

HIF-1 与 MVD 在上皮性卵巢癌中的表达

陈素琴, 高立亚, 张英辉

The Clinical Significance of HIF-1 and MVD Expression in Epithelial Ovarian Carcinoma

CHEN Su-qin, GAO Li-ya, ZHANG Ying-hui

Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Objective To study the relationship between the expression of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) and microvessel density (MVD) in epithelial ovarian tumors. **Methods** The 66 specimens of epithelial ovarian tumor and normal ovarian tissue samples were studied by SP immunohistochemical techniques and in situ hybridization techniques to explore the expression of HIF-1 mRNA and protein, and the microvessel density marked by CD105. **Results** The expression level of HIF-1 and HIF-1 mRNA in borderline and malignant ovarian tumors were higher than benign ovarian tumors and normal ovarian tissues ($P < 0.05$). CD105-MVD is higher in malignant ovarian tumors than borderline and benign ovarian tumors ($P < 0.05$). The correlation of HIF-1 and CD105-MVD was positive, and were negative with histological differentiation ($P < 0.05$). **Conclusion** HIF-1 may play an important role in occurrence and development of epithelial ovarian tumors.

Key words: Epithelial ovarian tumor; HIF-1; MVD; CD105

摘要:目的 探讨卵巢上皮性肿瘤中缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 与微血管密度(MVD)的关系。方法 采用原位杂交和免疫组化法检测 66 例卵巢上皮性肿瘤和正常卵巢组织中 HIF-1 mRNA 和蛋白的表达水平,用 CD105 标记 MVD。结果 HIF-1 mRNA 及 HIF-1 在卵巢上皮癌和交界性肿瘤中的表达高于良性肿瘤和正常卵巢组织 ($P < 0.05$)。CD105-MVD 值呈卵巢上皮癌 > 交界性肿瘤 > 良性肿瘤 ($P < 0.05$)。HIF-1 和 CD105-MVD 值明显正相关,且组织分化程度越低,表达越高 ($P < 0.05$)。结论 HIF-1 对卵巢癌的发生、发展具有重要作用。

关键词: 卵巢上皮性肿瘤; HIF-1; MVD; CD105

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)11-0713-03

0 引言

实体肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤细胞对缺氧的适应和新生血管形成。缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 是在缺氧条件下对基因发挥调控作用的一种转录因子,可通过上调 VEGF 的表达促进肿瘤血管形成,但 HIF-1 与肿瘤微血管密度(MVD)的相关性尚无定论。CD105 是一种新生血管的特异标志物,优先表达于增生状态肿瘤组织血管内皮细胞上,对微血管内皮细胞染色具有高度敏感性。但 CD105 在卵巢肿瘤方面的报道国内外甚少,因此本研究采用原位杂交和免疫组化(SP法)研究在卵巢上皮性肿瘤中 HIF-1 与 CD105 所标记的 MVD 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2004-12-16; 修回日期: 2005-09-07
作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院妇产科

选自 2002 年 3 月 ~ 2004 年 7 月间我院手术切除并经病理证实的卵巢上皮性肿瘤和正常卵巢组织标本共 66 例: (1) 卵巢上皮癌 27 例: 浆液性囊腺瘤 14 例, 黏液性囊腺瘤 7 例, 其他类型 6 例 (移行细胞癌 3 例和子宫内膜样癌 3 例); FIGO 分期: ~ 期 9 例, ~ 期 18 例; 组织学分级: 级 15 例, ~ 级 12 例。 (2) 卵巢交界性肿瘤 9 例: 交界性浆液性囊腺瘤 5 例, 交界性黏液性囊腺瘤 4 例; FIGO 分期: ~ 期 7 例, 期 2 例。 (3) 良性卵巢上皮性肿瘤 18 例: 浆液性囊腺瘤 5 例, 黏液性囊腺瘤 13 例。 (4) 正常卵巢 12 例, 均来自于子宫肌瘤或功能性子宫出血的病例行全子宫切除同时行卵巢切除, 病理证实卵巢组织无异常者。患者年龄 17 ~ 80 岁, 中位年龄 50 岁, 各组无差异, 所有患者术前均未接受过放疗、化疗及免疫治疗。标本经 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 5 μ m 连续切片备染。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交 HIF-1 mRNA 探针购自武汉博士德生物有限公司, 序列为: (1) 5' GGAA GTG

GCAACTGATGAGCAA GCTCA TAA-3' ; (2) 5'-ACACACTGTGTCCA GTTAGTTCAA ACTGAG-3' ; (3) 5'-AGCATGATAA TATTCA TAA TTGAGCGCC-3'。操作按说明书进行。

1.2.2 免疫组化 SP 法 兔抗人 HIF-1 多克隆抗体购自武汉博士德生物有限公司,工作浓度 1:100;鼠抗人 CD105 单克隆抗体购自 ADI 公司,工作浓度 1:20,操作按说明书进行。

