

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.11.013

胃癌组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2 与 CyclinD1 的表达及其相关性的研究\*潘理会<sup>1</sup>,李春辉<sup>2△</sup>,刘海旺<sup>2</sup>,程玉<sup>2</sup>

(1.承德医学院;2.承德医学院附属医院病理科,河北承德 067000)

**[摘要]** 目的 探讨胃癌组织中转化生长因子  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、Smad2 与细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)的表达及三者之间的相关性。**方法** 选择 2007 年 1 月至 2012 年 1 月内镜活检正常胃黏膜 20 份(正常胃组织)作为对照组,手术切除胃癌标本 60 份(高-中分化、低分化)作为胃癌组,用免疫组化法检测 TGF- $\beta$ 1、Smad2、CyclinD1 正常胃组织及胃癌组织中的表达。**结果** TGF- $\beta$ 1 及 CyclinD1 在胃癌组织中的表达高于对照组,Smad2 在胃癌组中的表达低于对照组;TGF- $\beta$ 1 及 CyclinD1 在低分化胃癌组中的表达高于高-中分化胃癌组;TGF- $\beta$ 1 及 CyclinD1 在无淋巴结转移的胃癌组中的表达低于有淋巴结转移的胃癌组;TGF- $\beta$ 1、CyclinD1 在胃癌组中的表达随着 TNM 分期的提高而升高,高-中分化胃癌组 Smad2 较低分化胃癌组表达升高,Smad2 的表达在无淋巴结转移的胃癌组中的表达高于有淋巴结转移的胃癌组;Smad2 在胃癌中的表达随 TNM 分期的提高而降低,TGF- $\beta$ 1、Smad2 及 CyclinD1 的表达与患病年龄、性别无关;TGF- $\beta$ 1 与 Smad2 呈负相关,TGF- $\beta$ 1 与 CyclinD1 呈正相关,CyclinD1 与 Smad2 呈负相关。

**结论** TGF- $\beta$ 1、Smad2 与 CyclinD1 的表达与胃癌的发病有关。

**[关键词]** 胃肿瘤;转化生长因子  $\beta$ 1;Smad2 蛋白质;细胞周期蛋白 D1;基因表达;相关性

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)11-1481-03

Expression of TGF- $\beta$ 1, Smad 2 and CyclinD1 in gastric carcinoma tissue and their correlation\*Pan Lihui<sup>1</sup>, Li Chunhui<sup>2△</sup>, Liu Haiwang<sup>2</sup>, Cheng Yu<sup>2</sup>

(1. Chengde Medical College; 2. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2 and CyclinD1 protein in gastric carcinoma tissue and their correlation. **Methods** 20 specimens of normal gastric tissue by the endoscopic biopsy (control group) and 60 surgical specimens (high-middle differentiation, low differentiation) of gastric carcinoma (gastric cancer group) were collected from January 2007 to January 2012. The immunohistochemical method was used to detect the expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2 and CyclinD1 in gastric cancer tissues and normal gastric mucosal tissues. **Results** The expression of TGF- $\beta$ 1 and CyclinD1 in the gastric cancer group was significantly higher than that in the normal gastric tissue group, while the expression of Smad2 in the gastric cancer group was significantly lower than that in the normal gastric tissue group; the expression of TGF- $\beta$ 1 and CyclinD1 in the low differentiation group was higher than that in the high-middle differentiation group, the expression of TGF- $\beta$ 1 and CyclinD1 in the non lymph node metastasis group was lower than that in the lymph node metastasis group; the expression of TGF- $\beta$ 1 and CyclinD1 protein in gastric cancer was increased with the increase of the TNM staging. The expression of Smad2 in the high-middle differentiation group was higher than that in the low differentiation group, the expression of Smad2 in the non-lymph node metastasis group was higher than that in the lymph node metastasis group; the expression of Smad2 in gastric cancer was decreased with the increase of the TNM staging. The expression of TGF- $\beta$ 1, Smad2 and CyclinD1 in the gastric cancer group had no relation with age and gender. TGF- $\beta$ 1 was negatively correlated with Smad2, TGF- $\beta$ 1 was positively correlated with CyclinD1, CyclinD1 was negatively correlated with Smad2. **Conclusion** TGF- $\beta$ 1 and Smad2 are related with the CyclinD1 expression and pathogenesis of gastric carcinoma.

