

Ang-2、VEGF 及 VEGFR3 在喉鳞癌中的表达及其临床意义

王宝山,刘艳梅,修贺明,王娟

Expression of Ang-2, VEGF and VEGFR-3 in Larynx Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance

WANG Bao-shan, LIU Yan-mei, XIU He-ming, WANG Juan

Department of Otorhinolaryngology, First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China

Abstract: Objective To explore the roles and the significances of angiopoietin-2(Ang-2), vascular endothelial growth factor(VEGF)and VEGFR-3 expression and their relationship with clinicopathologic characteristics of larynx squamous cell carcinoma. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect Ang-2, VEGF and VEGFR-3 expression in larynx squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. **Results** The expression level of Ang-2, VEGF and VEGFR-3 was significantly higher in larynx squamous cell carcinoma than in adjacent normal tissue(Ang-2, $P < 0.01$; VEGF, $P < 0.01$; VEGFR-3, $P < 0.01$). There was no significant correlation between Ang-2 expression and tumor differentiation or lymph node metastasis($P > 0.05$). VEGF and VEGFR-3 expression was correlated with lymph node metastasis($P < 0.05$) but not tumor differentiation($P > 0.05$). Positive correlation was found between expression of Ang-2 and VEGF($r = 0.8193$, $P < 0.01$), also between expression of VEGF and VEGFR-3($r = 0.7365$, $P < 0.01$). **Conclusion** Expression of Ang-2, VEGF and VEGFR-3 was closely associated with tumor angiogenesis and maturity. Their overexpression may play a major role during the development of larynx squamous cell carcinoma.

Key words: Angiopoietin-2(Ang-2); Vascular endothelial growth factor(VEGF); VEGFR-3; Larynx Squamous Cell Carcinoma

摘要:目的 研究喉鳞癌组织中促血管生成素-2(Angiopoietin-2, Ang-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及受体-3(VEGFR-3)的表达及其与临床病理学特征间的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法检测喉鳞癌患者癌组织及癌旁正常组织中促血管生成素-2(Ang-2)、血管内皮生长因子(VEGF)及血管内皮生长因子受体-3(VEGFR-3)的表达。**结果** Ang-2、VEGF 及 VEGFR-3 在喉鳞癌组织中表达显著高于癌旁正常组织(P 均 < 0.01); Ang-2 表达在肿瘤病理分化程度及有无淋巴结转移上差异无统计学意义($P > 0.05$), VEGF 与 VEGFR-3 的表达在病理分化程度上的比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 而有无淋巴结转移上的比较差异有统计学意义($P < 0.05$); Pearson 积差相关性分析:喉鳞癌组织中 Ang-2 与 VEGF 的表达呈正相关($r = 0.8193$, $P < 0.01$); VEGF 与 VEGFR-3 的表达也呈正相关($r = 0.7365$, $P < 0.01$)。**结论** Ang-2、VEGF 及 VEGFR-3 与肿瘤的血管生成和成熟密切相关,它们在喉鳞癌组织中的过表达可能在喉鳞癌的发展过程中起重要作用。

关键词: Ang-2; VEGF; VEGFR-3; 喉鳞癌

中图分类号: R739.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)06-0483-04

0 引言

既往研究发现促血管生成素(angiotensin, Ang)-2 和血管内皮生长因子(vascular endothelial

growth factor, VEGF)可以协同作用促进恶性肿瘤新生血管的形成,从而达到促进肿瘤生长的作用^[1],为肿瘤的治疗提供新的靶点。目前,有关 Ang-2 在喉鳞癌血管生成中的作用少见报道,为此,我们对两者的关系进行了研究,现报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料

收稿日期:2008-12-23;修回日期:2009-04-01

基金项目:河北省自然科学基金(C2008000990)

作者单位:050031 石家庄,河北医科大学第一医院耳鼻咽喉科

作者简介:王宝山(1967-),男,博士,主任医师,主要从事耳鼻咽喉头颈肿瘤的基础研究与临床治疗

通过病案检索收集河北医科大学病理教研室 2001 年 1 月 1 日~2004 年 12 月 31 日术前未经放疗的 41 例有淋巴转移的声门上型喉癌、下咽癌患者的原发灶及其转移淋巴结,以及 22 例无淋巴结转移的标本,同时取其癌旁正常组织。男 57 例,女 6 例;年龄 43~72 岁,中位年龄 55 岁。声门上型喉癌 37 例,下咽癌 26 例。按 2002 年 UICC TNM 分期标准,淋巴结转移组中Ⅲ期 12 例,Ⅳ期 29 例,其中高分化 8 例,中分化 22 例,低分化 11 例;非转移组Ⅲ期 14 例,Ⅳ期 8 例,其中高分化 10 例,中分化 8 例,低分化 4 例。所有标本均经两位副高以上职称的病理科医生复查确诊。

