基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1634-05

真核细胞翻译起始因子 4E、血管内皮生长因子与食管癌血管生成及转移的关系

马敏杰,韩 彪,刘 健,魏 宁,张 瑜,徐上清
(兰州大学第一医院胸心外科,兰州 730000)

【摘 要】目的:探讨真核细胞翻译起始因子 4E(Eukaryotic initiation factor 4E,eIF4E)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)在食管癌中的表达及其意义。方法:应用免疫组化 S-P 法检测 131 例食管癌组织及 20 例癌旁组织中eIF4E,VEGF 及微血管密度(Micro vessel density,MVD)的表达。结果:eIF4E、VEGF 在食管癌中的表达高于正常食管组织(P=0.000、P=0.002,P<0.05),且 eIF4E 和 VEGF 的表达与食管癌的浸润深度(P=0.001、P=0.004,P<0.05)、淋巴结转移情况(P=0.01、P=0.003,P<0.05)及临床分期显著相关(P=0.026、P=0.025,P<0.05)。结论:eIF4E、VEGF 协同表达对血管生成、食管癌的浸润、转移起到关键性的作用,可能为食管癌治疗中的一个新靶点。

【关键词】食管肿瘤;血管内皮生长因子;血管生成;肿瘤转移
【中国图书分类法分类号】Q756;R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-19

Correlative analysis between eIF4E and VEGF expression and angiogenesis and metastasis of human esophageal carcinoma

MA Min-jie, et al
(*Department of Thoracic Surgery, the First Hospital, Lanzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of eIF4E and vascular endothelial growth factor (VEGF) on neoangiogenesis and metastasis of human esophageal carcinoma. *Methods*: Immunohistochemistry was used to study the expression of eIF4E, VEGF and microvessel density (MVD) in 131 cases of esophageal carcinoma tissues. VEGF and eIF4E were detected also in 20 cases of adjacent normal esophageal tissues. CD34 was used to explore the microvessel density (MVD) as marker of endothelial cell. *Results*: eIF4E and VEGF showed a higher expression in esophageal carcinoma tissues than normal esophageal tissues. The expression of eIF4E and VEGF were significantly related to clinico-pathological features (depth of invasion, lymph-node metastasis and TNM stage) and MVD. *Conclusion*: the co-expression of eIF4E and VEGF plays a key role in angiogenesis, invasion and metastasis of esophageal carcinoma. eIF4E and VEGF may serve as a new target for the treatment of esophageal cancer.

【Key words】Esophageal carcinoma; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis; Metastasis

全世界每年约有 20 万人死于食管癌,我国是食管癌高发区,因食管癌死亡者仅次于胃癌居第 2 位。肿瘤血管新生、浸润和转移都是影响食管癌预后的重要因素[1]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前所知最重要的促血管生长因子,在肿瘤血管新生中起重要作用。食管癌中普遍存在 VEGF 的高表达,并且和较差的预后[2]、肿瘤进展[3]、血管新生[4]、淋巴浸润和转移[5]相关。在肿瘤血管新生、浸润和转移过程中,不断伴随着新蛋白的合成。这些新蛋白不但为肿瘤细胞增殖生长所必需,对于血管内皮细胞的增殖也很重要。因此,作为蛋白翻译起始所必需的 mRNA 帽结合蛋白,真核细胞翻译起始因子 4E(Eukaryotic initiation factor 4E,eIF4E)与肿瘤的血管新生[6]、恶性转化和转移[7]密切相关。eIF4E 表达升高能促进一系列血管新生相关蛋白如 VEGF 的翻译,因此我们推测:食管癌中 VEGF 和 eIF4E 的表达存在着相关性,并且和食管癌的分化、分期、血管新生、浸润和转移相关。本研究通过检测 131 例食管癌组织中 eIF4E、VEGF 的表达,以探讨其在食管癌的发生、发展及转移中的作用,并分析二者的相互关系,以便为食管癌的早期诊断、有效治疗及判断预后提供重要的科学依据。

作者介绍:马敏杰(1977-),男,主治医师,硕士,
研究方向:胸部肿瘤及外伤。
通讯作者:韩 彪,男,教授,E-mail:habiao66@msn.com。
基金项目:甘肃省科学事业项目(编号:QS031-C33-05)。

