

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.007

文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0038-05

水通道蛋白 1、血管内皮生长因子及微血管密度 在胃癌组织中的表达及临床意义*

董峰, 牛跃平, 郑英斌, 高健

(郑州大学第二附属医院 普外科, 河南 郑州 450014)

摘要: 目的 探讨水通道蛋白 1 (AQP1)、血管内皮生长因子 (VEGF)、微血管密度 (MVD) 在胃癌组织中的表达及 AQP1、VEGF、MVD 之间的相关性和临床意义。**方法** 选取郑州大学第二附属医院胃癌标本 79 例。每例分别取癌组织和癌旁组织 (距肿瘤边缘 <2 cm 处), 采用免疫组织化学方法检测 AQP1、VEGF 与 MVD 在胃癌组织和癌旁组织中的表达, 对 AQP1、VEGF 与 MVD 的表达及其与临床病理参数的关系进行分析。**结果** AQP1、VEGF 在胃癌组织与癌旁组织比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 胃癌组织高于癌旁组织; MVD 在胃癌组织的表达与癌旁组织比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 胃癌组织高于癌旁组织; AQP1、VEGF 及 MVD 与胃癌的分化、淋巴结转移、脉管癌栓及分期相关 ($P < 0.05$); 胃癌组织中 AQP1 与 VEGF 的表达呈正相关 ($r = 0.497, P < 0.05$); 在 VEGF 阳性表达的胃癌组织中, MVD 表达高于 VEGF 阴性表达的组织 ($P < 0.05$), 在 AQP1 阳性表达的胃癌组织中, MVD 表达高于 AQP1 阴性表达的组织 ($P < 0.05$)。**结论** AQP1、VEGF、MVD 存在协同作用, 与肿瘤的发生、发展密切相关。

关键词: 胃肿瘤; 水通道蛋白 1; 血管内皮生长因子类; 微血管

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Expression and clinical significance of aquaporin-1, vascular endothelial growth factor and microvessel density in gastric carcinoma*

Feng Dong, Yue-ping Niu, Ying-bin Zheng, Jian Gao

(Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of aquaporin-1 (AQP1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) in gastric carcinoma and their clinical significance. **Methods** Totally 79 gastric cancer patients who were admitted into our hospital from September 1, 2015 to June 1, 2017 were involved in this study. Tumor specimens and adjacent normal tissues (> 2 cm away from the tumor) were collected. Expression of AQP1, VEGF and MVD were identified by immunohistochemistry. Correlation among AQP1, VEGF, MVD and the clinicopathological parameters were determined. **Results** The expression of AQP1, VEGF and MVD in gastric carcinoma tissue was increased significantly when compared with those in para-cancerous tissue ($P < 0.05$). AQP1, VEGF and MVD were closely correlated with tumor differentiation, lymph node metastasis, vascular tumor thrombosis and staging ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that AQP1 was positively associated with VEGF expression ($r = 0.497, P < 0.05$). MVD was enhanced in VEGF positive and AQP1 positive cancer tissues

收稿日期: 2018-06-11

* 基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (No: 16A320018)

[通信作者] 牛跃平, E-mail: d1737165421@126.com

compared with that in VEGF negative or AQP1 negative tissue ($P < 0.05$). **Conclusions** Synergistic effect among AQP1, VEGF and MVD is involved in occurrence and development of gastric cancer.

Keywords: gastric neoplasms; aquaporin-1; vascular endothelial growth factor; microvessel

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,其早期症状不典型,诊断率低,往往发现时已处于进展期。我国胃癌的年病死率为25.21/10万,在各系统恶性肿瘤的死因中居首位。在肿瘤的发生、发展及侵袭过程中,微血管的生成起到至关重要的作用。在肿瘤微血管形成过程中,需要多种促进因子及抑制因子的共同调控,本文通过研究水通道蛋白1(aquaporin-1, AQP1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、微血管密度(microvessel density, MVD)在胃癌组织中的表达及其与临床病理参数的相关性,以期胃癌个体化治疗及其预后评估提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年9月1日—2017年6月1日郑州大学第二附属医院进展期胃癌行胃癌根治术新鲜标本79例。男性49例,女性30例;年龄28~81岁,中位57岁;术前均未行放化疗。每例分别取癌组织和癌旁组织(距肿瘤边缘 < 2 cm处),放置于中心实验室的 -80°C 冰箱中保存。术后病理分期,按第7版UICC-AJCC胃癌TNM分期标准:I期13例,II期21例,III期38例,IV期7例;有淋巴结转移51例,无淋巴结转移28例;脉管癌栓阳性43例,脉管癌栓阴性36例。按分化程度:高分化癌11例,中分化癌24例,低分化癌39例,未分化癌5例。

