

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.042

食管鳞状细胞癌中 HDGF、VEGF 表达与微血管形成的关系 *

杨 进¹ 马水根^{2△} 徐朝军¹ 尹晓清¹ 尹邦良³

(1 湖南省中医药大学第一附属医院 湖南 长沙 410007; 2 中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院 湖南 长沙 410013;

3 中南大学湘雅二医院 湖南 长沙 410011)

摘要 目的:研究食管鳞状细胞癌中肝癌衍生生长因子(HDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达及其与微血管形成的关系。**方法:**通过免疫组化 SABC 法检测和比较 68 例食管鳞癌、20 例切缘正常组织中 HDGF、VEGF 的表达和 CD34 标记的微血管密度(MVD),分析 HDGF 和 VEGF 表达之间的关系及其与食管鳞癌患者临床病理因素和食管癌组织 MVD 值的关系。**结果:**食管鳞癌组织中 HDGF(63.2%)和 VEGF(72.1%)的阳性表达率均明显高于切缘正常粘膜组织(15.0%、20.0%)($P<0.05$),食管鳞癌组织和切缘正常粘膜组织中的 MVD 值分别为 35.48 ± 5.75 和 13.50 ± 2.1 ($P<0.05$)。食管鳞癌组织 HDGF 的阳性表达率仅与其临床分期明显相关($P<0.05$),而 VEGF 的阳性表达率与其淋巴结转移、临床分期均显著相关($P<0.05$),二者在食管鳞癌组织中的表达呈显著正相关($P<0.05$)。食管鳞癌组织中 HDGF、VEGF 阳性表达组 MVD 值均明显高于 HDGF、VEGF 阴性表达组($P<0.05$)。**结论:**HDGF 能通过诱导 VEGF 的产生,从而促进血管生成,参与食管鳞癌的发生、发展及转移。

关键词:食管鳞状细胞癌;肝癌衍生生长因子;血管内皮生长因子;微血管密度;免疫组化法

中图分类号:R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)30-5956-04

Relationship between the Expression of HDGF, VEGF and the Angiogenesis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma*

YANG Jin¹, MA Shui-gen^{2△}, XU Zhao-jun¹, YIN Xiao-qing¹, YIN Bang-liang³

(1 The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410007, China;

2 The Affiliated Cancer Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, China;

3 The Second Xiangya Hospital of the Central South University, Changsha, Hunan, 410011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) and vascular endothelial growth factor(VEGF) and their correlation with microangiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma(SCC). **Methods:** Specimens from 68 cases of esophageal SCC tissues and 20 cases of the adjacent normal esophageal tissues were examined by immunohistochemical technique (SABC staining). The microvessel density (MVD) of tumor was evaluated using CD34 antibody as an endothelial marker with the same technique. The relationship between the expression of HDGF and VEGF was analyzed, and their correlations with clinicopathological characteristics and MVD values in patients with esophageal squamous cell carcinoma were discussed. **Results:** The positive expression rates of HDGF (63.2%) and VEGF (72.1%) were significantly higher in esophageal SCC tissues than those in the adjacent normal esophageal tissues (15.0%) and (20.0%) respectively ($P<0.05$), and so did the MVD which was (35.48 ± 5.75) in esophageal SCC and (13.50 ± 2.1) in the adjacent normal esophageal tissues($P<0.05$). The expression of HDGF was only correlated with the clinical stage of esophageal SCC($P<0.05$). The expression of VEGF had significant correlation with the clinical stage and lymph node metastasis of esophageal SCC($P<0.05$). The expression of HDGF were positively correlated with the expressions of VEGF($P<0.05$). The value of MVD in cases with positive expression of HDGF and VEGF were significantly higher than those cases with negative expression of HDGF and VEGF ($P<0.05$). **Conclusion:** HDGF could promote the tumor angiogenesis through inducing the production of VEGF, which was closely related to the occurrence, development and metastasis of esophageal SCC.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; Hepatoma derived growth factor; Vascular endothelial growth factor; Microvessel density; Immunohistochemical method

Chinese Library Classification(CLC): R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)30-5956-04

* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(14JJ7060)

