

IGF- I TGF-β1 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及与微血管密度的关系

刘彩艳 曲芃芃

摘要 目的:检测卵巢上皮性肿瘤中胰岛素样生长因子(IGF- I)、转化生长因子(TGF-β1)的表达及肿瘤微血管密度(MVD),分析其与卵巢癌临床病理特征的关系。方法:收集天津市中心妇产科医院2005年12月至2010年5月间诊治的卵巢癌35例,交界性肿瘤31例,良性肿瘤30例,正常卵巢组织20例。通过免疫组织化学法检测IGF- I及TGF-β1的表达与MVD。结果:上皮性卵巢癌中IGF- I及TGF-β1的表达显著高于交界性肿瘤、良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织($P<0.05$);IGF- I与卵巢癌组织学分级及腹水形成相关($P<0.05$),TGF-β1与腹水形成相关($P<0.05$);MVD与临床分期、组织分级、腹水形成相关($P<0.05$)。IGF- I和TGF-β1在各组中的表达存在正相关($r=0.68, P<0.05$);IGF- I、TGF-β1的表达与MVD均值存在显著正相关($r=0.45, P=0.01; r=0.39, P=0.02$);IGF- I、TGF-β1阳性组无瘤生存率及总生存率均有下降的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:上皮性卵巢癌中,IGF- I、TGF-β1的表达与MVD呈正相关。IGF- I、TGF-β1和MVD形成在上皮性卵巢癌发病机理中起着重要作用。

关键词 上皮性卵巢癌 胰岛素样生长因子- I 转化生长因子-β1 微血管密度 免疫组织化学法

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.18.002

Expression of IGF-I and TGF-β1 in Epithelial Ovarian Cancer and Its Relationship with Tumor Micro-vessel Density

Caiyan LIU, Pengpeng QU

Correspondence to: Pengpeng QU; E-mail: qu.pengpeng@hotmail.com

Department of Gynecological Oncology, Tianjin Central Hospital of Gynecology and Obstetrics, Tianjin 300100, China

Abstract Objective: To investigate the expression of IGF-I and TGF-β1 and the formation of tumor micro-vessel density in patients with epithelial ovarian cancer and to analyze the relationship among factors and clinicopathologic features of epithelial ovarian cancer. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect the expression of IGF-I and TGF-β1 proteins and to observe microvessel density (MVD) formation in 35 cases with epithelial ovarian cancer, 31 cases with borderline tumor, 30 cases with benign tumor, and 20 cases with normal ovarian tissues. **Results:** The expression of IGF-I and TGF-β1 was significantly higher in epithelial ovarian cancer tissues than in cases with borderline tumor, benign ovarian tumor, and normal ovarian tissues ($P < 0.05$). Among the patients with epithelial ovarian cancer, the expression of IGF-I was significantly different in various histological grades or ascites ($P < 0.05$). The expression of TGF-β1 was related to ascites ($P < 0.05$), whereas MVD was related to clinical stage, histological grade, and ascites ($P < 0.05$). The expression level of IGF-I and TGF-β1 in different tissues was positively correlated ($r = 0.68, P < 0.05$), similar to the correlation with MVD ($r = 0.45, P = 0.01; r = 0.39, P = 0.02$). The disease-free and overall survival rates in the positive groups of IGF-I and TGF-β1 exhibited a decrease, whereas no significant differences were observed in both groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** In epithelial ovarian carcinomas, the expression of IGF-I and TGF-β1 is positively correlated with MVD. IGF-I, TGF-β1, and MVD formation in epithelial ovarian cancer patients play an important role in pathogenesis.

Keywords Epithelial ovarian cancer; IGF-I; TGF-β1; Microvessel density; Immunohistochemistry

卵巢癌是妇科常见三大恶性肿瘤之一,死亡率居妇科恶性肿瘤之首,最新的统计显示,美国2011年卵巢癌发病人数为21 990例,死亡人数15 460例^[1]。目前普遍认为肿瘤的形成包括细胞增殖、凋亡抑制、肿瘤基质和肿瘤周围血管形成等多个方面。近年来,随着分子生物学技术的发展,人们越来越多的认识到一些生长因子与肿瘤发生、发展和预后有关。目前,国内外关于胰岛素样生长因子(insulin like

growth factor, IGF)和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)的研究日趋深入。本文对上皮性卵巢肿瘤中IGF- I、TGF-β1表达及其与肿瘤微血管生成的关系进行研究,为卵巢癌的早期诊断及判断预后提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集本院自2005年12月至2010年5月因卵巢

