

血管内皮生长因子表达与结直肠癌血管生成、转移的关系

郑丰平¹, 袁世珍², 王俊雅¹, 冯智英³, 文卓夫¹

(中山医科大学 1. 附属第三医院消化内科, 2. 孙逸仙纪念医院消化内科, 3. 附属第三医院病理科, 广东 广州 510630)

摘要: 【目的】探讨血管内皮生长因子(VEGF)、血小板反应素(TSP)在结直肠癌中的表达, 与结直肠癌微血管计数、转移之间的关系。【方法】用免疫组化方法(S-P法)检测 105 例原发性结直肠癌手术切除组织中的微血管计数(MVC)和 VEGF、TSP 蛋白表达。【结果】结直肠癌 VEGF 表达阳性率 61.9%, TSP 表达阳性率 72.4%。MVC 在 VEGF 表达阳性者明显高于 VEGF 表达阴性者(31.6 ± 13.2 vs 25.4 ± 10.7 , $P < 0.05$)。发生淋巴结转移、远处转移病人 VEGF 表达阳性率明显高于无转移者(P 均 < 0.05)。MVC 在 TSP 表达阳性者和阴性者之间没有显著性差异(28.7 ± 12.8 vs 30.8 ± 12.4 , $P = 0.434$)。TSP 表达与淋巴结转移和远处转移无关。【结论】VEGF 表达与结直肠癌血管生成和转移密切相关, 可作为反映结直肠癌发展和转移潜能的生物学指标。

关键词: 结肠直肠癌; 血管生成因子; 肿瘤转移

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)01-0073-03

The Relationship of Vascular Endothelial Growth Factor with Angiogenesis and Metastasis in Colorectal Adenocarcinoma ZHENG Feng-ping¹, YUAN Shi-zhen², WANG Jun-ya¹, FENG Zhi-ying³, WEN Zhuo-fu¹. (1. Department of Gastroenterology, Third Affiliated Hospital, 2. Department of Gastroenterology, Memorial Hospital, 3. Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

Abstract 【Objective】The aim of this study was to analyze the relationship of vascular endothelial growth factor, thrombospondin expression with angiogenesis and metastasis in colorectal adenocarcinoma. 【Method】The microvessel counts (MVC), the expression of VEGF and TSP protein in 105 primary colorectal carcinoma specimens were evaluated by immunohistochemical staining. 【Results】Sixty-five (61.9%) of the 105 cases were positive for VEGF protein, seventy-six (72.4%) positive for TSP protein. MVC was significantly higher in VEGF-positive tumors than in VEGF-negative tumors (31.6 ± 13.2 vs 25.4 ± 10.7 , $P < 0.05$). VEGF expression was more frequent in lymph node ($P < 0.05$) and hematogenous ($P < 0.05$) metastatic tumors than in non-metastatic tumors. MVC was not different between TSP-positive tumors and TSP-negative tumors (28.7 ± 12.8 vs 30.8 ± 12.4 , $P = 0.434$). TSP expression showed no association with lymph node and hematogenous metastasis. 【Conclusions】The expression of VEGF is closely associated with angiogenesis and tumor metastasis, it could be regarded as a biological marker in prognosis for colorectal tumor progression and metastasis.

Key words: colorectal neoplasms; angiogenesis factor; neoplasm metastasis

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 又称为血管通透因子(vascular permeability factor, VPF), 是最重要的促进血管生成的因子^[1], 将 VEGF 基因转入 VEGF 低表达的肿瘤细胞后, 该细胞的促血管生成能力增加, 侵袭性增强。在原发肿瘤中 VEGF 通过诱导血管生成产生了适宜于转移的环境。血小板反应素(thrombospondin, TSP)是最强的血管生成负性调节物之一, 能调节细胞的粘附、移行、增殖和分化, 诱导血小板聚集和抑制血管生成^[2]。本研究检测 VEGF、TSP 蛋白在结直肠癌中的表达, 分析 VEGF、TSP 与结直肠癌血管生成和转移的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集我院外科 1996 年 12 月至 2000 年 3 月原发性结直肠癌手术切除的标本 105 例, 男 58 例, 女 47 例, 年龄 22~85 岁, 中位年龄 59 岁。排除术前接受化疗或放疗的患者。标本作常规石蜡包埋, HE 染色。

1.2 VEGF、TSP 蛋白表达的检测

兔抗人因子 VIII 相关抗原(F-VIII RAg)多克隆抗体, 兔抗人 TSP 多克隆抗体 TSP Ab-8, 兔抗人 VEGF 多克隆抗体, 链霉菌抗生物素蛋白(Ultra-

