

转化生长因子 β 受体 I 及 Smad4 蛋白 在肾癌中的表达及意义

张爱莉¹ 任宗涛¹

[摘要] 目的:探讨转化生长因子 β 受体 I (TGF- β R I) 及 Smad4 在肾透明细胞癌(RCCC)及癌旁组织中的蛋白表达情况及临床意义。方法:采用免疫组织化学 P-V 法分别检测 58 例 RCCC 组织、36 例癌旁组织中 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白表达情况,并分析其表达水平与 RCCC 临床病理特征的关系。结果:①TGF- β R I 蛋白在 RCCC、癌旁组织的阳性表达率分别为 51.7%、80.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$);Smad4 蛋白在 RCCC、癌旁组织的阳性表达率分别为 56.9%、86.1%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在 RCCC 组织中的表达均与性别、年龄无关($P > 0.05$),而与肿瘤病理分级及临床分期相关($P < 0.05$)。③TGF- β R I 和 Smad4 蛋白表达呈正相关。结论:①TGF- β R I、Smad4 在 RCCC 中的表达降低,提示 TGF- β R I、Smad4 的表达缺失可能参与了 RCCC 的发生、发展。②TGF- β R I 与 Smad4 之间存在正相关,说明这两种因子在 TGF- β 信号通路中相互作用,共同参与了 RCCC 的发生、发展及转移。

[关键词] 肾透明细胞癌;转化生长因子 β 受体 I;Smad4 蛋白;免疫组织化学

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)11-0819-04

Expression and clinical significance of transforming growth factor β receptor I and Smad4 in renal carcinoma

ZHANG Aili REN Zongtao

(Department of Urology, Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050019, China)

Corresponding author: REN Zongtao, E-mail: XLRZT@126.com

Abstract Objective: To investigate the expression of transforming growth factor β receptor I (TGF- β R I) and Smad4 in specimens of renal clear cell carcinoma (RCCC) and peritumoral tissues and to study their clinical significance. **Method:** Immunohistochemistry was used to investigate the protein expression of TGF- β R I and Smad4 in 58 cases of RCCC and 36 cases of peritumoral tissues and their relationship with the clinical pathologic characteristics of RCCC was analyzed. **Result:** ①The positive expression rates of TGF- β R I in RCCC and peritumoral tissues were 51.7%, 80.6% respectively, which showed a statistical difference ($P < 0.05$). The positive expression rates of Smad4 in RCCC and peritumoral tissues were 56.9%, 86.1% respectively, which was a statistical difference ($P < 0.05$). ②The expressions of TGF- β R I and Smad4 protein were correlated with neither gender nor age ($P > 0.05$), whereas they were closely associated with clinical stages and pathologic grades ($P < 0.05$). ③There existed a positive correlation between the expression of TGF- β R I and Smad4. **Conclusion:** ①Lower expression levels of TGF- β R I and Smad4 may be contributed to formation and progression of RCCC. ②TGF- β R I positively correlates with Smad4. Moreover, their interaction may contribute to formation, invasion and metastasis of RCCC.

Key words renal clear cell carcinoma; transforming growth factor β receptor I; Smad4 protein; immunohistochemistry

近年来研究发现,转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β)信号通路与多种肿瘤的发生、发展密切相关。TGF- β 通过其受体(TGF- β R I、TGF- β R II)及下游 Smads 蛋白等共同调节细胞的增殖、分化、凋亡,若通路中的因子发生异常,都有可能导致细胞的恶性化。因此,深入研究 TGF- β R I 和 Smad4 在肾癌发生、发展过程中的分子变化,将可能揭示其发病的分子生物学机

制,为临床诊疗与预后提供有参考价值的指标。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集我院 2010 年 10 月~2011 年 11 月期间泌尿外科住院患者肾癌根治术后标本作为实验组用于免疫组化研究,经病理确诊的肾透明细胞癌(RCCC)标本 58 例,其中男 25 例,女 33 例,年龄 29~74 岁,平均年龄 56.6 岁,术前均未接受放、化疗。根据 1997 年 WHO 推荐将 Fuhrman 分级:高分化 17 例,中分化 28 例,低分化 13 例;分期按照 2002 年 AJCC 分期组合标准分为:I 期 20 例,II

