

[文章编号] 1007-385X(2006)05-0387-03

淋巴管生成与肿瘤转移

Lymphangiogenesis and tumor metastasis

王俊, 郭燕 综述; 陈正堂, 朱波 审阅(第三军医大学附属新桥医院 全军肿瘤研究所 400037)

[摘要] 淋巴结转移是肿瘤分期的重要内容和预后指标。淋巴管生成不仅参与了正常胚胎淋巴管发育、组织修复,而且在肿瘤淋巴结转移等病理状况下也具有十分重要的作用。近年来多种淋巴管内皮标记物如 LYVE-1、Prox-1、Podoplanin 的发现和淋巴管生成模型的建立,使得人们逐渐认识到淋巴管生成因子 VEGF-C、VEGF-D 的表达和分子调控,以及其受体 VEGFR-3 在促进肿瘤淋巴结转移过程中的地位。抗肿瘤淋巴管生成已经成为肿瘤生物治疗的新靶点,并证实阻断 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号通路可以抑制肿瘤淋巴结转移。

[关键词] 淋巴管生成;肿瘤;转移;淋巴管生成因子;血管内皮生长因子

[中图分类号] R73.37 **[文章标识码]** A

淋巴管负责引流组织液汇流入血液循环,从而维持内环境稳定,同时输送抗原提呈细胞诱导免疫反应。在实体肿瘤中,淋巴道转移是肿瘤细胞转移的主要途径,淋巴结转移是肿瘤分期的重要内容。近年研究发现,淋巴管生成是肿瘤发生淋巴结转移过程中的重要事件。随着淋巴管内皮特异标记物和淋巴管生长因子的发现,肿瘤诱发淋巴管生成的分子机制和以淋巴管生成作为抗肿瘤转移靶点的研究正成为当前的热点^[1]。本文就淋巴管内皮标记物、淋巴管生成因子以及淋巴管生成与肿瘤转移的关系作一综述。

1 淋巴管内皮标记物

淋巴管在组织形态学上明显不同于血管。首先淋巴管管壁薄,其管腔直径为毛细血管的3倍,通常呈塌陷状,只有当组织间隙液增高时才开放管腔;其次,毛细淋巴管无平滑肌细胞或外膜细胞包被,基底膜不完整或缺失,通透性较大。因此,相对于毛细血管,毛细淋巴管的鉴别有很大局限性,淋巴管生成的研究相对滞后^[2]。

1.1 VEGFR-3

血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)为膜型酪氨酸激酶受体,其配体为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)C和 VEGF-D,是介导淋巴管形成的重要信号分子。VEGFR-3 主要表达于正常成人组织和胚胎的淋巴管内皮细胞(lymphatic endothelial cell, LEC),但在肿瘤血管、视网膜上皮细胞、肌上皮细胞中亦有表达,因而其特异性不明显^[3]。

1.2 LYVE-1

淋巴管透明质酸受体-1(lymphatic vessel hyaluronan receptor-1, LYVE-1)是由322个氨基酸残基组成的膜蛋白,与CD44同源,均匀分布于淋巴管内外腔面,可以与细胞外基质的葡萄糖胺聚糖透明质酸结合,起到从组织摄取并转运透明质酸盐的作用^[4]。在胚胎龄约9d的小鼠静脉内皮细胞中,LYVE-1表达上调,而在成年鼠集合淋巴管 LYVE-1表达下调,仅在毛细淋巴管中持续高水平表达。此外,LYVE-1在人

和鼠的正常肝血窦内皮细胞、巨噬细胞中也有表达。因此,联合使用 LYVE-1 和其他标记物标记肿瘤淋巴管比较稳定可靠。

1.3 Podoplanin

Podoplanin 为一种相对分子质量38000的膜性黏蛋白,因最初发现表达在肾小球足突细胞而得名。Podoplanin 也表达于 LEC、角化细胞、肺泡细胞^[5]。目前尚未见 Podoplanin 表达于微血管的报道。Podoplanin 的功能不清,但表达缺乏导致小鼠肺发育异常;Podoplanin 基因敲除小鼠表现为爪部淋巴水肿、淋巴管功能和结构异常,提示其在淋巴管发育过程中具有调控作用。

