

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)14-1308-04

## 食管鳞癌中 TGF- $\beta$ 及其受体调节成分 Endoglin/CD105 的表达

马军<sup>1</sup> 郭敏<sup>1</sup> 李印<sup>2</sup> 唐芙爱<sup>1</sup> 虎建恩<sup>1</sup> 段芳龄<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 郑州大学消化疾病研究所, 郑州大学第二附属医院消化内科, 河南 郑州 450014, <sup>2</sup> 河南省肿瘤医院胸外科, 河南 郑州 450003 )

### Overexpressions of TGF- $\beta$ and its receptor regulatory component Endoglin/CD105 in esophageal squamous cell cancer

MA Jun<sup>1</sup>, GUO Min<sup>1</sup>, LI Yin<sup>2</sup>, TANG Fu-Ai<sup>1</sup>, HU Jian-En<sup>1</sup>, DUAN Fang-Ling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Digestive Diseases, Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, <sup>2</sup>Department of Thoracic Surgery, Tumor Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450003, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the expressions of TGF- $\beta$  and Endoglin/CD105 in esophageal carcinoma from patients in high incidence area in north China. METHODS: The expressions of TGF- $\beta$  and Endoglin/CD105 mRNA and protein were detected in 30 esophageal carcinoma samples using RNase protection assay and immunohistochemical staining. RESULTS: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 and Endoglin/CD105 mRNA, other than TGF- $\beta$ 2, were significantly increased in esophageal carcinoma than those of adjacent noncancerous tissue ( $P < 0.05$ ). There was a significant correlation between TGF- $\beta$ 3 and Endoglin/CD105 at mRNA level. CONCLUSION: The overexpressions of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 and Endoglin/CD105 may be involved in the regulation of angiogenesis in esophageal carcinoma. Endoglin/CD105 is an important angiogenesis marker as well as regulatory component on cell membrane in regulating the biological function of TGF- $\beta$ . Endoglin/CD105 could be a potential target to anti-angiogenesis therapy.

**【Keywords】** esophageal neoplasms; carcinoma, squamous cell; transforming growth factor beta; endoglin; neovascularization, pathologic

**【摘要】** 目的: 研究食管鳞癌中 TGF- $\beta$  和 Endoglin/CD105 的表达及在血管生成中的作用。方法: 采用 RNA 酶保护性分析和免疫组织化学方法对 30 例食管癌高发区食管癌患者的癌组织和癌旁组织 TGF- $\beta$  和 Endoglin/CD105 mRNA 和蛋白

收稿日期 2005-10-31; 接受日期 2006-06-12

通讯作者 段芳龄。Tel: (0371) 63921444 Email: wcbx@chinajournal.net.cn

作者简介: 马军和郭敏同为第 1 作者。马军, 博士, 讲师, 郑州大学消化疾病研究所副所长。Tel: (0371) 63921444 Email: iodd66@yahoo.com

表达水平进行检测。结果: 食管癌组织中 TGF- $\beta$ 1 和 TGF- $\beta$ 3 mRNA 较癌旁组织显著增高 ( $P < 0.05$ ), TGF- $\beta$ 2 无变化。食管癌组织中 Endoglin/CD105 mRNA 较癌旁组织也显著升高 ( $P < 0.05$ )。TGF- $\beta$ 3 mRNA 与 Endoglin/CD105 mRNA 的相关分析显示有相关关系。结论: TGF- $\beta$  和 Endoglin/CD105 参与了食管鳞癌血管生成过程的调节, Endoglin/CD105 不仅是细胞膜上 TGF- $\beta$  受体中调节 TGF- $\beta$  生物学功能的一个重要分子, 而且是新生血管的重要标志。因此调节 Endoglin/CD105 的功能可能成为抗血管治疗中的一个潜在的、具有较宽生物防治潜的靶点。

