论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0680-04

HDGF、VEGF在人肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系

郑 璐,梁 平,李 靖,杨彤翰,李洪艳,黄小兵,韩克强 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 探讨肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor,HDGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在人肝细胞癌组织中的表达与肿瘤组织微血管形成过程之间的关系和临床意义。**方法** 对108例人肝细胞肝癌及相应的癌旁肝组织标本进行了HDGF、VEGF和CD34免疫组织化学EnVision™法检测,并初步分析结果。**结果** HDGF、VEGF在肝癌组织中阳性表达率分别为63.2%、69.1%;癌旁组织中阳性率分别为16.7%、20.3%。肝癌组织中HDGF、VEGF的表达呈正相关($P<0.05$),且两者共同阳性表达与肿瘤微血管密度(microvessel density,MVD)值之间呈正相关($r=0.728$,$P<0.01$;$r=0.608$,$P<0.05$)。**结论** 肝癌组织中异常表达增高的HDGF、VEGF与肝癌微血管形成过程相关,可作为判断肝细胞癌侵袭能力、血管生成、判断患者预后的参考标志。

[关键词] 肝癌;肝癌衍生生长因子;微血管密度;免疫组织化学

[中图法分类号] R735.7;R73-37;R730.23 **[文献标志码]** A

Relationship of HDGF or VEGF expression with hepatocellular carcinoma angiogenesis: report of 108 cases

Zheng Lu, Liang Ping, Li Jing, Yang Tonghan, Li Hongyan, Huang Xiaobing, Han Keqiang (Department of Hepatobiliary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) or vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC) and its significance. **Methods** The expressions of HDGF and VEGF in 108 specimens of HCC and in their adjacent liver tissues were detected with EnVision™ immunohistochemistry. Tumor microvessel density (MVD) was evaluated using CD34 antibody as an endothelial marker with the same technique as well. **Results** Positive rates of HDGF (63.2%) and VEGF expressions (69.1%) were significantly higher in HCC tissues than those in the adjacent liver tissues (16.7% and 20.3% respectively). Positive rates of HDGF and VEGF expressions in the HCC tissues were positively correlated ($P<0.05$). The mean value of MVD was significantly higher in HCC tissues than in the adjacent liver tissues. Both HDGF and VEGF expressions were positively correlated with MVD value ($r=0.728$, $P<0.01$, $r=0.608$, $P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of HDGF and VEGF are involved in the angiogenesis of HCC, and may be regarded as markers for invasion, angiogenesis, metastasis and prognosis of hepatocellular carcinoma.

[Key words] hepatocellular carcinoma; hepatoma-derived growth factor; microvessel density; immunohistochemistry

Corresponding author: Li Jing, Tel: 86-23-68774606, E-mail: xqyylijing@tom.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是全世界第三大致死性肿瘤,有很高的致死率[1]。在我国,每年约有13万人死于此病,约占全世界每年肝癌总死亡人数的42%。血管生成(angiogenesis)是肝癌生长、转移、侵袭的关键因素之一。抑制肿瘤血管生成已成为肝癌分子治疗的新策略。因此,探讨肝癌血管生成的机制对其治疗意义重大。肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)最早由Nakamura等[2]从无血清培养的人类肝癌细胞系Huh7培养上清中纯化得到,是一种肝素结合的生长因子,主要表达于分裂旺盛和长寿命细胞。HDGF在多种肿瘤组织中表达增高,对HCC细胞、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞等具有明显的促增殖活性。最近研究发现HDGF可能是一种血管生成促进因子,能促进肿瘤新生血管的形成[3]。血管内皮生长因子(vascular endothelial

[通信作者] 李 靖,电话:(023)68774606,E-mail:xqyylijing@tom.com

growth factor, VEGF)是血管生成最关键的刺激因子,参与了肿瘤血管生成的多个环节。本研究采用免疫组织化学 EnVision™法检测在肝细胞癌组织中 HDGF、VEGF 的蛋白表达,并用抗-CD34 抗体标记肿瘤组织微血管密度(microvascular density, MVD),探讨肝癌组织中 HDGF 和 VEGF 的表达与肝癌血管形成的关系,并初步讨论其意义。

