

子宫内膜癌 VEGF-D、MLD 的表达及其与淋巴结转移的关系

董莉,黎卫平,闫文静,吴素香

Relationship between Expression of VEGF-D and MLD and Lymph Node Metastasis in Endometrial Carcinoma

DONG Li, LI Wei-ping, YAN Wen-jing, WU Su-xiang

Institute of Pathology, Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Abstract :Objective To analyze the relationship between expression of vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) and the microlymphatic density (MLD) and lymph node metastasis in endometrial carcinoma. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect VEGF-D and MLD in 53 cases of endometrial carcinoma and 20 cases of normal endometria. Lymphatic vessels were marked by D2-40 and the microlymphatic density (MLD) was counted by Masakazu's method. **Results** (1) The positive expression rate of VEGF-D and MLD in the endometrial carcinoma tissue (39/53, 23.54 ± 7.84) were much higher than that in normal endometria tissue (5/20, 10.48 ± 1.62) ($P < 0.05$); the positive expression rate of VEGF-D and MLD in lymph node-positive group (33/38, 32.05 ± 3.27) were much higher than that in lymph node-negative group (6/15, 20.23 ± 4.57) ($P < 0.05$); the positive expression rate of VEGF-D in endometrial carcinoma had no correlation with age, differentiation and depth of invasion ($P > 0.05$ respectively), but was significantly related to clinical stage ($P < 0.05$). (2) The positive expression of VEGF-D had correlation with MLD ($r_s = 0.398$, $P < 0.05$). The MLD of the positive group of the VEGF-D (31.17 ± 2.82) was higher than in the negative group (16.75 ± 3.63) ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive expression of VEGF-D in endometrial carcinoma has significantly correlation with MLD and it may induce lymphangiogenesis and promote the lymph node metastasis of endometrial carcinoma. The VEGF-D may be used as a valuable index in evaluating diagnosis, treatment and prognosis of endometrial carcinoma.

Key words: Endometrial carcinoma; Vascular endothelial growth factor D; Microlymphatic density; Lymph node metastasis

摘 要:目的 探讨子宫内膜癌组织中血管内皮生长因子 D(VEGF-D)和微淋巴管密度(MLD)的表达与淋巴结转移的关系。方法 选取子宫内膜癌标本 53 例,正常子宫内膜标本 20 例,以淋巴管特异性标记物 D2-40 标记淋巴管并计数 MLD,运用免疫组织化学技术检测 VEGF-D 和 MLD 在子宫内膜癌、正常内膜组织中的表达。结果 (1) VEGF-D 和 MLD 在子宫内膜癌组织中的阳性表达率及密度值(39/53, 23.54 ± 7.84)均显著高于正常内膜组织(5/20, 10.48 ± 1.62) ($P < 0.05$);两者在淋巴结转移组的阳性表达率及密度值(33/38, 32.05 ± 3.27)也明显高于无淋巴结转移组(6/15, 20.23 ± 4.57) ($P < 0.05$); VEGF-D 的表达在不同年龄、不同组织分化程度、不同浸润深度之间差异均无统计学意义($P > 0.05$),在临床分期的表达中差异有统计学意义($P < 0.05$)。 (2) 子宫内膜癌 VEGF-D 的表达与 MLD 存在相关性,相关系数 $r_s = 0.398$ ($P < 0.05$), VEGF-D 阳性组 MLD(31.17 ± 2.82)较 VEGF-D 阴性组 MLD(16.75 ± 3.63)显著增高($P < 0.05$)。结论 VEGF-D 在子宫内膜癌中呈高表达且与微淋巴管密度(MLD)呈正相关,其可能通过诱导淋巴管生成促进子宫内膜癌淋巴结转移,可作为指导子宫内膜癌诊治及判断预后的一个重要指标。

关键词:子宫内膜癌; VEGF-D; MLD; 淋巴结转移

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2008)12-0885-03

0 引言

子宫内膜癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,约占女性生殖道恶性肿瘤的 20%~30%,其发病率呈逐年上升趋势^[1]。子宫内膜癌主要通过淋巴道转移且

