论著

文章编号:1000-5404(2007)14-1416-03

VEGF和抑癌基因maspin在胃癌组织中的表达及意义

梁启廉,陈小东,王三明,李建文,黄 冰,郑朝晖,陈雪松 (广东医学院附属医院,广东医学院第一临床学院肿瘤中心,湛江 524001)

提 要:目的 观察血管内皮生长因子(VEGF)和抑癌基因maspin在胃癌组织中的表达情况,研究它们与胃癌临床特征的关系。**方法** 应用免疫组化法检测102例胃癌患者手术切除的癌组织和癌周正常组织中VEGF和maspin表达水平。**结果** VEGF在正常胃组织中未见表达,在胃癌组织中的表达率为50.0%,两者比较差异有显著性意义($P<0.01$)。maspin在正常胃组织中表达率为87.3%,在胃癌组织中的表达率为52.0%,两者比较差异有显著性意义($P<0.01$)。VEGF蛋白表达水平与胃癌浆膜浸润、TNM分期、淋巴结转移、5年生存率有关($P<0.05$),maspin蛋白表达水平与胃癌浆膜浸润、淋巴结转移、5年生存率有关($P<0.05$)。**结论** 同时检测胃癌组织中VEGF与maspin表达水平,对判断胃癌浸润转移潜能及评估患者预后有一定参考价值。

关键词: 血管内皮生长因子;maspin;胃肿瘤;免疫组织化学

中图法分类号: R735.2;R730.2 **文献标识码:** A

Expression of vascular endothelial growth factor and maspin in gastric carcinoma

LIANG Qi-lian, CHEN Xiao-dong, WANG San-ming, LI Jian-wen, HUANG Bing, ZHENG Zhao-hui, CHEN Xue-song (Department of Medical Oncology, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: Objective To study the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and maspin in gastric carcinoma and their relation to the clinicopathological features. **Methods** VEGF protein and maspin protein expression in 102 cases of human gastric carcinoma tissues and normal tissues around the foci were examined by immunohistochemical method (Envision). **Results** The overexpression rate of VEGF protein was 50.0% (51/102) in gastric carcinoma tissues and 0.0% (0/102) in normal tissues ($P<0.01$); as for maspin, the overexpression rate of maspin protein was 52.0% (53/102) in gastric carcinoma tissues and 87.3% (89/102) in normal tissues ($P<0.01$). The VEGF expressions were related to serosa invasion, TNM staging, lymph node metastasis and 5-year survival rate ($P<0.05$). There was a close relation of maspin expression with serosa invasion, lymph node metastasis and 5-year survival rate ($P<0.05$). **Conclusion** Detecting the protein levels of VEGF and maspin simultaneously in gastric carcinoma provide certain reference value in judging invasion and metastasis potential and evaluating the prognosis.

Key words: vascular endothelial growth factor; maspin; gastric carcinoma; immunohistochemical method

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,胃癌的形成和转移与其他恶性肿瘤一样是多因子、多基因共同作用的结果。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现最重要的血管生长因子[1],它与恶性肿瘤患者预后是近年的研究热点。maspin是近年发现的一种新抑癌基因,在人类某些肿瘤发生发展中起重要作用[2]。我们采用免疫组化方法检测VEGF和maspin蛋白在胃癌中的表达,探讨两者与胃癌生物学行为的关系。

1 材料与方法

1.1 材料来源

收集广东医学院附属医院1997年1月至2002年12月病理科归档的病历资料完整的102例胃癌组织标本,按全国胃癌协作组病理规范进行病理诊断和分级。在研究中,将胃癌按分化程度分为两型:分化型包括乳头状腺癌和管状腺癌,未分化型包括低分化腺癌、黏液细胞癌和印戒细胞癌,所有患者术前均未行化疗或放疗。同时取癌旁非肿瘤的正常组织石蜡标本为对照。

1.2 主要试剂

抗VEGF鼠源单克隆一抗购自福州迈新试剂公司;鼠抗人maspin即用型单克隆一抗(MS-1767-R7)购自美国Neomaker公司,Envision免疫组织化学试剂盒购于丹麦Dako公司。

作者简介:梁启廉(1967-),男,广东省湛江市人,副主任医师,副教授,主要从事消化系恶性肿瘤的基础和临床方面的研究,发表论文30余篇。电话:(0759)2387456,E-mail:lianqilian@gdmc.edu.cn

收稿日期:2006-05-30;修回日期:2006-12-04

1.3　方法

1.3.1　病理检查　　所有标本均经 10% 甲醛固定，常规石蜡包埋切片，HE 染色供病理观察。

1.3.2　免疫组化检测　　石蜡包埋组织以 4 μm 厚度连续切片，常规脱蜡至水，切片浸于 50 mmol/L（pH 8.0）乙二胺四乙酸溶液中，微波抗原修复 10 min，冷却至室温，充分水洗，PBS 浸洗，滴加正常山羊血清封闭液，室温 20 min；甩去多余液体，不洗，加入 VEGF 单抗或 maspin 单抗 4 ℃过夜；PBS 洗；滴加 S-P 9000 通用型生物素标记二抗，37 ℃，40 min；DAB 显色30 s，苏木精复染，系列乙醇脱水、透明、中性树胶封固。DAB 显色液配制：取 DAB 5 mg 溶于 100 ml 0.05 mol/L Tris-Hcl（pH 7.6）中，加入 30% 过氧化氢 10 μl，搅拌混匀后过滤（用前新鲜配制）；对照设置：正常小鼠血清代替一抗作替代对照，PBS 作空白对照。

