论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0434-04

肝素酶、bFGF在卵巢癌中的表达及与其血管生成的关系

韩 静[1],张 浩[2],杨 鹰[1],连 艳[1] (第三军医大学:[1]新桥医院妇产科,重庆 400037,[2]西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨肝素酶(heparanase,Hpa)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)在卵巢癌组织中的表达及与卵巢癌血管生成的关系。**方法** 采用免疫组化S-P法检测41例卵巢癌组织中Hpa、bFGF蛋白的表达同时对其微血管CD34进行染色,计数卵巢癌中的微血管MVD(microvessel density)。**结果** ①Hpa蛋白在卵巢癌组织中表达率增高并与卵巢癌中的微血管MVD及bFGF蛋白的表达成正相关($r=0.351$, $P<0.05$; $r=0.420$, $P<0.05$);②卵巢癌组织中bFGF阳性表达组MVD值高于bFGF阴性表达组;③卵巢癌组织中Hpa、bFGF均表达阳性组的MVD值高于其他组。④Hpa、bFGF及MVD的表达与卵巢癌的FIGO(2000)分期、分化程度有关。**结论** Hpa在卵巢癌组织中表达增高,并且与bFGF的表达及卵巢癌的血管生成正相关,Hpa可能通过释放和激活bFGF来促进血管生成,进而促进卵巢癌细胞的生长、浸润和转移过程。

关键词: 卵巢癌;免疫组化;肝素酶;碱性成纤维细胞生长因子

中图法分类号: R730.23; R737.31 **文献标识码:** A

Relationship of heparanase and bFGF expressions with angiogenesis in human ovarian carcinoma: report of 41 cases

HAN Jing[1], ZHANG Hao[2], YANG Ying[1], LIAN Yan[1] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of heparanase (Hpa) and basic fibroblast growth factor (bFGF) as well as their relationship with angiogenesis in human ovarian carcinoma. **Methods** Forty-one ovarian carcinoma specimens resected from the patients diagnosed with ovarian carcinoma from January 2003 to November 2007 were examined by immunohistochemistry for the expressions of Hpa and bFGF and microvessel density (MVD). **Results** Hpa highly expressed in ovarian carcinoma, and its expression was positively correlated with MVD and bFGF expression ($r=0.351$, $P<0.05$; $r=0.420$, $P<0.05$). In ovarian carcinoma specimens, MVD of bFGF-positive specimens was higher than that of bFGF-negative ones ($P<0.05$), and MVD of both Hpa-positive and bFGF-positive specimens was higher than that of other specimens ($P<0.05$). The expressions of Hpa and bFGF as well as MVD were significantly higher in FIGO stage Ⅲ and Ⅳ than those in stage Ⅰ and Ⅱ ($P<0.05$), and were significantly higher in poorly differentiated ovarian carcinoma specimens than those in moderately-highly differentiated ones ($P<0.05$). **Conclusion** Hpa highly expresses in human ovarian carcinoma and has a positive correlation with bFGF expression and ovarian carcinoma angiogenesis. High expression of Hpa in ovarian carcinoma tissues contributes to tumor angiogenesis, and the coexpression of Hpa and bFGF may play complementary biological role in tumor angiogenesis and tumor invasion and metastasis.

Key words: ovarian cancer; immunohistochemistry; heparanase; basic fibroblast growth factor

恶性肿瘤的无限制侵袭性生长及其转移依赖于血管生成(angiogenesis),目前研究表明肝素酶(heparanase,Hpa)的高表达可以明显促进肿瘤组织的血管生成能力,Hpa通过作用于内皮细胞的方式直接促进血管生成,还通过促进bFGF活性的方式间接诱发血管生成反应[1]。本研究对41例卵巢癌中的bFGF及其微血管密度(microvessel density,MVD)进行检测,并结合卵巢癌的临床病理特征,初步探讨卵巢癌中Hpa促肿瘤血管生成的机制。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取2003年1月至2007年11月在第三军医大学西南医院、新桥医院、大坪医院手术切除的卵巢癌组织标本41例,其

