

大肠癌组织中 VEGF-D、VEGFR-3 表达及淋巴管生成的相关性研究

朱建洲, 于农[△], 刘芳

(苏州高新区人民医院检验科, 江苏苏州 215129)

摘要:目的 研究大肠癌组织中血管内皮生长因子 D(VEGF-D)、VEGFR-3 表达及淋巴管生成的相关性。方法 选取该院大肠癌患者 83 例, 患者行根治术手术切除后预留新鲜的癌标本, 同时选取距离癌肿边缘 5 cm, 经病理证实无癌细胞残存的大肠组织, 测定大肠黏膜组织 VEGF-D 及 VEGFR-3 水平, 分析大肠组织 VEGF-D、VEGFR-3 的表达与淋巴管生成的关系。结果 大肠癌组织中 VEGF-D、VEGFR-3 表达水平较正常大肠黏膜组织显著较高($P < 0.05$); 肿瘤直径 < 3 cm 的大肠癌患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于肿瘤直径 ≥ 3 cm 的患者($P < 0.05$); 浸润深度未及浆膜患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于浸润浆膜及以外患者($P < 0.05$); Dukes 分期为 A+B 期患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于 C+D 期患者($P < 0.05$); VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达阳性标本其癌旁微淋巴管密度较阴性标本均显著较高($P < 0.05$)。结论 VEGF-D 可能通过其受体 VEGFR-3 促进大肠癌中淋巴管的生成, 肿瘤越大、组织浸润浆膜及以外、肿瘤分化程度越高患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平越高, 临床能通过对 VEGF-D、VEGFR-3 的检测判断大肠癌患者预后。

关键词: 大肠癌; 血管内皮生长因子 D; VEGFR-3; 淋巴管

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.08.025

中图法分类号: R735.35

文章编号: 1673-4130(2019)08-0991-04

文献标识码: A

Correlation between the expression of VEGF-D and VEGFR-3 in colorectal cancer tissues and lymphangiogenesis

ZHU Jianzhou, YU Nong[△], LIU Fang

(Department of Clinical Laboratory, Gaoxin District People's Hospital, Suzhou, Jiangsu 215129, China)

Abstract: Objective To study the correlation between the expression of vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) and VEGFR-3 in colorectal cancer tissues and lymphangiogenesis. **Methods** 83 patients with colorectal cancer in the hospital were selected. The fresh cancer specimens of patients were collected after radical resection, and the colorectal tissues without cancer cells confirmed by pathology and at 5cm far from the tumor edge were collected at the same time. The levels of VEGF-D and VEGFR-3 in colorectal mucosa tissues were detected and the relationship between the expression of VEGF-D and VEGFR-3 in colorectal tissues and lymphangiogenesis was analyzed. **Results** The expression of VEGF-D and VEGFR-3 in colorectal cancer tissues was significantly higher than normal colorectal mucosa tissues ($P < 0.05$). The levels of VEGF-D and VEGFR-3 in patients with tumors < 3 cm were significantly lower than patients with tumors ≥ 3 cm ($P < 0.05$). The levels of VEGF-D and VEGFR-3 in patients without depth of invasion to serosa were significantly lower than patients with serosa and beyond invasion ($P < 0.05$). The levels of VEGF-D and VEGFR-3 in patients in Dukes stage A+B were significantly lower than patients in Dukes stage C+D ($P < 0.05$). The adjacent lymphatic microvessel density in specimens with positive expression of VEGF-D and VEGFR-3 were significantly higher than negative specimens ($P < 0.05$). **Conclusion** VEGF-D may promote lymphangiogenesis in colorectal cancer through its receptor VEGFR-3. The larger tumors are, the deeper tissue infiltration is and the higher tumor differentiation is, the higher levels of VEGF-D and VEGFR-3 are. The detection of VEGF-D and VEGFR-3 can be used to predict the prognosis of patients.

