



VEGF-C和MMP-2蛋白表达对非小细胞肺癌预后的影响

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一，癌细胞的侵袭转移是影响肺癌患者预后的重要因素。研究表明，血管内皮生长因子(VEGF)是淋巴管内皮细胞增殖和趋化的特异性诱导因子，可以诱导肿瘤内部新生淋巴管形成和周围组织淋巴管扩张[1]，其表达的强度与淋巴结转移和患者的预后密切相关[2]；基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的水平上调可增强肿瘤细胞的侵袭性[3]。本研究应用免疫组织化学染色，检测42例非小细胞肺癌(NSCLC)组织中VEGF-C和MMP-2蛋白的表达情况，研究其与肿瘤大小、淋巴管密度(LVD)、组织类型、分化程度、临床分期、临床复发、淋巴结转移情况和术后生存时间的关系，为进一步探讨应用VEGF-C和MMP-2抑制剂改善NSCLC患者的预后提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 标本

选取我院胸外科1997~1999年手术切除并经病理证实的NSCLC 42例，男35例、女7例；年龄27~74岁，中位年龄64岁；其中鳞癌15例，腺癌27例；低分化16例，中分化17例，高分化9例。患者术前均未进行放疗或化疗，随访5年以上，生存期4.5~72个月(中位生存时间42个月)。所有标本均用10%甲醛固定，石蜡包埋切片，厚4 μm 。

1.2 实验方法

VEGF-C和SABC试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。用微波炉进行抗原修复(解冻档，10 min)。一抗(稀释度均为1:50，稀释剂为PBS)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，其余步骤参考SABC试剂盒介绍的方法进行操作。DAB显色。MMP-2(CA4001)和SP试剂盒(即用型)均购自福州迈新公司。一抗的稀释度为1:50(稀释剂为PBS)。其余步骤按SP试剂盒介绍的方法进行操作。以PBS代替一抗作阴性对照，以人流的胎盘绒毛组织作阳性对照。淋巴管的标记采用抗VIII因子相关抗原抗体(FVIII)和IV型胶原双重标记法进行[4]。多克隆抗体FVIII、鼠抗人单克隆抗体IV型胶原(CIV94)和SP双染试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。FVIII和IV型胶原分别用AEC和BCIP/NBT染色，即内皮细胞染成红色，基底膜染成暗紫色，仅染成红色而无暗紫色的脉管为淋巴管。

1.3 结果判断

VEGF-C和MMP-2蛋白均表达于细胞质(呈棕色)。(1)VEGF-C和MMP-2蛋白的判断：在高倍镜下取4个不同视野各计数200个癌细胞，阳性细胞数 $>10\%$ 为阳性，阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为阴性。(2)LVD的计算方法[5]：用低倍镜($\times 40$)观察切片，选择淋巴管最多的区域，以200倍显微镜计算3个视野的淋巴管总数作为每个病例的LVD。

1.4 统计学处理

数据用SPSS11.5处理，LVD的比较采用t检验，率的比较采用 χ^2 检验，生存分析采用Kaplan-Meier曲线法和Log Rank检验。

2.1 NSCLC组织中VEGF-C和MMP-2蛋白表达情况

42例NSCLC组织中，有23例VEGF-C蛋白呈阳性表达(图1)和26例MMP-2蛋白呈阳性表达(图2)，阳性表达率分别为54.8%和61.9%。

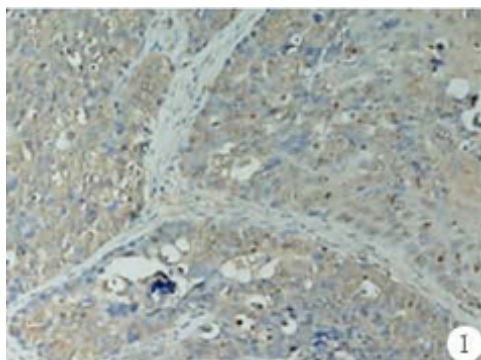


图1 肺癌VEGF-C蛋白免疫组化染色

Fig.1 Expression of VEGF-C protein detected by immunohistochemical staining in lung carcinoma (Original magnification: $\times 200$)

