

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201604006

· 论著 ·

鼻咽癌组织中乏氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子的表达及其临床意义

向元佛¹,张碧波¹,吴娟²,雷兰英³,王陈荣¹

(武汉市第一医院 1. 耳鼻咽喉科; 2. 皮肤科; 3. 病理科,湖北 武汉 430022)

摘要: **目的** 研究乏氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在鼻咽癌组织中的表达情况,并分析其相关性及其与患者预后的关系。**方法** 运用免疫组化染色及评分方法检测 56 例鼻咽癌患者及 18 例鼻咽部慢性炎症患者鼻腔黏膜组织中 HIF-1 α 、VEGF 的表达差异,并进一步分析 HIF-1 α 、VEGF 表达水平与鼻咽癌患者临床病理指标之间的关系。**结果** 免疫组化结果显示,在 56 例鼻咽癌患者中,HIF-1 α 蛋白表达阳性率为 53.6% (30/56),其中“-”26 例,“+”11 例,“++”12 例,“+++”7 例;VEGF 蛋白表达阳性率为 67.9% (38/56),其中“-”18 例,“+”17 例,“++”13 例,“+++”8 例;在 18 例鼻咽部慢性炎症患者中,HIF-1 α 和 VEGF 表达阳性率分别为 22.2% (4/18) 和 27.8% (5/18)。同时,在鼻咽癌患者中,HIF-1 α 、VEGF 的表达均与患者年龄、性别、分化程度无相关性 ($P > 0.05$),而与临床分期、T 分级、淋巴结转移具有相关性 ($P < 0.05$)。Spearman 分析显示鼻咽癌组织中 HIF-1 α 表达与 VEGF 表达呈正相关。**结论** 鼻咽癌组织中存在 HIF-1 α 及 VEGF 的高表达,HIF-1 α 及 VEGF 在鼻咽癌组织中的表达呈正相关,协同促进肿瘤新血管形成。

关键词: 乏氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 鼻咽癌; 免疫组化; 临床意义

中图分类号: R739.63 文献标识码: A 文章编号: 1007-1520(2016)04-0279-05

Expressions of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and their clinical significances

XIANG Yuan-di, ZHANG Bi-bo, WU Juan, LEI Lan-yin, WANG Chen-rong

(Department of Otolaryngology, the First Hospital of Wuhan City, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To detect the expressions of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues, and to investigate their relationships and clinical significances. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression levels of HIF-1 α and VEGF in 56 specimens of NPC and 18 of normal nasal mucosal tissue. The relationships between expression of HIF-1 α and that of VEGF, their expressions and clinicopathological features of NPC were analyzed. **Results** In NPC, the positive rate of HIF-1 α was 53.6% (30/56), including “+” in 11 cases, “++” in 12 and “+++” in 7. The positive rate of VEGF was 67.9% (38/56) including “+” in 17 cases, “++” in 13, and “+++” in 8. The positive rates of HIF-1 α and VEGF in normal nasal mucosa were 22.2% (4/18) and 27.8% (5/18), respectively. In NPC, the expressions of HIF-1 α and VEGF expression had no correlation with patients' age, gender and differentiation degree of tumor (all $P > 0.05$), but were correlated with clinical stage, T stage and lymphatic metastasis of tumor (all $P < 0.05$). Spearman analysis showed that HIF-1 α expression was positively correlated with that of VEGF in NPC. **Conclusion** HIF-1 α and VEGF are over-expressed in NPC. Their positively correlated over-expressions may have a synergistic effect on the neovascularization of NPC.

Key words: Hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; Nasopharyngeal neoplasm; Immunohistochemistry; Clinical significance