Key words: colorectal cancer; vascular endothelial growth factor D; VEGFR-3; lymph vessel

随着人们生活水平提高、饮食结构的变化, 我国大肠癌的发病率逐渐升高, 严重威胁着人们的生命健康^[1]。目前已经研究发现, 淋巴转移是影响大肠癌患

者预后的一个主要因素, 淋巴管可作为癌细胞转移和扩散的主要通道, 肿瘤微转移, 特别是淋巴结微转移逐渐受到临床重视^[2-3]。随着现代生物学和免疫学检

作者简介: 朱建洲, 男, 副主任技师, 主要从事临床生物化学诊断工作。 [△] 通信作者, E-mail: yunong78162@sina.com。

本文引用格式: 朱建洲, 于农, 刘芳. 大肠癌组织中 VEGF-D、VEGFR-3 表达及淋巴管生成的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(8):

测技术的发展,最新研究发现,血管内皮生长因子 D (VEGF-D)及其受体 VEGFR-3 的表达与淋巴管的生成密切相关,探讨 VEGF-D、VEGFR-3 与临床病理参数的关系,研究影响大肠癌淋巴管生成及转移的机制,对大肠癌临床分析、预后判断以及抗癌方法的制定都有着重要的意义^[4-5]。因此本次研究特选取本院大肠癌患者 83 例,分别取其癌标本和癌旁大肠组织,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2014 年 8 月至 2016 年 8 月收治的大肠癌患者 83 例,其中男 58 例,女 25 例,年龄 47~79 岁,平均(63.17±14.68)岁;结肠癌 39 例,直肠癌 46 例;肿瘤直径为 1~12 cm,平均(6.57±4.29)cm;溃疡性生长 37 例,浸润型生长 33 例,肿块型生长 13 例;高分化 17 例,中分化 47 例,低分化 19 例;根据 Dukes 分期:A 期 19 例,B 期 21 例,C 期 32 例,D 期 11 例。纳入标准:(1)经肠镜检查确诊为大肠癌;(2)无消化性溃疡以及胃肠道手术病史;(3)手术前均未进行任何治疗;(4)患者对本次研究知情并签署知情同意书。排除标准:(1)术前进行过化疗治疗者;(2)不适宜进行手术者。

1.2 方法 每例大肠标本取大肠癌组织及距离癌肿边缘 5 cm,经病理证实无癌细胞残存的正常肠组织 1 块,所有标本在肿瘤切下后 1 h 内置于液氮中保存。应用流式细胞术与免疫组化法对大肠癌组织和正常组织中的 VEGF-D、VEGFR-3 的表达进行检测,VEGF-D、VEGFR-3 抗体均购自武汉博士德生物技术有限公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。(1)流式细胞检测:选取待测的新鲜组织约 30 g,用剪刀将组织剪碎,用镊子将组织物在 120 目锈钢网上轻轻搓动,收集搓完后组织,制成 1×10⁶ 个/mL 的单细胞原液,取出 1 mL 原液分别加入 VEGF-D、VEGFR-3 抗体,操作步骤严格按照说明书进行。(2)免疫组化法:根据试剂盒说明滴加一抗 VEGF-D、VEGFR-3 和生物素化二抗及试剂 SABC,用 DBA 显色,苏木素复染,中性树脂封片待检。每张

切片观察 10 个高倍视野,以细胞中有棕黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色为阳性细胞。

1.3 观察指标 (1)采用美国 BD 公司生产的流式细胞仪测定 VEGF-D、VEGFR-3 水平,以荧光指数(FI)表达 VEGF-D、VEGFR-3 的相对含量,计算公式:FI=蛋白表达的平均荧光强度-对照样品平均荧光强度/正常对照样品平均荧光强度。(2)微血管计数在盲法下进行,每张切片由两名病理医师分别进行计数,微血管密度(MVD)的计数根据淋巴管淋巴管内透明质酸受体-1(LYVE-1)、同源异型核转录因子(Prox-1)染色结果判断,LYVE-1、Prox-1 阳性的管腔视为淋巴管,先于低倍镜(40 倍和 100 倍)下确定 3 个脉管着色最为密集的区域,然后改为 200 倍视野下计数淋巴管或微血管数目,每例计数 5 个视野,取其均值作为该病例的微淋巴管密度和微血管密度。正常大肠组织选择阳性染色脉管最丰富的区域,在 200 倍视野下分别计算淋巴管和微血管数目,计数 5 个视野,最后取其均值。LYVE-1、Prox-1 的检测分别应用山羊抗人 LYVE-1 单克隆抗体和山羊抗人 Prox-1 单克隆抗体进行免疫组织化学染色。

