

MVD及 VEGF表达与鼻咽癌侵袭转移关系的研究

MVD and the Expression of VEGF Correlate with Invasion and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma

李杰恩 黄光武 唐安洲 徐志文 周永 谭颂华

Li Jie'en Huang Guangwu Tang Anzhou Xu Zhiwen Zhou Yong Tan Songhua

(广西医科大学第一附属医院耳鼻喉科 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital,

Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要 为探讨微血管密度 (MVD) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达与鼻咽癌 (NPC) 侵袭转移关系, 在分子水平干预肿瘤血管生成, 预防 NPC 复发和转移打下基础, 采用免疫组织化学 S-P 法检测了 73 例 NPC 15 例鼻咽良性肿瘤、20 例无瘤鼻咽部石蜡标本组织中的 MVD 及 VEGF 表达, NPC 中转移组 49 例, 非转移组 24 例。结果: NPC 组织的 MVD 及 VEGF 表达显著高于鼻咽良性肿瘤组织及无瘤鼻咽组织的表达 (P 均 < 0.01), 转移组又较非转移组的表达高 (P 均 < 0.05); MVD 及 VEGF 的表达与临床分期相关。结论 NPC 组织的 MVD 及 VEGF 有可能作为判断肿瘤生物学行为、转移潜能及预后指标, 对采用血管生成抑制剂防止 NPC 转移有参考价值。

关键词 鼻咽肿瘤 血管内皮生长因子 血管生成 肿瘤转移

中图法分类号 R 739.6; R 730.231

Abstract To study the relationship between microvessel density (MVD) and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma (NPC), explore new approaches to prevent NPC from recurrence and metastasis by inhibiting tumors angiogenesis on the molecule level. MVD and the expression of VEGF were detected using immunohistochemical S-P staining in Paraffin-embedded specimens include 73 patients with NPC and 15 benign nasopharyngeal tumors, 20 tumor-free nasopharyngeal mucosac, MVD and the expression of VEGF in NPC were higher than that of benign nasopharyngeal tumors and tumor-free mucosac (all $P < 0.01$), metastatic carcinomas higher than nonmetastatic carcinomas (all $P < 0.05$). The expressions of VEGF and MVD were related to the clinical staging. MVD and expression of VEGF may serve as a parameter for determining tumor biological metastatic potential and prognosis. Angiogenesis inhibitors might be helpful in preventing NPC from metastasis.

Key words nasopharyngeal neoplasms, vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenesis, neoplasms invasion and metastasis

恶性肿瘤的生长、浸润及转移过程受到多种因素的影响。近来研究表明肿瘤诱导的血管生成反应与肿瘤的生长、浸润及转移密切相关^[1], 为探讨 NPC 血管生成与癌生物学行为的关系, 本研究采用免疫组织化学方法检测了 73 例 NPC 石蜡标本组织的微血管密度 (Microvessel density MVD) 及血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达, 探讨其与 NPC 侵袭转移关系, 为在分子水平干预肿瘤血管形成, 预防 NPC 复发和转移打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

以 73 例 NPC 患者的临床资料及瘤体活检组织的福尔马林固定、石蜡包埋标本为实验组, 男 42 例, 女 31 例, 年龄 25 岁~73 岁, 平均 43 岁。其中低分化鳞癌 63 例, 鳞癌 II 级 4 例, 腺癌 2 例, 泡状核细胞癌 4 例。临床分期 I 期 5 例, II 期 24 例, III 期 28 例, IV 期 16 例。另以鼻咽部良性肿瘤 15 例 (鼻咽纤维血管瘤 4 例, 乳头状瘤 3 例, 脊索瘤 3 例, 纤维瘤 3 例, 混合瘤 2 例), 鼻咽粘膜慢性炎症 20 例 (无瘤鼻咽组织) 蜡块标本作对照组。NPC 组分转移组及非

