维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0549-04

HIF-1α、VEGF 在胃癌中的表达及关系

万美珍[1],周林艳[1],袁 焱[2],岳灵萍[1]

(1. 江苏省常州市肿瘤医院病理科;2. 江苏省常州市肿瘤医院肿瘤外科,常州 213001)

【摘 要】目的:探讨 HIF-1α、VEGF 在胃癌组织中的表达及相关性。方法:应用免疫组织化学方法检测 84 例胃癌组织及癌旁正常组织中 HIF-1α、VEGF 的表达,并分析它们与临床病理因素的关系及相互间的关系。结果:84 例胃癌组织中及癌旁内对照正常胃组织 HIF-1α 阳性表达分别为 60.7%,16.7%($P<0.05$)。有、无淋巴结转移的癌组织中 HIF-1α 的表达率分别为 79.1%、41.5%($P<0.05$),侵润深度分别为粘膜或粘膜下、肌层或浆膜下、穿透浆膜层的癌组织中 HIF-1α 的表达率分别为 29.2%、62.2%、91.3%($P<0.05$)。未或低分化、中或高分化的癌组织中 HIF-1α 的表达率分别为 76%、54.2%($P>0.05$)。肿瘤大小≤5cm、>5cm 的癌组织中 HIF-1α 的阳性表达率分别为 64.7%、58%($P>0.05$)。男性为 63%,女性为 57.9%($P>0.05$),<60 岁为 52.3%,≥60 岁为 70%($P>0.05$)。VEGF 阳性表达为 73.8%(62/84)。HIF-1α 与 VEGF 的表达显出相关性,$P<0.05$。结论:HIF-1α 与胃癌的侵润、淋巴结转移有关,并与 VEGF 的表达具有明显相关性,HIF-1α 的作用部分通过 VEGF 的表达实现。因此可以将 HIF-1α 作为胃癌患者判断生物学行为及预后的指标之一,也为临床提供靶向治疗的方向。

【关键词】胃肿瘤;HIF-1α;VEGF

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-24

Relationship between the expressions of HIF-1α and VEGF in gastric cancers and its clinical significance

WAN Mei-zhen, et al

(*Department of Pathology, Changzhou Tumor Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the expressions of HIF-1α and VEGF in gastric cancers, and explore the correlation between HIF-1α and VEGF. *Methods*: The expressions of HIF-1α and VEGF in 84 specimens of gastric cancer and paracancerous normal tissues were detected by SP immunohistochemistry and the correlations of HIF-1α and VEGF to clinicopathologic features and association between HIF-1α and VEGF were analyzed with Sas 8.0 software. *Results*: Of the 84 specimens, the positive rate of HIF-1α expression was 60.7%(51/84), and it was much higher than that in paracancerous normal tissues (16.7%, 14/84, $P<0.05$). HIF-1α expression in tissues with lymph node metastasis(79.1%) was much higher than that in tissues without no lymph node metastasis 41.5%($P<0.05$). The expression rates of HIF-1α in cancer tissues with the invasion depth as the mucous membrane or under, muscle layer or under serosa, and penetrating the serosa were 29.2%, 62.2% and 91.3% respectively($P<0.05$). Expression rates of HIF-1α in cancer tissues with no or low differentiation, and medium or high differentiation were 76% and 54.2% respectively($P>0.05$). Expression rates in cancer tissues with tumor size≤5cm and >5cm were 64.7% and 58% respectively($P<0.05$), The rate for male was 63% while that for female was 59.7%($P>0.05$), The rate for patients aged <60 was 52.3%, while that for those aged≥60 was 70%($P>0.05$). The positive rate of VEGF expression was 73.8%(62/84). The expression of VEGF was significantly associated with that of HIF-1α($P<0.05$). *Conclusion*: The expression of HIF-1α is correlated to lymph node metastasis and the depth of invasion, The function of HIF-1α realizes partially through the expression of VEGF. Therefore, HIF-1α could serve as a parameter for evaluating malignancy and prediction of prognosis of gastric cancer and HIF-1α may be a direction of clinical therapy.

