

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1067.R.20111018.0024.001.html>

网络出版时间: 2011-10-18 00:04:24 DOI: CNKI:34-1067/R.20111018.0024.001

[文章编号] 1000-2200(2011)12-1299-04

· 基础医学 ·

## 缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 及血管生长因子-C 在直肠癌组织中的表达及其意义

朱小康<sup>1</sup> 韩福生<sup>2</sup> 李兴文<sup>1</sup> 刘先富<sup>2</sup>

**[摘要]**目的:检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )与血管生长因子-C(VEGF-C)在直肠癌中的表达,分析其与直肠癌临床病理参数的关系,探讨其在直肠癌的发生和淋巴转移过程中的作用。方法:采用免疫组织化学 Elivision plus 法检测 72 例直肠癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 的表达及 VEGFR-3 染色的微淋巴管密度。结果:HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 在直肠癌及癌旁组织中阳性率分别为 77.8%、83.0% 和 44.4%、42.0%,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );直肠癌淋巴结转移者中 HIF-1 $\alpha$  阳性率为 90.0%,无转移者为 63.5%,两者差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.78, P < 0.01$ );直肠癌淋巴结转移者中 VEGF-C 阳性率为 95.0%,无转移者为 68.8%,两者差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.82, P < 0.01$ )。在直肠癌高、中分化组和低、未分化组 HIF-1 $\alpha$  阳性率分别为 12% 和 44%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );VEGF-C 阳性率分别为 14% 和 46%,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );HIF-1 $\alpha$  与 VEGF-C 在直肠癌组织中的表达呈相关关系( $r = 0.105, P < 0.01$ )。结论:HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 在直肠癌患者癌组织中高表达,在癌旁组织中低表达,且其阳性表达与直肠癌淋巴结转移及癌组织分化程度有关,与年龄、性别无关。HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 在直肠癌组织中表达具有相关性,两者在直肠癌浸润转移过程中可存在协同效应。

**[关键词]** 直肠肿瘤;缺氧诱导因子-1 $\alpha$ ;血管生成因子-C;免疫组织化学

[中国图书资料分类法分类号] R 735.37 [文献标识码] A

### The expression and significance of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ and vascular endothelial growth factor-C in colorectal cancer

ZHU Xiao-kang<sup>1</sup>, HAN Fu-sheng<sup>2</sup>, LI Xing-wen<sup>1</sup>, LIU Xian-fu<sup>2</sup>

(1. Department of Tumor Surgery, Tumor Hospital of Gansu Province, Lanzhou Gansu 733000;

2. Department of Tumor Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and their relation to lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in colorectal cancer. **Methods:** The expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C in colorectal cancer tissues and normal colorectal tissues were detected in 72 patients with immunohistochemical Elivision plus method and microlymphatic vessel density in VEGFR-3 staining was calculated. **Results:** The positive rates of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C expressions density in colorectal cancer and adjacent normal tissue were 77.8% 83.0% and 44.4% 42.0% respectively, there were the statistical differences ( $P < 0.01$ ). The positive rate of HIF-1 $\alpha$  was 90.0% in lymph node metastasis cases, no transfer for 63.5%, the difference had statistical significance ( $P < 0.01$ ). The positive rate of VEGF-C was 95.0% in lymph node metastasis cases, no transfer for 68.8%, which had the statistical difference ( $\chi^2 = 7.78, P < 0.01$ ); the positive rates of HIF-1 $\alpha$  were 12% and 44%, which had the statistical significance ( $\chi^2 = 8.82, P < 0.01$ ). In high, medium differentiation of colorectal cancer group and low, undifferentiated group, the positive rates of VEGF-C was 14% and 46%, respectively, also had the statistical difference ( $P < 0.01$ ). The expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C in colorectal cancer tissues had synergistic effect ( $r = 0.105, P < 0.01$ ). **Conclusions:** The expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C are high in colorectal cancer, and low in adjacent tissues. The positive expression is associated with lymph node metastasis and the differentiation degree in carcinoma tissues, and has no relationship with age and sex. The expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C are associated with each other in colorectal cancer tissues, and exists the synergy effect in colorectal cancer metastasis process.

