

网络出版时间: 2018-11-5 15:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.021.html>

VIP 在肝癌中的表达及与巨噬细胞极化的相关性的研究

王 涛, 葛勇胜, 刘文斌, 束清华, 石 旭

摘要 目的 探讨肝细胞癌(简称肝癌)组织中血管活性肽(VIP)表达及其与癌组织中肿瘤相关巨噬细胞(TAM)极化的关系。方法 使用免疫组化的方法检查 90 例肝癌组织标本中癌组织和癌组织 2 cm 以外正常组织内的 VIP 蛋白的表达情况,及相应炎症细胞中 TAM 和两个亚型标志物 CD68、CD206、CD11c 蛋白表达情况; Western blot、实时定量 PCR(qRT-PCR)法检测 VIP 在 20 对新鲜冰冻标本肝癌及癌旁正常组织中的相对表达量。结果 Western blot 和 qRT-PCR 检测结果显示在蛋白和 mRNA 水平上,肝癌组织中 VIP 的相对表达量均高于癌旁组织($P < 0.01$)。免疫组化显示 VIP 在肝癌癌组织中阳性表达率为 80% (72/90),显著高于癌旁正常组织的阳性表达率 29% (26/90)。VIP 在肝癌组织中的表达和患者临床因素中肝硬化、年龄相关性有统计学意义($\chi^2 = 12.63, 4.756, P < 0.05$)。而与肝癌患者的肿瘤包膜、肝癌 TNM 分期、肿瘤大小等其他临床病理特征相关性无统计学意义;肝癌组织中 VIP 的表达强度与 TAM 标志物 CD68 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达强度呈正相关性,而与 M1 型巨噬细胞标志物 CD11c 呈负相关性。结论 VIP 在肝癌组织中表达高于癌旁组织,其表达与患者肝硬化及患者年龄相关,提示 VIP 与肝癌的发生和发展有一定关系;VIP 可能促进 TAM 向 M2 型极化来影响肝癌的生长。

关键词 肝细胞癌; VIP; TAM

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)12-1915-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.021

2018-07-26 接收

基金项目 安徽省自然科学基金(编号:1308085MH147);安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号:16040804011)

作者单位 安徽医科大学附属省立医院肝脏外科、肝胆胰外科安徽省重点实验室,合肥 230001

作者简介 王 涛,男,硕士研究生;

葛勇胜,男,博士,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: ahslyygs@163.com

肝细胞癌(简称肝癌)是消化系统最常见的实体肿瘤之一^[1],原发性肝癌患者由于多药耐药而预后较差^[2],患者总体复发率达到 70%。虽然肝癌的诊断和治疗手段不断提升,但其结果仍不理想,早期对肝癌所形成的认识以及评价重点为以临床背景作为基础的配套肿瘤分期(如: BCLC 以及 TNM 分期)。而近些年来肿瘤微环境的概念越来越得到人们的重视,其在肿瘤的预后及评价中发挥重要作用,免疫细胞作为肿瘤微环境的肿瘤组成部分^[3],免疫细胞中的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)被发现起着越来越重要作用。TAM 一般可以界定为两个基础分类:经典激活的促炎症 M1 型,替代性 M2 型。前期研究^[4]表明: M2 型巨噬细胞在肝癌患者晚期阶段的表达显著高于 M1 型巨噬细胞,并且影响其预后。那是什么原因会导致晚期肝癌中 M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞表达的差异促使进一步探究。

血管活性肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是由 28 个氨基酸组成的多肽,血管活性肠肽具有广泛的生理作用,涉及各个系统。研究^[5]显示 VIP 与恶性肿瘤的关系密切,如:一些恶性肿瘤组织中 VIP 含量增加,能调节 TNF α , IL-6, IL-12 和 INOS,参与肿瘤的免疫逃逸,其原理可能与巨噬细胞的极化有关。然而, VIP 与肝癌的关系鲜有报道,该研究通过该研究通过 Western blot 法和实时定量 PCR 法检测 VIP 在肝癌组织和癌旁组织中的表达,同时免疫组化染色检测肝癌组织和癌旁组织中 VIP 及巨噬细胞标志物 CD68, M1 巨噬细胞标记物 CD11c 以及 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达,初步探讨肝癌组织中 VIP 的表达及其与巨噬细胞极化的关系。

nucleus of each layer of epidermis, mainly in the upper part of stratum spinosum and granular layer. In normal control group, C/EBP β was abundantly expressed in the nucleus of each layer of epidermis. C/EBP β protein and mRNA expression was significantly decreased in psoriasis compared to the normal control($P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed that C/EBP β protein expression was negatively correlated with PASI score($r = -0.604, P = 0.017$). **Conclusion** The decrease of C/EBP β expression may participate in the development of psoriasis.