1.2 主要材料及试剂

AQP1兔抗人多克隆抗体、兔抗人VEGF多克隆抗体、鼠抗人CD34单克隆抗体、SP染色试剂盒及浓缩型DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 方法

所有标本经过4%的多聚甲醛固定后,脱水,透明化处理,石蜡包埋后,连续切片($4\ \mu\text{m}$)。常规脱蜡,水化后,采取免疫组织化学二步法(SP染色),操作步骤严格按照试剂盒说明书,DAB染色,苏木精复染,干燥后脱水,透明,封片。以PBS代替一抗做阴性对照,以已知阳性结果做为阳性对照。

1.4 判定标准

AQP1:以细胞膜被染色为棕黄色为阳性,VEGF:阳性为细胞膜或细胞质上出现黄色或棕黄色染色,每个切片有大于5%的胞膜或胞质染色,即可判定为VEGF阳性表达。MVD:首先在低倍镜($\times 40$)下选取血管密集区,然后在高倍镜($\times 200$)下选取3个视野,对新生血管进行计数,最后取其平均值即为MVD。

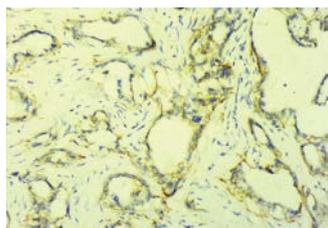
1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 t 检验,计数资料以率(%)表示,运用Spearman进行组间相关性分析,比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

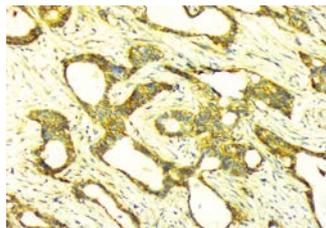
2 结果

2.1 AQP1、VEGF、MVD在胃癌组织与癌旁组织中的表达

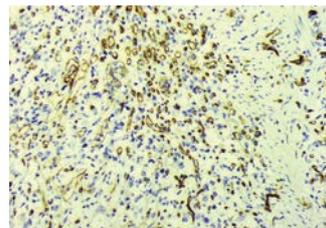
AQP1、VEGF在胃癌组织的表达与癌旁组织比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),胃癌组织的表达高于癌旁组织组;MVD在胃癌组织的表达与癌旁组织比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),胃癌组织的表达高于癌旁组织。见附图和表1。



胃癌中 AQP1 阳性表达



胃癌中 VEGF 阳性表达



胃癌组织中 MVD 高表达

附图 AQP1、VEGF、MVD在胃癌组织中的表达 ($\times 200$)

表 1 AQP1、VEGF、MVD 在胃癌组织与癌旁组织中的表达 (n=79)

组别	AQP1 例 (%)	VEGF 例 (%)	MVD 值 ($\bar{x} \pm s$)
胃癌组织	58 (73.42)	56 (70.89)	41.65 ± 6.10
癌旁组织	28 (35.44)	30 (37.97)	21.54 ± 5.06
χ^2 值	22.965	17.249	27.606
P 值	0.000	0.000	0.000

2.2 AQP1 与 VEGF 相关性分析

在 AQP1 阴性表达的胃癌组织中, VEGF 阳性表达率为 33.33% (7 例), 在 AQP1 阳性表达的胃癌组织中, VEGF 阳性表达率为 84.48% (49 例), 通过 Spearman 进行相关性分析, AQP1 与 VEGF 在胃癌组织中的表达呈正相关 ($r_s = 0.497, P < 0.05$)。见表 2。

2.3 AQP1 及 VEGF 与 MVD 在胃癌组织中表达比较

AQP1 阳性表达的胃癌组织 MVD 值与 AQP1 阴性表达的胃癌组织 MVD 值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MVD 在 AQP1 阳性表达的胃癌组织中的表达高于 AQP1 阴性表达的组织。VEGF 阳性表达的胃癌组

织 MVD 值与 VEGF 阴性表达的胃癌组织中 MVD 表达比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), MVD 在 VEGF 阳性表达的胃癌组织中的表达高于 AQP1 阴性表达的组织。见表 3。

表 2 AQP1 与 VEGF 相关性分析 例

AQP1	VEGF		合计
	阴性	阳性	
阴性	14	7	21
阳性	9	49	58
合计	23	56	79

表 3 AQP1 及 VEGF 与 MVD 在胃癌组织中表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MVD 值	t 值	P 值
AQP1				
阳性	58	44.16 ± 4.52	-8.146	0.000
阴性	21	34.80 ± 4.44		
VEGF				
阳性	56	44.31 ± 4.65	-8.260	0.000
阴性	23	35.17 ± 3.98		