**[Key words]** colorectal neoplasms; hypoxia inducible factors-1 $\alpha$ ; vascular endothelial growth factor-C; immunohistochemistry

[收稿日期] 2010-10-25

[作者单位] 1. 甘肃省肿瘤医院 肿瘤外科,甘肃 兰州 733000; 2. 蚌埠医学院第一附属医院 肿瘤外科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 朱小康(1984-)男,硕士,住院医师。

直肠癌是常见恶性肿瘤之一,和结肠癌统称为大肠癌,是我国的九大恶性肿瘤之一。由于其在直肠癌中所占比例高,且其位置偏低等特点,近年来成为消化道肿瘤的研究热点。直肠癌的病因尚未明

确,其发生、发展是一个受多基因、多步骤调控的复杂过程<sup>[1]</sup>。直肠癌根治性切除术后总的5年生存率在60%左右,早期直肠癌术后的5年生存率为80%~90%。转移和复发是影响疗效的重要因素,多数患者根治术后死于转移和复发。缺氧诱导因子-1(HIF-1)表达增加可使肿瘤血管形成或相关基因表达升高,包括血管内皮生长因子(VEGF)、纤维母细胞生长因子、转化生长因子受体。VEGF在肿瘤血管行程中起关键作用,它包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E和胎盘生长因子<sup>[2]</sup>。直肠癌的Dukes分期很好地结合了肿瘤的局部浸润与淋巴转移,可以与HIF-1、VEGF-C结合探讨直肠癌的转移机制,了解直肠癌侵袭转移倾向。本研究采用免疫组织化学技术观察直肠癌组织、癌旁组织和正常组织中HIF-1 $\alpha$ 表达及与VEGF-C、微淋巴管密度(MLVD)的关系,进一步探讨HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C在直肠癌发病机制中的作用及与肿瘤分期的关系。

## 1 资料与方法

1.1 标本来源 收集2008年1月至2009年1月蚌埠医学院第一附属医院直肠癌手术切除组织标本72例。患者术前均未接受放疗、化疗及其他肿瘤的治疗,病理检查证实为腺癌,其中男42例,女30例;年龄34~79岁。组织学分级:高分化16例,中分化34例,低分化22例;大体分型:溃疡性40例,肿块型26例,浸润型6例;Dukes分期:A期2例,B期30例,C期40例。

1.2 HIF-1 $\alpha$ 和VEGF-C检测方法 采用免疫组织化学EliVSION plus法进行蛋白检测。兔抗人HIF-1 $\alpha$ 多克隆抗体由Santa Cruz公司提供;VEGF-C多克隆抗体,免疫组织化学EliVSION plus试剂盒及DAB显色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供;VEGFR-3多克隆抗体由LAB公司提供。操作按试剂盒说明书进行。(1)石蜡切片脱蜡和水化后,用PBS(pH 7.4)冲洗3次,每次3 min。(2)根据每一种抗体的要求,对组织抗原进行相应的修复。(3)每张切片加1滴3%过氧化氢溶液,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS冲洗3次,每次3 min。(4)甩去PBS,每张切片加1滴第一抗体(HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C、VEGFR-3),4℃过夜。(5)PBS冲洗3次,每次5 min。(6)甩去PBS液,每张切片加1滴酶标抗鼠/兔聚合物增强剂(试剂A),室温下孵育20 min。(7)PBS冲洗3次,每次3 min。

(8)甩去PBS液,每张切片加1滴酶标抗鼠/兔聚合物(试剂B),室温下孵育30 min。(9)PBS冲洗3次,每次3 min。(10)甩去PBS液,每张切片加2滴新鲜配制的DAB,显微镜下观察3~10 min,阳性显色为棕色。(11)蒸馏水或自来水冲洗,苏木精复染0.1% HCl分化,自来水冲洗,PBS冲洗返蓝。(12)切片经过梯度乙醇脱水干燥(二甲苯透明)中性树胶封片。以PBS代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断 HIF-1 $\alpha$ 和VEGF在细胞膜或细胞质内有棕黄色颗粒为阳性(+),无着色者为阴性(-)根据着色强度及显色癌细胞比例将染色结果分为-、1+、2+、3+。(1)按切片中细胞显色有无及深浅评分:无显色为0分,棕黄色为1分,棕褐色为2分。(2)根据显色癌细胞的比例记分: $\leq 30\%$ 为1分, $>30\% \sim 71\%$ 为2分, $>71\%$ 为3分。二者的乘积为每例肿瘤积分。按积分高低分为:0分阴性(-),1~3分弱阳性(1+),4~6分中等阳性(2+),6~9分强阳性(3+)。

