

## 涎腺腺样囊性癌中 BDNF 和 TrkB 的表达及其临床意义

张 凯, 黄全顺, 徐锦程, 廖圣恺, 吴志刚, 刘 亮

**[摘要]** 目的:探讨脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其受体酪氨酸激酶 B(tyrosine kinase B, TrkB)与涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)的关系。方法:采用免疫组织化学链亲和素法分析 45 例 SACC 中 BDNF 和 TrkB 的表达,并统计分析表达结果与 SACC 病理学分型、临床分期、远处转移和神经侵犯之间的关系。结果:SACC 中 BDNF 和 TrkB 的表达率分别为 84.4% 和 88.9%,且与 SACC 的临床分期、远处转移关系密切( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ );TrkB 的表达还与神经浸润密切相关( $P < 0.01$ )。结论:BDNF 和 TrkB 能促进 SACC 的发生、发展及远处转移,可作为指标来预测 SACC 的远处转移和神经浸润。

**[关键词]** 涎腺肿瘤;癌,腺样囊性;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶 B;免疫组织化学

**[中国图书资料分类法分类号]** R 739.81 **[文献标识码]** A

## Expressions of BDNF and TrkB in salivary adenoid cystic carcinoma and its clinical significance

ZHANG Kai, HUANG Quan-shun, XU Jin-cheng, LIAO Sheng-kai, WU Zhi-gang, LIU Liang

(Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the relationship of the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase B (TrkB) to salivary adenoid cystic carcinoma (SACC). **Methods:** The immunoactivity of BDNF and TrkB in 45 cases of SACC was determined by immunohistochemistry method (streptavidin biotin method). The relationship of the expression of BDNF and TrkB with the histological type, clinical stage, perineural invasion and distant metastasis of the tumor was analyzed. **Results:** The positive expression rates of BDNF and TrkB were 84.4% and 88.9% in SACC. The statistical analysis showed that the expression level of BDNF and TrkB was positively correlated with the clinical stage and distant metastasis potential ( $P < 0.05 - P < 0.01$ ), and the expression level of TrkB was positively correlated with perineural invasion ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** BDNF and TrkB can promote the invasiveness and distant metastasis of SACC, which may act as a predictor of distant metastasis and perineural invasion of SACC.

**[Key words]** salivary gland neoplasms; carcinoma, adenoid cystic; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase B; immunohistochemistry

涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是最为常见的口腔颌面部恶性肿瘤,具有强浸润性、高转移力及易沿神经侵犯的特点,预后较差。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其特异性高亲和力受体酪氨酸激酶 B(tyrosine kinase B, TrkB)主要分布在中枢和外周神经系统,具有调控多种神经细胞的发育和分化的功能<sup>[1]</sup>。但新近的研究表明,多种神经源及非神经源性肿瘤中存在 BDNF 和 TrkB 的表达<sup>[2]</sup>,并涉及肿瘤的发病机制。我们应用免疫组织化学方法,对 TrkB 在 SACC 中的表达及分布特征进行研究,探讨 SACC 生物学特征的机制及 TrkB 检测的临床意义。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 1999~2005 年因原发病手术并经病理诊断为 SACC 患者 45 例,其中男 26 例,女 19 例;年龄 20~75 岁。根据国际抗癌联盟(UICC)2004 年涎腺癌、口腔癌和上颌窦癌的国际 TNM 分类及分期标准,45 例中低分期(I+II期)24 例,高分期(III+IV期)21 例。肿瘤标本经常规 10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色。按 WHO(2004 年)的涎腺肿瘤分类标准,将 ACC 分为筛状型、管状型和实体型 3 种基本类型。每例标本选取 4~10 张来自不同肿瘤部位的 HE 片于光镜下观察,发现有癌细胞沿神经周围或神经纤维束间浸润生长,判定为神经浸润,共 17 例。45 例中 23 例手术涉及区域淋巴结,6 例经病理确诊有颌下或颈部淋巴结转移。另取 12 例正常腺体作对照。

