

## 大鼠肝细胞癌 Ang2 和 Tie2 表达与肿瘤血管生成的关系

李文政<sup>1,\*</sup>, 杨 璞<sup>2</sup>, 彭光春<sup>1</sup>, 汤恢煥<sup>3</sup>, 周 军<sup>3</sup>, 付春燕<sup>4</sup>, 冯德云<sup>4</sup>, 周 旋<sup>1</sup>, 黄满平<sup>1</sup>, 周高峰<sup>1</sup>  
(中南大学湘雅医院 1. 放射科; 2. 卫生部肝胆肠外科研究中心; 3. 普外科; 4. 病理科, 长沙 410008)

**[摘要]** 目的:探讨肝细胞癌中 Ang2 和 Tie2 表达与肿瘤血管生成的关系。方法:清洁级雄性 Wistar 大鼠 38 只,随机分为对照组 5 只、实验组 25 只(5, 10, 15, 20, 25 d 组各 5 只)及实验补充组 8 只,采用免疫抑制法建立同种移植大鼠 CBRH-7919 肝细胞癌模型;采用免疫组织化学染色方法检测不同生长阶段实验组肝癌组织和对照组肝组织标本中 Ang2 和 Tie2 的表达,同时测定抗 CD31 标记的微血管密度。结果:共 24 只大鼠成功建模。肝细胞癌组织中 Ang2 和 Tie2 的表达均较对照组肝组织明显增高( $P < 0.05$ )。Ang2 和 Tie2 的表达水平与肿瘤微血管密度呈正相关( $P < 0.01$ )。在不同生长阶段 Ang2 呈早期、持续性高表达。结论:肝细胞癌血管生成与 Ang2 和 Tie2 的表达上调有关,Ang2 可能参与了肝细胞癌血管生成的启动环节。

**[关键词]** 癌,肝细胞; 血管生成; 血管生成素

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0523-05

## Expression of Ang2 and Tie2 and their relation with the angiogenesis of hepatocellular carcinoma in rats

LI Wen-zheng<sup>1,\*</sup>, YANG Pu<sup>2</sup>, PENG Guang-chun<sup>1</sup>, TANG Hui-huan<sup>3</sup>, ZHOU Jun<sup>3</sup>,  
FU Chun-yan<sup>4</sup>, FENG De-yun<sup>4</sup>, ZHOU Xuan<sup>1</sup>, HUANG Man-ping<sup>1</sup>, ZHOU Gao-feng<sup>1</sup>

(1. Department of Radiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. National Hepatobiliary and Entonic Surgery Research of Public Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 3. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 4. Department of Pathology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the relationship between the expression of Ang2, Tie2 and the angiogenesis of hepatocellular carcinoma in rats. **Methods** Thirty-eight healthy male rats were randomly divided into 3 groups: 5 rats in the control group; 25 rats in the experimental group were equally divided into 5-day, 10-day, 15-day, 20-day, and 25-day groups; the other 8 rats were used as the supplement of the experimental group. An allogenic transplanted rat model of CBRH-7919 hepatocellular carcinoma in situ was established by immunosuppression. The expressions of Ang2 and Tie2 were detected by immunohistochemical staining in cancerous tissues of different developmental stages and liver tissues of the control group. At the same time, microvessel density was determined by anti-CD31 immunohistochemical staining. **Results** CBRH-7919 hepatocellular carcinoma models were successfully set up in 24 rats. The expression level of Ang2 and Tie2 in cancerous tissues was much higher than that of liver tissues of the control group ( $P < 0.05$ ). The overexpression of Ang2 was pristine and continuous in different developmental stages. The expressions of Ang2 and Tie2 positively correlated with microvessel density in hepatocellular carcinoma ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The up-regulation of Ang2 and Tie2 may play important roles in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. Ang2 may participate in the start of angiogenesis of hepatocellular carcinoma.

