

文章编号:1005-6947(2005)06-0436-05

· 实验研究 ·

# 血管生成素和 VEGF 在人肝细胞癌血管生成作用机制的研究

邓伟, 梁力建

(中山大学附属第一医院 肝胆外科, 广东 广州 510080)

**摘要:**目的 探讨血管生成素(Ang)及受体 Tie-2、血管内皮生长因子(VEGF)在肝细胞癌血管生成和进展中的作用。方法 用 RT-PCR 和免疫组织化学方法分析 28 例肝细胞癌(HCC)、10 例肝硬化和 10 例正常肝标本。观察血管生成素及受体、VEGF 的表达与 HCC 肿瘤血管生成和临床病理的关系。结果 Ang/Tie-2, VEGF 在肝细胞癌中表达明显上调, 免疫组织化学也显示 Ang-2 和 VEGF, Tie-2 蛋白在肝癌表达增强。Ang-2/Ang-1 mRNA 比值、VEGF mRNA 与肿瘤血管侵犯及 CD34 染色的微血管密度相关。结论 Ang/Tie-2, VEGF 在 HCC 肿瘤血管生成和进展中起重要作用。

**关键词:**肝肿瘤/血液供给; 肝细胞癌/血液供给; 血管生成素; 血管内皮生长因子

**中图分类号:** R735.7; R730.261

**文献标识码:** A

## Effects of angiotensins/Tie-2 and VEGF expression on hepatocellular carcinoma angiogenesis

DENG Wei, LIANG li-jian

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of angiotensins and tyrosine kinase receptor Tie-2, vascular endothelial growth factor (VEGF) on the angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma (HCC).

**Methods** With the methods of RT-PCR and immunohistochemistry, the specimens from 28 HCC patients, 10 cirrhotics, and 10 normal livers were analysed, and the relationship between angiotensins, VEGF expression and the clinical pathological characteristics of HCC was studied. **Results** Ang/Tie-2 and VEGF were significantly up-regulated in HCC compared to cirrhotic tissue and normal liver tissue. Immunohistochemical staining also showed increased expression of Ang-2, VEGF, Tie-2 protein in HCC. A high Ang-2/Ang-1 mRNA ratio and high VEGF in HCC were closely associated with tumor vascular invasion and microvascular density level which assessed by CD34. **Conclusions** Ang/Tie-2 and VEGF may play critical roles in promoting tumor angiogenesis and progression in human HCC.

**Key words:** Liver neoplasms/blood supply; Hepatocellular Carcinoma/blood supply; Angiotensins; VEGF

**CLC number:** R735.7; R730.261

**Document code:** A

肝细胞癌(HCC)是临床上最常见的富血管、高转移恶性肿瘤之一,病情常进展迅速,并伴有进行性腹痛,肝脏肿大、黄疸、体重下降、腹水形成。它病情快速进展常和血管生成有关,但是血管

生成在肝癌进展中的机制还不清楚。血管内皮生长因子(VEGF)及受体系统在血管生成中起着重要作用。而血管的成熟和稳定又主要靠血管生成素(Angiotensin, Ang)及其受体 Tie-2 维持。目前认为,这两条信号途径是最直接参与新血管生成的血管内皮细胞的特异途径。本研究应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组化方法检测肝细胞癌组织中 Angiotensin-1 (Ang-1), Angiotensin-2 (Ang-2), Tie-2, VEGF, CD34 的表达,探讨这些血管生长

