

VEGF-C和 MMP-2 蛋白表达对非小细胞肺癌预后的影响

张惠忠¹, 魏益平¹, 李海刚², 王梅¹, 刘金耿¹, 吴澄¹(中山大学附属第二医院¹心胸外科,²病理科, 广东 广州 510120)

摘要:目的 研究血管内皮生长因子-C(VEGF-C)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)蛋白在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及其与肺癌生物学行为的关系。方法 应用免疫组化方法检测 42 例 NSCLC 组织中 VEGF-C 和 MMP-2 蛋白的表达情况,分析其与肿瘤大小、肿瘤淋巴管密度、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。结果 42 例 NSCLC 组织中,有 23 例 VEGF-C 蛋白表达呈阳性,阳性表达率为 54.8%;有 26 例 MMP-2 蛋白表达呈阳性,阳性表达率为 61.9%。VEGF-C 蛋白的表达与淋巴管密度、淋巴结转移呈正相关($P<0.05$),与组织分化程度、患者术后生存时间呈负相关($P<0.05$)。MMP-2 蛋白的表达与 NSCLC 的淋巴结转移正相关($P<0.05$),与患者术后生存时间呈负相关($P<0.05$)。VEGF-C 和 MMP-2 蛋白的表达之间呈正相关($r=0.469, P<0.05$)。结论 VEGF-C 和 MMP-2 蛋白的表达与 NSCLC 的生物学行为具有相关性,它们的高表达提示 NSCLC 患者容易出现淋巴结转移和预后不良。

关键词: 肺肿瘤;免疫组织化学;血管内皮生长因子-C;基质金属蛋白酶-2

中图分类号:R655; R730.3 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)09-1307-04

Expressions of vascular endothelial growth factor C and matrix metalloproteinases-2 and prognosis of non-small cell lung carcinoma

ZHANG Hui-zhong¹, WEI Yi-ping¹, LI Hai-gang², WANG Mei¹, LIU Jin-geng¹, WU Cheng¹

Departments of Cardiothoracic Surgery¹ and Pathology², Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) proteins and its relationship with the biological behaviors of non-small cell lung carcinoma (NSCLC). **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expressions of VEGF-C and MMP-2 proteins in 42 cases of NSCLC tissues. The relationship of VEGF-C and MMP-2 expressions was analyzed with the tumor size, lymphatic vessel density (LVD), histological type, differentiation, clinical recurrence, lymph node metastasis and patients' survival time. **Results** Out of the 42 cases of NSCLC, 23 and 26 cases showed positive expressions of VEGF-C and MMP-2 proteins, respectively, with the expression rates of VEGF-C and MMP-2 protein of 54.8% and 61.9%, respectively. VEGF-C expression was positively associated with LVD and lymph node metastasis ($P<0.05$), and inversely with the differentiation of NSCLC and the patients' survival time ($P<0.05$). MMP-2 expression was positively associated with lymph node metastasis ($P<0.05$) and inversely with the patients' survival ($P<0.05$). VEGF-C and MMP-2 expressions was positively associated ($r=0.469, P<0.05$). **Conclusion** The expressions of VEGF-C and MMP-2 proteins are closely associated with the biological behaviors of NSCLC, and their high expression suggests probable lymph node metastasis and poor prognosis.

Key words: lung neoplasms; immunohistochemistry; vascular endothelial growth factor-C; matrix metalloproteinases-2

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。

收稿日期:2006-05-27

基金项目:广州市科委科技攻关引导项目(02Z3-E0016)

Supported by Guangzhou Scientific Committee Science and Technology Project (02Z3-E0016)

作者简介:张惠忠(1963-),男,硕士,副教授,主要从事肺、食管肿瘤的研究,电话:020-81332295, E-mail: zhhzhgd@163.com

通讯作者:王梅

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 结果

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%。

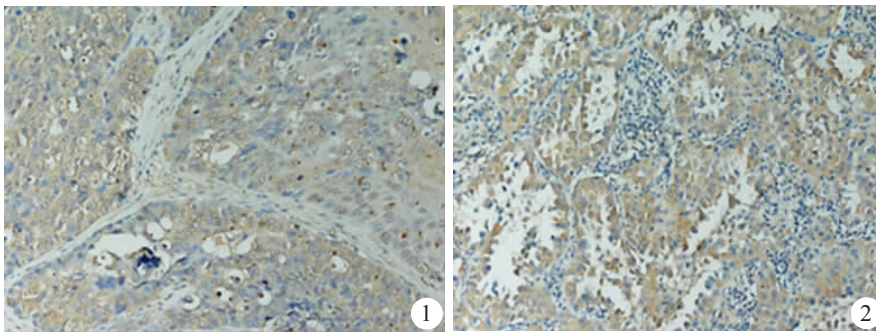


图 1 肺癌 VEGF-C 蛋白免疫组化染色

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)。

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

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	
Lymphnode metastasis				<0.05			<0.01
No	18	12	6		11	7	
Yes	24	7	17		5	19	

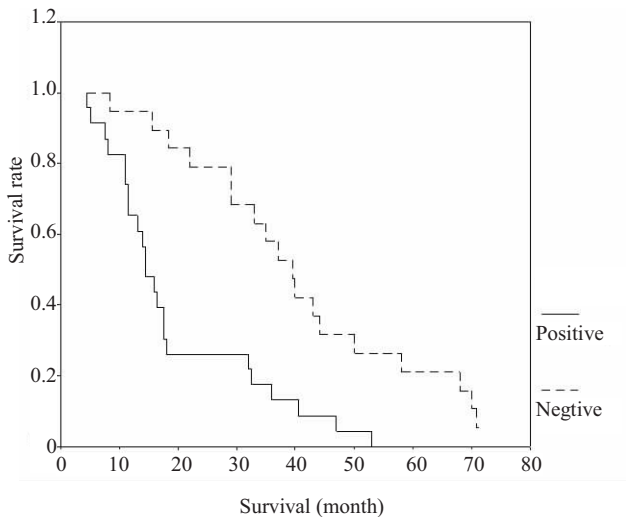


图 3 VEGF-C 蛋白表达与患者术后生存期的关系
Fig.3 Relationship between VEGF-C protein expression and the patients' survival time after operation

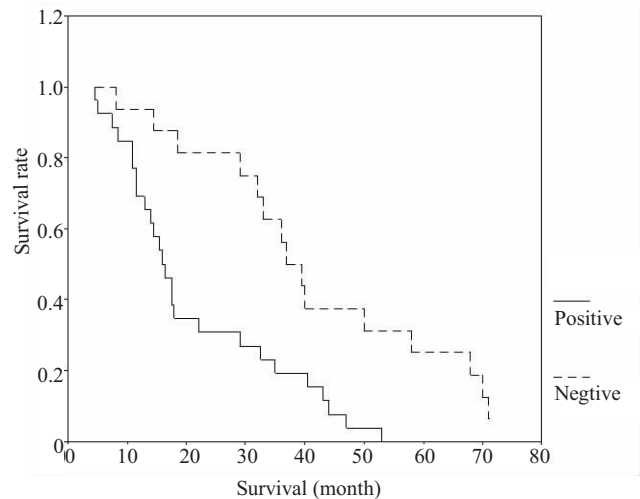


图 4 MMP-2 蛋白表达与患者术后生存期的关系
Fig.4 Relationship between MMP-2 protein expression and the patients' survival time after operation

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.