

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.03.007

非小细胞肺癌组织血管内皮生长因子的表达及微血管密度的变化

王雷^{1,2} 王国范^{2△} 王秀美³ 李笑颜³ 张玉革³⁽¹⁾ 山东省肿瘤医院, 山东 济南 250117; ⁽²⁾ 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250001;⁽³⁾ 济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029)

摘要 **目的** 观察非小细胞肺癌(NSCLC)组织血管内皮生长因子(VEGF)的表达及微血管密度(MVD)的变化,初步探讨 VEGF 在 NSCLC 发生发展及转移中的作用。**方法** 采用免疫组化法对 36 例 NSCLC 患者及 17 例肺良性瘤样病变患者周围正常组织中 MVD 及 VEGF 的表达进行检测。**结果** NSCLC 组织 VEGF 的阳性表达率及 MVD 值变化显著高于正常肺组织($P<0.05$; $P<0.01$)。VEGF 表达和 MVD 值与肿瘤组织学类型及分化程度有关,在高、中、低(I、II、III级)分化癌中存在显著差异($P<0.01$; $P<0.05$);有淋巴结转移组 VEGF 表达和 MVD 值显著高于无淋巴结转移组($P<0.05$)。**结论** VEGF 在肿瘤的血管形成、发展和转移中起重要作用,并可能成为肿瘤预后判断的参考指标。

关键词 VEGF;微血管密度;非小细胞肺癌

中图分类号 R734.2 **文献标识码** B **文章编号** 1000-9760(2014)06-176-04

肿瘤的发生、发展、浸润及转移等过程均与肿瘤血管生成有关,因此目前对肿瘤血管研究越来越引起大家的重视^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达于血管内皮细胞,研究表明,VEGF 是目前肿瘤新生微血管最强的促血管生成因子之一^[2],是研究肿瘤的重要受体。微血管密度(microvascular density, MVD)的测定已成为目前评价肿瘤血管生成的金标准。近年来,大家对肿瘤血管生成研究主要集中在肾癌、脑肿瘤、乳腺癌、胃癌等,这些组织中均查到有 VEGF 高度表达^[3]。CD34 是广泛存在于血管内皮细胞的一种抗原,是一类不同于Ⅷ因子相关抗原的蛋白质^[4]。研究发现,利用 CD34 进行免疫组化染色来显示并计量血管内皮细胞比Ⅷ因子相关抗原更具有特异性,敏感性也更强^[5]。目前,其在非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)的研究报道不多^[6]。本文观察了 NSCLC 组织中 VEGF 和 MVD 的表达,探讨其在 NSCLC 发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集本院自 2010 年 1 月 1 日至 2012 年 7 月

30 日 NSCLC 手术标本 36 例,术后病理证实为 NSCLC,且无癌组织坏死。其中鳞癌 15 例;腺癌 17 例(普通腺癌 14 例、细支气管-肺泡癌 3 例);腺鳞癌 4 例。排除术前有放疗、化疗及其他抗肿瘤治疗史。对照组 17 例取自同期接受手术治疗的肺部良性肿瘤患者病变周围 5cm 以外正常组织,其中结核球 6 例,错构瘤 3 例,肺平滑肌瘤 1 例,炎性假瘤 7 例。所有标本由 2 名病理医师会诊后确诊。

1.2 主要试剂

VEGF 鼠抗人单克隆抗体,鼠抗人 CD34 单克隆抗体, DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 病理学检查 每例标本均分为 10~15 块组织不等,均经 10% 福尔马林固定,常规石蜡切片,经过免疫组化染色,普通光学显微镜观察。

1.3.2 免疫组化染色 采用免疫组织化学 SP 法。VEGF 和 CD34 染色判定均以细胞膜及胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性。

1.4 判定标准

1.4.1 VEGF 阳性率的判定 先在低倍视野下(100×)找到观察部位,然后在高倍视野下(400×)每张切片选取 5 个视野,每个视野下观察 1000 个细胞,染色阳性细胞数<20%为(-),20%~50%为(+),50%~70%为(++),>70%为(+++)。