1.4 MLVD测定 采用免疫组织化学EliVSION plus法对VEGFR-3进行检测,除癌细胞胞质内呈现VEGFR-3阳性染色的棕黄色颗粒外,淋巴管也显示为棕黄色裂隙状、腔内无红细胞且无肌层的单层管腔,淋巴管内皮细胞多呈薄梭形,胞核突向管腔。在低倍镜下寻找VEGFR-3阳性脉管密集区,即“热区”,100倍视野计数10个“热区”中VEGFR-3阳性脉管数,取平均值为该病例的MLVD。肿瘤区内单个或成丛的内皮细胞,无论成堆与否均视为脉管计数,凡伴有肌层的脉管不予计数。

1.5 统计学方法 采用 $t'$ 检验、 $\chi^2$ 检验和Kappa值一致性分析。

## 2 结果

2.1 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C在直肠癌及癌旁组织中的表达 直肠癌及癌旁组织中HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C的表达见表1。HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C主要表现为胞质染色,在直肠癌组织中的表达主要位于癌细胞胞质及癌旁黏膜上皮和固有腺上皮的胞质中,在癌组织内的间质细胞可见散在表达,在直肠癌周血管内皮细胞部分呈阳性染色(见图1、2)。

2.2 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C与直肠癌的临床病理参数之间的关系 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C的表达率与直肠癌患者年龄及性别差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),但高、中分化组直肠癌组织中的阳性率明显低于低、未

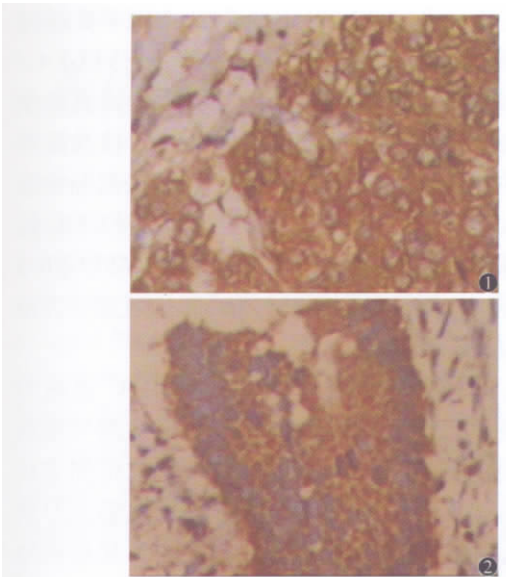


图 1 HIF-1 $\alpha$  在直肠癌组织中的阳性表达 图 2 VEGF-C 在直肠癌组织中的阳性表达(均为免疫组织化学染色)

分化组 ( $P < 0.01$ ), 有淋巴结转移组( Dukes C、D) 的阳性率明显高于无淋巴结转移组( Dukes A、B) ( $P < 0.01$ ) ( 见表 2)。

表 1 直肠癌及癌旁组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 的表达 [n; 百分率(%) ]

病理组织	n	HIF-1 $\alpha$		$\chi^2$	P	VEGF-C		$\chi^2$	P
		阳性(%)	阴性(%)			阳性(%)	阴性(%)		
直肠癌组织	72	56(77.8)	16(21.8)			60(83.3)	12(16.7)		
癌旁组织	72	32(44.4)	40(55.6)	16.83	<0.01	30(41.7)	42(58.3)	26.67	<0.01
合计	144	88(61.11)	56(38.89)			90(62.50)	54(37.50)		

表 2 不同直肠癌临床病理参数 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 的阳性率比较 [n; 阳性率(%) ]

临床病理参数	n	HIF-1 $\alpha$		P	VEGF-C		P
		+(%)	$\chi^2$		+(%)	$\chi^2$	
年龄							
<45	10	6(60.0)		1.1	>0.05	8(80.0)	0.02
$\geq 45$	62	50(80.6)			52(83.9)		
性别							
男	42	32(76.2)		0.15	>0.05	33(78.6)	1.65
女	30	24(88.0)			27(90.0)		
组织分化程度							
低、未分化	50	44(88.0)		8.05	<0.01	46(92.0)	6.93
高、中分化	22	12(54.5)			14(63.6)		
Dukes 分期							
A/B	32	20(62.5)		7.78	<0.01	22(68.8)	8.82
C/D	40	36(90.0)			38(95.0)		

