

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.05.16

肺癌中血管内皮生长因子及突变型 p53 基因表达及其临床意义研究

李印 车国卫 周清华 许金良

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)突变型 p53(mtp53)基因表达水平与肺癌病理生理学特征之间的关系。方法 采用免疫组化方法(LSAB法)检测 120 例肺癌组织及相应癌旁组织,40 例肺良性病变组织中的 VEGF、mtp53 表达水平。结果 肺癌组织中 VEGF、mtp53 基因的表达水平显著高于癌旁肺组织和肺良性病变组织($P < 0.01$)。VEGF、mtp53 基因表达水平与肺癌患者性别、年龄、吸烟史、组织学类型均无明显关系($P > 0.05$)。与原发肿瘤大小、细胞分化程度、淋巴结转移状态、P-TNM 分期均有密切关系($P < 0.01$)。mtp53 基因表达水平与 VEGF 表达水平呈显著正相关($P < 0.01$)。结论 VEGF、mtp53 基因可能参与了肺癌的发生、发展进程,可以作为肺癌生物学行为恶化的一项指标。

【关键词】 肺肿瘤 血管内皮生长因子 突变型 p53 基因

【中图分类号】 R734.2

Expressions of VEGF and mutant p53 gene and their clinical significance in lung cancer LI Yin*, CHE Guowei, ZHOU Qinghua, XU Jinliang. * Department of Thoracic Surgery, Henan Tumor Hospital, Zhengzhou, Henan 450052, P. R. China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between VEGF and mutant p53(mtp53) expression and its relation to the physiopathological characteristics of lung neoplasms. **Methods** The expression of VEGF and mtp53 was detected in 120 lung cancer lesions, paracancerous lesions and 40 benign pulmonary lesions by immunohistochemical staining(LSAB methods). **Results** VEGF and mtp53 gene expressions in lung cancer tissues were significantly higher than those in paracancerous and benign pulmonary tissues($P < 0.01$). VEGF and mtp53 expression was closely related to the size of primary cancer, lymph node status, P-TNM stages, cell differentiation grade of lung cancer($P < 0.01$). A highly positive relation was found between VEGF and mtp53($P < 0.01$). **Conclusion** The results suggest that expression of VEGF and mtp53 gene may plays an important role in the oncogenesis and development of lung cancer and may be served as a tumor marker to evaluate the biological behavior of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms VEGF Mutant p53

肺癌细胞恶性转化需要基因表型的改变和血管新生成,而血管生成与癌基因的突变和抑癌基因的缺失和突变有关。已有研究表明野生型 p53 可以抑制血管生成因子(如血管内皮生长因子 VEGF)的表达,并通过旁观效应抑制肿瘤的生长和转移,而突变型 p53(mtp53)则可以上调 VEGF 的表达,促进血管生成并促进肿瘤的生长和转移,但也有相反的报道^[1,2]。为了进一步研究非小细胞肺癌中 VEGF 和 mtp53 与其病理生理学特征之间的关系,我们采用免疫组化法对 120 例肺癌组织及相应癌旁组织中 VEGF、mtp53 表达水平进行检测,并以 40 例肺良性病变作为对照,结果如下。

1 材料与方法

1.1 组织标本 120 例肺癌手术切除标本均来自河南省肿瘤医院胸外科 1995 年 6 月至 2000 年 6 月接受手术治疗的患者,其中男性 84 例,女性 36 例,平均年龄 56.87 ± 10.33 岁。腺癌 35 例,鳞癌 55 例,腺鳞癌 30 例。低分化癌 41 例,中分化癌 52 例,高分化癌 27 例。P-TNM 分期(国际 UICC1997 分期标准)I + II 期 57 例,III + IV 期 63 例。术前未接受化疗及放疗患者的标本。同期 40 例肺良性标本作为对照(肺支气管扩张症 17 例,肺炎性假瘤 15 例,肺结核瘤 8 例)。

1.2 LSAB 法 - 免疫组化染色

1.2.1 主要试剂 抗 VEGF、mtp53 蛋白单克隆抗体(Santa Cruz 公司);生物素化标记的抗鼠抗体(DAKO 公司);SP 复合物(DAKO 公司)。

1.2.2 LSAB 法 将 5 μ m 厚的石蜡切片常规脱蜡, 逐级水化, 先经 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液行抗原修复, 然后依次加入正常小牛血清(1:10), VEGF、mtp53 抗体(1:100), 生物素化羊抗鼠抗体(1:200), SP 复合物(1:200)。以上各步之间均经 37℃ 恒温箱孵育 30 min, PBS 冲洗(小牛血清除外), 最后 DAB 染色, 苏木素复染, 树脂封片, 选用已知阳性组织平滑肌细胞作为阳性对照, 用 PBS 代替 VEGF、mtp53 抗体作为空白对照。