收稿日期:2005-04-07; 修订日期:2005-04-24。

**作者简介:**邓伟(1968-),男,广西桂林人,中山大学附属第一医院博士研究生,主要从事肝癌治疗方面的研究。

**通讯作者:**邓伟;电话:020-87755766-8214; E-mail: ddengwei1968@yahoo.com.cn。

因子在肝细胞癌生长和肿瘤血管形成中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本及来源

1.1.1 HCC 组 中山大学附属第一医院肝胆外科从 2004 年 3 月 ~ 2004 年 9 月手术切除的 HCC 标本 28 例,男 25 例,女 3 例;中位年龄 45.3 岁。分别于切除后即时取肿瘤部位和相应的癌旁组织(距癌边缘 < 1 cm)及远离癌组织(距癌边缘 > 10 cm 或取至另一肝段)<sup>[1]</sup>。各 2 份,1 份液氮固定,再置 -80℃ 冰箱保存备 RT-PCR 检查;另 1 份将肿瘤及无癌肝组织用 4% 甲醛固定,24 h 内常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。病理证实均为 HCC,直径均 > 3 cm,均为梁索型,Edmondson 分级 II ~ III 级 20 例,IV 级 8 例;肿瘤包膜完整 10 例,包膜侵犯 18 例;合并门静脉癌栓 6 例(左支癌栓 3 例、右支癌栓 2 例、主干癌栓 1 例),无门静脉癌栓 22 例;合并胆管癌栓 1 例,肝外淋巴结转移 1 例;合并肝硬化 25 例,无肝硬化 3 例。

1.1.2 肝炎后肝硬化组 标本 10 例。男 8 例,女 2 例;中位年龄 45.8 岁。全部病理诊断为门脉性肝硬化。

1.1.3 肝脏良性疾病组 为肝血管瘤旁或肝胆管结石无病变的肝组织 10 例。男 3 例,女 7 例;中位年龄 45.9 岁。其中肝血管瘤 7 例,病理证实为肝海绵状血管瘤,肝内胆管结石 3 例。

### 1.2 检测项目及方法

#### 1.2.1 Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF 的检测

(1) RT-PCR 技术 总 RNA 提取和 RT-PCR 扩增分别按 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 和 Takara 公司试剂盒说明进行。Ang-2, Ang-1, Tie-2, VEGF 的 PCR 引物序列(上海博亚生物公司合成)如下: Ang-2 引物为 5' ATCGCTACGTGCTGAAG3', 5' CTGTTG-GCTGATGCTAC3'; Ang-1 引物为 5' ACCAGCCTCTT-GTCTCAG3', 5' TGTCTTATCAGCGTCC3'; VEGF 引物为 5' GCTTTACTGCTGTACCTCCAC3', 5' AAAT-GCTTTCTCCGCTCTG3'; Tie-2 引物为 5' AAGAATGC-CACCATCACTC3', 5' CATAATCAGAAACGCCAATAG3'; CTCTGCACCGAGTCATCGTA3; 内对照 β-actin 为 5' GT-GGGGCGCCCCAGGCA3', 5' CTCCTTAATTGTCACG-CACGATTC3'。RT-PCR 反应条件为 70℃ 5 min, 冰浴 10 min, 42℃ 60 min, 95℃ 5 min, 冰浴, 以 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 的顺序循环 30 个周期,

最后 72℃ 延伸 10 min。将产物在 1% 的琼脂糖凝胶上行电泳,每次上样量均为 6 μL,在紫外灯上观察电泳结果,用 Syngene 凝胶成像分析系统分析。计算所得产物的积分吸光度与各自内参照积分吸光度的比值,观察该基因 mRNA 的表达水平。

(2) 免疫组化染色 兔抗人 VEGF, Ang-2, Ang-1, Tie-2 多克隆抗体,浓缩型,工作浓度 1:50; SABC (StreptAvidin-Biotin Complex) 免疫组化染色试剂盒, DAB 显色试剂盒,均为武汉博士德公司产品。步骤操作按说明书进行。用 PBS 替代一抗做阴性对照。结果判断: Ang-2, VEGF 阳性染色为胞浆棕黄色颗粒沉着,根据胞浆的染色细胞百分比评分。染色程度:基本不着色为 0 分;着色淡者为 1 分;着色适中者为 2 分;着色深者为 3 分。染色细胞百分比:着色细胞占计数细胞 < 5% 为 0 分; 6% ~ 25% 为 1 分; 26% ~ 50% 为 2 分; > 51% 为 3 分。将每张切片着色程度和着色细胞百分比相乘,最后得分 0 ~ 3 分为阴性, > 4 分者为阳性表达。

