

[文章编号] 1000-2200(2008)05-0512-03 ·

· 基础医学 ·

抑癌基因 DPC4 蛋白在食管癌中的表达及其意义

宋文庆^{1,2}, 陶仪声², 张洪福¹, 承泽农²

[摘要]目的:探讨 DPC4 与血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达与食管癌生物学行为的关系。方法:应用免疫组化 S-P 法检测 174 例食管癌组织抑癌基因 DPC4 与 VEGF 蛋白的表达。结果:DPC4 在癌旁正常食管黏膜和食管癌中的阳性表达率分别为 80.0% 和 40.8% ($P < 0.005$), 食管腺癌中 DPC4 的阳性率高于食管鳞癌 ($P < 0.05$)。随着分化程度的降低, DPC4 的阳性表达率呈下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 有淋巴结转移的食管癌组 DPC4 阳性率显著低于无淋巴结转移组 ($P < 0.005$); 而 VEGF 在癌旁正常食管黏膜和食管癌中阳性表达率分别为 23.3% 和 43.1% ($P < 0.05$); 随着分化程度的降低, 其阳性表达率呈明显上升, 有淋巴结转移组的阳性率显著高于无淋巴结转移组 ($P < 0.005$)。DPC4 和 VEGF 两者呈明显的负相关关系 ($P < 0.001$)。结论:DPC4 的低表达是食管癌发生的一个重要原因; DPC4 的低表达可能与促进食管癌血管的生成和淋巴结转移有关。

[关键词] 食管肿瘤; DPC4; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

[中国图书资料分类号] R 735.1 [文献标识码] A

Expression of DPC4 gene in esophageal carcinoma and its significance

SONG Wen-qing^{1,2}, TAO Yi-sheng², ZHANG Hong-fu¹, CHENG Ze-nong²

(1. Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

2. Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the correlation between the expressions of DPC4 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in esophageal carcinoma and their clinicopathological behavior. **Methods:** The expressions of DPC4 and VEGF proteins were examined by immunohistochemical method in 174 cases of esophageal carcinoma tissues. **Results:** The positive rates of DPC4 in normal esophageal mucosa and esophageal carcinoma were 80% and 40.8%, respectively ($P < 0.005$). The expression of DPC4 was higher in adenocarcinomas than in squamous carcinomas ($P < 0.05$). With the depression of differentiation, the positive rate of DPC4 descended, but was not significant ($P > 0.05$). The DPC4 expression of the group with lymph node metastasis was lower than the group without that ($P < 0.005$). But the positive rates of VEGF in normal esophageal mucosa and esophageal carcinoma were 23.3% and 43.1%, respectively ($P < 0.005$). With the depression of differentiation, the positive rate of VEGF ascend. The VEGF expression of the group with lymph node metastasis was higher than the group without that ($P < 0.05$). The expression of DPC4 was negative correlated with the expression of VEGF ($P < 0.001$). **Conclusions:** The low expression of DPC4 is an important factor of esophageal carcinoma occurrence; The low expression of DPC4 may accelerate creating blood vessels and lymph node metastasis of esophageal carcinoma.

[Key words] esophageal carcinoma; deleted in pancreatic carcinoma locus 4; vascular endothelial growth factor; immunohistochemistry

DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4, DPC4) 是 1996 年由 Hahn 等^[1] 首先发现的一种新的肿瘤抑制基因。最近的研究显示, DPC4 基因的失活与肺癌、胃癌、胆管癌等的发生有密切的关系, 而其在食管癌中的表达情况, 国内外相关报道较少。本研究应用免疫组织化学 S-P 法检测了 174 例食管癌组织和 30 例癌旁正常食管黏膜的 DPC4 基因的蛋白表达, 探讨其在食管癌发生机制中的作用, 为食管癌基因治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 标本来自蚌埠医学院第一附属医院 2005 年 1 月 ~ 2006 年 6 月食管癌手术 174 例, 其中男 138 例, 女 36 例; 年龄 36 ~ 79 岁。食管癌组织 174 例, 癌旁正常食管黏膜 30 例。按病理形态学分为: 鳞癌 164 例, 腺癌 10 例。按分化程度分为: 高分化 29 例, 中分化 123 例, 低分化 22 例。经两位有经验的病理医师复阅上述患者的病理切片, 所有标本经 10% 甲醛固定, 常规脱水包埋, 制成 4 μm 厚连续石蜡切片。

