

文章编号:1005-6947(2007)10-0959-03

· 基础研究 ·

## TFPI-2 对胰腺癌细胞增殖及血管新生的抑制作用

汤志刚, 孙振阳, 许戈良, 李建生, 胡何节, 陈炯

(安徽医科大学附属医院安徽省立医院 普通外科, 安徽 合肥 230001)

**摘要:**目的 探讨胰腺癌中组织因子途径抑制物-2(TFPI-2)的表达及作用。方法 采用免疫组织化学方法检测41例胰腺癌组织中TFPI-2、Ki-67和VEGF的表达及CD34单克隆抗体标记的微血管密度(MVD)。结果 I、II期胰腺癌TFPI-2阳性表达率(17/26)高于III、IV期(2/15),高分化癌(12/19)高于中、低分化(7/22)(均 $P < 0.05$ );I、II期癌细胞增殖指数(PI)( $24.45 \pm 6.19$ )低于III、IV期癌( $30.84 \pm 6.70$ ),高分化癌( $24.42 \pm 6.29$ )低于中、低分化癌( $28.84 \pm 7.12$ ), (均为 $P < 0.05$ );I、II期癌VEGF的阳性表达率(16/26)低于III、IV期癌(14/15),高分化癌(11/19)低于中、低分化癌(19/22)(均 $P < 0.05$ );I、II期癌MVD值( $26.92 \pm 1.06$ )低于III、IV期癌( $28.47 \pm 2.23$ ),高分化癌( $19.00 \pm 2.58$ )低于中、低分化癌( $16.68 \pm 1.79$ )(均 $P < 0.05$ )。胰腺癌组织中TFPI-2的表达与Ki-67和VEGF的表达呈负相关( $r = -0.62, P < 0.05$ ;  $r = -0.54, P < 0.05$ ),MVD与TFPI-2表达亦有相关。结论 TFPI-2表达能够抑制胰腺癌细胞增殖,并通过下调VEGF的表达抑制肿瘤新生血管的形成,这可能是其抑制胰腺癌的生长、转移的重要机制。

[中国普通外科杂志,2007,16(10):959-961]

**关键词:** 胰腺肿瘤; 新生血管化,病理性; 组织因子途径抑制物2

中图分类号:R 735.9

文献标识码:A

## Inhibitory effect of tissue factor pathway inhibitor 2 on cell proliferation of pancreatic carcinoma cells and tumor angiogenesis

TANG Zhi-gang, SUN Zhen-yang, XU Ge-liang, LI Jian-sheng HU He-jie, CHEN Jiong  
(Department of General Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

**Abstract: Objective** To explore the expression and action of tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) in pancreatic carcinoma (PC). **Methods** Tissue specimens from 41 pancreatic cancers were used to detect the expression of TFPI-2, Ki-67, VEGF and MVD tagged with CD34 by immunohistochemistry. **Results** The positive expression of TFPI-2 in stage I and II PC (17/26) was higher than that in stage III and IV (2/15) PC. The positive expression of TFPI-2 in well-differentiated PC (12/19) was also higher than that in moderate- and poorly-differentiated PC (7/22) ( $P < 0.05$ ). The cell proliferation index in stage I, II ( $24.45 \pm 6.19$ ) and well-differentiated PC ( $24.42 \pm 6.29$ ) was lower than that in stage III, IV ( $30.84 \pm 6.70$ ) and moderate-, and poorly-differentiated PC ( $28.84 \pm 7.12$ ) ( $P < 0.05$ ). The positive expression of VEGF in stage I and II PC (16/26) was higher than that in stage III and IV (14/15). The positive expression of VEGF in well-differentiated PC (11/19) was also higher than that in moderate- and poorly-differentiated PC (19/22) ( $P < 0.05$ ). The value of MVD in stage I, II ( $26.92 \pm 1.06$ ) and well-differentiated PC ( $19.00 \pm 2.58$ ) was lower than that in stage of III, IV ( $28.47 \pm 2.23$ ) and moderate- and poorly-differentiated PC ( $16.68 \pm 1.79$ ), ( $P < 0.05$ ). The expression of TFPI-2, Ki-67 and VEGF was negatively correlated. The MVD was related to the expression of TFPI-2. **Conclusions** TFPI-2 can inhibit cell proliferation of PC, and by reducing the expression of VEGF can inhibit the angiogenesis of new vessels in PC, which may play an important part in inhibitory effect on invasion and metastasis of PC.