收稿日期: 2007-11-23; 修回日期: 2008-04-15

作者单位: 730000 兰州大学医学院病理学研究所

作者简介: 董莉(1980-),女,硕士,主要从事肿瘤病理学方面研究

直接与其预后相关。大量实验研究表明,VEGF-D 不但是重要的肿瘤淋巴管生成因子,而且还能促进实验性肿瘤的淋巴结转移。本实验拟通过检测子宫内 膜癌中 VEGF-D 和 MLD 的表达,判断两者在子 宫内膜癌淋巴管形成及淋巴结转移中的作用,为子 宫内膜癌的诊治及预后判断提供新的途径。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集兰州军区总医院、甘肃省妇幼保健院 2002 年 10 月~2007 年 4 月间手术切除、HE 常规病理诊 断的子宫内膜癌石蜡包埋标本 53 例,患者年龄 27 ~69 岁,中位年龄 53 岁。其中高分化 19 例,中分 化 23 例,低分化 11 例;无肌层浸润 12 例,浅肌层浸 润($\leq 1/2$ 肌层)34 例,深肌层浸润($> 1/2$ 肌层)7 例;按 1988 年 FIGO 临床分期标准: 期 25 例, 期 17 例, 期 11 例;淋巴结转移 38 例,无淋巴结转 移 15 例。同期选择正常子宫内膜标本 20 例。

1.2 试剂

VEGF-D 为兔抗人多克隆抗体(浓缩型),购自 武汉博士德生物工程公司;D2-40 为鼠抗人单克隆 抗体,PV-6000 试剂,DAB 显色剂,PBS 缓冲液及抗 原修复液均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 方法

标本以 10 %福尔马林固定,常规石蜡包埋,切 片厚度 4 μ m。所有标本均行常规 HE 染色,病理组 织学确诊。石蜡包埋组织脱蜡水化;微波修复 5 ~ 10 min,重复一次,自然冷却至室温,3 % H₂O₂、37 孵育 10 min,滴加一抗,37 孵育 60 min,PBS 冲 洗;滴加 PV-6000 试剂,37 孵育 15 min,PBS 冲 洗;DAB 显色。设阳性对照(试剂公司提供的阳性 片)和阴性对照(PBS 代替)各 1 张。

1.4 结果判定

1.4.1 VEGF-D 染色判断标准 VEGF-D 阳性物 质主要定位于肿瘤细胞胞浆中。按 Shimizu 等^[2]方 法,阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分 别记为 0 ~ 3 分;着色阳性面积按无着色、着色 $< 1/3$ 、 $1/3 \sim 2/3$ 、 $> 2/3$ 分别记为 0 ~ 3 分,两项记 分之和判断结果: < 3 分为(-),3 分为(+),4 分为 (++) ,5~6 分为(+++)。

1.4.2 MLD 计数 按 Masakazu 等^[3]报道的方 法,先在低倍视野下观察切片,确定淋巴管密度最高 区域,再在 200 倍视野下选取最丰富的区域计数 5 个视野毛细淋巴管数,计算每个区域的微淋巴管数。

1.5 统计学方法

所有数据均用 SPSS 12.0 统计程序包进行统计

学分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为差异有统计学意义的检验 标准。采用 Chi-square 检验、*t* 检验及 Spearman 等 级相关检验。

2 结果

2.1 子宫内膜癌中 VEGF-D 的表达和 MLD

VEGF-D 阳性物质主要位于瘤细胞胞浆。 VEGF-D 在子宫内膜癌组织、淋巴结转移组的阳性 表达率均显著高于正常内膜组织及无淋巴结转移组 (*P* 均 < 0.05);MLD 在子宫内膜癌组织和淋巴结转 移组的密度值也明显高于正常内膜组织及无淋巴结 转移组(*P* 均 < 0.05),见表 1。

表 1 子宫内膜癌中 VEGF-D 的表达与 MLD
Tab 1 The expression of VEGF-D and MLD in endometrial carcinoma

组别	n		VEGF-D + -	χ^2	<i>P</i>	MLD($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
内膜癌组织	53	39	14			23.54 $\pm$ 7.84		
正常内膜组织	20	5	15	14.32	0.000	10.48 $\pm$ 1.62	7.31	0.000
有淋巴结转移	38	33	5			32.05 $\pm$ 3.27		
无淋巴结转移	15	6	9	9.85	0.002	20.23 $\pm$ 4.57	6.66	0.000

