



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.006

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201402142.pdf>

## VEGF和miR-205及靶蛋白Ezrin和Lamin A/C在卵巢癌中的表达及意义

周君<sup>1,2</sup>, 刘海玲<sup>1,2</sup>, 陈亦乐<sup>3</sup>, 文继舫<sup>1,2</sup>, 李龙<sup>1,2</sup>, 吴晓英<sup>1,2</sup>

(1. 中南大学湘雅基础医学院病理学系, 长沙 410078; 2. 中南大学湘雅医院病理科, 长沙 410008;

3. 湖南省肿瘤医院妇瘤科, 长沙 410013)

**[摘要]目的:** 分析血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), miR-205, Ezrin, Lamin A/C在卵巢癌组织中的表达及意义。**方法:** 采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测卵巢癌患者和正常女性血清中VEGF的含量; 免疫组织化学检测上皮性卵巢癌组织、卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中血管内皮细胞生长因子受体-1(vascular endothelial cell growth factor receptor-1, VEGFR-1), VEGFR-2, Ezrin, Lamin A/C蛋白的表达情况和CD31所标记的微血管密度(microvessel density, MVD); 采用荧光定量PCR方法检测卵巢上皮性癌组织、卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中miR-205, Ezrin和Lamin A/C的相对表达量。**结果:** VEGF在上皮性卵巢癌患者血清中的表达水平为(116.10±11.94), 高于正常女性(40.04±4.97,  $P<0.05$ ); VEGFR-1和VEGFR-2在卵巢上皮性癌组织中的阳性表达率分别为75.9%和91.4%, 高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中的阳性表达率( $P<0.05$ ), VEGFR-1和VEGFR-2在卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ); MVD在上皮性卵巢癌组织中的计数为(7.56±0.51), 高于正常卵巢组织(1.22±0.56,  $P<0.05$ ), MVD在卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ); miR-205在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量为(0.106±0.035), 高于正常卵巢组织中的相对表达量(0.0007±0.0005,  $P<0.05$ ), miR-205在卵巢良性肿瘤组织中的相对表达量为(0.0002±0.0003), 高于正常卵巢癌组织中的相对表达量, 但差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 免疫组织化学结果显示: Ezrin和Lamin A/C在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率分别为51.7%和60.3%, 低于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中的阳性表达率( $P<0.05$ ), Ezrin和Lamin A/C在卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中的表达差异无统计学意义( $P>0.05$ ); RT-PCR结果显示: Ezrin和Lamin A/C在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量低于正常卵巢组织中的相对表达量( $P<0.05$ ); Ezrin和Lamin A/C在卵巢良性组织中的相对表达量高于在上皮性卵巢癌组织, 但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论:** VEGF在上皮性卵巢癌患者血清中表达上调; miR-205在上皮性卵巢癌组织中表达上调; 差异蛋白Ezrin和Lamin A/C在上皮性卵巢癌组织中表达下调, 提示VEGF和miR-205及靶蛋白Ezrin和Lamin A/C与卵巢癌的侵袭、转移相关。

**[关键词]** miR-205; VEGF; 卵巢癌; Ezrin; Lamin A/C; 侵袭

## Expression and significance of VEGF, miR-205 and target protein Ezrin and Lamin A/C in ovarian cancer

收稿日期(Date of reception): 2013-09-25

作者简介(Biography): 周君, 博士研究生, 讲师, 主要从事妇科肿瘤研究; 刘海玲为共同第一作者。

通信作者(Corresponding author): 吴晓英, Email: 1596020172@qq.com.cn

基金项目(Foundation item): 国家自然科学基金(81172469); 中南大学研究生学位论文创新基金(2011ssxt108)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81172469) and the Fundamental Research Funds for the Central University of Central South University, P. R. China (2011ssxt108).

ZHOU Jun<sup>1,2</sup>, LIU Hailing<sup>1,2</sup>, CHEN Yile<sup>3</sup>, WEN Jifang<sup>1,2</sup>, LI Long<sup>1,2</sup>, WU Xiaoying<sup>1,2</sup>

(1. Department of Pathology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078;

2. Department of Pathology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

3. Department of Women Cancer, Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha 410013, China)

## ABSTRACT

**Objective:** To analyze the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), miR-205, Ezrin and Lamin A/C in ovarian cancer tissues.

**Methods:** The expression of VEGF in the serum of epithelial ovarian cancer and that of healthy volunteers were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; the expressions of vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1), VEGFR-2, Ezrin and Lamin A/C were detected by immunohistochemistry and the micro-vessel density (MVD) of CD31 was detected by immunohistochemistry in epithelial ovarian cancer, benign ovarian and normal ovarian specimens; and the expression of miR-205, Ezrin and Lamin A/C were detected by real-time PCR in epithelial ovarian cancer, benign ovarian and normal ovarian specimens.