1 材料与方法

1.1 标本采集

标本取自 2004－2008 年本科手术切除的 108 例肝细胞癌及其相对应的癌旁组织,肿瘤切除后立即选取新鲜肿瘤组织中最典型的部分,并选距癌组织边缘 2 cm 以上区域取癌旁组织。其中男性 76 例,女性 32 例;年龄 26～82(49.25±5.03)岁。取 8 例肝血管瘤切除标本的瘤旁 1 cm 处正常肝组织作为阴性对照组。受检者均为初诊手术的肝细胞癌患者,术前未接受化学治疗、放射治疗及免疫抑制治疗等,所有标本经病理组织学切片证实。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 兔抗人 HDGF 免疫组化单克隆抗体(Rabbit Anti-Human HDGF Monoclonal Antibody)购于武汉三鹰生物技术有限公司。兔抗 VEGF 多克隆抗体(Rabbit Anti-Vascular endothelial growth factor)购自北京赛驰生物科技有限公司。鼠抗人 CD34 免疫组化单克隆抗体(Mouse anti-human CD34 monoclonal antibody)和 EnVision™plus 试剂盒购于福建迈新生物技术开发公司。其余实验材料及试剂取自第三军医大学新桥医院中心实验室。制备标本的 3 μm 连续切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,高温高压抗原修复,EnVision™法染色,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、封片。每批染色均用已知阳性片作阳性对照,PBS 分别代替 HDGF、VEGF、CD34 单克隆抗体作为阴性对照[4]。

1.2.2 结果判断 HDGF、VEGF 以细胞膜及细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,阳性细胞数≥10% 为阳性表达,<10% 为阴性表达;用抗体 CD34 标记新生血管,计数 MVD 判断标准参照 Weidner 等[5]的标准,计算肿瘤内着色的毛细血管和微小血管,凡是棕色、单个内皮细胞或内皮细胞群者均作为 1 个血管计算,但肌层较厚及管腔面积 >8 个红细胞直径血管不计数。计数方法:每张染色片在 40 倍镜下选择血管最多的癌实质热点区,在 400 倍镜下选择 3 个视野进行血管计数,取其平均值,作为该病例的 MVD 值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验、t 检验和 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 108 例肝癌及癌旁肝组织的 HDGF 表达结果

癌旁肝组织中 HDGF 蛋白呈棕色染色主要位于细胞核,阳性率 16.7%(18/108)。阳性细胞为靠近血管外膜的巨噬细胞和少量腺体细胞。肝癌组织中 HDGF 染色主要位于细胞核,HDGF 阳性率 63.2%(68/108)。阳性细胞为部分癌细胞,血管内皮细胞和少量巨噬细胞(图 1)。肝癌组织与癌旁肝组织中 HDGF 蛋白阳性表达率的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

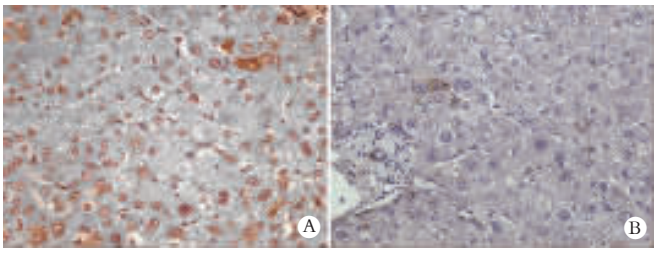


图 1 肝癌组织(A)及癌旁肝组织(B)中 HDGF 表达情况
(EnVision™ ×400)

2.2 108 例肝癌及癌旁肝组织的 VEGF 表达结果

VEGF 蛋白在癌旁肝组织的细胞质中呈染色阳性率 20.3%(22/108)。主要呈弥漫而不均匀的全细胞质表达。VEGF 蛋白在癌组织的细胞质中呈深棕色染色,肝癌组织中 VEGF 阳性率 69.1%(75/108)。阳性细胞的分布呈弥漫性、散在或小巢状分布,在胞质内呈膜下型、全浆型表达(图 2)。8 例正常肝组织的 HDGF、VEGF 均为阴性表达,阳性率为 0%(0/8)。肝癌组织 VEGF 蛋白阳性表达率明显高于癌旁肝组织,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