【Key words】 Gastric neoplasm; HIF-1α; VEGF

作者介绍:万美珍(1962-),女,副主任医师,
研究方向:消化道肿瘤病理

基金项目:常州市卫生局科研基金资助项目。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胃癌是最常见的癌肿之一,据统计占我国消化道恶性肿瘤的第一位,全身癌肿的第三位。近来研究表明,许多肿瘤包括前列腺、头颈部位的肿瘤中,肿瘤乏氧是预后不好的独立预测指标[1]。肿瘤的发生发展和血管生成与慢性缺氧有关。HIF-1α 在细胞缺氧环境中扮演重要作用,并能诱导其下游基因的表达,从而引起相应的代谢改变及提高氧供,而 VEGF 是肿瘤血管形成过程中最重要的刺激因子,同时是 HIF-1α 重要的靶基因。国内外有不多的文章就两者及其相互关系进行了阐述,但各家说法不一。本文旨在采用免疫组织化学方法检测 84 例胃癌组织中 HIF-1α、VEGF 的表达与临床病理间的关系及其两者的相关性。

1 资料与方法

1.1 研究资料

收集 1998～2005 年在我院接受手术的初诊胃癌组织标本 84 例,经 10%甲醛固定后常规石蜡包埋 3μm 厚连续切片。84 例中按组织学分级,未或低分化型 25 例,中或高分化型 59 例。按侵润深度分级,侵润主粘膜或粘膜下 24 例,侵润至肌层或浆膜下 37 例,穿透浆膜层 23 例。按淋巴结转移分级,有淋巴结转移 43 例,无淋巴结转移 41 例。按大小分级,≤5cm34 例,>5cm50 例。其中男性 46 例,女性 38 例。年龄 39～82 岁,<60 岁 44 例,≥60 岁 40 例。

1.2 主要试剂

鼠抗人 HIF-1α、VEGF 单克隆抗体及其它相关试剂购于福州迈新公司。

1.3 检测方法

采用免疫组织化学 SP 法。石蜡包埋的组织 4μm 连续切片;二甲苯脱蜡,乙醇梯度水化;3%过氧化物消除内源性过氧化物酶;EDTA 修复;正常羊血清室温下封闭;加入即用型一抗(鼠抗人 HIF-1α 单抗,鼠抗人 VEGF 单抗)4℃冰箱过夜;PBS 清洗,加入二抗,孵育 0.5h,冲洗后 DAB 显色,苏木精对比染色,中性树胶封片。

1.4 结果判断

由病理科专科医生独立阅片,对照 HE 染色确定肿瘤细胞区域,于显微镜下观察,每例观察 2 张切片,每张切片任意观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞。HIF-1α 的结果判断按照肿瘤细胞的染色比例分级。以伴或不伴胞浆染色的细胞核染色为阳性计数标准[2]。未着色(-);核染色 <1%(+);核染色 1%～10%伴或不伴胞浆弱染色(++);核染色 10%～50%伴或不伴明显的胞浆染色(+++);核染色 >50%伴或不伴强烈的胞浆染色(++++);我们认定前 3 个等级为阴

表 1 HIF-1α 与胃癌临床病理因素的关系

临床病理指标	n	HIF-1α		VEGF	
		阳性(%)	P 值	阳性(%)	P 值
性别					
男	46	29(63)		34(73.9)	
女	38	22(57.9)	>0.05	28(73.6)	>0.05
年龄					
<60	44	23(52.3)		31(70.5)	
≥60	40	28(70)	>0.05	31(77.5)	>0.05
分化程度					
差	25	19(76)		19(76)	
好	59	32(54.2)	<0.05	43(72.9)	>0.05
淋巴结转移					
有	43	34(79.1)		39(90.7)	
无	41	17(41.5)	<0.05	23(56.1)	<0.05
侵润深度					
T_1	24	7(29.2)		9(37.5)	
T_2	37	23(62.2)		31(83.8)	
T_3	23	21(91.3)	<0.05	22(95.7)	<0.05
肿瘤大小					
≤5cm	34	22(64.7)		18(52.9)	
>5cm	50	29(58)	>0.05	44(88)	<0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 胃癌 HIF-1α 免疫组化阳性表达(SP×100)

