

血管内皮生长因子-C 在分化型甲状腺癌的表达及意义

刘 柳,沈美萍*,马 晔

(南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)蛋白在分化型甲状腺癌组织中的表达及与临床病理特征的关系及意义。方法:应用免疫组化 SP 法检测 50 例甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)、50 例甲状腺滤泡状癌(follicular thyroid cancer, FTC)和 20 例正常甲状腺(NT)组织 VEGF-C 蛋白的表达。结果:VEGF-C 在 PTC、FTC、NT 组织的表达不一,阳性率分别为 48.0%、24.0%、10.0%($P < 0.05$);PTC 组织的 VEGF-C 阳性率在淋巴结转移组为 85.7%,高于无转移组的 40.0%及骨或肺转移组的 50.0%($P < 0.05$);FTC 组织的 VEGF-C 阳性率在淋巴结转移组为 57.1%,高于无转移组的 17.1%及骨或肺转移组的 25.0%($P < 0.05$);PTC 与 FTC 组织的 VEGF-C 表达差异主要存在于无转移及骨或肺转移组($P < 0.05$)。结论:VEGF-C 与分化型甲状腺癌的淋巴结转移密切相关,在分化型甲状腺癌的淋巴道转移中起着重要的作用。PTC 组织 VEGF-C 表达明显高于 FTC 组织,可以解释两者不同的淋巴结侵犯倾向。分化型甲状腺癌组织 VEGF-C 高表达可能可以预测其淋巴结转移。

[关键词] 分化型甲状腺癌;甲状腺乳头状癌;甲状腺滤泡状癌;血管内皮生长因子 C;淋巴结转移

[中图分类号] Q786;R736.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-686-04

Expression and significance of VEGF-C in differentiated thyroid cancer

LIU Liu, SHEN Mei-ping*, MA Ye

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate protein expression and significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in differentiated thyroid cancer (DTC) and its relationship with clinicopathologic features. **Methods:** The expression of VEGF-C in 50 papillary thyroid cancer (PTC), 50 follicular thyroid cancer (FTC) and 20 normal thyroid (NT) tissue specimens were detected by SP immunohistochemistry. **Results:** The positive rates of VEGF-C in PTC, FTC and NT tissues were significantly different (48.0% vs 24.0% vs 10.0%, $P < 0.05$). The positive rates of VEGF-C were higher in PTC with lymph node metastases than PTC without metastases and PTC with bone or lung metastases (85.7% vs 40.0% or 50.0%, $P < 0.05$). The positive rates of VEGF-C were higher in FTC with lymph node metastases than FTC without metastases and FTC with bone or lung metastases (57.1% vs 17.1% or 25.0%, $P < 0.05$). The difference between PTC and FTC was mainly found between groups without metastases and with bone or lung metastases ($P < 0.05$). **Conclusion:** VEGF-C is closely related to lymph node metastasis of DTC, and may play an important role in lymph node metastasis of DTC. The expression of VEGF-C is higher in PTC than FTC, and can explain the different propensities to lymph node metastasis of PTC and FTC. High expression of VEGF-C in tumor tissue may be a predictor of lymph node metastasis of DTC.

[Key words] DTC; PTC; FTC; VEGF-C; lymph node metastasis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 686-689]

分化型甲状腺癌包括甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer, PTC)及甲状腺滤泡状癌(follicular thyroid cancer, FTC), 同为源于甲状腺滤泡上皮

的恶性肿瘤,两者生物学特征大不相同。PTC 常早期发生淋巴结转移,预后良好,FTC 有明显的侵犯血管倾向,易经血道发生远处转移,淋巴结转移少,预后差于 PTC。血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 是一种重要的促淋巴管生长因子^[1],已证实 VEGF-C 与人类多种肿瘤(如乳腺癌、外阴癌、肺癌等)的淋巴结转移密切相关^[2-4]。本

