

# 乳腺疾病患者血浆 VEGF-C 水平与乳腺组织中 c-erbB-2 表达的关系

曲兆伟<sup>1</sup>, 张建国<sup>1</sup>, 张雅芳<sup>2</sup>, 郭宝良<sup>1</sup>, 沈滨<sup>1</sup>, 仲雷<sup>1</sup>

(1. 黑龙江省哈尔滨医科大学附属二院 乳腺外科, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨医科大学 解剖教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**应用酶联免疫吸附试验(ELISA法)检测61例乳腺癌患者和36例乳腺良性疾病患者手术前及12例健康人血浆中VEGF-C的含量,用免疫组织化学法检测乳腺组织中c-erbB-2的表达情况,并进行比较分析。结果显示,乳腺癌组血浆VEGF-C(P-VEGF-C)阳性表达率为63.93%,其表达与肿瘤淋巴结转移及临床分期有关( $P < 0.05$ ),与肿瘤大小、月经状况、雌孕激素受体及组织学分级无关( $P > 0.05$ ),乳腺癌组VEGF-C高于良性疾病组( $P < 0.01$ ),VEGF-C的表达水平在导管内癌与浸润性导管癌之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),P-VEGF-C与乳腺组织中c-erbB-2的表达呈正相关( $r = 0.454, P < 0.01$ )。提示乳腺癌患者血浆中VEGF-C表达可能成为鉴别乳腺良恶性病变、判断有无淋巴结转移及预后的辅助指标。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(11): 1112-1115]

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学; 血管内皮生长因子C/血液; c-erbB-2

**中图分类号:** R737.9

**文献标识码:** B

乳腺癌细胞的生长扩散不仅依靠自身的增殖,还能分泌众多血管生成因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血小板衍生因子(PDGF)等数十种。近年的研究证明,c-erbB-2原癌基因与乳腺癌的生物学行为和预后密切相关。以往关于VEGF家族的研究主要集中在肿瘤组织中,而近年发现它还可出现在肿瘤患者的血液、尿液、渗出液、漏出液中。本文旨在探讨与淋巴管的生发起作用的VEGF-C在乳腺癌患者血浆中的表达与组织中c-erbB-2表达的相关性及其与淋巴结转移和预后的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 病例分组及一般资料

1.1.1 乳腺癌组(恶性组) 61例。均为本院普外科2005年10月—2006年9月手术治疗的乳腺癌女性患者;年龄为(50.6 ± 9.8)岁;≤45岁者17例,>45岁者44例。其中病理诊断为浸

润性导管癌45例,黏液癌3例,髓样癌4例,导管内癌9例。患者术前均未接受手术治疗及放疗、化疗。按照美国癌症联合委员会(AJCC)的TNM分期标准分为0期9例,I期16例,IIa期15例,IIb期8例,IIIa期10例,IIIc期2例,IV期1例;其中伴淋巴结转移的21例,无淋巴结转移的40例。

1.1.2 乳腺良性病变(良性组) 36例。包括女性乳腺纤维腺瘤13例,乳腺增生病7例,乳管内乳头状瘤13例,男子乳房发育症3例;年龄为(43.1 ± 10.4)岁。

1.1.3 正常对照组(对照组) 12例。为体检肝肾功能正常的健康人,均无近期手术、创伤及肿瘤等病史,年龄为(46.1 ± 16.4)岁。

### 1.2 实验试剂及方法

1.2.1 主要试剂 人VEGF-C免疫酶联吸附试验(ELISA)试剂盒购自Bender MedSystems公司;鼠抗人c-erbB-2单克隆抗体、PV-9000二步法免疫组化试剂盒及DAB试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 血浆VEGF-C(P-VEGF-C)的测定 抽取健康皮试者及手术前患者静脉血4mL,置于含乙二胺四乙酸(EDTA)管中抗凝,离心(2000r/min,10min)后取上清液放入Eppendorf(EP)管中,整个

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30672420);黑龙江省科技攻关项目(2005G0972-00)

