DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.006


# 骨肉瘤 VEGF bFGF, TGF-β1和 TAF表达及其与血管生成的关系*

王 东** 肖华亮 李增鹏 陈 俐 (第三军医大学附属大坪医院病理科) 重庆, 400042

提 要 目的: 研究血管内皮生长因子 (VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、转化生长因子 β1 (TGF-β1)及其受体和肿瘤源性粘附因子 (TAF)在骨肉瘤中的表达特点,以及它们与肿瘤内微血管密度和病人预后的关系。方法: 应用免疫组化和形态计量检测 80例骨肉瘤微血管密度 (MVD), VEGF bFGF TGF-β1及其受体和 TAF的表达,并应用 COX比例风险模型检测上述因素和预后的关系。结果: 80例骨肉瘤中, VEGF/KDR强阳性 42例 (52.5%), bFGF/bFGFr阳性 46例 (57.5), TGF-β1/TGF-βR (RI)阳性 31例 (38.8%), TAF阳性 36例 (45%)。血管生成因子与其受体表达具有一致性,并与 MVD值显著相关。COX比例风险模型分析结果显示 MVD和 VEGF是影响骨肉瘤的重要因素 ($P<0.05$)。结论: VEGF bFGF FGF-β1和 TAF是骨肉瘤血管生成的重要因子,并通过促进血管生成影响病人的预后。其中 MVD和 VEGF是评估骨肉瘤病人预后的重要指标。

关键词 骨肿瘤;血管生成因子;预后
中图法分类号 R738.1

血管生成是肿瘤生长和转移的关键步骤[1]。最近的研究表明骨肉瘤和其它许多类型的肿瘤中肿瘤内微血管密度 (Microvascular density, MVD)是影响肿瘤预后的重要因素[2,3]。肿瘤血管生成是受多种血管生成因子调节的,如血管内皮生长因子 (Vascular endothelial cell growth factor, VEGF),碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF),转化生长因子 β-1(Transforming growth factor-β-1, TGF-β-1)和肿瘤源性粘附因子 (Tumor derived adhesion factor, TAF)等。本研究应用免疫组织化学方法检测 80例骨肉瘤上述血管生成因子的表达,并同时定量检测肿瘤微血管密度,旨在探讨各种血管生成因子表达与骨肉瘤血管密度及预后的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

选用 1968~1993年间长骨髓内型骨肉瘤 80例,其中手术切除标本 75例,活检标本 5例。截肢加化疗 35例 (43.8%),单纯性截肢 24例 (30%),瘤段切除灭活再植或断端融合 17例 (21.2%),活检未治 4例 (5%)。全部病例均有随访,总体 2年存活率为 33.8%, 5年存活率为 18.3%。

80例骨肉瘤中,男性 52例,女性 28例,男女比为 1.8∶1,年龄 11~68岁,平均 23岁,最高峰 10~19岁 54例,占 62.5%。肿瘤侵犯软组织者 74例 (92.5%),肿瘤直径 5~25 cm,平均 10 cm。组织学分组参照 Price三组法,组织学分型参照 Dahlin标准,并根据新的 WHO标准进行分类[4]。

### 1.2 免疫组化染色

全部标本均经 10%福尔马林液固定,石蜡包埋切片。所用抗体及其来源见表 1。LSAB试剂盒为 Dako公司产品,染色方法参照试剂盒说明进行。切片加一抗 FⅧ-RA和 CD31之前胰酶消化 20 min, PBS代替一抗作为阴性对照。

表 1 抗体类型及其来源

Tab 1 Type of antibodies and their source

| Antibodies | Type | Source | Dilution |
|---|---|---|---|
| FⅧ-Rag | Mouoclonal | Dako. Inc | 1∶20 |
| CD31 | Mouoclonal | Dako. Inc | 1∶20 |
| VEGF | Multiclonal | Santa Cruz | 1∶20 |
| VEGF receptor KDR | Multiclonal | Santa Cruz | 1∶20 |
| bFGF | Multiclonal | Santa Cruz | 1∶20 |
| FGFr | Mouoclonal | Santa Cruz | 1∶20 |
| TGF-β-1 | Multiclonal | Santa Cruz | 1∶20 |
| TGF-βR (RI) | Mouoclonal | Santa Cruz | 1∶20 |
| TAF | Mouoclonal | Gift of Miyazaki | 1∶50 |

