

· 临床论著 ·

血管内皮生长因子和凋亡抑制基因在肝细胞癌中的表达及与预后的相关性

兰涛 苑建磊 周国庆 刘寨新 张梅 李娜

【摘要】目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)和凋亡抑制基因 Bag-1、Bcl-2 在肝癌细胞、癌旁及正常肝细胞中的表达, 以及其与肝细胞癌预后的相关性。**方法** 利用免疫组织化学染色法分别检测 60 例癌组织、30 例癌旁组织及 14 例正常肝组织中 VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 的水平, 结合临床病理特征及预后对所得数据进行统计学分析。**结果** VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 在肝癌组织中的表达显著高于癌旁和正常肝组织 (P 均 < 0.05); VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 的表达与肝癌的分期、有无淋巴结转移、有无癌栓形成以及有无包膜形成相关, 差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05); 与患者性别、年龄、肿瘤分级及大小以及甲胎蛋白(AFP)等因素无关。VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 的表达呈高度一致性 ($P < 0.05$); VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 阳性患者的 1 年和 2 年生存率均显著低于阴性患者 ($P < 0.05$)。**结论** VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 与肝癌的生物学行为密切相关, 并可作为肝细胞癌患者预后的预测因素。

【关键词】 肝细胞癌; 血管内皮生长因子; Bag-1; Bcl-2; 累积生存率

Expression of vascular endothelial growth factor, and apoptosis inhibiting gene in human hepatocellular carcinoma and correlation with the prognosis LAN Tao, YUAN Jianlei, ZHOU Guoqing, LIU Zhaixin, ZHANG Mei, LI Na. The Second Department of General Surgery, Cangzhou People Hospital of Hebei, Southern Medical University, Cangzhou 061000, China

Corresponding author: LAN Tao, Email: alan200300@163.com

【Abstract】Objective To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), Bag-1 and Bcl-2 in hepatocellular carcinoma, para-tumor and normal liver tissue and to investigate the correlation of the presence of VEGF, Bag-1 and Bcl-2 with the prognosis of hepatocellular carcinoma. **Methods** The expressions of VEGF, Bag-1 and Bcl-2 proteins were detected by immunohistochemical stain in primary liver cancer (PLC) (60 cases), para-cancer (30 cases) and normal liver tissue samples (14 cases). Combined with the clinical pathological characteristics and prognosis of the data were statistically analyzed. **Results** Immunohistochemical analysis revealed that expression rates of VEGF, Bag-1 and Bcl-2 in PLC tissues were significantly higher than that in para-cancer tissues and normal liver tissues (all $P < 0.05$). The presence of VEGF, Bag-1 and Bcl-2 in the cancer cells were associated with clinical stage, with or without metastasis in lymph node, with or without capsular in tumor, with or without tumor embolus, all with significant differences (all $P < 0.05$). However, there was no significant difference with gender, age, tumor differentiation and size, and AFP (all $P > 0.05$). The expression of VEGF, Bag-1 and Bcl-2 had high degree of consistency. The 1-year and 2-year survival rates in patients with VEGF, Bag-1 and Bcl-2 positive were significantly decreased compared with patients of VEGF, Bag-1 and Bcl-2 negative ($P < 0.05$). **Conclusions** There was a closely relationship between VEGF, Bag-1, Bcl-2 and clinicopathological characteristics of PLC, and it may serve a prognostic factor for PLC.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Bag-1; Bcl-2; Accumulate survival rate

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.02.010

基金项目: 国家中医药管理局重点学科建设项目 (No. 国中医药发 [2012]32 号)

作者单位: 061000 沧州市, 南方医科大学附属沧州市人民医院普外二科

通讯作者: 兰涛, Email: alan200300@163.com

原发性肝癌（简称肝癌）是常见的消化系统恶性肿瘤，手术切除率低，预后差。Bag-1是一种抗凋亡基因，可抑制肝癌细胞凋亡，促进其转移，使肝癌患者生存期缩短。而肿瘤滋养血管增生又为肿瘤的转移提供了基础。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）可促使血管新生，并为肿瘤边的浸润、转移提供途径。VEGF、Bag-1和Bcl-2在肝癌中的表达及与临床病理学关系以及三者的相关性研究目前鲜见报道。本研究分别检测Bag-1、Bcl-2和VEGF在肝癌组织、癌旁肝组织及正常肝组织中的表达，进而探讨其与肝癌的相关性，报道如下。

