

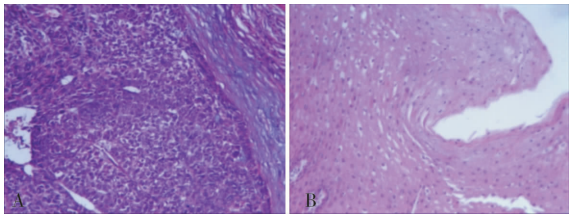
【临床研究】

食管癌在我国是常见的恶性肿瘤之一,其死亡的主要原因是恶性肿瘤细胞侵袭、转移,而肿瘤微血管的生成是其生长、转移及浸润的基础^[1]。与恶性肿瘤微血管相对抗的血管生成抑制蛋白1(vasohibin

1,VASH1)是新近研究所发现的^[2-3]。VASH1 具有负反馈调节血管生成功能,在恶性肿瘤血管生成的调节中起重要作用^[4],如乳腺癌^[5]、前列腺癌^[6]、尿路上皮癌^[7]等。而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)通过特异性地作用于血管内皮细胞,进而促进肿瘤的血管新生,增加血管通透性,促进恶性肿瘤细胞转移和播散。关于 VASH1、VEGF 在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)组织中的关系国内外文献报道较少,本实验采用免疫组织化学链霉亲和素过氧化物酶(streptavidin peroxidase,SP)法检测 ESCC 组织中 VASH1、VEGF 的表达,并探讨其表达与临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取中国人民解放军第 153 中心医院病理科 2006 年 7 月至 2007 年 10 月存档石蜡包埋 ESCC 组织标本 128 例和正常食管组织标本 42 例,均经病理苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色证实(图 1)。128 例 ESCC 患者中男 84 例,女 44 例;年龄 45 ~ 76 岁,平均(58.31 ± 7.62)岁;高分化 27 例,中分化 62 例,低分化 39 例;浸润深度:T₁ + T₂ 49 例,T₃ 65 例,T₄ 14 例;有淋巴结转移者 86 例,无淋巴结转移者 42 例;根据国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)2009 版 TNM 病理分期标准进行分期:I 期 18 例,II 期 36 例,III 期 53 例,IV 期 21 例。所有患者术前未经放射治疗、化学治疗及生物治疗,均有完整的临床病理资料。随访截止日期为 2012 年 10 月,生存期的计算从手术日期到随访截止日期,或因其他疾病、复发转移而死亡的日期为止,截尾值为 0。



A: ESCC 组织;B: 正常食管组织。
图 1 ESCC 组织和正常食管组织病理结果(HE 染色, ×100)
Fig.1 ESCC tissue and normal esophageal tissue(HE staining, ×100)

1.2 主要试剂 兔抗人抗体 VASH1(批号 bs-1505R)购于北京博奥森生物技术有限公司;兔抗人 VEGF 抗体(批号 ZA-0580)购于北京中杉金桥生物技术有限公司;SP 试剂盒及二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒购自北京中山试剂公司。

1.3 方法 将选取好的石蜡块在切片机上制成

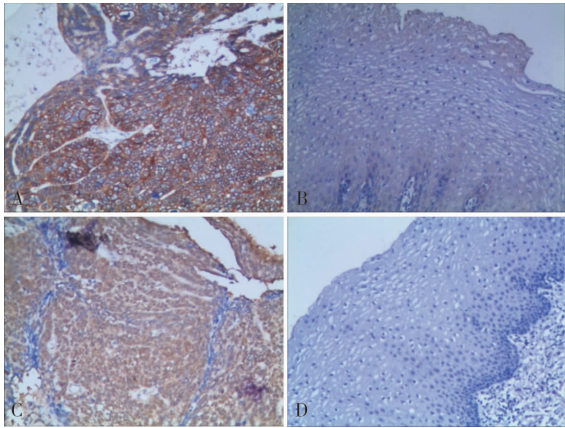
4 μm 厚切片,按免疫组织化学 SP 法检测 ESCC 组织标本和正常食管组织标本中 VASH1 和 VEGF 的表达,具体步骤:(1)烤片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇逐级水化;(2)热修复抗原;(3)消除内源性过氧化物酶活性;(4)封闭;(5)孵一抗;(6)孵二抗;(7)加入辣根过氧化物酶;(8)DAB 显色;(9)复染、脱水、透明、封片。一抗均按 1 : 100 稀释。用已知阳性片作对照,以磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)代替一抗作空白对照。

