

HIF-1 和 VEGF 的表达与肝细胞癌侵袭转移的关系

吴晓慧,王顺祥,李建坤,彭利,张萌,肖冰

Correlation of HIF-1 and VEGF Expression with Invasion and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma

WU Xiao-hui, WANG Shun-xiang, LI Jian-kun, PENG Li, ZHANG Meng, XIAO Bing

Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding Author: WANG Shun-xiang

Abstract: Objective To test the expressions of HIF-1, VEGF and counting microvascular density (MVD) in HCCs, paratumor tissues and normal liver tissues and determine the relationship between the former three factors and neoangiogenesis in HCCs. **Methods** SP method of Immunohistochemistry was used to detect the expression of HIF-1, VEGF and MVD in HCCs, paratumor tissues and normal liver tissues. **Results** Statistical analysis revealed that HIF-1-positive and VEGF-positive stain rate were higher in tumor tissue than that in tumor-surrounding tissue and in normal liver tissue ($P < 0.05$). Numerical value of MVD was significantly higher in tumor tissue than that in tumor-surrounding tissue and normal liver tissue ($P = 0.001$). HIF-1 expression is significantly higher in HCC with portal vein or biliary duct tumor thrombosis than that in without. In poorly differentiated HCC HIF-1-positive stain expression is significantly higher than that moderately and well differentiated HCC ($P < 0.05$). VEGF expression is significantly higher in HCC with intrahepatic or lymphatic metastasis, and portal vein or biliary duct tumor thrombosis than that in without respectively ($P < 0.05$). In tumor tissue samples with both HIF-1-positive and VEGF-positive stain, the value of MVD is higher than that in both HIF-1-negative and VEGF-negative stain tissue samples ($P = 0.001$). **Conclusion** HIF-1 could accelerate angiogenesis by up-regulating VEGF expression, and then accelerate invasion and metastasis of HCC.

Key words: Hepatocellular Carcinoma; HIF-1; VEGF; MVD

摘要:目的 探讨 HIF-1、VEGF 的蛋白表达与肝细胞癌血管新生及侵袭转移特性之间的关系。方法 采用免疫组化 SP 法检测肝细胞癌、癌旁肝组织和正常肝组织中 HIF-1、VEGF 的表达,并计数 MVD 值。结果 HIF-1 在肝细胞癌中的阳性表达率为 50.0%,显著高于癌旁(16.1%)和正常肝组织的(8.3%) ($P = 0.001$); VEGF 在肝细胞癌中的阳性表达率为 80%,显著高于癌旁(59.4%)和正常肝组织的(41.7%) ($P = 0.044$);肝细胞癌组织中 MVD 值显著高于癌旁和正常肝组织 ($P = 0.001$)。HIF-1 蛋白表达与有无门静脉或胆管癌栓及肿瘤分化程度有关 ($P < 0.05$); VEGF 蛋白的表达与有无肝内或淋巴结转移及有无门静脉或胆管癌栓有关 ($P < 0.05$)。HIF-1 与 VEGF 表达有关 ($P = 0.005$); HIF-1 与 VEGF 共同表达阳性组的 MVD 值显著高于共同表达阴性组 MVD 值 ($P = 0.001$)。结论 HIF-1 可能通过调节 VEGF 的表达促进肝细胞癌血管新生,从而促使肝细胞癌侵袭转移。

关键词:肝细胞癌; HIF-1; VEGF; MVD

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)07-0504-04

0 引言

缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 是广泛存在于动物及人体的多种肿瘤细胞

中的转录因子,由 HIF-1 和 HIF-1 亚基组成,其中由 HIF-1 决定 HIF-1 的活性。HIF-1 通过刺激肿瘤血管新生、维持肿瘤细胞的能量代谢、促进肿瘤增殖等作用引起肿瘤细胞的侵袭转移。本文拟探讨 HIF-1 和 VEGF 与肝细胞癌临床病理学特征、血管新生及其相互之间的关系。

收稿日期:2006-06-26;修回日期:2006-10-13
作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院肝胆外科

通讯作者:王顺祥
作者简介:吴晓慧(1979-),女,硕士,医师,主要从事肝癌侵袭转移机制的研究



表 1 不同肝组织中 HIF-1 和 VEGF 的表达及 MVD 值

liver tissues	cases	HIF-1 (%)	P	VEGF (%)	P	MVD	P
HCC	50	25 (50.0)		40 (80.0)		26.92 ±11.25	
Para-carcinoma	32	5 (16.1) *	0.001	19 (59.4) *	0.044	17.08 ±9.31 *	0.001
Normal liver tissue	12	1 (8.3) *		5 (41.7) *		15.22 ±6.38 *	

