

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.006

非小细胞肺癌组织中 VEGF 和 Bax 的表达及意义

曹文荣, 闫文修, 王雪利

(山东省青岛市第八人民医院病理科 266100)

[摘要] **目的** 观察非小细胞肺癌(NSCLC)中血管内皮生长因子(VEGF)和 Bax 的表达,并探讨其临床应用价值。**方法** 收集该院 NSCLC 患者肺组织石蜡标本 80 例(NSCLC 组)及良性病变病灶旁正常肺组织石蜡标本 20 例(对照组),采用 Western blot 和免疫组织化学染色(SP)法测定 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 的表达,并探讨二者与 NSCLC 病理类型、TNM 分期及淋巴结转移的相关性。**结果** NSCLC 组中 VEGF 阳性表达显著高于对照组,Ⅲ~Ⅳ期 VEGF 阴性表达高于 I~Ⅱ期,有淋巴结转移组织中的 VEGF 阳性表达高于无淋巴结转移组织,差异均有统计学意义($P<0.05$);VEGF 的表达与腺癌、鳞癌无相关性($P>0.05$)。NSCLC 组中 Bax 表达低于对照组,Ⅲ~Ⅳ期 Bax 阳性表达低于 I~Ⅱ期,有淋巴结转移组织中 Bax 阳性表达低于无淋巴结转移组织,差异均有统计学意义($P<0.05$);Bax 的表达与腺癌、鳞癌无相关性($P>0.05$)。NSCLC 中 VEGF 和 Bax 的表达呈负相关。**结论** VEGF 的表达在 NSCLC 中起着促进作用,并与 Bax 表达呈负相关,二者的表达可为 NSCLC 的诊断及预后提供判断依据。

[关键词] 癌,非小细胞肺;淋巴转移;血管内皮生长因子 A;bcl-2 相关 X 蛋白质

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)03-0307-03

Expression and significance of VEGF and Bax in non-small cell lung cancer

Cao Wenrong, Yan Wenxiu, Wang Xueli

(Department of Pathological, Eighth People's Hospital of Qingdao City, Qingdao, Shandong, 266100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Bax in non-small cell lung cancer (NSCLC) and clinical value. **Methods** Paraffin specimens were collected from 80 cases of NSCLC tissues (NSCLC group) and 20 cases of normal lung tissue adjacent to benign lesions (control group). Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of VEGF and Bax. The relationship of the expression of VEGF and Bax with histological classification, stage, lymph mode metastasis were analyzed. **Results** The expression of VEGF in NSCLC group was higher than that in control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The higher expression of VEGF in the group of stage Ⅲ-Ⅳ was obtained than that in the group of stage I-Ⅱ ($P<0.05$). The higher expression of VEGF in the group with lymph mode metastasis was obtained than that in the group without lymph mode metastasis ($P<0.05$). The expression of VEGF was not found to be related with histological classification ($P>0.05$). The expression of Bax in NSCLC tissue was lower than that in normal tissue, the differences was statistically significant ($P<0.05$). The lower expression of Bax in the group of stage Ⅲ-Ⅳ was obtained than that in the group of stage I-Ⅱ ($P<0.05$). The lower expression of Bax in the group with lymph mode metastasis was obtained than that in the group without lymph mode metastasis ($P<0.05$). The expression of Bax was not found to be related with histological classification ($P>0.05$). The expression of VEGF was negatively correlated with Bax in NSCLC ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of VEGF played a promoting effect in the NSCLC, and was negatively correlated with the expression of Bax protein, and the expression of the two could provide a basis for the diagnosis and prognosis of NSCLC.

[Key words] carcinoma, non-small-cell lung; lymphatic metastasis; vascular endothelial growth factor A; bcl-2-associated X protein

肺癌是目前世界上病死率位居第一位的恶性肿瘤。全国恶性肿瘤死亡第一位的也是肺癌,且发病率和病死率上升最快,病死率最高者男女均为肺癌^[1]。目前治疗肺癌的主要方式是手术治疗,比较认可的手术原则是尽量最大限度地保留肺组织,彻底切除病灶及转移肺组织,从而改善预后。但是目前早期诊断水平有限和患者早期症状不明显,确诊时肿瘤仍局限于原发部位的只有 16%,75%的肺癌确诊时已有区域转移(5 年生存率为 20.6%)或远处转移(5 年生存率为 2.8%)^[2]。而淋巴结受累或转移情况直接影响到患者术后的复发率及长期生存率,从而影响外科手术的治疗效果。

