

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)02-0194-03

## 血管生成拟态及相关蛋白 Mig-7、MMP-2 在胃癌组织中的表达及临床意义

廖世平, 高青\* (重庆医科大学附属第一医院消化内科, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的 研究胃癌组织血管生成拟态(VM)及相关蛋白 Mig-7、MMP-2 的表达及临床意义。方法 采用免疫组化技术观察 110 例胃癌中的 CD34、Mig-7 和 MMP-2 的表达, VM 用 CD34、PAS 双染色法确定, 并结合胃癌患者的临床病理资料进行相关分析。结果 110 例胃癌组织中存在 35 例 VM, 阳性率为 31.82%; VM 与病理分级及淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ), 中低分化组的阳性率(34%) 高于高分化组(10%), 有淋巴结转移组的 VM 阳性率高于无淋巴结转移组。110 例胃癌组织 Mig-7 表达 104 例, 阳性率为 94.54%; Mig-7 的高表达与淋巴结转移有关( $P < 0.05$ )。VM 阳性组 Mig-7 及 MMP-2 高表达率均高于 VM 阴性组( $P < 0.05$ )。VM 阳性组平均生存时间及中位生存时间均低于 VM 阴性组( $P < 0.05$ )。结论 胃癌组织中存在 VM, Mig-7 及 MMP-2 高表达可能协同促进 VM 形成; VM 与胃癌的侵袭、转移以及预后差密切相关。

**[关键词]** 胃癌; 血管生成拟态; Mig-7; 预后

**[中图分类号]** R392.33, R735.2 **[文献标志码]** A

## Expressions and clinical significance of vasculogenic mimicry and related protein Mig-7 and MMP-2 in gastric carcinoma

LIAO Shiping, GAO Qing\*

Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To study the expressions and clinical significance of vasculogenic mimicry (VM) and the related protein Mig-7 and MMP-2 in gastric carcinoma. **Methods** We observed the expressions of CD34, Mig-7 and MMP-2 in 110 patients with gastric carcinoma using immunohistochemistry, VM was determined by CD34/PAS double staining, and analyzed their correlations with the clinical and pathological characteristics of the patients. **Results** In the 110 patients with gastric carcinoma, 35 (31.82%) were found positive for VM expression, and it was correlated with the pathological degree and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ), that was, the positive rate of VM in the poorly-differentiated tissues (34%) was higher than that in the well-differentiated tissues (10%), and it was also higher in the lymph node metastasis than that in the non-lymph node metastasis. The expression of Mig-7 was found in 104 out of the 110 cases of gastric carcinoma, with a positive rate of 94.54%. The high expression of Mig-7 was related to lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The expression rates of Mig-7 and MMP-2 were higher in the VM-positive group than in the VM-negative group ( $P < 0.05$ ). The average survival time and median survival time of the VM-positive group were shorter than those of the VM-negative group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The presence of VM in gastric carcinoma tissues is proved. The high expressions of Mig-7 and MMP-2 in gastric carcinoma tissues may have a synergistic promoting effect on VM formation. VM is closely associated with the invasion, metastasis and poor prognosis of gastric carcinoma.

**[Key words]** gastric carcinoma; vasculogenic mimicry; Mig-7; prognosis

传统的抗肿瘤血管治疗不能有效改善实体肿瘤患者的生存率, 仍有一半以上的肿瘤患者因复发和转移致死<sup>[1]</sup>。部分胃癌患者, 在病程早期, 肿瘤大小尚未超过临界体积时, 已发生远处转移。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是一种独立于肿瘤血管生成的新的肿瘤微循环模式, 在多种肿瘤组织均有表达, 与肿瘤组织分化程度和转移相关, 但 VM

是否在胃癌组织中有类似作用, 目前尚未见报道。本实验就 VM 在胃癌中的表达及临床意义进行研究, 并探讨 VM 在胃癌组织中形成的可能机制。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集重庆医科大学附属第一医院 2005-01/2007-05 经手术切除、临床病理资料及预后资料完整的胃癌标本共