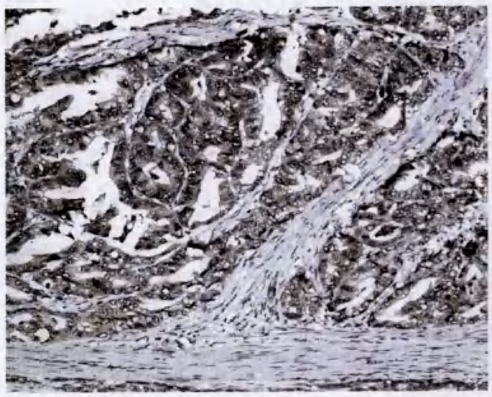


图 2 胃癌 VEGF 免疫组化阳性表达(SP×100)

性表达,后 2 个等级为阳性表达。VEGF 的结果判断按照肿瘤细胞的染色比例分级,胞浆染色为阳性计数标准,我们认为<10%的胞浆染色为阴性表达;≥10%为阳性表达。

1.5 统计学处理

使用 SAS8.0 软件统计分析,进行配对 χ^2 检验及 Fishers 确切检验,检验水准为双侧 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 癌组织与癌旁组织中 HIF-1α、VEGF 的表达及比较

HIF-1α 阳性染色表现为分布于细胞核上伴或不伴胞浆中的棕褐色颗粒(见图 1)。84 例胃癌组织中,HIF-1α 阳性表达为 60.7%(51/84)。在 84 例癌旁内对照正常胃组织中出现阳性表达为 16.7%(14/84),见于腺体及间质中。癌组织中 HIF-1α 的阳性率显著高于癌旁内对照组织($P<0.05$)。VEGF 阳性染色表现为分布于胞浆中的棕褐色颗粒,其阳性表达率为 73.8%(62/84)。癌旁内对照正常胃组织中出现阳性表达为 10.7%(9/84),癌组织中 VEGF 的阳性率显著高于癌旁内对照组织($P<0.05$)。

2.2 胃癌组织中 HIF-1α 的表达与淋巴结转移、侵润深度、肿瘤大小、组织学分级、年龄、性别等因素之间的关系(表 1)

有、无淋巴结转移的癌组织中 HIF-1α 的表达率分别为 79.1%、41.5%,有淋巴结转移的癌组织中 HIF-1α 的阳性率明显高于无淋巴结转移的胃癌组织($P<0.05$);侵润深度分别为粘膜或粘膜下、肌层或浆膜下、穿透浆膜层的癌组织中 HIF-1α 的表达率分别为 29.2%、62.2%、91.3%,侵润至肌层或浆膜下、穿透浆膜层的癌组织中 HIF-1α 的阳性率明显高于侵润至粘膜或粘膜下的癌组织($P<0.05$),穿透浆膜层的癌组织中 HIF-1α 的阳性率明显高于侵润至肌层或浆膜下的癌组织($P<0.05$);未或低分化、中或高分化的癌组织中 HIF-1α 的表达率分别为 76%、54.2%,两者的表达率间无差异($P>0.05$);肿瘤大小≤5cm、>5cm 的癌组织中 HIF-1α 的阳性表达率分别为 64.7%、58%,两者的表达率间无差异($P>0.05$);男性为 63%,女性为 57.9%,两者间无差异($P>0.05$);<60 岁为 52.3%,≥60 岁为 70%,两者间无明显差异($P>0.05$)。

2.3 胃癌组织中 VEGF 的表达与淋巴结转移、侵润深度、肿瘤大小、组织学分级、年龄、性别等因素之间的关系(表 1,图 2)

