

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.017

· 临床研究 ·

人胃癌组织中巨噬细胞移动抑制因子和 VEGF 的表达及其临床意义

付东梅¹, 李立方², 康玉华¹ (1. 河南大学淮河医院 消化内科, 河南 开封 475000; 2. 河南大学淮河医院 普通外科, 河南 开封 475000)

[摘要] **目的:**检测巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)和 VEGF 在胃癌组织中的表达,分析其与胃癌临床病理特征之间的关系。**方法:**选取河南大学淮河医院 2008—2013 年手术切除的 89 例胃癌组织与 2013 年手术切除的新鲜胃癌及癌旁标本 4 对,分别采用免疫组织化学法和 Western blotting 方法检测胃癌组织及其癌旁组织中 MIF 和 VEGF 的表达,结合临床资料分析其表达水平与胃癌临床病理特征之间的关系。**结果:**MIF 和 VEGF 在胃癌中的表达率分别为 88.8% 和 50.6%,而在癌旁组织中均无表达。胃癌组织中 MIF(0.87 ± 0.29 vs 0.23 ± 0.14 , $P < 0.05$)和 VEGF(0.89 ± 0.23 vs 0.34 ± 0.21 , $P < 0.05$)相对表达量均显著高于癌旁组织。MIF 和 VEGF 表达水平在不同年龄、性别组间无显著差异,而在不同分化程度和 TNM 临床分期组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**MIF 和 VEGF 在胃癌组织中呈高表达,且可能与胃癌的分化程度和 TNM 临床分期有关。

[关键词] 胃癌;巨噬细胞移动抑制因子;血管内皮细胞生成因子;生物标志

[中图分类号] R735.2; R730.23

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0455-04

Expression and clinical significance of macrophage migration inhibitory factor and VEGF in human gastric carcinoma tissues

Fu Dongmei¹, Li Lifang², Kang Yuhua¹ (1. Department of Digestion, Henan University-Affiliated Huaihe Hospital, Kaifeng 475000, He'nan, China; 2. Department of General Surgery, Henan University-Affiliated Huaihe Hospital, Kaifeng 475000, He'nan, China)

[Abstract] **Objective:**To determine the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric carcinoma in association with clinicopathological features of the carcinoma lesions. **Methods:** Eighty-nine tumor tissue specimens were collected between 2008 and 2013 and four pairs of tumor tissue and corresponding adjacent tissue specimens were collected in 2013 from patients who were diagnosed with gastric carcinoma in Henan University-Affiliated Hospital. Contents of MIF and VEGF proteins in gastric carcinoma and adjacent tissue specimens were assessed by immunohistochemical staining and Western blotting. The correlation of MIF and VEGF levels with clinicopathological features of gastric carcinoma was analyzed by statistical analysis. **Results:** MIF and VEGF were detected in 88.8% and 50.6% of gastric carcinoma respectively, but were undetectable in normal tissue specimens. In the four tissue pairs, gastric carcinoma tissue had significantly higher levels of MIF (0.87 ± 0.29 vs 0.23 ± 0.14 , $P < 0.05$) and VEGF (0.89 ± 0.23 vs 0.34 ± 0.21 , $P < 0.05$) compared with the corresponding adjacent tissue. The expression of MIF and VEGF was not associated with age and sex but was positively correlated with the histological grade and TNM stage of gastric carcinoma ($P < 0.05$). **Conclusion:** MIF and VEGF are highly expressed in gastric cancer and the expression level is correlated with the cancer staging.

[Key words] gastric cancer; macrophage migration inhibitory factor (MIF); VEGF; biomarker

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 455-480]

[作者简介] 付东梅(1983-),女,硕士生,主要从事消化系统疾病的基础与临床研究, E-mail: fdm_20009@126.com

[通信作者] 康玉华(Kang Yuhua, corresponding author), E-mail: flw_20009@126.com

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率居全球第二位,在中国胃癌居常见肿瘤的第三位,平均年病死率约0.016%^[1]。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)与炎症和免疫反应有关,在细胞生长和分化中起重要作用,包括肿瘤发生、创伤修复、胚胎发育等^[2-3]。除此之外,研究^[4-5]也证实,MIF在多种肿瘤中高表达,包括前列腺癌、结肠癌、乳腺癌等,而与其紧邻的非癌细胞中MIF表达无明显增加,并且其表达与肿瘤预后相关。VEGF是调节肿瘤组织血管形成的重要分子,并成为肿瘤发生发展及治疗中的研究热点^[6-7]。然而,MIF和VEGF在胃癌中的表达情况尚不清楚,本研究通过检测胃癌组织中的MIF和VEGF的表达,探讨其与胃癌临床病理特征的相关性,为胃癌的研究积累更多资料。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌组织标本来源于河南大学淮河医院2008-2013年普通外科手术病例89例,均经病理检验证实为胃癌,术前均未经任何治疗。其中包括54名男性、35名女性,年龄范围28~78岁(中位年龄59岁);其中高分化21例、中分化42例、低分化26例;根据国际胃癌TNM临床分期标准(UICC,1987),其中I期26例、II期19例、III期28例、IV期16例。另收集河南大学淮河医院2013年手术切除的新鲜胃癌及癌旁标本4对,癌旁组织至少距离肿瘤距离2.5 cm以上。组织离体后立即放置-80℃冰箱中低温保存。所有病例术前均未接受放化疗。

