

转化生长因子 β_1 和胰岛素样生长因子Ⅱ在肝癌组织中的表达及其与肝癌转移的关系

段建平¹, 丛书英¹, 吕洪² (1. 青岛市传染病医院, 青岛 266033; 2. 青岛海慈医疗集团 病理科, 青岛 266033)

摘要: 目的 探讨转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 和胰岛素样生长因子Ⅱ (IGF-Ⅱ) 在原发性肝细胞癌中的表达及其与肝癌转移的关系。方法 采用常规SP免疫组织化学染色检测39例原发性肝细胞癌患者标本中TGF- β_1 和IGF-Ⅱ的表达, 并以21例肝硬化患者、16例肝外伤及肝囊肿患者标本作为对照, 分析其表达水平与肝癌转移的关系。结果 TGF- β_1 和IGF-Ⅱ在转移组肝癌组织的表达率均明显高于无转移组, 在低分化组的阳性表达率明显高于高分化组。TGF- β_1 在正常肝脏组织及肝硬化组织中几乎不表达。IGF-Ⅱ在正常肝脏组织及肝硬化组织中呈弱阳性表达或几乎不表达。TGF- β_1 和IGF-Ⅱ在肝癌组织中的表达水平呈正相关。结论 TGF- β_1 和IGF-Ⅱ的表达与肿瘤分化程度及侵袭转移的发生有关, 可作为估计预后的指标, 对判断肝癌的恶性程度, 预测生物学行为具有一定的临床意义。

关键词: 转化生长因子 β_1 ; 胰岛素样生长因子Ⅱ; 免疫组织化学; 原发性肝细胞癌

Expression of TGF- β_1 and IGF-Ⅱ in hepatocellular carcinoma tissue and the relationship to metastasis

DUAN Jian-ping¹, CONG Shu-ying¹, LV Hong² (1. Qingdao Municipal Infectious Diseases Hospital, Qingdao 266033, China; 2. Department of Pathology of Qingdao Haici Healthcare Group, Qingdao 266033, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of transforming growth factor 1 (TGF- β_1) and insulin-like growth factor (IGF-Ⅱ) in hepatocellular carcinoma (HCC) and their relationships with HCC metastasis. **Methods** The expression of TGF- β_1 and IGF-Ⅱ in HCC specimens were examined in 39 cases with HCC by routine streptavidin-peroxidase (SP) immunohistochemical assay. The specimens of 21 cases of hepatocirrhosis and 16 cases of liver trauma and liver cyst were taken as control. The relationships between their expression levels, liver histopathological grading and correlations with metastasis were analyzed. **Results** The positive rate of TGF- β_1 and IGF-Ⅱ in HCC tissue of metastasis group were significantly higher than that in non-metastasis group, and significantly higher in lowly differentiated group were than in highly differentiated group. TGF- β_1 almost was negative in normal liver tissue and in hepatocirrhosis. IGF-Ⅱ was negative or weak positive in normal liver tissue and in hepatocirrhosis. The expressions levels of TGF- β_1 and IGF-Ⅱ in HCC tissue were positively correlated. **Conclusions** The expressions of TGF- β_1 and IGF-Ⅱ were correlated with differentiating degree of tumour and development of invasive metastasis. Furthermore, it may mediate important aspects of clinical diseases such as evaluating prognosis of HCC, judging malignant degree of HCC and prognosticating biological behaviour.

Key words: TGF- β_1 ; IGF-Ⅱ; Immunohistochemistry; Hepatocellular carcinoma

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 往往在疾病发现时已

有转移, 因此治疗效果欠佳, 预后差, 但其发生和转移机制并不十分清楚。在关于肝癌复发及转移的研究中, 某些生长因子水平的变化是当前研究的新热点, 本研究在同一肝癌组织中同时检测

