

VEGF-C、FLT-4、cPKC 在肺癌中的表达及意义

陈 敏,唐建武

The Expression and Clinical Significance of VEGF-C, FLT-4, cPKC in Lung Cancer

CHEN Min, TANG Jian-wu

Dalian Medical University, Dalian 116027, China

Abstract: Objective To investigate the expression of VEGF-C, FLT-4, cPKC in human lung cancer and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemical techniques were used to detect the expression of VEGF-C, FLT-4, cPKC in 93 cases of lung cancer. **Results** The expression of VEGF-C and FLT-4 were not significantly different among different tissue types, and cPKC is correlated between well differentiated and poorly differentiated. The expression of three factors in the second stage lung cancer was more than the first stage lung cancer. The three factor positive rate was significantly higher in lung cancer with lymph nodes metastasis than that without. **Conclusion** Expression level of VEGF-C, FLT-4, cPKC are associated with lymph node metastasis, tumor progression of lung cancer and correlated well among the expression of three factors.

Keywords: Lung cancer; VEGF-C; FLT-4; cPKC; Lymphatic metastasis

摘要:目的 研究转移相关基因 VEGF-C、FLT-4、cPKC 在肺癌中的表达及其临床意义。方法 应用免疫组化方法检测 93 例肺癌中的 VEGF-C、FLT-4、cPKC 的表达情况。结果 VEGF-C、FLT-4 在肺癌的不同组织类型之间无明显差异;cPKC 在高分化组与低分化组之间有统计学意义;但晚期病例三者表达均高于早期病例;三者的阳性表达率在淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组。结论 VEGF-C、FLT-4、cPKC 与肺癌的淋巴结转移密切相关,三者之间有高度的相关性。

关键词:肺癌;VEGF-C;FLT-4;cPKC;淋巴结转移

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)07-0387-03

0 引言

当前有关肿瘤淋巴结转移相关因子的研究仍处于起始阶段。血管内皮生长因子-C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是近几年发现的 VEGF 家族中的新成员,一个与 VEGF 不同的内皮细胞生长因子,VEGF-C 的受体有 VEGFR-2 和 VEGFR-3 (FLT-4),VEGF-C 对 FLT-4 优先结合。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 由 12 种具有不同生物学特性的同工酶组成,经典型 PKC (classical, cPKCs) 由 PKC α 、PKC β 、PKC γ 组成,激活时需依赖 Ca²⁺、DG 和磷脂酰丝氨酸或佛波酯;作为细胞内信号传导的重要递质,在肿瘤发生、发展、转移等方面发挥重要作用。既往对 VEGF-C、FLT-4 的研究多集中于甲状腺癌、乳腺癌、肠癌等,在肺癌方面国内尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 标本收集

收集 1995 年 1 月~2000 年 12 月大连医科大学附属第一、第二医院原发性肺癌手术切除标本 93 例。标本均经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续 5 μ m 厚度切片,经 HE 染色观察、病理学分型和 TNM 分期。其中鳞癌 29 例,腺癌 32 例,支气管肺泡细胞肺癌 15 例;小细胞癌 17 例;早期 (T₁₋₂N₁₋₂M₀) 61 例,晚期 (T₂₋₃N₂₋₃M₀₋₁) 32 例(按 1997 年最新国际抗癌联盟标准),有淋巴结转移者 56 例,无淋巴结转移者 37 例。

1.2 方法

采用常规 SABC 免疫组化法。兔抗人 VEGF-C、FLT-4、单克隆抗体 (IgG 型)、鼠抗人 cPKC 的多克隆抗体 (IgG 型)、正常山羊血清封闭液、山羊抗兔 IgG 二抗、SABC 等均购自武汉博士德生物技术公司,工作浓度 1:100,染色前用 0.05% 的胰蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 消化 20min。

1.3 结果判定及统计学处理

VEGF-C 表达定位于细胞膜或细胞浆,呈清晰棕黄色细颗粒。根据阳性细胞染色范围及强度分为 4 级:“-”为无明显阳性细胞;“+”为阳性细胞 <25%;“++”为阳性细胞在 25%~75% 之间;“+++”为阳性细胞 >75%,染色较强。实验数据采

