

VEGF-C/D 及其受体与胃癌淋巴转移关系的研究进展*

侯亚超 邓靖宇 综述 梁 寒 审校

摘要 淋巴管是肿瘤转移的一个重要途径,随着越来越多淋巴管生长因子和淋巴管标志物的发现,如血管内皮生长因子-C/D(VEGF-C/D)及受体血管内皮生长因子受体(VEGFR)3在肿瘤淋巴管生成、肿瘤经淋巴结转移过程中的作用机制取得了较大进展。VEGF-C/D的表达与胃癌淋巴道转移、癌周淋巴管密度、生存率、预后等临床病理特征密切相关。此外,实验动物模型与体外实验研究显示,抑制VEGF-C/D表达在胃癌治疗上具有一定的应用前景。现就VEGF-C/D及其受体与胃癌淋巴转移的相关性予以综述。

关键词 血管内皮生长因子C/D 血管内皮生长因子受体3 胃癌 淋巴结转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20140407

Correlation studies of VEGF-C/D and its receptor with lymph node metastasis in gastric cancer

Yachao HOU, Jingyu DENG, Han LIANG

Corresponding author: Han LIANG; E-mail: tjlianghan@126.com

Department of Stomach Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin Key Laboratory Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China

This work was supported by Project 973 of National Key R & D Planning (No. 2010CB529301); Tianjin Municipal Project of Science and Technology (No. 12ZCDZSY16400)

Abstract The lymphatic vessel is a crucial pathway for tumor metastasis. The discovery of more lymphatic growth factors and lymphatic vessel markers signifies the significant progress of studies on the role of vascular endothelial growth factor-C/D (VEGF-C/D) and one of its specific receptors in the mechanisms of tumor lymph-angiogenesis and lymph node metastasis. VEGF-C/D expression is related to the clinicopathologic features of gastric cancer, including lymph metastasis, micro-lymphatic vessel density in the paraneoplastic tissues, survival rate, and prognosis. Experimental animal models and in vitro experiments show that suppression of VEGF-C/D expression is beneficial in gastric cancer treatment. This article provides an overview of the association between VEGF-C/D and lymph node metastasis in gastric cancer.

Keywords: vascular endothelial growth factor-C/D, vascular endothelial growth factor receptor-3, gastric cancer, lymph node metastasis

胃癌是严重威胁人类身心健康的常见恶性肿瘤之一,胃癌发病率居恶性肿瘤第4位,病死率居恶性肿瘤第2位^[1]。目前胃癌患者主要的死亡原因在于早期发生的肿瘤细胞转移,而淋巴转移是其中最主要的扩散途径之一,被认为是胃癌患者重要的预后指标之一,但有关淋巴转移的具体机制问题迄今尚不明确。在肿瘤进展过程中,随着肿瘤细胞增殖和生长,肿瘤细胞、基质细胞和炎症细胞等产生一系列淋巴管生长因子,直接或间接作用于淋巴内皮细胞,促进淋巴管生成。

大量研究证实淋巴管生成在肿瘤淋巴转移中发挥至关重要的作用,与肿瘤淋巴转移、远处转移和预

后有关。关于肿瘤淋巴转移机制的研究主要基于肿瘤淋巴管生成,肿瘤淋巴管生成的分子机制研究;近年来基于淋巴管生成成为靶点的抗肿瘤治疗也成为研究的热点。目前相关研究表明,在肿瘤淋巴道转移及淋巴管新生过程中VEGF-C/D及其受体VEGFR-3相互关系发挥着重要作用。

1 VEGF家族及其受体

VEGF是1989年由Ferrara等从牛的垂体滤泡星状细胞培养液中分离纯化出来的一类糖蛋白,分子量约34~45 kD,其具有促进血管内皮细胞增殖及通透性的增加,引起细胞外基质发生改变的作用^[2]。目前已发现的VEGF家族成员有VEGF-A、-B、-C、-D、-E、-F和胎

