

HIF-1 α 与 VEGF 在乳腺癌组织中的表达及与放疗敏感性的相关性研究

肖若冰¹, 肖雅莉¹, 谢常军¹, 唐 婧²

(1. 南华大学附属第二医院肿瘤放射治疗科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学第二附属医院麻醉科)

摘要: **目的** 探讨缺血诱导因子-1 α (HIF-1 α) 与血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白在原发性乳腺癌组织中的表达及与放疗疗效的关系。**方法** 采用 SABC 免疫组化方法, 检测乳腺癌组织 (88 例) 和正常乳腺组织 (20 例) 中 HIF-1 α 与 VEGF 蛋白的表达。并分析 HIF-1 α 或 VEGF 蛋白表达与原发性乳腺癌组织临床病理学特征和预后的关系。**结果** HIF-1 α 与 VEGF 蛋白在原发性乳腺癌组织中的阳性表达率分别为 69.32% (61/88)、78.40% (69/88), 两者存在显著正相关性 ($r=0.68, P=0.006$)。二者均与癌组织的临床病理学特征有关; 27 例 HIF-1 α 阴性表达患者的生存时间明显长于 61 例阳性表达患者 ($P=0.008$); 19 例阴性 VEGF 患者的生存时间明显长于 69 例阳性 VEGF 患者 ($P=0.006$)。HIF-1 α 阳性表达患者中, VEGF 表达强度及放疗后局部未控率均高于 HIF-1 α 阴性组 ($P=0.01$); 其中 16 例 VEGF 阴性表达患者的生存时间明显长于 42 例 VEGF 阳性表达患者的生存时间 ($P=0.01$)。**结论** HIF-1 α 与 VEGF 蛋白表达可能与原发性乳腺癌的发生、浸润、转移有关, 二者高表达与乳腺癌放射抗拒性有密切关系。

关键词: 原发性乳腺癌; 临床病理学; 缺血诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 放射治疗

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of HIF-1 α and VEGF in Breast Cancer and the Relationship with the Curative Effect of Radiotherapy

XIAO Huobing, XIAO Yali, XIE Changjun, et al

(Department of Radiation Oncology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of HIF-1 α and VEGF protein in primary breast carcinoma, and to evaluate its clinical significance in clinicopathological status and prognosis of patients with primary breast carcinoma. **Methods** SABC immunohistochemistry was used to assay the expression of HIF-1 α or VEGF protein in the primary breast carcinoma patients (88 cases) or natural breast tissues (20 cases), respectively. **Results** The positive expression rates of HIF-1 α and VEGF protein in breast carcinoma tissues were 69.32% (61/88) and 78.40% (69/88), respectively. Clinicopathological parameters of breast carcinoma were associated with HIF-1 α and VEGF protein expression. The positive rate of HIF-1 α was positively correlated with the expression of VEGF protein ($r=0.68, P=0.006$). The positive expression of HIF-1 α was closely related to clinical stage, prognosis and short-term effects of radiotherapy ($P<0.05$). **Conclusion** HIF-1 α and VEGF expression in cancerous tissues may play an important role in invasion and metastasis of primary breast carcinoma. The expression of HIF-1 α and VEGF may serve as important parameters for evaluating the response to radiotherapy and establishing a prognosis for patients with primary breast cancer.

Key words: primary breast carcinoma; clinical pathology; HIF-1 α ; VEGF; radiotherapy

目前, 乳腺癌的发病率跃居女性常见恶性肿瘤的首位, 严重威胁广大女性的健康^[1], 国内乳腺癌的发病率和病死率呈逐年上升趋势^[2]。随着肿瘤分子遗

传学与分子生物学的发展,目前认为肿瘤的生长依赖于肿瘤血管生成。诱导血管生成的能力是恶性肿瘤生长、浸润和转移的前提之一^[3]。缺血诱导因子 1- α (hypoxiainducible factor1- α , HIF-1 α) 是最近发现的一种重要的促肿瘤生长因子和血管生长因子,细胞生物学和动物研究表明其表达与肿瘤的发生及生长有关^[4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 在肿瘤新生血管生成过程中起着至关重要的作用,增加肿瘤侵袭、转移的机会^[5]。放射治疗是乳腺癌的重要治疗手段。然而,常规分割放疗的疗效尚不理想。肿瘤复发、转移、对放疗抗拒的基础是肿瘤微环境缺氧和肿瘤新生血管的形成。本研究应用免疫组织化学染色技术(SABC 法)检测 HIF-1 α 与 VEGF 蛋白在正常乳腺组织和原发性乳腺癌组织中的表达,旨在探讨乳腺癌组织中 HIF-1 α 、VEGF 表达相关性以及对预后的影响。

