

HIF-1 α 、VEGF 和 pVHL 在肾透明细胞癌中的表达及意义

郭瑞华¹, 王蓉蓉², 陈建欧³, 陈林¹, 钱月嫦¹, 吴秀玲²

(1. 平阳县人民医院, 浙江 平阳 325400; 2. 温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000; 3. 温州市中医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 探讨 HIF-1 α 、VEGF 和 pVHL 在肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, CCRCC) 中的表达水平及与临床病理特征的关系。[方法] 采用免疫组化法检测 55 例 CCRCC 中 HIF-1 α 、VEGF 和 pVHL 3 种蛋白的表达, 并对其与临床分期、病理分级、淋巴结转移及预后关系作相关性分析。[结果] 52 例获得随访, 5 年内共有 12 例死亡。HIF-1 α 和 VEGF 在 55 例 CCRCC 中阳性表达率分别为 58.2%, 100.0%, pT₃/pT₄ 期组强表达率(72.7%、54.5%)显著高于 pT₁/pT₂ 期组(29.5%、20.5%)($P < 0.05$); 高级别组(75.0%、41.7%)显著高于低级别组(27.9%、23.3%)($P < 0.05$); 两者高表达与淋巴结转移及中位生存时间密切相关($P < 0.05$), 且两者表达存在正相关关系($r = 0.37, P < 0.05$)。pVHL 阳性表达率为 52.7%(29/55), 与病理分级、临床分期、淋巴结转移及 HIF-1 α 均无明显相关性($P > 0.05$)。[结论] HIF-1 α 和 VEGF 在肾透明细胞癌中的表达可作为预测患者预后的指标, 共同强表达预示生存时间短, 对临床早期干预治疗具有重要的指导意义。

关键词: HIF-1 α ; pVHL; 血管内皮生长因子; 癌; 肾细胞

中图分类号: R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)01-0059-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2014.01.B013

Expressions of HIF-1 α , VEGF and pVHL in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Their Significance

GUO Rui-hua¹, WANG Rong-rong², CHEN Jian-ou³, et al.

(1. the Hospital of Pingyang County, Pingyang 325000, China; 2. the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 3. Hospital of Traditional Chinese Medicine in Wenzhou City, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate expressions of HIF-1 α , VEGF and pVHL in clear cell renal carcinoma (CCRCC) and their clinical significance. [Methods] The protein expressions of HIF-1 α , VEGF and pVHL in CCRCC were evaluated immunohistochemically and the correlation among their expressions, clinical stage, pathological grade, lymph node metastasis and prognosis was analyzed. [Results] Fifty-two cases were followed up, and 12 cases died in 5 years. The expressions of HIF-1 α and VEGF in 55 patients with CCRCC were 58.2% and 100.0% respectively, and their expressions in stage pT₃/pT₄ group (72.7% and 54.5%) were significantly higher than those in stage pT₁/pT₂ group (29.5% and 20.5%)($P < 0.05$); and their expressions in high grade patients (75.0% and 41.7%) were higher than those in low grade patients (27.9% and 23.3%)($P < 0.05$). High expressions of HIF-1 α and VEGF significantly correlated with lymph node metastasis and median survival ($P < 0.05$), and a positive correlation between HIF-1 α and VEGF was found ($r = 0.37, P < 0.05$). Positive expression of pVHL was 52.7%(29/55) in CCRCC patients, which had no correlation with pathological grade, or clinical staging, or lymph node metastasis, or HIF-1 α ($P > 0.05$). [Conclusion] HIF-1 α and VEGF expression might be biomarker for assessment of CCRCC prognosis. Their strong coexpression in CCRCC predicts short survival, which plays an important significance for early intervention treatment of CCRCC.