收稿日期:2003-06-18;修回日期:2003-10-28

作者单位:116027 辽宁大连医科大学 2000 级硕士生

用秩和检验、 χ^2 检验等。所有统计学处理均在 SPSS 10.0 软件上完成, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF-C、FLT-4、cPKC 在肺癌不同病理分级、临床分期、淋巴结转移之间的表达

VEGF-C、FLT-4、cPKC 阳性表达呈棕黄色颗粒状, 位于细胞膜/细胞浆内。VEGF-C 在肺癌不同组织类型之间表达依次为鳞癌 75.9%、腺癌 75%、肺泡细胞癌 73.3%、小细胞癌 5.9%; 鳞癌、腺癌的高分化组多为“-”级至“+”级反应; 低分化组多为“+”级至“+++”级反应; 晚期病人 VEGF-C 表达率为 82.7%, 高于早期病人的 69.4% ($P > 0.05$)。VEGF-C 在淋巴结转移组的阳性表达率 73.7%, 显著高于无转移组的表达率 44.4% ($P < 0.05$)。

FLT-4 鳞癌、腺癌、肺泡细胞癌中表达率分别为 34.5%、34.4% 和 33.3%, 小细胞癌中仅有 1 例弱表达; 淋巴结转移组较无转移组显示出多的“++”级至“+++”级反应, 表达率为 35.1%, 高于无转移组 19.4% ($P < 0.05$)。

cPKC 在小细胞癌的表达率为 82.4%, 高于肺泡细胞癌的 73.3%、鳞癌的 72.4% 和腺癌的 69%; 高分化组多为“-”级至“+”级反应; 低分化组多为“++”级至“+++”级反应; 晚期病人表达率为 79.3%, 高于早期病人的 65.3%; 淋巴结转移组多为“++”级至“+++”级, 非转移组多为“+”级至“++”级反应, 表达率为 84.2%, 显著高于无转移组的 55.5% ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 肺癌组织中 VEGF-C 的表达与 cPKC 表达的关系

肺癌组织中 VEGF-C 的表达与 cPKC 表达二者之间的 $\chi^2 = 23.3$, $P = 0.0001$, VEGF-C 与 cPKC 之间有高度的相关性, 见表 2。

3 讨论

3.1 VEGF-C、FLT-4 与肺癌的表达及意义

VEGF-C 由 Joukov 等^[1] 1996 年从人类前列腺癌细胞株 PC-3 的 cDNA 文库中克隆并分离提纯出来。最近国外已有报道, 在人类许多恶性肿瘤包括甲状腺癌、前列腺癌、结肠癌、宫颈癌等原发癌组织中 VEGF-C 的表达与区域淋巴转移显著相关。但也有实验证明, VEGF-C、FLT-4 信号通路, 也可促进某些实体肿瘤血管生成并与血管转移有一定的关系, 具体机制不清^[2]。