1.4 结果判定 结果判定采用双盲法,同时有 2 位资深的病理科医师独立观察每张切片后做出判定,判定标准采用半定量评分法,根据染色强度和阳性细胞数来判定^[8]:首先按染色强度计分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;然后按阳性细胞百分比计分,0 分为阴性,1% ~ 10% 为 1 分,11% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分, > 75% 为 4 分。用染色强度得分和阳性细胞百分比得分的乘积作为判断标准,若积分 ≥ 4 分为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 等级相关性分析;绘制 VASH1 和 VEGF 的生存曲线并采用 Kaplan-Meier、Log-rank 检验方法分析;采用多因素 Cox 风险比例模型筛选 ESCC 预后的影响因素;P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VASH1 和 VEGF 在 ESCC、正常食管组织中的表达 结果见图 2。VASH1 主要表达于细胞质和(或)细胞膜,呈淡黄色至棕褐色颗粒;VEGF 主要表达于细胞质,呈棕褐色颗粒。



A: ESCC 组织中 VASH1 表达;B: 正常食管组织中 VASH1 表达;
C: ESCC 组织中 VEGF 表达;D: 正常食管组织中 VEGF 表达。
图 2 VASH1 和 VEGF 在 ESCC、正常食管组织中的表达 (SP 染色, ×100)
Fig.2 Expression of VASH1 and VEGF in ESCC and normal esophageal tissues (SP staining, ×100)

2.2 VASH1 和 VEGF 在 ESCC、正常食管组织中的阳性表达率比较 VASH1 在 ESCC 组织和正常食管组织中的阳性表达率分别为 53.91% (69/128) 和 7.14% (3/42), 差异有统计学意义($\chi^2 = 28.324, P < 0.05$); VEGF 在 ESCC 组织和正常食管组织中的阳性表达率分别为 59.38% (76/128) 和 16.67% (7/42), 差异有统计学意义($\chi^2 = 23.085, P < 0.05$)。

2.3 ESCC 组织中 VASH1、VEGF 表达与临床病理特征之间的关系 结果见表 1。VASH1 和 VEGF 表达与患者的年龄、性别及分化程度无关($P > 0.05$), 与浸润深度、TNM 分期和淋巴结转移呈显著相关性($P < 0.05$)。

表 1 ESCC 组织中 VASH1、VEGF 表达与临床病理特征之间的关系

Tab.1 Relationship between the expression of VASH1, VEGF in ESCC tissues and clinicopathological features

病理指标	<i>n</i>	VASH1 表达 阳性例数	χ^2	<i>P</i>	VEGF 表达 阳性例数	χ^2	<i>P</i>
性别							
男	84	45	0.011	0.916	49	0.110	0.740
女	44	24			27		
年龄							
<60 岁	76	43	0.538	0.463	46	0.103	0.748
≥60 岁	52	26			30		
浸润深度							
T ₁ + T ₂	49	19			20		
T ₃	65	42	7.574	0.023	45	11.753	0.003
T ₄	14	8			11		
TNM 分期							
I + II	54	23	4.812	0.028	25	6.624	0.010
III + IV	74	46			51		
分化程度							
高	27	17			18		
中	62	34	1.856	0.395	35	0.817	0.665
低	39	18			23		
淋巴结转移							
有	86	53	6.289	0.012	57	5.179	0.023
无	42	16			19		

2.4 ESCC 组织中 VEGF 和 VASH1 表达相关性 结果见表 2。ESCC 组织中 VASH1 与 VEGF 表达

表 3 多因素 Cox 比例风险模型分析结果

Tab.3 Multivariate Cox proportional risk model analysis results

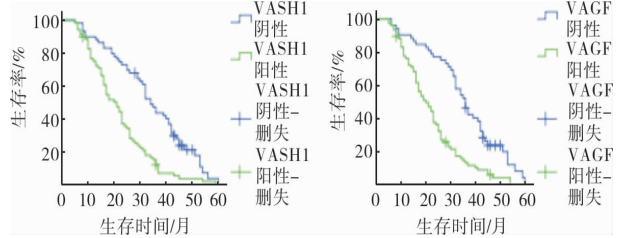
临床病理参数	<i>B</i>	<i>SE</i>	Wald χ^2	<i>P</i>	<i>RR</i>	95% CI	
						下限	上限
淋巴结转移	0.676	0.220	9.442	0.002	1.966	1.277	3.027
浸润深度	0.471	0.160	8.666	0.003	1.602	1.171	2.192
VEGF 表达	0.614	0.213	8.323	0.004	1.814	1.218	2.806
VASH1 表达	0.666	0.203	10.754	0.001	1.946	1.307	2.897