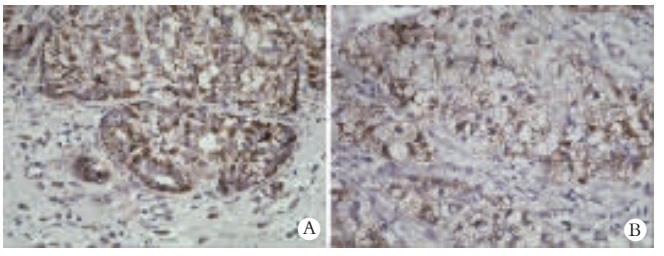


图 2 肝癌组织(A)及癌旁肝组织(B)中 VEGF 表达情况
(EnVision™ ×400)

2.3 CD34 及 MVD 计数结果

CD34 定位于血管内皮细胞膜上,呈棕黄色染色。在肝癌组织内显示弥漫的强阳性表达,而癌旁肝组织多为阴性(图 3)。阳性主要见于纤维间隔内的血管壁。癌旁肝组织中汇管区、纤维间隔中、肝窦内可见少量散在的 CD34 阳性表达。癌旁肝组织 MVD 值为(28.50±2.92),肝癌组织 MVD 值为(60.48±7.75)。两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

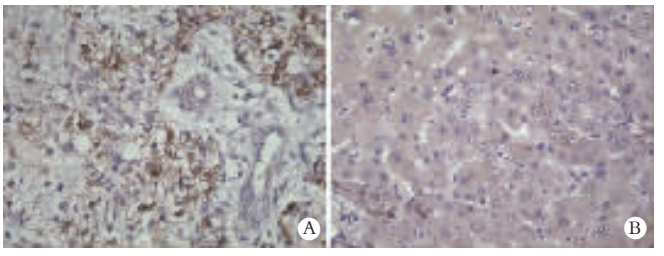


图 3 肝癌组织(A)及癌旁肝组织(B)中 CD34 表达情况
(EnVision™ ×400)

2.4 肝癌组织中 HDGF、VEGF 表达与 MVD 的关系

HDGF 阳性组(63%)MVD 值为(72.24±6.28),HDGF 阴

性组(37%)MVD值为(46.53±5.06),两组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。肝癌组织中HDGF阳性率与MVD值呈正相关($r=0.706$, $P<0.01$)。VEGF阳性组(69%)MVD值为(78.66±8.51),VEGF阴性组(31%)MVD值为(40.79±3.35),两组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。肝癌组织中VEGF阳性率与MVD值呈正相关($r=0.622$, $P<0.05$),组织中HDGF、VEGF表达越高,相应MVD值越大。HDGF、VEGF表达均为阳性的肿瘤组织MVD值最大(90.21±8.76),HDGF阳性而VEGF阴性(67.50±5.16)或HDGF阴性而VEGF阳性(60.87±7.23)的肿瘤组织次之,HDGF和VEGF均为阴性的肿瘤组织MVD值最小(30.58±3.95)。HDGF、VEGF均阳性组织与HDGF、VEGF均阴性组织比较差异有统计学意义($t=2.15$, $P<0.01$)。Spearman相关分析表明,HDGF与VEGF表达呈正相关($r=0.622$, $P<0.05$)。HDGF, VEGF表达均与MVD呈正相关($r=0.728$, $P<0.01$, $r=0.608$, $P<0.05$)。