在肺癌人群中,非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,

NSCLC)约占 85%。NSCLC 主要包括腺癌、鳞癌、大细胞癌三大类型。肺癌扩散的主要途径是淋巴结转移,其转移情况也是肺癌 TNM 分期的主要依据,是影响预后的重要因素。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与淋巴管的生成及转移密切相关^[3]。Bax 与 NSCLC 发生发展及转移密切相关。因此本研究应用 Western blot 和免疫组织化学染色(SP)法测定 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 的表达,探讨二者与 NSCLC 病理类型、TNM 及转移的相关性,为 NSCLC 的临床治疗和预后提供判断指标。

1 材料与方法

1.1 材料 收集本院 NSCLC 患者肺组织石蜡标本 80 例作

为 NSCLC 组,其中男 54 例,女 36 例,年龄 49~71 岁,平均年龄 58 岁,淋巴转移者 45 例,无淋巴转移者 35 例。根据 2002 国际抗癌协会 TNM 分期标准对病例进行临床分期。鳞癌 49 例,腺癌 31 例;TNM 分期:Ⅰ~Ⅱ期 58 例,Ⅲ~Ⅳ期 22 例。收集肺良性病变病灶旁正常肺组织石蜡标本 20 例,作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 测定各组织中 VEGF 和 Bax 的表达 裂解组织并收获蛋白。根据 BCA 试剂盒对蛋白浓度进行测定。蛋白样品上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS)凝胶电泳分离,湿法转膜。一抗孵育,4℃过夜;二抗室温孵育 1~2 h。漂洗,滴加 ECL 曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件对各抗体条带灰度值进行统计。

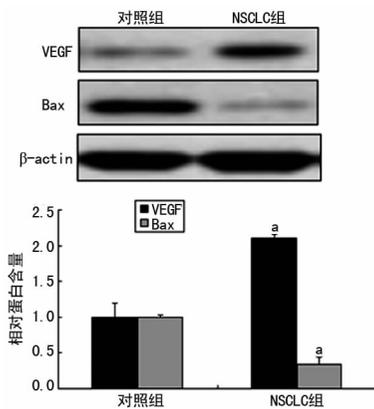
1.2.2 免疫组织化学染色(SP)法测定各组织中 VEGF 和 Bax 的表达 10%甲醛溶液固定组织,石蜡包埋,切片,抗原修复,室温冷却,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,一抗室温孵育,PBS 冲洗,二抗 37℃孵育,PBS 洗涤,DAB 溶液显色后冲洗、复染、脱水、透明、树胶封片。以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 结果判断 VEGF 和 Bax 蛋白染色阳性主要定位于细胞质,采用半定量计分法判定,高倍镜下随机选择 10 个视野,分别计算 500 个肿瘤细胞。切片中阳性细胞小于 5%为 0 分,6%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%~75%为 3 分,>75%为 4 分;染色深度以无阳性细胞为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色或棕褐色为 3 分,免疫反应的总得分为阳性细胞百分率与免疫染色强度总得分的乘积。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 组及对照组中 VEGF 和 Bax 表达 NSCLC 组的 VEGF 表达显著高于对照组($P<0.01$),其中鳞癌组织中 30 例高表达,腺癌组织 23 例高表达;NSCLC 组的 Bax 表达低于对照组($P<0.01$),其中鳞癌组织中 15 例高表达,腺癌组织 12 例高表达,见图 1、表 1。



^a: $P<0.01$,与对照组比较。

图 1 NSCLC 组与对照组中 VEGF 和 Bax 表达

2.2 不同病理类型 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达 VEGF 和 Bax 的表达在鳞癌、腺癌中差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 不同 TNM 分期 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达

Ⅲ~Ⅳ期 NSCLC 组织中 VEGF 的表达显著高于Ⅰ~Ⅱ期,Ⅲ~Ⅳ期 NSCLC 组织中 Bax 的表达显著低于Ⅰ~Ⅱ期,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.4 有无淋巴结转移的 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达 有淋巴结转移的 NSCLC 组织中 VEGF 的表达高于无淋巴结转移的 NSCLC 组织,有淋巴结转移的 NSCLC 组织中 Bax 的表达低于无淋巴结转移的 NSCLC 组织,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 1 不同病理类型肺癌组织中 VEGF 和 Bax 表达[n(%)]

