

肝细胞癌 VEGF、bFGF 与凋亡相关蛋白表达的关系

于德新¹,高志芹²,王 滨¹,宁厚法¹

Correlation between the Expressions of VEGF, bFGF and Some Apoptosis Proteins in Hepatocellular Carcinoma

YU De-xin¹, GAO Zhi-qin², WANG Bin¹, NING Hou-fa¹

1. Medical Imaging Center, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, China; 2. Department of Medical Biology, Weifang Medical College

Abstract: **Objective** To explore the correlation between the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and some apoptosis proteins including Fas, bax, bcl-2 and bcl-xl in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Thirty-eight cases (40 lesions) of HCC verified by histopathology were studied. The expressions of VEGF, bFGF, Fas, bax, bcl-2 and bcl-xl were detected with immunohistochemical SP method, and the relationships among these proteins were analyzed. **Results** The positive rate of VEGF, bFGF, Fas, bax, bcl-2 and bcl-xl was 77.5% (31/40), 75% (30/40), 20% (8/40), 25% (10/40), 27.5% (11/40) and 50% (20/40) in HCC respectively. The positive correlations between VEGF and bFGF, bcl-2 and bcl-xl were found ($P < 0.01$ respectively). The same results were also found between bax and bcl-2, VEGF and bcl-2, bax and bFGF ($P < 0.05$ respectively). **Conclusion** The angiogenesis and cell apoptosis in HCC may be regulated by the expressions of VEGF, bFGF, Fas, bax, bcl-2 and bcl-xl.

Key words: Carcinoma; Hepatocellular; Protein; Apoptosis; VEGF; bFGF

摘要: **目的** 探讨肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 组织中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 以及凋亡相关蛋白 Fas、bax、bcl-2 和 bcl-xl 之间的关系。 **方法** 对经病理证实的肝细胞癌 38 例共 40 个癌灶进行分析, 用免疫组化 SP 法检测癌组织中 VEGF、bFGF、Fas、bax、bcl-2 和 bcl-xl 的表达情况, 分析它们之间的相互关系。 **结果** VEGF、bFGF、Fas、bax、bcl-2 和 bcl-xl 的阳性表达率分别为 77.5% (31/40)、75% (30/40)、20% (8/40)、25% (10/40)、27.5% (11/40) 和 50% (20/40)。VEGF 与 bFGF、bcl-2 与 bcl-xl 之间明显相关 ($P < 0.01$), bax 与 bcl-2、VEGF 与 bcl-2、bax 与 bFGF 之间也存在一定的相关性 ($P < 0.05$)。 **结论** VEGF、bFGF 和凋亡相关蛋白共同调控 HCC 的血管生成和细胞凋亡。

关键词: 癌; 肝细胞; 蛋白; 细胞凋亡; VEGF; bFGF

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)05-0276-03

0 引言

原发性肝癌是我国第三位恶性肿瘤, 其中肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 为主要类型。HCC 的发生和发展不仅表现为细胞增殖与分化的异常, 同时也存在细胞凋亡的异常。研究证实, 恶性肿瘤发生、发展、浸润及转移的各阶段都依赖肿瘤新生血管生成^[1], 而细胞凋亡也与肿瘤的血管生成有一定的关系^[2]。因此肿瘤细胞的凋亡与血管生成之间存在着一定的联系, 它们共同调节肿瘤的生物学

行为。HCC 的血管生成和细胞凋亡受到多种相关基因/蛋白的调控, 本研究通过免疫组化 SP 法对血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和凋亡相关蛋白 Fas、bax、bcl-2 和 bcl-xl 的表达进行检测, 探讨它们之间的相互关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源和处理

回顾性分析 1998 年 1 月 ~ 2002 年 9 月手术切除并经病理证实的 HCC 38 例 (共 40 个癌灶), 其中男 35 例, 女 5 例, 年龄 31 ~ 74 岁, 平均 49.2 岁。全部病例均有完整的临床资料, 每例标本于病灶直径

收稿日期: 2004-04-08; 修回日期: 2004-05-24
基金项目: 山东省科学技术委员会和山东省教委资助课题 (1998BB1CCA1 和 J99 K58)
作者单位: 1. 261031 山东潍坊医学院附属医院影像中心, 2. 潍坊医学院医用生物学教研室

最大处取材,常规石蜡包埋后进行 4μm 连续切片。

1.2 免疫组化染色

选用北京中山公司的 VEGF、bax、bcl-2 和 bcl-xl 单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒和 Santa Cruz 公司的 bFGF 及 Fas 多克隆抗体进行免疫组化染色,并设阴性对照片,实验步骤按试剂盒的说明进行。

