维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0608－04

VEGF 和 Flt－1 表达和 MVD 计数与良性前列腺增生关系的研究

吴小候，梁鲁南

(重庆医科大学临床学院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨良性前列腺增生组织 VEGF、Flt－1 表达和 MVD 计数的意义。方法:采用免疫组织化学 S－P 法,检测 37 例良性前列腺增生和 6 例正常前列腺组织 VEGF、Fit－1 表达和 MVD 计数。结果:37 例良性前列腺增生组织 VEGF 阳性表达率 78.4%,6 例正常前列腺组织 VEGF 均为阴性表达,两者差异有显著意义。良性前列腺增生和正常前列腺组织 Fit－1 表达均为阳性,两者无显著差异。良性前列腺增生组织 MVD 值 8.00±3.28 明显高于正常前列腺组织的 4.83±1.83。VEGF 表达与 MVD 计数呈正相关,VEGF 与 Flt－1 表达呈正相关,Flt－1 表达与 MVD 计数无相关性;前列腺体积与 VEGF、Flt－1 表达和 MVD 计数无相关性。结论:在前列腺增生过程中,VEGF 表达和血管生成明显加强,提示 VEGF 可能参与良性前列腺增生,而 Flt－1 的作用并不明显。

【关键词】良性前列腺增生;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体－1,微血管密度

【中国图书分类法分类号】R697⁺.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－02－27

The expression of VEGF, Flt－1 and MVD in benign prostatic hyperplasia

WU Xiaohou, et al

(*Department of Urology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the MVD and the expression of VEGF, Flt－1 in benign prostatic hyperplasia (BPH). *Methods*: Immunohistochemical staining (S－P) was used to examine MVD and the expression of VEGF, Flt－1 in 37 cases of BPH and 6 cases of normal prostate (NP). *Results*: VEGF expression was negative in all 6 NP; the positive rate of VEGF in 37 BPH was 78.4%. Statistical significance existed between the two groups ($P<0.05$). The expression of Flt－1 were positive in two groups, and no statistical significance existed ($P>0.05$). MVD parameter was 4.83±1.83 in NP and 8.00±3.28 in BPH, while statistical significance existed between the two groups ($P<0.05$). In BPH, the expression of VEGF correlated to both MVD and Flt－1 ($P<0.05$), and Flt－1 did not correlate to MVD ($P>0.05$). There was no correlation between the size of prostate and MVD and the expression of both VEGF and Flt－1 in BPH ($P>0.05$). *Conclusion*: In the progress of benign prostatic hyperplasia, the expression of VEGF and angiogenesis are significantly developed. VEGF palys a necessary role in pathogenesis and development of BPH, but Flt－1 is a less important factor.

【Key words】Menign prostatic hyperplasia; Vascular endothelial growth factor; Fms－like tyrosine kinase receptor; Microvessel density

良性前列腺增生是老年男性常见病,可引起尿频。排尿困难,尿潴留、血尿等一系列临床症状,目前对良性前列腺增生的病因尚未完全了解,一般认为除性激素、细胞凋亡等原因外,多种细胞生长因子可能也参与了良性前列腺增生的发生。目前有关 VEGF 与 Flt－1 之间,以及二者与前列腺增生的关系研究尚少,本研究采用免疫组化法检测前列腺增生和正常前列腺组织 VEGF、Flt－1 表达和 MVD 计数,以探讨其临床意义。

作者介绍:吴小候(1954－),男,教授,
主要研究方向:泌尿系统疾病。

1 材料和方法

1.1 研究对象

良性前列腺增生症住院患者 37 例,年龄 58～87 岁,平均 71.3 岁。均行 TURP 治疗。6 例正常前列腺取自全膀胱切除者,年龄 20～35 岁,平均年龄 23.8 岁,作为对照组,将前列腺组织用福尔马林固定后石蜡包埋,切片厚 5μm,所有

维普资讯 http://www.cqvip.com

标本均常规 HE 染色,行病理组织学检查。

1.2 免疫组化染色法(S-P)

采用链霉素亲生物素过氧化物酶连接法(S-P 法)。石腊切片脱腊水化,3% 双氧水浸泡 10min,加免疫性动物血清,加一抗 VEGF、Flt-1 和 -CD_{31} 单抗 60min,加二抗及 S-P 复合物各 10min,DAB 显色,苏木素复染,各步之间用 PBS 液冲洗,以 PBS 液代替一抗作阴性对照。

1.3 试剂

通用型 SP 试剂盒,即用型 Mouse Monolonal Anti-VEGF 和即用型 Mouse Monolonal Anti-CD_{31} 购自福州迈新公司。即用型 Rabbit Polyclonal Anti-Flt-1 购自武汉博士公司。