有、无淋巴结转移的癌组织中 VEGF 的表达率分别为 90.7%、56.1%,有淋巴结转移的癌组织中 VEGF 的阳性率明显高于无淋巴结转移的胃癌组织($P<0.05$);侵润深度分别为粘膜或粘膜下、肌层或浆膜下、穿透浆膜层的癌组织中 VEGF 的表达率分别为 37.5%、83.8%、95.7%,侵润至肌层或浆膜下、穿透浆膜层的癌组织中 VEGF 的阳性率明显高于侵润至粘膜或粘膜下的癌组织($P<0.05$),穿透浆膜层的癌组织中 VEGF 的阳性率明显高于侵润至肌层或浆膜下的癌组织($P<0.05$);未或低分化、中或高分化的癌组织中 VEGF 的表达率分别为 76%、72.9%,两者的表达率间无差异($P>0.05$);肿瘤大小≤5cm、>5cm 的癌组织中 VEGF 的阳性表达率分别为 52.9%、88%,两者的表达率间有差异($P<0.05$);男性为 73.9%,女性为 73.6%,两者间无差异($P>0.05$);<60 岁为 70.5%,≥60 岁为 77.5%,两者间无明显差异($P>0.05$)。

2.4 HIF-1α 与 VEGF 的相关性

HIF-1α 与 VEGF 的表达显出相关性,$P<0.05$,表 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 HIF-1α 与 VEGF 表达的关系

		VEGF		χ^2
		+	−	
HIF-1α	+	42	9	
	−	20	13	4.956

3 讨 论

许多实体肿瘤都存在缺氧的现象。缺氧使肿瘤细胞失去凋亡的潜力,增强生成血管及其侵袭的能力,使其更容易侵犯周围组织及远处转移[3]。那么它通过什么机制来实现的呢? 缺氧诱导因子(HIF-1)处于肿瘤缺氧的中枢位置, 它是由 HIF-1α 和 HIF-1β 组成的异源性二聚体。HIF-1α 是其活性调节亚单位。HIF-1β 在任何情况下均持续稳定的表达,HIF-1α 在正常条件下表达很低, 但在氧浓度下降时, 其转录翻译水平则呈指数增加 [4]。因此 HIF-1α 是缺氧的产物之一。

在许多肿瘤中已证实 HIF-1α 的表达增强预示肿瘤细胞具有更强的侵袭性及转移能力[5]。在胃癌中,Mizokami 认为 HIF-1α 可以作为胃癌患者的独立预后指标之一[6]。韩冰也认为 HIF-1α 可作为评估胃癌发展、转移及预后的参考指标之一[7]。但 Urano 则认为在胃癌中 HIF-1α 与 VEGF 表达相关,但与其临床病理特征及病人的预后情况无关[8]。在我们的研究中,发现 HIF-1α 与胃癌的侵润深度及淋巴结转移具有明显的相关性,而与组织学分级,肿瘤大小无关,即随着肿瘤组织向外侵润,HIF-1α 表达增强,随着淋巴结转移的发生,HIF-1α 表达也随之增强。同时结果显示 HIF-1α 在癌旁的正常组织几乎不表达,在坏死区域表达增强,这表明 HIF-1α 不仅参与肿瘤细胞侵袭性增强与淋巴结转移,且与肿瘤的发生有关。因此, 我们有理由认为 HIF-1α 可以作为判断胃癌侵润转移倾向的指标之一,是可以作为判断胃癌患者的预后指标之一。而实验中出现的 HIF-1α 与肿瘤大小无关的现象,我们认为在一定程度上解释了肿瘤的大小并不决定肿瘤细胞侵润转移的能力,临床病理检查中经常遇到这样的情况:体积较大的肿瘤无淋巴结转移,而体积小的也会发生淋巴结转移及浆膜外的侵润。至于 HIF-1α 与组织学的关系应该加大样本作进一步的探讨。

