

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI:10.11699/cyxb20130815

卵巢上皮性肿瘤 fibulin-5 表达与血管生成的关系研究

钟立, 孙彤

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨卵巢上皮性肿瘤抗衰老关键蛋白(fibulin-5)表达与血管生成的关系。**方法:**术前应用彩色多普勒超声检测卵巢肿瘤血流并计测阻力指数(resistance index, RI), 术后采用免疫组织化学 SP 法检测 89 例卵巢上皮性肿瘤组织 fibulin-5 及 CD34 蛋白表达情况, 并以 CD34 标记的血管内皮细胞计数肿瘤组织微血管密度(microvessel density, MVD), 结合临床病理参数分析卵巢癌 fibulin-5 表达与肿瘤生物学行为的关系, 并对 fibulin-5 表达、MVD 及 RI 进行相关性分析。**结果:**fibulin-5 阳性表达在良性、交界性、恶性卵巢上皮性肿瘤间比较差别有统计学意义($\chi^2=20.654, P=0.000$)。良性、交界性、恶性卵巢上皮性肿瘤 MVD 呈上升趋势, 且任两组间比较差别均有统计学意义($F=88.97, P=0.000$)。卵巢癌 RI 中位数显著低于良性卵巢上皮性肿瘤($\chi^2=12.200, P=0.002$), 且与 MVD 呈负相关($r_s=-0.676, P=0.000$)。卵巢癌 fibulin-5 阳性表达在不同临床分期间比较差别有统计学意义, 但在不同年龄、分化程度及病理类型间比较差别无统计学意义, 且 fibulin-5 阳性表达与 MVD 呈负相关($r_s=-0.650, P=0.000$), 与 RI 呈正相关($r_s=0.430, P=0.004$)。**结论:**fibulin-5 随卵巢上皮性肿瘤进展而表达降低且与肿瘤血管生成相关。

【关键词】卵巢肿瘤; 免疫组织化学; 微血管密度; 阻力指数

【中国图书分类法分类号】R711.75

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-11-26

Expressions of fibulin-5 and their relationship with angiogenesis in epithelial ovarian tumor

ZHONG Li, SUN Tong

(Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate expressions of fibulin-5 and their relationship with angiogenesis in epithelial ovarian tumor. **Methods:** Blood flow signals of ovarian tumor were detected preoperatively by color Doppler ultrasound and resistance index (RI) was used for analysis. Expressions of fibulin-5 and CD34 in 89 patients with epithelial ovarian tumor were assessed by immunohistochemical SP method after operation. Microvessel density (MVD) was counted with endothelial cells marked by CD34. Relationship between expressions of fibulin-5 and tumor biological behavior was analyzed by MVD combined with clinical pathological parameters. Correlation among fibulin-5, MVD and RI in epithelial ovarian carcinoma was analyzed. **Results:** There were significant differences in positive expression of fibulin-5 among benign, border and malignant epithelial ovarian tumors ($\chi^2=20.654, P=0.000$). MVD among benign, border and malignant tumors showed ascendant trend and there were significant differences between groups ($F=88.97, P=0.000$). Median of RI was significantly lower in ovarian carcinoma than in benign epithelial ovarian tumor ($\chi^2=12.200, P=0.002$) and it was negatively correlated with MVD ($r_s=-0.676, P=0.000$). There were statistical significances in positive expressions of fibulin-5 among different clinical stages in ovarian carcinoma, but there was no difference among different age, differentiation degrees and pathological types. Positive expressions of fibulin-5 in ovarian carcinomas were negatively correlated with MVD ($r_s=-0.650, P=0.000$) and were positively correlated with RI ($r_s=0.430, P=0.004$). **Conclusions:** Expression of fibulin-5 protein is reduced with the progression of epithelial ovarian tumor and it is correlated with the tumor angiogenesis.

