

HIF-1 α 和 VEGF 在大肠癌中的表达及其相关性研究

王 前, 安泽武

(解放军第 252 医院, 河北 保定 071000)

摘 要: [目的] 探讨 HIF-1 α 和 VEGF 在大肠癌浸润、转移过程中的表达及其相互作用机制。[方法] 采用免疫组化 SP 法检测 90 例大肠癌组织及其相应癌旁组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。[结果] 癌旁组织中 HIF-1 α 的表达均为阴性, 大肠癌组织中的阳性表达率为 73.33% (66/90), 显著高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HIF-1 α 在大肠癌中阳性表达率与临床分期、浸润深度和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 与大肠癌分化程度无关 ($P > 0.05$)。癌旁组织中 VEGF 的表达均为阴性, 在大肠癌组织中的阳性表达率为 70.00% (63/90), 显著高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。VEGF 在大肠癌中阳性表达率与临床分期、浸润深度和淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 与大肠癌分化程度无关 ($P > 0.05$)。大肠癌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达具有正相关性 ($r = 0.592, P < 0.05$)。[结论] HIF-1 α 与 VEGF 的表达率均随着大肠癌浸润深度、淋巴结转移和临床分期的发展而增高, 共同参与了大肠癌的发生、发展, 可作为大肠癌浸润和转移的重要判定指标。HIF-1 α 可能通过上调 VEGF 的蛋白表达, 促进大肠癌血管生成而促进大肠癌的转移, 抑制 HIF-1 α 的表达可能是治疗大肠癌的新手段。

主题词: 结直肠肿瘤; 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α); 血管内皮生长因子

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2013) 11-0858-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.11.B007

Expressions and Correlation of HIF-1 α and VEGF in Colorectal Cancer

WANG Qian, AN Ze-wu

(the 252 PLA Hospital, Baoding 071000, China)

Abstract: To investigate the expression of HIF- α and VEGF in invasion and metastasis of colorectal cancer and their interaction mechanism. [Methods] The expressions of HIF-1 and VEGF were detected by SP immunohistochemistry method in cancer and cancer adjacent tissues of 90 cases with colorectal cancer. [Results] The expression of HIF-1 α in cancer adjacent tissues was negative, while the positive expression rate was 73.33% (66/90) in cancer tissues, with significant difference between them ($P < 0.05$). The expression of HIF-1 α was significantly associated with the depth of invasion, lymph node metastasis and Dukes stage ($P < 0.05$), but not associated with the grade of differentiation ($P > 0.05$). The expression of VEGF in cancer adjacent tissues was negative, while the positive expression rate was 70.00% (63/90) in cancer tissues, with significant difference between them ($P < 0.05$). The expression of VEGF was significantly associated with the depth of invasion, lymph node metastasis, and Dukes stage ($P < 0.05$), but not associated with the grade of differentiation ($P > 0.05$). The expression of HIF-1 α and VEGF was positively correlated ($r = 0.592, P < 0.05$). [Conclusion] The expression of HIF-1 α and VEGF increases with the increasing lymph node metastasis, cancer invasion and clinical staging. They both take part in the carcinogenesis of colorectal cancer, and might be important indicators for the diagnosis of invasion and metastasis of colorectal cancer. HIF-1 α might promote tumor angiogenesis and invasion by upregulating the expression of VEGF protein. Therefore, inhibition the expression of HIF-1 α might be a new method for the treatment of colorectal cancer.

Subject words: colorectal neoplasms; HIF-1 α ; VEGF

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth

factor, VEGF) 是肿瘤新生血管形成中的关键刺激因子, 特异性高表达于新生血管内皮细胞表面, 与受体酪氨酸激酶结合, 一方面直接作用于血管内皮细胞刺激有丝分裂诱发血管生成, 另一方面增加血管渗

通讯作者: 安泽武, 主任医师, 硕士; 解放军第 252 医院普外一科, 河北省保定市百花东路 991 号 (071000); E-mail: anzewu99@126.com

