

# 色素上皮源性因子与胃癌组织血管生成和临床病理因素的关系

邵春奎, 方建晨, 苏祖兰, 冯智英, 何丹  
(中山大学附属第三医院病理科, 广东 广州 510630)

**摘要**【目的】研究色素上皮源性因子(PEDF)和血管内皮生长因子(VEGF)在胃癌组织中的表达及与癌组织中微血管密度(MVD)的关系,探讨 PEDF 在胃癌组织血管生成中的作用及 PEDF 与胃癌临床病理因素的关系。【方法】用 S-P 免疫组织化学法检测 82 例人体胃癌组织标本中胃癌细胞内 PEDF 和 VEGF 的表达,标记 CD34 分子显示血管内皮细胞,并计数上述胃癌组织内的微血管密度,统计学分析上述分子标记物间的关系以及各分子标记物与胃癌临床病理因素间的关系。【结果】所有的正常胃黏膜均有 PEDF 表达,胃癌组织 PEDF 表达率约 43%,VEGF 表达率约 54%;与高分化胃癌相比,低分化胃癌组织 PEDF 表达率低( $P < 0.05$ ),MVD 高( $P < 0.05$ );PEDF 低表达的胃癌细胞易侵犯浆膜( $P < 0.05$ ),易淋巴结转移( $P < 0.01$ )和远处转移( $P < 0.01$ );胃癌组织 PEDF 表达与 MVD( $P < 0.01$ )和 VEGF( $P < 0.01$ )表达呈负相关关系,VEGF 表达与 MVD 呈正相关关系( $P < 0.01$ )。【结论】PEDF 低表达和 VEGF 高表达可能是胃癌组织内微血管生成的分子基础,是促进胃癌细胞发生淋巴及血道转移的重要因素。

关键词:胃癌;色素上皮源性因子;微血管密度

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)02-0153-04

## Association of Pigment Epithelium-derived Factor with Angiogenesis and Clinicopathological Factors of Gastric Carcinoma

SHAO Chun-kui, FANG Jian-chen, SU Zu-lan, FENG Zhi-ying, HE Dan

(Department of Pathology, Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract**【Objective】To investigate the relationship between expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD), and investigate the role of PEDF in angiogenesis and association of PEDF expression with clinicopathological factors in gastric carcinoma.【Methods】S-P immunohistochemistry method was used to detect the expression of PEDF and VEGF in 82 cases of gastric carcinoma tissue samples. CD34 was used to mark endothelial cells and the MVD was calculated. The relationship between the molecular markers and the relationship between the markers and clinicopathological factors of gastric carcinoma were analyzed.【Results】PEDF expression was showed in all normal gastric mucous. The positive rate of PEDF and VEGF were 43% and 54% in gastric carcinoma. Compared with well-differentiated gastric cancer, the poorly differentiated gastric cancer showed a lower PEDF expression ( $P < 0.05$ ) and a higher MVD ( $P < 0.05$ ). The gastric carcinoma cells with lower PEDF expression tend to invade visceral peritoneum ( $P < 0.05$ ) and metastases by lymphatic vessels ( $P < 0.01$ ) and blood ( $P < 0.01$ ). There were negative correlation between PEDF and MVD ( $P < 0.01$ ), VEGF ( $P < 0.01$ ) and positive correlation between VEGF and MVD ( $P < 0.01$ ).【Conclusion】Lower PEDF and higher VEGF expression might be the molecular basis of angiogenesis in gastric carcinoma tissue and play an important role in lymphatic and blood metastasis of gastric carcinoma.