【Key words】 ovarian tumor; immunohistochemistry; microvessel density; resistance index

卵巢癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一, 其发病隐匿, 多数患者确诊时已属晚期。尽管

近年来治疗技术不断改进, 卵巢癌患者 5 年生存率仍无明显提高。研究表明恶性肿瘤的发生发展与血管生成密切相关。抗衰老关键蛋白(fibulin-5)是细胞外基质蛋白(fibulin)家族中的最新成员, 其参与血管的生成和修复。本研究术前应用彩色多普勒血

作者介绍: 钟立, Email: zl563266388@sina.com,

研究方向: 妇产科超声影像。

通信作者: 孙彤, Email: suntg98@163.com。

流显像(color Doppler flow imaging,CDFI)检测卵巢肿瘤血流,术后采用免疫组织化学 SP 法检测卵巢上皮性肿瘤组织中 fibulin-5 和 CD34 蛋白的表达,探讨 fibulin-5 表达及其与肿瘤血管生成的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2011 年 3 月至 2012 年 3 月重庆医科大学附属第一医院妇科临床病理资料完整的卵巢上皮性肿瘤患者,术前均未接受放疗或化疗。其中恶性肿瘤 42 例,年龄 21~79 岁,平均 52 岁;病理类型:浆液性囊腺癌 25 例,黏液性囊腺癌 9 例,其他类型 8 例(子宫内膜样癌 6 例,透明细胞癌 2 例);临床分期:按国际妇产科联盟(1986 年)的分期标准,Ⅰ期 7 例,Ⅱ期 7 例,Ⅲ期 25 例,Ⅳ期 3 例;病理分化程度:高分化 9 例,中分化 14 例,低分化 19 例。交界性肿瘤 9 例,年龄 21~73 岁,平均 38 岁。良性肿瘤 38 例,年龄 18~75 岁,平均 43 岁。所有病例均经手术和病理证实。

1.2 主要试剂及仪器

鼠抗人 fibulin-5 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗人 CD34 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。超声检查采用美国 GE 公司 Voluson 730、E8 彩超仪。

1.3 研究方法

1.3.1 CDFI 全部患者术前 1 周内行超声检查,采用频率为 3.5~5.0 MHz 变频探头,二维超声多切面扫描盆腔,观察肿块位置、形态、大小、内部回声、有无腹水等情况。彩色多普勒观察肿块内部及周边血流分布情况,以脉冲多普勒获取稳定血流频谱,连续测量 3 个心动周期阻力指数(resistance index, RI),取平均值。每例患者均在病灶内多点取样,取最低 RI 值。

1.3.2 免疫组化检测 fibulin-5、CD34 蛋白的表达 常规石蜡切片,切片厚度 4 μm ,取连续切片直接贴于经多聚赖氨酸处理过的载玻片。参照试剂盒说明用相邻切片分别作 fibulin-5 和 CD34 免疫组化染色。fibulin-5 抗体工作液浓度为 1:100,CD34 抗体工作液浓度为 1:150,用已知阳性切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 免疫组化结果判定

1.4.1 以免疫反应得分(immuno-reactive score,IRS)法^[1-2]评定 fibulin-5 免疫组化阳性染色 高倍镜(200 $\times$)下随机选取

5 个视野,每个视野计数 200 个细胞,根据染色强度(staining intensity,SI)、阳性细胞数(percentage of positive cells,PP)和两者的乘积进行综合判断。SI:未着色记为 0 分;淡黄色记为 1 分;黄色记为 2 分;棕黄色记为 3 分。PP:未着色记为 0 分;1%~10%记为 1 分;11%~50%记为 2 分;51%~80%记为 3 分;81%~100%记为 4 分。IRS:0 分为阴性(-);1~4 分为弱阳性(+);5~8 分为阳性(++);9~12 分为强阳性(+++)。

1.4.2 以 CD34 标记的血管内皮细胞计数微血管密度(microvessel density,MVD) 参照文献[3]方法,凡染成棕褐色的单个内皮细胞或细胞团,不管是否形成管腔,只要与周围的血管、肿瘤细胞等有清楚界限,都计为 1 个微血管。有平滑肌壁和管腔直径大于 8 个红细胞直径的血管不纳入计数。每张切片高倍镜(200 $\times$)下计数 5 个微血管密集区,取其均值为该切片 MVD 值。

