

· 实验研究 ·

肾母细胞瘤中 Stat3 HIF-1α 及 VEGF 的表达及意义

牛之彬¹, 王常林¹, 侯英¹, 杨屹¹, 高红²

(中国医科大学附属盛京医院 1. 小儿外科; 2. 小儿先天畸形重点实验室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘 要] 目的 研究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, Stat3)和低氧诱导因子 HIF-1α(hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α)在肾母细胞瘤(Wilms' tumor, WT)中的表达及其临床意义。方法 应用免疫组化 SABC 法辅以计算机图像分析的方法, 研究 Stat3, HIF-1α 与 VEGF 在 52 例 WT 组织, 47 例瘤旁组织及 8 例正常肾组织表达强度情况。结果 VEGF, Stat3 及 HIF-1α 在 WT 组织中表达强度较瘤旁组织及正常肾组织显著增强($P < 0.05$), 且瘤旁组织中 VEGF 表达强度高于正常肾组织。另外, 临床分期Ⅲ~Ⅳ和预后不良病理类型的 WT 中 Stat3 及 VEGF 表达强度明显高于临床分期Ⅰ~Ⅱ的 WT, 预后不良病理类型及直径 ≥ 6 cm 的 WT 中 HIF-1α 表达强度较预后良好型及直径 < 6 cm 的 WT 升高。结论 VEGF, Stat3 及 HIF-1α 表达与肾母细胞瘤的发展预后有关, 参与了肿瘤血管的生成及肿瘤的增殖侵袭, Stat3 可能对 HIF-1 和 VEGF 的表达起着重要的调控作用, 对于靶向治疗肾母细胞瘤具有一定意义。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(5): 461-464]

[关键词] 信号传导与转录激活因子 3; 低氧诱导因子 1α; 血管内皮生长因子; 肾母细胞瘤; 血管生成
[中图分类号] R737.11 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)05-0461-04

Expression of Stat3, HIF-1α and VEGF in Wilms' tumor

NIU Zhi-Bin, WANG Chang-Lin, HOU Ying, YANG Yi, GAO Hong. Department of Pediatric Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: niuzb@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in Wilms' tumor and their roles in the development of Wilms' tumor. **Methods** The expression of Stat3, HIF-1α and VEGF were detected by the immunohistochemical staining in 52 specimens from Wilms' tumor tissues, 47 from adjacent kidney tissues and 8 from normal kidney tissues. The expression intensity was analyzed by computer image processing. **Results** The expression of Stat3, HIF-1 and VEGF were significantly up-regulated in Wilms' tumor tissues compared to those in adjacent tissues and normal kidney tissues ($P < 0.05$). Stat3 and VEGF proteins in Wilms' tumor tissues of stage Ⅲ-Ⅳ and high risk histopathology were significantly higher than those of stage Ⅰ-Ⅱ and low risk histopathology. The higher expression of HIF-1 in Wilms' tumor tissues was shown in tumors with high risk histopathology and tumor size ≥ 6 cm. **Conclusions** Increased expression of Stat3, HIF-1 and VEGF were found in Wilms' tumor tissues, and may be related to the development and angiogenesis of Wilms' tumor. Stat3 may regulate the expression of HIF-1 and VEGF, so it could be an effective target for inhibiting VEGF expression and angiogenesis of Wilms' tumor.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(5): 461-464]

Key words: Signal transducer and activator of transcription 3; Hypoxia-inducible factor-1α; Vascular endothelial growth factor; Wilms' tumor; Angiogenesis

肾母细胞瘤(Wilms' tumor, WT)是小儿泌尿系统中最常见的恶性肿瘤, 占小儿实体瘤的8%, 目前仍是威胁儿童健康的重要疾病。靶向治疗抑制肿瘤的血管生成及诱导细胞凋亡是目前肿瘤治疗的热点和新途径, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所知主要的血管内皮生长因子, VEGF在促进肿瘤血管内皮细胞增殖和增加血管通透性方面起着重要的作用。有学者研究表明, VEGF在WT的发生发展中起到了重要的作用。在近期研究中显示, 虽然诱导VEGF的蛋白很多,