表 4 AQP1、VEGF 的表达与临床病理参数的关系 例 (%)

临床病理参数	n	AQP1 阳性	χ^2 值	P 值	VEGF 阳性	χ^2 值	P 值
肿瘤大小							
≤ 5 cm	47	36 (76.60)	0.600	0.438	35 (74.47)	0.721	0.396
>5 cm	32	22 (68.75)			21 (65.63)		
分型							
高、中分化	35	20 (57.14)	8.529	0.003	15 (42.86)	23.922	0.000
低、未分化	44	38 (86.36)			41 (93.18)		
淋巴结转移							
有	51	42 (82.35)	5.886	0.015	42 (82.35)	9.168	0.002
无	28	16 (57.14)			14 (50.00)		
脉管癌栓							
有	43	41 (95.35)	23.255	0.000	41 (95.35)	27.362	0.000
无	36	17 (47.22)			15 (41.67)		
分期							
I、II 期	34	15 (44.12)	26.257	0.000	15 (44.12)	20.724	0.000
III、IV 期	45	43 (95.56)			41 (91.11)		

2.4 AQP1、VEGF与MVD的表达与临床病理参数的比较

AQP1、VEGF的表达与胃癌的分化、淋巴结转移、脉管癌栓及分期有关($P < 0.05$),与肿瘤大小无关($P > 0.05$)(见表4);MVD的表达与胃癌的分化、淋巴结转移、脉管癌栓及分期有关($P < 0.05$),与肿瘤大小无关($P > 0.05$)(见表5)。

表5 MVD的表达与临床病理参数的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理参数	n	MVD值	t值	P值
肿瘤大小				
≤ 5 cm	47	42.15 ± 6.03	8.920	0.375
>5 cm	32	40.90 ± 6.21		
分化程度				
高、中分化	35	37.82 ± 4.70	5.980	0.000
低、未分化	44	44.69 ± 5.35		
淋巴结转移				
有	51	43.15 ± 5.79	3.111	0.003
无	28	38.91 ± 5.78		
脉管癌栓				
有	43	45.87 ± 3.44	10.324	0.000
无	36	36.60 ± 4.53		
分期				
I、II期	34	36.34 ± 4.26	10.303	0.000
III、IV期	45	45.62 ± 3.76		

3 讨论

在动植物及微生物的体内存在一种特异性水通道蛋白,被称作水通道蛋白(Aquaporins, AQP),其广泛分布于机体的多个器官,以满足机体组织的生理需求,且其在细胞的生命活动及凋亡过程中,也发挥至关重要的作用^[1]。已有文献报道^[2]AQP1与如乳腺癌、膀胱癌、喉癌、黑色素瘤等多种肿瘤的发生密切相关。赵子伟等^[3]在研究过程中发现AQP1在结直肠癌中的阳性表达率高于癌旁组织,提示AQP1对结直肠癌的发生发展密切相关。同时又有研究^[4]指出VEGF与AQP1在非小细胞肺癌中的表达比癌旁组织高,且具有一定相关性,推测在肿瘤的生长过程中,AQP1通过与VEGF的互相作用,促进肿瘤的浸润与转移。本研究中AQP1在胃癌组表达阳性率高于癌旁组织中阳性表达率,差异有统计学意义;胃癌组织中AQP和

VEGF的表达呈正相关,提示两者在胃癌的发生、发展过程中具有协同作用。

在人体内,多种细胞均能表达VEGF,在促进血管内皮细胞生长、诱导新生血管形成及调节血管的发展过程中起着关键作用,是目前已知的最重要的血管活性因子之一,而血管的生成在癌细胞的生长、浸润、转移过程中起着重要作用。SIMONETTI等^[5]发现VEGF在肿瘤组织中的表达高于正常组织,认为VEGF能促进肿瘤微血管形成,在肿瘤的发生、发展过程中发挥重要的作用。本实验中,胃癌组织中VEGF的表达高于癌旁组织;VEGF阳性表达的胃癌组织中的MVD表达高于VEGF阴性表达的组织,推测VEGF与MVD在胃癌组织中表达呈正相关,VEGF参与肿瘤新生血管形成,在癌变形成及以后的浸润及转移过程中起重要的作用。