1.3 免疫组化染色的结果判定

VEGF 和 bFGF 免疫组化染色在瘤细胞胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞(见图 1、2),凡阳性细胞数 30%者为阳性表达,<30%以及无着色者为阴性表达。Fas 免疫组化染色位于肿瘤细胞的胞浆和/或胞膜(见图 3),bax、bcl-2、bcl-xl 主要位于肿瘤细胞胞浆(见图 4~6),分别计数十个高倍(×400)视野,阳性细胞数 20%者为阳性表达,<20%者以及无着色者为阴性表达。

1.4 统计学处理

所有数据均使用 SPSS 11.5 统计软件进行分

析,统计方法为 χ^2 检验及 Fisher 精确概率检验法,显著水平为 0.05(双侧)。

2 结果

本组病例 HCC 癌组织中 VEGF、bFGF、Fas、bax、bcl-2 和 bcl-xl 的阳性表达率分别为 77.5% (31/40)、75% (30/40)、20% (8/40)、25% (10/40)、27.5% (11/40) 和 50% (20/40)。在癌组织中当 VEGF 表达增多时 bFGF 的表达也相应增加 ($P = 0.001$, $\chi^2 = 10.703$); bcl-2 与 bcl-xl 的表达也呈正相关关系 ($P = 0.000$, $\chi^2 = 15.172$)。另外,当 bax 呈阳性和阴性表达时,bcl-2 的阳性表达率分别为 60% (6/10) 和 16.7% (5/30),具有显著差异 ($P = 0.014$, $\chi^2 = 7.064$),也是正相关。VEGF 与 bcl-2、bFGF 与 bax 之间分别具有正性相关关系(分别为 $P = 0.043$, $\chi^2 = 4.405$ 和 $P = 0.043$, $\chi^2 = 4.444$),但研究未发现 Fas 分别与其他 5 种蛋白之间的相互关系,见表 1。

表 1 HCC 组织中 VEGF、bFGF、Fas、bax、bcl-2 和 bcl-xl 之间的关系

项目	例数	bax		bcl-2		bcl-xl		VEGF		bFGF	
		+(%)	P	+(%)	P	+(%)	P	+(%)	P	+(%)	P
Fas	-	7(21.9)	*	7(21.9)	*	16(50)	*	25(78.13)	*	24(75)	*
	+	3(37.5)		4(50)		4(50)		6(75)		6(75)	
bax	-			5(16.7)	**	12(40)	*	22(73.33)	*	20(66.67)	**
	+			6(60)		8(80)		9(90)		10(100)	
bcl-2	-					9(31)	***	20(68.97)	**	20(68.97)	*
	+					11(100)		11(100)		10(90.9)	
bcl-xl	-							13(65)	*	13(65)	*
	+							18(90)		17(85)	
VEGF	-									3(33.3)	***
	+									27(87.1)	

注: * $P > 0.05$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.01$

3 讨论

细胞凋亡与肿瘤的发生、发展密切相关,而血管生成则对于肿瘤的生长和转移具有重要的意义。细胞凋亡不仅与 HCC 的发生、发展关系密切,而且也影响 HCC 的转移和血管生成,在此过程中有多种相关调控基因或蛋白的参与。VEGF 和 bFGF 均为特异性较高促血管生长因子,Fas 和 bax 是凋亡诱导蛋白,bcl-2 和 bcl-xl 为凋亡抑制蛋白,本研究主要探讨它们之间的相互关系。

VEGF 是一种高度特异的内皮细胞有丝分裂原,是目前所知作用最强的促血管生长因子,也是目前发现唯一能增加血管通透性的强有效的因子。它几乎在所有实体瘤细胞中都有过量表达,在 HCC 组织中可以检测到 VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉ 的

表达。FGF 是具有血管活性的广谱促细胞分裂剂,对于多种间质衍化细胞和内皮细胞均显示出促增殖的作用。bFGF 不仅促进内皮细胞的有丝分裂,还促进细胞外基质降解并诱导内皮细胞脱离基质向肿瘤区迁移。肝细胞癌是典型多血供的肿瘤,本组病例 VEGF 与 bFGF 的表达率较高,提示这两种血管生长因子共同促进 HCC 的血管生成;另外,在 VEGF 阳性表达的病灶,bFGF 的表达相应增加,这也符合其他研究认为二者具有协同性的观点^[3]。

Fas 是细胞表面诱导凋亡的死亡受体,Fas 通过与其配体 FasL 结合,可将死亡信号传入细胞内。Fas/FasL 系统对于 HCC 的发生、发展、预后有着极为重要的作用。在本组病例中,Fas 分别与 VEGF、bFGF、bax、bcl-2 和 bcl-xl 之间未见相关性,可能对