1.4 Prox-1 和其他标记物

Prox-1 是同源异型盒转录因子基因产物,与果蝇 prospero 基因同源,其特异性地表达于胚胎 LEC 及成人正常组织,在晶状体、肝上皮的血管窦、胰腺和神经系统中也有表达,须与 LYVE-1 联合使用才可确定淋巴管特异性。Hong 等^[6]采用基因转染等技术证明,Prox-1 转染的血管内皮细胞表达 VEGFR-1 降低,VEGFR-3 增高,可定向分化为 LEC,是淋巴管生成调控机制中的关键因子,故称其为淋巴管生成过程中的“总开关”。此外,还有其他一些标记物,如 D2-40、Desmo2、plakin52 核苷酸单抗等,甚至核转录因子 NF- κ B 也可作为淋巴管内皮的标记物^[7]。然而,迄今为止尚无绝对特异性的淋巴管内皮标记物。

2 淋巴管生成因子

2.1 VEGF-C 和 VEGF-D

VEGF-C 和 VEGF-D 是迄今为止发现的最重要的淋巴管生成因子。肿瘤细胞分泌的 VEGF-C 和 VEGF-D 均可与

[作者简介] 王俊(1979-),男,湖北鄂州人,在读博士,医师,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究,

E-mail: gy79@mail.tmmu.com.cn

[通讯作者] 陈正堂, E-mail: chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn

VEGFR-3 结合,通过促进 LEC 增殖、迁移和存活来介导淋巴管生成。完整结构的 VEGF-C 和 VEGF-D 仅结合 VEGFR-3,不结合 VEGFR-2;而加工后成熟的 VEGF-C 和 VEGF-D 片段与 VEGFR-2、VEGFR-3 亲和力显著增强。VEGF-C 纯合子缺失 (homozygous deletion) 导致小鼠淋巴管生成的缺乏,提示在小鼠胚胎淋巴管发育过程中 VEGF-C 是必需的。相比之下,VEGF-D 的敲除并不影响淋巴管的生成。此外,研究还发现,VEGF-C、VEGF-D 可以与其他受体结合而启动淋巴管生成信号,如 $\alpha 9\beta 1$ 整合素、神经浆 (neuropilin) 受体。值得一提的是,肿瘤相关的炎症细胞如巨噬细胞,也能表达 VEGF-C 和 VEGF-D,可能在肿瘤淋巴管生成中具有重要作用^[8]。

2.2 其他生长因子

除 VEGF-C 和 VEGF-D 外,其他多种生长因子在 LEC 增殖、淋巴管形成中也起着一定的作用。(1) 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)。Chang 等^[9]发现,在角膜中央注入低浓度的 FGF-2 可以刺激小鼠角膜淋巴管生成,而高浓度的 FGF-2 则引起血管生成;用抗 VEGFR-3 抗体可阻断 FGF-2 引起的淋巴管生成,提示此过程与 FGF-2 诱导血管内皮细胞和血管周细胞上调 VEGF-C 表达有关。进一步研究发现,FGF-1 和 FGF-2 还可通过激活 Prox-1、上调 FGFR-3 基因表达从而诱导 LEC 增殖。(2) 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)。IGF 也可以直接诱导 LEC 增殖、迁移,此过程不依赖于 VEGFR-3 通路,而由 IGF 特异性受体介导^[10]。(3) 血小板衍生的生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)。Cao 等^[11]发现 PDGF-BB 可直接促进 LEC 增殖和淋巴管生长;小鼠纤维肉瘤细胞中表达的 PDGF-BB 诱导了淋巴管生成并促进淋巴管转移。(4) VEGF-A。VEGF-A 的主要作用是诱导血管生成,虽然可以结合 VEGFR-2,但其效应是招募产生 VEGF-C 和 VEGF-D 的炎症细胞,而不是直接刺激淋巴管的生成。

2.3 促炎细胞因子

Ristimaki 等^[12]发现,白细胞介素 (interleukin, IL)1- β 、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 可以上调成人成纤维细胞表达 VEGF-C mRNA。唐瑞峰等^[13]用 10 ng/ml 的 IL-1 α 刺激胰腺癌细胞 COLO2357 或用 100 ng/ml 的 IL-6 刺激胰腺癌细胞 CAPAN21 3 h 后,发现肿瘤细胞产生 VEGF-C mRNA 增加了 2 倍。这些研究表明,促炎细胞因子能诱导肿瘤细胞或非肿瘤细胞表达 VEGF-C,是肿瘤细胞自分泌和旁分泌 VEGF-C 的调节因子,但其详细的作用机制尚不清楚。

3 淋巴管生成和肿瘤转移的关系

3.1 VEGF-C、VEGF-D 表达与淋巴管转移和预后的关系

大量临床病理研究证实,在多种人类肿瘤中,包括乳腺癌、非小细胞肺癌、结肠癌、恶性黑色素瘤、甲状腺癌、前列腺癌等肿瘤中,VEGF-C 表达与淋巴管转移密切相关;高水平表达 VEGF-C 的肿瘤患者较低水平表达 VEGF-C 患者的预后差^[14]。相对而言,对 VEGF-D 的研究报道较少,仅在结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌和胃癌中发现高表达的 VEGF-D 与