Subject words: HIF-1 α ; pVHL; VEGF; carcinoma, renal cell

肾细胞癌占成人肾脏恶性肿瘤的 80%, 居泌尿

系统肿瘤第 2 位, 每年全世界约 9.5 万人死于肾癌, 约 1/3 肾癌患者初诊时已发生转移, 其生物学行为极为多变, 难以预测^[1,2]。现有的资料表明, 肾细胞癌的形成是多种基因共同参与的结果。缺氧诱导因子-1(HIF-1 α)作为细胞平衡和缺氧诱导基因表达的中

基金项目: 温州市鹿城区科技计划项目(S090201)

通讯作者: 吴秀玲, 副主任, 主任医师, 硕士; 温州医科大学附属第一医院病理科, 浙江省温州市瓯海区南白象上蔡村(325000); E-mail: wwxll718@163.com

收稿日期: 2013-09-02; **修回日期:** 2013-10-18

心调节因子, 可调控一系列靶基因 (如 *VEGF*、*GLUT1*、*GLUT3* 等) 的转录, 在肿瘤的增殖、转移以及发生、发展中起着重要作用^[3]。本实验探讨 HIF-1 α 和 VEGF、pVHL 3 种蛋白在肾透明细胞癌(CCRCC) 中的表达意义及与预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2005~2006 年平阳县人民医院病理科和温州医科大学附属第一医院病理科确诊的 CCR-CC 55 例, 其中男性 35 例, 女性 20 例, 年龄 13~88 岁 (中位年龄 58 岁), 临床表现为纳差、消瘦 2 例, 无痛性血尿 20 例, 腰痛或不适 3 例, 其余均为体检发现。肿块位于左肾 32 例, 右肾 23 例, 直径 (1.5~14)cm $\times$ 12cm $\times$ 9cm。pT₁ 期 32 例, pT₂ 期 12 例, pT₃/pT₄ 期 11 例。病理分级: G₁ 18 例, G₂ 25 例, G₃/G₄ 12 例, 10 例伴淋巴结转移, 均行肾癌根治术。术后对所有病例进行随访, 随访时间最短为术后 25 个月, 最长为 84 个月。共获得 52 例随访资料, 3 例失访, 5 年内 12 例死亡, 40 例健在。

1.2 检测方法

所有标本均经 4% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察, 并根据 Fuhrman 组织学分级法对肿瘤进行分级。免疫组织化学染色采用 Envision 二步法。HIF-1 α 、pVHL 和 VEGF (北京中杉公司产品, 工作浓度为 1:50) 三种抗体标记的操作均按说明书进行。以已知的 CCRCC 标本作 HIF-1 α 、VEGF 和 pVHL 的阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。HIF-1 α 、VEGF 的染色结果判定: 胞浆、胞核、胞膜表达定义为阳性; 每例均选择肿瘤细胞表达最强的区域计算阳性细胞数, 定义不着色或 1%~10% 阳性细胞数为 0 (阴性), 11%~30% 为 1+ (弱表达), 31%~70% 为 2+ (中度表达), >70% 为 3+ (强表达)^[4]。pVHL 染色结果判定: 胞浆或胞膜浅黄至棕黄色为阳性, 不着色为阴性。

1.3 统计学处理

使用 SPSS12.0 软件, 用 χ^2 和 Fisher 检验及 Speaman 等级相关分析数据。自手术日起计算生存时间, 采用 Kaplan-Meier 法统计, 生存曲线采用 Log-Rank 检验。

2 结果

2.1 HIF-1 α 蛋白在 CCRCC 中的表达

所有正常肾小管胞浆弱表达 HIF-1 α , 肾小球不表达 (Figure 1)。CCRCC 大部分胞核表达 HIF-1 α , 少数病例浆膜、浆核同时表达 (Figure 2)。HIF-1 α 在 CCRCC 中表达率为 58.2% (32/55)。pT₁、pT₂ 期组强表达率 [25.0% (8/32)、41.7% (5/12)] 明显低于 pT₃/pT₄ 期组 (72.7%, 8/11) ($P<0.05$)。G₁/G₂ 组强表达率 (27.9%, 12/43) 明显低于 G₃/G₄ 组 (75.0%, 9/12) ($P<0.05$)。有淋巴结转移组强表达率为 50.0% (5/10), 与无淋巴结转移组 (35.6%, 16/45) 比较, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。随访期内死亡组强表达率 58.3% (7/12), 与存活组 (30.0%, 12/40) 比较, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 1)。HIF-1 α 弱表达和阴性表达组的中位生存时间 (82 个月) 明显长于中度表达组和强