Key words: gastric neoplasm; pigment epithelium-derived factor; microvessel density

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):153-156]

色素上皮源性因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 是近年发现的人体内重要的

收稿日期 2005-10-19

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(001407,05001748);教育部留学回国人员启动基金资助项目(2004)

作者简介:邵春奎(1965-),男,安徽淮南人,博士,副教授。E-mail:shaock2001@yahoo.com

血管增生抑制因子<sup>[1,2]</sup>。对前列腺癌<sup>[3]</sup>、视网膜母细胞瘤<sup>[4]</sup>、脑胶质细胞瘤<sup>[5]</sup>和骨肉瘤<sup>[6]</sup>的初步研究发现, PEDF 具有抑制肿瘤血管生成, 促进肿瘤细胞分化、凋亡和抑制肿瘤细胞侵袭、转移的作用。本研究拟探讨 PEDF 基因在胃癌组织中的表达情况, 以及 PEDF 表达与胃癌组织微血管密度的关系。PEDF 在调节胃癌组织血管生成时与 VEGF 表达的关系。

## 1 材料与方方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集 1998 年 3 月至 2004 年 4 月我院外科手术切除胃癌标本 82 例, 病人年龄为 22~88 岁, 中位年龄 55 岁。由于青年型胃癌有较特殊的临床病理表现, 故此本组资料在以年龄分组时以 40 岁为界。标本用体积分数 100 mL/L 福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋, HE 染色。观察指标包括组织学类型、分化程度、生长方式、淋巴结转移、远处转移和浆膜浸润等。

1.1.2 试剂 羊抗人 PEDF 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品, 工作浓度为 1:100, 鼠抗人 CD34 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体均来自 DAKO 公司。S-P 试剂盒购自福建迈新公司。

### 1.2 方法和结果判断

1.2.1 PEDF 和 VEGF 的免疫组化 S-P 法检测 高压修复抗原, 每次染色均用 PBS 溶液代替第一抗体做阴性对照。结果判断按染色强度评分: 不着色 0 分, 淡黄色 1 分, 棕黄色 2 分, 棕褐色 3 分。按阳性细胞所占的百分比打分: 阴性 0 分, 阳性细胞 10%~1 分, 11%~50% 2 分, 51%~75% 3 分, >75% 为 4 分。将染色强度和阳性细胞百分比的分值相乘, 乘积大于 3 分为免疫组化反应阳性。

1.2.2 MVD 的检测 癌组织内微血管密度 (microvessel density, MVD) 测定参照 Weidner 方法, 将 CD34 染色阳性的单个内皮或一簇内皮细胞作为一个微血管。先在低倍镜 ( $\times 40$ ) 下扫描整个切片, 寻找高密度血管区, 再在高倍镜 ( $\times 200$ ) 下计数被染成棕黄色的血管数目, 计数时避开坏死区和出血区。结果取 4 个 200 倍视野下的血管数目的平均数。

### 1.3 统计学分析

MVD 与各个临床病理因素间的关系用 t 检

验, PEDF 和 VEGF 表达与 MVD 间的关系、与各临床病理因素间的关系及它们之间的关系用卡方检验。所有统计学处理由 SPSS10.0 分析系统完成。

## 2 结果

### 2.1 标志物在胃癌细胞内表达的一般特点

PEDF 阳性反应定位于胃癌细胞浆中 (图 1); CD34 表达于血管内皮细胞浆中 (图 2); VEGF 位于胃癌细胞浆中 (图 3)。

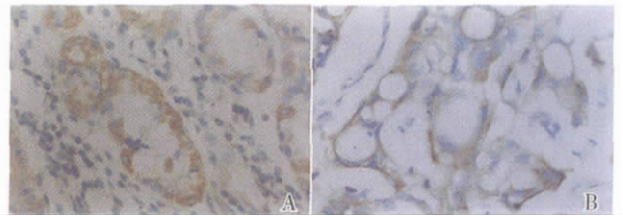


图 1 色素上皮源性因子的表达

Fig.1 Expression of pigment epithelium-derived factor (IHC staining,  $\times 400$ )

pigment epithelium-derived factor located in the cytoplasm and the quantities of PEDF in normal gastric mucous cells (A) more than that in gastric carcinoma cells (B)