收稿日期: 2013-08-06; **修回日期:** 2013-09-05

透性促进细胞迁移。缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内产生的一种异源二聚体转录因子,在缺氧诱导的基因表达中起着关键作用。本研究检测大肠癌组织 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达情况,研究其与临床病理特征的关系,分析两种蛋白在大肠癌浸润和转移过程中的作用,为判断预后及指导临床治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集解放军第 252 医院医院普通外科 2011 年 7 月至 2013 年 5 月手术的大肠癌标本及其配对的距癌灶 5cm 以上的癌旁组织标本各 90 例,标本均经组织病理确诊;患者术前均未接受过放化疗。其中男性 50 例,女性 40 例,年龄 35~76 岁,中位年龄 56 岁。Dukes 分期:A 期 10 例,B 期 19 例,C 期 47 例,D 期 14 例。分化程度:高分化腺癌 18 例,中分化腺癌 15 例,低分化腺癌 36 例,未分化癌 11 例。浸润深度:浸润达浆膜层者 62 例,浸润未达浆膜层者 28 例。淋巴结转移情况:淋巴结转移者 68 例,未发生淋巴结转移者 22 例。

1.2 主要试剂

鼠抗人 HIF-1 α 、VEGF 单克隆抗体及其他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 4 μ m 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-1 α 单抗,鼠抗人 VEGF 单抗)4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;PBS 清洗,加入二抗,温育 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-1 α 的结果判断按照肿瘤细胞的染色比例分级。以伴或不伴胞质染色的细胞核染色为阳性计数标准^[1],(-):没有染色或<1%的细胞核染

色;(+):1%~10%的细胞核染色,和(或)较弱的胞质染色;(++):10%~50%的细胞核染色,和(或)明显的胞质染色;(+++): $\geq$ 50%的细胞核染色,和(或)较强的胞质染色。(-)为阴性;(+)~(+++)为阳性。VEGF 的结果判断^[2]按照肿瘤细胞的染色比例分级,胞质染色情况为阳性计数标准,我们以<10%的胞质染色为阴性表达; $\geq$ 10%为阳性表达。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 χ^2 检验和相关性分析。

2 结 果

2.1 癌组织与癌旁组织中 HIF-1 α 和 VEGF 的表达及比较

90 例大肠癌组织中,HIF-1 α 阳性表达主要在细胞核,部分胞质中也可见阳性表达,大肠癌坏死区和大肠癌浸润边缘的细胞核表达最明显 (Figure 1)。VEGF 主要表达在细胞的胞质中(Figure 2)。HIF-1 α

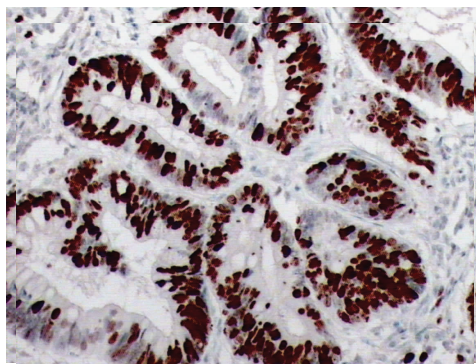


Figure 1 Expression of HIF-1 α in colorectal cancer (×400)

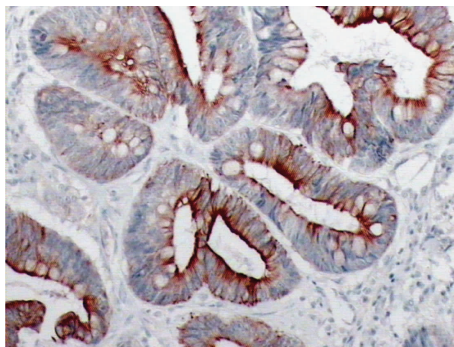


Figure 2 Expression of VEGF in colorectal cancer(×400)

Table 1 The relation of HIF-1α and VEGF with the clinicopathological characteristics of colorectal cancer

Clinicopathologic characteristics	n	HIF-1α			χ^2	P	VEGF			χ^2	P
		+	-	Positive rate(%)			+	-	Positive rate(%)		
Gender											
Male	50	39	11	78.00	>0.05	0.263	37	13	74.00	>0.05	0.355
Female	40	27	13	67.50			26	14	65.00		
Clinical stage											
A+B	29	12	17	41.38	<0.05	0.000	6	23	20.69	<0.05	0.000
C+D	61	54	7	88.52			57	4	93.44		
Infiltration degree											
Non-invasion of serosa	28	13	15	46.43	<0.05	0.000	13	15	46.43	<0.05	0.001
Invasion of serosa	62	53	9	85.48			50	12	80.65		
Lymph node metastasis											
No	22	10	12	45.45	<0.05	0.001	6	16	27.27	<0.05	0.000
Yes	68	56	12	82.35			57	11	83.82		
Differentiation											
High/moderate	33	24	9	72.72	>0.05	0.921	21	12	63.64	>0.05	0.316
Poor	57	42	15	73.68			42	15	73.68		