转移组: 转移组 49例(其中远处转移 7例),男 30例,女 19例,年龄 25岁~73岁,平均 48岁;非转移组 24例,男 14例,女 10例,年龄 25岁~70岁,平均 39岁。

1.2 试剂

兔抗人第 8因子相关抗原 (F8-RA) 抗体 (ZA-0111),兔抗人 VEGF抗体 (SC-507),S-P免疫组化试剂盒等 购自北京中山公司

1.3 染色

采用免疫组化 S-P法 VEGF染色时进行微波抗原修复, F8-RA染色时进行胰酶消化。VEGF及 F8-RA工作浓度均为 1:50 每次染色过程中,用 PBS代替每一种一抗处理切片作为阴性照片。苏木素复染、水洗、反蓝、烤干、中性树胶封片。

1.4 结果判断

(1) VEGF阳性标准及阳性分级: VEGF阳性细胞的细胞浆染色棕黄色。每张切片选择 4个区在 400× 倍视野下连续计数 100个肿瘤细胞,以组织中阳性细胞数比值,将其分为四级: 阴性: 无阳性细胞; I级: 阳性细胞数 1%~60%; II级: 阳性细胞数 61%~80%; III级: 阳性细胞数 > 80%。

(2) 微血管判断标准及计数方法参照文献 [1] 计数时光镜下先以放大 100倍视野选择 4个微血管染色最丰富区(即所谓新生血管热点区),然后在 400倍视野下计数每一热点区中一个视野内的微血管数,取最高值列入分析。

1.5 数据处理

使用 PEMS (华西医科大学统计学教研室) 统计软件包对数据进行统计学处理, X^2 , t , t' 检验及等级相关分析

2 结果

2.1 VEGF的表达情况

NPC组织染色阳性率为 80.82% (59/73) (转移组 93.8% (46/49), 其中 I级 11例, II级 17例, III级 21例; 非转移组 54.1% (13/24), 其中 I级 13例, II级 8例, III级 3例)。良性肿瘤 40% (6/15), 见图 1 无瘤鼻咽组织为 10% (2/20) NPC组织中 VEGF表达显著高于鼻咽良性肿瘤及无瘤鼻咽组织者 ($P < 0.01$); 转移组又较未转移组高 ($P < 0.05$); 远处转移者又较局部淋巴结转移者高 ($P < 0.05$) 鼻咽良性肿瘤表达高于无瘤鼻咽组织 ($P < 0.05$)。VEGF在 T₁、T₂、T₃ 及 T₄ 期之间的表达程度亦有差异 ($P < 0.05$)。 (表 1 表 2)

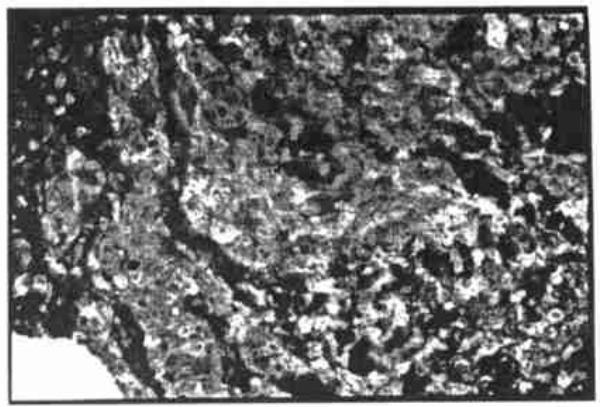


图 1 NPC组织的 VEGF表达 S-P× 200

Fig. 1 VEGF expression in NPC by S-P× 200

表 1 3组组织 VEGF表达

Table 1 VEGF expression in NPC, benign nasopharyngeal tumors and tumor-free mucosac

组别 Group	+	-	阳性率 Positive rate (%)
a 无瘤 NPC组织 Tumor-free mucosac	2	18	10
b 鼻咽良性肿瘤 Benign tumors	6	9	40
c NPC	59	14	80.82

b 与 a 比较 $P < 0.05$; c 与 a b 比较 $P < 0.01$ b Compared with a, $P < 0.05$; c Compared with a b all $P < 0.01$.