关于 VEGF-C、FLT-4 在肺癌中的表达国外仅

表 1 93 例不同病理临床特征肺癌 VEGF-C、FLT-4、cPKC 蛋白表达

组织学类型	例数	染色结果				阳性率 (%)	
		-	+	++	+++		
鳞癌							
VEGF-C	高分化	13	4	5	2	2	69.2
	低分化	16	3	4	4	5	81.2
FLT-4	高分化	13	9	3	1	0	30.8
	低分化	16	10	2	2	2	37.5
cPKC	高分化	13	5	3	2	3	61.5
	低分化	16	3	4	3	6	81.2*
腺癌							
VEGF-C	高分化	16	5	6	2	3	68.7
	低分化	16	3	6	3	4	81.3
FLT-4	高分化	16	11	2	2	1	31.3
	低分化	16	10	2	3	1	37.5
cPKC	高分化	16	6	5	2	3	62.5
	低分化	16	4	2	4	6	75.0*
肺泡细胞癌							
VEGF-C		15	4	1	4	6	73.7
FLT-4		15	10	2	2	1	33.3
cPKC		15	4	1	4	6	73.3
小细胞癌							
VEGF-C		17	16	0	1	0	5.9
FLT-4		17	16	1	0	0	5.9
cPKC		17	3	2	5	7	82.3
临床分期							
VEGF-C	早期	61	27	18	8	8	55.7
	晚期	32	8	4	8	12	75.0
FLT-4	早期	61	46	8	5	2	24.6
	晚期	32	20	4	5	3	37.5
cPKC	早期	61	17	15	15	14	72.1
	晚期	32	8	2	5	17	75.0
淋巴结转移							
VEGF-C	无转移	36	20	8	6	2	44.4
	有转移	57	17	10	10	15	73.7*
FLT-4	无转移	36	29	4	3	0	19.4
	有转移	57	37	8	7	5	35.1*
cPKC	无转移	36	16	9	6	5	55.5
	有转移	57	9	8	14	26	84.2*

*: $P < 0.05$

表 2 肺癌组织中 VEGFC 的表达与 cPKC 表达的相关性

VEGF-C	cPKC	
	阴性	阳性
阴性	15	8
阳性	6	47

有 1 例报道, 而国内尚无报道。本实验通过对 93 例肺癌的研究发现, 有 58 例 VEGF-C 表达呈阳性, 22 例 FLT-4 表达呈阳性, VEGF-C、FLT-4 表达在鳞癌、腺癌、支气管肺泡癌之间无统计学上的差异。高分化型的鳞癌、腺癌两者的阳性率低于低分化型, 晚期病例 VEGF-C 表达与早期病例相比较无相关性, 但二者与淋巴结转移密切相关, 即在发生淋巴结转移的肺癌中高表达, 且与无淋巴结转移组之间有显

著差别。Kajita 等^[3]检测了 62 例非小细胞肺癌亦揭示:VEGF-C 在鳞癌中的表达略高于腺癌,FLT-4 在部分癌细胞当中表达,二者与不同组织类型、临床分期、肺癌的分化程度并未呈现具有统计学意义的差异,只是在原发癌与转移组间表现出明显的差别;且发现 VEGF-C 与 FLT-4 之间存在一定的协同关系,即 VEGF-C 表达较高者 FLT-4 表达亦强烈,两者之间存在相关性。这与本试验得出的结论相一致。Tsurusaki^[4]的实验证实,FLT-4 基因表达主要局限在淋巴管内皮细胞内和邻近边缘肿瘤细胞当中,且随着浸润深度其表达密度递增,VEGF-C、FLT-4 表达增高与癌周淋巴管数目增加相一致,但微血管密度并无改变。这与上述文献^[2]实验结果有分歧,Joukov^[1]认为 VEGF-C 促进血管生成可能与 VEGFR-2 有关,而与 FLT-4 的关系不大。看来 FLT-4 与其配体 VEGF-C 的结合是否与血管生成有关,尚需要研究证实。

值得注意的是,本实验发现 VEGF-C 在非小细胞肺癌和小细胞肺癌表达之间有差异,在 17 例小细胞肺癌中只有 1 例呈现阳性表达,是否因为小细胞肺癌来源于神经外胚层、许多属性与非小细胞肺癌不同有关,尚难以定论。

3.2 cPKC 与肺癌的表达及意义

早期,Jones 等^[5]在研究人小细胞肺癌细胞株 NCI-H345 细胞时,发现 cPKC⁻ 能引起细胞周期异常,导致肺癌的发生。本实验通过 93 例肺癌的研究发现,cPKC 阳性表达率为 76.3%,在肺鳞癌表达阳性率轻度高于腺癌,小细胞癌表达最强,但之间无明显差异;低分化肺癌较高分化肺癌 cPKC 过度表达更明显;中晚期肺癌亦较早期肺癌明显过度表达 cPKC。即往有研究证实,肺鳞癌中 PKC 表达无论从蛋白水平还是从 mRNA 水平均显著高于腺癌和大细胞癌。进一步观察到低分化肺癌较中~高分化肺癌 PKC⁻ 过度表达更明显。中晚期肺癌亦较早期肺癌 PKC⁻ 明显过度表达。