3 讨论

肿瘤血管的产生是一个十分复杂的过程,只有充足的血供才能支持肿瘤新陈代谢并加快其生长、浸润和转移,但同时宿主对肿瘤的发展是排斥的,必然会限制其血供。肿瘤血管的生长机理主要是由肿瘤细胞和血管内皮细胞通过双向旁分泌后,诱发出体内多种细胞因子介导产生的瀑布式生化反应[6]。HDGF是一种肝素结合的生长因子,定位于1q21-q23[7]。有6个外显子和5个内含子,其氨基酸序列包含2个核定位信号序列(nuclear localization signal, NLS)和一个PWWP结构域(Pro-Trp-Trp-Pro),有6个丝氨酸和1个苏氨酸磷酸化位点。HDGF主要表达于分裂旺盛和长寿命细胞。在细胞内HDGF可分布于细细胞质和细胞核中,以细胞核为主。HDGF与多种肿瘤的恶性增殖密切相关,并能促进新生血管的形成[3]。HDGF在肝癌、非小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、黑色素瘤等肿瘤组织中表达增高,肿瘤血管生成增多,HDGF核标记指数(HDGF-LI)与患者生存率呈负相关[3,8,9]。在体外用siRNA下调HDGF能抑制NSCLC细胞系A549、H1944、H358、H226的非锚着生长,细胞侵袭能力下降。在裸鼠移植瘤模型中HDGF沉默的A549细胞系其肿瘤形成和生长明显要比单用脂质体或无关siRNA处理的对照组缓慢,HDGF沉默的肿瘤内血管形成明显减少、肿瘤坏死增多[10]。过度表达HDGF的NIH3T3细胞稳定转染体可使裸鼠产生肉瘤样肿瘤,且肿瘤有丰富的新生血管形成。用HDGF反义寡核苷酸下调HDGF表达能明显抑制人肝癌细胞系HuH-7的增殖[11]。HDGF在肝癌组织中显著上调表达,与肝癌的血管生成相关,是肝癌抗血管生成治疗潜在的干预靶点[8,12]。

VEGF是血管生成最关键的刺激因子,参与了肿瘤血管生成的每个环节。VEGF的表达受一些多肽生长因子的调节,上调表达的VEGF可通过旁分泌等方式对血管内皮细胞增殖、水解基膜、迁移和血管构建等环节进行调控,进而促进新生血管形成。实体肿瘤的生长不仅取决于肿瘤细胞的种植效率和增生速度,还取决于肿瘤新生血管的形成。血管形成一部分源于原血管网的过度生长,另一部分源于血管内皮祖细胞形成的新生血管[13-15],而且血管生成前肿瘤细胞几乎不能进入血液循环,但血管生成后进入血液循环的肿瘤细胞与血管密度成正比。MVD通常被用来判断肿瘤微血管的增殖状况,CD34是形成血管的再生上皮细胞的一个标志物,标志的微血管是毛细血管,而在正常肝组织窦状表面不标志,其敏感性和特异性均优于Ⅷ因子、CD31、vWF、UEA-1,是目前测定MVD的良好指标[16]。

本实验结果提示,HDGF和VEGF在肝细胞癌中的表达水平明显高于癌旁肝组织,两者间有显著正相关性。HDGF和VEGF的表达均与MVD呈正相关,且两者共同阳性表达组MVD值最高。结合最新研究进展和本实验结果,我们认为HDGF及VEGF均能促进肝细胞癌的增殖和血管生成,HDGF在肝癌中可能起到类似于血管生长因子的作用,参与肿瘤微血管生成。增生的血管为肿瘤细胞提供养分及通路,从而使肿瘤细胞得以持续增殖、迁移、黏附。HDGF与VEGF表达呈正相关,说明两者之间可能存在某种相互调节机制。Okuda等[17]研究发现过度表达HDGF的NIH3T3细胞稳定转染体可使裸鼠产生肉瘤样肿瘤,并发现肿瘤有丰富的新生血管形成,而且HDGF表达可诱导VEGF的表达,抗-VEGF中和抗体可明显抑制过度表达HDGF的肿瘤组织生长,但不能阻断其生长。结合本实验结果,说明HDGF除了直接促进肿瘤血管形成外,还可能与诱导VEGF产生有关,也说明HDGF在促进肿瘤血管形成方面可能比VEGF作用更强。HDGF和VEGF的共同阳性表达组的MVD明显高于单一因子表达组及共同阴性组,提示HDGF、VEGF可作为判断肝细胞癌侵袭能力、血管生成、判断患者预后的参考标志,而两者的共同检测具有更高的参考价值。

综上所述,可认为肝癌组织中HDGF的高表达与其微血管的异常增生密切相关。HDGF的表达状况有可能作为判断肝癌微血管增生状况和患者预后的参考指标之一,因此,HDGF可成为一种新的反映肝细胞癌生物学行为的客观指标,抑制肝癌中HDGF的表达可

能起到直接抑制微血管生成和下调 VEGF 表达两种效应,HDGF 可能成为抗肝癌血管生成的新靶点。HDGF 促进肝癌微血管生成的具体分子机制仍需深入研究来阐明。

参考文献:

[1] Pitot H C. Adventures in hepatocarcinogenesis[J]. Ann Rev Pathol, 2007, 2: 1 - 29.

