

HIF-1 α 、VEGF 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义

游志鹏 宋 华 赵莉莲

Expression and clinical implication of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in retinoblastoma

You Zhipeng, Song Hua, Zhao Julian. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract Objective The invasion and metastasis of tumor cells depend on the growth of new blood vessels, and tumor neovascularization was regulated by a lots of factors. This study aimed to investigate the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinoblastoma and explore the correlation of HIF-1 α and VEGF with tumor invasion and metastasis and analyze their relationship with clinicopathology characters and determine their effect on angiogenesis. **Methods** Forty-six retinoblastoma specimens with different clinical stages were collected in Affiliated Second Hospital of Nanchang University. The specimens received neither radiotherapy nor chemotherapy. The retinal tissue near the tumor was as control. Immunohistochemistry was used to detect the expression of HIF-1 α protein and VEGF protein in retinoblastoma. The relationship between expression of HIF-1 α and VEGF and stage of tumor was analyzed. **Results** The HIF-1 α and VEGF were highly expressed in the ischemia or necrosis area of retinoblastoma. Expression of HIF-1 α was mainly in cell nuclear and partly in cytoplasm, and VEGF was mainly expressed in cytoplasm of tumor cells. The expression of HIF-1 α and VEGF was gradually increased with the rising of tumor stage ($P < 0.05$) and showed significant correlation between expression of HIF-1 α and VEGF with tumor stage ($r_s = 0.943, P < 0.01$). HIF-1 α expression was also positively related to VEGF level in retinoblastoma ($r_s = 0.946, P < 0.01$). **Conclusion** HIF-1 α and VEGF were over-expressed in retinoblastoma cells, and the expressions were related to clinical staging, invasion and metastasis of tumor cells. The expression of HIF-1 α and VEGF was one of the predictors for the biological behaviors of retinoblastoma. HIF-1 α and VEGF may play an important role in angiogenesis and tumor progression in retinoblastoma.

Key words retinoblastoma; hypoxia-inducible factor-1 alpha; vascular endothelial growth factor

摘要 目的 探讨缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)在视网膜母细胞瘤(RB)组织中表达情况及其在肿瘤血管形成、浸润及转移等生物学行为中作用。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 RB 组织中 HIF-1 α 蛋白、VEGF 蛋白的表达情况,并探讨其表达与肿瘤的分级的相关性及 HIF-1 α 和 VEGF 两者的相关性。**结果** HIF-1 α 、VEGF 蛋白在 RB 中呈高表达, HIF-1 α 阳性细胞为肿瘤细胞核染色、部分胞浆染色, VEGF 阳性细胞为肿瘤细胞胞浆染色, HIF-1 α 、VEGF 表达在不同临床分期间差异有统计学意义($P < 0.05$), 且其表达和临床分期密切相关($P < 0.05$); HIF-1 α 、VEGF 二者表达存在正相关($r_s = 0.946, P < 0.01$)。**结论** HIF-1 α 及 VEGF 的高表达与 RB 的临床分期呈正相关, 在 RB 新生血管形成、肿瘤的浸润、转移中可能发挥重要作用。

关键词 视网膜母细胞瘤; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)11-0992-04

肿瘤的生长和转移依赖肿瘤细胞对缺氧的适应和新生血管形成^[1], 而肿瘤新生血管的形成受多种因子的调控。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是缺氧条件下肿瘤细胞生长的一种转录

因子。其可能在肿瘤血管生成中起中心调控作用^[2]。HIF-1 α 通过调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等众多下游靶基因的表达发挥其作用^[3]。VEGF 是众多因子中刺激肿瘤血管生成最关键的生长因子^[4], 有关 VEGF 的研究报道较多。HIF-1 α 在肿瘤生物学行为中的作用近年来引起了人们的

作者单位: 330006 南昌大学第二附属医院眼科

通讯作者: 游志鹏 (Email: yzp74@sina.com)

