

实时荧光定量 PCR 检测早期宫颈癌及前哨淋巴结 VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 表达

赵 群, 吴玉梅, 王建东, 宋 芳, 王 玥, 王晓丽

(首都医科大学附属北京妇产医院, 北京 100006)

摘 要: [目的] 研究血管内皮生长因子 (VEGF)-C 及 VEGF-D mRNA 在早期宫颈癌和前哨淋巴结中的表达水平。[方法] 收集 51 例早期宫颈癌患者宫颈组织、癌周组织、前哨转移淋巴结、非前哨无转移淋巴结、正常区域组织。透射电镜观察淋巴结转移情况, 实时荧光定量 PCR 检测 VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 的表达量, 并研究其与宫颈癌临床病理各因素之间的关系。[结果] 透射电镜显示宫颈癌周区可见到淋巴管增生。VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 在宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结中的表达均显著高于正常宫颈组织和非前哨无转移淋巴结 ($P < 0.05$)。VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 在宫颈癌组织中的表达在不同淋巴结转移、淋巴管侵犯、肿瘤浸润深度下差异有统计学意义 (P 均 < 0.05), 而不同年龄、临床分期、病灶大小、组织分化、病理类型之间的差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。[结论] VEGF-C 及 VEGF-D 在早期宫颈癌的淋巴结转移中起重要作用, 可能成为预测宫颈癌淋巴结转移的关键指标, 有望成为抑制宫颈癌淋巴结转移的治疗靶点。

关键词: 宫颈肿瘤; 前哨淋巴结; 血管内皮生长因子 (VEGF); 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)01-0014-05

Detection of VEGF-C and VEGF-D mRNA in Cervical Cancer Early Stage and Sentinel Lymphatic Node by Real-Time PCR

ZHAO Qun, WU Yu-mei, WANG Jian-dong, et al.

(Beijing Obstetrics and Gynecologic Hospital, Capital Medical University, Beijing 100006, China)

Abstract: [Purpose] To investigate VEGF-C and VEGF-D mRNA levels in early stage of cervical cancer and sentinel lymphatic nodes (SLN). [Methods] The cancer tissues, pericancerous tissues, positive SLN, negative non-SLN and normal tissues in 51 cases with cervical cancer early stage were collected. Lymphatic metastasis was observed using transmission electronic microscope, VEGF-C and VEGF-D mRNA were detected by real-time PCR, and the relationships of VEGF-C and VEGF-D mRNA with clinicopathologic factors were studied. [Results] With transmission electronic microscopy, there were hyperplastic lymphatic vessels surrounding the cervical cancer tissues. Expressions of VEGF-C and VEGF-D mRNA in cancer tissues, pericancerous tissues, or positive SLN tissues were significantly higher than those in negative non-SLN or normal tissues ($P < 0.05$). The expressions of VEGF-C and VEGF-D mRNA in cervical cancer were significantly different between those with and without lymph node metastasis, those with and without lymph vessel invasion, and depths of tumor invasion ($P < 0.05$), but there was no significant difference between ages, stages, lesion sizes, grades, or pathologic types ($P > 0.05$). [Conclusion] VEGF-C and VEGF-D play an important role in lymph node metastasis of cervical cancer early stage. VEGF-C and VEGF-D may be crucial indexes for predicting lymph nodes metastasis, and may become treatment target for inhibition of lymph node metastasis of cervical cancer.