1.3 结果判定标准

HIF-1 mRNA 及 HIF-1 以肿瘤细胞核或胞浆出现棕黄色颗粒作为阳性,采用显色强度结合阳性细胞百分率法判定结果^[1],每张切片在 400 倍光镜下随机观察 5 个高倍视野,计数肿瘤细胞总数和阳性细胞个数,得出阳性百分率,再根据染色强度进行评分,强阳性 3 分,弱阳性 1 分,介于两者之间 2 分。每例染色强度指数(S) = (3 × 强阳性细胞百分率 + 2 × 中度阳性细胞百分率 + 1 × 弱阳性细胞百分率) / 5。

CD105-MVD 测定:CD105 主要表达于血管内皮细胞,与临近肿瘤细胞及周围结缔组织分界清楚的棕黄色单个内皮细胞或内皮细胞群作为一个微血管计数,但血管管腔面积大于 8 个红细胞的血管不纳入计数范围。按 Weilder 等^[2]报道的方法,先用 100 倍光镜扫视整个切片,选择 5 个微血管密集区(热区),然后在 400 倍光镜下计数热区被抗 CD105 染成棕黄色血管数目,取 5 个视野平均值作为 MVD,用 MVD 值表示 CD105 表达数量。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析及相关性分析,检验效能 0.05。

2 结果

2.1 HIF-1 mRNA 和 HIF-1 蛋白表达情况

HIF-1 mRNA 和 HIF-1 蛋白表达情况基本相同,主要定位于肿瘤细胞的胞浆、胞核及血管内皮细胞,以胞浆多见。正常卵巢组织及良性肿瘤差异无显著性(P > 0.05),低于交界性肿瘤(P < 0.05),但交界性肿瘤和卵巢上皮癌之间差异无显著性(P > 0.05)。在癌组织中,HIF-1 弥散分布,见表 1。

2.2 CD105-MVD 表达情况

CD105 在癌组织和交界性肿瘤表达较强,在良性肿瘤则着色较浅,经方差分析 MVD 值呈卵巢上皮癌 > 交界性肿瘤 > 良性肿瘤(P < 0.05),良性肿瘤和正常卵巢组织差异无显著性(P > 0.05),见表 1。

表 1 HIF-1 mRNA、HIF-1 及 CD105-MVD 在卵巢上皮性肿瘤中的表达

组别	病例数	HIF-1 mRNA $\bar{x} \pm s$	HIF-1 $\bar{x} \pm s$	CD105-MVD
正常卵巢	12	0.004 ± 0.009	0.007 ± 0.014	0.667 ± 0.778
良性卵巢上皮性肿瘤	18	0.048 ± 0.087	0.093 ± 0.172	3.471 ± 2.510
交界性卵巢肿瘤	9	0.615 ± 0.550	0.889 ± 0.624	11.373 ± 4.041
卵巢上皮癌	27	0.842 ± 0.708	1.169 ± 0.929	22.382 ± 6.178

2.3 卵巢癌组织 HIF-1 mRNA、HIF-1 及 CD105-MVD 与病理参数的关系

2.3.1 按病理组织学分级 29 例卵巢癌中高分化 15 例 HIF-1 mRNA 为 0.576 ± 0.566, HIF-1 为 0.852 ± 0.809, CD105-MVD 为 20.142 ± 6.034; 中低分化 12 例 HIF-1 mRNA 为 1.174 ± 0.750, HIF-1 为 1.565 ± 0.947, CD105-MVD 为 25.182 ± 5.337。HIF-1 mRNA 和 HIF-1 蛋白的表达及 CD105-MVD 在卵巢癌组织学分级中呈负相关,中低分化组各指标的表达均高于高分化组(P < 0.05),有显著性差异。

2.3.2 按 FIGO 分期, I ~ II 期、HIF-1 mRNA 为 0.754 ± 0.636, HIF-1 为 0.948 ± 0.818, CD105-MVD 21.067 ± 6.732; III ~ IV 期 HIF-1 mRNA 为 0.885 ± 0.756, HIF-1 为 1.279 ± 0.982, CD105-MVD 23.039 ± 5.973。两项比较无显著差异(P > 0.05)。

2.3.3 按组织学类型分析 浆液性癌 14 例 HIF-1 mRNA 为 0.941 ± 0.690, HIF-1 为 1.365 ± 0.799, CD105-MVD 23.405 ± 6.111; 黏液性癌 7 例 HIF-1 mRNA 为 0.760 ± 0.860, HIF-1 为 0.949 ± 1.151, CD105-MVD 18.900 ± 5.332; 其他类型 6 例 HIF-1 mRNA 0.704 ± 0.650, HIF-1 为 0.968 ± 1.005, CD105-MVD 24.057 ± 6.635。三项间比较,各项均无显著差异(P > 0.05)。

经 Spearman 等级相关分析,HIF-1 mRNA 和 HIF-1 蛋白与 CD105-MVD 均为正相关,相关系数分别为 $r_s = 0.732, P < 0.05, r_s = 0.734, P < 0.05$ 。