**Key words:** hepatocellular carcinoma; angiogenesis; angiopoietin

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006,31(4):0523-05]

肝细胞癌是严重危害人类健康的常见富血管恶性肿瘤,其生长、侵袭、转移及预后均与肿瘤血管生成密切相关。在血管生成分子机制的研究领域,血管生成促进因子和抑制因子的平衡失调导致血管生成的观点已被普遍接受。既往研究表明,Angiopoietins (Ang)/Tie2 信号转导通路的激活在新生血管的重塑、成熟和维持稳定方面起着重要的调节作用<sup>[1]</sup>,但它们在肝细胞癌血管生成中的作用及其机制目前尚未完全阐明或存在分歧。本研究通过建立同种原位移植大鼠肝细胞癌模型,试图探讨 Ang2 和 Tie2 的表达与肝细胞癌血管生成的关系,初步探索肝细胞癌血管生成的调控机制,并为进一步的抗血管生成治疗研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 40 只健康清洁级雄性 Wistar 大鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号 SCXK(沪)2003-0003]。其中 2 只 6 周龄者作为种鼠,余 38 只质量 250~300 g,随机分为对照组 5 只、实验组 25 只及实验补充组 8 只。大鼠肝细胞癌瘤株 CBRH-7919 购自中科院上海细胞生物研究所。RPMI 1640 培养基为美国 Gibco 公司产品,兔抗大鼠 Ang2, Tie2, CD31 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,兔二步法免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制作 种鼠、实验组及实验补充组大鼠均参考程文等<sup>[2]</sup>的方法进行免疫抑制:于大鼠腹部皮下注射 200 mg/kg 阿糖胞苷,2 d 后以 6 Gy<sup>60</sup>Co 照射大鼠全身,并于照射当天每只大鼠肌肉注射 2.5 mg/kg 地塞米松,之后隔日注射 1 次,共 3 次。CBRH-7919 大鼠肝癌细胞株以含 10% 小牛血清、100 mg/L 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI 1640 完全培养基在 37℃,5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度的细胞培养箱中培养,常规方法传代。收集指数生长期的 CBRH-7919 肝癌细胞,配成 5×10<sup>6</sup>/mL 的细胞悬液,取制备好的肿瘤细胞悬液 0.5 mL 以 1 mL 注射器接种于经 8% 硫化钠脱毛处理的种鼠背部皮下,10~14 d 后即形成明显隆起结节。无菌条件下切取皮下接种 14 d 后大鼠

背部皮下生长活跃的肿瘤组织,剔除筋膜和坏死成分,以眼科剪剪成 1 mm×1 mm×2 mm 大小条状瘤块,用生理盐水冲洗后置于无血清的 PRMI 1640 培养液中备用。于实验动物腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg,麻醉生效后仰卧位固定,消毒皮肤,铺无菌巾,开腹,暴露左肝,用眼科镊以 30° 夹角斜行向肝实质插入约 1 cm 构成隧道,植入备好的癌组织块,明胶海绵压迫止血,逐层关腹。移植术后连续 3 d 肌肉注射青霉素 16×10<sup>4</sup> U,并继续隔日肌注地塞米松 2 次。

1.2.2 病理学评价 肝内移植后第 5,10,15,20,25 d 分别取相应时间点实验组全部大鼠及 1 只对照组大鼠行开腹探查后断头处死大鼠,收集癌组织和对照组肝组织标本,以 10% 甲醛溶液固定,以石蜡包埋,切片。按常规方法进行组织切片 HE 染色,按照《中国常见恶性肿瘤诊治规范》中肝细胞癌的诊断标准进行组织学分类和分级。用二步法行 CD31, Ang2, Tie2 免疫组织化学染色,以 PBS 代替一抗作阴性对照。参照 Weidner 等<sup>[3]</sup>的方法测定微血管密度,微血管计数的标准为:凡是染成棕黄色的单个或成簇内皮细胞均作为一个血管计数,分辨不清或染色模糊的细胞、肌层较厚和/或管腔面积大于 8 个红细胞直径的血管不计入内。Ang2, Tie2 阳性染色半定量分级方法为:高倍镜下每张切片随机选取 5 个阳性染色细胞较密集视野,各计数 100 个细胞,以 5 个视野中阳性细胞百分比的平均值代表相应蛋白的表达水平,并分为 0 级(阴性)、1 级(弱阳性)、2 级(阳性)和 3 级(强阳性),分别评分为 0,1,2,3 分,无阳性细胞为 0 分,阳性细胞数小于 10% 为 1 分,10%~40% 之间为 2 分,大于 40% 为 3 分。

