

转录因子 Prox-1 对大肠癌中淋巴管生成的作用

傅仲学 肖世尧 王春毅 张彦斌

【摘要】 目的 探讨大肠癌中转录因子 Prox-1 的表达及对淋巴管生成、淋巴结转移的作用。方法 采用 RT-PCR 检测大肠癌正常组织、癌交界组织、癌组织中 Prox-1 的表达;用免疫组织化学 SP 法测定淋巴管密度(lymphatic vascular density, LVD)。结果 大肠癌组织、癌交界组织中 Prox-1 的表达水平均显著高于正常组织($P < 0.05$)。癌交界组织中 Prox-1 的表达水平在 Dukes A + B 期和 C + D 期、有无淋巴结转移之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常组织与癌交界组织的 LVD 比较差异有统计学意义($P < 0.05$);癌交界组织中 LVD 在 Dukes A + B 期和 C + D 期、有无淋巴结转移之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。癌交界组织中 Prox-1 mRNA 的表达水平与 LVD 呈正相关($r = 0.54, P = 0.018$)。结论 Prox-1 的过度表达诱导淋巴管内皮细胞的分化、生成;Prox-1 是预测肿瘤淋巴转移影响的有效因子之一,但不是独立因子;在进行预测时应选用癌交界组织。

【关键词】 转录因子 Prox-1; 淋巴转移; 大肠肿瘤

【中图法分类号】 R735.3⁺4 **【文献标识码】** A

Effects of Prox-1 on lymphangiogenesis in colorectal carcinoma FU Zhong-xue, XIAO Shi-yao, WANG Chun-yi, ZHANG Yan-bin. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

【Abstract】 **Objective** To study the expression of Prox-1 in colorectal carcinoma and its effects on lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. **Methods** Twenty-five colorectal carcinoma patients admitted in our department from April to August 2004 were involved in this study. RT-PCR was used to detect the expression of Prox-1 mRNA in normal tissues, paracarcinoma tissues and tumor tissues; immunohistochemical method (SP) was used to examine the lymphatic vessel density (LVD). **Results** The expression of Prox-1 mRNA in tumor tissues and paracarcinoma tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P < 0.05$). The expression of Prox-1 in paracarcinoma tissues in groups of Dukes A + B, Dukes C + D, and groups with or without lymph node metastasis showed significant difference ($P < 0.05$). There was statistical difference upon LVD between normal tissues and paracarcinoma tissues ($P < 0.05$). LVD of paracarcinoma tissues in groups of Dukes A + B, Dukes C + D, and groups with or without lymph node metastasis showed significant difference ($P < 0.05$). The expression of Prox-1 mRNA in paracarcinoma tissues had positive linear relation with LVD ($r = 0.54, P = 0.018$). **Conclusions** (1) The overexpression of Prox-1 induced the differentiation and growth of lymphatic endothelial cells. (2) Prox-1 is an effective factor in anticipating lymphatic metastasis, but not an independent factor. (3) Paracarcinoma tissue is preferable in anticipating lymphatic metastasis.

【Key words】 Prox-1; Lymphatic metastasis; Colorectal carcinoma

肿瘤的侵袭和转移是影响患者预后的重要因素。淋巴结转移是大肠癌常见的转移途径,伴有淋巴结转移的大肠癌患者 5 年生存率远低于无淋巴结转移者。多种因素影响大肠癌淋巴结转移,其中转录因子 Prox-1 是淋巴系统发育不可缺少的因子,在淋巴管新生、发育中具有重要的作用^[1-2]。本研究旨在探讨 Prox-1 对大肠癌中淋巴管生长的作用及其临床意义。

作者单位: 400016 重庆医科大学附属第一医院普外科

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本: 收集我科 2004 年 4 月至 2004 年 8 月病理学诊断明确,术前未经过放疗、化疗的 25 例住院手术患者的大肠癌组织,癌交界组织和正常大肠黏膜。25 例中男 16 例,女 9 例;平均年龄 46.47 岁(27 ~ 80 岁)。直肠癌 14 例,结肠癌 11 例。病理类型均为腺癌,高分化 6 例,中分化 14 例,低分化 5 例。Dukes A + B 期 12 例, C + D 期 13 例。有