作者简介:韩 静,女,河北省唐山市人,硕士,主治医师,主要从事妇科肿瘤发生机制方面的研究,发表论文6篇。E-mail:side001@163.com

通信作者:杨 鹰,电话:(023)68755612

收稿日期:2008-06-13;修回日期:2008-06-28

中浆液性囊腺癌 22 例、黏液性囊腺癌 10 例,其他 9 例。所有病例均经病理学确诊,手术前均未接受化疗及放疗。选取同期正常卵巢组织(取自卵巢浆液性囊肿周边的正常卵巢组织)10 例作为对照。所有标本均制成蜡块进行实验。

1.2　实验材料

山羊抗人 Hpa 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;兔抗人 bFGF 多克隆抗体工作液(RAB-0305)购自福州迈新生物技术有限公司;鼠抗人原始造血细胞单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。免疫组化试剂盒 S-P-9001、S-P-9002 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3　实验方法

1.3.1　免疫组化方法　　Hpa 蛋白的检测采用免疫组化 S-P 法,实验步骤按试剂盒说明书进行:切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭,0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH = 6.0)中微波修复 20 min,Hpa 多克隆抗体按 1∶50 稀释孵育,4 ℃过夜;DAB 显色,苏木精复染,中性树胶封片。恶性黑色素瘤(胆囊)标本作为阳性对照。PBS 替代一抗作空白对照。阳性细胞判定标准:以细胞浆和/或细胞膜中出现棕黄色颗粒为 Hpa 阳性显色:即无着色为(－);阳性染色弱,阳性范围 < 癌组织面积 50% 者判定为(＋);染色弱,阳性范围 > 50% 者判定为(＋＋);染色强,阳性范围 < 50% 者判定为(＋＋＋);染色强,阳性范围≥50% 者判定为(＋＋＋＋)。并将染色强度为(＋)~(＋＋)为弱阳性;(＋＋＋)~(＋＋＋＋)划为强阳性;(－)为阴性。

1.3.2　卵巢癌组织 bFGF 免疫组化染色　　染色方法同上。所用一抗为兔抗人 bFGF 多克隆抗体工作液;以已知 bFGF 阳性的大肠癌标本为阳性对照,以 PBS 代替一抗为阴性对照。阳性细胞判定标准:以肿瘤细胞细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性。阳性判断标准及定量测定同上。

1.3.3　卵巢癌组织微血管免疫组化染色　　染色方法同上。所用一抗为鼠抗人 CD34 单克隆抗体,1∶100 稀释;以已知 CD34 阳性的卵巢癌标本为阳性对照,以 PBS 代替一抗为阴性对照。MVD 计数:先用 100 倍光镜扫视整个切片,寻找高血管密度区,然后在此区域内以 400 倍光镜取 3 个视野计数染成棕黄色(阳性部位在血管内皮细胞)的微血管数目 MVD,结果以其平均值表示。选取的平均血管直径大于 7 μm 且小于 200 μm。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计分析,对各组 Hpa 表达阳性率进行 χ^2 检验,对各组 MVD 进行 t 检验、对 Hpa 表达、bFGF 表达和 MVD 之间相关性进行相关性分析,对不同组织学类型之间的 Hpa、bFGF 表达和 MVD 比较采用方差分析,取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2　结果

2.1　免疫组化结果

Hpa 蛋白主要在卵巢癌细胞细胞质内表达,在部分血管内皮细胞内也有表达(图 1)。41 例患者中 Hpa 蛋白表达呈阳性者 33 例,呈阴性者 8 例,阳性率为 80.48%。在 10 例正常卵巢组织中只有一例呈弱阳性表达,主要表达在血管内皮细胞细胞质中,阳性率为 10.00%。Hpa 蛋白在卵巢癌和正常卵巢组织中的表达有显著性差异($P < 0.01$)。