通讯作者: 段建平 Email: duancoco@sina.com

TGF- β_1 和IGF-II,旨在探讨TGF- β_1 和IGF-II在肝细胞癌发生与转移中的作用,并观察两者之间有无相关性。

1 材料与方法

1.1 标本采集及病理切片 选择1999~2007年间青岛海慈医疗集团手术切除的HCC标本39例,其中男性24例,女性15例,年龄38~85岁,平均年龄(58.05 ± 10.58)岁。均经手术后病理切片证实为肝细胞癌。39例标本按肿瘤细胞分化程度分为高分化者6例,中分化者21例,低分化者12例;按癌结节多少分为单结节30例,多结节9例。其中,伴有肝硬化者31例,AFP阳性者35例,HBsAg阳性者34例,伴有转移者(淋巴结转移、门静脉癌栓、侵犯邻近器官及远处转移)21例。另选取21例肝硬化、16例肝外伤及肝囊肿病例作为对照,其中男性22例,女性15例,年龄20~75岁,平均年龄(50.0 ± 16.0)岁。取上述患者手术切除的存档石蜡包埋的标本连续切片,厚度为4 μm ,进行免疫组织化学染色。

1.2 试剂 兔抗人IGF-II多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司。兔抗人TGF- β_1 单克隆抗体购于北京中山生物科技公司。免疫组织化学染色试剂盒[过氧化物酶标记的链霉亲和素(streptavidin-peroxidase)染色试剂盒]购自北京中山生物科技公司。

1.3 方法 TGF- β_1 和IGF-II的检测采用常规SP免疫组织化学技术染色。用PBS缓冲液代替TGF- β_1 和IGF-II作阴性对照,用已知肝细胞癌组织作阳性对照,DAB显色,按照试剂盒说明操作。

1.4 结果判定

TGF- β_1 和IGF-II根据细胞显色程度及着色范围来评分。

1.4.1 按切片中显色癌细胞数比例计分 0分:无癌细胞显色;1分:显色癌细胞占癌细胞总数<25%;2分:显色癌细胞占癌细胞总数>25%,但<50%;3分:显色癌细胞占癌细胞总数>50%。

1.4.2 按切片中癌细胞显色强度计分 0分:癌细胞无显色;1分:呈浅黄色(弱染色);2分:呈棕

黄色(中等染色);3分:呈棕褐色(强染色)。

将两项相加>3分记为阳性,≤3分记为阴性。

1.5 统计学方法 分析采用SPSS 11.0统计软件,进行 χ^2 检验分析组间差异,Spearman分析进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β_1 在肝癌组织中的表达 在正常肝组织中无明显表达,染色阴性,在肝癌及癌旁组织中均可见到不同程度的着色,从浅黄色至棕褐色不等,大量TGF- β_1 阳性表达的颗粒呈棕黄色,均匀分布于细胞质,少量可见胞膜着色,阳性细胞呈灶性分布,见图1。39例肝癌组织中TGF- β_1 阳性表达率为74.4%(29/39),非癌组织阳性表达率为29.7%(11/37),两者差异有统计学意义($\chi^2 = 15.169$, $P < 0.01$)。

2.2 IGF-II在肝癌组织中的表达 在正常肝组织中无明显表达,染色阴性,肝癌组织中IGF-II阳性表达物呈棕黄色,在胞浆弥漫分布,少数细胞出现胞核着色,胞膜未见着色,在癌组织中呈异质性分布,见图2。39例肝癌组织中IGF-II阳性表达



图1 TGF- β_1 在肝癌组织中表达
(常规SP免疫组织化学染色, 100 \times)



图2 IGF-II在肝癌组织中表达
(常规SP免疫组织化学染色, 100 \times)

率为66.7% (26/39), 非癌组织阳性表达率仅为24.3% (9/37), 肝癌组织中阳性表达率明显高于非癌组织 ($\chi^2 = 13.702, P < 0.05$), 两者差异有统计学意义。

