

VEGF 及其受体的表达与肝癌的生物学特性关系

• 实验研究 •

杜滂 魏经国

【摘要】 目的:通过检测裸鼠肝癌模型中肝癌不同生长时期的病理改变与血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR) KDR 及 Flt-1 的异常表达,探讨肝癌复发转移与 VEGF 及其受体间的关系。方法:将裸鼠 25 只随机分成 5 组,1 组为对照外,其余 20 只原位种植入肝癌细胞,分别于 1 周、2 周、3 周、4 周作血管造影,取标本切片行 HE 染色及用免疫组化的方法检测 anti-VEGF, anti-KDR 及 anti-Flt-1 的表达。结果:血管造影显示种植后 2 周组肝脏血管开始有增生及扭曲,3 周及 4 周组血管改变更加明显。各组成瘤率均为 100%,光镜下 1 周组可见瘤细胞散在肝血窦周围,2 周组瘤细胞聚集成团,3 周组、4 周组瘤细胞团形态不规则,边界不清,向瘤周浸润,瘤细胞团内可见坏死。1 周组瘤细胞 VEGF 表达成弱阳性,2 周组 VEGF 表达成阳性,3 周组及 4 周组 VEGF 表达强阳性;正常对照组于种植后 1 周组肿瘤细胞与周围肝细胞 VEGFR 表达未见明显差异,种植后 2 周、3 周、4 周肿瘤新生血管 VEGFR 表达逐渐增强,肿瘤新生血管内皮细胞的 VEGFR 着色明显强于瘤周血管内皮细胞。肿瘤细胞亦可见 VEGFR 染色。结论:多血供的肝癌结节 VEGF 及其受体表达较强。肿瘤的生长、局部浸润、远处转移与 VEGF 及其受体密切相关。VEGF 首先来源于旁分泌,在后期肿瘤自分泌是 VEGF 高表达的重要来源。这可能是肝癌阻断血供后,瘤灶能存活、复发和转移的重要原因之一。

【关键词】 肝肿瘤 血管内皮生长因子 血管内皮生长因子受体

【中图分类号】 R735.7, R815 【文献标识码】 A 【文章编号】 1000-0313(2002) 06-0542-04

The relationship between the expression of VEGF and VEGFR and biological characteristics of liver cancer DU Pang, WEI Jingguo. Department of Radiology, Tangdu Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038

【Abstract】 Objective: To investigate the relationship between the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and the recurrence or metastasis of liver tumor. Methods: 25 nude mice were averagely divided into 5 groups including control group and the other 4 treated groups. Human hepatocellular carcinoma was implanted into the liver of the treated group, which was induced into the model of liver cancer in mouse. Then, angiography was performed in the treated groups by the end of 1wk, 2wk, 3wk and 4wk, respectively. Meanwhile, HE staining of the specimen of the liver cancer in mice was made to measure the expression of VEGF, KDR and Flt-1. Results: After implantation of hepatocellular carcinoma, angiogram showed increased and tortuous vascularities of the liver in model at 2 weeks, and dramatic change of the vascularity at 3 and 4 weeks. All mice in treated groups were found tumor cells. Microscopically, tumor cells were shown around blood sinusoid in 1 week, the tumor cells assembled a mass in 2 weeks. The tumor appeared irregular and the border of the mass was ill-defined in 3 and 4 weeks. The expression of VEGF enhanced gradually from 1wk to 4wks. There was no significant difference in the expression of VEGFR between the control group and treated group in 1 week. The expression of VEGFR in the neovascularity of the tumor gradually enhanced from 2 to 4 weeks, and its HE staining appeared more obviously than that of vessel endothelial cells around the tumor. Conclusion: The expressions of VEGF and VEGFR in the hypervascular hepatocellular carcinoma appear obviously. And their expressions may be closely associated with the growth, invasion and distant metastasis of the tumor.