广泛关注,是众多肿瘤相关因子中研究的热点之一,但其在视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, RB) 中表达国内外研究较少,尚待深入。因此本文以免疫组织化学方法,观察 HIF-1 α 及 VEGF 在 RB 中的表达规律,探讨其在肿瘤生长、浸润、转移中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我科病理室 2001—2007 年的 RB 行眼球摘除的 46 例 (46 眼) 石蜡包埋块,其中男 25 例,女 21 例;年龄 5 个月 ~ 10 岁,平均 3.8 岁。临床分型参照文献 [5],分为 I 期:单发或多发,肿瘤 < 4 PD,位于眼底赤道部或赤道后;II 期:单发或多发,肿瘤 4 ~ 10 PD,眼底赤道部或赤道后;III 期:单发或多发,肿瘤 > 10 PD,位于眼底赤道部后;IV 期:单发或多发,肿瘤 > 10 PD,达锯齿缘;V 期:肿瘤占 1/2 眼底以上,玻璃体播散。46 例中, I 期者 5 例, II 期者 5 例, III 期者 21 例, IV 期者 11 例, V 期者 4 例。46 例病例手术前均未接受放疗或化疗。肿瘤旁视网膜组织 15 例作为对照。

1.2 主要试剂

免疫组织化学试剂: HIF-1 α 一抗为兔抗人多克隆抗体,为浓缩型工作液,工作浓度 1:100, VEGF 一抗为鼠抗人单克隆抗体,二者为即用型工作液;生物素 - 链霉菌抗生物素蛋白 (二抗) 检测系统 (SP) 试剂盒。以上试剂均购自福州迈新公司,操作按说明书进行。

1.3 实验方法

免疫组织化学染色切片脱蜡至水, 3% H₂O₂ 室温孵育 20 min; 10% 正常山羊血清室温孵育 10 min。HIF-1 α 多克隆抗体、VEGF 单克隆抗体均采用微波抗原修复。其余按照 SP 试剂盒说明操作。PBS 代替一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。

1.4 结果判断

参照 Zhong 等 [2] 方法,光镜下 HIF-1 α 蛋白以细胞核或胞浆内有浅黄色、棕色、棕黄色细颗粒为阳性。高倍镜下 ($\times 400$) 对每张切片随机选择 5 个视野,每个视野记数 200 个细胞,共计 1 000 个,计算每张切片阳性细胞百分率,切片中阳性细胞数 < 1% 为阴性片, 1% ~ 10% 为阳性 (+), 11% ~ 50% 为中度阳性 (++) , > 50% 为强阳性 (+++) ; VEGF 蛋白以肿瘤细胞胞浆内出现浅黄色、棕色、棕黄色细颗粒为阳性,参照 Takahashi 等 [6] 方法,将 VEGF 表达分为 < 20 为阴性, 21% ~ 50% 为阳性 (+), 51% ~ 80% 为中度阳性 (++) , > 80% 为强阳性 (+++) 共 4 级。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析, HIF-1 α 、VEGF 在不同肿瘤分期中的表达用多样本 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验, HIF-1 α 和 VEGF 与肿瘤分期关系及二因子在肿瘤组织中表达的相关性用 Spearman 法行秩相关分析, HIF-1 α 与 VEGF 表达的一致性检验采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RB 组织中 HIF-1 α 的表达

HIF-1 α 阳性细胞为细胞核染色和部分胞浆染色 (图 1), 阳性细胞一般出现在肿瘤周边或缺血、坏死区。以 PBS 代替一抗的对照片中未见表达 (图 2)。HIF-1 α 在不同分期的 RB 中的表达差异有统计学意义 ($H = 39.987, P < 0.01$); RB 不同分期各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1); RB 级别与 HIF-1 α 表达呈正相关 ($r_s = 0.943, P < 0.01$)。