资料与方法

一、一般资料

收集2009年5月至2011年6月沧州市人民医院普外二科手术切除的肝癌标本（均为肝细胞癌）60例。术后定期随访，失访3例。另选取癌旁组织标本30例，正常肝组织标本14例，全部病例均由病理确诊。

二、实验方法

采用免疫组织化学的方法检测VEGF、Bag-1

及Bcl-2在肝癌组织、癌旁组织及正常组织中的表达。

三、结果判定

阳性细胞的胞浆呈棕黄色。根据Kikachi等^[1]标准评估Bag-1蛋白表达情况；根据Sinicrope等^[2]标准评估Bcl-2蛋白表达情况；按刘鹏等^[3]标准评估VEGF蛋白表达情况；按照国际抗癌联合会的TNM分期来进行临床分期；依据Edmondson分级标准来判断肿瘤的分化程度。

四、统计学处理

应用SPSS 17.0软件进行统计学分析，三者的表达差异及相关性采用卡方检验；三者的生存率研究采用Log-rank检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

一、VEGF、Bag-1及Bcl-2在肝癌、癌旁组织及正常肝组织中的表达

肝癌中VEGF、Bag-1及Bcl-2的表达最高，与癌旁组织、正常肝组织中的表达差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），见表1。

表1 VEGF、Bag-1及Bcl-2在肝癌、癌旁肝组织及正常肝组织中的表达（例）

组织	VEGF		χ^2	P	Bag-1		χ^2	P	Bcl-2		χ^2	P
	+	-			+	-			+	-		
肝癌	44	16			48	12			45	15		
癌旁肝组织	13	17	7.715	0.006 ^a	14	16	10.369	0.002 ^a	15	15	5.625	0.017 ^a
正常肝组织	3	11	13.197	0.001 ^a	4	10	14.371	0.000 ^a	3	11	14.294	0.000 ^a

注：^a与肝癌组织相比较， $P < 0.05$

表2 VEGF、Bag-1及Bcl-2表达与肝癌临床病理特征的关系（例）

因素	VEGF		χ^2	P	Bag-1		χ^2	P	Bcl-2		χ^2	P
	+	-			+	-			+	-		
年龄（岁）												
≤60	20	5	0.974	0.324	18	7	1.714	0.163	16	9	2.766	0.087
>60	24	11			30	5			29	6		
性别												
男	32	10	0.584	0.445	35	7	0.972	0.258	32	10	0.196	0.491
女	12	6			13	5			13	5		
包膜形成												
有	6	7	6.269	0.012	5	8	17.897	0.000	6	7	7.365	0.012
无	38	9			43	4			39	8		
癌栓形成												
有	14	1	4.091	0.043	15	0	5.000	0.021	15	0	6.667	0.006
无	30	15			33	12			30	15		
肿瘤大小												
≤5 cm	20	8	0.073	0.505	21	7	0.820	0.280	20	8	0.357	0.382
>5 cm	24	8			27	5			25	7		
淋巴转移												
有	14	1	4.091	0.039	15	0	5.588	0.014	15	0	6.667	0.006
无	30	15			33	12			30	15		
肝癌分期												
I + II	13	10	5.390	0.020	15	8	5.094	0.028	14	9	3.972	0.047
III + IV	31	6			33	4			31	6		
分级												
I + II	26	11	0.463	0.496	30	7	0.071	0.520	37	10	0.212	0.444
III + IV	18	5			18	5			18	5		
AFP (ng/ml)												
≤400	16	9	1.909	0.167	19	6	0.429	0.368	18	7	0.206	0.437
>400	28	7			29	6			27	8		

二、肝癌中 VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 的表达及其与临床病理特征的关系

VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 的表达与肝癌的分期、有无淋巴结转移、有无癌栓形成、有无包膜形成有关, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与患者性别、年龄、肿瘤分级和大小以及甲胎蛋白 (AFP) 水平等无关 ($P > 0.05$)。

三、VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 在肝癌中的表达

Bag-1 及 Bcl-2 在肝癌中共同阳性表达患者 39 例, 共同阴性表达患者 6 例, 二者呈正相关关系 ($\chi^2 = 5.000, P < 0.05$); Bag-1 和 VEGF 在肝癌标本中同时阳性表达患者 40 例, 同时阴性表达者 8 例, 二者表达呈正相关关系 ($\chi^2 = 12.273, P < 0.05$); Bcl-2 和 VEGF 在肝癌标本中同时阳性表达患者 41 例, 同时阴性表达者 12 例, 二者表达呈正相关关系 ($\chi^2 = 29.091, P < 0.05$), 见表 3 ~ 5。