淋巴管转移呈正相关,是肿瘤患者存活的独立预后因子。

然而,有少量研究不支持 VEGF-C 或 VEGF-D 表达与淋巴管转移、不良预后呈正相关。在口腔鳞状上皮细胞癌中,VEGF-C 的表达仅发生在 T1、T2 期肿瘤中;在早期未分化胃癌中,VEGF-C 表达与淋巴管转移密切相关,但不是高分化的肿瘤;在成神经细胞瘤中并未发现 VEGF-C 表达与淋巴管转移间的相关性。此外,VEGF-D 与淋巴管转移的关系也不明确,如乳腺癌组织中表达的 VEGF-D mRNA 表达下调,与淋巴管转移呈负相关,而在另一项研究中乳腺癌 VEGF-D 蛋白表达上调,并与淋巴管转移和不良预后呈正相关^[15]。

3.2 瘤内和瘤周淋巴管生成

淋巴管密度 (lymphatic vessel density, LVD) 是评价肿瘤淋巴管生成的重要指标。LVD 与肿瘤患者不良预后的关系已经在乳腺癌、前列腺癌、胃癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌和口腔鳞状细胞癌等肿瘤中得到证实。然而,有关肿瘤瘤内和瘤周淋巴管生成与肿瘤转移的关系仍然不清楚。某些研究认为,瘤周高 LVD 而不是瘤内 LVD 与肿瘤侵袭相关,瘤体产生的静水压将瘤内淋巴管压扁使其不具有功能,而瘤周提供了一个潜在的低压、低容量环境,更有利于肿瘤细胞的渗透和播散^[16]。而另一些研究认为,对于某些肿瘤,如头颈部癌、甲状腺癌和黑色素瘤,瘤内的淋巴管也具有功能,瘤内高 LVD 与淋巴管转移正相关,而且促进了淋巴管转移的发生^[17]。

在不同肿瘤或相同肿瘤类型研究中,有关 VEGF-C 和 VEGF-D 表达、LVD、淋巴管转移、远处转移和预后间的相互关系的差异,我们分析原因可能是:LVD 计数方法的不同,选择淋巴管内皮标志物的不同所造成,或者是选择的样本大小、肿瘤组织类型和分期不同所造成。瘤周或瘤内淋巴管均包含已存在的淋巴管和新生的淋巴管,它们在功能上难以鉴别。

3.3 新生的肿瘤淋巴管来源

在胚胎中,淋巴管的发育是从胚胎静脉出芽 (sprouting) 开始的,而关于肿瘤新生淋巴管的来源目前还存在争议:(1) 骨髓来源的内皮细胞促进了肿瘤淋巴管生成。Religa 等^[18]用辐射处理淋巴管炎症角膜模型小鼠后,再输入骨髓来源的细胞,发现 VEGFR-3 或 VEGFR-2 阳性的细胞掺入到了新生的淋巴管中;(2) 肿瘤组织中的淋巴管生成来源于已经存在的淋巴管内皮。He 等^[19]认为,与新生的肿瘤血管不同,肿瘤中的新生淋巴管并不是来源于骨髓内皮祖细胞,而是来源于已存在的淋巴管。(3) 巨噬细胞在一定条件下还可以直接分化为 LEC,如骨髓来源的 CD11⁺ 巨噬细胞在炎症环境下能形成淋巴管样结构,具有 LEC 的表型^[20]。

4 研究淋巴管生成的模型

人们对淋巴管发育和功能的认识促进了淋巴管生成模型的建立。研究淋巴管生成常用的模型有:(1) LEC。相对于血管内皮细胞,LEC 获取比较困难,可以从人淋巴结或新生儿包皮中原代分离,或者使用抗 VEGFR-3/podoplanin 抗体包被的磁珠,或用流式细胞术从真皮微管内皮细胞中分

选^[21]。最近 sironi 等^[22]报道,小鼠 LEC 也可以从注射有不完全弗氏佐剂诱导的小鼠腹腔淋巴管瘤中分离得到,而且 LEC 在体外可以形成管样结构。(2) 体外淋巴管增殖模型。周宏志等^[23]利用诱导的淋巴管瘤在体外建立了淋巴管立体培养模型,为在体外研究各种可溶性或不可溶性的细胞外基质成分,或药物对淋巴管生成的影响提供了方便。(3) 角膜淋巴管生成模型。正常角膜缺乏淋巴管和血管,但在很多角膜疾病手术或角膜移植后可出现角膜的血管化和淋巴管生成,利用此特点可以建立炎症诱导的角膜淋巴管生成模型。