1.2.3 统计学处理 计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。应用 SPSS11.5 对计量资料进行单因素方差分析;半定量等级资料采用 Kruskal-Wallis *H* 秩和检验,组间两两比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。两个变量间相关性采用 Spearman 等级相关分析。

## 2 结 果

2.1 模型制作 手术及实验过程中先后有 9 只死于麻醉意外、失血性休克、术后感染,余 24 只

存活大鼠均造模成功,包括 5 d 组、10 d 组、15 d 组、20 d 组各 5 只,25 d 组 4 只。大体解剖肉眼观瘤结节呈灰白色,卵圆形或不规则形,边界较清晰,无包膜,直径 2 ~ 15 mm,部分可见周边子灶,部分与腹壁粘连,4 例伴有腹水,未见明显肿大的腹腔淋巴结,瘤结节剖检呈灰白色,质韧,较大结节内可见灶性坏死。

**2.2 病理检查** 光镜下证实实验组瘤结节为肝细胞性肝癌。

**2.2.1 CD31 表达** 对照组肝组织中未见 CD31 表达。肝细胞癌中 CD31 表达定位于微血管内皮细胞,呈棕黄色或棕褐色(图 1)。5 d 组、10 d 组、15 d 组、20 d 组和 25 d 组 CD31 表达均明显高于对照组( $P < 0.01$ )。10 d 组、15 d 组、20 d 组和 25 d 组 CD31 表达水平均较 5 d 组明显增高

( $P < 0.05$ ),有随种植时间延长微血管密度(microvessel density, MVD)逐渐增加的趋势,但 10 d 组、15 d 组、20 d 组与 25 d 组间两两比较其 MVD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表 1)。

表 1 不同组别 CD31, Ang2 及 Tie2 的表达水平

组别	CD31 ( $\times$ 个/HP)	Ang2 评分(例)			Tie2 评分(例)				
		0	1	2	3	0	1	2	3
对照组	0	5	0	0	0	5	0	0	0
实验组									
5 d 组	6.40 $\pm$ 1.52**	0	0	4	1	0	4	1	0
10 d 组	36.20 $\pm$ 4.87** $\Delta$	0	0	3	2	0	0	3	2
15 d 组	42.20 $\pm$ 8.70** $\Delta$	0	0	3	2	0	0	3	2
20 d 组	47.80 $\pm$ 10.40** $\Delta$	0	0	2	3	0	0	3	2
25 d 组	47.25 $\pm$ 6.60** $\Delta$	0	0	3	1	0	0	3	1

与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 5 d 组比较,  $\Delta P < 0.05$

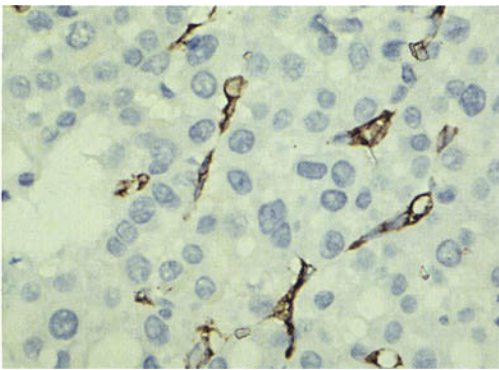


图 1 肝癌组织 CD31 免疫组织化学染色(微血管密度为 47.32 个/HP,  $\times 400$ )