Subject words: cervical neoplasms; sentinel lymph nodes; vascular endothelial growth factor (VEGF); real-time PCR

淋巴结转移是宫颈癌最主要的转移途径, 也是影响患者预后的重要因素之一。但至今缺乏早期发现盆腔淋巴结转移的方法, 宫颈癌淋巴转移的机理

基金项目: 北京市卫生局科学研究基金

通讯作者: 吴玉梅, 主任, 教授, 博士; 首都医科大学附属北京妇产医院妇科, 北京市东城区骑河楼街 17 号 (100006); E-mail: wym-530@sohu.com。

收稿日期: 2012-07-06; **修回日期:** 2012-08-30

也尚未明确。本研究采用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术检测早期宫颈癌、癌周、前哨淋巴结 (sentinel lymph node, SLN)、非 SLN 及正常区域血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)-C 及 VEGF-D mRNA 的表达, 并分析其与淋巴管侵犯、淋巴结转移及其他临床病理因素之间的

关系,寻找早期发现淋巴转移的标志物,探讨早期宫颈癌淋巴转移的机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2006年3月~2009年3月于首都医科大学附属北京妇产医院妇科就诊的51例早期宫颈癌患者。患者年龄平均45.5(25~63)岁,≤35岁16例,>35岁35例;临床分期(2000年FIGO分期标准):I_{b1}期25例,I_{b2}期7例,II_a期19例;病理类型:鳞状细胞癌41例,腺癌10例;分化程度:高-中分化38例,低分化13例;肿瘤直径≤4cm32例,直径>4cm19例;浸润深度:≤1/2深度者21例,>1/2深度者30例;淋巴转移者17例(其中前哨淋巴结转移16例),未发生转移者34例。

1.2 标本取材与处理

用放射性核素^{99m}Tc 硫胶体(^{99m}Tc labeled tracer,^{99m}Tc)及亚甲蓝(methylene blue)联合作为示踪剂,于手术前18h左右将^{99m}Tc1ml(37.5Meq)分别注射在宫颈3、6、9、12点黏膜下深度5~10mm(距离肿瘤边缘>0.5cm),次日手术麻醉成功后,宫颈同一部位4个点分别注入1%亚甲蓝各1ml,共4ml。开腹后距离注射时间约20~30min应用手提式γ计数探测器于盆腔淋巴引流区域探测,同时观察蓝染的淋巴管、淋巴结及淋巴管引流方向及部位,将探测出计数升高至10倍以上(视为核素阳性)和/或蓝染的淋巴结视为SLN予以标记并切除,其余淋巴结视为非SLN,按照常规行盆腔淋巴结切除及广泛性子宫切除术。手术标本离体后,迅速解剖观察肿瘤大小、浸润深度。然后每个病例分别切取癌组织内、距癌边缘0.5cm标记为癌周区,距癌边缘>2cm标记为正常区;淋巴结切取:沿其长轴通过淋巴结入门处一分为二并带周围组织约5mm。冻存标本:放入高温灭菌的冻存管中并经液氮罐转运至-80℃冰箱备用。电镜标本:将上述组织切取1mm×1mm×1mm的标本放入2.5%戊二醛固定液内2~4h(4℃),然后用0.1mol/L PB溶液漂洗,间隔10min1次,共漂洗3次,4℃保存备用。其余标本送常规病理检查。

1.3 主要试剂和仪器

总RNA提取试剂盒(Trizol法)(北京百泰克公

司),2×One-step SYBR real-time RT-PCR kit(北京百泰克公司),放射性核素^{99m}Tc 硫胶体(北京401所配制)。透射电子显微镜(JEOL JEM-1230),荧光定量PCR仪(Stratagene Mx3000PTM Multiplex Quantitative PCR System)。

1.4 研究方法

1.4.1 透射电镜观察

收集新鲜宫颈癌手术标本15例(癌内、癌周、正常区及前哨转移淋巴结组织),2.5%戊二醛固定液(4℃)固定4h,经清洗、脱水、渗透、包埋、聚合、超薄切片与重金属双染色等处理后,进行透射电镜观察。