Key words psoriasis vulgaris; tissue; C/EBP β ; immunohistochemistry; PCR

1 材料与方法

1.1 病例资料 以安徽省立医院肝脏外科收治案例作为基础,选择2006年4月~2015年10月,进行相关的切除标本资料同时在相关的病理证实中确定归属于肝细胞性肝癌的石蜡标本,选择的标本数量90例,其中男性标本62例,女性28例,TNM分期为I/II级55例,III/IV级35例。同时选定该院内的肝胆胰实验室所存放的肝癌以及周边组织的标本共计20例,针对其开展配套的Western blot以及qRT-PCR的检验工作。选择的案例在手术之前并没有进行化疗、放疗以及介入等相关的治疗操作;这一分析得到了患者以及家属的书面认可,同时已经通过了院内伦理学委员会的审批程序。

1.2 主要试剂 CD11c抗体购自美国abcam公司;VIP抗体、CD206抗体和CD68抗体均购自北京bioass公司;免疫组化试剂盒和 β -actin购自北京中杉金桥公司;ECL超敏发光试剂盒、逆转录试剂盒购自美国Thermo公司;PCR引物购自上海生工生物工程公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组化染色 运用免疫组化SP法检测CD68、CD11c、CD206和VIP蛋白表达,所选肝癌标本来自于医院病理科,制成2 μ m厚切片,过三道二甲苯及乙醇后,经过抗原高温还原,按1:2 000加入VIP抗体(CD68为1:400,CD206为1:100,CD11c为1:100),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入通用型二抗37 $^{\circ}$ C孵育30 min,PBS洗片后,DAB显色;随后苏木精复染,再经酒精梯度脱水、中性树胶封片。步骤均参照试剂盒的说明书进行操作,对各分子进行染色。

1.3.2 Western blot 取肝癌及癌旁组织100 mg,增添相关的RIPA细胞裂解液1 ml,在4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min条件下离心处理15 min,获得蛋白,配制SDS-PAGE凝胶,1:4的比例增添5 \times SDS-PAGE缓冲液。在沸水状态下加热持续10 min,以此来实现充分变性的效果。样品降低到室温之后,上样至SDS-PAGE孔就可以完成。对每孔的剂量为5~20 μ l。浓缩胶实际采用的电压参数是80 V。电泳结束后,分离蛋白并将蛋白至PVDF膜上,将膜放入预制的洗涤液之内,持续漂洗5 min,VIP一抗(抗属于兔抗1:300稀释;同时其中采用了10%的分离胶)4 $^{\circ}$ C的状态下低速摇动过夜。1:10 000进行HRP标记二抗的稀释操作。在室温环境中持续2 h。增添,洗涤3次。显影、定影,结果拍照、扫描;同法用兔抗人

β -actin作内参对照;VIP条带灰度值与 β -actin灰度值之比用于统计学分析。

1.3.3 qRT-PCR 参照TRIzol说明书提取20例冰冻标本中肝癌组织和癌旁组织总RNA,合成cDNA,PCR扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性2 min;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 10 s,经过40个循环。VIP荧光定量引物序列F:5'-CTTGGGTCAACTTTCTGCCA-3',R:5'-GGCGG-GTATAGTTGTCAGTG-3',扩增产物长度131 bp;内参(β -actin)F:5'-GGGAAATCGTGCGTGACATTA-AGG-3',R:5'-CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3',扩增产物长度180 bp;VIP mRNA的表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