【Key words】 Liver neoplasms Vascular endothelial growth factor Vascular endothelial growth factor receptor

对于恶性肿瘤来说,新生血管的形成与肿瘤的生长、局部浸润、远处转移密切相关。肿瘤不仅通过肿瘤血管从宿主得到丰富的营养,而且还要通过血管向宿主输出大量恶性细胞,导致肿瘤不断生长和转移。研究发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)不仅能提高血管的渗透性,还可通过血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)促进血管内皮细胞增生,形成新生血管。所以,VEGF 及其受体在肿瘤形成及发展中所起的作用倍受关注。肝癌血供阻断治疗在临床广泛应用,但尚存在不少有争议的问题。Lin 等指出经肝动脉栓塞近期疗效尚佳,但经 TAE 治疗的

远期生存率没有显著提高^[1]。其中肝癌复发的重要原因与新生的肿瘤血管形成间的关系密切。本研究重点观察原位种植肝癌的病理学改变与 VEGF 及其受体表达的变化,初步探讨肝癌复发与 VEGF 及其受体的关系。

材料与与方法

1. 模型的建立

裸鼠 25 只,鼠龄 8 周,雌雄不限,体重 18~22g,无菌环境下饲养及手术操作。25 只鼠分作 5 组,每组 5 只。试验组分别为正常对照组、种植后 1 周组、2 周组、3 周组和 4 周组。10g/l 戊巴比妥 50mg/kg 腹腔注射麻醉后,于右上腹切口,逐层分离暴露肝右叶,注入浓缩瘤细胞 0.08~0.1ml,平均细胞数 5×10^6 个,逐层缝合备用。

作者单位: 710038 西安,第四军医大学唐都医院放射科
作者简介: 杜滂(1974~),女,陕西咸阳人,硕士,主要从事腹部影像诊断工作。

2 标本与取材

血管造影后,立刻剪开裸鼠胸腔,暴露心脏,用 6 号针头由左心室进入主动脉,生理盐水 30ml 冲洗,40g/l 多聚甲醛 50ml 灌注固定后,取出肝脏置于 40g/l 多聚甲醛中保存。

3 血管造影

自小鼠尾静脉手推注入 76% 泛影葡胺 0.5ml, 1s 内注完,注射的同时开始拍片,拍片的速度为 4 帧/秒。

4 标本制作:将所需标本取出,放入 20g/l 蔗糖液中浸泡 24h,直至组织完全沉淀,冰冻切片将标本切片,厚度为 10 μ m,室温干燥后取一套组织切片 HE 染色。另取 3 套组织切片用 0.01mol/l kPBS 冲洗,置于含有 3g/l Triton X100 的 0.01mol/l kPBS 内 30min,再用 0.01mol/l kPBS 冲洗后加入 anti-VEGF, anti-KDR 或 anti-Flt-1 抗体,孵育 24h 后,依步骤加入二抗及显色剂。

结果判定:切片染色结果经 leica 图像分析仪检测强度,特异信号强度 $I = OD_{\text{背景区}} / OD_{\text{测定区}}$, $OD_{\text{背景区}}$ 为背景区平均光密度值, $OD_{\text{测定区}}$ 为测定区平均光密度值,用任一单位,从 0~225。I 值为 1,说明测定区信号强度与背景区相同,指示无特异性染色;I 值越大说明特异性染色越强。

5. 结果统计学处理

数据以均数士标准差表示,经正态性检验为服从正态分布,方差齐性,实验组与正常对照组行配对 t 检验,用本校统计教研室 SPSS 软件行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义。

结 果

1. 血管造影

自尾静脉注入对比剂后,对比剂经下腔静脉至心脏,主动脉、腹主动脉、肝动脉依次显影。正常组 5 例均显示肝动脉各级分支清晰,锐利,无扭曲及压迫征象。种植后 1 周组 5 例中,3 例显示与正常组基本相同,2 例可在肝右叶见到一小的类圆形低密度区,动脉期及静脉期均可见,未见明显瘤染色。种植后 2 周组中,2 例血管影像与正常组基本相同,2 例可见散在的小点状高密度影,1 例可见肝右前叶有一小团状瘤染色。种植后 3 周和 4 周中,2 例造影失败外,8 例肝内血管显影清楚,肝血管粗细不均,走行异常,可见多个团状瘤染色(图 1)。