[收稿日期]2006-11-20; [修回日期]2006-12-31
[作者简介]牛之彬,男,博士,讲师。主攻方向:小儿泌尿外科。
[通讯作者]王常林,教授,中国医科大学附属盛京医院儿外科,邮编:110004。

但只有信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, Stat3)和低氧诱导因子 HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是作为启动子的转录因子,同时后两者与肿瘤细胞抗凋亡及增殖等方面特性也密切相关^[1,2]。鉴于三者关系密切并且均为目前肿瘤研究中的热点,本研究用免疫组织化学辅以计算机图像分析的方法研究 WT 中 Stat3, HIF-1 α 与 VEGF 的表达,探讨其与 WT 发生发展的关系及对于肿瘤治疗的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 取自卫生部小儿先天畸形实验室标本库,肾母细胞瘤标本 52 例,其中男 27 例,女 25 例,年龄在 0.5 ~ 11 岁,平均年龄 4.2 岁,术前均未作放疗、化疗及免疫治疗并均经病理证实;其中 47 例标本同时在距癌组织边缘 5.0 cm 以外的组织处取材,另有 8 例非肾脏疾病死亡尸检肾组织作为对照。标本均在手术中无菌取材后液氮处理,放入 -80℃ 深低温冰箱保存。

1.1.2 试剂 免疫组化试剂:抗 Stat3 抗体为兔抗人多克隆抗体即用型(购自福建迈新生物技术公司),抗 HIF-1 α 及 VEGF 抗体为兔抗人多克隆抗体即用型(产自 Santa Cruz 公司,武汉博士德生物技术公司分装)。

1.1.3 标本处理准备 标本取材解冻后采用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,常规连续 4 μ m 切片。每例标本随机留取 5 片用以实验分析。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学链霉亲合素-生物素-过氧化物酶复合法(SABC 法),操作步骤严格按照说明书进行,步骤如下:石蜡切

片常规脱蜡至水,内源过氧化物酶阻断 10 min,微波抗原修复,非免疫动物血清孵育 20 min,与一抗(1:100)抗体在 4℃ 冰箱中孵育过夜,与二抗抗体(购自 Santa cruz 公司)在室温中孵育 20 min,链霉亲合素-过氧化物酶溶液温育 30 min,显色 5 ~ 10 min,苏木素对比染色后,脱水,透明,封片。用已知阳性切片作阳性对照,用磷酸缓冲盐溶(PBS)代替一抗作阴性对照,光镜下观察,并予记录。

结果判定:以细胞浆中黄色颗粒为 Stat3, HIF-1 α 与 VEGF 的阳性表达颗粒(见图 1),以阳性表达区域的累积光密度值表示表达强度。

1.2.2 计算机图像分析 应用 C7070WZ 图像采集系统,关闭自动白平衡功能,固定光源光圈以统一图像采集条件;先在低倍镜(10 $\times$ 10)下全面观察切片以确定阳性表达区域,然后于高倍镜(10 $\times$ 20)下取 5 个视野,分别采集图像并分组(Stat3 组, HIF-1 α 组, VEGF 组)保存。

采用 Image-pro plus5.1 软件分析系统测量图像:矫正光密度后于各组图像中各挑选一张典型图片选色及分析测量,并按其操作程式编制各组宏(批处理程序),运行各组宏批量分析各组图片,测量指标如下:背景区域平均光密度(density),阳性区域面积(area),阳性区域累积光密度值(integrated optical density, IOD);计算阳性区域表达光密度值(IOD⁺),公式为:IOD⁺ = IOD - density $\times$ area,该值代表目的蛋白表达强度。

1.2.3 统计学分析 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异比较采用 *t* 检验,应用 SPSS11.0 软件进行数据分析。确定 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