**[Key words]** stomach neoplasms; transforming growth factor beta1; smad2 protein; CyclinD1; gene expression; correlation

转化生长因子  $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1)的生长抑制作用是通过其信号转导通路完成的,TGF- $\beta$ 1首先与其对应的受体结合形成复合物,该复合物可活化下游的细胞信号传导物质 Smad2 蛋白,活化的 Smad2 与 Smad4 结合后形成转录复合物进入细胞核,而人类细胞周期蛋白 D1 (cell cycle proteinD1, Cyclin D1)是 G<sub>1</sub> 期细胞增殖信号的关键蛋白,其在细胞核中过表达可使细胞过快进入细胞周期造成恶性增殖,而 TGF- $\beta$ 1、Smad2 与 CyclinD1 在胃癌组织中的表达及相关性的研究尚少见报道,本实验收集承德医学院附属医院 2007 年 1 月至 2012 年 1 月手术切除的胃癌组织标本 60 份,采用免疫组

化的方法检测胃癌组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad2 与 CyclinD1 蛋白的表达及相关性,为胃癌的发病机制研究提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集承德医学院附属医院 2007 年 1 月至 2012 年 1 月内镜活检正常胃黏膜 20 份(正常胃组织)为对照组,手术切除的胃癌组织标本 60 份(高-中分化、低分化)为胃癌组,运用免疫组化 Elivision 法检测 TGF- $\beta$ 1、Smad2、CyclinD1 在正常胃组织及胃癌组织中的表达,胃癌患者均未作任何放疗化疗治疗。

## 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂** 鼠抗人 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 抗体即用型免疫组化试剂盒由武汉博士德生物技术公司提供。

**1.2.2 检测方法** 两组组织标本常规石蜡包埋后,连续切片 4 μm 常规脱蜡至水,以 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min,在微波炉中进行抗原修复,加正常山羊血清工作液进行封闭,分别加 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 抗体在 37 °C 湿盒中温育 60 min 后,在湿盒中 4 °C 过夜,DAB 显色,苏木素复染核,封片,观察,另外,组织切片用 PBS 替代 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 抗体作为阴性对照,阳性对照为已知 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 阳性的胃癌组织标本及已知阳性的正常胃组织标本。

**1.2.3 结果判定** 应用 CMIAS 真彩色医学图象分析系统,每张切片随机选择 5 个高倍(×200)视野,分别对 5 个不同视野中的各组免疫组化结果进行积分光密度(integral optical density,IOD)测定,然后计算平均 IOD 值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS11.5 统计学软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较用方差分析。并将各因子 IOD 值进行相关性分析,以 *P* < 0.05 为差别有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 两组 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 表达比较** TGF-β1 及 CyclinD1 在胃癌组织中的表达高于对照组,两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05);Smad2 蛋白在胃癌组中的表达低于对照组,两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

