

· 论 著 ·

## 肝内胆管癌组织中 PIGF 的表达与 MVD 的关系

傅翔<sup>1</sup>, 王济明<sup>1△</sup>, 张雷<sup>2</sup>, 谢焯<sup>2</sup>, 姜歆<sup>3</sup>, 李刚<sup>3</sup>

(1. 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科 400016; 重庆市中山医院; 2. 普外科; 3. 病理科 400013)

**摘要:**目的 研究肝内胆管癌(ICC)组织中 PIGF 的表达与微血管密度(MVD)的关系。方法 通过免疫组织化学的方法检测 50 例肝内胆管癌及 8 例正常肝组织胆管上皮细胞胎盘生长因子(PIGF)的表达及 MVD。结果 ICC 组织 PIGF 阳性表达率、强阳性表达率分别为 54%、28%, 正常肝组织胆管上皮细胞 PIGF 阳性表达率、强阳性表达率分别为 25%、0%, ICC 组织 MVD 及正常肝组织 MVD 分别为 52.88±21.40、14.86±3.38, ICC 组织 PIGF(+)、(++) 表达率及 MVD 均显著高于正常肝内胆管上皮细胞( $P<0.05$ )。胆管癌 PIGF(++) 组、PIGF(+) 组及 PIGF(-) 组 MVD 分别为 65.36±22.87、51.80±18.12、36.68±17.80, 胆管癌 PIGF(++) 组 MVD>PIGF(+) 组 MVD>PIGF(-) 组 MVD, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 PIGF 在肝内胆管癌的发生、发展中起着一定的作用, 尤其是在血管生成方面。

**关键词:**胆管, 肝内; 胆管肿瘤; 胎盘生长因子; 微血管密度; 血管生成

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)12-1152-03

## Relationship between the expression of PIGF and MVD in human intrahepatic cholangiocarcinoma

Fu Xiang<sup>1</sup>, Wang Jiming<sup>1△</sup>, Zhang Lei<sup>2</sup>, Xie Wei<sup>2</sup>, Jiang Xin<sup>3</sup>, Li Gang<sup>3</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of General Surgery, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China; 3. Department of Pathology, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400013, China)

**Abstract:** Objective To study the relationship between the PIGF expression and MVD in human intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). **Methods** The expression of PIGF and MVD were examined by immunohistochemistry in 50 human intrahepatic cholangiocarcinoma tissues and 8 normal liver tissues. **Results** The (+) and (++) expression rate of PIGF were 54% and 28% in ICC tissues, 25% and 0% in biliary epithelium of the normal liver tissues, respectively. The MVD of ICC tissues and normal liver tissues were 52.88±21.40 and 14.86±3.38, respectively. The (+) and (++) expression rate of PIGF and MVD in ICC tissues were significantly higher than that in normal liver tissues ( $P<0.05$ ). The MVD of PIGF(++) group, PIGF(+) group, and PIGF(-) group were 65.36±22.87, 51.80±18.12, and 36.68±17.80, respectively. The MVD of PIGF(++) group was higher than that of PIGF(+) group, MVD of PIGF(+) group was higher than that of PIGF(-) group, and the differences were significant ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PIGF is related to ICC. The increased PIGF expression may be one of the factors that promote angiogenesis in human ICCs.

**Key words:** bile ducts; intrahepatic; bile duct neoplasms; PIGF; MVD; angiogenesis

原发性肝癌有三种组织学类型, 肝细胞癌、胆管细胞癌(即肝内胆管癌)及混合细胞性肝癌。肝内胆管癌(ICC)在原发性肝癌中仅次于肝细胞癌且其预后较肝细胞癌差, 近年来它的发病率和病死率均呈上升趋势<sup>[1-3]</sup>, 术后 5 年生存率仅为 22%~36%<sup>[4]</sup>。血管生成在肿瘤的发生、生长、浸润和转移过程中扮演着极其重要的角色<sup>[5-6]</sup>。目前测量肿瘤微血管密度(MVD)是评价血管生成的主要方法之一。胎盘生长因子(PIGF)属于血管内皮细胞生长因子(VEGF)家族, 具有多种生物学作用, 能刺激血管内皮细胞生长、迁移和扩增, 引起白细胞浸润, 肿瘤生长等<sup>[7]</sup>。本实验旨在测量各种分化程度肝内胆管癌及正常非肿瘤性肝组织标本中 PIGF 的表达和他们的 MVD, 研究他们的联系, 以期找到促进肿瘤血管生成的因素, 为探索新的治疗方式、方法提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** (1) ICC 组: 选取第三军医大学病理科 2006 年至 2010 年手术切除治疗的 ICC 患者石蜡标本 50 例, 所有患者术后标本均经两位有经验的病理科医师根据 2000 年世界卫生组织(WHO)制定的 ICC 病理诊断标准重新分级。50 例患