于本组病例而言 Fas 独立发挥其促凋亡的作用。bax 与 bcl-2 大约有 21% 的同源性, bax 通过结合 bcl-xl 及 bad 以增加 bax/bcl-2 总量来实现其促细胞凋亡的作用^[4]。李江等^[5]通过体外实验研究发现, bax 可以诱导人肝癌细胞系 HCC-9204 细胞发生凋亡。本研究发现, bax 的阳性表达率 25%, 相对其他的研究^[6,7], 本组病例 Fas 和 bax 的阳性表达率均偏低, 提示本组病例可能正处于增殖旺盛期, 因此可能 Fas 和 bax 的表达均受到一定的抑制。本组病例 bax 与 bFGF 的表达正相关, 可能与当 bFGF 表达时同时诱导 bax 蛋白的产生以筛除一些老化的肿瘤细胞或表型类似正常的细胞从而共同促进肿瘤的生长有关。

bcl-2 对细胞凋亡具有关键性调节作用, bax 与 bcl-2 的比例决定细胞的凋亡状态: bcl-2 表达水平高于 bax 时, bcl-2 形成同源二聚体, 细胞凋亡受抑制; bax 表达水平高于 bcl-2 时, 则形成 bax 同源二聚体, 凋亡增强; bcl-2 和 bax 水平相当时, bcl-2 和 bax 形成异源二聚体, 凋亡终止^[8]。本组病例显示 bax 表达与 bcl-2 的阳性表达呈正性相关。由于细胞凋亡对肿瘤组织的生长具有选择压力, 特别对于那些获得了基因改变(如 p53 突变)的细胞克隆, 通过凋亡筛除了一些老化的肿瘤细胞或肿瘤细胞增殖过程中可能产生的一些表型类似正常的细胞, 选择更具有侵袭力、增殖旺盛的细胞克隆, 促进肿瘤的发生、发展, 因此 bax 的表达可能与此有关, 与此同时 bcl-2 则发挥抑制其他肿瘤细胞凋亡的作用, 二者共同促进 HCC 的生长。研究认为 bcl-2 的过表达与肿瘤的血管生成密切相关^[9], 我们也发现, VEGF 与 bcl-2 之间存在着正性相关关系, 表明 VEGF 的表达可以上调 bcl-2 的表达从而抑制 HCC 肿瘤细胞的凋亡, 这与 Pidgeon 等的结论一致^[10]。

bcl-xl 可使肿瘤细胞在无细胞生长因子的状态下也不发生凋亡。Takehara 等^[11]研究发现 bcl-xl

在肝癌组织中的表达水平明显升高, 可抑制诸如血清饥饿疗法、p53 激活等引起的细胞凋亡。本研究显示, bcl-xl 表达和 bcl-2 的表达呈正性相关, 说明两种凋亡抑制基因共同抑制 HCC 的细胞凋亡, 促进 HCC 的快速生长。

(本文图见封 3)

参考文献:

- [1] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(16): 10931-10934.
- [2] Riedel F, Gotte K, Bergler W, et al. Inverse correlation of apoptotic and angiogenic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(3): 471-476.
- [3] West A F, O Donnell M, Charlton R G, et al. Correlation of vascular endothelial growth factor expression with fibroblast growth factor-8 expression and clinico-pathologic parameters in human prostate cancer [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85 (4): 576-583.
- [4] Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for bcl-xl and bcl-2, displaces bax and promotes cell death [J]. *Cell*, 1995, 80 (2): 285-291.
- [5] 李江, 于欣欣, 杨新科, 等. bax 基因过表达诱导肝癌细胞凋亡 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21 (2): 114-116.
- [6] 顾炜, 彭志海, 裴国强, 等. 肝癌组织中凋亡信号蛋白的表达及临床意义 [J]. *中国肿瘤*, 2003, 12 (1): 48-50.
- [7] 陆东东. 肝癌中 iNOS 与 p16, bax 的表达及其与细胞凋亡关系 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2003, 19 (1): 58-59.
- [8] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.
- [9] Nor JE, Christensen J, Liu J, et al. Up-Regulation of bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (5): 2183-2188.
- [10] Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2001, 85(2): 273-278.
- [11] Takehara T, Liu X, Fujimoto J, et al. Expression and role of bcl-xl in human hepatocellular carcinomas [J]. *Hepatology*, 2001, 34 (1): 55-61.