作者单位:天津市中心妇产科医院妇科(天津市300100)

通信作者:曲芃芃 qu.pengpeng@hotmail.com

肿物手术治疗且临床资料完整的病例标本共96例,其中上皮性卵巢癌35例,平均年龄52(32~67)岁;临床分期按国际妇产科协会FIGO标准:I~II期18例,III~IV期17例;按WHO分类法组织学类型:浆液性腺癌25例,黏液性腺癌10例;组织学分级:高分化6例,中分化15例,低分化14例;腹水或腹腔冲洗液阳性者20例,阴性者15例。交界性肿瘤31例,其中黏液性18例,浆液性13例;良性肿瘤30例,其中浆液性囊腺瘤20例,黏液性囊腺瘤10例。对照组为因子宫肌瘤行子宫切除术同时切除卵巢者,术后病理证实为正常卵巢20例。所有患者术前均未行放疗、化疗及免疫治疗。

1.2 方法

应用Envision二步法,兔抗人转化生长因子 $\beta 1$ 多克隆抗体及CD34鼠抗人单克隆抗体,购自北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗人胰岛素样生长因子单克隆抗体,购自北京博奥森生物有限公司。

1.3 判定标准

IGF-I、TGF- $\beta 1$ 阳性染色为细胞胞浆内呈现棕黄色颗粒。在双盲条件下,随机选取5个高倍视野,每视野计数细胞200个,结果判定采用半定量记分方法。标准如下^[2]:阳性细胞数(positive percentage):即阳性细胞占细胞总数的比例:0分:阴性;1分:阳性细胞 $\leq 10\%$;2分:11%~50%;3分:51%~75%;4分: $> 75\%$;染色强度(staining intensity):0分:无着色;1分:浅黄色;2分:棕黄色;3分:棕褐色,染色深浅需与背景着色相对比。染色强度与阳性细胞百分比计分的乘积 > 3 分为免疫反应(+).

微血管密度(MVD):在低倍镜下($\times 100$)选择癌灶内内皮细胞染色清晰,微血管最密集的5个区域,然后在400倍镜下计数每个区域中的血管数,取5个区域的平均数。

1.4 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件对数据进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料采用 χ^2 检验进行显著性检验。指标间的相关性采用Pearson Correlation Coefficient检验。生存分析采用Kaplan-Meier法。显著性检验标准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGF-I、TGF- $\beta 1$ 在卵巢组织中的表达

IGF-I、TGF- $\beta 1$ 阳性表达均位于细胞浆(图1,2,表1)。IGF-I在4种卵巢组织中的阳性表达率分别为82.9%(29/35)、58.1%(18/31)、43.3%(13/30)、40.0%(8/20)。上皮性卵巢癌组IGF-I的表达与交界性上皮性肿瘤组、良性肿瘤组和正常卵巢组比较,差异均有统计学意义($\chi^2=4.929$ 、11.037、10.618, $P<$

0.05)。TGF- $\beta 1$ 在四种卵巢组织中的阳性表达率分别为74.3%(26/35)、48.4%(15/31)、40.0%(12/30)、20.0%(4/20),卵巢癌组TGF- $\beta 1$ 的阳性表达率明显高于其他三种卵巢组织,差异均有统计学意义($\chi^2=4.686$ 、7.820、15.128, $P<0.05$)。

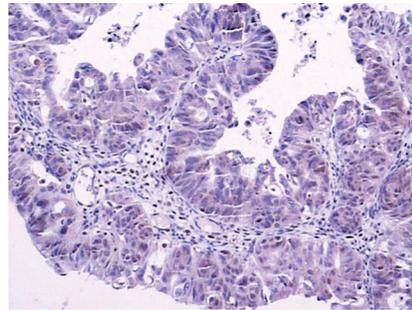


图1 IGF在卵巢组织中的表达(H&E $\times 100$)

Figure 1 IGF immunohistochemistry (H&E $\times 100$)

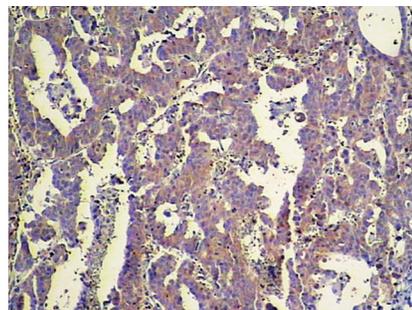


图2 TGF在卵巢组织中的表达(H&E $\times 100$)

