

直肠癌中 VEGF 与 PCNA 的表达及其临床意义

谢敏¹, 吴建平², 夏小勤¹, 吴昌鸣², 任辉明³

摘要: 目的 通过检测直肠癌中 VEGF 及 PCNA 的表达, 探讨其对直肠癌的发生、发展及其对预后的意义。方法 应用免疫组化 S-P 法, 检测直肠癌中 VEGF 及 PCNA 的表达。结合组织学分类、淋巴结转移等分析。结果 正常结肠粘膜中 VEGF 及 PCNA 的阳性率分别为 15.4% 及 6.7%, 直肠腺瘤中 VEGF 及 PCNA 的阳性率分别为 16% 及 28%, 直肠癌中 VEGF 及 PCNA 的阳性表达率分别为 45.5% 及 84.9%。结论 综合检测 VEGF 与 PCNA, 对于直肠癌的诊断、治疗及预后有明显指导意义。

关键词: 直肠肿瘤; 血管内皮细胞生长因子; 增殖细胞核抗原; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3⁺⁷ **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2002)05-0380-03

The expression of VEGF and PCNA in rectal cancer and its clinical significance

XIE Min, WU Jian-ping, XIAXiao-qin, et al

Department of abdominal and urinary surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China

Abstract: **Objective** To explore the detection of VEGF and PCNA in colorectal cancer to the significance of genesis, development and prognosis. **Methods** By means of immunohistochemistry technique (S-P), to detect the expression of VEGF and PCNA in colorectal tissues, and combined with histology type and lymph node metastasis. **Results** The positive expression rate of VEGF and PCNA of normal colorectal tissue, colorectal adenoma and colorectal cancer are 15.4%, 16%, 45.5%, 6.7%, 28% and 84.9% respectively. **Conclusion** Combined detection of VEGF and PCNA can play an obvious guidance role in diagnosis, treatment and prognosis of rectal cancer.

Keywords: Rectum neoplasms; Vascular endothelial growth factor; Proliferating cell nuclear antigen; Immunohistochemistry

直肠癌作为大肠癌的一部分,在癌症病人中所占比例较大,随着人们生活水平的提高,近年来有升高的趋势。新近的研究表明肿瘤的发生不仅与细胞的增殖有关,而且与肿瘤细胞的凋亡及血管形成等有关。作者应用免疫组化对直肠癌中 VEGF 及 PCNA 的表达情况进行了研究,探讨直肠肿瘤细胞增殖、凋亡及血管形成的规律,从而进一步阐明其在直肠肿瘤发生中的作用及其对直肠癌早期诊断和预后的意义。现报告如下。

1 材料与方

1.1 材料 收集湖北省肿瘤医院病理科 1998 ~ 2000 年经外科手术切除及肠镜活检的直肠标本,其中腺瘤(包括绒毛状腺瘤)25 例,男 14 例,女 11 例,年龄 20 ~ 74 岁,平均 43 岁;腺癌 66 例,男 36 例,女

30 例,年龄 28 ~ 77 岁,平均 49 岁,15 例正常粘膜取自距肿瘤边缘 5cm 以上的切缘。所有标本均经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,分别作 H. E 染色及免疫组化标记,HE 切片按 1981 年《全国大肠癌病理协作研究统一规范》复诊,所有病例术前及检查前均未接受放疗及化疗。

1.2 试剂及免疫组化方法 小鼠抗人单克隆抗体 VEGF 及 PCNA (PC10) 为美国 Santa Cruz 公司产品, S-P 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物制品有限公司,按试剂盒说明书操作,用 PBS 代替一抗作阴性对照,已知直肠癌阳性切片作阳性对照。免疫组化步骤如下:

- (1) 切片脱蜡至水。
- (2) 蒸馏水新鲜配置 3% H₂O₂ 室温 5 ~ 10min 灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。
- (3) 微波修复抗原:将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液, pH6.0, 微波炉加热至 96 ~ 100 $^{\circ}$ C, 持续 20 ~ 30min, 冷却后进行下一步。
- (4) 滴加抗原修复液, 室温 10min。蒸馏水洗 3 次。