1 资料与方法

1.1 材料

收集 2006 年 7 月~2011 年 7 月经病理确诊为原发性乳腺癌患者 88 例,年龄 47.5 $\pm$ 3.2 岁(25~68 岁),排除原位癌。全部病例均经过乳腺癌改良根治术及放射治疗(5000 cGy/5 周)。平均随访时间为 42 个月(15~60 个月),3 例失去随访,随访率 96.59%。对照组标本 20 例,均为疑似乳癌病灶,但病理检查均为正常或纤维瘤旁的正常乳腺组织。

1.2 免疫组化 SABC 检测

采用免疫组织化学染色 SABC 法。标本依次进行以下处理:多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 连续切片,于 70 $^{\circ}$ C 烤片 15 min,梯度乙醇脱水,30 mL/L H₂O₂ 灭活内源酶,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。正常山羊血清室温孵育 15 min。滴加 20~30 μ L PBS 稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。二抗依次在 37 $^{\circ}$ C 下,孵育 45 min,PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次。DAB 显色 5~10 min,自来水充分洗涤,苏木素复染 5 min,稀盐酸淡化 30 s,冲洗 5 min。脱水、透明、封片,镜检。用 PBS 替代第一抗体作阴性对照。鼠源性抗人 HIF-1 α mAb (工作浓度 1:150, # ABIN188152) 与 VEGF mAb(工作浓度 1:100, # A-BIN190121) 和免疫组织化学染色采用 SABC 法试剂盒均购自上海生工生物技术有限公司。HIF-1 α 表达阳性判断标准按 Zhong 等^[6]的报道。HIF-1 α 表

达于乳腺癌细胞核,呈棕黄色颗粒状。(-):无染色或<1% 的细胞核染色;(+):1%~10% 的细胞核染色,或较弱的胞浆染色;(++):10%~50% 的细胞核染色,或明显的胞质染色;(+++):>50% 的细胞核染色,或较强的胞浆染色。(-)为阴性;(+)~(+++)为阳性。VEGF 表达阳性判断标准按 Volm 等^[7]的评判标准。选染色均匀的癌间质区,在 400 倍视野下,以着色细胞占视野细胞总数的多少分为 0~3 级。0 级:0;1 级:<25%;2 级:26%~50%;3 级:>50%。0 级为阴性,1 级以上为阳性。

1.3 统计学处理

所有数据用 SPSS13.0 处理,计数资料采用 χ^2 检验。进行 Spearman 相关分析,Kaplan-Meier 生存曲线,Log-Rank 法进行两组间生存率比较的显著性检验,Cox 回归模型进行生存分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 与 VEGF 蛋白的表达及其与原发性乳腺癌临床病理学参数的关系

原发性乳腺癌组织的免疫组织化学染色结果显示,癌细胞的细胞质中见 VEGF 蛋白的阳性表达,均呈弥漫分布的强弱不等的棕黄色颗粒,癌细胞的细胞核中有 HIF-1 α 蛋白的阳性表达。乳腺癌组织中 HIF-1 α 蛋白与 VEGF 蛋白的阳性表达率分别为 69.32% (61/88) 和 78.40% (69/88),而正常乳腺组织中的阳性表达率则分别为 5% (1/20) 和 10% (2/20)。HIF-1 α 蛋白与 VEGF 蛋白的阳性表达有着显著正相关($r=0.68,P=0.006$)。

表 1 HIF-1 α 表达与原发性乳腺癌临床病理参数的关系(例,%)			
临床病理参数	<i>n</i>	阴性表达	阳性表达
淋巴结转移			
有	57	12(21.05)	45(78.95)
无	31	15(48.39)	16(51.61) ^a
雌激素受体(ER)			
ER(+)	50	7(14.00)	43(86.00)
ER(-)	38	20(52.32)	18(47.68) ^b
孕激素受体(PR)			
PR(+)	54	18(33.33)	36(66.67)
PR(-)	34	9(26.47)	25(73.53)
CerbB-2 基因			
CerbB(+)	52	17(32.69)	35(67.31)
CerbB(-)	36	10(27.78)	26(72.22)

与淋巴结转移组相比,a; $P<0.05$;与 ER(+)组相比,b; $P<0.01$

在原发性乳腺癌组织中 HIF-1 α 与 VEGF 蛋白的表达情况与患者临床病理参数之间的关系分别见表 1、表 2。统计学分析表明, HIF-1 α 与 VEGF 蛋白的表达与患者年龄、性别、大小及肿瘤发生部位均无相关性(均 $P > 0.05$); 雌激素受体阴性及未转移的组织中 HIF-1 α 与 VEGF 蛋白的阳性表达率均明显低于雌激素受体阳性及有淋巴结转移的癌组织; 二者在孕激素受体阴性组与孕激素受体阳性组的差异不显著(均 $P > 0.05$); 二者与乳腺癌的相关基因 CerbB-2 表达也无关(均 $P > 0.05$)。