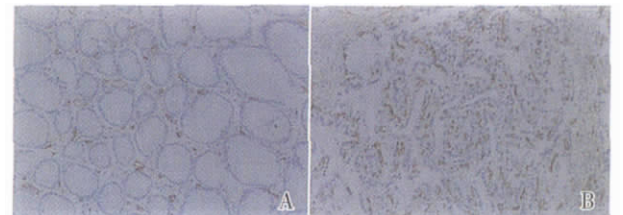


图 2 CD34 的表达

Fig.2 CD34 expression (IHC staining,  $\times 100$ )

The microvessel density (MVD) in normal gastric mucous (A) was much lower than that in gastric carcinoma (B)

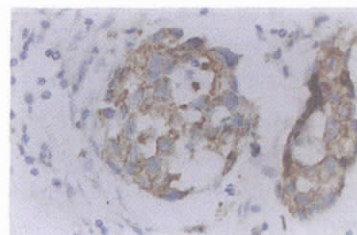


图 3 血管内皮生长因子在胃癌细胞中的表达

Fig.3 Vascular endothelial growth factor (VEGF) expressed in gastric carcinoma cells (IHC staining,  $\times 400$ )

VEGF located in the cytoplasm

### 2.2 PEDF、VEGF 及 MVD 的表达

胃癌组织 PEDF 表达率约 43%, 正常胃黏膜 100% 表达, 且表达强度显著高于胃癌细胞; VEGF

在正常胃黏膜无表达, 胃癌组织 VEGF 表达率约 54%, 胃癌组织内 MVD 显著高于正常胃黏膜。

### 2.3 MVD、PEDF 和 VEGF 与胃癌临床病理因素的关系

与高分化胃癌相比, 低分化胃癌组织 MVD 高 ( $t = 2.34, P < 0.05$ ), PEDF 低表达 ( $\chi^2 = 4.12, P < 0.05$ ), VEGF 高表达 ( $\chi^2 = 4.31, P < 0.05$ ); 有淋巴结转移的胃癌组织 MVD 高 ( $t = 2.81, P < 0.01$ ), PEDF 低表达 ( $\chi^2 = 7.21, P < 0.01$ ), VEGF 高表达 ( $\chi^2 = 6.34, P < 0.01$ ); 有远处转移的胃癌组织 MVD 高 ( $t = 3.12, P < 0.01$ ), PEDF 低表达 ( $\chi^2 = 7.51, P < 0.01$ ), VEGF 高表达 ( $\chi^2 = 7.88, P < 0.01$ ); 有浆膜侵犯的胃癌组织 PEDF 低表达 ( $\chi^2 = 3.96, P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 MVD、PEDF 和 VEGF 与胃癌临床病理因素的关系  
Table 1 Relationship between MVD, PEDF, VEGF, and clinicopathological factors of gastric carcinoma

Clinicopathological factors	Patient(n)	MVD(x)	Positive[ n( % )]	
			PEDF	VEGF
<b>Gender</b>				
Male	38	40 ± 8	17( 45 )	20( 53 )
Female	44	43 ± 9	18( 41 )	24( 55 )
<b>Age</b>				
<40 yr	18	43 ± 12	8( 44 )	10( 56 )
40 yr	64	46 ± 13	27( 42 )	34( 53 )
<b>Position of stomach</b>				
Upper part	26	37 ± 10	12( 46 )	13( 50 )
Middle part	13	38 ± 10	6( 46 )	7( 54 )
Lower part	43	42 ± 11	17( 40 )	24( 56 )
<b>Lauren type</b>				
Intestinal type	20	43 ± 11	8( 40 )	10( 50 )
Diffuse type	62	46 ± 12	27( 44 )	34( 55 )
<b>Histological type</b>				
Well-differentiated	22	37 ± 11 <sup>1)</sup>	12( 55 ) <sup>1)</sup>	9( 41 ) <sup>1)</sup>
Poorly differentiated	60	56 ± 12	23( 38 )	35( 58 )
<b>Lymph node involved</b>				
Positive	54	55 ± 13 <sup>2)</sup>	15( 28 ) <sup>2)</sup>	36( 67 ) <sup>2)</sup>
Negative	28	21 ± 10	20( 71 )	8( 29 )
<b>Visceral peritoneum involved</b>				
Positive	39	38 ± 11	12( 31 ) <sup>2)</sup>	20( 51 )
Negative	43	44 ± 12	23( 54 )	24( 56 )
<b>Distant metastases</b>				
Positive	28	65 ± 15 <sup>2)</sup>	3( 11 ) <sup>2)</sup>	25( 89 ) <sup>2)</sup>
Negative	54	22 ± 9	32( 59 )	19( 35 )