* Compared with HCC, P < 0.05

1 资料与方法

1.1 资料 收集 2003 年 9 月 ~ 2005 年 3 月我院手术切除的肝癌标本 50 例,其中男 36 例,女 14 例;年龄 28 ~ 73 岁,平均年龄 54.0 岁。术后均经病理诊断为肝细胞癌,根据 Edmondson 分级法,其中 I 级 29 例, II 级 21 例。另 32 例癌旁组织取自距肝癌组织边缘 2 cm 以上的肝组织,12 例正常组织作为对照。所有标本均用 10% 甲醛固定。

1.2 实验方法 鼠抗人 HIF-1 为美国 LAB VISION 公司产品,兔抗人 VEGF 为 Santa Cruz 公司产品,兔抗人 VIII 因子相关抗原多克隆抗体为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

固定好的组织标本脱水,石蜡包埋,常规病理切片,4 μm 厚,HE 染色,由有经验的病理医师诊断核实,选取含肿瘤组织标本的蜡块,采用常规免疫组化 SP 法进行免疫组化检测,同时设阳性和阴性对照:阳性对照为试剂公司提供的强阳性标本切片,阴性对照采用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 代替一抗。

1.3 免疫组化结果判定标准 评分标准按 Shimizu 方法,对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别记 0、1、2、3 分,着色阳性面积按无着色、着色 < 1/3、1/3 ~ 2/3、> 2/3 分别记 0、1、2、3 分,然后根据两项记分之和判断其结果: 3 分为阳性。

1.4 MVD 结果判定 MVD 计数方法:采用 Weidner^[1] 等的校正技术,在低倍镜 (100 倍) 视野中,寻找新生血管最密集区,在高倍镜 (200 倍) 视野下进行计数,3 个高倍镜视野 (200 倍) 血管的均数即为新生血管数。

1.5 统计学方法 所有数据均应用 SPSS10.0 统计软件进行分析。HIF-1 和 VEGF 蛋白表达水平的组间显著性差异采用卡方检验,MVD 值的组间显著性差异采用单因素方差分析和 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同肝组织中 HIF-1 和 VEGF 蛋白的表达及 MVD 值 肝癌组织中 HIF-1 阳性着色主要分布于细胞浆,小部分胞核中也有表达,分化程度越低

着色程度越深,HIF-1 在正常肝组织和癌旁肝组织胞浆中无着色或着色较浅,见图 1 ~ 4。VEGF 主要定位在胞浆,正常肝组织中无 VEGF 染色或染色较浅;不同分化程度的肝癌组织 VEGF 染色差别不明显,见图 5 ~ 8。肝癌组织微血管染色数多于癌旁和正常肝组织,见图 9 ~ 11。HIF-1 和 VEGF 在肝细胞癌中的表达显著高于癌旁和正常肝组织 (P < 0.05);肝癌组织 MVD 值显著高于癌旁和正常肝组织 (P < 0.05),见表 1。

2.2 HIF-1 和 VEGF 蛋白表达及其与 MVD 的关系 在肝细胞癌组织中 HIF-1 和 VEGF 阳性表达组 MVD 值均显著高于阴性表达组,且 HIF-1 和 VEGF 共同表达阳性组的 MVD 值高于 HIF-1 和 VEGF 共同表达阴性组 (P < 0.05),见表 2;HIF-1 和 VEGF 蛋白的表达呈显著正相关 (P < 0.05),见表 3。

表 2 肝癌组织中 HIF-1 和 VEGF 的表达与 MVD 的关系

	cases	MVD	t	P
HIF-1				
positive	25	30.28 ±10.09		
negative	25	23.56 ±11.53	2.19	0.033
VEGF				
positive	40	29.03 ±10.50		
negative	10	20.07 ±4.84	2.84	0.007
HIF-1 / VEGF				
positive	24	30.71 ±10.08		
negative	9	18.30 ±4.29	3.55	0.001

表 3 肝癌组织中 HIF-1 和 VEGF 表达的关系

VEGF	HIF-1		t	P
	positive	negative		
positive	24	16	8.00	0.005
negative	1	9		

2.3 HIF-1 和 VEGF 蛋白表达与肝细胞癌病理特征的关系 HIF-1 蛋白表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、有无肝内或淋巴结转移和 AFP 等无关 (P > 0.05),但与有无门静脉或胆管癌栓及肿瘤的分化程度有关 (P < 0.05);VEGF 蛋白表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、AFP 及肿瘤分化程度等无关 (P > 0.05),但与有无肝内或淋巴结转移、有无门静脉或胆管癌栓有关 (P < 0.05),见表 4。