者中, 男 22 例, 女 28 例, 平均年龄 61.4 岁。术中发现有淋巴结转移 7 例, 病理分型高分化 18 例, 中分化 23 例, 低分化 9 例。所有患者术前均未行放疗、化疗及免疫治疗。(2) 对照组: 选取重庆市中山医院非肿瘤后立即尸解的正常肝组织 8 例, 男 5 例, 女 3 例, 平均年龄 54.7 岁。

**1.2 试剂** 兔抗人胎盘生长因子多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。鼠抗人 CD34 单克隆抗体(克隆号: QBEnd/10)购自福州迈新生物技术开发有限公司。广谱 SP 免疫组化检测试剂盒(SP-0022)购自北京博奥森生物技术有限公司。

**1.3 方法** 标本经甲醛固定, 常规脱水、石蜡包埋, 连续 4 μm 切片。脱蜡至水。分别进行常规 HE 染色及免疫组化染色(二步法), 阴性对照以 PBS 液代替一抗。免疫组化具体步骤: 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min, 微波修复 20 min, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶活性。山羊血清封闭, 室温孵育 15 min 后倾去。滴加一抗, 37℃ 孵育 3 h。PBS 冲洗 3 min×3 次, 滴加生物素化二抗工作液, 37℃ 孵育 15 min。PBS 冲洗 3 min×3 次, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作

液,37℃孵育 15 min,PBS 冲洗。DAB 显色剂显色,自来水冲洗,苏木素复染。梯度酒精脱水、透明、封片。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组化结果判定

1.4.1 PIGF 阳性结果判定 PIGF 阳性表达为肿瘤细胞胞浆染成棕黄色,评价均采用 Fromowitz 等<sup>[8]</sup>提出的阳性细胞半定量分级法。高倍镜下计数 1 000 个肿瘤细胞,将阳性肿瘤细胞的百分率和染色强度分别计分。具体计分标准如下:(1)阳性细胞的百分率小于 5%为 0 分,5%~<26%为 1 分,26%~<51%为 2 分,51%~76%为 3 分,>76%为 4 分。(2)阳性细胞的染色强度为无染色为 0 分,染成淡棕黄色 1 分,染成中等棕黄色 2 分,染成深棕黄色或胞浆中出现深棕色斑块 3 分。(1)+(2)为组织总积分,总分为 0~7 分。0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4~7 分为强阳性(++).

1.4.2 MVD 的测定 在不知道患者结局的情况下,由两位有经验的病理医师测定 MVD。光镜下,CD34 染色阳性细胞呈棕黄色。采用 Weidner 的方法进行 MVD 测定<sup>[9]</sup>。首先在低倍镜(5×10)下扫视整个切片,寻找血管高密度集中的区域作为“热点”。然后在高倍镜(20×10)下计数微血管数目,每例标本计数 5 个高倍视野,取其平均值作为该标本的微血管数。任何呈棕黄色的阳性内皮细胞或内皮细胞簇,只要与邻近血管、肿瘤细胞或其他结缔组织成分分界清楚,无论有无血管腔,即可计为 1 个微血管数。但肌层较厚及管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管不作为计数对象。

1.4.3 ICC 组织分化程度判定 ICC 根据形态学可分为高、中、低分化腺癌。在常见类型腺癌中,高分化癌形成均一的管状或乳头状结构,中分化腺癌显示中度扭曲的管状,伴有筛状和(或)条索状结构,而低分化癌则为严重扭曲的管状结构,有明显的细胞多形性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS17.0 进行数据处理。所有资料均经过正态性检验。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料两组样本均数间的比较采用两独立样本的 *t* 检验,计量资料多组样本均数间的比较采用单因素方差分析,多组独立样本之间率的比较采用均采用卡方检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PIGF 主要表达于细胞浆,在 ICC 组织中其阳性率为 54.00%,强阳性率为 28.00%;正常肝组织胆管上皮细胞中其阳性率为 25.00%,无强阳性发现。两组构成差别具有统计学意义( $P < 0.05$ )。在正常肝组织,CD34 主要表达于汇管区小血管及中央静脉,正常肝组织的肝窦对 CD34 基本不反应。ICC 组织 MVD 为  $52.88 \pm 21.40$ ,正常肝组织门管区 MVD 为  $14.86 \pm 3.38$ ,两者差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见封 2 图 1、2,表 1。