1.2 试剂与方法 鼠抗人 DPC4 单克隆抗体由北京中杉公司代理, 购自 Santa Cruz Biotechnology 公司, 为浓缩型。免疫组化 S-P Kit 为 Maxim-bio 公司。实验步骤按试剂盒说明书进行, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作阴性对照, 以已知阳性片作阳性

[收稿日期] 2007-07-10

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2006KJ343B)

[作者单位] 1. 安徽医科大学 病理学教研室, 安徽 合肥 230032;

2. 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 宋文庆 (1971 -), 女, 讲师。

[通讯作者] 张洪福, 研究生导师, 教授。

对照, DAB 显色, 苏木精复染。

1.3 结果判断 以细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性。先按染色强度打分: 0 分为无色, 1 分为浅黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色, 染色强度需与背景着色相对比; 再按阳性细胞所占百分比打分: 0 分为阴性, 1 分为阳性细胞 ≤ 10%, 2 分为 11% ~ 50%, 3 分为 51% ~ 75%, 4 分为 > 75%, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积 ≥ 2 分为免疫反应 (+)。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验和配对计数资料的相关分析。

2 结果

2.1 食管癌中 DPC4 的表达 在癌旁正常食管黏膜中 DPC4 的阳性表达率为 80% (见图 1), 食管癌中的阳性表达率为 40.8%; 两者差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。食管腺癌中 DPC4 的阳性率高于食管鳞癌 ($P < 0.005$) (见图 2, 3), 有淋巴结转移的食管癌组 DPC4 阳性率显著低于无淋巴结转移组 ($P < 0.005$)。分化程度与 DPC4 的阳性表达率无明显关系 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 DPC4、VEGF 的表达与组织学类型、淋巴结转移及分化程度的关系 (n)

临床病理特征	n	DPC4			χ^2	P	VEGF			χ^2	P
		+	-	阳性率 (%)			+	-	阳性率 (%)		
部位											
癌旁正常											
食管黏膜	30	24	6	80.0	15.80	<0.005	7	23	23.3	4.16	<0.05
食管癌	174	71	103	40.8			75	99	43.1		
组织类型											
鳞状细胞癌	164	64	101	39.0	4.94	<0.05	71	93	43.3	0.02	>0.05
腺癌	10	8	2	80.0			4	6	40.0		
淋巴结转移											
有	53	13	40	24.5	8.36	<0.005	45	8	84.9	54.31	<0.005
无	121	58	63	47.9			30	91	24.8		
分化程度											
高分化	29	18	11	62.1			8	21	27.6		
中分化	123	48	75	39.0	5.49	>0.05	53	70	43.1	6.63	<0.05
低分化	22	8	14	36.3			14	8	63.6		

2.2 VEGF 在食管鳞状细胞癌中的表达 在癌旁正常食管黏膜中 VEGF 阳性表达率为 23.3%, 而在食管癌中阳性表达率为 43.1%, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$); VEGF 阳性表达率随着分化程度的降低呈明显上升 (见图 4), 有淋巴结转移组的阳性率显著高于无淋巴结转移组 ($P < 0.005$)。但与其组织学类型差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.3 VEGF 与 DPC4 在食管癌中表达相关性分析 DPC4 在癌旁正常食管黏膜中的阳性率明显高于 VEGF ($P < 0.05$), 而 VEGF 在淋巴结转移组中的阳性率明显高于 DPC4 ($P < 0.05$) (见表 2)。VEGF 与 DPC4 在食管癌中的表达无统计学意义 ($P > 0.05$), 但呈负相关关系 ($r = -0.4022, P < 0.001$) (见表 3)。

