

· 综述 ·

肿瘤淋巴管生成与淋巴结转移的研究进展

杜力成 王栋 王强修

恶性肿瘤细胞经淋巴管道播散到邻近组织或者远处器官是恶性肿瘤的生物学特征之一,发生淋巴结转移常标志着肿瘤的预后不良。近年来,随着淋巴管生长因子和淋巴管标志物研究的不断进展,肿瘤淋巴管生成与淋巴结转移的关系研究逐步深入,抗淋巴管生成研究已成为肿瘤生物治疗研究领域新的热点^[1]。为此,本文就近年来肿瘤淋巴管生成与肿瘤淋巴转移的最新研究进展予以综述。

一、肿瘤淋巴管生长因子及其受体

血管内皮生长因子家族(vascular endothelial growth factors family, VEGFs)是一族调节内皮细胞生长的因子,由几种在血管和淋巴管的形成中担任重要角色的分泌型糖蛋白组成。目前鉴定出的淋巴管生长因子血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)和血管内皮生长因子-D(vascular endothelial growth factor-D, VEGF-D)即是该族成员。

与 VEGF-C 和 VEGF-D 两种配体结合的受体主要有血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)和血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3),两者同属血管内皮生长因子受体家族(vascular endothelial growth factor receptor family, VEGFRs)^[1]。

(一)肿瘤淋巴管生长因子

肿瘤淋巴管生长因子主要包括 VEGF-C 和 VEGF-D,两者均为 VEGF 家族成员^[1]。此外,其他分子如促血管生成因子-2(angiotensin-2)、神经纤毛蛋白-2(neuropilin-2, NP-2)和转录因子 prox-1 对淋巴管系统的形成和维持起重要作用。

1. VEGF-C:由 Joukov 等^[2]利用受体亲和色谱法从人类前列腺癌细胞株 PC-3 的 cDNA 文库中克隆分离出。人 VEGF-C 基因位于染色体 4q34 上。VEGF-C 前蛋白包括一个 N 端信号肽、VEGF 的同源区和一个 C 端前肽。VEGF-C 以同源二聚体的形式自由分泌到细胞外,大多数分泌型 VEGF-C 是其多肽蛋白前体的水解产物。蛋白水解提高了 VEGF-C 和 VEGFR-3 的结合力,也使得它能结合并激活 VEGFR-2^[3]。通过与受体 VEGFR-3 和 VEGFR-2 结合,VEGF-C 调控淋巴管和血管的生成。

Sugiura 等^[4]检测了 160 例口腔鳞癌患者癌组织中的 VEGF-C 蛋白,发现高表达的 VEGF-C 促进肿瘤淋巴管的生长,并与肿瘤淋巴结转移密切相关,提示 VEGF-C 可以作为淋巴结转移的标志。Shibata 利用小分子干扰 RNA (siRNA) 技术对转移性乳腺癌小鼠模型进行治疗,8 周后观察疗效,结果发现以 VEGF-C siRNA 处理的实验组小鼠肿瘤扩张的淋巴管数量明显减少,淋巴结转移率明显降低,证实了 VEGF-C 可以促进肿瘤淋巴管增殖及淋巴结转移,提示 VEGF-C 可以成为治疗乳腺癌淋巴结转移的

有效靶点^[5]。

2. VEGF-D:首先在鼠的成纤维细胞中作为 FIGF(c-fos-induced growth factor)被鉴定出^[6]。1998 年 Achen 等^[7]确认了 VEGF 家族的这个新成员并将之命名为 VEGF-D。人 VEGF-D 基因定位于 Xp22.31。在 VEGF 家族中,VEGF-D 和 VEGF-C 关系最为密切,和 VEGF-C 一样,VEGF-D 以前体方式分泌,并经蛋白水解过程去掉 N-端和 C-端前肽,然后由中间的 VEGF 同源区形成非共价的同源二聚体成熟形式。VEGF-D 的前体蛋白经过水解加工后,与 VEGFR-2 和 VEGFR-3 的亲合力大大增加^[8]。