### 1.3 肿瘤内 MVD计数[7]

应用 CMIAS真彩色图像分析系统测定。首先选取具有代表性的组织切片,排除肿瘤出血区及边缘反应区。低倍镜 (40×)观察确定每例切片中 3个血管密度最高区域 (热点区域),然后在高倍镜 (200×)下,计数每个区域的 MVD,其平均值即作为该例肿瘤的 MVD值。

### 1.4 统计学处理

MVD和血管生成因子表达与骨肉瘤临床病理的关系,应用 $\chi^2$检验。各种血管生成因子的表达和 MVD之间的相关性应用 Spearman等级相关分析。MVD及血管生成因子表达与病人预后的关系应用多因素 COX模型分析。所有统计学处理皆采用 SAS软件包完成 (重庆医科大学卫生统计学教研室)。

* 全军"九五"青年基金项目,军队-18
** 王 东,男,34岁,副主任医师,副教授,博士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 2 结果

### 2.1 肿瘤内 MVD计数

FⅧ-RA和 CD31阳性产物定位于血管内皮细胞胞浆,80例骨肉瘤中50例两种抗原皆为阳性,另外30例 FⅧ-RA阳性16例,CD31阳性14例。因此,本组肿瘤微血管密度是综合 FⅧ-RA和/或 CD31免疫组化染色结果计数的。80例骨肉瘤中 MVD值范围为7.3-93,中位数为31.1,平均值为35.4

### 2.2 骨肉瘤 VEGF和受体 KDR的表达

VEGF阳性产物主要定位于肿瘤细胞浆,见图1,毛细血管内皮细胞亦可见弱表达。VEGF受体 KDR表达主要见于内皮细胞胞浆。VEGF和 KDR表达基本一致。80例骨肉瘤中,(-)级组38例(47.5%),(+)级组42例(52.5%)。

### 2.3 骨肉瘤中 bFGF/bFGF受体(bFGFr)的表达

bFGF和 bFGFr在骨肉瘤中的表达亦具有一致性,即两者表达同时阴性或阳性。bFGF和 bFGFr主要定位于肿瘤细胞胞浆,在新生的毛细血管内皮细胞亦可见表达,见图2 80例骨肉瘤中,46例阳性,阳性率为57.5%。

### 2.4 骨肉瘤中 TGFβ1/TGFβ(RI)的表达

TGFβ1和其受体 TGFβ(RI)在骨肉瘤中均呈灶性表达,主要定位于肿瘤新生毛细血管内皮细胞,而在肿瘤细胞中很少表达,见图3 TGFβ1和 TGFβ(RI)表达有一致性,即两者表达同时阴性或阳性。本组有31例阳性,阳性率为38.8%。

### 2.5 骨肉瘤中 TAF的表达

80例骨肉瘤均有 TAF的表达,但表达强度和阳性细胞数量明显不同,据此将骨肉瘤分为两组。TAF阳性组36例(45%),阴性组44例(55%)。TAF主要定位于肿瘤细胞浆和肿瘤新生血管周围,在增生的血管内皮细胞亦见 TAF强表达,见图4 TAF在肿瘤细胞中的表达强度与血管周围的染色强度有很好的一致性。