表 2 转移组和非转移组 VEGF表达 (t' 检验)

Table 2 VEGF expression in metastatic tumors and nonmetastatic tumors (t' test)

组别 Group	n	$\bar{x} \pm s$
a. 转移组 Metastatic tumors	49	2.33 ± 0.89
c. 局部转移 Local metastasis	42	2.24 ± 0.72
d. 远处转移 Distant metastasis	7	2.86 ± 0.15
b. 非转移组 Nonmetastatic tumors	24	1.34 ± 0.75

a 与 b 比较, $P < 0.01$; c 与 d 比较, $P < 0.05$ a Compared with b, $P < 0.01$; c Compared with d, $P < 0.05$.

2.2 MVD计数情况

NPC组织中微血管分布不均, 主要集中于癌间质区, 癌巢内极少 (图 2) NPC组织 MVD明显高于鼻咽良性肿瘤及无瘤鼻咽组织 (P 均 < 0.01), 转移组较未转移组高 ($P < 0.01$); 远处转移者又较局部淋巴结转移者高 ($P < 0.05$)。鼻咽良性肿瘤组织中 MVD较无瘤鼻咽组织者高 ($P < 0.05$) (表 3 表 4)

2.3 临床分期的 VEGF MVD比较

I、II 期 (早期) 分别与 III、IV 期 (进展期) 比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$); 而 I 期与 II 期, III 期与 IV 期之间差异无显著性 ($P > 0.05$)

表 3 3组组织中 MVD表达的比较 (Wilcoxon法)

Table 3 MVD in NPC, benign nasopharyngeal tumors and tumor-free mucosac (Wilcoxon)

组别 Group	例数 Case	$x \pm s$
a. 无瘤 NPC组织 Tumor-free mucosac	20	2.63 ± 0.96
b. NPC良性肿瘤 Benign tumors NP	15	5.30 ± 1.98
c. NPC	73	14.58 ± 4.78

a 与 b比较, $P < 0.05$, 与 c比较, $P < 0.01$; b 与 c比较 $P < 0.01$

a Compared with b, $P < 0.05$, Compared with c, $P < 0.01$, b

Compared with c, $P < 0.01$

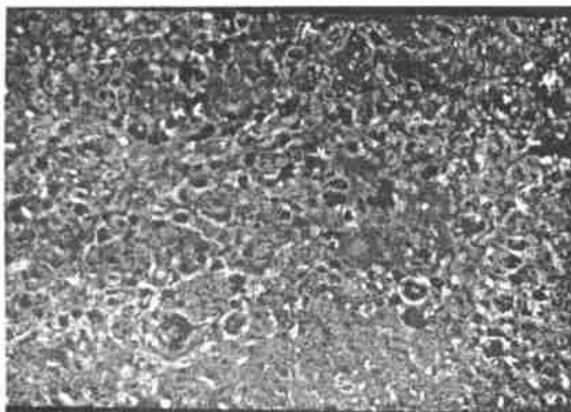


图 2 NPC组织的 MVD S-P × 200

Fig. 2 MVD in VPC by S-P at × 200

表 4 转移组和非转移组 MVD表达的比较 (t' 检验)

Table 4 MVD in metastatic tumors and nonmetastatic tumors (t' test)

组别 Group	例数 Case	$x \pm s$
a. 转移组 Metastatic tumors	49	17.0 ± 4.67
c. 局部转移 Local metastasis	42	16.07 ± 3.91
d. 远处转移 Distant metastasis	7	22.53 ± 5.15
b. 非转移组 Nonmetastatic tumors	24	10.33 ± 3.16

a 与 b比较, $P < 0.01$; c 与 d比较, $P < 0.05$ a Compared with

b, $P < 0.01$; c Compared with d, $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤的浸润和转移是影响预后的主要因素。但其确切机制尚未明了。近来研究表明,肿瘤诱导的血管生成反应与肿瘤的生长、浸润及转移密切相关。原发肿瘤生长需要有新的血管生成,同样,转移灶要继续生长也要有新的血管生成^[2,3]。如能抑制或破坏这些新生血管就可以防止肿瘤的发展和转移。因此,寻找毒性低,效果好的血管生长抑制剂是近来肿瘤研究的新热点。