[基金项目] 江苏省科技厅国际科技合作计划国际产学研合作项目(BZ2009053)

*通讯作者, E-mail: shenmeip@yahoo.com

研究采用免疫组化方法,对 100 例分化型甲状腺癌组织进行 VEGF-C 蛋白的检测,并以 20 例正常甲状腺(normal thyroid, NT)组织为对照,观察 VEGF-C 蛋白在分化型甲状腺癌组织的表达及其与临床病理特征之间的关系,探讨 VEGF-C 在 PTC 和 FTC 的表达差异及意义。

1 资料与方法

1.1 标本

选取南京医科大学第一附属医院 1997 年 6 月~2010 年 12 月资料完整的 100 例分化型甲状腺癌手术患者的甲状腺癌组织标本,其中 PTC 50 例(男 19 例,女 31 例,无转移 35 例,淋巴结转移 7 例,骨或肺转移 8 例,中位年龄 45 岁),FTC 50 例(男 19 例,女 31 例,无转移 35 例,淋巴结转移 7 例,骨或肺转移 8 例,中位年龄 45 岁)。所选取的淋巴结转移病例均无远处转移,骨或肺转移病例均无淋巴结转移。另选取 20 例因良性甲状腺疾病行甲状腺切除术患者的 NT 组织做对照(男 10 例,女 10 例,中位年龄 45 岁)。所有患者手术前未经任何治疗,均经组织病理学确诊。

1.2 方法

组织标本均经 10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片,所有 HE 切片重新阅片。免疫组化 SP 法,所有抗原均经 EDTA pH8.0 高压锅煮沸进

行抗原修复,经 DAB 显色后,苏木素对比染色,中性树胶封固。缓冲液代替一抗做阴性对照,乳腺癌组织做阳性对照。兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,SP 法试剂盒购自福州迈新公司。

VEGF-C 蛋白免疫组化染色阳性信号定位于胞浆,呈棕黄色。按阳性细胞占实质细胞比例计分:无着色(0 分), $\leq 10\%$ (1 分), $11\% \sim 50\%$ (2 分), $> 50\%$ (3 分)。0~1 分为阴性表达,2~3 分为阳性表达^[5]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件,各组间率的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF-C 在 PTC、FTC 及 NT 组织的表达

VEGF-C 阳性表达呈棕黄色颗粒状,位于细胞胞浆,主要表达于甲状腺癌细胞,偶表达于间质脉管内皮细胞及正常甲状腺细胞,其中有 VEGF-C 阳性表达的脉管多数为壁薄无肌层的脉管。VEGF-C 表达阳性率在 PTC、FTC、NT 组织逐渐降低,依次分别为 48.0% (24/50)、24.0% (12/50) 和 10.0% (2/20) ($P < 0.05$)。其中 NT 组织 VEGF-C 大多数呈阴性,仅 2 例可见点灶状散在阳性表达,而 PTC、FTC 组织可见 VEGF-C 弥漫阳性表达(图 1)。

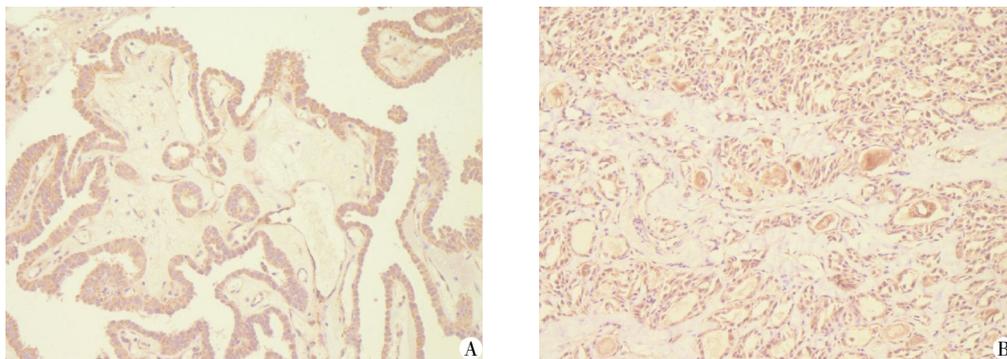


图 1 VEGF-C 在 PTC 组织(A)和 FTC 组织(B)中弥漫阳性表达(DAB, $\times 200$)