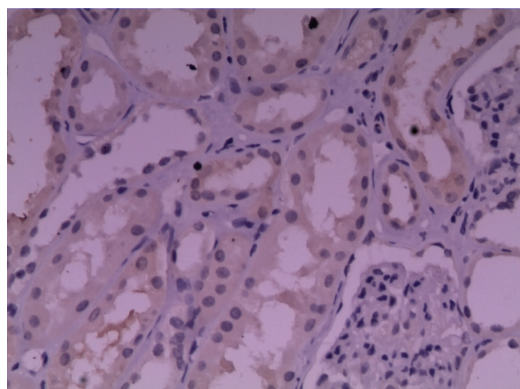


Figure 1 Weak positive expression of HIF-1 α in kidney tubules, with no expression in glomerulus (×200)

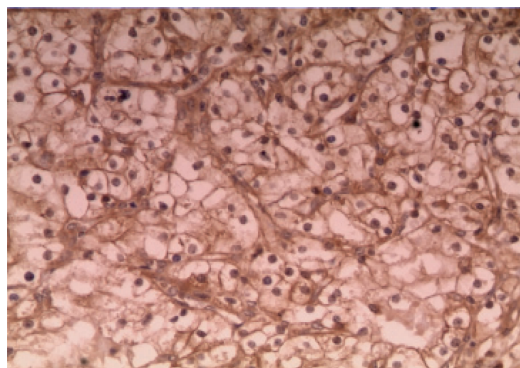


Figure 2 Positive expression of HIF-1 α in cytoplasm, membrane and nucleus of CCRCC (×200)

Table 1 Correlation between the clinicopathological features and the expression of HIF-1 α , pVHL and VEGF

Parameters	N	HIF-1 α expression					VEGF expression					pVHL expression			
		0	1+	2+ and 3+	χ^2	P	1+	2+	3+	χ^2	P	Positive	Negative	χ^2	P
T stage															
pT ₁	32	20	4	8			21	5	6			12	20		
pT ₂	12	3	4	5	6.67	0.01	5	4	3	5.89	0.015	5	7	4.20	0.074
pT ₃ /pT ₄	11	0	3	8*			2	3	6			8	3		
Fuhrman grade															
G1/G2	43	21	10	12			25	8	10			16	27		
G3/G4	12	2	1	9	3.99	0.046	3	4	5	4.12	0.042	9	3	5.16	0.132
Lymph node metastasis															
Yes	10	1	4	5			2	2	6			6	4		
No	45	22	7	16	5.09	0.024	26	0	9	4.67	0.031	19	26	5.83	0.106
Survival 5 years															
Death	12	2	3	7			2	4	6			7	5		
Live	40	20	8	12	7.47	0.006	23	8	9	6.17	0.013	16	24	5.167	0.293

Note:*, Compared with pT₁, pT₂ stage.

表达组(67个月和64个月)($P<0.05$)(Figure 3)。

2.2 VEGF 在 CCRCC 中的表达

所有正常肾小管、肾小球内皮细胞胞浆中等强度表达 VEGF(Figure 4), VEGF 在 CCRCC 中主要表达于胞浆,少数病例胞浆和胞核同时表达,或胞浆和胞膜、核同时表达(Figure 5)。VEGF 在肾透明细胞癌中表达率为 100.0%。pT₁、pT₂ 期组强表达率[18.8%(6/32)、25.0%(3/12)]明显低于 pT₃/pT₄ 期组(54.5%, 6/11)($P<0.05$)。G1/G2 组强表达率(23.3%, 10/43)明显低于 G3/G4 组(41.7%, 5/12) ($P<0.05$)。有淋巴结转移组强表达率为 60.0%(6/10), 与无淋巴结转移组(20.0%, 9/45)比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。随访期内死亡组强表达率 50.0%(6/12), 与存活组(22.5%, 9/40) 比较,差异具有统计学意义 ($P<0.05$)(Table 1)。VEGF 弱表达和中度表达组的中位生存时间(80个月和79个月)明显长于强表达组(59个月) ($P<0.05$)(Figure 6)。