四、VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 表达与患者生存率的相关性

VEGF、Bag-1 及 Bcl-2 阳性表达患者 1 年和 2 年生存率均低于阴性患者, 阳性患者的生存期显著低于阴性患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 6 和图 1 ~ 3。

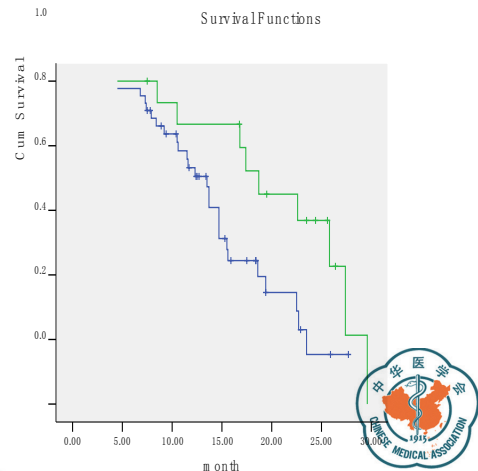


图 1 VEGF 阳性表达组患者与阴性组患者生存曲线

讨 论

目前 Bag-1 在多种恶性肿瘤中均有表达已有报道^[4], 本研究中, 肝癌组织中 Bag-1 的表达率最高, Bag-1 在肝癌、癌旁及正常肝组织中的表达具有显著性差异。本研究发现, Bag-1 与肝癌是否存在淋巴结转移、临床分期、是否有包膜存在、癌栓的形成与否等密切相关。研究表明 Bag-1 与乳腺、胃恶

表 3 Bag-1 及 Bcl-2 在肝癌中的表达关系 (例)

		Bag-1		χ^2	P
		+	-		
Bcl-2	+	39	6	5.000	0.035
	-	9	6		

表 4 Bag-1 及 VEGF 在肝癌中的表达关系 (例)

		VEGF		χ^2	P
		+	-		
Bag-1	+	40	8	12.273	0.001
	-	4	8		

表 5 Bcl-2 及 VEGF 在肝癌中的表达关系 (例)

		VEGF		χ^2	P
		+	-		
Bcl-2	+	41	4	29.091	0.000
	-	3	12		

表 6 VEGF、Bag-1 和 Bcl-2 表达与生存率的相关性

		例数	生存率 (%)		P
			1 年	2 年	
VEGF	+	44	73.2	15.4	0.033
	-	16	86.7	56.9	
Bag-1	+	48	72.5	19.0	0.040
	-	12	92.2	57.7	
Bcl-2	+	45	73.8	20.0	0.038
	-	15	93.2	58.6	