**2.2 TGF-β1 Smad2、CyclinD1 在不同分化程度胃癌组织中的表达及与临床特征的关系** TGF-β 的表达在胃癌低分化组高

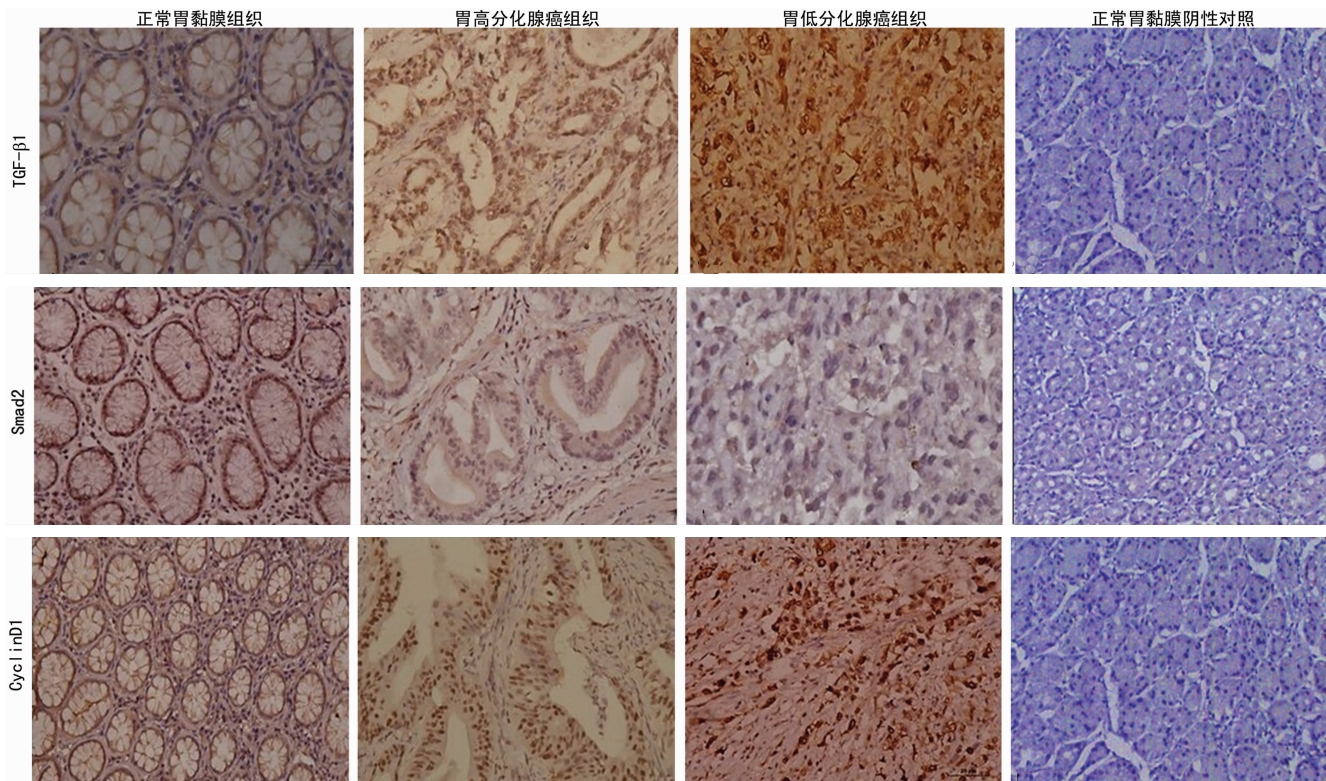
于高-中分化组(*P* < 0.05),在无淋巴结转移的胃癌组织中的表达低于有淋巴结转移的胃癌组织(*P* < 0.05),在胃癌组的 IOD 值随着 TNM 分期的提高而升高,I ~ II 期为 16.01 ± 5.33,III ~ IV 期为 22.24 ± 4.42,组间比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。Smad2 的表达在高-中分化胃癌组织中 IOD 值高于低分化胃癌组织(*P* < 0.05),在无淋巴结转移的胃癌组织中的 IOD 值高于有淋巴结转移的胃癌组织(*P* < 0.05),在胃癌组的 IOD 值随着 TNM 分期的提高而降低,III ~ IV 期为 13.13 ± 3.07,I ~ II 期为 19.23 ± 4.12,组间比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。CyclinD1 的表达在低分化胃癌组织中 IOD 值高于高-中分化胃癌组织(*P* < 0.05),在无淋巴结转移胃癌组织中的 IOD 值低于有淋巴结转移的胃癌组织(*P* < 0.05),在胃癌组的 IOD 值随着 TNM 分期的提高而升高,I ~ II 期与 III ~ IV 期比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。TGF-β1、Smad2、CyclinD1 蛋白表达均与患者年龄、性别无关(*P* > 0.05),见图 1、表 2。