[Chinese Journal of General Surgery,2007,16(10):959-961]

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(050430702)。

收稿日期:2007-08-21; 修订日期:2007-10-08。

作者简介:汤志刚,男,湖北浠水人,安徽医科大学附属医院安徽省立医院副主任医师,主要从事肝胆胰基础及临床方面的研究。

通讯作者:汤志刚 E-mail:tzg7031@163.com

**Key words:** Pancreatic Neoplasms; Neovascularization, Pathologic; Tissue Factor Pathway Inhibitor 2

**CLC number:** R 735.9

**Document code:** A

胰腺癌是一种恶性程度高、预后差的消化道肿瘤,侵袭和转移是其最重要的生物学特性,其机制仍未明了。本研究应用免疫组织化学技术对41例胰腺癌组织中的组织因子途径抑制物2(tissue factor pathway inhibitor 2, TFPI-2)、Ki-67蛋白、血管内皮生长因子(VEGF)和肿瘤微血管密度(MVD)进行检测,研究TFPI-2对胰腺癌肿瘤细胞增殖及肿瘤血管生成的影响,探讨其抑制胰腺癌生长、侵袭及转移的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本及其病例资料 从本院2003年1月—2006年12月行胰腺癌手术患者中筛选出经病理证实为胰腺腺癌,病理资料完整的41例石蜡切片标本。组织经10%甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切成5 $\mu$ m切片。本组男28例,女13例;年龄32~73(平均57)岁。按照国际抗癌联盟(UICC)制定的胰腺癌分期标准<sup>[1]</sup>, I期8例, II期17例, III期10例, IV期6例;高分化19例,中、低分化22例。患者术前均未经放疗及化疗。

1.1.2 主要试剂 多克隆抗兔TFPI-2抗体、CD34多克隆抗体购自Santa Cruz公司;VEGF抗体购自福州迈新生物技术开发公司;Ki-67单克隆抗体购自北京中山生物技术公司;EnVision免疫组化染色试剂盒购自Dako公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 二步法免疫组化染色(EnVision System)

(1)石蜡切片常规脱水;(2)根据一抗具体说明预处理组织切片;(3)3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消除内在过氧化物酶5 min;蒸馏水漂洗,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗;(4)一抗孵育30 min, PBS漂洗3 $\times$ 5 min;(5)EnVision孵育10~30 min, PBS漂洗3 $\times$ 5 min;(6)DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色2~10 min,流水冲洗;(7)苏木素复染,常规封片。用PBS代替一抗作阴性对照,用已知阳性标本作阳性对照。

1.2.2 结果判定 (1)TFPI-2阳性表达信号为细胞浆内棕黄染色细小颗粒。按阳性细胞数分为4级:无阳性细胞或阳性细胞<5%为(-);阳性细胞5%~10%为(+);阳性细胞11%~40%为(++);阳性细胞>40%为(+++)。(2)Ki-67蛋白表达阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色。细胞增殖指数(PI)=Ki-67阳性细胞数/肿瘤细胞总数 $\times$ 100%。每张切片在400倍镜下随机选定

10个视野进行观察。(3)VEGF表达的阳性判断标准按Takahashi等<sup>[2]</sup>报道的方法。(4)肿瘤MVD按Weidner方法测定<sup>[3]</sup>:先用40倍光镜寻找微血管分布均匀区域,排除肿瘤出血区及边缘反应区。再在200倍镜下计数染成棕黄色的血管数;任何染色的血管内皮细胞或血管内皮簇,只要它们与邻近血管、肿瘤细胞及其他结缔组织分开,即可视为一个血管。计数5个视野下的血管数,取其均值。

### 1.3 统计学处理

实验数据行 $t$ 检验、 $\chi^2$ 检验及Spearman相关分析。采用SPSS11.5进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TFPI-2, Ki-67(PI), VEGF及MVD与胰腺癌临床病理的关系