2.2 RB 组织中 VEGF 蛋白表达

VEGF 阳性细胞主要在肿瘤细胞的胞浆中。强阳性染色肿瘤细胞多位于浸润前缘, 新生血管内皮细胞阳性染色 (图 3)。以 PBS 代替一抗的对照片中未见

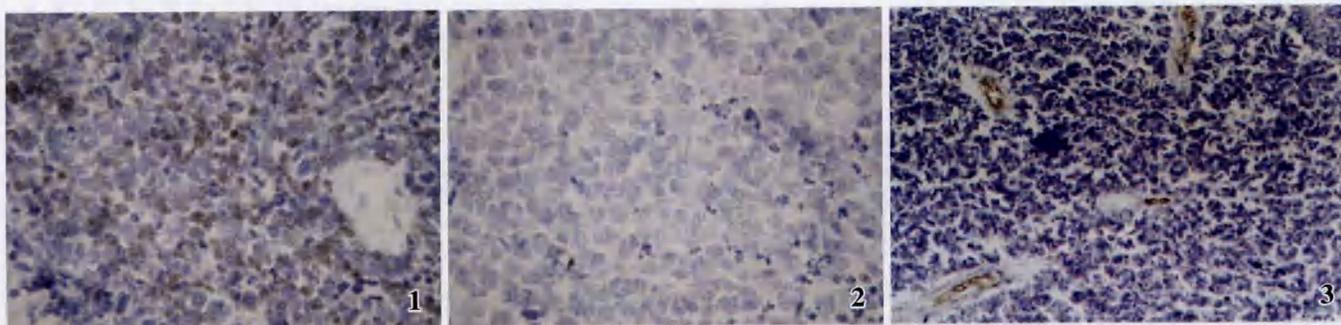


图 1 HIF-1 α 在肿瘤的周边或缺血、坏死区表达,在细胞核和部分胞浆中棕色染色 (SP $\times 200$) 图 2 以 PBS 代替一抗的对照片中呈阴性表达 ($\times 200$) 图 3 VEGF 在肿瘤细胞和新生血管的内皮细胞中呈阳性表达 ($\times 200$)
 Fig. 1 HIF-1 α is expressed in cellular nuclear and cytoplasm in tumor, showing the brown staining ($\times 200$) Fig. 2 HIF-1 α shows the absent response in the control sample ($\times 200$) Fig. 3 VEGF shows the positive expression in tumor cells and neovascular endothelial cells

VEGF 表达。VEGF 在不同分期的 RB 中的表达差异有统计学意义 ($H = 34.866, P < 0.01$); RB 不同分期各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1); RB 级别与 VEGF 表达呈正相关 ($r_s = 0.903, P < 0.01$)。

表 1 HIF-1 α 和 VEGF 在 RB 中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of HIF-1 α and VEGF in retinoblastoma ($\bar{x} \pm s$)

Tumor stage	n	HIF-1 α	VEGF
I	5	0.64 \pm 0.23	11.08 \pm 0.24
II	5	5.24 \pm 0.49	16.42 \pm 0.66
III	21	16.45 \pm 1.08	24.34 \pm 1.61
IV	11	27.73 \pm 2.00	38.00 \pm 1.32
V	4	47.85 \pm 2.83	50.85 \pm 1.14

$H_{HIF-1\alpha} = 39.987, P < 0.01; H_{VEGF} = 34.866, P < 0.01$ (Kruskal-Wallis H rank sum test)

2.3 HIF-1 α 与 VEGF 表达的一致性检验

HIF-1 α 与 VEGF 两因子在 RB 组织中表达的一致性,经统计学处理差异有统计学意义 ($\chi^2 = 0.69, 0.25 < P < 0.50$) (表 2); 二者表达存在正相关 ($r_s = 0.946, P < 0.01$)。

表 2 RB 组织 HIF-1 α 与 VEGF 表达的关系 (n)

Table 2 The correlation of expression of HIF-1 α with VEGF in retinoblastoma (n)

HIF-1 α	VEGF		Total
	+	-	
+	36	6	42
-	0	4	4
Total	36	10	46

$\chi^2 = 0.69, 0.25 < P < 0.50$ (χ^2 test)

3 讨论

肿瘤的发生发展与癌基因的激活、抑癌基因的失活以及许多相关因子的参与,可见这些因子与肿瘤生长有着密切的关系。当肿瘤的直径超过 1~2 mm 时,肿瘤的生长就需要新生血管提供氧气及营养来维持其生长^[7],否则肿瘤细胞将凋亡。

缺氧等因素刺激了肿瘤的血管发生,这个过程由肿瘤或宿主细胞释放的各种正反向调节因子介导调控,而血管生成则是肿瘤继续生长、转移及复发的先决条件。HIF-1 是在缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子,它可以调控如 VEGF 等多种缺氧相关靶基因的表达,促使机体产生一系列缺氧适应反应。HIF-1 主要由 HIF-1 α 和 HIF- β 2 个亚单位组成,其中 HIF-1 α 是主要的氧调节亚基和功能亚基^[8],它决定 HIF 的活性。人类 HIF-1 α 基因定位于 14 号染

