

· 论著 ·

血管内皮生长因子及色素上皮衍生因子在乳腺癌中的表达及临床意义

周丹 张敏 许鹏程 于洋 张琳 唐廷勇 吴爱国

【摘要】 目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)、色素上皮衍生因子(PEDF)在乳腺癌组织中的表达水平及其与乳腺癌病理特征的关系。**方法** 采用 Envision 免疫组织化学方法对 20 例乳腺良性病变组织(纤维腺瘤)、85 例乳腺浸润性导管癌组织中的 VEGF、PEDF 和 CD34 表达情况进行检测。CD34 表达反映微血管密度(MVD)。计数资料采用 χ^2 检验, Spearman 等级相关分析方法进行相关性分析。**结果** VEGF 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 71.7% (61/85), 高于在乳腺良性组织中的阳性表达率 40% (8/20), 差异有统计学意义($\chi^2=9.959, P=0.002$); PEDF 在乳腺癌组织中的阳性表达率为 41.2% (35/85), 低于在乳腺良性组织中的阳性表达率 90% (18/20), 差异有统计学意义($\chi^2=19.683, P=0.000$)。在乳腺癌组织中 VEGF 与 PEDF 表达呈负相关($r=-0.365, P=0.019$)。乳腺癌组织中 VEGF 表达与肿瘤直径($\chi^2=26.31, P=0.000$)、TNM 分期($\chi^2=5.428, P=0.020$)、淋巴结转移有关($\chi^2=5.368, P=0.021$); PEDF 表达与 TNM 分期($\chi^2=8.584, P=0.003$)、肿瘤直径($\chi^2=11.079, P=0.001$)、绝经状态($\chi^2=4.507, P=0.034$)、ER 状态有关($\chi^2=3.974, P=0.046$)。MVD 值在 PEDF 阴性组高于阳性组(38.67 ± 6.52 比 $22.56\pm5.16, Z=-0.984, P=0.000$), 在 VEGF 阳性组则高于阴性组(38.78 ± 6.28 比 $25.36\pm5.12, Z=-0.972, P=0.000$)。**结论** 乳腺癌组织中存在 PEDF、VEGF 的表达相关性, 且与 MVD 相关, 对认识乳腺癌的生物学特性以及指导乳腺癌的诊疗具有重要意义。

【关键词】 乳腺肿瘤; 血管内皮生长因子; 色素上皮衍生因子; 微血管密度

【中图分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Expressions of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in breast cancer and their clinical significance Zhou Dan, Zhang Min, Xu Pengcheng, Yu Yang, Zhang Lin, Tang Tingyong, Wu Aiguo. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510582, China

Corresponding author: Wu Aiguo, Email: waglyz@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) in breast cancer tissue, and their relationship with the clinicopathological characteristics of breast cancer patients. **Methods** The expressions of VEGF, PEDF and CD34 were detected in 20 cases of benign breast diseases (fibroadenoma) and 85 cases of invasive ductal carcinoma by Envision immunohistochemical method. CD34 expression reflected microvessel density (MVD). The numeration data were analyzed by Chi-square test, and Spearman rank test was used for correlation analysis. **Results** The positive expression rate of VEGF was 71.7% (61/85) in breast cancer tissue, significantly higher than 40% (8/20) in breast benign tissue ($\chi^2=9.959, P=0.002$); The positive expression rate of PEDF was 41.2% (35/85) in breast cancer tissue, significantly lower than 90% (18/20) in breast benign tissue ($\chi^2=19.683, P=0.000$); VEGF expression was negatively correlated with PEDF expression

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.04.005

基金项目: 佛山市卫生局医学科研立项课题(2014197)

作者单位: 510282 广州, 南方医科大学珠江医院普通外科(周丹, 吴爱国); 528100 佛山, 中山大学附属佛山医院, 佛山市第一人民医院乳腺外科(周丹); 510515 广州, 南方医科大学基础医学院组胚教研室(张敏, 许鹏程, 于洋, 张琳); 510282 佛山, 广东医学院附属三水医院普通外科(唐廷勇)