**表 1 两组 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 的 IOD 值比较( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	<i>n</i>	TGF-β1	Smad2	CyclinD1
对照组	20	8.13 ± 2.01	13.31 ± 3.25	9.45 ± 2.29
胃癌组	60	12.25 ± 5.12 <sup>a</sup>	6.42 ± 2.13 <sup>a</sup>	16.20 ± 4.32 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:*P* < 0.05,与对照组比较。

**2.3 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 之间相关关系** TGF-β1 与 Smad2 呈显著负相关(*r* = -0.782, *P* < 0.05),与 CyclinD1 呈低度正相关(*r* = 0.496, *P* < 0.05);CyclinD1 与 Smad2 呈显著负相关(*r* = -0.789, *P* < 0.05)。



**图 1 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 蛋白在各组组织标本中表达(IHC×200)**

**表 2 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 在胃癌组织中的表达及与临床特征的关系( $\bar{x} \pm s$ )**

项目	<i>n</i>	TGF-β1		Smad2		CyclinD1	
		IOD 值	<i>P</i>	IOD 值	<i>P</i>	IOD 值	<i>P</i>
年龄(岁)			>0.05		>0.05		>0.05

续表 2 TGF-β1、Smad2、CyclinD1 在胃癌组织中的表达及与临床特征的关系(̄x±s)

项目	n	TGF-β1		Smad2		CyclinD1	
		IOD 值	P	IOD 值	P	IOD 值	P
≥60	28	16.41±4.20		15.51±1.37		14.41±3.10	
<60	32	17.14±3.27		13.21±1.83		14.01±4.35	
性别			>0.05		>0.05		>0.05
男	37	17.26±4.23		16.02±3.04		15.34±3.32	
女	23	18.24±2.83		15.65±3.21		14.51±2.11	
组织学分级			<0.05		<0.05		<0.05
高-中分化	28	10.62±2.35		16.12±2.32		13.41±1.81	
低分化	32	13.24±3.81		12.52±1.57		15.17±2.36	
淋巴结转移			<0.05		<0.05		<0.05
无	27	10.34±6.53		16.52±2.13		13.32±3.54	
有	33	14.51±2.34		9.35±2.24		17.52±3.42	
TNM 分期			<0.05		<0.05		<0.05
I + II	29	16.01±5.33		19.23±4.12		16.10±3.01	
III + IV	31	22.24±4.42		13.13±3.07		22.21±3.24	

### 3 讨 论

在正常细胞中, TGF-β1 通过阻断细胞从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期而抑制细胞增殖。因此, 具有肿瘤抑制因子的作用, 若阻断对细胞的这种生长抑制作用, 可导致细胞增殖促进肿瘤的发生、发展。肿瘤细胞自身会反馈性的增加 TGF-β1 的分泌, 一定程度上促进肿瘤细胞与细胞外基质的相互作用, 导致血管内皮细胞增生和肿瘤内血管的形成给肿瘤的生长和转移提供合适的微环境<sup>[1]</sup>, TGF-β1 可依赖 Smad2/3 的作用抑制 Bcl-x1 表达进而抑制细胞增长<sup>[2-3]</sup>。本结果显示, TGF-β1 在正常胃组织中弱表达, 在胃癌中表达上调, 且随着胃癌分化程度的降低、淋巴结转移、TNM 分期增高而表达增强, 其表达与患者的年龄及性别无关, 表明 TGF-β1 与胃癌的发生、发展有关<sup>[4-7]</sup>。

