

KDR mRNA 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义

曾辉,伍钢,郭水英,王涛,胡健莉,戴晓芳

KDR mRNA Expression and its Clinical Significance in Human Non-Small Cell Lung Cancer

ZENG Hui, WU Gang, GUO Shui-ying, WANG Tao, HU Jian-li, DAI Xiao-fang

Cancer Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430023, China

Corresponding Author: WU Gang, E-mail: wuganger@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the correlation between expression level of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) and the microvessel density (MVD) and biological behavior of non-small cell lung cancer (NSCLC) and its prognosis. **Methods** KDR mRNA and MVD expression in 62 cases of NSCLC and 16 cases of benign pulmonary lesions were tested with in situ hybridization and immunohistochemistry methods, respectively. **Results** (1) significant differences in MVD and KDR mRNA expression were found between NSCLC and benign pulmonary lesions ($P < 0.01$), lung cancer MVD increased with the increase of the KDR mRNA expression, they had positive relation. (2) MVD and KDR mRNA in lung adenocarcinoma was higher than that in squamouscarcinoma ($P < 0.01$), they increased with the lymph node metastasis and advancing of TNM stage ($P < 0.01$). (3) Between the survival time in the group less than 5 years and the group more than 5 years, both MVD and KDR mRNA expression had significant difference ($P < 0.01$). **Conclusions** MVD and KDR are closely related to the occurrence, development and metastasis of NSCLC, they can be used as a major judgement for biological behavior and prognosis of NSCLC, KDR may be as a potential target in the anti-angiogenesis therapy of NSCLC.

Key words: Vascular endothelial growth factor receptor-2; Non-small cell lung cancer; In situ hybridization; Microvessel density

摘要:目的 探讨血管内皮生长因子受体-2 (KDR) 与微血管密度表达与非小细胞肺癌 (NSCLC) 生物学行为与预后的关系。方法 分别应用原位分子杂交及免疫组织化学方法检测 62 例 NSCLC 和 16 例肺良性瘤样病变组织中的 KDR mRNA、MVD 的表达。结果 (1) NSCLC 与肺的良性瘤样病变 MVD、KDR mRNA 的表达具有显著性差异 ($P < 0.01$), 肺癌 MVD 随 KDR mRNA 表达增强而增多, 两者呈正相关。(2) MVD 和 KDR mRNA 的表达在肺腺癌高于肺鳞癌 ($P < 0.01$) 两者随淋巴结转移、TNM 分期的进展而升高 ($P < 0.01$)。(3) 生存期 < 5 年者 MVD 和 KDR mRNA 的表达显著高于生存期 > 5 年者 ($P < 0.01$)。结论 MVD 和 KDR mRNA 的表达与 NSCLC 的发生、发展、转移关系密切, 可以作为评估 NSCLC 生物学行为及预后判断的指标, KDR 可能成为 NSCLC 的一个潜在的抗血管生成治疗的靶点。

关键词: 血管内皮生长因子受体-2; 非小细胞肺癌; 原位分子杂交; 微血管密度

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)04-0228-03

0 引言

肺癌的侵袭和转移是患者治疗失败和死亡的主

要原因, 而新生血管的生成是肺癌侵袭和转移的解剖学和生理学基础, 血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其受体-2 (Kinase domain-containing receptor, KDR/VEGFR-2/Flk-1) 在促进内皮细胞的分裂与增殖, 促进血管生成中起着关键作用。

收稿日期: 2005-04-25; 修回日期: 2005-09-13

基金项目: 湖北省科技攻关基金 (2003AA301C05)

作者单位: 430023 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心

作者简介: 曾辉 (1975-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤的早期诊断与综合治疗的研究工作

通讯作者: 伍钢 E-mail: wugangzr@yahoo.com.cn

本研究应用原位分子杂交技术检测非小细胞肺癌 (Non-small cell lung cancer, NSCLC) 中 KDR mRNA 的表达, 应用免疫组化 S-P 法检测微血管密

度 (Microvascular density, MVD) 的表达, 试图探讨 KDR mRNA 的表达对 MVD 的影响, 以及 KDR mRNA 表达与临床病理特征及预后的相关性, 以探测 KDR 的作用机制, 为 NSCLC 的抗血管生成治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料 选用 1999 年 3 月至 2000 年 3 月我院心胸外科手术切除并经病理学确诊的 NSCLC 标本 62 例, 其中男 44 例, 女 18 例; 年龄 37~76 岁, 平均 55.9 岁。所有患者术前均未行放疗和化疗, 经影像学检查确认无远处转移。按 WHO《肺肿瘤组织学分型》(1981) 标准, 包括肺鳞癌 27 例, 肺腺癌 35 例。组织学分级为 级 7 例, 级 25 例, 级 30 例。按 UICC(1997) 肺癌分期标准, 包括 期 17 例, 期 10 例, 期 33 例, 期 2 例。肿瘤长径为 1.8~11.0 cm, 平均 5.0 cm。有淋巴结转移 39 例, 无淋巴结转移 23 例。其中 42 例有完整随访资料, 生存期 < 5 年者 32 例, > 5 年者 10 例。另选同期肺良性瘤样病变 16 例(其中结核球 11 例, 炎性假瘤 3 例, 浆细胞肉芽肿 1 例, 纤维软骨脂肪瘤 1 例) 组织标本作对照。