1.4.2 实时荧光定量RT-PCR

按照Trizol法(北京百泰克公司)实验步骤提取总RNA。按照2×one-step SYBR(北京百泰克公司)操作步骤进行实时荧光定量RT-PCR,引物由上海生工设计合成,上样体系:2×one-step SYBR mix 10μl,模板RNA(300ng),上游引物(10μmol/L)0.4μl,下游引物(10μmol/L)0.4μl,RT-PCR mix 1μl,RNase free H₂O至20μl。RT-PCR程序:42℃ 20min→95℃ 5min→(95℃ 15s→55℃ 15s→72℃ 20s)40个循环→95℃ 1min→55℃ 30s→95℃ 30s。每个样品重复3次实验,通过观察样品扩增曲线和溶解曲线,了解实验情况。同时进行内参基因β-actin检测。将标准品进行10倍梯度稀释成3.0×10~3.0×10⁵拷贝5个梯度后,进行荧光定量RT-PCR,将阳性梯度的模板浓度和对应的CT值进行标准曲线的计算,标准曲线为Y=-2.563×lgX+23.5;其中Y对应CT值;X为标本的拷贝数。

1.5 统计学处理

应用SPSS15.0统计软件包进行统计分析。计量资料结果以均数±标准差表示。符合正态分布的数据比较采用配对或独立两样本t检验,不符合正态分布的数据采用行×列表卡方检验。所有假设检验用双侧检验,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 透射电镜下宫颈癌微淋巴管的组织形态学特征

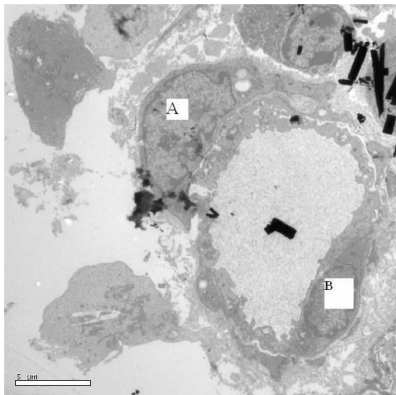
宫颈癌组织内可见大量肿瘤细胞,并可见到极少数塌陷、扭曲的淋巴管。正常区未见到肿瘤细胞,可见到淋巴管,呈长圆管状、短棒状,形态规则,管壁

薄,仅由一层内皮细胞构成。宫颈癌周区可见到淋巴管增生,部分淋巴管可见周围的锚丝及胶原纤维出现不同程度的溶解破坏,管壁有溶解、破坏和断裂,形成开放的间隙;并可见肿瘤细胞向淋巴管黏附并向淋巴管伸出伪足,偶见肿瘤细胞正在进入淋巴管(Figure 1),部分淋巴管内可见癌细胞(Figure 2)。转移前哨淋巴结(SLN(+))内可见到肿瘤细胞(Figure 3)。

2.2 Real-time PCR 检测 VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 表达

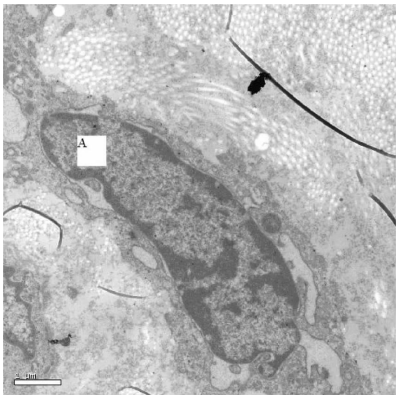
所提取宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结、非前哨无转移淋巴结、正常区域各组织的总 RNA 经 10g/L

琼脂糖凝胶电泳检测可见 2 条清晰的 RNA 带: 28S、18S, 由强变弱, 条带清晰可见, 无明显降解(Figure 4)。紫外分光光度计检测 RNA 浓度, A260 / A280 比值 1.80~2.0, 表明 RNA 纯度较高。Real-time RT-PCR 实验结果显示: 内参基因 β -actin 在宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结、非前哨无转移淋巴结组织及正常宫颈组织中的表达无显著差异 ($P>0.05$)。VEGF-C mRNA 在宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结中的表达显著高于正常宫颈组织和非前哨无转移淋巴结 ($P<0.01$)。VEGF-C mRNA 在前哨转移淋巴结中的表达显著高于宫颈癌内和癌周组织 ($P<0.05$)。



