

CTHRC1和VEGF-C在直肠癌组织中的表达及相关性

李靖涛, 赵洪川, 高春, 姚力, 陈少轩, 姚树坤

■背景资料

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 因其易发生转移和扩散、术后复发转移率较高, 探索其转移机制一直是众多学者的研究重点. VEGF已经被证实可以通过促进新生血管形成等机制参与肿瘤的发生、发展. CTHRC1被体外实验证实能够提高细胞的迁移能力, 但在直肠癌组织中的表达报道较少.

李靖涛, 高春, 北京协和医学院研究生院 北京市 100010
赵洪川, 姚力, 陈少轩, 姚树坤, 卫生部北京中日友好医院 北京市 100029

李靖涛, 主治医师, 医学博士在读, 主要从事消化系统恶性肿瘤的发生机制及防治研究.

作者贡献分布: 此课题由姚树坤、赵洪川及李靖涛设计; 研究过程由李靖涛、高春、姚力及陈少轩操作完成; 数据分析由李靖涛与高春完成; 本论文写作由李靖涛与姚树坤完成.

通讯作者: 姚树坤, 教授, 100029, 北京市, 卫生部北京中日友好医院消化内科. yaoshukun6@yahoo.com.cn

电话: 010-64222978

收稿日期: 2009-04-08 修回日期: 2009-04-28

接受日期: 2009-05-05 在线出版日期: 2009-05-08

Expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma

Jing-Tao Li, Hong-Chuan Zhao, Chun Gao, Li Yao, Shao-Xuan Chen, Shu-Kun Yao

Jing-Tao Li, Chun Gao, Graduate School, Peking Union Medical College, Beijing 100010, China

Hong-Chuan Zhao, Li Yao, Shao-Xuan Chen, Shu-Kun Yao, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Correspondence to: Professor Shu-Kun Yao, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China. yaoshukun6@yahoo.com.cn

Received: 2009-04-08 Revised: 2009-04-28

Accepted: 2009-05-05 Published online: 2009-05-08

Abstract

AIM: To study expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma.

METHODS: Ninety-eight patients diagnosed with rectal carcinoma at China-Japan Friendship Hospital from October 2004 to August 2008, were included in our study. No treatment was given before surgery and the specimens were collected after surgery. The expression of CTHRC1 and VEGF-C was examined by immunohistochemistry and the correlation with clinical characteristics was analyzed by SPSS10.0.

RESULTS: VEGF-C was mainly located in the tumor cells, and its expression was statistically correlated with tumor differentiation, clinical stages and lymph metastasis ($P < 0.05$). The expression of CTHRC1 was correlated with the

clinical stages and tumor differentiation ($P < 0.05$), both of the expressions had no correlation with the age or gender of patients. Moreover, a positive correlation was observed between VEGF-C and CTHRC1 by correlative analysis ($r = 0.629, P < 0.001$).

CONCLUSION: CTHRC1 and VEGF-C may play important roles in invasion and metastasis in human rectal carcinoma. The two biomarkers can be applied to assess the malignancy of rectal cancer.

Key Words: Collagen triple helix repeat containing 1; Vascular endothelial growth factor; Rectal cancer

Li JT, Zhao HC, Gao C, Yao L, Chen SX, Yao SK. Expression and correlation between CTHRC1 and VEGF-C in human rectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1318-1323

摘要

目的: 探讨血管内皮生长因子(VEGF-C)和胶原三股螺旋重复蛋白1(CTHRC1)在直肠癌组织中的表达特点及二者的相关性.

方法: 收集我院2004-10/2006-08手术切除的直肠癌病理标本98例, 术前均未行任何治疗. 采用免疫组织化学方法检测VEGF-C和CTHRC1的表达. 分析他们的表达与患者年龄、性别以及直肠癌分化程度、临床分期及淋巴结转移的关系.