收稿日期: 2001-12-16; 修回日期: 2002-08-06

作者单位: 1. 430079 武汉, 湖北省肿瘤医院腹泌外科, 2. 病理科; 3. 荆门市人民医院肿瘤科

- (5) 滴加正常血清封闭液, 室温 20min。去掉多余液体, 不洗。
- (6) 滴加适当稀释的一抗 (VEGF 及 PCNA), 室温 120min。0.01MPBS 洗 2min × 3 次。
- (7) 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 20 °C 20min, 0.01MPBS 洗 2min × 3 次。
- (8) 滴加试剂 SABC, 20 °C 20min, 0.01MPBS 洗 5min × 4 次。
- (9) DAB 显色。
- (10) 苏木素轻度复染。脱水、透明、封固。显微镜观察。

1.3 结果判断 免疫组化染色阳性反应为棕黄色 - 黄色, PCNA 定位于细胞核, VEGF 定位于细胞浆 (图略), PCNA 用增殖指数 (proliferative indices, PI) 表示, PI 是指 PCNA 阳性细胞占肿瘤细胞的百分率, 并将之分为四级, 1% ~ 25% 为 I 级, 26% ~ 50% 为 II 级, 51% ~ 75% 为 III 级, 75% 为 IV 级。其中 I ~ II 级为弱阳性, III ~ IV 级为强阳性。

2 结果

2.1 VEGF 和 PCNA 在直肠粘膜及癌组织中的表达结果 正常直肠粘膜上皮细胞中可见部分细胞呈 PCNA 的低水平表达, 且主要位于粘膜基底层细胞, 腺癌则是肿瘤组织中癌细胞胞核中有表达, 直肠腺癌中 VEGF 及 PCNA 的阳性表达率分别为 45.5% 及 84.9%, 两种抗体的详细表达情况见表 1、2。

表 1 直肠组织中 VEGF 的表达

| 组织类型 | n | VEGF | |
|------|----|------|----|
| | | 阳性 | 阴性 |
| 正常粘膜 | 15 | 13 | 2 |
| 腺瘤 | 25 | 21 | 4 |
| 腺癌 | 66 | 36 | 30 |

表 2 直肠组织中 PCNA 的表达

| 组织类型 | n | PCNA | | |
|------|----|------|-----|-----|
| | | 阳性 | 弱阳性 | 强阳性 |
| 正常粘膜 | 15 | 14 | 1 | 0 |
| 腺瘤 | 25 | 18 | 4 | 3 |
| 腺癌 | 66 | 10 | 30 | 26 |

经统计学检验, PCNA 在直肠癌中的表达与在正常粘膜及直肠腺瘤中的表达相比 P 值 <0.01 , 有极显著性差异, 而 VEGF 在直肠癌中的表达与在正常粘膜及直肠腺瘤中的表达相比 P 值 <0.05 , 有显著性差异。

2.2 两种抗体表达与淋巴结转移的关系, 见表 3

表 3 VEGF 及 PCNA 表达与直肠癌淋巴结转移之间的关系

| 淋巴结转移 | n | VEGF 阳性 | PCNA 阳性 |
|-------|----|---------|---------|
| 转移 | 36 | 25 | 32 |
| 未转移 | 30 | 5 | 24 |

经统计学检验, VEGF 的表达与淋巴结转移之

间有极显著性差异 ($P < 0.01$), 但 PCNA 的表达与淋巴结转移之间则无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 两种抗体表达与腺癌分级之间的关系, 见表 4
表 4 VEGF 及 PCNA 表达与直肠腺癌分级的关系

| 腺癌 | n | VEGF | PCNA |
|-----|----|------|------|
| 高分化 | 30 | 12 | 25 |
| 中分化 | 26 | 13 | 22 |
| 低分化 | 10 | 5 | 9 |