表 2 VEGF 表达与原发性乳腺癌临床病理参数的关系(例, %)

临床病理参数	<i>n</i>	阴性表达	阳性表达
淋巴结转移			
有	57	6(10.53)	51(89.47)
无	31	13(41.94)	18(58.06) ^b
雌激素受体(ER)			
ER(+)	50	5(10.00)	45(90.00)
ER(-)	38	14(36.84)	24(63.16) ^a
孕激素受体(PR)			
PR(+)	54	13(24.07)	41(75.93)
PR(-)	34	6(17.65)	28(82.35)
CerbB-2 基因			
CerbB(+)	52	11(21.15)	41(78.85)
CerbB(-)	36	8(22.22)	28(77.78)

与 ER(+) 组相比, a: $P < 0.05$; 与淋巴结转移组相比, b: $P < 0.01$

2.2 HIF-1 α 、VEGF 表达与乳腺癌放疗疗效及预后关系

61 例阳性表达患者(b)的生存时间(Cum survival)明显短于 27 例 HIF-1 α 阴性表达患者(a) ($P = 0.008$, 图 1); 19 例阴性 VEGF 患者(a)比 69 例阳性 VEGF 患者(b)的生存时间明显延长($P = 0.006$, 图 2)。HIF-1 α 阳性表达的患者中, 放疗后局部未控率及 VEGF 表达强度均高于 HIF-1 α 阴性组($P = 0.01$); 其中 16 例 VEGF 阴性表达患者(a)的生存时间明显长于 42 例 VEGF 阳性表达患者(b)的生存时间($P = 0.01$, 图 3)。

3 讨 论

多数实体肿瘤中均存在缺氧的微环境, 是瘤组织不同于正常组织的较为特异的改变。肿瘤的缺氧状态可诱导一系列促血管生成的多种细胞因子释放, 由此增进肿瘤的生长及转移, 是肿瘤为耐受缺氧作出的自身调节和适应。HIF-1 是对肿瘤缺氧直接

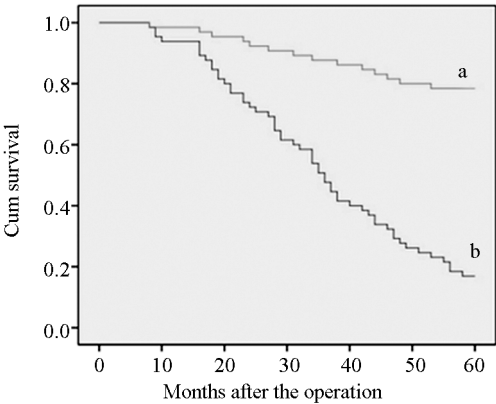


图 1 HIF-1 α 表达与患者的生存率曲线

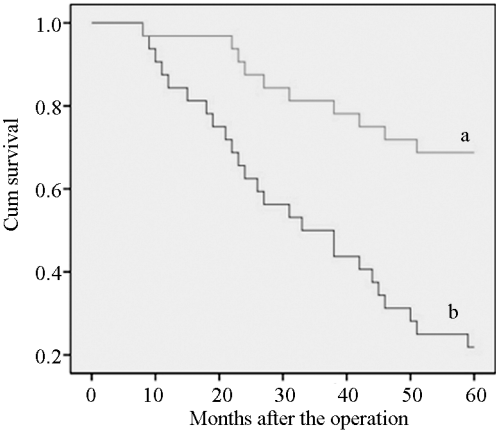


图 2 VEGF 表达与患者的生存率曲线

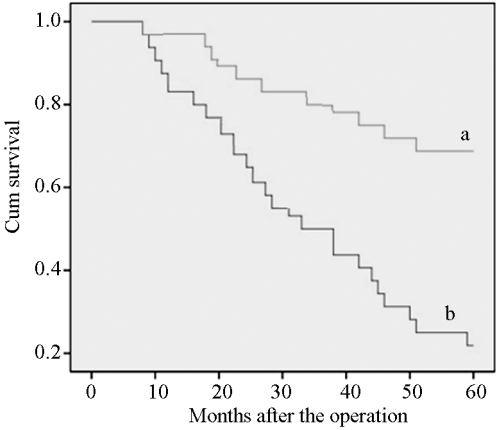


图 3 HIF1- α 阳性表达组中不同 VEGF 患者的生存率曲线

作出反应的一个关键性蛋白质, 在缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种异源二聚体核转录因子。它由 α 和 β 两个亚单位构成, 其中 HIF-1 α 是唯一的氧调节亚单位, 决定 HIF-1 的活性^[8]。缺氧条件下, 细胞核产生 HIF-1 与靶基因上的 HIF-1

