

胃癌组织中MK、VEGF表达的意义

赵治国, 史飞涛, 周明锴, 崔静, 付刚, 刘占举

赵治国, 史飞涛, 周明锴, 崔静, 刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
付刚, 焦作市第二人民医院病理科 河南省焦作市 454001
通讯作者: 赵治国, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科, zzghappy@eyou.com
电话: 0371-65261229
收稿日期: 2006-10-25 接受日期: 2006-11-10

Expression of midkine and vascular endothelial growth factor and their significances in gastric carcinoma

Zhi-Guo Zhao, Fei-Tao Shi, Ming-Kai Zhou, Jing Cui, Gang Fu, Zhan-Ju Liu

Zhi-Guo Zhao, Fei-Tao Shi, Ming-Kai Zhou, Jing Cui, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China
Gang Fu, Department of Pathology, the Second People's Hospital of Jiaozuo City, Jiaozuo 454001, He'nan Province, China

Correspondence to: Zhi-Guo Zhao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, He'nan Province, China. zzghappy@eyou.com
Received: 2006-10-25 Accepted: 2006-11-10

Abstract

AIM: To investigate the expression vascular endothelial growth factor (VEGF) and midkine (MK) and their significances in gastric carcinoma.

METHODS: Immunohistochemistry was performed to detect the expression of MK, VEGF and CD34 in gastric carcinoma ($n = 64$) and adjacent normal tissues ($n = 20$).

RESULTS: The positive rates of MK and VEGF expression were significantly higher in gastric cancer tissues than those in the normal ones (76.6%, 79.7% vs 0, 15.0%, both $P < 0.01$). The expression of MK and VEGF had marked correlations with the invasion depth ($\chi^2 = 7.111$, $P = 0.008$; $\chi^2 = 7.590$, $P = 0.006$), lymph node metastasis ($\chi^2 = 4.814$, $P = 0.028$; $\chi^2 = 6.207$, $P = 0.013$), and clinical stages ($\chi^2 = 13.971$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 18.554$, $P = 0.000$). The value of MVD in patients

with positive MK expression was notably higher than that in ones with negative MK expression (31.745 ± 8.592 vs 24.680 ± 8.938 , $P < 0.01$), and there was a positive correlation between MK and VEGF expression ($\chi^2 = 4.447$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: MK and VEGF may play synergistic roles in the growth, invasion and metastasis of gastric carcinoma, and their co-expression may be a useful indicator for the prognosis of gastric carcinoma.

Key Words: Gastric carcinoma; Midkine; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

Zhao ZG, Shi FT, Zhou MK, Cui J, Fu G, Liu ZJ. Expression of midkine and vascular endothelial growth factor and their significances in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3517-3520

摘要

目的: 研究中中期因子(midkine, MK)和血管内皮生长因子(VEGF)在胃癌组织中的表达情况, 并探讨其临床意义。

方法: 采用免疫组织化学方法检测64例胃癌组织、20例癌旁正常组织中MK、VEGF和CD34蛋白表达情况。

结果: 胃癌组织中MK、VEGF的阳性表达率分别为76.6%和79.7%, 显著高于癌旁正常组织(0, 15.0%)($P < 0.05$)。MK、VEGF的表达水平与胃癌的浸润深度($\chi^2 = 7.111$, $P = 0.008$; $\chi^2 = 7.590$, $P = 0.006$)、淋巴结转移($\chi^2 = 4.814$, $P = 0.028$; $\chi^2 = 6.207$, $P = 0.013$)、临床分期($\chi^2 = 13.971$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 18.554$, $P = 0.000$)。MK表达阳性的胃癌组织MVD显著高于MK表达阴性的胃癌组织(31.745 ± 8.592 vs 24.680 ± 8.938 , $P < 0.01$), 而且MK、VEGF表达在胃癌中也存在一定相关性($\chi^2 = 4.447$, $P < 0.05$)。

结论: MK、VEGF在胃癌的生长、侵袭与转移中起重要作用, 他们之间存在相互诱导或是协同效应, 其共同表达可作为判断胃癌预后的指标。

■背景资料

新生血管对胃癌生长转移起着至关重要的作用, 血管生成受多种因子调节。中期因子(midkine, MK)对肿瘤新生血管的形成具有调控作用。在人类多种恶性肿瘤中高水平表达^[1-2]。血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子, 在肿瘤血管形成中起重要作用^[3]。二者都可以促进肿瘤血管形成。

