

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.017

血管生成素-2 及其受体在卵巢癌组织中的表达及与血管生成的关系

杨素梅¹, 刘可玲², 王立敏¹, 高建宏¹, 李 华¹, 高玉霞¹

Relationship between Expressions of Angiopoietin-2 and Its Receptors and Angiogenesis in Ovarian Cancer

Yang Sumei¹, Liu Keling², Wang Limin¹, Gao Jianhong¹, Li Hua¹, Gao Yuxia¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, The People's Hospital of Langfang City, Langfang 065000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The People's Hospital of Xianghe County

Abstract: Objective To explore the correlations between the expressions of Angiopoietin-2 (Ang-2) and its receptor (Tie-2) and the microvessel density (MVD), as well as several clinicopathologic parameters in ovarian carcinomas. **Methods** The expressions of Ang-2 and Tie-2 were detected By RT-PCR, and MVD by the immunohistochemical method in 25 specimens of normal ovaries, 25 specimens of benign ovarian tumors and 65 specimens of ovarian cancer. **Results** The MVD in the ovarian cancer group was significantly higher than that in the benign ovarian tumors group ($t = 2.61, P < 0.05$), moreover there was a significantly varied MVD among different clinical stages of ovarian cancer ($F = 4.618, P < 0.05$). Both positive rate and level of Ang-2 mRNA were markedly highest in the ovarian cancer group than those in the benign ovarian tumors group and the control group ($P < 0.05$). There was a significant difference of Ang-2 mRNA in different clinical stages of ovarian cancer (0.298 ± 0.022 vs. $0.206 \pm 0.086, P < 0.05$). A positive correlation was found between the MVD and the expression level of the Ang-2 mRNA ($r_{MV} = 0.685, P < 0.05$). Tie-2 mRNA was only observed from 5 specimens of ovarian cancer. **Conclusion** Ang-2 was high-expression, and associated with the increased formation of tumor blood vessels in ovarian cancer.

Key words: Ovarian carcinoma; Angiopoietin-2 (Ang-2); Tie-2; VEGF; MVD

摘要: 目的 探讨血管生成素-2 (Ang-2) 及其受体 (Tie-2) 在卵巢癌中的表达及与血管生成、临床病理特征的关系。 **方法** 采用 RT-PCR 法检测 25 例正常卵巢组织标本、25 例良性卵巢肿瘤和 65 例恶性卵巢肿瘤中 Ang-2 及其受体 Tie-2 的表达水平, 并采用免疫组织化学法检测各标本的微血管密度 (MVD)。 **结果** 恶性组 MVD 显著高于良性组 ($t = 2.61, P < 0.05$), 不同临床分期的卵巢癌 MVD 的差异有统计学意义 ($F = 4.618, P < 0.05$)。恶性组 Ang-2 mRNA 阳性率和表达水平显著高于良性组和对照组 ($P < 0.05$), 不同临床分期的卵巢癌标本 Ang-2 mRNA 表达水平有显著性差异 (0.298 ± 0.022 vs. $0.206 \pm 0.086, P < 0.05$)。恶性组 MVD 与其 Ang-2 mRNA 表达水平呈正相关关系 ($r_{MV} = 0.685, P < 0.05$)。仅在 5 例恶性卵巢癌标本中检测到 Tie-2 mRNA 表达, 良性组和对照组未检出。 **结论** 恶性卵巢癌组织中高表达 Ang-2, 其与卵巢癌肿瘤血管大量形成有关。

关键词: 卵巢癌; 血管生成素-2; 血管生成素-2 受体; 血管内皮生长因子; 微血管密度

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)02-0185-04

0 引言

卵巢癌致死的主要原因是易于转移和复发, 肿瘤浸润和转移依赖大量肿瘤新生血管形成^[1-2]。肿瘤血管新生受多种因素调控, 其中血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血管生成素-2 (Angiopoietin-2, Ang-2) 相互协调起

重要作用^[3]。当 VEGF 存在时, Ang-2 可与内皮细胞表面的 Tie-2 受体结合, 诱导内皮细胞增殖出芽, 促进新生血管形成; Ang-2 也可与肿瘤细胞表面 Tie-2 受体结合, 诱导其表达促血管生成调控因子, 促进新生血管形成^[3]。已有大量研究证实 VEGF 与卵巢癌发生发展密切相关, 但 Ang-2 与卵巢癌的关系尚不十分明确。本研究对卵巢癌中的微血管密度 (microvessel density, MVD)、Ang-2 及其受体 Tie-2 的表达进行检测, 研究其相互关系, 并分析其与肿瘤临床病理特征的关系, 以探讨其在卵巢癌诊断、预后及指导治疗中的价值。