2.3 pVHL 在 CCRCC 中表达

正常肾小管、肾小球 pVHL 呈弱表达。55 例 CCRCC 患者中呈胞浆阳性者 29 例 (52.7%)(Figure 7)。pVHL 表达与肿瘤分级、临床分期、淋巴结转移均无明显相关性($P>0.05$)。随访期内死亡组强表达率 58.3%(7/12),与存活组(40.0%, 16/40)比较,差异无统计学意义($P>0.05$))(Table 1)。pVHL 阳性组的中位生存时间(77个月)与阴性组(74个月)相比无显著性差异($P>0.05$)(Figure 8)。

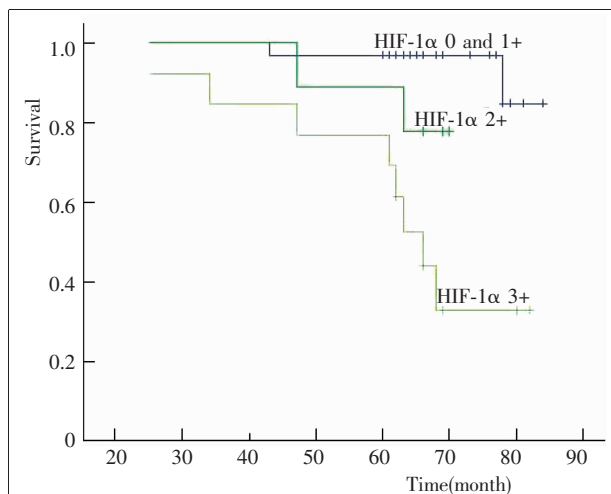


Figure 3 Survival curves of CCRCC patients stratified according to HIF-1 α protein expression

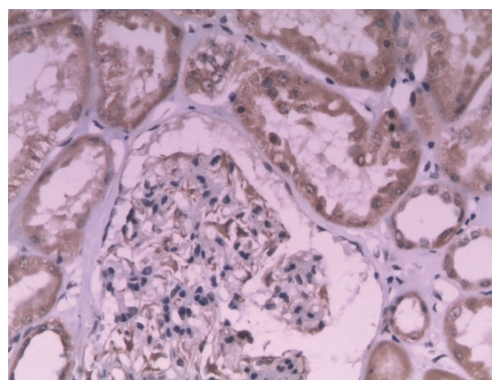


Figure 4 Positive expression of VEGF in kidney tubules and glomerulus (×200)

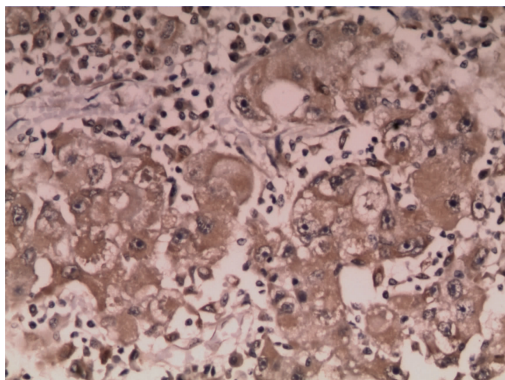


Figure 5 Positive expression of VEGF in CCRCC (×200)

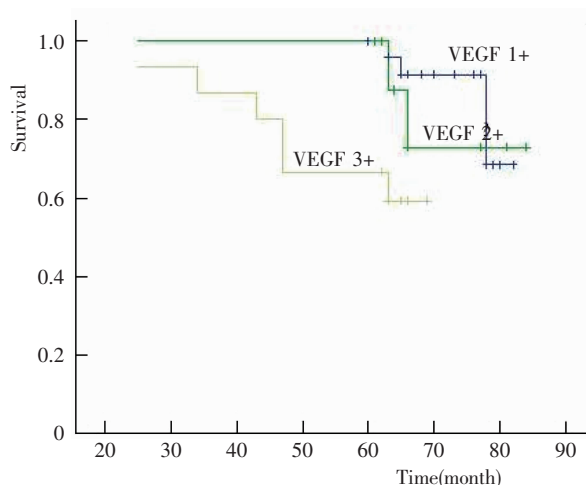


Figure 6 Survival curves of CCRCC patients stratified according to VEGF protein expression