鼻咽癌(NPC)是常见的耳鼻咽喉科恶性肿瘤,其发病可能是原癌基因激活、抑癌基因的失活、环境因素改变等多因素、多基因共同作用的复杂过程^[1]。由于影响鼻咽癌治疗和预后的主要因素为转移和复发,因此,探讨影响鼻咽癌转移及复发的相关因素具有重要的临床意义。在恶性肿瘤的发生发展和转移过程中,新生血管的生成和对低氧的耐受性是其中的关键环节^[2]。乏氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是在缺氧诱导情况下肿瘤细胞产生的一种核转录因子,其转录调控产物与肿瘤的血管生成及侵袭转移密切相关^[3]。在缺氧条件下,细胞内 HIF-1 α 表达升高,调节其下游一系列靶基因的表达,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,从而促进肿瘤新生血管生成和侵袭转移,从而使细胞适应缺氧环境,促进肿瘤的恶性转化^[4-5]。VEGF是目前所知最重要的促血管生成因子,VEGF通过结合血管内皮细胞上的受体,经过细胞内一系列信号转导过程,可强烈的促进内皮细胞的分化,刺激血管生成^[6-7]。迄今为止,关于 HIF-1 α 和 VEGF 在鼻咽癌中的表达及临床意义已有少量文献报道,但目前尚无一致结论。本文旨在研究 HIF-1 α 和 VEGF 在鼻咽癌组织中的表达情况,并探讨其与鼻咽癌的临床病理指标及预后的关系,为临床相关研究及防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收取2008年5月~2013年9月于我院进行活检并确诊鼻咽癌患者的石蜡标本56例,所有患者均具有完整病历存档,随访资料健全。56例鼻咽癌患者中男47例,女9例;肿瘤临床分期采用2002年国际抗癌联盟(UICC 2002年)分期标准,其中高分化19例,中低分化37例;临床分期中I、II期41例,III、IV期15例;T1、T2期38例,T3、T4期18例;无颈部淋巴结转移33例,有颈部淋巴结转移23例。同时收集于本院进行手术的18例慢性鼻咽部炎症患者的鼻腔黏膜组织作为对照。

1.2 免疫组化

①石蜡切片标本置于载玻片后,再75℃烤箱烤片3h,然后立即置于梯度二甲苯溶液和梯度乙醇溶液中进行切片脱蜡,放置待用;②先使用碧云天公司抗原修复液进行修复,对已脱蜡的病理切片进行HE

染色和PHD2免疫组化染色。染色步骤为:3% H₂O₂室温孵育5~10min,以消除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水冲洗,PBS浸泡约5min(至少2次);5%~10%正常山羊血清(PBS稀释)封闭,置于室温孵育约10min,倾去血清,勿洗,滴加一抗PHD2一抗购自sigma公司工作液,37℃孵育4h或4℃过夜;PBS冲洗,5min3次;滴加适量生物素标记的二抗工作液,37℃孵育10~30min;PBS冲洗,5min3次;滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育约10~30min;PBS冲洗,5min3次;显色剂显色15min(DAB);自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。阳性对照采用Hela细胞,阴性对照使用磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗。染色结束后,置于显微镜下拍照分析并统计各组之间表达差异。

1.3 评价标准

本研究采取双盲法判定免疫组化实验结果,染色结束后,在光学显微镜高倍镜下(400倍)观察切片,每张切片随机选择6个视野比较。HIF-1 α 和VEGF免疫组化染色的最终得分以阳性细胞百分率及染色强度得分两项得分之后进行计算,其中细胞染色强度得分评判标准为:无着色0分,弱着色1分(浅黄色),中等着色2分(棕黄色),强着色3分(黄褐色)。阳性细胞百分率及得分计算方法为:阳性细胞 $\leq 5\%$ 记为0分,6% \leq 阳性细胞 $\leq 25\%$ 记为1分,26% \leq 阳性细胞 $\leq 50\%$ 记为2分,阳性细胞 $> 50\%$ 记为3分。将两项得分相加后进行组化结果着色强度判定,判定标准为:0分阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为中等阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。

1.4 统计学分析

本研究采用SPSS 15.0统计学软件进行统计,同种蛋白的组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义;两种蛋白表达的相关性分析及比较采用Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 免疫组化检测 HIF-1 α 、VEGF 在鼻咽癌组织中的表达情况

高倍显微镜下可见鼻咽癌组织中HIF-1 α 蛋白主要分布在细胞质,细胞核也有少量表达(图1A)。在56例鼻咽癌组织中,HIF-1 α 蛋白表达阳性率为53.6%(30/56),具体数据见表1。VEGF蛋白表达

部位主要在细胞质,细胞膜也有少量染色(图1B)。VEGF蛋白表达阳性率为67.9%(38/56),其中“-”18例,“+”17例,“++”13例,“+++”8例。具体数据见表1。同时,在18例鼻咽部慢性炎症患者的鼻黏膜组织中,HIF-1 α 蛋白表达阳性率为22.2%(4/18),VEGF蛋白表达阳性率分别为27.8%(5/18)(图1C、D),与鼻咽癌组织相比,HIF-1 α 和VEGF的表达量差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

