

文章编号:1005-6947(2005)02-0146-03

· 简要论著 ·

TGF- β 1, TGF- β RII 和 CDK4 在原发性肝细胞肝癌中的表达及其意义

陈学敏, 李厚祥

(江苏省常州市第一人民医院 肝胆外科, 江苏 常州 213003)

摘要:探讨 TGF- β 1, TGF- β RII 和 CDK4 的表达与肝癌临床病理因素的关系。检测 57 例原发性肝细胞肝癌和癌旁组织中 TGF- β 1, TGF- β RII 和 CDK4 的表达水平, 并作相关分析。结果示 TGF- β 1 在肝癌组织中的阳性表达率(82.46%), 显著高于癌旁组织(66.67%) ($P < 0.05$); TGF- β RII 在肝癌组织中的阳性表达率(35.09%), 显著低于癌旁组织(84.21%) ($P < 0.05$); CDK4 在肝癌组织中的阳性表达率(61.40%), 与癌旁组织中的表达(77.19%), 两者差异无显著性 ($P > 0.05$)。TGF- β 1 在有转移的患者中的表达率(92.31%), 明显高于无转移者(74.19%) ($P < 0.05$); 而 TGF- β RII 在有包膜浸润、转移、组织分化 III, IV 患者中染色较浅且阳性表达率明显下降, 分别为 19.52%, 19.23% 和 7.14%, 明显低于相对应组的 50.0%, 49.39% 和 62.07% ($P < 0.01$)。CDK4 的阳性表达主要集中在有包膜浸润、转移、组织分化 III, IV 患者中 ($P < 0.05$)。TGF- β 1 与 CDK4 的表达呈正相关 ($r = 0.5848$, $P < 0.01$)。提示 TGF- β 1 过表达和 TGF- β RII 表达下降可能增强了肝癌细胞的浸润、转移; CDK4 升高可能促使肿瘤细胞对 TGF- β 1 介导的生长抑制和促进凋亡作用产生逃逸现象。

关键词: 肝肿瘤/病理学; 肝细胞瘤/病理学; TGF- β 1; TGF- β RII; CDK4

中图分类号: R735.7; R730.261

文献标识码: B

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是近年来发现的一类结构相似的蛋白质家族, 在不同条件下, 它们具有抑制或促进细胞增殖或分化的双向调节作用, 而且影响细胞外基质的合成^[1]。TGF- β 1 是 TGF- β 家族中第一个被发现的, 在血小板中含量丰富。国内外学者^[2] 发现, 许多组织均有 TGF- β mRNA 的表达。并认为它们在肿瘤的发生和发展中起到重要作用^[3]。目前对肝癌组织中 TGF- β 1 表达的研究较多, 但 TGF- β 1 及 TGF- β RII 表达与肝癌的浸润、转移的关系还不清楚。本研究用免疫组织化学(免疫组化)方法检测 TGF- β 1, TGF- β RII 和 CDK4 在原发性肝细胞肝癌中的表达水平, 探讨其与该肿瘤临床病理因素的关系。

1 材料与方法

1.1 标本采集

57 例标本来自南通医学院附属医院手术切除并经病理证实的原发性肝细胞肝癌患者。临床资料包括患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤分化程度、有无包膜浸润及转移情况等(附表)。所有标本经 4% 福尔马林固定、乙醇梯度脱水、石蜡包埋, 切片厚 4 μ m, 玻片经 APES 溶液预处理以防止脱片。

1.2 免疫组化染色

兔抗人 TGF- β 1, TGF- β RII 及鼠抗人 CDK4, SP 试剂盒均由福州迈新生物技术开发公司提供。抗原修复液为柠檬酸钠液缓冲液, 由迈新生物技术开发公司提供配方自行配制。采用生物素标记的第二抗体与链霉素抗生物素蛋白连接的过氧化物酶及基质色素混合液测定细胞和组织中的抗原。切片常规脱腊水化后, 在加一抗前行微波抗原修复。已知阳性组织作阳性对照, 每次染色均以 PBS 代替一抗作阴性对照。严格按照 SP 试剂盒说明书操作, DAB 显色。