作者简介:杨进(1979-),男,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:食管癌的防治研究,

电话:0731-85369067, E-mail: yangjin98@gmail.com

△通讯作者:马水根,电话:0731-89762101, E-mail: msg10@21cn.com

(收稿日期:2014-04-10 接受日期:2014-05-09)

前言

食管癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率位居恶性肿瘤的第4位。阐明食管癌的生物学行为,对了解其发病机制,开发高效特异的诊断和治疗方法及提高患者的五年生存率具有重要的意义。肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)是从人肝癌细胞株 Huh-7 中提取出来的一种肝素结合蛋白^[1],高表达于胎儿组织,转录到细胞核后可以刺激细胞增殖,促进细胞有丝分裂。有研究表明,HDGF 参与肿瘤细胞的恶性生物学行为如增殖、侵袭和转移等,其高表达与肿瘤患者的预后密切相关。血管生成是肿瘤发生发展过程中的关键事件。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),又称血管通透因子(vascular permeability factor, VPF),是促进内皮细胞的迁移、增殖和分化最重要的分子之一,在体外具有促细胞分裂的作用,在体内具有促血管生成的作用,与骨肉瘤、胃癌、宫颈癌和肺癌等的预后密切相关,降低其表达可以抑制肿瘤组织的血管生成,诱导肿瘤细胞凋亡,从而起到治疗肿瘤的作用。

本研究应用免疫组化 SABC 法检测了食管鳞癌组织中 HDGF、VEGF 蛋白的表达,并分析了二者表达的相关性及其与 MVD 的关系,旨在探讨二者的表达与食管鳞癌患者性别、年龄、临床分期、淋巴结转移和组织学分级等的关系,为食管鳞癌的诊断和治疗提供帮助。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取中南大学湘雅二医院 2011 年 3 月至 2013 年 3 月期间初次住院的 68 例食管鳞癌病例。受检者均行手术治疗,术前均未接受其它治疗,术后标本均经病检确诊。年龄 42~73 岁,平均 60.4 岁,年龄 ≥ 55 岁者 51 例, < 55 岁者 17 例;男 49 例,女 19 例;伴淋巴结转移者 40 例;组织学分级按 WHO 标准:高中分化癌 44 例,低分化癌 24 例;TNM 临床分期:I-II 期 43 例,III-IV 期 25 例。同时选取 20 例切缘正常粘膜组织作为对照组。

1.2 方法

采用免疫组化链霉菌-抗生物素蛋白-过氧化物酶法(SABC 法),选择已知阳性切片作阳性对照,用 PBS 溶液替代一抗作阴性对照。HDGF 兔抗人多克隆抗体工作液浓度 1:100。鼠抗人 VEGF 及 CD34 单克隆抗体为工作液。具体操作如下:石蜡切片烤片 24 小时,二甲苯脱蜡,水化,蒸馏水洗,3% H_2O_2 处理 15 分钟,蒸馏水洗。抗原高压修复,室温冷却,PBS 洗。正常山羊血清封闭 15 分钟,去血清后滴加一抗,4℃ 过夜,PBS 洗,滴加生物素标记二抗,37℃ 30 分钟,PBS 洗,滴加 SABC,37℃ 15 分钟,PBS 洗,DAB 显色,自来水洗,苏木素复染,盐酸酒精分化,流水返蓝,脱水,二甲苯透明,封片。

1.3 结果判定标准

临床和病理双盲阅片。HDGF 阳性为胞质和胞核均呈现浅黄色至棕黄色,VEGF 阳性为胞质呈现黄色,高倍镜下随机取 10 个视野,各记数 100 个细胞,计算其阳性率,将平均阳性率 $>20\%$ 的归为阳性, $\leq 20\%$ 的归为阴性;用抗体 CD34 标记新生血管,计数着色的毛细血管和微小血管,凡着色的单个内皮细胞或内皮细胞簇,带或不带管腔均作为 1 个微血管计数(microvessel density, MVD),每张染色切片选择 3 个血管最多的间质区,在 200 倍视野下计数,每例标本分别计数 5 个视野,取其平均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 版,计数资料率的比较及相关性分析采用 χ^2 检验,计量资料平均值的比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞癌及切缘正常粘膜组织中的 HDGF、VEGF 表达及 MVD 值的比较