和 VEGF 的阳性表达率分别为 73.33% (66/90) 和 70.00% (63/90);90 例癌旁组织中 HIF-1α 和 VEGF 全部为阴性表达 (0/90), 两种蛋白在癌组织与癌旁组织中表达的比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 大肠癌组织中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达与临床病理特征的关系

90 例大肠癌中 HIF-1α 和 VEGF 蛋白的阳性表达在不同分化程度及性别中差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但不同临床分期、浸润程度和有淋巴结转移的大肠癌标本中差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 1)。

2.3 大肠癌组织中 HIF-1 与 VEGF 蛋白表达之间的关系

90 例大肠癌中, HIF-1α 与 VEGF 同为阳性者 57 例, 同为阴性者 18 例, 两者之间呈显著相关 ($r=0.592, P<0.05$)。

3 讨 论

肿瘤的生长与转移是一个多因素多步骤的复杂过程, 血管的形成在肿瘤的生长、浸润及转移过程中发挥极其重要的作用。肿瘤血管的形成不仅为肿瘤的生长提供条件, 也为肿瘤细胞通过新生血管发生远处转移提供途径^[3]。VEGF 在肿瘤新生血管形成中发生关键作用, 在包括大肠癌在内的多种肿瘤中呈高表达, 并与肿瘤复发和预后不良等密切相关。

同时发现低氧是恶性肿瘤快速生长和转移的普

Table 2 The association of HIF-1α and VEGF in colorectal cancer

HIF-1α	VEGF		r	P
	+	-		
+	57	9	0.592	0.0001
-	6	18		

遍现象, 目前被证实的低氧诱导基因的数量愈来愈多。HIF-1 在缺氧诱导的基因表达中起着关键作用。HIF-1 主要由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚单位组成, 其中 HIF-1α 是惟一的氧调节亚单位, 它决定 HIF-1 的活性^[4], HIF-1α 与 VEGF 在肿瘤研究中的作用和地位日益受到重视。

Ryan 等^[5]通过免疫组化研究发现, 在良性肿瘤组织中, HIF-1α 表达处于正常水平; 在许多原发性恶性肿瘤中 HIF-1α 表达升高, 而在转移性肿瘤中 HIF-1α 表达升高更加显著。Zhong 等^[6]分析了 179 例不同类型肿瘤标本中 HIF-1α 的表达, 发现在包括前列腺癌、乳腺癌和大肠癌等 13 种肿瘤中可见 HIF-1α 呈不同程度的表达, 而在相应的良性肿瘤中没有检测到 HIF-1α。孙景洲等^[7]在胃癌中分析了 HIF-1α、VEGF 的表达, 而在对应良性疾病中无表达。本实验结果表明, 在用免疫组化方法检测 90 例大肠癌组织中 HIF-1α 的表达水平时, 66 例为阳性表达, 24 例为阴性表达, 阳性表达率为 73.33%, 与癌旁组织全部阴性表达相比, 差异有显著统计学意义 ($P<0.05$)。这说明 HIF-1α 在大肠癌中的过度表达对大肠癌的发生、发展可能有一定的意义。

关于 HIF-1 α 在肿瘤中的表达与肿瘤临床病理因素的关系,各家的研究结果不尽相同,主要集中在 HIF-1 α 的表达与肿瘤分化程度的关系上。刘延等^[8] 研究显示,HIF-1 α 与肝癌的肿瘤分化程度无明显相关性,本实验结果显示 HIF-1 α 在大肠癌 Dukes A/B 和 C/D 期的阳性表达率分别为 41.38% 和 88.52%,组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$);随着大肠癌浸润深度的加深,HIF-1 α 表达阳性率也明显增加 (46.43% vs 85.48%),组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$);淋巴结转移组的 HIF-1 α 表达阳性率为 82.35%,显著高于淋巴结未转移组的 45.45% ($P<0.05$),但 HIF-1 α 的表达与大肠癌的分化程度无明显关系 ($P>0.05$)。这表明 HIF-1 α 过度表达可反映大肠癌的生物行为,可能成为判断大肠癌浸润和转移的有价值指标。