1.2 实验方法 采用 SP 法进行免疫组化染色。切片脱蜡,梯度乙醇水化后抗原热修复。分别加入内源性生物素及过氧化物阻断剂,再加非免疫羊血清。

[收稿日期] 2007-11-28

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2007B361zc)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院,口腔科,安徽蚌埠 233004

[作者简介] 张 凯(1968-),男,讲师,副主任医师。

然后分别滴加 BDNF 和 TrkB 兔抗人多克隆抗体(工作浓度 1:200, Santa Cruz 公司提供), 4 °C 过夜。再依次滴加即用型二抗及三抗(北京中杉公司提供的 SP 试剂盒), DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明, 封片, 干燥。除标明外, 各步骤均在室温下进行。阳性对照为鼠脑, 阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.3 判断标准 BDNF 和 TrkB 定位在胞核及胞质上, 以出现棕黄色颗粒者为阳性。染色强度以多数阳性细胞呈现的染色特征为标准, 分四级: 阴性(-), 肿瘤细胞核或质中无着色; 弱阳性(+), 肿瘤细胞核或质中出现浅黄色染色颗粒; 阳性(++) , 肿瘤细胞核或质中出现棕黄色染色颗粒; 强阳性(+++) , 肿瘤细胞核或质中出现深棕色染色颗粒。所有结果均进行双盲读片。

1.4 统计学方法 采用秩和检验及配对  $\chi^2$  检验。

2 结果

2.1 BDNF 和 TrkB 在正常涎腺组织及 SACC 中的表达 在 12 例正常涎腺组织中, 有 6 例 BDNF 表达阳性, 5 例 TrkB 表达阳性; 阳性反应主要存在于导管细胞胞核及胞质中, 腺泡细胞均为阴性(见图 1)。45 例 SACC 中, 分别有 38 例和 40 例出现 BDNF 和 TrkB 不同程度的表达, 表达率分别为 84.4% 和 88.9%, 阳性反应主要位于癌细胞胞核和胞质, 阳性

细胞呈散在或弥漫分布于癌细胞中。而且神经束中存在中等以上强度的染色(见图 2,3)。

2.2 BDNF 的表达强度与 SACC 临床病理特征之间的关系 SACC 三种病理类型 BDNF 的表达强度以实体型较强, 管状型和筛状型稍弱。肿瘤不同病理类型间染色强度差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。存在神经浸润 17 例(37.78%), 未见浸润 28 例(62.22%), 两组间 BDNF 表达强度差异亦无统计学意义( $P > 0.05$ )。不同的临床分期及有无远处转移, 在 BDNF 的表达差异均有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。

2.3 TrkB 的表达强度与 SACC 临床病理特征之间的关系 本实验收集的 45 例腺样囊性癌标本中 TrkB 的表达强度在不同病理类型间的染色强度差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 但在有无神经浸润、临床高低分期以及有无区域淋巴结转移的两组间 TrkB 表达强度差异有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )(见表 1)。

2.4 SACC 中 BDNF 和 TrkB 表达之间的关系 BDNF 表达阳性的 38 例 SACC 组织中, 有 37 例 TrkB 阳性表达; TrkB 表达阴性的 5 例 SACC 组织中, 有 4 例 BDNF 表达阴性。在 SACC 组织中, BDNF 和 TrkB 的表达呈正相关关系( $r = 0.6287, P < 0.01$ )。

表 1 SACC 的 TrkB 免疫组化反应与病理分型、临床分期、远处转移及神经浸润的关系(n)

分组	n	TrkB					BDNF							
		-	+	++	+++	$H_c$	P	-	+	++	+++	$H_c$	P	
病理分型														
筛状型	21	3	9	5	4			3	8	6	4			
管状型	11	2	4	2	3	1.73	>0.05	2	5	3	1	1.01	>0.05	
实体型	13	0	5	4	4			2	4	3	4			
临床分期														
I + II	24	4	13	5	2	3.01 $\Delta$	<0.01	5	13	4	2	2.84 $\Delta$	<0.01	
III + IV	21	1	5	6	9			2	4	8	7			
远处转移														
有转移	6	0	1	2	3	2.49 $\Delta$	<0.05	0	1	3	2	2.28 $\Delta$	<0.05	
无转移	17	4	9	3	1			4	7	5	1			
神经浸润														
有浸润	17	1	4	4	8	2.60 $\Delta$	<0.01	2	4	5	6	1.93 $\Delta$	>0.05	
无浸润	28	4	14	7	3			5	13	7	3			

