2 月—2010 年 5 月手术切除胃癌标本 43 例,其中男性患者 30 例,女性患者 13 例。年龄 25—71 岁,平均年龄 48 岁。按 2003 年 UICC 胃癌 TNM 分期标准,期 2 例,期 8 例,期 20 例,期 13 例。其中淋巴结转移者 9 例,无淋巴结转移 34 例。全部标本经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,4μm 厚连续切片待测。

1.2 检测方法

1.2.1 Real-Time PCR 检测 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 表达

①采用一步法提取胃癌组织 RNA,用紫外分光光度仪检测其纯度,电泳检测其完整性。②逆转录 cDNA 逐一加入试剂盒提供的试剂及 2μg 总 RNA,反应体系 20μl,反应条件 37℃ 水浴 60 分钟,加热到 95℃ 维持 5 min。得 RT 终溶液即为 cDNA

作者简介 苏川妮,女,主要从事消化科疾病的临床及研究工作,
电话:13974170051 E-mail: huangli9999@sina.com
(收稿日期 2011-01-15 接受日期 2011-02-10)

溶液,置冰浴待用。③实时定量 PCR 将经过梯度稀释的 DNA 模板及所有 cDNA 样品分别加入反应试剂、上下游引物及 cDNA 1 μ l,反应体积为 25 μ l,反应条件:95 $^{\circ}$ C 变性 10sec,59 $^{\circ}$ C 退火 15sec,72 $^{\circ}$ C 延伸 20sec,内参为 40 个循环,目的基因为 45 个

循环。内参、VEGF-C 和 VEGFR-3 分别于 85 $^{\circ}$ C、81.5 $^{\circ}$ C 和 82 $^{\circ}$ C 收集荧光。各基因引物序列如下图。④定量分析 根据绘制的梯度稀释 DNA 标准曲线,将目的基因浓度除以内参浓度,即为胃癌标本目的基因校正后的相对含量(表 1)。

表 1 Real-Time PCR 各基因引物序列及产物长度
Table 1 Real-Time PCR primers and the gene product of the length

Gene	two-way primer sequence	product length(bp)
β -actin	F:5'CCTGTACGCCAACACAGTGC3'	211
	R:5' ATACTCCTGCTTGCTGATCC3'	
VEGF-C	F:5'GCCCCAAACCAGTAACAATC3'	235
	R:5'GTTGAGTCATCTCCAGCATCC3'	
VEGFR-3	F:5'GCATCCCATCGGTCCACTA3'	190
	R:5'AGCCACCACATCGGAACAC3'	

1.2.2 ELISA 检测为胃组织匀浆中 VEGF-C 和 VEGFR-3 中的表达

将各组胃组织设标准冰上匀浆,收集上清液,余下步骤按 ELISA 试剂盒说明书操作。在酶标仪检测 492nm 处的吸光值。所有 OD 值都减除空白孔的吸光值再进行计算。以标准品 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.62、0 pg/ml 之 OD 值在半对数纸上作图,将浓度作为 X 轴,OD 值作为 Y 轴,胃组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 浓度与 OD 值成正比,可通过绘制标准曲线求出样本中胃组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 浓度。

1.3 统计学处理

所有样本用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,实验组间比较采用方差分析,概

率 $P < 0.05$ 表示在统计学上差异显著。

2 结果

2.1 胃癌组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的 mRNA 表达

Real-Time PCR 结果显示,胃癌组织 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 相对表达量明显升高,与正常对照组相比,有淋巴结转移的胃癌组织 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 相对表达量由 0.0004 ± 0.0004 和 0.006 ± 0.0002 升至 0.07 ± 0.01 和 0.12 ± 0.01 ,无淋巴结转移组也升至 0.03 ± 0.01 和 0.06 ± 0.02 ,差异均有明显差异($P < 0.05$),淋巴结转移组与未转移组相比,差异也有显著性($P < 0.05$)(图 1A、图 1B)。