当 TGF-β1 信号通路改变, 其对靶细胞失去效应, 可促进肿瘤的演进<sup>[8]</sup>。TGF-β1 调控的基因通常依赖于即 Smad2, Smad2 在细胞核中形成转录活化复合体, 可用来调控 TGF-β1 对下游基因的表达<sup>[9-12]</sup>, 研究发现 Smad2 主要通过干扰活化的 TGF-β1 型受体对其磷酸化水平的调节, 从而进一步阻断 TGF-β1 生长抑制信号的传导。本实验结果发现, Smad2 蛋白在正常胃黏膜中高表达, 在胃癌中 Smad2 低表达, 而高-中分化胃癌 Smad2 的表达比低分化者高, 同样, 在有淋巴结转移者中 Smad2 的表达低于无淋巴结转移者, TNM 分期 III ~ IV 期的 Smad2 的表达低于 TNM 分期 I ~ II 期, 以上结果表明, 随着胃癌的发生、发展 Smad2 的表达呈现下降的趋势, 说明 Smad2 在胃癌的发生、发展过程中起到一定作用。

TGF-β1 与其对应的受体结合形成复合物, 该复合物可活化下游的细胞信号传导物质 Smad2 蛋白, 活化的 Smad2 与 Smad4 结合后形成转录复合物进入细胞核, Cyclin D1 是 G<sub>1</sub> 期细胞增殖信号的关键蛋白其在核中过表达可使细胞过快进入细胞周期造成恶性增殖, 目前对 CyclinD1 与胃癌发生、发展关系的研究并不明确, Cyclin D1 的过度增殖可能是胃癌发生的重要因素<sup>[13-15]</sup>, 本研究发现, CyclinD1 在胃癌中的表达明显高于正常胃黏膜, 低分化胃癌的表达低于高中分化胃癌, 而且在分化程度越低的癌肿表达率越高, 该研究结果揭示 CyclinD1

与胃癌的分化程度、浸润深度及淋巴结转移密切相关, 同时研究发现 TGF-β1 与 Smad2 呈负相关, 提示 Smad2 对 TGF-β1 有抑制作用, CyclinD1 与 Smad2 呈负相关, 提示 Smad2 对 CyclinD1 可能具有负调节作用, TGF-β1 与 CyclinD1 之间呈正相关, 提示 TGF-β1 对 CyclinD1 有正调节作用, 即 TGF-β1/Smad2 信号通路可能通过调节 CyclinD1 导致胃癌的发生、发展, 而 TGF-β1/Smads 信号通路中 TGF-β1, Smad2 在胃癌发生、发展中的作用机制仍需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system[J]. EMBO J, 2000, 19(8): 1745-1754.
- [2] Wrana JL, Attisano L, Wieser R, et al. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor [J]. Nature, 1994, 370(6488): 341-347.
- [3] Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(5): 265-273.
- [4] Laverty HG, Wakefield LM, Occleston NL, et al. TGF-beta3 and cancer: a review[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(4): 305-317.
- [5] Li Z, Miao Z, Jin G, et al. βig-h3 supports gastric cancer cell adhesion, migration and proliferation in peritoneal carcinomatosis[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(3): 558-564.
- [6] Nadauld LD, Ford JM. Family history as a positive prognostic factor in gastric cancer[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(7): 683-684.
- [7] Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, et al. Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(12): 2866-2869.
- [8] Na D, Lv ZD, Liu FN, et al. Transforming growth factor β1 produced in autocrine/paracrine manner(下转第 1486 页)



分泌产生, HIV 感染后导致 CD4<sup>+</sup> T 细胞下降, 然而 CD8<sup>+</sup> T 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞也可以少量分泌 IFN- $\gamma$ , 从而导致该试验受 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞的影响并不十分明显<sup>[13]</sup>, 因此本研究认为可以应用于 HIV 感染合并 TB 的诊断中。

为了分析导致 HIV 感染合并 TB 患者 IGRA 出现假阴性的因素, 本研究对 HIV 感染合并 TB 患者 IGRA 阳性和阴性的相关资料进行了对比分析, 结果显示性别、感染方式及 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数对于 IGRA 结果影响并不明显, 而经过抗逆转录病毒治疗 HIV 感染合并 TB 患者 IGRA 阴性发生率较高, 这一结果可能是因为本研究样本量较小有关, 也可能是因为经过抗逆转录病毒治疗对机体的免疫功能有影响, 有待进一步研究。

综上所述, 本研究认为 IGRA 在诊断 HIV 感染合并 TB 患者中敏感度较高, 值得临床推广应用, 但是本研究存在因为病例资源有限, 样本量过少的局限性, 导致结果难免存在偏差, 因为本研究将进一步扩大样本量进行研究。

#### 参考文献

[1] Sails AD, Barrett A, Sarginson S, et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in East Lancashire 2001-2009[J]. Thorax, 2011, 66(8): 709-713.