很多研究证实,VEGF-D 蛋白表达量与肿瘤淋巴管密度、肿瘤淋巴结转移程度密切相关。Arigami 等^[9]检测了早期胃癌标本 VEGF-D 的蛋白表达,发现 VEGF-D 的蛋白表达水平与患者淋巴结微转移密切相关,因而认为 VEGF-D 表达可以作为早期胃癌淋巴结微转移指针。van Iterson 等^[10]研究了浸润性乳腺癌中 VEGF-D 与淋巴结转移的关系,结果表明 VEGF-D 表达水平越高,则肿瘤周围淋巴管密度越大,肿瘤淋巴结转移率越高。

(二)肿瘤淋巴管生长因子受体

肿瘤淋巴管生长因子受体主要包括 VEGFR-2 和 VEGFR-3。VEGFR-2 和 VEGFR-3 同属 VEGFR 家族,为酪氨酸蛋白激酶受体(receptor tyrosine kinases, RTKs)。VEGFR-2,即 KDR(kinase insert domain containing receptor)或 Flk-1,主要在血管内皮细胞表达,被激活以后可以诱导血管内皮细胞生长,但亦可由造血干细胞、巨核细胞、视网膜前体细胞表达。它最早由 Terman 等^[11]于 1992 年从人脐静脉内皮细胞 cDNA 库中应用已知酪氨酸激酶同源引物通过 PCR 扩增而获得。

VEGFR-3 由 Flt-4 基因编码,最早由 Pajusola 等^[12]于 1992 年自人 HEL 红白血病细胞 cDNA 库中克隆获得,含有 1298 个氨基酸开放读码框架。VEGFR-3 与 VEGFR-2 一样,都包含有 7 个免疫球蛋白样结构的细胞外区域、跨膜区和一个有酪氨酸激酶活性的细胞内区域。

研究显示,VEGFR-2 信号通道主要介导肿瘤血管生成,而 VEGFR-3 信号通道主要介导肿瘤淋巴管生成,后者是通过 VEGFR-3 和其配体 VEGF-C、VEGF-D 的相互作用实现的。VEGF-C 和 VEGF-D 通过结合主要定位于淋巴管内皮上的受体 VEGFR-3 诱导肿瘤淋巴管生长,并促进恶性肿瘤转移。研究显示,VEGFR-3 诱导产生的新生淋巴管是由一层极薄的没有基底膜的细胞排列而成,通透性极高,这种结构是肿瘤细胞发生黏附,穿入并转移到远处淋巴结的形态学基础^[13-14]。

新近有研究指出,除 VEGFR-2 和 VEGFR-3 以外,VEGF-C 和 VEGF-D 还可以与 NP-2 结合,并且 NP-2 参与了淋巴管生成的过程^[15]。

二、肿瘤淋巴管生成的调控机制

研究发现,恶性细胞通过激活肿瘤周围已存在的淋巴管增生,或者通过促进肿瘤周围及瘤内新生淋巴管增生,从而加快肿瘤细胞侵袭淋巴管的进程^[16]。尽管淋巴管生成对肿瘤淋巴结转移的重要作用已得到公认,然而时至今日淋巴管生成的分子

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.20.060

作者单位:250021 济南,山东大学附属省立医院普外科(杜力成),胸外科(王栋),病理科(王强修)

通讯作者:王栋,Email:tjwd83@163.com

机制仍不十分清楚,目前研究认为主要有以下因子在淋巴管生成过程中起到调控作用。

1. VEGFR-3对淋巴管生成起调控作用:VEGFR-3通过结合其配体 VEGF-C 和 VEGF-D 从而激活淋巴管内皮细胞的增殖和迁移,从而调控淋巴管内皮细胞的生成。VEGFR-3介导的信号通路是目前学界较为公认的淋巴管生成的主要调控方式。