1.3 结果判定 VEGF 定位于肿瘤细胞浆或细胞膜, 阳性物质呈棕黄色, mtp53 定位于肿瘤细胞核, 阳性物质呈棕黄色, 每张片子 400 倍镜下 10 个视野, 每个视野 100 个细胞, 共计 1 000 个细胞, 平均值为 100 个细胞中的阳性数。

1.4 统计方法 *F* 检验, 直线相关分析, 在 SPSS 10.0 软件上进行。

2 结果

2.1 肺癌组织中 VEGF 和 mtp53 表达水平显著高于癌旁组织和肺良性病变组织 ($P < 0.01$), 癌旁组织显著高于肺良性病变组织 ($P < 0.05$) (图 1、2)(表 1)。

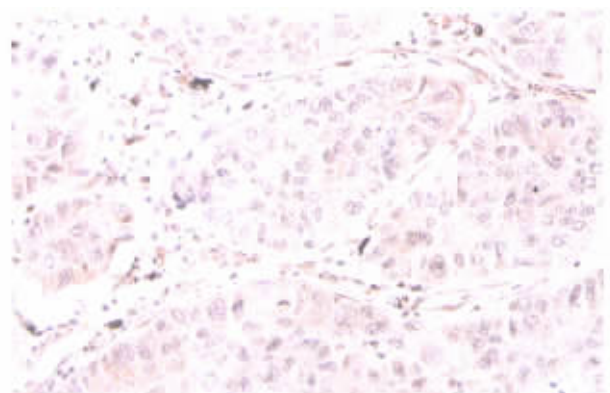


图 1 VEGF 在肺鳞癌中的表达, 阳性细胞浆呈棕黄色(LSAB 法 $\times 175$)

Fig 1 The expression of VEGF in lung squamous cell carcinoma, positive cytoplasm shown brown-yellow(LSAB methods $\times 175$)

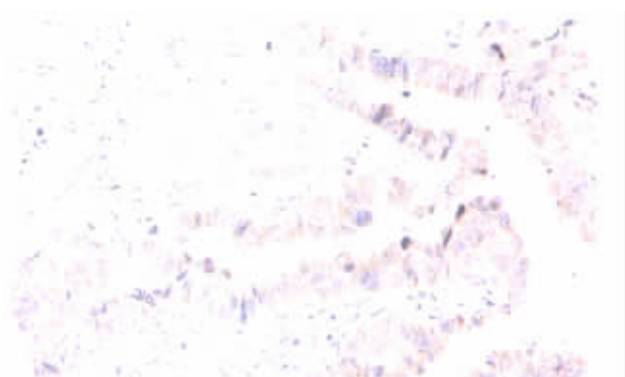


图 2 VEGF 在肺腺癌中的表达, 阳性细胞浆呈棕黄色(LSAB 法 $\times 175$)

Fig 2 The expression of VEGF in lung adenocarcinoma, positive cytoplasm shown brown-yellow(LSAB methods $\times 175$)

表 1 不同肺组织中 VEGF、mtp53 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of VEGF and mtp53 expressions among different lung tissues ($\bar{x} \pm s$)

Lung tissues	VEGF	mtp53
Cancer tissue	78.70 \pm 17.11	86.37 \pm 10.90
Paracancerous tissue	46.76 \pm 21.97	20.15 \pm 11.97
Benign tissue	17.70 \pm 15.53	8.02 \pm 6.60
<i>P</i> value	< 0.01	< 0.01

2.2 VEGF 及 mtp53 表达水平患者性别、年龄、吸烟史、肺癌原发部位、组织学类型等均无明显关系 ($P > 0.05$), 而与原发性肿瘤大小、淋巴结转移状态、P-TNM 分期、癌细胞分化程度等均有密切关系 ($P < 0.05$)。VEGF、mtp53 表达水平在 III、IV 期患者明显高于 I、II 期患者, 且有随 P-TNM 分期进展而升高的趋势(表 2)。

表 2 VEGF 表达水平与肺癌病理生理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Relation between VEGF and mtp53 expression level and physiopathological characteristics of lung cancer ($\bar{x} \pm s$)