结果: VEGF-C主要分布于肿瘤细胞中, 其表达与直肠癌分化程度、临床分期及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$); CTHRC1表达与直肠癌分化程度、临床分期密切相关($P < 0.05$), 二者与直肠癌发生的年龄、性别无明显相关. 此外, CTHRC1与VEGF-C的表达量呈正相关($r = 0.629, P < 0.001$).

结论: VEGF-C和CTHRC1在直肠癌侵袭转移中可能起重要作用, 二者的表达可作为判定直肠癌生物学行为的参考指标.

关键词: 胶原三股螺旋重复蛋白1; 血管内皮生长因

■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科

子; 直肠癌

李靖涛, 赵洪川, 高春, 姚力, 陈少轩, 姚树坤. CTHRC1和VEGF-C在直肠癌组织中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(13): 1318-1323
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1318.asp

0 引言

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 近年来其发病率有明显增高趋势^[1]. 血管内皮生长因子C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)已经被研究证实可以通过促进血管形成和诱导淋巴管生成等机制参与肿瘤的发生、发展. 胶原三股螺旋重复蛋白1(collagen triple helix repeat containing 1, CTHRC1)也被体外实验证实能够提高细胞的迁移能力^[2], 但其在直肠癌组织中的表达报道较少. 本研究采用免疫组织化学方法研究直肠癌组织中VEGF-C和CTHRC1的表达, 并进行相关性分析, 初步探讨VEGF-C和CTHRC1在直肠癌发生、发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2004-10/2006-08手术切除的直肠癌病理标本98例, 男54例, 女44例, 年龄35-90(62.88±10.2)岁, 术前均未行任何治疗. 临床分期: I期20例, II期24例, III期54例. 病理分期: T₁N₀ 6例, T₂N₀ 14例, T₃N₀ 21例, T₄N₀ 3例, T₂N₁ 3例, T₃N₁ 8例, T₄N₁ 43例. 病理类型: 高分化腺癌14例, 中分化腺癌57例, 低分化腺癌27例. 兔抗人VEGF-C pAb(ZA-0266)、二步法检测试剂盒(K86815B)、DAB显色试剂盒(ZLI-9018)为中杉金桥产品. 兔抗人CTHRC1 pAb(ab54181-100)为Abcam公司产品.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法: 组织常规石蜡包埋, 连续作厚4 μm的切片. 免疫组织化学实验采用SP法, 操作过程严格参照说明书进行, 阳性对照使用由既往实验证实的阳性组织, 阴性对照使用PBS代替一抗.

1.2.2 图像分析: 阳性信号为棕黄色细小颗粒, 表达强度根据细胞着色强弱和着色细胞比例综合确定, 在200倍, 5个及以上视野下按切片中细胞染色强度记分: 0分为细胞无染色, 1分为染色呈浅黄色, 2分为染色呈棕黄色, 3分为染色呈褐色; 再按切片中显色细胞所占比例记分: 0分为无阳性染色细胞, 1分为染色细胞占总数的30%以下, 2分为30%-70%, 3分为70%以上细胞染色. 每张切

表 1 不同性别患者VEGF-C和CTHRC1积分(分)

性别	n	VEGF-C	CTHRC1
M	55	4.82 ± 5.36	5.84 ± 6.35
F	43	4.64 ± 5.20	5.72 ± 6.23

表 2 不同TN分期患者VEGF-C和CTHRC1积分(分)

T分期	N分期	n	VEGF-C	CTHRC1
T ₁	N ₀	6	3.54 ± 1.34	4.10 ± 0.77
T ₂	N ₀	14	3.27 ± 1.73	5.24 ± 1.66
T ₂	N ₁	3	6.20 ± 1.93	7.20 ± 0.60
T ₃	N ₀	21	4.05 ± 1.47	4.89 ± 1.63
T ₃	N ₁	8	6.03 ± 0.85	7.38 ± 1.23
T ₄	N ₀	3	5.00 ± 0.34	7.27 ± 0.50
T ₄	N ₁	43	6.63 ± 1.26	7.31 ± 1.11

片肿瘤细胞染色积分为: 强度计分×比例记分.