1)P< 0.05 2)P< 0.01

### 2.4 PEDF 和 VEGF 表达与 MVD 的关系

胃癌组织 MVD 的中位数( median) 是 38.6, 因

此, 在观察 MVD 与各基因表达间的关系时, 以 40 作为分组界限将胃癌组织标本分为 2 组。MVD 小于 40 组中, MVD 的均数和标准差为 27 ± 9, 大于 40 组为 56 ± 12。统计分析表明胃癌组织 MVD 与 PEDF 表达呈负相关关系 ( $r = -0.26, P < 0.01$ ), 而与 VEGF 表达呈正相关关系 ( $r = 0.32, P < 0.01$ ), 见表 2。

表 2 PEDF 和 VEGF 表达与 MVD 的关系

Table 2 Correlation between VEGF, PEDF expression and MVD

MVD	Patients(n)	Positive[ n( % )]	
		PEDF	VEGF
<40	36	25( 69 )	11( 31 )
40	46	10( 22 )	33( 72 )

### 2.5 PEDF 与 VEGF 表达的关系

PEDF 与 VEGF 的表达呈负相关关系 ( $r = -0.35, P < 0.01$ ), 见表 3。

表 3 PEDF 与 VEGF 表达的关系

Table 3 Correlation between PEDF and VEGF expression [ n( % )]

PEDF		VEGF	
		Positive	Negative
Positive	35	8( 23 )	27( 77 )
Negative	47	36( 77 )	11( 23 )

## 3 讨 论

色素上皮源性因子具有抑制血管内皮细胞增生和移动的作用, 其在眼睛角膜中含量很高, 是维持眼睛角膜无血管状态的重要因子<sup>[1]</sup>。PEDF 通过促进新生内皮细胞表达 FasI 而引起细胞凋亡, 由于原先存在的血管内皮细胞不表达 FasI, 这样 PEDF 在抑制新生血管的同时, 不影响原来的血管结构<sup>[7]</sup>。自从发现 PEDF 能抑制内皮细胞增生和新生血管形成以来, 人们便开始探讨它在阻止肿瘤血管形成方面的作用。在移植的前列腺癌<sup>[3]</sup>和 Wilm's 瘤<sup>[8]</sup>组织中, PEDF 治疗组的肿瘤组织 MVD 低, 肿瘤生长慢。Guan 等<sup>[9]</sup>发现人脑胶质瘤分化越差, 其细胞表达的 PEDF 就越少。本实验中 PEDF 表达与胃癌组织中 MVD 呈负相关关系; PEDF 低表达的胃癌组织分化差, 易发生淋巴结和远处转移, 易于浆膜浸润。PEDF 在胃癌细胞中的表达情况对判断预后可能有重要的参考价值。

血管内皮生长因子(VEGF)是目前已知的最强的血管增生刺激因子。研究发现肿瘤细胞比相应的正常组织高表达 VEGF,且高表达 VEGF 的肿瘤组织生长速度快,易发生转移<sup>[9]</sup>。本结果显示高表达 VEGF 的胃癌组织中微血管密度高,易于发生淋巴结和血道转移。提示 VEGF 可能通过刺激胃癌组织内血管增生而促进胃癌细胞转移。