胰腺癌组织中TFPI-2, Ki-67(PI), VEGF及CD34标记MVD表达水平与胰腺癌的组织学分级及TNM临床分期有关,而与其他病理因素无关(表1)。

**表1** TFPI-2和VEGF表达、MVD计数及PI值与胰腺癌临床病理特征的关系

病理特征	TFPI-2 阳性率(%)	VEGF 阳性率(%)	MVD 值	PI 值
性别				
男	12/28(42.86)	21/28(75.00)	18.65 $\pm$ 3.04	26.66 $\pm$ 7.39
女	7/13(53.85)	9/13(69.23)	17.35 $\pm$ 2.16	27.08 $\pm$ 6.45
年龄(岁)				
>50	13/29(44.83)	22/29(75.86)	16.73 $\pm$ 2.13	26.37 $\pm$ 7.42
$\leq$ 50	6/12(50.00)	8/12(66.67)	17.89 $\pm$ 2.73	27.81 $\pm$ 6.16
大小(cm)				
$\leq$ 5	6/14(42.86)	10/14(71.43)	16.92 $\pm$ 3.27	27.31 $\pm$ 7.09
>5	13/27(48.15)	20/27(74.07)	18.03 $\pm$ 2.46	25.80 $\pm$ 7.06
组织学分级				
高分化	12/19(63.16)	11/19(57.89)	19.00 $\pm$ 2.58	24.42 $\pm$ 6.29
中、低分化	7/22(31.82) <sup>1)</sup>	19/22(86.36) <sup>1)</sup>	16.68 $\pm$ 1.79 <sup>1)</sup>	28.84 $\pm$ 7.12 <sup>1)</sup>
TNM分期				
I, II期	17/26(65.38)	16/26(61.54)	26.92 $\pm$ 1.06	24.45 $\pm$ 6.19
III, IV期	2/15(13.33) <sup>2)</sup>	14/15(93.33) <sup>2)</sup>	28.47 $\pm$ 2.23 <sup>2)</sup>	30.84 $\pm$ 6.70 <sup>2)</sup>

注:1)与高分化组比较, $P < 0.05$ ; 2)与I, II期组比较, $P < 0.05$

### 2.2 TFPI-2表达与VEGF表达及MVD的关系

胰腺癌中TFPI-2的表达与VEGF表达呈负相关( $r = -0.54$ ,  $P < 0.05$ )(表2)。MVD值与TFPI-2表达有关,19例TFPI-2表达阳性的胰腺癌组织MVD值为33.33 $\pm$ 3.23,22例TFPI-2表达阴性的胰腺癌组织MVD值为36.00 $\pm$ 3.17,两组比较,差异有统计学意义( $t = 2.67$ ,  $P < 0.05$ )。

表2 胰腺癌中TFPI-2与VEGF表达的相关性

TFPI-2 表达	VEGF 表达				合计
	(-)	(+)	(++)	(+++)	
(-)	2	4	6	10	22
(+)	3	2	2	1	8
(++)	2	2	1	1	6
(+++)	4	1	0	0	5
合计	11	9	9	12	41

注:TFPI-2的表达与VEGF呈负相关( $r = -0.54, P < 0.05$ )

### 2.3 TFPI-2表达与PI的关系

41例胰腺癌中按TFPI-2基因表达水平(-)~(+++),对应的PI分别为 $31.32 \pm 5.98$ ,  $29.09 \pm 4.61$ ,  $21.22 \pm 4.20$ 和 $18.34 \pm 1.11$ 。两者呈负相关( $r = -0.62, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

TFPI-2基因位于人类7号染色体7q22<sup>[4]</sup>,体内主要以32kD的形式存在于内皮细胞和成纤维细胞的细胞外基质(ECM)中。TFPI-2蛋白是具有Kunitz型结构的丝氨酸蛋白酶抑制物,体外可强烈抑制纤溶酶、胰蛋白酶、金属蛋白酶1,3(MMP-1, MMP-3)等多种蛋白酶,而纤溶酶、组织蛋白酶以及MMP-1和MMP-3参与ECM的重塑过程,在血管生成及肿瘤细胞侵袭转移等一系列生理、病理过程中扮演重要角色。因此TFPI-2可通过对这些酶的抑制以维持ECM的结构完整,调控肿瘤细胞的生长及侵袭转移。Yanamandra等在体外将转染重组rAAV-TFPI-2的SNB19细胞与人毛血管内皮细胞(HMEC)一并培养,微血管定量分析发现,rAAV-TFPI-2对毛细血管网状结构形成的抑制率可达85%;进一步裸鼠体内实验证实,rAAV-TFPI-2在已形成的肿瘤血管的基础上最大可100%抑制新生毛细血管的形成。在对纤维肉瘤、恶性脑膜瘤等研究中也发现,TFPI-2可通过抑制新生血管的形成来抑制肿瘤细胞的增殖,降低其对周围组织的侵袭及远处转移<sup>[5-7]</sup>。