统计学处理 实验结果用mean±SD表示, 应用SPSS10.0统计软件根据数据性质, 分别应用t检验、方差分析、Pearson相关分析等方法分析, $P<0.05$ 表示差异显著有统计学意义.

2 结果

2.1 CTHRC1和VEGF-C的表达 CTHRC1、VEGF-C阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 在癌组织中, 主要定位于癌细胞的胞膜和(或)胞质, 少数病例癌细胞胞核着色, 血管内皮细胞上未见VEGF-C染色(图1-3).

2.2 年龄与VEGF-C、CTHRC1积分的关系 VEGF-C积分与CTHRC1积分间具有一定正相关性($r = 0.629$, $P<0.001$); 年龄与VEGF-C、CTHRC1积分无明显相关.

2.3 性别与VEGF-C、CTHRC1积分的关系 t检验结果显示, 不同性别之间VEGF-C积分($t = 0.40$, $P = 0.688$)、CTHRC1积分($t = 0.33$, $P = 0.745$)均无显著性差异(表1).

2.4 TN分期与VEGF-C积分、CTHRC1积分的关系 VEGF-C积分在T分期之间无显著性差异(图1A, C和E), 在N分期之间有显著性差异, N₁积分值>N₀积分值($P<0.001$, 图1A-F). CTHRC1积分在不同TN分期间无显著性差异(表2, 图1G-H).

2.5 临床分期与VEGF-C、CTHRC1积分的关系 II期、III期与I期比较, VEGF-C和CTHRC1积分均差异显著($P<0.05$); III期与II期比较, 积分差异亦均显著($P<0.05$, 表3, 图2).

2.6 病理分型与VEGF-C积分、CTHRC1积分的

■ 相关报道

CTHRC1基因在体外实验中已经被证实其过表达能够提高细胞的迁移能力并抑制I型胶原的合成. 可以通过限制胶原基质沉积和促进细胞迁移参与血管的损伤修复, 因此, 其表达可能与肿瘤的侵袭及恶性程度相关.

