

文章编号:1005-6947(2006)04-0298-03

· 简要论著 ·

乳腺癌中缺氧诱导因子-2 α ,微血管密度与细胞凋亡的关系

孔雷¹, 曹建军¹, 杨为检², 陈晓²

(1. 山东省曲阜市人民医院 普通外科, 山东 曲阜 273100; 2. 山东省曲阜市第二人民医院 普通外科, 山东 曲阜 273100)

摘要:应用免疫组织化学技术和末端脱氧核苷酸转移酶介导的 X-dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL) 检测 66 例乳腺癌中缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α) 的表达, 检测微血管密度 (MVD) 和细胞凋亡。结果示 66 例乳腺癌 HIF-2 α 阳性率为 42.4%, 其表达随病理分期的升高而增加 ($P < 0.01$)。HIF-2 α 的表达与乳腺癌病理分级无关 ($P > 0.05$), 而与 MVD 呈正相关 ($r = 0.685, P < 0.01$), 与肿瘤凋亡指数 (AI) 呈负相关 ($r = -0.561, P < 0.01$)。乳腺癌 MVD 与 AI 呈负相关 ($r = -0.581, P < 0.01$)。提示在乳腺癌发展过程中, HIF-2 α 对肿瘤的能量代谢和新血管生成有促进作用; 微血管的形成可抑制肿瘤细胞的凋亡, 从而促进肿瘤的恶性进展。

关键词: 乳腺肿瘤/病理学; 缺氧诱导因子-2 α ; 细胞凋亡

中图分类号: R737.9; R329.21

文献标识码: B

肿瘤微环境的改变可影响肿瘤的新生血管生成和肿瘤细胞的凋亡状态^[1]。为此, 笔者对乳腺癌肿瘤细胞中缺氧诱导因子-2 α (HIF-2 α), 微血管的形成与肿瘤细胞凋亡的关系进行研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源

66 例乳腺癌组织取自华中科技大学同济医学院附属同济医院 1998—2002 年手术切除标本。男 39 例, 女 27 例; 年龄 32~69 (平均 58) 岁。诊断均经病理切片证实。按 Furrman 分级, I 级 16 例, II 级 28 例, III 级 16 例, IV 级 6 例。按 1997 年国际癌症联合会 (UICC) 制定的 TNM 分期标准, T₁ 期 21 例, T₂ 期 26 例, T₃ 期 19 例。9 例癌旁正常乳腺组织 (离肿瘤边缘 > 5 cm) 作为对照, 并经病理切片证实为正常乳腺组织。所有病例术前均行放疗或化疗。

1.2 免疫组织化学染色

标本经 10% 福尔马林固定, 常规脱水包埋, 作

4 μ m 连续切片。采用 Envision 免疫组化二步法进行免疫组化染色, 试剂盒购自美国 Zymed 公司, 实验步骤根据说明书进行。主要试剂鼠抗人 HIF-2 α 单抗为美国 Novus 公司产品, 鼠抗人第八因子相关抗原 (FVIII R Ag) 单抗为丹麦 Dako 公司产品。细胞凋亡原位检测试剂盒购自 Boehringer-mannheim 公司, 操作按说明书进行。二氨基联苯 (DAB) 显色, 微波修复抗原, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

1.3.1 HIF-2 α 蛋白结果判定 以细胞核或胞浆内有棕黄色细胞颗粒为阳性, 肿瘤细胞无反应为阴性。高倍镜下 ($\times 200$) 随机选择 5~10 个视野, 计数 1 000 个瘤细胞中阳性染色细胞, 并计算 HIF-2 α 标记指数 (LI)。LI = 阳性染色细胞/计数瘤细胞总数 $\times 100\%$ 。LI > 5% 者为 HIF-2 α 阳性表达病例。

1.3.2 为保证肿瘤微血管密度 (MVD) 计数的客观性和准确性, 首先选取具有代表性的组织切片, 排除肿瘤出血区及边缘反应区。低倍镜观察确定每例切片中 3 个血管密度最高的区域, 然后高倍镜下计数每个区域, 其平均值即为该肿瘤的 MVD 值。

1.3.3 细胞凋亡结果判定 以细胞核内有棕黄色细胞颗粒为阳性。排除肿瘤坏死区, 随机选择 5~10 个高倍镜视野 ($\times 200$), 计数不少于 1 000 个细胞, 统计 TUNEL 染色阳性细胞的百分比, 表示为凋亡指数 (AI)。