Figure 2 TGF immunohistochemistry (H&E $\times 100$)

表1 IGF-I、TGF- $\beta 1$ 在上皮性卵巢肿瘤及正常卵巢组织中的表达 例(%)

Table 1 The expression of IGF-I and TGF- $\beta 1$ in epithelial ovarian cancer and in normal ovarian tissues

组别	例数	IGF-I		TGF- $\beta 1$	
		阳性	阴性	阳性	阴性
上皮性卵巢癌	35	29(82.9)	6(17.1)	26(74.3)	9(25.7)
交界性上皮性肿瘤	31	18(58.1)	13(41.9)	15(48.4)	16(51.6)
卵巢良性肿瘤	30	13(43.3)	17(56.7)	12(40.0)	18(60.0)
正常卵巢	20	8(40.0)	12(60.0)	4(20.0)	16(80.0)

2.2 IGF-I、TGF- $\beta 1$ 阳性表达与上皮性卵巢癌组织临床病理特征的关系

上皮性卵巢癌中,高、中、低分化组中IGF-I的阳性表达率分别为50%(3/6)、80.0%(12/15)、100%(14/14),随着分化程度的降低,IGF-I阳性表达率增加,三者比较差异有统计学意义($\chi^2=7.012$, $P<0.05$),腹水或腹腔冲洗液阳性组IGF-I阳性率95%(19/20),阴性组66.7%(10/15),二者比较差异具有统计学意义($\chi^2=4.884$, $P<0.05$)。比较不同年龄、临床分期、组织学类型组IGF-I的表达比较差异无统计学意义(表2)。

表2 卵巢癌组织中 IGF- I、TGF-β1 的表达与临床病理特性的关系 例

Table 2 Relationship of IGF-I and TGF-β1 expression with clinicopathologic features of epithelial ovarian cancer

病理参数	例数	IGF- I				TGF- β 1			
		阳性	阴性	χ^2	<i>P</i>	阳性	阴性	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)									
≥50	22	19	3	0.513	0.474	17	5	0.277	0.599
<50	13	10	3			9	4		
临床分期									
I~II	17	14	3	0.006	0.939	12	5	0.237	0.627
III~IV	18	15	3			14	4		
组织学类型									
浆液性	25	21	4	0.080	0.777	19	6	0.135	0.714
黏液性	10	8	2			7	3		
组织学分级									
高分化	6	3	3	7.012	0.018	4	2	0.549	0.882
中分化	15	12	3			11	4		
低分化	14	14	0			11	3		
腹水									
有	20	19	1	4.844	0.028	18	2	6.033	0.014
无	15	10	5			8	7		

腹水或腹腔冲洗液阳性组 TGF-β1 阳性表达率为 90.0%(18/20), 阴性组 53.3%(8/15), 二者比较差异有统计学意义($\chi^2=6.033, P<0.05$)。TGF-β1 阳性表达与其他病理特征无相关性。

2.3 CD34 的表达

2.3.1 不同卵巢组织中的 MVD CD34 免疫组化染色后血管壁内皮细胞呈棕色或棕褐色(图3)。上皮性卵巢癌组织中, MVD 均值与其他卵巢组织比较, 差异有统计学意义($t=8.81, 18.81, 29.59, P<0.05$, 表3)。

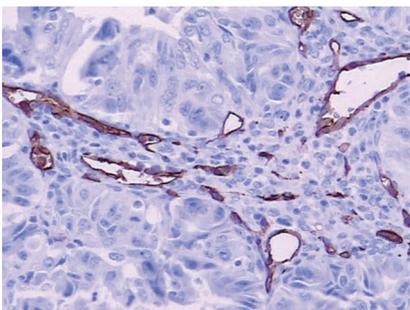


图3 CD34在卵巢组织中的表达(×200)

Figure 3 CD34 immunohistochemistry (×200)

2.3.2 MVD测定与上皮性卵巢癌组织临床病理特征的关系 卵巢癌 III~IV 期中 MVD 值为(19.17±1.67), 高于 I~II 期中 MVD 值(15.91±1.13), 两组之间比较差异有统计学意义($t=6.81, P<0.05$) 卵巢癌

