

胃癌组织中 Her-2、VEGF-C 的表达及意义

王哲近 麻忠武 陈 峰 潘步建 徐迈宇 金肖丹

摘 要 **目的** 检测表皮生长因子受体 2(HER-2)、血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在胃癌组织中的表达,并分析结果与临床病理之间的关系。**方法** 选取 50 例胃癌组织及 20 例癌旁正常胃组织标本,采用免疫组化方法检测 HER-2、VEGF-C 的表达,并分析其表达情况及临床参数之间的关系。**结果** 50 例胃癌组织中 HER-2、VEGF-C 蛋白的阳性表达率为 38% (19/50)、48% (24/50);在胃正常组织中均无表达;HER-2、VEGF-C 蛋白表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径、分化程度差异均无统计学意义($P>0.05$);而与肿瘤浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移差异有统计学意义($P<0.05$);HER-2 与 VEGF-C 在胃癌组织中的表达呈正相关($r_s=0.353, P<0.05$)。**结论** HER-2、VEGF-C 在胃癌组织中均存在表达,两者与肿瘤的浸润与转移密切相关。

关键词 胃癌 表皮生长因子受体 2 血管内皮生长因子 C

中图分类号 R735 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.037

Expression and Significance of Her-2 and VEGF-C in Human Gastric Carcinoma Tissues. Wang Zhejin, Ma Zhongwu, Chen Feng, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, Wenzhou Central Hospital, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To determine the expression of human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) and vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in gastric carcinoma tissues, and analyze the results and the relationship with clinical pathologic. **Methods** Immunohistochemical method was performed to detect the expressions of HER-2 and VEGF-C in 50 samples of gastric carcinoma tissues and 20 samples of normal gastric mucosal tissues. Then we analyzed their relationships with clinicopathologic parameters. **Results** The positive rate of HER-2, VEGF-C in the 50 cases primary gastric cancer tissues were 38% (19/50) and 48% (24/50). However, the expression of HER-2, VEGF-C was not found in nearby gastric tissues. No correlation was found between expression levels of HER-2 and VEGF-C in gastric carcinoma tissues with sexes, ages, tumor locations, size, differentiation type. The positive expression rate of HER-2 and VEGF-C was correlated to depth of invasion, TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis of gastric cancer patients ($P<0.05$). In gastric carcinoma tissues, the expression of HER-2 and VEGF-C have positive correlation ($r_s=0.353, P<0.05$). **Conclusion** Expression of HER-2, VEGF-C was observed in gastric cancer. Both of them correlate with the presence of cancer invasion and metastasis.

Key words Gastric cancer; Epidermal growth factor 2; Vascular endothelial growth factor-C

胃癌是全世界及我国常见的恶性肿瘤,其致死率仍居恶性肿瘤的第 2 位,仅次于肺癌,是全球公共健康的巨大危险,胃癌的发生和发展仍是目前研究的重点之一。本研究应用免疫组化方法检测并分析血管内皮生长因子 C (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 和表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 在胃癌组织和正常胃黏膜组织的表达情况与临床病理之间的联系,探讨其临床应用价值,为胃癌的临床诊断与治疗提供参考依据。

资料与方法

1. 临床资料:收集温州市中心医院外科 2011 年 8 月 ~

2013 年 2 月期间手术切除的胃癌标本 50 例。入选标准:①由资深病理科医师确诊为原发性胃癌标本;②有完整的临床病理资料;③术前未进行放疗、化疗或免疫等治疗。其中,男性 34 例,女性 16 例;年龄 ≥ 60 岁 40 例, <60 岁 10 例;肿块位于贲门胃底(上部)20 例,位于胃体 12 例,位于胃窦、幽门 18 例;肿块长径 ≥ 5 cm 30 例, <5 cm 20 例;高、中分化癌 27 例,低、未分化癌 23 例;侵及黏膜+肌层 17 例,侵及浆膜层及浆膜外 33 例;TNM I + II 期 21 例, III + IV 期 29 例;有淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 16 例;有远处转移 28 例,无远处转移 22 例。同时收集同期由资深病理科医师确诊的 20 例距肿瘤灶 5cm 以上正常胃壁组织标本,作为对照组。

2. 试剂:兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体、鼠抗人 HER-2 单克隆抗体均购于北京中杉金桥生物技术有限公司;试剂盒选用即用型免疫组化(IHC)二步法 EliVisionTM 广谱染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