收稿日期: 2012-09-10; 接受日期: 2012-10-12

作者简者: 廖世平(1983-), 女, 重庆人, 硕士研究生

Tel: 13657639524; E-mail: 719850062@qq.com

\* Corresponding author, 高青, E-mail: gaoqing27@yahoo.com.cn



110例,经病理医师阅片确诊为胃癌。随访时间从手术时间至2012-08月。110例胃癌患者中,男79例,女31例。分化程度:低分化76例,中分化24例,高分化10例。生存时间从术后1个月至87个月。临床分期:I期10例,II期23例,III A期47例,III B期26例,IV期4例。兔抗人单克隆抗体CD34购自CST;兔抗人多克隆抗体Mig-7购自abcam;兔抗人MMP-2购自Proteintech;SP超敏试剂盒(羊/兔),购自康为世纪公司;DAB试剂盒购自北京中杉金桥公司;PAS染色试剂盒购自上海源叶生物公司。

## 1.2 方法

1.2.1 CD34与PAS双重染色方法及VM结构 采用SP法,进行CD34免疫组化染色,按照SP法操作,DAB染色后终止反应。再行PAS染色,切片于显微镜下观察,肿瘤细胞围成管腔样结构,管壁无CD34阳性的内皮细胞环绕,管腔内有红细胞的管腔结构判断为VM;管腔有CD34阳性的血管内皮及PAS阳性的基底膜结构,判断为内皮依赖性血管。

1.2.2 Mig-7免疫组化染色及结果判断 石蜡切片脱蜡水化,高温抗原修复;PBS液冲洗10 min,血清封闭20 min;PBS冲洗10 min,加兔抗人多克隆抗体Mig-7(1:50),按照SP法操作。结果判定:细胞膜及细胞质染色为棕黄色为阳性表达。随机选择5个有代表性的高倍镜视野,每个视野计数100个肿瘤细胞,着色强度按无着色、浅黄色、中等黄色、棕黄色分别判断为0、1、2、3分,着色细胞数占计数细胞百分率<10%为0分,<25%为1分,<50%为2分,>50%为3分。将每张切片的着色强度及着色细胞百分率得分相乘,为其最后得分。0-1分为阴性,2-3分为弱阳性,4-6分为中等阳性,6分以上为强阳性,≤3分为低表达,≥4分为高表达。

1.2.3 MMP-2免疫组化染色及结果判断 步骤同1.2.2。染色判断方法同1.2.2结果判定,阳性物质定位于细胞质。

1.2.4 统计学分析 应用SPSS19软件进行 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。Kaplan-Meier生存分析比较VM阳性组及阴性组生存时间。

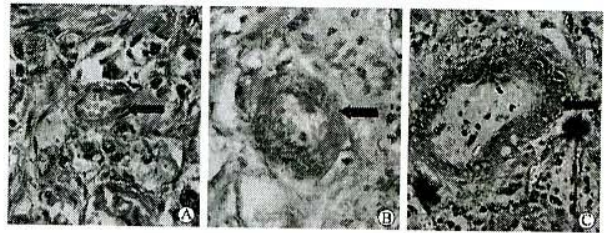
## 2 结果

2.1 胃癌组织中VM情况 110例胃癌组织中35例存在VM,阳性率为31.82%。HE染色镜下见管腔周围由肿瘤细胞组成,管腔内可见红细胞。CD34/PAS双重染色可见一层PAS阳性物质围成基底膜样结构分开肿瘤细胞及红细胞,围成管腔的肿瘤细胞CD34染色阴性。CD34染色阳性,无论PAS染色为阴性或阳性,均判断为内皮依赖性血管(图1)。

2.2 胃癌组织中Mig-7情况 胃癌组织中Mig-7表达104例,阳性率为94.54%;表达于细胞膜及细胞质棕黄色颗粒,正常组织中未见Mig-7染色阳性物质。高表达34例,低表达70例(图2)。

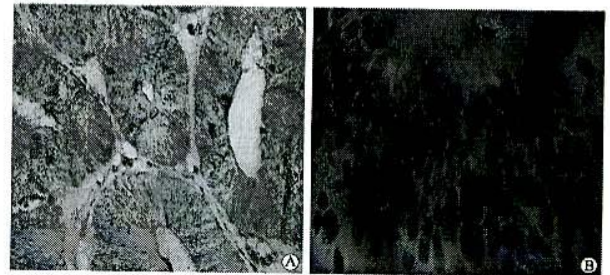
2.3 MMP-2表达情况 胃癌组织中均表达MMP-2,39例高表达,71例低表达,表达于胞质中棕黄色颗粒(图3)。