收稿日期: 2001-06-06

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2001201)

作者简介: 郑丰平(1966-), 男, 浙江开化人, 博士, 主治医师。

sensitive S-P)试剂盒,购自于福州迈新公司(Maxim Bio, Inc)。

用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学染色方法(S-P法),方法按试剂盒的要求进行。每次染色采用PBS(pH7.4)替代一抗作阴性对照,以正常结肠组织切片作正常对照。F-VIIIaAg染色不需要抗原修复处理。

1.3 VEGF、TSP 结果的判断

采用兼顾阳性染色强度和阳性细胞所占百分比的判断标准^[4]。将结肠直肠癌肿瘤细胞染色强度打分:0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。在高倍镜下计数400个结肠直肠癌肿瘤细胞,按染色阳性细胞所占百分比打分:0分为阴性,1分为阳性细胞 $\leq 10\%$,2分为11~50%,3分为51~75%,4分为 $> 75\%$ 。染色强度与阳性百分比的乘积 > 3 分为免疫反应阳性。并按乘积分数分为4个等级:-(0、1、2分)、+(3、4分)、++(6、8分)、+++ (9、12分)。

1.4 微血管计数方法

与背景明显有别的任何一个被染成棕色的内皮细胞或不管是否有腔的细胞丛,作为一个微血管计数,而管径大于约8个红细胞并具有厚肌层的血管不作为微血管计数。先在低倍镜(10 \times 10)下全面观察切片确定肿瘤内最高微血管密度区,然后计数3个高倍镜(20 \times 10)视野下的微血管计数。以最高值作为该病例的微血管计数^[3]。

1.5 统计学处理

计量资料比较采用 t 检验和方差分析;计数资料比较用 χ^2 及Fisher精确检验。采用SPSS8.0统计软件包分析。

2 结果

2.1 VEGF 蛋白表达

105例结肠癌标本中,65例(61.9%)结肠癌 VEGF 表达阳性。VEGF 表达阳性的肿瘤细胞多位于结肠癌浸润前缘。VEGF 表达于结肠癌细胞浆和细胞膜,血管内皮细胞可见 VEGF 染色较弱,见图1。正常黏膜细胞未见 VEGF 表达阳性。

2.2 TSP 蛋白表达

72.4%(76/105)结肠癌 TSP 表达阳性。TSP 在结肠癌内的表达呈现出肿瘤细胞染色不均一性,强阳性不一定位于肿瘤浸润的前缘。TSP 也表达于癌细胞浆和细胞膜,少数正常的结肠直

肠黏膜细胞,一些血管内皮细胞和间质细胞可见弱 TSP 染色。

2.3 VEGF、TSP 表达与微血管计数的关系

微血管计数在 VEGF 表达阳性的结肠癌病人明显高于 VEGF 表达阴性者(31.6 \pm 13.2 vs 25.4 \pm 10.7, $P=0.013$);而结肠癌微血管计数在 TSP 表达阳性者和阴性者之间没有显著性差异(28.7 \pm 12.8 vs 30.8 \pm 12.4, $P=0.434$),见图2。

2.4 VEGF、TSP 表达与临床病理的关系

各组 VEGF、TSP 表达率在结肠癌浸润深度、组织学分级、肿瘤大小之间没有差别。发生淋巴结转移病人 VEGF 表达阳性率明显高于无淋巴结转移者。发生远处转移病人 VEGF 表达阳性率明显高于无远处转移者。I、II期结肠癌 VEGF 表达率相近,无显著性差别,而 III、IV期结肠癌 VEGF 表达率明显高于 I、II期者。结肠癌 TSP 的表达率在有无淋巴结转移或有无远处转移者之间、在结肠癌 TNM 分期 I、II期和 III、IV期之间没有显著性差异。结果见表1。

表1 结肠直肠癌 VEGF、TSP 表达与临床病理的关系
Table 1 VEGF and TSP expression association with clinicopathologic parameters in colorectal adenocarcinomas

Parameters	n	VEGF			TSP		
		-	+	P	-	+	P
Wall invasion							
Submucosal	35	15	20		13	22	
Adventitia	53	20	33	0.643	10	43	0.127
Neighboring structure	17	5	12		6	11	
Histological grade							
I	51	20	31		13	38	
II	45	16	29	0.859	4	31	0.771
III	9	4	5		2	7	
Tumor size							
≤ 5 cm	33	13	20		9	24	
≤ 10 cm	59	21	38	0.764	16	43	0.964
< 10 cm	13	6	7		4	9	
Lymph node metastasis							
Negative	72	32	40		20	52	
Positive	33	8	25	0.048	9	24	0.957
Hematogenous metastasis							
Negative	89	38	51		22	67	
Positive	16	2	14	0.022	7	9	0.135
TNM stage							
I、II	63	30	33		14	49	
III、IV	42	10	32	0.014	15	27	0.099