3. 实验方法: (1) VEGF - C、Her - 2 检测: 所有标本经 10% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度为 4 μ m, 采用 EliVision™ 免疫组化方法, 切片常规脱蜡和水化后, 抗原修复, 切片浸入 pH 6.0 浓度 0.01mol/L 柠檬酸钠缓冲液中, 放置高压锅中, 先中高火加热 7min, 停 3min, 再中高火加热 3min 冷却至室温。用 PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 3min; 每张切片加 1 滴 3% H₂O₂ 室温下孵育 10min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性, PBS 冲洗 3 次, 每次 3min; 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴一抗, 室温下孵育 60min; PBS 冲洗 3 次, 每次 5min, 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴聚合物增强剂 (试剂 A), 室温下孵育 10min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3min; 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴酶标记抗兔聚合物 (试剂 B), 室温下孵育 10min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3min; 除去 PBS 液, 每张切片加 1 滴新鲜配制的 DAB 溶液显色, 自来水冲洗, 苏木素复染, 盐酸乙醇分化。最后脱水、透明、封片、镜检。以 PBS 替代一抗行阴性对照染色, 试剂公司提供的已知阳性切片为阳性对照。(2) 结果判断: 由两个病理学医师在未知临床病理资料情况下读取结果, 并协商取得统一。肿瘤细胞出现棕黄色颗粒为阳性标记, VEGF - C 主要为胞质染色阳性, HER - 2 主要为胞质、胞膜。评判标准: 有棕褐色或棕黄色着色为阳性。每张组织切片随机选取 5 个高倍镜视野, 计数 500 个细胞, 根据切片中阳性细胞所占同类细胞总数百分比和阳性标记细胞着色强度的差异, 分别记为 -、+、++、+++ 4 个等级, 即 <5% 为阴性 (-), 5% ~ 25% 为弱阳性 (+), 25% ~ 50% 为阳性 (++) , 50% 以上为强阳性 (+++)。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 15.0 统计软件行统计学处理, 采用卡方检验, Spearman 等级相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HER - 2、VEGF - C 蛋白在胃癌及癌旁正常胃组织中的表达: 见图 1 ~ 图 4。免疫组化结果显示, HER - 2、VEGF - C 在胃癌组织中均有表达, HER - 2 见于胞膜及胞质表达, VEGF - C 见于胞质表达。在 50 例胃癌组织中 HER - 2、VEGF - C 阳性表达率分别为 38% (19/50)、48% (24/50), 20 例正常胃黏膜

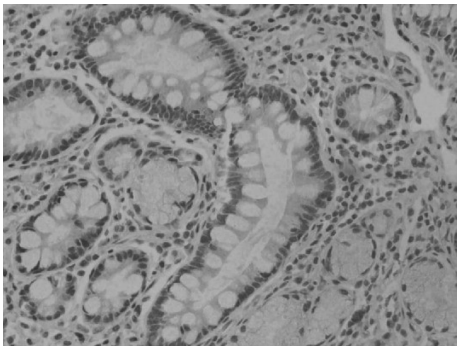


图 1 HER - 2 在正常胃黏膜组织中阴性表达 (EV 法, $\times 400$)

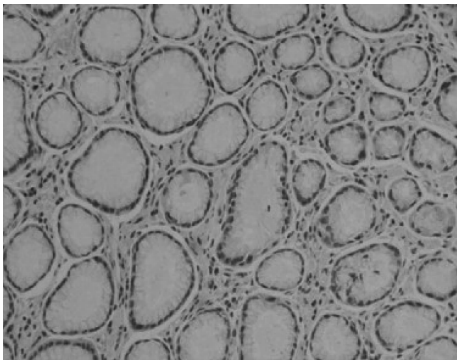


图 2 VEGF - C 在正常胃黏膜组织中阴性表达 (EV 法, $\times 200$)

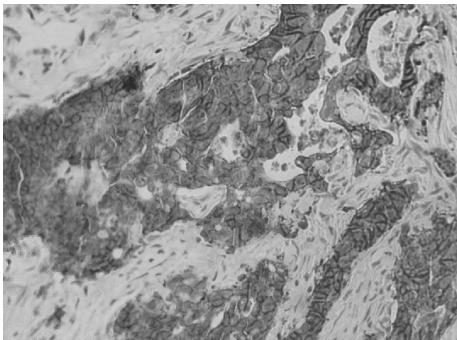


图 3 HER - 2 在胃癌中阳性表达 (EV 法, $\times 400$)

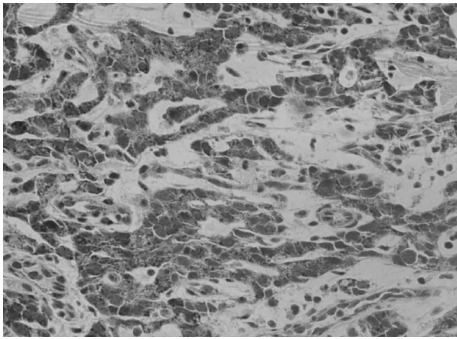


图 4 VEGF - C 在胃癌中阳性表达 (EV 法, $\times 400$)