△ [通信作者] 王国范, E-mail: gf-wang@21cn.com

1.4.2 MVD 计数方法 以 CD34 作为血管内皮标记物,首先在显微镜低倍视野(100×)扫视整张石蜡切片,在每张切片找出 3 个微血管密集区,然后在高倍视野(400×)下计数,视野面积为 0.443mm²。每张切片均计数 3 个视野,取平均值即为 MVD 计数^[3]。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析。

2 结果

2.1 NSCLC 组织 VEGF 的表达及 MVD 值的变化

见表 1。

2.2 不同临床及病理学特征的 NSCLC 患者 VEGF、MVD 表达情况比较

结果显示,VEGF 的表达阳性率与患者性别、

年龄、吸烟之间的差异均无统计学意义($P>0.05$);而在不同组织类型及有无淋巴结转移之间,VEGF 的阳性分布和 MVD 计数均有统计学意义($P<0.05$),且 VEGF 在腺癌中表达率最高。不同肿瘤的病理分级及 TNM 分期中 VEGF 阳性分布差异有统计学意义($P<0.05$);病理分级及 TNM 分期越高,VEGF 表达分布越多。见表 2。

表 1 VEGF 在肺组织中的表达及 MVD 变化

	VEGF 表达率(%)	MVD 值($\bar{x}\pm s$)
对照组	23.5	19.71±6.41
NSCLC	75	25.45±2.31
<i>t</i>	—	3.565
<i>P</i>	0.01*	0.002

注: * 采用 Fisher 概率法

表 2 VEGF 及 MVD 表达与临床病理特征关系

参数	n	VEGF 阳性				(+) %	<i>P</i>	MVD	<i>P</i>
		—	+	++	+++				
性别	男	19	4	5	7	3	73.68	0.286	25.95±1.61
	女	17	2	3	10	2	76.47		24.82±2.83
年龄	<60 岁	17	3	4	8	2	70.00	0.187	25.84±1.90
	≥60 岁	19	3	4	9	3	81.25		25.41±1.84
组织类型	鳞癌	8	3	3	2	0	60.00	0.023*	23.75±2.76
	腺癌	15	1	2	8	4	88.24		25.40±1.24
	腺鳞癌	13	2	3	7	1	75.00		26.55±1.62
病理分级	I 级	9	4	2	3	0	44.44	0.008**	26.12±2.10
	II 级	10	2	2	4	2	85.71		25.20±2.27
	III 级	17	0	4	10	3	84.62		25.09±2.67
TNM 分期	I 级	8	3	2	2	1	55.56	0.013*	24.00±2.07
	II 级	10	3	2	5	0	73.33		24.81±2.14
	III 级	12	0	4	10	4	91.67		27.18±1.72
吸烟指数	≤400 支/年	18	3	5	8	2	81.25	0.302	25.83±1.75
	>400 支/年	18	3	3	9	3	70.00		25.44±1.98
淋巴结转移	有	15	6	2	6	1	44.44	0.010*	24.47±2.06
	无	21	0	6	11	4	85.19		26.29±1.34

注: * $P<0.05$; ** $P<0.01$; △ $P<0.05$; △△ $P<0.01$ 。

2.3 VEGF 阳性表达与阴性表达组 MVD 计数的比较

结果显示,36 例 NSCLC 患者中,VEGF 阳性者(27 例)MVD 值明显高于 VEGF 阴性者(9 例),差异有显著性($P<0.01$)。表明 MVD 与 VEGF 的表达有一定的关系。见表 3。

表 3 VEGF 阳性表达和阴性表达组 MVD 值的比较($\bar{x}\pm s$)

VEGF	n	MVD
+	27	26.22±1.36
—	9	23.44±1.74
<i>t</i>		-4.2929
<i>P</i>		<0.001

3 讨论

实体肿瘤的生长过程可分为有血管期和无血管期,肿瘤在无血管期获取所需的营养的过程主要靠周围组织的弥散,并通过此途径排泄代谢产物。当肿瘤增长到一定体积时便开始启动血管生成,使肿瘤生长进入血管期;但肿瘤的新生血管并不完整,比正常成熟血管更容易遭受到肿瘤细胞的破坏,而肿瘤细胞可沿着新生的血管开启所谓胶原裂隙发生侵袭^[7]。研究发现实体肿瘤的血管生成是普遍存在的特征,血管生成与肿瘤组织的侵袭、转移密切相关,VEGF 作为血管内皮细胞标记物之一,目前已成为国内外研究的热点^[8]。