Characteristics	<i>n</i>	VEGF	mtp53	<i>P</i> value
Sex				> 0.05
Male	84	79.92 \pm 17.89	86.45 \pm 10.23	
Female	36	84.63 \pm 11.43	85.95 \pm 10.82	
Age				> 0.05
≥ 54	77	83.63 \pm 15.84	88.00 \pm 10.15	
< 54	43	78.83 \pm 17.85	85.05 \pm 11.37	
Smoking history				> 0.05
With	91	80.55 \pm 17.45	86.54 \pm 10.86	
Without	29	81.00 \pm 16.64	86.02 \pm 11.11	
Location				> 0.05
Central type	75	83.07 \pm 16.24	87.11 \pm 10.39	
Peripheral type	45	78.49 \pm 11.34	85.68 \pm 11.38	
Tumor size				< 0.01
T1 + T2	77	75.26 \pm 18.54	60.91 \pm 11.55	
T3 + T4	43	85.42 \pm 14.09	55.82 \pm 6.68	
Lymph node status				< 0.05
N0	47	70.65 \pm 17.72	41.15 \pm 11.72	
N1-3	73	88.02 \pm 12.37	90.17 \pm 8.50	
Histology				> 0.05
SCC	55	80.60 \pm 17.49	86.90 \pm 10.25	
AD	35	81.46 \pm 16.47	87.14 \pm 11.22	
ASC	30	84.07 \pm 16.54	85.07 \pm 10.49	
Differentiation grade				< 0.05
Low	41	89.07 \pm 7.42	91.15 \pm 6.18	
Intermediate	52	77.77 \pm 18.33	46.15 \pm 10.96	
High	27	67.28 \pm 23.28	25.61 \pm 12.96	
P-TNM stage				< 0.01
I + II	57	70.53 \pm 16.34	40.39 \pm 10.77	
III + IV	63	90.51 \pm 9.53	94.13 \pm 5.05	

SCC: squamous cell carcinoma; AD: adenocarcinoma; ASC: adenosquamous cell carcinoma

2.3 应用直线相关性分析发现, VEGF 与 mtp53 呈正相关性 ($R = 0.712, P < 0.01$)。

3 讨论

血管形成不但为肿瘤细胞生长提供条件, 也使癌细胞通过这些不成熟的血管进入血流导致远处转移, 而肿瘤血管形成 (vascularogenesis) 与某些基因功能和结构的改变, 多种细胞因子的正负性调节, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 及细胞微环境的改变均有密切关系^[3]。而 p53 基因的突变和缺失是肿瘤发生的早期分子事件, 突变型 p53 基因丧失对细胞周期 G1—S 节点的调节作用, 细胞进入 S 期后, 加速了 DNA 的复制和异常的核分裂, 在形态表现为明显的异形性, 在非小细胞肺癌中其突变率为 47.8%, 小细胞肺癌中其突变率为 80% 左右^[4-7]。周清华等^[8]报告 41 例肺癌中 p53 突变为 16 例, 且突变类型主要以移码、同义、错义突变三种类型。本研究也观察到肺癌组织中 VEGF 和 mtp53 表达水平均显著高于癌旁组织和肺良性病变组织 ($P < 0.01$)。

Niklinski 等^[9]发现 p53 发生于肺癌的早期, 随着肿瘤的进展 p53 突变率逐步增高, 但其突变与肺癌患者的性别、年龄、病理类型无关, 而 p53 阴性组的术后生存率显著高于 p53 阳性组, 提示是非小细胞肺癌的预后因子之一。另外 p53 的突变也降低了肺癌细胞的凋亡而引起肺癌病理生理学特征的改变。Nishizaki 等^[10]用野生型 p53 转染肺癌细胞株 (BEAS-2B) 发现有 2B 细胞株的克隆形成率受到抑制, 在裸鼠体内不能生长为肿瘤。同样, Li 等^[11]应用反义 VEGF 基因能阻断 VEGF 基因的表达, 并能明显抑制肿瘤的生长、血管生成及肺转移和远处器官转移。这充分说明了 VEGF 表达水平对肺癌的生长速率、淋巴结转移状态及 P-TNM 分期等病理生理学特征均有一定影响。目前已知, 肺癌发生发展过程中, 血管生成因子通过供给和维持基质细胞和癌细胞增生而发挥重要作用。本研究观察到 VEGF、mtp53 表达水平与原发肿瘤大小、淋巴结转移状态、P-TNM 分期、癌细胞分化程度等均有密切关系 ($P < 0.01$)。