那么 HIF-1α 又是通过什么机制实现其作用呢? 有学者认为 HIF-1α 连于几个缺氧反应基因的反应元件上,调控多种基因的表达,而这些靶基因涉及肿瘤细胞的能量代谢、血管生成,对肿瘤生长和转移发挥重要作用,因此通过激活这些基因参与肿瘤的发生发展,即血管生成,细胞增生、凋亡、侵润及转移的过程[9]。VEGF 是血管生成因子,是 HIF-1α 重要的靶基因。许多学者发现在脑肿瘤、卵巢肿瘤中 HIF-1α 的高表达与肿瘤中血管密度相关,提示 HIF-1α 参与血管的生成[10]。VEGF 在肿瘤细胞的侵润能力与转移潜力扮演重要的作用[11-13]。Folkman 推断实体肿瘤的生长与转移均与血管生成密不可分,这是肿瘤发展过程中的重要事件[14]。我们的数据显示了在胃癌中 HIF-1α 和 VEGF 在肿瘤侵润与转移扮演重要作用,VEGF 的表达与 HIF-1α 的表达具有明显的相关性。因此可以说明缺氧或其他因素诱发 VEGF 基因的转录,从而使 VEGF 表达增加,而这一过程受 HIF-1α 调控,且 HIF-1α 调节肿瘤侵润转移能力是通过 VEGF 的作用的。

综上所述,HIF-1α 与胃癌的侵润、淋巴结转移有关,并与 VEGF 的表达具有明显相关性,HIF-1α 的作用部分通过 VEGF 的表达实现。因此可以将 HIF-1α 作为胃癌患者判断生物学行为及预后的指标之一。也为临床提供靶向治疗的方向。

参 考 文 献

[1] Wouters BG,Weppler SA, Koritzinsky M,et al. Hypoxia as a target for combined modality treatments[J]. Eur J Cancer,2002;38(2):240-257.

[2] Chen WT,Huang CJ,Wu MT,et al. Hypoxia-inducible Factor-1 is Associated with Risk of Aggressive Behavior and Tumor Angiogenesis in Gastrointestinal Stromal Tumor[J]. Japanese Journal of Clinical Oncology,2005;35(4):207-213.

[3] Graeber TG,Osmanian C,Jacks T,et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors[J]. Nature,1996;379(6560):88-91.

[4] Semenza GL. HIF-1:using two hands to flip the angiogenic switch[J]. Cancer Metastasis Rev,2000;19(1-2):59-65.

[5] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression:pathophysiology and therapeutics[J]. Trends Mol Med,2002;8(4 suppl):S62-S67.

[6] Mizokami K,Kakeji Y,Oda S,et al. Clinicopathologic significance of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression in gastric carcinomas[J]. J Surg Oncol,2006;94(2):149-154.

[7] 韩 冰,徐瑞华,史艳侠,等. HIF-1α 在胃癌组织中的表达及

(下转第 556 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

少了 RD1 和 RD2 区域编码的 ESAT-6、CFP-10 和 MPT64 抗原蛋白质，而 H37Ra 存在 RD1 和 RD2 区域[5]。这些表明 H37Ra 的免疫原性较好、毒力较低，用作疫苗可能比较安全有效。

机体抗结核病免疫主要依靠 T 淋巴细胞介导的细胞免疫。MTB 经呼吸道进入肺泡后，肺泡巨噬细胞吞噬细菌，MTB 产生的抗原性物质，可分别经 MHC-II 类和 I 类分子途径激活机体的 $CD4^+$T 细胞和 $CD8^+$T 细胞[6]。活化的 $CD4^+$T 细胞产生 IFN-γ 和 IL-2 等细胞因子，其中 IFN-γ 可充分活化巨噬细胞，促其杀伤胞内吞噬的 MTB[7-9]。$CD8^+$T 细胞通过识别靶细胞，诱导细胞凋亡，破坏 MTB 生长环境，使新增抗原提呈细胞呈递 MTB 而起到免疫监视的作用。$CD8^+$T 细胞也能够分泌 IFN-γ。除产生细胞因子外，$CD8^+$T 细胞还直接攻击感染靶细胞，通过释放穿孔素或颗粒溶素(Granulysin)途径溶解感染细胞。CD3 是所有成熟 T 细胞表面标志。我们用结核菌 H37Ra 免疫小鼠后脾脏 $CD3^+$T 细胞、$CD4^+$T 细胞显著高于 NS 对照组，表明 H37Ra 免疫小鼠后能有效激活机体 T 淋巴细胞及其亚群，从而产生抗结核保护性免疫。H37Ra 免疫小鼠后脾脏 $CD3^+$T 细胞、$CD4^+$T 细胞及 $CD8^+$T 细胞的百分率均不同程度地高于 BCG 免疫小鼠，表明 H37Ra 可能比 BCG 更能激活 $CD4^+$T、$CD8^+$T 细胞，从而产生抗结核保护性免疫。PPD 特异性脾淋巴细胞增殖反应和 IFN-γ 的分泌水平，都说明 H37Ra 和 BCG 一样在小鼠体内诱导了免疫记忆，当再次遇到相同抗原刺激时便激活了更为强烈的细胞免疫应答。