1 材料及方法

1.1 研究对象

131 例组织标本全部取自兰州大学第一医院胸外科 1994~2007 年资料完整的住院手术患者，均经病理证实为食管癌，患者年龄 40~73 岁，男 94 例，女 37 例。所有患者术前均未接受化疗、放疗或其它针对肿瘤的治疗，均在全麻下行食管癌切除术。131 例食管癌中高分化癌 39 例，中分化癌 75 例，低分化癌 17 例，全部病例按照国际抗癌联盟（UICC）1997 年分期标准进行分期，侵润深度：Tis 6 例，T1 10 例，T2 44 例，T3 58 例，T4 13 例；淋巴分期：N0 44 例，N1 87 例；远处转移：M0 101 例，M1 30 例，临床分型：0 期 1 例，Ⅰ期 7 例，Ⅱa 期 13 例，Ⅱb 期 51 例，Ⅲ期 44 例，Ⅳ期 15 例。正常对照组织全部取自手术切除食管断端，距瘤体约 10 cm 均经病理证实为正常组织。

1.2 标本处理

所有标本均经 100 ml/L 甲醛液固定，常规石蜡包埋，制备成 4 μm 厚的连续切片 5 张，1 张行苏木精－伊红染色，其余切片贴附于经防脱处理的载玻片上，60℃干燥 72 h 后，用于不同的免疫组织化学染色。

1.3 实验方法

1.3.1 苏木精－伊红染色 切片常规苏木精－伊红染色进行。

1.3.2 免疫组织化学染色方法 本实验采用 S-P 染色法检测 eIF4E、VEGF 和 CD34 在各标本上的表达。S-P 试剂盒，购自福州迈新生物技术开发司。将切片进行免疫组织化学标记，3％双氧水室温 5 min，蒸馏水洗，PBS 浸泡 5 min。5％~10％正常羊血清，室温孵育 10 min，倾去血清后加入适当稀释的一抗 eIF4E（鼠单抗、554R16，ABCAM）、VEGF（兔单抗，Santa cruz）或 CD34（MAB-0034），37℃孵育 60 min，PBS 浸泡 5 min 共 3 次。滴加生物素标记的二抗 37℃孵育 15 min，PBS 浸泡 5 min 共 3 次。滴加辣根酶标记的链霉卵白素 37℃孵育 15 min，PBS 浸泡 3 min 共 3 次。DAB 显色，水洗后，苏木精复染，分色，返蓝，脱水透明，封固。以 PBS 代替第一抗体为阴性对照。

1.3.3 观察指标

1.3.3.1 eIF4E 阳性判定标准 eIF4E、选染色均匀的区域，显微镜下随机选择 10 个高倍视野计数，阳性细胞数 <10%为阴性，≥10%为阳性。切片中癌组织阳性染色弱，阳性范围＜癌组织面积 50%者判定为（+）；染色弱，阳性范围＞50%判定为（++）；染色强，阳性范围＜ 50%判正为（+++）；染色强，阳性范围＞50%判定为（++++）。并将染色强度（-）~（++）划分为低表达，（+++）~（++++）划为高表达[8]。

1.3.3.2 VEGF 阳性判定标准 对 VEGF 标记切片，采用 Eastham 等[9]的方法。即无着色为（-）；切片中癌组织阳性染色弱，阳性范围＜癌组织面积 50%者判定为（+）；染色弱，阳性范围＞50%判定为（++）；染色强，阳性范围＜ 50%判正为（+++）；染色强，阳性范围＞50%判定为（++++）。并将染色强度（-）~（++）划分为低表达，（+++）~（++++）划为高表达[8]。以肿瘤细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性判定标准。

1.3.3.3 CD34 阳性判定微血管密度（Micro vessel density，MVD）在低倍视野下选取肿瘤微血管数量（CD34 阳性）最丰富区域，在 200× 视野范围计 5 个视野的微血管数目，取平均值作为 MVD；以血管内皮细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性判定标准。

