

EGFR 和 VEGF mRNA 在上皮性卵巢癌组织中的表达及其临床意义

陈爱平*, 杨蕊蕊, 张红玲, 宋 慧 (青岛大学医学院附属医院 妇科, 山东 青岛 266003)

[摘要] 目的: 探讨表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)基因和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因 mRNA 在卵巢癌组织中的表达状况及临床意义。方法: 选取青岛大学医学院附属医院妇科手术治疗的 58 例患者新鲜组织标本(包括 12 例正常卵巢、11 例卵巢良性肿瘤及 35 例卵巢上皮癌),用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 EGFR mRNA 和 VEGF mRNA 的表达情况,分析它们与恶性肿瘤临床病理特征的关系及它们之间的相关性。结果: 卵巢上皮癌组织中 EGFR、VEGF mRNA 阳性表达率(71.4%、100%)均显著高于正常卵巢(16.7%、25.0%)及卵巢良性肿瘤组织(27.3%、36.4%)($P < 0.05$);EGFR mRNA 表达与卵巢上皮癌手术病理分期有关,Ⅲ~Ⅳ期的阳性表达率及表达强度高于 I~II 期($P < 0.05$);VEGF mRNA 表达与卵巢上皮癌手术病理分期及淋巴结转移有关,Ⅲ~Ⅳ期和有淋巴结转移组织的表达强度分别高于 I~II 期和无淋巴结转移组织($P < 0.05$);EGFR 和 VEGF mRNA 表达两者之间有显著相关性($r = 0.438, P < 0.05$)。结论: EGFR 和 VEGF 基因高表达与卵巢癌的发生及转移有相关性,两者可能有协同作用。

[关键词] 表皮生长因子受体;血管内皮生长因子;卵巢肿瘤;表达;病理特征

[中图分类号] R737.31; R730.2 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2008)04-0388-05

Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and vascular endothelial growth factor mRNA in ovarian carcinoma and its significance

CHEN Ai-ping*, YANG Rui-rui, ZHANG Hong-ling, SONG Hui (Department of Gynecology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA and vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in ovarian carcinoma and its significance. **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to determine the expression of EGFR mRNA and VEGF mRNA in 58 specimens, including 12 normal, 11 benign and 35 malignant ovarian carcinomas, which were obtained during operation from patients treated in the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College. The relationship between EGFR and VEGF mRNA expression and the clinicopathological features was analyzed. **Results:** The positive rates of EGFR and VEGF mRNA were significantly higher in the malignant ovarian specimens than in the normal and benign ones ($P < 0.05$). EGFR mRNA expression was correlated with the clinical stages of ovarian carcinomas, with the expression at stage III-IV significantly higher than that of stage I-II ($P < 0.05$). The expression of VEGF mRNA was correlated with the clinical stages and lymph node metastasis of ovarian carcinomas. VEGF mRNA expression in carcinomas of stage III-IV or those with lymph node metastasis was significantly higher than that at stage I-II and those without lymph node metastasis (all $P < 0.05$). Besides, the expression of EGFR mRNA was correlated with the expression of VEGF mRNA ($r = 0.438, P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of EGFR and VEGF is positively correlated with the carcinogenesis and metastasis of ovarian carcinoma, and there might be a synergistic effect between the 2.

[Key words] epidermal growth factor receptor (EGFR); vascular endothelial growth factor (VEGF); ovarian neoplasms; expression; pathologic characteristic

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 388-392]

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是原癌基因 C-erbB-1 的表达产物,与肿瘤的发生、发展密切相关。近年来对 EGFR 与肿瘤的血管生成、高侵袭性及转移关系的研究越来越多,很多研究提示了高度相关性的存在^[1-5]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知活性最强、专属性最高的血管生

成因子。VEGF 表达与多种肿瘤的血管生成、临床病理特征和不良预后有关^[6-7]。癌基因的激活表达

[基金项目] 青岛市科技基金资助项目(No. KGD-10)。Supported by the Science and Technology Foundation of Qingdao (No. KGD-10)