2. 病理结果

大体病理:各组成瘤率均为 100%,1 周组肉眼难以分辨病灶,镜下可见聚集成团的瘤细胞;2 周组 5 例中 3 例肉眼可看到小的瘤结节影,直径约 0.5~3.0mm,数目 2~7 个;3 周组 5 例肉眼都可看到白色的瘤结节影,直径约 1~10mm;4 周组中瘤结节更大,其中直径最大 1 例达 16mm,分布更广泛和密集,相互间有融合,其中有 2 例肝脏明显变形变硬,此组裸鼠消瘦明显。

HE 染色结果:种植后 1 周组,光镜下可见瘤细胞散在,有些聚集成团,境界较清楚,未见明显包膜形成,聚集成团的瘤细胞主要集中在汇管区附近,瘤周肝细胞肿胀,可见少量巨噬细胞浸润,肝脏大体结构未见破坏。2 周组,光镜下可见瘤细胞团形状不规则,无包膜,肝脏结构部分被破坏,瘤周可见巨噬细胞浸润,有些血管分枝形成向瘤细胞团突起的芽突。3 周组可见多个瘤细胞团向四周浸润,分界不清,肝组织正常结构遭到破坏,血管中可见游走的瘤细胞。4 周组可见瘤细胞大片融合,其中可见大小不等的坏死区,肝脏正常结构严重破坏(图 2)。

3. VEGF 及其受体免疫组化结果

anti-VEGF 免疫组化结果:正常对照组 2 例可见 anti-VEGF 抗体的阳性染色。这些阳性染色主要集中在汇管区周围的巨噬细胞等,但染色较弱,其余 3 例未见阳性染色。种植后 1~4 周组中,anti-VEGF 染色逐渐上升,阳性反应主要集中在瘤细胞膜及细胞质中,3 周及 4 周组中 anti-VEGF 染色强阳性,其中有一坏死区周围瘤细胞 anti-VEGF 染色最深,瘤周肝细胞无染色或仅有极弱染色,3 周组及 4 周组与正常对照组相比有明显差别 ($P < 0.01$)。