低、中、高分化三组中 MVD 值分别为(18.04±2.00)、(17.96±2.26)、(15.57±1.33), 随着分化程度降低, MVD 值增加, 三者比较差异有统计学意义($F=3.60, P<0.05$, 表4), 腹水或腹腔冲洗液阳性组 MVD 值为(18.39±2.11), 阴性组(16.51±1.80), 二者比较差异具有统计学意义($t=2.78, P<0.05$)。MVD 的表达与上皮性卵巢癌患者的年龄、组织学类型无显著性差异。

表3 上皮性卵巢肿瘤与正常卵巢组织中 MVD 均值 $\bar{x}\pm s$

Table 3 MVD in epithelial ovarian cancer and in normal ovarian tissues

组别	例数	MVD(条)
上皮性卵巢癌	35	17.58 ± 2.17
交界性上皮性肿瘤	31	13.88 ± 2.65
卵巢良性肿瘤	30	11.32 ± 1.50
正常卵巢	20	6.21 ± 1.43

2.4 IGF- I 及 TGF-β1 的相关性、MVD 与 IGF- I 及 TGF-β1 表达的关系

在卵巢癌中 IGF- I、TGF-β1 均阳性者 22 例, 均阴性者 5 例, 两者呈正相关($r=0.68, P<0.05$); IGF- I 阳性表达 29 例, MVD 样本均数为(18.02±2.12), 阴性 6 例, MVD 样本均数(15.47±0.65), 经 *t* 检验两组 MVD 比较差异有统计学意义($t=5.37, P<0.05$, 表5), IGF- I 阳性表达与 MVD 呈正相关($r=0.45, P=0.01$); TGF-β1 阳性表达 26 例, MVD 样本均数为(18.08±2.11), 阴性

9例, MVD样本均数(15.16±1.75), 经*t*检验两组MVD比较差异亦有统计学意义($t=2.45, P<0.05$), TGF-β1阳性表达与MVD呈正相关($r=0.39, P=0.02$)。

2.5 生存分析

对35例上皮性卵巢癌患者进行随访, 随访时间12~60个月, 平均随访26.88个月, 其中30例生存, 3例死亡, 2例失访, 随访率为94.29%。

采用Kaplan-Merier方法进行生存分析, 并行Log-Rank时序检验, 结果显示IGF-I、TGF-β1阳性组患者无瘤生存率为81.48%、80.0%, 阴性组为100%、100%, 两者比较差异无统计学意义($\chi^2=1.351, P=0.245; \chi^2=1.581, P=0.209$)。IGF-I、TGF-β1阳性组患者死亡率为11.11%、12%, 阴性组为0, 两者比较差异亦无统计学意义($\chi^2=0.470, P=0.493; \chi^2=0.480, P=0.489$)。虽无统计学差异, 但阳性组无瘤生存率均有下降的趋势(图4, 5)。

表4 卵巢癌组织中MVD均值与临床病理特性的关系 $\bar{x} \pm s$

Table 4 Relationship between MVD and the clinicopathologic features of epithelial ovarian cancer

病理参数	例数	MVD(条)	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
年龄(岁)				
≥50	22	17.75 ± 2.43	0.60	0.55
<50	13	17.29 ± 1.69		
临床分期				
I~II	17	15.91 ± 1.13	6.81	<0.01
III~IV	18	19.17 ± 1.67		
组织学类型				
浆液性	25	17.84 ± 2.03	1.11	0.28
黏液性	10	16.94 ± 2.48		
组织学分级				
高分化	6	15.57 ± 1.33	3.60	0.04
中分化	15	17.96 ± 2.26		
低分化	14	18.04 ± 2.00		
腹水				
有	20	18.39 ± 2.11	2.78	0.01
无	15	16.51 ± 1.80		

表5 IGF-I表达与MVD的相关性 $\bar{x} \pm s$

Table 5 Correlation of IGF-I and TGF-β1 expression with MVD

指标	例数	MVD(条)	<i>t</i>	<i>P</i>
IGF-I				
阳性	29	18.02 ± 2.12	5.37	<0.01
阴性	6	15.47 ± 0.65		
TGF-β1				
阳性	26	18.08 ± 2.11	2.45	0.02
阴性	9	15.16 ± 1.75		

