

参考文献

- 1 Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neutroprotection[J]. *Cardiovas Res*, 2004, 63 (2): 208 - 216
- 2 杨巍, 蔡彦, 梅育嘉, 等. 促红细胞生成素治疗急性心肌梗死的研究进展[J]. *中国全科医学*, 2010, 12(3): 1360 - 1363
- 3 Garg K, Yadav HN, Singh M, *et al.* Mechanism of cardioprotective effect of erythr - opoietin - induced preconditioning in rat heart[J]. *Indian J Pharmacol*, 2010, 42(4): 219 - 223
- 4 余思, 何晓顺, 马毅. 改良大鼠腹部心移植模型的制作[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2008, 40(3): 327 - 329
- 5 Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, *et al.* Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome C release after cardiac cold ischemia and reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286 (5): 1633 - 1641
- 6 张薇薇, 马康华. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2012, 23(4): 250 - 252
- 7 陈旻, 明腾. 心肌缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. *山东医药*, 2014, 54(41): 98 - 100
- 8 赵冠聪. 氧自由基与心肌缺血再灌注损伤[J]. *医学信息*, 2013, 26 (2 上): 337 - 339
- 9 田毅, 柳培雨, 田国刚. 异氟醚和片托普利联合预处理对兔心肌缺血再灌注心肌酶学的影响[J]. *局解手术学杂志*, 2013, 5(22): 466 - 471
- 10 Bayram E, Atalay C. Identification of the culprit artery involved in inferior wall acute myocardial infarction using electrocardiographic criteria[J]. *Int Med Res*, 2004, 32(1): 392 - 411
- 11 Lu MJ, Chen YS, Huang HS, *et al.* Erythropoietin alleviates post - ischemic injury of rat hearts by attenuating nitrosative stress[J]. *Life Sci*, 2012, 90(19): 776 - 784
- 12 Talan MI, Latini R. Myocardial infarction: cardioprotection by erythropoietin[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 9(82): 265 - 302
- 13 Shen Y, Wang Y, Li D, *et al.* Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates heart ischemia - reperfusion injury in rats by suppressing the systemic inflammatory response[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(5): 1595 - 1597
- 14 吴锦波, 吴平生. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞凋亡[J]. *医学综述*, 2011, 17(19): 2961 - 2963
- 15 陈宇, 张露萍, 石艳葵, 等. 心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡的分子机制[J]. *西南军医*, 2012, 14(6): 888 - 891
- 16 孙宇, 陈建. 细胞凋亡与心肌缺血再灌注损伤研究[J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2009, 10(1): 34 - 45

(收稿日期: 2015 - 01 - 19)

(修回日期: 2015 - 02 - 03)

胃癌组织中 LKB1 和 VEGF - C 的表达及其意义

李利义 罗 越 周玲玲 林海鸿 卢明东 郑志强

摘 要 **目的** 探讨 LKB1 和 VEGF - C 在胃癌中的表达及临床意义。**方法** 应用免疫组化方法, 检测 LKB1 和 VEGF - C 在人胃癌组织中的表达, 同时对其与胃癌临床病理因素的关系进行统计学分析。**结果** LKB1 在胃癌组织中高表达率为 27.1%, 显著低于正常组织; VEGF - C 在胃癌组织中高表达率为 67.14%, 显著高于正常组织; 而且, LKB1 表达与 VEGF - C 表达呈显著负相关($r = 0.736, P = 0.000$)。胃癌组织中 LKB1 和 VEGF - C 的表达水平与肿瘤的组织分化程度、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期显著相关($P < 0.05$)。**结论** LKB1 和 VEGF - C 有望成为胃癌分子诊断和病期评估的标志之一。

关键词 LKB1 VEGF - C 胃癌 临床病理因素**中图分类号** R735**文献标识码** A**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.022