收稿日期:2004-03-24; 修订日期:2004-07-02。

作者简介:陈学敏(1976-), 男, 湖北襄樊人, 江苏常州市第一人民医院硕士研究生, 主要从事肝脏肿瘤临床方面的研究。

通讯作者:陈学敏 电话:0519-5994976; E-mail:tomuer@163.com。

附表 TGF- β 1,TGF- β RII和CDK4蛋白在原发性肝细胞肝癌中的表达

临床指标	<i>n</i>	TGF- β 1			TGF- β RII			CDK4			
		<i>n</i>	阳性率(%)	<i>P</i>	<i>n</i>	阳性率(%)	<i>P</i>	<i>n</i>	阳性率(%)	<i>P</i>	
性别	男	44	38	86.36	0.8854	13	29.55	0.1289	28	63.64	0.6155
	女	13	9	69.23		7	53.85		7	53.85	
年龄(岁)	>50	26	22	84.62	0.5098	9	34.62	0.8870	14	53.85	0.3975
	≤50	31	25	80.65		7	35.48		21	67.74	
病理组织 分级	I~II	29	23	79.31	0.0478	18	62.07	0.0000	21	51.72	0.0077
	III~IV	28	24	85.71		2	7.14		15	71.43	
甲胎蛋白	阴性	19	15	78.95	0.2229	7	36.84	0.5818	11	57.89	0.4013
	阳性	38	33	84.21		13	35.21		24	63.16	
包膜浸润	阴性	30	24	80.00	0.0371	15	50.00	0.0053	20	46.67	0.0404
	阳性	27	23	85.19		5	19.52		14	77.78	
肿瘤大小	≤5cm	27	20	74.07	0.3917	10	37.04	0.6365	21	62.96	0.5523
	>5cm	30	27	90.00		10	33.33		17	60.00	
转移	阴性	31	23	74.19	0.0470	15	49.39	0.0092	21	45.16	0.0078
	阳性	26	24	92.31		5	19.23		14	80.77	

1.3 结果判断

阳性判断标准:细胞浆中出现浅黄色、棕黄色颗粒为 TGF- β 1 阳性;细胞膜上或细胞浆中出现浅黄色、棕黄色颗粒为 TGF- β RII 阳性;细胞核出现棕褐色、棕黄色染色为 CDK4 阳性。每张切片分别取上、下、左、右及中心共 5 个区域进行细胞计数,每个区域计数 200 个肿瘤细胞,共计数 1 000 个细胞;计算染色细胞所占比例。对染色结果进行半定量法评估根据阳性肿瘤细胞所占比例及表达强度分 3 级:无阳性反应细胞或阳性反应细胞表达率 $\leq 25\%$ 为阴性(-);阳性细胞表达率在 $25\% \sim 50\%$ 和/或染色呈浅棕色者为弱阳性(+);阳性细胞表达率 $\geq 50\%$ 和/或染色呈棕褐色者为强阳性(++).

1.4 统计学处理

用 Stata 7.0 软件对资料进行统计学处理。等级资料用成组秩和检验及配对秩和检验;Spearman 法行相关性分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TGF- β 1,TGF- β RII 和 CDK4 蛋白在肝癌中的表达

(1) TGF- β 1 呈异质性分布,主要表达在癌细胞、癌旁肝细胞等实质细胞,而间质细胞、细胞外结缔组织及包膜中少量表达;肝癌组织阳性表达率为 82.46% (47/57),癌旁组织为 66.67% (38/57),两者差异有显著性 ($P < 0.05$)。(2) 肝癌细胞膜上均无 TGF- β RII 表达,仅少量癌细胞 TGF- β RII 在