表 4 肝癌组织中 HIF-1 和 VEGF 的表达及其与肝癌临床病理特征的关系

characteristics		case	HIF-1 (%)	P	VEGF (%)	P
sex	Male	36	18(50.0)	1.0	31(86.1)	0.090
	Female	14	7(50.0)		9(64.3)	
ages	50	20	7(35.0)	0.083	16(80.0)	1.000
	>50	30	18(60.0)		24(80.0)	
tumor size	5cm	15	5(33.3)	0.123	11(73.3)	0.700
	>5cm	35	20(57.1)		29(82.9)	
intrahepatic or lymphatic metastasis	no	28	12(42.9)	0.254	19(67.9)	0.015
	yes	22	13(59.1)		21(95.5)	
tumor thrombosis	no	23	8(34.9)	0.047	15(65.2)	0.040
	yes	27	17(63.0)		25(92.6)	
AFP	20	20	7(35.0)	0.332	13(65.0)	0.070
	>20	30	16(53.3)		27(90.0)	
tumor differentiation	+	29	11(37.9)	0.045	24(82.8)	0.830
	+	21	14(66.7)		16(76.2)	

3 讨论

缺氧是实质性肿瘤微环境的基本特征之一,缺氧状态下,细胞内缺氧反应基因(VEGF、红细胞生成素、酪氨酸羟化酶及参与糖酵解的酶类)转录和表达发生改变,从而对缺氧作出应激反应,使肿瘤细胞产生一系列适应性变化^[2]。缺氧反应基因的调控主要是由 HIF-1 来实现。HIF-1 极不稳定,易被蛋白酶降解,常氧条件下半衰期小于 10 min,但在缺氧时半衰期显著延长。HIF-1 决定 HIF 的活性,在肿瘤组织中广泛表达。Zhong 等^[3]分析 179 例肿瘤标本后发现,19 种不同肿瘤中有 13 种存在 HIF-1 表达。我们的研究结果显示,HIF-1 在肝细胞癌组织中的表达显著高于癌旁及正常肝组织($P < 0.05$),说明 HIF-1 的表达与肝细胞癌的发生、发展有关。

缺氧引起的基因表达改变可能是肿瘤生长、侵袭转移的一个关键环节^[4]。宋炯等^[5]研究结果表明直肠癌组织 HIF-1 的表达与肿瘤 Dukes 分期、淋巴结转移、远处转移显著相关,而与肿瘤的病理类型、分化程度无明显相关性。李玉军等^[6]发现 HIF-1 与胰腺癌的浸润和转移密切相关。本研究结果显示,HIF-1 与肝细胞癌有无胆道或门静脉癌栓及分化程度密切相关,说明 HIF-1 可能与肝细胞癌侵袭转移等生物学行为有关。最近发现,甲胎蛋白 AFP 基因也是一种对缺氧敏感的基因^[7]。但是,我们的研究结果显示,HIF-1 与患者 AFP 值无关,可能与样本量较小有关系。

VEGF 是最早被发现的能为缺氧诱生的促血管生成因子^[8]。目前已经明确 VEGF 在几乎所有的肿瘤中普遍高表达。我们的研究结果显示肝癌组织中 VEGF 高表达,且 VEGF 蛋白的表达与有无肝内及淋巴结转移、有无门静脉或胆管癌栓有关($P <$

0.05),说明 VEGF 的高表达反映了肝细胞癌侵袭转移的特性。

HIF-1 阳性表达组 MVD 值显著高于阴性表达组($P < 0.05$);VEGF 阳性表达组 MVD 值显著高于阴性表达组($P < 0.05$),说明 HIF-1 和 VEGF 均与肝细胞癌的血管新生有关。

在缺氧条件下调节 VEGF 表达的信号传导途径中,HIF-1 的确起着关键作用。研究表明,HIF 在多个层次调节 VEGF 的表达,其功能包括增强 VEGF 的转录活性与增加 VEGF mRNA 稳定性两个方面^[9,10]。本研究结果显示肝细胞癌组织中 HIF-1 和 VEGF 表达有关。VEGF 和 HIF-1 共同表达阳性组 MVD 值为 30.71 ± 10.08 ,共同表达阴性组 MVD 值 18.30 ± 4.29 ,其差异有统计学意义($P = 0.001$),说明 HIF-1 可能是通过调节 VEGF 的表达促进肝细胞癌血管新生。