MVD能良好的反应肿瘤微血管生成的状态,目前已被广泛应用与临床和基础实验当中。在多种恶性肿瘤组织中MVD均为高表达,但在正常器官、组织和大血管等位置,其表达能力降低^[6]。GRIGORE等^[7]在研究中发现恶性肿瘤中的MVD表达程度高,其与肿瘤微血管形成关系密切。本研究中的胃癌组织中MVD与癌旁组织比较,差异有统计学意义,说明MVD与恶性肿瘤关系密切,其可能参与肿瘤的发生发展。在研究胃癌组织中MVD与AQP1表达时,笔者发现有关两者间相关性的研究尚少,但本实验中AQP1阳性表达的胃癌组织中,MVD表达高于AQP1阴性表达的组织,差异有统计学意义,故可预测在胃癌组织中,AQP1与MVD的表达可能存在正相关关系,两者共同参与了胃癌的发生、发展过程,但相关资料尚不足,有待进一步研究。

在肿瘤的发生、发展过程中,需要大量的水和营养物质,在肿瘤细胞中高表达的AQP1可改变肿瘤的形态、体积及细胞上皮渗透压,从而协助肿瘤的生长,加快肿瘤向周围组织浸润^[8]。CHANG等^[9]发现,胃癌组织中VEGF和MVD表达强度与Borrmann型、肿瘤分化、肿瘤侵袭、淋巴结转移、TNM分期相关,VEGF和MVD高表达的患者总体生存率低于VEGF和MVD低表达的患者。CARVALHO等^[10]报道MVD表达程度高的乳腺癌患者远处转移和术后复发的风险增高;另一些研究显示,随着MVD的增加,肿瘤的生长,侵袭和转移率也都增加^[11]。本研究中结果与上述报道一致,AQP1、VEGF与MVD的表达强度与肿瘤

大小无关,但与胃癌的分化、淋巴结转移、脉管癌栓及分期关系密切,推断 3 者在肿瘤的生成、浸润、转移过程中有促进及协同作用。

综上所述, AQP1、VEGF 与 MVD 在胃癌组织中的表达高于癌旁组织, 3 者之间存在协同作用, 参与了肿瘤的发生发展过程, 因此本研究可为肿瘤的预后评估提供一定的临床资料。此外, 在抗肿瘤药物中, 大多数研究都与新的靶点有关, 靶向药物的开发层出不穷, 以期推出新的高效靶向药物, 但仍不能挽救多数晚期肿瘤患者, 更无法彻底治愈肿瘤, 故仍需继续深入研究, 深层次探究肿瘤的发生、发展机制, 为肿瘤的治疗提供新的思路。

参 考 文 献:

- [1] NAGARAJU G P, BASHA R, RAJITHA B, et al. Aquaporins: Their role in gastrointestinal malignancies[J]. *Cancer Letters*, 2016, 373(1): 12-18.
- [2] 刘国斌, 邹祖圣. 水通道蛋白 1 与肿瘤的研究现状 [J]. *陕西医学杂志*, 2010, 39(7): 878-880.
- [3] 赵子伟, 闫兆鹏, 殷红专, 等. 水通道蛋白 1 与缺氧诱导因子 1 在结直肠癌中的表达及与肿瘤转移之间的关系 [J]. *中国医学工程*, 2012, 20(1): 14-16.
- [4] ZHANG J, SHIYING Y U, YIN T. Expression and clinical significance of AQP1, HPA and VEGF in non-small cell lung cancer[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2009, 19(18): 2750-2749.
- [5] SIMONETTI O, LUCARINI G, RUBINI C, et al. Microvessel density and VEGF, HIF-1 α expression in primary oral melanoma: correlation with prognosis[J]. *Oral Diseases*, 2013, 19(6): 620-627.
- [6] NASSIRI F, CUSIMANO M D, SCHEITHAUER B W, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy[J]. *Anticancer Research*, 2011, 31(6): 2283-2290.
- [7] GRIGORE D, SIMIONESCU C E, STEPAN A, et al. Assessment of CD105, α -SMA and VEGF expression in gastric carcinomas[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2013, 54(3 Suppl): 701-707.
- [8] XIE Y, WEN X, JIANG Z, et al. Aquaporin 1 and aquaporin 4 are involved in invasion of lung cancer cells[J]. *Clinical Laboratory*, 2012, 58(1/2): 75-80.
- [9] CHANG Y, NIU W, LIAN P L, et al. Endocan-expressing microvessel density as a prognostic factor for survival in human gastric cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(23): 5422-5429.
- [10] CARVALHO M I, CARVALHO M I, GUIMARÃES M J, et al. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours.[J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 95(3): 1094-1099.
- [11] KONDA V J, HART J, LIN S, et al. Evaluation of microvascular density in Barrett's associated neoplasia[J]. *Modern Pathology*, 2013, 26(1): 125-130.

(张西倩 编辑)