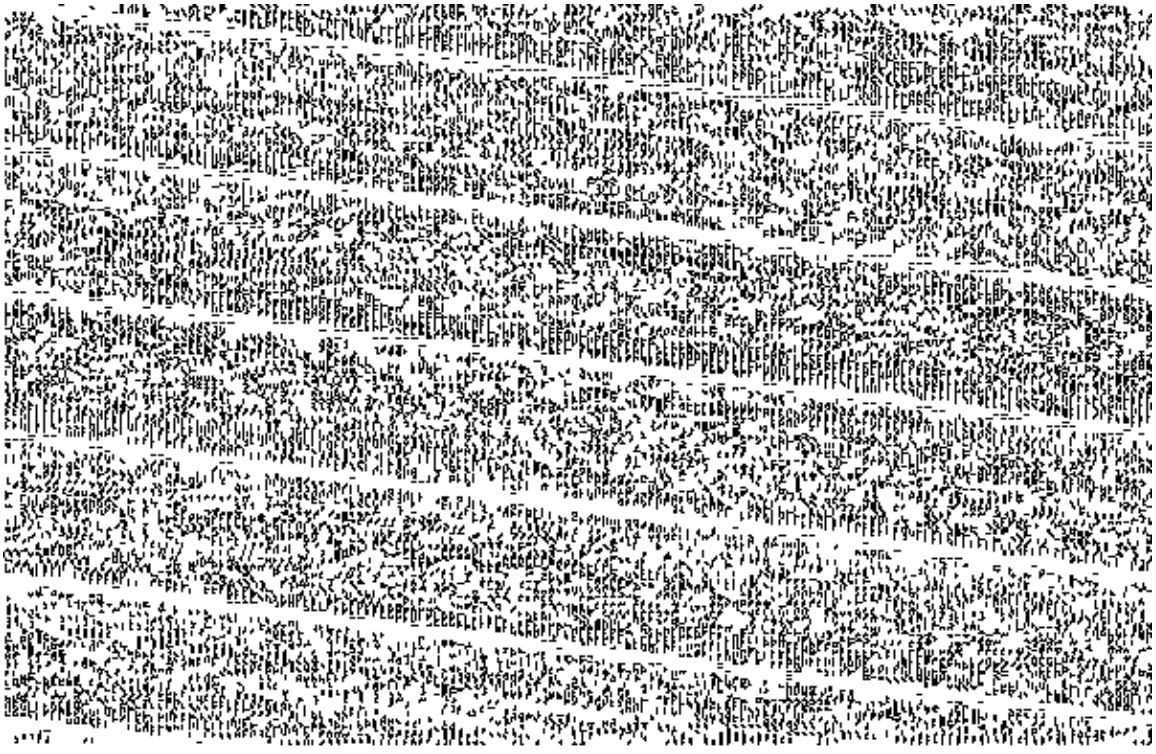


图1 骨肉瘤 VEGF免疫组化染色 阳性产物主要定位于肿瘤细胞浆(LSAB× 200)

**Fig 1 Immunohistochemical staining for VEGF in osteosarcoma**

Positive product is localized mainly in the cytoplasm of tumor cells (LSAB× 200)

图2 骨肉瘤 bFGF免疫组化染色 阳性产物主要定位于肿瘤细胞浆(LSAB× 200)

**Fig 2 Immunohistochemical staining for bFGF in osteosarcoma**

Positive product is mainly localized in the cytoplasm of tumor cells (LSAB× 200)

图3 骨肉瘤 TGFβ-1免疫组化染色 阳性产物主要定位于血管内皮细胞,呈灶性分布(LSAB× 200)

**Fig 3 Immunohistochemical staining for TGFβ-1 in osteosarcoma**

The positive product is localized mainly in the endothelial cells, showing focal pattern(LSAB× 200)

图4 骨肉瘤 TAF免疫组化染色 阳性产物主要定位于肿瘤细胞浆及毛细血管壁(TSAB× 200)

**Fig 4 Immunohistochemical staining for TAF in osteosarcoma**

Positive product is localized mainly in the wall of blood vessels and the cytoplasm of tumor cells (LSAB× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.6 骨肉瘤血管生成因子表达与临床病理的关系

肿瘤 MVD和血管生成因子的表达与肿瘤大小, Price分级和 Dahlin分型无关,而与 WHO新分型有关,即在高分化型中 MVD和血管生成因子的表达明显低于其它组织类型(表略)。

2.7 骨肉瘤血管生成因子表达及 MVD的相关分析

Spearman相关分析结果血管生成因子 VEGF FGF TGF-β1和 TAF表达有着显著相关性,而 TAF和 VEGF TAF和 TGFβ1相关性不显著。上述血管生成因子的表达与 MVD值均显著相关。

2.8 MVD和血管生成因子的表达与骨肉瘤预后

应用 COX比例风险模型,评估血管生成因子 VEGF bFGF TGFβ1、TAF和肿瘤内微血管密度 MVD与骨肉瘤病人预后的关系。用整体 COX模型分析结果显示各种血管生成因子与预后均显著相关,而用逐步 COX模型分析只有 MVD和 VEGF与病人预后显著相关,而 bFGF TGFβ1和 TAF对病人的预后影响不大,见表 2,这可能与 bFGF TGFβ1、TAF与 MVD VEGF相关显著有关。