**收稿日期:**2006-12-01; **修订日期:**2007-01-22。

**作者简介:**曲兆伟,男,黑龙江鸡西人,哈尔滨医科大学硕士研究生,主要从事乳腺癌淋巴管生成与淋巴道转移机制方面的研究。

**通讯作者:**张建国 E-mail:zhangjiang43@hotmail.com

过程在采血后 1h 内完成。然后置  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,待成批检测,避免反复冻融。采用人 VEGF-C ELISA 试剂盒测定标本 VEGF-C 浓度,严格按照试剂盒说明书操作。

### 1.2.3 c-erbB-2 免疫组织化学(免疫组化)检测

收集手术切除标本,10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,4 $\mu\text{m}$  连续切片;用 PV-9000 二步法,按免疫组化操作规程进行,DAB 显色。磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。c-erbB-2 阳性细胞为膜着色。结果判断:不着色为阴性(-);着色阳性细胞数  $>10\%$  为阳性,其中着色弱且不连续为弱阳性(+);着色中等且部分连续为阳性(++);着色强且连续为强阳性(+++)。

1.2.4 乳腺癌组织学分级方法 按 Bloom-Richandsom 法<sup>[1]</sup>依据组织分化程度(以腺管的形成为主要依据)、核多形性和核分裂计分相加,分为 I 级(3~5 分)分化好,II 级(6~7 分)分化中等,III 级(8~9 分)分化差。

### 1.3 统计学处理

数据以 SPSS10.00 统计软件进行数据处理。采用 *t* 检验和 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 各组 P-VEGF-C 的表达

对照组 P-VEGF-C 均数与良性组 P-VEGF-C 均数之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。恶性组 P-VEGF-C 均数与正常对照组及良性组之间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 P-VEGF-C 在各组中的表达情况( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	P-VEGF-C (pg/mL)
对照组	12	71.32 $\pm$ 36.96 <sup>†</sup>
良性组	36	92.09 $\pm$ 39.58 <sup>†</sup>
恶性组	61	199.12 $\pm$ 111.37

注:† 与恶性组比  $P < 0.01$

### 2.2 乳腺不同病理类型的 P-VEGF-C

在 36 例良性病变中,P-VEGF-C 在不同病理类型之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在恶性组中,浸润性导管癌的 P-VEGF-C 均数显著高于黏液癌、髓样癌和导管内癌的 P-VEGF-C 均数( $P < 0.05$ )。导管内癌与黏液癌、髓样癌之间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),导管内癌与乳腺增生病和乳管内乳头状瘤差异有显著性( $P < 0.05$ ),而与其他良性乳腺疾病间差异无显著性( $P > 0.05$ )(表 2)。

表 2 P-VEGF-C 在不同病理类型中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

病理类型	<i>n</i>	P-VEGF-C (pg/ml)
对照组	12	71.32 $\pm$ 36.96
恶性组		
浸润性导管癌	45	222.18 $\pm$ 116.60
黏液癌	3	103.53 $\pm$ 33.98 <sup>1)</sup>
髓样癌	4	97.71 $\pm$ 42.89 <sup>1)</sup>
导管内癌	9	160.76 $\pm$ 63.72 <sup>1)</sup>
良性组		
纤维腺瘤	13	104.14 $\pm$ 45.06
乳腺增生病	7	76.69 $\pm$ 49.90 <sup>2)</sup>
乳管内乳头状瘤	13	87.73 $\pm$ 30.16 <sup>2)</sup>
男子乳房发育症	3	94.64 $\pm$ 20.01

注:1)与浸润性导管癌比较, $P < 0.05$ ; 2)导管内癌比较, $P < 0.05$

### 2.3 P-VEGF-C 的表达与乳腺癌的临床病理因素的关系

恶性组中,肿块直径、绝经前后、雌孕激素受体的表达情况以及组织学分级等病理因素的表达情况以及组织学分级等病理因素的 P-VEGF-C 表达组间差异均无显著性(均  $P > 0.05$ );但 P-VEGF-C 的表达与有、无淋巴结转移差异有显著性( $P < 0.05$ ),而淋巴结转移数目  $\leq 3$  个与  $> 3$  个差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。随着 TNM 分期的增加 P-VEGF-C 值亦升高;III,IV 期高于 0, I, II 期( $P < 0.05$ )(表 3)。

