

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.04.0459

· 短篇论著 ·

缺氧诱导因子 1 α 和血管内皮生长因子在子宫内膜癌中的表达及临床意义

孙文惠子¹, Dhruba Paudel¹, 欧阳一芹^{2*}, 宋思蕊², 童晓文², 李怀芳², 王建军², 初磊²

1. 同济大学医学院, 上海 200092

2. 同济大学附属同济医院妇产科, 上海 200065

[摘要] **目的** 分析缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 在子宫内膜癌和癌旁组织中的表达差异, 探讨缺氧状态以及这 2 种蛋白在子宫内膜癌发生、发展中的临床意义。**方法** 选择 2011 年 1 月至 2012 年 12 月在同济大学附属同济医院接受手术治疗的子宫内膜癌患者 128 例, 采用免疫组织化学法检测术后癌组织和配对癌旁组织中 HIF1- α 和 VEGF 蛋白表达, 并对患者进行定期随访, 分析这 2 种蛋白表达与患者预后的关系。构建人子宫内膜癌细胞缺氧模型, 检测细胞中 HIF1- α 和 VEGF 蛋白表达, 并观察细胞增殖、侵袭及凋亡情况。**结果** 子宫内膜癌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白阳性表达率均高于癌旁组织 (P 均 <0.05), HIF-1 α 蛋白在淋巴结转移阳性、高组织学分级、肿瘤最大径 ≥ 4 cm 和孕激素受体阳性的患者中阳性率较高 (P 均 <0.05), VEGF 蛋白在淋巴结转移阳性、高组织学分级、肌层浸润较深、肿瘤最大径 ≥ 4 cm、雌激素受体阳性、孕激素受体阳性和高病理分期的患者中阳性率较高 (P 均 <0.05); HIF-1 α 阴性患者的 5 年总生存率高于阳性患者 ($P<0.05$), VEGF 阴性患者 5 年总生存率与阳性患者相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。人子宫内膜癌细胞缺氧模型中, HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达均增加 (P 均 <0.05), 细胞增殖和侵袭能力均增强 (P 均 <0.05), 凋亡减少 ($P<0.05$)。**结论** HIF-1 α 和 VEGF 蛋白与子宫内膜癌的发展有关, HIF-1 α 蛋白表达阳性提示预后不良。

[关键词] 子宫内膜肿瘤; 缺氧诱导因子 1 α ; 血管内皮生长因子类; 预后

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)04-0459-05

Expression and clinical significance of hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor in endometrial cancer

SUN Wen-hui-zi¹, Dhruba Paudel¹, OUYANG Yi-qin^{2*}, SONG Si-rui², TONG Xiao-wen², LI Huai-fang², WANG Jian-jun², CHU Lei²

1. Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China

[Abstract] **Objective** To investigate the difference of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in endometrial cancer and para-carcinoma tissues, and to explore the clinical significance of hypoxia and the two proteins in the development and progression of endometrial cancer. **Methods** From Jan. 2011 to Dec. 2012, 128 patients with endometrial cancer underwent surgery in Tongji Hospital of Tongji University. The expression of HIF-1 α and VEGF in cancer tissues and paired para-carcinoma tissues was detected using immunohistochemical method. The patients were followed up regularly, and the relationship between the expression of HIF-1 α and VEGF and the prognosis of the patients was analyzed. The hypoxic cell model of human endometrial cancer was constructed to detect the expression of HIF-1 α and VEGF proteins and observe the cell proliferation, invasion and apoptosis. **Results** The positive rates of HIF-1 α and VEGF in cancer tissues were significantly higher than those in the para-carcinoma tissues (both $P<0.05$). The positive rate of HIF-1 α was higher in the patients with lymph node metastasis, high histological grade, maximal tumor diameter ≥ 4 cm or positive progesterone receptor (all $P<0.05$). The positive rate of VEGF was higher in the patients with lymph node metastasis, high histological grade, deep myometrial invasion, maximal tumor diameter ≥ 4 cm, positive estrogen receptor, positive progesterone receptor or high pathological stage (all $P<0.05$). The 5-year overall survival rate of the

[收稿日期] 2019-01-01 **[接受日期]** 2019-02-22

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目(16411950200), 中央高校基本科研业务费学科交叉项目(0400219380). Supported by Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (16411950200) and Interdisciplinary Project of Basic Scientific Research Fees of Central Universities (0400219380).