3 讨论

当肿瘤细胞群生长超过数个立方毫米时,细胞必须表达血管生成表型^[5]。血管生成诱导因子(包括 VEGF)参与了肿瘤组织血管生长的过程。

本研究中 VEGF 表达阳性病人的微血管计数明显高于 VEGF 表达阴性病人;在癌浸润前缘,微血管密度较高,血管生成的程度活跃,VEGF 表达也明显,显示了 VEGF 表达与新生血管部位的一致性。Takahashi 在对结肠癌研究中也报道了类似的结果^[6]。

国内外已有 VEGF 和肿瘤血管生成等生物学行为相关性的研究报告。在无胸腺小鼠的皮下肿瘤中,VEGF 受体表达水平的上调和肝转移是同时发生的;应用 VEGF 单克隆抗体可产生剂量和时间依赖性的肿瘤抑制作用,并明显减少肝转移的发生。结直肠癌病人血清 VEGF 水平明显高于结直肠腺瘤病人和正常人,血清 VEGF 水平与 Dukes 分期、血清 CEA 水平明显相关,血清 VEGF 水平在肝或肺转移病人高于局灶性肿瘤病人^[7]。本研究也有类似的发现,发生淋巴结转移、远处转移者 VEGF 表达均明显高于无转移者,但与反映结直肠癌生物学行为的其他因素如肿瘤分化程度、浸润深度、肿瘤大小没有关系;VEGF 表达在 TNM 分期较晚的 III、IV 期结直肠癌明显高于 I、II 期病人。在转移性肿瘤中,VEGF 高表达,其血管密度也明

显增高,揭示 VEGF 表达和微血管计数均在不同程度上反映了与结直肠癌肿瘤发展、转移之间的密切关系。最近报道一些小肿瘤能被内镜下切除或局部手术切除而无需清扫淋巴结,但是 VEGF 表达阳性的病人,可能应该做传统的结直肠癌切除术加淋巴结清扫。

(本文图 1,图 2 见插页 4. Fig. 1, Fig. 2 shown in back coloured page 4)

参考文献:

- [1] Kim K J, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo* [J]. *Nature* 1993, 362(6423): 841.
- [2] Robert D D. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1 [J]. *FASEB J*, 1996, 10(10): 1183.
- [3] Macchiarini P, Fontanini G, Hardin M J, *et al.* Relation of neo-vascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer [J]. *Lancet*, 1992, 340(8812): 145.
- [4] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. *中国癌症杂志*, 1996, 6(4): 229.
- [5] Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue [J]? *Cancer Res*, 1986, 46(2): 467.
- [6] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana C D, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(18): 3964.
- [7] Fujisaki K, Mitsuyama K, Toyonaga A, *et al.* Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer [J]. *Am J Gastroenterol*, 1998, 93(2): 249.

(编辑 黄小延)

·简讯·

英《自然》杂志称中国已具有世界研究水平

东方网 2001 年 11 月 2 日消息:“首先要祝贺中国科学家。在过去 3 年里,约 30 篇中国本土学者的论文叩开了《自然》杂志大门,主要集中在古生物学、地球物理学、细胞学等领域。要知道,《自然》选稿可是非常挑剔的。”作为世界顶尖学术期刊之一,英国《自然》杂志的论文代表了世界科学发展的最高水平,由此成为全球科学家心中的“圣殿”。昨天,由 3 位资深编辑组成的代表团来到中科院上海分院,他们此行的目的是加强与上海科技界的合作交流,同时期待更多的研究成果投向《自然》。“为什么要来中国?毫无疑问,这里已成为具有世界水平的研究来源之一!”代表团成员之一的辛克莱博士眉飞色舞地告诉记者,她所负责的《自然生物技术》每月收到全世界近 200 篇论文,中国作者在其中占了 1%,这是非常值得骄傲的。而刚刚出版的《腾飞之龙》专辑,更是浓缩了最近 10 年来自中国的激动人心的古生物发现。查尔斯·詹宁斯博士也赞同地点头:“相比过去,中国学者的论文质量有了长足进步,语言也不再成为他们投稿的障碍。”这位《自然》杂志北美区主编同时透露,除发表论文以外,编辑部已考虑聘任中国编委,协助杂志审稿。面对中科院学术厅数百双认真的眼睛,物理编辑海尔默博士说:激动人心的成果、实用价值,是《自然》杂志最看重的两个方面。她鼓励青年科学家更主动地提出问题,创造性地思维。“我们对所有来稿一视同仁。当然,一些世界知名实验室会有优势,但我相信,新人新观点同样能获得青睐。”比发表论文更重要的,是树立良好学风。詹宁斯博士告诉记者,1998 年,《自然》杂志曾向中国科学家发放了一份如何投递文章的小册子,封面上印有一句中国古训——“质重于量”。“我们希望以此提醒青年学者:严谨求实,切忌浮躁。无论从事科学研究活动还是撰写研究论文,都应该注重创新和学术内涵,而非追求文章的数量和外观包装。”

