

IGF- I R、VEGF-C 在食管鳞癌中的表达及临床病理意义

The Expression of IGF- I R and VEGF-C in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Its Clinicopathological Significance//LIU Chuan-xin, XIE Zong-tao, YU Li-chao, et al.

刘传信¹, 谢宗涛¹, 俞力超², 王志强¹, 王振军¹

(1. 无锡市第四人民医院, 江苏 无锡 214000;

2. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212001)

摘要: [目的] 探讨食管鳞癌组织中 IGF- I R、VEGF-C 的表达及其临床病理学意义。[方法] 应用 Envision 二步法检测 95 例食管鳞癌石蜡标本及 20 例食管正常组织中 IGF- I R、VEGF-C 蛋白的表达。应用免疫印迹 (Western Blot) 检测 20 例食管鳞癌新鲜组织及相应癌旁正常食管组织中 IGF- I R、VEGF-C 的表达。[结果] IGF- I R、VEGF-C 在食管鳞癌组织中的阳性率均显著性高于食管正常组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。IGF- I R 的阳性表达与食管鳞癌淋巴结转移、组织分化程度、浸润深度相关 ($P < 0.05$), VEGF-C 的阳性表达与食管鳞癌淋巴结转移、浸润深度相关 ($P < 0.05$)。Spearman 相关分析显示, 食管鳞癌中 IGF- I R、VEGF-C 的表达呈正相关 ($r = 0.287, P < 0.05$)。IGF- I R、VEGF-C 阳性表达组和两者共阳性表达组患者的 5 年生存率均明显低于阴性表达组 ($P < 0.05$)。[结论] IGF- I R、VEGF-C 在食管鳞癌组织中呈高表达, 两者表达呈正相关, 检测食管鳞癌组织中 IGF- I R、VEGF-C 表达水平对患者预后判断有一定意义。

关键词: 食管鳞癌; 胰岛素样生长因子- I 受体; 血管内皮生长因子 C; 免疫组化; 免疫印迹

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)02-0090-04

近年来胰岛素样生长因子 (insulin like growth factors, IGFs) 中的 IGF- I 受体 (IGF- I R) 及血管内皮生成因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 中的 VEGF-C 在食管癌发生发展、浸润、远处转移中的作用受到广泛的关注。IGF- I R 属于跨膜酪氨酸蛋白激酶受体家族, 被促肿瘤生长因子 IGF 激活后, 导致细胞内转录的激活和调节蛋白的合成, 发挥促细胞增殖作用^[1], 参与细胞生长调控及恶性转化^[2]。VEGF-C 与淋巴管内皮细胞上的 VEGFR-3 结合, 诱导肿瘤组织周边的淋巴管扩大以及肿瘤内部淋巴管生成, 促进肿瘤发生淋巴结转移^[3]。近期有学者发现, IGF- I R 能通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡与其它生长因子如 VEGF-C 的信号传导通路相互作用实现促瘤作用^[4]。目前国内有关食管鳞癌中 IGF- I R 及 VEGF-C 关系的报道较少, 本文就此作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集江苏大学附属医院胸心外科 2003 年 1~10

收稿日期: 2011-08-22; 修回日期: 2011-11-15

月间临床资料完整的手术切除食管鳞癌石蜡标本 95 例, 男性 53 例, 女性 42 例, 中位年龄 61 岁 (44~78 岁)。所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他针对肿瘤的治疗, 均在全麻下行食管癌根治术, 术后病理均为鳞癌。UICC 临床分期 T₁₋₂ 期 52 例, T₃₋₄ 期 43 例。20 例正常食管组织取自切除食管切缘距瘤缘约 5cm 以上, 均经病理检查确认为正常组织。所有标本经福尔马林固定, 常规脱水透明、浸蜡、包埋, 连续 4 μ m 厚度切片 2 张, 用于免疫组化染色。

20 例食管鳞状细胞癌新鲜组织均来自江苏大学附属医院 2007 年 12 月至 2008 年 1 月间临床资料完整的食管癌患者, 男性 11 例, 女性 9 例, 年龄 44~78 岁, 平均年龄 61 岁。癌组织手术切除离体后 30min 内置于液氮中速冻后, 于 -70℃ 冰箱中保存待用。所有患者术前均未接受化疗、放疗或其他任何针对肿瘤的治疗, 均在全麻下行食管癌根治术, 术前均经病理学确诊为鳞状细胞癌。20 例正常食管组织取自同一患者距癌缘约 5cm 以上的切缘, 均经病理确诊为正常食管组织。