**Results:** The expression of VEGF in the serum of epithelial ovarian cancer patients ( $116.10 \pm 11.94$ ) was significantly higher than that of healthy volunteers ( $40.04 \pm 4.97$ ,  $P < 0.05$ ). The positive expression rates of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the epithelial ovarian cancer specimens were 75.9% and 91.4% respectively, which were significantly higher than that in the benign ovarian and the normal ovarian specimens ( $P < 0.05$ ). No differences were observed in the positive expression rates of VEGFR-1 and VEGFR-2 between the benign ovarian and the normal ovarian specimens ( $P > 0.05$ ). The average length of MVD in the epithelial ovarian cancer specimens ( $7.56 \pm 0.51$ ), was significantly higher than that in the normal ovarian specimens ( $1.22 \pm 0.56$ ,  $P < 0.05$ ) and in the benign ovarian specimens ( $0.7 \pm 0.39$ ,  $P < 0.05$ ). No differences were observed in the average length of MVD between the benign ovarian and the normal ovarian specimens ( $P > 0.05$ ). The relative expression level of miR-205 was  $0.106 \pm 0.035$  in the epithelial ovarian cancer specimens, which was significantly higher than that in the normal ovarian specimens ( $0.0007 \pm 0.0005$ ,  $P < 0.05$ ); the relative expression level of miR-205 in the benign ovarian specimens was ( $0.0002 \pm 0.0002$ ), higher than that in the normal ovarian specimens, but with no significance ( $P > 0.05$ ). The positive expression rates of Ezrin and Lamin A/C in the epithelial ovarian cancer specimens were 51.7% and 60.3%, respectively, which were significantly lower than those in the benign ovarian and the normal ovarian specimens ( $P < 0.05$ ). No differences were observed in the positive expression rates of Ezrin and Lamin A/C between the benign ovarian and the normal ovarian specimens ( $P > 0.05$ ). The relative expression levels of Ezrin and Lamin A/C mRNA in the epithelial ovarian cancer specimens were ( $0.026 \pm 0.003$ ) and ( $0.060 \pm 0.007$ ), respectively, which were significantly lower than those in the normal ovarian specimens ( $P < 0.05$ ). There was no statistical significance between the relative expression level of Ezrin and Lamin A/C mRNA in the epithelial ovarian cancer specimens and that in the benign ovarian specimens ( $0.029 \pm 0.011$ ,  $0.089 \pm 0.019$ ;  $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** VEGF is significantly expressed in the serum of epithelial ovarian cancer patients; and miR-205 is up-regulated in the epithelial ovarian cancer specimens. Ezrin and Lamin A/C are down-regulated in the epithelial ovarian cancer samples. VEGF, miR-205 and target protein may be associated with the invasion and metastasis of epithelial ovarian cancer.

## KEY WORDS

miR-205; VEGF; ovarian cancer; Ezrin; Lamin A/C; invasion

卵巢癌是发生于卵巢的一种恶性肿瘤, 病死率高居妇科恶性肿瘤首位。卵巢癌主要特点之一是易发生转移, VEGF可通过与血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)特异性结合, 进而在肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用。近期研究<sup>[1]</sup>发现: 卵巢癌细胞除表达VEGF外, 还表达VEGFR, 提示VEGF可通过自分泌、旁分泌方式直接作用于卵巢癌细胞本身。多项实验研究<sup>[2-3]</sup>证实VEGF参与卵巢癌的发生、发展、侵袭和转移。但具体的调控机制目前尚不清楚。近年来, 一类新发现的微小RNA(miRNA, miRNA)与肿瘤的侵袭和转移密切相关。一般来说, miRNA作为类似于肿瘤抑制基因发挥作用, 在肿瘤中常常表达为上调, 相反, 作为类似于癌基因发挥作用在癌症中常常表达为下调。然而, miR-205的表达在很大程度上取决于肿瘤的组织学类型。近有研究<sup>[4-5]</sup>显示miR-205与VEGF之间有相互作用关系, 但卵巢癌中的miRNA与VEGF的作用方式尚未见报道, 究竟miR-205与VEGF是如何起作用的, 通过什么机制? 基于这些问题, 本课题组首先以卵巢组织的临床标本为研究对象, 分析VEGF及其受体、miR-205及其候选靶蛋白Ezrin和Lamin A/C在卵巢癌组织中的表达, 并探讨其临床意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

新鲜的卵巢标本来源于2011年9月至2013年3月湖南省肿瘤医院手术切除的上皮性卵巢癌组织25例、卵巢良性肿瘤组织9例和正常卵巢组织12例, 所有组织标本均为手术后立即取材并保存于液氮中, 均经高资历病理诊断医师确诊, 并收集相应完整的临床病历资料。所有卵巢癌患者均为初治手术, 术前未接受放化疗治疗, 未合并其他系统恶性肿瘤, 患者年龄(52.55±7.02)岁。卵巢肿瘤按照FIGO的分期标准分为: I~II期2例, III~IV期23例。卵巢肿瘤按照WHO组织学分级标准分为: 浆液性腺癌11例, 黏液性腺癌14例。卵巢良性肿瘤为良性囊腺瘤, 患者年龄(38.55±1.58)岁; 正常卵巢组织: 取相近年龄段且因其它原因而行卵巢切除的正常卵巢组织12例, 患者年龄(51.16±6.95)岁。标本的收集均获得患者的知情并签订知情同意书。

石蜡标本85例收取于2011年9月至2013年3月中南大学湘雅医院卵巢组织石蜡块, 其中上皮性卵巢癌组织58例, 年龄为37~73(52.41±6.82)