淋巴结转移者 13 例,无淋巴结转移者 12 例;肝转移者 1 例。

癌交界组织取自以手触摸肿瘤边缘为界向近端 0.5 cm × 0.5 cm 的组织,正常大肠黏膜取自距肿瘤边缘 15 cm 处。每一病例标本均在手术切除后立即采集两块,一块立即液氮速冻 1 h 以上, -80 °C 冰箱中保存备用;另一块用 10% 甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋,保存备用。所有病例均进行组织学诊断,临床分期、分型,同时收集其临床资料。

1.1.2 试剂: Trizol 购自上海生物工程技术服务有限公司; RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa; Podoplanin 单克隆抗体(鼠抗人)购自美国 Angiobio 公司; Histostain™-Plus Kits 及浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物: Prox-1, 上游: 5'-ATGTCATCTCACCA-CCTGAG-3', 下游: 5'-ATGTCATCTCACACCTGAG-3', 引物长度 365 bp; β -actin, 上游: 5'-ATGATATCGC-CGCGCTCGTC-3', 下游: 5'-CGCTCGGTGAGGATCT-TCA-3', 引物长度 580 bp。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法测定 Prox-1 mRNA 表达水平

1.2.1.1 标本组织总 RNA 的提取: 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。经紫外线分光光度计 $A_{260\text{nm}}$ 、 $A_{280\text{nm}}$ 处测定 RNA 纯度。DEPC 水溶解 RNA, 测 A 值并计算 RNA 含量。

1.2.1.2 RT-PCR: 操作按说明书进行。

1.2.1.3 扩增产物鉴定: 取 10 μ l 终产物, 经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 扩增带, 可见扩增产物分别为 365 bp 和 580 bp, 与所设计的扩增产物相符。空白对照及阴性对照未见任何扩增带, 说明为特异性扩增产物。

1.2.1.4 Prox-1 基因的定量: 将琼脂糖凝胶电泳结果用美国 UVP GDS-8000 System 凝胶图像分析系统扫描并分析, 凝胶数字扫描成像系统照相并测定目的基因扩增条带和与之配对的内参照 β -actin 扩增条带的绝对积分 IOD 值, 结果以目的条带的绝对积分 IOD 值同与之配对的内参照 β -actin 扩增条带的绝对积分 IOD 值的比值(即 β -actin 校正值)表示。

1.2.2 免疫组织化学染色淋巴管内皮细胞透明质酸受体(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1, LYVE-1)测定淋巴管密度

1.2.2.1 免疫组织化学 SP 法染色: 根据 Histostain™-Plus Kits 和浓缩型 DAB 试剂盒说明书进行。

将切片置于苏木精溶液中复染, 盐酸酒精分化,

自来水冲洗; 切片依次置于梯度酒精中逐级脱水后, 于 60 °C 烤箱中烘烤干燥, 二甲苯透明, 用中性树脂胶封片, 室温自然干固后镜检。

1.2.2.2 结果判定: 用已知的阳性片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

LYVE-1 特异性与透明质酸在淋巴管腔表面共同表达, 均匀分布于淋巴管内皮细胞的基底面和胞腔面, 在血管壁上完全不表达。在使用免疫组化 SP 法染色后, 以棕色或棕黄色为阳性。在镜下可见组织中被染成棕黄色的管状或条索状微淋巴管, 而血管完全不着色, 并可见其中的红细胞。

微淋巴管密度判定: 先在低倍镜($\times 40$)下扫描整个视野, 选择中高淋巴管密度区, 然后在高倍镜($\times 200$)下计数被染成棕黄色的淋巴管数目。结果用 5 个高倍镜视野下的淋巴管数目的平均数表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 软件分别进行 *t* 检验、 χ^2 检验、方差分析和 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 Prox-1 mRNA 的表达水平与临床病例特征的关系

患者正常组织、癌交界组织、癌组织中 Prox-1 mRNA 表达水平(IOD 值)分别为: 0.51 ± 0.46 、 3.11 ± 2.99 、 3.28 ± 3.21 (图 1~3), 三者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。而在不同的性别、年龄、浸润深度及分化程度组其表达水平差异无统计学意义。癌交界组织中 Prox-1 mRNA 表达水平在 Dukes 分期、淋巴结转移比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 不同部位 Prox-1 mRNA 的表达水平与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