1.2 抗体和试剂

所用第一抗体 IGF- I R 多克隆抗体 (工作浓度

1:200)购自武汉博士德公司、VEGF-C 多抗(工作浓度 1:200)购自 Santa Cruz Biotechnology Inc,抗鼠/兔双标二抗、DAB 显色系统均为德国 DAKO 公司产品。GAPDH 一抗购自上海康成生物工程公司,抗兔 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology Inc。

1.3 方法

用 Envision 二步法对 95 例食管鳞癌石蜡标本及相应 20 例食管正常组织分别进行 IGF- I R、VEGF-C 蛋白检测。切片常规脱蜡水化,抗原热修复,非免疫动物血清封闭。滴加一抗,过夜后滴加二抗,各步骤间以 PBS 缓冲液冲洗,连续 3 次。室温孵育,DAB 显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,40℃温水孵 30min,脱水,透明,封片。已知阳性片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

应用免疫印迹 Western Blot 检测 20 例食管鳞癌新鲜癌组织及相应 20 例癌旁正常食管组织中 IGF- I R、VEGF-C 的表达。通过蛋白提取、蛋白质定量及变性、聚丙烯酰胺电泳、转膜、免疫印迹等步骤,在 Typhoon 9400 多功能激光扫描成像系统上扫描,检测食管鳞癌组织及癌旁正常组织中的蛋白条带灰度比值。

1.4 结果判断

IGF- I R 阳性表达主要为癌细胞膜棕黄色染色,VEGF-C 阳性表达主要为癌细胞浆棕黄色着色。光镜下观片,双盲法记数阳性细胞,随机选 5 个高倍镜视野($\times 400$),记数 300 个肿瘤细胞,根据着色细胞数目判定染色结果。参考 Kawamoto 的标准,棕黄色细胞 $\leq 30\%$ 为阴性,棕黄色细胞数 $>31\%$ 为阳性。将染色程度分为 4 级:棕黄色细胞数 $\leq 30\%$ 为(-), $31\% \sim 50\%$ 为(+), $51\% \sim 80\%$ 为(++), $\geq 81\%$ 为(+++),+~+++判为阳性。

1.5 随访与统计学处理

所有患者均进行随访,平均随访时间 38 个月(3~60 个月)。采用电话回访、门诊复查分别于术后 6、12、18、24、30、36、48、60 个月定期进行随访,截止日期为 2008 年 10 月 30 日。

采用 SPSS11.5 for Windows 统计软件进行处理,阳性率的比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Excel 2003 软件辅助作图。

2 结果

2.1 IGF- I R、VEGF-C 在食管鳞癌和正常组织表达

IGF- I R、VEGF-C 蛋白的 Western 免疫印迹检测提示,食管鳞癌组织的蛋白条带灰度比值分别为 0.576825 ± 0.028433 、 0.428650 ± 0.053611 ,而相应正常食管组织的蛋白条带灰度比值分别为 0.427842 ± 0.021425 、 0.306108 ± 0.040964 。食管鳞癌组织中 IGF- I R、VEGF-C 蛋白表达明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

IGF- I R (+34 例,++25 例,+++18 例)、VEGF-C (+29 例,++22 例,+++13 例)在食管鳞癌组织中的阳性率分别为 81.10% (77/95)、67.40% (64/95) (图 1、2),在正常组织阳性率分别为 20.00% (4/20)、5.00% (1/20),IGF- I R ($\chi^2=29.573$, $P < 0.05$)、VEGF-C ($\chi^2=26.152$, $P < 0.05$) 在癌组织中的阳性率均明显高于正常组织。见表 1。

表 1 IGF- I R、VEGF-C 在食管鳞癌和正常组织表达

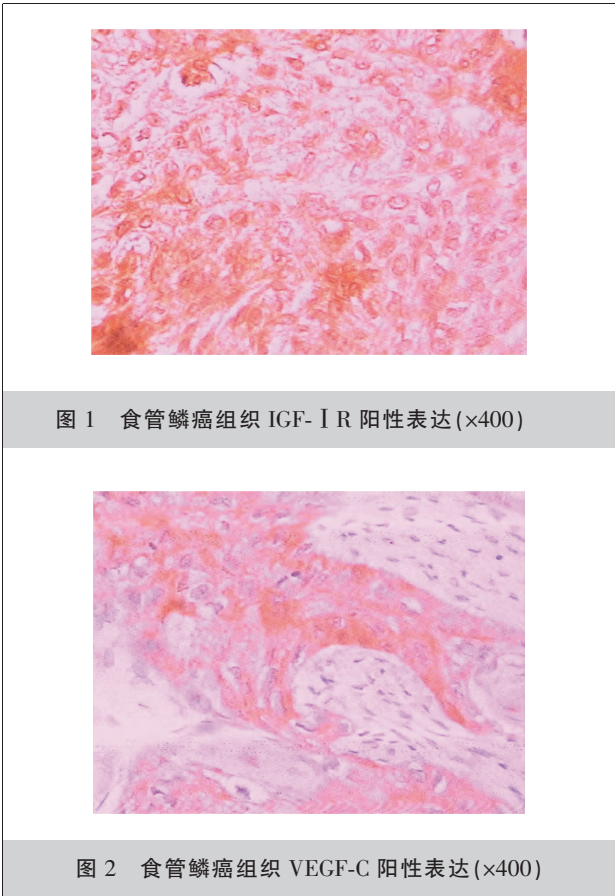
组别	例数	VEGF-C 阳性(%)	IGF- I R 阳性(%)
癌组织	95	64(67.40)	77(81.10)
正常组织	20	1(5.00)	4(20.00)
χ^2		26.152	29.573
P 值		0.000	0.000