[作者简介] 孙文惠子, 硕士生. E-mail: 1731205@tongji.edu.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-66111051, E-mail: oyyq1124@hotmail.com

patients with negative HIF-1 α was significantly higher than that of the patients with positive HIF-1 α ($P < 0.05$), while there was no significant difference in the 5-year overall survival rate between the patients with negative and positive VEGF ($P > 0.05$). In the hypoxic cell model of human endometrial cancer, the expression levels of HIF-1 α and VEGF were significantly increased, cell proliferation and invasion were significantly increased, and the cell apoptosis was significantly reduced (all $P < 0.05$). **Conclusion** HIF-1 α and VEGF are related to the progress of endometrial cancer, and positive expression of HIF-1 α indicates a poor prognosis.

[Key words] endometrial neoplasms; hypoxia-inducible factor 1 α ; vascular endothelial growth factors; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(4): 459-463]

子宫内膜癌是发生于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤,好发于围绝经期和绝经后女性,其发病率在女性常见恶性肿瘤中位居第6位^[1]。研究表明,在子宫内膜癌形成和发展过程中存在缺氧情况,缺氧状态也会严重影响子宫内膜癌的发展^[2]。缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是由氧敏感的 α 亚基和组成型表达的 β 亚基(也称为芳烃受体核易位蛋白)组成的异二聚体,可通过调节葡萄糖摄取、能量代谢、血管生成、红细胞生成、细胞增殖和凋亡、细胞-细胞和细胞-基质相互作用来调节低氧状态下的细胞功能^[3-4]。研究发现,HIF特别是HIF-1 α 和HIF-2 α 与肿瘤的发生、转移和上皮-间质转化有关^[5-6]。

肿瘤转移最常见的方式是通过血液和(或)淋巴结,血管生成对肿瘤生长和转移至关重要。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的血管生成因子之一,能够促进新血管和淋巴管的形成^[7],并增加血管外基质的沉积,为建立新的毛细血管网提供营养^[8]。本研究拟探讨HIF-1 α 和VEGF在子宫内膜癌中的表达情况及其临床意义。

1 资料和方法

1.1 临床研究

1.1.1 研究对象 选择2011年1月至2012年12月在同济大学附属同济医院接受手术治疗的子宫内膜癌患者128例。入选标准:(1)子宫内膜癌的确诊均经术后病理学检查确诊;(2)初次诊断为子宫内膜癌,入院时未接受任何化学治疗或手术治疗;(3)排除临床资料不完整、继发性肿瘤、多器官功能衰竭和多发性肿瘤的患者。通过医院病历查询系统查询宫颈癌患者的一般资料和临床病理学指标。本研究通过同济大学附属同济医院伦

理委员会批准。初诊时,128例患者的平均年龄为(58.20 \pm 10.36)岁。

1.1.2 标本采集与保存 获取每例患者的子宫内膜癌组织和癌旁正常组织(距离肿瘤 \geq 3 cm),分别进行液氮冷冻保存和病理组织切片。

1.1.3 免疫组织化学法检测 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达 将载玻片置于重铬酸钾和浓硫酸混合液中浸泡1 h,然后用流水冲洗载玻片,冲洗后将载玻片浸泡于乙醇中,最后放置于37 $^{\circ}$ C温箱中烘干;在铁模具中加入液态石蜡,将组织置于石蜡中进行包埋;将石蜡标本切片,放置于40 $^{\circ}$ C温水中浸泡5 min,捞取后于37 $^{\circ}$ C恒温箱中烘干;载玻片梯度脱蜡;抗原修复和血清封闭后加入一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;加入二抗,37 $^{\circ}$ C温箱孵育30 min;取出后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗3次,每次5 min,擦干后加入SABC,于37 $^{\circ}$ C温箱孵育30 min。

1.1.4 随访 自确诊时起,对所有研究对象定期随访,随访问隔为4周。通过面对面访问和查阅患者疾病档案的方式了解患者的疾病进展。随访终止时间为2017年12月31日。总生存期定义为自初诊为子宫内膜癌开始至患者因子宫内膜癌死亡或随访终止的时间,无进展生存期定义为从随访时间开始至患者出现复发、死亡、肿瘤相关并发症或继发第二肿瘤的时间。