1.2 免疫组织化学方法检测MIF、VEGF在胃癌及癌旁组织中的表达

89例胃癌组织经10%多聚甲醛固定,石蜡包埋,制成4~5 μm连续切片,经烘干、脱蜡、修复,2%羊血清封闭20 min。加入2% BSA稀释的一抗(MIF鼠源性抗体,1:120;VEGF鼠源性抗体,1:150),4℃孵育过夜,加入生物素化二抗(羊抗鼠IgG抗体,1:200)孵育1 h。经DAB显色、苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明后中性树胶封片。以PBS替代一抗作为阴性对照,已知阳性切片作为阳性对照。由两位病理科医师分别双盲阅片。结果判定标准:MIF、VEGF以细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。首先根据全部组织中肿瘤细胞染色的阳性细胞所占总细胞的比例进行评分。每例切片随机选取10个高倍视野进行结果判定。按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比综合计分。染

色强度:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞数:小于总数的10%为0分,10%~25%为1分,26%~50%为2分,>50%为3分。染色强度得分与阳性细胞数得分相乘:0~3分为阴性,>3分为阳性。

1.3 Western blotting检测MIF、VEGF在胃癌、癌旁组织中的表达

选取临床分期I~IV期胃癌及其癌旁组织各4对,共8例。取200 mg组织,提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,取50 μg蛋白样品经15% SDS-PAGE后转印至PVDF膜。5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入MIF和VEGF一抗(鼠源性,1:1 000),室温孵育2 h或4℃过夜。洗涤后加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(1:2 000)室温孵育1 h。ECL化学发光试剂盒显影。以β-actin为内参,应用Image Master 8.0软件计算MIF和VEGF与β-actin条带灰度的比值进行定量分析。

1.4 统计学处理

采用SPSS17.0软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间计量资料的比较用两样本 t 检验,多组间计量资料的比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)。MIF和VEGF的表达与临床病例资料之间关系的分析采用卡方检验、四格表确切概率法和Spearman等级相关分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIF和VEGF在低分化胃癌组织中高表达

免疫组织化学方法检测结果(图1)显示,MIF和VEGF两者者在胃癌组织中的阳性表达率分别是88.8%和50.6%,MIF着色主要位于细胞膜和细胞质,VEGF着色位于细胞质,两者在胃正常上皮、高分化胃癌中表达较低,而在低分化胃癌组织中表达最高。

2.2 MIF和VEGF蛋白在胃癌组织中高表达

Western blotting检测结果(图2)显示,MIF(0.87 ± 0.29 vs 0.23 ± 0.14 , $P < 0.05$)、VEGF(0.89 ± 0.23 vs 0.34 ± 0.21 , $P < 0.05$)蛋白在胃癌组织中的表达均显著高于癌旁组织。

2.3 MIF和VEGF蛋白表达与临床病理特征的关系

分析MIF和VEGF与各临床特征相关性(表1)发现,两者表达在不同年龄、性别组间无显著差异,而在不同胃癌组织的分化程度和TNM临床分期组间有显著差异($P < 0.05$)。