作者单位:天津医科大学肿瘤医院胃部肿瘤科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

*本文课题受国家重点研究发展计划973计划项目(编号:2010CB529301)和天津市科技计划项目(编号:12ZCDZSY16400)资助

通信作者:梁寒 tjlianghan@126.com

盘生长因子(placental growth factor, PIGF)7种^[3], VEGF蛋白由其可作用于相应的受体而发挥重要的生物学功能。VEGF受体属于受体酪氨酸激酶超家族,主要有VEGFR-1/Flt1(fms-like tyrosine kinase)、VEGFR-2[Flk/KDR(kinase insert domain confining receptor)]和VEGFR-3(Flt4)3种,最近还发现了一些低分子的VEGF受体,如神经纤维蛋白(neuropilin-1/neuropilin-2、NRP-1/NRP-2)等。VEGF受体分子由3部分组成,即7个免疫球蛋白样结构形成的细胞外部分,含有酪氨酸酶活性的胞内部分和跨膜区域。其中细胞内部分含有一段酪氨酸插入序列,是磷酸化下游信号分子的结合位点。VEGF与其受体Ig样的第5、6结构域结合,从而使VEGFR通过Ig样的第4结构域形成二聚体,激活受体酪氨酸激酶使其磷酸化,激活下游的Ras/MAPK、PI3K/AKT等信号转导途径,发挥生物学效应,如促进肿瘤淋巴管生成等。其中VEGFR-1主要在血管内皮细胞上表达,VEGFR-2在血管、淋巴管内皮细胞上均有表达,而VEGFR-3在胚胎的早期可表达于血管内皮细胞,到胚胎后期和出生以后仅表达于淋巴管内皮细胞^[4], VEGF受体的不同分布决定了VEGF家族各成员37种不同作用。

2 VEGF-C/D及其受体VEGFR-3

VEGF-C/D是最早被鉴定的特异性淋巴管生长因子,作为VEGF家族中重要的成员,均具有VEGF同源结构域保守序列。在VEGF家族中,VEGF-C和VEGF-D结构最为相近,在结构上与其他VEGF家族成员有所不同,其N-末端、C-末端分别有一段前肽序列,前肽的蛋白降解过程影响VEGF-C和VEGF-D的生物活性,VEGF-C/VEGF-D的不同剪切体与受体VEGFR-2和VEGFR-3的亲和力发生变化,从而发挥不同的生物学效应,与VEGFR-3结合特异性地诱导淋巴管生成,而与VEGFR-2结合主要诱导血管生成^[5],但最近研究提示VEGF-C/D与VEGFR-2结合在一定条件下也可以诱导淋巴管生成^[6]。VEGF-C与胚胎淋巴管发育密切相关,VEGF-C缺失小鼠胚胎完全缺乏淋巴管系统,于出生前死于内部液体集聚^[7]。转基因小鼠过表达VEGF-C/VEGF-D显示淋巴管异常增生,然而VEGF-D缺乏小鼠不出现淋巴管系统发育异常,过表达VEGF-C/VEGF-D可以诱导肿瘤淋巴管生成和淋巴转移^[8]。

VEGFR-3是第一个淋巴管特异性生长因子受体,在正常成人组织中,VEGFR-3主要表达于淋巴内皮细胞,而不表达于血管内皮细胞。VEGFR-3特异性地与VEGF-C/VEGF-D结合,但不与VEGF-A结合,与淋巴系统的发生、淋巴管结构和功能的维持及淋巴管新生有关。在胚胎发育过程中,VEGFR-3是

胚胎血管发育所必需的,VEGFR-3缺陷小鼠无法形成正常的血管结构,导致在胚胎期9.5 d于淋巴管出现前死亡,阻碍了分析VEGFR-3在淋巴管发育中的作用^[9]。有研究发现VEGFR-3突变出现于Chy突变小鼠中,这种小鼠的特点是皮肤淋巴水肿,支持VEGFR-3在淋巴管发育和发挥正常功能中的重要作用^[10]。转基因鼠研究也显示,在体内单一激活VEGFR-3信号转导通路足够诱导功能性淋巴管生成^[11]。