1.2 人子宫内膜癌细胞实验

1.2.1 细胞分组与增殖能力检测 在对数生长期,选取生长状态良好的KLE细胞(人子宫内膜癌细胞),铺96孔板,并做好标记;每孔接种细胞 1×10^6 个,置于细胞培养箱中培养,并密切观察细胞生长状态。待细胞贴壁生长后,将细胞分为缺氧组和对照组,缺氧组加入160 μ L二氯化钴干预液,对照组加入等量的PBS。分别在干预后0、

24、48 和 72 h 用酶标仪检测细胞光密度值, 拟合曲线并计算标准曲线方程, 计算细胞数。

1.2.2 蛋白质印迹法检测 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的表达 收集各组细胞, 裂解后离心取上清, 凝胶电泳后转膜, 牛奶封闭。加入 HIF-1 α 和 VEGF 抗体 (英国 Abcam 公司) 于 4 °C 下孵育过夜, 用 TBST 洗膜; 加入二抗室温下孵育 1 h; TBST 洗膜后进行化学发光反应曝光。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期 每组收集 1×10^6 个细胞于流式管中, 用 PBS 冲洗 3 次, 用 75% 乙醇涡旋混匀, 于 4 °C 下避光过夜, 次日离心后去除上清, 用 PBS 洗去乙醇, 使用 7-氨基放线菌素 D (7-aminoactinomycin D, 7-AAD) 染色, 1 h 内上流式细胞仪进行检测。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 收集各组细胞, 用无血清培养液洗 3 次, 计数, 配成细胞悬液。在 Transwell 小室 (Transwell BD Matrigel, 美国 Corning 公司) 上室中加入 100 μ L 细胞悬液, 下室中加入 500 μ L 含有 20% 胎牛血清的条件培养液, 于 37 °C 培养箱中孵育 20~24 h。取出小室用 PBS 洗 2 次, 5% 戊二醛 4 °C 固定; 加入 0.1% 结晶紫, 室温染色 5~10 min; PBS 洗 2 次, 用棉球擦去上表面细胞, 在显微镜下观察, 取 9 个随机视野计数, 统计结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异的比较采用独立样本 t 检验, 多组间差异的比较采用单因素方差分析并用 Dunnett 法或 LSD 法进行两两比较; 不符合正态分布的计量资料以中位数和范围表示。计数资料以例数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白在子宫内膜癌和癌旁组织中的表达 免疫组织化学检测结果表明, HIF-1 α 和 VEGF 蛋白在子宫内膜癌组织中的阳性率分别为 75.0% (96/128) 和 64.8% (83/128), 癌旁组织中阳性率分别为 10.9% (14/128) 和 20.3% (26/128)。子宫内膜癌组织中 2 种蛋白的阳性表达率均高于癌旁组织, 差异均有统计学

意义 (P 均 < 0.05)。

2.2 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达与子宫内膜癌临床病理特征的关系 按照免疫组织化学检测结果将研究对象分为 HIF-1 α 蛋白阳性组和阴性组、VEGF 蛋白阳性组和阴性组, 分析 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达与子宫内膜癌临床病理特征的关系。结果 (表 1) 表明, HIF-1 α 蛋白在淋巴结转移阳性、高组织学分级、肿瘤最大径 ≥ 4 cm 和孕激素受体阳性的患者中阳性率较高 (P 均 < 0.05), 而与患者的年龄、肌层浸润深度、病理类型、雌激素受体状态和病理分期无明显关联 ($P > 0.05$); VEGF 蛋白在淋巴结转移阳性、高组织学分级、肌层浸润较深、肿瘤最大径 ≥ 4 cm、雌激素受体阳性、孕激素受体阳性和高病理分期的患者中阳性率较高 (P 均 < 0.05), 而与患者的年龄和病理类型无明显关联 ($P > 0.05$)。

2.3 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达与子宫内膜癌预后的关系 128 例子宫内膜癌患者随访 28.8~68.2 个月, 中位随访时间为 43.5 个月。中位总生存期为 28.9 个月 (10.3~49.2 个月), 中位无进展生存期为 21.2 个月 (8.3~39.4 个月)。HIF-1 α 蛋白阴性组 5 年总生存率和 5 年无进展生存率均高于阳性组, 差异均有统计学意义 (71.9% vs 31.3%, $P < 0.05$; 59.4% vs 17.7%, $P < 0.05$); VEGF 蛋白阴性组患者的 5 年总生存率与阳性组比较差异无统计学意义 (55.6% vs 33.7%, $P > 0.05$), 但 5 年无进展生存率高于阳性组 (48.9% vs 16.9%, $P < 0.05$)。