食管鳞癌及切缘正常粘膜组织中 HDGF、VEGF 的阳性表达率分别为 63.2%和 15.0%,72.1%和 20.0%,食管鳞癌组织均显著高于切缘正常粘膜组织($P<0.05$)。食管鳞癌组织 MVD 值为 35.48 ± 5.75 ,显著高于切缘正常粘膜组织,二者有显著差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 食管鳞癌及切缘正常粘膜组织中的 HDGF、VEGF 表达及 MVD 值的比较

Table 1 Comparison of the expression of HDGF and VEGF and MVD between esophageal squamous cell carcinoma tissue and adjacent normal esophageal tissue

Histological type	Case	Positive HDGF expression	Positive VEGF expression	MVD($\bar{x} \pm s$)
		(%)	(%)	
Esophageal squamous cell carcinoma	68	43(63.2)	49(72.1)	35.48 ± 5.75
Adjacent normal esophageal tissue	20	3(15.0)	4(20.0)	13.50 ± 2.1
χ^2		14.413	17.485	
t				8.452
P		0.000	0.000	0.000

2.2 HDGF 和 VEGF 表达与食管鳞癌临床病理因素的关系

临床分期晚的食管鳞癌组织中 HDGF 的阳性表达率显著高于临床分期早的食管鳞癌组织($P<0.05$);临床分期晚、有淋巴结转移的食管鳞癌组织中 VEGF 的阳性表达率明显高于临床分期早、无淋巴结转移的食管鳞癌组织($P<0.05$),见表 2。

2.3 食管鳞癌组织中 HDGF 和 VEGF 表达的相关性

在 43 例 HDGF 阳性的食管鳞癌中,VEGF 阳性者 38 例,25 例 HDGF 阴性食管鳞癌中,VEGF 阴性者 14 例,经 Pearson 关联性检验分析,二者表达呈显著正相关($\gamma=0.477$, $P<0.05$),见表 3。

2.4 食管鳞癌组织中 HDGF 和 VEGF 表达与 MVD 的关系

表 2 HDGF 和 VEGF 表达与食管鳞癌临床病理因素的关系

Table 2 The relationship between HDGF and VEGF expression and clinicopathologic factors of esophageal squamous cell carcinoma

Group	Case	HDGF expression			VEGF expression		
		Positive(%)	χ^2	P	Positive(%)	χ^2	P
Sex							
Male	49	30(61.2)	0.305	>0.05	36(73.5)	0.173	>0.05
Female	19	13(68.4)			13(68.4)		
Years							
≥ 55	51	32(62.7)	0.021	>0.05	37(72.5)	0.024	>0.05
< 55	17	11(64.7)			12(70.6)		
Clinical Stage							
I-II	43	22(51.2)	7.332	<0.05	26(60.5)	4.826	<0.05
III-IV	25	21(84.0)			23(85.2)		
Lymphnode							
Metastasis			0.760	>0.05		8.080	<0.05
N0	28	16(57.1)			15(53.6)		
N1	40	27(67.5)			34(85.0)		
Histological							
Grade			0.188	>0.05		1.683	>0.05
G1-G2	44	27(61.4)			34(77.3)		
G3	24	16(66.7)			15(62.5)		

食管鳞癌组织中 HDGF 阳性组 MVD 值为 (43.26± 6.11), 值为(46.90± 7.07),亦明显高于阴性组(16.79± 2.13),差异具有明显高于阴性组 (18.55± 3.61), (P<0.05); VEGF 阳性组 MVD 统计学意义(P<0.05),见表 4。

表 3 食管鳞癌组织中 HDGF 和 VEGF 表达的相关性

Table 3 The relationship between expression of HDGF and VEGF in esophageal squamous cell carcinoma

VEGF	HDGF		Total
	Negative	Positive	
Negative	14	5	19
Positive	11	38	49
total	25	43	68

注: Pearson 相关系数 $\gamma=0.477$, P=0.000。

Note: Pearson correlation factor $\gamma=0.477$, P=0.000.