表 2 VEGF 和 DPC4 在癌旁正常食管黏膜及淋巴结转移中表达的结果比较 (n)

DPC4	癌旁正常食管黏膜中 VEGF			χ^2	P	淋巴结转移中 VEGF			χ^2	P
	+	-	合计			+	-	合计		
+	3	21	24	10.24	<0.005	7	6	13	23.27	<0.005
-	4	2	6			38	2	40		
合计	7	23	30			45	8	53		

表 3 VEGF 与 DPC4 在食管癌中表达的结果比较

DPC4	VEGF		合计	χ^2	P
	+	-			
+	15	56	71	0.14	>0.05
-	60	43	103		
合计	75	99	174		

3 讨论

近年研究表明, 肿瘤的发生涉及多种癌基因和抑癌基因的改变。抑癌基因是正常细胞增殖的重要稳定因素。抑癌基因的失活是导致肿瘤发生的重要

原因之一。1996 年 Hahn 等发现的 DPC4 基因被认为是一个新的抑癌基因。该基因定位于染色体

18q21.1, DCC 基因着丝粒旁侧, 有 11 个外显子和 12 个内含子。其核苷酸序列保存在 Gene Bank 的 V44375 中。DPC4 基因转录子长 2 680 bp, 编码 552 个氨基酸残基组成的蛋白质。其蛋白产物 Smad4 是转化生长因子 β (TGF β) 超家族受体的直接底物, 而 TGF β 具有抑制细胞生长和肿瘤转移等多种功能。这提示 DPC4 基因的表达产物也可能具有类似的重要功能。并可能参与了不同肿瘤的发生。

TGF β 是细胞促有丝分裂反应的抑制物, 其对上皮细胞、肿瘤细胞有强烈的抑制生长作用^[1], 在 TGF β 家族的信号转导中 DPC4 分子是其伙伴分子。TGF β 信号传导过程主要依赖 TBR-I 和 TBR-II 的协同作用。T β R-II 自体磷酸化后与配体结合使 T β R-I 磷酸化, 再把信号传递给 TGF β 反应的下游底物^[2]。T β R-I 的下游底物是 Smad 蛋白。Smad 蛋白有 4 种亚型: Smad1、Smad2、Smad3、Smad4。Smad 和 DPC4 都是介导 TGF β 家族信号转导的分子^[3], Smad 蛋白成员与 TGF β 家族成员间有特异的对应关系, BMPs 通过 Smad1; 活化素通过 Smad2; Smad3 是通过 Smad2 的亚型与 DPC4 基因产物结合发生作用。在 TGF β 信号转导途径中, DPC4 与不同的 Smad 蛋白相互作用是信号转导的中心环节。肿瘤 DPC4 基因失活, 必然导致 Smad-TGF β 信号转导途径的破坏, 失去对肿瘤细胞增殖的抑制作用^[4,5], 因此 DPC4 也可被认为是一种肿瘤抑制剂^[6]。Hahn 等^[7]发现 64% 的胰腺癌中 DPC4 蛋白阳性率降低。本研究中 DPC4 在癌旁正常食管黏膜和食管癌中的阳性表达率分别为 80%、40.8%, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.005$), 提示食管癌中有 DPC4 的低表达, 说明 DPC4 的低表达与食管癌的发生有一定关系。众多研究表明, DPC4 的表达缺失与组织分化有关, 分化越差的恶性肿瘤, DPC4 的缺失率越高。然而本研究显示 DPC4 的阳性表达率随着分化程度的降低呈下降趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。但在有淋巴结转移的食管癌组中其阳性率显著低于无淋巴结转移的食管癌组 ($P < 0.005$), 提示 DPC4 的低表达可促进食管癌发生淋巴结转移。