1.4 统计学分析

应用统计软件 SPSS 13.0 分析资料，计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，计数资料采用 χ^2 检验、方差分析，计量资料采用 t 检验，应用 Log-Rank 检验比较不同组别生存时间，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 食管癌及正常食管组织中 eIF4E、VEGF、MVD 的表达

131 例食管癌组织中，eIF4E 阳性 105 例（80.2%），VEGF 阳性 99 例（75.6%）。20 例正常食管组织中未见 eIF4e 阳性表达，6 例 VEGF 阳性表达。食管癌组织中 eIF4e 和 VEGF 的表达阳性率显著高于正常食管组织（$P<0.01$）。食管癌中 MVD 计数为 30.59±13.38，显著高于正常食管组织的 MVD 计数 13.82±4.16（$P<0.01$）。见表 1。

2.2 eIF4E，VEGF 和 MVD 的表达与食管癌分化程度的关系

eIF4E 在高、中、低分化食管癌中的表达阳性率逐步升高（$P<0.05$），而 VEGF 和 MVD 的表达阳性率则缺少这种变化趋势。说明在本研究中提示 eIF4E 基因过度表达随恶性度增加而升高，从而证实 eIF4E 有使细胞恶性转化的能力。VEGF、MVD 在食管癌中的表达与食管癌分化程度无关。

2.3 eIF4E，VEGF 和 MVD 的表达与食管癌临床分期的关系

eIF4E 在 0+Ⅰ+Ⅱ、Ⅲ+Ⅳ 中阳性率分别为：73.6%、88.7%。VEGF 在 0+Ⅰ+Ⅱ、Ⅲ+Ⅳ 中阳性率分别为：73.6%、88.1%。MVD 在 0+Ⅰ+Ⅱ、Ⅲ+Ⅳ 中分别为：35.95±5.19、43.19±7.15 由此说明在本研究中 eIF4E、VEGF 在食管癌中的表达与临床分期显著相关（$P<0.05$），食管癌组织中 MVD 于临床分期无显著相关（$P>0.05$）。

表 1 eIF4E、VEGF 和 MVD 在食管癌和正常食管中的表达

类型	例数	eIF4E 阳性数百分比	检验值	VEGF 阳性数百分比	检验值	MVD	P 值
食管癌	131	105（80.2%）	χ^2=52.622	99（75.6%）	χ^2=17.01	30.59±13.38	0.000 1*
正常食管	20	0	P=0.000 1	6（30%）	P=0.000 1	13.82±4.16	

*$P<0.001$ 差异有统计学意义

2.4 eIF4E,VEGF 和 MVD 的表达与食管癌淋巴结转移及 M 分期的关系

根据表 2,说明在本研究中 eIF4E、VEGF 在食管癌中的表达与食管癌淋巴结转移 M 分期情况显著相关 ($P<0.05$),食管癌组织中 MVD 于食管癌淋巴结转移情况无显著相关 ($P>0.05$)。

2.5 eIF4E 与 VEGF 在食管癌中的关系

eIF4E 在本组食管癌中的表达与 VEGF 的表达呈显著相关($r=0.553, P<0.01$)同时 eIF4E 与 VEGF 在本组食管癌中的表达与 MVD 显著相关($P<0.01$)。

2.6 不同 eIF4E 表达水平对食管癌病人生存时间的影响

根据 eIF4E 的表达水平将 131 例病人分成 3 组,采用 Kaplan-meier 方法描绘 3 组的生存曲线,用 Log-Rank 检验比较 3 组生存时间,差异有显著的统计学意义($P<0.001$)。见表 3 和图 5。

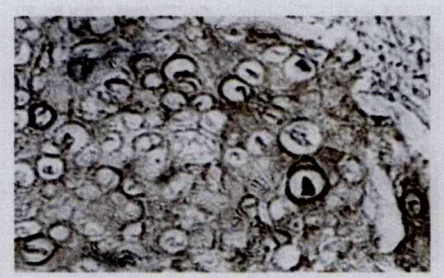
2.7 Cox 风险比例模型预测影响食管癌预后的因素

采用 Cox 风险比例模型,拟合 131 例食管癌患者临床病理因素及癌组织中 eIF4e、VEGF、MVD 的表达强度进行预后多因素分析。由表 4 可知 eIF4e 的表达程度、远处转移及食管癌淋巴结转移是食管癌术后影响生存时间危害性因素。



