

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.010

HIF-1 α 、MMP-9、MVD 在肾细胞癌中的表达及临床意义

李培勇, 辛 军, 伍佰聪, 辛明华, 吴文峰

(福建医科大学附属泉州第一医院泌尿外科, 泉州 362000)

【摘要】目的:探讨缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)在肾癌中的表达及其与微血管密度(microvessel density, MVD)和肿瘤进展的关系。**方法:**应用免疫组织化学法检测 60 例肾癌组织和 20 例癌旁正常肾组织中 HIF-1 α 和 MMP-9 的表达及其血管生成情况, 并分析三者与各临床病理参数之间的关系。**结果:**HIF-1 α 在肾癌组织和癌旁正常组织中的表达率分别为 58.33%, 0%; MMP-9 在肾癌组织和癌旁正常组织中的表达率分别为 63.33%, 20%; 肾癌组织和癌旁正常组织中 MVD 均值分别为 (37.93 ± 11.94) 条/HP, (22.30 ± 7.89) 条/HP, HIF-1 α 、MMP-9 及 MVD 在肾癌中的表达与癌旁正常组织中的表达分别比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 并且与病理分期和淋巴结转移具有相关性。**结论:**HIF-1 α 、MMP-9 和 MVD 在肾癌组织中呈持续高表达, HIF-1 α 和 MMP-9 参与肾癌新生血管的形成, 并与侵袭转移关系密切, 三者联合检测是判断肾癌侵袭转移有价值的指标。

【关键词】肾癌; 缺氧诱导因子-1 α ; 基质金属蛋白酶-9; 微血管密度; 血管形成; 转移

【中国图书分类法分类号】R737.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-04

Expressions of HIF-1 α , MMP-9 and MVD in renal carcinoma and their clinical significances

LI Peiyong, XIN Jun, WU Baicong, XIN Minghua, WU Wenfeng

(Department of Urology, the First Hospital in Quanzhou, Fujian Medical University)

【Abstract】Objective: To study the expressions of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in renal carcinoma tissues and to study their relationship with microvessel density (MVD) and tumor progression. **Methods:** Immunohistochemical staining was used to detect the expressions of HIF-1 α and MMP-9 as well as angiogenesis in 60 cases of renal carcinoma tissues and 10 cases of adjacent normal kidney tissues and the relationships between HIF-1 α , MMP-9, MVD and clinicopathological parameters were analyzed. **Results:** Positive expression rates of HIF-1 α in renal carcinoma tissues and adjacent cancer tissues were 58.33% and 0% respectively; positive expression rates of MMP-9 in renal carcinoma tissues and adjacent cancer tissues were 63.33% and 20% respectively; mean values of MVD in renal carcinoma tissues and adjacent cancer tissues were (37.93 ± 11.94) strip/HP and (22.30 ± 7.89) strip/HP respectively. There were statistical significances in expressions of HIF-1 α , MMP-9, MVD between renal carcinoma tissues and adjacent cancer tissues ($P < 0.05$) and they were correlated with pathology classification and lymph node metastasis. **Conclusions:** Increased expressions of HIF-1 α , MMP-9, MVD are found in renal carcinoma tissues. HIF-1 α and MMP-9 are involved in the angiogenesis of renal carcinoma and are correlated with cancer invasion and metastasis. Combined detection of HIF-1 α , MMP-9 and MVD can provide valuable index for judging invasion and metastasis of renal carcinoma.

【Key words】 renal carcinoma; hypoxia inducible factor-1 α ; matrix metalloproteinase-9; microvessel density; angiogenesis; metastasis

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是起源于肾实质集合小管上皮系统的恶性肿瘤,也是成人肾脏最常见的恶性肿瘤。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)是一种 DNA 结合蛋白,在缺氧环境中通过与下游多种缺氧靶基因结合

并调节其转录,使肿瘤组织血管生成增加及产生多种活性物质来维持癌细胞的能量代谢,为肿瘤细胞的增殖及侵袭、转移提供物质基础^[1]。基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)作为一类蛋白酶类,可通过降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和血管基底膜,并促进肿瘤新生血管的形成,在肿瘤的侵袭、转移中起着重要的作用^[2]。HIF-1 α 及 MMP-9 在其他恶性肿瘤中有较多研究,但