2.4 缺氧对 KLE 细胞中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达的影响 蛋白质印迹分析结果显示, 缺氧组细胞中 HIF-1 α 蛋白、VEGF 蛋白的相对表达量均高于对照组, 差异均有统计学意义 (5.46 ± 1.45 vs 1.12 ± 0.19 , $P < 0.05$; 3.87 ± 0.32 vs 1.13 ± 0.14 , $P < 0.05$)。

2.5 缺氧对 KLE 细胞增殖、侵袭能力的影响 细胞增殖实验表明, 干预 72 h 后, 缺氧组的细胞数多于对照组, 差异有统计学意义 ($9\ 783.0 \pm 45.6$ vs $7\ 276.0 \pm 76.3$, $P < 0.05$)。Transwell 实验检测结果显示, 干预 72 h 后, 缺氧组的穿膜细胞数多于对照组, 差异有统计学意义 (421.0 ± 16.8 vs 287.0 ± 12.5 , $P < 0.05$)。

表1 128例子宫内膜癌患者的临床病理特征与 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达的关系

临床特征	N	HIF-1 α			VEGF			n
		阳性 N=96	阴性 N=32	P 值	阳性 N=83	阴性 N=45	P 值	
年龄(岁)				0.503			0.506	
<50	38	27	11		23	15		
\geq 50	90	69	21		60	30		
淋巴结转移				<0.001			<0.001	
阳性	41	38	3		36	5		
阴性	87	58	29		47	40		
组织学分级				<0.001			0.023	
G1	49	46	3		25	24		
G2	69	42	27		52	17		
G3	10	8	2		6	4		
肌层浸润深度				0.548			<0.001	
无	22	16	6		4	18		
浅	77	56	21		53	24		
深	29	24	5		26	3		
病理类型				0.377			0.827	
腺癌	98	75	23		64	34		
鳞腺癌	21	16	5		14	7		
其他	9	5	4		5	4		
肿瘤最大径 d/cm				0.018			0.008	
<4	96	67	29		56	40		
\geq 4	32	29	3		27	5		
雌激素受体				0.690			<0.001	
阳性	105	78	27		80	25		
阴性	23	18	5		3	20		
孕激素受体				0.001			<0.001	
阳性	102	83	19		74	28		
阴性	26	13	13		9	17		
病理分期				0.888			0.012	
I 期	87	66	21		49	38		
II 期	32	23	9		26	6		
III 期	9	7	2		8	1		

HIF-1 α : 缺氧诱导因子 1 α ; VEGF: 血管内皮生长因子

2.6 缺氧对 KLE 细胞周期和凋亡的影响 流式细胞术结果表明, 缺氧组细胞在 G₀/G₁ 期的比例低于对照组 (34% vs 52%), 在 S 期和 M/G₂ 期的比例高于对照组 (S 期: 46% vs 32%; M/G₂ 期: 20% vs 16%); 同时, 缺氧组细胞的凋亡率低于对照组, 差异有统计学意义 [(4.50 \pm 0.03) % vs (8.70 \pm 0.14) %, P<0.05]。

3 讨论

血管生成对于实体瘤的生长和转移是必需的, 而 VEGF 是最有效的血管生成介质^[7]。研究发现, 胃癌患者术前血清 VEGF 水平高于对照组, 且术

前血清 VEGF 水平与 T 分期、N 分期和 TNM 分期有关^[9]。抗 VEGF 抗体联合化学治疗可延长宫颈癌患者的生存期^[10]。HIF 是氧敏感的异二聚体转录因子, 是细胞适应低氧环境的关键调节因子。研究发现, 在小细胞肺癌中, HIF-1 α 作为一种关键的转录调控因子, 调控多种细胞因子如 VEGF-A 的表达, 并促进小细胞肺癌细胞的增殖和血管生成^[11]。Ahluwalia 和 Tarnawski^[12]提出 VEGF 是 HIF-1 α 的靶基因, 受 HIF-1 α 调控进行转录, 促进低氧条件下肿瘤的血管生成进而促进肿瘤转移。