肿瘤组织和正常组织中的血管增生相似,受二个相互制约的平衡系统调控:一是血管增生抑制因子,如 PEDF 等,二是血管增生刺激因子,如 VEGF 等。肿瘤组织内微血管密度是这二个系统作用的结果。本研究见胃癌组织内微血管密度高于其相应的正常胃黏膜,癌组织内 VEGF 的表达高于正常黏膜,PEDF 的表达低于正常黏膜。这可以推测胃黏膜上皮在癌变过程中,促进了血管增生刺激因子 VEGF 基因表达,抑制了血管增生抑制因子 PEDF 基因表达,从而打破了原先存在于正常胃黏膜组织中调控血管增生的平衡系统。胃癌组织中微血管密度的增加正是这种平衡被破坏的结果。新生血管的形成不仅给癌细胞带来了丰富的营养,且增加了癌细胞进入血管和淋巴管的机会,促进转移发生。

#### 参考文献:

- [1] DAWSON D W, VOLPERT O V, GILLIS P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis[J]. *Science*, 1999, 285(5425):245- 248.
- [2] 方建晨, 邵春奎, 苏祖兰. 色素上皮源性因子与肿瘤[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(3):

283- 285.

- [3] DOLL J A, STELLMACH V M, BOUCK N P, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6):774- 780.
- [4] CRAWFORD S E, STELLMACH V, RANALLI M, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(24): 4421- 4428.
- [5] GUAN M, YAM H F, SU B, et al. Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(4):277- 282.
- [6] QUAN G M, QJAIMI J, NADESAPILLAI A P, et al. Resistance of epiphyseal cartilage to invasion by osteosarcoma is likely to be due to expression of antiangiogenic factors[J]. *Pathobiology*, 2003, 70(6): 361- 367.
- [7] VOLPERT O V, 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.
- [8] ABRAMSON L P, STELLMACH V, DOLL J A, et al. Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model [J]. *J Pediatr Surg*, 2003, 38(3):336- 342.
- [9] STOELTZING O, ELLIS L M. Regulators of vascular endothelial growth factor expression in cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2004, 119:33- 58.

(编辑 黄小延)

(上接第 147 页 from page 147)

#### 参考文献:

- [1] WATTS J. China faces up to HIV/AIDS epidemic [J]. *Lancet*, 2003, 362(9400): 1983.
- [2] WALKER N, GRASSLY N C, GARNETT G P, et al. Estimating the global burden of HIV/AIDS: what do we really know about the HIV pandemic? [J]. *Lancet*, 2004, 363(9427): 2180- 2185.
- [3] AINSWORTH M, TEOKUL W. Breaking the silence: setting realistic priorities for AIDS control in less-developed countries [J]. *Lancet*, 2000, 356(9223): 55- 60.
- [4] TANG J W, PILLAY D. Transmission of HIV-1 drug resistance [J]. *J Clin Virol*, 2004, 30(1): 1- 10.
- [5] JOHNSON M O, CHARLEBOIS E, MORIN S F, et al. Perceived adverse effects of antiretroviral therapy [J]. *J*

*Pain Symptom Manage*, 2005, 29(2): 193- 205.

- [6] 易世红, 王放, 王丽萍, 等. 双黄连粉针剂体外抗病毒药效学研究[J]. *白求恩医科大学学报*, 2001, 27(5): 490- 492.
- [7] 张妍玲, 张涛源, 陈集双. 双黄连粉针剂治疗艾滋病的临床观察[J]. *山西医科大学学报*, 1999, 30(2): 177- 179.
- [8] RUDI P, JAN B, MASANORI B, et al. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds [J]. *J Virol Meth*, 1988, 20(4):309- 321.
- [9] 崔晓兰, 贺玉琢, 高英杰, 等. 中药复方血清药理学方法学探讨- [J]. *中国实验方剂学杂志*, 1999, 5(3): 36- 37.
- [10] 张军平, 张伯礼, 山本清高. 中药药物血清的制作方法探讨[J]. *天津中医药*, 2004, 21(4): 274- 276.

(编辑 张敏瑞)