**【关键词】** 食管肿瘤; 癌; 鳞状细胞; 转化生长因子  $\beta$ ; endoglin; 新生血管化; 病理学

**【中图分类号】** R735.1 **【文献标识码】** A

## 0 引言

TGF- $\beta$  是一类多功能细胞因子, 参与多种细胞功能的调节, 包括细胞增殖、分化、迁移、细胞外基质的合成等<sup>[1]</sup>。TGF- $\beta$  是  $M_r$  25 000 的二聚体, 哺乳动物细胞中包括三种亚型: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3。TGF- $\beta$ 1 在细胞生长过程中的作用较为复杂, 研究显示在不同细胞类型和/或不同阶段可促进或抑制细胞生长<sup>[2]</sup>, 在多种(尤其是上皮源性)非恶性细胞中, 它通过诱导细胞凋亡和/或通过上调细胞周期依赖抑制因子(p15, p21 和 p27)的水平将细胞阻滞在 G1 期从而抑制细胞的生长<sup>[2-4]</sup>。由于恶性肿瘤细胞常存在 TGF- $\beta$  受体的丢失、突变和/或缺陷而对 TGF- $\beta$ 1 生长抑制作用产生抗性<sup>[2]</sup>, 此外, TGF- $\beta$ 1 可通过刺激肿瘤血管生成、细胞外基质重塑及抑制机体对肿瘤细胞的免疫反应等多种途径促进肿瘤的生长<sup>[2,5]</sup>。本研究对食管癌高发区食管癌患者癌组织中 TGF- $\beta$  及其受体调节分子 Endoglin mRNA 进行检测并探讨其在血管生成中的作用。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 30 例食管癌标本来自食管癌高发区河南省林州市人民医院 1999-03 ~ 05 间手术患者。术中切除的食管癌标本迅速放入液氮中储存备用。其中男 17 例, 女 13 例, 年龄 43 ~ 71(平均  $56 \pm 9$ ) 岁。病理学检查均为食管鳞状上皮细胞癌, 其中高中分化

20例,低分化10例。

## 1.2 方法

1.2.1 RNA提取和多探针RNA酶保护性分析 根据以往描述的方法<sup>[6]</sup>,对食管癌标本进行多部位取材,在低温下研碎后采用 Tri-reagent(美国MRC公司产品)提取总RNA,分光光度计(Pharmacia-Biotech)检测RNA浓度,以30 μg分装备用。采用多探针RNA酶保护性分析试剂盒(美国Pharmingen产品),以hck3为多探针模板(包括TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3)根据产品说明进行操作。采用Cyclone Phosphorimager(美国HP公司产品)对mRNA表达进行定量分析。看家基因L32作为内参照以确定RNA的上样量,每例标本尽量重复多次,以减少误差。部分标本因为RNA量不足,只做1次,如图1中病例8的癌旁组织和病例9的癌组织。

### 1.2.2 肿瘤组织中血管的组织化学染色及定量分析

食管癌CD105免疫组织化学染色及定量分析采用Fenton等<sup>[7]</sup>的方法。①冰冻组织切片:新鲜标本用OCT包埋后4~5 μm连续切片,尽量避开出血坏死区。30例新鲜组织冰冻切片后,丙酮固定10 min,空气中干燥10 min后备用。②血管的组织化学染色(CD105)方法:PBS洗10 min × 1, 5 min × 1; 50 mL/L正常血清封闭30 min, PBS洗5 min × 3; 30 mL/L双氧水5 min, PBS洗5 min × 3; CD105(1:100)孵育过夜; PBS洗5 min × 3; HRP标记的羊抗兔抗体(1:25)孵育1 h, PBS洗5 min × 3; AEC显色40 min,置于PBS中。③肿瘤血管的定量分析:在显微镜下采用SONY自动数码成像系统(3-CCD型)对每一例肿瘤组织随机选取起始点连续采集16个200 × 高倍视野形成一张完整肿瘤血管图片(总面积为1514 mm<sup>2</sup>)用于定量分析。采用商用Image-pro-plus软件对血管进行定量分析,其原理为计算机随机选取多个点以测量随机点与血管的平均距离(以μm为单位),因此血管平均距离越小,血管密度越高。