anti-KDR 免疫组化结果:正常对照组中,肝血窦内皮细胞以及肝血管内皮细胞均呈阳性染色,染色部位位于细胞膜及细胞质中。种植后 1 周组与正常对照组相比未见差

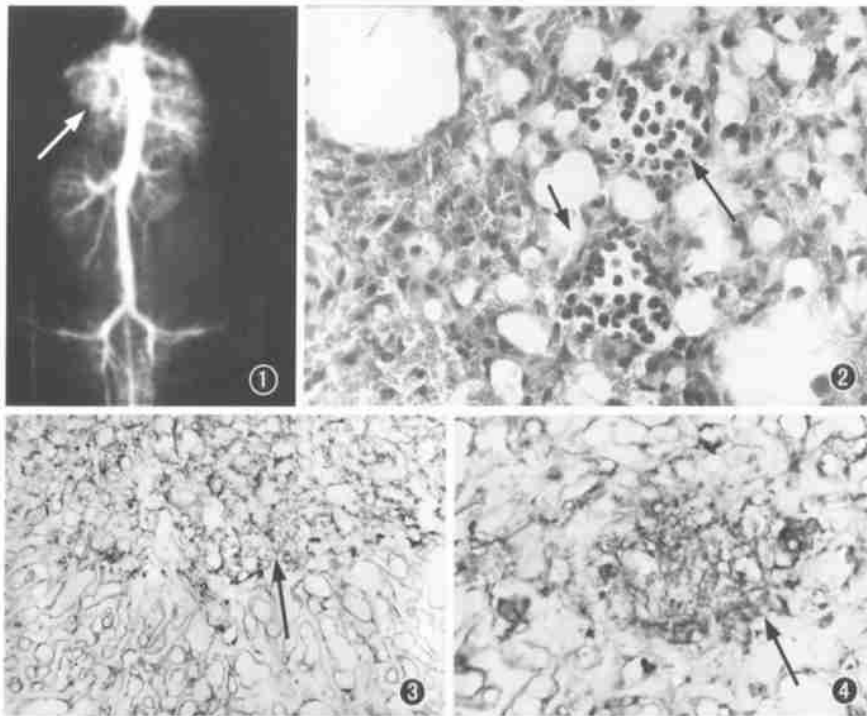


图 1 血管造影(4 周)肝内血管粗细不均,走行异常,可见多个大小不等的团状瘤染色(箭)。图 2 HE $\times 40$,瘤细胞种植后 2 周示瘤细胞聚集成团(箭),无包膜,肝脏结构部分被破坏。图 3 免疫组织化学染色 $\times 20$,瘤细胞种植后 3 周组 KDR 染色示:瘤血管内皮细胞染色重(箭),明显超过瘤周肝血窦内皮细胞。图 4 免疫组织化学染色 $\times 20$,瘤细胞种植后 3 周组 Flt-1 染色示:瘤血管内皮细胞染色重(箭),明显超过瘤周肝血窦内皮细胞。

异($P > 0.05$)。2周组中,肝血窦内皮细胞及肝小血管内皮细胞阳性染色较前略重,瘤灶内皮细胞可见阳性染色(图3),与正常对照组相比有差异($P < 0.05$)。3周组及4周组中,肝血窦内皮细胞及肝小血管内皮细胞阳性染色及瘤血管内皮染色进一步加重,瘤血管内皮细胞染色明显较瘤周血管内皮细胞重,部分瘤细胞亦可见阳性染色,与正常对照组相比有明显差异($P < 0.01$)。上述 anti-KDR 阳性表达均位于细胞膜及细胞质中。

anti-Flt-1 免疫组化结果:与 anti-KDR 免疫组化结果相比染色的程度,部位基本相同。正常对照组中,肝血窦内皮细胞以及肝血管内皮细胞均呈阳性染色。种植后1~4周肝血窦内皮细胞及肝小血管内皮细胞染色逐渐加深,瘤血管内皮细胞染色亦逐渐加深,并超过肝血窦内皮细胞(图4),部分瘤细胞染色阳性。Anti-Flt-1 阳性表达位于细胞膜及细胞质,3周组及4周组与正常对照组相比有明显差异($P < 0.01$)。

讨论

血管造影在临床上是一种能较早发现肿瘤的检查手段。本组试验中,血管造影的结果与肿瘤进展的程度成正相关。种植后2周即可观察到瘤染色,3周以上组血管造影均可明显观察到团状瘤染色,肿瘤生长的早期阶段对肝内血管影响较小时,血管造影不能有所显示。结合病理学检查,我们观察到血管造影的结果与 VEGF 的表达成正相关,种植后2周组始可明显见 VEGF 的表达,随着肿瘤的进展,VEGF 的表达迅速升高,血管造影结果显示多血供的癌结节 VEGF 的表达尤为明显。