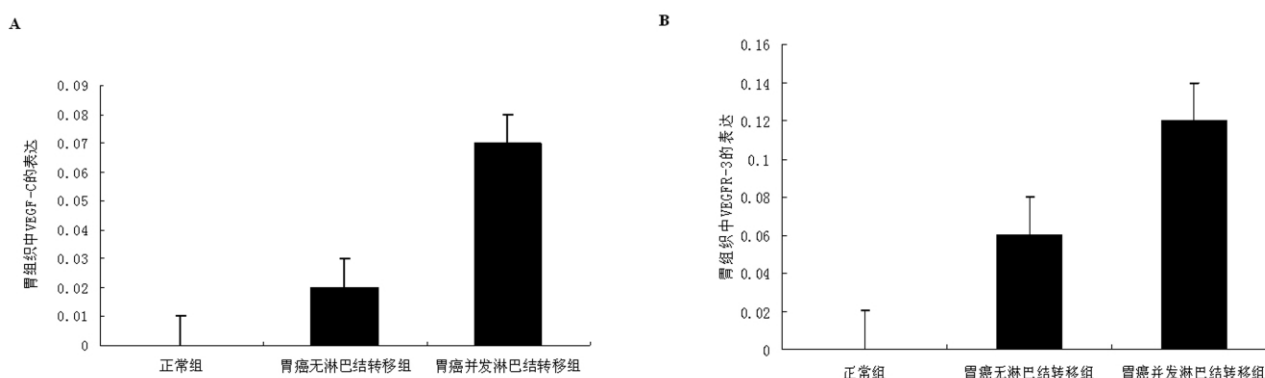


图 1 VEGF-C 和 VEGFR-3 mRNA 的相对表达量

注: A VEGF-C mRNA 的相对表达量, B VEGFR-3 mRNA 的相对表达量

Fig.1 VEGF-C and VEGFR-3 mRNA relative expression

Note: A VEGF-C mRNA relative expression; B VEGFR-3 mRNA relative expression

2.2 胃组织匀浆中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的蛋白表达

ELISA 检测显示,与正常胃组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的蛋白表达相比,胃癌无淋巴结转移组及胃癌并发淋巴结转移组中 VEGF-C 和 VEGFR-3 均明显增加(图 2A、2B)。

3 讨论

胃癌以淋巴道转移为主,对肿瘤淋巴管形成的研究远没有对肿瘤血管形成的研究那样受到重视,其主要原因就在于没有发现特异的鉴别新生淋巴管的标志物。尽管实验中常可观察到在肿瘤周围基质中有淋巴管的扩大并经常穿入肿瘤实质的现象发生,但人们一直不清楚这些扩大的淋巴管是肿瘤发生前局部早已存在的淋巴管,还是肿瘤发生后新生成的淋巴管^[2]。也有

学者认为,肿瘤内缺少有功能的淋巴管,由于肿瘤内间质压力较高的原因,肿瘤内淋巴管的结构与功能均不同于肿瘤周边组织的淋巴管。近来的研究证明,肿瘤细胞可以通过表达淋巴管生成的调控因子 VEGF-C 和 VEGF-D 等诱导淋巴管生成,并且

促进肿瘤细胞的淋巴道转移。这些发现使得淋巴管生成开始成为研究肿瘤淋巴道转移这些发现使得淋巴管生成开始成为研究肿瘤淋巴道转移的焦点,并有可能成为治疗肿瘤淋巴道转移的靶点^[3-5]。