统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS10.0软件进行统计分析,食管癌组织及癌旁组织mRNA分析采用配对资料 $t$ 检验,相关分析采用直线相关分析计算相关系数,检验采用Pearson检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TGF-β mRNA表达水平检测 TGF-β mRNA表达水平见图1,其量化结果见表1。其中TGF-β1, TGF-β3在食管癌组织中的mRNA较癌旁组织明显增高( $P < 0.05$ ), TGF-β2与癌旁组织中相比无变化。

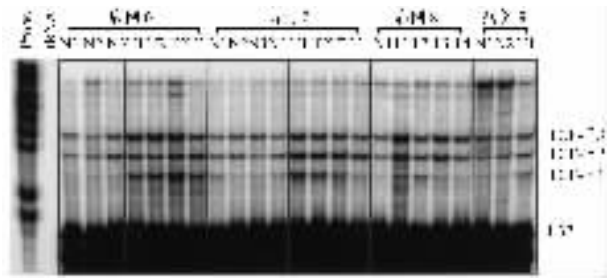


图1 RNA酶保护试验检测食管鳞癌和癌旁组织转化生长因子mRNA表达情况

图1中显示病例6-9的TGF-β1, β2, β3的mRNA表达, N表示癌旁组织, T表示肿瘤组织,定量分析以L32作为内参照。

表1 原发性食管鳞癌TGF-β mRNA表达情况

( $n=30, \bar{x} \pm s$ )

组别	TGF-β1	TGF-β2	TGF-β3
癌旁组织	34.5 ± 4.6	31.8 ± 4.4	30.3 ± 3.2
食管癌组织	58.0 ± 7.7 <sup>a</sup>	42.3 ± 4.5	47.1 ± 4.8 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 癌旁组织。

### 2.2 食管鳞癌组织Endoglin mRNA及蛋白检测

对Endoglin mRNA的定量分析<sup>[8]</sup>显示食管癌组织中Endoglin(69.3 ± 3.9)较癌旁组织(89.1 ± 7.4)显著升高( $P < 0.05$ )。采用免疫组织化学方法对肿瘤组织中Endoglin/CD105染色,如图2所示,Endoglin/CD105分布于间质血管,阳性血管呈紫红色(AEC显色),而肿瘤细胞仅有轻微着色,对阳性血管定量分析显示食管癌组织中Endoglin/CD105染色的血管平均距离(密度)为(50.4 ± 18.4) μm。