Figure 1 Diffuse positive expression of VEGF-C in PTC (A) and FTC (B) (DAB staining, $\times 200$)

2.2 VEGF-C 在 PTC 组织的表达与临床参数之间的关系

50 例 PTC 组织 VEGF-C 表达与临床参数的统计学分析显示,VEGF-C 表达与 PTC 患者的年龄、性别、肿瘤大小无关。淋巴结转移组 VEGF-C 的阳性率高于无转移及骨或肺转移组($P < 0.05$, 表 1),无转移及骨或肺转移组之间 VEGF-C 表达无差异。

2.3 VEGF-C 在 FTC 组织的表达与临床参数之间的关系

50 例 FTC 组织 VEGF-C 表达与临床参数的统计学分析显示,VEGF-C 表达与 FTC 患者的年龄、性别、肿瘤大小无关。淋巴结转移组 VEGF-C 的阳性率高于无转移及骨或肺转移组($P < 0.05$, 表 1),无转移及骨或肺转移组之间 VEGF-C 表达无差异。

2.4 VEGF-C 在 PTC 与 FTC 组织的表达差异

根据肿瘤的转移情况(无转移、淋巴结转移、骨或肺转移)将 PTC 及 FTC 分为 3 组,比较同类型组别之间 PTC 与 FTC 组织 VEGF-C 的表达差异,统计

学分析显示 PTC 与 FTC 组织的 VEGF-C 表达差异主要存在于无转移及骨或肺转移组, VEGF-C 表达在

PTC 明显高于 FTC ($P < 0.05$, 表 1)。在发生淋巴结转移组, PTC 与 FTC 组织的 VEGF-C 表达差异不明显。

表 1 VEGF-C 在 DTC 的表达与临床病理特征之间的关系

Table 1 The expression of VEGF-C to clinic pathologic features of DTC

(n)

临床参数	VEGF-C 在 PTC 的表达				VEGF-C 在 FTC 的表达			
	n	(+)	(-)	阳性率(%)	n	(+)	(-)	阳性率(%)
年龄(岁)								
≤45	24	9	15	37.5	24	8	16	33.3
>45	26	15	11	57.7	26	4	22	15.4
性别								
男	19	9	10	47.4	19	5	14	26.3
女	31	15	16	48.4	31	7	24	22.6
肿瘤直径(cm)								
≤2	33	15	18	45.5	18	4	14	22.2
2~4	13	7	6	53.4	17	4	13	23.5
>4	4	2	2	50.0	15	4	11	26.7
转移情况								
无转移	35	14	21	40.0	35	6	29	17.1 [#]
淋巴结转移	7	6	1	85.7 [*]	7	4	3	57.1 [*]
骨或肺转移	8	4	4	50.0	8	2	6	25.0 [#]

与无转移组及骨或肺转移组比较, * $P < 0.05$; 与 PTC 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