表 4 食管鳞癌组织中 HDGF 和 VEGF 表达与 MVD 的关系

Table 4 The relationship between expression of HDGF, VEGF and MVD in esophageal squamous cell carcinoma

Group	HDGF expression		VEGF expression	
	Positive	Negative	Positive	Negative
MVD	43.26± 6.11	18.55± 3.61	46.90± 7.07	16.79± 2.13
t	5.022		7.360	
P	0.000		0.000	

3 讨论

肝癌衍生生长因子(HDGF)是从人肝癌细胞株中提纯而来的一种酸性肝素结合蛋白,具有细胞增殖活性。作为肝素结合生长因子家族的成员之一,HDGF 具有广泛的生物学功能,包括促有丝分裂和促血管生成,抑制细胞凋亡,参与创伤修复等活性。HDGF mRNA 在多种组织器官中均有表达,主要出现于胎儿组织中,随着细胞的分化成熟,其表达水平会渐渐降低。研

究表明,HDGF 在动物模型及多种癌细胞中呈高表达,而在癌旁组织中呈低表达,其过度表达与肿瘤的复发及一些不良的临床病理特征显著相关,如肿瘤的大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移及脉管浸润等^[28]。本研究结果表明食管鳞癌组织中 HDGF 蛋白表达显著上调,且与患者的性别、年龄、有无淋巴结转移及肿瘤细胞分化程度均无关,而与其临床分期显著相关,表明 HDGF 的高表达可能与食管鳞癌的发展有关^[9]。

血管内皮生长因子(VEGF)是非常重要的血管生成刺激因

子,可在体内诱导新生血管的形成。VEGF 是高度保守的同源二聚体糖蛋白,由于 mRNA 剪切方式的不同,可以产生出至少 5 种蛋白形式,能直接作用于血管内皮细胞,促进其有丝分裂并增殖,增加血管通透性。VEGF 与实体瘤细胞的生长、转移、组织学分级和预后密切相关^[10-15]。肿瘤的生长和转移都需要依赖于新生血管的生成,来提供足够的氧气和营养物质,维持肿瘤组织的快速生长。抑制肿瘤的血管生成可抑制其生长和转移,是一种有效的抗肿瘤治疗,抑制 VEGF 的表达因而成为潜在的抗癌治疗策略^[16]。人源化抗 VEGF 单克隆抗体(Avastin)能中和 VEGF 的生理作用,已被美国批准用于治疗多种肿瘤^[17]。本研究发现食管鳞癌组织中 VEGF 蛋白表达明显上调,且与患者的临床分期和有无临床转移显著相关,但与患者的性别、年龄及肿瘤细胞分化程度均无关,表明 VEGF 的高表达可能促进了食管鳞癌的进展,其促血管生成作用可能有助于食管癌细胞侵入淋巴管,在淋巴结形成转移灶。

通过测定肿瘤组织中微血管密度可以反映肿瘤血管的生成情况^[18]。本研究结果显示食管鳞癌组织中 MVD 值显著高于切缘正常粘膜组织,表明食管癌组织中血管生成增加;而 HDGF、VEGF 阳性表达组的 MVD 值明显高于阴性表达组,提示 HDGF 和 VEGF 可能共同参与了食管鳞癌新生血管的生成^[19,20]。此外,HDGF 表达与 VEGF 表达呈显著正相关,我们推测 HDGF 可能通过诱导 VEGF 的产生,提高食管鳞癌新生血管生成,进而促进食管癌的发生和发展。