组织中 HER - 2、VEGF - C 均无表达。上述两组间 HER - 2 和 VEGF - C 阳性表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 胃癌组织与癌旁正常组织中的 HER - 2 和 VEGF - C 阳性率比较

观察指标	分组	癌组织	癌旁正常组织	χ^2	P
Her - 2	(+)	19	0	3.944	0.047
	(-)	31	20		
VEGF - C	(+)	24	0	6.125	0.013
	(-)	26	20		

2. HER-2、VEGF-C 蛋白的表达与胃癌的临床病理参数之间的关系:HER-2、VEGF-C 蛋白的表达与患者的性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤直径、分化程度均无明显相关性($P>0.05$);而与肿瘤浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移有关($P<0.05$),差异有统计学意义(表 2)。

表 2 50 例胃癌患者胃癌组织中 HER-2、VEGF-C 表达与临床病理特征间的相关性

参数	n	HER-2				VEGF-C			
		阳性	%	χ^2	P	阳性	%	χ^2	P
性别									
男性	34	12	35.3	0.330	0.566	16	47.1	0.038	0.846
女性	16	7	43.8			8	50.0		
年龄(岁)									
<60	10	3	30.0	0.048	0.827	3	30.0	0.846	0.358
≥60	40	16	40.0			21	52.5		
肿块部位									
上部	20	7	35.0	0.151	0.927	9	45.0	0.120	0.942
中部	12	5	41.7			6	50.0		
下部	18	7	38.9			9	50.0		
肿瘤直径(cm)									
<5	20	7	35.0	0.127	0.721	7	35.0	2.257	0.133
≥5	30	12	40.0			17	56.7		
分化程度									
高中分化	27	9	33.3	0.543	0.461	11	40.7	1.239	0.266
低、未分化	23	10	43.5			13	56.5		
浸润深度									
黏膜+肌层	17	3	17.7	4.529	0.033	4	25.53	6.179	0.013
侵及浆膜层及浆膜外	33	16	48.5			20	60.61		
TNM									
I+II	21	4	19.0	5.520	0.019	5	23.81	8.489	0.004
III+IV	29	15	51.7			19	65.52		
淋巴结转移									
无	16	2	12.5	6.494	0.011	4	25.1		
有	34	17	50.0			20	58.8		
远处转移									
无	22	4	18.2	6.549	0.010	5	22.73	10.053	0.002
有	28	15	53.6			19	67.86		

3. 胃癌组织中 HER-2 与 VEGF-C 表达的相关性分析:胃癌组织间 HER-2 与 VEGF-C 表达 Spearman 等级相关分析结果显示,HER-2 与 VEGF-C 表达 Spearman 等级相关系数,两者在胃癌中的表达呈正相关($r_s=0.353,P<0.05$,表 3)。

表 3 HER-2、VEGF-C 在胃癌组织表达的相关性(n)

HER-2	VEGF-C			
	-	+	++	+++
-	20	8	2	1
+	3	3	2	1
++	2	2	2	1
+++	1	1	1	0

讨 论

HER-2 基因又称 C-erbB-2 基因,是人类表皮生长因子家族的第 2 个成员,定位于人染色体 17q21,编码一种相对分子质量为 185000U 的跨膜蛋白^[1]。HER-2 的表达在恶性肿瘤的发生和发展中起重要作用,并对恶性肿瘤的预后和治疗产生影响^[2,3]。本研究发现 HER-2 在胃癌组织有较高的表达,表达率为 38% (19/50),与正常胃黏膜组织的表达相比差异有统计学意义($P<0.05$),这说明 HER-2 表达与肿瘤有关,且 HER-2 的激活参与了胃癌的发生、发展;此外 HER-2 与胃癌浸润深度、TNM 分期、淋巴结转移、远处转移有关($P<0.05$),提示 HER-2 在恶性肿瘤的形成、增殖、转移等过程中起重要作用;且 HER-2 在淋巴结转移的癌组织中的表

达 50% (17/34) 显著高于无淋巴结转移的癌组织,与文献报道基本相符,这表明 HER-2 在淋巴结转移及远处转移过程中被激活并可能参与胃癌的浸润及淋巴结转移^[4]。