子宫内膜癌组织 VEGF-D 的表达与患者年龄、 组织分化程度、肌层浸润深度均无关(*P* 均 > 0.05)。 而在不同临床分期中的表达差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

表 2 子宫内膜癌 VEGF-D 的表达与临床病理因素的关系
Tab 2 Relationship between expression of VEGF-D and clinicopathological factors in endometrial carcinoma

临床病理 因素	<i>n</i>	VEGF-D		χ^2	<i>P</i>
		+	-		
年龄					
< 45	12	7	5		
> 45	41	32	9	0.98	0.322
分化程度					
高分化	19	13	6		
中分化	23	19	4	1.78	0.410
底分化	11	7	4		
肌层浸润深度					
无	12	8	4		
$\leq 1/2$	34	28	6	5.04	0.080
$> 1/2$	7	3	4		
临床分期					
	25	14	11		
	17	15	2	7.55	0.023
	11	10	1		

2.2 子宫内膜癌 VEGF-D 的表达强度与 MLD 的 关系

子宫内膜癌组织 VEGF-D 阳性组 MLD(31.17 ± 2.82)较阴性组 MLD(16.75 ± 3.63)显著增高($P < 0.05$),MLD 和 VEGF-D 表达强度呈正相关关系,随 VEGF-D 表达的增强逐渐增高,相关系数 $r_s = 0.398$ ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 子宫内膜癌 VEGF-D 的表达强度与 MLD 的关系
Tab 3 Relationship between VEGF-D and MLD in endometrial carcinoma

VEGF-D 分级	n	MLD($\bar{x} \pm s$)	P
-	14	16.75 $\pm$ 3.63	0.003
+	9	22.92 $\pm$ 3.62	
++	17	31.58 $\pm$ 4.04	
+++	13	37.08 $\pm$ 2.51	

3 讨论

大量临床病理研究证实,在多种人类肿瘤中,VEGF-C 表达与淋巴结转移密切相关;高水平表达 VEGF-C 的肿瘤患者较低水平表达 VEGF-C 患者的预后差^[4]。相对而言,对于 VEGF-D 的表达及与肿瘤淋巴结转移关系的报道不多,且结论存在分歧。VEGF-D 是 1998 年在核酸数据库中通过同源性搜索发现的第二个淋巴管生长因子^[5]。VEGF-D 可与 VEGFR-2、VEGFR-3 结合,在脉管发育上具有双重作用:既可诱导血管生成(主要由 VEGFR-2 介导)又可诱导淋巴管生成(主要由 VEGFR-3 介导),其中与 VEGFR-3 结合可促进淋巴管生成。VEGF-D 与 VEGFR-3 的胞外区域高度特异性结合,使受体自身磷酸化而激活细胞内信号传导通路,刺激淋巴管内皮细胞的增殖、迁移,诱导淋巴管生成参与体内多种病理生理过程。Stacker 等^[6]报道,VEGF-D 可在小鼠肿瘤模型中诱导肿瘤淋巴管生成,同时肿瘤也表现出更高的转移率和生长率,且 VEGF-D 可通过诱导淋巴管新生加速肿瘤细胞向淋巴道播散。Onogawa 等^[7]报道,VEGF-D 高表达与结肠癌淋巴结转移和预后不良显著相关。在胃癌、卵巢癌中也发现高表达的 VEGF-D 与淋巴结转移呈正相关,是肿瘤患者存活的独立预后因子。但是也有一些研究得出不同的结论,如在肺腺癌^[8]、头颈部鳞癌^[9]等,VEGF-D 表达与淋巴结转移无关,甚至 VEGF-D 低表达与淋巴结转移显著相关。推测可能是因为不同肿瘤中决定肿瘤转移的主要因素不同,而且 VEGF-D 前体的蛋白水解程度和 VEGFR-3 的表达方式也有差别,同时不同肿瘤自身生长产生不同的物理压力也会对淋巴管生成起不同的阻碍作用。我们的实验结果显示,子宫内膜癌组织中 VEGF-D 阳性表达率(73.58%)明显高于正常内膜组织