综上所述,HIF-1 可以通过调节 VEGF 的表达,增加肝细胞癌新生血管的生成,促进肝细胞癌的侵袭转移。

(本文图见第 546 页)

参考文献:

- [1] Weidner N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow[J]. Jpathol, 1998, 184(1):119-122.
- [2] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev cancer, 2003, 3(10): 721-732.
- [3] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia inducible factor-1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5830-5835.
- [4] Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(3): 718-722.
- [5] 宋炯,刘丰,傅仲学,等. 缺氧诱导因子-1、VEGF 和 MVD 在

直肠癌中的表达及临床意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2004, 19(4): 314-316.

[6] 李玉军, 纪祥瑞. 缺氧诱导因子-1 表达与胰腺癌病理学特征及新生血管生成的关系[J]. 胰腺病学, 2003, 3(3): 140-144.

[7] Mazure NM, Chauvet C, Bois-Joyeux B, et al. Repression of alpha-fetoprotein gene expression under hypoxic conditions in human hepatoma cells: characterization of a negative hypoxia-response element that mediates opposite effects of hypoxia-inducible factor-1 and c-Myc[J]. Cancer Res, 2002, 62(4): 1158-1165.

[8] Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance[J]. J Clin Invest, 2001, 108(1): 39-40.

[9] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-684.

[10] Hirota K. Hypoxia-inducible factor 1, a master transcription factor of cellular hypoxic gene expression[J]. J Anesth, 2002, 16(2): 150-159.

[编辑:刘红武;校对:贺文]

· 短篇个案 ·

右乳腺非典型纤维黄色瘤合并左肺癌肉瘤 1 例

王 昆, 黄云超, 马千里

关键词: 乳腺; 非典型纤维黄色瘤; 肺肿瘤
 中图分类号: R730.26; R737.9; R734.2
 文章编号: 1000-8578(2007)07-0507-01

文献标识码: D

0 引言

非典型纤维黄色瘤(atypical fibroxanthoma)是一种罕见的真皮间质恶性肿瘤,国内仅有 1 例报道,发生于左下肢。我院收治了 1 例发生于乳腺的患者,且合并少见的肺癌肉瘤、胸椎多发性转移瘤。报告如下。

1 病例资料

患者,女,54 岁,无意中触及右乳腺一肿块,即在当地医院行“右乳肿块切除术”,术后病理诊断:“右乳单纯癌”。转入昆明医学院第三附属医院进一步治疗,给予 CMF 方案新辅助化疗一疗程后,行右乳癌改良根治术,术后切除标本多点取材未发现肿瘤细胞,腋窝淋巴结 6/6 反应性增生,再将患者当地医院切除的乳腺肿块石蜡切片送我院会诊,病理诊断:(右乳)非典型纤维黄色瘤;免疫组化:上皮细胞角蛋白 CK(L)(-),结构蛋白 Des(-)、重度酸性钙结合蛋白 S-100(-)、间叶成分的波形蛋白 Vim(+),巨噬细胞标记 CD68(+),内皮细胞标记 CD34 血管阳性。出院后患者一般情况良好。

1 年后患者出现干咳、胸痛,胸部 CT 检查:左肺上叶中心型肿块,再行左肺上叶切除术,术后病理诊断:(左肺上叶)癌肉瘤;免疫组化:上皮细胞角蛋白 CK(-)、癌胚抗原 CEA(-)、上皮膜抗原 EMA(-)、突触素 Syn(-)、胃泌素 Gas(-)、肌动蛋白 Act(±)、波形蛋白 Vim(+),嗜铬素 CgA(+)。术后 2 月,患者

又出现胸背剧烈疼痛,胸椎 CT 及骨扫描诊断:胸椎多发骨质破坏并椎管受累。患者拒绝胸椎成形术或胸椎穿刺进一步确诊,胸椎破坏首先考虑癌肉瘤转移,但也不排除非典型纤维黄色瘤转移可能,予 CAP 方案化疗一疗程后行胸椎姑息性放疗,疼痛明显缓解出院,出院后出现呼吸困难,42 天后全身衰竭死亡。