病理类型	n	VEGF	Bax
鳞癌	45	30(66.67)	15(33.33)
腺癌	35	23(65.71)	12(34.28)
χ^2		7.238	0.509
P		>0.05	>0.05

表 2 不同 TNM 分期 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达[n(%)]

TNM 分期	n	VEGF	Bax
Ⅰ~Ⅱ	49	8(25.86)	32(65.31)
Ⅲ~Ⅳ	31	31(63.26)	7(22.58)
χ^2		4.521	4.309
P		<0.01	<0.01

表 3 有无淋巴结转移的 NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达[n(%)]

淋巴结转移	n	VEGF	Bax
无	58	30(51.72)	36(62.06)
有	22	15(68.18)	8(36.36)
χ^2		7.917	6.345
P		<0.05	<0.01

2.5 VEGF 和 Bax 表达的相关性 经 Pearson 相关性分析,NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达负相关($r=-0.492$, $P<0.01$)。

3 讨论

随着手术治疗,化疗,放疗及生物治疗不断推进,NSCLC 的治疗已经有了很大的进步,但目前 5 年生存率不足 15%。其主要原因是诊断 NSCLC 时,发现 1/3 以上肿瘤发生了远处转移,术后转移复发较多^[1]。报道称,约有 50% 完全切除的 NSCLC 患者因远处转移而治疗失败^[2]。而淋巴结转移是肿瘤转移的主要方式,对 NSCLC 临床病理分期、患者预后判断及选择针对性的治疗具有重要的临床意义。

VEGF 可通过诱导内皮细胞增殖和淋巴管生长,促进膀胱癌、皮肤恶性黑色素瘤、舌鳞状细胞癌、胃癌等肿瘤的淋巴转移,表明其表达可作为一个临床指标对预后进行评估^[4]。Hu 等^[5],Brussino 等^[6]研究发现 NSCLC 组织中 VEGF 阳性表达量显著高于正常组织,本实验也发现 VEGF 在 NSCLC 中阳性表达高于正常组织,说明 VEGF 与 NSCLC 的发生有关。Liu 等^[7],刘东华等^[8]等研究进一步证实Ⅲ~Ⅳ期 NSCLC 组织中 VEGF 的阳性表达显著高于Ⅰ~Ⅱ期,本研究也证实了此观

点,说明 VEGF 跟 NSCLC 临床 TNM 分期有关系。Hao 等^[9]研究证实 VEGF 与 NSCLC 的淋巴管生成和淋巴结转移密切相关。VEGF 在受到肿瘤侵犯边缘的表达与 NSCLC 患者的淋巴结转移与淋巴结侵犯有密切的关系^[10]。本研究中同样也观察到 VEGF 在有淋巴结转移肺组织中高表达,与无淋巴结转移肺组织对比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 NSCLC 组织中 VEGF 的表达与淋巴结转移密切相关。RNA 干扰介导的 VEGF 沉默能抑制 NSCLC 组织的生长和转移^[11]。进一步说明,通过调节 VEGF 的表达能显著影响 NSCLC 组织的生长及转移,可作为 NSCLC 治疗的一个新的靶点。同时在本研究中 VEGF 在腺癌、鳞癌中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),说明肺癌组织中 VEGF 的表达与病理类型无关,在以 VEGF 为靶点对 NSCLC 进行干预治疗时,无需考虑组织病理类型。

细胞凋亡发生异常,影响着肿瘤的生长转移。已有研究证实了在肿瘤中检测细胞凋亡相关基因的表达可成为肿瘤诊断和判断预后的有效手段^[12]。其中 Bcl-2 家族是被研究得最多的一类细胞凋亡相关基因。Bax 是 Bcl-2 家族中促凋亡基因,当细胞内 Bcl-2 表达过多,与 Bax 形成二聚体,使胶质瘤细胞凋亡趋势减弱,打破了细胞增殖与凋亡的平衡,使细胞数目不断增加,从而表现出生长优势,是 NSCLC 肿瘤转移形成的重要基础。Sun 等^[13]和刘瑞芳等^[14]发现 Bax 在 NSCLC 中的表达明显低于正常组织,并且与 NSCLC 的淋巴结转移, TNM 分期相关。本实验亦发现 Bax 在 NSCLC 中表达明显低于正常组织,并与 TNM 分期,与淋巴结转移有关,从而说明 Bax 的表达与 NSCLC 的发生发展及淋巴结转移密切相关。而 Caputi 等^[15]用免疫组织化学检测 55 例 NSCLC 组织,发现 72.7% 患者 Bax 高表达,且高表达的 Bax 与 TNM、病理类型和肿瘤分级之间没有关系。与本实验结果不一致的原因有可能是实验样本量太小造成误差,病例的选择,实验方法等不同有关。本研究也发现在 NSCLC 中, Bax 在腺癌、鳞癌中的表达无差异。这些结果充分证实了 Bax 对 NSCLC 发生发展起负调控,由于 Bax 表达降低,肿瘤细胞凋亡作用减弱,侵袭作用加强,促进淋巴转移。