有关肿瘤血管形成因子 VEGF 与 mtp53 的关系, Kakolyris 等^[12]报道 mtp53 阴性的癌细胞中 VEGF 表达低, 且成熟的新生血管密度高, 而 mtp53 阳性的癌细胞中 VEGF 表达高, 不成熟血管密度高。Fontanini 等^[13, 14]认为在肺支气管上皮细胞癌变过程中, mtp53 的表达和 VEGF 同步增高, 并可检测到微血管密度也在加大。但 Konishi 等^[15]和 Slodkowska 等^[16]研究表明

mtp53 与 VEGF 没有相关性。本研究结果显示 VEGF 与 mtp53 呈正相关性。

肺癌细胞中癌基因和抑癌基因的突变促进血管发生和生成已在一些实验中得到证实, VEGF、mtp53 表达水平的升高能促进血管新生, 促进肿瘤的转移, 从而影响肺癌的临床病理特征。因此, 结合本研究结果, 我们认为 VEGF、mtp53 可能参与了肺癌的发生、发展、浸润、转移并进而影响患者的预后。

参 考 文 献

- 1 Fujiwara T, Nishizaki M, Tanaka N. Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic—implication for lung cancer gene therapy. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000 27(8):1217-1224.
- 2 Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, et al. bcl-2 and c-erbB-2 proteins are involved in the regulation of VEGF and of thymidine phosphorylase angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999 17(7):545-554.
- 3 车国卫, 周清华. 血管内皮生长因子在肺癌中的表达及临床应用研究进展. *中国肺癌杂志* 2001 4(1):77-80.
- 4 Fontanini G, Vignati S, Bigini D, et al. Human non-small cell lung cancer: p53 protein accumulation is an early event and persists during metastatic progression. *J Pathol* 1994 174(1):23-31.
- 5 Ebina M, Martinez A, Birrer MJ, et al. In situ detection of unexpected patterns of mutant p53 gene expression in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 2001 20(27):3568-3572.
- 6 Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, et al. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 2001 20(18):2225-2234.
- 7 Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* 2001 28(2 Suppl 4):3-13.
- 8 周清华, 刘伦旭, 杨振华, 等. 人原发性肺癌组织 p53、Rb 基因点突变研究. *肿瘤* 1996 16(2):171-173.
- 9 Niklinski J, Niklinska W, Chyczewski L, et al. Molecular genetic abnormalities in premalignant lung lesions: biological and clinical implications. *Eur J Cancer Prev* 2001 10(3):213-226.
- 10 Nishizaki M, Fujiwara T, Tanida T, et al. Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin Cancer Res* 1999 5(5):1015-1023.
- 11 Li JM, Han JS, Huang Y, et al. A novel gene delivery system targeting cells expressing VEGF receptors. *Cell Res* 1999 9(1):11-25.
- 12 Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, et al. Experiment of vascular maturation in non-small cell lung cancer using a novel basement membrane component, LH39: correlation with p53 and angiogenic factor expression. *Cancer Res* 1999 59(21):5602-5507.
- 13 Fontanini G, Calcinai A, Boldrini L, et al. Modulation of neoangiogenesis in bronchial preneoplastic lesions. *Oncol Rep* 1999 6(4):813-817.
- 14 Fontanini G, Bigini D, Vignati S, et al. p53 expression in non small cell lung cancer: clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1993 13(3):737-742.
- 15 Konishi T, Huang CL, Adachi M, et al. The K-ras gene regulates vascular endothelial growth factor gene expression in non-small cell lung cancers. *Int J Oncol* 2000 16(3):501-511.

16 Slodkowska J, Sikora J, Roszkowski Sliz K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor receptors in lung cancer. Anal Quant Cytol Histol 2000 22(5):398-402.

(收稿 2001-02-19 修回 2001-04-10)
(本文编辑 张世雯)

· 短篇报道 ·

心肺运动试验在肺切除患者术前评价中的作用

葛军 鲁继斌 赵立

【中图分类号】 R734.2

自 1999 年 9 月 ~ 2000 年 3 月 我们对于我院行开胸肺切除手术的 43 例患者在术前进行了常规肺功能检查和心肺运动试验 (CPX) 现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 男 27 例,女 16 例,39 ~ 72 岁,平均 57.3 岁。行左全肺切除 4 例,肺叶切除 35 例(包括右肺中下叶切除 1 例),楔形(局部)切除 4 例。术后病理证实:鳞癌 13 例,腺癌 16 例,小细胞未分化癌 5 例,腺鳞癌 2 例,结核球 5 例,炎性假瘤 2 例。

1.2 方法 常规肺功能试验包括用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼出量(FEV₁)及最大通气量(MVV)等指标。