色体 (14q21~24),其 cDNA 全长 3 720 bp,编码 826 个氨基酸。机体在缺氧状态下 HIF-1 α 可上调其下游靶基因 VEGF 和糖酵解酶等表达,VEGF 可促进肿瘤的血管生成。增加肿瘤的侵袭性和转移率,糖酵解酶可影响细胞的能量代谢。目前已经发现 HIF-1 α 的靶基因多达 40 余种,这些 HIF-1 α 的靶基因产物在肿瘤的细胞代谢、新生血管生成、肿瘤增生、侵袭和转移中也具有重要的作用,VEGF 即是其中的一个靶基因。HIF-1 α 可诱导促血管生成因子 VEGF 的表达、促进新生血管形成,为肿瘤细胞的侵袭和转移创造条件^[9]。多数肿瘤组织具有缺氧的微环境,在氧感受和缺氧信号转导中处于关键地位的 HIF-1 α 及表达受其调控的 VEGF 也因在肿瘤发展过程起着重要的作用而逐渐成为肿瘤研究的热点之一。

RB 是婴幼儿较为常见的眼内恶性肿瘤,恶性程度高,严重危害患者的视力和生命。HIF-1 α 在肿瘤组织对缺氧的微环境的适应及肿瘤发生、浸润和转移中起重要作用,其在 RB 中的作用也逐渐受到人们的关注,目前相关研究较少。现已证实^[10-11] HIF-1 α 在中枢神经系统恶性肿瘤中表达,并已发现^[12] 在视网膜缺血时其表达水平增高。在动物模型中发现^[13],常氧条件下视网膜中 HIF-1 α 表达极其微弱,而低氧状态下 HIF-1 α 表达增强。HIF-1 α 在大多数人类实体肿瘤组织中呈过度表达,但其在 RB 中鲜见报道。已发现脑肿瘤及乳腺癌中 HIF-1 α 的过度表达与肿瘤微血管密度密切相关,HIF-1 α 的过度表达有助于血管形成,且被认为是乳腺癌、早期宫颈癌、早期食管癌等高度恶性、侵袭性的标志物^[2,14]。本实验结果显示,正常视网膜组织中无 HIF-1 α 表达,而在 RB 中 HIF-1 α 呈阳性表达且其临床分期明显相关,HIF-1 α 高表达可以作为判断 RB 浸润转移等生物学行为的重要指标。

VEGF 特异作用于血管内皮细胞,促进内皮细胞的有丝分裂和趋化作用,还增加血管通透性,使管内的纤维蛋白原等外渗,不仅为内皮细胞迁移和新生毛细血管网的建立提供必要基质,也为肿瘤的生长提供良好基质。VEGF 有促进血管形成的作用,从而可能参与肿瘤的浸润和转移过程。VEGF 在胃癌、结肠、直肠^[15] 等多数肿瘤组织中的表达明显增高,并与其生物学行为相关。膀胱癌、黑色素瘤细胞系中 VEGF 的过度表达也可加速肿瘤生长、血管新生和转移^[16-17]。在本研究中,发现 VEGF 在 RB 组织中高表达且临床分期密度相关。随着眼内肿瘤组织学分期的进展,VEGF 的表达增强 ($P < 0.01$),表明其参与 RB 浸润转移,并可作为其生物学行为的一个参考指标。与游志鹏

等^[18]的研究相符。

Canneliet 等^[19]研究认为肿瘤的血管增生很大程度由 HIF-1 α 控制,其作用部分是由于其上调 VEGF 表达的结果。亦有研究表明^[20-22],缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 在诱导肿瘤中 VEGF 的分泌起关键作用。同其他恶性肿瘤一样, RB 的发生发展、浸润转移等生物学行为是一个极其复杂的多层次、多因子参与相互拮抗和协调作用的过程,目前 VEGF 在 RB 中的研究较为深入,但关于 HIF-1 α 在 RB 中的研究才刚刚起步。Duyndan 等^[23]的研究,将人的视网膜细胞在 1% O₂ 条件下培养 0.5 ~ 3 h 不等,结果显示, HIF-1 α mRNA 表达未见明显变化,而 HIF-1 α DNA 水平、蛋白水平及 VEGF 表达随时间延长而呈递增趋势。本实验结果显示:在 RB 中 HIF-1 α 与 VEGF 表达显著正相关,但 HIF-1 α 对其靶基因 VEGF 在肿瘤血管生成和转移中的作用仍需进一步证实。此外,研究中还发现, HIF-1 α , VEGF 蛋白表达在临床分级中有显著差别,提示 HIF-1 α 及 VEGF 可能参与 RB 的浸润和转移。本研究所选择的病例数有限,需增加病例数并对不同分期的标本进行检测研究以进一步确定 HIF-1 α 的表达与肿瘤临床分期的关系,同时明确他们与 RB 病理分级是否存在相关性。