岁。卵巢肿瘤按照WHO组织学分级标准分为: 浆液性癌28例, 黏液性癌30例。正常卵巢组织13例, 因其它原因而行卵巢切除的, 年龄为34~59(47.69±6.84)岁。卵巢良性肿瘤组织14例, 年龄为15~88(38.53±2.12)岁, 所有标本均经术后高资历的病理诊断医师阅片证实。

血清标本收取于2011年9月至2013年11月湘雅医院上皮性卵巢癌患者血标本20例, 年龄为(51.70±1.09)岁。健康志愿者女性血标本18例, 年龄为(47.67±8.93)岁。标本收集采用抗凝管抽取空腹血液, 4℃静置30 min后离心沉淀吸取血清, 分装, -80℃冻存备用。

### 1.2 试剂与仪器

miRNA反转录试剂盒和miRNA real-time PCR试剂盒购自德国Qiagen公司, VEGF试剂盒由武汉博士德生物科技有限公司提供, 兔抗人VEGF-1和VEGF-2多克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司, SABC免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司。紫外分光光度计为德国Eppendorf公司产品。iMark酶标仪11361为美国BIO-RAD公司生产。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 RNA的提取和RT-PCR

采用TRIzol试剂提取组织总RNA, 然后采用紫外分光光度计测定RNA的纯度和浓度, 采用1%的琼脂糖凝胶(含溴化乙锭EB)进行电泳, 评价RNA完整性和是否有基因组DNA的污染, -70℃保存备用。RT-PCR检测Ezrin和Lamin A/C及miR-205按试剂盒说明书进行操作, 首先取1 μg总RNA作为模板与2 μL反转录酶混合, 在20 μL反应体系中, 37℃30 min, 进行反转录反应, 95℃5 min, 终止反应。收集cDNA, 然后将cDNA 150倍稀释, 取2 μL稀释的cDNA与10 μL SYBR Green引物混合, 20 μL反应体系(PCR反应程序): 95℃变性30 s; 接着执行40个循环, 条件为95℃5 s, 60℃34 s, U6作为内参。

#### 1.3.2 ELISA检测VEGF水平

所有患者均在住院未经治疗的情况下清晨空腹抽取3 mL静脉血, 离心后取上层血清封口, 置-80℃冰箱保存, 待测。采用ELISA测定VEGF含量。检测步骤严格按试剂盒说明书进行, 用酶标仪测定。在450 nm处测吸光度值, 测定值按标准曲线换算成VEGF含量, 最小的VEGF检测浓度<30 ng/L。

#### 1.3.3 免疫组织化学检测

采用免疫组织化学SABC进行检测, 石蜡块标

本连续切片, 厚度为4  $\mu\text{m}$ , 肿瘤组织切片进行微波抗原修复。严格按VEGFR-1, VEGFR-2, Lamin A/C和CD31试剂盒说明进行。Ezrin抗体、VEGFR-1和VEGFR-2抗体免疫组织化学染色后, 以在细胞浆、细胞膜中出现棕褐色细颗粒状为阳性, Lamin A/C抗体以在细胞核、核膜中出现棕褐色细颗粒状为阳性表达。免疫组织化学结果评分<sup>[6]</sup>采用半定量方法, 按其评分分为不表达(0~1分), 低表达(2分), 中度表达(3~5分), 高表达(6~7分)。评分 $\leq 2$ 分的为阴性表达,  $>2$ 分的为阳性表达。CD31抗体主要表达在肿瘤间质的血管内皮细胞。微血管密度(microvessel density, MVD)计数的判定方法参照Wendner等<sup>[7]</sup>方法: 微血管定义为邻近的血管、肿瘤细胞及其它结缔组织分开的被染成棕色的单个内皮细胞或细胞簇, 大于6个内皮细胞形成的管腔或未染色的管腔不计数。400倍镜下寻找毗邻肿瘤细胞微血管最为丰富的间质热点区, 尽量避开肿瘤坏死区和血管硬化区, 有平滑肌纤维包绕的或管腔直径大于6个红细胞直径之和的较大血管不在微血管计数范围, 分别计数5个400倍视野范围内微血管数量, 取其均值作为各标本的MVD。

#### 1.4 统计学处理

所得数据均采用SPSS13.0统计软件进行分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多样本间均数采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-*t*检验。免疫组织化学计数结果, 组间阳性率的比较

采用卡方检验或Fisher确切概率法检验。检验水准 $\alpha=0.05$ , 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VEGF在卵巢癌患者血清中表达

VEGF的检测采用血清标本, 其中上皮性卵巢癌患者血标本20例, 健康志愿者女性血标本18例。VEGF在卵巢上皮癌患者血清中的表达量为(116.10 $\pm$ 11.94) pg/mL, 高于正常对照组血清中的表达量(40.04 $\pm$ 4.97) pg/mL, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.2 VEGFR-1和VEGFR-2在卵巢癌组织中的表达