表 2　MVD和血管生成因子的表达与骨肉瘤预后

**Tab 2　Correlation of MVD and the expression of angiogenic factors with the prognosis of patients with osteosarcoma**

| | DF | Parameter estimate | $S\bar{x}$ | $\chi^2$ | $P$ | Risk ratio |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MVD | 1 | 0.020568 | 0.00676 | 9.24803 | 0.0024 | 1.021 |
| VEGF | 1 | 0.660278 | 0.18218 | 13.13580 | 0.0003 | 1.935 |
| bFGF | 1 | 0.257551 | 0.29618 | 0.75617 | 0.3845 | 1.294 |
| TGFβ1 | 1 | -0.089103 | 0.29248 | 0.09281 | 0.7606 | 0.915 |
| TAF | 1 | 0.106932 | 0.31540 | 0.11494 | 0.7346 | 1.113 |

## 3　讨论

血管内皮生长因子(VEGF),亦称血管通透性因子(Vascular permeability factor, VPF),是由正常或肿瘤细胞产生的,分子量为(34~50)×$10^3$ u的二聚体蛋白[8]。VEGF受体有两种,即 Flt1/KDR和 Flk1。VEGF与内皮细胞的特异受体作用,通过旁分泌机制刺激内皮细胞的增生、移位和结构形成。此外,它亦具有增加血管通透性的作用,促进包括纤维蛋白原(Fibrinogen)的血浆蛋白的渗出[9],故 VEGF对血管性肿瘤间质产生具有重要的生物学作用。在骨肉瘤组织中 VEGF表达主要定位于肿瘤细胞,而 VEGF受体 KDR主要表达于肿瘤新生毛细血管内皮,在肿瘤周围正常的骨组织或软组织中未见 KDR表达。VEGF表达强度和 MVD值显著相关,进一步证实肿瘤细胞产生 VEGF在骨肉瘤血管生成中发挥重要作用。

碱性生长因子(bFGF),亦是重要的血管生成因子之一。它可直接刺激内皮细胞的增生,促进内皮细胞产生蛋白酶,调节内皮细胞表面整合素表达并促进内皮细胞迁移[8]。此外,bFGF和 VEGF还有协同作用[9],维持内皮细胞慢时相的通透性增加。Relf等[3]发现乳腺癌组织中 bFGF mRNA水平及其蛋白表达显著高于正常组织。本结果也表明多数骨肉瘤中 bFGF蛋白高表达(57.5%),bFGF和 FGFr表达具有较好一致性,且与 MVD值显著相关,提示 bFGF是骨肉瘤的重要血管生成因子。

TGFβ1在血管修复过程中激活的内皮细胞中有表达。在体外 TGFβ1可能通过诱导巨噬细胞产生细胞因子间接刺激血管生成。在体内可具有 bFGF类似的作用,但作用机制与 bFGF不完全一样,bFGF可促进内皮细胞合成整合素 α3、α5和 β1[10]。本研究的结果显示 TGFβ1/TGFβ(RI)在骨肉瘤的血管内皮细胞中特异性的高表达,而在骨肉瘤细胞中不表达或极少表达,TGFβ1/TGFβ(RI)的表达与骨肉瘤 MVD值密切相关($P<0.05$)。该结果提示 TGFβ1可能主要通过内皮细胞自分泌机制促进骨肉瘤血管生成。

TAF是一分子量约 30×$10^3$ u的细胞粘附蛋白,通过 DNA克隆和氨基酸序列分析,证实其与 mac25基因和前列腺环素刺激因子(PSF)高度同源,故又称为 TAF/mac25/PSF。体外实验证实 TAF促进血管内皮细胞和Ⅳ型胶原的结合,以及管状结构的形成。免疫组化结果显示 TAF和Ⅳ型胶原共同定位于肿瘤毛细血管周围,在正常组织的毛细血管周围未见表达,因此 TAF是肿瘤组织特异的[11]。我们的结果也显示 TAF定位于骨肉瘤肿瘤血管周围,而且 TAF的染色强度与肿瘤血管密度正相关。