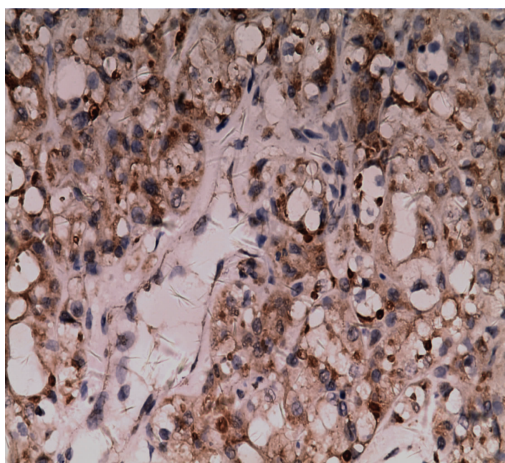


Figure 7 Cytoplasm positive expression of pVHL in CCRCC (×200)

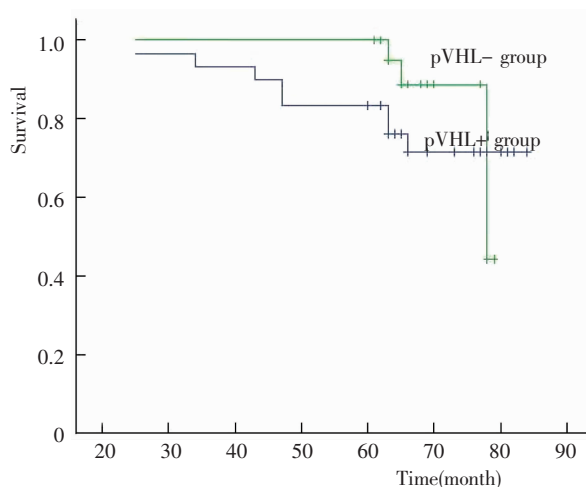


Figure 8 Survival curves of CCRCC patients stratified according to pVHL protein expression

2.4 HIF-1α 与 VEGF 和 pVHL 表达的相关性

29 例 pVHL 阳性病例中 20 例 HIF-1α 阳性, 余 26 例 pVHL 阴性者中 12 例 HIF-1α 阳性, 两者无明显相关性 ($P>0.05$)。23 例 HIF-1α 阴性病例中 16 例 VEGF 阳性, 32 例 HIF-1α 阳性病例中 32 例阳性, 两者呈正相关性 ($r=0.37, P<0.05$)。

3 讨 论

HIF-1α 受氧浓度、VHL 基因突变状态及相关分子通路激活状态等影响^[3-5]。VHL 基因突变或甲基化

见于 80% 的遗传性 CCRCC 和 50%~60% 的散发性 CCRCC, 其基因产物 VHL 蛋白 (pVHL) 的 α 链与 E-longinB 等组成泛素连接酶复合物, β 链则与 HIF-1α 结合, 在正常氧浓度下将 HIF-1α 降解。缺氧及 VHL 失活或突变均可导致 HIF 降解减少, 稳定性增加及细胞内积聚, 通过 HIF-1 DNA 序列上的识别位点与下游靶基因 VEGF、PDGF、CXCR 等 DNA 序列上的 HIF 结合位点结合, 过多地发挥其转录因子的功能, 形成转录起始复合物, 从而启动靶基因 VEGF 等转录和相应的蛋白增加, 而 VEGF 进而作用于存在于血管内皮细胞表面的受体, 激活一系列缺血转

导通路,诱导新生血管的形成,促进肿瘤细胞的增殖与肿瘤的进展^[3,5-7]。本研究结果显示,从低级别CCRCC到高级别CCRCC,HIF-1 α 的表达率明显增加,高分期的肿瘤及有淋巴结转移的病例,HIF-1 α 的表达明显增高。VEGF的表达率随着肿瘤分期、分级增加而增加,并与淋巴结转移、肿瘤的死亡明显相关。研究结果还显示HIF-1 α 与VEGF两者呈正相关关系,进一步证实了HIF-1 α 能调节下游靶基因VEGF的功能。