■创新盘点

MK、VEGF二者与胃癌血管生长及胃癌生长及侵袭、转移的关系尚未见有文献报道。

关键词: 胃癌; 中期因子; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

赵治国, 史飞涛, 周明镨, 崔静, 付刚, 刘占举. 胃癌组织中MK、VEGF表达的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(36):3517-3520

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3517.asp>

0 引言

中期因子(midkine, MK)对肿瘤新生血管的形成具有调控作用, 在人类多种恶性肿瘤中高水平表达^[1-2]. 血管内皮生长因子(VEGF)是重要的促血管生成因子, 在肿瘤血管形成中起重要作用^[3]. 二者都可以促进肿瘤血管形成. 我们采用免疫组织化学技术对64例经手术治疗的胃癌患者组织标本进行MK、VEGF和MVD检测, 探讨MK、VEGF与胃癌血管生成的关系, 对两者的相关性进行分析, 从而为胃癌的临床治疗及判断预后提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集焦作市第二人民医院病理科2001-05/2005-05手术切除的胃癌组织标本64例. 其中男45例, 女19例, 年龄34-76(平均62.3)岁. 病理分期按照1997年国际抗癌联盟(UICC)分期标准. 所有病例术前均未进行化疗、放疗及其他抗癌治疗, 术后均经病理检查确诊. 另取20例癌旁距离肿瘤边缘不小于5 cm正常组织作为对照. 兔抗人MK多克隆抗体、免疫组化试剂盒及DAB显色剂购自武汉博士德公司, 鼠抗人VEGF和CD34 mAb购自美国Santa Cruz公司.

1.2 方法 组织经甲醛固定, 常规石蜡包埋, 做4 μ m厚连续切片, 免疫组化SABC法检测MK、VEGF和CD34的表达情况. MK抗体工作浓度为1:150, VEGF抗体和CD34抗体工作浓度为1:100. 具体实验程序严格按照试剂盒说明书进行. 用已知的阳性切片作为对照, 以PBS代替一抗作为阴性对照. 结果的判定标准为: MK和VEGF以肿瘤细胞细胞膜和(或)细胞质内出现清晰的棕黄色颗粒为阳性, 结果以阳性细胞数所占百分比表示. 随机取10个高倍视野, 每个视野计数100个细胞. 肿瘤细胞中MK阳性细胞数<20%者为阴性(-), 20%-50%者为弱阳性(+), >50%者为强阳性(++). 微血管染色用鼠抗人CD34 mAb, CD34阳性为血管内皮细胞胞质着色, 采用Weidner微血管方法, 先在低倍镜($\times 40$)下观察每例切片中3个不重复血管密度最高区域, 然后在高倍镜下计数

每个区域MVD值, 求其平均值即作为该例组织的MVD值, 结果用mean $\pm$ SD表示.

统计学处理 应用SPSS10.0统计分析软件包进行统计学处理, 计数资料采用 t 检验, 分类资料采用 χ^2 检验和单因素方差分析, MK和VEGF的相关性用spearman等级相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 MK和VEGF的表达及MVD的计数与分布 在20例正常胃黏膜组织中未见MK蛋白染色或仅见微弱染色, 表达率为0%, 在64例胃癌组织中, 49例MK蛋白染色为阳性, 表达率为76.6%, 二者相比, 差别有统计学意义($P < 0.01$); 而VEGF在正常胃黏膜组织和胃癌组织中分别有3例和51例阳性, 表达率分别为15.0%和79.7%. MK和VEGF阳性染色主要定位于胃癌细胞的胞质上, 细胞核无染色. 染色在癌组织内成弥漫性分布, 并存在明显的异质性, 在胃癌组织的边缘部位表达增强. 胃癌细胞外间质中还发现纤维组织着色、小血管内皮细胞及弹力膜层亦着色, 尤其是血管密集处明显增强. 本组胃癌组织的MVD均值为 30.089 ± 8.294 , 癌旁正常组织的MVD均值为 15.012 ± 7.134 , 两者差异有统计学意义($P < 0.01$). 阳性血管分布呈异质性, 主要分布于癌灶边缘.

2.2 MK和VEGF表达与胃癌各临床病理因素之间的关系 MK、VEGF在胃癌组织中的表达与患者年龄、性别、肿瘤直径大小及胃癌分化程度无关($P > 0.05$), 与胃癌组织的浸润深度、淋巴结转移及临床分期密切相关($P < 0.05$)(表1).

