

· 论 著 ·

76 例食管胃交界腺癌肿瘤相关成纤维细胞免疫组化观察<sup>\*</sup>周海英<sup>1</sup>, 吴爱萍<sup>2△</sup>, 刘岩<sup>2</sup>, 陈银苹<sup>3</sup>, 郑素琴<sup>2</sup>, 王文雅<sup>2</sup>

(1. 河北医科大学附属唐山工人医院胸外科; 2. 华北煤炭医学院病理教研室, 唐山;

3. 华北煤炭医学院流行病学与卫生统计学教研室, 唐山 063000)

**摘要:**目的 观察肿瘤相关成纤维细胞(TAFs)中成纤维细胞活化蛋白(FAP)和肝细胞生长因子(HGF)的表达,探讨其与食管胃交界腺癌的关系。方法 用免疫组化 SP 法检测 FAP、HGF 在食管胃交界腺癌、正常胃黏膜及慢性萎缩性胃炎胃黏膜中的表达情况,并分析其与临床病理参数的关系。结果 正常胃黏膜及慢性萎缩性胃炎胃黏膜上皮和间质组织内均未见 FAP 或 HGF 阳性细胞,在食管胃交界腺癌标本间质中可见 FAP、HGF 阳性细胞。结论 FAP、HGF 阳性细胞数目与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目等相关。

**关键词:**食管胃交界腺癌;肿瘤相关成纤维细胞;FAP;HGF

中图分类号:R735.1;R730.2

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)03-0257-02

Effect of tumor-associated fibroblasts on the infiltration and metastasis of adenocarcinoma of esophagogastric junction<sup>\*</sup>

ZHOU Hai-ying<sup>1</sup>, WU Ai-ping<sup>2△</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, et al.

(1. Department of Thoracic Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Hebei Medical University;

2. Department of Pathology, North China Coal Medicine College, Tangshan;

3. Department of Epidemiology and Health Statistics, North China Coal Medicine College, Tangshan 063000, China)

**Abstract: Objective** To observe the expression of fibroblast activating protein (FAP) and hepatocyte growth factor (HGF) in tumor-associated fibroblasts (TAFs), and to investigate the correlation between TAFs and adenocarcinoma of esophagogastric junction. **Methods** The expression of FAP and HGF in adenocarcinoma of esophagogastric junction, normal gastric mucosa and chronic atrophic gastritis was detected by immunohistochemistry, and the clinicopathological correlation was analyzed. **Results** FAP and HGF didn't express in normal gastric mucosa and chronic atrophic gastritis, but did in adenocarcinoma of esophagogastric junction. **Conclusion** In adenocarcinoma of esophagogastric junction, the expression of FAP and HGF is positively related to tumor diameter, differentiation, infiltration depth and lymph node metastasis.

**Key words:** adenocarcinoma of esophagogastric junction; tumor-associated fibroblasts; FAP; HGF

侵袭和转移是恶性肿瘤最为明显的生物学特性,既与肿瘤细胞自身特性相关,亦受临近肿瘤宿主成分的影响,因此,有学者提出了肿瘤-宿主界面微环境这一概念,即变异上皮与其临近间质所构成的微生态环境<sup>[1]</sup>。肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts, TAFs)是此界面体系中最重要宿主细胞之一,其所分泌的成纤维细胞活化蛋白(FAP)、肝细胞生长因子(HGF)等在恶性肿瘤发生、发展中起重要作用<sup>[2]</sup>。食管胃交界腺癌是指横跨食管和胃交界的腺癌,过去多笼统称为胃贲门腺癌。但无论从病理上还是临床特征上,贲门癌均与远端胃癌有明显的不同,却与食管远端腺癌有许多相似之处,因此,学术界都倾向将食管胃交界腺癌列为一独立类型的肿瘤,并按食管癌 TNM 分期标准进行分期<sup>[3-4]</sup>。本课题通过研究 FAP、HGF 的表达,分析食管胃交界腺癌中 TAFs 及其与临床病理参数的关系。

## 1 临床资料

**1.1 一般资料与标本采集** 选择本院 2006~2009 年原发性食管胃交界腺癌手术切除患者标本 76 例,其中男 51 例,女 25 例;年龄 40~76 岁,中位 59 岁。所有患者术前均未经化疗和放疗。另通过胃溃疡行胃大部切除术获取正常胃黏膜标本 6