收稿日期: 2010-04-22; 修回日期: 2011-11-04

作者单位: 1. 065000 河北廊坊, 河北省廊坊市人民医院妇产科; 2. 河北省香河县人民医院妇产科

作者简介: 杨素梅 (1974-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的诊治工作

1 资料与方法

1.1 资料

收集廊坊市人民医院妇科和香河县人民医院妇科 2009 年 1 月—2010 年 10 月间手术切除并经病理确诊为卵巢恶性肿瘤标本 65 例, 良性病变 25 例, 同期因其他良性病变而手术切除的正常卵巢组织 25 例。恶性肿瘤患者年龄 39~54 岁, 中位年龄 46 岁。根据 WHO 肿瘤国际组织学分类标准, 恶性肿瘤标本按组织学类型分为: 浆液性囊腺癌 48 例、黏液性囊腺癌 12 例、子宫内膜样癌 3 例、低分化腺癌 2 例; 按照国际妇产科联盟 (FIGO) 2000 年制定的临床分期标准分为: I 期 7 例、II 期 34 例、III 期 15 例、IV 期 9 例; 依据组织结构和细胞分化程度分为: 高分化 13 例、中分化 23 例、低分化 29 例。所有患者术前均未接受放化疗或激素治疗。标本取材后一部分用液氮速冻, -80°C 保存备用; 另一部分经 4% 甲醛溶液固定后, 石蜡包埋备用。

1.2 试剂

CD34 鼠抗人单克隆抗体和 SP 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。RNA 抽提试剂盒购于 Invitrogen 公司, PCR 引物由北京赛百盛公司合成。IPP 吸光度分析软件 (IPP v6.0) 购于 Media Cybernetics 公司。

1.3 免疫组织化学 SP 法

组织蜡块 $7\ \mu\text{m}$ 厚连续切片, 脱蜡至水后置于柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 高温高压 90 s 进行热修复。余步骤按照 SP 试剂盒说明书完成, DAB 显色, 光学显微镜观察拍照, IPP 光密度分析软件进行图像分析。用 PBS 液代替一抗作为阴性对照; 乳腺癌间质微血管内皮细胞 CD34 高表达作为阳性对照。

1.4 微血管密度 (MVD) 计数

低倍视野下扫视整个组织切片, 在肿瘤浸润区域选取内皮细胞染色清晰、微血管数量密集的视野, 即热点区。在热点区 400 倍视野下拍照记录, 以棕黄色的内皮细胞或内皮细胞簇为微血管区, 但管腔 >8 个红细胞大小或带有肌层、管腔较厚的血管均不计数。分析 5 个高倍视野, 以 400 倍视野计数所有染色的微血管数, 并以其均数作为 MVD 值。

1.5 RT-PCR 法检测 Ang-2 表达

用 Trizol 提取组织标本总 RNA, 紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 浓度和纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.7$)。RT-PCR 按试剂盒说明操作。Ang-2 上游引物: $5'$ -GAAGCTGCCAGGTGAGAAAC- $3'$, 下游引物: $5'$ -TTCCAAAGGATTATGGCAGG- $3'$, 产物大小为 391 bp。Tie-2 上游引物: $5'$ -TGAAGTGAGAGAAGGTCTGTG- $3'$, 下游引物: $5'$ -CAGCCGAGGAGTGTGTAATGT- $3'$, 产物大小为 239 bp。内参 β -actin 上游引物: $5'$ -GTGGGGCGC-CCCAGGCACCA- $3'$, 下游引物: $5'$ -GTCCTTAATGTCACGCACGATTTC- $3'$, 产物大小为 539 bp。反应参数: 94°C 预变性 5 min, 然后 94°C 变性 1 min, 58°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪拍照记录, 并用 IPP 吸光度分析软件进行图像分析。各泳道 PCR 产物与内参 β -actin 的吸光度之比, 作为 Ang-2 及其受体 mRNA 的相对含量。

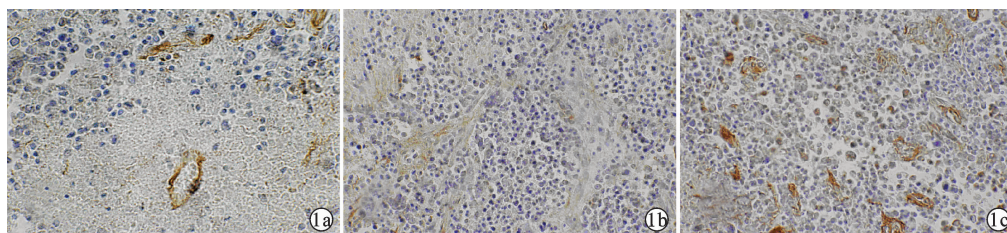
1.6 统计学方法

所有数据用统计学软件 SPSS 11.5 进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 选用两独立样本均数的 t 检验或多组单因素随机对照资料方差分析; 计数资料采用两独立样本比率的 χ^2 检验; 相关性分析采用 Pearson 相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同卵巢组织中 MVD 的表达