1.2 主要试剂 CD34 鼠单抗、免疫组化 S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂购自福州迈新生物技术开发有限公司, KDR mRNA 原位杂交试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 实验方法 石蜡块标本制成 4μm 切片, 原位分子杂交采用胃蛋白酶暴露 mRNA 核酸片断, 参照试剂说明书进行, 以细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性杂交信号, 少量胞核也有阳性信号, 无阳性信号为阴性。免疫组织化学染色程序按 S-P 试剂盒说明书进行, 同时用已知的阳性切片在同条件下染色作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为空白对照。

肿瘤 MVD 的测量应用 HPIAS-2000 型全医学彩色图像分析系统分析处理。参照 Weidner 方法^[1], 先在低倍光镜(×20, ×100)下扫描整张切片, 确定 3 个高血管密度区, 即“热点”, 再在高倍镜(×400)下计数被染成黄色的微血管数目, 结果用 3 个高倍镜视野下微血管数目的平均数表示。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 11.5 统计软件包, 两个均数之间的比较用 student t 检验, 计数资料用 ² 检验。

2 结果

2.1 MVD 与 NSCLC NSCLC 组织内微血管密度分布, 相互间联系紧密, MVD 平均为 43.78 ±

12.46; 肺良性瘤样病变微血管分布均匀且少, MVD 平均为 7.42 ± 4.12, NSCLC 较肺良性瘤样病变显著升高 (P < 0.01) (表 1)。从表 1 还可以看出, 肺腺癌组织 MVD 明显高于鳞癌组织 (P < 0.05),

+ 期组 MVD 明显高于 + 期组 (P < 0.05), 有淋巴结转移组 MVD 明显高于无淋巴结转移组 (P < 0.05), 而不同组织学分级与肿瘤大小间无显著性差异。

2.2 KDR mRNA 与 NSCLC KDR mRNA 阳性信号以胞质出现棕黄色或棕褐色颗粒判断(图略)。由表 1 可见, KDR mRNA 表达在肺癌高、中、低分化组织中依次上调, 低分化、中分化肺癌组织中阳性表达率较高分化显著升高, 差异有显著性 (P < 0.05)。TNM 分期 + 期病例中 KDR mRNA 表达阳性率 80% (39/45) 高于 + 期病例的 58.82% (10/17), 差异有显著性 (P < 0.01)。有淋巴结转移者表达阳性率较阴性组差异有显著性 (P < 0.05)。肿瘤大小间 KDR 的阳性表达率差异也有显著性 (P < 0.05)。而 KDR mRNA 表达阳性率与肺癌的病理类型无明显相关关系 (P > 0.05)。

2.3 MVD 和 KDR mRNA 表达与 NSCLC 预后 从表 1 可见, 生存期 < 5 年组的 MVD 明显高于生存期 > 5 年组 (P < 0.01); 同样, 生存期 < 5 年组的 KDR mRNA 的阳性表达率亦明显高于生存期 > 5 年组 (P < 0.05)。

表 1 MVD、KDR mRNA 和 NSCLC 临床生物学的关系

项目	n	MVD $\bar{x} \pm s$	P	KDR mRNA		P
				阳性例数	阳性率 (%)	
组织类型						
癌组织	62	43.78 ± 12.46	< 0.01	49	79.03 %	< 0.01
良性瘤样病变	16	7.42 ± 4.12		2	12.5 %	
鳞癌	27	35.87 ± 11.89	< 0.01	20	74.1 %	> 0.05
腺癌	35	49.01 ± 9.63		29	82.9 %	
组织学分级						
高分化	7	40.51 ± 12.26	> 0.05	3	42.9 %	< 0.05
中分化	25	42.01 ± 12.43		20	80.0 %	
低分化	30	45.87 ± 12.49		26	86.7 %	
病理分期						
+	27	36.47 ± 10.41	< 0.01	16	59.23 %	< 0.01
+	35	48.54 ± 11.41		33	94.29 %	
肿瘤大小						
≤ 3cm	17	42.70 ± 12.99	> 0.05	10	58.82 %	< 0.05
> 3cm	45	44.83 ± 11.35		39	80 %	
淋巴结转移						
无	23	33.78 ± 8.52	< 0.01	14	60.87 %	< 0.05
有	39	48.89 ± 10.96		35	89.74 %	
生存时间						
≤ 5 年	32	44.83 ± 11.52	< 0.01	30	93.75 %	< 0.05
> 5 年	10	33.22 ± 9.96		1	10 %	