1.3.3　阳性结果判定和图像分析　　对于 VEGF，在光镜下有棕黄色颗粒反应出现在细胞膜、细胞质中均为阳性反应细胞，高倍镜下阳性细胞数占视野 10% 以下为阴性；高倍镜下阳性细胞数占视野 10% 以上为有意义，计为阳性。对于 maspin，在光镜下有棕黄色颗粒反应出现在细胞质或细胞质与细胞核中为阳性反应细胞，高倍镜下阳性细胞数占视野 20% 以下为阴性；高倍镜下阳性细胞数占视野 20% 以上为有意义，计为阳性。

1.4　统计学处理

采用简明统计分析软件行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　VEGF 和 maspin 蛋白在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达情况

VEGF 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率为 50.0%（51/102），在癌旁正常组织中的阳性表达率为 0.0%（0/102），两者比较有显著性差异（$\chi^2=68.0$，$P<0.01$）；maspin 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率为 52.0%（53/102），在癌旁正常组织中的阳性表达率为 87.3%（89/102），两者比较有显著性差异（$\chi^2=30.0$，$P<0.01$）。

2.2　VEGF 蛋白在胃癌组织中的表达与临床病理因素的关系

结果表明 maspin 蛋白表达水平与浆膜浸润、TNM 分期、淋巴结转移有关（$P<0.05$），见表 1。

2.3　maspin 蛋白在胃癌组织中的表达与临床病理因素的关系

结果表明 maspin 蛋白表达水平与将膜浸润、淋巴结转移有关（$P<0.05$），见表 1。

表 1　VEGF 蛋白和 maspin 蛋白表达水平与胃癌临床病理因素的关系

项目	例数	VEGF 蛋白表达					maspin 蛋白表达				
		VEGF 蛋白表达（例）		阳性率（%）	χ^2	P	maspin 蛋白表达（例）		阳性率（%）	χ^2	P
		阴性	阳性				阴性	阳性			
年龄					0.63	0.43				0.00	0.99
≤55 岁	52	28	24	46.2			25	27	51.9		
>55 岁	50	23	27	54.0			24	26	52.0		
性别					0.05	0.83				0.05	0.83
女	33	17	16	48.5			15	18	54.5		
男	69	34	35	50.7			34	35	50.7		
部位					0.38	0.83				0.04	0.98
贲门	22	12	10	45.5			11	11	50.0		
胃体	23	12	11	47.8			11	12	52.2		
胃窦	57	27	30	52.6			27	30	52.6		
Borrmann 类型					0.04	0.83				0.01	0.94
Ⅰ、Ⅱ	35	18	17	48.6			17	18	51.4		
Ⅲ、Ⅳ	67	33	34	50.7			32	35	52.2		
肿瘤最大径					0.16	0.69				0.18	0.67
≤4.0 cm	54	28	26	48.1			27	27	50.0		
>4.0 cm	48	23	25	52.1			22	26	54.2		
组织学类型					2.13	0.14				1.38	0.24
分化型	35	14	21	60.0			14	21	60.0		
未分化型	67	37	30	44.8			35	32	47.8		
浆膜浸润					6.79	0.01				6.48	0.01
无	59	36	23	39.0			22	37	67.7		
有	43	15	28	65.1			27	16	37.2		
TNM 分期					14.52	0.00				0.72	0.87
Ⅰ	37	25	12	32.4			16	21	56.8		
Ⅱ	17	11	6	35.3			8	9	52.9		
Ⅲ	20	4	16	80.0			10	10	50.0		
Ⅳ	28	11	17	60.7			15	13	46.4		
淋巴结转移					10.36	0.00				6.19	0.01
无	42	29	13	31.0			14	28	66.7		
有	60	22	38	63.3			35	25	41.7		

2.4 VEGF 和 maspin 蛋白表达与胃癌患者预后的关系

102 例胃癌患者中有随访资料的 93 例,5 年生存率:Ⅰ期为 82.7%,Ⅱ期为 51.8%,Ⅲ期为 13.7%,Ⅳ期为 1.3%。VEGF 表达阴性的患者 5 年生存率 63.4% 明显高于 VEGF 表达阳性的患者 31.2%,有显著性差异($\chi^2 = 19.4$, $P < 0.05$)。maspin 表达阳性的患者 5 年生存率(64.5%)明显高于 maspin 表达阴性的患者(34.4%),有显著性差异($\chi^2 = 16.9$, $P < 0.05$)。