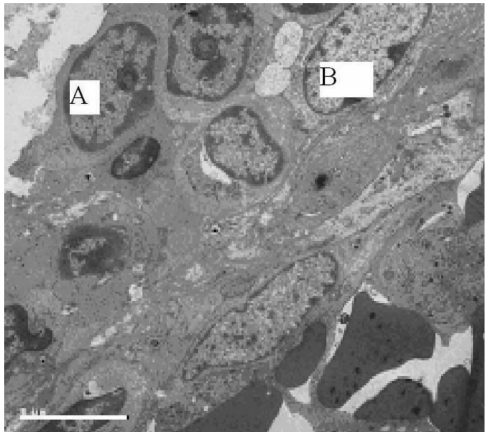
A:Tumor cell with extending pseudopod;
B:Endothelial cell of lymphatic vessel.

Figure 1 Tumor cell stretching out pseudopod into lymphatic cavity under transmission electron microscope (TEM)($\times 500$)



A:Tumor cell invading into lymphatic vessel.

Figure 2 Tumor cell invading into lymphatic vessel under TEM ($\times 15\ 000$)



A:Tumor cell invading into SLN;
B:SLN lymphatic cell.

Figure 3 Tumor cell invading into SLN under TEM ($\times 5\ 000$)

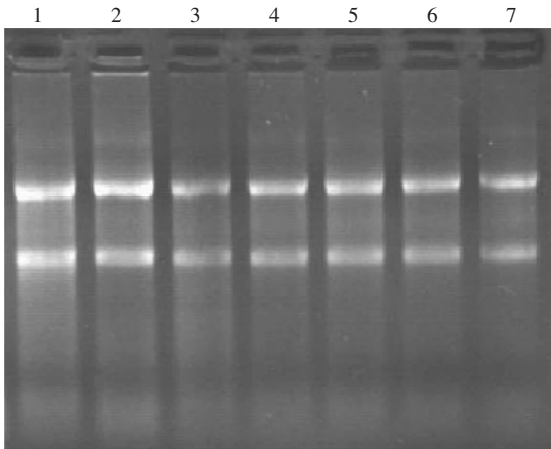


Figure 4 Extracted total RNA with agarose gel electrophoresis

VEGF-D mRNA 在宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结中的表达显著高于正常宫颈组织 ($P<0.01$) 和非前哨无转移淋巴结 ($P<0.05$)。VEGF-D mRNA 在前哨转移淋巴结中的表达显著高于宫颈癌内 ($P<0.05$), 与宫颈癌周组织比较无显著差异 ($P>0.05$)。见表 1。

2.3 VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 在宫颈癌组织中的表达及其与临床病理因素之间的关系

VEGF-C 及 VEGF-D mRNA 在宫颈癌组织中的表达与淋巴结转移、淋巴管侵犯、肿瘤浸润深度方面有显著性差异 ($P<0.05$), 而不同年龄、临床分期、病灶大小、组织分化、病理类型宫颈癌患者间的 VEGF-C、VEGF-D 表达率的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

3 讨论

在 I ~ II 期宫颈癌中, 淋巴结阴性患者的 5 年生存率可达 75%~95%, 而淋巴结阳性患者的 5 年生存率仅为 52.1%~62.1%^[1], 可见淋巴转移是影响宫颈癌患者预后的主要因素之一。但是据统计 I、II 期盆腔淋巴结转移率分别为 15.14%、28.16%, 常规切除的淋巴结中约有 70%~80% 并无肿瘤转移^[2]。现有的辅助检查方法(B 超、CT、MRI 等)均不能准确地发现盆腔淋巴结转移。盆腔淋巴结清扫可导致血管神经损伤、淋巴囊肿合并感染、盆腔粘连等多种并发症, 破坏机体免疫系统功能的完整性。正确地判断盆腔淋巴结转移, 避免不必要的淋巴结清扫手术, 是