例,慢性萎缩性胃炎胃黏膜标本 6 例。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 手术标本** 行常规甲醛固定,24h 内取材,石蜡包埋后行 4 $\mu$ m 厚连续切片,分别进行常规 HE 染色和免疫组化染色(SP 法)。

**1.2.2 免疫组化试剂** 为鼠抗人 FAP 单克隆抗体(Alexis 公司)、鼠抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体(ZYMED 公司)、鼠抗人 HGF 单克隆抗体(Alexis 公司)、免疫组化即用型 SP 试剂盒(福建迈新生物技术开发公司)等。免疫组化染色过程参照试剂盒说明书操作。

**1.2.3 以分别表达 FAP、HGF、Vimentin 的乳腺癌标本** 为各自阳性对照;以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

**1.2.4 由 2 位资深病理医师独立观察** 每张切片。结合阳性片中典型阳性细胞的着色特征并排除边缘效应、刀痕等非特异性染色干扰因素的影响,将胞膜、胞浆中出现棕黄色着色的细胞判定为 FAP/HGF 阳性显色细胞;将胞浆中出现棕黄色颗粒的细胞判定为 Vimentin 阳性显色细胞。结合细胞形态、位置进行分析,判定 Vimentin 阳性显色细胞为成纤维细胞,Vimentin 与 FAP 同时阳性者为 TAF。FAP、HGF 根据阳性细胞染

<sup>\*</sup> 基金项目:华北煤炭医学院博硕启动基金资助项目(BS05029)。<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:wuaiping5293@163.com。

色程度及染色细胞百分率进行评分。选择 10 个典型视野( $\times 400$ ),每个视野内随机计数 50 个成纤维细胞,共 500 个,阳性细胞百分率用分值表示,不表达为 0 分, $<10\%$ 为 1 分, $10\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\%$ 为 3 分;基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色深者为 2 分;每个视野内着色程度得分与着色细胞百分率得分相乘为该视野的最后得分,每张片子 10 个视野的平均分值为该标本的最后染色分值。参照 Hasebe 等<sup>[5]</sup>和郑华等<sup>[6]</sup>的标准,将最后平均染色分值小于 1 者记为染色阴性标本, $>1$ 者记为染色阳性标本。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。食管胃交界腺癌组与对照组、食管胃交界腺癌组各病理分级之间 FAP(HGF)染色分值比较采用秩和检验;FAP、HGF 染色阳性标本百分率比较采用卡方检验;FAP、HGF 染色分值与食管胃交界腺癌病理分级是否相关采用 Spearman's 分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 正常胃黏膜及慢性萎缩性胃炎组** 黏膜上皮和间质组织内均未见 FAP 或 HGF 阳性细胞,在间质中可见较多 Vimentin 阳性细胞,尤其是在远离上皮的间质中。

**2.2 食管胃交界腺癌组** 在间质中可见 FAP、HGF 阳性细胞,且染色阳性标本数目与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目等呈正相关,且各组间阳性标本数比较,差异有统计学意义。FAP、HGF 两者之间呈正相关,其有效度及信度差异无统计学意义(表 1)。

表 1 食管胃交界腺癌中 FAP、HGF 的表达 ( $n$ )

临床特征	$n$	FAP		$P$	HGF		$P$
		-	+		-	+	
肿瘤直径(cm)				0.016 2			0.027 1
<3	41	16	25		18	23	
$\geq 3$	35	5	30		7	28	
分化程度				0.003 7			0.016 1
好	20	8	12		9	11	
差	56	6	50		10	46	
浸润深度				$<0.001$			$<0.001$
T <sub>1</sub>	6	5	1		6	0	
T <sub>2</sub>	25	10	15		12	13	
T <sub>3</sub>	36	3	33		6	30	
T <sub>4</sub>	9	1	8		1	8	
淋巴结转移				0.000 5			0.001 2
N <sub>0</sub>	11	8	3		9	2	
N <sub>1</sub>	16	5	11		7	9	
N <sub>2</sub>	33	9	24		11	22	
N <sub>3</sub>	16	1	15		3	13	

淋巴结转移与 FAP 的 Spearman 相关系数为 0.379 9,  $P = 0.000 7$ ;淋巴结转移与 HGF 的 Spearman 相关系数为 0.356 4,  $P = 0.001 6$ 。