病理因素	例数	正常组织		癌交界组织		癌组织	
		IOD 值	P	IOD 值	P 值	IOD 值	P 值
Dukes 分期							
A + B	12	0.56 ± 0.49	0.56	1.60 ± 2.31	0.03	2.71 ± 2.25	0.45
C + D	13	0.43 ± 0.47		4.73 ± 3.03		3.93 ± 4.15	
淋巴结转移							
有	13	0.46 ± 0.46	0.66	4.46 ± 0.97	0.03	3.78 ± 3.94	0.48
无	12	0.56 ± 0.49		1.60 ± 2.31		2.71 ± 2.25	

2.2 不同部位的淋巴管密度(lymphatic vascular density, LVD)与肿瘤临床病理的关系

在正常组织和癌交界组织中被免疫组织化学 SP 法染色为棕黄色的淋巴管清晰可见, 而微血管不着色, 可以清楚分辨淋巴管与血管(图 4, 5)。在癌

组织中,淋巴管扭曲、变形(图 6),丧失淋巴管的生理功能,所以对癌组织不测定 LVD。

正常组织的 LVD 为(6.05 ± 2.00)个/mm²,癌交界组织为(10.04 ± 3.40)个/mm²,两者比较差异有统计学意义(P < 0.05)。而在不同的性别、年龄、浸润深度及分化程度其表达水平比较差异无统计学意义;癌交界组织的 LVD 在 Dukes 分期、淋巴结转移比较差异有统计学意义(P < 0.05,表 2)。

表 2 不同部位 LVD 与肿瘤临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

病理因素	例数	正常组织		癌交界组织	
		LVD(个/mm ²)	P 值	LVD(个/mm ²)	P 值
Dukes 分期					
A + B	12	5.02 ± 1.32	0.65	8.33 ± 1.91	0.032
C + D	13	6.26 ± 2.52		11.58 ± 3.79	
淋巴结转移					
有	13	6.26 ± 2.52	0.65	11.58 ± 3.79	<0.033
无	12	5.02 ± 1.32		8.33 ± 1.91	

2.3 癌交界组织中 Prox-1 mRNA 的表达水平与 LVD 的相关性分析

癌交界组织中 Prox-1 mRNA 的表达水平与 LVD 呈正相关($r = 0.54, P = 0.018$,图 7)。

3 讨论

Prox-1 是果蝇的同源异型盒基因 prospero 在哺乳动物中的同源框基因转录因子。Wilting 等^[3]采用免疫荧光技术观察了 Prox-1 在人胚胎、成人正常组织及病理组织中淋巴管内皮细胞上的表达,发现 19 周的人胚胎组织中 Prox-1 与 VEGFR-3 共同表达于淋巴干和毛细淋巴管的内皮细胞上。在成人血管瘤和淋巴血管瘤组织的淋巴管内皮细胞上,Prox-1 则与 CD₃₁共同表达,证实了 Prox-1 是一种特异性高于 VEGFR-3 的淋巴管内皮细胞标志物。Reis 等^[1]和 Wigle 等^[4]采用插入 β-半乳糖基因敲除鼠的 Prox-1 基因,发现敲除 Prox-1 基因后,静脉内皮