2.4 MVD 与 KDR mRNA 表达的关系 62 例

NSCLC 中, KDR mRNA (+) 49 例, KDR mRNA (-) 13 例; KDR mRNA (+) 者 MVD 为 51.72 ± 6.71 , KDR mRNA (-) 者 MVD 为 44.03 ± 10.84 , KDR mRNA 表达阳性者 MVD 较 KDR mRNA 表达阴性者明显升高 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 KDR 的表达与微血管密度(MVD)的关系

KDR	n	MVD(个/0.1024mm ²)	F	t	P
阳性组	49	51.72 ± 6.71	5.638	3.196	< 0.01
阴性组	13	44.03 ± 10.84			

3 讨论

肿瘤的血管新生成是一个包括血管内皮溶解, 内皮细胞增殖和迁移及血管腔形成的复杂过程, 并且是由促进和抑制血管生成的正负相关因子共同调控的复杂过程。在生理状况下, 正负因子处于平衡状态。而肿瘤在其生长、演进过程中分泌促血管生成的相关因子, 将平衡打破, 诱导血管新生。肿瘤血管生成过程中 VEGF 及其受体 KDR 起重要作用。VEGF 基因显性阴性研究表明 KDR 与血管岛、血管形成和造血有关, 提示 KDR 是血管生成的主要调控因子^[2]。VEGF 具有强烈的诱导血管内皮细胞表达其受体的作用, VEGF 及其受体通过自分泌或旁分泌途径, 联合调控内皮细胞分化与血管形成。由于实体瘤的生长与转移对血管新生的依赖性, VEGF 及其受体已成为近年来抗治疗血管生成的重要研究靶点。

本研究结果显示, NSCLC 中 MVD 和 KDR mRNA 表达明显高于肺良性瘤样病变 ($P < 0.05$), MVD 随 KDR 表达增强而增多, 两者呈正相关, 与 Koukourakis 等^[3]报道一致。提示在 NSCLC 中存在着活跃的血管生成, KDR 作为 VEGF 的最重要的功能受体, KDR 在介导肿瘤血管新生方面起重要的作用。

KDR 在肿瘤组织中的表达水平与肿瘤患者预后的关系, 目前仍然存在较大的争议, Delmotte 等^[4]进行的 meta 分析发现, VEGF 可以作为预测

NSCLC 患者的预后指标, 而 KDR 作为 NSCLC 患者的预后指标的证据不足, 但 Decaussin 等^[5]的研究表明, KDR mRNA 的表达水平与肺癌组织中的血管生成呈正相关, 而与 NSCLC 患者的生存期呈负相关。本研究发现, KDR mRNA 表达水平与 NSCLC 患者的生存期呈负相关, 且可以作为预测 NSCLC 的预后指标。

综上所述, 肺癌组织中 KDR mRNA 表达明显高于良性病变组织, 且与肺癌大小、淋巴结转移状况和 PTNM 分期呈正相关 ($P < 0.01$), 而与癌细胞分化程度呈负相关。KDR mRNA 阳性表达组的 5 年生存率显著低于阴性表达组, 从而提示 KDR 参与了肺癌的发生发展, 与肺癌的恶性程度密切相关, 可以作为肺癌生物学行为的一项评估指标。而且 KDR mRNA 的表达阳性者较 KDR mRNA 表达阴性者的 MVD 数目显著增加, 提示 KDR 可能成为 NSCLC 的一个潜在的抗血管治疗的靶点。

参考文献:

- [1] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2):169-180.
- [2] Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, et al. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells[J]. Lab Invest, 1999, 79(12):1573-1582.
- [3] Koukourakis MI, Gatromanolaki A, Thorpe PE, et al. Vascular endothelial growth factor/ KDR activated MVD versus CD31 standard microvessel density in non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(11):3088-3095.
- [4] Delmotte P, Martin B, Pasemans M, et al. VEGF and survival of patients with lung cancer: a systematic literature review and meta analysis[J]. Rev Mal Respir, 2002, 19(5):577-584.
- [5] Decaussin M, Sartelet H, Robert C, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptor (VEGFR-1/ Flt-1 and VEGFR-2/ Flk-1/ KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival[J]. J Pathol, 1999, 188(4):369-377.

[编辑: 刘红武]