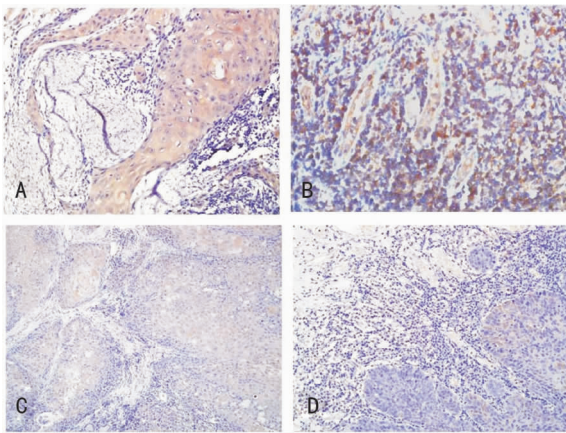


图1 HIF-1 α 和VEGF在鼻咽癌与鼻咽部慢性炎症组织中的表达(免疫组化 $\times 400$) A:鼻咽癌组织中HIF-1 α 高表达;B:鼻咽癌组织中VEGF高表达;C:鼻咽部慢性炎症组织中HIF-1 α 低表达;D:鼻咽部慢性炎症组织中VEGF低表达

表1 HIF-1 α 和VEGF分别在56例鼻咽癌组织中的表达情况(例,%)

蛋白表达	例数	百分比
HIF-1α		
阴性	26	46.4
弱阳性	11	19.6
中等阳性	12	21.4
强阳性	7	12.5
VEGF		
阴性	18	32.1
弱阳性	17	30.4
中等阳性	13	23.2
强阳性	8	14.3

2.2 HIF-1 α 及VEGF表达水平与患者的临床病理特征之间的关系

分别分析HIF-1 α 和VEGF表达水平与鼻咽癌患者临床资料之间的关系,发现56例鼻咽癌患者中,HIF-1 α 的蛋白表达水平差异与患者性别、年龄、分化程度无相关性($P > 0.05$),而与临床分期、T分

级、淋巴结转移具有相关性($P < 0.05$)(表2)。VEGF蛋白表达水平同样与患者临床分期、T分级、淋巴结转移具有显著相关性($P < 0.05$),而与患者性别、年龄、分化程度无关(表3)。

表2 HIF-1 α 蛋白表达与患者临床病理特征的关系[例(%)]

临床资料	例数	HIF-1 α 蛋白表达		P
		阴性	阳性	
性别				
男	47	21(37.5)	26(46.4)	0.867
女	9	5(8.9)	4(7.1)	
年龄(岁)				
<59	12	7(12.5)	5(8.9)	0.753
≥ 59	44	19(33.9)	25(44.6)	
分化程度				
中、低	39	18(32.1)	21(37.5)	0.242
高	17	8(14.3)	9(16.1)	
淋巴结转移				
无	33	19(34.0)	14(25.0)	0.017
有	23	7(12.5)	16(28.6)	
临床分期				
I、II	41	22(39.3)	19(34.0)	0.028
III、IV	15	4(7.1)	11(19.6)	
T分级				
T1、T2	38	21(37.5)	17(30.4)	0.013
T3、T4	18	5(8.9)	13(23.2)	

表3 VEGF蛋白表达与患者临床病理特征的关系[例(%)]

临床资料	例数	VEGF蛋白表达		P
		阴性	阳性	
性别				
男	47	14(25.0)	33(58.9)	0.912
女	9	4(7.1)	5(8.9)	
年龄(岁)				
<59	12	6(10.7)	6(10.7)	0.830
≥ 59	44	12(21.4)	32(57.1)	
分化程度				
中、低	39	12(21.4)	27(48.2)	0.304
高	17	6(10.7)	11(19.6)	
淋巴结转移				
无	33	11(19.6)	22(39.3)	0.017
有	23	7(12.5)	16(28.6)	
临床分期				
I、II	41	13(23.2)	26(46.4)	0.028
III、IV	15	5(8.9)	12(21.4)	
T分级				
T1、T2	38	14(25.0)	24(25.0)	0.013
T3、T4	18	4(7.1)	14(42.9)	

2.3 HIF-1 α 与VEGF表达之间的相关性

56例鼻咽癌组织标本中,HIF-1 α 与VEGF同时表达阳性者24例,HIF-1 α 与VEGF同时表达阴性者13例,VEGF阳性表达且HIF-1 α 阴性表达者

14例, HIF-1 α 阳性表达且 VEGF 阴性表达者 5 例。采用 Spearman 等级相关分析, 结果显示, HIF-1 α 与 VEGF 之间呈正相关性 ($r=0.703$, $P<0.001$)。具体见表 4。