1.2 检测方法

将所有手术标本经 4% 中性甲醛液固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片,利用免疫组织化学 PV 法检测 VEGF、VEGFR-3、Ang-2 的表达。鼠抗人 VEGF 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品;兔抗人 Ang-2 多克隆抗体为武汉博士德公司产品。工作比率均为 1:50。用已知阳性切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3 结果判定

应用 PV 法(Polymer Conjugated)进行免疫组织化学染色,染色阳性的细胞浆和(或)核呈棕黄色颗粒。采用 Nikon NIS-Elements Basic Research Ver-2.1 彩色图像分析系统,每张切片随机取 5 个视野(×400)做图像分析,计算每张切片的平均光密度,得到该组阳性细胞的平均光密度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料比较行 *t* 检验;相关性检验采用 Pearson 积差相关性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 喉鳞癌组织和癌旁正常组织中 Ang-2、VEGF

和 VEGFR-3 蛋白的表达

喉鳞癌中 Ang-2 呈强阳性表达,显著高于癌旁正常组织($t = 3.474, P < 0.01$)。阳性颗粒呈棕黄色,主要定位于癌灶边缘的肿瘤细胞胞质,少量血管内皮细胞也可见微弱表达,见图 1。同样喉鳞癌中 VEGF 和 VEGFR-3 的表达也显著高于癌旁正常组织(VEGF: $t = 4.736, P < 0.01$; VEGFR-3: $t = 6.561, P < 0.01$),见表 1。阳性颗粒主要定位于肿瘤细胞的细胞质和(或)胞核中,见图 2、3。三者染色存在异质性,即在不同组织和区域染色强度及染色面积不相同。

表 1 喉鳞癌及癌旁正常组织中 Ang-2、VEGF 及 VEGFR-3 的中位密度值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Meandensity of Ang-2、VEGF and VEGFR-3 in throat squamous cell carcinoma and normal throat tissues($\bar{x} \pm s$)

| Tissue | n | Ang-2 | VEGF | VEGFR-3 |
|-------------------------|----|-------------|-------------|-------------|
| Laryngeal Carcinoma | 63 | 0.21 ± 0.04 | 0.18 ± 0.03 | 0.22 ± 0.03 |
| Normal laryngeal mucous | 63 | 0.17 ± 0.05 | 0.14 ± 0.03 | 0.15 ± 0.05 |

2.2 喉鳞癌中 Ang-2、VEGF 和 VEGFR-3 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系

Ang-2 表达在病理分化程度及有无淋巴结转移中差异均无统计学意义($P > 0.05$)。VEGF 与 VEGFR-3 的表达在病理分化程度上的比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而在有无淋巴结转移上的比较,有淋巴结转移组的表达要明显高于无淋巴结转移组,其差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

2.3 Ang-2、VEGF 和 VEGFR-3 三者之间的相关性

Pearson 积差相关性分析显示:喉鳞癌组织中 Ang-2 与 VEGF 的表达呈高度正相关($r = 0.82, P < 0.01$);VEGF 与 VEGFR-3 的表达也呈高度正相关($r = 0.74, P < 0.01$)。

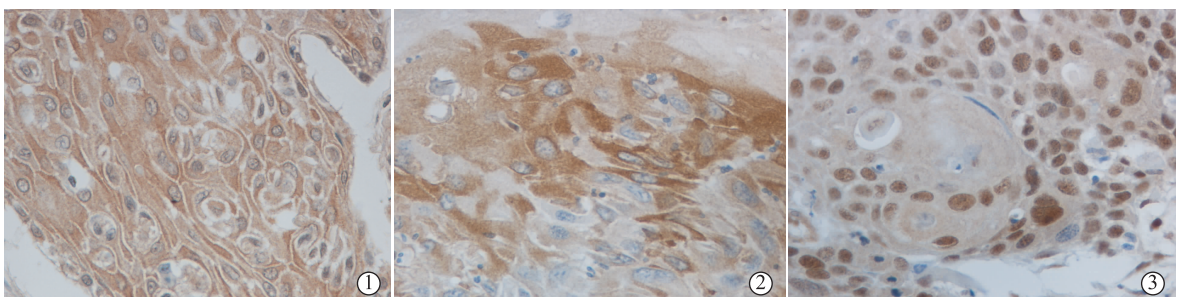


图 1 喉鳞癌组织 Ang-2 蛋白的表达 图 2 喉鳞癌组织 VEGF 蛋白的表达 图 3 喉鳞癌组织 VEGFR-3 蛋白的表达
Figure 1 Expression of Ang-2 in throat squamous cell carcinoma Figure 2 Expression of VEGF in throat squamous cell carcinoma Figure 3 Expression of VEGFR-3 in throat squamous cell carcinoma