3 讨论

自 1996 年被 Joukov 等发现以来, VEGF-C 被证明是一种重要的促淋巴管生长因子。VEGF-C 可激活并结合主要表达于淋巴管内皮细胞的 VEGFR-3, 引起局部淋巴管增生和新生, 肿瘤细胞通过基底膜不完整的新生淋巴管侵入淋巴系统, 发生淋巴道转移; 同时, VEGF-C 可使肿瘤细胞分泌相应细胞因子, 改变局部微环境, 使肿瘤细胞在淋巴系统更易生存, 促进肿瘤经淋巴道转移^[6-9]。VEGF-C 也可激活并结合主要表达于血管内皮细胞的 VEGFR-2, 引起血管新生^[10], 可参与肿瘤的发展及血道转移。过去认为 VEGF-C 由肿瘤细胞分泌, 通过旁分泌途径作用于内皮细胞, 最近有研究发现, 淋巴管内皮细胞也可分泌 VEGF-C, 通过自分泌途径促进淋巴管增生^[11]。除了在甲状腺癌细胞胞浆, 本实验在间质内皮细胞胞浆内也观察到了 VEGF-C 的表达, 本实验还观察到有 VEGF-C 表达的内皮细胞大多位于壁薄无明显肌层的脉管, 考虑淋巴管可能大, 支持 VEGF-C 可通过自分泌途径作用于淋巴管内皮细胞的观点。

为研究 VEGF-C 与分化型甲状腺癌淋巴道转移或血道转移的关系, 本实验根据肿瘤的转移情况, 将 PTC 及 FTC 各分为 3 组; 其中无转移组为肿瘤局限于甲状腺及邻近组织, 无淋巴结或远处转移; 淋

巴结转移组不存在肿瘤远处转移, 经淋巴道发生淋巴结转移; 骨或肺转移组不存在淋巴结转移, 经血道发生骨或肺转移。

因 PTC 好发淋巴转移, 以往实验主要研究 VEGF-C 和 PTC 淋巴结转移之间的关系, 已发现 VEGF-C 在有淋巴结转移的 PTC 组织表达明显高于无淋巴结转移的 PTC 组织^[12]。本实验结果提示, 在伴发淋巴结转移的分化型甲状腺癌组织, VEGF-C 表达明显高于无淋巴结转移的癌组织。VEGF-C 可能通过局部淋巴管新生及改变局部微环境等途径, 参与分化型甲状腺癌的淋巴道转移^[6-9]。本实验没有发现 VEGF-C 与分化型甲状腺癌的血道转移有关, 可能原因为 VEGF-C 与 VEGFR-3 的亲合力远远高于与 VEGFR-2 的亲合力, VEGF-C 对淋巴管的影响大于对血管作用^[13]。

与 Fellmer 等^[14]实验结果类似, 本实验发现 VEGF-C 在 PTC 组织、FTC 组织及 NT 组织的表达存在明显差异, 依次为 PTC 高于 FTC 高于 NT 组织, 符合三者的生物学特征: PTC 好发淋巴结转移、FTC 淋巴结转移少见、NT 无转移行为。本实验还发现, 伴淋巴结转移的 PTC 及 FTC 中 VEGF-C 表达均明显增高, 且两者之间 VEGF-C 差异消失, 提示随着癌组织 VEGF-C 表达的增加, PTC 及 FTC 都呈现出明显淋巴结侵犯性。

总之, 本实验表明, VEGF-C 在分化型甲状腺癌

的淋巴道转移过程中可能起着重要的作用,两种分化型甲状腺癌组织的 VEGF-C 表达差异可以解释两者不同的淋巴结侵犯性。在尚未发生淋巴结转移的分化型甲状腺癌,癌组织 VEGF-C 高表达可能可以预测分化型甲状腺癌的淋巴结转移。

PTC 好发淋巴结转移,虽然淋巴结转移与预后关系不大,但较无淋巴结转移的 PTC,发生淋巴结转移的 PTC 患者术后更易复发^[15];FTC 淋巴结转移少见,一旦发生,对预后影响不良。所以,对于分化型甲状腺癌尤其癌组织高表达 VEGF-C 的分化型甲状腺癌,预防及抑制肿瘤的淋巴结转移,对于改善肿瘤结局非常重要。鉴于 VEGF-C 在分化型甲状腺癌淋巴道转移中所起的重要作用,有望使用 VEGF-C 中和性抗体等药物阻断分化型甲状腺癌组织 VEGF-C 与 VEGFR-3 的结合,抑制肿瘤组织内淋巴管新生及肿瘤的淋巴道转移,且此类药物不影响正常淋巴管功能,有效而安全^[16-17]。