作者介绍:李培勇, Email: lipeiyong1@163.com,

研究方向:泌尿外科疾病的研究。

通信作者:辛 军, Email: xinjun0595@163.com。

是在泌尿系统肿瘤,特别是肾恶性肿瘤中研究的相对较少,本实验应用免疫组织化学技术检测肾癌中 HIF-1 α 和 MMP-9 的表达及微血管密度(microvessel density, MVD),并探讨 HIF-1 α 和 MMP-9 与肾癌血管生成及其侵袭、转移的关系及其临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 60 例来自福建医科大学附属泉州第一医院泌尿外科 2010 年 1 月至 2012 年 3 月手术切除后经病理检查确诊的肾癌石蜡包埋标本,其中男性 37 例,女性 23 例;年龄 13~81 岁,平均年龄(56.03 $\pm$ 15.52)岁。按 2009 年美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)肾癌临床分期标准(TNM)分为:Ⅰ期 19 例,Ⅱ期 16 例,Ⅲ期 18 例,Ⅳ期 7 例。按 Fuhrman 分级,Ⅰ级+Ⅱ级共 36 例,Ⅲ级 15 例,Ⅳ级 9 例。其中淋巴结转移 12 例,静脉瘤栓形成 22 例;所有病例都未合并或已排除其他疾病如肾结核、肾结石、肾感染性疾病、肾良性肿瘤、肾盂肿瘤、肾间叶肿瘤、后腹腔其他肿瘤等;并且所有患者术前均未经放疗、化疗、免疫治疗或靶向治疗。在 60 例肾癌标本中随机选取 20 例标本进行切片获取癌旁正常肾组织(经资深病理科医生看片确定)进行免疫组化实验作为对照组。

1.2 主要试剂和方法

HIF-1 α 、MMP-9 及 CD34 均为鼠抗人单克隆抗体,各试剂及免疫组化试剂盒均购自江苏希望生物有限公司。本实验采用免疫组化 SP 法,全部标本均用 10%甲醛固定,无水酒精脱水,常规石蜡包埋。每例连续切片 3 张,分别用于检测 HIF-1 α 、MMP-9 和 CD34,切片厚 4 μ m。方法均按照 SP 试剂盒说明书进行操作。每组切片均以同型抗体(江苏希望生物技术有限公司)代替一抗作阴性对照。

1.3 免疫组化染色结果判定

1.3.1 HIF-1 α 染色结果的判断标准 HIF-1 α 阳性表达主要位于细胞核,细胞质亦有少部分染色,见图 1、图 4;判断标准参照 Maxwell^[9]为:先按着色强度打分:无着色为 0 分,浅棕黄色的为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;然后在高倍镜下(400 $\times$)计算每张切片阳性细胞百分率,按阳性细胞所占百分比打分: $\leq$ 5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分, $\geq$ 51%为 3 分,以每个组织着色程度和染色细胞百分率得分相加的和为最后得分:0~1 分为阴性(-),2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.3.2 MMP-9 染色结果的判断标准 MMP-9 以胞质内出现棕黄色颗粒视为着色细胞,见图 2、图 5。判断标准同 1.3.1 的方法。

1.3.3 MVD 计数 采用 Weidener^[4]法:以被 CD34 染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇为 1 个血管标记,计数肿瘤内着色的毛细血管和微小血管,凡管腔大于 8 个红细胞的血管均不计数。先在低倍镜(100 $\times$)下浏览全体,选取 5 个微血管最密集的“热点”区域,再换高倍镜(400 $\times$)下计数,6 个不同区域计数微血管数量取平均值,见图 3、图 6。

1.4 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计。HIF-1 α 、MMP-9 在肾癌中的表达与癌旁正常组织中的表达比较及肾细胞癌各临床病理参数之间的关系采用 Mantel-Haenszel 卡方和计算 OR 值;MVD 在肾癌与癌旁正常组织中的表达比较及 HIF-1 α 、MMP-9 与 MVD 相关性检验用 t 检验;HIF-1 α 和 MMP-9 相关性检验用 Spearman 等级相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 、MMP-9 和 MVD 在肾癌中的表达情况

HIF-1 α 在肾癌组织和癌旁正常组织中的表达率分别为 58.33%,0.00%;MMP-9 在肾癌组织和癌旁正常组织中的表达率分别为 63.33%、20.00%;肾癌组织和癌旁正常组织中 MVD 均值分别为(37.93 $\pm$ 11.94)条/HP,(22.30 $\pm$ 7.89)条/HP;见表 1。HIF-1 α 、MMP-9 及 MVD 在肾癌中的表达与癌旁正常组织中的表达分别比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 HIF-1 α 、MMP-9 和 MVD 在肾癌中表达与肾癌临床病理参数间的关系