表 2 Ang-2、VEGF 和 VEGFR-3 表达与临床病理特征之间的关系

Table 2 The relationship between expression of Ang-2, VEGF and VEGFR and clinicopathological characteristics

| Group | n | Ang-2(meandensity) | P | VEGF(meandensity) | P | VEGFR-3(meandensity) | P |
|---------------------------|----|--------------------|-------|-------------------|-------|----------------------|-------|
| Path -grade | | | | | | | |
| poorly differentiated | 15 | 0.19 ± 0.02 | | 0.21 ± 0.02 | | 0.20 ± 0.05 | |
| moderately differentiated | 30 | 0.21 ± 0.04 | >0.05 | 0.18 ± 0.04 | >0.05 | 0.22 ± 0.03 | >0.05 |
| well differentiated | 18 | 0.23 ± 0.01 | | 0.18 ± 0.01 | | 0.23 ± 0.03 | |
| Transfer | | | | | | | |
| Yes | 41 | 0.18 ± 0.03 | | 0.22 ± 0.05 | | 0.26 ± 0.05 | |
| No | 22 | 0.19 ± 0.04 | >0.05 | 0.18 ± 0.07 | <0.01 | 0.22 ± 0.03 | <0.05 |

3 讨论

当肿瘤的大小超过 1~2 mm³时,要进一步生长就必须依赖于肿瘤内新生血管的生成^[2]。新生的血管不仅提供肿瘤生长所需的营养物质,还被利用为转移的通道,通过血液循环将原发癌细胞送至转移的靶器官。

新生血管形成受到多种细胞因子的调节, VEGF 及其受体系统和 Ang 及其受体 Tie-2 系统是调节肿瘤血管生成的两条重要途径^[3],它们可能在肿瘤的发生、发展和转移过程中起重要作用^[4],了解肿瘤新生血管形成的调控机制,有助于寻找肿瘤治疗的新靶点^[5]。

促血管生成素家族是近年发现的与血管生成及成熟有关的因子,它可特异性的作用于内皮细胞酪氨酸激酶受体系统(receptor tyrosine kinase, RTKS),在生理和病理血管新生中起重要作用^[6]。该家族包括 Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-4 等,其中对 Ang-1、Ang-2 研究较为深入,Ang-1 与内皮细胞酪氨酸激酶受体 Tie-2 结合,有利于血管成熟稳定;而 Ang-2 则竞争性抑制 Ang-1 与 Tie-2 受体结合,拮抗 Ang-1 的作用,使内皮外周紧密结构松弛^[7],而且是目前证实的仅有的两个特异性作用于血管内皮的生长因子之一^[8]。实验表明 Ang-2 在喉鳞癌癌旁正常组织中几乎无表达,而在喉鳞癌组织表达明显上调($P < 0.01$),这与 Ang-2 在其他多数实体瘤内表达情况相一致,提示它可能与肿瘤发生、发展过程中的某些生物学行为的调节有关。然而目前对 Ang-2 在肿瘤中的表达定位尚存在争议,早期的研究报道 Ang-2 表达仅定位于内皮细胞的胞质中^[9-10],近来 Ochiuni 等^[11]在对结肠癌、直肠癌的研究中发现 Ang-2 不仅见于内皮细胞,而且在肿瘤细胞质内同样也可见其表达。我们用免疫组化方法观察 Ang-2 在喉鳞癌的表达,发现 Ang-2 主要定位于鳞癌细胞的胞质中,尤其是在癌灶边缘的血管重塑区,少量间质细胞如血管内皮细胞也可见其呈弱阳性表达,说明喉鳞癌中 Ang-2 可能主要由肿瘤细

胞分泌产生,并通过自分泌和旁分泌方式发生作用。本研究发现 Ang-2 在喉鳞癌癌组织中的表达要明显高于癌旁正常组织,而与分化程度和有无淋巴结转移差异无统计学意义。