1.5 统计分析

所有数据均使用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。计量资料符合正态分布数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不符合正态分布数据采用中位数 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。组间均数比较采用单因素方差分析;等级资料采用 Kruskal-Wallis 检验;相关性分析采用 Spearman 相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 卵巢上皮性肿瘤组织 fibulin-5、CD34 蛋白的表达

fibulin-5 主要分布于细胞质,阳性染色为黄色或棕黄色(图 1A1~A3),fibulin-5 阳性表达在良性、交界性、恶性卵巢上皮性肿瘤间比较差别有统计学意义($\chi^2=20.654, P=0.000$)。89 例卵巢上皮性肿瘤均有 CD34 蛋白表达,阳性染色为棕褐色(图 1B1~B3),良性、交界性、恶性肿瘤 MVD 呈上升趋势,且任两组间比较差异均有统计学意义($F=88.97, P=0.000$)(表 1)。

2.2 卵巢上皮性肿瘤 CDFI 特点

89 例卵巢上皮性肿瘤患者中,有 9 例 CDFI 未检出血流信号,其中良性肿瘤 5 例,交界性肿瘤 2 例,恶性肿瘤 2 例。卵巢癌 RI 中位数(0.47)低于良性卵巢上皮性肿瘤(0.60),差别有统计学意义($\chi^2=12.200, P=0.002$)(表 1)。

2.3 卵巢癌 fibulin-5 表达、MVD 及 RI 与临床病理特征的关系

临床分期为Ⅰ、Ⅱ期的卵巢癌组织 fibulin-5 表达水平高于Ⅲ、Ⅳ期,而 fibulin-5 表达在不同年龄、分化程度及病理类

表 1 卵巢上皮性肿瘤 fibulin-5 表达、MVD 及 RI 比较

Tab.1 Comparison of expressions of fibulin-5, MVD and RI in epithelial ovarian tumor

组别	例数 (n)	fibulin-5 表达				χ^2 值	P 值	MVD($\bar{x}\pm s$)	F 值	P 值	RI[M(Q_1, Q_3)]	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++								
良性	38	12	6	14	6			18.94 $\pm$ 7.80			0.60(0.48,0.67)		
交界性	9	6	1	2	0	20.654	0.000	31.36 $\pm$ 8.45	88.97	0.000	0.48(0.20,0.54)	12.200	0.002
恶性	42	33	5	3	1			41.39 $\pm$ 7.05			0.47(0.42,0.56)		

型间比较差别无统计学意义。不同分期、分化程度的MVD比较差别有统计学意义;不同年龄、病理类型 MVD 比较差别无统计学意义。RI 中位数在肿瘤不同年龄、临床分期间比较差别无统计学意义,而在不同分化程度、病理类型间比较差异有统计学意义(表 2)。

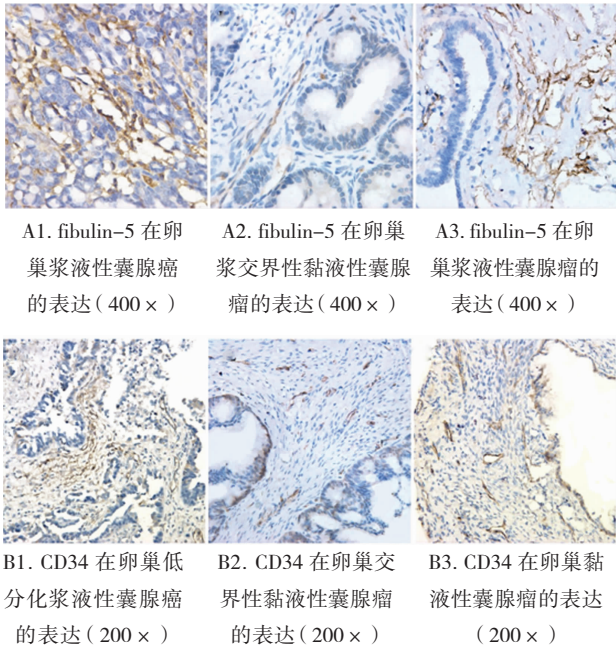


图 1 卵巢上皮性肿瘤 fibulin-5、CD34 的表达
Fig.1 Expressions of fibulin-5 and CD34 in epithelial ovarian tumors