5 靶向肿瘤淋巴管生成的策略和展望

在实体肿瘤中,肿瘤细胞或其他间质细胞高表达 VEGF-C、VEGF-D,通过激活 VEGFR-3 诱导淋巴管生成,增加的淋巴管密度使得肿瘤更容易进入淋巴管从而运输到区域淋巴结。因此,根据 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号通路以及其他信号通路在肿瘤转移中的重要性,靶向此通路可能阻断肿瘤淋巴管转移。靶向肿瘤淋巴管生成的策略包括:(1) 阻断 VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 信号通路。如使用中和性的抗 VEGF-C、VEGF-D、VEGFR-3 和 VEGFR-2 抗体^[24],或通过腺病毒或腺相关病毒表达可溶性的 VEGFR-3 片段^[25],或借助小干扰 RNA (small interference RNA) 介导的基因沉默技术靶向 VEGF-C、VEGF-D 和其受体^[26];(2) 靶向其他信号通路。如靶向 PDGF-BB、FGF、IGF 等生长因子信号通路^[27];(3) 开发抑制 VEGFR-3、VEGFR-2 激酶活性的小分子抑制剂,如 BAY 43-9006、CEP-7055 和 PTK787 等,目前这些小分子抑制剂正处于临床试验阶段;(4) 靶向促炎细胞因子调节 VEGF-C 生成的信号通路。

可以预见,同血管生成一样,淋巴管生成的研究为肿瘤转移的治疗提供了新的思路,在不远的将来可以进入到临床阶段。目前,关键的问题是探讨在肿瘤患者中抑制淋巴管生成及淋巴结转移的可行性。在新的手段应用于患者之前,我们应该更深入理解淋巴管生成在肿瘤中的生物学行为,以及调控淋巴管生成的相关信号通路,同时应该考虑肿瘤诱导的淋巴管是否可以逆转,抑制淋巴管生成是否可能会带来不良反应。

[参 考 文 献]

[1] Cueni LN, Detmar M. New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease[J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(10): 2167-2177.

[2] Ji RC. Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix[J]. *Lymphat Res Biol*, 2006, 4(2):83-100.

[3] Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(10): 1355-1360.

[4] Gao F, Lu YM, Cao ML, *et al*. Expression and quantification of LYVE-1 in human colorectal cancer[J]. *Clin Exp Med*, 2006, 6(2):65-71.

[5] Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, *et al*. Markers for the lymphat-

ic endothelium: In search of the holy grail[J]? *Microsc Res Tech*, 2001, 55(2):61-69.

- [6] Hong YK, Harvey N, Noh YH, *et al*. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate[J]. *Dev Dyn*, 2002, 225(3):351-357.
- [7] Saban MR, Memet S, Jackson DG, *et al*. Visualization of lymphatic vessels through NF-kappaB activity[J]. *Blood*, 2004, 104(10):3228-3230.
- [8] Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, *et al*. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: Impact on lymphangiogenesis and survival[J]. *Surgery*, 2006, 139(6):839-846.
- [9] Chang LK, Garcia-Cardena G, Farnes F, *et al*. Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11658-11663.
- [10] Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, *et al*. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43):15593-15598.
- [11] Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, *et al*. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(4): 333-345.
- [12] Ristimaki A, Narko K, Enholm B, *et al*. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(14): 8413-8418.
- [13] 唐瑞峰, 王曙霞, 张风瑞, 等. 白细胞介素-1 α 、6 对胰腺癌细胞分泌内皮生长因子 A、C 的调节作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(4): 401-403.
- [14] Staker SA, Achen MG, Jussila L, *et al*. Lymphangiogenesis and cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8): 573-578.
- [15] Koyama Y, Kaneko K, Akazawa K, *et al*. Vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor-D messenger RNA expression in breast cancer: Association with lymph node metastasis[J]. *Clin Breast Cancer*, 2003, 4(5): 354-360.
- [16] Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, *et al*. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics[J]. *Science*, 2002, 296(5574): 1883-1886.
- [17] Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, *et al*. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(5): 1315-1320.
- [18] Religa P, Cao R, Bjorndahl M, *et al*. Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels[J]. *Blood*, 2005, 106(13): 4184-4190.
- [19] He Y, Rajantie I, Ilmonen M, *et al*. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3737-3740.
- [20] Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, *et al*. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2363-2372.
- [21] Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, *et al*. Isolated lymphatic en-

(下转第 396 页)