肾癌组织中 HIF-1 α 、MMP-9 和 MVD 的表达均与不同临床分期、病理分级及淋巴结转移密切相关($P<0.05$;OR 值 95%可信区间不包含 1;有统计学意义);与患者年龄、性别、肿瘤大小无关($P>0.05$;OR 值 95%可信区间包含 1;无统计学意义);见表 2。

2.3 HIF-1 α 、MMP-9 与 MVD 在肾癌组织中表达的相关性

35 例 HIF-1 α 阳性者的 MVD 值为 42.32 $\pm$ 10.08,25 例阴性者 MVD 值为 33.20 $\pm$ 12.77,阳性者的 MVD 值明显高于阴性者($t=3.066$, $P<0.05$);38 例 MMP-9 阳性者的 MVD 值为 41.41 $\pm$ 10.31,22 例阴性者为 32.38 $\pm$ 13.18,阳性者的 MVD 值明显高于阴性者($t=2.932$, $P<0.05$);表明 HIF-1 α 和 MMP-9 阳性表达与 MVD 均呈正相关。HIF-1 α 和 MMP-9 均表达阳性为 34 例,表达均阴性为 20 例,两者呈显著正相关($P<0.05$)。

表 1 HIF-1 α 和 MMP-9 在不同肾脏组织中的表达情况

Tab.1 Expressions of HIF-1 α and MMP-9 in different renal tissues

组织类型	例数(n)	HIF-1 α 表达情况			MMP-9 表达情况			MVD 表达 ($\bar{x} \pm s$)
		阴性	阳性	阳性率(%)	阴性	阳性	阳性率(%)	
肾癌组织	60	25	35	58.33	22	38	63.33	37.93 $\pm$ 11.94
癌旁正常组织	20	20	0	0.00	16	4	20.00	22.30 $\pm$ 7.89

注: HIF-1 α 在肾癌和癌旁正常组织中表达比较, $\chi^2=21.893$, $P<0.05$;MMP-9 在肾癌和癌旁正常组织中表达比较, $\chi^2=11.829$, $P<0.05$;MVD 在肾癌和癌旁正常组织中表达比较, $t=5.454$, $P<0.05$

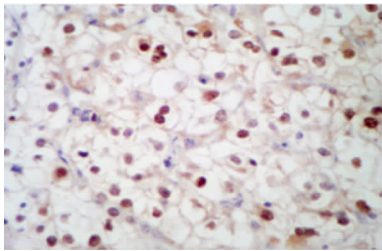


图 1 HIF-1α 在肾癌中的表达 (400 ×)
Fig.1 Expressions of HIF-1α in renal carcinoma (400 ×)

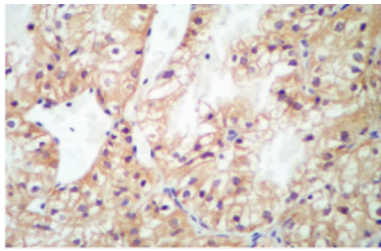


图 2 MMP-9 在肾癌中的表达 (400 ×)
Fig.2 Expressions of MMP-9 in renal carcinoma (400 ×)

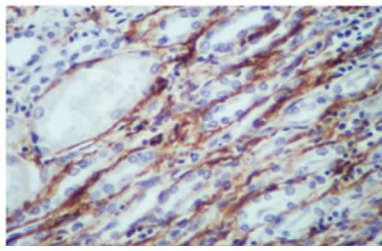


图 3 CD34 在肾癌中表达 (400 ×)
Fig.3 Expressions of CD34 in renal carcinoma (400 ×)

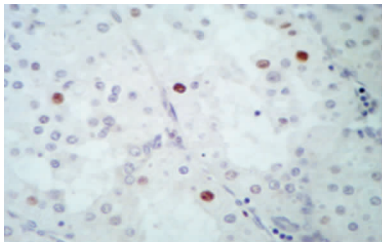


图 4 HIF-1α 在癌旁组织中的表达 (400 ×)
Fig.4 Expressions of HIF-1α in adjacent cancer tissues (400 ×)