表 3 P-VEGF-C 不同临床与病理条件下的表达( $\bar{x} \pm s$ )

病理因素	<i>n</i>	P-VEGF-C (pg/mL)	<i>P</i> 值
肿瘤大小(cm)			
T $\leq 2$	31	185.88 $\pm$ 110.97	$>0.05$
T $> 2$	30	212.80 $\pm$ 111.99	
绝经情况			
绝经前	30	207.04 $\pm$ 109.38	$>0.05$
绝经后	31	191.46 $\pm$ 114.53	
淋巴结转移情况			
(-)	40	164.27 $\pm$ 84.87	$>0.05$
(+)	21	265.49 $\pm$ 126.92	
淋巴结阳性个数			
$\leq 3$	13	251.11 $\pm$ 115.10	$>0.05$
$> 3$	8	288.86 $\pm$ 149.33	
雌激素受体(ER)			
(-)	28	201.86 $\pm$ 121.70	$>0.05$
(+)	33	196.80 $\pm$ 103.66	
孕激素受体(PR)			
(-)	12	230.71 $\pm$ 117.57	$>0.05$
(+)	49	191.38 $\pm$ 109.66	
分化程度			
I	4	212.66 $\pm$ 80.48	$>0.05$
II	33	217.86 $\pm$ 118.29	
III	8	244.77 $\pm$ 134.10	
TNM 分期			
0, I, II	48	172.77 $\pm$ 89.87	$>0.05$
III, IV	13	296.40 $\pm$ 131.72	

## 2.4 P-VEGF-C 与 c-erbB-2 基因的关系

采用 ELISA 法检测 EDTA 抗凝的 12 例正常人 (对照组) 血浆 VEGF-C, 其值为 72.83 pg/mL [ (6.30 ~ 129.04) pg/mL ]; 取其 95% 可信区间的上限 129.04 pg/mL 作为临界值。大于临界值者为 P-VEGF-C 阳性。在恶性组患者血浆中 VEGF-C 表达的强度与 c-erbB-2 的表达强度呈正相关 ( $r = 0.454, P < 0.01$ ) (表 4)。

表 4 血浆 VEGF-C 与 c-erbB-2 基因的关系

指标	分组	n	c-erbB-2			
			- (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)
P-VEGF-C	-	22	17(76.92)	5(23.08)	0(0)	0(0)
	+	39	14(32)	10(36)	13(24)	2(8)
总数		61	31	15	13	2

注:  $r = 0.454, P < 0.01$

## 3 讨论

VEGF 家族包括 VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 及 PlGF。其中 VEGF-C 主要通过 VEGFR-3 相结合, 以调节肿瘤淋巴管的生成, 属特异的新生淋巴管刺激因子。

淋巴道转移是乳腺癌转移的最主要方式。VEGF-C 具有促进肿瘤淋巴管生成的作用, 与肿瘤淋巴道转移密切相关<sup>[2]</sup>。Karpanen 等<sup>[3]</sup>观察到, 在乳腺癌组织中 VEGF-C 能促进淋巴管的生成。近年来, 关于体液中 VEGF 的研究已有报道。Heer 等<sup>[4]</sup>测定 200 名乳腺癌患者血清 VEGF 含量, 发现 S-VEGF 水平明显高于正常对照组。由于血清中的粒细胞、血小板所含的大量 VEGF<sup>[5]</sup>对实验造成干扰, 故近年来倾向于使用血浆进行测定。Adams 等<sup>[6]</sup>用 ELISA 法检测 201 例标本的 S-VEGF 和 P-VEGF, 结果显示 P-VEGF 在乳腺癌患者中较正常对照组显著升高, 但与血小板计数无相关性。