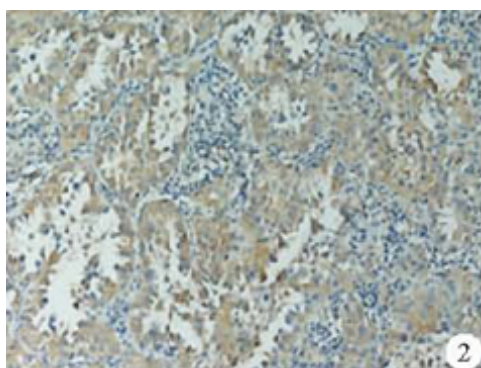


图2 肺癌MMP-2蛋白免疫组化染色

Fig.2 Expression of MMP-2 protein detected by immunohistochemical staining in lung carcinoma (Original magnification: $\times 200$)

2.2 肺癌组织中VEGF-C和MMP-2蛋白的表达与临床病理指标的关系

VEGF-C蛋白的表达与LVD、肿瘤组织分化程度和淋巴结转移呈正相关，与肿瘤大小、组织学类型、临床分期和肿瘤复发之间均无统计学意义(表1)。VEGF-C蛋白阳性表达组的术后中位生存时间为14.5个月，明显低于阴性表达组的39.5个月，两组比较有显著性差异($P < 0.01$) (图3)。MMP-2蛋白的表达与淋巴结转移呈正相关，与肿瘤大小、LVD、组织类型、分化程度、临床分期和肿瘤复发之间均无统计学意义(表1)。MMP-2蛋白阳性表达组的术后中位生存时间为16.0个月，明显低于阴性表达组的39.0个月，两组比较有显著性差异($P < 0.01$) (图4)。

表1 VEGF-C 和 MMP-2 蛋白在肺癌组织中的表达及与临床病理指标的关系

Tab.1 Relation of VEGF-C and MMP-2 protein expressions with clinicopathological characteristics of the tumor

| Item | n | VEGF-C | | P value | MMP-2 | | P value |
|--------------------------|----|---------|----------|---------|---------|---------|---------|
| | | - | + | | - | + | |
| Tumor size (cm) | 42 | 4.8±2.6 | 6.17±3.1 | >0.05 | 4.9±2.5 | 6.0±3.2 | >0.05 |
| Lymphatic vessel density | 42 | 7.8±1.5 | 9.39±2.4 | <0.05 | 8.2±2.5 | 9.0±1.9 | >0.05 |
| Histological type | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| Squamous carcinoma | 15 | 6 | 9 | | 5 | 10 | |
| Adenocarcinoma | 27 | 13 | 14 | | 11 | 16 | |
| Differentiation | | | | <0.05 | | | >0.05 |
| Well | 9 | 7 | 2 | | 5 | 4 | |
| Mediate | 17 | 9 | 8 | | 5 | 12 | |
| Low | 16 | 3 | 3 | | 6 | 10 | |
| Clinical stage | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| Stage 1 | 25 | 14 | 11 | | 11 | 14 | |
| Stage 2 | 12 | 4 | 8 | | 4 | 8 | |
| Stage 3 | 4 | 1 | 3 | | 1 | 3 | |
| Stage 4 | 1 | 0 | 1 | | 0 | 1 | |
| Recurrence | | | | >0.05 | | | >0.05 |
| No | 24 | 12 | 12 | | 10 | 14 | |
| Yes | 18 | 7 | 11 | | 6 | 12 | |
| Lymphonode metastasis | | | | <0.05 | | | <0.01 |
| No | 18 | 12 | 6 | | 11 | 7 | |
| Yes | 24 | 7 | 17 | | 5 | 19 | |