结合位点结合,启动和促进靶基因的转录。靶基因转录启动后,相应的蛋白质产物增加,这些产物在肿瘤细胞适应缺氧、能量代谢、调节血管内皮生长因子(VEGF)的表达,促进肿瘤新生血管形成和转移、放疗抗性和化疗耐药起重要作用^[9]。VEGF 是多功能性的分子,在生理及病理条件下均发挥重要功能,是肿瘤诱导产生的新生血管的最主要的细胞因子之一^[10]。VEGF 基因的表达受许多因素的调控和影响,其中最主要的缺血缺氧可上调 VEGF 的表达水平。目前认为 HIF-1 α 在缺氧诱导的 VEGF 基因表达上调中发挥关键作用^[11]。

本研究显示乳腺癌组织中 HIF-1 α 阳性率为 69.32%,并与淋巴结转移、雌激素受体阳性和 VEGF 表达显著相关,表明 HIF-1 α 与乳腺癌血管生成、浸润转移有关。VEGF 阳性率为 78.40%,其表达与淋巴结转移、雌激素受体阳性有关。Cox 模型多因素分析表明,HIF-1 α 与 VEGF 可作为独立的预后因素。其机制可能是随着肿瘤的不断生长,体积增大,血供不足,诱导 HIF-1 α 的表达,而 HIF-1 α 则通过其转录活性影响其下游基因。它的下游基因有参与糖代谢的各种酶如磷酸果糖酶、丙酮酸激酶、烯醇化酶等,各种生长因子如血管内皮生成因子、胰岛素样生长因子,还有促红细胞生成素、一氧化氮合酶等。另有研究认为,HIF-1 α 能通过诱导抗凋亡蛋白 IAP-2 的表达以及促凋亡蛋白 Bax 的抑制而抑制肿瘤细胞凋亡^[12]。国内外最新研究报道,HIF-1 α 和 VEGF 高表达的乳腺癌病人预后不良^[13-14],我们的研究结果也说明二者表达阳性的病人生存大大降低。

综上所述,HIF-1 α 与 VEGF 蛋白高表达于原发性乳腺癌组织,与肿瘤的转移有关,同时,其表达受雌激素调控,且二者的阳性表达与乳腺癌放射抗拒性有密切关系。

参考文献:

- [1] 郑飞,姜达. 乳腺癌内分泌治疗研究进展[J]. 肿瘤基础与临床,2012,25(1):84-88.
- [2] Northington L, Martin T, Walker JT, et al. Integrated community education model: breast health awareness to impact late-stage breast cancer [J]. Clin J Oncol Nurs, 2011,15(4): 387-392.
- [3] Campos SM, Guastalla JP, Subar M, et al. A comparative study of exemestane versus anastrozole in patients with postmenopausal breast cancer with visceral metastases[J]. Clin Breast Cancer,2009,9(1):39-44.
- [4] Kim HO, Jo YH, Lee J, et al. The C1772T genetic polymorphism in human HIF-1 α gene associates with expression of HIF-1 α protein in breast cancer[J]. Oncol Rep,2008,20(5):1181-1187.
- [5] 许文伟,付俊武,阚文宏. 缺氧诱导因子-1 α 对肿瘤调控机制的研究进展[J]. 广东医学,2011,32(22):3015-3017.
- [6] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases[J]. Cancer Res, 1999, 59(22):5830-5835.
- [7] Volm M, Koomagi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer[J]. Int J Cancer, 1997, 74(1):64-68.
- [8] van der Groep P, Bouter A, Menko FH, et al. High frequency of HIF-1 α overexpression in BRCA1 related breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 111(3):475-480.
- [9] Kim EA, Gershtein ES, Vysotskaya IV, et al. Expression of VEGF and VEGFR2 in tumors during neoadjuvant therapy of patients with breast cancer[J]. Bull Exp Biol Med,2008,145(2):245-248.
- [10] Ge YL, Zhang X, Zhang JY, et al. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells[J]. Int Immunopharmacol,2009,9(4):389-395.
- [11] Cayre A, Rossignol F, Clottes E, et al. aHIF but not HIF-1 α transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res,2003,5(6):R223-R230.
- [12] Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, et al. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 α expression in invasive breast cancer[J]. J Clin Pathol,2005,58(2):172-177.
- [13] Kaya AO, Gunel N, Benekli M, et al. Hypoxia inducible factor-1 α and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients[J]. J BUON,2012,17(4):663-668.
- [14] Wang J, Guo Y, Wang B, et al. Lymphatic microvessel density and vascular endothelial growth factor-C and -D as prognostic factors in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature[J]. Mol Biol Rep,2012,39(12):11153-11165.

(此文编辑:秦旭平)