$\Delta$ 示  $u_c$  值

3 讨论

SACC 是最常见的涎腺恶性肿瘤之一, 也是最具特征性的口腔颌面部恶性肿瘤, 自 1856 年

Billroth 首先描述并命名为“圆柱瘤”(cylindroma)以来, 其独特的生物学特征吸引了众多学者对其进行了大量的研究, 试图通过破译 SACC 某一特性的机制来认识该肿瘤的生物行为, 尤其是侵袭性、嗜神经

性和远处转移的规律。

我们应用免疫组化方法研究 BDNF、TrkB 表达在涎腺腺样囊性癌中的作用,发现正常涎腺组织中只有部分导管上皮出现 BDNF、TrkB 表达,而在腺样囊性癌组织中 BDNF、TrkB 表达率分别高达 84.4% 和 88.9%,且分布范围较广,提示在涎腺腺样囊性癌中不仅异常表达 BDNF,也高表达其高亲和力受体 TrkB。而且二者的表达强度之间呈正相关关系 ( $P < 0.01$ ),与文献报道 BDNF/TrkB 自分泌表达于多种实体肿瘤相符<sup>[3,4]</sup>。BDNF 通过激活 TrkB 可诱导包括细胞增殖和迁移等复杂的生物学效应。因此,BDNF/TrkB 共表达于 SACC 细胞可能参与了 SACC 的自分泌生长刺激和血行播散。通常 BDNF 与 TrkB 结合后至少可激活;Ras/MAPK 通路、PI3K 通路、PLC- $\gamma$  通路,这 3 条通路与细胞增殖及肿瘤发生密切相关。

文献报道,TrkB 和 BDNF 在恶性程度高、预后不良患者中的阳性表达率高<sup>[3,5]</sup>。本实验中 TrkB 和 BDNF 的表达率在高分期组大于低分期组,且这两组 BDNF 和 TrkB 表达率的组间比较均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),说明 TrkB 和 BDNF 的表达水平与 SACC 的分期和预后有关。这可能由于两者之间形成的 BDNF/TrkB 信号转导通路具有促进肿瘤血管再生的作用,因而促进肿瘤发生和发展。胡豫等<sup>[6]</sup>在体外实验中发现 BDNF 可明显促进内皮细胞迁移和微血管管状结构的形成。Donovan 等<sup>[7]</sup>证实,BDNF 过度表达的小鼠心脏微血管密度增加,在体外 BDNF 能抑制心脏微血管内皮细胞的凋亡<sup>[7]</sup>。此外,Nakagawara 等<sup>[5]</sup>发现外源性的 BDNF 诱导 TrkB 的磷酸化,从而促进表达 TrkB 的 NB 细胞轴突延伸,并以自分泌或旁分泌方式在体内促进 NB 存活。Pearse 等<sup>[2]</sup>对 MM 的研究也证实 BDNF/TrkB 信号转导途径可以促进细胞的存活,有助于肿瘤的进展。

在实验中我们还发现,6 例发生淋巴结转移的 SACC 标本中 BDNF、TrkB 的阳性表达率要明显高于无淋巴结转移者,两者之间差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示涎腺腺样囊性癌中 BDNF、TrkB 的过度表达可能与淋巴结转移也有一定关系。推测可能与 BDNF/TrkB 轴抑制肿瘤细胞的失巢凋亡有关:由于 BDNF 与 TrkB 的结合可激活 Ras 癌基因,而 Ras 激活的下游效应子 PI3K 和 Raf 激酶均能启动 PI3K/Akt 和 Raf/MEK/ERK 激酶信号途径而抑制细胞的失巢凋亡。BDNF 可能通过诱导蛋白水解酶的释放来促进基底膜侵袭以及允许肿瘤进入富含 TrkB 的基质中,从而增加肿瘤细胞穿透基底膜的能