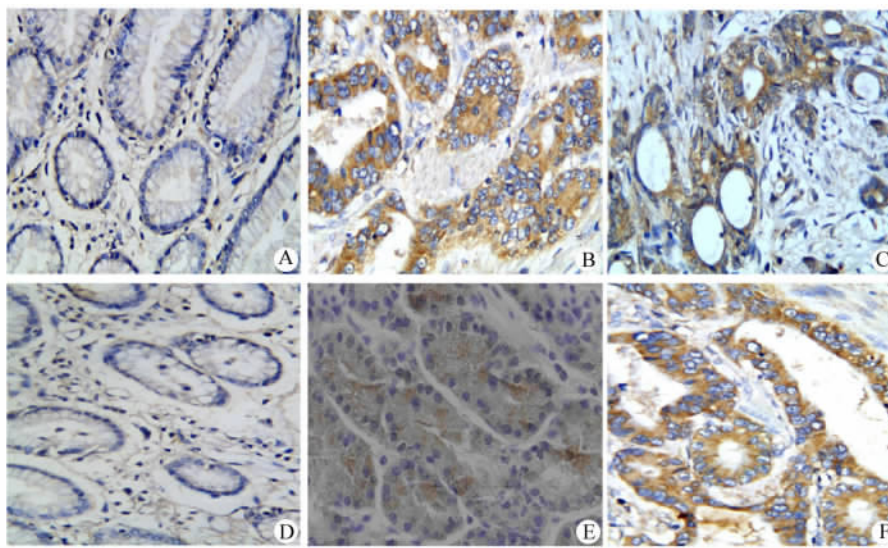


图 1 MIF 和 VEGF 在胃上皮细胞及胃癌组织中的表达情况(×400)

Fig. 1 Expression of MIF and VEGF in gastric epithelial cells and gastric cancer tissues(×400)

A: MIF expression in gastric epithelium; B: MIF epithelial cells in well-differentiated gastric cancer; C: MIF expression in poorly-differentiated gastric cancer; D: VEGF expression in gastric epithelium; E: VEGF expression in poorly-differentiated gastric cancer; F: VEGF expression in well-differentiated gastric cancer

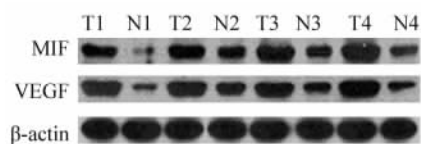


图 2 MIF、VEGF 蛋白在胃癌组织中的表达高于癌旁组织

Fig. 2 Expressions of MIF and VEGF in gastric cancer tissues were higher than them in the adjacent tissues

(T: Tumor tissues; N: Tumor-adjacent tissues)

3 讨论

MIF 于 20 世纪 60 年代被发现^[8],因其能够抑制巨噬细胞向血管外游走而得名,是一种来源于 T 淋巴细胞的细胞因子。长期以来,认为 MIF 仅在炎症反应中起作用,直到 20 世纪 90 年代中后期才开始研究 MIF 在肿瘤发展和演变过程中的作用。MIF 主要由间质巨噬细胞和炎症 T 细胞分泌,同时肿瘤细胞也可分泌,巨噬细胞通常聚集在肿瘤浸润区域邻近的间质组织中,而肿瘤细胞和巨噬细胞的相互作用可导致细胞外基质降解酶的产生,促进血管生成反应,这两种反应可促进癌细胞的浸润和转移^[9-11]。MIF 可能是炎症反应与肿瘤发生的纽带,在肿瘤发生发展的过程中发挥着重要作用。MIF 促

进细胞增殖,用抗体或基因沉默/敲除阻断 MIF 可导致细胞增殖减慢,抑制肿瘤生长和血管生成,间接影响肿瘤的生长和发展进程。VEGF 是特异性作用于血管内皮细胞的血管生成因子,是 Ferrara^[12-13]从牛垂体滤泡星状纯化分离到的一种肝素结合因子,主要促进内皮细胞的增殖,诱导新生血管形成。在恶性肿瘤中常过量表达,约 50% 的人类肿瘤细胞可引检测到 VEGF^[14],其表达水平与肿瘤的微血管密度成正相关^[15-17],VEGF 表达的高低在一定程度上代表了肿瘤组织血管生成的能力,同时也代表了肿瘤生长和浸润的能力^[18-20]。

本研究通过检测 MIF 和 VEGF 在胃癌及其癌旁组织中的表达情况发现,MIF 和 VEGF 在胃癌中的表达率分别为 88.8% 和 50.6%,而在癌旁组织中均低表达,表明 MIF 和 VEGF 可能是胃癌演变多阶段演进过程中的重要变化分子之一。通过对正常粘膜组、高分化组、中分化组和低分化胃癌组的 MIF 和 VEGF 蛋白的免疫组织化学检测发现:不同病理分期的患者各组间 MIF 和 VEGF 表达均有显著差异($P < 0.05$)。而且随着胃部由正常粘膜向浸润性胃癌不断演化,MIF 和 VEGF 浓度和蛋白表达也升高和增强。这说明 MIF 和 VEGF 在胃癌的演变过程中占有重要地位,如果在胃的癌前病变期中采用 MIF 和 VEGF 抗体或者利用基因干扰技术对其进行

扰,也许能够延缓或者阻止肿瘤进程。由此推测,检测血清 MIF 和 VEGF 浓度可以对早期胃癌具有一定的预警作用,且检测方法方便快捷。因此,MIF 和 VEGF 很有潜力作为胃癌分子诊断的生物标志,值得进一步研究。

表 1 MIF 和 VEGF 表达与胃癌临床病理特征的关系
Tab. 1 Relationship between MIF and VEGF expression and clinicopathological features of gastric cancer