Table 1 Copy number of β -actin, VEGF-C and VEGF-D mRNA in various tissues

mRNA	Cancer tissue	Paracancerous tissue	SLN(+)	Non-SLN(-)	Normal tissue
β -actin	47328±19286	48740±18632	45990±15774	47140±22647	49690±20866
VEGF-C	54630±149777	51770±14932	69410±17396*	32220±16044**	29410±12687**
VEGF-D	7688±1898	8612±2219	9930±2438*	5260±2905*	4651±1558**

Note: * Comparing with cancer tissue, $P<0.05$; **Comparing with cancer tissue, $P<0.01$.

Table 2 Relationship of Expressions of VEGF-C and VEGF-D mRNA with Clinicopathologic features

Parameters	n	VEGF-C mRNA	P	VEGF-D mRNA	P
Age(years)					
≤35	16	53768±13977	0.423	7564±1564	0.151
>35	35	552876±15237		7650±1760	
FIGO stage					
I b1+ I b2	32	548796±13654	0.612	6976±1863	0.146
II a	19	583659±15870		7091±1672	
Tumor size(cm)					
≤4	32	527470±145948	0.564	6693±1276	0.120
>4	19	563874±15438		6954±1782	
Pathologic type					
Squamous cell carcinoma	41	543985±12984	0.759	6837±1820	0.705
Adenocarcinoma	10	530498±13870		6012±1690	
Differentiation degree					
Well-moderate differentiation	38	490846±15387	0.498	7027±1709	0.121
Poor differentiation	13	507287±13904		6301±1545	
Lymphatic vessel infiltration					
-	33	402873±14390	0.039	6602±1840	0.014
+	18	563872±15638		7954±1756	
Infiltration depth					
≤1/2	21	427692±15367	0.042	6587±1809	0.019
>1/2	30	583091±15298		7356±1769	
Lymph node metastasis					
Non-SLN(-)	33	433769±15395	0.0254	6408±1874	0.021
SLN(+)	16	561248±14982		7740±1791	

当今亟待解决的问题。

血管内皮生长因子家族包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和胎盘生长因子(placental growth factor, PlGF)。其中 VEGF-C 和 VEGF-D 被认为与肿瘤血管生成和淋巴管生成最为密切^[3]。SLN 是肿瘤发生转移的“第一站”淋巴结,是区域及远处淋巴结发生转移的早期事件^[4]。我们的前期研究^[5]发现宫颈癌 SLN 检测具有一定的复杂性和不确定性。早期宫颈癌采用 ^{99m}Tc 硫胶体(Tc99)与亚甲蓝联合,可以优势互补,具有更高的 SLN 检出率。本研究显示宫颈癌周区可见到淋巴管增生并明显增多,可见肿瘤细胞向淋巴管粘附并向淋巴管伸出伪足,偶见肿瘤细胞正在进入淋巴管。VEGF-C 和 VEGF-D mRNA 在宫颈癌内、癌周、前哨转移淋巴结中的表达显著高于正常宫颈组织和非前哨无转移淋巴结($P<0.05$), VEGF-C 和 VEGF-D 在宫颈癌组织中的表达在不同淋巴结转移、淋巴管侵犯、肿瘤浸润深度方面有显著性差异($P<0.05$),提示 VEGF-C 和 VEGF-D mRNA 升高发生在宫颈癌淋巴转移的早期。最近 Ishii 等^[6]研究显示口腔癌细胞可以促使 SLN 在发生肿瘤转移前即产生新生淋巴管。Michiyo^[7]研究显示 VEGF-C 通过自分泌和旁分泌方式刺激肿瘤细胞转移,均与本研究结果相符。VEGF-C 和 VEGF-D 促进淋巴管新生,为宫颈癌细胞的转移创造了便利条件,VEGF-C 和 VEGF-D 在早期宫颈癌的淋巴结转移中发挥了重要作用。因此 VEGF-C 和 VEGF-D mRNA 可能成为预测宫颈癌淋巴结转移的关键指标。Real-time PCR 检测 VEGF-C 和 VEGF-D mRNA 为临床提供了简便易行、客观、定量的检测方法。