[2] Nakamura H, Kambe H, Egawa T, *et al*. Partial purification and characterization of human hepatoma-derived growth factor[J]. Clin Chim Acta, 1989, 183(3): 273 - 284.

[3] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, *et al*. Expression of hepatoma-derived growth factor is correlated with lymph node metastasis and prognosis of gastric carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 117 - 122.

[4] 丁会民, 秦锡虎, 朱峰, 等. 组织因子表达与肝癌微血管生成关系及临床意义[J]. 肝胆胰外科杂志, 2008, 20(5): 331 - 335.

[5] Weidner N, Semple J P, Welch W R, *et al*. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1 - 8.

[6] Yancopoulos G D, Davis S, Gale N W, *et al*. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. Nature, 2000, 407 (6801): 242 - 248.

[7] Gregory S G, Barlow K F, McLay K E, *et al*. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1[J]. Nature, 2006, 441 (7091): 315 - 321.

[8] Yoshida K, Tomita Y, Okuda Y, *et al*. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2006, 13(2): 159 - 167.

[9] Uyama H, Tomita Y, Nakamura H, *et al*. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1): 6043 - 6048.

[10] Zhang J, Ren H, Yuan P, *et al*. Down-regulation of hepatoma-derived growth factor inhibits anchorage-independent growth and invasion of non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66 (1): 18 - 23.

[11] Narron J V, Stoops T D, Barringhaus K, *et al*. Hepatoma-derived growth factor is expressed after vascular injury in the rat and stimulates smooth muscle cell migration[J]. Pediatr Res, 2006, 59(6): 778 - 783.

[12] Yoshida K, Nakamura H, Okuda Y, *et al*. Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocarcinogenesis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(11): 1293 - 1301.

[13] Gupta G P, Massague J. Cancer metastasis: building a framework[J]. Cell, 2006, 127(4) 679 - 695.

[14] 李方方, 徐酉华, 罗庆. VEGF 特异 siRNA 重组腺病毒构建及其对 K562 细胞增殖的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (13): 1305 - 1308.

[15] 梁启廉, 陈小东, 王三明, 等. VEGF 和抑癌基因 maspin 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(14): 1416 - 1418.

[16] Poon R T, Ng IO, Lau C, *et al*. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(7): 1775 - 1785.

[17] Okuda Y, Nakamura H, Yoshida K, *et al*. Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor[J]. Cancer Sci, 2003, 94(12): 1034 - 1041.

(**收稿**:2009-10-13;**修回**:2009-12-10)

(编辑 邓强庭)

作者投稿注意事项

本刊已正式启用远程稿件处理系统,作者首次投稿时,须先登陆本刊网站注册。具体操作方法:进入本刊主页(外网:http://aammt.tmmu.com.cn;内网:http://202.202.224.153),在左上角用户登陆区点击“在线注册”申请帐号。注册时请注意:一定要按要求填写有效资料,并留下作者常用的邮箱地址和手机号,方便编辑部与您联系,如有变更,请及时修改资料,并通知编辑部。

注册成功后,请登陆进入系统,点击左侧“投稿箱”中的“我要投稿”并按提示进行操作。投稿时请注意:请确认稿件符合本刊格式(请参照本刊主页“作者园地”要求排版)。上传稿件后请重新登陆,确认是否上传成功,并点击稿件确认能否正常打开。如因网络问题不能上传稿件,可与本刊编辑部联系(电话:023 - 68752187)。

投稿成功后,请及时寄/送审稿费、单位介绍信(除证明稿件内容的真实性之外,还应证明稿件无一稿多投、不涉及保密问题、署名无争议等)、论文授权书(在本刊主页下载,请各署名作者亲笔签名)至编辑部。同时请作者关注邮箱里本刊发送的信息,也可随时登陆本刊在线系统查看稿件状态。

本刊编辑部