2.2 ICC 组根据 PIGF 表达情况,将其分为 PIGF(-)、(+)及(++)组,分别计算其 MVD 值,可见 PIGF(++)组 MVD 值大于 PIGF(+)组 MVD 值大于 PIGF(-)组 MVD 值,采用单因素方差分析计算  $P < 0.05$ 。PIGF(-)与(+),(-)与(++),(+)与(++)两两比较,3 组间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

ICC 组根据其分化程度情况,将其分为低分化、中分化及高分化组,分别计算其 MVD 值,可见低分化组 MVD>中分化组 MVD>高分化组 MVD,但采用单因素方差分析计算  $P > 0.5$ ,差异不具有统计学意义,见表 3。

2.3 ICC 患者组中,PIGF 阴性者,低、中、高分化所占比例分别为:11.1%,55.6%,33.3%;PIGF 阳性者,低、中、高分化所占比例分别为:25.9,40.7,33.3;PIGF 强阳性者,低、中、高分化所占比例分别为:7.1%,50.0%,42.9%,差异不具有统计学意义( $P = 0.602$ ),见表 4。

2.4 ICC 患者组中,PIGF(-)组、(+)组、(++)组发生淋巴结转移者所占比例分别是:11.1%、14.9%、14.2%,差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 5。

表 1 ICC 组与对照组 PIGF 表达情况及 MVD 值

组别	PIGF(n)			MVD	P
	-	+	++		
ICC 组	9	27	14	$52.88 \pm 21.40$	
对照组	6	2	0	$14.86 \pm 3.38$	$< 0.05$

表 2 PIGF(-)、(+)、(++)组 MVD 值

组别	MVD	P
PIGF		
-	$36.68 \pm 17.80$	
+	$51.80 \pm 18.12$	
++	$65.36 \pm 22.87$	$< 0.05$

表 3 ICC 低、中、高分化组 MVD 值

分化程度	MVD	P
低	$58.17 \pm 20.55$	
中	$54.41 \pm 23.94$	
高	$48.27 \pm 18.42$	$> 0.05$

表 4 ICC 组织中 PIGF 的表达与分化程度的关系

项目	分化程度(n)			P
	低分化	中分化	高分化	
PIGF				
-	1	5	3	
+	7	11	9	
++	1	7	6	$> 0.05$

表 5 ICC 组织中 PIGF 的表达与淋巴结转移的关系

项目	无淋巴结转移(n)	有淋巴结转移(n)	P
PIGF			
-	8	1	
+	23	4	
++	12	2	$> 0.05$

3 讨 论

肿瘤的生长必须有血液供应,相应地在肿瘤生长过程中血管生成显得尤为重要。如果没有血管生成,当肿瘤直径达到 0.2~2.0 mm 时肿瘤就会因缺氧而停止生长<sup>[10]</sup>。肿瘤血管生成是一个极其复杂的过程,参与的细胞因子众多,但近年来众多研究证明 VEGF 家族成员在这一过程中起着极其重要的作