1.4 统计学处理 选用统计学软件 SPSS19.0 对研究数据进行分析和处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF-D、VEGFR-3 在大肠癌、正常肠组织中的表达 大肠癌组织中 VEGF-D、VEGFR-3 表达水平较正常大肠黏膜组织显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 VEGF-D、VEGFR-3 在大肠癌、正常肠组织中的表达

组织类型	<i>n</i>	VEGF-D	VEGFR-3
大肠癌组织	83	1.53±0.21	1.35±0.28
正常大肠黏膜组织	83	1.03±0.19	1.06±0.24
<i>t</i>		16.085	7.164
<i>P</i>		0.001	0.001

表 2 VEGF-D、VEGFR-3 的表达与大肠癌临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	VEGF-D	<i>t</i>	<i>P</i>	VEGFR-3	<i>t</i>	<i>P</i>
肿瘤大小	<3 cm	39	1.26±0.24	7.141	1.32±0.26	3.306	0.001
	≥3 cm	44	1.57±0.15				
浸润深度	未及浆膜	46	1.32±0.21	4.723	1.32±0.20	3.313	0.001
	浆膜及以外	37	1.53±0.19				
Dukes 分期	A+B	40	1.33±0.24	4.128	1.32±0.24	2.970	0.003
	C+D	43	1.51±0.15				

2.2 VEGF-D、VEGFR-3 的表达与大肠癌临床病理特征的关系 肿瘤直径<3 cm 的大肠癌患者 VEGF-

D、VEGFR-3 水平均显著低于肿瘤直径≥3 cm 的患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);浸润深度未及浆膜

患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于浸润浆膜及以外患者,差异有统计学意义($P < 0.05$);Dukes 分期为 A+B 期患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于 C+D 期患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 微淋巴管密度与 VEGF-D、VEGFR-3 表达的关系 VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达阳性标本其癌旁微淋巴管密度较阴性标本均显著较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 微淋巴管密度与 VEGF-D、VEGFR-3 表达的关系

指标	VEGF-D 蛋白表达		VEGFR-3 蛋白表达	
	阳性 (n=46)	阴性 (n=37)	阳性 (n=36)	阴性 (n=47)
微淋巴管密度	10.55±2.47	8.57±3.04	11.32±2.26	8.79±2.62
t	3.275		4.721	
P	0.001		0.001	

3 讨论

近年来,我国大肠癌的发病率呈逐年上升趋势,严重危害着人们的生命健康。浸润与转移是恶性肿瘤重要的生物学特性,随着研究的深入人们发现,淋巴转移是导致癌细胞发生转移的主要途径^[6-7]。正常的大肠组织的毛细血管管腔较小,且数量较少,而恶性肿瘤周边的淋巴管密度会显著增加,淋巴转移提示着肿瘤的发展,而淋巴管腔的生成是受淋巴管生成因子以及其受体介导和调控的,对淋巴管生成因子及其受体的表达进行探究,对大肠癌患者预后的判断有着重要意义^[8-9]。血管内皮生长因子(VEGF)是内皮细胞中具有特异性的有丝分裂原,具有明显的促进某些内皮细胞有丝分裂的作用,特别是促进血管的生成^[10]。VEGF-D 属于 VEGF,是一种重要的淋巴管生成因子,可以作用于淋巴管内皮细胞上与其受体 VEGFR-3 结合并激活,促进淋巴管内皮细胞的增殖和淋巴管的生成,调控血管以及淋巴管内皮细胞的新生,在肿瘤的生长和转移方面起着重要的作用^[11-12]。VEGFR-3 是一种受体酪氨酸激酶,广泛分布于早期的胚胎血管内细胞上,在胚胎发育后期以及正常的成体中,VEGFR-3 只特异性表达在淋巴管内皮细胞中,处于相对静止的状态,而一旦机体发生炎症反应或有肿瘤生成,VEGFR-3 便会再次被激活与其配体结合,诱导内皮细胞的增殖与迁移^[13-14]。

赵云霞等^[15]研究者认为,在恶性肿瘤组织中 VEGF-D 的表达诱导会使 VEGFR-3 水平上升,并激发 VEGFR-3 活化,活化后的 VEGFR-3 介导的信号转导通路会促使淋巴管生成,导致癌细胞的浸润和转移。通过本次研究发现,大肠癌组织中 VEGF-D、VEGFR-3 表达水平较正常大肠黏膜组织显著较高,这说明 VEGF-D 的高表达与大肠癌的生长、转移有关,VEGF-D、VEGFR-3 表达的升高能反应肿瘤预后