收稿日期: 2005-06-25; 修订日期: 2005-11-24。

作者简介: 孔雷, 男, 山东曲阜人, 山东省曲阜市人民医院主治医师, 主要从事乳腺外科方面的研究。

通讯作者: 孔雷 E-mail: kongpengsd@163.com。

1.4 统计学处理

采用 χ^2 检验及 Fisher's 精确概率检验。HIF-2 α LI 与 MVD, AI 行相关分析。

2 结果

2.1 乳腺癌组织 HIF-2 α 表达

本组乳腺癌 HIF-2 α 表达率为 42.4% (28/66), 9 例正常乳腺组织无 HIF-2 α 表达, 两者差异有显著意义 ($P < 0.05$)。HIF-2 α 主要表达于乳腺癌胞核, 胞浆也有表达, 肿瘤边缘和坏死明显区域表达明显增多 (图 1)。

2.2 乳腺癌中 HIF-2 α 与各病理因素的关系

HIF-2 α 在乳腺癌的各种病理类型中的表达差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。HIF-2 α 的表达随乳腺癌病理分期的升高而增加, 差别有显著性意义 ($P < 0.01$)。HIF-2 α 表达与乳腺癌病理分级无关, 在各级表达中差别无显著性意义 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.3 乳腺癌 HIF-2 α , MVD 及 AI 三者的相关性

第八因子相关抗原单抗特异地与微血管内皮细胞内的抗原结合, 表现为微血管内皮细胞浆着色, 呈棕黄色。有时血管因肿瘤组织的挤压推移或切片与血管长轴一致, 表现为片状或条索状的棕黄色结构 (图 2)。HIF-2 α 与乳腺癌细胞 MVD 之间呈正相关 ($r = 0.685, P < 0.01$)。乳腺癌 MVD 与 AI 呈负相关 ($r = -0.581, P < 0.01$) (表 1)。

2.4 细胞凋亡

66 例乳腺癌和 9 例正常乳腺组织行凋亡检测, 乳腺癌中细胞凋亡较正常乳腺组织增加 (图 3); 两者的 AI 分别为 1.26 (0.89 ~ 1.66) 和 0.15 (0.11 ~ 0.19), 差异有极显著性 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.5 AI 与 HIF-2 α 的相关性

66 例乳腺癌凋亡检测中 28 例 HIF-2 α 阳性表达者相关分析显示, LI 与 AI 呈负相关 ($r = -0.56, P < 0.01$) (表 1)。

图 1 乳腺癌组 HIF-2 α 蛋白的表达 (可见 HIF-2 α 表达明显增多)

图 2 乳腺癌组细胞的 MVD (可见 MVD 表达明显增多)

图 3 乳腺癌组细胞凋亡 (可见凋亡细胞明显增多)

表 1 乳腺癌中 HIF-2 α 表达与病理类型、分期和分级的关系

项目	HIF-2 α		MVD 阳性 细胞计数	AI
	(+)	(-)		
病理类型				
浸润性导管癌	12	18	57.3 \pm 25.34	1.28 \pm 0.35
浸润性小叶癌	8	12	64.6 \pm 27.52	1.14 \pm 0.58
黏液癌	5	4	78.3 \pm 32.15	1.16 \pm 0.54
髓样癌	3	4	87.5 \pm 41.23	1.32 \pm 0.66
病理分期				
T ₁ , T ₂	14	33	43.4 \pm 25.87	0.84 \pm 0.27
T ₃	14	5	96.7 \pm 39.12	1.62 \pm 0.79
病理分级				
I, II	19	25	39.2 \pm 28.56	0.67 \pm 0.26
III, IV	9	13	99.6 \pm 42.13	2.25 \pm 0.48
对照组		9	0.23 \pm 14.75	0.17 \pm 0.16

3 讨论

肿瘤形成过程中一个关键的步骤是肿瘤细胞对缺氧的适应, 而适应缺氧的策略则是形成多血管体系和提高糖酵解速率。通常, HIF-2 α 调控的基因涉及能量代谢、激素代谢、肿瘤血管生成和转移等多个方面, 具体介导转录的基因有血管内皮因子 (VEGF)、葡萄糖载体 1 (GLUT1)、糖酵解酶、红细胞生成素 (EPO)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、转铁蛋白、酪氨酸羟化酶、血红素氧化酶 - 1 等^[1]。Kevin 等^[2] 发现, HIF-2 α 蛋白在大多数乳腺癌 (约占乳腺癌的 85%) 中表达显著上调, 正常肾组织低于所能测定的阈值。HIF-2 α 对 VEGF

mRNA 和内皮细胞特异性受体酪氨酸激酶(TIE-2)基因的启动子有更强的激活能力,而 HIF-1 α 不能激活 TIE-2 启动子。因此,HIF-2 α 信号传导通路可能在乳腺肿瘤中具有特别的意义。