VEGF 是一种多功能的细胞因子, 它通过刺激血管内皮细胞增生从而诱导血管的形成。肿瘤是典型的血管依赖性病变, 肿瘤血管一方面为其运送营养物质, 另一方面可以携带肿瘤细胞离开原发部位形成转移瘤。Schwarte-Waldhoff 等^[8]在研究胰腺癌细胞株时发现, 体内 Smad4 的重新表达抑制肿瘤形

成的一个重要原因是抑制了肿瘤血管的形成, 减少了 VEGF 的表达而增加了 TSP-1 (血管形成抑制子血小板反应蛋白-1) 的表达。由此可以推测 VEGF 和 TSP-1 可能是 DPC4 的下游基因。然而 DPC4 在食管癌肿瘤血管生成中的作用机制, 到目前为止仍然不太清楚。最近的研究显示 DPC4 除了在信号传导途径中的中心作用以外, 还具有独立于 TGF β 的功能, 如 DPC4 具有调节细胞黏附和侵入的潜在功能, 以及抑制肿瘤组织的血管增殖和促进凋亡等^[9]。本研究显示, DPC4 和 VEGF 两者的表达呈明显的负相关。提示 DPC4 可能通过下调 VEGF 的表达, 间接抑制血管的形成, 从而抑制肿瘤的形成和转移。

本研究显示, DPC4 的低表达是导致食管癌形成的一个重要原因; 同时由于 DPC4 的低表达, 其抑制肿瘤组织的血管增殖的功能降低, 失去了对 VEGF 表达的调控, 间接的促进了食管癌血管的生成, 促进了食管癌的淋巴结转移。所以, 我们可以通过增强 DPC4 基因的表达来调控 VEGF 的表达, 从而达到抑制食管癌的形成和转移的目的。

(本文图 1~4 见封四)

[参 考 文 献]

- [1] Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1 [J]. *Science*, 1996, 271(5 247): 350-353.
- [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] Liu F, Hata A, Baker JC, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator [J]. *Nature*, 1996, 381(6 583): 620-623.
- [4] Zhang Y, Feng XH, Wu RY, et al. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response [J]. *Nature*, 1996, 383(6 596): 168-172.
- [5] Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, et al. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways [J]. *Nature*, 1996, 383(6 603): 832-836.
- [6] Lin X, Liang M, Liang YY, et al. Activation of transforming growth factor-beta signaling by SUMO-1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4 [J]. *Biol Chem*, 2003, 278(21): 18 714-18 719.
- [7] Hahn SA, Bai RY, Koester C, et al. SMIF, a smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF beta signaling [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(3): 181-190.
- [8] Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, et al. Smad4/DPC4 mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(17): 9 624-9 629.
- [9] Weidner N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients [J]. *Hum Pathol*, 2000, 31(4): 403-405.

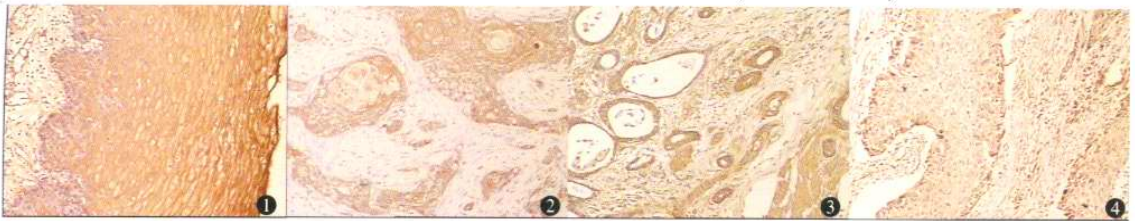


图 1 DPC4 在正常鳞状细胞中阳性表达(S-P 法 ×400) 图 2 DPC4 在高分化鳞癌中阳性表达(S-P 法 ×400)
图 3 DPC4 在腺癌中阳性表达(S-P 法 ×400) 图 4 VEGF 在低分化鳞癌中阳性表达((S-P 法 ×400)

claudin-1、claudin-4 在子宫内膜癌的表达及其意义(正文见 515 页)