2.2 VEGF-C、IGF- I R 表达与食管癌临床病理特征的关系

IGF- I R 的阳性表达与食管癌淋巴结转移、分化程度、浸润深度显著性相关($P < 0.01$)。VEGF-C 的阳性表达与食管癌淋巴结转移、浸润深度显著性相关($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 VEGF-C 与 IGF- I R 表达与食管癌临床病理特征关系

临床病理特征	例数	VEGF-C		IGF- I R	
		阳性	P 值	阳性	P 值
淋巴结转移			< 0.000		0.001
+	54	48		50	
-	41	16		27	
分化程度			0.154		0.001
低	29	16		28	
中	36	28		31	
高	30	20		18	
浸润深度			< 0.000		0.001
T ₁₋₂	52	24		36	
T ₃₋₄	43	40		41	



2.3 食管鳞癌组织 VEGF 与 IGF- I R 表达相关性

IGF- I R、VEGF-C 在 95 例食管鳞癌中表达的共阳性率为 63.16%(60/95)，两者表达呈明显正相关($r=0.287, P<0.05$)。见表 3。

表 3 IGF- I R、VEGF-C 在食管鳞癌中表达的相关性

IGF- I R	VEGF-C				合计
	-	+	++	+++	
-	14	3	1	0	18
+	7	12	9	6	34
++	6	8	7	4	25
+++	4	6	5	3	18
合计	31	29	22	13	95

2.4 IGF- I R、VEGF-C 表达与食管鳞癌预后的关系

IGF- I R 阳性表达组 5 年生存率为 42.43%，明显低于阴性表达组的 60.00%，差异有统计学意义($P<0.05$)。VEGF-C 阳性表达组 5 年生存率为 37.39%，明显低于阴性表达组的 60.00%，差异有统计学意义($P<0.05$)；IGF- I R、VEGF-C 共阳性表达组 5 年生存率为 35.24%，明显低于共阴性表达组的 56.80%，有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨 论

胰岛素样生长因子家族 (IGFs) 包括 IGF- I 和 IGF- II 及其受体 (IGF- I R、IGF- II R)，IGF- I 和 IGF- II 主要通过 IGF- I R 构成自分泌或旁分泌环路而发挥生理作用。IGF- I R 是种族保守性受体，被配基促肿瘤生长因子 IGF 激活后，经过一系列信号转导，导致细胞内转录的激活和调节蛋白的合成，发挥促细胞增殖作用^[1]。有研究表明 IGF- I R 在肝细胞癌、乳腺癌、结肠癌、Ewing 肉瘤和前列腺癌等中表达上调，并与其发生、发展关系密切，在 IGF- I R 基因缺陷的动物模型中肿瘤的发生则受到抑制，提示 IGF- I R 异常表达与恶性肿瘤的发生关系密切^[5]。本研究发现，IGF- I R 蛋白表达在食管鳞癌组织中的阳性率达 81.10%(77/95)，与正常对照组差异有统计学意义。IGF- I R 蛋白表达与食管癌的淋巴结转移、分化程度、浸润深度均显著性相关($P<0.01$)。说明 IGF- I R 过度表达可增强癌细胞增殖、浸润能力，并促进癌细胞的转移；IGF- I R 表达阳性者预后明显较表达阴性者差，因此检测食管鳞癌组织中 IGF- I R 蛋白的表达情况，对判断其预后积极的临床意义。