HIF-1 α 对CCRCC的预后影响,文献报道并不一致。Lidgren等^[8]利用免疫印迹法检测66例CCRCC,结果显示肿瘤HIF-1 α 的表达明显高于正常肾组织,HIF-1 α 的表达虽与肿瘤的大小、病理分级、分期、静脉浸润无明显相关性,但却是肿瘤的独立预后影响因素,高表达HIF-1 α 的CCRCC反而预后较好。而利用免疫组化法检测,结果显示高表达HIF-1 α 组和低表达HIF-1 α 组间的生存时间无明显差异。大多数研究者的结果显示,高表达HIF-1 α 的多为高级别、高分期的CCRCC,且预后较差,生存时间短^[6]。有分析认为这种迥然不同的结果是由于使用的实验方法不同所致,HIF-1 α 在肿瘤细胞内定位(浆表达或核表达)影响着它的功能发挥,HIF-1 α 为核转录因子,在细胞核内被激活,胞浆的高表达意味着已转录到胞浆,其预后相对较好^[3,6,8]。本研究利用免疫组化方法,结果显示55例CCRCC中23例核表达,12例为胞浆表达,高级别的CCRCC核表达相对较多,是否核表达HIF-1 α 提示预后较差,有待进一步研究。

作为肾细胞癌特异性基因VHL的蛋白产物pVHL,除上述的功能以外,它还能促进肾细胞分化与生长,通过Mdm2途径修复DNA酶,而且在维护p53核因子的稳定,调节纤维连接蛋白基质信号,以及细胞内环境调节中起关键作用^[7]。本研究结果显示,CCRCC中pVHL的表达率为52.7%,且与CCRCC的临床分期、病理分级、淋巴结转移均无关,提示pVHL异常仅在部分CCRCC形成中起关键作用。近年有实验观察到,把野生型pVHL重组到VHL缺陷的CCRCC细胞株中,并不能促进HIF-1 α 的表达,而把野生型的VHL基因重组到VHL缺陷的CCRCC细胞株,却能促进HIF-1 α 的表达,这一结果表明,HIF-1 α 的表达上调并不是由pVHL直接调节,可能还存在其他调节机制^[9]。本实验结果发现,

随着肿瘤分级、分期的增高,HIF-1 α 与pVHL两者的表达率均增高,但未发现两者相关性,亦提示两者之间尚存在其他调节机制。这些实验结果提示,已被多数研究者^[10]所证实的CCRCC发生、发展的VHL—HIF—VEGF调节通路需要进一步完善和证实。

本研究显示HIF-1 α 在CCRCC中呈高表达,其强阳性表达多见于高分期、高级别及淋巴结转移病例,HIF-1 α 与pVHL不存在相关关系,HIF-1 α 和VEGF在CCRCC中的表达强度可作为预测患者预后的指标,且HIF-1 α 和VEGF的表达存在相关性,共同强表达预示生存率低,对于临床早期干预治疗具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Zhao H, Ljungberg B, Grankvist K, et al. Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma[J]. PLoS Med, 2006, 3(1): 1549–1676.
- [2] Rathmell WK, Chen S. VHL inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(1): 63–73.
- [3] Shen C, Kaelin WG Jr. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma[J]. Semin Cancer Biol, 2013, 23(1): 18–25.
- [4] Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression in renal cell carcinoma analyzed by tissue microarray [J]. Eur Urol, 2006, 50(6): 1272–1277.
- [5] Carroll VA, Ashcroft M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α versus HIF-2 α in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6264–6270.
- [6] Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α in clear cell renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(24): 7388–7393.
- [7] Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2012; 33(1): 9–16.
- [8] Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, et al. The expression of hypoxia inducible factor 1 α is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(3): 1129–1135.
- [9] Wiesener MS, Munchenhagen PM, Berger I, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas[J]. Cancer Res, 2001, 61(13): 5215–5222.
- [10] Procopio G, Verzoni E, Iacovelli R, et al. Prognostic factors for survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapies[J]. Br J Cancer, 2012, 107(8): 1227–1232.