3 VEGF-C/D及其受体与胃癌淋巴转移的关系

3.1 VEGF-C/D在胃癌组织中的表达

VEGF-C/D是肿瘤相关新生淋巴管道形成过程中极为重要的信号调节因子。VEGF-C/D可以结合VEGFR-3后引起下游分子Shc、Grb2磷酸化,再通过MARK信号途径促使淋巴内皮细胞增生、迁移和存活而形成新生的淋巴管道,从而为肿瘤细胞发生淋巴转移提供有利条件。Watanabe等^[12]证实VEGF-CmRNA水平与胃癌患者淋巴结转移显著相关,进一步研究发现VEGF-C蛋白表达水平与术后淋巴结组织内淋巴管密度呈正比,提示VEGF-C可能参与促进胃癌组织淋巴管生成并加速淋巴结转移而导致患者预后变差。其他研究者也证实胃癌中VEGF-C的表达与肿瘤淋巴管密度和淋巴结转移密切相关^[13]。Yang等^[14]通过VEGF-C转染胃癌细胞建立一个人胃癌相关淋巴管再生模型证实VEGF-C在促进淋巴管再生和局部淋巴结转移起着非常重要的作用。Zhang等^[15]则发现生存素的表达升高可能是由于胃癌组织中高水平的VEGF-C表达所致,从而为胃癌细胞的侵袭性增强和淋巴结转移率升高奠定基础。Wang等^[16]证实胃癌同时表达VEGF-C和VEGF-A将比单一表达VEGF-C或VEGF-A能进一步的加快肿瘤生长、更高水平的新血管和淋巴管生成、更高浸润转移风险。Han等^[17]证实在胃癌中VEGF-C和VEGFR-3表达与淋巴结转移有关,是淋巴系统转移重要的危险因素,因此VEGF-C和VEGFR-3表达可作为淋巴结转移的预测因子和明确的预后指标。Wang等^[18]对123例胃癌患者手术标本采用免疫组化以D2-40标记淋巴管内皮细胞后发现VEGF-D表达和肿瘤新生淋巴管密度显著相关($P<0.001$),且肿瘤新生淋巴管还与淋巴结转移和淋巴管肿瘤细胞侵犯显著相关($P<0.001$)。Tanaka等^[19]报道VEGF-D转染后的胃癌细胞株(KKLS)能够促进淋巴管和血管增生、细胞增殖和抗凋亡,显示VEGF-D能够通过自分泌和旁分泌的方式参与人胃癌的进展过程。VEGF-D不仅与胃癌淋巴结转移显著相关,还是导致胃癌根治术后肝转移发生的独立影响因素^[20],而胃癌根治术后肝转移的发生也是与腹腔淋巴结转

移密切相关的^[21]。Choi等^[22]发现VEGFR-3阳性的淋巴管密度在胃癌中显著增加,且与原发肿瘤大小、淋巴侵袭、淋巴结转移有关。

3.2 VEGF-C/D与癌周淋巴管

Gao等^[23]利用染色评分方法证实了胃癌病灶周围淋巴管VEGF-C表达阳性率高于癌灶内淋巴管($P<0.05$)。运用LYVE-1和VEGFR-3对淋巴管进行标记后,发现癌周淋巴管的密度[中位数为 (14.2 ± 3.7) 个/ mm^2]显著高于癌灶内淋巴管密度[中位数为 (9.9 ± 3.5) 个/ mm^2],表明癌周淋巴管的增殖活力更高。由此推论,这些增加的淋巴管可能是在VEGF-C的刺激作用下新生的,VEGF-C含量增加可以促使癌周淋巴管增生。该研究还使用MKN-45细胞系(Gao来源于胃腺癌组织,同时具有表达VEGF-C的能力)接种于免疫缺陷小鼠皮下,分别检测不同时间段小鼠种植瘤周围的淋巴管密度,发现随着时间的推移,癌周组织淋巴管密度显著增加,而癌灶内并无此变化,说明该肿瘤细胞产生的VEGF-C能促使癌周组织淋巴管增生。Wang等^[18]对123例胃癌患者手术标本采用免疫组织化学以D2-40标记淋巴管内皮细胞后发现癌周组织淋巴管密度(P-LVD)的增加与VEGF-C、VEGF-D/VEGFR-3系统有关,P-LVD增加是胃癌淋巴结转移和预后的独立影响因子。