VEGF-C 是 VEGF 家族一员，具有酪氨酸激酶活性，VEGF-C 与其特异性受体 VEGFR-3 (即 Flt-4) 结合后使其酪氨酸激酶磷酸化，促进淋巴管上皮细胞的转移，诱导淋巴管内皮细胞蛋白重组，刺激内皮细胞增生。近来的研究也发现 VEGF-C 在一些恶性肿瘤如头颈部肿瘤、甲状腺癌、食管癌、乳腺癌、胃癌、子宫癌、前列腺癌、非小细胞肺癌中呈过表达，且与肿瘤的淋巴结转移及(或)淋巴管浸润显著相关^[6,7]。本研究发现，VEGF-C 蛋白在食管鳞癌组织中的阳性率达 67.40%(64/95)，与正常对照组差异有统计学意义；同时发现 VEGF-C 蛋白表达与食管癌的淋巴结转移、浸润深度显著性相关($P<0.01$)，而与分化程度无相关性，此结果 Kitadai 等^[5]报道相一致。表明 VEGF-C 蛋白在食管鳞癌中存在过表达，提示 VEGF-C 与食管鳞癌的浸润转移有密切关系。

Tatsuya 等^[7]应用血管内皮细胞 IGF- I 受体基因敲除小鼠为模型，发现同正常对照组相比，实验鼠新生血管生成下降，同时伴有 VEGF、内皮细胞 NO 合酶和内皮素-1 表达的减少。Smith 等^[8]研究发现 IGF- I 通过与 IGF- I R 结合激活 VEGF，激活丝裂

酶原活化蛋白激酶(MAPK)途径,促进新生血管形成。这些结果提示,IGFs 与 VEGF 之间或许构成一条轴,而胰岛素样受体在这个轴中起到了桥梁作用。进一步研究发现,IGF- I R 通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡与其它生长因子如 VEGF-C 的信号传导通路相互作用实现促瘤作用。本研究发现 IGF- I R、VEGF-C 在 95 例食管鳞癌中表达的共阳性率为 63.16%,两者之间的表达呈正相关 ($r=0.287, P<0.05$)。IGF- I R、VEGF-C 阳性及两者共阳性组患者预后差,进一步证实了 IGF- I R、VEGF-C 在肿瘤的发生、发展、转移中相互作用。

IGF- I R 在增生性细胞中的广泛表达以及其在癌细胞生长过程中所起的决定性作用使其成为一个治疗肿瘤的全新靶点。Baserga 等^[9]已明确证实封闭 IGF- I R 能导致活体内肿瘤细胞的大量凋亡,能抑制肿瘤的发生,阻断肿瘤的侵袭和远处转移。所有能使受体表达下调及抑制受体酪氨酸激酶活性的措施都伴有最强烈的抗肿瘤效应,如抗 IGF- I R 的单链抗体(IGF- I R scFv-Fc)、显型负性突变型 IGF- I R 和可溶性 IGF- I R 片段等的运用^[10,11]。VEGF-C、IGF- I R 关系密切,并相互作用促进肿瘤的发生发展,抑制 IGF- I R 的表达、阻止其激活以及激活后效应不仅能发挥抗肿瘤作用,也能阻止 VEGF-C 效应的最大发挥。

综上,IGF- I R 和 VEGF-C 在食管鳞癌中过表达,且两者表达呈正相关,检测两者表达对预后判断有一定意义。

参考文献:

- [1] Samani AA, Brodt P. The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2001, 10 (2) : 289-312.
- [2] Cosaceanu D, Budiu RA, Carapancea M, et al. Ionizing radiation activates IGF- I R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism[J]. Oncogene, 2007, 26(17): 2423-2434.
- [3] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C mediated lymphangiogenesis promotes tumor metastasis[J]. EMBO J, 2001, 20(4):672-682.
- [4] Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factor and their binding protein; biological actions [J]. Endocrine Rev, 1995, 16 (1) : 3-34.
- [5] Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2001, 93 (5) : 662-666.
- [6] Noguchi T, Takeno S, Shibata T, et al. VEGF-C expression correlates with histological differentiation and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. Oncol Rep, 2002, 9(5):995-999.
- [7] Tatsuya K, Daid V, Kiyoshi S, et al. Knockout of insulin and IGF- I receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization [J]. Clin Invest, 2003, 111 (12) : 1835-1842.
- [8] Smith LE, Shew W. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-I receptor [J]. Nature Medicine, 1999, 5(12) : 1390-1395.
- [9] Baserga R, Peruzzi F, Reiss K. The IGF-1 receptor in cancer biology[J]. Int J Cancer, 2003, 107(6): 873 - 877.
- [10] Brodt P, Samani A, Navab R. Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60(8): 1101-1107.
- [11] Uchida Y, Shimada G, Watanabe H, et al. In esophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis [J]. Br J Cancer, 1998, 77 (10):1704-1709.