本试验结果显示种植后1周组病理切片上可观察到大部分的瘤细胞集聚在肝血窦周围,境界清楚,肿瘤细胞的 VEGF 的表达较低;2周组可见境界不清的瘤细胞团及成芽状突起的新生血管;3周及4周组可见到肿瘤坏死区域以及血管中的瘤细胞,伴随上述病理改变。2~4周组 VEGF 表达逐渐增高,坏死区域周围的瘤细胞 VEGF 的表达高于其他瘤细胞。随着肿瘤的生长、发展,KDR 及 Flt-1 的表达逐渐上调。正常的肝血窦内皮及肝小血管内皮都可见 KDR 及 Flt-1 染色,2周组以后内皮细胞的染色逐渐加深,肿瘤血管内皮染色亦逐渐加深,而且瘤血管内皮细胞染色较肝血窦内皮细胞染色重。癌组织边缘区细胞的染色要强于中心区,部分无血管区域的癌细胞也有弱的 KDR 及 Flt-1 染色。通过对照肝癌不同生长时期的病理改变与 VEGF 的表达,我们认为肝癌的生长、浸润、转移与 VEGF 的关系极其密切。

正常组织细胞内有 VEGF 表达,VEGF 被认为是目前发现的作用最强、特异度最高的血管内皮生长因子之一,VEGF 的异常表达和肝癌的复发转移密切相关。有研究显示^[2],复发转移组 VEGF 表达阳性率高达 86.2%,显著高于无转移复发组。VEGF 产生的原因中缺氧被认为是一个重要的因素。Ladoux A 等认为组织内氧含量的降低是血管形成的首要原因,Shweiki D 和 Plate K 等^[3]研究人的胶质细胞瘤后,认为 VEGF 的表达随氧含量的降低而升高。Motohiro N 等^[4]认为低氧含量下人脐静脉内皮细胞明显增殖,可见 VEGF 是缺血缺氧下最基本的血管生成因子之一。肝癌在发展过程中对氧气及其他营养物质

具有相当大的依赖性。在肝癌形成的早期阶段,主要依靠门脉供血,所以可见种植后1周组的瘤细胞聚集在血窦及小血管周围。随着肿瘤细胞不断生长,不断地在局部浸润,向远处转移,肿瘤细胞对氧的需求不断增高,由于周围组织提供氧的能力有限,肿瘤细胞的氧紧张度增加,这可能导致 VEGF 合成增加,通过血管内皮细胞 VEGFR,促进新生血管形成。由于新生血管结构不完整及 VEGF 的强血管渗透作用,部分瘤细胞穿过血管壁进入血管内向远处转移。4周组中有1例瘤体大片坏死,血管造影显示瘤血管增生非常明显,且内皮细胞 VEGF 的表达很高。Takuji T 等^[5]曾报道过人肝癌的恶性程度与 VEGF 表达成正相关关系,据其研究报道,肿瘤的恶性程度越高、肿瘤越大,肿瘤细胞内 VEGF 的含量也就越高,其原因可能是因为恶性程度越高的肿瘤细胞对氧的需求量有关。

据报道^[6,7],VEGFR 的表达也受缺氧或缺氧依赖的条件诱导。但是与 VEGF 受缺氧直接诱导不一样,内皮细胞的 VEGF 受体不受缺氧的直接诱导,而是在缺氧条件下培养的细胞在自身产生的某些因子调控下,受体的表达才被上调。VEGFR 在肿瘤发展过程中亦具有重要的作用。研究表明,缺失编码 KDR 基因的小鼠胚胎内皮细胞不能分化,血管无法形成。缺失编码 Flt-1 基因的同源小鼠不抑制内皮细胞的分化,但所形成的血管功能严重受损。进一步研究^[8,9]发现 VEGF 诱导内皮细胞 VEGFR 激活后,既能引起细胞增殖效应,又能诱导细胞移动,在肿瘤新生血管形成和侵袭过程中具有重要的作用。另据报道^[10],VEGF、KDR 强阳性组微血管密度计数明显增高,肿瘤病人淋巴结转移组 VEGF、Flt-1、KDR 强阳性表达例数增多($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),证实了 VEGF 及其受体与肿瘤转移能力呈正相关。在肝癌血运阻断治疗中,肝癌区域内 2mm 以上的肝动脉被阻塞,大部分肝癌细胞急性缺氧坏死,但瘤周毛细血管网并未全部被阻塞,仍有部分血供存在,而且,3h 后坏死区的毛细血管便可开始再生,这可能是部分癌细胞残留的组织学基础。在癌灶大部分血供阻断后,残留的癌细胞及瘤周的部分肝细胞或间质细胞都处于缺氧状态,因而成为诱导 VEGF 大量产生原因之一。通过瘤细胞及瘤周细胞旁分泌及自分泌作用诱导内皮细胞 VEGF 受体表达升高,进一步改变了 VEGF 的生物学效应。血运阻断后,肿瘤细胞部分坏死,可导致细胞之间的粘附能力下降,这又为肿瘤细胞转移提供了基础。这一过程实际上是肿瘤与宿主相互作用的结果,一方面肿瘤刺激内皮细胞的增殖和迁徙,另一方面内皮细胞也通过自分泌及旁分泌功能刺激其自身、成纤维细胞甚至肿瘤细胞的增殖^[11,12]。而这种相互作用是通过肿瘤血管生成因子完成的。单纯的以血运阻断为主治疗并没有消除这种诱因,相反在某种程度上加剧了缺氧的程度,这也许可以解释肿瘤复发所用的时间明显短于原发肝癌形成所用时间的原因。