VEGFR-1和VEGFR-2的表达主要用石蜡切片进行检测, 其中上皮性卵巢癌组织58例, 卵巢良性肿瘤组织14例, 正常卵巢组织13例。VEGFR-1和VEGFR-2阳性表达位于卵巢癌细胞膜、细胞质及癌间质的血管内皮细胞的胞膜或胞浆, 在正常对照和卵巢良性肿瘤组中的血管内皮细胞。VEGFR-1和VEGFR-2在正常对照组、卵巢良性肿瘤组和上皮性卵巢癌组中都表达, 且表达阳性率逐渐升高。VEGFR-1和VEGFR-2在上皮性卵巢癌组织与正常卵巢组织之间的差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 在卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织之间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ; 表1, 图1)。

表1 VEGFR-1 和 VEGFR-2 在上皮性卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组和正常卵巢组中的表达

Table 1 Expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 in epithelial ovarian cancer tissue, benign ovarian tumor tissue and normal ovarian tissue

组别	n	VEGFR-1		VEGFR-2	
		阳性例数	阳性率/%	阳性例数	阳性率/%
正常对照组	13	3	23	6	46
卵巢良性肿瘤组	14	6	42.8	9	64.2
上皮性卵巢癌组	58	44	75.9	53	91.4

与正常对照组比较,  $P<0.05$

### 2.3 MVD的计数

MVD的变化主要用石蜡切片进行检测, 其中上皮性卵巢癌组织58例, 卵巢良性肿瘤组织14例, 正常卵巢组织13例。上皮性卵巢癌组织中MVD分布不均, 癌外周组织的微脉管较内部密集。MVD在正常卵巢组织中的计数为

(1.22 $\pm$ 0.56), 低于在上皮性卵巢癌组织中的计数(7.56 $\pm$ 0.51), 差异具有统计学意义( $P<0.05$ ); MVD在卵巢良性肿瘤组织中的计数为(0.7 $\pm$ 0.39), 低于在正常卵巢组织中的计数(1.22 $\pm$ 0.56), 差异无统计学意义( $P>0.05$ , 图2)。

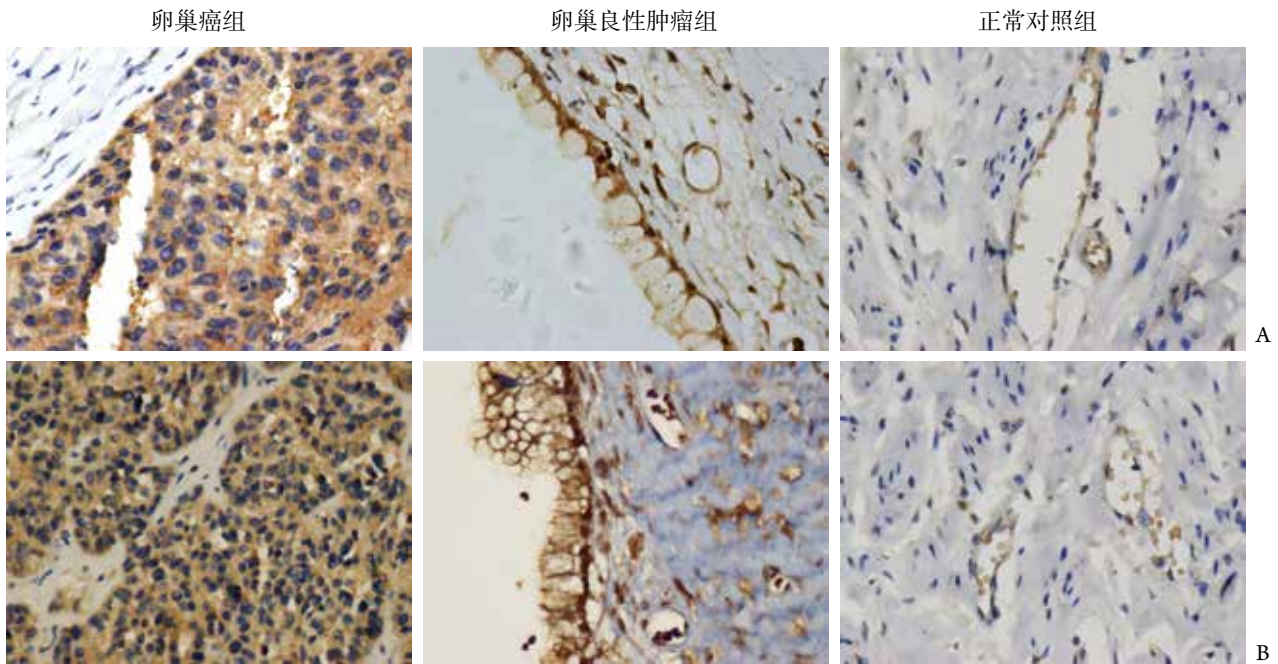


图1 VEGFR-1和VEGFR-2在上皮性卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组和正常对照组的表达(SABC, ×400)

Figure 1 Expression of VEGFR-1 and VEGFR-2 in epithelial ovarian cancer tissue, benign ovarian tumor tissue and normal ovarian tissue (SABC, ×400)