Orme 等[10]认为，在 4～5 只小鼠为 1 组的实验中，如果某种处理措施能使肺部荷菌量下降 $0.7\log_{10}$ CFU 则为有效。本研究发现毒株 H37Rv 攻击 4 周后，H37Ra 免疫小鼠与 NS 对照组比较肺组织荷菌量下降 $0.954\log_{10}$CFU，说明 H37Ra 和 BCG 一样免疫小鼠后能够抵抗毒株 H37Rv 的攻击，表明 H37Ra 有可能作为新型结核疫苗。

参 考 文 献

[1] Behera,D. Global Tuberculosis Control:Surveillance,Planning,Financing[R]. Geneva:WHO,2007.

[2] Fattorini L. Strategies for the development of new tuberculosis vaccines[J]. Minerva Med,2007;98(2):109-119.

[3] Orme IM. Tuberculosis vaccines:current progress[J]. Drugs,2005;65(17):2437-2444.

[4] North RJ,Izzo AA. Mycobacterial virulence. Virulent strains of Mycobacteria tuberculosis have faster in vivo doubling times and are better equipped to resist growth-inhibiting functions of macrophages in the presence and absence of specific immunity[J]. J Exp Med,1993;177(6):1723-1733.

[5] Kalra M,Grover A,Mehta N,et al. Supplementation with RD antigens enhances the protective efficacy of BCG in tuberculous mice [J]. Clin Immunol,2007;125(2):173-183.

[6] Yoshikai Y. Immunological protection against mycobacterium tuberculosis infection[J]. Crit Rev Immunol,2006;26(6):515-526.

[7] Mitsuyama M,Akagawa K,Kobayashi K,et al. Up-to-date understanding of tuberculosis immunity[J]. Kekkaku,2003;78(1):51-55.

[8] MacMicking JD,Taylor GA, Mckinney JD,et al. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47[J]. Science,2003;302(5645):654-659.

[9] 陶 昆，卢资瑜，陈思静，等. 结核菌 H37Ra 免疫小鼠后机体抗结核细胞免疫功能的研究[J]. 第三军医大学学报，2006;28(11):1195-1197.

[10] Orme IM,McMurray DN,Belisle JT,et al. Tuberculosis vaccine development:recent progress[J]. Trends Microbiol,2001;9(3):115-118.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 552 页)

临床意义[J]. 癌症，2006;25(11):1439-1442.

[8] Urano N, Fujiwara Y,Doki Y,et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in gastric adenocarcinoma[J]. Gastric Cancer,2006;9(1):44-49.

[9] Forsythe JA,Jiang BH,Iyer NV,et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1[J]. Mol Cell Biol,1996;16(9):4604-4613.

[10] Mizukami Y, Li J,Zhang X,et al. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer[J]. Cancer Res,2004;64(5):1765-1772.

[11] Dvorak HF,Brown LF,Detmar M,et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor,microvascular hypermeability, and angiogenesis[J]. Am J Pathol,1995;146(5):1029-1039.

[12] 梁启廉，陈小东，王三明，等. VEGF 和抑痰基因 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.

[13] HIF-1α、JNK1、P-gp、MRP1 和 LRP 蛋白在胃痰中的表达与临床病理及预后的关系[J]. 第三军医大学学报，2007;29(18):1755-1759.

[14] Folkman J,Watson K,Ingber D,et al. Inducation of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasis[J]. Nature,1989;339(6219):58-61.

(责任编辑：关蕴良)