总之,肿瘤的持续生长和侵袭转移有赖于充足的微血管生成和血液供应,肿瘤细胞之间与基质细胞之间的沟通是通过包括各种生长因子、细胞因子、蛋白水解酶系统在内的复杂网络来实现的,这一过程的实现则与组织的微环境密切相关。针对肿瘤微血管生成而控制肿瘤的生长及转移将具有更重要的意义。

参考文献

- Lin DY, Lin SM. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterol Hepatology, 1997, 12(9): 5319-5323.
- 夏景林, 杨秉辉, 叶胜龙, 等. 原发性肝癌肿瘤血管密度及其表达的临床病理意义[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(6): 440-442.
- Shweiki D, Itin A, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis [J]. Nature, 1992, 359(6390): 843-845.
- Milauer B, Conghi MP, Plate PH, et al. Dominant negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many types cancers in vivo [J]. Cancer Res, 1996, 56(7): 1615-1620.
- Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, et al. p53, vessel count and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer [J]. Int J Cancer, 1998, 79(1): 34-38.
- Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis [J]. N Engl J Med, 1995, 333(26): 1757-1763.
- Saphir A. Angiogenesis: the unifying concept in cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(22): 1658-1659.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood island formation and vasculogenesis in FLK-1 deficient mice [J]. Nature, 1995, 376(6535): 62-66.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and vascular endothelial growth factor [J]. Cell, 1998, 92(6): 735-745.
- 陈江华, 王杰军, 何金, 等. 血管内皮生长因子及其受体在结肠癌中的表达及意义 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2000, 15(5): 472-477.
- 李春海, 李克勤. 肿瘤微血管生成机制与肿瘤侵袭和转移 [J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3): 181-183.
- Weidner N. Tumour vascularity as a prognostic factor in cancer patients, the evidence continues to grow [J]. Pathol, 1998, 184(2): 119-125.

(2001-12-04 收稿 2002-04-04 修回)

肺隔离症一例

• 病例报道 •

李良才 唐秉航

【中图分类号】R814.42, R563 【文献标识码】D 【文章编号】1000-0313(2002)06-0545-01

病例资料 患者,男,27岁。因体检胸片发现左下肺肿块行CT检查,自诉无胸部不适及呼吸道症状。

CT平扫:左下肺后基底段类圆形实性肿块,密度均匀,CT值35HU,边界尚清楚,横断面范围3.0cm×3.5cm,周围血管纹理明显增粗、增多,于肿块内侧隐约见一血管影与降主动脉相连(图1a);增强扫描及血管重建成像清晰显示肿块供血动脉来自降主动脉,并见分支血管附于肿块边缘(图1b、c),静脉回流至左下肺静脉,肿块本身无明显强化。CT诊断肺隔离症(叶内型)。