(学讯转载)

血管内皮生长因子表达与结直肠癌血管生成、转移的关系 (正文见第 73 页)

The Relationship of Vascular Endothelial Growth Factor with Angiogenesis and Metastasis
in Colorectal Adenocarcinoma (Text in page 73)

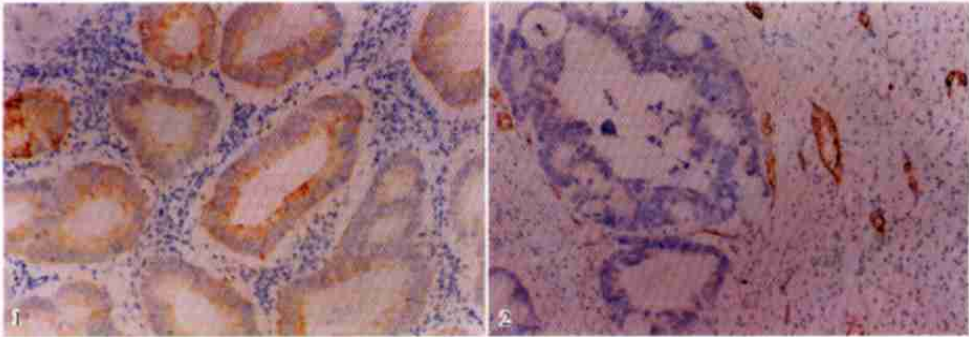


图 1 结直肠癌 VEGF 免疫组化染色

图 2 结直肠癌血管内皮细胞 F-Ⅷ RAg 免疫组化染色

Fig. 1 Immunohistochemical staining for vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in colorectal adenocarcinoma (× 200)

Fig. 2 Vascularization in colorectal adenocarcinoma was demonstrated by immunohistochemical staining for F-Ⅷ RAg (× 200)

彩色多普勒超声评价腮腺血流与唾液分泌的关系 (正文见第 76 页)

Relationship Between the Blood Flow of Parotid Gland and Salivary Secretion: Evaluation with Color Doppler Sonography (Text in page 76)

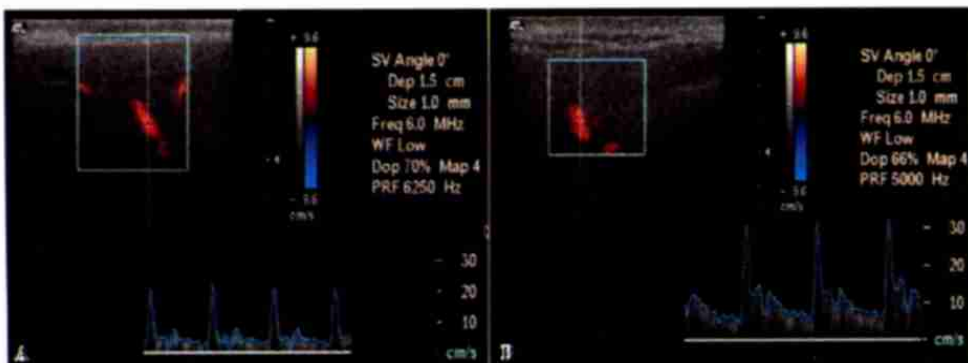


图 1 酸刺激前后腮腺小动脉血流变化

Fig. 1 Changes of arterial blood flow in parotid gland before and during lemon stimulation

A: $v_s = 20.1 \text{ cm/s}$, $v_m = 0 \text{ cm/s}$, $RI = 1.0$

B: $v_s = 30.1 \text{ cm/s}$, $v_m = 5.0 \text{ cm/s}$, $RI = 0.8$