2.4 卵巢癌组织 fibulin-5 表达与血管生成的关系

卵巢癌组织 fibulin-5 阳性表达与 MVD 呈负相关($r_s=-0.650, P=0.000$),与 RI 呈正相关($r_s=0.430, P=0.004$),MVD 与

RI 呈负相关($r_s=-0.676, P=0.000$)。

3 讨 论

卵巢癌是女性生殖系统常见的三大恶性肿瘤之一,死亡率居妇科恶性肿瘤之首。因其发病隐匿,多数患者确诊时已至晚期,随着肿瘤细胞减灭术及有效化疗方案的进展,仍有近 80%的患者复发或耐药,5 年生存率约 30%。如何早期诊断和治疗卵巢癌一直是妇科肿瘤研究的热点。

fibulin-5 能直接与原弹性蛋白结合,并将后者锚于细胞表面,这对形成最重要的细胞外基质——弹性纤维十分关键^[4-5]。研究表明在正常的人类心脏、卵巢和结肠等组织中有 fibulin-5 mRNA 的表达^[6],而在肾癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌等组织中 fibulin-5 的表达水平降低^[7-9]。本研究结果显示 fibulin-5 阳性表达在良性、交界性、恶性卵巢上皮性肿瘤间比较差别有统计学意义,且随着肿瘤临床分期的增加 fibulin-5 表达降低,而其表达与年龄、分化程度及病理类型无关。据此提示, fibulin-5 表达降低可能与卵巢上皮性肿瘤发生发展存在一定相关性。

已有较多研究表明恶性肿瘤的发生发展与其血管生成密切相关。肿瘤新生血管不仅为肿瘤生长提供营养和氧气,还可向机体输送肿瘤细胞,从而促进肿瘤的生长、侵袭和转移,抑制血管生成可导致肿瘤早期生长停滞^[10]。MVD 是目前衡量肿瘤新生

表 2 卵巢癌 fibulin-5 表达、MVD 及 RI 与临床病理特征的关系														
Tab.2 Relationship between expressions of fibulin-5,MVD,RI and clinical and pathological features of epithelial ovarian carcinoma														
病理特征	组别	例数 (n)	fibulin-5 的表达				χ^2 值	P 值	MVD ($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值	RI[M(Q ₁ ,Q ₃)]	χ^2 值	P 值
			-	+	++	+++								
年龄(岁)							0.150	0.699		0.28	0.600		0.351	0.553
	<50	20	15	4	0	1			42.00 ± 6.92			0.48 (0.41,0.52)		
	≥50	22	18	1	3	0			40.84 ± 7.29			0.47 (0.43,0.60)		
分期							4.829	0.028		6.41	0.015		1.383	0.240
	I、II	14	8	4	2	0			37.73 ± 6.44			0.52 (0.42,0.60)		
	III、IV	28	25	1	1	1			43.22 ± 6.72			0.47 (0.42,0.52)		
分化程度							5.718	0.057		15.94	0.000		32.863	0.000
	低分化	19	18	0	1	0			45.99 ± 5.42			0.43 (0.40,0.47)		
	中分化	14	10	3	0	1			39.86 ± 5.94			0.49 (0.46,0.56)		
	高分化	9	5	2	2	0			34.07 ± 4.12			0.60 (0.28,0.63)		
分类							4.758	0.093		2.53	0.093		6.185	0.045
	浆液性	25	21	2	1	1			42.80 ± 7.52			0.44 (0.40,0.52)		
	黏液性	9	8	1	0	0			41.73 ± 5.06			0.46 (0.38,0.55)		
	其他	8	4	2	2	0			36.60 ± 5.88			0.55 (0.50,0.60)		