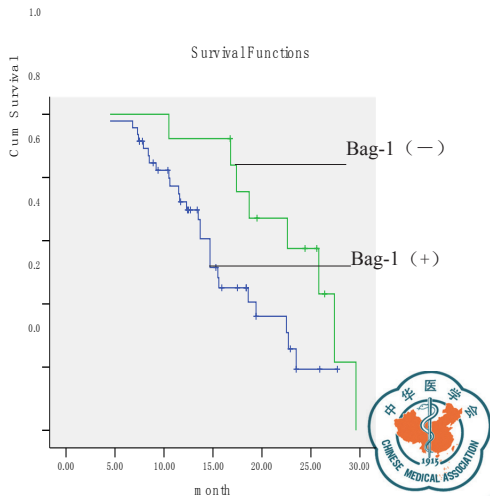


图2 Bag-1 阳性表达组患者与阴性组患者生存曲线

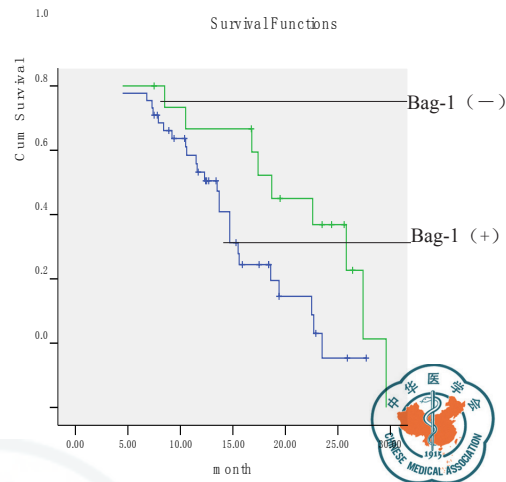


图3 Bcl-2 阳性表达组患者与阴性组患者生存曲线

性肿瘤的分化及 TNM 分期密切相关^[5-6]。李莹等^[7]在胃癌的扩散转移中 Bag-1 起着重要作用。本研究表明,患者 1 年和 2 年生存率比较结果显示, Bag-1 阳性患者的生存率显著低于阴性患者,差异具有统计学意义,故 Bag-1 可能对肝癌患者的预后产生一定的影响。与孙念峰等^[8]研究结果相似, Bag-1 与结肠癌患者 5 年生存率呈显著相关性,肿瘤分期越晚, Bag-1 的阳性表达率越高,患者预后也越差。多数研究发现, Bag-1 在乳腺癌细胞浆中有高水平表达,并与患者较短的生存时间及总的存活数显著相关。但是,另外一些研究提出了相反的观点,即肿瘤中 Bag-1 的过表达可降低患者的死亡风险,并且可以作为预测患者良好预后的一项指标^[9]。故 Bag-1 与肿瘤预后的相关性仍需进一步研究。

本研究发现, Bcl-2 在肝癌组织、癌旁肝组织及正常肝组织中表达差异具有统计学意义。钱燕春等^[10]认为 Bcl-2 与肝癌临床分期、淋巴结转移及预后呈正相关。本研究与之相似, Bcl-2 与肝癌是否有淋巴结转移、临床分期、是否有包膜存在、癌栓的形成与否等密切相关。Tsamandas 等^[11]认为 Bcl-2 与胃癌的发生有关,并与其分化程度及淋巴结转移有关。可能是因为 Bcl-2 使细胞凋亡程序紊乱,导致肿瘤细胞过度生长、分裂,使细胞恶性程度增加,进而促使肿瘤发展,并出现转移。但有学者认为, Bcl-2 仅在肿瘤早期发生过程中发挥作用,而与肿瘤进一步发展无关。彭鹏等^[12]认为,胃癌的癌变前期过程与 Bcl-2 密切相关,而进展期与其无关,故 Bcl-2 可作为胃黏膜早期癌变的监测指标。故 Bcl-2 在肿瘤发生、发展过程中的作用仍需进一步明确。本研究中患者 1 年和 2 年生存率比较结果

显示, Bcl-2 阳性患者的生存率显著低于阴性患者。李冬霞等^[13]研究提示 Bcl-2 可影响胃癌患者的预后,与本研究结果相似。但是目前一些研究也表明, Bcl-2 与进展期胃癌、乳腺癌患者的预后无关,故仍需进一步进行研究。

目前,许多文献报道了血管内皮生长因子(VEGF)与人多种恶性肿瘤的生长、侵袭、转移及预后密切相关。目前关于 VEGF 与肝癌关系的研究较多。本研究中, VEGF 与肝癌是否存在有淋巴结转移、临床分期、是否有包膜存在、癌栓的形成与否等密切相关,而与患者性别、年龄、肿瘤分级及大小、甲胎蛋白(AFP)水平等无关。王智霞等^[14]研究发现,肝癌组织中 VEGF 的表达水平显著高于癌旁和远癌组织,肿瘤包膜的形成和肿瘤远处转移与 VEGF 的表达密切相关。可能是肝癌细胞因 Bag-1 和 Bcl-2 等抗凋亡因素的存在,出现生存期延长,快速生长,故对氧和营养的需求增加,易导致癌细胞缺氧,而缺氧是 VEGF 最强诱导剂,导致 VEGF 大量分泌并与 VEGFR 特异性结合,从而可使血管内皮细胞生长、繁殖和分化,导致生成新的血管,又会促进肿瘤的增长、浸润及转移,故形成一个往复循环。肿瘤的恶性程度越高、体积越大则对氧的需求越高,故 VEGF 的分泌则越多。新生的血管基底膜不完整,血管壁薄,肿瘤细胞易渗透至细胞间隙,形成浸润,肿瘤细胞穿透到血管内使顺血流到远端部位,形成转移灶。目前许多研究结果显示, VEGF 是目前促进肿瘤血管生成的最重要的因子,其可以作为立指标来预测肿瘤患者的预后。但张帅等^[15]研究表明, VEGF 对晚期肝癌的血管行程中无明显作用,对晚期肝癌患者的预后无关。