食管癌组织 HE 染色 ×400

图 1 食管癌组织苏木精 - 伊红染色



食管癌组织 eIF4E 阳性染色(细胞核、胞浆、胞膜)×400

图 2 食管癌 eIF4E 免疫组织化学染色(s-p 法)

表 2 eIF4E、VEGF 和 MVD 在食管癌中的表达

组 别	eIF4E				VEGF			MVD	
	例数	阳性数	阳性率(%)	检验值	阳性数	阳性率(%)	检验值	均数 ± 标准差	P 值
性 别									
男	94	77	81.9	$\chi^2=2.142$	70	74.5	$\chi^2=0.220$	35.32 ± 7.55	0.317*
女	37	28	70.3	$P=0.143$*	29	78.4	$P=0.639$*	37.23 ± 4.17	
年 龄									
< 60	103	84	81.6	$\chi^2=0.594$	79	76.7	$\chi^2=0.331$	35.59 ± 3.87	0.876*
≥60	28	21	75.0	$P=0.441$*	20	71.4	$P=0.565$*	36.07 ± 6.11	
分化程度									
高	39	26	66.7		29	74.4		33.13 ± 7.93	
中	75	63	84.0	$\chi^2=7.241$ $P=0.027$※	59	78.7	$\chi^2=1.507$ $P=0.471$	31.92 ± 5.29	0.878*
低	17	16	94.1		11	64.7		32.52 ± 6.17	
浸润深度									
Tis+T1+T2	60	42	70.0	$\chi^2=7.173$	40	66.7	$\chi^2=4.756$	23.78 ± 4.16	0#
T3+T4	71	63	88.7	$P=0.007$#	59	83.1	$P=0.029$#	42.01 ± 5.40	
淋巴转移									
N0	44	30	68.2	$\chi^2=5.968$	28	63.6	$\chi^2=5.113$	31.87 ± 7.17	0.051*
N1	87	75	86.2	$P=0.015$※	71	81.6	$P=0.024$※	38.44 ± 5.74	
远处转移									
M1	30	28	93.3	$\chi^2=4.249$	27	90.0	$\chi^2=4.387$	32.44 ± 4.57	0.112*
M0	101	77	76.2	$P=0.039$※	72	71.3	$P=0.036$※	37.74 ± 5.74	
临床分期									
0+Ⅰ+Ⅱ	72	53	73.6	$\chi^2=4.300$	49	68.1	$\chi^2=4.893$	35.95 ± 5.19	0.375*
Ⅲ+Ⅳ	59	52	88.1	$P=0.038$※	50	84.7	$P=0.027$※	43.19 ± 7.15	

*$P>0.05$ 差异无统计学意义;※$P<0.05$ 差异有统计学意义;#$P<0.01$ 差异有显著统计学意义

表 3 Log-Rank 检验比较 3 组生存时间

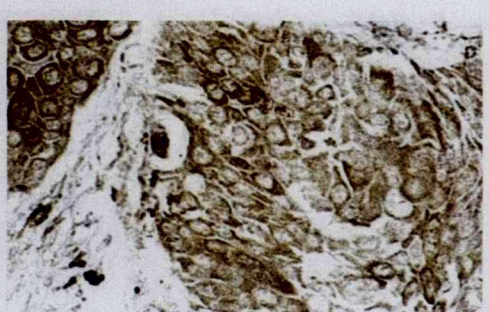
	统计值	df	P 值
Log Rank 法	24.39	2	0.00 001*
Breslow 法	19.86	2	0.00 001*
Traone-ware 法	22.06	2	0.00 001*