VEGF、Stat3 及 HIF-1 α 在 WT 组织中表达强度

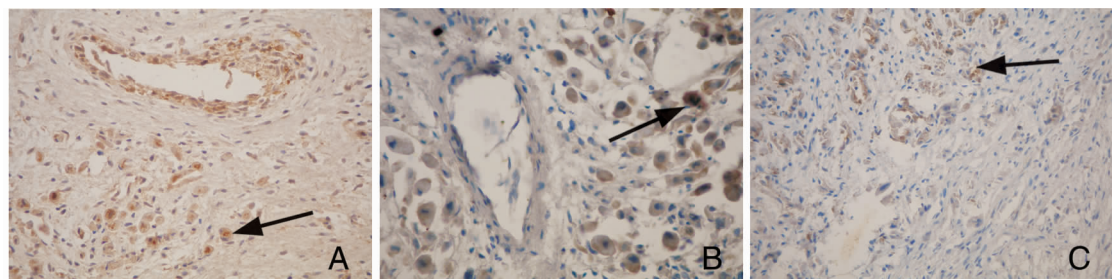


图1 WT 组织中 VEGF, HIF-1 α , Stat3 表达(免疫组化 SABC 法, 400 $\times$) A: VEGF 表达阳性, 细胞浆中显示黄色颗粒, 箭头所示; B: HIF-1 α 表达阳性, 细胞浆中显示黄色颗粒, 箭头所示; C: Stat3 表达阳性, 细胞浆中显示黄色颗粒, 箭头所示。

较瘤旁组织及正常肾组织显著增强 ($P < 0.05$), 并且瘤旁组织中 VEGF 表达强度高于正常肾组织, 见表 1; 另外, 临床分期 III ~ IV 和预后不良病理类型的 WT 中 Stat3 及 VEGF 表达强度明显高于临床分期 I ~ II 的 WT, 预后不良病理类型及直径 ≥ 6 cm 的 WT 中 HIF-1 α 表达强度较预后良好型及直径 < 6 cm 的 WT 升高, 见表 2。

表 2 52 例 WT 各临床病理因素与 VEGF, Stat3 及 HIF-1 α 表达的关系 (IOD⁺值 $\times 10^3$)

例数	肿瘤大小		临床分期		组织分型	
	<6 cm (12 例)	≥ 6 cm (40 例)	I ~ II (38 例)	III ~ IV (14 例)	预后良好型 (35 例)	预后不良型 (17 例)
Stat3 组	13.15 $\pm$ 3.14	11.84 $\pm$ 5.90	10.56 $\pm$ 4.96	16.41 $\pm$ 6.07 ^a	10.05 $\pm$ 5.02	16.44 $\pm$ 5.75 ^b
HIF-1 α 组	7.23 $\pm$ 3.56	11.71 $\pm$ 6.33 ^c	9.83 $\pm$ 4.67	12.95 $\pm$ 8.46	10.02 $\pm$ 5.71	14.58 $\pm$ 5.65 ^b
VEGF 组	19.82 $\pm$ 4.76	18.78 $\pm$ 4.90	17.43 $\pm$ 4.79	23.34 $\pm$ 5.09 ^a	15.17 $\pm$ 5.71	26.95 $\pm$ 3.14 ^b

a 与同组分期为 I ~ II 期比较, $P < 0.01$; b 与预后良好型比较, $P < 0.01$; c 与同组 < 6 cm 者比较, $P < 0.05$