本实验结果表明, 乳腺癌患者 P-VEGF-C 明显高于乳腺良性疾病及正常对照组 ( $P < 0.01$ ); III, IV 期乳腺癌 P-VEGF-C 表达明显高于 0, I, II 期 ( $P < 0.05$ ); 浸润性导管癌明显高于导管内癌 P-VEGF-C 的表达 ( $P < 0.05$ ); 导管内癌明显高于乳腺良性疾病 P-VEGF-C 的表达 ( $P < 0.05$ )。

揭示在乳腺癌早期阶段, 大量产生的 VEGF-C 即促进淋巴管新生, 增加癌细胞发生淋巴转移的几率, 并通过肿瘤内脉管释放入血, 使其在血浆中表达增加。Duff 等<sup>[7]</sup>研究发现直肠癌患者血

浆中 VEGF-C 的表达水平明显高于正常人群, 在早期和晚期患者之间 P-VEGF-C 的水平也存在显著差别。赵金伟等<sup>[8]</sup>对胃癌血清中 VEGF-C 的研究也得出相同结论。本研究还发现, P-VEGF-C 的表达与肿瘤大小、月经状况、激素水平及组织学分级无关。而淋巴结转移组的乳腺癌患者 P-VEGF-C 的表达水平与未发生转移组相比差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。提示患者血浆 VEGF-C 水平可能作为预测乳腺癌转移、复发潜能的指标。

在乳腺癌预后判断中, 用免疫组化方法检测 c-erbB-2 基因的表达是较为肯定的指标之一<sup>[9-10]</sup>。Yen 等<sup>[11]</sup>研究表明 EGFR/ErbB-2 和 ErbB-2/ErbB-3 异二聚体较之其他受体更能促进 VEGF 基因的表达, 其过量表达能增加 VEGF 的表达。ErbB 介导的 VEGF 转录增量调节的区域位于 VEGF 启动子上游的 -88 ~ -66 区域之间, 提示 VEGF 可能是 c-erbB-2 传导路径下游的目标。有学者<sup>[12-13]</sup>研究指出, c-erbB-2 表达会导致 VEGF 表达的增加, 进而使血管生成增加。本研究表明 P-VEGF-C 表达与 c-erbB-2 的表达呈正相关 ( $r = 0.454, P < 0.01$ ), 与上述学者报道相一致。血浆中 VEGF-C 水平与组织中 c-erbB-2 基因表达情况和肿瘤内脉管新生之间可能存在某种联系, 其过度表达可能提示乳腺癌预后不良。故认为 P-VEGF-C 有可能成为早期鉴别乳腺良恶性病变、判断有无淋巴结转移及预后的辅助指标之一。

Weich 等<sup>[14]</sup>的报道, 在肿瘤患者中血循环的 VEGF-C 可能来源于体内多种细胞的分泌, 但血浆中与肿瘤组织中 VEGF-C 的相关性尚待深入研究证实。

## 参考文献:

- [1] Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer [J]. Br J Cancer, 1957, 9(2):359-377.
- [2] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 91(2):125-132.
- [3] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth [J]. Cancer Res, 2001, 61(5):1786-1790.
- [4] Heer K, Kumar H, Read JR, et al. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: its relation with cancer type and estrogen receptor status [J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(11):3491-3494.
- [5] Petri Salven, Arto Orpana, Heikki Joensuu. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor [J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(3):487-491.