2.3 MK与胃癌组织MVD和VEGF之间的关系 MK表达阳性的胃癌组织MVD均值为(31.745 ± 8.592), MK表达阴性者MVD均值为(24.680 ± 8.938), 两者差别具有统计学意义($P < 0.01$). 在64例胃癌组织中MK和VEGF表达共同为阳性者37例, MK和VEGF表达共同为阴性者8例, MK表达阳性而VEGF表达阴性者12例, MK表达阴性而VEGF表达阳性者7例, 表达一致率为70.31%(45/64). Spearman等级相关分析表明二者之间表达存在显著相关性($\chi^2 = 4.447, P < 0.05$).

3 讨论

大量研究证明, 血管生成是肿瘤生长、侵袭、转移的基本要素, 新生血管的形成在肿瘤发生、发展的过程中起重要作用^[4]. VEGF是促进

表 1 MK和VEGF表达与胃癌各临床病理因素之间的关系

因素	<i>n</i>	MK阳性数(%)	χ^2	<i>P</i>	VEGF阳性数(%)	χ^2	<i>P</i>
年龄							
≤60岁	29	24 (82.8)	1.135	0.287	20 (69.0)	0.001	0.973
>60岁	35	25 (71.4)			24 (68.6)		
性别							
男	45	36 (80.8)	0.998	0.318	29 (64.4)	1.308	0.253
女	19	13 (68.4)			15 (78.9)		
直径							
≤5 cm	26	19 (73.1)	0.296	0.586	17 (65.4)	0.231	0.631
>5 cm	38	30 (78.9)			27 (71.1)		
分化程度							
高	16	11 (68.8)	0.885	0.643	9 (56.3)	3.180	0.204
中	26	20 (76.9)			21 (80.8)		
低	22	18 (81.8)			14 (63.6)		
浸润深度							
未达浆膜层	24	14 (58.3)	7.111	0.008	12 (50.0)	7.590	0.006
达到或超过浆膜层	40	35 (87.5)			33 (82.5)		
淋巴结转移							
无	27	17 (63.0)	4.814	0.028	14 (51.9)	6.207	0.013
有	37	32 (86.5)			30 (81.1)		
分期							
I a+ I b	9	3 (33.3)	13.971	0.001	2 (22.2)	18.554	0.000
II + III a	26	19 (73.1)			15 (57.5)		
III b+IV	29	27 (93.1)			27 (93.1)		

■应用要点

临床上联合检测MK, VEGF的表达, 其共同表达可能有助于判断胃癌的预后。

血管生成的重要因子, 是一种具有肝素结合活性的同源二聚体糖蛋白, 由多种细胞分泌, 他以旁分泌的方式, 通过酪氨酸激酶受体特异性地作用于内皮细胞, 对内皮细胞产生促分裂、增生和趋化作用, 并能增强血管通透性, 有利于血浆, 纤维蛋白外渗, 促进血管形成^[5]。

MK是近年来发现的一个新基因, 他与多向因子(pleiotrophin, PTN)一起组成一个新的肝素结合生长因子(HBGFs)家族。生理情况下MK基因的表达随个体的发育而变化, 在胚胎期高表达, 出生后逐渐降低, 在成年组织中, 除肾脏和小肠上皮外, 其他部位几乎不表达。近来研究证明, MK mRNA在多种癌组织中出现高频率, 高强度表达, 其可能与肿瘤的发生、生长及转移有关^[1,6-8]。MK高度表达于各种肿瘤细胞, 通过基因药物方法阻断MK的表达, 抑制其作用途径, 可以达到促进肿瘤细胞凋亡的目的^[9-10]。有研究表明, MK和VEGF与肿瘤的发生、发展具有一定的相关性。但是, 对于MK, VEGF在胃癌的血管形成, 侵袭和转移过程中所起的作用是否具有协同性, 尚未发现有研究。

我们的研究结果显示, MK的表达与患者年龄, 性别, 肿瘤大小, 胃癌分化程度无关, 与胃癌的浸润深度, 淋巴结转移, 临床分期及MVD密切相关。由此可见, MK在胃癌的发生和发展过程中起重要作用。Ikematsu *et al*^[11]发现, 在神经母