3 讨论

实体肿瘤的发展必需有血管生成的参与。血管生成是实体肿瘤生长和转移的必要条件, 如果没有新生血管为肿瘤带来氧和营养物质, 并带走代谢产物, 实体肿瘤的生长直径不会超过 2 mm^[3]。现已认识到 VEGF 为特异的血管内皮细胞刺激因子, 能够促进内皮细胞的增殖、分裂, 促进新的血管生成, 同时引起细胞外基质的改变而增加血管的通透性。在肿瘤的血管生成中, 内皮细胞增殖和细胞外基质的降解是两个基本组成部分, VEGF 在促进血管内皮细胞增殖和增加血管通透性方面的作用恰是肿瘤血管新生所必须的。目前认为, VEGF 在诸多促进肿瘤血管生成的因素中, 起着最基础、最关键的作用^[4]。WT 起源于未分化的后肾胚胎, 是间质组织和上皮细胞组成的恶性混合瘤, 作为一种生长迅速的实体肿瘤, 血管生成无疑在其发生发展中起到了重要作用, 有学者^[5]研究了 WT 患儿血清中 VEGF 的表达情况, 指出其与肿瘤发生、发展及转移明显相关, 可作为监测 WT 预后的临床指标。本研究显示 WT 中 VEGF 表达升高, 临床分期 III ~ IV 和预后不良病理类型的 WT 中 VEGF 表达强度明显高于临床分期 I ~ II 者, 与文献报道一致。另外, 本研究显示瘤旁组织中 VEGF 表达强度高于正常肾组织并且瘤组织与瘤旁组织中 VEGF 表达无明显差异, 提示 VEGF 的高表达可能是 WT 发展中的早期事件, 为 WT 的进一步侵袭生长提供了条件, 同时表明手术中彻底清除瘤旁组织对于治疗 WT 具有重要意义。

表 1 VEGF, Stat3 及 HIF-1 α 在各组标本中表达情况 (IOD⁺值 $\times 10^3$)

分组	正常肾组织	肾母细胞瘤组织	瘤旁组织
Stat3 组	0.39 $\pm$ 0.16	12.14 $\pm$ 5.26 ^{a, b}	0.42 $\pm$ 0.21
HIF-1 α 组	0.49 $\pm$ 0.19	10.67 $\pm$ 5.69 ^{a, b}	0.52 $\pm$ 0.21
VEGF 组	9.33 $\pm$ 4.13	19.02 $\pm$ 4.87 ^a	14.62 $\pm$ 4.02 ^a

a 与正常肾组织比较, $P < 0.01$; b 与瘤旁组织比较, $P < 0.05$

HIF-1 最先由 Semenza^[6] 于 1992 年发现, 作为被低氧诱导的、连接在红细胞生成素基因低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 上的一个核因子, HIF-1 由 α 、 β 亚基组成, 其中 α 亚基是唯一的氧调节亚单位, 决定 HIF-1 的活性^[7]。在低氧条件下, HIF-1 α 产生并作为蛋白性调节因子与多种靶基因结合调节其转录活性, 介导组织细胞产生一系列的缺氧适应性反应; 在恶性肿瘤中, 不断增多的细胞数导致细胞耗氧量不断增加, 造成肿瘤局部处于缺氧状态, 肿瘤在适应缺氧时主要有两种方式: ①肿瘤血管生成; ② Warburg 效应, 即肿瘤在缺氧甚至有氧状态下增加糖酵解酶活性而加速糖酵解来获取能量^[8], 因此处于缺氧状态的肿瘤细胞仍能不断增殖、浸润^[9]; 同时, 肿瘤缺氧的微环境也是肿瘤治疗效果差、易产生放化疗耐受性的重要原因。HIF-1 α 可以在基因水平上直接调控 VEGF 的表达, 而 VEGF 在肿瘤血管形成调控方面起着重要作用, 因此 HIF-1 是恶性肿瘤诱导新生血管形成的一个主要调节因子, 另外 HIF-1 α 在多种糖酵解酶过程中也起着重要的转录调控作用, 从而促进肿瘤生长。有研究^[10]表明在大多数人类肿瘤中存在 HIF-1 α 的过表达, HIF-1 α 的活性在维持肿瘤细胞的能量代谢、新血管生成、促进肿瘤增殖和转移中起重要作用。本研究显示, HIF-1 α 在 WT 中高表达且在预后不良病理类型及直径 ≥ 6 cm 的 WT 中 HIF-1 α 表达强度较预后良好型及直径 < 6 cm 的 WT 升高, WT 的病理类型与其体积是有一定关联的, 生长迅速、侵袭生长往往提示预后不佳, HIF-1 α 应该在其代谢增殖中起到了重要作用。