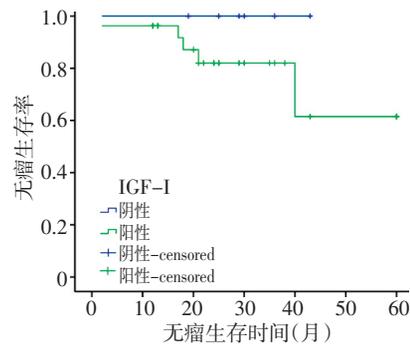


图4 IGF-I表达与无瘤生存曲线

Figure 4 IGF-I disease-free survival curves

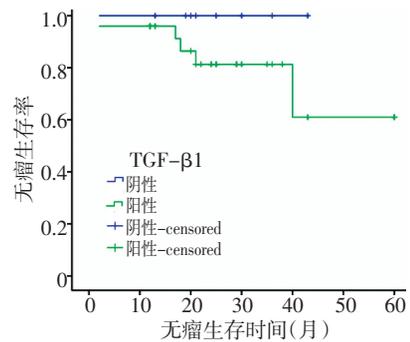


图5 TGF-β1表达与无瘤生存曲线

Figure 5 TGF-β1 disease-free survival curves

3 讨论

3.1 IGF-I与卵巢癌

胰岛素样生长因子及其结合蛋白可以促进细胞生长、抑制凋亡。目前已公认, IGFs与多种肿瘤的发生发展密切相关, 如Wilm's瘤、乳腺癌、肺癌、肝癌、膀胱癌^[3]等。自20世纪90年代初, 人们通过研究表明IGFs在卵巢癌细胞中也有表达。持续性排卵造成的周期性组织损伤与增殖修复、周期性类固醇激素的刺激参与了卵巢癌的发生发展。本实验显示, 上皮性卵巢癌中IGF-I的表达均显著高于其他三种卵巢组织。有研究^[4]报道, 卵巢癌患者在手术前血清IGF-I水平显著高于正常组($P<0.05$), 手术后6个月与正常组比较无显著性差异($P>0.05$)。本研究发现, 卵巢癌IGF-I的阳性表达与组织学分级及腹水形成相关($P<0.05$)。说明IGF的高表达对肿瘤的浸润和转移起着促进作用, 与肿瘤的恶性程度密切相关。

3.2 TGF-β1与卵巢癌

转化生长因子β是细胞自分泌和旁分泌的细胞内源性生长抑制因子, TGF-β1作为TGF-β细胞因子超家族的成员, 调节多种靶基因的表达, 在细胞分化、增殖及凋亡中发挥重要作用, 同时具有参与细胞外基质的分泌和发育分化等多种生理功能^[5]。TGF-β1在肿瘤形成早期能够抑制上皮细胞生长, 而在晚期, 则促进肿瘤细胞的浸润和转移^[6]。TGF-β1

功能的发挥依赖于TGF- β 1与其受体T β R(transforming growth factor beta receptor, T β R)的结合,通过Smads蛋白信号通路发挥作用。这一信号传导通路中任一环节发生异常,都可致信号传导紊乱,导致肿瘤发生。Hempel等^[7]研究发现,TGF- β 信号传导通路被破坏后,卵巢癌细胞的侵袭能力和运动能力会大幅增强。Yao等^[8]研究发现,TGF- β 1参与卵巢癌细胞的上皮-纤维原细胞-成纤维细胞的转变过程,TGF- β 1高表达与卵巢癌细胞的转移扩散密切相关。本研究提示,卵巢癌TGF- β 1的阳性表达率明显高于其他三种卵巢组织,这与Wang等^[9]研究结论相同。TGF- β 1在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达与腹水形成有关,与患者其他病理特征无相关性。TGF- β 1在卵巢癌尤其是晚期卵巢癌的发生、发展和转移过程中起着十分重要的作用。

3.3 血管生成与卵巢癌

众所周知,正如其他实体肿瘤一样,血管生成是卵巢肿瘤进展和转移的关键因素。目前许多学者将MVD作为肿瘤微血管形成程度的标志和肿瘤的生物特征^[10]。目前,常用的血管内皮细胞标记物为VIII因子、CD31及CD34抗体,本研究选择CD34作为标记物,CD34表达主要位于肿瘤细胞间质的内皮细胞,呈环状或点状,卵巢癌组织中围绕癌巢的新生血管数量明显增加,血管排列紊乱、密集、扭曲。本研究中,上皮性卵巢癌组织的MVD值显著高于其他三种卵巢组织,这与国内学者的研究结果相似^[11]。关于CD34标记的MVD与卵巢癌各预后因素之间关系说法不一,有待进一步研究。本研究中,MVD值与临床分期、组织学分级及腹水形成有关,国内外一些学者的研究发现黏液性卵巢癌中MVD高于浆液性卵巢癌^[12],推测可能是浆液性和黏液性卵巢癌血管生成机制不同。