通信作者: 吴爱国, Email: waglyz@sina.com

($r = -0.365$, $P = 0.019$). In invasive ductal carcinoma, the expression of VEGF was significantly related with tumor diameter ($\chi^2 = 26.31$, $P = 0.000$), TNM stage ($\chi^2 = 5.428$, $P = 0.020$), and lymphatic metastasis ($\chi^2 = 5.368$, $P = 0.021$); the expression of PEDF was significantly related with tumor diameter ($\chi^2 = 11.079$, $P = 0.001$), TNM stage ($\chi^2 = 8.584$, $P = 0.003$), menstruation status ($\chi^2 = 4.507$, $P = 0.034$), and ER status ($\chi^2 = 3.974$, $P = 0.046$). The MVD value in PEDF negative was higher than that in PEDF positive group (38.67 ± 6.52 vs 22.56 ± 5.16 , $Z = -0.984$, $P = 0.000$); The MVD value in VEGF positive was higher than that in VEGF negative group (38.78 ± 6.28 vs 25.36 ± 5.12 , $Z = -0.972$, $P = 0.000$). **Conclusion** There is a correlation between PEDF and VEGF expression in breast cancer tissue, and the expressions of the two factors are also related to MVD, which may provide reference to the physicians in recognizing the biological characteristics of breast cancer and guiding the diagnosis and treatment of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; Vascular endothelial growth factor; Pigment epithelium-derived factor; Microvessel density

乳腺癌是女性最常见的一种恶性肿瘤,也是导致女性死亡的主要原因之一^[1]。其形成和转移与其他恶性肿瘤一样是多基因、多因子共同作用的结果。血管新生与实体瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关,已成为肿瘤治疗的新靶点之一^[2]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所知的最重要的促血管生成因子,为抗肿瘤血管形成治疗最为成熟的靶分子;色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是近年来发现的能有效抑制新生血管形成的因子。既往研究也显示肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)与多种恶性肿瘤的侵袭性密切相关。针对以上情况,本研究采用免疫组织化学法检测 VEGF、PEDF 以及 CD34 在乳腺癌中的表达水平,探讨其与临床病理因素的关系及它们之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

选取广东医学院附属三水医院病理科 2005 年 1 月至 2006 年 12 月间 85 例浸润性乳腺癌存档组织蜡块,患者均为女性,平均年龄为 (51.8 ± 2.0) 岁,所有病例术前均未进行过放射治疗和化疗,术后均经病理证实为浸润性导管癌,而且均有完整的临床和病理资料。根据第七版美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)制定的乳腺癌病理学标准^[3]进行病理学分类和 TNM 分期,Ⅰ期 17 例,Ⅱ期 38 例,Ⅲ期 30 例。伴有淋巴结转移者 47 例(N_1 期 18 例、 N_2 期 23 例、 N_3 期 6 例),无淋巴结转移者 38 例。同期 20 例乳腺纤维腺瘤组织做对照组。

1.2 主要试剂

VEGF 兔抗人单克隆抗体、CD34 鼠抗人单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; PEDF 鼠抗人单克隆抗体购自美国 CHEMICON 公司;免疫组织化学试剂盒(EnVision™ detection kit)购自美国 DAKO 公司。

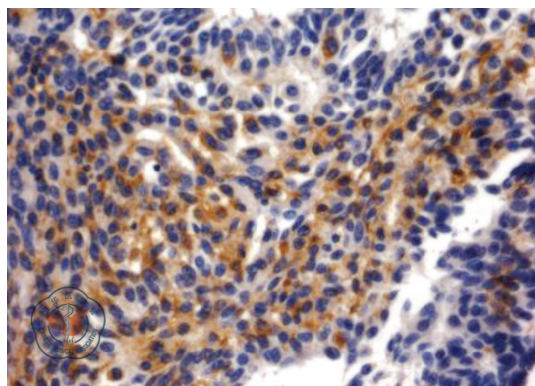
1.3 方法

乳腺癌组织石蜡包埋,4 μm 连续切片,常规 HE 染色。切片脱蜡、复水、0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液进行抗原修复,10% H_2O_2 灭活内源性过氧化氢酶,5% 牛血清蛋白封闭,孵育一抗(VEGF 兔抗人单克隆抗体、CD34 鼠抗人单克隆抗体和 PEDF 鼠抗人单克隆抗体),按照试剂盒要求用 Envision 法检测抗原表达。免疫组织化学检测按照试剂盒说明操作,设阳性对照及阴性对照。至少有 2 名有经验的病理医师独立观察切片。