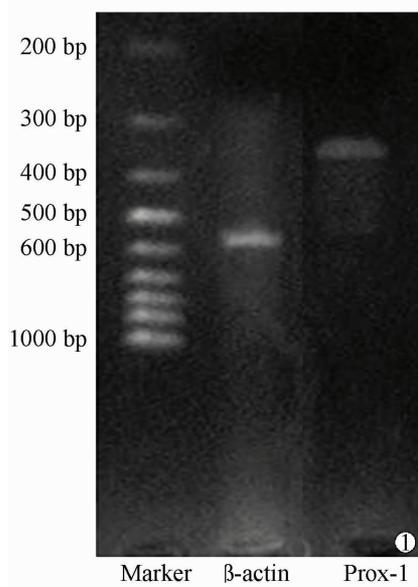


图 1 正常组织中 Prox-1 mRNA 的表达

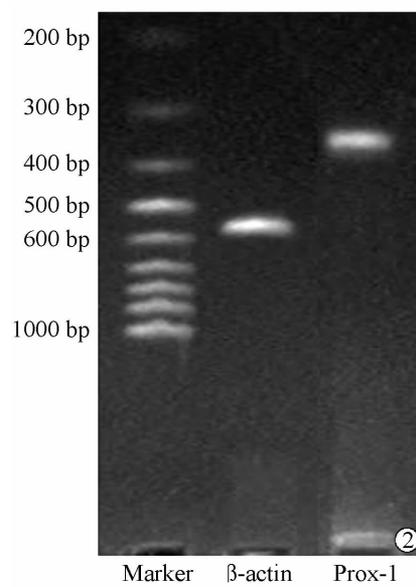


图 2 癌交界组织中 Prox-1 mRNA 的表达

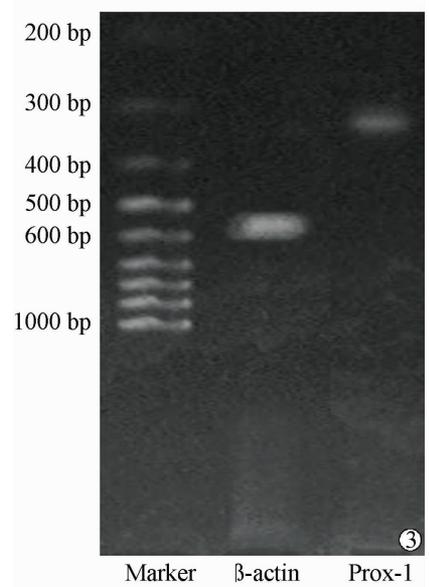


图 3 癌组织中 Prox-1 mRNA 的表达

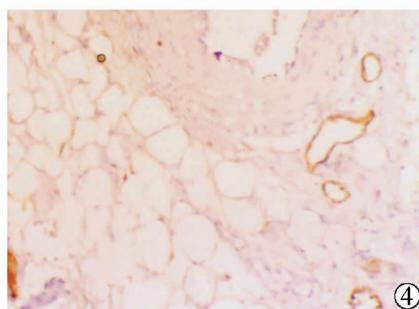


图 4 正常组织淋巴管 (免疫组织化学染色 ×100)

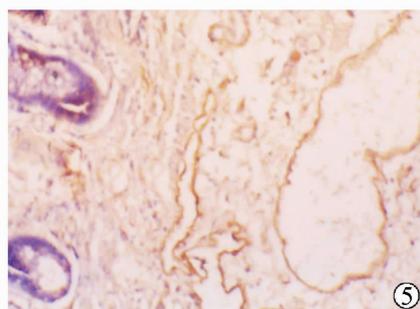


图 5 癌交界组织淋巴管 (免疫组织化学染色 ×100)

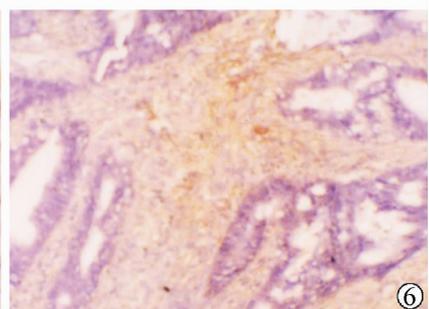


图 6 癌组织中淋巴管 (免疫组织化学染色 ×100)