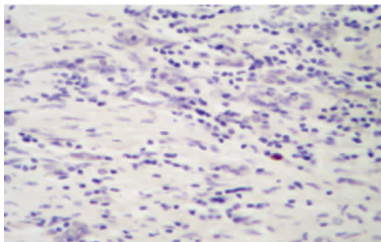


图 5 MMP-9 在癌旁组织中的表达 (400 ×)
Fig.5 Expressions of MMP-9 in adjacent cancer tissues (400 ×)

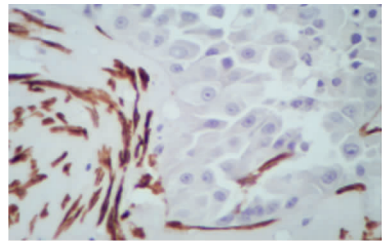


图 6 CD34 在癌旁组织中的表达 (400 ×)
Fig.6 Expressions of CD34 in adjacent cancer tissues (400 ×)

表 2 HIF-1α、MMP-9 及 MVD 在肾癌组织中表达与肾癌临床病理参数间的关系

Tab.2 Expressions of HIF-1α、MMP-9、MVD in renal carcinoma tissues and their relationship with renal carcinoma clinical parameters

临床病理参数	例数 (n)	HIF-1α 表达			MMP-9 表达			MVD 表达情况	
		阳性 (n , %)	P 值	OR 值	阳性 (n , %)	P 值	OR 值	($\bar{x} \pm s$)	P 值
性别									
男	37	21 (56.7)	0.965	0.844	23 (62.2)	0.971	0.876	39.22 ± 12.25	0.437
女	23	14 (60.8)			15 (65.2)			36.69 ± 11.93	
年龄 (岁)									
≥ 50	35	21 (60.0)	0.965	1.179	24 (68.6)	0.472	1.714	38.32 ± 11.37	0.954
< 50	25	14 (56.0)			14 (56.0)			38.12 ± 13.27	
肿瘤大 (cm)									
> 7	26	18 (69.2)	0.134	2.25	19 (73.1)	0.276	2.143	37.85 ± 12.27	0.820
≤ 7	34	17 (50.0)			19 (55.9)			38.58 ± 12.11	
Fuhrman 分级									
I + II	36	16 (44.4)	0.017 ^a	0.211	17 (47.2)	0.004 ^a	0.128	34.74 ± 10.68	0.017 ^a
III + IV	24	19 (79.2)			21 (87.5)			41.58 ± 10.78	
临床分期									
I + II	35	15 (42.9)	0.010 ^a	0.188	18 (51.4)	0.024 ^a	0.265	35.23 ± 12.56	0.010 ^a
III + IV	25	20 (80.0)			20 (80.0)			43.20 ± 9.51	
淋巴结转移									
阳性	12	11 (91.7)	0.008 ^a	11.00	11 (91.7)	0.021 ^a	8.556	48.58 ± 6.30	0.001 ^a
阴性	48	24 (50.0)			27 (56.2)			35.67 ± 11.83	

注: a, 各指标在肾癌各病理参数中的比较有统计学意义的结果, $P < 0.05$

3 讨 论

HIF-1α 是一种由 α 和 β 2 个亚单位构成的核转录因子, 具有多种生物活性, 可与下游的不同缺

氧反应基因上的 HIF-1α 结合位点结合, 影响其产物的合成, 在肿瘤血管生成、细胞能量代谢中起调控作用。Kevin 等^[5]研究表明, 在 RCC 癌中, HIF-1α 可增强下游靶基因 VEGF、葡萄糖载体 1 等的表达, 调节肿瘤血管的形成和细胞能量代谢。近些年来的

研究发现,HIF-1 α 在多种癌及癌前病变中表达明显上调,Zhong等^[6]研究的19种肿瘤中发现有13种肿瘤均存在HIF-1 α 不同程度的高表达,亦在某些癌前病变组织中表达增强,而在正常组织中未表达上调;并且发现HIF-1 α 与肿瘤病理分级、临床分期及有无淋巴结转移呈明显正相关。HIF-1 α 表达上调促进肿瘤新生血管生成,有利于肿瘤的转移和复发,国内李凡等^[7]研究膀胱移行细胞癌HIF-1 α 表达和肿瘤血管生成关系时发现HIF-1 α 在膀胱移行细胞癌中的表达明显上调并与肿瘤复发和VEGF、MVD表达呈正相关。本实验采用免疫组化SP方法检测肾癌中HIF-1 α 的表达,结果表明肾癌组织中HIF-1 α 的表达明显高于癌旁正常组织,两者差异有统计学意义;并且与临床分期、病理分级具有相关性,本实验结果与以上研究者研究结果相似。