2 讨论

非典型纤维黄色瘤又称为皮肤奇异纤维肉瘤(paradoxical fibrosarcoma of skin),WHO《软组织和骨肿瘤的病理学和遗传学》的最新分类(2002 年)^[1],把该病由软组织肿瘤分类归入皮肤肿瘤分类。该病生物学行为不活跃,发生于成人。组织学以成簇的梭形、上皮样及巨细胞为特征,细胞异形较明显,常有脂质沉积。瘤细胞表达 vimentin、CD74、HAM-56、a1 抗胰蛋白酶。

临床上,非典型纤维黄色瘤最常表现为快速增大或外生型息肉,孤立性,又常为溃疡状。好发生于头颈部,其他部位也可发生,大部分病人有长时间的曝光史^[2]。有人认为发生于年龄较轻者,其病变常位于非曝光区。但在发病机制上,大部分非典型纤维黄色瘤病例在分子水平上是由 UV 射线激发发生的^[3]。仔细询问该患者既无曝光史也无外伤史。此病变直径一般为 1~6 cm,多为 1~2 cm。病变表面皮肤光滑,可呈黄色。临床上应与鳞状细胞癌、恶性黑色素瘤、

分叶状毛细血管瘤鉴别。临床治疗局部切除可治愈,浅表病变很少复发,也有少数病变发生转移的报告。

而肺癌肉瘤(pulmonary carcinosarcoma)是一类罕见的双向分化的恶性肿瘤,估计占全部肺肿瘤的 0.3%~0.36%^[4]。国内外文献仅见零星散在报道,到目前为止,国内也仅报告 100 余例,该病多见于中老年男性,90%的患者与吸烟有关。患者无吸烟史且为女性,实属罕见。组织学中癌和肉瘤的成分分别以鳞癌和纤维肉瘤最为多见^[5],要注意与梭形细胞鳞状细胞癌鉴别。同其他肺癌一样,肿瘤的位置决定了临床症状。治疗上首选手术,对化疗、放疗不敏感,易远处广泛转移,预后差,大多数死于症状出现后的 2 年内。

我们所遇到这样的 1 例患者,两种肿瘤均与常见发病原因、性别、生活习惯不吻合,说明非典型纤维黄色瘤、癌肉瘤可发生于很多部位和不同的人群。

参考文献:

[1] Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. World Health Organization classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Soft tissue and Bone [M]. Lyon: IARC Press, 2002, 47-107.

[2] Lum DJ, King AR. Peritoneal Metastases From an Atypical Fibroxanthoma [J]. Am J Surg Pathol, 2006, 30(8): 1041-1046.

[3] Dei Tos AP, Maestro R, Doglioni C, et al. Ultraviolet-induced p53 mutations in atypical fibroxanthoma [J]. Am J Pathol, 1994, 145(2): 11.

[4] 张俊红, 廖美焱, 谢丛华, 等. 肺癌肉瘤 3 例报告并文献复习[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(10): 658.

[5] Koss MN, Hochholzar L, Formmeh RA. Carcinosarcomas of the lung: a clinicopathologic study of 66 patients[J]. Am J Surg Pathol, 1999, 23(12): 1514-1526.

[编辑:周永红;校对:贺文]

收稿日期:2006-06-30;修回日期:2006-11-01

作者单位:650118 昆明医学院第三附属医院胸心血管外科

作者简介:王昆(1975-),男,硕士在读,主治医师,主要从事胸部肿瘤外科研究

CD105、MMP-2 和 MMP-9 在骨巨细胞瘤中的表达及意义

(正文见 490 页)

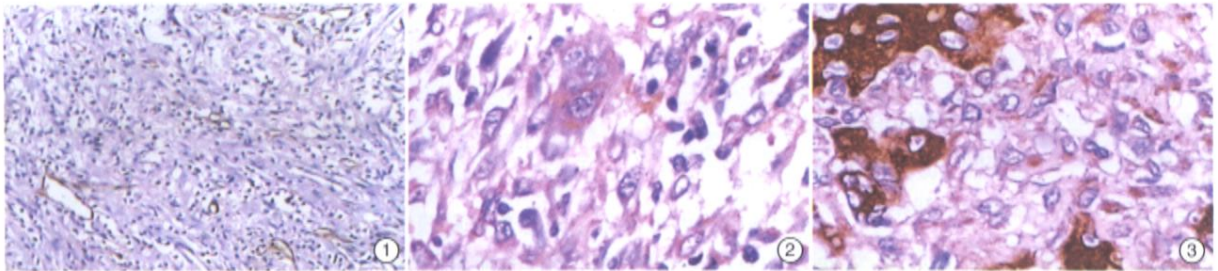


图 1 CD105 标记的新生血管, 管腔仅由数个内皮细胞围成(SP × 100)
 图 2 MMP-2 在骨巨细胞瘤的多核巨细胞和单核间质细胞胞浆内呈阳性表达(SP × 400)
 图 3 MMP-9 在骨巨细胞瘤的单核间质细胞和多核巨细胞胞浆均呈阳性表达(SP × 400)