3 讨论

恶性肿瘤增生过快,必然导致局部缺氧,但肿瘤细胞仍能不断增殖、浸润,说明其自身存在着对缺氧的调节和适应。研究发现 HIF-1 是对缺氧调控的中心转录因子,由 $HIF-1\alpha$ 、 $HIF-1\beta$ 两个亚基组成,其中 HIF-1 是决定 HIF-1 活性的缺氧调控亚基。其靶基因涉及肿瘤细胞的能量代谢、血管生成,对肿瘤的生长和转移发挥重要作用。



卵巢上皮癌是女性生殖器三大恶性肿瘤之一,难于早期发现,生存率低。如何提高其早期诊断率及改善晚期患者的远期疗效,是临床面临的重点和难点问题。卵巢癌细胞表达 HIF-1 已得到公认^[3],但 HIF-1 与 MVD 是否有关尚无定论。Birner 等^[4]研究认为在卵巢上皮癌中 HIF-1 的表达水平和 MVD(由 CD34 标记)显著相关;但 Nakayama 等^[5]认为 HIF-1 的表达和 MVD(由 CD31 标记)无关。两者所得结论不同,但有一个共同点即标记 MVD 所用的 CD31 和 CD34 均属于泛血管内皮细胞标记物,通常与非增殖性大血管的内皮细胞反应较好,但在肿瘤组织等活性增生性微血管中其表达有时并不稳定。而 CD105 是转化生长因子(TGF- β)受体复合物成分之一,主要表达于肿瘤组织边缘部分血管起源的内皮细胞上,是判断血管形成状态的理想指标。已有研究发现宫颈癌^[6]、子宫内膜癌^[7]中 CD105 标记的 MVD 优于 CD31、CD34、

因子相关抗原等标记的 MVD,与患者生存期相关,可作为独立的预后指标;而 CD31、CD34、因子相关抗原与患者的生存期无相关性。而且缺氧可以使内皮细胞分泌大量的 CD105,进而促进肿瘤新生血管形成。

本研究发现在随着肿瘤的发展,HIF-1 蛋白及 HIF-1 mRNA 的表达呈逐渐增高的趋势,而且肿瘤组织的分化程度越低,其表达水平越高,说明 HIF-1 不仅从蛋白水平,而且从转录水平对卵巢肿瘤的发展发挥作用。虽然二者在交界性和癌组织的表达差异无统计学意义,但明显高于良性肿瘤,这与 Birner 等^[4]的研究结果相一致,提示 HIF-1 的表达增高出现于卵巢上皮癌形成的早期阶段,可能对肿瘤由良性向恶性的转化发展起着某种重要的促进作用,可作为卵巢肿瘤早期的一种新标记。

本研究还发现随着卵巢上皮性肿瘤由良性到交界性到恶性的进展,CD105-MVD 显著增加,而且随病理学分级的升高 MVD 值也显著增加,提示 CD105-MVD 可作为一个有用的临床病理检测指

标。

肿瘤新生血管形成取决于肿瘤周围微环境中促进因子和抑制因子等正负调节因子的平衡。有实验表明在 HIF-1 缺乏的肿瘤,VEGF 及 MVD 显著降低,肿瘤生长明显减慢。TSA 可通过抑制 HIF-1 的表达减少肿瘤血管生成^[8]。本研究发现 HIF-1 表达程度与 CD105-MVD 明显正相关,提示促血管生成可能是 HIF-1 促进卵巢上皮癌浸润发展的主要途径之一,联合检测卵巢上皮癌组织中 HIF-1 和 CD105-MVD,可提高预测肿瘤转移的可靠性。

明确 HIF-1 与卵巢上皮性肿瘤的关系具有重要意义,不仅可以使我们认识卵巢上皮癌的发生、发展规律,还可为寻找新的治疗方法提供思路。

参考文献:

- [1] 马正中, 阎秀, 刘树范, 等. 诊断细胞病理学[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000. 824.
- [2] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumor[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 168-180.
- [3] Francesca S, Laura R, Valeriana DC, et al. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1 in ovarian carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(31): 27850-27855.
- [4] Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 in epithelial ovarian tumors: Its impact on prognosis and on response to chemotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 1661-1668.
- [5] Nakayama K, Kanzaki A, Hata k, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) gene expression in human ovarian carcinomas[J]. Cancer Lett, 2002, 176(2): 215-223.
- [6] Brewer CA, Setterdahl JJ, Li MJ, et al. Endoglin expression as a measure of microvessel density in cervical cancer[J]. Obstet Gynecol, 2000, 96(2): 224-228.
- [7] Reda S, Katherine M, Ming Y, et al. Endoglin(CD105) expression in endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Pathology, 2003, 22: 248-253.
- [8] 黄宏, 张珍祥, 徐永健. TSA 对人肺腺癌 A549 细胞裸鼠移植瘤 HIF-1、VEGF 的实验研究[J]. 肿瘤防治研究. 2004, 31(2): 73-75.

[编辑: 安 凤]