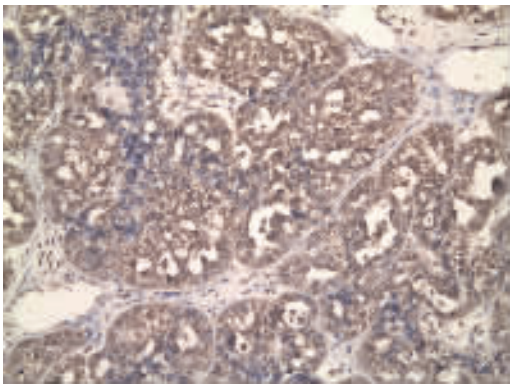


图 1　Hpa 在卵巢癌中的表达　(S-P ×200)

2.2　Hpa 蛋白阳性表达与 MVD 的相关性分析

卵巢癌病例中,33 例 Hpa 蛋白阳性表达与 MVD(图 2)的相关性分析,结果 Hpa 蛋白的表达与 MVD 呈正相关($r = 0.351$, $P < 0.05$)。

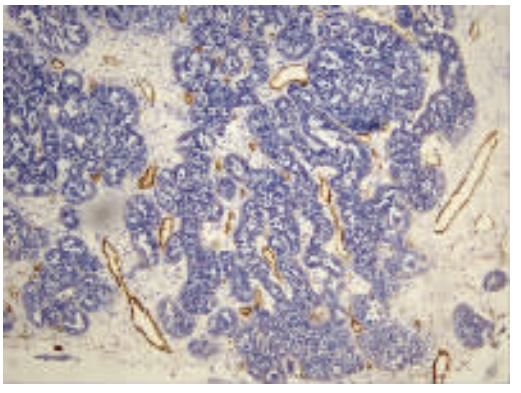


图 2　卵巢癌中血管的形态学观察　(S-P ×200)

2.3　bFGF 蛋白阳性表达与 MVD 的相关性分析

卵巢癌组织中 bFGF 阳性 28 例(28/41),bFGF 阳性部位主要在肿瘤细胞细胞质中(图 3),bFGF 阳性表达组 MVD 值高于 bFGF 阴性表达组 MVD 值(77.01 ±67.43 *vs* 39.76 ±47.17)($P < 0.05$)。

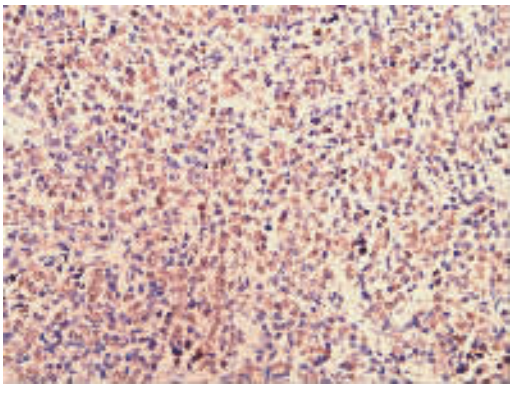


图 3　晚期卵巢癌中的 bFGF 表达　(S-P ×400)

2.4　Hpa、bFGF 蛋白共表达与 MVD 关系

41 例卵巢癌组织中 Hpa、bFGF 均表达阳性的 25 例,其他 16 例归为其他组。二者均阳性表达组的 MVD 值高于其他组的 MVD 值(82.05 ±69.43 *vs* 38.87 ±43.10)($P < 0.05$)。