经统计学检验, 两种抗体的表达与直肠癌分级之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

一般来说, 大肠癌的发病随年龄增长而迅速上升。20 世纪 70 年代青年人大肠癌是当时我国大肠癌流行病学特点之一。随着大肠癌发病率的迅速上升, 近年来年龄构成已与欧美相近, 说明其与饮食、生活习惯的改变有关。武汉地区属内陆地区, 青年人大肠癌依然常见, 临床医师不能以病人年轻而忽视大肠癌的可能。在大肠癌低发区, 直肠癌远比结肠癌多见, 可占 80% 左右, 且直肠癌可通过简单易行的直肠指检或肛门镜发现。

大肠癌两性发病率相似, 在美国男、女性大肠癌均居第 3 位常见癌。1995 年上海市区新发大肠癌病人中男性 1057 人, 女性 987 人, 男性大肠癌为第 4 位常见癌, 女性大肠癌居第 2 位常见癌症。本组男性大肠癌病人 36 例, 女性大肠癌病人 30 例, 男、女性比例相近。

VEGF 是一种特异性作用于内皮细胞的多功能因子, 对诱导和调节肿瘤血管形成有重要作用。其主要生物学功能有: (1) 能增加血管尤其是微血管的通透性, 为血管形成过程中多种细胞迁移提供一个纤维网络; (2) VEGF 是一种选择性促血管内皮细胞有丝分裂原, 直接刺激内皮细胞增殖, 并产生纤维蛋白原激活剂和胶原酶, 这不仅可促进内皮细胞活动, 有利于血管生成, 而且还有利于肿瘤细胞脱落进入血管或向邻近组织扩散, 为肿瘤的浸润转移创造条件, VEGF 对肿瘤血管形成的促进作用已在多种肿瘤中得以证实, 本实验结果为进一步探讨直肠癌的抗血管生成治疗奠定了基础, VEGF 可作为抗癌治疗的新靶点, 针对 VEGF 及其受体的抗血管治疗, 为肿瘤防治开辟了另一新途径。Broll 等^[1] 认为血清中 VEGF 浓度与肿瘤的体积和大小明显相关, 血清 VEGF 浓度远高于正常组织定量的患者预后差, Werther 等^[2] 认为血清中 VEGF 浓度高则可预测其生存期短。基于这个理由, VEGF 可作为病人的预后指标。由于其低敏感度而不是对大肠癌有效的肿瘤标记, 但如和 CEA 结合则可明显提高术前诊断敏感性。Akagi

等^[3]发现 VEGF 阳性组病人的生存时间比 VEGF 阴性病人短,但无统计学差别,但是 VEGF 可能在大肠癌的淋巴扩散中起重要作用,我们的研究也证实了这一点。Lissoni 等^[4]发现大肠癌患者血液中 VEGF 的高浓度及较差的预后不仅与 VEGF 诱导的新生血管形成有关,还与 VEGF 相关的免疫抑制有关。

PCNA 是近年来发现的聚积于 S 期复制细胞的胞核中的周期依赖性蛋白,作为 DNA 聚合酶的辅助蛋白直接参与细胞增殖过程的 DNA 复制,其表达反映了细胞的增殖活性,Kovac 认为 PCNA 可作为大肠癌的独立的预后因素。Watanabe 发现进展期大肠癌患者 PCNA 阳性细胞率明显高于早期癌症患者。本研究中 PCNA 的表达阳性率较高(84.9%)与刘勇等对大肠癌的研究结果相似。PCNA 的阳性表达(尤其是强阳性)意味着肿瘤细胞处于增殖期,而处于增殖期的肿瘤对药物治疗最敏感,有利于指导临床化疗。本研究中 PCNA 在肿瘤淋巴结转移及分级上未表现出显著性差异,说明其没有促进肿瘤分化与肿瘤转移的作用,符合其作用原理。

从对以上两种因子 PCNA 及 VEGF 的讨论中,我们可以看出它们在直肠癌的发生、发展中有着不同的作用机理。在肿瘤的发展及转移中 VEGF 起着极大的作用,VEGF 的表达在直肠癌的肿瘤分级及转移中有着显著性差异,检测 VEGF 有助于了解肿瘤的

发生、发展状况与淋巴结转移的情况。PCNA 作为与细胞周期相关的蛋白,其阳性表达率对直肠癌的药物治疗具有指导意义。综合检测 VEGF 与 PCNA,对于直肠癌的诊断、治疗及预后有着明显的指导意义。