## 3 讨论

TAFs 是肿瘤-宿主界面体系中最重要宿主细胞,表达多种细胞因子、蛋白酶、黏附分子等,与肿瘤细胞相互作用,不

同程度增加肿瘤细胞的恶性表型,对肿瘤发生、生长、血管形成、浸润与转移有重要作用,并具有器官特异性。

FAP 是 TAFs 的标志性产物之一,属于丝氨酸蛋白酶类,其选择性表达于上皮性肿瘤间质及伤口愈合处,具有分解明胶和 I 型胶原的活性以及类似二肽基肽酶的活性<sup>[7]</sup>。FAP 主要通过下列方式对肿瘤-宿主界面微环境中各组成成分产生影响:(1)通过直接溶解与其相邻的细胞外基质或激活另外一种蛋白酶而间接溶解基质,促进癌细胞的侵袭,并参与基质的重建;(2)解离与基质蛋白结合的生长因子,使之发挥促癌细胞生长的作用;(3)促进肿瘤微血管生成,从而有利于癌细胞的生长、侵袭<sup>[8-9]</sup>。

HGF 是 TAFs 分泌的一种血源性生长因子,是近年来研究较多的调节肿瘤细胞浸润、转移的关键细胞因子。在促进细胞分裂、增殖、分化、运动及形态发生、血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡等方面发挥重要的生物学功能<sup>[10]</sup>。HGF 在肿瘤侵袭、转移中的作用机制包括以下几个方面:(1)促进肿瘤细胞迁移,增加癌细胞侵袭性<sup>[11]</sup>;(2)诱发血管生成,HGF 可通过磷脂酰肌醇 3 激酶通路诱导血管内皮生长因子的分泌和表达,从而间接促进血管生成<sup>[12]</sup>;(3)促进细胞增殖。

本实验通过对 FAP、HGF 染色阳性细胞的形态、位置进行分析,初步确定其属于成纤维细胞类型。为进一步明确细胞类型,本实验同时进行了波形蛋白的免疫组化染色,结果显示,对应于 FAP 阳性染色的细胞区域,波形蛋白的表达也呈阳性,说明其属于成纤维细胞类型。免疫组化结果显示,FAP 及 HGF 在无病变胃黏膜、慢性萎缩性胃炎间质中不表达,在食管胃交界腺癌间质中表达阳性,提示 FAP 及 HGF 可作为判定胃黏膜良恶性病变的指标之一。另外在食管胃交界腺癌中,FAP、HGF 染色阳性标本数目与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目等呈正相关,提示 FAP、HGF 的表达与食管胃交界腺癌的恶性程度及侵袭程度有密切关系,FAP 及 HGF 表达明显则肿瘤向深度侵袭的可能性加大,淋巴结转移的可能性加大。随着癌细胞的不断浸润扩展,间质中更多的成纤维细胞转化为 TAFs,分泌更多的 FAP 及 HGF 发挥生物学效应,造成癌细胞进一步侵袭、转移。抑制 FAP 及 HGF 的活性可能抑制肿瘤的侵袭和转移。

综上所述,食管胃交界腺癌中 TAFs 的 FAP、HGF 表达增加,且与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目等临床病理参数相关。因此,推测 TAFs 可能通过其分泌的各种蛋白及生长因子等,对食管胃交界腺癌的浸润、转移等起着较重要的作用。

## 参考文献:

- [1] Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface[J]. Nature, 2001, 411(17): 375.
- [2] 武剑, 邓红. 癌相关成纤维细胞与肿瘤细胞相互作用对肿瘤发生发展的影响[J]. 浙江大学学报(医学版), 2008, 37(2): 212.
- [3] Marsman WA, Tytgat GN, ten Kate FJ, et al. Differences and similarities of adenocarcinomas of the esophagus and esophago-gastric junction[J]. J Surg Oncol, 2005, 92(3): 160.
- [4] von Rahden BH, Feith M, Stein HJ. Carcinoma of the cardia: classification as esophageal or gastric(下转第 261 页)

将会导致肿瘤的发生。从理论上讲肿瘤中具有永生特性的肿瘤干细胞自身不会或很少凋亡。那么肿瘤干细胞是否具有这一特性,本实验将肾癌干细胞球及肾癌细胞分别在贫瘠化的无血清培养基中作用 24h 后,发现肾癌干细胞球更耐受这种贫瘠化的“土壤”,有着较低的凋亡率。这一结果提示肿瘤干细胞具有永生化的特性,与一般肿瘤细胞相比生存能力更强。2007 年 Ali 等<sup>[15]</sup>研究 9L 细胞干细胞球生存素、MRP-3 mRNA 表达量较 9L 单层培养细胞表达量升高,提示凋亡率下降。