Expression of LKB1 VEGF - C in Gastric Cancer and Its Significance. Li Liyi, Luo Yue, Zhou Lingling, *et al.* Department of gastrointestinal surgery, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of LKB1 and VEGF - C in gastric cancer and its clinical significance. **Methods** The expression of LKB1 and VEGF - C in human gastric cancer were detected by immunohistochemistry. The relationship between expression of LKB1 and VEGF - C and the clinicopathological factors was statistically analyzed. **Results** The expression rate of LKB1 in gastric cancer was 27.1%, and it was significantly lower than that of normal tissue; The expression rate of VEGF - C in gastric cancer was 67.14%, and it was significantly higher than normal tissue. Meanwhile, the expression of LKB1 was negative consistent with the expression of VEGF - C ($r = 0.736, P = 0.000$). The expression levels of LKB1 and VEGF - C were closely correlated with histological cellular differentiation, invasion depth, lymph node metastasis and TNM stage ($P < 0.05$). **Conclusion** LKB1 and VEGF - C expressions may

基金项目: 温州市科技计划基金资助项目(Y20130266)

作者单位: 325027 温州医科大学附属第二医院育英儿童医院胃肠外科(李利义、罗越、林海鸿、卢明东、郑志强), 病理科(周玲玲)

provide an evidence for molecular diagnosis and stage evaluation of gastric cancer.

Key words Liver kinase B1; Vascular endothelial growth factor C; Gastric carcinoma; Clinicopathological factors

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤,居肿瘤相关致死率第2位^[1]。胃癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多基因异常的累积过程,其中抑癌基因突变导致其表达失活是胃癌发生、发展的重要机制之一^[2,3]。LKB1(liver kinase B1)是一种常见的抑癌基因,主要通过调控细胞的代谢以及通过使细胞周期阻滞在G₁期而抑制细胞增殖、促进细胞凋亡等途径抑制癌症的发生^[4]。除PJ综合征(Peutz-Jeghers syndrome)外,LKB1的基因突变与肺腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌等癌症的发生有关。血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)可以促进新生血管形成,新生血管为肿瘤生长提供营养,并间接促进肿瘤细胞增殖,而且VEGF-C可以促进淋巴管内皮细胞增殖分化并诱导淋巴管生成^[5]。本研究应用免疫组化方法检测人胃癌中LKB1和VEGF-C的表达,并结合临床病理资料进行分析,探讨LKB1与VEGF-C在胃癌中的作用及相互关系。

材料与方法

1. 材料:收集笔者医院外科2012年1月~2013年6月间手术治疗的胃癌患者70例,其中男性39例,女性31例,患者年龄37~81岁,中位年龄63岁,所有患者术前均经病理学证实,均未接受放疗或化疗。胃癌分期依据美国癌症联合委员会(AJCC)2010年TNM分期,每份标本于术后10min内取材于肿瘤组织及正常胃黏膜组织(距肿瘤组织边缘>5cm),全部标本取材后迅速置于-80℃冰箱保存备用。

2. 试剂:免疫组织化学SP试剂盒购自德国宝灵曼公司。兔抗人VEGF-C试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品。鼠抗人LKB1单克隆抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司。其他常规试剂均为国产分析纯。

3. 方法:采用S-P法进行免疫组化染色。所有标本经10%甲醛固定,常规石蜡包埋后制备5μm厚连续切片。石蜡切片脱蜡,以微波枸橼酸盐进行抗原修复,DAB显色,苏木精复染,脱水,透明封片,显微镜下观察,操作过程中严格质控。用已知的阳性切片作为阳性对照,用PBS代替一抗,作为阴性对照。

4. 结果判定标准:在组织切片中LKB1阳性细胞主要表现为细胞核和(或)细胞质染为棕黄色,VEGF-C阳性细胞主要表现为细胞质和(或)细胞膜染为棕黄色。免疫染色的结果由两位病理科医生检查。每个样本随机选择5个高倍视野,评估染色强度和阳性细胞的百分比。染色范围被半定量的分为5个等级,依据阳性细胞的百分比:0级(≤5%阳性细胞);1级(6%~25%阳性细胞);2级(26%~50%阳性细胞);3级(51%~75%阳性细胞);4级(>75%阳性细胞)。染色强度