1.4 结果判定 免疫组化结果的判读由两名经验丰富的不知患者临床资料的病理科医师双盲读片。染色评分:棕褐色3分,棕黄色2分,浅黄色1分,着色很弱或未着色为0分。阳性百分率计算:光镜下随机观察5个高倍镜视野,阳性细胞百分率0~5%为0分,5%~50%为1分,50%~75%为2分,75%~100%为3分。两者相乘结果为0分的记为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~6分为中等强度阳性(++),9分为强阳性(+++),+~+++均判为阳性;两者相乘结果的分数得分 ≥ 4 分者即定为高表达,分数 < 4 分者即定为低表达。

1.5 统计学处理 采用SPSS 16.0和GraphPad Prism软件进行分析,对属于定量数据的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,两变量间相关性分析采用Spearman秩相关分析,若两变量都存在等级关系采用Gamma法进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VIP在肝癌、癌旁及正常肝组织中qRT-PCR的相对表达量 检测结果显示,肝癌组织中mRNA相对表达水平(1.10 ± 0.48)高于癌旁组织(0.22 ± 0.13),其差异有统计学意义($t = 7.88$, $P < 0.01$)。见图1。Western blot法分析显示,肝癌组织中VIP相对含量(0.87 ± 0.20)高于癌旁组织(0.46 ± 1.56),差异有统计学意义($t = 5.57$, $P < 0.01$)。见图2。

2.2 免疫组化结果 染色结果显示VIP在肝癌组织及癌旁组织均有表达,表达部位是细胞质,但肝癌组织细胞中阳性表达率为80% (72/90),明显高于癌旁组织中的表达率29% (26/90),

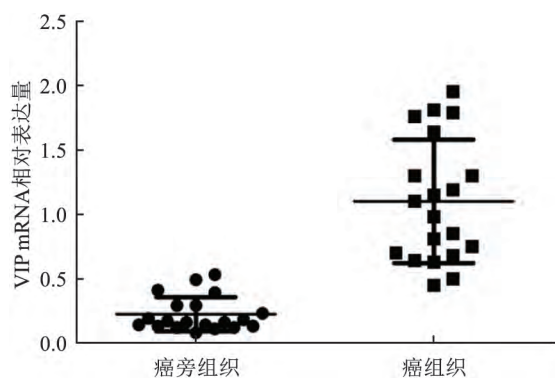


图1 qRT-PCR 实验分析 VIP 在肝癌组织及癌旁组织中的表达

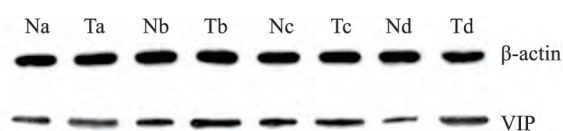


图2 肝癌及癌旁组织中 VIP 蛋白的表达

T: 肝癌组织; N: 癌旁组织; a、b、c、d: 4 组配对的肝癌与癌旁组织

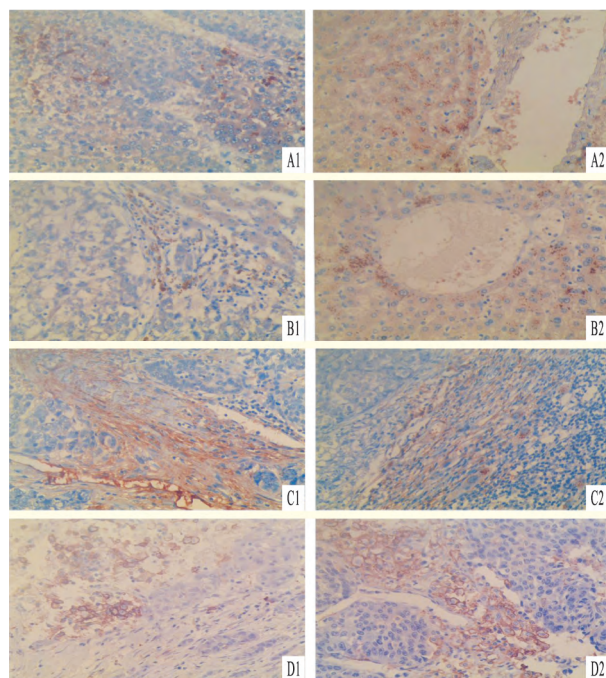


图3 免疫组化染色检测各指标在癌和

癌旁组织中的表达 HE × 400

A: VIP; B: CD68; C: CD206; D: CD11c; 1: 癌组织; 2: 癌旁组织

见图3。VIP 的表达和临床因素中患者肝硬化、患者年龄相关 ($\chi^2 = 12.63, 4.756, P < 0.05$) ,而与肝癌患者的肿瘤包膜、肝癌 TNM 分期、肿瘤大小等其他临床病理特征无明显相关性,见表1。同时结果显