3.4 IGF- I、TGF- β 1与MVD的关系

肿瘤新生血管形成过程是各种血管形成生长因子和抑制因子共同作用的结果。在细胞恶性转化过程中,IGF- I可以刺激肿瘤细胞表达血管内皮生长因子(VEGF),从而诱发血管形成^[13];TGF- β 1通过调控内皮细胞的基因,增加胶原蛋白的形成和聚集,参与血管内皮细胞的出芽及管腔形成,促进肿瘤组织血管生成。本研究发现,IGF- I、TGF- β 1表达阳性的MVD均值明显高于阴性者($P<0.05$),提示IGF- I、TGF- β 1的过量表达,能够促进微血管密度的增高。

肿瘤晚期时机体对TGF- β 1的反应性降低,引起c-myc基因过度表达,细胞发生恶性转化,而在c-myc基因和IGF的联合诱导下,癌细胞启动一个持续性、不规则的增殖过程,同时两者又可通过自分泌和旁分泌作用影响微环境,直接或间接促进血管生成,促进卵巢

癌的发生与转移。本研究结果表明两者存在正相关。

3.5 IGF- I、TGF- β 1与生存分析

有研究^[14]表明,IGF- I、TGF- β 1阳性及阴性组间总生存率差异有统计学意义,两者表达升高提示患者预后不良。本研究中,虽然IGF- I、TGF- β 1阳性组患者无瘤生存率低于阴性组,死亡率高于阴性组,但两者比较差异均无统计学意义,且5年生存率及总生存率均达60%。这一结果可能与随访时间短、样本例数少有关,有待于延长随访时间、扩大样本含量进行进一步研究。

综上所述,IGF- I、TGF- β 1对上皮性卵巢癌恶性程度的评估有一定的参考意义,但是否能作为预测术后生存时间的可靠指标及其与微血管密度的关系还需进一步研究。

参考文献

- 1 Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4):212-236.
- 2 许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志, 1996,6(4):229-271.
- 3 Watson JA, Burling K, Fitzpatrick P, et al. Urinary insulin-like growth factor 2 identifies the presence of urothelial carcinoma of the bladder [J]. BJU Int, 2009, 103(5): 694-697.
- 4 刘书敏.卵巢癌患者手术治疗前后血清IGF-I、CA125和TSGF检测的临床意义[J].放射免疫学杂志,2009,22(3):208-210.
- 5 杨树东,范钦和,孙荣超,等.肾透明细胞癌中TGF- β 1和MMP2的免疫组化研究[J].诊断病理学杂志,2007,14(4):258-261.
- 6 Massagué J. TGF β in cancer[J]. Cell, 2008, 134(2):215-230.
- 7 Hempel N, How T, Dong M, et al. Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(12): 5231-5238.
- 8 Yao Q, Qu X, Yang Q, et al. CLIC4 mediates TGF-beta1-induced fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation in ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2009, 22(3):541-548.
- 9 Wang ST, Liu JJ, Wang CZ, et al. Expression and correlation of Lewis y antigen and TGF- β 1 in ovarian epithelial carcinoma [J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1065-1071.
- 10 Romanque P, Pigué AC, Dufour JF. Targeting vessels to treat hepatocellular carcinoma[J]. Clin Sci (Lond), 2008, 114(7): 467-477.
- 11 张奎美,纪新强,徐平平.卵巢上皮性癌中APE/Ref-1的表达及与VEGF和MVD的关系[J].肿瘤基础与临床,2009,22(1):11-14.
- 12 汪宏波,王泽华,林美华.上皮性卵巢癌细胞凋亡指数和肿瘤微血管密度与肿瘤复发的关系[J].中国实用妇科与产科杂志,2005,21(3):163-165.
- 13 Stearns M, Tran J, Francis MK, et al. Activated Ras enhances insulin-like growth factor I induction of vascular endothelial growth factor in prostate epithelial cells[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2085-2088.
- 14 张丽,昌晓红,沈丹华,等. Foxp3,TGF- β 1,VEGF,CD3- ζ 和IL-10在卵巢上皮性癌中的表达与预后相关分析[J].中国医药生物技术, 2008,3(4):258-264.

(2011-12-19收稿)(2012-05-15修回)

(本文编辑:邢颖)