2.3 肝癌中TGF- β_1 和IGF-II表达与临床病理学关系 肝癌组织中TGF- β_1 和IGF-II在肝癌中的表达与临床病理学参数的关系见表1、表2。

通过比较单结节与多结节组TGF- β_1 和IGF-II的表达发现, 两者之间无明显差异性 ($\chi^2 = 0.072, \chi^2 = 0, P > 0.05$)。同样, 在是否伴有肝硬化及AFP阳性、HBsAg阳性组之间, TGF- β_1 和IGF-II的表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

比较转移组与非转移组中TGF- β_1 和IGF-II的表达, 发现TGF- β_1 和IGF-II在肿瘤转移组的表达明显高于无转移组, 两者之间有显著差异 ($\chi^2 = 10.403, \chi^2 = 11.607, P < 0.05$)。通过比较TGF- β_1 和IGF-II表达与临床病理特征之间的关系发现, TGF- β_1 和IGF-II表达与细胞分化程度有关, 在低分化组的阳性表达率均高于高分化组 ($\chi^2 = 10.286, \chi^2 = 10.125, P < 0.05$), 而中分化组与高分化组、中分化组与低分化组之间, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

对各病理分组中TGF- β_1 和IGF-II表达的研究, 发现两者在肝癌组织中的表达水平呈正相关 (相关系数 $r = 0.581, P < 0.05$)。

3 讨论

原发性肝癌是世界范围内发病率很高的恶性肿瘤之一, 全世界每年新增病例超过100万, 以亚太地区居多。该病在发现时往往已是晚期, 多数已有转移, 尽管近年来在手术治疗及介入治疗等方面取得了较大进步, 但其总疗效仍不尽如人意, 肝癌根治切除后的5年复发率高达61.5%, 预后很差, 而肝癌的高转移率是其疗效欠佳的主要原因。有效控制转移和术后复发直接关系到患者的预后, 国内外许多学者试图利用分子生物学手段来提高肝癌的治愈率, 通过开发靶向分子药物, 设计出多种基因治疗手段联合应用的治疗方案, 并取得了令人鼓舞的成果。

TGF- β_1 属TGF- β 超家族, 分子质量为25 kb, 是一种具有多种生物功能的多肽类生长因子, 正常情况下及肿瘤早期, 它可通过活化CDKs抑制因子, 进而阻止细胞生长于G1期, 抑制多种正常细胞及肿瘤细胞的生长, 发挥抑癌因子的作用。但到了肿瘤晚期, 由于TGF- β_1 对体液免疫及细胞

表1 肝癌中TGF- β_1 和IGF-II表达与临床病理学关系

		例数 (n=39)	TGF- β_1 阳性表达[例 (%)]	IGF-II 阳性表达[例 (%)]
癌结节多少	单结节	30	22 (73.3%)	20 (66.7%)
	多结节	9	7 (77.8%)	6 (66.7%)
肝硬化	有	31	23 (74.2%)	21 (67.7%)
	无	8	6 (75.0%)	5 (62.5%)
AFP	+	35	27 (77.1%)	23 (65.7%)
	-	4	2 (50.0%)	3 (75.0%)
HBsAg	+	34	25 (73.5%)	22 (64.7%)
	-	5	4 (80.0%)	4 (80.0%)

表2 肝癌中TGF- β_1 和IGF-II表达与临床病理学关系

		例数 (n=39)	TGF- β_1 阳性表达[例 (%)]	IGF-II 阳性表达[例 (%)]
组织学分级	高分化	6	2 (33.3%)	1 (16.7%)
	中分化	21	15 (71.4%)	14 (66.7%)
	低分化	12	12 (100%)	11 (91.7%)
转移	伴有	21	20 (95.2%)	19 (90.5%)
	不伴有	18	9 (50.0%)	7 (38.9%)