血管生成是指原于已存在的毛细血管和毛细血管后微静脉的新的毛细血管性血管的生长。有研究表

明 VEGF是诱导肿瘤血管发生的重要调节因素,在血管的发生中起着重要的作用,与肿瘤的侵袭转移有关^[3-6]。本研究发现,NPC组织的 VEGF及 MVD明显高于正常鼻咽粘膜组织,而进展期较早期高,VEGF与 MVD呈正相关,说明 VEGF是 NPC血管生成的重要因子,并通过促进血管生成影响患者的预后。本研究的结果还显示,VEGF在 T₁、T₂、T₃及 T₄期 NPC病人中的表达程度随病情的发展而逐渐升高,合并淋巴结或远处转移者明显升高,表明当 NPC快速增殖生长时,肿瘤血管形成相对迟缓,局部组织缺氧引起癌细胞分泌 VEGF增加,刺激血管发生以改善局部血供。本组病例有 7例就诊时即出现远处转移,其中 4例为 T₃期以下,说明肿瘤诱发的新生血管结构功能异常是肿瘤发生远处转移的重要原因。

NPC瘤内微血管密度增高引起淋巴结转移的机制尚未有学者阐述,但已有研究表明血管生成与淋巴结转移增加有关^[1,7],以及淋巴管形成有关^[2]。尽管淋巴结转移的发生被认为是通过淋巴管进行的,但其发生也是系统转移的征象^[8],涉及血管生成所导致的血液中运行癌细胞的协同作用。新的血管生成后,癌细胞迅速增殖,肿瘤前缘的癌细胞侵犯原发部位间质残存的淋巴管而发生淋巴结转移^[9]。我们的研究发现,NPC淋巴结转移组的 MVD较非转移组高,表明 VEGF诱导的血管生成在 NPC的发生发展及转移过程中起重要作用,并可作为判定肿瘤转移潜能及预后的指标。

通过对 NPC组织、鼻咽良性肿瘤及无瘤鼻咽组织的 VEGF和 MVD检测,我们发现 NPC组织 MVD及 VEGF表达与其癌生物学行为密切相关,有可能作为判定肿瘤生物学行为、转移潜能及预后的指标,有助于预测 NPC转移的高危患者,并为采用血管生成抑制剂防止 NPC复发转移提供参考。

参考文献

- 1 Bosan S, Delellis RA, Healtley GJ. Microvessel quantition and prognosis in invasive breast carcinoma. Hum Pathol, 1992, 23 (4): 755~ 761.
- 2 Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD et al.. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis and proliferation of Human colon cancer. Cancer Res 1995, 55 (9): 3964~ 3968.
- 3 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 1990, 82 (1): 4~ 6

(下转第 74页 Continue on page 74)

细胞贴壁的作用,但培养到第 2 天,已粘附的细胞大部分脱落;珠核表面变得非常光滑,这可能与蛋白质物质被细胞分解融化有关。刘汀等在珍珠囊的预培育中也发现虽然鼠尾胶原对细胞悬液具贴附作用,但随着培养时间的延长会失去贴壁能力^[8]。而多聚赖氨酸和 SM 物质对细胞的粘附作用一直能持续到进行插囊育珠。一方面可能因为粘附的细胞不能消化分解这类物质,另一方面同这类物质本身的结构特性有关。