2.3 直肠癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 表达的一致性

分析 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 在 72 例患者中同时阳性 50 例, 阳性率为 69.4%; 均不表达 6 例, 阴性率为 8.3%; 只有 HIF-1 $\alpha$  表达 6 例, 表达率为 8.3%; 只有 VEGF-C 表达 10 例, 表达率为 13.9%。HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 在直肠癌组织中一致性系数 Kappa 值为 0.105 ( $P < 0.05$ ) ( 见表 3)。

表 3 直肠癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 表达的一致性分析

HIF-1 $\alpha$	VEGF-C				合计	Kappa 值	P
	-	1+	2+	3+			
-	6	3	5	2	16	0.105	<0.05
1+	3	4	4	6	17		
2+	2	3	5	5	15		
3+	1	6	8	9	24		
合计	12	16	22	22	72		

2.4 MLVD 与淋巴结转移和 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 的关系 VEGFR-3 染色主要表现: 除癌细胞胞质内呈现 VEGFR-3 阳性染色的棕黄色颗粒外, 淋巴管也显示为棕黄色裂隙状、腔内无红细胞且无肌层的单层管腔, 淋巴管内皮细胞多呈薄梭形, 细胞核突向管腔 ( 见图 3)。

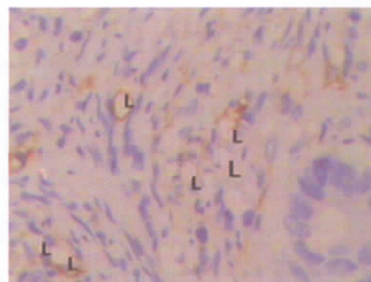


图 3 直肠癌组织中 MLVD 的表达(免疫组织化学染色)

72 例直肠癌组织中淋巴结转移 40 例, MLVD 值为 ( $4.9 \pm 1.3$ ); 淋巴结无转移 32 例, MLVD 值为 ( $2.6 \pm 0.7$ ), 差异有统计学意义 ( $t' = 9.59, P < 0.01$ ) 提示淋巴结转移与 MLVD 增加有关联。HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 双阳性 50 例, 其 MLVD 值为 ( $3.07 \pm 0.41$ ); HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 双阴性 6 例, 其 MLVD 值为 ( $1.89 \pm 0.21$ ), 差异有统计学意义 ( $t' = 6.90, P < 0.01$ ) 表明 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 表达增加可以促进 MLVD 的增加。

3 讨论

直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一。近年来随着人们饮食结构和生活习惯的改变, 直肠癌在我国发病率逐年上升, 其发病机制尚不清楚。近 20 年来, 虽然直肠癌根治术方法不断进展, 但是患者的

预后并未明显改善。大约 50% 的患者死于腹腔局部或区域的复发和转移,而癌细胞在腹腔内、淋巴结、骨髓及外周血中的微转移则是导致大肠癌术后复发转移的重要因素<sup>[3]</sup>。

淋巴结转移是结直肠癌转移的主要途径,是决定结直肠癌患者预后的最重要指标之一。由于直肠的黏膜下层和浆膜层有丰富的淋巴管网,当肿瘤侵及黏膜层以下深度时,癌细胞就有可能进入淋巴系统,随着淋巴引流方向从壁内淋巴结、肠旁淋巴结、中间淋巴结向中央淋巴结扩散,但也有跳跃性和逆向性扩散。据不同直肠的部位,有向上、侧方和向下 3 个途径的淋巴引流方向。位置越低,转移途径也越多。淋巴结转移与肿瘤浸润的深度、病理类型和细胞分化程度有关<sup>[4]</sup>。随着肠壁浸润深度的加深,淋巴结的转移率也加大,恶性程度高的黏液腺癌、印戒细胞癌和未分化癌的淋巴结转移率高于恶性程度低的管状腺癌、乳头状癌。因此,手术时淋巴结的清扫是很有必要的。尽管如此,在淋巴结清扫彻底的患者,常规苏木精-伊红染色“无淋巴结转移”的 N<sub>0</sub> 期大肠癌患者中,46.1% 在术后 5 年内死于局部复发或远处转移,提示淋巴系统或全身存在微转移<sup>[5]</sup>。陈维香等<sup>[6]</sup> 研究得出,直肠癌微转移与患者的年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤大小及肿瘤组织分化程度无关,而与肿瘤浸润深度密切相关,其中微转移与组织分化程度无相关性的结论差异可能与研究的样本量及种族差异有关。