1.2.2 微血管密度 (MVD) 的检测 参照文献<sup>[2]</sup>方法进行。兔抗人 CD34 单克隆抗体,即用型,为福建迈新公司产品。CD34 阳性染色定位于血管内皮细胞,呈棕黄色,癌组织内孤立的棕黄色血管内皮细胞或细胞簇,代表一条单独的微血管。在 10 × 物镜下挑选微血管分布最高的区域,然后在 40 × 物镜下 (0.196 mm<sup>2</sup>/每视野) 计数 5 个视野中被 CD34 染成棕黄色的血管数目,取其平均值作为微血管密度。分辨不清或染色模糊的细胞不计入。

### 1.3 统计学处理

所有数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS11 统计处理软件进行,分别进行方差分析 (one-way ANOVA 检验)、卡方检验 (率的检验)、t 检验和相关分析。两两多重比较采用 Student Newman Keuls (S-N-K) 方法,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 血管生成素, Tie-2, VEGF mRNA

Ang-1 mRNA 在肝细胞癌、肝硬化、良性肝脏疾病正常肝组织中的表达各组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); Ang-2, Tie-2, VEGF mRNA 在肝细胞癌、邻近癌旁组织、较远离癌旁、肝硬化及肝脏良性疾病正常肝组织增高,各组间有差异;其中 Ang-2 和 VEGF mRNA 在癌组织较邻近癌旁组织表达增高 ( $P < 0.05$ ) (表 1, 图 1)。

表1 血管生成素及受体、VEGF在肝细胞癌、癌旁、肝硬化及正常肝组织中的表达

分组	Ang-1 mRNA	Ang-2 mRNA	Tie-2	VEGF mRNA
HCC	0.9429 ± 0.01584	4.4922 ± 0.2875	3.0375 ± 0.3624	4.7261 ± 0.2533
癌旁组织	0.9332 ± 0.01867	3.1432 ± 0.2631 <sup>1)</sup>	3.0264 ± 0.3469 <sup>1)</sup>	3.1565 ± 0.5903 <sup>1)</sup>
远离癌组织	0.9350 ± 0.02285	2.2200 ± 0.2615 <sup>1),2)</sup>	1.3589 ± 0.2 <sup>1),2)</sup>	2.3525 ± 0.2493 <sup>1),2)</sup>
肝硬化组	0.9320 ± 0.01619	2.0900 ± 0.1398 <sup>1),2)</sup>	1.5720 ± 0.2226 <sup>1),2)</sup>	2.1800 ± 0.06515 <sup>1),2)</sup>
良性肝脏疾病组	0.9400 ± 0.02160	2.1840 ± 0.09947 <sup>1),2)</sup>	1.5250 ± 0.3136 <sup>1),2)</sup>	1.3440 ± 0.05892 <sup>1),2)</sup>
<i>F</i>	1.216	376.4	167.928	247.864
<i>P</i>	0.309	<0.0001	<0.0001	<0.0001

注:1)与HCC组比较  $P < 0.05$ ; 2)与癌旁组织组比较  $P < 0.05$

## 2.2 Ang-1, Ang-2, Tie-2, VEGF 免疫组织化学染色在肝癌、肝硬化及正常肝组织中的表达

Ang-1在各组均100%阳性表达,无差异( $P > 0.05$ ); Ang-2, Tie-2, VEGF在HCC及癌旁组织表达较其余组阳性率高,组间有差异( $P < 0.05$ ); Ang-2阳性的良性疾病肝组织染色程度明显较HCC组织淡(表2)(图2,3)。

## 2.3 CD34 的表达

CD34免疫组织化学染色显示,肿瘤血管主要位于肿瘤梁索之间,排列紊乱,变形,扭曲;癌旁肝组织血管主要在汇管区,结构较完整(图4)。MVD水平在HCC明显高于癌旁及远癌肝组织(分别为  $73.3214 \pm 5.6703$ ,  $21.8929 \pm 4.3660$ ,  $20.8326 \pm 4.2881$ ,  $P < 0.01$ )。

M: DNA maker; 1: HCC组织; 2: 癌旁组织; 3: 癌周组织; 4: 肝硬化组织; 5: 正常肝组织

图1 Ang-2 mRNA 的表达水平

表2 血管生成素/Tie-2、VEGF在肝癌、肝硬化、正常肝组织的免疫组化(%)