Fig. 1 CD31 immunohistochemistry staining of hepatocellular carcinoma tissue (MVD is 47.32/HP,  $\times 400$ )

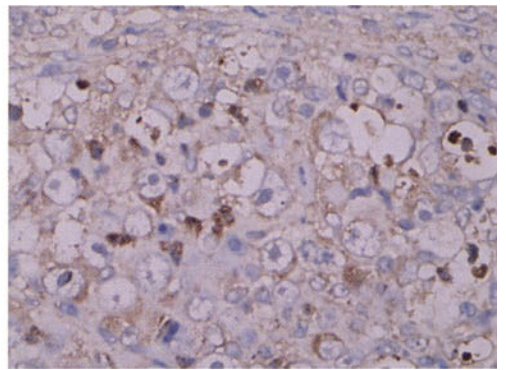


图 2 肝癌组织 Ang2 免疫组织化学染色(评分为 3 分,  $\times 400$ )

Fig. 2 Ang2 immunohistochemistry staining of hepatocellular carcinoma tissue (mark 3,  $\times 400$ )

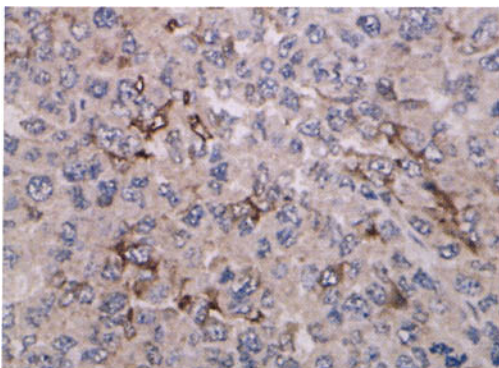


图 3 肝癌组织 Tie2 免疫组化染色(评分为 3 分,  $\times 400$ )

Fig. 3 Tie2 immunohistochemistry staining of hepatocellular carcinoma tissue (mark 3,  $\times 400$ )

**2.2.2 Ang2 表达及其与 MVD 的关系** 对照组肝组织中未见 Ang2 表达。实验组中 Ang2 在多数肿瘤细胞和部分肿瘤微血管内皮可见表达(图 2),阳性表达率为 100% (24/24);其中强阳性 11 例,阳性 13 例,癌组织 Ang2 表达水平较对照组肝组织明显上调( $P < 0.01$ )。5 d 组、10 d 组、15 d 组、20 d 组和 25 d 组各组间两两比较 Ang2 表达水平差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。Spearman 等级相关分析显示:癌组织 Ang2 蛋白表达水平与微血管密度呈正相关( $r = 0.671, P < 0.001$ )。强阳性表达 Ang2 的癌组织其 MVD 值亦较阳性表达者高(表 2)( $P < 0.05$ ),即随着 Ang2 表达水平增高, MVD 有增高的趋势。

2.2.3 Tie2 表达及其与 MVD 的关系 Tie2 在对照组肝组织中未见表达。但在癌组织微血管内皮大量表达(图3),阳性表达率为100%(24/24),其中强阳性12例,阳性8例,弱阳性4例,癌组织与对照组肝组织 Tie2 表达水平差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。5 d 组 Tie2 表达水平高于对照组( $P < 0.01$ ),但低于10 d 组、15 d 组、20 d 组和25 d 组( $P < 0.05$ ),后4组间表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Spearman 等级相关分析显示:癌组织 Tie2 蛋白表达水平与微血管密度呈正相关( $r = 0.783, P < 0.001$ )。对不同 Tie2 表达水平癌组织的 MVD 值进行方差分析和两两比较发现,Tie2 呈弱阳性、阳性和强阳性表达者其 MVD 值差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),随着 Tie2 表达水平增高,其微血管密度亦逐渐增高(表2)。

表2 不同 Ang2 和 Tie2 表达水平肝癌组织 MVD(个/HP)比较( $\bar{x} \pm s$ )