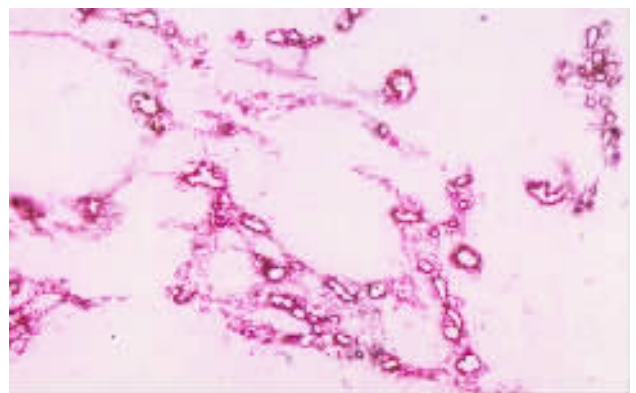


图2 Endoglin/CD105在食管鳞癌中的染色 AEC × 200

2.3 TGF-β和Endoglin的相关性分析 TGF-β3 mRNA与Endoglin/CD105 mRNA的相关分析显示有相关关系( $r=0.55, P < 0.05$ )。

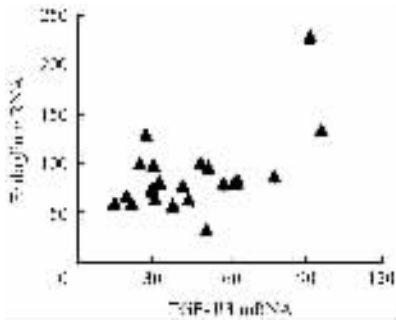


图3 TGF-β3 mRNA 和 Endoglin/CD105 mRNA 在食管癌中的相关性

### 3 讨论

实验证明 TGF-β1 过度表达可增加肿瘤血管密度和转移潜能<sup>[9]</sup>,可增加 VEGF,降低 thrombospondin-1 从而促进血管生成;TGF-β1 中和抗体、反义治疗或阻断 TGF-β 的信号传导通路可抑制血管生成,延缓肿瘤生长<sup>[2,10-11]</sup>。

TGF-β 通过与细胞跨膜蛋白受体结合发挥其生物作用,其跨膜蛋白受体有三种亚型 TGF-β RI, RII, RIII。RI 和 RII 结构相似,具有丝氨酸-苏氨酸激酶活性,RIII 则不具有激酶活性,也不是信号传导所必须,但其可促进 TGF-β1, TGF-β2 和 TGF-β3 与 RI, RII 结合。

Endoglin( 又称 CD105 )是  $M_r$  约为 180 000 的跨膜糖蛋白,主要在增殖活跃的内皮细胞中表达。近年对 CD105 在组织中的分布及其功能的研究越来越显示出其在血管生成中的作用。目前认为它是新生血管生成的显著标志。内皮细胞表达的 CD105 持续保持磷酸化,提示其在信号传导过程中和/或与胞质内蛋白质相互作用过程中具有一定作用。有资料显示 CD105 是 TGF-β 受体系统的成分之一,它能与 TGF-β RI 和 RII 共免疫沉降,它通过与 TGF-β RI 和/或 RII 相互作用促进 TGF-β1 和 TGF-β3 与其受体高亲和力结合,且 TGF-β1 可上调 CD105 基因表达,CD105 过度表达调节多种细胞对 TGF-β 的反应,Lastres 等<sup>[12]</sup>证实在 U937 白血病细胞中导入 CD105 可抑制 TGF-β1 诱导的细胞黏附、纤维连接蛋白( fibronectin )的合成、血小板内皮细胞黏附分子-1 的磷酸化。Letamendia 等<sup>[13]</sup>也在大鼠成肌细胞中证实 CD105 过度表达可抑制 TGF-β1 诱导的生长抑制和纤维蛋白溶解酶激活抑制因子( plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1 )的合成。Li 等<sup>[14]</sup>用反义技术证实抑制体外培养内皮细胞的 CD105 表达增强了 TGF-β1 抑制其生长和迁移。这些研究结果提示 CD105 可影响细胞对 TGF-β1

的特异反应,调节 TGF-β 受体复合物释放的细胞内信号,因此血管生成过程依赖于 TGF-β 和 CD105 的相互作用。

本研究发现食管癌组织 TGF-β1, TGF-β3, Endoglin/CD105 mRNA 水平较癌旁组织显著升高, TGF-β2 无明显变化。TGF-β 与 CD105 存在显著相关性或相关趋势,提示 TGF-β1, TGF-β3 和 Endoglin( CD105 )参与了食管鳞状细胞癌血管生成过程的调节。Endoglin( CD105 )不仅是增殖内皮细胞的标记物,而且是细胞膜上 TGF-β 受体中调节 TGF-β 生物学功能的一个重要分子,因此调节 Endoglin( CD105 )的功能可能成为抗血管治疗中的一个潜在的、具有较宽生物防治谱的靶点。