¹ 河北医科大学第四医院泌尿外科(石家庄,050019)
通信作者:任宗涛,E-mail: XLRZT@126.com

期 21 例,Ⅲ+Ⅳ期 17 例。36 例癌旁肾组织(大于癌边缘 2.0 cm)为对照组。

1.2 主要制剂和试剂

TGF- β R I 兔多克隆抗体购自北京中杉金桥生物制品有限公司,兔抗人 Smad4 单克隆抗体购自 Bioworld 生物技术有限公司,PV-9000 二步法免疫组化试剂盒,浓缩型 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物制品有限公司。

1.3 方法

免疫组织化学染色采用免疫组化 P-V 二步法,用已知阳性切片作阳性对照,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。具体操作方法按试剂盒标准操作说明进行。

1.4 结果判定

由两名病理科医师进行双盲法阅片,对镜下胞浆或胞膜阳性表达的细胞数比例和表达强度打分,以染色强度和阳性细胞率的得分之和判断。

1.5 统计学处理

所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。运用 χ^2 检验分析 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在不同分组中阳性表达率的差异,两指标表达的相关性采用 Spearman 等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在肾癌、癌旁组织中的表达

TGF- β R I、Smad4 蛋白主要表达于细胞浆,阳性染色表现为细胞浆内可见棕黄色颗粒,其在肾癌组织中染色强度较弱,表现为浅黄色(图 1①、图 1②)。而 TGF- β R I、Smad4 蛋白在癌旁组织中为强表达,染色为棕黄色(图 1③、图 1④)。

TGF- β R I 蛋白在肾癌、癌旁组织的阳性表达率分别为 51.7%、80.6%,差异有统计学意义($P < 0.05$);Smad4 蛋白在 RCCC、癌旁组织的阳性表达率分别为 56.9%、86.1%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表 1。

2.2 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白与肾癌临床指标的关系

TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在肾癌中的表达均与性别、年龄无关,而与病理分级、临床分期、肿瘤大小、淋巴结是否转移相关($P < 0.05$)。详见表 1。

2.3 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白表达的关系

58 例肾癌标本中,二者同时表达阳性 24 例,同时表达阴性者 19 例,TGF- β R I 阳性 Smad4 阴性 6 例,Smad4 阳性 TGF- β R I 阴性 9 例,相关性检验结果显示 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在 RCCC 组织中的表达呈正相关,Spearman 相关系数 $r = 0.483$ ($P < 0.05$)。