呈显著正相关($r = 0.543, \chi^2 = 37.810, P < 0.05$)。

表 2 ESCC 组织中 VEGF 和 VASH1 表达相关性
Tab.2 Correlation between the expression of VEGF and VASH1 in ESCC tissue

VEGF 表达	VASH1 表达		<i>r</i>	χ^2	<i>P</i>
	阳性	阴性			
阳性	58	18	0.543	37.810	0.000
阴性	11	41			

2.5 ESCC 组织中 VASH1、VEGF 表达水平与患者术后生存期的关系 结果见图 3。通过查阅病例、电话等对 128 例患者进行随访, 失访 10 例, 失访率为 7.8%。Kaplan-Meier 生存曲线行 Log-Rank 检验分析表明: VASH1 阳性表达患者的中位生存时间为 21 个月, 显著短于阴性表达组的 34 个月, 阴性表达组的预后显著高于阳性表达组, 差异有统计学意义($\chi^2 = 21.477, P < 0.05$); VEGF 阳性表达组患者的中位生存时间为 20 个月, 显著短于阴性表达组的 36 个月, 阴性表达组的中位生存时间显著长于阳性表达组, 差异有统计学意义($\chi^2 = 23.530, P < 0.05$)。



A: VASH1 表达; B: VEGF 表达。

图 3 VASH1 和 VEGF 阳性表达组与阴性表达组生存曲线比较

Fig.3 Comparison of survival curves between VASH1 and VEGF positive expression groups and negative expression groups

2.6 影响 ESCC 患者预后的因素 结果见表 3。将年龄、性别、浸润深度、TNM 分期、分化程度、淋巴结转移、VASH1 及 VEGF 表达水平进行多因素 Cox 回归分析, 结果显示, 浸润深度、淋巴结转移、VASH1 及 VEGF 表达水平为影响 ESCC 患者的独立预后因素($P < 0.05$)。

3 讨论

VASH 是从 VEGF 诱导基因中分离得到的一个新基因^[3],具有抗血管生成的功能,其编码的蛋白质被命名为血管生成抑制蛋白(vasohibin, VASH);其基因位于 14q24.3 染色体,包括 8 个外显子和 7 个内含子^[9];C-端是重要的抗血管生成区域^[10]。KIMURA 等^[11]提取出与 VASH 同源的蛋白,称为 VASH2,原来发现的 VASH 称为 VASH1;但 VASH1 和 VASH2 的作用截然相反:VASH1 表达于血管内皮细胞,在血管发芽之前终止血管生成;而 VASH2 表达于出芽前的单核细胞浸润中,起着促进血管生成作用。另外,VASH1 具有抑制淋巴结转移的功能,实验表明,将含有淋巴结转移的癌细胞移植到小鼠体内,然后将 VASH1 基因的腺病毒注入,结果显示,肿瘤局部淋巴结和淋巴管转移得到抑制^[12]。VASH1 在恶性肿瘤血管生成的调节中起重要作用^[4],从而影响恶性肿瘤的发展、侵袭和转移。LU 等^[13]报道,在卵巢癌中,Zeste 基因增强子的人类同源物(enhancer of Zeste homolog 2, EZH2)经甲基化使 VASH1 失活,以致 VASH1 的表达下调,从而增强肿瘤血管生成。TAMAKI 等^[5]报道,VASH1 在乳腺癌组织中的表达显著高于对照组;并且与临床分期及微血管有显著相关性;VASH1 还可作为转移和预后的指标之一。本研究发现,VASH1 在 ESCC 组织中高表达,而在正常食管组织中低表达,这与 ZHAO 等^[14]在肾恶性肿瘤的研究观点相反,但与 YOSHINAGA 等^[15]在宫颈恶性肿瘤的研究观点相同,分析原因可能与 VASH1 在不同组织中的表达不同有关。VASH1 在 ESCC 组织中随着肿瘤浸润深度越深,其阳性表达率越高,这与 KOSAKA 等^[6]报道 VASH1 在前列腺癌中的研究观点相似。另外,TNM 分期越晚的 ESCC 组织中 VASH1 的阳性表达率越高;有淋巴结转移 ESCC 组织中 VASH1 表达较无淋巴结转移组织中高,这说明 VASH1 能对抗 ESCC 中血管及淋巴管的形成。而 MIYAZAKI 等^[7]实验发现,VASH1 在尿路上皮癌中表达与淋巴结转移差异无统计学意义,但与肿瘤分期、浸润深度及微血管差异有统计学意义。本研究生存分析结果显示,VASH1 低表达组患者生存时间优于 VASH1 高表达组患者,这与预期的结果相反,可推测恶性肿瘤组织在促进血管形成的同时,也诱导 VASH1 的表达,用来对抗血管的生成,因此,VASH1 的表达在一定程度上能间接反映肿瘤新生血管的形成。多因素 Cox 分析结果显示,VASH1 可作为 ESCC 预后的独立危险因素,这与 VASH1 在乳腺癌^[5]、尿路上皮癌^[7]和前列