肾癌干细胞的成功培养及鉴定具有重要意义,从新的角度解释了肾癌的发生、发展及其耐受放、化疗的特性,为肾癌的基础研究提供了新的思路。通过研究其凋亡特性,明确了肾癌干细胞在肾癌发生、发展中的作用,为今后肾癌的治疗提供了明确的靶向。

#### 参考文献:

- [1] 周天贵,周承贵,陈先国,等. 肾癌组织中 MMP-7 表达和 MVD 测定及其临床意义[J]. 山东医药,2009,48(40):22.
- [2] Godley P, Kim SW. Renal cell carcinoma[J]. Curr Opin Oncol,2002,14:280.
- [3] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. Cancer Res, 2003,63(18):5821.
- [4] Cheng MX, Xiu LG, Yu XL. A new method to culture primary neural stem cells of embryonic rats[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008,12(16):3189.
- [5] Shalaw FG, Slimani S, Kolopp-Sarda MN, et al. Effect of cyclic stretching and foetal bovine serum (FBS) on proliferation and extra cellular matrix synthesis of fibroblast [J]. Biomed Mater Eng,2006,16(Suppl 4):S137.
- [6] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, et al. Long-term culture of mouse male germ line stem cells under serum- or feeder-free condition[J]. Bio Reprod,2005,72(4):985.
- [7] Hong-mei P, Gui-an C. Serum-free medium cultivation to improve efficacy in establishment of human embryonic stem cell lines[J]. Hunman Reprod,2006,21:217.
- [8] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2004:109.
- [9] 安江洪,钱莘,敖绪军,等. CD133 在人 NSCLC 组织和细胞系中表达的初步研究[J]. 重庆医学,2008,37(9):932.
- [10] Benedetta B, Bruno S, Grange C, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney [J]. Am J Pathol,2005,166(2):545.
- [11] 翟羽佳,常文军,侯建国,等. 肾透明细胞癌 CD133 的表达及其体外对干扰素和 5-氟尿嘧啶处理效果的影响[J]. 第二军医大学学报,2009,30(3):252.
- [12] Stupp R, Hegi ME. Targeting brain-tumor stem cells[J]. Nat Biotechnol,2007,25(2):193.
- [13] Singh SK, Dirks PB. Brain tumor stem cells: identification and concepts[J]. Neurosurg Clin N Am,2007,18(1):31.
- [14] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells[J]. Cancer Cell,2007,11(1):69.
- [15] Ali JG, Dwain I, Gentao L, et al. Spheres isolated from 9L gliosarcoma rat cell line possess chemoresistant and aggressive cancer stem-like cells[J]. Stem Cells,2007,432:281.

(收稿日期:2009-07-30 修回日期:2009-08-16)

(上接第 258 页)

- cancer[J]. Int J Colorectal Dis,2005,20(2):89.
- [5] Hasebe T, Sasaki S, Imoto S, et al. Proliferative activity of intratumoral fibroblasts is closely correlated with lymph node and distant organ metastases of invasive ductal carcinoma of breast[J]. Am J Pathol,2000,156(5):1701.
- [6] 郑华,申俊,高庆红,等. 口腔鳞状细胞癌间质成纤维细胞  $\alpha$ -SMA 的表达及意义[J]. 国际口腔医学杂志,2007,34(3):157.
- [7] Garin-chesa P, Old LJ, Retting WJ. Cell surface glycoprotech of reactive stromal fibroblasts as potential antibody target in human epithelial cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1990,87(18):7235.
- [8] Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, et al. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin [J]. Cancer Res, 1993, 53(14):3327.
- [9] Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, et al. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(12):5657.
- [10] 高力,张曦,陈幸华. 肝细胞生长因子与恶性血液病的相关研究进展[J]. 重庆医学,2006,35(8):746.
- [11] Kermorgant S, Paricio T, Dessirier V, et al. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease over production. Evidence for P13 kinase and PKC involvement[J]. Carcinogenesis, 2001,22(7):1035.
- [12] Dong G, Chen Z, Li ZY, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor induced activation of MEK and P13K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res,2001,61(15):5911.

(收稿日期:2009-07-05 修回日期:2009-08-07)