肿瘤的新生淋巴管缺乏连续的基膜,内皮细胞间连接疏松有较大的间隙,肿瘤细胞容易沿着这些间隙进入淋巴管,是肿瘤转移的关键步骤<sup>[7]</sup>。Sebastian 等<sup>[8]</sup> 用免疫组织化学染色研究乳腺癌标本,结果显示,MLVD 和微淋巴管浸润与淋巴结转移相关,微淋巴管浸润是淋巴结转移最主要的因素。本研究显示,HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 可能是造成直肠癌患者淋巴结转移及微淋巴管浸润的重要因素。

对 72 例直肠癌患者 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 阳性表达相关性的分析,得出二者具有等级相关性。有研究也表明,HIF-1 $\alpha$  在多个层次调节 VEGF-C 的表达,其功能包括增强 VEGF-C 的转录活性与增加 VEGF mRNA 稳定性 2 个方面。最新研究发现,通过特定 siRNA 抑制 HIF-1 $\alpha$  在卵巢癌组织中的表达导致了 VEGF 生成减少和新生血管减少,进一步证实抑制 HIF-1 $\alpha$  具有抗肿瘤活性,必要且有可能证明 HIF-1 $\alpha$  可作为治疗卵巢癌的靶向目标。同时也有报道 VEGF-C 是 HIF-1 $\alpha$  的靶基因。是否可以提示 HIF-

1 $\alpha$  可能是通过介导 VEGF-C 的合成,VEGF-C 通过激活其配体 VEGFR-3,形成 HIF-1 $\alpha$ /VEGF-C/VEGFR-3 途径对肿瘤淋巴管形成调控,促进直肠癌淋巴管生成,并导致肿瘤浸润和淋巴结转移及微淋巴管转移。可以通过阻断其中任何一环节来阻断肿瘤淋巴管转移,以利于治疗。数据<sup>[9-10]</sup> 表明,VEGF-C 促进转移过程的后期步骤,并确定 VEGF-C/VEGFR-3 作为治疗靶点,不仅可以预防转移,而且可建立为治疗转移的方法。

总之,直肠癌组织中 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 表达与 Dukes 分期、淋巴结转移密切相关,联合检测可提高对结直肠癌生物学行为评估的准确性,且检测方法简单、迅速。我们认为,在原有病理分级、临床分期的基础上,结合 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 检测可以更准确地估计结直肠癌的恶性程度,判断患者的预后及转移风险。对 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF-C 表达增高的患者,术后应采取积极合理的综合治疗方案,以提高疗效,并有望以 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF-C、VEGFR-3 为靶向的治疗可以为肿瘤治疗带来新的惊喜。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Tuve S, Wagner SN, Schitteck B, et al. Alterations of deltaTA-p73splice transcripts during melanoma development and progression [J]. *Int J Cancer* 2004, 108(1): 162-165.
- [2] Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells [J]. *J Mol Cancer* 2003 2: 23.
- [3] Das S, Ladell DS, Podgrabinska S, et al. Vascular endothelial growth factor-C induces lymphangitic carcinomatosis, an extremely aggressive form of lung metastases [J]. *Cancer Res* 2010, 70(5): 1814-1824.
- [4] 刘宝善. 消化器官肿瘤学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 765.
- [5] 范跃祖, 李新平, 刘文方, 等. 大肠癌患者淋巴结微转移与肿瘤复发转移和预后 [J]. *中华普通外科杂志*, 2005, 20(10): 669-670.
- [6] 陈维香, 费绍华, 祝蕾, 等. 荧光定量 PCR 对 N<sub>0</sub> 期结直肠癌淋巴结微转移的检测及其临床意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(8): 583-585.
- [7] Duenne AA, Werner JA. Functional anatomy of lymphatic vessels under the aspect of tumor invasion [J]. *Recent Result Cancer Res* 2000, 157: 82-89.
- [8] Sebastian F, Schoppmann MD, Guenther Bayer MD, et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasive breast cancer [J]. *Ann Surg* 2004, 240(2): 306-312.
- [9] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. *Nat Med* 2003 9(6): 677-684.
- [10] Bryant CS, Munkarah AR, Kumar S, et al. Reduction of hypoxia-induced angiogenesis in ovarian cancer cells by inhibition of HIF-1 alpha gene expression [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2010, 282(6): 677-683.

( 本文编辑 刘璐 )