Stat 蛋白家族是一组可以被不同的细胞因子受体激活的相关蛋白,在细胞因子-受体相互作用的过程中充当载体,保持信号在细胞内传递的内在特异性。在正常细胞中,激活蛋白是一个瞬时的过程,并且呈微弱表达,Stat 分子的过高表达往往出现在恶性增殖性疾病中,Stat3 是 Stat 家族的重要成员,Stat3 信号传导通路细胞的增殖、分化及凋亡密切相关,该通路持续激活可导致细胞异常增殖和恶性转化,目前定义为癌基因^[11]。Stat3 可激活 Bcl-2, Bcl-X 等抗凋亡基因并且与 c-Jun 合作抑制 Fas 的表达,从而妨碍了癌细胞凋亡^[12]。目前,许多 Stat3 的靶基因已经被确定,包括编码抗凋亡蛋白的 Bcl-xl, Mcl-1 和 Bcl-2,增殖相关蛋白 Cyclin D1 和 Myc 以及促血管发生因子 VEGF^[13]。关于 Stat3 表达与 WT 的发生发展的关系的研究尚未见报道,在本研究中显示,Stat3 在 WT 组织中表达提高,并且临床分期Ⅲ~Ⅳ和预后不良病理类型的 WT 中 Stat3 表达强度明显高于临床分期Ⅰ~Ⅱ者,表明其与 WT 的恶性程度有关,在 WT 生长浸润转移中起到了重要的作用。

在最近的研究中,Stat3 与 VEGF, HIF-1 的关系得到了进一步的论述:虽然诱导 VEGF 的蛋白很多,但只检测到有两个作为启动子的主要转录因子: HIF-1 和 Stat3,在多种癌症中 Stat3 活性表达和 HIF-1 都在上游被调控。有研究证明,需要 Stat3 才能诱导基础和生长信号导致的 HIF-1 表达。此外,由多个肿瘤生长刺激因子(IL-6R, C-Src, Her2/Neu)诱导的 VEGF 在没有 Stat3 信号时会减少^[1]。Xu Q 等^[2]进一步阐明了 Stat3 能够调节 Akt 的表达,进而上调生长因子诱导的 HIF-1 的高表达,他们在体外实验中,以小分子抑制剂作用于 Stat3 实现了阻断 HIF-1 和 VEGF 表达,在动物体内实验中显示,当 Stat3 被抑制后,由 IL-6R 和 Jak/Stat, PI3K/Akt 等信号通路诱导激活的血管生成能力也被抑制,从而抑制了肿瘤生长和血管生成。因此,Stat3 可能对 HIF-1 和 VEGF 的表达起着重要的调控作用,对于肿瘤的靶向治疗具有更大意义。本组病例研究显示 Stat3, HIF-1 及 VEGF 在 WT 的发生发展中也起着重要的作用,可以为 WT 的诊断及判断预后提供参考,同时,Stat3 作为一个抑制肿瘤 HIF-1, VEGF 表达和血

管生成的有效靶点可以为治疗 WT 提供新的研究途径,值得进一步研究探讨。

[参 考 文 献]

[1] Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, et al. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas[J]. *Oncogene*, 2005, 24(19): 3110-3120.

[2] Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, et al. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2005, 24(36): 5552-5560.

[3] Kirkali Z, Tuzel E, Mungan MU. Recent advance in kidney cancer and metastatic disease[J]. *BJU Int*, 2001, 88(8): 818-824.

[4] Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma[J]. *Blood*, 2000, 95(8): 2630-2636.

[5] 张谦,单岩,陈清江. 血管内皮生长因子在预测肾母细胞瘤转移中的作用[J]. *中华儿科杂志*, 2005, 43(3): 213-214.

[6] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12): 5447-5454.

[7] Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(14): 7987-7992.

[8] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics[J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8(4 Suppl): S62-67.

[9] Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 485-490.

[10] Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(2): 411-421.

[11] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene[J]. *Cell*, 1999, 98(3): 295-303.

[12] Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, et al. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(3): 517-528.

[13] Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(9): 1139-1142.

(本文编辑:吉耕中)