组织分组	Ang-1	Ang-2	VEGF	Tie-2
肿瘤组织	100(28/28)	85.7(24/28)	82.1(23/28)	64.3(18/28)
癌旁组织	100(28/28)	50(14/28) <sup>1)</sup>	82.1(23/28)	42.9(12/28) <sup>1)</sup>
远离癌组织	100(28/28)	21.4(6/28) <sup>1),2)</sup>	35.7(10/28) <sup>1),2)</sup>	10.7(3/28) <sup>1),2)</sup>
肝硬化组织	100(10/10)	20.0(2/10) <sup>1),2)</sup>	40.0(4/10) <sup>1),2)</sup>	20.0(2/10) <sup>1),2)</sup>
良性肝脏疾病组织	100(10/10)	20.0(2/10) <sup>1),2)</sup>	40.0(4/10) <sup>1),2),3)</sup>	10.0(1/10) <sup>1),2)</sup>

注:1)与HCC组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与癌旁组织组比较,  $P < 0.05$

a: HCC 组织

b: 远离癌组织

图4 HCC 及远离癌周组织中 CD34 免疫组织化学染色( $\times 400$ )

#### 2.4 Ang-2/Ang-1 mRNA 比值、VEGF mRNA 与 MVD 的相关性

由于 Tie-2 的信号是由 Ang-2 和 Ang-1 之间的平衡决定的,用 Ang-2/Ang-1 mRNA 的比值来评估其在 HCC 中与 MVD 的相关性,在 HCC, Ang-2/Ang-1 比值与 MVD 明显相关(相关系数  $r = 0.720$ ,  $P < 0.01$ ); VEGF mRNA 也与 MVD 明显相关(相关系数  $r = 0.660$ ,  $P < 0.01$ )。

#### 2.5 Ang-2/Ang-1 mRNA 比值及 VEGF 和临床病理的关系

HCC  $> 5$  cm 者与  $< 5$  cm 者、有血管侵犯与无血管侵犯的 Ang-2/Ang-1 mRNA 比值差异有统计学意义,对肿瘤有无包膜、不同分期的 Ang-2/Ang-1 mRNA 比值差异无统计学意义; VEGF 在肿瘤不同分期之间相对半定量值比较无统计学差异,而在肿瘤大小、有无血管侵犯、有无肿瘤包膜之间比较,有统计学差异(表3)。

表3 Ang-2/Ang-1 mRNA 比值、VEGF 和临床病理的关系

临床病理	n	Ang-2/Ang-1 mRNA ratio	P 值	VEGF mRNA	P 值
肿瘤包膜					
有	10	4.7600 $\pm$ 0.2802	>0.05	4.5190 $\pm$ 0.1453	<0.01
无	18	4.6989 $\pm$ 0.2607		4.9258 $\pm$ 0.2342	
肿瘤大小					
$\leq 5$ cm	9	4.5233 $\pm$ 0.1386	0.002	4.8116 $\pm$ 0.2370	0.007
$> 5$ cm	19	4.8358 $\pm$ 0.2473		5.5456 $\pm$ 0.1910	
血管侵犯					
有	8	5.0450 $\pm$ 0.2496	<0.01	5.0050 $\pm$ 0.1464	<0.01
无	20	4.6276 $\pm$ 0.1545		4.6145 $\pm$ 0.1464	
分期					
II ~ III	20	4.7100 $\pm$ 0.2172	>0.05	4.7125 $\pm$ 0.2086	>0.05
IV	8	4.7925 $\pm$ 0.3756		4.7600 $\pm$ 0.3571	

### 3 讨论

肿瘤的生长依赖适当的血供,肿瘤分泌的血管内皮生长因子,可以刺激血管生成和支持肿瘤扩

张转移。肿瘤血管生成是评价 HCC 患者预后的独立因子<sup>[3]</sup>。目前认为, VEGF 和 Ang 家族是仅对内皮细胞有作用的特异性的已知生长因子,研究表明,它们在肿瘤血管生成中起最重要作用。对

VEGF和肝细胞癌的关系已有大量报道,结果各异。而另一血管内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体Tie-2及其配体Ang-1和Ang-2是最近发现的血管生长因子,研究认为<sup>[4]</sup>,它们可能在肝癌的转移中起作用。