示肝癌组织中 VIP 的表达与 CD68 的表达呈正相关性 ($r = 0.443, P < 0.05$) ,见表2; VIP 的表达与 CD206 也呈正相关性 ($r = 0.328, P < 0.05$) ,见表3; 而与 CD11c 呈负相关性 ($r = -0.309, P < 0.05$) ,见表4。

表1 VIP 的表达与临床病理特征之间的关系 (n)

项目	n	VIP 表达强度		χ^2 值	P 值
		低表达	高表达		
性别					
男	62	32	30	0.020	0.887
女	28	14	14		
年龄(岁)					
<50	37	24	13	4.756	0.029
≥50	53	22	31		
肿瘤直径(cm)					
≤5	32	15	17	0.357	0.550
>5	58	31	27		
肿瘤包膜					
完整	52	29	23	1.069	0.301
缺失	38	17	21		
TNM 分期					
I ~ II	55	27	28	0.231	0.631
III ~ IV	35	19	16		
AFP(ng/ml)					
>20	44	21	23	0.394	0.530
≤20	46	25	21		
HBsAg					
阳性	61	30	31	0.282	0.595
阴性	29	16	13		
肝硬化					
有	68	42	26	12.63	0.000
无	22	4	18		

表2 VIP 与 CD68 相关性 (n)

VIP 表达强度	CD68 表达强度				合计
	-	+	++	+++	
-	6	8	4	0	18
+	14	12	2	0	28
++	6	7	3	4	20
+++	3	6	7	8	24
合计	29	33	16	12	90

表3 VIP 与 CD206 相关性 (n)

VIP 表达强度	CD206 表达强度				合计
	-	+	++	+++	
-	8	6	4	0	18
+	6	15	6	1	28
++	7	6	7	0	20
+++	3	10	6	5	24
合计	24	31	23	6	90

表4 VIP 与 CD11c 相关性(*n*)

VIP 表达强度	CD11c 表达强度				合计
	-	+	++	+++	
-	2	4	5	7	18
+	5	8	7	8	28
++	6	7	3	4	20
+++	8	7	7	2	24
合计	21	26	22	21	90

3 讨论

最开始是 Said et al^[6] 在上世纪 70 年代对猪小肠的研究中报道 VIP 的,为一类特定形式的碱性多肽,内部构成为 28 个氨基酸残基,对其结构进行研究,发现五分之一是螺旋模式,而剩下的结构不存在明显的规律;人类的 VIP 基因位于 6q24 号染色体区域,核苷酸长度为 9 kb,该基因包括 7 个外显子。其通过外周以及相关神经系统分泌,具备扩张血管、加快肠道运用的功能,属于是胰泌素/VIP 族的一类物质,同样也是一类关键的脑肠肽,在胃肠道等身体的多个组织和器官中均存在,跟消化系统的健康状况存在着直接的关联^[7]。VIP 通过 G 蛋白耦联受体 (VPAC1、VPAC2、PAC1) 同时利用及 PI3K 渠道,在生物体内发挥着重要的功能。当下研究^[8] 表明 VIP 跟免疫性能还有密切的关系。VIP 能够带动特定细胞出现抑炎因子 IL-10,同时对其他类型的因子具备相应的抑制功能。降低共刺激分子 B7 的表达;VIP 治疗可抑制肿瘤坏死因子、IL-6、IL-12 和诱导型一氧化氮合酶的表达^[9]。VIP 参与了胃癌、前列腺癌及血液系统恶性肿瘤^[10] 多种肿瘤的生长。研究^[11] 表明发 VIP 诱导的 BCL-2 家族蛋白磷酸化可通过 Ras/MAPK 和 PKA 信号通路在前列腺癌中抑制细胞凋亡,从而达到肿瘤逃逸功能,促进肿瘤生长。研究^[12] 证实胃癌组织中 VIP 表达与胃癌组织中炎性细胞内 NKG2D、PI3K 表达呈负相关性,而 NKG2D-PI3K 信号转导通路是肿瘤免疫细胞发挥免疫的重要信号通路。结肠癌患者血浆内的 VIP 水平为 $(116 \pm 10.14) \mu\text{g/ml}$,明显高于正常健康人的水平 $(42.44 \pm 2.54) \mu\text{g/ml}$ 。结肠癌细胞株 Caco-2 在分化时,VIP 表达的受体是增加的,用碘标记 HT29 细胞株结肠癌表面的 VIP 受体,用放射性元素检测仪检测,随即在溶酶体内可检测到放射性,说明 VIP 受体是被溶酶体吞噬并分解,3 min 后其放射性减少 50% 左右。同时动物实验^[13] 表明,VIP 能促进大鼠