A: Expression of VEGFR-1; B: Expression of VEGFR-2

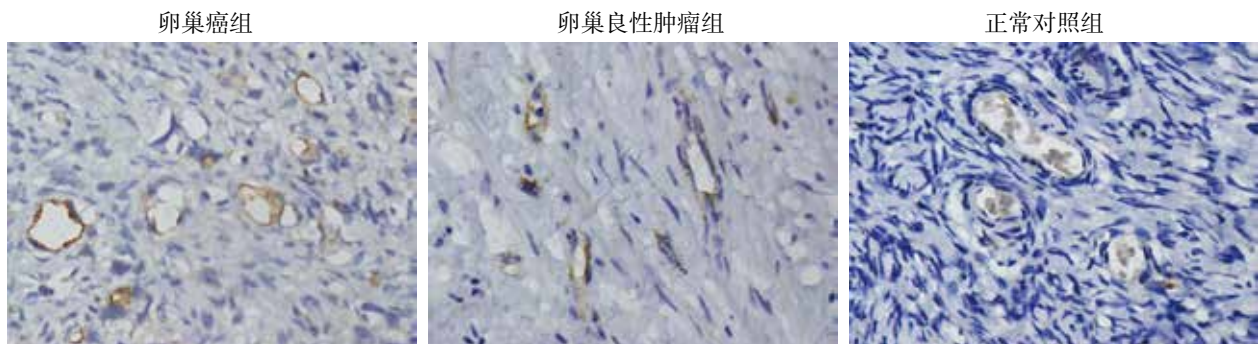


图2 上皮性卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组和正常对照组的MVD(SABC, ×400)

Figure 2 MVD in epithelial ovarian cancer tissue, benign ovarian tumor tissue and normal ovarian tissue (SABC, ×400)

#### 2.4 miR-205在卵巢癌组织中的表达

miR-205基因用新鲜的卵巢标本进行测定,其中上皮性卵巢癌组织25例、卵巢良性肿瘤组织9例和正常卵巢组织12例。miR-205基因在不同卵巢组织中的表达水平不同,结果显示:miR-205在正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织及上皮性卵巢癌组织中都有表达。miR-205在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量为 $(0.106 \pm 0.035)$ ,高于正常卵巢组织中的相对表达量 $(0.0007 \pm 0.0005)$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),miR-205在卵巢良性肿瘤组织中的相对表达量为 $(0.0002 \pm 0.0003)$ ,亦高于正常卵巢癌组织中

的相对表达量 $(0.0007 \pm 0.0005)$ ,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

#### 2.5 Ezrin和Lamin A/C蛋白在卵巢组织中的表达

Ezrin和Lamin A/C蛋白表达主要用石蜡切片进行检测,其中上皮性卵巢癌组织58例,卵巢良性肿瘤组织14例,正常卵巢组织13例。Ezrin和Lamin A/C蛋白阳性表达表现为卵巢组织细胞膜或细胞浆呈棕黄色颗粒,阴性为卵巢组织的细胞膜和细胞质不着色。Ezrin在正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织和上皮性卵巢癌中均表达,阳性表达率逐

渐降低, 分别为92.3%, 85.7%和51.7%。Lamin A/C在正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织和上皮性卵巢癌组织中均表达, 阳性表达率分别为92.3%, 92.8%和60.3%。正常卵巢组、卵巢良性肿瘤组与上皮性卵巢癌组之间的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。Ezrin和Lamin A/C蛋白在正常对照组与上皮性卵巢癌组之间差异有统计学意义( $P<0.05$ ), 与卵巢良性肿瘤组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ; 表2, 图3)。

## 2.6 Ezrin和Lamin A/C基因的表达水平

Ezrin和Lamin A/C基因用新鲜的卵巢标本进行测定, 其中上皮性卵巢癌组织25例、卵巢良性肿瘤组织9例和正常卵巢组织12例。Ezrin和Lamin

A/C在正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织及上皮性卵巢癌组织中均有表达。Ezrin在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量为( $0.026\pm 0.003$ ), 低于正常卵巢组织中的相对表达量( $0.045\pm 0.005$ ), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); Ezrin在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量亦低于卵巢良性肿瘤组织中的相对表达量( $0.029\pm 0.011$ ), 但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。Lamin A/C在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量为( $0.060\pm 0.007$ ), 低于正常卵巢组织中的相对表达量( $0.212\pm 0.020$ ), 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); Lamin A/C在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量低于卵巢良性肿瘤组织的相对表达量( $0.089\pm 0.019$ ), 但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表2 Ezrin 和 Lamin A/C 蛋白在卵巢组织中的表达

Table 2 Expression of Ezrin and Lamin A/C protein in ovarian tissues

组别	n	Ezrin		Lamin A/C	
		阳性例数	阳性率 / %	阳性例数	阳性率 / %
正常对照组	13	12	92.3	12	92.3
卵巢良性肿瘤组	14	12	85.7	13	92.8
上皮性卵巢癌组	58	30	51.7*	35	60.3*