本研究结果显示,66 例乳腺癌 HIF-2 α 阳性率为 42.4%,正常乳腺组织无 HIF-2 α 表达,与 Kevin 等^[2] 结果相近。而且,HIF-2 α 表达随着 TNM 分期的升高而增加($P < 0.01$),各期间差异有显著性。提示 HIF-2 α 表达与乳腺癌的生长、发展及自然病程有关。其机制可能是随着肿瘤的不断生长、体积增大、血供不足发生缺氧坏死,诱导 HIF-2 α 表达;而 HIF-2 α 在乳腺癌中能增强其下游靶基因 VEGF, GLUT1 和糖酵解酶等基因的表达,从而启动靶基因转录和相应的蛋白产物增加,使肿瘤细胞在适应缺氧、能量代谢、肿瘤血管生成及转移中起重要作用^[2]。HIF-2 α 表达与病理分级无关。提示 HIF-2 α 表达检测对判定乳腺癌的恶性程度无明显的临床意义。

HIF-2 α 与乳腺癌细胞 MVD 具有明显相关性,这可能与乳腺癌中 HIF-2 α 增加和 VEGF 上调密切相关。其机制如前所述,随着肿瘤的不断生长,因血供不足而导致缺氧坏死,诱导 HIF-2 α 过度表达。而 HIF-2 α 在乳腺癌中能增强其下游靶基因 VEGF 基因的表达,活化的 HIF 与靶基因上的 HIF 结合位点结合,形成转录起始复合物,从而启动靶基因转录和相应的蛋白产物增加,VEGF 表达增加,进而作用于血管内皮细胞表面的 VEGFR1 和 VEGFR2,可激活一系列的缺血转导通路,诱导新生血管的生成,血管密度增加^[3]。

肿瘤的生长系通过肿瘤细胞的增殖与凋亡的失平衡而实现,肿瘤细胞凋亡减少和/或增殖活性增加导致肿瘤的恶性进展,但多数情况下这一过程是通过细胞凋亡来调节的^[4]。目前,HIF-2 α 与乳腺癌细胞凋亡的关系,国内外学者有较大争议。本研究发现 66 例行凋亡检测的乳腺癌中 28 例 HIF-2 α 呈阳性表达,且 LI 与 AI 呈负相关。即 HIF-2 α 对细胞凋亡有抑制作用。已有研究证实,在乳腺癌发展过程中,MVD 的上调可抑制肿瘤细

胞凋亡,从而促进肿瘤恶性进展^[5]。该结果提示 HIF-2 α 高表达时,可上调 MVD 致使乳腺癌中细胞凋亡抑制,引起肿瘤细胞增殖/凋亡平衡的紊乱,致使乳腺癌中细胞凋亡抑制,有利于细胞增值,从而促进乳腺癌的发生和发展。

此外,HIF-2 α 在调控相关基因表达时,与 HIF-2 α 结合的缺氧反应元件(HRE)位点具有细胞特异性。Maxwell 等^[6] 将 EPO 3' 端 HRE 与靶基因相连,转染不同哺乳动物细胞,结果发现缺氧可诱导靶基因在这些细胞中的转录并表达。HRE 突变可阻断上述过程,说明 HIF 对下游基因的调节必须通过 HRE,而 HRE 的组织细胞特异性则可为乳腺癌的基因治疗提供可能性。因此,HIF-2 α 的检测为临床提供了一个有意义的参考指标。本研究进一步表明,HIF-2 α 蛋白在乳腺癌中表达的研究不仅可以为判断乳腺癌的生物学特性提供重要依据,亦为靶向 HIF-2 α 的抗乳腺癌治疗提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumor [J]. *Nature*, 1999, 397 (1): 88-97.
- [2] Turner KJ, Moore JW, John A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation [J]. *Cancer Research*, 2002, 62 (10): 2957-2961.
- [3] Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, *et al.* c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1 alpha dependent [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (23): 7972-7977.
- [4] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis [J]. *Cell*, 1996, 85 (2): 353-357.
- [5] Fox SB, Braganca J, Turley H, *et al.* CITED4 inhibits hypoxia-activated transcription in cancer cells, and its cytoplasmic location in breast cancer is associated with elevated expression of tumor cell hypoxia-inducible factor 1 alpha [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (17): 6075-81.
- [6] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, *et al.* The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [J]. *Nature*, 1999, 399 (6773): 271-275.