VEGF 免疫组化检测结果显示,VEGF 的表达在大肠癌不同分化程度间差异无统计学意义 ($P>0.05$),VEGF 在大肠癌组织中的总阳性率为 70.00% (63/90),表明 VEGF 的过度表达与大肠癌的发生、发展有关;大肠癌浸润深度不同,VEGF 的表达明显不同,浸润未达浆膜者的阳性率 (46.43%) 明显低于达浆膜者 (80.65%);有淋巴结转移者,其 VEGF 阳性表达率为 83.82% 明显高于无淋巴结转移者的 27.27%;随着临床 Dukes 分期增加,VEGF 在大肠癌中的阳性表达率亦明显增加,C/D 期的阳性率为 93.44%,而 A/B 期的阳性率仅为 20.69%;在 A/B 期与 C/D 期之间比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。这说明随着大肠癌逐渐发展,VEGF 表达逐渐增强,且与大肠癌 Dukes 分期、大肠癌浸润深度、淋巴结转移相关,说明检测大肠癌 VEGF 的表达水平可以作为判断大肠癌生物行为的参考指标。

童刚领等^[9] 分析了 HIF-1 α 和 VEGF 在横纹肌肉瘤中的表达,并阐明 HIF-1 α 和 VEGF 在横纹肌肉瘤的发生中具有协同作用,本研究资料显示,90 例大肠癌组织中 HIF-1 α 蛋白和 VEGF 蛋白表达共同阳性者为 47 例,HIF-1 α 阳性而 VEGF 阴性者为 19 例,VEGF 阳性而 HIF-1 α 阴性者为 16 例,共同阴性者为 8 例,经相关性分析发现,两者具有正相关性。这提示 HIF-1 α 与 VEGF 存在着调控关系,HIF-1 α /VEGF 通路在调节大肠癌新生血管生成过程中具有十分重要的作用,两者在大肠癌的侵袭、转移过程中

可能具有协同作用。另有研究证实,HIF-1 α 不仅可促进 VEGF 的转录,而且可增加 VEGF mRNA 的稳定性,促进肿瘤新生血管生成,而 VEGF mRNA 稳定性增加对 VEGF 蛋白表达的上调也有促进作用^[10]。

综上所述,HIF-1 α 和 VEGF 在大肠癌组织中高表达,并与大肠癌的临床 Dukes 分期、浸润深度和淋巴结转移有关,HIF-1 α 的表达与 VEGF 的表达呈正相关。由此我们认为 HIF-1 α 和 VEGF 共同参与了大肠癌的发生、发展,HIF-1 α 可能通过上调 VEGF 的蛋白表达促进大肠癌血管生成,进而促进大肠癌的转移,它们在大肠癌血管生成和生长侵袭转移过程中具有相互叠加或协同作用。

参考文献:

- [1] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5835.
- [2] Cascinu S, Staccioli MP, Gasparini G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(7): 2803-2807.
- [3] Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis[J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(26): 1757-1763.
- [4] Song IS, Wang AG, Yoon SY, et al. Regulation of glucose metabolism-related genes and VEGF by HIF-1 alpha and HIF-1 beta, but not HIF-2 alpha, in gastric cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41(1): 51-58.
- [5] Ryan HE, Poloni M, McNulty W, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is a positive factor in solid tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(15): 4010.
- [6] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1541-1545.
- [7] Sun JZ, Jin GY, Chen YQ, et al. Expression of TWIST, HIF-1 α and VEGF in gastric cancer and their significance [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2012, 28(8): 748-751. [孙景洲, 金光玉, 陈友权, 等. TWIST, HIF-1 α , VEGF 在胃癌中的表达及意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2012, 28(8): 748-751.]
- [8] Liu Y, Li XZ, Yang DH. Expression of SENP-1 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Sun Yat-sen University (Medical Science)*, 2012, 33 (4): 465-470. [刘延, 李湘兹, 杨定华. SENP-1 和 HIF-1 α 在肝细胞肝癌中的表达及临床意义 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012, 33(4): 465-470.]
- [9] Tong GL, Sun XF, Zhen ZJ. Expressions of HIF-1 α and VEGF in rhabdomyosarcoma and their clinical significance[J]. *Tumor*, 2012, 32(8): 634-638. [童刚领, 孙晓非, 甄子俊. HIF-1 α 和 VEGF 在横纹肌肉瘤中的表达及临床意义 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(8): 634-638.]
- [10] Kim SE, Shim KN, Jung SA, et al. The clinicopathological significance of tissue levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in gastric cancer[J]. *Gut Liver*, 2009, 3(2): 88-94.