文章编号:1005-6947(2007)11-1115-03

· 简要论著 ·

# 乳腺癌前哨淋巴结活检对腋窝淋巴结状态的预测价值研究

陈波<sup>1</sup>, 陆云飞<sup>2</sup>, 薛明兴<sup>1</sup>, 叶春梅<sup>1</sup>, 黄自明<sup>1</sup>

(1. 湖北省妇幼保健院 乳腺外科, 湖北 武汉 430070; 2. 广西医科大学第一附属医院 胃肠腺体外科, 广西南宁 530021)

**摘要:**为探讨乳腺癌前哨淋巴结(SLN)组织学特征对腋窝淋巴结状态的预测价值,笔者应用专利蓝或锝<sup>99m</sup>标记的大分子右旋糖苷(<sup>99m</sup>Tc-DX)为示踪剂成功显示20例乳腺癌患者的SLN。术中先进行前哨淋巴结活检(SLNB),再行乳腺癌改良根治术。并应用常规病理(HE)、免疫组化(IHC)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测腋窝淋巴结转移。结果显示,20例患者共找到腋窝淋巴结254个,其中SLN48个,NSLN206个。常规病理证实3例患者7个前哨淋巴结有癌转移,NSLN206个均无癌转移。免疫组化染色检测到7例患者11个SLN CK-19表达阳性,2个NSLN表达阳性。RT-PCR检测CK-19 mRNA 14例患者30个SLN和22个NSLN表达阳性。提示乳腺癌前哨淋巴结活检能准确预测患者腋窝淋巴结的状态。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(11): 1115-1117]

**关键词:** 乳腺癌; 前哨淋巴结; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应

**中图分类号:** R 737.9

**文献标识码:** B

目前,早期乳腺癌的治疗越来越趋向于缩小手术范围。乳腺癌前哨淋巴结活检(SLNB)是这一领域的一大进展。笔者应用专利蓝(patent blue)或锝<sup>99m</sup>标记的大分子右旋糖苷(<sup>99m</sup>Tc-DX)作为示踪剂定位乳腺癌前哨淋巴结<sup>[1]</sup>,并应用免疫组化染色(IHC)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测腋窝淋巴结微转移,以探讨乳腺癌前哨淋巴结组织学特征对腋窝淋巴结状态的预测价值。现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 一般资料

应用专利蓝或<sup>99m</sup>Tc标记的大分子右旋糖苷(<sup>99m</sup>Tc-DX)为示踪剂成功显像SLN并经常规病理证实腋窝淋巴结阴性或仅有SLN阳性的乳腺癌患者20例,共获得腋窝淋巴结254个,其中SLN48个,NSLN206个。

### 1.2 标本处理

每个淋巴结平均分成2块,一块行HE常规病理检查和免疫组化染色检查,另一块立即投入液氮中冷冻,待提取RNA用于RT-PCR检测。

**收稿日期:**2007-04-04; **修订日期:**2007-09-17。

**作者简介:**陈波,男,湖北长阳人湖北省妇幼保健院主治医师,主要从事乳腺疾病基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**陈波 E-mail:philard@sina.com.cn

- [6] Adams J, Carder P J, Downey S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (11): 2898 - 2905.
- [7] Duff SE, Li C, Renehan A, *et al.* Immunodetection and molecular forms of plasma vascular endothelial growth factor-C [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(2): 339 - 343.
- [8] 赵金伟,王广义. 胃癌患者血清 VEGF-C 和 VEGF-A 的水平变化及 VEGF-C 在胃癌组织中的表达[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2006, (03): 483 - 485.
- [9] 高鹏,周庚寅,魏军民,等. 乳腺癌 c-erbB2 过表达与生存率、内分泌治疗效果和预后的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(10): 735 - 738.
- [10] Aziz SA, Pervez S, Khan S, *et al.* Significance of immunohistochemical c-erbB-2 product localisation pattern for prognosis in human breast cancer [J]. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7 (3): 190 - 196.
- [11] Yen L, Benlimame N, Nie ZR, *et al.* Differential regulation of tumor angiogenesis by distinct ErbB homo- and heterodimers [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(11): 4029 - 4044.
- [12] Gottfried E, Konecny GE, Meng YG, *et al.* Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(5): 1706 - 1716.
- [13] 易晓雷,易文君,冉承茂,等. 乳腺癌 c-erbB-2 的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(4): 297 - 299.
- [14] Weich HA, Bando H, Brokelmann M, *et al.* Quantification of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) by a novel ELISA [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 285(2): 145 - 155.