## 2.4 VM与Mig-7及MMP-2比较 VM阳性组Mig-7高表达率及MMP-2高表达率均高于VM阴性组( $P < 0.05$ ,表1)。



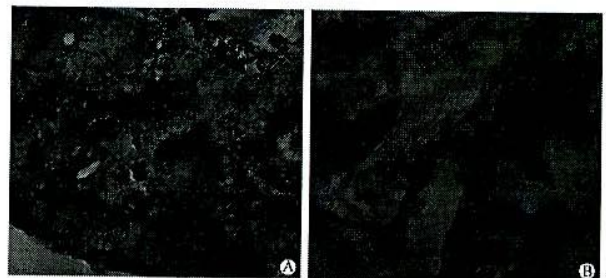
A: 黑色箭头见HE染色高倍镜下肿瘤细胞围成的VM结构,内可见红细胞(HE); B: 黑色箭头可见肿瘤细胞围成VM,CD34染色阴性,PAS阳性物质围成基底膜样结构分开肿瘤细胞及腔内红细胞(IHC); C: CD34/PAS双重染色可见CD34阳性物质及PAS阳性物质围成的内皮依赖性血管(IHC)。

图1 血管生成拟态及内皮依赖性血管在胃癌组织中的表达( $\times 400$ )



A: VM阳性组高表达; B: VM阴性组低表达。

图2 Mig-7在胃癌组织中的表达( $\times 400$ )



A: VM阳性组高表达; B: VM阴性组低表达。

图3 MMP-2在胃癌组织中的表达( $\times 400$ )

表1 VM与Mig-7、MMP-2的关系

	Mig-7高表达	Mig-7低表达	MMP-2高表达	MMP-2低表达
VM <sup>+</sup>	21*	14*	22*	13*
VM <sup>-</sup>	13	56	17	58

\* $P < 0.05$  vs VM<sup>-</sup>。

2.5 VM及Mig-7表达的临床结果 VM表达与性别、年龄、临床分期无相关。与分化程度及有无淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ),中低分化组VM阳性率高于高分化组,有淋巴结转移的VM阳性率高于无淋巴结



转移组。Mig-7 表达与性别、年龄、临床分期、分化程度无相关;与有无淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ),有淋巴结转移的 Mig-7 高表达率高于无淋巴结转移组(表 2)。

表 2 临床资料与 VM 及 Mig-7 的关系

临床病理特点	n	VM <sup>+</sup>	VM <sup>-</sup>	Mig-7 高表达	Mig-7 低表达
性别					
男	79	26	53	25	49
女	31	9	22	9	21
年龄					
≥60 岁	59	19	40	21	37
<60 岁	51	16	35	13	33
肿瘤大小					
≥4 cm	47	19	28	18	27
<4 cm	63	16	47	16	43
分化程度					
低分化	76	30 <sup>a</sup>	46	24	52
中分化	24	4 <sup>a</sup>	20	10	14
高分化	10	1 <sup>a</sup>	9	0	4
淋巴结转移					
有	68	28 <sup>a</sup>	40	25 <sup>b</sup>	36
无	42	7 <sup>a</sup>	35	9 <sup>b</sup>	34
临床分期					
I	10	1	9	0	5
II	23	5	18	5	17
IIIA	47	15	32	14	33
IIIB	26	12	14	12	14
IV	4	2	2	3	1

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs VM<sup>-</sup>, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs Mig-7 低表达。