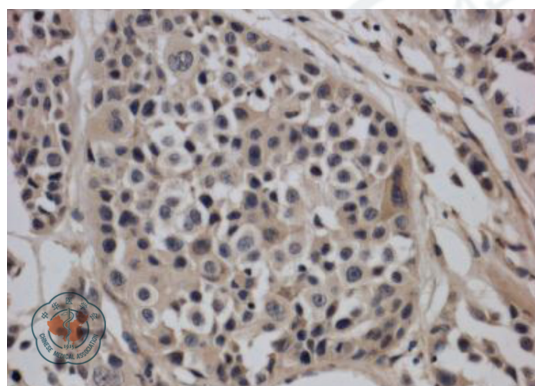
1.4 结果分析

VEGF 蛋白、PEDF 蛋白染色结果判定以细胞质、细胞膜内出现弥漫或散在分布的棕黄色颗粒的肿瘤细胞计数为阳性细胞^[4]。随机选择 10 个高倍视野,计数 1000 个肿瘤细胞,计算阳性细胞百分率。 $<10\%$ 为(-), $10\% \sim 50\%$ 为(+), $>50\%$ 为(++). 在分析时将(-)、(+)定义为低表达(阴性)、(++)定义为高表达(阳性)。VEGF 阳性着色位于乳腺癌细胞质中(图 1)。PEDF 阳性主要表达于乳腺癌细胞质和细胞膜中(图 2)。CD34 的表达判定阳性染色为棕黄色(图 3),参照 Weidner 等^[5]报道的方法,进行 MVD 计数:先在低倍镜($\times 100$)下全面观察切片,以确定肿瘤内血管密度最高处,再在高倍镜($\times 400$)下观察,与周围组织成分明显区别的内皮细胞或细胞丛作为一

个血管计数。记录 5 个视野内的微血管数,取其平均数作为该病例的 MVD 值。



着色位于细胞质中,呈棕黄色颗粒;VEGF:血管内皮生长因子
图 1 VEGF 在乳腺浸润性导管癌中的表达(×400)



着色位于细胞质和细胞膜中,呈棕黄色颗粒;PEDF:色素上皮衍生因子
图 2 PEDF 在乳腺浸润性导管癌中的表达(×400)

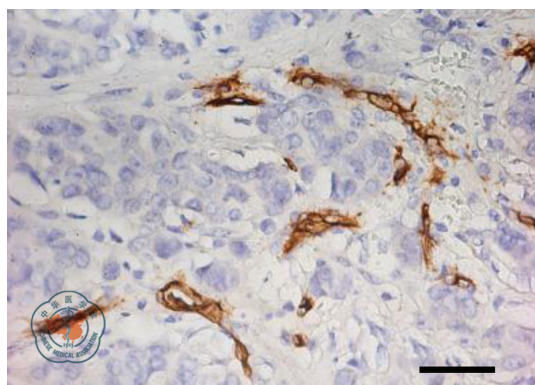


图 3 乳腺浸润性导管癌血管中 CD34 阳性内皮细胞表达(×400)

1.5 统计学分析

应用统计软件 SPSS 20.0 统计处理,离散型分类资料采用卡方检验,经正态性和方差齐性检验,MVD 方差齐且满足正态分布,采用 Spearman 相关系数分析乳腺癌组织中 PEDF 和 VEGF 表达

关系,对 PEDF、VEGF 与 MVD 关系进行组间比较,非相关性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF、PEDF 在乳腺癌及乳腺良性组织中的表达

VEGF 在乳腺良性组织中阳性表达 8 例(40%, 8/20)、乳腺癌组织中阳性表达 61 例(71.8%, 61/85),差异有统计学意义($\chi^2 = 9.959, P = 0.002$)。PEDF 在乳腺良性组织中阳性表达 18 例(90%, 18/20),乳腺癌组织中阳性表达 35 例(41.2%, 35/85),两者的差异有统计学意义($\chi^2 = 19.683, P = 0.000$)。

2.2 VEGF、PEDF 的表达与乳腺癌临床病理特征的关系及肿瘤 MVD 计数结果

VEGF 表达与乳腺癌肿瘤直径、临床 TNM 分期、淋巴结转移有关;PEDF 表达与临床 TNM 分期、肿瘤直径、绝经状态、ER 状态有关,具体统计数值见表 1。

2.3 VEGF、PEDF 在乳腺癌中表达的相关性

VEGF 和 PEDF 在乳腺癌组织中的阳性率分别为 71.8% (61/85)、41.20% (35/85)。Spearman 等级相关分析表明乳腺癌组中 PEDF 和 VEGF 的表达呈负相关($r = -0.272, P = 0.012$, 表 2)。

2.4 乳腺癌中 VEGF、PEDF 表达与 MVD 的关系

以 VEGF 和 PEDF 表达的阳性与阴性的判断标准,将组织标本分为阳性组与阴性组,比较两组间的 MVD 值,VEGF 阴性表达组的 MVD 明显低于阳性表达组($Z = -0.972, P = 0.000$);PEDF 阳性表达组的 MVD 明显低于阴性表达组($Z = -0.984, P = 0.000$)。