1.4 检测指标

1.4.1 VEGF 表达 VEGF 表达主要定位于增生的前列腺上皮细胞浆或细胞膜,一些血管内皮细胞也有 VEGF 弱阳性表达,细胞浆或细胞膜呈棕黄染色者为 VEGF 表达阳性细胞。阳性细胞<10% 或未染色为 VEGF 表达阴性,记为"-";阳性细胞≥10%<50% 为"+",≥50% 为"++"[1]。

1.4.2 Flt-1 表达 Flt-1 主要分布于前列腺腺上皮细胞浆或细胞膜、前列腺间质细胞[1]。判断方法同 VEGF。

1.4.3 CD_{31} 表达及 MVD 计数 CD_{31} 可特异地使微血管内皮染色。在前列腺间质区凡染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为一个血管计数,肌层较厚及管腔面积大于 8 个红细胞直经的血管不计数;每张染色切片首先在 100 倍镜下选择 3 个血管最多的前列腺间质区,其后在 200 倍视野下进行血管计数,每例标本分别计数 5 个视野,取平均值[2]。

1.5 统计方法

采用 SAS6.12 软件(重庆医科大学统计教研室),根据资料性质分别采用 χ^2 检验、秩和检验、t 检验、Spearman 相关分析。显著性水平 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 VEGF 在良性前列腺增生和正常前列腺组织的表达

VEGF 表达主要定位于增生的前列腺上皮细胞浆或细胞膜,一些血管内皮细胞也有 VEGF 弱刚性表达,阳性着色为棕黄色。37 例良性前列腺增生组织 VEGF 表达"-"8 例(21.6%),"+"20 例(54.1%),"++"9 例(24.3%);6 例正常前列腺组织 VEGF 表达"-"6 例(100%),两者差异有显著意义($P<0.05$)。

2.2 Flt-1 在良性前列腺增生和正常前列腺组织的表达

Flt-1 表达定位于前列腺上皮细胞浆或细胞膜,在前列腺间质细胞、血管内皮细胞也有 Flt-1 弱阳性表达,阳性着色为棕黄色颗粒。37 例良性前列腺增生组织 Flt-1 表达"+"24 例(64.9%),"++"例(35.1%),6 例正常前列腺组织 Flt-1 表达均"+"(100%),经秩和检验良性前列腺增生与正常前列腺组织 Flt-1 表达无显著性差异($\chi^2=1.522$, $P>0.05$)。

2.3 良性前列腺增生和正常前列腺组织中 CD_{31} 表达及 MVD 计数

CD_{31} 刚性染色表现为血管内皮细胞浆棕黄色颗粒。前列腺间质内微血管大小、形态差异较大,部分表现为单皮细胞、内皮细胞簇或无明显管腔,管腔明显不规则;微血管分布呈明显异质性,前列腺结节区微血管较丰富。通过 CD_{31} 阳性表达结果计数前列腺组织中的 MVD。37 例良性前列腺增生组织 MVD 值为 0.08±3.28 个(3~16 个),6 例正常前列腺组织 MVD 值为 4.48±1.38 个(3~7 个),经 t 检验两组 MVD 差异有显著性意义($t=2.29$, $P<0.05$)。

2.4 良性前列腺增生体积与 VEGF、Flt-1 和 MVD 的关系

Spearman 相关分析示,良性前列腺增生体积与 VEGF 表达无相关性($r=0.04326$, $P>0.05$),体积与 MVD 计数无相关性(-0.0441, $P>0.05$),体积与 Flt-1 表达无相关性($r=-0.31826$, $P>0.05$),但 P 值接近 0.05($P=0.0549$)。

2.5 良性前列腺增生组织 VEGF、Flt-1 表达以及 MVD 计数的相互关系

Spearman 相关分析示,良性前列腺增生组织 VEGF 与 Flt-1 表达呈正相关($r=0.38983$, $P<0.05$),VEGF 表达与 MVD 计数呈正相关($r=0.64804$, $P<0.0001$),Flt-1 表达与 MVD 计数无相关性($r=0.15202$, $P>0.05$)。

3 讨 论

VEGF 调控血管生成的作用强、特异性高,通过作用于内皮细胞上的特异性受体而发挥其生物学作用,现已证实 VEGF 及其家族成员在肿瘤血管生成及其它生理、病理的血管生成中都是必不可少的诱导因子。人 VEGF 基因位于染色体 6P21.3,全长 14Kb,由 8 个外显子和 7 个内含子组成。VEGF 有两个高亲和力受体,即 Flt-1 和 KDR/Flt-1,它们表达于血管内皮细胞,VEGF 受体基因研究表明[3],