在体外培养珍珠囊最重要地是建立完整的珍珠囊结构。由于目前尚无法精确地分离外套膜组织中的各类细胞,特别是外上皮细胞、内上皮细胞和结缔组织细胞三类细胞,因此无法按比例在体外建立珍珠囊。其结果是虽然有不少细胞粘附在珠核上,但细胞之间无法建立应有的连接,不能形成结构完整的珍珠囊。相反,用外套膜组织块贴附在珠核上进行培养,外套膜组织建立体外珍珠囊的过程同体内建立珍珠囊的过程基本上是一致的,外上皮细胞从外套膜组织块中迁出,沿着珠核的表面移动,逐渐包裹珠核表面,同时外套膜组织中的结缔组织细胞再包裹在外上皮细胞表面,最终形成结构较完整的珍珠囊,这种珍珠囊是真正意义上的珍珠囊。

我们在几年的插囊育珠中得出的一个共同的结果:用外套膜组织的细胞悬液形成的体外珍珠囊用于插囊育珠无法得到珍珠,而将外套膜组织块形成的体外珍珠囊用于插囊育珠能够得到珍珠。说明,细胞悬液所形成的珍珠囊还不是完善的珍珠囊,而由外套膜组织块形成的珍珠囊才具有完整的结构和功能。

用外套膜组织块形成的体外珍珠囊用于插囊育珠实验中往往出现成珠率低、素珠多和育珠贝死亡率高。这同插核技术无不相关。切口的大小及珠核通过切口运至预定核位的方式直接影响到体外珍珠囊的

结构变化。若体外珍珠囊在珠核上贴附不牢固、切口过小,就会造成体外珍珠囊受到破坏,使它们在到达预定核位之前完全脱落,无法产生珍珠,只能是素珠,而保持完整结构珍珠囊的珠核最终产生珍珠。我们在 1999 年的实验中,改进了插核技术,切口变大,扩大输送通道,使成珠率明显提高。我们取得的部分成功说明,插囊育珠的方式和设想是可行的,但真正用于生产还需要做大量的基础工作。

参考文献

- 1 王爱民,苏琼,阎冰等. 马氏珠母贝外套膜组织培养条件和方法初探. 广西科学院学报, 1995, 11 (3-4): 17~22.
- 2 鄂征. 组织培养技术. 第 2 版,北京:人民卫生出版社, 1988. 55~91.
- 3 Farris V K. Molluscan cell dissociation and reaggregation. Science, 160: 1245~1246.
- 4 杜晓东,何海平,吴熙载. 皱纹冠蚌珍珠囊发育的研究. 水生生物学报, 1991, 15 (3): 227~233.
- 5 Machii A. Histological studies on the pearl-sac formation. Bull. Natn. Pearl Res. Lab., 1968, 13: 1489~1539.
- 6 Awaji M, Suzuki T. The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster. Fisheries Science, 1995, 61 (5): 747~751.
- 7 胡曦璇,石安静. 珍珠囊研究概况. 水生生物学报, 1994, 18 (1): 76~81.
- 8 刘汀,沈亦平,郑俊英等. 合浦珠母贝 (*Pinctada martensii* Dunker) 珍珠囊体外预培育的初步研究. 武汉大学学报 (自然科学版), 1997, 43 (6): 802~804.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 66 页 Continue from page 66)

- 4 Koch AE, Harlow LA, Haines GK et al.. Vascular endothelial growth factor, a cytokine modulating endothelial function in Rheumatoid arthritis. J Immunol, 1994; 152 (8): 4149~4156.
- 5 Maeda K, Chung Y, Ogawa Y et al.. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer, 1996; 77 (5): 858~863.
- 6 Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R et al.. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clin Invest, 1989; 84 (5): 1470~1478.
- 7 Roychowdhury PF, Tseng A, Fu KK et al.. New

prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma tumor angiogenesis and C-erb B2 expression. Cancer, 1996, 77 (8): 1419~1426.

- 8 Horak ER, Leek R, Klenk N et al.. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast Cancer. Lancet, 1992, 340 (8828): 1120~1124.
- 9 Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P et al.. Tumor microvessel density, P53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. J Clin Oncol. 1994, 12 (2): 454~457.

(责任编辑: 蒋汉明)