综上所述,HDGF 和 VEGF 在食管鳞癌中的高表达可能通过促进血管生成,参与食管鳞癌的发生、发展及转移,通过抑制 HDGF 和 VEGF 的过度表达可能为食管癌提供了新的有效的治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Nakamura H, Kambe H, Egawa T, et al. Partial purification and characterization of human hepatoma-derived growth factor [J]. Clin Chim Acta, 1989, 183(3): 273-284
- [2] Zhao J, Ma MZ, Ren H, et al. Anti-HDGF targets cancer and cancer stromal stem cells resistant to chemotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(13): 3567-3576
- [3] Tsai HE, Liu GS, Kung ML, et al. Downregulation of hepatoma-derived growth factor contributes to retarded lung metastasis via inhibition of epithelial-mesenchymal transition by systemic POMC gene delivery in melanoma[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(6): 1016-1025
- [4] Li M, Shen J, Wu X, et al. Downregulated expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) reduces gallbladder cancer cell proliferation and invasion[J]. Med Oncol, 2013, 30(2):587-587
- [5] Thirant C, Galan-Moya EM, Dubois LG, et al. Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor [J]. Stem Cells, 2012, 30(5): 845-853
- [6] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Expression level of hepatoma-derived growth factor correlates with tumor recurrence of esophageal carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(7): 2141-2149
- [7] Zhao J, Yu HX, Lin L, et al. Interactome study suggests multiple cellular functions of hepatoma-derived growth factor (HDGF) [J]. Journal of Proteomics, 2011, 75(2): 588-602
- [8] Lin YW, Li CF, Chen HY, et al. The expression and prognostic significance of hepatoma-derived growth factor in oral cancer[J]. Oral Oncology, 2012, 48(7): 629-635
- [9] 徐统震, 孙雪飞, 栾子营, 等. HDGF 和 ADAM9 在食管癌中的异常表达及意义[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2013, 29(10): 610-613
Xu Tong-zhen, Sun Xue-fei, Luan Zi-ying, et al. The expression and significance of HDGF and ADAM9 in esophageal cancer [J]. Chin J Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 29(10): 610-613
- [10] Rybalov M, Ananias HJ, Hoving HD, et al. PSMA, EpCAM, VEGF and GRPR as Imaging Targets in Locally Recurrent Prostate Cancer after Radiotherapy[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 6046-6061
- [11] Shu Q, Li W, Li H, et al. Vasostatin Inhibits VEGF-Induced Endothelial Cell Proliferation, Tube Formation and Induces Cell Apoptosis under Oxygen Deprivation[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 6019-6030
- [12] Bergmann L, Beck J, Bothe K, et al. Treatment algorithm for metastatic renal cell carcinoma-recommendations based on evidence and clinical practice[J]. Oncol Res Treat, 2014, 37(3): 136-141
- [13] Liu YC, Zhao J, Hu CE, et al. Comprehensive analysis of vascular endothelial growth factor-C related factors in stomach cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 1925-1929
- [14] Li L, Wang L, Song P, et al. Critical role of histone demethylase RBP2 in human gastric cancer angiogenesis[J]. Mol Cancer, 2014, 13(1): 81-81
- [15] Yu YF, Zhang Y, Shen N, et al. Effect of VEGF, P53 and telomerase on angiogenesis of gastric carcinoma tissue [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2014, 7(4): 293-296
- [16] Feng Q, Yu MZ, Wang JC, et al. Synergistic inhibition of breast cancer by co-delivery of VEGF siRNA and paclitaxel via vaporeotide-modified core-shell nanoparticles [J]. Biomaterials, 2014, 35(18): 5028-5038
- [17] Verzoni E, Grassi P, Testa I, et al. Targeted treatments in advanced renal cell carcinoma: focus on axitinib [J]. Pharmacogenomics Pers Med, 2014, 27(7): 107-116
- [18] Li WD, Yang DL, Wang SL, et al. Increased expression of CD146 and microvessel density (MVD) in invasive micropapillary carcinoma of the breast: Comparative study with invasive ductal carcinoma-not otherwise specified [J]. Pathology-Research and Practice, 2011, 207(12): 739-746
- [19] 周强, 何庆. HDGF 和 VEGF 在胃癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 中国医药指南, 2013, 11(12): 67-70
Zhou Qiang, He Qing. Relationship of HDGF and VEGF Expression with Gastric Cancer Angiogenesis [J]. Guide of China Medicine, 2013, 11(12): 67-70
- [20] Shree G S, Nidhi A, Siddhartha D G, et al. Angiogenesis in renal cell carcinoma: correlation of microvessel density and microvessel area with other prognostic factors [J]. Int Urol Nephrol, 2011, 43(1): 125-129