力,并促进细胞迁徙和转移,如发生淋巴管浸润,也就加大淋巴结转移的机会。也有研究显示,表达 TrkB 的细胞易发生癌变,并具有癌转移特性,尤其是 TrkB 的过度表达激活了 PI3K,赋予细胞骨架变形、细胞迁移、异位附着、转移瘤生成及瘤内新血管生成等癌细胞生存、转移和侵袭的特性<sup>[8,9]</sup>。

此外,BDNF 和 TrkB 与 SACC 神经浸润之间关系显示,神经浸润与 TrkB 的表达强度关系密切 ( $P < 0.01$ ),而与 BDNF 的表达强度无关 ( $P > 0.05$ )。在实验中我们注意到,神经浸润的标本中 BDNF 的表达强度较高,但差异无统计学意义,这可能与标本数量有关,有待于增加样本量进一步研究。另外也可能神经浸润与 BDNF 无关,TrkB 可能通过其他通路或机制参与肿瘤神经侵犯。

综上所述,本实验证实 SACC 高表达 BDNF 及其受体 TrkB,而且该 BDNF/TrkB 轴与 SACC 的临床分期和远处转移关系密切,因此 BDNF 和 TrkB 有可能成为预测 SACC 预后的生物学标志。另外 TrkB 的表达还与 SACC 的神经浸润有关,有望为判断肿瘤是否存在神经浸润提供参考。

(本文图 1~3 见封三)

#### [参 考 文 献]

- [1] Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development [J]. *Cancer Lett*, 2001, 169 (2): 107-114.
- [2] Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival [J]. *Blood*, 2005, 105 (11): 4 429-4 436.
- [3] Aoyama M, Asai K, Shishikura T, et al. Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants [J]. *Cancer Lett*, 2001, 164 (1): 51-60.
- [4] Satoh F, Mimata H, Nomura T, et al. Autocrine expression of neurotrophins and their receptors in prostate cancer [J]. *Int J Urol*, 2001, 8 (7): S28-S34.
- [5] Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, et al. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14 (1): 759-767.
- [6] 胡 豫,孙春艳,王雅丹,等. 脑源性神经营养因子 (BDNF) 在多发骨髓瘤患者血浆中表达增高及其意义的初步研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13 (1): 104-109.
- [7] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization [J]. *Development*, 2000, 127 (21): 4 531-4 540.
- [8] Liotta LA, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell [J]. *Nature*, 2004, 430 (7 003): 973-974.
- [9] Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophin receptor TrkB [J]. *Nature*, 2004, 430 (7 003): 1 034-1 039.

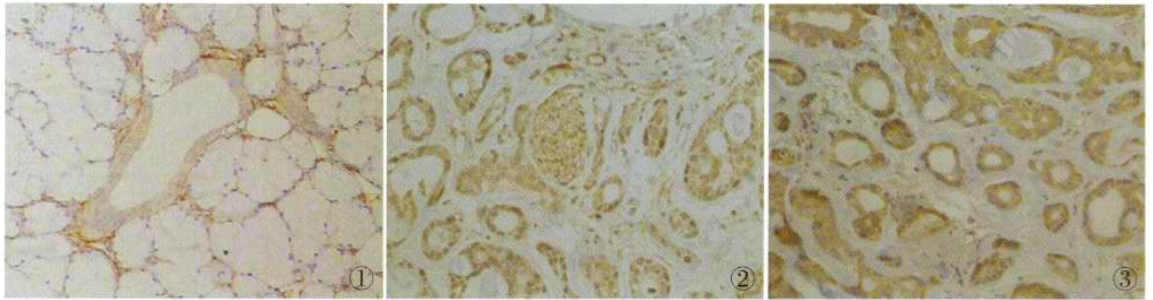


图1 TrkB 在正常涎腺组织中高表达 (SP×200) 图2 TrkB 在筛状型 SACC 中的表达 (SP×200) 图3 BDNF 在筛状型 SACC 中的表达(SP×200)

乳腺浸润性微乳头状癌临床病理学研究(正文见第 294 页)