也分为半定量的0~3分:0分(阴性),1分(弱阳性),2分(中度阳性),3分(强阳性)。两位病理科医生讨论和仔细反复阅片后,为每个样本分配一个一致的分数。强度和百分数的得分相乘,得到最终的染色分数:- (0分),+ (1~4分),++ (5~8分),+++ (9~12分)。统计分析的时候,-和+归为低表达,++和+++归为高表达。

5. 统计学方法:应用SPSS 16.0统计软件对实验数据进行分析。率的比较选择 χ^2 检验,相关性检验采用Spearman等级相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 胃不同组织中LKB1和VEGF-C的表达情况:LKB1阳性表达表现为细胞核和(或)细胞质染为棕黄色(图1),VEGF-C阳性表达表现为细胞质和(或)细胞膜染为棕黄色(图2)。在胃正常组织中,LKB1蛋白高表达率为88.6%(62/70)。在70例胃癌组织中,有19例LKB1高表达,表达率为27.1%,两者差异有统计学意义($P<0.01$)。在胃正常组织中,VEGF-C蛋白高表达率为8.57%(6/70)。在70例胃癌组织中,有47例VEGF-C高表达,表达率为67.14%。两者差异有统计学意义($P<0.01$)。

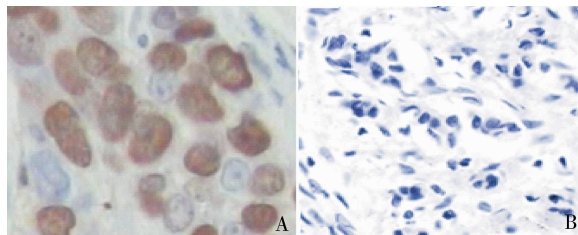


图1 LKB1在胃癌中的表达(免疫组化染色,×400)

A. 阳性;B. 阴性

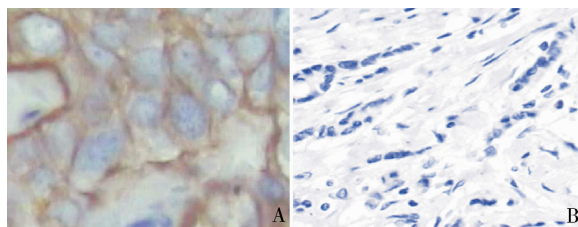


图2 VEGF-C在胃癌中表达(免疫组化染色,×400)

A. 阳性;B. 阴性

2. LKB1和VEGF-C表达与胃癌临床病理因素的关系:胃癌组织中LKB1和VEGF-C的表达水平与组织分化程度、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期显著相关($P<0.05$),而与患者性别、年龄及肿瘤直径之间差异无统计学意义($P>0.05$),详见表1。

表 1 LKB1 和 VEGF - C 表达与胃癌临床病理因素的关系

组别	n	LKB1		P	VEGF - C		P
		低表达	高表达		低表达	高表达	
性别							
男性	39	29	10	>0.05	12	27	>0.05
女性	31	22	9		11	20	
年龄(岁)							
<70	44	33	11	>0.05	13	31	>0.05
≥70	26	18	8		10	16	
肿瘤直径(cm)							
>5	29	21	8	>0.05	11	18	>0.05
<5	41	30	11		12	29	
组织分化							
高分化及中分化	38	22	16	0.002	19	19	0.001
低分化及印戒	32	29	3		4	28	
浸润深度							
T ₁ + T ₂	25	13	12	0.003	12	13	0.044
T ₃ + T ₄	45	38	7		11	34	
淋巴结转移							
无	24	10	14	0.000	13	11	0.006
有	46	41	5		10	36	
TNM 分期							
Ⅰ期 + Ⅱ期	27	12	15	0.000	14	13	0.007
Ⅲ期 + Ⅳ期	43	39	4		9	34	