本文研究了VEGF和Ang在HCC中的表达,并探讨在HCC进展中血管生成的调节机制。本研究表明,VEGF,Ang-2,Tie-2 mRNA及蛋白水平在HCC及癌旁表达较远癌组织、肝硬化和正常肝组织明显增高,差异有统计学意义。免疫组化CD34染色内皮细胞发现,所有肝癌标本都有大量新生血管存在,在肿瘤组织中MVD比癌旁及远癌组织明显增高。新生血管表现为扭曲、扩张、粗细不均等混乱状态。提示血管生成可能在HCC发生和转移中起重要作用,VEGF和Ang/Tie2两条信号传导通路都参与了肿瘤血管的生成。而新生血管的混乱状态可能是由于血管生长因子表达不平衡引起。如VEGF,Ang-2表达上调,Ang-1相对下调。Ang-1通过促进内皮细胞与周围细胞之间的黏附和相互作用,保持和稳定成熟血管。而Ang-2可能作为一个Ang-1信号的自然拮抗者,竞争性与Tie-2结合,阻断了Ang-1稳定血管活性的作用。离断血管内皮细胞和外周血管支持细胞、细胞外基质的黏附。这样就产生两个结果,一方面,Ang-2表达增强,Ang-1表达下降,血管内皮细胞凋亡,原有的血管衰退,从而降低了血管的稳定性;同时,也由于Ang-2高表达,血管内皮细胞处于高度不稳定状态,如此就为新生血管提供了生存空间<sup>[5]</sup>。在VEGF存在情况下,进一步促进了血管内皮细胞增生,结果导致大量有缺陷的血管形成,有利于肿瘤浸润及转移。在其他肿瘤如胃癌、乳腺癌、卵巢癌、脑神经胶质瘤、肺癌等,这一结果也得到证实<sup>[6,7]</sup>。但两个分子在时间上和空间上如何协同作用的机制还不清楚。VEGF,Ang-2免疫组化显示肿瘤细胞浆内有表达,提示可能是HCC生长过程中,肿瘤细胞通过旁分泌方式产生血管生长因子,促进肿瘤血管生成。

本研究也分析了Ang,VEGF与HCC恶性生物学行为的关系,VEGF mRNA,Ang-2/Ang-1比值与

MVD相关,VEGF mRNA和Ang-2/Ang-1 mRNA比值在肿瘤大于5cm、有血管浸润的病例中明显升高,而与肿瘤分级无关。VEGF mRNA还在无包膜的HCC病例中升高。有研究<sup>[8]</sup>认为CD34抗体染色的血管是真正的新生肿瘤血管,说明Ang和VEGF与HCC肿瘤血管生成有关,与HCC的恶性生物学行为密切相关。总之,VEGF和Ang信号通路在HCC浸润转移中起着独立而又协同的作用,在抗HCC转移的治疗中,是否需要同时针对这两个靶点有待今后进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 梁力建,吕明德,黄洁夫,等.原发性肝癌与癌周组织雄激素受体的临床研究[J].中华肿瘤杂志,1996,18(3):314-317.
- [2] Etoh T, Inoue H, Tanaka S, *et al.* Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5):2145-2153.
- [3] Maeda K, Chung YS, Takatsuko S, *et al.* Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(2):477-481.
- [4] 刘学强,万恒荣,陈海生,等.促血管生成素在原位种植肝癌组织中的表达及其意义[J].中国普通外科杂志,2004,13(3):196-198.
- [5] Dhar DK, Naora H, Yamanoi A, *et al.* Requisite role of VEGF receptors in angiogenesis of hepatocellular carcinoma: a comparison with angiopoietin/Tie pathway [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(1A):379-386.
- [6] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation [J]. *Nature*, 2000, 407(6801):242-248.
- [7] Zhang L, Yang N, Park JW, *et al.* Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, Supporting Angiogenesis in Ovarian [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12):3403-3412.
- [8] Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, *et al.* Quantitation of sinusoid like vessels in hepatocellular carcinoma: its clinical and prognostic significance [J]. *Hepatology*, 1997, 26(5):1216-1223.