目前已发现多种恶性肿瘤中 VEGF 表达增高,并认为其与肿瘤的生长、血管的新生有关^[12]。VEGF 通过与 3 种选择性表达在血管内皮细胞上的高亲和力酪氨酸受体 VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(Flt-1/KDR)和 VEGFR-3(Flt-4)结合,引起一系列的信号传导,促进内皮细胞的增殖与迁移,最终引起新生血管形成,在肿瘤的发生、发展以及转移中发挥其作用^[13]。本研究发现,VEGF 及 VEGFR-3 在喉鳞癌癌组织中的表达要明显高于癌旁正常组织,而有淋巴结转移组的表达要明显高于无淋巴结转移组,与分化程度无显著性差异,并且二者成正相关。虽然以往研究发现在成体,VEGFR-3 表达主要局限于淋巴管内皮系统;但也有研究^[14]发现 VEGFR-3 还表达于微毛细血管,甚至表达于有裂隙的、壁不连续的毛细血管的内皮细胞中。一个可能的原因是这些血管内皮细胞未分化成熟,类似于早期胚胎细胞,表达所有的 VEGFR 受体。VEGFR-3 蛋白还被发现于前列腺癌^[15]等恶性肿瘤组织中。本实验表明 VEGF 主要表达于肿瘤细胞的胞质中,VEGFR-3 主要表达于肿瘤细胞的胞核中,这可能与增加肿瘤蛋白水解酶活性(尿激酶、胶原酶等),促进间质降解有关,也可能阻碍抗原呈递细胞的成熟,具有免疫作用有关。Kukk E 等^[16]研究发现 VEGF-C 通过结合受体 VEGFR-3,使受体产生自身磷酸化,通过胞质内信号传递,使 DNA 有丝分裂增强,导致靶细胞的增殖。因此 VEGFR-3 在肿瘤细胞中的高表达可能具有促进肿瘤的增殖生长的作用。

有研究表明,Ang-2 对血管的作用与其他促血管生成因子特别是 VEGF 的存在与否密切相关^[17-18]。当 VEGF 不存在时,Ang-2 的表达主要使血管发生退化、数目减少,同时伴有内皮细胞的凋亡;而当 VEGF 存在时,Ang-2 诱导内皮细胞分裂、

移位,使新生血管呈非出芽式生长。本实验研究发现,Ang-2 于 VEGF 表达成正相关。因此,深入研究肿瘤细胞中 Ang-2、VEGF 及 VEGFR-3 的表达对今后的肿瘤治疗具有重要意义。

综上所述,Ang-2 在喉鳞癌组织中的表达明显上调并与喉鳞癌组织的血管生成密切相关,提示 Ang-2 可能通过促进血管生成而参与了肿瘤细胞增殖、浸润、转移等恶性生物学行为的调节。Ang-2 和 VEGF 有协同效应,能特异性地作用于血管内皮细胞^[18],潘立峰等^[19]研究发现 VEGF 反义 RNA 能抑制裸鼠体内食管癌细胞的生成,减少肿瘤内血管的生成,促进细胞凋亡,因此 Ang-2、VEGF 及 VEGFR-3 可作为喉鳞癌抗血管生成治疗策略中的靶向因子或直接作为抗喉鳞癌细胞的靶向因子,使抗肿瘤过程中对正常组织的损害减到最小。

参考文献:

- [1] Ogawa M, Yamamoto H. Hepatic expression of Ang-2 RNA in metastatic colorectal cancer[J]. *Hepatology*, 2004, 39(2): 528-539.
- [2] O'Reilly MS, Holugrem L, Folkman J, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma[J]. *Cell*, 1994, 79(2): 315-328.
- [3] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF[J]. *Science*, 1999, 284(5422): 1994-1998.
- [4] 刘学强, 万恒荣, 陈海生, 等. 促血管生成素在原种植肝癌组织中的表达及其意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(3): 196-198.
- [5] Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization[J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(9): 1231-1236.
- [6] 刘舒, 王绿娅, 郭恒怡, 等. 血管生成素的作用机制和功能[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(3): 273-275.
- [7] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 277(5322): 55-60.
- [8] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 242-248.
- [9] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 277(5322): 55-60.
- [10] Stratman A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(5): 1459-1466.
- [11] Ochiuni T, Tanaka S, Oka S, et al. Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24(3): 539-547.
- [12] 朱有法, 许敬尧. 大肠癌血管内皮生长因子的表达与转移的相关性研究[J]. *实用肿瘤杂志*, 2002, 17(3): 185-187.
- [13] Frelin C, Ladoux A, Dangelo G. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis[J]. *Ann Endocrinol Paris*, 2000, 61(1): 70-74.
- [14] Partanen T A, Arola J, Saaristo A, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues[J]. *FASEB J*, 2000, 14(13): 2087-2096.
- [15] Tsurusaki T, Kanada S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis[J]. *British Journal of Cancer*, 1999, 80(12): 309-313.
- [16] Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development [J]. *Development*, 1996, 122(12): 3829-3837.
- [17] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 277(5322): 55-60.
- [18] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption regression and growth in tumors mediated by angiopoietin and VEGF[J]. *Science*, 1999, 284(5422): 1994-1998.
- [19] 潘立峰, 李巧霞, 单保恩, 等. VEGF 反义 RNA 抑制裸鼠体内食管癌细胞生长的实验研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(8): 457-459.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]