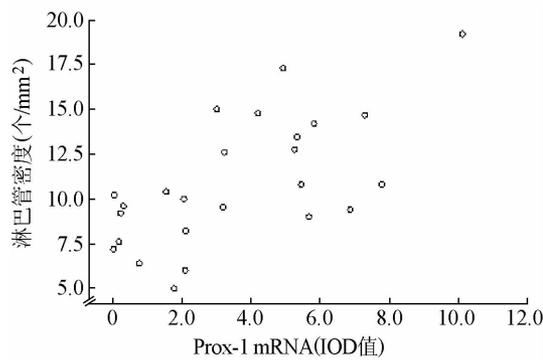


图7 Prox-1 mRNA 表达水平与淋巴管密度的关系

细胞无法向淋巴内皮细胞定向分化;胚胎发育时以出芽方式自静脉内皮细胞生成淋巴管的过程受阻;所有内皮细胞均不表达 VEGFR-3 或 LYVE-1 等淋巴管内皮细胞标志物,但并未影响血管形成过程。这表明在内皮细胞分化中,Prox-1 表达将通过分裂、增生、发芽而形成淋巴管的细胞亚群;或者说细胞表达 Prox-1 后,这些细胞向淋巴管内皮方向分化。Hong 等^[5]采用基因转染实验证明,Prox-1 单一基因即可促成血管内皮细胞定向分化为淋巴管内皮细胞表型,是淋巴管生成调控机制中的关键因子,其后在对卡波西肉瘤的研究中再次证实了 Prox-1 是淋巴发育的主要调控因子^[6]。Petrova 等^[7]在研究中发现,即使是表型稳定的血管内皮细胞在过度表达的 Prox-1 的作用下也能被诱导生成淋巴管上皮细胞。他们认为在淋巴管内皮细胞的生成中 Prox-1 起到了淋巴内皮细胞增殖之诱导因素和决定性因子的作用。Pipsa 和 Petrova^[8]认为 Prox-1 可以作为治疗的靶基因。

Prox-1 在淋巴内皮细胞发育中的分布模式与 Sabin^[9]的淋巴系统起源于静脉系统的学说正好吻合。但目前引导 Prox-1 表达的信号以及 Prox-1 调节内皮发芽的机制尚不清楚。Prox-1 可能调节淋巴内皮细胞发芽、分支所需的某些细胞黏附分子或金属蛋白酶的表达,或者调节维持淋巴管内皮细胞迁移、发芽的某些引导信号的表达。本研究发现癌组织和癌交界组织中 Prox-1 基因的表达水平显著高

于正常组织 ($P < 0.05$);且癌交界组织在 Dukes A + B 期与 C + D 期的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);有淋巴结转移和无淋巴结转移的比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在对 Prox-1 与 LVD 相关的分析中发现 Prox-1 与 LVD 成线性正相关 ($r = 0.54, P < 0.018$)。上述研究结果提示,Prox-1 在大肠癌组织、癌交界组织中过度表达,与大肠癌淋巴管新生有显著的相关性,可能促进淋巴管内皮细胞的分化、生成;是预测淋巴转移影响的有效因子,但不是独立因子;在对肿瘤淋巴转移预测中,选择癌交界组织进行基因表达水平的检测具有临床意义。但 Prox-1 的具体作用机制尚不清楚,可作为下一步研究的方向。

参考文献

- [1] Reis RM, Reis-Filho JS, Longatto Filho A, *et al.* Differential Prox-1 and CD31 expression in mucosae, cutaneous and soft tissue vascular lesions and tumors. *Pathol Res Pract*, 2005, 201 (12):771 - 776.
- [2] 王伟,吴小鹏,王建平,等. 人 Syk 基因的表达与大肠癌关系的研究. *中国现代普通外科进展*, 2006, 9(1):40 - 42.
- [3] Wilting J, Papoutsi M, Christ B, *et al.* The transcription factor Prox-1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J*, 2002, 16(10):1271 - 1273.
- [4] Wigle JT, Harvey N, Detmar M, *et al.* An essential role for Prox-1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*, 2002, 21(7):1505 - 1513.
- [5] Hong YK, Harvey N, Nob Y H, *et al.* Prox-1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn*, 2002, 225(3):351 - 357.
- [6] Hong YK, Foreman K, Shin JW, *et al.* Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet*, 2004, 36(7):683 - 685.
- [7] Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, *et al.* Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J*, 2002, 21(17):4593 - 4599.
- [8] Saharinen P, Petrova TV. Molecular regulation of lymphangiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014:76 - 87.
- [9] Sabin FR. A critical study of the evidence presented in several articles on the development of the lymphatic system. *Anat Rec*, 1911, 5:417 - 446.

(收稿日期: 2007-04-27)

(本文编辑: 陈敏、张昊)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者署名要求

作者及署名应符合论文署名作者和单位的要求,作者不得超过 8 个,一旦作者顺序确定,不得任意更改。

本刊编辑部