胞浆中表达,在核周围呈颗粒状聚集;癌旁组织中,大部分肝细胞在胞浆表达,少数肝细胞呈线性膜表达;肝癌组织中阳性表达率为 35.09% (20/57),显著低于癌旁组织的 84.21% (48/57) ($P < 0.01$)。(3) CDK4 呈棕褐色、棕黄色阳性颗粒主要位于细胞核,极少数位于细胞浆中;肝癌组织阳性率为 61.40% (35/57),癌旁组织为 77.19% (44/57),两者无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.2 TGF- β 1,TGF- β RII 和 CDK4 的表达与肝癌临床指标的关系

TGF- β 1 在有转移患者中的阳性表达率为 92.31% 明显高于无转移患者的 74.19% ($P < 0.05$);而 TGF- β RII 在有包膜浸润、转移、组织分化 III,IV 的患者中染色较浅且阳性表达率明显下降,分别为 19.52%,19.23% 和 7.14%,明显低于相对组 50.0%,49.39% 和 62.07% ($P < 0.01$);CDK4 的阳性表达主要集中在有包膜浸润、转移、组织分化 III,IV 的患者中 ($P < 0.05$)。3 种蛋白在原发性肝细胞肝癌中的表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、甲胎蛋白是否阳性无关(附表)。

2.3 原发性肝癌中 TGF- β 1,TGF- β RII 和 CDK4 蛋白表达的相互关系

通过 spearman 等级相关分析,肝癌细胞 TGF- β 1 与 CDK4 的表达呈正相关 ($r = 0.5848$, $P < 0.01$);与 TGF- β RII 间无相关性 ($r = 0.1737$, $P = 0.1962$)。

3 讨论

细胞的正常增殖有赖于正性调节因子和负性调节因子之间的动态平衡。TGF- β 是一类具有多种生物功能的多肽类生长抑制因子,分子质量为 25 kD,属 TGF- β 超家族。目前证实在哺乳动物中存在 3 种 TGF- β 同种型,即 TGF- β 1, 2, 3^[4],三者生物学作用相似,其中以 TGF- β 1 的含量最高,具有代表性。TGF- β 1 可通过活化 CDKs 抑制因子,进而阻断细胞的生长于 G₁ 期^[5],抑制多种正常细胞和肿瘤细胞的生长。

正常情况下以及肿瘤早期,TGF- β 1 通过其信号系统和 CDK4 作用于细胞周期,以致细胞增殖,诱导细胞分化或凋亡,从而发挥抑癌因子的作用;特定情况下,特别是肿瘤晚期,肿瘤细胞逃逸这种负调控作用,并且高表达 TGF- β 1,通过自分泌和旁分泌作用影响其微环境,促进血管生长,调节细胞外基质(ECM),抑制机体免疫监视功能^[6,7],促进肿瘤细胞侵袭、转移。本研究观察到肝癌组织、癌旁组织中均有较高的 TGF- β 1 表达,肝癌组织中 TGF- β 1 的表达高于癌旁组织,差异有显著性($P < 0.05$)。此结果与 Ito^[8] 和 Bedossa^[9] 报道的研究结果相一致。这可能与机体启动自我保护性机制,增加癌旁组织特别是癌组织中 TGF- β 1 的表达从而抑制细胞的增殖有关。本研究还发现:有包膜浸润者 TGF- β 1 阳性表达显著高于无包膜浸润者($P < 0.01$);有转移者 TGF- β 1 阳性表达显著高于无转移者($P < 0.01$);肝癌 III, IV 级 TGF- β 1 阳性表达显著高于 I, II 级。这提示 TGF- β 1 表达异常可能是肝癌发生、发展、浸润及转移过程中的重要事件;此乃 TGF- β 1 抑制了机体体液免疫和细胞免疫作用,帮助肿瘤细胞逃逸机体的免疫监视,其负性调控作用下降。