[2] Fortún J, Martín-Dávila P, Navas E, et al. Changes in the epidemiology of tuberculosis; the influence of international migration flows[J]. Enferm Infect Microbiol Clin, 2011, 29(9): 654-659.

[3] Lawn SD, Bekker LG, Wood R. How effectively does HAART restore immune responses to Mycobacterium tuberculosis? Implications for tuberculosis control[J]. AIDS, 2005, 19(11): 1113-1124.

[4] 韦海旭, 席薇莲, 陆利欢, 等.  $\gamma$ -干扰素释放分析 T-SPOT. TB 在结核性疾病中的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(8): 1439-1444.

[5] Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21 st century; new tools to tackle an old enemy[J]. Chest, 2007, 131(6): 1898-1906.

[6] 于兰, 王黎明, 唐志荣, 等. HIV/AIDS 患者合并活动性结

核病的诊断及方法探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(4): 377-382.

[7] 刘国华, 王林, 崔为国, 等. HIV 感染者 PPD 试验结果及其与 CD4 细胞计数的关系分析[J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(4): 195-196.

[8] 安云庆, 高晓明. 医学免疫学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 157-158.

[9] 彭卫生, 王英年, 肖成志. 新编结核病学[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 138-139.

[10] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection an update[J]. Ann Intern Med, 2008, 149(3): 177-184.

[11] Chapman AL, Munkanta M, Wikinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis specific T cells[J]. AIDS, 2002, 16(17): 2285-2293.

[12] 郑素华, 端木宏瑾, 李拉民, 等. 人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者结核菌素试验反应的研究[J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(6): 320-322.

[13] Kang JY, Rhee CK, Kang NH, et al. Clinical utility of two interferon-gamma release assays on pleural fluid for the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. Tuberc Respir Dis (Seoul), 2012, 73(3): 143-150.

[14] Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Specific detection of tuberculosis infection with an interferon-gamma based assay using new antigens[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(1): 59-64.

[15] Aichelburg MC, Rieger A, Breitenacker F, et al. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole-blood interferon-gamma release assay in HIV-1-infected individuals[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(7): 954-962.

(收稿日期: 2014-09-08 修回日期: 2015-01-05)

(上接第 1483 页)

affects the morphology and function of mesothelial cells and promotes peritoneal carcinomatosis[J]. Int J Mol Med, 2010, 26(3): 325-332.

[9] Ananiev J, Gulubova M, Tchernev G, et al. Relation between transforming growth factor- $\beta$ 1 expression, its receptor and clinicopathological factors and survival in HER2-negative gastric cancers[J]. Wien Klin Wochenschr, 2011, 123(21/22): 668-673.

[10] Li X, Yue ZC, Zhang YY, et al. Elevated Serum Level and Gene Polymorphisms of TGF- $\beta$ 1 in Gastric Cancer[J]. J Clin Lab Anal, 2008, 22(3): 164-171.

[11] Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, et al. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5321-5330.

[12] 张勇, 秦娜, 于斌. TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路的研究进展[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(1): 155-157.

[13] Stelow EB, Mills SE, Jo VY, et al. Adenocarcinoma of the upper aerodigestive tract[J]. Adv Anat Pathol, 2010, 17(4): 262-269.

[14] García-González MA, Nicolás-Pérez D, Lanas A, et al. Prognostic role of host cyclooxygenase and cytokine genotypes in a Caucasian cohort of patients with gastric adenocarcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46179.

[15] Neal JT, Peterson TS, Kent ML, et al. H. pylori virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model[J]. Dis Model Mech, 2013, 6(3): 802-810.

(收稿日期: 2014-11-10 修回日期: 2015-01-25)