[作者简介] 陈爱平(1964-),女,博士,硕士生导师,主任医师,主要从事妇科肿瘤学研究

* Corresponding author. E-mail: chenaiping516@163.com

与抑癌基因的失活是卵巢癌的发病机制之一。目前, 国内外对卵巢上皮癌的各种癌基因已有深入的研究, 但在 mRNA 水平上对卵巢上皮癌组织中 *EGFR* 与 *VEGF* 的表达情况进行分析报道尚少。本研究应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法研究卵巢肿瘤组织中 *EGFR* 和 *VEGF* 的表达情况及两者与卵巢肿瘤发生发展的关系, 并分析上皮性卵巢癌中 *EGFR* 与 *VEGF* 表达之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 2004 年 4 月 - 2007 年 10 月青岛大学医学院附属医院妇科手术治疗并经病理诊断证实的原发性卵巢上皮癌 35 例, 年龄 23 ~ 75 岁, 中位年龄 50.5 岁。其中浆液性腺癌 24 例、黏液性腺癌 6 例、子宫内膜样腺癌 3 例、透明细胞癌 1 例、恶性 Brenner 瘤 1 例。根据 FIGO2000 手术病理分期标准, I ~ II 期 15 例, III ~ IV 期 20 例。根据 WHO 分级, 高分化 2 例、中分化 6 例、低分化 27 例。患者术前均未进行任何放疗或化疗。另取同期 11 例良性卵巢上皮性肿瘤、12 例正常卵巢组织作为对照(子宫肌瘤同时行附件切除者的卵巢组织, 经 H-E 染色确定)。手术后 0.5 ~ 1 h 迅速取组织冻存于 -80℃ 冰箱备用。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取液、RT-PCR 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。从 Genbank 中查到 *EGFR*、*VEGF* 及 *GAPDH* 的基因序列, 采用 PCGENE 软件设计出引物如下: *EGFR* mRNA 上游引物 5'-AACACAGTGGAGCGAATTCCTTT -3', 下游引物 5'-GGAAGTCCATCGACATGTTGCT -3', 扩增片段 262 bp。 *VEGF* mRNA 上游引物 5'-CAGCTACTGCCATC-CAATCGA-3', 下游引物 5'-CTGGCCTTGGTGAG-GTTTGAT-3', 扩增片段 199 bp。 *GAPDH* mRNA 上游引物 5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3', 下游引物 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3', 扩增片段 146 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 RT-PCR 检测 *EGFR* 和 *VEGF* mRNA 的表达

按 RNA 抽提操作手册(大连宝生物工程公司)的方法提取组织总 RNA。提取的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, 通过紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 光密度值而计算 RNA 的纯度与浓度。逆转录反应按试剂说明操作。

PCR 反应 20 μ l 总体积, 取 cDNA 2 μ l, 加 10 \times buffer 2 μ l, dNTP 0.8 μ l, Hot-start Taq DNA 聚合酶 0.2 μ l, 上下游引物各 1 μ l, 超纯水 13 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min 终末延伸。取 PCR 扩增产物 10 μ l 上样于 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/ml 溴化乙锭), 110 V 电压电泳 40 min, 然后将凝胶

放入凝胶电泳成像系统, 在紫外光下自显影, 分析条带光密度值, 以待检基因和 *GAPDH* 条带强度的比值作为目的基因的相对值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS14.0 软件进行统计学分析。 *EGFR*、*VEGF* 表达阳性率的组间差异显著性检验采用 χ^2 检验; 用 $\bar{x} \pm s$ 代表组内基因表达平均水平, 组间差异的显著性检验采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 正常卵巢及卵巢肿瘤组织中 *EGFR* 及 *VEGF* mRNA 的表达

EGFR mRNA、*VEGF* mRNA 及内参照基因 *GAPDH* mRNA 的 PCR 扩增片段分别为 262 bp、199 bp 和 146 bp(图 1)。在正常卵巢、卵巢良性肿瘤及卵巢上皮癌组织中, *EGFR* mRNA 和 *VEGF* mRNA 阳性表达率分别为 16.7% (2/12)、27.3% (3/11)、71.4% (25/35) 和 25% (3/12)、36.4% (4/11)、100% (35/35)。卵巢上皮癌中的阳性表达率显著高于正常卵巢及卵巢良性肿瘤 ($P < 0.05$), 卵巢良性肿瘤与正常卵巢比较阳性表达率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