情况,能继续促进淋巴管内皮的生长。肿瘤直径 < 3 cm 的大肠癌患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于肿瘤直径 ≥ 3 cm 的患者,浸润深度未及浆膜患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于浸润浆膜及以外患者,Dukes 分期为 A+B 期患者 VEGF-D、VEGFR-3 水平均显著低于 C+D 期患者,VEGF-D、VEGFR-3 的表达能反应大肠癌临床病理特征,提示 VEGF-D、VEGFR-3 参与到了肿瘤的生长、浸润与转移。VEGF-D 与 VEGFR-3 相结合,诱导肿瘤内以及肿瘤周边淋巴管的增生,淋巴管的表面积以及通透性增加,趋化肿瘤细胞进入到淋巴管内,肿瘤细胞通过间质液流动运转至淋巴管中,最终发生淋巴转移^[16-17]。VEGF-D、VEGFR-3 蛋白表达阳性标本其癌旁微淋巴管密度较阴性标本均显著较高,VEGFR-3 与 VEGF-D 结合后发生磷酸化,使多条细胞内信号传导通路被激活,淋巴内皮细胞发生增殖分化,新生的淋巴管尚且缺乏连续的基底膜,内皮细胞间的连接较为疏松,且间隙较大,而肿瘤内的淋巴管较为密集,随着肿瘤的生长,瘤间质渗出物的增加,逐渐向周围毛细淋巴管扩张,因此肿瘤周边的淋巴管密度较正常组织更为密集。

4 结论

在大肠癌发生发展过程中,VEGF-D、VEGFR-3 发挥了一定作用。大肠癌中 VEGF-D、VEGFR-3 可能与肿瘤周边淋巴管生成相关,其表达上升诱导淋巴管生成。可将 VEGF-D、VEGFR-3 作为评估大肠癌淋巴结转移、淋巴管浸润能力的辅助指标。

参考文献

- [1] 刘盛楠,刘瑞,范婷婷,等. 结直肠癌的诊断和治疗研究进展[J]. 山东医药,2017,57(40):110-112.
- [2] 肖世尧,杨文斌,杨恒. 结肠癌 Prox-1 表达与淋巴管密度的关系及其临床意义[J]. 空军医学杂志,2015,31(2):83-85.
- [3] 曾子杰,刘秀峰,谢佳云. 大肠癌术后淋巴结转移高危因素的预测[J]. 中国老年学杂志,2016,36(14):3452-3454.
- [4] KAZAKYDASAN S, RAHMAN Z A, ISMAIL S M, et al. Prognostic significance of VEGF-C in predicting micrometastasis and isolated tumour cells in N0 oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med,2017,46(3):194-200.
- [5] 黄静,李燕萍,薛刚,等. 血清 VEGF-C、VEGF-D 及 VEGFR-3 联合 TSH 检测在甲状腺乳头状癌诊断中的价值[J]. 南方医科大学学报,2014,34(12):1814-1817.
- [6] 李铭强. 淋巴结大小对结肠癌淋巴结分期的预测价值[J]. 广东医学,2016,37(1):148-150.
- [7] 曾子杰,刘秀峰,谢佳云. 大肠癌术后淋巴结转移高危因素的预测[J]. 中国老年学杂志,2016,36(14):3452-3454.
- [8] BENLAHFID M, TRABOULSI W, SERGENT F, et al. Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) and its receptor PROKR2(下转第 998 页)