结肠癌的生长,VIP 受体拮抗剂协同结肠癌化疗药物作用于结肠癌模型鼠,能明显增强疗效,说明 VIP 在结肠癌作用中主要还是起着促进肿瘤生长的方向,而抑制 VIP 的作用,则能抑制肿瘤的效果。生理情况下 VIP 随门静脉血流进入肝脏,大部分与肝细胞表面的 VIPR 进入细胞内被溶酶体消化降解,肝硬化时肝功能障碍,VIP 灭活减少,其 VIP 血浆浓度升高,另有动物实验^[14] 表明小鼠体内的 VIP 的表达量是随着年龄增长而增加的,这和本实验证明高龄患者组织内 VIP 表达高于低龄以及肝硬化患者 VIP 表达较高相一致。

TAM 作为生长因子、细胞因子趋化因子等分子的作用靶点,能改变肿瘤微环境,促进肿瘤恶化。M1 巨噬细胞型主要能分泌杀伤分子、炎症因子、趋化因子等参与炎症反应、清除病原体,还可高提呈抗原,参与免疫应答发挥抗肿瘤效应;M2 型巨噬细胞抗原提呈能力较弱,抑制了 T 细胞增殖,参与了肿瘤的发生、发展及转移,促进血管和淋巴管生成等。最近的研究^[15] 表明 anti-TAM 作用的小分子抑制剂抑制肿瘤生长,如细胞毒性因子、唑来膦酸。然而这些对肿瘤抑制剂表现出低渗透和有限的影响,说明抑制 TAM 作用主要是要选择性抑制 M2 型巨噬细胞而不是 M1 型巨噬细胞的作用才会达到最佳的效果。本研究中结果显示 VIP 与 TAM 标志物 CD68 和 M2 型巨噬细胞标志物 CD206 的表达呈正相关性,说明 VIP 可能促进了巨噬细胞向 M2 型活化,用 VIP 类似物或受体拮抗剂来抑制 TAM 的作用将能选择性的抑制 M2 巨噬细胞而不会抑制 M1 型巨噬细胞的作用,将能更好的抑制肿瘤生长。这仅仅是从有限的实验数据中得到的推论,需要更多的动物实验和体外细胞实验进一步证实。

参考文献

- [1] Waller L, Deshpande V, Pysopoulos N. Hepatocellular carcinoma a comprehensive review [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(26): 2648-63.
- [2] Jin X, Cai L, Wang C, et al. CASC2/miR-24/miR-221 modulates the TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cell through caspase-8/caspase-3 [J]. *Cell Death Dis* 2018, 9(3): 318.
- [3] Noy R, Pollard J W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. *Immunity* 2014, 41(1): 49-61.
- [4] Shu Q H, Ge Y S, Ma H X, et al. Prognostic value of polarized macrophages in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. *J Cell Mol Med* 2016, 20(6): 1024-35.