细胞瘤患者血清中可以检测到MK, 且随着肿瘤临床分期升高, 血清中的MK水平也随着升高, 这与我们的研究结果一致。VEGF也与胃癌的浸润深度, 淋巴结转移, 临床分期及MVD也存在相关性。目前, 大多数研究认为MVD值高是肿瘤预后不佳的指标。张宏图 *et al*^[12]研究也发现胃癌患者血清VEGF浓度高于健康对照, 与胃癌浸润深度, 淋巴结转移, 远处转移, 肿瘤分期密切相关。毛振彪 *et al*^[13]的研究也发现血清VEGF含量的增强, 预示胃癌的转移和预后不良。虽然MK参与肿瘤生长和转移的机制尚未十分清楚, 但是我们从研究中发现, MK蛋白阳性染色主要定位于胃癌细胞的胞质上, 细胞核无染色。染色在癌组织内成弥漫性分布, 并存在明显的异质性, 在胃癌组织的边缘部位表达增强。胃癌细胞外间质中还发现纤维组织着色、小血管内皮细胞及弹力膜层亦着色, 尤其是血管密集处明显增强。Mashour *et al*^[14]的实验结果也表明, MK在肿瘤血管细胞表达, 而在正常血管内皮细胞不表达。因此, 我们推测, MK可能通过刺激而内皮细胞增殖, 促进肿瘤血管的形成, 从而促进胃癌的发生、发展及转移。Ren *et al*^[15]的研究也发现, MK在食管鳞状细胞癌中过渡表达, 且在肿瘤血管形成和侵袭中起重要作用。

我们的研究结果还显示, MK和VEGF在胃癌组织中的表达有一定的相关性($P<0.05$), 在64

例胃癌组织中,有37例共同表达阳性,8例共同表达阴性,表达一致率为70.31%(45/64)。MK表达阳性率高的胃癌组织切片中,VEGF表达阳性率也增高,并且表达的部位基本一致,但是二者具有协同性的机制还需要进一步研究。MK、VEGF在胃癌的侵袭和转移中起重要作用,临床上联合检测MK、VEGF的表达,其共同表达可能有助于判断胃癌的预后。

4 参考文献

- Ikematsu S, Yano A, Aridome K, Kikuchi M, Kumai H, Nagano H, Okamoto K, Oda M, Sakuma S, Aikou T, Muramatsu H, Kadomatsu K, Muramatsu T. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83: 701-706
- Kato M, Shinozawa T, Kato S, Endo K, Terada T. Increased midkine expression in intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *Liver* 2000; 20: 216-221
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25
- Kuiper RA, Schellens JH, Blijham GH, Beijnen JH, Voest EE. Clinical research on antiangiogenic therapy. *Pharmacol Res* 1998; 37: 1-16
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611
- Ye C, Qi M, Fan QW, Ito K, Akiyama S, Kasai Y, Matsuyama M, Muramatsu T, Kadomatsu K. Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79: 179-184
- 罗祥基,殷正丰,吴孟超.中期因子及其与肿瘤的关系. *临床与实验病理学杂志* 1999; 15: 441-442
- Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, Hiasa Y, Cho M, Uemura H, Hirao Y, Muramatsu T, Kadomatsu K. Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* 1999; 57: 253-257
- Qi M, Ikematsu S, Ichihara-Tanaka K, Sakuma S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine rescues Wilms' tumor cells from cisplatin-induced apoptosis: regulation of Bcl-2 expression by Midkine. *J Biochem (Tokyo)* 2000; 127: 269-277
- Adachi Y, Matsubara S, Muramatsu T, Curiel DT, Reynolds PN. Midkine promoter-based adenoviral suicide gene therapy to midkine-positive pediatric tumor. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 588-592
- Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Sakuma S, Wakai K, Muramatsu T, Kadomatsu K. Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer* 2003; 88: 1522-1526
- 张宏图,胡祥.血清中血管内皮生长因子与胃癌侵袭和转移的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 344-345
- 毛振彪,肖明兵,黄介飞,倪海兵,倪润洲,魏群,张弘.内皮生长因子在胃癌血清中的表达意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1220-1221
- Mashour GA, Ratner N, Khan GA, Wang HL, Martuza RL, Kurtz A. The angiogenic factor midkine is aberrantly expressed in NF1-deficient Schwann cells and is a mitogen for neurofibroma-derived cells. *Oncogene* 2001; 20: 97-105
- Ren YJ, Zhang QY. Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2006-2010

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(世界胃肠病学杂志社2006-12-28)