(25.00%),VEGF-D 的这种表达提示其在子宫内膜癌的发生、发展中可能发挥重要作用。VEGF-D 的表达与子宫内膜癌患者的年龄、组织分化程度、肌层浸润深度无关,而与临床分期密切相关,其表达随临床分期升高而逐渐增高,表明临床分期越晚侵袭性越强,VEGF-D 的表达越强,淋巴结的转移率就越高。在淋巴结转移组中,VEGF-D 的阳性表达率(86.84%)明显强于无淋巴结转移组(40.00%),表明 VEGF-D 的高表达与子宫内膜癌淋巴结转移密切相关。检测 VEGF-D 可作为临床判断子宫内膜癌生物学行为及预后的重要参考指标。

目前,肿瘤 MLD 与肿瘤淋巴结转移之间关系的研究受到人们的高度关注。

在乳腺癌的研究中观察到乳腺癌淋巴管密度增加与腋窝淋巴结转移呈正相关,且 MLD 越高,腋窝淋巴结转移的概率越大^[10]。在结肠癌的研究中也有相似报道^[11],癌周淋巴管密度升高与淋巴结转移、淋巴管侵犯、远处器官转移呈正相关。本实验运用单克隆抗体 D2-40 标记淋巴管,D2-40 是分子量为 40kD 的氧连接型唾液酸糖蛋白,经过组织超微结构和其他淋巴管标记物证实,只存在于淋巴管内皮细胞上,此抗体对淋巴管内皮具有很强的特异性和敏感性^[12]。本实验结果显示,子宫内膜癌淋巴结转移组 MLD(32.05 ± 3.27)明显高于无淋巴结转移组 MLD(20.23 ± 4.57),推测子宫内膜癌淋巴管密度增加是其淋巴道转移过程中的一个重要步骤,是影响淋巴道转移的重要因素。其机制可能为肿瘤内部淋巴管增殖扩张及密度升高,增加了瘤细胞与淋巴管内皮接触面积^[13],使得进入淋巴循环的瘤细胞数目增多。MLD 的检测可作为预测肿瘤转移的重要指标。

有报道发现在乳腺癌中,随癌细胞 VEGF-D 表达强度的增加,其癌组织内的淋巴管密度也明显增加^[14]。在结肠癌的研究中亦有相似报道^[15],淋巴管密度的增加与癌细胞 VEGF-D 表达增高呈正相关。本实验结果显示,VEGF-D 阳性组较阴性组 MLD 显著增高,MLD 随 VEGF-D 表达的增强具有增高的趋势,两者表达呈正相关,从而表明两者在子宫内膜癌的发生及转移中可能均是很重要因素。推测 VEGF-D 与 MLD 在子宫内膜癌中高表达可能与促进肿瘤增生及淋巴管生成相关联。因此,在此领域的继续研究不但可能会进一步揭示 VEGF-D 和 MLD 在子宫内膜癌发生、发展及转移中的作用机制,而且可通过对两者的抑制为防治子宫内膜癌提供新的思路 and 措施。

(下转第 891 页)

反应,如胃肠道出血、穿孔、严重的过敏或肝肾功能损害。提示长期维持使用舒林酸是安全的。

因此,舒林酸长期维持治疗可使家族性腺瘤性息肉病患者结肠残存腺瘤数目、异型程度下降,绒毛管状腺瘤的比例下降,可能具有延缓或预防结肠癌发生的作用。目前为止舒林酸还不足以取代手术,患者仍需定期复查肠镜,但可作为手术治疗的有益补充,这一点与国外作者的观点一致^[14]。

参考文献:

[1] 李军,吕愈敏,顾芳,等.舒林酸长期治疗家族性腺瘤性息肉病的临床研究[J].中华消化杂志,2005,25(3):153-156.

[2] Nugent KP, Phillips RK. Rectal cancer risk in older patients with familial adenomatous polyposis and an ileorectal anastomosis: A cause for concern. [J]. Br J Surg, 1992, 79 (11): 1204-1206.

[3] Labayle D, Fischer D, Vielh P, et al. Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis [J]. Gastroenterology, 1991, 101(3): 635-639.