■创新盘点

本研究采用免疫组织化学方法研究直肠癌组织中CTHRC1和VEGF-C的表达,并进行相关性分析,初步探讨VEGF-C和CTHRC1在直肠癌发生、发展中的作用。

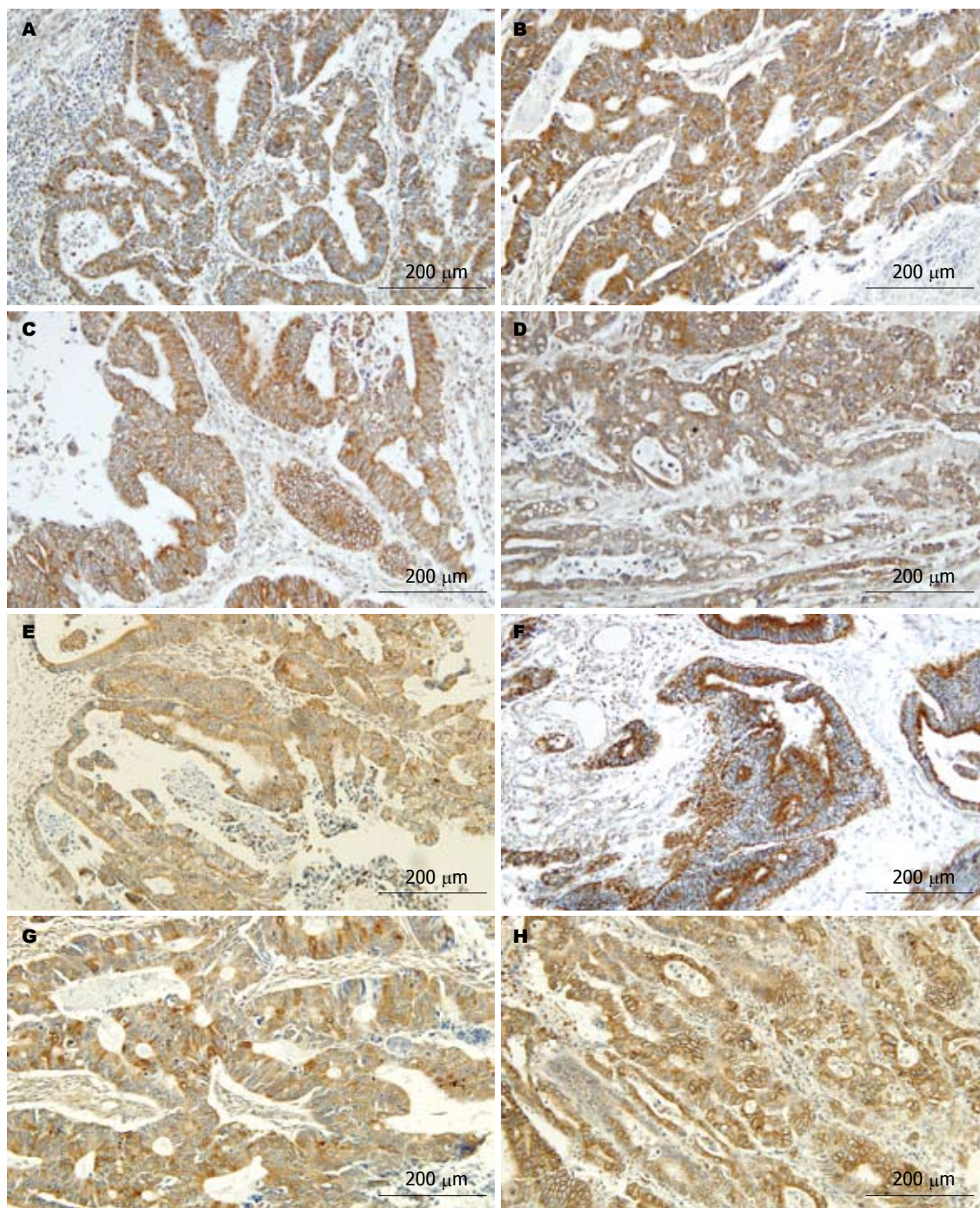


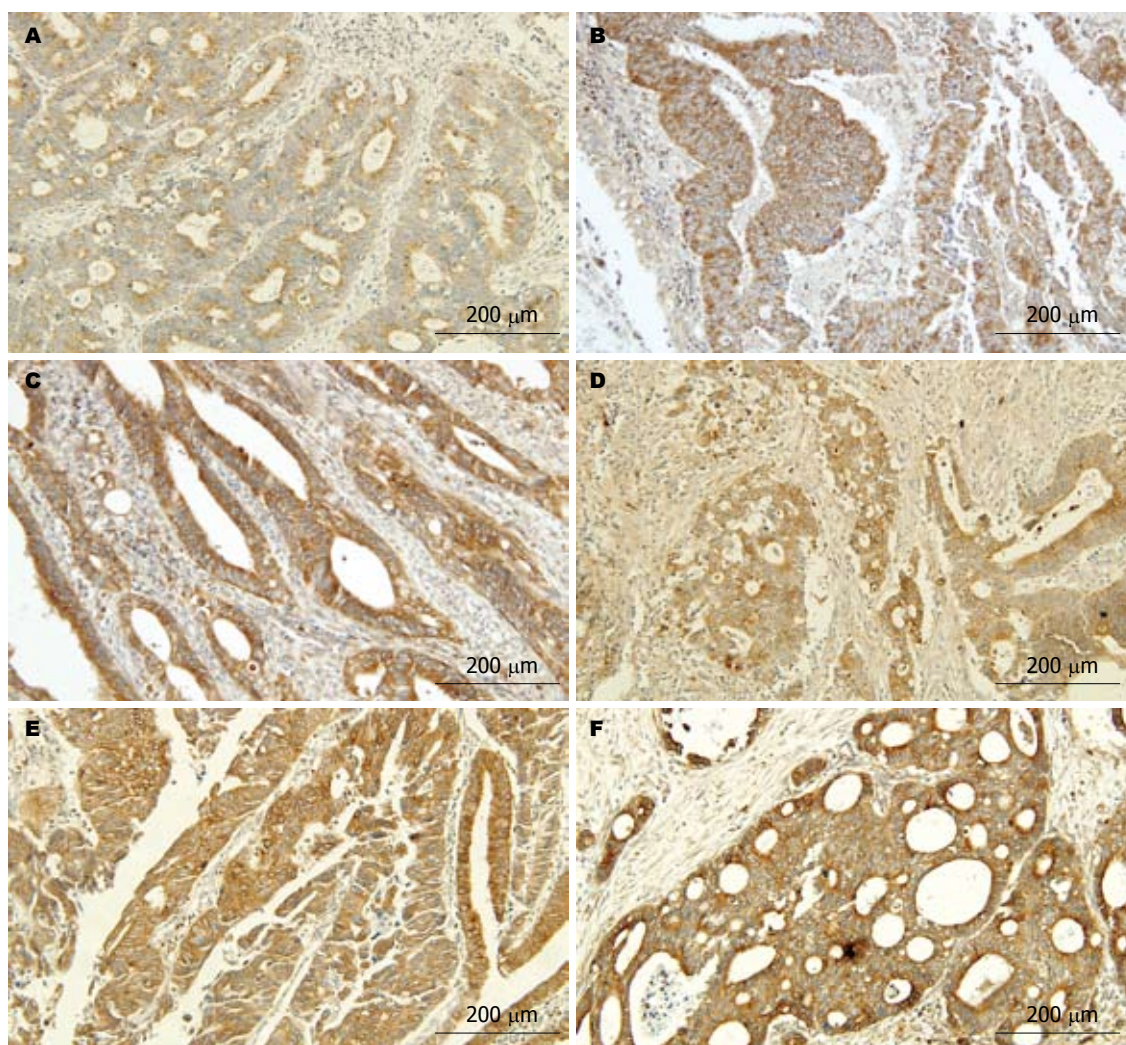
图1 不同TN分期组织VEGF-C和CTHRC1表达($\times 200$). A: 中分化腺癌 T_2 VEGF-C阳性表达; B: 中分化腺癌 T_2N_1 VEGF-C强阳性表达; C: 中分化腺癌 T_3 VEGF-C阳性表达; D: 中分化腺癌 T_3N_1 VEGF-C强阳性表达; E: 中分化腺癌 T_4 VEGF-C阳性表达; F: 中分化腺癌 T_4N_1 VEGF-C强阳性表达; G: 中分化腺癌 T_2N_1 CTHRC1强阳性表达; H: 中分化腺癌 T_3N_1 CTHRC1强阳性表达。

关系 高分化、中分化与低分化组比较, VEGF-C积分和CTHRC1积分差异均显著($P<0.05$); 高分化与中分化组比较, 积分差异亦均显著($P<0.05$, 图3, 表4)。

3 讨论

直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 因其易发生转移和扩散、术后复发转移率较高, 探索其

转移机制一直是众多学者的研究重点^[3]。肿瘤血管形成和淋巴管生成对肿瘤的生长及转移有重要作用, 并受多种细胞因子的诱导和调节, VEGF-C是其中重要的因子之一。VEGF-C的表达已经被研究证实可能与肿瘤的预后密切相关^[4-7]。本研究发现VEGF-C的表达与直肠癌的分化程度和临床分期密切相关, 与既往结论基本一致。Zheng *et al*^[8]的研究中也发现VEGF-C表达