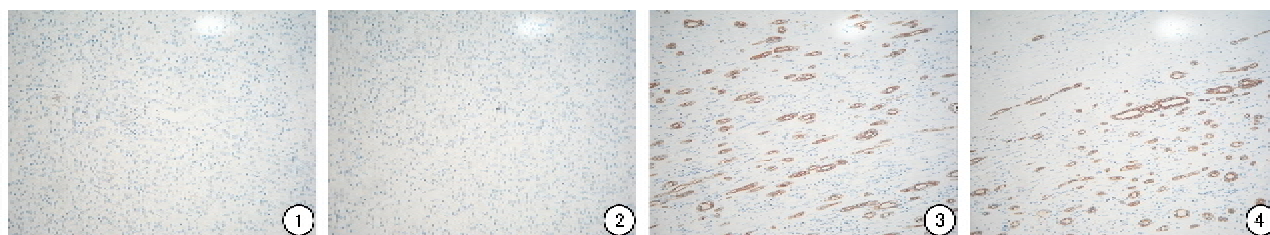
表 1 TGF- β R I、Smad4 表达与 RCCC 临床特征之间的关系

临床参数	例数	TGF- β R I		P 值	Smad4		P 值
		阳性	阴性		阳性	阴性	
分组				<0.05			<0.05
肾癌组织	58	30	28		33	25	
癌旁组织	36	29	7		31	5	
性别				>0.05			>0.05
男	25	14	11		15	10	
女	33	16	17		18	15	
年龄				>0.05			>0.05
<60	28	13	15		13	15	
≥ 60	30	17	13		20	10	
瘤体大小				<0.05			<0.05
≤ 7.0 cm	28	19	9		20	8	
> 7.0 cm	30	11	19		13	17	
病理分级				<0.05			<0.05
高分化	17	15	2		13	4	
中分化	28	14	14		17	11	
低分化	13	1	12		3	10	
临床分期				<0.05			<0.05
I	20	18	2		19	1	
II	21	10	11		13	8	
Ⅲ+Ⅳ	17	2	15		1	16	
淋巴结转移				<0.05			<0.05
有	17	2	15		0	17	
无	41	28	13		33	8	

3 讨论

近年来,随着分子生物学的发展,人类对肿瘤的认识也更加深入,导致肿瘤的原因,除了环境、理化因素外,更重要的是与癌基因激活,抑癌基因的失活、突变等相关,其中 TGF- β 信号通路与肿瘤之间的关系逐渐被学者所关注,该通路发挥着多重功能,不仅调节胚胎发育,促进创伤愈合及细胞外基质(ECM)形成,而且调节着细胞的正常增殖、分化。TGF- β 信号通路传导功能的完成需要 TGF- β 、TGF- β 受体(TGF- β R)、下游的 Smad 蛋白及辅助因子等共同完成,任何一个元素的表达改变或缺失都可导致整个信号传导通路异常,使其丧失抑制上皮细胞生长的作用,进而导致肿瘤发生^[1,2],可能与肿瘤的发生、发展、转移存在密切联系^[3]。TGF- β 完成信息准确无误的传递需要 TGF- β 受体及 Smads 等因子的参与,Smads 蛋白是 TGF- β 的作用底物,扮演着一种从细胞外到细胞核之间的信息传递者的重要角色^[4]。在 TGF- β 介导的大部分生物学效应中,T β R 缺陷、Smad 蛋白缺失都有可能使 TGF- β 生长抑制作用丧失,甚至成为刺激肿瘤生长的因子^[5]。

在 TGF- β 信号通路中发挥更加重要作用的是转化生长因子 β 受体 I (TGF- β R I),由于 TGF- β 具有抑制细胞生长的作用,TGF- β R I 的改变,如基



①TGF- β R I 在肾癌中的表达;②Smad4 在肾癌中的表达;③TGF- β R I 在癌旁组织中的表达;④Smad4 在癌旁组织中的表达

图 1 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在肾癌、癌旁组织中的表达 (IHC, 200 $\times$)

因突变、表达水平降低、功能的丧失,都有可能使 TGF- β 丧失抑制细胞生长的负调控作用,进而诱发细胞恶性增殖,导致肿瘤的发生。相关研究发现,多种细胞可以逃逸 TGF- β 的负调控作用而恶性增殖,这与细胞表面的 TGF- β R I 的表达缺失相关,提示 TGF- β R I 可能在抑制细胞异常增殖,维持其正常生理机能方面发挥着一定的作用^[6]。我们的研究发现 TGF- β R I 主要表达于细胞浆,但其在 RCCC 中表达强度较弱,其阳性表达率为 51.7%,而癌旁组织则为强表达,阳性表达率为 80.6%,显著高于癌组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),提示 TGF- β R I 在肾癌中的低表达可能参与了肾细胞癌的发生。其原因可能是,由于 TGF- β 对细胞具有抑制增殖、促进凋亡等负调控作用,肿瘤细胞表面的 TGF- β R I 表达缺失,使得 TGF- β 的负调控信号传导过程受阻,从而使肿瘤细胞得以逃逸负调控信号,进而表现为肿瘤细胞无限制增殖。此外本研究发现,TGF- β R I 蛋白的阳性表达率随着 RCCC 病理学分级及临床分期的增高而降低,有淋巴结转移组阳性表达率显著低于无转移组,其差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 TGF- β R I 的低表达可能参与了肾癌的发展、侵袭。这可能是由于 TGF- β R I 的表达缺失造成了 TGF- β 在肿瘤细胞内积聚,使得肿瘤细胞对负调控信号产生耐受,进而恶性增殖。