与正常对照组比较, \* $P<0.05$

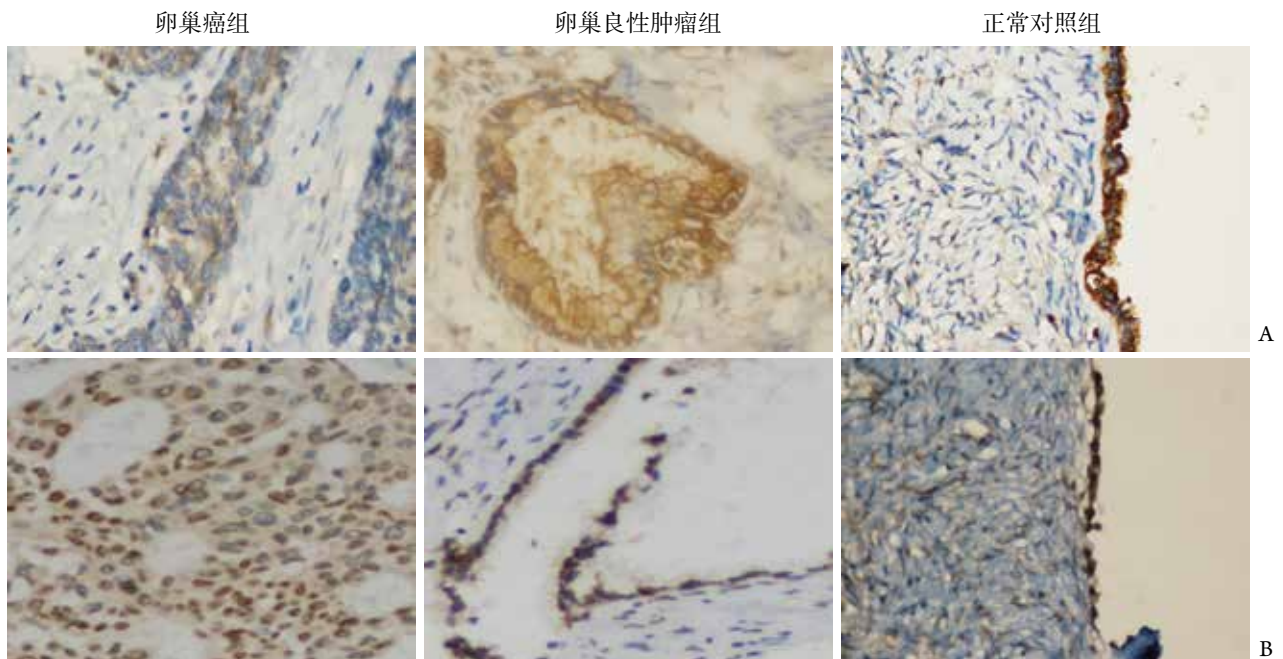


图3 Ezrin 和 Lamin A/C 在上皮性卵巢癌组、卵巢良性肿瘤组和正常对照组中的表达 (SABC,  $\times 400$ )

Figure 3 Expression of Ezrin and Lamin A/C in epithelial ovarian cancer tissue, benign ovarian tumor tissue and normal ovarian tissue (SABC,  $\times 400$ )

A: Expression of Ezrin; B: Expression of Lamin A/C

### 3 讨论

VEGF是一类与血管内皮细胞增殖及血管新生密切相关的生长因子,它通过与特异性受体结合在胚胎发育、创伤愈合、肿瘤的生长和侵袭转移中发挥重要的作用。VEGF需要与靶细胞上的受体结合才能发挥生物学功能。迄今为止有5种VEGFR被发现,分别被命名为VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), VEGFR-3 (Flt-4), Np-1 (neuropilin-1)和 Np-2 (neuropilin-2)。其中研究最多的3种受体是VEGFR-1, VEGFR-2和VEGFR-3,这3种受体同属于酪氨酸蛋白激酶受体(receptor tyrosine kinases, RTKS)超家族。大量研究<sup>[8-12]</sup>表明VEGF除了以旁分泌方式与血管内皮细胞上的受体结合来促进肿瘤的生长、侵袭和转移外,它还可以通过肿瘤细胞表面的受体结合后刺激肿瘤细胞增殖和迁移;提示VEGF可通过自分泌方式直接作用于肿瘤细胞本身,进而促进肿瘤的侵袭和转移。

本实验首先采用ELISA检测VEGF在上皮性卵巢癌患者血清中的表达,结果显示VEGF在上皮性卵巢癌患者血清中的表达量远远高于在正常卵巢癌患者血清中的表达量,与Li等<sup>[2]</sup>研究结果一致,提示VEGF与上皮性卵巢癌的发生、生长、侵袭和转移密切相关。本实验同时采用免疫组织化学技术检测VEGFR在卵巢组织中的表达,发现VEGFR-1和VEGFR-2在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率分别为75.9%和91.4%,均高于正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤组织中的阳性表达率;说明卵巢癌细胞表面有VEGFR的存在及高表达,可接受VEGF的作用。既往研究<sup>[9,11]</sup>结果表明:VEGF的分泌增加可促进肿瘤微血管增长,肿瘤的血管生成是肿瘤细胞生长及转移所必需的,MVD作为衡量血管生成的定量指标,与肿瘤的发展和预后密切相关。VEGF, VEGFR与MVD计数往往呈正相关。VEGF在卵巢癌组织中表达增高,很可能通过促进血管生成而影响肿瘤的进展与预后<sup>[10]</sup>,这与本实验结果CD31标记的MVD在上皮性卵巢癌组织中的平均值高于其在正常卵巢组织中的平均值的结果一致。综合以上数据表明:VEGF可与上皮性卵巢癌细胞表面的受体特异性结合,可促进血管新生,影响卵巢癌的发生、发展、侵袭和转移。