在本实验 57 例淋巴转移的肺癌组织中有 48 例 cPKC 表达阳性(84.2%),在无淋巴转移组中 36 例有 20 例表达阳性(55.5%),两组间存在显著的统计学意义。Dennis^[6]在体外观察到转染了反义 PKC⁻ mRNA 的黑色素瘤细胞的转移率较对照组降低 75%。PKC 促癌增殖与侵袭的具体机制可能是 PKC 提高肿瘤自分泌移动因子(autocrinemotilityfactor,AMF)的亲和力,增加肿瘤细胞的侵袭能力,或者通过改变肿瘤细胞与胞外基质的黏附性,如:与 MMP-1、MMP-2 等表达的协同性,影响肿瘤的转移。

3.3 VEGF-C、FLT-4、cPKC 与肺癌

VEGF-C/FLT-4 自分泌通路可以活化细胞内不同的信号系统,产生级联反应,使 DNA 有丝分裂增强,导致细胞增殖。cPKC 作为细胞内传导的重要递质,其活化至关重要。那么 VEGF-C/FLT-4 与 cPKC 有什么内在联系呢?表 1、2 结果分析表明。在肺癌组织中 cPKC 表达阳性率高于 VEGF-C、FLT-4 的表达;在肺癌分化程度、病理分期、淋巴结转移方面显示出与 VEGF-C、FLT-4 表达的一致性,即在低分化组、晚期病例和淋巴结转移组均显示出较多的“++”级至“+++”级反应,阳性表达率均高于高分化组、早期病例和无转移组,尤其在淋巴转移组,三者表达明显有协同性,VEGF-C、FLT-4 表达较高者 cPKC 表达亦强烈,统计学上提示有显著意义的差别。由此我们可以得出:VEGF-C 与受体 FLT-4 结合,诱导 VEGFR-3 酪氨酸激酶磷酸化,激活 PKC 信号传导系统,最终导致细胞增殖。在我们实验中 cPKC 为普通型包括⁻、⁻、⁻,由前述文献可见,不同的 cPKC 亚型在肺癌不同组织类型、分化程度及病理分期中表达强度是可变的。同样,在不同的条件下,表达的 cPKC 亚型亦不同。

通过本实验,VEGF-C、FLT-4、cPKC 协同表达上升已得到确认,但 VEGF-C/FLT-4 究竟由何种亚型介导胞外信息传至核内产生效应的;反之,不同的 cPKC 亚型由于其在肺癌组织中表达强度的不同是否也影响 FLT-4 与其配体之间的亲和性,尚需进一步探讨证实。

参考文献:

- [1] Joukov V, Pa jusolak, Kai painen A, et al. Anovel vascular endothelial growth factor VEGF⁻ Cisali gandforthe Flt⁻ 4 and KDR receptor tyrosinases[J]. EMBO J, 1996, 15 (6): 1751-1755.
- [2] Valtola R, Salven P, Heikkila P, et al. VEGFR⁻ 3 and Its Ligand VEGF-C Are Associated with Angiogenesis in Breast Cancer[J]. Amer J Pathol, 1999, 154 (5): 1381-1390.
- [3] Kajita Y, Ohta Y, Kimura K, et al. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in small cell lung cancer[J]. BJ Cancer, 2001, 85 (2): 255-260.
- [4] Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-c expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis[J]. BJ Cancer, 1999, 80 (12): 309-313.
- [5] Jones CL, Beck LK, Brozna JP, et al. Properties of classic protein kinase C in human small cell lung carcinoma NCI-H345 cells[J]. Cell Growth Differ, 1995, 6: 1627-1630.
- [6] Dennis JV, Deau NM, Bennett CF, et al. Human melanoma metastasis inhibited by folivin gEX vivo treatment with an antisense oligonucleotide to PKC [J]. Cance Lett, 1998, 128: 65-70.

[编辑: 安 凤; 校对: 贺文]