越来越多的研究表明存在多种细胞因子作用于肿瘤血管生成过程。这些细胞因子有的是肿瘤内皮细胞相对特异的,如 VEGF和 TAF,有的则是亲多种组织性的,如 bFGF和 TGFβ1,有的主要作用于血管生成的早期阶段,如 VEGF,有的则主要作用于后期阶段,如 TAF。我们应用免疫组化方法检测这些血管生成因子及其受体在骨肉瘤组织的表达,并研究它们之间的相互关系,结果表明:① 血管生成因子及其受体在肿瘤中的表达有较好的一致性,进一步证实旁分泌或自分泌是血管生成因子促进血管生成的主要途径;② 多种血管生成因子 VEGF bFGF TGFβ1、TAF表达显著相关;③ 上述血管生成因子的表达与肿瘤内微血管密度均显著正相关。该结果进一步表明各种血管生成因子之间可能具有协同作用,共同促进肿瘤微血管的生成,而其真正的调节机能仍有待于进一步研究。

肿瘤微血管密度是影响实体肿瘤的预后的重要因素。我们的研究亦证实骨肉瘤微血管密度与病人预后

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有关[2]。本研究应用整体 COX模型分析显示微血管密度和血管生成因子 VEGF、bFGF、TGFβ1、TAF表达均各自与病人预后显著相关,但逐步 COX模型分析结果,只有 MVD和 VEGF与病人预后有关。由于血管生成因子的表达与微血管密度密切相关,显然血管生成因子是通过促进肿瘤血管生成而影响病人预后的。

## 参考文献


1 Folkman J. What is the evidence that tumor are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4

2 王 东,陈 俐,高奉浔. 骨肉瘤中血管密度与预后的研究. 中华病理学杂志, 1997, 26(5): 266

3 Relf M, Lejeune S, Scott P A E, *et al*. Expression of the angiogenetic factors, vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, transforming growth factor β-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. Cancer Res, 1997, 57(3): 963

4 Schajowicz F, Sissons H A, Sobin H. The World Health Organization's histologic classification of bone tumor. A commentary on the second edition. Cancer, 1995, 75(5): 1208

5 Hollingsworth H C, Kohn E C, Steiberg S M, *et al*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol, 1995, 147(1): 33

6 Leugng D W, Cachianes G, Kuang W J, *et al*. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenesis mitogen. Science, 1989, 246(4935): 1306

7 Liotta L, Sardel G, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res, 1976, 36(4): 889

8 Sepp N T, Li L J, Lee K H, *et al*. Basic fibroblast growth factor increases expression of the α Vβ3 integrin complex on human microvascular endothelial cells. J Invest Dermatol, 1994, 103(1): 295

9 Pepper M S, Ferrara N, Orci L, *et al*. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 189(5): 824

10 Enenstein J, Waleh N S, Kramer R H. Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. Exp Cell Res, 1992, 203(2): 499

11 Akaogi K, Okabe Y, Sato J, *et al*. Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessels and in cappillary tube-like structures of cultured vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(8): 8384


(收稿: 1998-02-10;修回: 1998-07-15)

(编辑 刘 鹏)

# Expsession of vascular endothelial cell growth factor, basic fibroblast growth factor, transforming growth factorβ1 and tumor derived adhesion factor in osteosarcoma and its relation to angiogenesis

Wang Dong, Xiao Hualiang, Li Zengpeng, Chen Li (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

**Abstract** **Objective**: To investigate the expression of vascular endothelial cell growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factorβ1 (TGFβ1) and tumor-derived adhesion factor (TAF) in osteosarcoma and its relation to neovascularizton and prognosis of the disease. **Methods**: The intratumoral microvessel density (MVD) and expression of VEGF, bFGF, TGFβ1 and TAF were determined in 80 cases of osteosarcoma with immunohistochemistry and morphometry. The relationship between the expression of the angiogenic factors and prognosis of the disease was evaluated with a multivariate analysis using COX proportion hazard model. **Results**: Of the 80 cases, 42 were strong positive for VEGF/KDR (52.5%), 46 for bFGF/bFGFr (57.5%), 31 for TGFβ1/TGFβ (RI) (38.8%) and 36 for TAF (45%) respectively. The expression of the angioenic factors was coordinated with that of their receptors and significantly correlated with MVD. The multivariate analysis using COX hazard model showed that were the most important indicators in prognosis of the disease. **Conclusion**: All the four factors are involved in the angiogenesis of osteosarcoma. MVD and VEGF are the most useful parameters to evaluate the prognosis of osteosarcoma.

**Key words** osteosarcoma; angiogenic factor; prognosis

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net