人类miR-205定位于染色体1q32.2区域的LOC642587基因,近年研究发现,miR-205在肿瘤细胞的分化以及疾病的发生发展过程中发挥巨大作用。近有研究<sup>[4-5]</sup>已经证实miR-205与VEGF之间的作用, Gregory等<sup>[13]</sup>也证明miR-205和miR-200

家族通过靶向作用ZEB1和SIP1能影响EMT,表明miR-205与肿瘤的侵袭和转移存在相关性。本实验采用RT-PCR检测上皮性卵巢癌组织中miR-205的表达,结果显示miR-205在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量明显高于卵巢良性肿瘤组织及正常卵巢组织,与Iorio等<sup>[14]</sup>报道一致;提示miR-205在上皮性卵巢癌的侵袭和转移中起一定的作用。

Ezrin蛋白又称为细胞绒毛蛋白、P81或VilIn-2,与根蛋白和膜突蛋白在结构和功能上有70%的同源性,故称之为ERM蛋白家族。具有活性的Ezrin蛋白可参与调节肿瘤发生、发展及侵袭、转移等密切相关的细胞活动。Ezrin在皮肤癌<sup>[15]</sup>、胰腺癌<sup>[16]</sup>、乳腺癌<sup>[17]</sup>、结肠癌<sup>[18]</sup>、子宫内膜癌<sup>[19]</sup>、喉鳞癌<sup>[20]</sup>、前列腺癌<sup>[21]</sup>和鼻咽癌<sup>[22]</sup>等肿瘤中过表达并促进肿瘤的侵袭和转移,可作为肿瘤预后的分子标志物;而Ezrin在卵巢癌中的表达及作用存在争议。本研究采用免疫组织化学技术检测Ezrin蛋白在卵巢组织中的表达,结果发现Ezrin在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率为51.7%,低于正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤组织中的阳性表达率,差异有统计学意义。同时荧光定量PCR检测Ezrin表达水平, Ezrin在正常卵巢组的相对表达量高于上皮性卵巢癌组织中的相对表达量,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );此结果与 Moilanen等<sup>[23]</sup>报道的一致,提示Ezrin与卵巢癌的侵袭、转移相关。Ezrin在卵巢癌中的表达下调与其它肿瘤的表达不一致,可能与肿瘤组织类型的不同有关。

Lamin A/C包括LaminA和LaminC,这是两种不同的剪接体,也称为A型Lamins,主要作用是核膜提供骨架结构和维持核的稳定。Lamin A/C参与DNA的复制、基因转录的调控、细胞分化与凋亡、生长促进剂和核迁移的调控。因此, Lamin A/C的缺失或下调与各种不同组织来源的肿瘤发生和转移密切相关。大量研究表明,在许多恶性肿瘤如血液系统的恶性肿瘤<sup>[24]</sup>、结肠癌<sup>[25]</sup>、前列腺癌<sup>[26]</sup>、肺癌<sup>[27]</sup>和胃癌<sup>[28]</sup>中Lamin A/C的表达缺失。由此可见, Lamin A/C表达下调或缺失时,细胞的侵袭和增殖能力大大提高。本研究采用免疫组织化学检测Lamin A/C蛋白在卵巢组织中的表达,结果发现Lamin A/C在上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率为60.3%,均低于正常卵巢组织和卵巢良性肿瘤组织中的阳性表达率,差异具有统计学意义。同时荧光定量PCR检测Lamin A/C基因的表达水平, Lamin A/C在正常卵巢组织中的相对表达量均高于在上皮性卵巢癌组织中的相对表达量,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );表明Lamin A/C在上皮性卵巢癌中低表达,提示Lamin A/C与卵巢癌的侵袭

和转移相关。

综上所述, 临床标本的检测结果显示了 VEGF, miR-205 和 Ezrin, Lamin A/C 在上皮性卵巢癌的表达与侵袭和转移相关, 四者在其中可能起协同作用, 本实验在前期<sup>[29]</sup>研究中对 VEGF165 刺激后的上皮性卵巢癌细胞系 HO8910 进行了 miRNA 基因芯片技术的检测, 结果表明 VEGF165 能诱导 miR-205 表达上调, 生物信息学方法也预测到 miR-205 与差异蛋白 Ezrin 和 Lamin A/C 的 3'-UTR 均有结合位点; 提示 VEGF 可能通过 miRNA-205 介导的相关靶蛋白 Ezrin 和 Lamin A/C 调控卵巢癌的侵袭与转移。