维普资讯 http://www.cqvip.com

KDR 与血管形成和造血有关,Flt－1 在内皮细胞排列形成管腔时发挥主要作用。Habn 等[4]推测 Flt－1 在良性前列腺增生发病中起主要作用。

MVD 是目前公认的评价血管生成的标准,利用抗血管内皮某些特殊成分(细胞粘附分子 CD_{31}、CD_{34}、或Ⅷ因子抗原)的单克隆抗体进行免疫组化染色可显示出组织的微血管成分,以便计数 MVD 值。

3.1 VEGF、Flt－1 和 MVD 计数与前列腺增生的关系

人胚胎前列腺成纤维细胞可产生 VEGF,成年后 VEGF 下降,良性前列腺增生或肿瘤时 VEGF 又增多。Doll 等[5]发现在前列腺疾病发展过程中,血管生成抑制因子—血小板反应素－1(TSP－1)产生减少,而血管生成因子—VEGF 和(或)FGF－2 产生增加。本组采用免疫组化法检测发现 37 例良性前列腺增生组织 VEGF 阳性表达(＋～＋＋)29 例,而 6 例正常前列腺组织未见 VEGF 表达,良性前列腺增生组织与正常前列腺组织 VEGF 表达有显著性差异($P<0.05$)。结果表明良性前列腺增生组织 VEGF 表达明显高于正常前列腺组织,提示 VEGF 在良性前列腺增生发病过程中可能起一定的作用。

Flt－1 特异表达于血管内皮细胞,Ferrer 等[6]发现除了前列腺癌细胞、血管内皮细胞表达 Flt－1 外,良性增生的前列腺腺上皮也有 Flt－1 表达。目前国内有关 Flt－1 蛋白在良性前列腺增生组织的表达尚未见报道。本实验发现 37 例良性前列腺增生组织和 6 例正常前列腺组织的腺上皮及间质均有 Flt－1 表达,在前列腺血管内皮细胞也有弱阳性表达,但是 Fit－1 在良性前列腺增生和正常前列腺组织表达强度无显著性差异($P>0.05$)。结果提示,前列腺在增生过程中,Flt－1 并没有明显增加,推测 Flt－1 与前列腺增生发病过程关系不大。研究还发现随着前列腺体积增大,其 Flt－1 表达反而减弱,虽然无统计学差异,但 P 值非常接近 0.05($P=0.0549$),其临床意义不清,有可能前列腺中 Flt－1 数目基本恒定,当前列腺体积增大时,Flt－1 并无相应增多所致。

Deering 等[7]发现良性前列腺增生组织中结节区 MVD 显著高于非结节区,认为良性前列腺增生结节形成及发展需要增加血液供应。在本实验中,我们观察良性前列腺增生组织 MVD 计数,发现 37 例前列腺增生组织 MVD 值为 8.00±3.28 个(3～16 个),6 例正常前列腺组织 MVD 值为 4.83±1.83 个(3～7 个),两者比较有显著性意义($P<0.01$),表明良性前列腺增生组织 MVD 值明显高于正常前列腺组织,提示良性前列腺增生的发生有新生血管的参与。同时还发现 VEGF 强阳性(＋＋)表达的前列腺结节区微血管数目明显增多,VEGF 表达与血管生成部位具有一致性。

综上所述,在良性前列腺增生发生和发展过程中,血管生成明显增强,表现为 VEGF 表达和 MVD 计数增加。VEGF 参与了良性前列腺增生发生和发展过程,Flt－1 在前列腺增生过程中作用不大。

3.2 VEGF、Flt－1 和 MVD 的相互关系

VEGF 不仅作为旁分泌因子刺激血管内皮细胞增殖,同时还可能作为自分泌因子通过直接作用于前列腺上皮细胞自身的 Flt－1 而促进腺上皮细胞生长。Weingartner 等[8]认为 VEGF 与 Flt－1 结合可促进新生血管形成及前列腺增生。Barleon 等[9]发现向各种癌细胞株的培养基中添加外源性 VEGF 可以提高癌细胞 Flt－1mRNA 表达,因而认为 VEGF 对其受体的表达有诱导作用。本实验结果经 Spearman 相关分析,表明良性前列腺增生组织 VEGF 表达与 Flt－1 表达呈正相关(spearman $r=0.38938$ $P=0.0171$),VEGF 表达与 MVD 计数亦呈正相关(spearman $r=0.64804$ $P<0.0001$)。我们推测在良性前列腺增生过程中 VEGF 的过度表达可以上调 Flt－1 表达,VEGF 通过与 Flt－1 作用发挥其生物学作用,二者结合促进新生血管的形成,MVD 增加,同时促进前列腺增生。实验结果还表明,前列腺增生组织中 Flt－1 表达与 MVD 计数之间无明显相关性。

参 考 文 献

[1] Ravindranath N, Wion D, Bracher P, et al. Eidermal Growth factor modulated the expression of vascular endothelial growth factor in the human prostate[J]. JAndrol, 2001;22(3):432－443.