良性组 MVD 值显著高于健康对照组 ($t = 5.724, P < 0.05$); 恶性组 MVD 值显著高于良性组 ($t = 2.61, P < 0.05$), 见表 1、图 1。恶性组中不同临床分期卵巢癌标本 MVD 值间差异有统计学意义 ($F = 4.618, P < 0.05$), 随着 FIGO 分期的增高, 卵巢癌组织中 MVD 值逐渐升高。不同组织学类型和不同病理分级间的 MVD 值差异无统计学意义。



1a: control group; 1b: the benign group; 1c: the malignant group

图 1 对照组、良性组和恶性组标本微血管 CD34 染色结果 (SP $\times 400$)

Figure 1 The microvasculars CD34 staining results in the control group, the benign group and the malignant group (SP $\times 400$)

表 1 MVD 及 Ang-2 mRNA、Tie-2 mRNA 表达

Table 1 MVD and the expressions of Ang-2 mRNA and Tie-2 mRNA

Groups	Number of cases	MVD	Positive rate of Ang-2 mRNA (%)	Positive rate of Tie-2 mRNA (%)
Control group	25	5.319 ± 1.623	12	0
Benign group	25	8.956 ± 2.11 ^a	20	0
Malignant group	65	14.483 ± 4.296 ^b	70.8 ^{c,d}	7.692

Note: ^a: $P < 0.05$, compared with the control group; ^b: $P < 0.05$, compared with the benign group; ^c: $P < 0.05$, compared with the control group; ^d: $P < 0.05$, compared with the benign group

2.2 不同卵巢组织中 Ang-2 mRNA 的表达

通过 RT-PCR 分析,恶性组、良性组和对照组 Ang-2 表达阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 43.542$, $P < 0.05$),其中恶性组高于良性组和对照组,良性组和对照组间差异无统计学意义($\chi^2 = 1.935$, $P > 0.05$),见表 1。恶性组 Ang-2 mRNA 的表达水平显著高于良性组和对照组[(0.256 ± 0.162) vs. (0.1 ± 0.089), $P < 0.05$; (0.256 ± 0.162) vs. (0.05 ± 0.026), $P < 0.05$],而良性组和对照组间 Ang-2 mRNA 的表达差异无统计学意义[(0.1 ± 0.089) vs. (0.05 ± 0.026), $P > 0.05$],见图 2。恶性组中,Ⅲ~Ⅳ期患者标本 Ang-2 mRNA 的表达水平高于Ⅰ~Ⅱ期患者标本,差异有统计学意义(0.298 ± 0.022) vs. (0.206 ± 0.086), $P < 0.05$),见表 2。不同年龄、不同组织学类型和不同病理分级卵巢癌标本中 Ang-2 表达差异无统计学意义,见表 2。

2.3 Tie-2 mRNA 的表达

25 例良性组标本和 25 例对照组标本中均未检测到 Tie-2 mRNA 表达,见表 1、图 2;65 例恶性卵巢癌标本中,仅有 5 例检测到 Tie-2 mRNA 表达,表达阳性率为 7.692%,与良性组、对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 恶性卵巢癌标本中 MVD、Ang-2 mRNA 和 Tie-2 mRNA 表达相关性分析

应用 Pearson 相关分析法分析,发现恶性组

MVD 与 Ang-2 mRNA 表达水平呈正相关关系($r_{MV} = 0.685$, $P < 0.05$)。而恶性组 MVD 与 Tie-2 mRNA 表达、Ang-2 mRNA 与 Tie-2 mRNA 表达均无相关关系($P > 0.05$)。

表 2 恶性卵巢癌组织中 Ang-2 mRNA

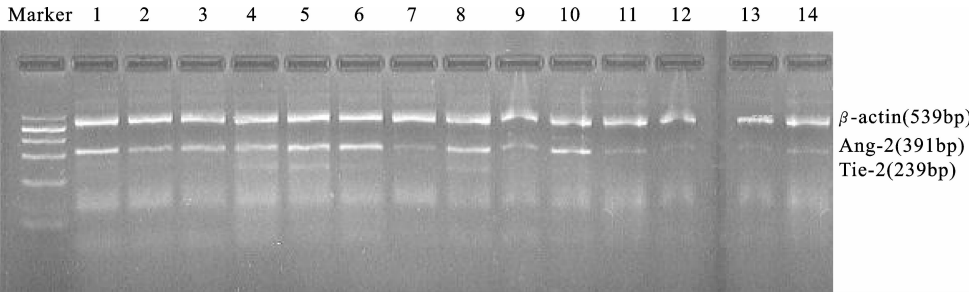
表达与临床病理特征的关系

Table 2 The relationships between the Ang-2 mRNA expression and the clinical or pathological features in the malignant group