3. 胃癌组织 LKB1 表达与 VEGF - C 表达之间的相关关系:经 *Spearman* 系数检验分析显示,胃癌组织 LKB1 表达与 VEGF - C 表达呈显著负相关($r = 0.736, P = 0.000$),差异有统计学意义(表 2)。由此推测,LKB1 可能通过调控 VEGF - C 的表达而在胃癌中发挥重要作用。

表 2 胃癌组织 LKB1 表达与 VEGF - C 表达的关系

LKB1	VEGF - C		合计
	高表达	低表达	
高表达	2	17	19
低表达	45	6	51
合计	47	23	70

讨 论

抑癌基因突变导致其表达失活是胃癌发生、发展的重要机制之一,是目前研究的热点。LKB1 是 1998 年首次从 PJ 综合征患者中发现的抑癌基因,LKB1 染色体定位于 19p13.3,整个基因跨度为 23kb,包括 10 个外显子和 11 个内含子,编码一种丝氨酸 - 苏氨酸蛋白激酶。

LKB1 可以调解细胞的增殖、迁移和分化,在多种肿瘤的发病及转归中扮演重要角色^[6]。LKB1 在肺癌发生、发展、分化和转移中起着非常重要的作

用^[7,8],有研究报道,LKB1 的功能缺失或突变失活与 1/3 的肺腺癌有关^[9]。Contreras 等^[10]发现:在鼠模型中 LKB1 基因突变导致的 LKB1 表达下调可以导致子宫内膜样腺癌的发生,而且 LKB1 表达下调促进了子宫内膜癌的高侵袭性。本研究发现,胃正常组织中 LKB1 蛋白高表达率为 88.5%,胃癌组织中 LKB1 高表达率为 27.1%,两者差异有统计学意义,提示 LKB1 表达下调与胃癌的发生有关。

VEGF - C 是新生血管形成的重要调控因子,能特异性作用于血管内皮细胞,促进内皮细胞增殖、增加血管通透性,诱导肿瘤血管生成,而且,VEGF - C 还可以通过与淋巴管内皮细胞上的 VEGF 受体结合,增加淋巴管的通透性,促进淋巴细胞的增生,诱导淋巴管的生成^[11]。本实验结果显示,胃正常组织中 VEGF - C 的高表达率为 8.57%,胃癌组织 VEGF - C 的高表达率达 67.14%,差异有统计学意义,提示 VEGF - C 在胃癌的发生、发展中起关键作用。

分析 LKB1 和 VEGF - C 的表达与胃癌临床病理因素的关系发现:低分化及印戒细胞的胃癌组织的 LKB1 的高表达率明显低于高分化及中分化者,并且随着胃癌的浸润深度、淋巴结转移、临床分期的增加,LKB1 的高表达率也显著降低,提示 LKB1 的表达下调可能促进胃癌的进展及淋巴结转移;VEGF - C 的

表达水平与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴转移及 TNM 分期密切相关。以上结果提示 LKB1 和 VEGF - C 的检测有望成为胃癌分子诊断和病期评估的标志之一。

Ylikorkala 等^[12]报道 LKB1 基因缺失可导致小鼠胚胎血管发育异常,胚胎成纤维细胞高表达 VEGF,提示 LKB1 可能通过某种机制调控 VEGF 的表达。程忠强等^[13]报道,LKB1 和 VEGF - C 在鼻咽癌中的表达呈相反趋势。笔者研究了胃癌组织中 LKB1 和 VEGF - C 表达的相关性,实验结果经 Spearman 等级相关分析表明两者显著负相关,说明抑癌基因 LKB1 可能通过调控 VEGF - C 的表达而起作用。