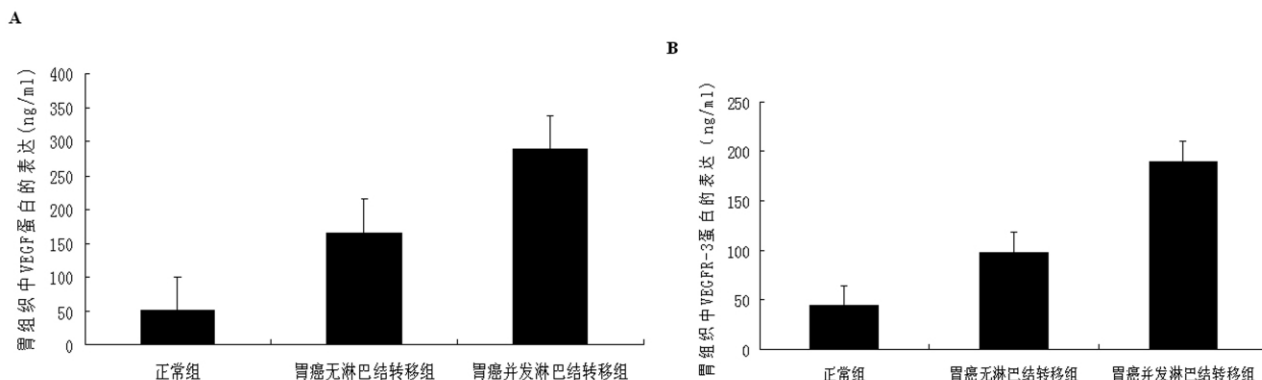


图2 VEGF-C 和 VEGFR-3 蛋白的表达

注:A:VEGF-C 蛋白的表达,B:VEGFR-3 蛋白的表达

Fig.2 VEGF-C and VEGFR-3 protein expression

Note: A: VEGF-C protein expression, B: VEGFR-3 protein expression

VEGF-C 是 VEGF 家族的成员,目前被认为是淋巴管内皮细胞生长因子,它与血管内皮生长因子受体-3 (VEGFR-3)结合,可促进淋巴管的新生,与 VEGFR-2 结合,可促进血管的新生。在正常成人组织中,VEGFR-3 主要局限在淋巴管内皮细胞^[6-8]。现有的实验证据表明,VEGF-C 可通过与其受体 VEGFR-3 的结合,促进实体瘤内淋巴管的新生,并促进肿瘤细胞的淋巴结转移,VEGF-C/D 可作为膀胱癌的预后标志物^[9-11]。本研究结果显示,胃癌组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 蛋白及 mRNA 表达显著高于正常胃组织,且在癌组织边缘地带,大量的新生淋巴管,在有淋巴管转移的胃癌组织中 VEGF-C 和 VEGFR-3 的表达显著高于无淋巴管转移的胃癌组织。表明 VEGF-C 和 VEGFR-3 可促进胃癌组织淋巴管生成和转移。

VEGF-C 和 VEGFR-3 在胃癌淋巴管生成和转移过程中可能的作用机制有:(1)二者作用于 VEGFR-3 诱导其酪氨酸激酶磷酸化,引起淋巴管内皮细胞增生、从而使原有淋巴管增生、扩张^[12]。(2)作为一种特异的趋化因子,高表达 VEGF-C 的胃癌细胞与淋巴管内皮细胞具有亲和作用,可促使胃癌细胞向淋巴管内皮细胞移动,同时淋巴管内皮细胞局部释放旁分泌因子影响胃癌细胞侵袭性及与胞外基质的黏附性,有利于胃癌细胞向淋巴管内渗透、转移。(3)VEGF-C 还能使外周的淋巴管扩张和淋巴管的通透性增加,使淋巴管周围的组织间隙内压力增加,影响锚丝,牵拉内皮细胞,造成淋巴管腔增大,相互重叠的内皮细胞间连接开放,致使肿瘤细胞和组织间液迅速进入淋巴管发生转移。(4)胃癌细胞通过 VEGF-C 与 VEGFR-3 相互作用,可调节自身生长,促进增殖、抑制凋亡,从而具有更高的增殖活性及浸润性^[13]。

综上所述,VEGF-C 和 VEGFR-3 可作为胃癌预后的分子标志物,临床上可通过阻断血管内皮生长因子及其受体抑制胃癌淋巴管的生成及转移,改善胃癌患者的生活质量并延长其寿命。

参考文献(References)

- [1] 杨进强,李勇,范立桥,等. VEGF-C 及其受体 VEGFR-3 在胃癌淋巴转移中的作用[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(11): 1256-1259
Yang Jinqiang, Li Yong, Fan Liqiao, et al. VEGF-C and its receptor VEGFR-3 in lymphatic metastasis of gastric cancer [J]. Second Military Medical University, 2005, 26 (11): 1256-1259
- [2] 贾麾,宋永喜,王洪. 胃癌侵袭转移相关基因研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(12): 2583-2585
Jia Hui, Song Yongxi, Wang Hong. Gastric cancer invasion and metastasis-related Genes[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008,8 (12): 2583-2585
- [3] 滕月娥,李午生,金峰,等. 胃癌组织 COX-2、VEGF-C 表达与淋巴结转移及预后关系的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2005,32(11): 607-610
Teng Yue-e, Li Wu-sheng, Jin Feng, et al. Gastric COX-2, VEGF-C expression and lymph node metastasis and prognosis [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2005, 32 (11): 607-610
- [4] 邢光明,曲明阳,张桂平,等. 血管和淋巴管生成及淋巴转移的关系[J]. 中华普通外科杂志, 2004,19(6): 361-363
Xing Guang-ming, Qu Ming-yang, Zhang Gui-ping, et al. Vessels and lymphangiogenesis and lymphatic metastasis [J]. Journal of General Surgery, 2004,19(6): 361-363
- [5] Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis[J]. J SCDB, 2002, 13: 9-18
- [6] 程鑫,韩明,张仕状,等. VEGF、CD34、VEGF-C 和 VEGFR-3 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展,2008,8(10):1921-1923
Chen Xin, Han Ming, Zhang Shizhuang, et al. Expression and Clinical Significance of VEGF,CD34,VEGF-C and VEGFR-3 in Gastric Carcinoma[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008,8(10):1921-1923
- [7] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor C mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis[J]. J EMBO, 2001, 20: 672-682