进一步通过 Pearson 相关性分析发现, NSCLC 组织中 VEGF 和 Bax 表达负相关,且已有报道在乳腺癌细胞 MCF-7 中,通过 siRNA 干扰 VEGF 的表达,可显著降低 Bcl-2/Bax 比例,并诱导癌细胞凋亡^[16],提示通过干扰 VEGF 表达,提高 Bax 表达,能促进肿瘤细胞凋亡,避免癌细胞转移风险。

总之, VEGF 的表达在 NSCLC 发生、发展中起着促进作用, Bax 的表达在 NSCLC 发生发展中起着抑制作用,二者的表达呈负相关,可为 NSCLC 的诊断及预后提供判断依据。

参考文献

[1] Siegel R, Ma JM, Zou ZH, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1):9-29.

[2] Zhong W, Yang X, Bai J, et al. Complete mediastinal lymphadenectomy: the core component of the multidisciplinary therapy in resectable non-small cell lung cancer [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 34(1):187-195.

[3] Donnem T, Al-Shibli K, Al-Saad S, et al. VEGF-A and VEGFR-3 correlate with nodal status in operable non-small cell lung cancer; inverse correlation between expres-

sion in tumor and stromal cells[J]. Lung Cancer, 2009, 63(2):277-283.

- [4] 吴海珍, 刘东华. VEGF 与非小细胞性肺癌关系的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(3):513-515.
- [5] Hu Y, Hu MM, Shi GL, et al. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2014, 40(9):1136-1142.
- [6] Brussino L, Culla B, Bucca C, et al. Inflammatory cytokines and VEGF measured in exhaled breath condensate are correlated with tumor mass in non-small cell lung cancer[J]. J Breath Res, 2014, 8(2):027110.
- [7] Liu X, Zhang H, Yu X, et al. The correlation of expression of VEGF and EGFR with SUV of (18)FDG-PET-CT in non-small cell lung cancer[J]. Contemp Oncol (Pozn), 2014, 18(5):334-339.
- [8] 刘东华. 非小细胞肺癌 VEGF-C 的表达及 LYVE-1 标记的微血管密度与淋巴结转移的关系[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(18):3927-3928.
- [9] Hao S, Yang Y, Liu Y, et al. JAM-C promotes lymphangiogenesis and nodal metastasis in non-small cell lung cancer [J]. Tumour Biol, 2014, 35(6):5675-5687.
- [10] Xin X, Majumder M, Girish GV, et al. Targeting COX-2 and EP4 to control tumor growth, angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis to the lungs and lymph nodes in a breast cancer model[J]. Lab Invest, 2012, 92(8):1115-1128.
- [11] Feng Y, Hu J, Ma J, et al. RNAi-mediated silencing of VEGF-C inhibits non-small cell lung cancer progression by simultaneously down-regulating the CXCR4, CCR7, VEGFR-2 and VEGFR-3-dependent axes-induced ERK, p38 and AKT signalling pathways [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(15):2353-2363.
- [12] Yigit S, Demir L, Tarhan MO, et al. The clinicopathological significance of Bax and Bcl-2 protein expression with tumor infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma[J]. Neoplasma, 2012, 59(5):475-485.
- [13] Sun Q, Hua J, Wang Q, et al. Expressions of GRP78 and Bax associate with differentiation, metastasis, and apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(6):6753-6761.
- [14] 刘瑞芬, 蒋军广, 张晓燕, 等. 凋亡相关基因 bax 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9):2002-2003.
- [15] Caputi M, Groeger AM, Esposito V, et al. Frequent high expression of bax pro-apoptotic protein in non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Res, 1999, 19(1B):825-827.
- [16] Ge YL, Zhang X, Zhang JY, et al. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(4):389-395.