VEGF-C 作为一种较新的 VEGF 家族成员,在恶性肿瘤区域淋巴结转移的重要作用日益受到人们的关注。林媛媛等^[5]研究发现胃癌组织中 VEGF-C 表达阳性率达 61.7%,较正常胃组织的表达率显著升高,提示 VEGF-C 表达升高促进了胃癌细胞向周围组织器官浸润,有利于出现淋巴转移。本研究采用免疫组化法发现胃癌患者的 VEGF-C 阳性表达率为 48% (24/50),与国外文献报道胃癌 VEGF-C 阳性率为 51.7% 基本相符^[6]。本研究中 20 例正常胃黏膜均无阳性表达,两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$),这说明 VEGF-C 在恶性肿瘤中高度表达。本研究中淋巴结阳性 VEGF-C 阳性率为 58.82% (20/32),众多的国内外研究一致认为,胃癌 VEGF-C 表达与淋巴结转移密切相关,其可作为判断肿瘤预后的独立指标^[7-10]。

本研究结果显示,HER-2 和 VEGF-C 与胃癌的浸润、临床分期及淋巴结的转移情况有关,提示 HER-2 和 VEGF-C 蛋白可能参与了肿瘤的生长过程,参与到肿瘤的分化过程中,进一步参与肿瘤的进展。HER-2 是细胞来源的癌基因,其具有酪氨酸酶活性,表达产物可模拟生长因子并通过自分泌生长因子环路刺激自身的生长,在受到某些致癌因素的作用后,其结构或表达失控而被激活,转而具有肿瘤转化活性,激活后的 HER-2 增加与细胞转化有关的酪氨酸酶的活性,可促使细胞发生恶性转化,导致肿瘤的深部浸润和转移^[11]。VEGF-C 主要作用是诱导淋巴管内皮细胞增殖、迁移,增加淋巴管的通透性,其在恶性肿瘤淋巴管的形成中也起着重要作用^[12]。由于 VEGF-C 高表达是很强的淋巴管生成的促进因子,本研究通过 Spearman 等级相关分析显示胃癌组织中 HER-2 与 VEGF-C 表达强度呈正相关,进而证实了 HER-2 对胃癌中淋巴管生成的促进作用,HER-2

和 VEGF-C 可能作为链式作用,促进肿瘤的发展,对其关系的研究将有助于判断胃癌进展的机制。

综上所述,本研究检测胃癌组织中 HER-2、VEGF-C 的表达,发现两者与肿瘤的浸润与转移密切相关,且两者表达强度呈正相关,这有助于临床预测胃癌侵袭性及预后,并为分子靶向治疗药物在胃癌的应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- 1 任涛文,吴静,周永宁,等. HER-2 在胃癌及其淋巴结组织中表达的临床意义[J]. 第四军医大学学报,2009,30(21):2323-2326
- 2 Kong YC, Jacob JB, Flynn JC, *et al.* Autoimmune thyroiditis as an indicator of autoimmune sequelae during cancer immunotherapy[J]. *Autoimmun Rev*,2009,9(1):28-33
- 3 Chua TC, Merrett ND. Clinicopathologic factors associated with HER2 positive gastric cancer and its impact on survival outcomes - A systematic review[J]. *Int J Cancer*,2012,13(3):2845-2856
- 4 张银华,马晓梅,赵峰,等. 胃癌中 HER-2 蛋白的表达及其临床意义[J]. 新疆医科大学学报,2014,37(8):1033-1036
- 5 林媛媛,张艳美. 血管内皮生长因子-C 在胃癌中的表达及意义[J]. 潍坊医学院学报,2013,35(5):397-399
- 6 Ueda M, Terai, Kumagai K, *et al.* vascular endothelial growth factor cexpression is closely related to invasion phenotype in gynecological tumor cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 82(1): 162-166
- 7 胡逸人,郑志强. 早期胃癌组织中 VEGF-C 表达与淋巴结微转移关系的研究[J]. 浙江医学,2012,34(3):190-194
- 8 吴生华,俞继卫,郑林海,等. CNTN-1、VEGF-C 和 VEGFR-3 在胃癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国普外基础与临床杂志,2011,18(2):142-148
- 9 Ozmen F, Ozmen MM, Ozdemir E, *et al.* Relationship between LYVE-1, VEGFR-3 and CD44 gene expressions and lymphatic metastasis in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*,2011,17(27):3220-3228
- 10 李锐,唐秀芬,张彬彬. 胃癌患者血清及癌组织中血管内皮生长因子-C 水平与肿瘤淋巴结转移的关系[J]. 中华消化内镜杂志,2013,30(1):50-53
- 11 孙鑫鑫,王超群,黄必飞,等. 胃癌中表皮生长因子受体 2 蛋白的表达及其临床意义[J]. 浙江医学,2014,36(2):127-129
- 12 Chen JC, Chang YW, Hong CC, *et al.* The role of the VEGF-C/VEGFRs axis in tumor progression and therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2012,14(1): 88-107

(收稿日期:2014-10-21)

(修回日期:2014-11-18)