腺癌^[6]等多因素 Cox 分析结果一致。

VEGF 基因位于染色体 6p21.3,包含 7 个内含子和 8 个外显子。VEGF 家族中包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E; VEGF-A 具有促进血管形成的作用,而 VEGF-C 和 VEGF-D 有促进淋巴管生成的作用^[12,16]。VEGF 为恶性肿瘤的浸润和转移提供新血管和淋巴管的生成。ZAMAN 等^[17]研究发现,在乳腺癌患者血清中,VEGF 水平明显升高,但肿瘤切除后其水平显著下降,这说明肿瘤组织参与 VEGF 的表达、产生和释放。贾如江等^[18]报道,VEGF 在胰腺癌中的表达与病理分期及淋巴结转移显著相关,且 VEGF 可作为胰腺癌的预后指标。本研究结果显示,VEGF 表达与 ESCC 组织的浸润深度、TNM 分期及淋巴结转移等因素有相关性,这可能与 VEGF 促进肿瘤的血管和淋巴管生成有关,以致肿瘤细胞浸润和转移。另外,多因素 Cox 分析显示,VEGF 可作为 ESCC 预后的独立危险因素,但这与 LUO 等^[19]报道的 VEGF 在 ESCC 中表达不足以判断预后的观点相反,其原因或许与本研究样本量少有关。

SHIMIZU 等^[9]研究发现,VEGF 与 VASH1 密切相关,VEGF 或成纤维细胞生长因子作用于血管内皮生长因子受体 2 以激活酪氨酸激酶-丝裂原活化蛋白激酶 1-细胞外调节蛋白激酶信号通路,从而激活蛋白激酶 C- δ (protein kinase C- δ , PKC- δ)信号通路,诱导 VASH1 生成,这可以解释本研究结果 VEGF 与 VASH1 表达呈正相关性。也许有其他的机制来解释 VEGF 和 VASH1 之间的关系,这有待进一步研究。

综上所述,VASH1 具有抑制肿瘤淋巴管和血管的生成,而 VEGF 在恶性肿瘤的血管和淋巴管的形成中起重要作用,因此,期望 VASH1 在 ESCC 中能够为抗血管形成及药物治疗提供新的靶点。

参考文献:

[1] LI S H, TIAN H, YUE W M, et al. Metastasis-associated protein 1 nuclear expression is closely associated with tumor progression and angiogenesis in patients with esophageal squamous cell cancer[J]. *World J Surg*, 2012, 36(3): 623-631.

[2] SATO Y. The vasohibin family; a novel family for angiogenesis regulation[J]. *J Biochem*, 2013, 153(1): 5-11.

[3] WATANABE K, HASEGAWA Y, YAMASHITA H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(7): 898-907.

[4] HORIE S, SUZUKI Y, KOBAYASHI M, et al. Distinctive role of vasohibin-1A and its splicing variant vasohibin-1B in tumor angiogenesis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2016, 23(5): 133-141.

(下转第 923 页)