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原,能够与血管内皮细胞上的相应受体结合,促进血管内皮细胞分裂、趋化,从而促进血管生成,但对血管内皮细胞以外的其他细胞无促进分裂作用。VEGF 通过增加血管内皮细胞的内囊泡小体功能使血管通透性增加^[9],不但可导致间质水肿和癌性胸腹水,并且可使血管内血浆蛋白外渗,而且能够为肿瘤细胞的生长提供良好的基质。由于肿瘤细胞在生长时自身不能产生纤维蛋白原,VEGF 引起的肿瘤血管通透性的提高,对肿瘤的新生血管形成就显得尤为重要;VEGF 还可通过改变内皮细胞基因的活化形式,抑制内皮细胞的凋亡^[10]。研究发现 VEGF 及其家族成员在众多生理和病理过程中的新生血管生成中都是必不可少的诱导因子之一,尤其在肿瘤新生血管形成的过程中^[11]。人们发现 VEGF 虽然可以在很多正常组织中表达,但表达水平一般偏低,而在一些血供丰富、代谢旺盛的正常组织 VEGF 的表达常均高于其他组织。VEGF 在多数实体瘤细胞中,无论是 mRNA 水平还是蛋白质水平均有过量表达^[12]。

本文运用 VEGF 在血管内皮表达的特性,探讨肿瘤新生血管的形成。通过 MVD 数值的测定,探讨肺癌发生、发展与转移的关系。本文结果显示,VEGF 在 NSCLC 组织中呈高表达,其 MVD 值也高于正常肺组织($P < 0.05$)。VEGF 表达和 MVD 值与肿瘤组织学分化程度有关,在低、中、高分化癌中存在显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);肺癌组织中淋巴结转移阳性组 VEGF 表达和 MVD 值显著高于阴性组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。因此推测肺癌组织标本中 VEGF 的 MVD 计数越多,发生淋巴结转移的机会越多,新生血管增生越

活跃,肿瘤生长越快,生存期越短,VEGF 可能会成为肺癌患者判断预后的参考指标之一。同时发现 VEGF 在肺癌不同病理类型和正常肺组织中均有不同程度的表达,VEGF 在腺癌中的表达最强,为 88.24%;在鳞癌及腺鳞癌中的表达较弱,分别为 60.0%、75.0%;在正常肺组织中的表达最弱,阳性率为 23.5%。通过比较肺癌组织与正常组织、比较不同的肺癌组织类型、发生淋巴结转移和无淋巴结转移组,说明肺癌肿瘤的生长是一种依赖于新生血管形成的过程,组织局部的 VEGF 表达水平高时,血管生长越快,组织生长迅速是肺癌生长的特征。关于 MVD 值与肿瘤远处及淋巴结转移的关系,目前尚无统一定论。本文显示肺癌 MVD 与淋巴结转移有一定的关系。目前尚没有对 MVD 定量方法进行标准化,结果的差异除可能与肿瘤本身的异质性有关外,同时也与研究者所选取的血管内皮细胞的标志物及采用的处理、分析方法异同有一定关系。

本文结果提示,VEGF 在肿瘤血管发生、发展、浸润和转移中起重要作用,有可能成为肿瘤预后判断的参考指标。抗血管生成治疗策略是针对恶性肿瘤血管生成的关键步骤进行干预治疗,对肿瘤血管生成的阻断有可能抑制肿瘤的生长,故对肿瘤血管生成的深入研究,有望为肺癌的早期诊断和治疗提供帮助。

参考文献:

- [1] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis; a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
- [2] Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary derived folliculo stellate cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(19): 7311-7315.
- [3] Johnson JP, Rothbacher U, Sers C. The progression associated antigen MUC18; A unique member of the immunoglobulin super gene family[J]. Melanoma Res, 1993, 3(5): 337-340.
- [4] Beierle EA, Strande LF, Chen MK. VEGF up regulates BCL-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells[J]. Pediatr Surg, 2002, 37(3): 467-471.
- [5] Huang CY, Shen ZY. Vascular endothelial growth factor fundamental research and experimental study in plastic surgery[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2002, 16(1): 64-69.
- [6] Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ. Plasminogen activator system vascular endothelial growth factor and colorectal cancer p