在本资料中 VEGF-C 和 VEGF-D mRNA 在宫颈癌组织中的表达均与淋巴结转移、淋巴管侵犯、肿瘤浸润深度方面有显著性差异($P<0.05$),但 VEGF-C mRNA 在癌内、癌周和 SLN 中的拷贝数均显著高于 VEGF-D,且 VEGF-C mRNA 在前哨转移淋巴结中的表达显著高于宫颈癌内和癌周组织($P<0.05$),而 VEGF-D mRNA 在前哨转移淋巴结中的表达与宫颈癌周组织比较无显著差异($P>0.05$)。表明二者既具有一定的协同性,但作用却不甚相同。有研究发现 VEGF-D 在肺腺癌和头颈鳞癌中的作用要小于 VEGF-C^[8],二者的关系仍需进一步研究。VEGF-C 和 VEGF-D 共同作用于 VEGFR-3(Flt4)受体^[9],使

后者发生磷酸化激活,继而激活多条细胞内信号传导,促使淋巴管内皮细胞增殖、分化、迁移、抗凋亡,最终形成新生淋巴管。近来研究^[10]显示使用小干扰 RNA 或 VEGF-C 和 VEGF-D 受体(VEGFR)的拮抗剂,可以抑制肿瘤淋巴管形成和淋巴转移,提示 VEGF-C 和 VEGF-D 可望成为抑制宫颈癌淋巴结转移的治疗靶点。

总之,VEGF-C 和 VEGF-D mRNA 升高发生在宫颈癌淋巴转移的早期,可能参与了宫颈癌发生、发展的过程,在宫颈癌的淋巴结转移中起重要作用;有可能成为预测宫颈癌淋巴结转移的关键指标,并成为抑制宫颈癌淋巴结转移、提高宫颈癌疗效的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Kobierski J, Emerich J, Królikowska B, et al. Lymph node metastasis as a prognostic factor in cervical carcinoma[J]. Ginekol Pol, 2002, 73(11):925-929.
- [2] Agnaldo L, Fernando M, Paub T, et al. Clinicopathological features influencing pelvic lymph node metastasis and vaginal and parametrial involvement in patients with carcinoma of the cervix[J]. Gynecol Obstet Invest, 2005, 59(4): 92-96.
- [3] Ko YH, Jung CK, Lee MA, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D in resected non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res Treat, 2008, 40(3):133-140.
- [4] Rob L, Strnad P, Robova H, et al. Study of lymphatic mapping and sentinel node identification in early stage cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2005, 98(2):281-288.
- [5] Wu YM, Wang JD, Song F, et al. Clinical study of sentinel lymph nodes detection in early stage cervical cancer[J]. Journal of Oncology, 2008, 14 (2): 91-94. [吴玉梅, 王建东, 宋芳, 等. 早期子宫颈癌前哨淋巴结检测的临床研究[J]. 肿瘤学杂志, 2008, 14(2):91-94.]
- [6] Ishii H, Chikamatsu K, Sakakura K, et al. Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2010, 46(5):373-378.
- [7] Michiyo K, Yasuhiko K, Miwako T, et al. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(22):7205-7214.
- [8] O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA. Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis[J]. Cancer, 2001, 92(3):556-568.
- [9] Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, et al. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies [J]. Thromb Haemost, 2003, 90(2):167-184.
- [10] Zhang D, Li B, Shi J, et al. Suppression of tumor growth and metastasis by simultaneously blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-C with a receptor-immunoglobulin fusion protein [J]. Cancer Res, 2010, 70(6):2495-2503.