## 参考文献

1. 陈亚冰, 叶大风, 谢幸, 等. 卵巢上皮癌细胞中 VEGF 和 VEGFRs 的表达与 STATs 的活化[J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(1): 33-37.  
CHEN Yabing, YE Dafeng, XIE Xing, et al. Expression of VEGF/VEGFRs and activation of STATs in ovarian cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2005, 27(1): 33-37.
2. Li L, Wang L, Zhang W, et al. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer[J]. Anticancer Res, 2004, 24(3b): 1973-1979.
3. Ueda M, Terai Y, Kumagai K, et al. Vascular endothelial growth factor C gene expression is closely related to invasion phenotype in gynecological tumor cells[J]. Gynecol Oncol, 2001, 82(1): 162-166.
4. Yue X, Wang P, Xu J, et al. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A[J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 1200-1206.
5. Wu H, Zhu S, Mo YY, et al. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer[J]. Cell Res, 2009, 19(4): 439-448.
6. Jennet M, Harvey, Gary M, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer [J]. Am Soc Clin Oncol, 1999, 17(5): 1474-1481.
7. Wendner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognosis indicator in early-stage breast carcinoma[J]. Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.
8. 卢运萍, 张阿丽, 王世宣, 等. 卵巢癌血管内皮生长因子过度表达及肿瘤浸润转移机制的探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(5): 294-297.  
LU Yunping, ZHANG Ali, WANG Shixuan, et al. Role of vascular endothelial growth factor overexpression in ovarian tumor invasion and mechanism[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2002, 37(5): 294-297.
9. Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(13): 3004-3009.
10. Gadducci A, Viacava P, Cosio S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in primary tumors and peritoneal metastases from patients with advanced ovarian carcinoma[J]. Anticancer Res, 2003, 23(3C): 3001-3008.
11. 哈建利, 张泽波. 卵巢癌组织中 VEGF 的表达及其与 MVD 的关系[J]. 咸宁学院学报: 医学版, 2011, 25(4): 296-298.  
HA Jianli, ZHANG Zebo. Study on relationship between expression of VEGF and microvascular density in human epithelial ovarian cancer tissue[J]. Journal of Xianning University. Medical Sciences, 2011, 25(4): 296-298.
12. Lee JS, Kim HS, Jung JJ, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and p53 and c-erbB-2 protein expression[J]. Gynecol Oncol, 2002, 85(3): 469-475.
13. Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, et al. MicroRNAs as regulators of Epithelial-mesenchymal transition [J]. Cell Cycle, 2008, 7(20): 3112-3118.
14. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(18): 8699-8707.
15. Wu B, Li J, Huang D, et al. Baicalein mediates inhibition of migration and invasiveness of skin carcinoma through Ezrin in A431 cells[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 527.
16. Zhong ZQ, Song MM, He Y, et al. Knockdown of Ezrin by RNA interference reverses malignant behavior of human pancreatic cancer cells in vitro[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3781-3789.
17. Mak H, Naba A, Varma S, et al. Ezrin phosphorylation on tyrosine 477 regulates invasion and metastasis of breast cancer cells [J]. BMC Cancer, 2012, 12: 82.
18. Wang HJ, Zhu JS, Zhang Q, et al. High level of ezrin expression in colorectal cancer tissues is closely related to tumor malignancy [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(16): 2016-2019.
19. Yasuoka H, Tsujimoto M, Inagaki M, et al. Clinicopathological significance of podocalyxin and phosphorylated Ezrin in uterine endometrioid adenocarcinoma[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(5): 399-402.
20. Gao W, Zhang C, Feng Y, et al. Fascin-1, ezrin and paxillin contribute to the malignant progression and are predictors of clinical prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e50710.
21. Valdman A, Fang X, Pang ST, et al. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue[J]. Eur Urol, 2005, 48(5): 852-857.
22. Endo K, Kondo S, Shackelford J, et al. Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration[J]. Oncogene, 2009, 28(14): 1725-1735.
23. Moilanen J, Lassus H, Leminen A, et al. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients[J]. Gynecol



- Oncol, 2003, 90(2): 273-281.
24. Agrelo R, Setien F, Espada J, et al. Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(17): 3940-3947.
25. Willis ND, Cox TR, Rahman-Casans SF, et al. Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2988.
26. Debes JD, Sebo TJ, Heemers HV, et al. p300 modulates nuclear morphology in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(3): 708-712.
27. Machiels BM, Broers JL, Raymond Y, et al. Abnormal A-type lamin organization in a human lung carcinoma cell line[J]. Eur J Cell Biol, 1995, 67(4): 328-335.
28. Wu Z, Wu L, Weng D, et al. Reduced expression of lamin A/C correlates with poor histological differentiation and prognosis in primary gastric carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 8.
29. 李泽夏. miR-205介导VEGF促卵巢癌细胞侵袭机制的初探[D]. 长沙: 中南大学, 2012.
- LI Zexia. The role of miR-205 mediated VEGF promoting invasion of human ovarian cancer cell [D]. Changsha: Central South University, 2012.

(本文编辑 彭敏宁)

**本文引用:** 周君, 刘海玲, 陈亦乐, 文继航, 李龙, 吴晓英. VEGF和miR-205及靶蛋白Ezrin和Lamin A/C在卵巢癌中的表达及意义[J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(2): 142-150. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.006

**Cite this article as:** ZHOU Jun, LIU Hailing, CHEN Yile, WEN Jifang, LI Long, WU Xiaoying. Expression and significance of VEGF, miR-205 and target protein Ezrin and Lamin A/C in ovarian cancer [J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2014, 39(2): 142-150. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.02.006