Smad 蛋白在 TGF- β 信号通路中扮演着一种衔接者的角色,它通过某种方式将 TGF- β 配体与受体结合所产生的信息协同传递到细胞核。Smad4 蛋白作为 TGF- β 信号通路中的一种关键因子,如果其出现某种异常改变,都有可能使其丧失与 R-smads 蛋白结合进入细胞核的能力,进而使 TGF- β 抑制细胞增殖的作用丧失,使得细胞的生长无法接受到正负反馈信息,引起恶性化进程^[7]。研究发现,Smad4 基因是一种抑癌基因,在某种程度上可发挥抑制肿瘤生长的作用^[8],Tascilar 等^[9]通过免疫组织化学方法研究了 249 例胰腺癌组织中 Smad4 蛋白的表达情况,发现 Smad4 的表达情况可以在一定程度上反映患者的预后,那些胰腺癌组织中 Smad4 表达阳性的患者的生存期较表达阴

性者明显延长,预后较好,这也说明了 Smad4 发挥了抑癌基因的作用。此外,Smad4 蛋白与 DNA 之间的结合能力也影响着 TGF- β 的信号传导功能,如果 Smad4 蛋白中 MH1 结构域发生错义突变,便会导致这种结合能力减弱,这样一来,Smad4 蛋白突变后,虽然可以接受 TGF- β 信号刺激,但其积聚在细胞核内不执行功能^[10]。Smad4 的表达异常可见于多种肿瘤,如食管癌、结肠癌、胃癌、宫颈癌等^[11]。我们的研究发现,RCC 组与癌旁组织组相比,Smad4 蛋白的阳性表达率逐渐升高,分别为 56.9% (33/58)、86.1% (31/36),差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外还发现随着肿瘤临床分期及病理分级的升高,Smad4 的阳性表达率有逐渐降低的趋势(高分化组与中分化组之间差异不明显),说明 Smad4 蛋白作为抑癌基因的产物,与 RCCC 的临床进展及恶性程度相关。

综上所述,本研究分析了 TGF- β R I 蛋白和 Smad4 蛋白在 RCCC、癌旁组织中的表达与临床特征之间的关系,说明 TGF- β R I 和 Smad4 蛋白在 RCCC 中的低表达,以及二者的正协同作用,共同参与了 RCCC 的发生、发展、转移,这项发现可能成为肾细胞癌治疗进程中一个新的突破点。因此,进一步深入研究 TGF- β R I 和 Smad4 在肾细胞癌生物学行为中的作用机制,将会为肾癌的治疗提供新途径。

[参考文献]

- 1 Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, et al. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta-dependent apoptosis [J]. J Biol Chem, 2000, 275(46): 36295-36302.
- 2 Chen W, Fu X B, Sheng Z Y. Review of current progress in the structure and function of Smad protein[J]. Chinese Medical Journal, 2002, 115(3): 446-450.
- 3 Subramanian G, Schwarz R E, Higgins L, et al. Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype [J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5200-5211.