[2] Welder N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis; anew significant and independent prognostic indicator in early syage breast carcinoma[J]. JNatl Cancer Inst, 1992;84:1875－1882.

[3] Lin P, Sanlar S, Shan S, et al. Inhitition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor[J]. Cell grow Differ, 1998;9:

维普资讯 http://www.cqvip.com

49.

[4] Hahn D, Simak R, SteinerGE, et al. Expression of the VEGF - receptor Flt - 1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues[J]. J Urol, 2000; 164(2): 506 - 510.

[5] Doll JA, Reiher FK, Crawford SE, et al. Thrombospondin - 1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor - 2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate[J]. Prostate, 2001; 49(4): 293 - 305.

[6] Ferrer FA, Miller LJ, Lindquist R, et al. Exprression of vascular endothelial growth factor receptor in human prostate cancer[J]. J Urol, 1999; 54: 567 - 572.

[7] Deering ME, Bigler SA, Brown M, et al. Microvascularity in benign prostatic hyperplasia[J]. Prostate, 1995; 26: 111 - 115.

[8] Weingartner K, Ben Sasson SA, Stewart R, et al. Endothelial cell proliferstion activity in BPH and prostate cancer, an in vitro model for assessment[J]. J Urol, 1998; 159: 465 - 470.

[9] Barleon B, Sieister G, Martiny - Baron G, et al. Vascular endothelial growth factor up - regulates its receptor fims - like tyrosine linase(Flt - 1) and a soluble variant of Flt - 1 in human vascular endothelial cells[J]. Cancer Res, 1997; 57(23): 5421 - 5425.

(上接第 593 页)区人群[7] 10/10 和 10/12 基因型出现频率最高，10/11、10/13、11/13、12/12、12/13 次之，其中 10/10、10/16、11/11、11/12、12/14 和 13/13 基因型在西南地区和华北地区汉族之间差异有显著性，提示不同地域的中国汉族人群 NOS2 基因型存在一定差异，进一步的研究尚需扩大样本进行探讨。

与中国华北地区人群[7]和英国人群[8]比较，中国西南地区人群 $(CCTTT)_{11}$、$(CCTTT)_{15}$ 和 $(CCTTT)_{16}$等位基因频率与华北人群差异不显著，而与英国人群差异有显著性；$(CCTTT)_{9}$、$(CCTTT)_{10}$等位基因频率与华北人群和英国人群差异均有显著性；$(CCTTT)_{12}$、$(CCTTT)_{13}$等位基因频率与英国人群差异不显著，而与华北人群差异有显著性；$(CCTTT)_{14}$等位基因频率与华北人群和英国人群差异均无显著性。以上均提示，NOS2 基因 (CCTTT)n 微卫星多态性在不同种族间存在差异，且在同一种族不同地区也存在着差异，因此，对该多态性与相关疾病的研究，应该在不同种族、不同地区中分别进行。不同微卫星多态性是否均存在此种地域差异，需要进一步的研究。

本研究发现了 NOS2 基因 9 个等位基因，未发现华北地区人群和英国人群均出现的 8 等位基因及华北地区人群中出现的 18、19 等位基因，可能与地域差异有关，但也可能是样本不足所致，因此有待于增加样本进行研究。

参 考 文 献

[1] Rudic RD, Sheseley EG, Maeda N, et al. Direct evidence for the importance of endothelium - derived nitric oxide in vascular remodeling[J]. J. Clin. Invest, 1998; 101: 731 - 736.

[2] Xu W, Liu L, Emson PC, et al. Evolution of a homopurine - homopyrimidine pentanucleotide repeat sequence upstream of the human inducible nitric oxide synthase gene[J]. Gene, 1997; 204: 165 - 170.

[3] 孙宏玉，郭景元. STR 基因等位基因阶梯制备方法尝试[J]. 中国法医学杂志，2000; 15(s): 33 - 34.

[4] Hou Y, Prinz M, Staak M. Comparison of different tests for deviation from Hardy - Weinberg equilibrium of AMFLP population data[M]. In: Bar W, Fiori A, Rossi U. eds. Advances in forensic haemogenetics 5. Berlin, Heideberg, New York: Springer - Verlag, 1994; 511 - 514.

[5] Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups[J]. Genomics, 1992; 12: 141 - 153.

[6] Jin L, Chakraborty R. Population dynamics of DNA fingerprint patterns within and between populations[J]. Genet Res, 1994; 63(1): 1 - 9.

[7] 吕 星，路 萍，刑瑞云，等. 中国人诱导型一氧化氮合酶基因 STR 多态性研究[J]. 遗传学报，2002; 29: 290 - 293.

[8] Warpeha KM, Xu W, Lin L, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT) n repeat of NOS2A in diabetic retinopathy[J]. FASEB J, 1999; 13: 1825 - 1832.