VEGFR-3在胚胎发育初期广泛表达于血管内皮细胞,对心血管系统的发育起着至关重要的作用,VEGFR-3基因缺陷的小鼠会因心血管功能衰竭而在胚胎早期死亡^[17]。到胚胎后期,VEGFR-3分布逐步局限于淋巴管,血管几乎不表达。在成人,VEGFR-3几乎只特异性的表达于淋巴管内皮细胞上^[17-18]。VEGFR-3与其特异的配体 VEGF-C、VEGF-D 结合可以引起内皮细胞的增殖和迁移,调控血管及淋巴管内皮细胞的新生,对胚胎发育及肿瘤的生长和转移起重要调控作用。

Karkkainen 等^[19]的研究发现,遗传性淋巴水肿患者存在 VEGFR-3 基因错义突变,证实 VEGFR-3 在淋巴管形成过程起作用。Jettsch 等^[20]发现过表达 VEGF-C 的转基因小鼠,其皮肤淋巴管出现增生,考虑是过量的 VEGF-C 结合并激活了位于淋巴管内皮上的 VEGFR-3 所致。Makinen 等^[21]观察了可溶性的 VEGFR-3 对皮肤淋巴管网络的影响,在 keratin 14 的启动子调控下,高表达量的可溶性 VEGFR-3 由于中和了 VEGF-C 和 VEGF-D,从而影响了淋巴管内皮上 VEGFR-3 的激活,皮肤因缺乏功能性淋巴管而出现淋巴水肿,从另一个侧面提示了内源性的 VEGFR-3 对淋巴管形成的作用。

肿瘤生物治疗方面研究表明,阻断 VEGFR-3 介导的信号传导途径可有效抑制肿瘤淋巴管生成,进而抑制肿瘤淋巴管转移,提示 VEGFR-3 是治疗恶性肿瘤转移特别是淋巴道转移有效的分子生物靶^[22]。Pytowski 等^[23]通过实验证实,使用 VEGFR-3 的抗体可以阻断淋巴管生成的信号传导从而抑制淋巴管新生。Burton 等^[24]使用 VEGFR-3 的抗体 mF4-31C1 对前列腺癌 SCID 鼠模型进行干预,应用免疫组化法测定淋巴管密度。实验结果发现:SCID 鼠经抗体 mF4-31C1 干预后,其肿瘤淋巴管增殖明显受到抑制,区域淋巴管转移率明显降低。

2. prox-1 是淋巴管生成基本的调控因子:prox-1,即同源异型核转录因子基因 (prosporo-related homeobox1, PROX-1) 产物,在内皮细胞中仅特异性地表达于胚胎淋巴管及成人正常组织和肿瘤内淋巴管,在非内皮细胞中可存在于晶状体、心脏、胰腺及神经系统^[25]。Wigle 等^[26]观察了 PROX-1 基因在胚胎期淋巴系统发生过程中的作用,研究者敲除 PROX-1 基因后,发现原始静脉内皮细胞以出芽方式生成淋巴管的过程暂停,胚胎淋巴管系统无法形成。进一步研究发现,所有内皮细胞均不表达淋巴管内皮标志物而只表现出血管内皮细胞的特征,因此研究者认为 PROX-1 基因对胚胎期淋巴管形成和静脉内皮向淋巴管内皮细胞的定向分化具有重要作用,研究结果显示 prox-1 是淋巴管生成最基本的调控因子。Hong 等^[27]利用基因转染将 PROX-1 基因转入人皮肤微血管内皮细胞,并检测目的基因在 mRNA 和蛋白水平的表达,结果发现单一 PROX-1 基因即可促成血管内皮细胞向淋巴管内皮细胞表型的定向分化,证实了 prox-1 在淋巴管生成调控机制中的关键作用。Chang 等^[28]测定了非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织中 prox-1 蛋白表达情况,发现 prox-1 主要定位在