表1 Hpa、bFGF 表达和 MVD 与卵巢癌临床病理特征的关系

临床病理因素	例数	Hpa		bFGF		MVD 值	
		积分光密度($\bar{x}\pm s$)	P	积分光密度($\bar{x}\pm s$)	P	微血管计数($\bar{x}\pm s$)	P
组织学类型							
浆液性囊癌	22	30 224.44±26 047.86		11 476.62±13 966.89		60.02±66.58	
黏液性囊癌	10	21 085.01±34 599.15	0.393	10 820.58±9 272.29	0.329	72.28±53.72	0.858
其他类型	9	16 032.47±23 102.77		4 224.46±10 437.99		69.10±71.94	
年龄							
<50 岁	18	27 187.88±30 940.94	0.652	15 802.89±10 914.94	0.514	57.34±55.55	0.479
≥50 岁	23	23 073.83±25 515.89		19 155.20±12 775.82		71.35±69.85	
FIGO(2000)分期							
Ⅰ-Ⅱ期(早期)	7	831.71±1715.45	0.010	3 764.76±2 085.20	0.025	43.27±21.51	0.023
Ⅲ-Ⅳ期(晚期)	34	29 831.12±27 798.75		19 820.89±11 186.13		69.71±68.52	
分化程度							
高-中分化	16	13 098.80±24 154.89	0.024	10 959.46±12 154.84	0.028	43.18±24.18	0.036
低分化	25	32 419.97±27 670.04		20 601.64±11 982.03		79.29±76.45	

2.5 Hpa、bFGF 蛋白表达的关系

相关性检验结果显示,33 例 Hpa 蛋白表达阳性的卵巢癌病例中 Hpa 表达和 bFGF 表达呈正相关($r=0.420$,$P<0.05$)。

2.6 Hpa、bFGF 表达和 MVD 与卵巢癌临床病理特征的关系

Hpa、bFGF 表达和 MVD 与 FIGO(2000)分期和卵巢癌分化程度有关,在 FIGO(2000)分期中,临床晚期标本(Ⅲ~Ⅳ期)中的 Hpa、bFGF 表达和 MVD 高于临床早期(Ⅰ~Ⅱ期)($P<0.05$);低分化组高-中分化组中的 Hpa、bFGF 表达和 MVD 高于高-中分化组,差异具有显著性($P<0.05$);Hpa、bFGF 表达和 MVD 与组织学类型、及年龄无关($P>0.05$),结果见表1。

3 讨论

近年来许多研究证实,恶性肿瘤的生长、浸润和转移与肿瘤新生血管生成密切相关,肿瘤在无血管阶段生长十分缓慢,不发生浸润和转移,而一旦肿瘤组织中有新生血管产生则肿瘤生长迅速,并开始浸润和转移。肿瘤的血管生成能够通过灌注效应、转移效应和旁分泌效应促进肿瘤的生长、浸润和转移,这是包括卵巢肿瘤在内的实体肿瘤普遍存在的病理现象。Hpa 在内皮细胞迁移过程中通过降解内皮细胞基底膜(BM)来促进新生血管形成[2],活化的内皮细胞能够与 Hpa 一起降解细胞外基质(extra cell ulermatrices,ECM)[3],本研究结果显示,33 例 Hpa 呈阳性表达的卵巢癌病例中,Hpa 蛋白的表达与 MVD 成正相关,提示 Hpa 的高表达有可能促进卵巢癌血管的生成,Hpa 在促进肿瘤血管生成的过程中具有重要作用。

Hpa 可通过直接、间接两种方式发挥促血管生成作用[4]:①直接作用,Hpa 可直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成[5];②间接作用,Hpa 通过激活 bFGF[6] 间接诱发血管生成反应。