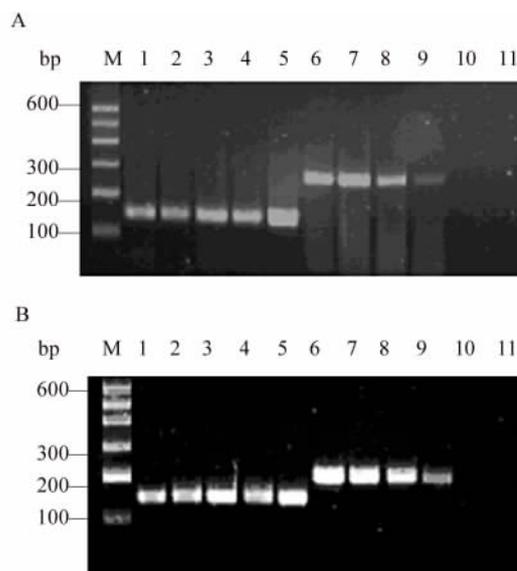


图 1 RT-PCR 检测 *EGFR* mRNA (A) 和 *VEGF* mRNA (B) 在卵巢癌组织中的表达

Fig. 1 Expression of *EGFR* mRNA (A) and *VEGF* mRNA (B) in ovarian carcinoma tissue as detected by RT-PCR
M: DNA marker; 1 ~ 5: The expression of *GAPDH* mRNA in ovarian carcinoma; 6 ~ 7: The expression of *EGFR* mRNA or *VEGF* mRNA in ovarian carcinoma; 8 ~ 9: The expression of *EGFR* mRNA or *VEGF* mRNA in benign ovarian tumor; 10: The expression of *EGFR* mRNA or *VEGF* mRNA in normal ovary; 11: Negative control

2.2 EGFR mRNA 表达与卵巢上皮癌组织临床病理特征的关系

恶性卵巢肿瘤组织中 EGFR 的表达与患者年龄、组织学分型、细胞学分级及淋巴结转移无关,但其表达与 FIGO 分期有关;Ⅲ~Ⅳ期组织中 EGFR 阳性表达率(85%)高于 I~II 期(46.67%)($P < 0.05$),且期别越晚,EGFR mRNA 表达量越高($P < 0.05$,表 1)。

2.3 VEGF mRNA 表达与卵巢上皮癌组织临床病理特征的关系

恶性卵巢肿瘤组织中 VEGF mRNA 的阳性表达

率与患者年龄、组织学分型、细胞学分级、FIGO 分期无关,但其表达强度在Ⅲ~Ⅳ期患者为(0.94 ± 0.22)明显高于 I~II 期患者的(0.60 ± 0.21),($P < 0.01$);另外,VEGF mRNA 表达强度在有淋巴结转移的患者为(1.00 ± 0.15)高于无淋巴结转移患者(0.74 ± 0.27)($P < 0.05$,表 2)。

2.4 EGFR mRNA 和 VEGF mRNA 在卵巢上皮癌中表达的相关性

Pearson 相关分析显示,在 35 例卵巢上皮癌组织中,EGFR mRNA 和 VEGF mRNA 的表达之间呈正相关($r = 0.438, P < 0.05$)。

表 1 卵巢上皮癌 EGFR mRNA 表达与临床病理特征的关系

Tab. 1 Relationship between the EGFR mRNA expression and clinicopathologic features of ovarian carcinoma

Group	EGFR mRNA (+) n(%)	P values	EGFR mRNA expression ($\bar{x} \pm s$)	P values
Age				
≥51	13/18(72.22)	1.000	0.99 ± 0.24	0.123
<51	12/17(70.59)		0.83 ± 0.31	
Histological types				
Serous carcinoma	17/24(70.83)	1.000	0.90 ± 0.32	0.885
Others	8/11(72.73)		0.92 ± 0.18	
Differentiation				
Moderately/well				
differentiated	6/8(75.00)	1.000	0.86 ± 0.18	0.577
Poor differentiated	19/27(70.37)		0.93 ± 0.33	
Clinical stage				
I ~ II	7/15(46.67)	0.027	0.74 ± 0.29	0.003
III ~ IV	17/20(85.00)		1.04 ± 0.20	
Lymph node metastasis				
No	20/27(74.07)	0.661	0.89 ± 0.30	0.564
Yes	5/8 (62.50)		0.97 ± 0.22	

3 讨论

EGFR 是跨膜受体,在表皮细胞增殖、迁移、侵袭和生存中起重要作用。它具有酪氨酸激酶活性,被激活后可通过多种信号途径促进肿瘤细胞增殖和肿瘤血管形成。随着对 EGFR 研究的深入,发现肿瘤的发生发展与其密切相关,肿瘤细胞表面存在 EGFR 高表达^[8]。Nielsen 等^[9]研究表明,62% 上皮性卵巢癌中存在 EGFR 过表达。Tomov 等和本课题组前期工作^[1-2]采用免疫组化方法研究了 EGFR 在