肿瘤浸润的边缘而非瘤内,且 prox-1 蛋白表达水平越高,肿瘤的淋巴管转移率及肿瘤 pTNM 分级越高,因而认为 prox-1 可以为 NSCLC 淋巴管转移的预测因子。

另外,调控淋巴管生成和维持其功能的可能的受体还包括酪氨酸激酶受体 Tie2 和 NP-2^[15,29]。

三、淋巴管生成与肿瘤淋巴管转移

淋巴管转移是恶性肿瘤转移的主要途径之一,也是影响患者预后和治疗策略选择的重要因素。淋巴管生成在肿瘤转移过程中起着重要的作用。研究表明,肿瘤细胞能够诱导肿瘤相关淋巴管形成,反过来,增生淋巴管道又促进了肿瘤细胞向淋巴道的播散^[30]。

Vamos 等^[31]用免疫组化法测定了 103 例 NSCLC 患者的肿瘤标本,发现肿瘤淋巴管密度与肿瘤淋巴管转移程度显著相关。Massi 等^[32]对 45 例表皮黑色素瘤患者进行了病例对照研究,免疫组化法检测了肿瘤标本的淋巴管密度,并以计算机辅助分析软件进行形态分析,结果发现肿瘤淋巴管密度与前哨淋巴管转移情况密切相关,且肿瘤边缘的淋巴管密度远高于瘤灶内。越来越多的研究证实,通过抑制 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号途径可以下调肿瘤淋巴管的增殖从而抑制肿瘤淋巴管转移^[5,33-34]。Alam 等^[33]研究者利用一种新的 VEGFR-3 的抑制剂 SAR131675 对多种恶性肿瘤的动物模型进行治疗干预,结果发现,该抑制剂对恶性肿瘤的淋巴管转移和远处转移均有抑制作用,其中对乳腺癌 4T1 荷瘤鼠模型的淋巴管转移的抑制率达 50%^[33]。也有学者利用治疗性抗体阻断 VEGF-C 与其跨膜受体 Nrp-2 的结合,从而打破 VEGF-C 诱导的淋巴管内皮细胞迁移以及肿瘤相关淋巴管生成的进程,为抗肿瘤转移研究提供了新的思路^[35]。

四、结语

淋巴管转移是肿瘤转移的主要途径之一,也是癌症患者预后的重要指标,寻找有效的预防和治疗肿瘤淋巴管转移的方法对于肿瘤治疗具有重要的意义。

近年来,随着淋巴管特异性标志物的发现,淋巴管生成和肿瘤淋巴管转移的分子生物学研究取得了新的进展,一些可能有效的抗淋巴管转移靶点逐步发现并得到验证。然而相对于趋于成熟的肿瘤新生血管生成机制及抗血管治疗研究而言,肿瘤淋巴管生成及抗肿瘤淋巴管治疗研究仍处于初级阶段,淋巴管生成与肿瘤转移的关系问题一直是肿瘤研究领域的难题,而肿瘤淋巴管转移机制的某些关键问题也一直存在争议。尽管很多研究已证实了肿瘤周围淋巴管存在增殖和扩张的现象,然而对于肿瘤内是否存在功能性淋巴管这一问题还有争议,另外对于淋巴管生成相关因子及其受体在淋巴管形成过程中的作用及其对恶性肿瘤的预后价值也还有不同观点,诸如此类问题均有待进一步研究。阐明肿瘤淋巴管生成机制,进一步探讨已知淋巴管生成因子如 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 及其他淋巴管生成的相关调控因子及其生物学作用,深入研究淋巴管的生成与肿瘤淋巴管转移的关系,阐明肿瘤淋巴管转移过程和分子机制,从而寻找肿瘤淋巴管转移有效的治疗靶点是一个具有实际意义的研究课题。

(本文参考文献见光盘)

(收稿日期:2012-07-09)

(本文编辑:马超)