- [5] Vacas E ,Bajo A M ,Schally A V ,et al. Vasoactive intestinal peptide induces oxidative stress and suppresses metastatic potential in human clear cell renal cell carcinoma [J]. *Mol Cell Endocrinol* , 2013 ,365(2) : 212 – 22.
- [6] Said S I ,Mutt V. Polypeptide with broad-biological activity: I-isolation from small intestine [J]. *Science* ,1970 ,169(3951) : 1217 – 8.
- [7] Li G ,Wu K ,Tao K ,et al. Vasoactive intestinal peptide induces CD14 + HLA-DR-low myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer[J]. *Mol Med Rep* 2015 ,12(1) : 760 – 8.
- [8] Jimeno R ,Leceta J ,Martínez C ,et al. Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells [J]. *Immunol Cell Biol* 2012 ,90(2) : 178 – 86.
- [9] Chen L ,Yuan W ,Chen Z ,et al. Vasoactive intestinal peptide represents activation of tumor-associated macrophages in gastric cancer *via* regulation of TNF α , IL-6 , IL-12 and iNOS [J]. *Int J Oncol* , 2015 ,47(4) : 1361 – 70.
- [10] Petersen C T ,Hassan M ,Morris A B ,et al. Improving T-cell expansion and function for adoptive T-cell therapy using *ex vivo* treatment with PI3K δ inhibitors and VIP antagonists [J]. *Blood Adv* 2018 ,2 (3) : 210 – 23.
- [11] Sastry K S ,Chouchane A I ,Wang E ,et al. Cytoprotective effect of neuropeptides on cancer stem cells: vasoactive intestinal peptide-induced antiapoptotic signaling [J]. *Cell Death Dis* ,2017 ,8(6) : 2844 – 54.
- [12] 万娟,孙姚,王翀,等.胃癌组织VIP与癌组织炎症细胞内NKG2D、PI3K p85 α 、NF- κ B p65表达的关系[J]. *山东医药* 2015 ,55(24) : 10 – 3.
- [13] Hejna M ,Hamilton G ,Brodowicz T ,et al. Serum levels of Vasoactive intestinal peptide(VIP) in patients with adenocarcinomas of the gastrointestinal tract [J]. *Anticancer Res* ,2001 ,21(2A) : 1183 – 7.
- [14] 王利,唐承薇,王春晖,等.发育过程中肝脏血管活性肠肽及其受体量的变化[J]. *生理学报* 2005 ,57(3) : 379 – 83.
- [15] Giraudo E ,Inoue M ,Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis [J]. *J Clin Invest* ,2004 ,114(5) : 623 – 33.

The expression of vasoactive intestinal peptide and its relationship with macrophage polarization in hepatocellular carcinoma

Wang Tao ,Ge Yongsheng ,Liu Wenbin ,et al

(*Dept of Hepatic Surgery ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,
Anhui Province Key Laboratory of Hepatopancreatobiliary Surgery ,Hefei 230001*)

Abstract *Objective* To research the expression of vasoactive intestinal peptide(VIP) and its relationship with macrophage polarization in hepatocellular carcinoma(HCC) . *Methods* Immunohistochemistry was used to examine the expression of VIP protein in 90 cases of HCC and surrounding healthy tissues; and CD68 ,CD206 ,CD11c as the macrophage markers in inflammatory were also detected. Western blot and PCR (qRT-PCR) were used to detect the relative expression of VIP in 20 pairs of frozen liver cancer and surrounding tissues. *Results* Immunohistochemical staining showed that the positive expression rate of VIP in the the 90 HCC tissues was 80% ,which appeared at a high level compared to adjacent tissues (29%) . There was a relationship between expression of VIP in tumor cells in HCC and Liver cirrhosis and age ($\chi^2 = 12.63$, $P < 0.05$) ,while no significant correlation to the TNM stage , tumor size , and other clinical pathological. The results of Western blot and qRT-PCR showed that the expression of VIP in hepatocellular carcinoma was greater than that in the surrounding healthy tissues($P < 0.01$) . The expression of VIP in HCC tissue was positively correlated with CD68 and CD206 , and negatively correlated with CD11c. *Conclusion* The expression of VIP in HCC tissues is higher than those in adjacent and is associated with gender and age of in HCC ,which indicate that VIP may play important role in the occurrence and development of HCC. VIP may promote the TAM to M2 polarization to influence the growth of HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; VIP; TAM