本实验采用免疫组化方法检测41例胰腺癌组织中TFPI-2, Ki-67及VEGF的表达,并测定抗CD34抗体标记的MVD。发现TFPI-2的表达与胰腺癌组织学分级及其临床分期有关,中、低分化的胰腺癌组织中TFPI-2阳性表达率低于高分化的胰腺癌组织,Ⅲ,Ⅳ期的胰腺癌组织TFPI-2的表达亦低于Ⅰ、Ⅱ期胰腺癌组织。Ki-67抗原是存在于增殖细胞核中的一种非组蛋白性核蛋白,是一种细胞周期及肿瘤生长的标志抗原,其表达的高低反映了细胞的增殖状态及细胞所处的细胞周期,能灵敏地反映肿瘤细胞的增殖活性<sup>[8]</sup>。本研究发现,TFPI-2高表达的胰腺癌组织中Ki-67表达反而降低,两者呈负相关, ( $r = -0.62, P < 0.05$ )。TFPI-2基因表达下降,肿瘤细胞增殖明显增加。TFPI-2可能通过对细胞周期的调节来

抑制肿瘤细胞的增殖从而抑制肿瘤的生长。VEGF的表达与TFPI-2的表达呈负相关;发生转移、恶性程度高的胰腺癌组织中TFPI-2表达较低而VEGF表达却增加。CD34是血管内皮细胞标记物,能显示极微小的肿瘤新生血管,有很高的特异性和灵敏性<sup>[9]</sup>。实验中发现已发生转移、恶性程度高的胰腺癌组织的MVD值高于无转移、恶性程度低的胰腺癌组织。说明不同的胰腺癌组织其新生血管的数量有所不同。胰腺癌细胞的生长依赖肿瘤新生血管的形成。这一过程可能受胰腺癌细胞与HMEC相互作用的影响。胰腺癌细胞合成释放的血管生成因子(AF)及内皮细胞释放的VEGF和分化因子(differentiation factor)可能在新生血管的形成中起关键作用。TFPI-2的表达与VEGF的表达呈负相关;TFPI-2阳性的胰腺癌组织中的MVD值低于TFPI-2表达阴性的胰腺癌组织,说明TFPI-2能抑制胰腺癌肿瘤新生血管的形成,其机制可能是通过下调VEGF的表达而实现的。

TFPI-2在胰腺癌中表达与胰腺癌的侵袭、转移有关,具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,参与了细胞周期的调节,可能是一种与细胞增殖及细胞周期有关的基因。同时,TFPI-2可能通过抑制肿瘤新生血管形成阻断其营养供应从而抑制肿瘤的生长,发挥其抗肿瘤及抑制肿瘤侵袭、转移效应。这可能为胰腺癌的基因治疗提供了新靶向。

### 参考文献:

- [1] Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer [J]. Cancer, 1997, 80(9):1803-1804.
- [2] Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer [J]. Cancer Res, 1995, 55(18):3964-3968.
- [3] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. Am J Pathol, 1995, 147(1):9-19.
- [4] Kong D, Ma D, Bai H, et al. Expression and characterization of the first kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor-2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 324(4):1179-1185.
- [5] Yanamandra N, Kondraganti S, Gondi CS, et al. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) expressing TFPI-2 inhibits invasion, angiogenesis and tumor growth in a human glioblastoma cell line [J]. Int J Cancer, 2005, 115(6):998-1005.
- [6] Chand HS, Du X, Ma D, et al. The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice [J]. Blood, 2004, 103(3):1069-1077.
- [7] Kondraganti S, Gondi CS, Gujrati M, et al. Restoration of tissue factor pathway inhibitor inhibits invasion and tumor growth in vitro and in vivo in a malignant meningioma cell line [J]. Int J Oncol, 2006, 29(1):25-32.
- [8] Kayasleuk F, Zorludemir S, Gumurdulu D, et al. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological and grade [J]. Neurooncology, 2002, 57(2):115-121.
- [9] 邵成浩, 胡先贵, 唐岩, 等. 胰腺癌的血管生成及临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(2):45-47.