本研究中60例肝癌中Bag-1和Bcl-2、Bag-1和VEGF、Bcl-2和VEGF的表达呈显著正相关,提示Bag-1和Bcl-2、Bag-1和VEGF、Bcl-2和VEGF呈“配体-受体”关系。这种模式可能使二者相互诱导对方的表达,形成了一个正反馈环路。Bag-1和Bcl-2呈正相关报道较多,在乳腺癌患者中, Bag-1与Bcl-2的表达呈显著相关性,对乳腺癌的发生、发展起到重要作用, Bag-1和VEGF与乳腺癌的发生、发展关系密切,二者在乳腺癌中的表达呈高度一致性。关于Bcl-2和VEGF相关性的报道较少,该观点尚需进一步研究来证实。

Bag-1与Bcl-2呈协同作用,抑制肿瘤细胞的凋亡,延长瘤细胞的存活时间,使肿瘤生长过快,进而出现组织缺氧,从而诱导瘤细胞分泌VEGF,促进肿瘤血管的生成,为肿瘤的侵袭及转移奠定了基础。三者间可能存在一个反馈循环路径,它们之间的协同作用进一步导致肿瘤的发展,为临床的治疗增加了困难,但同时也将为临床和基础研究提供新的领域,为肿瘤的治疗提供新的途径。

参考文献

- 1 Kikachi R, Noguchi T, Takeno S, et al. Nuclear bag-1 expression reflects malignant potential in colorectal carcinoma[J]. *British J Cancer*,2002,87(10):1136-1139.
- 2 Sinicrope FA, Rusan SB, Cleary KR, et al. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis[J]. *Cancer Res*,1995,55(3):237-241.
- 3 刘鹏,孙慧,宁连胜,等. 血管内皮生长因子与乳腺癌临床病理因素及预后的关系[J]. *天津医科大学学报*,2002,8(2):144-146.
- 4 Noguchi T, Takeno S, Shibata T, et al. Nuclear bag-1 expression is a biomarker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Disesophagus*,2003,16(2):107-111.
- 5 陈永华,师水生. 胃腺癌Bag-1蛋白的表达及临床意义[J]. *临床医药实践杂志*,2008,1(6):432-434.
- 6 石艳辉,孙钰清,卓越. 胃癌组织中Bag-1, BCL-2, PCNA的表达[J]. *黑龙江医药科学*,2005,12,28(6):13-15.
- 7 李莹,麻日虎,杨兵,等. 抗凋亡基因Bag-1在胃癌组织的表达及其临床意义[J]. *中国药物与临床*,2011,11(5):522-523.
- 8 孙念峰,张建良,王国斌. 抗凋亡基因Bag-1和Bcl-2在结肠癌组织中的表达及相互关系的研究[J]. *中国现代普外科进展*,2008,11(5):395-398.
- 9 Turner BC, Krajewski S, Krajewska M, et al. Bag-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer[J]. *J Clin Oncol*,2001,19(4):992-1000.
- 10 钱燕春,唐平. 肝细胞癌中Bcl-2及Bax基因的表达及临床意义[J]. *中国当代医药杂志*,2009,16(8):10-11.
- 11 Tsamandas AC, Kardamakis D, Tsiomalos P, et al. The potential role of Bcl-2 expression, apoptosis and cell proliferation (Ki-67 expression) in case of gastric carcinoma and correlation with classic prognostic factors and patient outcome[J]. *Anticancer Res*,2009,29(2):703-709.
- 12 彭鹏,邹文荣. P53, VEGF, Bcl-2在进展期胃癌组织中的表达[J]. *现代医药卫生*,2011,27(2):184-186.
- 13 李冬霞,司艳莉,邓晓慧,等. 52例胃癌组织中的Survivin和Bcl-2蛋白表达研究. *重庆医学*,2011,40(2):2206-2207.
- 14 王智霞,乔玉春. IGF- II与VEGF在肝癌组织中的表达及相关性研究[J]. *河北医药*,2012,12(2):158-159.
- 15 张帅,古维立,杨劭宇,等. 肝癌促血管生成因子对肝癌手术预后的影响[J]. *中国普通外科杂志*,2011,20(7):708-712.

(收稿日期: 2013-10-31)

(本文编辑: 孙荣华)

兰涛,苑建磊,周国庆,等. 血管内皮生长因子和凋亡抑制基因在肝细胞癌中的表达及与预后的相关性[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2014, 8(2): 198-202.

中华医学会