参考文献:

- [1] BrollR,ErdmannH,DuchrowM,etal.Vascularendothelial growth factor (VEGF) -avaluable serum tumor marker in patients with colorectal cancer[J].Eur J Surg Oncol,2001,27:37-42.
- [2] WertherK,ChristensenJ,NielsenHJ.Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma[J].Br J Cancer,2002,86:417-423.
- [3] AkagiK,IkedaY,MiyazakiM,etal.Vascularendothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues[J].Br J Cancer,2000,83:887-891.
- [4] LissoniP,MaluginiF,BonfantiA,etal.Abnormal enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells,IL-12 and endothelin-1[J].J Biol Regul Homeost Agents,2001,15:140-144.
- [5] WatanabeI,IsozakiH,ToyodaM,etal.Immunohistochemical study on the progression of colorectal cancer with respect to poptosis-related gene products, and labeling index of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [J].Gan Toka Gaku Ryo,1998,25 (Suppl 3):410-414.

(刘红武校对)

(上接第 377 页)

这种抑制作用随着 As₂O₃浓度的增高呈逐渐增强趋势;我们在腹水标本电镜切片中观察到中剂量 As₂O₃注射 3 次,腹水中癌细胞呈典型凋亡形态学改变,说明中、高剂量的 As₂O₃除具有抑制腹水生成延长荷瘤裸鼠寿命外,还可不同程度地降低 MKN-45 细胞对裸鼠的致瘤率和荷瘤裸鼠的死亡率。As₂O₃消除 MKN-45 细胞致瘤性与其剂量有关,即随着剂量的增加,致瘤性减低,这是高浓度 As₂O₃诱导 MKN-45 细胞凋亡的结果,而表阿霉素则无此作用^[3]。

砷剂抗癌作用的机理复杂、广泛而且特异。“癌灵号”在使急性粒细胞性白血病患者取得临床缓解时,在癌细胞与正常细胞之间有选择性,即 As₂O₃可选择性地诱导幼稚粒细胞凋亡,但检查患者骨髓像发现即使长期用药对骨髓造血功能却无抑制作用,反而能刺激造血^[4],因此,与一般化疗药相比 As₂O₃只杀伤肿瘤细胞而不损伤正常细胞。我们的研究表明,腹腔内注射 As₂O₃后,腹水中癌细胞呈凋亡形态学改变,而各组裸鼠在安全剂量范围内未见砷中毒死亡,进一步证明 As₂O₃确能选择性地杀伤腹腔内的肿瘤细胞。

细胞水平及裸鼠的研究均表明 As₂O₃可诱导胃

癌细胞凋亡,提示 As₂O₃对胃癌可能有一定的治疗作用,设想在肿瘤局部或腹腔内注射有效剂量的 As₂O₃使肿瘤细胞凋亡^[5],既可避免全身用药的副作用又可减少用药剂量,对提高生活质量、延长寿命有一定益处。有资料表明临床上砷剂治疗白血病的有效剂量为 20mg/日,我们对 As₂O₃体内用量的研究结果只适用于裸鼠,对人类胃癌腹水的治疗,As₂O₃的用量还需进一步实验研究确定。

参考文献:

- [1] 邓志华,蔡洪培,等.三氧化二砷对正常肝细胞及肝癌细胞株的影响[J].中华消化杂志,1999,19(4):227-229.
- [2] 张晨,姚华,凌冰,等.砷对大鼠生育繁殖及子代发育影响的研究[J].卫生研究,1997,26(3):179-182.
- [3] 陈军,尹浩然,林言箴.早期和延期腹腔内化疗对结肠癌细胞腹腔种植的影响[J].中国肿瘤临床,1997,24(3):210-213.
- [4] 倪建华,陈国强,沈志祥,等.静脉滴注三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病的药代动力学分析[J].中华血液学杂志,1997,18(5):250-253.
- [5] HinoN,HigashiT,NousoK.Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J].Liver,1996,16(2):123-129.

(刘红武校对)