血管的常用指标,也是反映肿瘤生物学行为、评估多种肿瘤预后的重要参考指标^[11-12]。本研究结果显示良性、交界性、恶性卵巢肿瘤组织 MVD 逐渐升高,且在恶性肿瘤组织中随临床分期的增加而升高。彩色多普勒检查结果显示恶性卵巢上皮性肿瘤血流信号检出率(40/42)高于良性肿瘤(33/38),且恶性肿瘤血流 RI 中位数低于良性肿瘤。以上结果表明,血管生成与卵巢上皮性肿瘤发生发展密切相关,这与文献报道一致^[13-14]。相关性分析结果显示卵巢癌 MVD 与 RI 呈负相关, fibulin-5 阳性表达与 MVD 呈负相关、与 RI 呈正相关。提示 fibulin-5 低表达与卵巢癌血管生成存在某种联系。

研究表明 fibulin-5 能抑制内皮细胞增殖与侵袭,调节多种促血管生成因子的水平,影响细胞外基质的降解和重建,控制血管生成从而诱导肿瘤的衰退^[15-16]。因此 fibulin-5 是一种新型的血管生成抑制剂,可能成为肿瘤抗血管治疗的新靶点。本研究结果表明 fibulin-5 表达降低可能与卵巢上皮性肿瘤发生发展有一定相关性,且 fibulin-5 的低表达与卵巢癌血管生成存在某种联系, fibulin-5 可能是卵巢癌具有高侵袭、高转移能力的分子基础。目前 fibulin-5 在卵巢上皮性肿瘤的研究较少,且其对肿瘤细胞生物学特性的影响还不甚清楚。因此,进一步研究 fibulin-5 在卵巢上皮性肿瘤生长以及血管生成中的具体调控机制尤为必要,这将为卵巢癌的抗血管治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Gutt C N, Brinkmann L, Mehrabi A, et al. Dietary omega-3-polyunsaturated fatty acids prevent the development of metastases of colon carcinoma in rat liver[J]. *Eur J Nutr*, 2007, 46(5): 279-285.
- [2] Hass S, Pierl C, Harth V, et al. Expression of xenobiotic and steroid hormone metabolizing enzymes in human breast carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(8): 1785-1791.
- [3] Ding S, Li C, Lin S, et al. Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(7): 861-866.
- [4] Freeman L J, Lomas A, Hodson N, et al. Fibulin-5 interacts with fibrillin-1 molecules and microfibrils[J]. *Biochem J*, 2005, 388(Pt1): 1-5.
- [5] Nonaka R, Onoue S, Wachi H, et al. DANCE/fibulin-5 promotes elastin fiber formation in a tropoelastin isoform-dependent manner[J]. *Clin. Biochem*, 2009, 42(7-8): 713-721.
- [6] Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, et al. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(32): 22476-22483.
- [7] Schiemann W P, Blobe G C, Kalume D E, et al. Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion: Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(30): 27367-27377.
- [8] Hu Z, Ai Q, Xu H, et al. Fibulin-5 is down-regulated in urothelial carcinoma of bladder and inhibits growth and invasion of human bladder cancer cell line 5637[J]. *Urol Oncol*, 2011, 29(4): 430-435.
- [9] Yue W, Sun Q, Landreneau R, et al. Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15): 6339-6346.
- [10] Bhat T A, Singh R P. Tumor angiogenesis—a potential target in cancer chemoprevention[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(4): 1334-1345.
- [11] Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(12): 1823-1832.
- [12] Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal T Z, et al. Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2006, 25(3): 365-372.
- [13] Gadducci A, Ferrero A, Cosio S, et al. Intratumoral microvessel density in advanced epithelial ovarian cancer and its use as a prognostic variable[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5B): 3925-3932.
- [14] Gomez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J, et al. Angiogenesis and ovarian cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11(9): 564-571.
- [15] Albig A R, Schiemann W P. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2004, 23(6): 367-379.
- [16] Albig A R, Neil J R, Schiemann W P. Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2621-2629.

(责任编辑:冉明会)