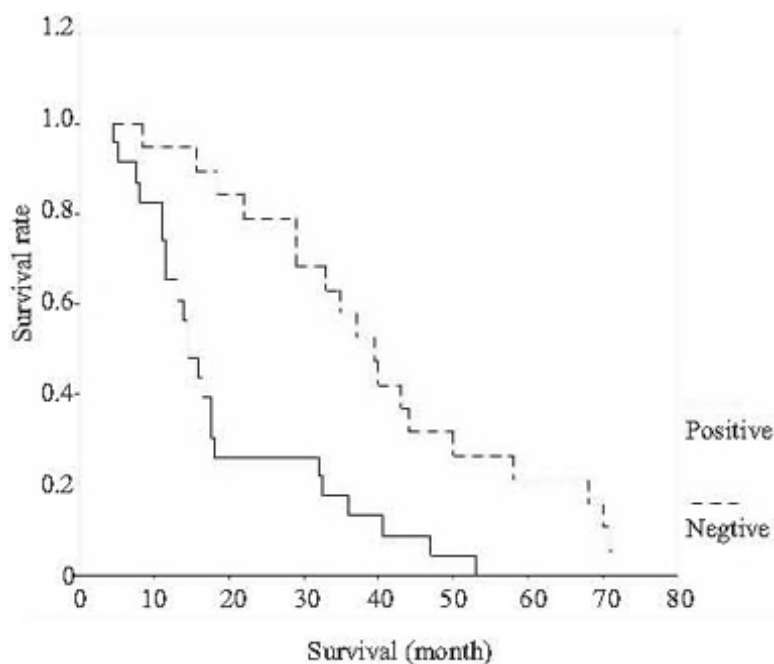


图3 VEGF-C蛋白表达与患者术后生存期的关系

Fig.3 Relationship between VEGF-C protein expression and the patients' survival time after operation

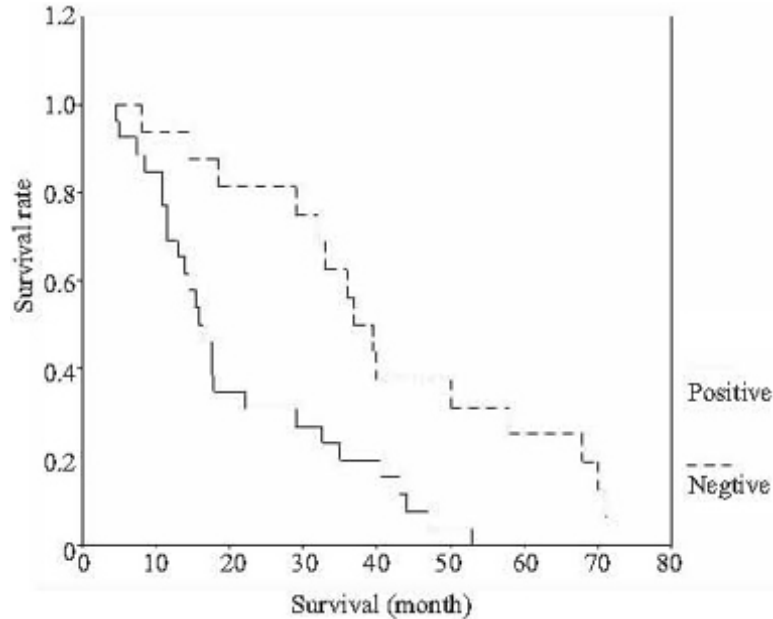


图4 MMP-2蛋白表达与患者术后生存期的关系

Fig.4 Relationship between MMP-2 protein expression and the patients' survival time after operation

2.3 NSCLC组织中VEGF-C蛋白和MMP-2蛋白表达的相互关系

42例NSCLC组织中, 有19例VEGF-C和MMP-2蛋白表达均呈阳性, 12例VEGF-C和MMP-2蛋白均为阴性, 4例仅VEGF-C蛋白呈阳性表达, 7例仅MMP-2蛋白呈阳性表达, 两种蛋白的表达之间在统计学上有显著性差异 ($P < 0.05$), 且呈正相关 ($r = 0.469$)。