■应用要点
CTHRC1 和 VEGF-C 可能在直肠癌的血管发生和侵袭转移中起着重要作用, 检测CTHRC1和 VEGF-C的表达可能作为判断直肠癌生物学行为的参考指标, 辅助判断直肠癌的预后。

图 2 不同临床分期组织VEGF-C和CTHRC1表达($\times 200$)。A: 中分化腺癌Ⅰ期VEGF-C弱阳性表达; B: 中分化腺癌Ⅱ期VEGF-C阳性表达; C: 中分化腺癌Ⅲ期VEGF-C强阳性表达; D: 中分化腺癌Ⅰ期CTHRC1弱阳性表达; E: 中分化腺癌Ⅱ期CTHRC1阳性表达; F: 中分化腺癌Ⅲ期CTHRC1强阳性表达。

表 3 不同临床分期患者VEGF-C和CTHRC1积分(分)

临床分期	<i>n</i>	VEGF-C	CTHRC1
I	20	3.35 ± 1.59	4.9 ± 1.53
II	24	4.17 ± 1.41 ^a	5.17 ± 1.73 ^a
III	54	6.51 ± 1.24 ^{ac}	7.31 ± 1.09 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs I期; ^c $P < 0.05$ vs II期。

表 4 不同病理分型患者VEGF-C和CTHRC1积分(分)

病理分型	<i>n</i>	VEGF-C	CTHRC1
低分化	27	6.98 ± 1.03	7.24 ± 1.01
中分化	57	5.09 ± 1.66 ^a	6.40 ± 1.66 ^a
高分化	14	2.87 ± 1.23 ^{ac}	4.03 ± 1.34 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 低分化; ^c $P < 0.05$ vs 中分化。

与直肠癌分化程度密切相关, 随着直肠癌分化程度降低, VEGF-C表达增强。汪美华 *et al* 研究表明VEGF-C表达与结肠癌病理分级无关, 其原因可能与仅将结肠癌病理分为高、低分化两级或所用分析方法不一致有关^[9-10]。

本研究还发现VEGF-C的表达与性别、年龄在统计学上无明显相关, 但与淋巴结转移密切相关。VEGF-C的表达在不同性别和不同年龄无明显差异, 与文献[11-12]报道基本一致。但De

Vita *et al* 在研究中发现^[12], 血清中VEGF-C水平与年龄呈负相关, 其原因可能与所选择标本有关, 血清中的VEGF-C表达可能与直肠癌组织有差异。目前已有研究发现VEGF-C过度表达的肿瘤细胞具有较高的局部淋巴结转移率^[13], 本研究在直肠癌组织中证实了上述观点。我们的研究结果显示VEGF-C的表达与淋巴结转移有显著的相关性, 并与直肠癌组织的临床分期密切相关, 也许VEGF-C可以作为评价直肠癌预后的

■同行评价

CTHRC1在直肠癌的研究目前未见相关报道。本研究发现CTHRC1在直肠癌组织中呈高表达,且与VEGF的表达量呈正相关,对进一步研究CTHRC1在直肠癌中的生物学作用有参考价值。