Clinical and pathological features	n	Ang-2 mRNA	F or t	P
Age(years)				
<50	29	0.252 ± 0.042		
≥50	36	0.261 ± 0.054	0.791	0.532
Clinical stages				
Ⅰ~Ⅱ	41	0.206 ± 0.086		
Ⅲ~Ⅳ	24	0.298 ± 0.022	4.006	0.015
Degrees of differentiation				
High	13	0.275 ± 0.048		
Middle	23	0.252 ± 0.049	0.426	0.542
Low	29	0.250 ± 0.050		
Pathological types				
Serous cystadenocarcinoma	48	0.252 ± 0.052		
Mucinous cystadenocarcinoma	12	0.274 ± 0.038	2.003	0.124
Other types	5	0.225 ± 0.042		

3 讨论

卵巢癌是致死率较高的女性生殖系统恶性肿瘤,易于转移和复发是其致死主要原因。肿瘤浸润和转移依赖大量肿瘤新生血管形成。多项针对卵巢癌患者的研究发现:癌组织中存在大量血管生成现象^[1]。Raspollini 等^[2]研究了 83 例晚期浆液性卵巢癌组织的 MVD,发现 MVD 与患者总生存期和无病生存期相关,为该疾病复发的独立预后因素。本研究对 65 例卵巢癌标本、25 例良性病变和 25 例正常对照的 MVD 进行检测,结果显示恶性组 MVD 显著高于良性组和对照组。进一步证实 MVD 与卵巢癌密切相关。本研究还就 MVD 与临床分期、组织学类型、病理分级等的相关性进行了分析,结果发现 FIGO 临床分期越晚,MVD 值越高。进一步说明大量微血管生成可能是肿瘤细胞生长和转移的重要



1~10;the malignant group;11~12;the benign group;13~14;the control group.

图 2 Ang-2 mRNA 及其受体 Tie-2 mRNA 在部分卵巢癌标本表达情况

Figure 2 The expression of Ang-2 mRNA and Tie-2 mRNA in some ovarian cancer specimens

基础。

肿瘤血管新生受多种因素调控,其中 VEGF 和 Angs 相互协调,在其中扮演重要角色^[3]。VEGF 专一作用于血管内皮细胞,促进血管内皮增殖,是主要的血管生成促进因子,在肿瘤血管生成中起核心作用^[4]。除 VEGF 外,近年又发现另一专一作用于血管内皮细胞的血管新生因子家族——血管生成素(Angs),其主要包括 Ang-1 和 Ang-2 两个亚型。与经典促血管生成因子 VEGF 不同,Ang-1 并不促进内皮细胞增殖,而是延长内皮细胞寿命,促使血管稳定成熟。Ang-2 主要拮抗 Ang-1 作用,破坏血管稳态,导致内皮细胞凋亡、血管退化;但在 VEGF 同时存在时,Ang-2 则可促进血管内皮细胞增殖、出芽,诱导血管新生^[3]。由于肿瘤血管多是不成熟的血管,故 Ang-2 与肿瘤性血管生成的关系更为密切^[3]。Ang-2 在血管肉瘤、胶质瘤、胃癌等恶性肿瘤的高表达^[5-6]也说明了这一点。已有大量研究证实 VEGF 在卵巢癌组织和细胞株中高表达,并与该疾病的临床病理特征密切相关,是卵巢癌患者治疗及预后一项重要检测指标^[7]。Ang-2 被发现在乳腺癌、宫颈癌等妇科肿瘤中过表达^[8-9],但其在卵巢癌患者的表达情况尚不明确。鉴于 VEGF 和 Ang-2 在肿瘤血管新生中的密切关系,本研究检测卵巢癌组织 Ang-2 表达水平,结果表明恶性组中 Ang-2 表达阳性率显著高于良性组和对照组,恶性组 Ang-2 表达水平显著高于良性组和对照组。提示 Ang-2 也与卵巢癌密切相关。进而对 Ang-2 表达与卵巢癌标本 MVD 的关系进行研究,结果显示两者呈正相关,进一步说明 Ang-2 过表达可能通过诱导卵巢癌组织中血管新生,参与卵巢癌发生发展过程。同时我们还注意到晚期(Ⅲ~Ⅳ)卵巢癌患者的 Ang-2 表达高于早期(Ⅰ~Ⅱ)患者,提示 Ang-2 很可能作为一个反映卵巢肿瘤恶性程度的生物学指标。上述实验结果与王前等^[1]的研究具有相关性,他们检测到在卵巢癌组织中内源性抑血管生成因子 EVEC(Fibulin-5,扣针蛋白-5)表达显著减少;Ⅲ~Ⅳ期患者组织的 EVEC 表达水平低于Ⅰ~Ⅱ患者。有学者认为 Angs 和 EVEC 的基因表达可相互影响^[10]。Ang-2 是否通过抑制 EVEC 表达,减少血管壁基质形成,导致血管通透性增高,诱导内皮细胞出芽和新生血管形成尚有待于进一步研究确定。不同年龄、不同组织学类型和不同病理分级卵巢癌组织中 Ang-2 表达差异无统计学意义,提示 Ang-2 表达与年龄、组织学类型和病理分级无关。