### 【参考文献】

- [1] Massagué J. The transforming growth factor-β family [ J ]. *Annu Rev Cell Biol*, 1990, 6: 597-641.
- [2] Cua DJ, Kastelein RA. TGF-beta, a 'double agent' in the immune pathology war [ J ]. *Nat Immunol*, 2006, 7( 6 ): 557-559.
- [3] Rama S, Suresh Y, Rao AJ. TGF beta1 induces multiple independent signals to regulate human trophoblastic differentiation: Mechanistic insights [ J ]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 206( 1-2 ): 123-136.
- [4] Ye L, Zhang HY, Wang H, et al. Effects of transforming growth factor beta 1 on the growth of rhabdomyosarcoma cell line RD [ J ]. *Chin Med J ( Engl )*, 2005, 118( 8 ): 678-686.
- [5] Platten M, Wick W, Weller M. Malignant glioma biology: Role for TGF-beta in growth, motility, angiogenesis, and immune escape [ J ]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52( 4 ): 401-410.
- [6] 郭敏, 王立东, Ding I. 食管鳞状上皮细胞癌中 IL-8 mRNA 水平的检测及其与 CD105 血管距离的关系 [ J ]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2002, 11( 3 ): 662-264.
- [7] Fenton BM, Paoni SF, Lee J, et al. Quantification of tumor vasculature and hypoxia by immunohistochemical staining and HbO<sub>2</sub> saturation measurement [ J ]. *Br J Cancer*, 1999, 79( 3-4 ): 464-471.
- [8] 郭敏, 高珊珊, 宋子博, 等. 食管癌高发区食管癌组织中 VEGF, Angiopoietin 及其受体的表达及意义 [ J ]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2004, 13( 3 ): 253-257.
- [9] Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, et al. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma [ J ]. *Cancer*, 2001, 91( 5 ): 964-971.
- [10] Morena AM, Oshima CT, Gebirim LH, et al. Early nuclear alterations and immunohistochemical expression of Ki-67, Erb-B2, vascular endothelial growth factor ( VEGF ), transforming growth factor ( TGF-beta1 ) and integrin-linked kinase ( ILK ) two days after tamoxifen in breast carcinoma [ J ]. *Neoplasma*, 2004, 51( 6 ):

481-486.

- [11] Benckert C, Jonas S, Cramer T, et al. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(5): 1083-1092.
- [12] Lastres P, Letamendia A, Zhang H, et al. Endoglin modulates cellular response to TGF- $\beta$ 1 [J]. *J Cell Biol*, 1996, 133(5): 1109-1121.

- [13] Letamendia A, Lastres P, Botella LM, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- $\beta$  [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 33011-33019.
- [14] Li C, Hampson IN, Hampson L, et al. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1 on human vascular endothelial cells [J]. *FASEB J*, 2000, 14(1): 55-64.

编辑 许福明

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)14-1311-01

## 股动脉入路介入术后假性动脉瘤彩超引导压迫修复

车玉英<sup>1</sup>, 白新燕<sup>2</sup>, 李军<sup>3</sup>, 李超民<sup>1</sup>, 杨瑜莹<sup>1</sup>, 贺东风<sup>1</sup>, 罗薇<sup>1</sup>, 拓步雄<sup>1</sup>, 李慧<sup>1</sup> (解放军第451医院: <sup>1</sup>心内科, <sup>2</sup>超声科, 陕西西安710054, <sup>3</sup>第四军医大学西京医院超声科, 陕西西安710033)

【关键词】股动脉入路; 假性动脉瘤; 彩超超声

【中图分类号】R445.1 【文献标识码】B

**0 引言** 股动脉是经皮冠状动脉(冠脉)介入诊疗术最常用的血管入路, 股动脉穿刺操作简单, 但术后发生血肿、假性动脉瘤等外周血管并发症仍占一定比例。尤其是冠脉介入治疗术后加强抗凝, 一旦出现局部出血并发症很棘手。我院近两年冠脉介入术发生4例假性动脉瘤(femoral pseudoaneurysms)在彩超引导下按压修复获得成功。