肿瘤要向外侵袭转移必须要穿过由细胞间基质和基底膜组成的ECM。MMPs是一族具有降解血管基底膜和ECM的内肽酶,近年来研究发现MMP-9是降解ECM中IV型胶原蛋白的主要酶之一,可破坏ECM及其血管基底膜,并且可以促进肿瘤血管生成增加,肿瘤血管化增强,是血管发生启动系统中的主要成员之一。其次,MMP-9还可与细胞表面黏附分子结合,使肿瘤细胞更容易向外侵袭及转移。有研究发现MMP-9在水解ECM时会产生一些有活性的生物片段,对诱导肿瘤细胞的增殖和侵袭、转移具有一定作用^[8]。郭继华等^[9]研究发现MMP-9在膀胱癌中的表达上调,并且促进膀胱尿路上皮癌间质中血管的生成。本研究显示MMP-9在肾癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织,并随着临床分期及病理分级的增加而表达增强,特别是当出现肿瘤侵袭和转移时阳性表达显著增强,这也提示MMP-9参与肾癌的发生并在肾癌侵袭、转移过程中起着重要作用。

MVD是评价血管生成的金标准。恶性肿瘤生长及其转移都离不开肿瘤血管的生长,肿瘤新生血管的增加与肿瘤的生物行为有着密切的关系。文献^[10]报道MVD与RCC的侵袭、转移密切相关,是反映肾癌生物行为的指标之一。本实验研究发现,肾癌中生成的血管多位于肿瘤的周边及侵袭、转移活跃区域,这表明RCC在生长过程中产生了大量促血管生成因子,促进了肿瘤产生大量的新生血管。本研究表明肾癌的MVD值与肿瘤的临床分期和病理分级正相关。

综上所述,RCC是富含血管的实体肿瘤,新生

血管不仅可为肿瘤提供生长所需的物质基础,还可为肿瘤的侵袭、转移提供路径条件。本实验研究表明HIF-1 α 和MMP-9均可促进肿瘤血管的形成,使肿瘤细胞适应缺氧环境,有利于癌细胞的增殖,同时破坏ECM,两者相互协调促进肿瘤细胞的生长及其侵袭、转移。因此,联合检测HIF-1 α 和MMP-9及MVD对评估RCC恶性程度、转移及预后具有一定价值。

参 考 文 献

- [1] Nishi H, Nakada T, Kyo S, et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediate upregulation of telomerase(hTERT)[J]. *Mol cell Biol*, 2004, 24(13): 6076-6083.
- [2] Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(10): 737-744.
- [3] Maxwell P. HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney[J]. *Am Soc Nephro*, 2003, 14(11): 2712-2722.
- [4] Weidner N. New paradigm for vessel intravasation by tumor cells[J]. *Am J Pathol*, 2002, 60(6): 1937-1939.
- [5] Kevin J, John W, Adam J, et al. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10): 2957-2961.
- [6] Zhong H, DeMarzo A M, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in common human cancers and their metastases[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(22): 5830-5835.
- [7] 李凡, 杨为民, 叶章群. 膀胱癌中缺氧诱导因子-1 α 的表达和肿瘤血管生成的关系[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2007, 22(4): 283-286.
- [8] Li F, Yang W M, Ye Z Q. HIF-1 α expression correlates with angiogenesis in bladder cancer[J]. *Journal of Clinical Urology*, 2007, 22(4): 283-286.
- [9] Nelson A R, Fingleton B, Rothenberg M L, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, 18(5): 1135-1149.
- [10] 郭继华, 王惠荣, 王俊, 等. 膀胱移行细胞癌MMP-9表达与间质微血管密度、肿瘤转移的关系[J]. *中国癌症杂志*, 2004, 14(2): 116-118.
- [11] Guo J H, Wang H R, Wang J, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its correlation with tumor interstitial microvascular density and tumor metastasis in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *China Oncology*, 2004, 14(2): 116-118.
- [12] 南勋义, 贺大林, 党建功, 等. 肾癌组织中VEGF、VEGFR、MVD表达的临床意义[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2001, 22(5): 267-268.
- [13] Nan X Y, He D L, Dang J G, et al. VEGF, VEGFR and MVQ in renal cell carcinoma of different biological behavior[J]. *Chinese Journal of Urology*, 2001, 22(5): 267-268.

(责任编辑: 关蕴良)