值得思考的是肿瘤细胞 TGF- β 1 过度表达同样没有出现肿瘤自身生长抑制。分析其原因,可能与许多上皮来源的肿瘤均存在细胞表面丢失 TGF- β R 和失去对 TGF- β 1 抑制作用的敏感性现象有关。许多研究表明,肿瘤细胞表面丢失 TGF- β R 可能是其逃避负性生长调节的一个共性。本组肝癌组织 TGF- β RII 表达率明显低于癌旁组织($P < 0.05$),且表达率的下降同样显示出与肿瘤的分化、浸润、转移有关($P < 0.01$)。提示肝癌细胞由于 TGF- β RII 表达的下调和/或缺失,使得 TGF- β 1 对肝癌细胞的生长抑制作用被严重削弱和/或丢失,而发挥 TGF- β 1 旁分泌作用。这为肿瘤细胞的生长创造良好环境,有利于肿瘤细胞的生长、浸润、转移。本资料的等级相关分析表明,TGF- β 1 与 TGF- β RII 在肝癌中的表达无明显相关性,其原因可能是本组未考

虑 TGF- β RII 在 TGF- β 1 信号传导中的作用。TGF- β RII 能自由与配体结合,而 TGF- β RII 只能识别配体与 II 型受体的嵌合体,并与之结合形成四聚体。但肝癌细胞如果仅有 TGF- β RII 表达而 TGF- β RII 缺失也可影响 TGF- β 1 信号转导,导致癌细胞失去对细胞生长的负性调控作用。有关 TGF- β 1 和 TGF- β RII, TGF- β RII 与肝癌生长、浸润、转移的关系尚待深入研究。

TGF- β 1 及其信号系统对细胞周期实现调控作用最终通过 CDK4 而得以实现。本研究发现 CDK4 在肝癌组织中有高表达,阳性率为 61.40%,与癌旁组织中的表达差异无显著性($P > 0.05$);而在分化程度差、有浸润及转移的肝癌组织中显著增高($P < 0.01$)。这可能说明 CDK4 的过表达能抵抗 TGF- β 的生长抑制作用,促进肿瘤细胞的生长和发展,反映了肿瘤的生物特性;促进浸润、转移,是肝癌发生、发展中的重要事件。笔者还发现,TGF- β 1 和 CDK4 在肝癌中的表达水平呈等级正相关($r = 0.5848$, $P < 0.001$)。提示无论是 TGF- β 1 对 CDK4 的表达抑制作用减弱,还是另有其他使 CDK4 表达增加的因素,都说明 CDK4 升高,在 TGF- β 1 介导生长抑制作用的削弱和/或肿瘤对 TGF- β 1 生长抑制作用的逃逸过程中可能起重要作用。

参考文献:

- [1] Sporn MB, Roberts AB. Recent progress and new challenges[J]. Cell Biol, 1992, 119(5): 1017-1021.
- [2] Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor - β : Biological function and chemical structure[J]. Science, 1986, 233(4763): 522-534.
- [3] 历有名,陈峰,蔡卫民.原发性肝细胞癌患者转化生长因子 β 1 的基因表达及临床意义[J].中华消化杂志, 1999, 19(1): 29-31.
- [4] Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P, et al. Specificity, diversity, and regulation in TGF - beta superfamily signaling[J]. FASEB J, 1999, 13(15): 2105-2124.
- [5] 陈修熙,来茂德.转化生长因子 β 研究进展[J].世界华人消化杂志, 2000, 8(12): 1405-1409.
- [6] Yazumi S, Ko K, Watanabe N, et al. Disrupted transforming growth factor - beta signaling and deregulated growth in human biliary tract cancer cells[J]. Int J Cancer, 2000, 86(6): 782-789.
- [7] Lee C, Sintich SM, Mathews EP, et al. Transforming growth factor - beta in benign and malignant prostate[J]. Prostate, 1999, 39(4): 285-290.
- [8] Ito N, Kawata S, Tamura S, et al. Elevated levels of transforming growth factor beta messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Res, 1991, 51(15): 4080-4083.
- [9] Bedossa P, Peltier E, Terris B, et al. Transforming growth factor - beta 1 (TGF - beta 1) and TGF - beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers [J]. Hepatology, 1995, 21(3): 760-766.