- ultrastructural study of a case with literature review [J]. Arch Pathol Lab Med, 1993, 117(3): 239–243.
- 3 Amin M B. Histological variants of urothelial carcinoma; diagnostic, therapeutic and prognostic implications [J]. Mod Pathol, 2009, 22(Suppl 2): S96–S118.
 - 4 Petrescu A, Berdan G, Hulea I, et al. Small cell carcinoma of the urinary bladder—a new case report [J]. Rom J Morphol Embryol, 2007, 48(3): 309–314.
 - 5 Bastús R, Caballero J M, González G, et al. Small cell carcinoma of the urinary bladder treated with chemotherapy and radiotherapy: results in five cases [J]. Eur Urol, 1999, 35(4): 323–326.
 - 6 Ashi M, Terauchi F, Nukui A, et al. Small-cell neuroendocrine carcinoma as a variant form of prostate cancer recurrence; a case report and short literature review [J]. Urol Oncol, 2006, 24(3): 313–317.
 - 7 Chhabra S, Hegde P, Singhal P. Primary small cell carcinoma of the urinary bladder—mini-review of the literature[J]. APJCP, 2012, 13(8): 3549–3553.
 - 8 Stein M E, Bernstein Z, Abacioglu U, et al. Small cell (neuroendocrine) carcinoma of the prostate; etiology, diagnosis, prognosis, and the therapeutic implications—a retrospective study of 30 patients from the rare cancer network[J]. Am J Med Sci, 2008, 336(6): 478–488.
 - 9 Faggiano A, Mansueto G, Ferolla P, et al. Diagnostic and prognostic implications of the World Health Organization classification of neuroendocrine tumors [J]. J Endocrinol Invest, 2008, 31(3): 216–233.
 - 10 Colarossi C, Pino P, Giuffrida D, et al. Large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) of the urinary bladder; a case report[J]. Diagnostic Pathology, 2013, 8(1): 19–22.
 - 11 Chen H, Sun Y, Wu C, et al. Pathogenesis of prostatic small cell carcinoma involves the inactivation of the P53 pathway[J]. Endocr Relat Cancer, 2012, 19(3): 321–331.
 - 12 Tai S, Sun Y, Squires J M, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma [J]. Prostate, 2011, 71(15): 1668–1679.
 - 13 吴静, 方克伟, 石志豪, 等. 多西紫杉醇治疗前列腺癌的分子机制研究[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(8): 436–440.
 - 14 蔡建良, 李宁忱, 那彦群. 前列腺小细胞神经内分泌癌诊治特点分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2010, 31(6): 391–394.
 - 15 Brownback K R, Renzulli J, Delellis R, et al. Small-cell prostate carcinoma; a retrospective analysis of five newly reported cases [J]. Indian J Urol, 2009, 25(2): 259–263.
 - 16 Abbas F, Civantos F, Benedetto P, et al. Small cell carcinoma of the bladder and prostate[J]. Urology, 1995, 46(5): 617–630.
 - 17 Uemura K I, Nakagawa G, Chikui K, et al. A useful treatment for patients with advanced mixed-type small cell neuroendocrine carcinoma of the prostate; A case report [J]. Oncology Letters, 2013, 5(3): 793–796.
 - 18 Capizzello A, Peponi E, Simou N, et al. Pure small cell carcinoma of the prostate; a case report and literature review[J]. Case Rep Oncol, 2011, 4(1): 88–95.
 - 19 Ismaili N, Heudel P E, Elkarak F, et al. Outcome of recurrent and metastatic small cell carcinoma of the bladder[J]. BMC Urology, 2009, 9(6): 4–11.

(收稿日期: 2013-05-30)

(上接第 821 页)

- 4 Shi Y. Structural insights on Smad function in TGF beta signaling[J]. Bioessays, 2001, 23(3): 223–232.
- 5 Kinugasa S, Abe S, Tachibana M, et al. Overexpression of transforming growth factor- β in Scirrhous carcinoma of the Stomach correlates with decreased survival [J]. Oncology, 1998, 55(6): 528–587.
- 6 Wang J, Sun L, Myeroff L, et al. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 1995, 270(37): 22044–22049.
- 7 Kim Y H, Lee H S, Lee H J, et al. Prognostic significance of the expression of smad4 and smad7 in human gastric carcinomas [J]. Ann Oncol, 2004, 15(4): 574–580.
- 8 Hahn S A, Schutte M, Shmsul T M, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1 [J]. Science, 1996, 271(5247): 350–353.
- 9 Tascilar M, Skinner H G, Rosty C, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(12): 4115–4121.
- 10 Kang Y, Mariano J M, Angdisen J, et al. Enhanced tumorigenesis and reduced transforming growth factor-beta type II receptor in lung tumors from mice with reduced gene dosage of transforming growth factor-beta 1 [J]. Mol Carcinog, 2000, 29(2): 112–126.
- 11 Barrett M T, Schutte M, Kern S E, et al. Allelic loss and mutational analysis of the DPC4 gene in esophageal adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(19): 4351–4353.

(收稿日期: 2013-03-23)