Liang 等^[6]转染 LKB1 至 A549 肺癌细胞系后,发现 LKB1 的高表达通过降低转录因子 SP1 (specificity protein 1) 的表达和活性导致 VEGF 的表达下调,从而抑制肺癌细胞的侵袭能力。Safe 等^[14]研究发现 LKB1 基因突变所致的功能缺失,导致了促进肺癌新生血管形成的 VEGF 及其转录因子 SP1 表达水平的上调,从而促进了肿瘤的转移。臧远胜等^[15]应用巢式 PCR 方法,构建 LKB1 真核表达载体,检测肺癌细胞中 LKB1 的表达,然后利用 siRNA 技术干扰 SP1 的表达,结果显示:SP1 参与 LKB1 基因对 VEGF - C 的表达调控,证实了 LKB1 通过负调控转录因子 SP1 的表达来调控 VEGF 的表达。VEGF 基因的近端富含 GC 序列,是转录因子 SP1 的顺式作用原件,激活的 SP1 能上调 VEGF 的表达。LKB1 具有丝/苏氨酸激酶活性,转录因子 SP1 可能是 LKB1 的磷酸化底物,磷酸化的 SP1 转录活性增强,从而促进 VEGF 转录和表达。

综上所述,联合检测 LKB1 和 VEGF - C 的表达,有助于预测胃癌的发生、发展及预后。下一步本课题组将构建 LKB1 的真核表达载体并以脂质体法转染胃癌细胞株,使 LKB1 基因获得性表达,从而控制肿瘤的进展,这可能成为抗肿瘤治疗的新靶点。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011,61:69 - 90

- 2 Ushijima T, Nakajima T, Maekita T. DNA methylation as a marker for the past and future[J]. Gastroenterol, 2006,41(5):401 - 407
- 3 Zavala GL, Luengo JV, Ossandon CF, *et al.* Hierarchical clustering analysis to detect associations between clinical and pathological features of gastric tumors and hypermethylation of suppressor genes[J]. Rev Med Chil, 2007,135(1):17 - 25
- 4 Tiainen M, Ylikorkala A, Makela TP. Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999,96(16):9248 - 9251
- 5 Detoraki A, Staiano RI, Granata F, *et al.* Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009,123(5):1142 - 1149
- 6 Liang X, Li ZL, Jiang LL, *et al.* Suppression of lung cancer cell invasion by Lkb1 is due to the downregulation of tissue factor and vascular endothelial growth factor, partly dependent on SP1[J]. Int J Oncol. 2014,44(6):1989 - 1997
- 7 Osoegawa A, Kometani T, Nosaki K, *et al.* LKB1 mutations frequently detected in mucinous bronchioloalveolar carcinoma[J]. Jpn J clin Oncol, 2011,41(9):1132 - 1137
- 8 Gill RK, Yang SH, Meerzaman D, *et al.* Frequent homozygous deletion of the LKB1/STK11 gene in non - small cell lung cancer[J]. Oncogene, 2011,30(35):3784 - 3791
- 9 Ghaffar H, Sahin F, Sanchez - Cepedes M, *et al.* LKB1 protein expression in the evolution of glandular neoplasia of the lung[J]. Clin Cancer Res, 2003,9(8):2998 - 3003
- 10 Contreras CM, Gurumurthy S, Haynie JM, *et al.* Loss of Lkb1 provokes highly invasive endometrial adenocarcinomas[J]. Cancer Res. 2008,68(3):759 - 766
- 11 He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis[J]. Biochim Biophys Acta, 2004,1654(1):3 - 12
- 12 Ylikorkala A, Rossi DJ, Korsisaari N, *et al.* Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in LKB1 - deficient mice[J]. Science, 2001,293(5533):1323 - 1326
- 13 程忠强,王伟,强化龙,等. LKB1 及 VEGF - C 在鼻咽癌中的表达及意义[J]. 浙江医学,2014,36(15):1314 - 1316
- 14 Safe S, Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer[J]. Eur J Cancer, 2005,41(16):2438 - 2448
- 15 臧远胜,周平坤,丁新民,等. 转录因子 spl 对肺癌细胞 LKB1 - VEGF 通路调控作用研究[J]. 军事医学科学院院刊,2007,1:11 - 15

(收稿日期:2014 - 12 - 28)

(修回日期:2015 - 02 - 05)

欢迎订阅

欢迎赐稿