(下转第 1358 页)

- per() hexacyanoferrate() [J]. Microchem J, 2006, 82(2): 163-167
- [9] Celma C, Allue JA, Prunonosa J, et al. Determination of N- acetylcysteine in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. J. Chromatogr A, 2000, 870 (1-2): 13-22
- [10] Nozal M J, Bernal J L, Toribio L, et al. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) [J]. J. Chromatogr A, 1997, 778 (1-2): 347-353
- [11] 王芳侠, 徐创莉, 陈赞民, HPLC 法测定乙酰半胱氨酸颗粒中有关物质 [J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1665-1667
Wang Fang-xia, Xu Chuang-li, Chen Zan-min, Detection of relevant substance from acetylcysteine granules by HPLC [J] China Tropical Medicine, 2007, 7(9): 1665-1667
- [12] 李红, 杨育民, Luminol-Cu()体系流动注射化学发光法测定乙酰半胱氨酸 [J]. 光谱实验室, 2010, 27 (5): 1968-1970
Li Hong, Yang Yu-min, Determination of Acetylcysteine in Luminol-Cu () System by Flow Injection Chemiluminescence [J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory, 2010, 27 (5): 1968-1970
- [13] 刘红萍, 流动注射化学发光法测定 N- 乙酰半胱氨酸的研究 [J]. 化学研究与应用, 2007, 19 (4): 454-456
Liu Hong-ping, Flow injection chemiluminescence determination of N-acetylcysteine [J]. Chemical Research and Application, 2007, 19 (4): 454-456
- [14] 张广彬, 陈宪民, 李海燕, 等. 反相流动注射化学发光法测定含巯基药物的含量 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2010, 31(1): 125-128
Zhang Guang-bin, Chen Xian-min, Li Hai-yan, et al. Determination of sulfhydryl-containing drugs by reverse flow injection chemiluminescence analysis [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2010, 31(1): 125-128
- [15] Elham A T, Nagiba Y H, Fahima A A et al. Fluorimetric Determination of some Sulfur Containing Compounds through Complex Formation with Terbium(Tb3+) and Uranium (U3+) [J]. J. Fluoresc, 2007, 17(3): 293-300

(上接第 1342 页)

- [8] Karpanen M, Egeblad MJ, Karkkainen, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumour lymphangiogenesis and intralymphatic tumour growth [J]. Cancer Res, 2001, 61:1786-1790
- [9] 祖雄兵, 叶章群, 周四维, 等. 淋巴管密度和功能形态与膀胱癌淋巴结转移关系的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(4): 224-226
Zu xiong-bing, Ye Zhang-qun, Zhou Si-wei, et al. Functional morphology of lymphatic vessel density and lymph node metastasis in bladder cancer research[J]. Journal of Urology, 2006, 27 (4): 224-226
- [10] 郭永顺, 戴宇平, 夏金堂, 等. 膀胱移行细胞癌环氧化酶 2 表达与淋巴管和血管生成的关系 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2009, 30(3): 299-303
Guo Yong-shun, Dai Yu-ping, Xia Jin-tang, et al. Bladder transitional cell carcinoma of the COX-2 expression and lymph vessels and angiogenesis [J]. Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2009, 30 (3): 299-303
- [11] 陆晓哲, 卓文利, 王安喜, 等. 膀胱癌组织 VEGF-C 表达与淋巴管生成和淋巴结转移之间关系的研究 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13 (8): 721-723
Lu Xiao-zhe, Zhuo Wen-li, Wang An-xi, et al. Bladder cancer VEGF-C expression and lymphangiogenesis and lymph node metastasis of the relationship between[J]. Journal of Clinical Oncology, 2008, 13 (8): 721-723
- [12] Choi WW, Lewis MM, Lawson D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression [J]. Mod Pathol, 2005, 18 (1): 143-152
- [13] Dias S, Choy M, Alitalo K, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FL T-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy[J]. Blood, 2002, 99(6): 2179-2184