	MVD	
	Ang2	Tie2
阴性	—	—
弱阳性	—	6.25 ± 1.71 * Δ
阳性	27.46 ± 15.19 Δ	33.00 ± 11.54 Δ
强阳性	45.00 ± 14.62	46.92 ± 8.33

与阳性组比较,\*  $P < 0.05$ ;与强阳性组比较,Δ  $P < 0.05$

### 3 讨 论

Angiopoietins/Tie2 是新近发现的一条重要的信号转导通路,在机体生理、病理性血管生成中对新生血管的形成、重塑、成熟及维持稳定等过程发挥着重要的调节作用。Tie2 是血管内皮细胞特异性表达的酪氨酸激酶型受体,在机体生理性血管生成活跃的器官和多种肿瘤的微血管内皮表达增加。单独抑制 Tie2 途径可抑制肿瘤的发展和血管生成<sup>[4]</sup>,表明 Tie2 是独立于 VEGF 的肿瘤血管生成调节通路。Tie2 的配体血管生成素(Angiopoietin, Ang)家族是一组分泌型的细胞因子,是唯一含有受体激动剂和抑制剂的促血管生成因子。Ang1 和 Ang2 已被证实与肿瘤血管生成关系密切<sup>[5]</sup>,但其作用机制仍未完全阐明。多数意见认为:Ang1 和 Tie2 结合后,促进受体磷酸化,调节血管从内皮细胞层形成为多细胞的精细血管结构的成熟过程,并通过细胞-细胞、细胞-基质等相互作用维持血管结构稳定;Ang2 对血管生成的影响与局部的微环境有关,当 VEGF 等血管生成促进因子存在时,Ang2 竞争抑制 Ang1 引起的 Tie2 受体激

酶磷酸化,促进血管结构松解,消除血管基底膜和周围细胞对血管生成的限制,并增加内皮细胞对 VEGF 等的敏感性,形成新的毛细血管,当局部缺乏这些因子时,Ang2 则通过抑制 Ang1 的稳定血管作用使血管消退<sup>[6,7]</sup>。

目前关于血管生成素及其受体在肝癌血管生成中作用的研究报道尚不多。已有的研究结果显示:Ang1 在正常肝脏和肝癌组织中均表达,且癌组织、癌旁组织及正常肝组织之间的表达差异无显著性意义<sup>[8,9]</sup>;Ang2 在癌组织高表达,而在正常肝组织不表达<sup>[8-10]</sup>;Tie2 在癌组织高表达,而在正常肝组织微量表达甚至无表达<sup>[11]</sup>。Tanaka 等<sup>[8]</sup>发现 Ang2 在富血管 HCC 癌组织高表达,在乏血管 HCC 癌组织低表达,转染 Ang2 基因后荷人肝癌裸鼠肿瘤生长加速且常伴有瘤内出血。Chen 等<sup>[10]</sup>的研究结果显示 Tie2 在肝癌组织微血管内皮大量表达,且其表达水平与肿瘤直径、微血管密度及门静脉侵犯密切相关。Mitsuhashi 等<sup>[5]</sup>则发现肝癌组织与癌旁组织 Ang1, Tie2 的 mRNA 含量无明显差别,而肝癌组织 Ang2 mRNA 明显高于癌旁,且 Ang2/Ang1 比值增高与 HCC 门脉侵犯、肿瘤直径、微血管密度和生存时间相关。关于目的基因 Ang1, Ang2 和 Tie2 在 HCC 的表达定位目前尚未形成共识。Torimura 等<sup>[12]</sup>通过免疫组织化学发现 Ang1, Ang2 定位于癌细胞、星形细胞和平滑肌细胞, Tie2 定位于内皮细胞、星形细胞和平滑肌细胞。Kuroda 等<sup>[9]</sup>用原位杂交和免疫组化发现 Tie2 不仅表达于内皮细胞,还可见于肝干细胞。Moon 等<sup>[13]</sup>亦用原位杂交和免疫组织化学的方法发现 Ang1 定位于大血管支持细胞、基质细胞、内皮细胞和肿瘤细胞,而 Ang2 和 VEGF 则主要定位于癌细胞,并据此推测肝癌细胞以旁分泌方式产生大量 Ang2 和 VEGF,两者交互作用,是 HCC 富血管的关键。