控制在肿瘤生物学行为中发挥作用的因子(如 HIF-1 α 、VEGF 等)或将正常的抑癌基因导入肿瘤细胞去补偿和代替突变或缺失的抑癌基因,达到抑制肿瘤的生长或逆转其表型的恶性肿瘤的基因治疗,将成为恶性肿瘤的一种重要治疗模式。其他肿瘤的最近研究发现^[24],通过抑制卵巢癌中 HIF-1 的活性可以下调肿瘤中 VEGF 的表达,为未来新的肿瘤治疗方案提供可能。在 RB 基因治疗方面,以 VEGF 为靶基因的基础研究已经开展^[25]。相信随着 HIF-1 α 及 VEGF 研究的深入,会更加详尽的认识其缺氧机制及其载 RB 浸润转移等生物学行为中的作用,进而为肿瘤的治疗提供新的思路并进一步应用于临床。

参考文献

- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285: 1182 - 1186
- Zhong H, de Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in common human cancer and their metastasis [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 5830 - 5835
- Bozova S, Elpek GO. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in experimental cirrhosis; correlation with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis [J]. *APMIS*, 2007, 115(7): 795 - 801
- Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, et al. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma [J]. *Ontology*, 2003, 64: 61 - 73

- 李凤鸣. 眼科全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 2382 - 2383
- Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. Expression of vascular endothelial factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 3964 - 3968
- Carron CP, Meyer DM, Pegg JA, et al. A peptidomimetic antagonist of the integrin alpha (v) beta 3 inhibits leydig cell tumor growth and development of hypercalcemia of malignancy [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9): 1930
- Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 551 - 578
- Lando D, Gorman JJ, Whitelaw ML, et al. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible by prolyl and asparaginyl hydroxylation [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(5): 781 - 790
- Wiener CM, Booth G, Semenza GL. In vivo expression of mRNA encoding hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225: 485 - 488
- Halterman MW, Miller CC, Federoff HJ. Hypoxia-inducible factor-1 alpha mediates hypoxia-induced delayed neuronal death that involves p53 [J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 6818 - 6824
- Ozaki H, Yu AY, Della A, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha is increased in ischemic retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40: 182 - 189
- 张薇, 李若溪, 许建华, 等. 低氧条件下大鼠视网膜 HIF-1 α 及 p53 的表达及相关分析 [J]. *国际眼科杂志*, 2006, 16(4): 793 - 795
- Bachtiary B, Schindl M, Potter R, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 2234 - 2240
- Harada Y, Shirouzu K. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR/FLK-1 (FETAL LIVER KINASE-1) as prognostic factors in human colorectal cancer [J]. *Int J Clin Oncol*, 2001, 6: 221 - 228
- Sigala S, Missale G, Missale C, et al. Different neurotransmitter systems are involved in the development of esophageal achalasia [J]. *Life Sci*, 1995, 56(16): 1311 - 1320
- Bulstrode NW, Grobbelaar AQ. Longterm prospective follow-up botulinum toxin treatment for facial rhytides [J]. *Aesthetic Plas Surg*, 2002, 26(5): 356 - 359
- 游志鹏, 赵菊莲, 汪昌运. 血管内皮生长因子在视网膜母细胞瘤中的表达及意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(20): 3045 - 3051
- Canneliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1 alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis [J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 485 - 490
- May D, Iltin A, Gal O, et al. Ero1-L α plays a key role in a HIF-1 mediated pathway to improve disulfide bond formation and VEGF secretion under hypoxia; implication for cancer [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 1011 - 1020
- Yasuda S, Arii S, Mori A, et al. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumor; correlation with hypoxia-inducible factor-1 alpha and its significance [J]. *J Hepatol*, 2004, 40: 117 - 123
- Ashima M. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) and HIF-1 protein in retinal pigment epithelial cells [J]. *Pediatric Res*, 1999, 45(4): 421 - 426.
- Duyndan MC, van Berkel MP, Dorsman JC, et al. Cisplatin and doxorubicin repress vascular endothelial growth factor expression and differentially down-regulate hypoxia-inducible factor I activity in human ovarian cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(2): 191 - 201
- Jia RB, Zhang P, Zhou YX, et al. VEGF-targeted RNA interference suppresses angiogenesis and tumor growth of retinoblastoma [J]. *Ophthalmic Res*, 2007, 39(2): 108 - 115

(收稿: 2008-12-06 修回: 2009-09-28)

(本文编辑: 尹卫靖)