3.3 VEGF-C/D在外周血中的表达

由于在组织原位检测VEGF-C/D有其局限性,存在着诊断上的主观因素以及治疗上的差异,因此外周血VEGF-C/D的检测可能成为预测胃癌早期转移的一个重要指标。Kabashima等^[24]通过免疫组织化学方法将早期胃癌分为有淋巴结浸润组和无淋巴结浸润组,分别进行外周血VEGF-C检测,结果发现有淋巴结浸润组的VEGF-C阳性率(36%)显著高于无淋巴结浸润组的阳性率(14%)。Wang等^[25]证实胃癌患者术前血清VEGF-C水平与淋巴结转移和生存期有关。并且血清VEGF-C的表达水平还可作为预测胃癌发生淋巴转移的分子生物学指标^[26]。Tsirlis等^[27]采用ELISA对于胃癌患者和正常对照人群进行研究后发现血清VEGF-D在胃癌患者接受手术切除前水平显著高于术后水平($P<0.001$),然而血清VEGF-C在胃癌患者接受手术切除前水平显著低于术后水平($P<0.001$),因此VEGF-C/VEGF-D比率值可能是恶性肿瘤最有潜力的预测因子,并且VEGF-D联合CA19-9预测胃癌淋巴结转移的敏感性和特异性可以分别达到86%和82%。

4 VEGF-C/D及其受体在淋巴转移治疗上的应用前景

肿瘤的淋巴道转移是恶性肿瘤早期的主要转移途径之一,是影响患者预后的重要因素。因此,如何

有效的抑制肿瘤淋巴转移的发生,在肿瘤的治疗研究中成为了热点。目前的观点认为,针对VEGF-C/D与VEGFR-3轴在肿瘤淋巴转移中所起的关键作用,可以通过减少或阻断两者的相互作用来达到抑制肿瘤细胞淋巴道转移的发展进程。

Zhu等^[28]证实用反义VEGF-C基因转染胃癌SGC-7901细胞系能够抑制VEGF-C表达和阻止细胞增殖,因此反义VEGF-C基因能够抑制肿瘤生长和降低肿瘤转移与复发。抗VEGFR-3治疗能够抑制肿瘤生长和转移,而抗VEGFR-2治疗在限制原发肿瘤生长非常有效,但在抑制淋巴结转移方面疗效欠佳;但对于分泌VEGF-D的肿瘤联合应用抗VEGFR-3和VEGFR-2抗体是有效的抗肿瘤转移治疗的方法^[29]。通过在裸鼠内接种OCUM-2MLN胃癌细胞创建的胃癌动物模型,口服给予抑制VEGFR-3的药物Ki23057发现,Ki23057组可显著($P<0.01$)降低淋巴转移性胃癌模型中原位肿瘤的体积和数量,且经Ki23057药物治疗的胃癌中淋巴入侵和淋巴管新生的程度也显著($P<0.05$)降低,提示针对VEGFR-3引起的淋巴管新生,抑制其磷酸化作用是一种抑制胃癌淋巴转移的治疗策略^[30]。近来一个新的免疫球蛋白(Ig)融合蛋白受体已经研制成功,可以同时结合VEGF-A和VEGF-C,该融合蛋白能有效地抑制肿瘤生长和转移^[31]。

5 展望

淋巴道转移是胃癌转移的重要途径,也是影响患者预后的决定性因素。因此VEGF-C/D及其受体因在促进肿瘤淋巴管生成中的重要作用而成为人们关注的焦点。胃癌细胞通过VEGF-C/D与其自身上的受体VEGFR-3相互作用,加速肿瘤细胞的增殖并抑制其凋亡的发生,使肿瘤细胞增殖活性及扩散能力显著增强,加速肿瘤细胞的淋巴道转移,降低患者的生存时间和生存率。随着研究的深入,VEGF-C/D及其受体可作为胃癌组织发生淋巴转移的潜在性指标,也可在临床工作中将其作为判断胃癌患者预后的重要评估因素,同时针对VEGF-C/D与VEGFR-3轴的干扰有望成为胃癌淋巴转移分子治疗的新突破,为胃癌的抗淋巴转移的治疗开辟一条新路径。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- 2 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun. 1989, 161(2):851-858.
- 3 Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(10):795-803.
- 4 Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation

- of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(2):203–212.
- 5 Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(1):4–25.
- 6 Dellinger MT, Meadows SM, Wynne K, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 promotes the development of the lymphatic vasculature[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e74686.
- 7 Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(1):74–80.
- 8 Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice[J]. *Science*, 1997, 276(5317):1423–1425.
- 9 Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3[J]. *Science*, 1998, 282(5390):946–949.
- 10 Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, et al. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(22):12677–12682.
- 11 Veikkola T, Jussila L, Makinen T, et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice[J]. *EMBO J*, 2001, 20(6):1223–1231.
- 12 Watanabe M, Tanaka H, Ohira M, et al. Intranasal Lymphangiogenesis Precedes Development of Lymph Node Metastasis and Accelerates Progression of Gastric Cancer[J]. *J Gastrointest Surg*, 2014, 18(3):481–490.
- 13 Kigure W, Fujii T, Sutoh T, et al. The association of VEGF-C expression with tumor lymphatic vessel density and lymph node metastasis in patients with gastric cancer and gastrointestinal stromal tumor[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(122):277–280.
- 14 Yang B, Jing C, Wang J, et al. Identification of microRNAs associated with lymphangiogenesis in human gastric cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2014, 16(4):374–379.
- 15 Zhang J, Zhu Z, Sun Z, et al. Survivin gene expression increases gastric cancer cell lymphatic metastasis by upregulating vascular endothelial growth factor-C expression levels[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2):600–606.
- 16 Wang X, Chen X, Fang J, et al. Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(4):586–597.
- 17 Han FH, Li HM, Zheng DH, et al. The effect of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF receptor-3 on the clinical outcome in patients with gastric carcinoma[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(12):1172–1179.
- 18 Wang XL, Fang JP, Tang RY, et al. Different significance between intratumoral and peritumoral lymphatic vessel density in gastric cancer: a retrospective study of 123 cases[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:299.
- 19 Tanaka M, Kitadai Y, Kodama M, et al. Potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine factor for human gastric carcinoma cells[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(10):2121–2127.
- 20 Deng J, Liang H, Sun D, et al. Vascular endothelial growth factor-D is correlated with hepatic metastasis from gastric cancer after radical gastrectomy[J]. *Surgery*, 2009, 146(5):896–905.
- 21 Deng J, Liang H, Sun D, et al. Analysis of risk factors for the interval time, number and pattern of hepatic metastases from gastric cancer after radical gastrectomy[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(15):2440–2447.
- 22 Choi JH, Oh YH, Park YW, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor-D expression and VEGFR-3-positive vessel density with lymph node metastasis in gastric carcinoma[J]. *J Korean Med Sci*, 2008, 23(4):592–597.
- 23 Gao P, Zhou GY, Zhang QH, et al. Lymphangiogenesis in gastric carcinoma correlates with prognosis[J]. *J Pathol*, 2009, 218(2):192–200.
- 24 Kabashima A, Machara Y, Kakeji Y, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor C is related to lymphogenous metastasis in early gastric carcinoma[J]. *Oncology*, 2001, 60(2):146–150.
- 25 Wang TB, Deng MH, Qiu WS, et al. Association of serum vascular endothelial growth factor-C and lymphatic vessel density with lymph node metastasis and prognosis of patients with gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(12):1794–1797.
- 26 Wang TB, Wang J, Wei XQ, et al. Serum vascular endothelial growth factor-C combined with multi-detector CT in the preoperative diagnosis of lymph node metastasis of gastric cancer[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2012, 8(2):180–186.
- 27 Tsirlis TD, Kostakis A, Papastratis G, et al. Predictive significance of preoperative serum VEGF-C and VEGF-D, independently and combined with Ca19-9, for the presence of malignancy and lymph node metastasis in patients with gastric cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102(6):699–703.
- 28 Zhu P, Zhang J, Chen Q, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in gastric carcinoma and the effect of its antisense gene transfection on the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901[J]. *Am J Surg*, 2012, 204(1):78–83.
- 29 Matsumoto M, Roufail S, Inder R, et al. Signaling for lymphangiogenesis via VEGFR-3 is required for the early events of metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(6):819–832.
- 30 Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Kowalczyk O, et al. Serum levels of VEGF and VEGF-C in patients with endometrial cancer[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2011, 22(1):45–51.
- 31 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.

(2014-03-13 收稿)

(2014-05-07 修回)

(本文编辑:贾树明)

作者简介

侯亚超 专业方向为胃肠肿瘤外科及综合治疗。

E-mail:houyachao1987@163.com