用<sup>[11-13]</sup>。VEGF 家族成员包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及 PlGF 等。PlGF 是一种分泌型同源二聚体糖蛋白,正常表达于胎盘组织滋养叶细胞,具有促进滋养细胞增殖和介导血管生成等作用,能刺激血管内皮细胞生长、迁移和扩增,引起白细胞浸润,肿瘤生长等<sup>[7]</sup>。通过对小鼠 PlGF 基因沉默的研究表明 PlGF 表达的缺失不会对小鼠的生长发育、生殖和生存产生影响。然而 PlGF 表达缺失的小鼠在病理状态下表现出明显的血管生成和动脉生成障碍。比如缺血和肿瘤发生,虽然以上两种情况 VEGF-A 表达均正常的增加,但仍然表现出血管生成和动脉生成障碍。在 PlGF 特异性的受体 VEGFR-1 表达缺陷的小鼠同样出现血管生成和动脉生成障碍,这些数据提示在病理状态下 VEGF-A 依赖的血管生成中,PlGF 扮演着关键的角色<sup>[14]</sup>。近年来的多项研究表明 PlGF 与肿瘤血管生成存在着密切的关系。Carmeliet 等<sup>[15]</sup>通过实验发现表达 PlGF 的纤维肉瘤在野生型小鼠体内生长得最大,血管化程度最高,不表达 PlGF 的纤维肉瘤在 PlGF 缺陷小鼠体内生长的最小,血管化程度最低。Chen 等<sup>[16]</sup>发现胃癌组织中 PlGF 表达明显高于癌旁非肿瘤黏膜,其表达水平与 MVD、肿瘤浸润、淋巴结转移、肿瘤分期等有明显相关性。Wei 等<sup>[17]</sup>发现结肠癌组织中 PlGF 主要表达于结肠癌细胞,在结肠癌组织中表达水平明显高于非癌组织,且与肿瘤分期正相关,与生存率负相关。

ICC 属于原发性肝癌第二常见的类型,目前国内尚未见有关其表达 PlGF 与血管生成的研究。在本实验中,作者从蛋白质水平对 ICC 组织及正常肝组织中 PlGF 进行检测,并测定他们的 MVD。作者发现 PlGF 在 ICC 组织中的阳性率及强阳性率均远大于正常肝组织中的胆管上皮细胞( $P < 0.05$ ),ICC 组织 MVD 明显高于正常肝组织 MVD( $P < 0.05$ )。PlGF(++) 组、PlGF(+) 组及 PlGF(-) 的 MVD 依次呈递减关系( $P < 0.05$ ),这提示 PlGF 可能在 ICC 的发生、发展中起着一定的作用,并参与了 ICC 血管生成的调控,促进新生血管的增殖,增殖的血管又为肿瘤的生长提供了温床,形成恶性循环。此结果与 Takamura 等<sup>[18]</sup>的实验结果亦相符。但肿瘤血管生成是一个极其复杂的过程,参与的细胞因子及信号传导途径众多,在这其中,PlGF 究竟扮演着一个什么样的角色,它的上游分子又是什么,还需要进一步实验加以证明。不同分化程度癌组织的 MVD 有轻微差别,但没有统计学意义( $P < 0.05$ ),究其原因,可能和癌旁组织炎症反应引起的血管生成有一定关系,还需进一步研究。除此之外,没有发现 PlGF 的表达与癌组织分化程度和淋巴结转移有相关性( $P > 0.05$ )。

综上所述,作者认为 PlGF 在 ICC 的发生、发展中起着一定的作用,尤其是在血管生成方面。可能成为 ICC 的治疗的新靶点。

#### 参考文献:

- Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States[J]. *Hepatology*, 2001, 33(6):1353-1357.
- Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Arora S, et al. Increase in mortality rates from intrahepatic cholangiocarcinoma in England and Wales 1968-1998[J]. *Gut*, 2001, 48(6):816-820.
- Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M. Cholangiocarcinoma: recent progress. part 1: epidemiology and etiology[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(10):1049-1055.
- Jarnagin WR, Shoup M. Surgical management of cholangiocarcinoma[J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(2):189-199.
- Bernstein LR, Liotta LA. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis[J]. *Curr Opin Oncol*, 1994, 6(1):106-113.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(1):4-6.
- Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, et al. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels[J]. *Cell*, 2007, 131(3):463-475.
- Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, et al. Ras p21 expression in the progression of breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 1987, 18(12):1268-1275.
- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(1):9-19.
- Roskoski RJr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62(3):179-213.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. *Nature*, 2000, 407(6801):242-248.
- Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(10):795-803.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis[J]. *Nat Med*, 2000, 6(4):389-395.
- De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(6):241-246.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions[J]. *Nat Med*, 2001, 7(5):575-583.
- Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, et al. The significance of placenta growth factor angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer[J]. *Cancer Lett*, 2004, 213(1):73-82.
- Wei SC, Tsao PN, Yu SC, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer[J]. *Gut*, 2005, 54(5):666-672.
- Takamura M, Yamagiwa S, Wakai T, et al. Loss of liver-intestine cadherin in human intrahepatic cholangiocarcinoma promotes angiogenesis by up-regulating metal-responsive transcription factor-1 and placental growth factor[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(1):245-254.