本研究以 128 例子宫内膜癌患者为研究对象, 结果发现癌组织中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白的阳

性表达率高于癌旁组织,且2种蛋白的表达与淋巴结转移、组织学分级、肿瘤大小有关,是肿瘤发生发展的重要因素。进一步通过人子宫内膜癌细胞模拟缺氧环境,观察其侵袭、增殖及凋亡情况,发现缺氧能促进子宫内膜癌细胞增殖和侵袭,抑制细胞凋亡。本研究结果表明HIF-1 α 、VEGF表达与子宫内膜癌的发生、发展密切相关,VEGF、HIF-1 α 极有可能诱导癌细胞的浸润、转移,是子宫内膜癌侵袭性生物学行为的标志物之一。

VEGF与各个受体的相互作用是血管生成的关键过程,血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)的表达通常局限于血管内皮细胞,被广泛认为是驱动血管生成的主要受体^[13],且被认为是调节内皮细胞增殖和迁移的关键信号^[14]。本研究未探讨VEGF与其受体的关系,HIF-1 α -VEGF-VEGFR途径是否在子宫内膜癌的转移中起重要作用仍需进一步研究。明确HIF-1 α 和VEGF对子宫内膜癌侵袭、转移的作用机制将为子宫内膜癌的临床治疗奠定基础。

[参考文献]

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J/OL]. *Int J Cancer*, 2015, 136: E359-E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] DIAKOS C I, CHARLES K A, MCMILLAN D C, CLARKE S J. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2014, 15: e493-e503. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70263-3.
- [3] HIROTA K. Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2015, 15: 29-40.
- [4] ESKANDANI M, VANDGHANOONI S, BARAR J, NAZEMIYEH H, OMIDI Y. Cell physiology regulation by hypoxia inducible factor-1: targeting oxygen-related nanomachineries of hypoxic cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99: 46-62.
- [5] ZHANG J, ZHU L, FANG J, GE Z, LI X. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 α activation[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 29. doi: 10.1186/s13046-016-0306-2.
- [6] YANG J, ZHANG X, ZHANG Y, ZHU D, ZHANG L, LI Y, et al. HIF-2 α promotes epithelial-mesenchymal transition through regulating Twist2 binding to the promoter of E-cadherin in pancreatic cancer[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 26. doi: 10.1186/s13046-016-0298-y.
- [7] WIECK M M, SPURRIER R G, LEVIN D E, MOJICA S G, HIATT M J, REDDY R, et al. Sequestration of vascular endothelial growth factor (VEGF) induces late restrictive lung disease[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11: e0148323. doi: 10.1371/journal.pone.0148323.
- [8] ZHANG Y, LIU X, ZHANG J, LI L, LIU C. The expression and clinical significance of PI3K, pAkt and VEGF in colon cancer[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4: 763-766.
- [9] WU J, LIU X, WANG Y. Predictive value of preoperative serum CCL2, CCL18, and VEGF for the patients with gastric cancer[J/OL]. *BMC Clin Pathol*, 2013, 13: 15. doi: 10.1186/1472-6890-13-15.
- [10] ROSEN V M, GUERRA I, MCCORMACK M, NOGUEIRA-RODRIGUES A, SASSE A, MUNK V C, et al. Systematic review and network meta-analysis of bevacizumab plus first-line topotecan-paclitaxel or cisplatin-paclitaxel versus non-bevacizumab-containing therapies in persistent, recurrent, or metastatic cervical cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2017, 27: 1237-1246.
- [11] WAN J, MA J, MEI J, SHAN G. The effects of HIF-1 α on gene expression profiles of NCI-H446 human small cell lung cancer cells[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 150. doi: 10.1186/1756-9966-28-150.
- [12] AHLUWALIA A, TARNAWSKI A S. Critical role of hypoxia sensor—HIF-1 α in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing[J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 90-97.
- [13] CLARKE J M, HURWITZ H I. Targeted inhibition of VEGF receptor 2: an update on ramucirumab[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2013, 13: 1187-1196.
- [14] LIN S W, HUANG S C, KUO H M, CHEN C H, MA Y L, CHU T H, et al. Coral-derived compound WA-25 inhibits angiogenesis by attenuating the VEGF/VEGFR2 signaling pathway[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13: 861-878.