表 4 56 例鼻咽癌组织中 HIF-1 α 与 VEGF 表达的相关性(例)

HIF-1 α	例数	VEGF	
		阴性	阳性
阴性	26	13	14
阳性	30	5	24

3 讨论

在恶性肿瘤的发生发展过程中, 新生血管生成发挥着重要的作用。肿瘤既能通过新生血管从宿主吸取养分继续生长, 同时, 新生血管又可以向远处输送肿瘤细胞, 从而促进肿瘤从原发灶向继发灶的转移^[8]。自 1971 年 Folkman 首次提出肿瘤生长的血管依赖性假说后^[9], 关于肿瘤血管生成的研究受到越来越多国内外学者们的重视, 抗血管生成靶向治疗逐渐成为肿瘤防治领域的热点问题。其中, 在肿瘤血管生成涉及的多条信号传导通路中, HIF-1 α /VEGF 传导途径发挥着重要作用。HIF-1 α 是人体在乏氧条件下广泛存在的一种转录因子。在肿瘤细胞中, HIF-1 α 可通过促进新生血管生成和肿瘤转移, 使肿瘤适应缺氧环境, 促进其恶性转化。其下游所调控的靶基因包括 VEGF、红细胞生成素等。VEGF 是已知的最重要的促血管生成因子, 能特异结合血管内皮细胞, 促进内皮细胞的生长分化, 强烈刺激血管生成^[10-11]。目前的研究已发现 HIF-1 α /VEGF 在多种肿瘤的生长和转移中发挥着关键作用, 然而, 关于 HIF-1 α 、VEGF 和鼻咽癌的相关性及具体机制的研究尚存在一定的争议。本研究通过对鼻咽癌患者的 HIF-1 α 和 VEGF 表达水平进行免疫组化及评分, 统计两者在鼻咽癌组织中的表达情况及相关性。

在本研究中, 我们采用了免疫组化法检测了 HIF-1 α 、VEGF 蛋白在鼻咽癌组织中的表达情况, 通过细胞染色强度和阳性细胞百分率对结果进行评分, 结果发现, HIF-1 α 蛋白主要分布在细胞质, 少量位于细胞核, 在 56 例鼻咽癌组织中表达阳性率为 53.6% (30/56)。VEGF 蛋白同样定位在细胞质, 表达阳性率为 67.9% (38/56)。此外, 在 18 例慢性鼻咽部炎症患者中, HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达阳性率分别为 22.2% (4/18) 和 27.8% (5/18), 与鼻咽癌

组织相比, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。以上结果提示 HIF-1 α 和 VEGF 在鼻咽癌组织中均呈显著高表达, 提示其表达水平可能和鼻咽癌的发生发展具有相关性。继而作者分析了 HIF-1 α 、VEGF 表达水平与鼻咽癌患者临床病理指标之间的关系, 结果显示, HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平均与患者年龄、性别、分化程度无显著相关性 ($P>0.05$), 而与肿瘤的临床分期、T 分级、淋巴结转移情况具有相关性 ($P<0.05$), 这与部分研究者的前期研究成果一致。Fang 等^[12]研究表明在乳腺癌中 HIF-1 可通过促进 VEGF 的表达, 从而间接促进肿瘤血管的发生。Chang 等^[13]研究发现 VEGF 是肿瘤新生血管生成的起始因子。在小鼠模型中, 以菌体和肿瘤诱导后出现新生血管生成, 毛细血管中组织蛋白酶增加, 蛋白酶抑制剂减少。Ouchi 等^[14]报道 VEGF 在肿瘤新血管形成中起主导作用, 在缺氧等因素的刺激下, HIF-1 α 表达升高进一步导致 VEGF 表达增加, 对血管生成起着正向调馈作用。与上述研究结果一致, 我们的研究发现, 随着鼻咽癌临床分期的提高和淋巴结转移的增多, HIF-1 α 和 VEGF 的表达水平也相应升高, 具有正相关, 提示 HIF-1 α /VEGF 可能与鼻咽癌的发生和转移过程密切相关, 但关于其具体机制, 尚需大量基础实验的进一步研究。