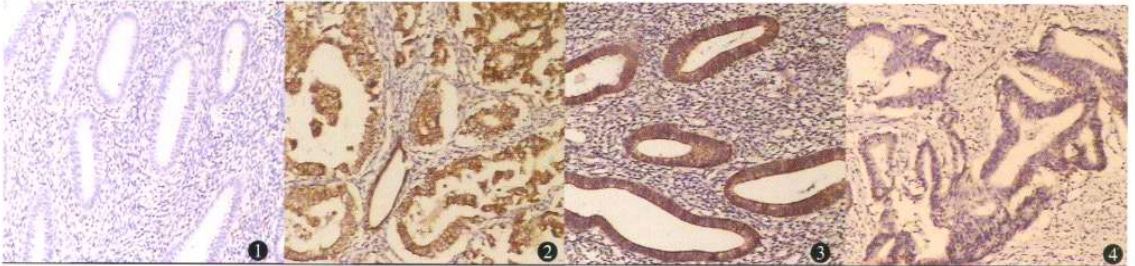


图 1 claudin-4 在增生期子宫内膜的表达(S-P 法 ×100) 图 2 claudin-4 在子宫内膜癌的表达(S-P 法 ×100)
图 3 claudin-1 在增生期子宫内膜的表达(S-P 法 ×100) 图 4 claudin-1 在子宫内膜癌的表达(S-P 法 ×100)

感染后肠易激综合征患者结肠黏膜肥大细胞与 IL-2、IFN- γ 的表达及意义(正文见 569 页)

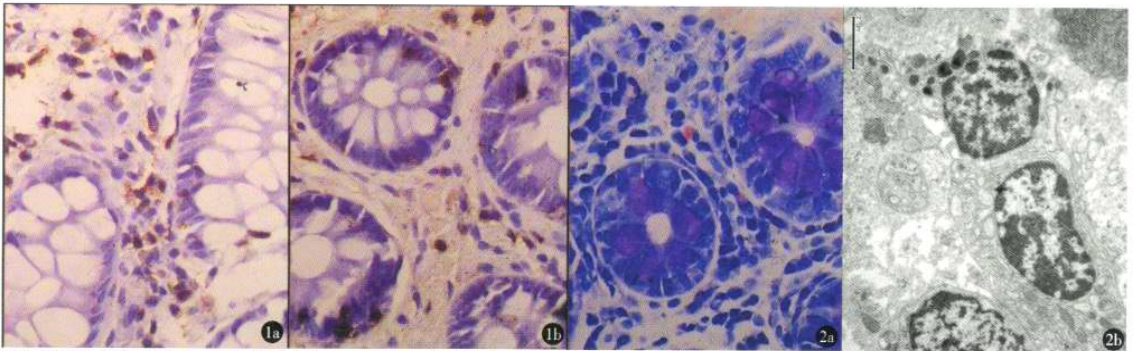


图 1 感染后肠易激综合征患者结肠黏膜 IL-2、IFN- γ 的表达(1a:IL-2;1b:IFN- γ)(×400)
图 2 2a:光镜下感染后肠易激综合征患者结肠黏膜肥大细胞(×400);2b:电镜下黏膜上皮内肥大细胞与浆细胞等神经内分泌细胞紧密相靠(×100 00)

蚌埠医学院学报

双月刊(1976年3月创刊)
2008年第33卷第5期(总第155期)
2008年9月15日出版

Journal of Bengbu Medical College

Bimonthly(Founded in March 1976)
2008,Vol.33, No.5 (Sum 155)
September 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)