本实验用免疫组织化学染色方法对 Ang2 和 Tie2 在肝细胞癌中的表达水平和表达部位进行了研究,结果显示:Ang2 和 Tie2 在癌组织中表达均显著增高;Ang2 主要定位于癌细胞胞浆内,在部分微血管内皮亦有少量表达, Tie2 表达则定位于癌组织微血管内皮;Ang2 和 Tie2 的表达水平均与癌组织微血管密度正相关,即高表达 Ang2 和 Tie2 的癌组织具有相对较高的微血管密度;Ang2 蛋白与 Tie2 蛋白的表达呈正相关。以上结果表明 Ang2 和 Tie2 与肝癌血管生成密切相关,随着微血

管密度升高,Ang2 与 Tie2 从基因水平至蛋白水平的表达均相应上调;Ang2 可能主要通过旁分泌机制由肝癌细胞产生,然后通过与肿瘤微血管内皮细胞上的特异性酪氨酸激酶型受体 Tie2 结合竞争抑制 Ang1 引起的 Tie2 受体激酶磷酸化和血管稳定作用,并增加内皮细胞对 VEGF 等的敏感性,从而促进肝癌血管生成;而 Ang2 在部分微血管内皮少量表达则可能是内皮细胞的自分泌机制的调节作用。

本研究结果尚显示在不同生长阶段肝细胞癌中 Ang2 呈持续高表达,肝内接种后第 5 天其表达水平即明显上调,提示 Ang2 可能参与了肝细胞癌血管生成的启动环节,Ang2 表达增高可能是肝细胞癌等一些肿瘤血管生成的最早期标志,为探索肝癌的早期诊断手段和抗血管生成靶点提供了一条新思路。

#### 参考文献:

- [1] Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, et al. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells [J]. *Microvasc Res*, 1999, 58(3):224-237.
- [2] 程文,张青萍,贡雪灏,等. 超声监护下免疫抑制大鼠肝癌模型的建立 [J]. *中国医学影像技术*, 2003, 17(7): 5-7.
- [3] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis: Correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1-8.
- [4] Siemeister G, Schirner M, Weindel K, et al. Two independent mechanisms essential for tumor angiogenesis: inhibition of human melanoma xenograft growth by interfering with either the vascular endothelial growth factor receptor pathway or the Tie-2 pathway [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(13):3185-3191.
- [5] Mitsuhashi N, Shimizu H, Ohtsuka M, et al. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2003, 37(5): 1105-1113.
- [6] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance [J]. *Science*, 1997, 277(5322):48-50.
- [7] Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced post-natal neovascularization [J]. *Circ Res*, 1998, 83(3):233-240.
- [8] Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, et al. Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(3):341-345.
- [9] Kuroda H, Ohtsuru A, Futakuchi M, et al. Distinctive gene expression of receptor-type tyrosine kinase families during rat hepatocarcinogenesis [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(5): 473-480.
- [10] Chen L, Yang Z, Wang G, et al. Expression of angiopoietin-2 gene and its receptor Tie2 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Tongji Med Univ*, 2001, 21(3):228-230, 235.
- [11] Zhao ZC, Zheng SS, Wan YL, et al. The molecular mechanism underlying angiogenesis in hepatocellular carcinoma: the imbalance activation of signaling pathways [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2003, 2(4):529-536.
- [12] Torimura T, Ueno T, Kin M, et al. Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2004, 40(5):799-807.
- [13] Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: A key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? [J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(6): 552-557.

( 本文编辑 陈丽文 )