3 讨论

血管生成是许多器官正常或疾病状态下极其重要的生理过程,侵袭性肿瘤的生长和转移依赖于肿瘤的血管生成,促血管生成和抗血管生成因子的局部平衡是肿瘤生长过程肿的"血管生成开关",此种平衡一旦打乱,则使肿瘤获得生长和转移的能力。血管内皮生长因子(VEGF)是 Ferrara 等从牛垂体滤泡细胞培养液中分离出的一种高度特异性促血管内皮细胞有丝分裂的生长因子,血管内皮生长因子是目前所知的作用最强、特异性最高的促血管生成因子,比组胺作用强 50 000 倍,在肿瘤血管生成过程中发挥核心作用,它是相对分子质量为 $(34 \sim 45) \times 10^3$ 的高度糖基化碱性蛋白,由相对分子质量为 $(17 \sim 22) \times 10^3$ 的同源双聚体构成;VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,其主要生物学功能[3]:①刺激血管生成;②促进内皮细胞的增生和迁移;③增加血管尤其是微小血管的渗透性,使血浆大分子外渗沉积在血管外基质中,为肿瘤细胞的生长和新生毛细血管网的建立提供营养;④促进某些蛋白水解酶的作用使基质降解。以上作用均有助于肿瘤的血管形成、浸润与转移。多数实体瘤均过度表达 VEGF,在某些肿瘤中已将其作为一种新的肿瘤标志物,与其他实体肿瘤一样,胃癌的发生、发展也与肿瘤血管生成有关。Saito 等[4]研究提示 VEGF 表达阳性的胃癌患者的 5 年生存率为 33.0%,而 VEGF 表达阴性的胃癌患者的 5 年生存率为 67.6%,且经多因素分析提示 VEGF 为一独立的预后因素。

本组结果表明 VEGF 在胃癌的肿瘤组织中的表达明显高于正常组织,且在肿瘤组织中 VEGF 蛋白表达强度与浆膜浸润、TNM 分期、淋巴结转移、5 年生存率等相关,提示 VEGF 可作为考量肿瘤侵袭转移能力、反映胃癌生物学行为的一个重要指标。

maspin(mammary-serpin)基因是 1994 年发现的一种新的丝氨酸蛋白酶抑制剂[5];Shi 等[6]用质粒和反转录病毒转染乳腺癌 TM40D 细胞株使 maspin 表达上调时,结果显示出 maspin 具有抑制肿瘤细胞生长和转移的作用;Sopel 等[7]研究表明 maspin 具有能调节细胞凋亡、移动和血管生成等生物学功能。大量研究表明,maspin 在肿瘤浸润转移的各个环节中起着重要的作用;最近的研究表明 maspin 还可以通过调节小 G 蛋白 Rac1 和 PAK1(p21-活性激酶)的活性来抑制细胞的运动,通过磷酰肌醇-3 激酶(PI3K)和细胞外信号调节激酶(ERK)途径来调节细胞的黏附[8];Maass 等[9]用采用 RT-PCR 方法检测 45 例原发性乳腺癌 maspin 的表达,阳性率为 64%(29/45),但确诊后 3 年内有远处转移的 8 例患者中,有 6 例无 maspin 的表达($P < 0.05$)。因此,maspin 作用肿瘤侵袭和转移潜能的抑制因子在乳腺癌中表达的缺失可作为远处转移和预后的预测。

本组结果显示 maspin 在胃癌肿瘤组织中的表达强度明显减低,明显低于正常组织,且在肿瘤组织中 maspin 蛋白表达强度与浆膜浸润、淋巴结转移、5 年生存率相关。上述结果表明 VEGF 和 maspin 表达与胃癌的生物学行为有关,可作为判断胃癌浸润转移潜能和预后的参考指标。

参考文献:

[1] 于冬梅,阎晓初,郭德玉,等. VEGF 和 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2180-2182.

[2] 阎 雄,姚榛祥. maspin/pEFTPRES2N 表达载体的构建及应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22): 2205-2208.

[3] Tammetla T, Enholm B, Alitalo K, *et al*. The biology of vascular endothelial growth factor[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(3): 550-563.

[4] Saito H, Tsujitani S, Kondo A, *et al*. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with hematogenous recurrence in gastric carcinoma[J]. Surgery, 1999, 125(2): 195-201.

[5] Cao D, Wilentz R E, Abbruzzese J L, *et al*. Aberrant expression of maspin in idiopathic inflammatory bowel disease is associated with disease activity and neoplastic transformation[J]. Int J Gastrointest Cancer, 2005, 36(1): 39-46.

[6] Shi H Y, Zhang W, Liang R, *et al*. Modeling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm[J]. Histol Histopathol, 2003, 18(1): 201-206.

[7] Sopel M, Kasprzyk I, Berdowska I. Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2005, 43(2): 109-116.

[8] Odero-Marah V A, Khalkhali-Ellis Z, Chunthapong J, *et al*. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2003, 2(4): 398-403.

[9] Maass N, Hojo T, Rosel F, *et al*. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis[J]. Clin Biochem, 2001, 34(4): 303-307.

(编辑 王 红)