讨论 肺隔离症是一种肺的先天发育畸形,组织学上为一发育不良、结构紊乱的肺实质结构,无支气管进入,内含有发育不全的支气管壁的各种成分,通常为囊性或囊实性结构。其血供来自体循环,70%来自降主动脉^[1]。根据隔离肺与正常肺组织是否位于同一脏层胸膜内,分为肺叶内型和肺叶外型。影像上多数学者^[2,3]将肺隔离症的肺内CT改变分为3种类型:①含有气体和液体的囊肿或软组织肿块;②围绕囊肿或肿块周围的肺气肿

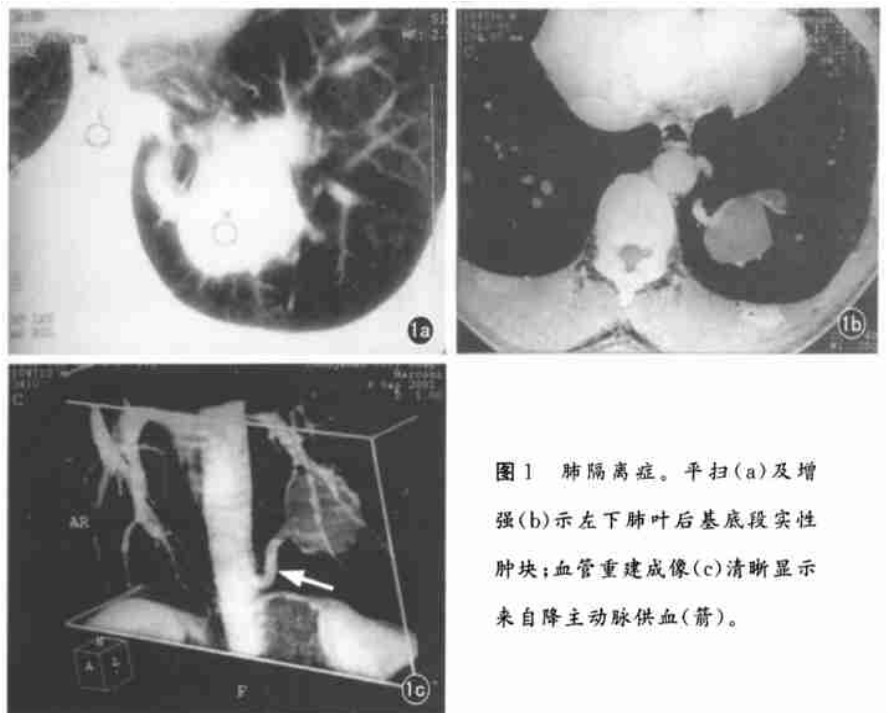


图1 肺隔离症。平扫(a)及增强(b)示左下肺叶后基底段实性肿块;血管重建成像(c)清晰显示来自降主动脉供血(箭)。

改变;③局限性肺多血管征。本例CT表现为左下肺后基底段实性软组织肿块,CT增强血管成像清晰、立体显示供血动脉来自降主动脉,影像表现典型。鉴别诊断上需考虑到支气管源性囊肿、先天性膈疝等。本病例血管成像由多层面螺旋CT重建获得,图像质量可与动脉造影媲美,极好地显示隔离肺的供血动脉,有效地为手术治疗提供解剖信息。

参考文献

- 李果珍. 临床CT诊断学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 305.
- 孙忠华, 严洪珍. 肺隔离症的影像诊断[J]. 中国医学影像学杂志, 1997, 5(1): 14-16.
- 阮俊德, 陈积贤, 陈丽英, 等. 肺隔离症的影像学诊断[J]. 中华放射学杂志, 1995, 29(1): 35-38.

(2002-03-04 收稿 2002-04-09 修回)

作者单位: 528403 广东, 中山市人民医院CT室

作者简介: 李良才(1970~), 男, 广东罗定人, 主治医师, 主要从事腹部影像诊断工作。