Feature	MIF		P	VEGF		P
	(-)	(+)		(-)	(+)	
Gender						
Men	6	48		27	27	
Women	4	31	0.963	17	18	0.895
Age (t/a)						
<50	2	13		8	7	
50~70	7	55	0.825	30	32	0.731
>70	1	11	0.681	6	6	0.919
Tumor differentiation						
Low	1	25		6	20	0.010
Middle	11	31*	0.019	23	19*	
High	8	13*	0.003	15	6*	0.000
TNM						
I	8	18	18	8		
II	1	18 [△]	0.035	10	9	0.257
III	1	27 [△]	0.007	11	17 [△]	0.027
IV	0	16 [△]	0.014	5	11 [△]	0.016

* P < 0.05 vs low differentiation group;

[△] P < 0.05 vs TNM I group

[参 考 文 献]

[1] 叶任高, 陆再英, 谢毅, 等. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 393.
 [2] He XX, Chen K, Yang J, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer [J]. Mol Med 2009, 15(1/2): 1-10.
 [3] Vasseur S, Afzal S, Tomasini R, et al. Consequences of DJ-1 up-regulation following p53 loss and cell transformation [J]. Oncogene, 2012, 31(5): 664-670.
 [4] 郑伟, 王家富, 黄庆玉. 巨噬细胞移动抑制因子与肿瘤关系的研究进展 [J]. 泰山医学院学报, 2005, 26(2): 178-180.
 [5] Wu W, Juan W, Liang C, et al. S100A9, GIF and AAT as potential combinatorial biomarkers in gastric cancer diagnosis and prognosis [J]. Proteomics Clin Appl, 2012, 6(3/4): 152-162.
 [6] Chen Q, Wang Z, Zhang K, et al. Correction: VEGF sterin con-

fers gemcitabine resistance in pancreatic cancer [J]. World J Surg Oncol, 2013, 54(10): 6724-6734.
 [7] Fu Y, Lai Y, Wang Q, et al. Overexpression of VEGF sterin promotes angiogenesis via the vascular endothelial growth factor in primary ovarian cancer [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6): 1726-1732.
 [8] Cao M, Yie S, Liu J, et al. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer [J]. Tissue Antigen, 2011, 78(2): 120-128.
 [9] Cohen M, Yossef R, Erez T, et al. Serum apolipoproteins C-I and C-III are reduced in stomach cancer patients: Results from MALDI-based peptidome and immuno-based clinical assays [J]. PLoS ONE, 2011, 6(1): e14540.
 [10] Guo Y, Hou J, Luo Y, et al. Functional disruption of macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppresses proliferation of human H460 lung cancer cells by caspase-dependent apoptosis [J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 28-37.
 [11] Yamashita K, Sakuramoto S, Watanabe M. Genomic and epigenetic profiles of gastric cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications [J]. Surg Today, 2011, 41(1): 24-38.
 [12] 胡可可, 陈晓琼, 邓赫男, 等. 巨噬细胞移动抑制因子和血管内皮生长因子在宫颈癌中的表达及意义 [J]. 现代医药卫生, 2010, 26(7): 970-975.
 [13] Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(12): 1785-1788.
 [14] Los M, Voest EE, Borel IH. VEGF as a target of therapy in gastrointestinal oncology [J]. Dig Surg, 2005, 22(4): 262-293.
 [15] Aoyagi K, Kouhiji K, Yano S, et al. VEGF significance in peritoneal recurrence from gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 2005, 8(3): 155-163.
 [16] Shida A, Fujioka S, Ishibashi Y, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma [J]. World J Surg, 2005, 29(12): 1600-1607.
 [17] Siegel R, Ward E, Jemal A. Cancer statistics 2011 [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(4): 212-236.
 [18] Kim C, Lee JL, Ryu MH, et al. A prospective phase II study of cetuximab in combination with XELOX (capecitabine and oxaliplatin) in patients with metastatic and/or recurrent advanced gastric cancer [J]. Invest New Drugs, 2011, 29(2): 366-373.
 [19] Enzinger PC, Burtness B, Hollis D, et al. CALGB 80403/ECOG 1206: A randomized phase II study of three standard chemotherapy regimens (ECF, IC, FOLFOX) plus cetuximab in metastatic esophageal and GE junction cancer [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(15 Suppl): 4006.
 [20] Xiaolei W, Ximei C, Changqing Y, et al. Overexpression of both VEGF-A and VEGF-C in gastric cancer correlates with prognosis, and silencing of both is effective to inhibit cancer growth [J]. Int J Clin Pathol, 2013, 6(4): 586-597.

[收稿日期] 2014 - 03 - 11 [修回日期] 2014 - 07 - 01

[本文编辑] 黄静怡