- and protection against atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220 (1): 110-117.
- [12] WASSEL C L, BERARDI C, PANKOW J S, et al. Soluble P-selectin predicts lower extremity peripheral artery disease incidence and change in the ankle brachial index; the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (Mesa) [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(2): 405-411.
- [13] ANTONOPOULOS C N, SFYROERAS G S, KAKISIS J D, et al. The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(1): 17-24.
- [14] NEUBAUER H, SETIADI P, GUENESDOGAN B, et al. Influence of glycaemic control on platelet bound CD40-CD40L system, P-selectin and soluble CD40 ligand in Type 2 diabetes [J]. *Diabetic Medicine*, 2010, 27(4): 384-390.
- [15] CARVALHO A C, SOUSA R B, FRANCO A X, et al. Protective effects of fucoidan, a P- and L-Selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2014, 43 (1): 82-87.
- [16] 苏菲亚, 王静. 2 型糖尿病合并急性脑梗死患者血清 P-选择素水平及血栓弹力图指标的变化 [J]. *山东医药*, 2018, 58(1): 75-77.
- [17] GOKULAKRISHNAN K, DEEPA R, MOHAN V, et al. Soluble P-selectin and CD40L levels in subjects with pre-diabetes, diabetes mellitus, and metabolic syndrome -the Chennai Urban Rural Epidemiology Study [J]. *Metabolism*, 2006, 55(2): 237-242.
- [18] JANI P K, SCHWANER E, KAJDFICSI E, et al. Complement MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating E-selectin expression [J]. *Mol Immunol*, 2016(75): 38-47.
- [19] ÇAKAR M, BALTA S, SARLAK H, et al. Arterial stiffness and endothelial inflammation in prediabetes and newly diagnosed diabetes patients [J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2015, 59(5): 407-413.
- [20] ALJWAID H, WHITE D L, COLLARD K J, et al. Non-transferrin-bound Iron is associated with biomarkers of oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction in type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29 (7): 943-949.
- [21] MATSUMOTO K, SERA Y, UEKI Y, et al. Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetic microangiopathy and macroangiopathy [J]. *Diabet Med*, 2002, 19(10): 822-826.
- [22] TAILOR A, GMNGER D N. Role of adhesion molecules in vascular regulation and damage [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2000, 2(1): 78-83.
- [23] 薛晓辉, 马庆祥. 血清 VEGF 与 SE-选择素在糖尿病视网膜病变患者中的表达及意义 [J]. *陕西医学杂志*, 2016, 45 (10): 1316-1320.
- [24] SHESTAKOVA M V, KOCHMASOVA T V, GORELYSHEVA V A, et al. The role of adhesion molecules (ICAM-1 and E-selectin) in development of diabetic microangiopathies [J]. *Ter Arkh*, 2002, 74(6): 24-27.

(收稿日期: 2018-10-02 修回日期: 2018-12-28)

(上接第 993 页)

- are associated to human colorectal cancer progression and peritoneal carcinomatosis [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 21 (2): 1-10.
- [9] 卢壁辉, 黄壮生. MMP-7、VEGF-C 和 VEGFR-3 在结肠癌组织中的表达及相关性 [J]. *广东医学*, 2015, 36(6): 878-880.
- [10] 刘颖蕾, 乔海风, 周峰, 等. VEGF-C、VEGF-D mRNA 及 D2-40 在宫颈癌中表达的临床意义 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2015, 16(1): 22-25.
- [11] 张伟, 任风云, 金丹, 等. 血管内皮生长因子-D 表达与非小细胞肺癌淋巴管生成和淋巴结转移的相关性 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(11): 2917-2920.
- [12] GARCÍA-CABALLERO M, BLACHER S, PAUPERT J, et al. Novel application assigned to toluquinol; inhibition of lymphangiogenesis by interfering with VEGF-C/VEGFR-3 signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173 (12): 1966-1987.
- [13] 樊善继, 徐海帆, 胡泽成, 等. 大肠癌患者组织多项基质金属蛋白、VEGF-C、VEGF-D、Ets-1、CD44v6 及 VEGFR-3 的变化 [J]. *海南医学院学报*, 2014, 20(2): 177-179.
- [14] AL-SHAREEF H, HIRAOKA SI, TANAKA N, et al. Use of NR1P1, a novel biomarker, along with VEGF-C, VEGFR-3, CCR7 and SEMA3E, to predict lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2444-2454.
- [15] 赵云霞, 马琳, 蔡兆根. 乳腺癌中 VEGF-D/VEGFR-3 与淋巴管生成的关系及临床意义探讨 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2015, 24(1): 85-89.
- [16] 刘昕, 马洁, 刘骞, 等. 腹腔镜直肠癌根治术的淋巴结检出数目影响因素分析 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2016, 38(12): 915-919.
- [17] 苏燕燕, 杨翀董, 兵孔颖, 等. 右半结肠癌小淋巴结的检出及对病理分期的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41 (10): 879-880.

(收稿日期: 2018-10-11 修回日期: 2019-01-18)