3 讨论

在肿瘤靶向治疗研究中,抗血管生成治疗是近 10 年来一个研究热点^[6]。血管新生由血管增殖刺激因子和抑制因子共同平衡调控,在肿瘤生长和转移机制中发挥了重要的作用。近年来的研究发现,对许多人类实体瘤细胞使用 VEGF 靶向治疗和加入外源性 PEDF 有可能抑制肿瘤血管生成,延长患者生存期^[4]。

VEGF 是目前公认的作用最强、特异性最高的促血管生成因子之一,它高效作用于血管内皮

表 1 乳腺癌患者的临床病理参数与 PEDF、VEGF 表达情况的关系

项目	例数	VEGF 表达		χ^2 值	P 值	PEDF 表达		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性			阳性	阴性		
年龄				1.425	0.233			0.762	0.382
≥60 岁	17	6(35.3)	11(64.7)			6(35.3)	11(64.74)		
<60 岁	68	35(51.5)	33(48.5)			32(47.0)	36(53.0)		
肿瘤直径				26.31	0.000			11.079	0.001
<2 cm	31	12(38.7)	19(61.3)			18(58.0)	13(41.9)		
≥2 cm	54	49(90.7)	5(9.25)			12(22.2)	42(77.8)		
TNM 分期				5.428	0.020			8.584	0.003
I + II 期	55	30(54.5)	25(45.5)			29(52.7)	26(47.3)		
III 期	30	24(80.0)	6(20.0)			6(20.0)	24(80.0)		
淋巴结转移				5.368	0.021			0.082	0.774
有	47	36(76.6)	11(23.4)			20(42.6)	27(57.4)		
无	38	20(65.8)	18(47.4)			15(39.5)	23(60.5)		
组织学分级				0.071	0.790			0.389	0.533
I + II 级	55	40(72.7)	15(27.3)			24(43.6)	31(56.4)		
III 级	30	21(70.0)	9(30.0)			11(36.7)	19(63.3)		
绝经状态				0.005	0.946			4.507	0.034
绝经前	46	38(82.6)	8(17.4)			17(37.0)	29(63.0)		
绝经后	39	32(82.1)	7(17.9)			18(46.2)	11(53.8)		
ER				1.313	0.252			3.974	0.046
阳性	52	35(67.3)	17(32.7)			32(61.5)	20(38.5)		
阴性	33	26(78.8)	7(21.2)			13(39.4)	20(60.6)		

表 2 乳腺癌组织中 PEDF 与 VEGF 表达相关性

VEGF	PEDF		合计
	+	-	
+	20	41	61
-	15	9	24
合计	35	50	85

VEGF: 血管内皮生长因子; PEDF: 色素上皮衍生因子; $r = -0.365, P = 0.019$

细胞,有强烈的促分裂和趋化作用,能特异性刺激内皮细胞增殖,还具有血管通透性作用,是刺激肿瘤血管生长最关键的生长因子^[7]。研究显示,VEGF 可在多种人的实体性肿瘤中呈阳性表达,并与肿瘤的恶性程度及进展相关^[8-9]。本研究发现乳腺癌组织中 VEGF 的阳性表达率明显高于乳腺纤维腺瘤组织,而且乳腺癌组织中 VEGF 表达水平分别与肿瘤直径、TNM 分期、淋巴结转移情况有关。其作用机制可能是 VEGF 促进肿瘤血管生成使肿瘤组织血管数目增多,血管通透性增加,血管内物质渗出增多,使肿瘤细胞得到更多的氧

和营养物质,增生加快。肿瘤血管的大量形成也增加了肿瘤细胞进入循环系统发生转移的可能性,新生血管对肿瘤细胞的通透性较大,从而有利于转移的发生^[10]。

Bard 等^[11]报道在 55% 的乳腺癌细胞系中可检测到 PEDF 表达,但均维持在较低水平。Cai 等^[12]运用 PCR 及免疫组织化学技术检测 PEDF 蛋白表达,同样发现 PEDF 蛋白表达与疾病类型、ER 表达、淋巴结转移密切相关。MVD 先前被用于定量估计浸润性乳腺癌组织肿瘤血管发生并且独立评估肿瘤预后^[13]。然而,乳腺癌组织中 PEDF 表达和 MVD 之间的相关性鲜见相关报道和研究。本研究发现, PEDF 阳性表达组的 MVD 明显低于阴性表达组;且 PEDF 表达与肿瘤直径、临床分期有关,临床分期越晚, PEDF 表达率越低;雌激素阴性组、绝经前患者 PEDF 表达率亦明显降低。研究结果与 Zhou 等^[14]的报道相一致,肿瘤血管新生的程度是决定肿瘤潜在生长的关键因素,并提示 PEDF 蛋白的表达与 MVD 和疾病预后