2.6 VM 与生存时间关系 VM 阳性组平均生存时间为 28.35 月,中位生存时间为 23.00 月;VM 阴性组平均生存时间为 47.69 月,中位生存时间为 33.00 月( $P < 0.05$ ,图 4)。

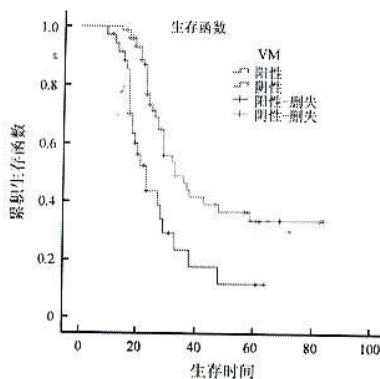


图 4 曲线显示 VM 阳性组较 VM 阴性组生存时间短

### 3 讨论

肿瘤血管是肿瘤生长、浸润、转移的营养供给,而 VM 是对经典肿瘤血管生成理论的重要补充,与肿瘤远处转移及患者不良预后密切相关<sup>[2]</sup>。因此,研究 VM 形成的相关机制和与患者生存时间的关系具有重要的临床意义。研究表明,VM 形成与多因子相关蛋白的参与有关,如基质金属蛋白酶(MMPs)、缺氧诱导因子- $\alpha$ (HIF- $\alpha$ )等<sup>[3]</sup>。Gavin 等<sup>[4]</sup>研究发现 Mig-7 是肿瘤 VM 中的重要调节因子,它通过增加肿瘤细胞的侵袭,促进 VM 的形成,从而加快肿瘤的转移。并证实多种肿瘤组织中均有表达,而在正常组织中不表

达。Petty 等在研究中证实:Mig-7 在肿瘤细胞形成 VM 管腔样结构中促使肿瘤可塑性变化,表达多种特异的内皮因子基因,从而形成特异 VM 结构<sup>[5-6]</sup>。目前 Mig-7 在胃癌组织中的表达情况,以及与 VM 关系的研究较为少见。

本研究显示,VM 存在于胃癌组织中,并与性别、年龄、临床分期无相关,而与肿瘤病理分化程度及有无淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ),其中中低分化组 VM 阳性率高于高分化组,有淋巴结转移组 VM 阳性率高于无淋巴结转移组,差异具有统计学意义,与 Li 等<sup>[7]</sup>报道结果一致。而且,VM 阳性组 Mig-7、MMP-2 表达均高于 VM 阴性组( $P < 0.05$ ),二者有良好的相关性,与 Petty 等<sup>[8]</sup>研究一致。由此,推测 Mig-7 高表达可促进 MMP-2 的表达,二者对促进 VM 形成有协同作用,使肿瘤较早的发生侵袭、转移。此外,Mig-7 在中低分化组高表达率高于高分化组,表明 Mig-7 与肿瘤恶性程度有正相关。由于 Mig-7 在正常组织中不表达,可作为 VM 形成的标志物之一。

本研究通过 Kaplan-Meier 生存分析显示,VM 阳性组中位生存时间(23.00 月)低于 VM 阴性组(33.00 月),VM 阳性组及阴性组的 5 年生存率分别为 34.29% 及 54.67%,差异具有统计学意义。表明 VM 与肿瘤的浸润、远处转移密切相关,是患者不良预后的重要指标。

总之,VM 存在于胃癌组织,并与肿瘤组织分化程度和转移有明显的相关性,与患者生存时间密切相关。Mig-7 作为胃癌 VM 形成中重要调节因子,参与 VM 的形成,抑制 Mig-7 表达可干预其形成,对防止胃癌转移提供了实验的依据,为胃癌临床治疗提供了新的靶点。

### 参考文献:

- [1] Guzman G, Cotler SJ, Lin AY. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma [J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(12): 1776-1781.
- [2] 田 翀,高 青. 结肠癌血管生成拟态的形态学观察及生成机制 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(22): 2568-2571.
- [3] Comito G, Calvani M. HIF-1 $\alpha$  stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51(4): 893-904.
- [4] Robertson GP. Commentary Mig-7 linked to vasculogenic mimicry [J]. Am J Pathol, 2007, 170(5): 1454-1456.
- [5] Petty AP, Garman KL, Winn VD, et al. Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell specific-Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation [J]. Am J Pathol, 2007, 170(5): 1763-1780.
- [6] Ping YF, Bian XW. Concise review: Contribution of cancer stem cells to neovascularization [J]. Stem Cells, 2011, 29(6): 888-894.
- [7] Li M, Gu Y, Zhang Z, et al. Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of gastric adenocarcinoma [J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(2): 259-266.
- [8] Petty AP, Wright SE, Rewers-Felkins KA, et al. Targeting Mig-7 inhibits carcinoma cell invasion, early primary tumor growth, and stimulates monocytic oncolytic activity [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(8): 2412-2423.