bFGF 是一种强有力的促血管生成剂,通常以无活性的状态存在于正常组织中,但在损伤组织、炎症及肿瘤浸润中可以被激活并发挥促血管生成作用,对肿瘤间质血管新生和侵袭起有重要作用。因为 Hpa 增高导致的大量 bFGF 的释放和激活[7],可能是 Hpa 促进肿瘤血管生成的机制之一,所以我们对卵巢癌中的 bFGF 蛋白进行了检测,发现 bFGF 阳性表达组 MVD 值高于 bFGF 阴性表达组 MVD 值,提示 bFGF 能够促进卵巢癌血管的生成。同时,卵巢癌组织中 Hpa 和 bFGF 表达呈正相关;Hpa、bFGF 均阳性表达组的 MVD 值高于其他组的 MVD 值,表明 Hpa 有可能通过释放和激活 bFGF 来促进卵巢癌的血管生成,且二者对卵巢癌的血管生成起着协同的作用,这与 Mikami 等[8]的研究结果一致。Mikami 等[8]利用免疫组化法检测了食道癌中 Hpa、bFGF 的表达,发现它们都主要定位于癌细胞和靠近癌巢的微血管内皮细胞;有肌层和外膜侵犯的癌中 Hpa 表达明显增强。染色阳性的病例较阴性者有更高的 MVD;二者共表达的癌组织 MVD 最高,Hpa mRNA 表达与 MVD 直接相关。另外,Hpa 阳性病例中,bFGF 也有更高的阳性率。

本研究结合卵巢癌的临床病理特征对 Hpa、bFGF 及 MVD 进行了进一步分析,发现 Hpa、bFGF 及 MVD 的表达与卵巢癌的分化程度和 FIGO(2000)分期有关,低分化卵巢癌比高分化卵巢癌中的 Hpa、bFGF 及 MVD 的表达增高,Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌组织内的 Hpa、bFGF 及 MVD 表达高于Ⅰ~Ⅱ期,提示随着细胞分化程度的降低和 FIGO 分期的增加,Hpa、bFGF 及 MVD 在原发性卵巢癌中的表达程度增高,说明 Hpa 可能通过 bFGF 来促进卵巢癌组织的血管生成与肿瘤侵袭能力,从而提示 Hpa 表达增高是卵巢癌发生浸润、转移的重要因素。

在卵巢癌的生长、转移过程中,血管的生成为其提供了必须的物质基础和转移通道,血管的生成与肿瘤的生长、转移密切相关。Hpa 在卵巢癌组织中呈高表达,并且与 bFGF 的表达和卵巢癌的血管生成正相关,因此,Hpa 可能通过释放和激活 bFGF 来促进血管生成,进而促进了卵巢癌细胞的生长、浸润和转移过程。

参考文献：

[1] Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, *et al*. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis[J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2 (Suppl): 37 - 45.

[2] Hammer R E, Richardson J A, Simmons W A, *et al*. High prevalence of colorectal cancer in HLA-B27 transgenic F344 rats with chronic inflammatory bowel disease[J]. J Investig Med, 1995, 43(3): 262 - 268.

[3] Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, *et al*. Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action[J]. FASEB J, 2001, 15(9): 1661 - 1663.

[4] Gao J, Su L, Qin R, *et al*. Transfection of antisense oligodeoxynucleotide inhibits heparanase gene expression and invasive ability of human pancreatic cancer cell *in vitro*[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(1): 72 - 74.

[5] Escobar-Galvis M L, Jia J, Zhang X, *et al*. Transgenic or tumor-induced expression of heparanase upregulates sulfation of heparan sulfate [J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(12): 773 - 778.

[6] Vlodavsky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, *et al*. The impact of heparanese and heparin on cancer metastasis and angiogenesis[J]. Pathophysiol Haemost Thromb, 2006, 35(1 - 2): 116 - 127.

[7] El-Assal O N, Yamanoi A, Ono T, *et al*. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(5): 1299 - 1305.

[8] Mikami S, Ohashi K, Katsube K, *et al*. Coexpression of heparanase, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human esophageal carcinomas[J]. Pathol Int, 2004, 54(8): 556 - 563.