明显相关。

研究表明恶性肿瘤中存在 VEGF 受体的高表达和 VEGF 的自分泌机制,即 VEGF 直接作用于肿瘤细胞表面的受体,刺激细胞增殖^[15]。而高水平的 PEDF 能够从许多方面抑制癌转移,如抑制血管生成,抑制肿瘤细胞增殖,增加肿瘤细胞凋亡,减少肿瘤细胞迁移和侵袭等。PEDF 为 VEGF 促血管生成的抑制因子,通过受体 VEGFR-1 通路来抑制 VEGF 血管生成作用^[16]。本研究也观察到乳腺癌组织中 VEGF 阳性表达者 MVD 显著增高,这提示乳腺癌的发生发展与新生血管密切相关,降低 VEGF 表达可能有减少乳腺癌血管生成的作用。笔者推测可能是由于 VEGF 通过一系列复杂的机制诱导血管的形成,为肿瘤的生长提供充足的营养,从而促进肿瘤体积增大,但详细机制目前尚不十分清楚,有待进一步研究。Volpert 等^[17]研究表明 PEDF 通过 Fas/FasL 死亡通路引起内皮细胞凋亡,而且减少了 VEGF 的表达。PEDF 已显示了其有能力在 VEGF、成纤维细胞生长因子 1 (FGF-1)、FGF-2、IL-8 存在的环境中抑制内皮细胞迁移^[18],以上理论部分解释了本研究结果,PEDF 表达率降低,导致肿瘤分期晚,同时 PEDF 与 VEGF 的表达呈负相关。

因此联合检测这两种蛋白的表达情况,对于判断乳腺癌患者的预后以及指导治疗等均有一定的临床意义,而两者之间相互作用的分子机制尚不明确,仍有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Jiménez B, Volpert OV. Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis [J]. J Mol Med, 2001, 78(12):663-672.
- [3] Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer; the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(6):1471-1474.
- [4] 郑民, 梁岳培, 王洋. 非小细胞肺癌组织中 VEGF、PEDF 的表达变化及意义[J]. 山东医学, 2011, 51(18):53-54.
- [5] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1):9-19.
- [6] Abdelhaleem M. Frequent but nonrandom expression of lymphoid markers on de novo childhood acute myeloid leukemia [J]. Exp Mol Pathol, 2007, 83(2):259-263.
- [7] Thurston G, Kitajewski J. VEGF and Delta-Notch; interacting signaling pathways in tumour angiogenesis [J]. Br J Cancer, 2008, 99(8):1204-1209.
- [8] Masago K, Fujita S, Kim YH, et al. Effect of vascular endothelial growth factor polymorphisms on survival in advanced-stage non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Sci, 2009, 100(10):1917-1922.
- [9] Ganggaiswari A, Kresno SB, Krisnuhoni E. VEGF expression and desmoplastic reaction as potential progressive factors in young patients with colorectal cancer [J]. Acta Med Indones, 2010, 42(1):6-11.
- [10] El-Sissy AH, El-Mashari MA, Bassuni WY, et al. Aberrant lymphoid antigen expression in acute myeloid leukemia in Saudi Arabia [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2006, 18(3):244-249.
- [11] Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(1):114-121.
- [12] Cai J, Jiang WG, Grant M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of VEGFR1 [J]. J Biol Chem, 2006, 281(6):3604-3613.
- [13] Offerken BV, Borre M, Overgaard J. Quantification of angiogenesis as a prognostic marker in human carcinomas: a critical evaluation of histopathological methods for estimation of vascular density [J]. Eur J Cancer, 2003, 39(7):881-890.
- [14] Zhou D, Cheng SQ, Ji HF, et al. Evaluation of protein pigment epithelium-derived factor (PEDF) and microvessel density (MVD) as prognostic indicators in breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(11):1719-1727.
- [15] Wu W, Shu X, Hovsepyan H, et al. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors [J]. Oncogene, 2003, 22(22):3361-3364.
- [16] Zhang Y, Han J, Yang X, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis and growth of gastric carcinoma by down-regulation of VEGF [J]. Oncol Rep, 2011, 26(3):681-686.
- [17] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor[J]. Nat Med, 2002, 8(4):349-357.
- [18] Aparicio S, Sawant S, Lara N, et al. Expression of angiogenesis factors in human umbilical vein endothelial cells and their regulation by PEDF [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 26(2):387-394.

(收稿日期:2014-03-17)

(本文编辑:刘军兰)

周丹,张敏,许鹏程,等. 血管内皮生长因子及色素上皮衍生因子在乳腺癌中的表达及临床意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2014,8(4):248-252.