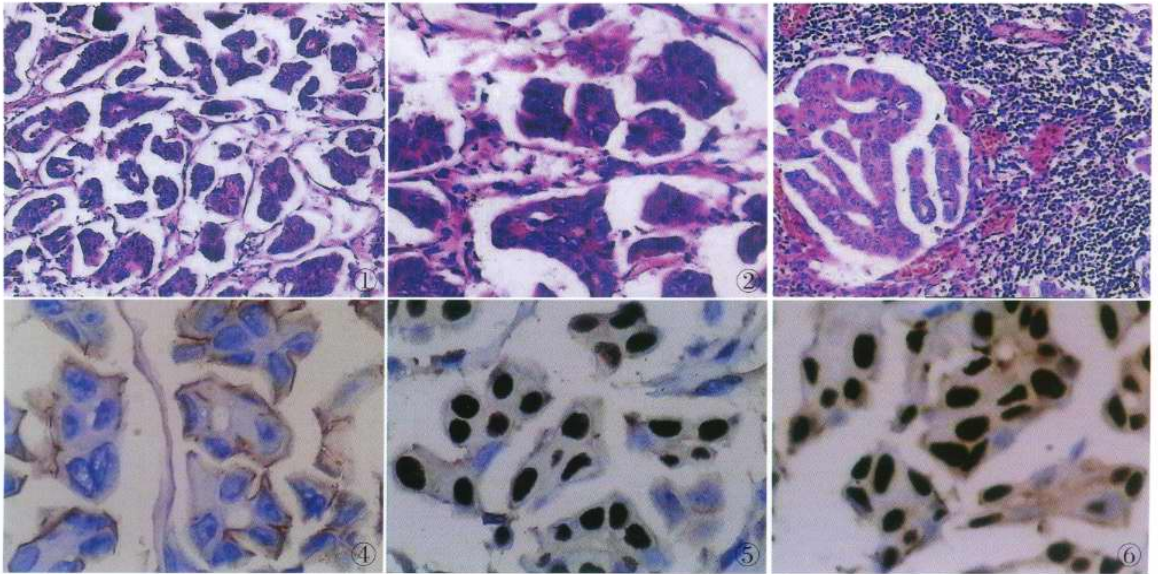


图1 瘤细胞排列呈乳头状或腺管状,由纤细的胶原纤维分隔,其间有空腔隙,分隔带无内衬上皮(HE) 图2 瘤细胞呈立方形,胞质红染,核深染,有轻度异型性(HE) 图3 淋巴结内转移性肿瘤成分仍保持乳头状或腺管状结构(HE) 图4 瘤细胞 EMA 染色反极阳性(阳性部位在乳头或腺管的周边部)(SP法) 图5 瘤细胞 ER 染色阳性(SP法) 图6 瘤细胞 PR 染色阳性(SP法)

蚌埠医学院学报

双月刊(1976年3月创刊)  
2008年第33卷第3期(总第153期)  
2008年5月15日出版

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly(Founded in March 1976)  
2008,Vol.33,No.3 (Sum 153)  
May 15,2008

主管单位:安徽省教育厅  
主办单位:蚌埠医学院  
主 编:祝 延  
编辑出版:蚌埠医学院学报编辑部  
(安徽省蚌埠市东海大道2600号 233030)  
电话:(0552)3175456

电子信箱:bang@chinajournal.net.cn  
印 刷:蚌埠市光大彩色制印有限公司  
国内订阅:全国各地邮政局  
国内总发行:蚌埠市邮政局  
国外总发行:中国国际图书贸易总公司  
(北京399信箱)

Responsible Institution The Education Department of Anhui Province  
Sponsored by Bengbu Medical College  
Editor in Chief ZHU Yan  
Edited and Published by The Editorial Board of Journal of  
Bengbu Medical College,Bengbu Anhui 233030,China  
Tel:(0552)3175456

E-mail bang@chinajournal.net.cn  
Printed by Bengbu Guangda Color Printing Co.Ltd  
Domestic Subscription Local Post Offices  
Domestic Distribution Bengbu Post Office  
Foreign Distribution China International Book Trading Corporation  
(P.O.Box 399,Beijing,China)