目前国内外虽有关于 HIF-1 α /VEGF 在头颈部肿瘤中表达的报道, 但结论尚不一致, 而联合检测两者在鼻咽癌中的表达及相互关系的研究更为少见。我们的研究通过 Spearman 等级相关分析 HIF-1 α 与 VEGF 在鼻咽癌中的表达相关性, 发现两者均呈高表达, 且表达程度呈显著的正相关, 从而提示在鼻咽癌的发生发展中, HIF-1 α /VEGF 通路的调控可能起着重要的作用。鼻咽癌肿瘤组织处于肿瘤微环境中, 这一环境下的主要变化为肿瘤血管结构及组织分布异常, 肿瘤微环境会造成缺氧的特征^[14]。HIF-1 α 是缺氧诱导因子, 在缺氧刺激下其表达水平显著升高。目前在胃癌、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中的研究表明, HIF-1 α 在 VEGF 信号通路中起着枢纽作用^[15-17], 既能增加 VEGF mRNA 的稳定性, 也可以增加 VEGF 的转录活性, 进而促进肿瘤新生血管的形成, 在鼻咽癌组织的生长、浸润和转移中起作用^[18]。

综上所述, 我们的研究发现 HIF-1 α 、VEGF 可能是鼻咽癌在肿瘤微环境中介导新生血管生成的关键蛋白。因此, 抑制 HIF-1 α /VEGF 通路可能会为抑制鼻咽癌细胞的存活、血管生成以及侵袭转移等方面

提供新的思路。同时,临床检测 HIF-1 α 和 VEGF 在鼻咽癌中的表达水平,有助于判断鼻咽癌的发生、发展及预后。对 HIF-1 α 和 VEGF 在鼻咽癌中的作用及机制进行进一步更深入的研究,可为鼻咽癌的抗血管生成靶向治疗提供实验室依据。

参考文献:

[1] Wee JT, Ha TC, Loong SL, et al. Is nasopharyngeal cancer really a "Cantonese cancer" [J]. Chin J Cancer, 2010, 29(5):517 - 526.

[2] Roskoski R, Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression [J]. Crit Re Oncol Hematol, 2007, 62(3):179 - 213.

[3] Schönerberger MJ, Kovacs WJ. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles [J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 21(3): 42.

[4] 刘阳, 杨福兵, 刁正文, 等. 葡萄糖转运蛋白-3 及缺氧诱导因子 1 α 在星形细胞瘤中的表达 [J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10(1): 29 - 32.

[5] 赵宁辉, 杨勇涛, 徐蔚, 等. 低氧诱导因子 1 α 过表达对 PC12 细胞 CoCl₂ 拟缺氧模型中凋亡的影响 [J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(12): 1189 - 1192.

[6] Yancopoulos GD. Clinical application of therapies targeting VEGF [J]. Cell, 2010, 143(1): 13 - 16.

[7] Simiantonaki N, Jayasinghe C, Michel-Schmidt RS, et al. Hypoxia-induced epithelial VEGF-C/VEGFR-3 upregulation in carcinoma cell lines [J]. Int J Oncol, 2008, 32(3): 585 - 592.

[8] Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angio-genesis [J]. Anticancer Res, 2005, 25(1): 3327 - 3333.

[9] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182 - 1186.

[10] Bauer AJ, Terrell R, Doniparthi NK, et al. Vascular endothelial growth factor monoclonal antibody inhibits growth of anaplastic thyroid cancer xenografts in nude mice [J]. Thyroid, 2002, 12(11): 953 - 961.

[11] 吴万桂, 袁捷, 林惠华. 肿瘤抗血管生成治疗的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床与康, 2010, 17(1): 76 - 77.

[12] Fang J, Zhou Q, Liu LZ, et al. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(4): 858 - 864.

[13] Chang SH, Kanasaki K, Gocheva V, et al. VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin-cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation [J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4537 - 4544.

[14] Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle [J]. Circ Res, 2005, 96(8): 838 - 846.

[15] Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis [J]. Cancer Cell, 2009, 15(3): 232 - 239.

[16] Fan X, Krieg S, Kuo CJ, et al. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium [J]. FASEB J, 2008, 22(10): 3571 - 3580.

[17] Benest AV, Harper SJ, Herttuala SY, et al. VEGF-C induced angiogenesis preferentially occurs at a distance from lymphangiogenesis [J]. Cardiovasc Res, 2008, 78(2): 315 - 323.

[18] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. Science, 1989, 246(4935): 1306 - 1309.

(收稿日期:2015 - 11 - 30)

· 消息 ·

版权说明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊已被《中国学术期刊网络出版总库》及万方系列数据库收录,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时向本刊声明,本刊将作适当处理。