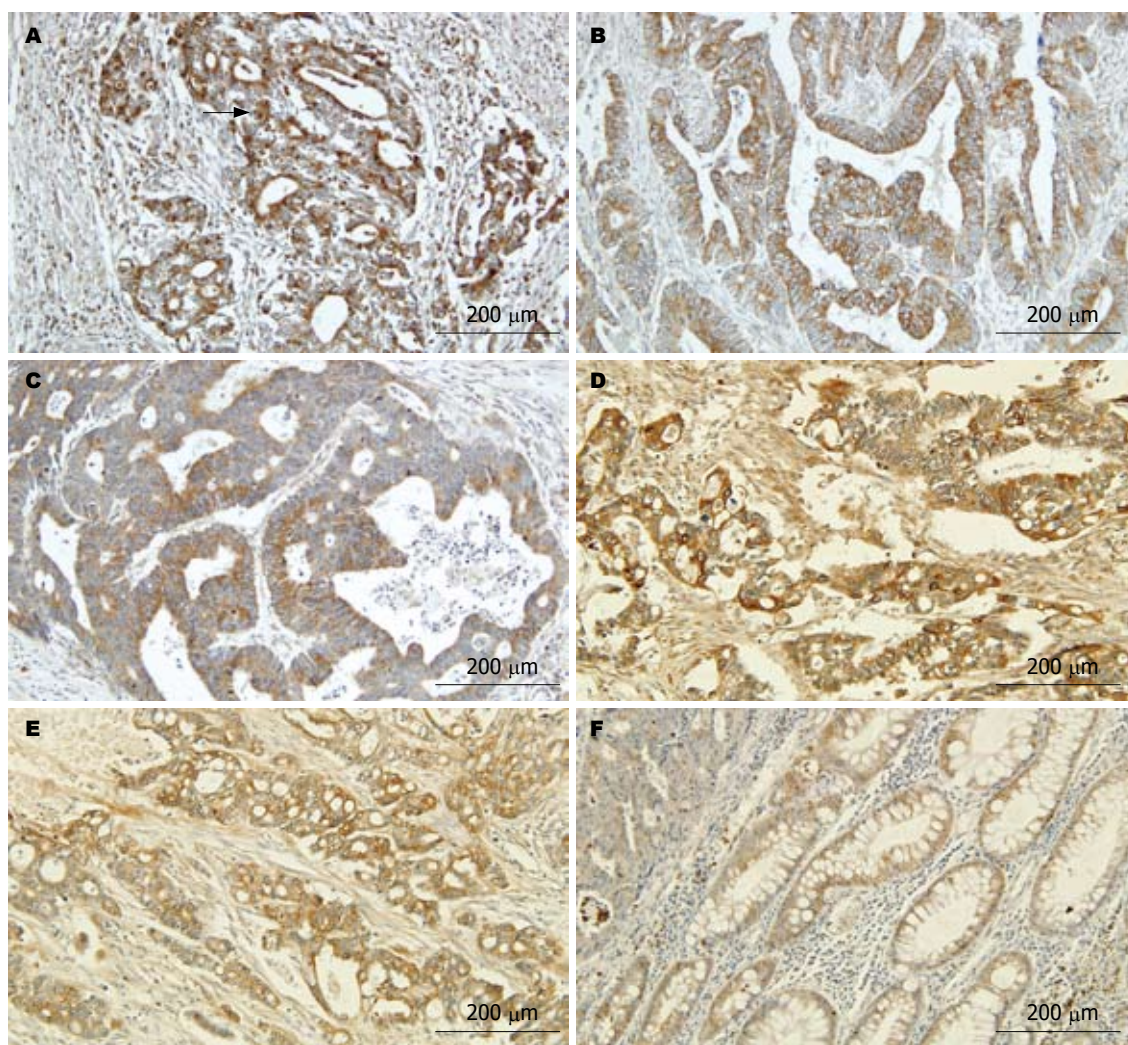


图3 不同病理分型组织VEGF-C和CTHRC1表达($\times 200$)。A: 低分化腺癌T₄N₁ VEGF-C强阳性表达; B: 中分化腺癌T₄N₁ VEGF-C阳性表达; C: 高分化腺癌T₄N₁ VEGF-C弱阳性表达; D: 低分化腺癌T₄N₁ CTHRC1强阳性表达; E: 中分化腺癌T₄N₁ CTHRC1阳性表达; F: 高分化腺癌T₄N₁ CTHRC1弱阳性表达。