*P<0.001 差异有显著统计学意义

表 4 影响食管癌术后生存时间的危害性因素

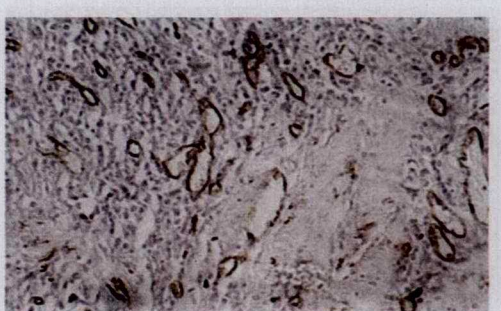
变量	Hazards ratio	95% CI	P 值
性别	1.327	0.916~2.598	0.245
VEGF	1.953	0.796~4.873	0.176
T 分期	0.976	0.392~2.553	0.387
M 分期	3.086	1.479~4.811	0.019*
N 分期	5.174	2.579~18.635	0.012*
临床分期	1.295	0.845~1.984	0.263
eIF4e	2.485	1.373~4.498	0.026*
MVD	1.407	0.731~2.836	0.231

*P<0.05 差异有统计学意义



食管癌组织 VEGF 阳性染色（胞浆、胞膜染色） ×400

图 3 食管癌 VEGF 免疫组织化学染色（s-p 法）



食管癌组织中的新生微血管 ×200

图 4 食管癌 CD34 免疫组织化学染色

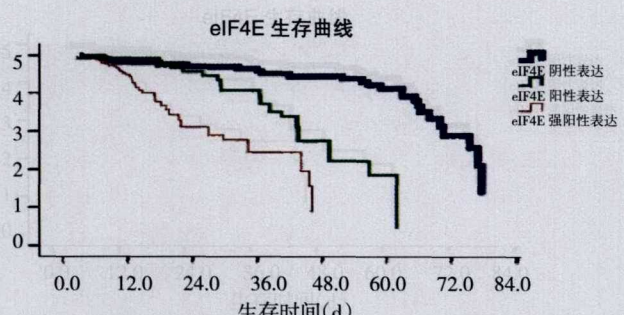


图 5 不同 eIF4E 表达水平对食管癌病人生存曲线。横坐标代表生存时间，纵坐标代表样本例数

3 讨 论

eIF4E 是蛋白翻译起始所必需的 mRNA 帽结合蛋白，eIF4E 过度表达导致一些肿瘤相关基因表达产物增加，使细胞过度增殖和恶性变化。eIF4E 过表达还能增加肿瘤细胞 VEGF 的蛋白合成、进而刺激血管新生[6]。

食管癌中普遍存在 VEGF 的高表达，并且和较差的预后[2]、肿瘤进展[3]、血管新生[4]、淋巴浸润和转移[5]相关。这些高表达的 VEGF 是否由 eIF4E 所驱动，对于研究食管癌血管新生、浸润和转移的详细机制，进而提供新的治疗靶点具有重要意义。本研究发现 eIF4E 和 VEGF 蛋白在食管癌中表达阳性率显著高于正常食管组织。高表达的 eIF4E 和 VEGF 与食管癌中肿瘤浸润、淋巴转移、远处转移和较高的临床分期呈正相关。我们还发现 eIF4E 与 VEGF 在食管癌中具有显著正相关，即 eIF4E 的高表达会导致 VEGF 的表达水平增高。这说明在食管癌中，eIF4E 的表达和 VEGF 具有相似的趋势，二者可能存在某些调节关系。

在许多肿瘤中，eIF4E 和 VEGF 的表达具有高度相关性。Yang 等应用组织芯片分析了多种肿瘤来源的组织，发现 eIF4E 和 VEGF 在黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌、淋巴瘤、前列腺癌和卵巢癌都具有相关性[10]。VEGF 在食管癌中是一个重要的预后因子，而 eIF4E 的研究相对较少。Salehi 等发现 eIF4E 在食管癌组织中的表达显著高于正常食管组织，并且与进展期食管癌密切相关[11]。我们的研究证实了这些发现，同时还首次发现食管癌中 eIF4E 和 VEGF 的表达具有高度相关性。

eIF4E 和 VEGF 的高度相关，而 VEGF 能促进血管新生、

导致肿瘤微血管密度增加。我们接着比较了 eIF4E 表达和 MVD 的表达趋势，发现在浸润深度、淋巴转移、远处转移和临床分期方面，二者的表达趋势高度一致。这说明了 eIF4E 表达能增加促进血管新生、增加肿瘤微血管密度，这很可能是通过增加 VEGF 表达介导的。