（编辑　栾　嘉）

文章编号：1000-5404(2009)05-0437-01

个案与短篇

经导管封堵先天性主动脉窦瘤破口 2 例

祁国奇，刘　苏　　（河北医科大学第二医院心脏外科，石家庄 050000）

先天性主动脉窦瘤破裂是临床上比较少见的先天性心脏病，占先天性心脏病的 0.31% ~3.56%。传统的治疗方法为外科手术修补，近年来，随着介入治疗技术的发展，国内外已有经导管主动脉窦瘤破口封堵术获得成功的报道[1,2]。2007 年，我科经导管成功封堵先天性主动脉窦瘤破口 2 例，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　病例资料

病例 1：患者，男性，24 岁，主因“活动后胸闷、心悸半月余”入院。心脏听诊胸骨左缘第 3 ~4 肋间可闻及双期连续性杂音。胸片：两肺血正常，升主动脉稍增宽，心胸比率 0.4。心脏彩超：二维超声心动图大动脉短轴切面探及无冠窦呈囊袋状向右房侧膨出，基底部直径约 11 mm，膨出约 14 mm，右房面破口直径约 8 mm；彩色多普勒显示破口处可见连续左向右分流。

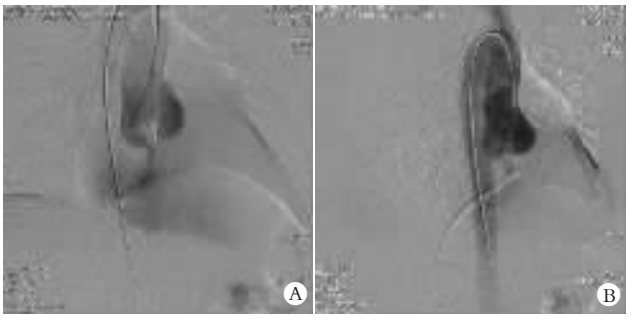
病例 2：患者，女性，27 岁，主因“发现心脏杂音 2 个月”入院。心脏听诊胸骨左缘第 3 ~4 肋间可闻及Ⅲ/Ⅵ收缩期杂音。胸片：两肺血正常，主动脉结稍宽，心胸比率 0.45。心脏彩超：二维超声心动图右室流入道长轴切面探及右冠状窦局部略向右房侧膨出，基底部直径约 9 mm，右房面破口直径约 4 mm，右冠窦破入右房处可见左向右分流。

1.2　方法

2 例患者均在局部麻醉下，穿刺右侧股动静脉，行右心导管检查，随后行升主动脉造影。观察主动脉窦瘤大小、形态、破口、分流部位以及主动脉瓣和右冠状动脉开口等情况。造影完毕建立股动脉-升主动脉-主动脉窦瘤破口-右房-下腔静脉-股静脉轨道，在 X 线透视和经胸超声心动图监测下经股静脉途径植入封堵器。

2　结果

升主动脉造影显示：病例 1 见主动脉无冠窦窦瘤形成，窦瘤呈漏斗状，其基底部直径约 12 mm，右房面破口约 8 mm，藉无冠窦破口右心房显影（图 1A）。病例 2 见主动脉右冠窦窦瘤形成，窦瘤呈漏斗状，其基底部直径约 9 mm，藉右冠窦破口右心房显影（图 2A），2 例造影均未见主动脉瓣返流。根据升主动脉造影结果，分别植入美国 AGA 公司直径 16/14 mm 及 12/10 mm 的动脉导管封堵器各 1 枚，封堵后重复升主动脉造影未见主动脉瓣返流，封堵部位未见残余分流存在，封堵器形态、位置良好（图 1B，图 2B），释放封堵器，手术过程顺利。2 例患者术后常规给予抗菌素和抗凝治疗。复查心脏彩超见封堵器位置良好，未见残余分流。



A：封堵前；B：封堵后

图 1　病例 1 封堵前后升主动脉造影表现

作者简介：祁国奇，男，内蒙古自治区包头市人，博士，副主任医师，主要从事心血管外科方面的研究。电话：(0311) 66002991，E-mail：qiguoqi@gmail.com

收稿日期：2008-11-17；**修回日期**：2008-12-08

（下转 440 页）