[编辑: 贺文; 校对: 杨卉]

bag-1、bcl-2 在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义

(正文见 284 页)

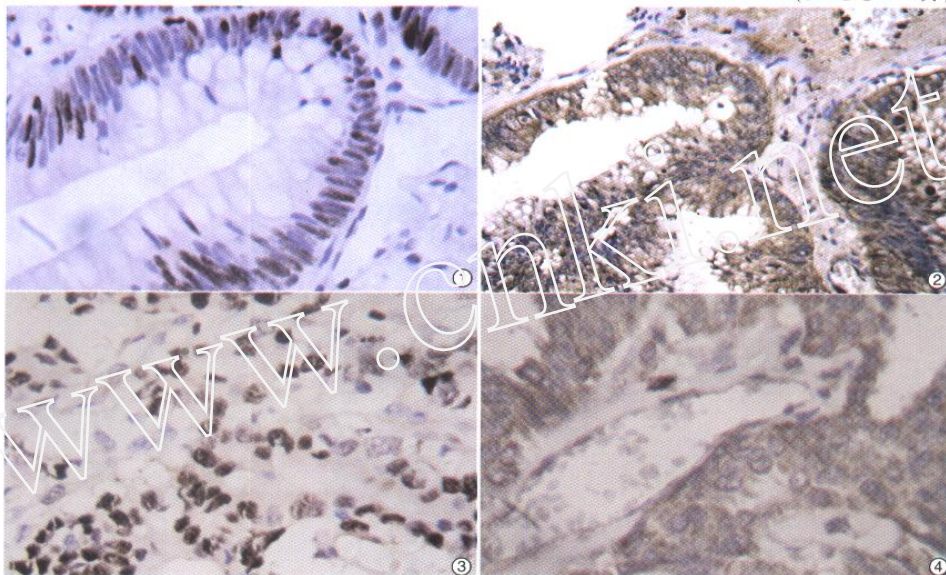


图1 大肠腺瘤细胞核 bag-1 阳性表达 (SP × 400)

图2 大肠腺瘤胞浆 bcl-2 阳性表达 (SP × 200)

图3 大肠癌细胞核 bag-1 阳性表达 (SP × 400)

图4 大肠腺瘤胞浆 bcl-2 阳性表达 (SP × 400)

肝细胞癌 VEGF、bFGF 与凋亡相关蛋白表达的关系

(正文见 276 页)

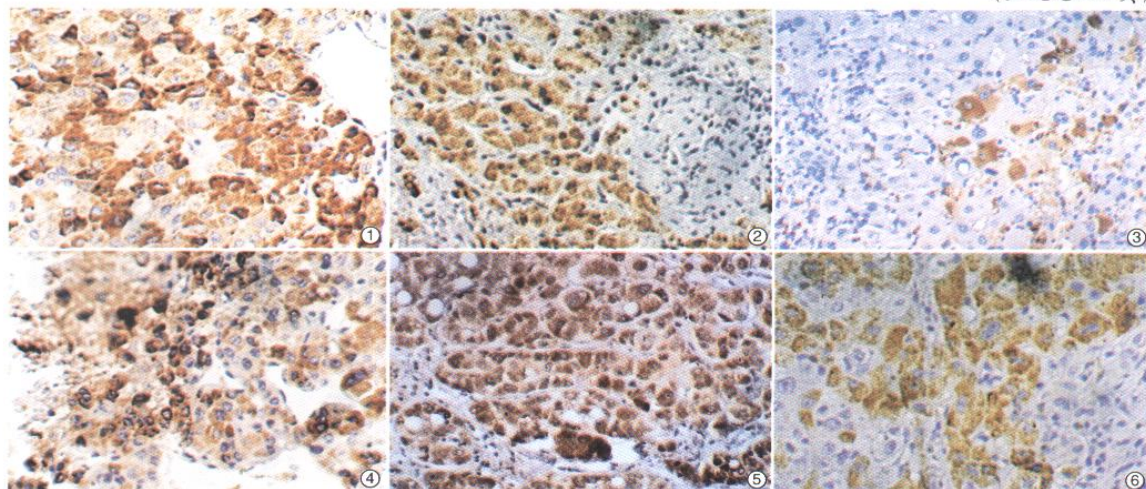


图1 免疫组化染色显示部分癌细胞胞浆/胞膜 VEGF 阳性 (棕黄色 × 400)

图2 免疫组化染色显示部分癌细胞胞浆/胞膜 bFGF 阳性 (棕黄色 × 400)

图3 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆/胞膜 Fas 阳性 (棕黄色 × 400)

图4 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆 bax 阳性 (棕黄色 × 400)

图5 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆 bcl-2 阳性 (棕黄色 × 400)

图6 免疫组化染色显示部分 HCC 癌细胞胞浆 bcl-xl 阳性 (棕黄色 × 400)