HIF-1 α 和 VEGF 的表达与肝细胞癌侵袭转移的关系

(正文见 504 页)

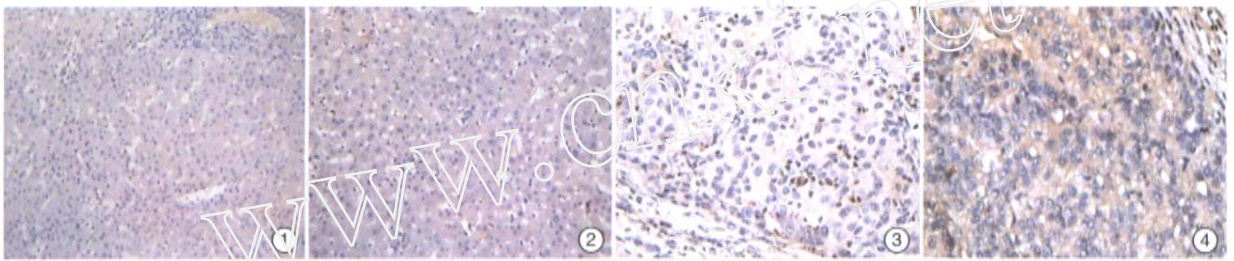


图 1 正常肝组织 HIF-1 α 免疫染色(IHC × 200) 图 2 癌旁肝组织 HIF-1 α 免疫染色(IHC × 200) 图 3 中分化肝癌组织 HIF-1 α 免疫染色(IHC × 400) 图 4 低分化肝癌组织中 HIF-1 α 免疫染色(IHC × 400)

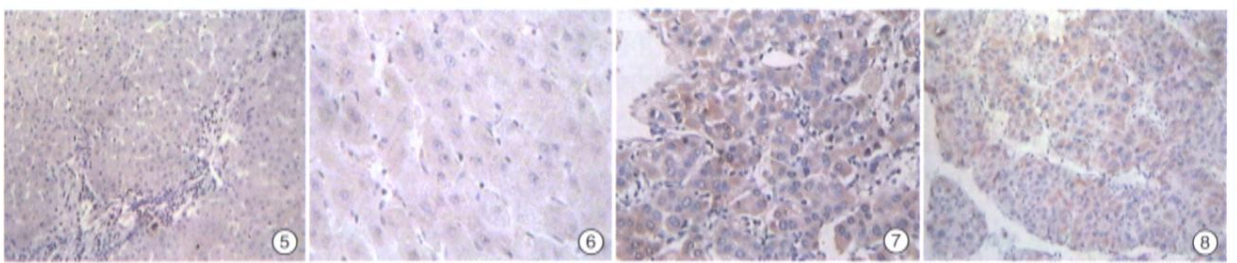


图 5 正常肝组织 VEGF 免疫染色(IHC × 200) 图 6 癌旁肝组织 VEGF 免疫染色(IHC × 400) 图 7 中分化肝癌组织 VEGF 免疫染色(IHC × 400) 图 8 低分化肝癌组织中 VEGF 免疫染色(IHC × 200)

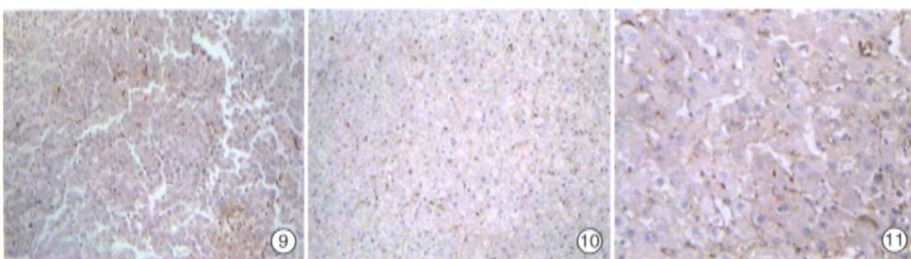


图 9 正常肝组织中微血管染色(IHC × 200) 图 10 癌旁肝组织中微血管染色(IHC × 200) 图 11 肝癌组织中微血管染色(IHC × 400)