在卵巢癌发病过程中,高表达的 VEGF 一方面以旁分泌方式结合于内皮细胞表面的 VEGF 受体,促进肿瘤性的血管形成;另一方面以自分泌方式与肿瘤细胞表面的 VEGF 受体结合,促进肿瘤细胞增殖、迁移^[11]。Tie-2 是 Ang-2 的膜受体;其在卵巢癌

细胞的表达水平直接反映 Ang-2 以何种方式发挥作用。本研究结果显示 Tie-2 较少在卵巢癌组织表达,这显然不同于 VEGF 受体在卵巢癌细胞的广泛分布^[7],提示卵巢癌组织中过表达的 Ang-2 可能主要以旁分泌方式发挥作用;通过激活内皮细胞表面 Tie-2 受体,促进内皮细胞存活、出芽,导致新生血管形成增加,参与卵巢癌的发生、发展。

综上所述,卵巢癌患者存在 Ang-2 高表达,在高水平 VEGF 协同作用下,高表达的 Ang-2 以旁分泌作用方式刺激肿瘤血管大量生成,促进卵巢癌细胞增殖、扩散、迁移,参与卵巢癌的发生、发展;Ang-2 可能不仅为卵巢癌病情检测、预后判断提供了一个有效的分子生物学指标,还为针对卵巢癌患者血管新生的靶向治疗提供了一个新思路。

参考文献:

- [1] Wang Q, Li XG, Zhang Y, et al. Expression of EVEC in Ovarian carcinoma and its biological significance[J]. Zhong Hua Zhong Liu Za Zhi, 2010, 32(9): 676-680. [王前, 李新国, 张怡, 等. 卵巢癌组织中 EVEC 的表达及其生物学意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(9): 676-680.]
- [2] Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, et al. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2004, 14(5): 815-823.
- [3] Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis[J]. Biochemistry(Mosc), 2008, 73(7): 751-762.
- [4] Greenberg JJ, Cheresh DA. VEGF as an inhibitor of tumor vessel maturation: implications for cancer therapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(11): 1347-1356.
- [5] Detjen KM, Rieke S, Deters A, et al. Angiopoietin-2 promotes disease progression of neuroendocrine tumors[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2): 420-429.
- [6] Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy[J]. Curr Oncol Rep, 2009, 11(2): 111-116.
- [7] Collinson FJ, Hall GD, Perren TJ, et al. Development of antiangiogenic agents for ovarian cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2008, 8(1): 21-32.
- [8] Imanishi Y, Hu B, Jarzynka MJ, et al. Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the $\alpha(5)\beta(1)$ integrin-mediated pathway[J]. Cancer Res, 2007, 67(9): 4254-4263.
- [9] Wang X, Hou JQ, Jiang L, et al. The expression and its clinical significance of Angiopoietin-2 in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia[J]. Chin J Gerontology, 2010, 30(15): 2128-2130. [王璇, 侯建青, 姜蕾, 等. 促血管生成素-2 在宫颈癌及宫颈上皮内瘤变中的表达及其临床意义[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(15): 2128-2130.]
- [10] Tang JC, Xu ZP. Fibulin-5 and disease[J]. Zhongguo Sheng Wu Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao, 2010, 26(6): 511-516. [汤佳城, 许正平. 扣针蛋白-5 与疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(6): 511-516.]
- [11] Fragoso R, Elias AP, Dias S. Autocrine VEGF loops, signaling pathways, and acute leukemia regulation[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48(3): 481-488.

[编辑校对: 安 凤]