我们还发现，eIF4E 基因蛋白在高分化、中分化、低分化的表达率逐渐递增，提示 eIF4E 基因过度表达随恶性度增加而升高，从而证实 eIF4E 有使细胞恶性转化的能力，可能和促进生长因子的蛋白翻译有关。而 VEGF 和 MVD 在不同分化状态的食管癌标本中的表达无显著性差别。我们的发现也证实了其它作者在肺癌中的发现：eIF4E 高表达于低分化肺癌组织[12]。

我们分析了食管癌患者的生存时间，发现 eIF4E 表达水平与生存时间显著相关，eIF4E 表达越高，生存时间越短。多因素分析显示：eIF4e 的表达程度、远处转移及食管癌淋巴结转移是食管癌术后影响生存时间危害性因素。而 VEGF 和 MVD 对生存影响相对较小。

我们的研究不仅揭示食管癌高表达 VEGF 和 eIF4E 存在相关，还证实 eIF4E 是一个比 VEGF 更好的用于预测患者生存的预后因子。这将为食管癌提供新的治疗方法提供重要信息。针对 eIF4E 的反义核酸在动物体内有有效抑制肿瘤生长而毒性很小[13]。在食管癌中，靶向 eIF4E 的治疗将值得进一步研究。

总之，我们的研究表明：eIF4E、VEGF 协同表达对食管癌血管生成、浸润和转移起到关键性的作用。eIF4E 的过度表达与食管癌的致瘤性和生存时间密切相关，能作为食管癌恶性程度的一个分子标志和治疗靶标。

参 考 文 献

[1] Vallböhmer D, Brabender J, Metzger R, et al. Genetics in the Pathogenesis of esophageal cancer: possible predictive and prognostic factors [J]. J Gastrointest Surg, 2010, 14(Suppl 1): 75-80.

[2] Liu P, Chen W, Zhu H, et al. Expression of VEGF-C correlates with a poor prognosis based on analysis of prognostic factors in 73 patients with esophageal squamous cell carcinomas[J]. Jpn J Clin Oncol, 2009, 39(10): 644-650.

[3] Chen L, Ren G S, Li F, et al. Expression of livin and vascular endothelial growth factor in different clinical stages of human esophageal carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(37): 5749-5754.

[4] Ding M X, Lin X Q, Fu X Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C and angiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(28): 4582-4585.

[5] Matsumoto M, Natsugoe S, Okumura H, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor-C correlates with lymph node micrometastasis in submucosal esophageal cancer[J]. J Gastrointest Surg, 2006, 10(7): 1016-1022.

[6] Zhou S, Wang G P, Liu C, et al. Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer[J]. BMC Cancer, 2006, 6(7): 231.

[7] De Benedetti A, Graff J R. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases [J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3189-3199.

[8] Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, et al. The cooperative role of p27 with cyclinE in the prognosis of advanced gastric carcinoma[J]. Cancer, 2000, 89(6): 1214-1219.

[9] Hughes S E, Hall P A. Overview of the fibroblast growth factor and receptor families; complexity, functional diversity, and implication for future cardiovascular research [J]. Cardiovascular Res, 1993, 27(5): 1199-1203.

[10] Yang S X, Hewitt S M, Steinberg S M, et al. Expression levels of eIF4E, VEGF, and cyclin D1, and correlation of eIF4E with VEGF and cyclin D1 in multi-tumor tissue microarray[J]. Oncol Rep, 2007, 17(2): 281-287.

[11] Salehi Z, Mashayekhi F. Expression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and 4E-BP1 in esophageal cancer[J]. Clin Biochem, 2006, 39(4): 404-409.

[12] Wang R, Geng J, Wang J H, et al. Overexpression of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and its clinical significance in lung adenocarcinoma [J]. Lung Cancer, 2009, 66(2): 237-244.

[13] Graff J R, Konicek B W, Vincent T M, et al. Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity [J]. J Clin Invest, 2007, 117(9): 2638-2648.

(责任编辑：关蕴良)

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127