3 讨论

3.1 VEGF-C蛋白对肺癌患者临床预后的影响

近年研究显示, 肿瘤细胞的增殖和侵袭性增强可能与肿瘤细胞内VEGF的表达上调有关[6]。癌组织内存在淋巴管, 而且其分布贯穿整个肿瘤组织, 淋巴管的数量多少与淋巴结的转移状况呈正相关[7]。VEGF-C蛋白是淋巴管内皮细胞增殖和趋化的特异性诱导因子, 经旁分泌的方式分泌后, 与受体VEGFR-2和VEGFR-3结合, 使受体产生自身磷酸化, 通过细胞质内的信息传递, 增加有丝分裂活动, 导致内皮细胞增殖和新生淋巴管形成[8]。因此, VEGF-C蛋白的表达与淋巴管生成数量呈正比, 与淋巴结转移呈显著正相关。本研究发现, VEGF-C蛋白表达与肿瘤组织的LVD、淋巴结转移呈正相关, 与患者术后生存时间呈负相关, 即VEGF-C蛋白阳性表达组的LVD水平较阴性表达组高, 且VEGF-C蛋白的阳性表达率越高, 越容易发生淋巴结转移, 预后越差。提示NSCLC组织的VEGF-C蛋白能够诱导淋巴管内皮细胞的增殖和肿瘤新生淋巴管的形成, 促进癌细胞通过淋巴道转移。这可能是由于过度表达的VEGF-C蛋白与VEGFR-3结合后, 导致内皮细胞增殖和新生淋巴管的形成[8], 使肿瘤组织的淋巴管增多, 淋巴管占据的面积增大, 癌细胞有更多的机会与淋巴管直接接触, 进而侵袭淋巴管并形成转移。本研究还发现, VEGF-C蛋白的表达与组织分化程度呈负相关, 即随着肿瘤组织分化程度的增高, VEGF-C蛋白的表达明显降低, 提示分化越差的肿瘤, 表达VEGF-C蛋白的能力越强, 越容易诱导淋巴管内皮细胞增殖, 进而促进新生淋巴管形成和癌细胞的淋巴道转移。上述结果提示, 可以进一步研发VEGF-C蛋白的抑制剂, 阻止癌细胞通过淋巴系统转移, 延长患者的生存时间。

3.2 MMP-2蛋白对肺癌患者临床预后的影响

肿瘤的侵袭和转移是通过各种蛋白水解酶如基质金属蛋白酶(MMPs)降解细胞外基质开始的。MMP-2是MMPs家族中重要成员, 对多种细胞外基质均有降解作用。研究发现促使MMP-2水平上调可增强卵巢癌细胞的侵

袭性[3]。MMP-2表达是影响胃癌患者预后的独立指标[9]。本研究结果也显示MMP-2蛋白的表达与淋巴结的转移呈正相关、与肺癌患者术后生存期呈负相关。为了抑制MMP-2蛋白促进肿瘤发生转移这一特性，目前国外已研制出人工合成的能选择性抑制MMP-2蛋白的药物。有些药物正处于临床试验阶段，初步结果表明：它们与化疗药物联合使用，可提高临床疗效。因此，进一步探明这类药物抑制MMP-2蛋白表达和改善肺癌患者预后的机制，将成为今后研究的重要方向。

3.3 VEGF-C蛋白与MMP-2蛋白的关系

MMP-2和VEGF均为肿瘤转移相关基因。肿瘤转移靶器官的微环境有产生MMPs和VEGFs的能力，这有利于肿瘤细胞在靶器官内停泊、生长和血管生成[10]。本研究结果显示，在肺癌组织中VEGF-C和MMP-2蛋白的表达之间存在正相关性，但二者之间相互作用的分子机制仍有待进一步研究。

参考文献：

- [1] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2001, 7(2): 192-8.
- [2] Miyata Y, Kanda S, Ohba K, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and-D[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3): 800-6.
- [3] Zhang A, Meng L, Wang Q, et al. Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up-regulation of VEGF and induction of MMP-2[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(4): 831-6.
- [4] Gombos Z, Xu X, Chu CS, et al. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(23): 8364-71.
- [5] Su JL, Shih JY, Yen ML, et al. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 554-64.
- [6] 刘柯, 王丽莉, 郑燕芳, 等. 抗HPV16E6核酶对宫颈癌CaSKi细胞侵袭表型和VEGF表达的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(5): 529-32.
- Liu K, Wang LL, Zheng YF, et al. Effects of anti-HPV16 E6-ribozyme on invasiveness of cervical carcinoma cell line CaSKi and vascular endothelial growth factor expression[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2004, 24(5): 529-32.
- [7] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis[J]. *EMBO J*, 2001, 20(4): 672-82.
- [8] Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C[J]. *J Cell Physiol*, 1997, 173(2): 211-5.
- [9] Kubben FJ, Sier CF, van Duijn W, et al. Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(7): 1035-40.
- [10] Donadio AC, Durand S, Remedi MM, et al. Evaluation of stromal metalloproteinases and vascular endothelial growth factors in a spontaneous metastasis model[J]. *Exp Mol Pathol*, 2005, 79(3): 259-64.