良、恶性卵巢肿瘤中的表达情况,结果发现恶性卵巢组织 EGFR 的表达率显著高于良性组织,差别有显著性意义;有腹水和进展期患者的 EGFR 表达率更高。Alper 等^[3]研究表明卵巢癌细胞中 EGFR 的过度表达,导致侵袭力增加。所以,高水平的 EGFR 往往反映了肿瘤的高侵袭力和高转移性及预后不良。本研究发现 EGFR 在恶性卵巢肿瘤组织中的表达明显高于良性肿瘤和正常组织($P < 0.05$),说明在卵巢肿瘤发生过程中 EGFR 可能起到了一定的作用;而且随临床期别的增加,EGFR 的表达也逐渐增

强,其在Ⅲ~Ⅳ期的卵巢癌组织中的表达明显高于Ⅰ~Ⅱ期卵巢癌组织($P < 0.05$),说明 *EGFR* 参与了卵巢肿瘤的发展过程,可作为判断肿瘤恶性程度

的一个指标,*EGFR* 表达阳性的肿瘤细胞具有更强的转移力和侵袭性。

表2 卵巢上皮癌 *VEGF* mRNA 表达与临床病理特征的关系Tab. 2 Relationship between the *VEGF* mRNA expression and clinicopathologic features of ovarian carcinoma

Group	<i>VEGF</i> mRNA(+) n(%)	<i>P</i> values	<i>VEGF</i> mRNA expression ($\bar{x} \pm s$)	<i>P</i> values
Age				
≥51	18/18(100)	1.000	0.82 ± 0.25	0.121
<51	17/17(100)		0.71 ± 0.27	
Histological types				
Serous carcinoma	27/24(100)	1.000	0.77 ± 0.25	0.446
Others	11/11(100)		0.86 ± 0.32	
Differentiation				
Moderately/well				
differentiated	8/8(100)	1.000	0.77 ± 0.34	0.762
Poor differentiated	27/27(100)		0.93 ± 0.33	
Clinical stages				
Ⅰ~Ⅱ	15/15(100)	1.000	0.60 ± 0.21	0.000
Ⅲ~Ⅳ	20/20(100)		0.94 ± 0.22	
Lymph node metastasis				
No	27/27(100)	1.000	0.74 ± 0.27	0.031
Yes	5/8(100)		1.00 ± 0.15	

VEGF 是一种内皮细胞特异性致分裂原和体内血管生成的诱导因子,可特异性促进内皮细胞生长及血管生成,增加血管的通透性,有助于肿瘤侵袭转移^[10],是目前诱导肿瘤血管生成作用最强、特异性最高的血管生长因子。对 *VEGF* 在卵巢癌中的表达与临床病理的关系,尚有不同观点。Shen 等^[11]研究了 65 例卵巢癌、13 例交界性肿瘤和 17 例良性卵巢肿瘤中 *VEGF* 表达,认为 *VEGF* 表达与肿瘤临床分期、病理分级及预后相关,是独立的预后因素。Hermann 等^[12]研究了 45 例浆液性卵巢癌 *VEGF* 表达表明,*VEGF* 阳性表达率不仅与 FIGO 分期相关,且与肿瘤细胞有丝分裂活性呈正相关。然而 Nishid 等^[13]研究发现 *VEGF* 表达与临床病理特点及预后无关。本研究结果显示,恶性卵巢上皮性肿瘤中 *VEGF* 表达阳性率显著高于卵巢良性肿瘤和正常卵巢组织,且发现 *VEGF* 表达强度随着卵巢癌临床分期增高而增强($P < 0.05$)。对上皮性卵巢癌中有无淋巴结转移者的 *VEGF* mRNA 表达分析表明,有淋

巴结转移者的 *VEGF* 表达量较无淋巴结转移者明显增高($P < 0.05$)。提示 *VEGF* 在卵巢癌侵袭转移过程中发挥了重要的作用,可能参与卵巢恶性肿瘤的转移过程。

近年来 *EGFR* 与肿瘤新生血管的形成和血道转移的关系已引起许多专家学者的关注,并得到了广泛的证实。Raspollini 等^[14]研究表明,在晚期浆液性低分化卵巢癌中,*EGFR* 过度表达和肿瘤血管发生有关,肿瘤细胞有血液供应增殖更加迅速。Patrizia 等^[15]发现 *EGFR* 能通过刺激肿瘤细胞分泌 *VEGF* 来诱导血管生成。因此 *EGFR* 的激活能增强血管生成分子的表达,表明 *EGFR* 介导的信号转导在血管生成中发挥重要作用。本研究的相关分析发现,*EGFR* 和 *VEGF* 的表达呈显著正相关,说明它们在卵巢癌的发展过程中可能起协同作用,*EGFR* 可能通过上调血管生成分子的表达来促进新生血管形成,从而促进卵巢癌的发生、发展。