[4] Gardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis [J]. N Engl J Med, 1993, 328(18): 1313-1316.

[5] 安燕芳,吕愈敏,叶嗣懋.舒林酸对家族性腺瘤性息肉病的疗效及作用机制的探讨[J].中华消化杂志,2000,20(4):243-245.

[6] Cruz-Correa M, Hyland LM, Romans KE, et al. Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: a prospective cohort study [J]. Gastroenterology, 2002, 122(3):

641-645.

[7] Winde G, Schmid KW, Schlegel W, et al. Complete reversion and prevention of rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis by rectal low-dose sulindac maintenance treatment. Advantages of a low-dose nonsteroidal anti-inflammatory drug regimen in reversing adenomas exceeding 33 months [J]. Dis Colon Rectum, 1995, 38(8): 813-830.

[8] Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1470(2): M69-M78.

[9] 李军,吕愈敏,金珠,等.塞来昔布对二甲胍诱导的大鼠畸变隐窝灶的预防作用[J].中华消化杂志,2004,24(3):151-153.

[10] 李传凤,吕愈敏,倪菊华,等.体外过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在舒林酸抗结肠肿瘤机制中的作用[J].北京大学学报·医学版,2007,39(1):72-76.

[11] Lim SJ, Lee YJ, Lee E. p38MAPK inhibitor SB203580 sensitizes human SNU-C4 colon cancer cells to exsulind-induced apoptosis [J]. Oncol Rep, 2006, 16(5): 1131-1135.

[12] Nagamine M, Okumura T, Tanno S, et al. PPAR gamma ligand-induced apoptosis through a p53-dependent mechanism in human gastric cancer cells [J]. Cancer Sci, 2003, 94(4): 338-343.

[13] Koornstra JJ, Rijcken FE, Oldenhuis CN, et al. Sulindac inhibits beta-catenin expression in normal-appearing colon of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and familial adenomatous polyposis patients [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005, 14(7): 1608-1612.

[14] Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis [J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(2): 385-398.

[编辑:贺文;校对:周永红]

(上接第 887 页)

参考文献:

[1] 谢虹.子宫内膜癌发病相关因素的分析[J].临床和实验医学杂志,2007,6(2):108-109.

[2] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Haras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues [J]. Hum Pathol, 1990, 21(6): 607-612.

[3] Ohno M, Nakamura T, Kunimoto Y, et al. Lymphagenesis correlates with expression of vascular endothelial growth factor-C in colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2003, 10(4): 939-943.

[4] Staker SA, Achen MG, Jussila L, et al. Lymphangiogenesis and cancer metastasis [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 573-578.

[5] Achen M G, 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) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(2): 548-553.

[6] Stacker S A, Caesar C, Baldwin M E, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics [J]. Nat Med, 2001, 7(2): 186-191.

[7] Onogawa S, Kitada Y, Taknaka S, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma [J]. Cancer Sci, 2004, 95(1): 32-39.

[8] Niki T, Iba S, Tokunou M, et al. Expression of vascular endo-

thelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(6): 2431-2439.

[9] O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis [J]. Cancer, 2001, 92(3): 556-568.

[10] 何建军,任予,王柯.乳腺癌周微淋巴管密度与腋淋巴结转移的相关性研究[J].中国现代医学杂志,2007,17(5):551-557.

[11] 方义湖,黄琼,邓红,等.微淋巴管和微血管密度对结肠癌的预后意义[J].临床与实验病理学杂志,2007,23(1):17-20.

[12] Marc P, Pusztaszeri, Walter Seelentag, et al. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Flt-1 in normal human tissues [J]. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2006, 54(4): 385-395.

[13] Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis [J]. Cancer, 2003, 98(2): 413-423.

[14] 汤红平,张雅洁,顾莹莹,等.VEGF-C和VEGF-D在乳腺癌中的表达及其作用[J].肿瘤,2006,26(6):551-555.

[15] 刘宝全,张雅芳,马晶,等.血管内皮生长因子D和血管内皮生长因子受体3在人结肠癌中的表达及淋巴道转移中的作用[J].解剖学报,2007,38(1):56-61.

[编辑校对:安凤]