目前,分化型甲状腺癌的治疗以手术为主,辅以放射性碘及内分泌治疗。随着对分化型甲状腺癌生长转移机制研究的深入,VEGF-C 与分化型甲状腺癌之间的关系会日益清晰。而抗脉管药物研究的发展与成熟,将会为分化型甲状腺癌的综合治疗提供新的选择及方法。

[参考文献]

- [1] Su JL,Chen PS,Chien MH,et al. Further evidence for expression and function of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer cells[J]. *Cancer Cell*,2008,13(6):557-560
- [2] Raica M,Cimpean AM,Ceausu R,et al. Lymphatic microvessel density,VEGF-C,and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer [J]. *Anticancer Res*,2011,31(5):1757-1764
- [3] Jach R,Dyduch G,Radon-Pokrachka M,et al. Expression of vascular endothelial growth factors VEGF- C and D, VEGFR-3,and comparison of lymphatic vessels density labeled with D2-40 antibodies as a prognostic factors in vulvar intraepithelial neoplasia(VIN) and invasive vulvar cancer[J]. *Neuro Endocrinol Lett*,2011,32(4):530-539
- [4] Liu H,Yang Y,Xiao J,et al. COX-2-mediated regulation of VEGF-C in association with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in lung cancer [J]. *Anat Rec*, 2010,293(11):1838-1846
- [5] Siironen P,Ristimäki A,Narko K,et al. VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*,2006,13(2):465-473
- [6] Takahashi K,Saqa Y,Mizukami H,et al. Development of a mouse model for lymph node metastasis with endometrial cancer[J]. *Cancer Sci*,2011,102(12):2272-2277
- [7] Zhou S,Tan C,Dai Z,et al. Tacrolimus enhances the invasion potential of hepatocellular carcinoma cells and promotes lymphatic metastasis in a rat model of hepatocellular carcinoma;involvement of vascular endothelial growth factor-C[J]. *Transplant Proc*,2011,43(7):2747-2754
- [8] He Y,Rajantie I,Pajusola K,et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels [J]. *Cancer Res*,2005,65(11):4739-4746
- [9] Harrell MI,Iritani BM,Ruddell A. Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2007,170(2):774-786
- [10] Tammela T,Zarkada G,Wallgard E,et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation[J]. *Nature*,2008,454(31):656-660
- [11] 马捷,周晓军,周航波,等. 甲状腺乳头状癌中 VEGF-C 和 VEGF-D 的表达及相关性与临床病理特征的关系[J]. *临床与实验病理学杂志*,2010,26(4):429-432
- [12] Issaka RB,Oommen S,Gupta SK,et al. Vascular Endothelial growth factors C and D induces proliferation of lymphangiomiomatosis cells through autocrine crosstalk with endothelium [J]. *Am J Pathol*,2009,175(4):1410-1420
- [13] Yancopoulos GD,Davis S,Gale NW,et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. *Nature*, 2000,407(6801):242-248
- [14] Fellmer PT,Sato K,Tanaka R,et al. Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas [J]. *Surgery*,1999,126(6):1056-1061
- [15] Beasley NJ,Lee J,Eski S,et al. Impact of nodal metastases on prognosis in patients with well-differentiated thyroid cancer [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002,128(7):825-828
- [16] Karpanen T,Wirzenius M,Mäkinen T,et al. Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by post-natal lymphatic vessel maturation[J]. *Am J Pathol*,2006, 169(2):708-718
- [17] Zhuo W,Luo C,Wang X,et al. Endostatin inhibits tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis via cell surface nucleolin on lymphangiogenic endothelial cells [J]. *J Pathol*,2010,222(3):249-260

[收稿日期] 2011-11-30