免疫有较强的抑制作用,机体对TGF- β_1 反应性降低,帮助瘤细胞逃逸机体的免疫监视,引起细胞过度生长^[1]。TGF- β_1 可控制c-myc基因表达及Rb磷酸化诱导细胞凋亡,当TGF- β_1 介导的Smad7上调,引起抗凋亡因子NF- κ B活化,信号通路的组成成分发生变化,导致细胞对TGF- β_1 耐受,c-myc过表达,Rb的抑制作用解除,从而使细胞无限制增殖,导致肿瘤的发生^[2,3]。TGF- β_1 也可引起血管内皮生长因子的过度表达,促进血管生成,为肿瘤细胞生长、转移提供良好的局部环境^[4]。它还可以通过增加瘤细胞与胞外基质的相互作用来促进癌的侵袭和转移^[5]。

IGF-II是肝细胞产生的自分泌和(或)旁分泌生长因子之一,是与胰岛素同源的多肽,并具有胰岛素样活性,引起不同类型细胞的有丝分裂。在肝硬化及肝细胞癌的发展过程中,由于门脉高压和肿瘤快速生长引起血供相对不足而导致局部缺氧^[6]以及乙型肝炎病毒感染等因素均可刺激IGF-II大量表达,过量的IGF-II和(或)缺氧又可刺激VEGF mRNA及蛋白质合成,从而加速或扩大了肿瘤新生血管的形成^[6]。过量表达的IGF-II也可直接作用于自身和(或)邻近肝细胞膜上的IGF-IR和(或)IGF-IIR,促使细胞从G1期进入S期,加速DNA和蛋白质等的合成,导致细胞恶性转化^[7]。Lee等^[8]报道,IGF-II通过刺激内皮细胞移行和形态分化直接诱导肿瘤血管形成,其机制可能与IGF-II促进p38有丝分裂原激活的蛋白激酶(p38MAPK)和p125局部黏附激酶(p125FAK)的磷酸化激活以及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)活性上调有关。因此,IGF-II可直接或间接通过增加VEGF的合成促进肿瘤血管形成^[6]。

本研究在同一肝癌组织中同时观察TGF- β_1 和

IGF-II的共同表达情况,探讨两者在肝癌中表达的意义及其与肝癌转移的关系。结果表明TGF- β_1 和IGF-II在肝癌中均有不同程度的阳性表达,两者在已有转移发生的肝癌组织中的表达均显著高于不伴转移的肝癌组织($P < 0.05$),且两者具有正相关性。结合文献,考虑在肝癌晚期,机体对TGF- β_1 的反应性降低,引起c-myc基因过度表达,细胞过度生长,发生恶性转化^[8],而在c-myc基因和IGF-II的联合诱导下,能使肝细胞启动一个持续性、不规则的增殖过程,从而加速了细胞的恶性转化。两者又可通过自分泌和(或)旁分泌作用影响微环境,直接或间接促进血管生成等方式,促进肝癌的发生与转移,且两者在这一过程中可能具有协同作用。

参考文献

- [1] Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, et al. Transforming growth factor- β_1 -induced apoptosis is blocked by β_1 -integrin-mediated mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells[J]. Cancer Sci, 2004, 95: 878-886.
- [2] 邹黎, 姚登福, 邵儒军, 等. 肝癌组织TGF- β_1 异常表达与HBV复制的病理学关系分析[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2005, 14: 552-555.
- [3] Flanders KC, Burmester JK. Medical applications of transforming growth factor- β [J]. Clin Med Res, 2003, 1: 13-20.
- [4] 高华平. 转化生长因子 β_1 及其在肝癌形成中的作用[J]. 国际肿瘤学杂志, 2007, 34: 289-292.
- [5] 王旭东, 战志利. TGF- β 及其受体与肿瘤的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32: 1016-1020.
- [6] Lee YM, Bac MH, Lee OH, et al. Synergistic induction of in vivo angiogenesis by the combination of insulin-like growth factor-II and epidermal growth factor[J]. Oncol Rep, 2004, 12: 843-848.
- [7] 马静, 汤为学. 胰岛素样生长因子II与肝细胞癌[J]. 医学研究杂志, 2006, 35: 55-56.
- [8] 卜召祥, 姚登福, 杨大明. 转化生长因子 β_1 异常表达与肝癌早期诊断[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2003, 12: 413-416.

收稿日期: 2009-02-18