独立危险因素。

对于VEGF-C在肿瘤组织的表达部位及作用方式,目前文献报道不一。Wizigmann-Voos *et al*^[14]认为VEGF-C主要表达于肿瘤细胞, Brown *et al*却发现VEGF-C不仅表达于肿瘤细胞,也可表达于血管内皮细胞^[15-16]。我们的研究发现,VEGF-C主要表达于直肠癌细胞中,在肿瘤血管内皮细胞中并无明显表达。结合目前已经明确的作用机制,我们推测VEGF-C可能主要是通过旁分泌作用诱导肿瘤血管及淋巴管形成,从而促进肿瘤细胞的生长、转移,同时可能作为一种自分泌生长调节因子直接促进肿瘤细胞的生长。

CTHRC1基因在体外实验中已经被证实其过表达能够提高细胞的迁移能力并抑制I型胶原的合成^[2],可以通过限制胶原基质沉积和促进细胞迁移参与血管的损伤修复,因此,其表达可能与肿瘤的侵袭及恶性程度相关^[17]。本研究的结果

证实直肠癌组织中CTHRC1的表达与直肠癌的分化程度和临床分期密切相关,但是与直肠癌发生的年龄和性别无明显相关。另外,本研究发现CTHRC1的表达与VEGF-C的表达呈显著正相关,也许CTHRC1能够与VEGF-C发挥协同作用,从而为肿瘤细胞的侵袭和转移创造合适的细胞外环境。

因此,我们推测CTHRC1和VEGF-C可能在直肠癌的血管发生和侵袭转移中起着重要作用,检测CTHRC1和VEGF-C的表达可能作为判断直肠癌生物学行为的参考指标,辅助判断直肠癌的预后。但是二者间的确切关系尚不清楚,有待进一步深入研究和证实。

4 参考文献

- 1 Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18:

- 581-592
- 2 Pygay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE, Lindner V. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration. *Circ Res* 2005; 96: 261-268
- 3 Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. *Cancer Lett* 2008; 260: 1-10
- 4 Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 793-800
- 5 Lee JJ, Chu E. An update on treatment advances for the first-line therapy of metastatic colorectal cancer. *Cancer J* 2007; 13: 276-281
- 6 Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani K, Karameris A, Kombouras C. Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer. *J Surg Res* 2008; 147: 99-107
- 7 Ferroni P, Palmirotta R, Spila A, Martini F, Formica V, Portarena I, Del Monte G, Buonomo O, Roselli M, Guadagni F. Prognostic value of carcinoembryonic antigen and vascular endothelial growth factor tumor tissue content in colorectal cancer. *Oncology* 2006; 71: 176-184
- 8 Zheng S, Han MY, Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230
- 9 汪美华, 万美珍, 周林艳, 陈玉芳, 岳灵萍. COX-2、VEGF在结肠癌组织中的表达及其临床意义. *肿瘤基础与临床* 2008; 21: 294-295
- 10 欧玉荣, 于东红, 刘德纯, 承泽农. COX-2与VEGF-C在大肠癌中的表达及与预后的关系. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2008; 17: 320-323
- 11 牟江洪, 阎晓初, 王东, 吴小华, 李增鹏, 向德兵. 大肠癌VEGF-C表达与淋巴结转移和预后的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1061-1064
- 12 De Vita F, Orditura M, Lieto E, Infusino S, Morgillo F, Martinelli E, Castellano P, Romano C, Ciardiello F, Catalano G, Pignatelli C, Galizia G. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 270-278
- 13 Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312: 549-560
- 14 Witzigmann-Voos S, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 1995; 55: 1358-1364
- 15 Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993; 143: 1255-1262
- 16 蔡瑞霞, 盛霞, 袁志浩, 叶增强. CD105、COX-2和VEGF在结直肠癌中的表达及其与血管新生的关系. *肿瘤防治研究* 2007; 34: 125-127
- 17 Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y. Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3716-3722

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人员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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-05-08)