最新的研究发现, *EGFR* 抑制剂 gefitinib 可以

减少 VEGF 的表达^[14], 并且 EGFR 抑制剂与 VEGF 抑制剂在临床试验中联合应用也显示出更好的疗效^[15]。本研究结果表明, EGFR、VEGF 在卵巢癌中表达升高, EGFR 和 VEGF 在卵巢肿瘤血管形成过程中可能起协同作用, 为多靶点治疗提供了一定依据, 并对提示患者预后和筛选治疗方案有重要指导作用。

[参 考 文 献]

[1] Tomov S, Popovska S, Veselinova T, et al. Immunohistochemical analysis of epidermal growth factor receptors expression in malignant ovarian tumors [J]. Akush Ginekol (Sofia), 2005, 44(Suppl 2): 42-47.

[2] 陈爱平, 张 晶, 刘 辉, 等. EGFR、MVD 和 LRP 在上皮性卵巢癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(3): 248-253.

[3] Alper O, Bergmann-Leitner ES, Bennett TA, et al. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93 (18): 1375-1384.

[4] Sini P, Wyder L, Schnell C, et al. The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(12): 4521-4532.

[5] Raspollini MR, Castiglione F, Garbini F, et al. Correlation of epidermal growth factor receptor expression with tumor microdensity vessels and with vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma [J]. Int J Surg Pathol, 2005, 13(2): 135-142.

[6] 沙 丹, 何友兼. VEGF 及其受体 Flt21、KDR 在鼻咽癌组织中的表达及意义 [J]. 癌症, 2006, 25(2): 229 - 234.

[7] 唐琼兰, 刘卫平, 张文燕, 等. CYR61 和 VEGF 在结外鼻型 NK/T 细胞淋巴瘤中的表达及其意义 [J]. 中华血液学杂志,

2006, 27(10): 661 - 665.

[8] Stoscheck CM, King LE Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis [J]. Cancer Res, 1986, 46(3): 1030-1037.

[9] Nielsen JS, Jakobsen E, Holund B, et al. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR over expression in borderline and epithelial ovarian cancer [J]. Int J Gynecol Cancer, 2004, 14(6): 1086-1096.

[10] Senger DR, Van de Water L, Brown LF, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology [J]. Cancer Metastasis Rev, 1993, 12 (3-4): 303- 324.

[11] Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma [J]. Br J Cancer, 2000, 83(2): 196-203.

[12] Brustmann H, Naudé S. Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with high mitotic activity and high FIGO stage [J]. Gynecol Oncol, 2002, 84(1): 47-52.

[13] Nishida N, Yano H, Komai K, et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma [J]. Cancer, 2004, 101(6): 1364-1374.

[14] Pore N, Jiang Z, Gupta A, et al. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms [J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3197- 3204.

[15] Ciardiello F, Troiani T, Bianco R, et al. Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multitarget anticancer therapy [J]. Ann Oncol, 2006, 17 (Suppl 7): 109- 114.

[收稿日期] 2008 - 05 - 26 [修回日期] 2008 - 07 - 01
[本文编辑] 王 莹

欢迎订阅《肿瘤研究与临床》

《肿瘤研究与临床》是由中华人民共和国卫生部主管, 中华医学会、山西省肿瘤研究所、山西省肿瘤医院主办的肿瘤学专业学术期刊, 是中华医学会系列杂志之一, 被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国际著名检索系统及国内各大检索数据库收录, 为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国生物医学核心期刊、中国肿瘤学类核心期刊。主要栏目: 专论、基础研究、临床研究、临床经验、技术改进、调查报告、讲座、综述、短篇及个案报告、消息等。

《肿瘤研究与临床》为月刊, 大 16 开, 72 页, 随文插图, 每月 28 日出版。每期定价 6.00 元, 全年 72.00 元。本刊刊号 ISSN 1006 - 9801; CN11-5355/R。邮发代号: 22-137, 国外发行代号 M04755(中国图书贸易总公司), 全国各地邮局(所) 均可订阅。如邮局订阅延误, 可直接汇款至编辑部补订。

联系地址: 山西省太原市职工新街 3 号; 邮编: 030013
联系电话: 0351-4650389、4650386; 传真: 0351-4651415
E-mail: zlyjylc@163.com; 网址: http://www.zlyjylc.com.cn