心肺运动试验以电动脚踏车(Ergomet-

rics 900)为运动工具。热身功率设为 20 W,踏车速率维持 55 ~ 60 转/分,踏车 3 分钟。此后按受试者性别、年龄、体重等因素以每分钟 5 ~ 20 W 功率递增并保持踏车速率不变,直到患者不能维持原有运动或出现不能耐受的症状(如呼吸困难、胸痛等)以及血压过高或下降、心律失常、心率过快及血氧饱和度 < 90% 时将功率降为热身功率,直到血压、脉搏等较稳定时停止。整个过程中,十二导联心电图、血氧饱和度、血压及脉搏持续监测,主要观测的试验指标包括最大摄氧量(maximal oxygen uptake, $\dot{V}O_{2max}$)、每公斤体重最大摄氧量及最大运动功率(work rate, WR_{max})等。

以上测试采用 SensorMedics Vmax229 肺功能/心肺运动测试仪(美国),均在术

前 1 ~ 3 天内进行。术前常规检测动脉血气。统计学处理采用 *t* 检验或 χ^2 检验。

2 结果

2.1 全组 5 例发生心肺并发症。有、无并发症两组患者的年龄、性别、常规肺功能指标及术前动脉血气分析均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 CPX 中,有并发症组患者的 $\dot{V}O_{2max}$ [(0.90 ± 0.22) L/min, (14.44 ± 2.45) ml·Kg⁻¹·min⁻¹] 明显低于无并发症组患者 [(1.32 ± 0.35) L/min, (21.24 ± 4.64) ml·Kg⁻¹·min⁻¹] ($P < 0.02$)。

2.3 将 $\dot{V}O_{2max}$ (ml·Kg⁻¹·min⁻¹)、FEV₁ (%)、MVV (%) 以不同界值判定术后心肺系统并发症发生率(表 1)。

表 1 各指标不同界值对术后心肺并发症发生率的判定

Tab 1 Predictive characteristics of preoperative tests for postoperative cardiopulmonary complications

Item	Cutoff value	Incidence(%)		χ^2	P value
		≥ Cutoff value	< Cutoff value		
$\dot{V}O_{2max}$ (ml·Kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	15	5.6(2/36)	42.9(3/7)	7.94	< 0.01
	17.5	3.2(1/31)	33.2(4/12)	7.63	< 0.01
FEV ₁ (%)	40	7.5(3/40)	66.7(2/3)	9.51	< 0.01
	50	8.6(3/35)	25.0(2/8)	1.71	> 0.05
MVV(%)	40	13.2(5/38)	0(0/5)	0.74	> 0.05
	50	8.6(3/35)	25.0(2/8)	1.71	> 0.05

3 讨论

本实验结果显示,常规肺功能指标在有、无并发症患者组间均无显著差异 ($P > 0.05$)。分析原因如下:常规肺功能指标仅反映通气功能,却无法反映不良的心功能带给手术的危险性。另外,心肺功能在负荷增加时可以相互影响和代偿^[1],而上述指标亦无法反映这种关系。

与常规肺功能试验不同,在心肺运动试验中,有并发症组患者的最大摄氧量明

显低于无并发症组 ($P < 0.05$)。而且当以 15 ml·Kg⁻¹·min⁻¹ 和 17.5 ml·Kg⁻¹·min⁻¹ 为界值时,高于和低于界值的患者间并发症发生率均有显著差异 ($P < 0.01$)。心肺运动试验对患者施加的负荷在某种程度上与肺切除手术相似^[2],常规肺切除术后摄氧量可增加 10% ~ 20%^[3],这就需要整个心肺和氧传递系统具备良好的功能储备。由此可以推测,术前心肺运动试验中 $\dot{V}O_{2max}$ 较低的患者术后同样不能满足类似的高代谢需求而易于发生心肺功能障碍^[3]。因此,在肺切除手术的术前评价中, $\dot{V}O_{2max}$ 作为反映上述功能的综合指标能更全面准确地评价患者对手术的耐受力。

参 考 文 献

- Walsh GL, Morice RC, Putnam JB, et al. Resection of lung cancer is justified in high-risk patients selected by exercise oxygen consumption. Ann Thorac Surg, 1994, 58(3): 704-710.
- Bolliger CT, Perruchoud AP. Functional evaluation of the lung resection candidate. Eur Respir J, 1998, 11(1): 198-212.
- Gilbreth EM, Weisman IM. Role of exercise stress testing in preoperative evaluation of patients for lung resection. Clin Chest Med, 1994, 15(2): 389-403.

(收稿 2000-12-29 修回 2001-07-10)
(本文编辑 李蓓兰)