**1 一般资料** 我院2003-11/2005-11经股动脉入路行冠脉介入术230例(男146, 女84)例, 年龄36~85(平均72.0 $\pm$ 12.6)岁(不包括经桡动脉入路例数)。术后4例发生股动脉假性动脉瘤, 均为女性, 年龄分别为53岁、60岁、68岁、76岁, 3例合并高血压, 1例合并糖尿病。术前常规应用低分子肝素、阿司匹林、波立维等药抗凝。冠状动脉造影: 3例血管狭窄<50%, 给予药物治疗; 1例前降支中段狭窄90%, 术中植入支架1枚。介入术后1~4d穿刺部位疼痛, 触及搏动性包块, 闻及血管杂音, 彩色多普勒超声检查确诊为假性动脉瘤。

**2 按压修复方法** 超声辨别出假性动脉瘤的颈部(即假腔与动脉连通处)并引导按压其颈部直至闭塞, 同时保持股动脉血流通常, 按压后穿刺部位血管杂音消失, 股动脉与包块之间异常血流中断, 按压30~90min, 加压包扎, 卧床休息24h。观察血管杂音及足背动脉搏动情况, 超声随访。

**3 讨论** 股动脉假性动脉瘤是经股动脉入路行介入诊疗术常见并发症之一, 未及时处理, 假性动脉瘤可能会出现血管

破裂、血栓栓塞、压迫周围神经组织、皮肤和皮下组织坏死和显著失血等不良后果<sup>[1]</sup>。随着介入手术量的急剧增加, 医源性假性动脉瘤的发生率为0.05%~4%<sup>[2]</sup>。假性动脉瘤发生的主要原因有: ①动脉穿刺技术不熟练及穿刺部位不正确; ②动脉鞘管型号过大(大于8F)或球囊回抽不充分拔管使动脉伤口扩大; ③术后动脉压迫止血手法不正确; ④围手术期应用抗凝药物; ⑤高血压患者动脉穿刺点由于血管内压力高难以愈合; ⑥年龄大, 动脉粥样硬化严重, 血管中层弹性纤维破坏, 穿刺后收缩能力差; ⑦穿刺点过低, 鞘管进入股动脉分支; ⑧股动脉穿刺部位血管畸形; ⑨术后过早活动(用力咳嗽、大便屏气等)卧床小于24h。本组例1术后3d排便用力, 例2术后4d用力打喷嚏, 例3术后第2日去卫生间突发穿刺部位剧痛, 例4术后即出现局部肿块, 闻及血管杂音, 超声提示股动静脉发育畸形。我们采用股动脉入路介入治疗230例, 发生4例假性动脉瘤, 占0.58%。对于介入术后出现穿刺部位肿胀或血肿, 伴有局部血管杂音, 应考虑假性动脉瘤的可能。彩色多普勒超声对假性动脉瘤的定性诊断准确率几乎达100%, 为急性假性动脉瘤首选的辅助检查<sup>[3]</sup>。目前治疗主要有加压包扎、超声引导下按压修复及超声引导下注射凝血酶, 很少需要外科修补<sup>[4]</sup>。本组采用超声引导下按压修复治疗, 随访6~12mo, 无复发, 局部无疼痛、出血、周围肿块和下肢肿胀等发生。按压修复治疗成功的要点: 早发现, 早治疗, 对股动脉穿刺术后疼痛明显或局部肿胀者及早行彩超检查, 发现假性动脉瘤既施行按压修复治疗, 瘤腔越小, 按压时程越短, 病程越长, 瘤体内可能被内皮细胞覆盖, 难以形成血栓。正确的按压技巧使用最小的压力而达到阻断通道血瘤的目的。冠脉介入术时有条件可选择经桡动脉入路操作, 避免假性动脉瘤的发生。

### 【参考文献】

- [1] Pena LL, Olin JW, Coines D, et al. ultrasound-guided thrombin injection for the treatment of postcatheterization pseudoaneurysms [J]. *Circulation*, 2000, 102: 2391-2395.
- [2] Sackett WR, Taylor SM, Coffey CB, et al. Ultrasound guided thrombin in occlusion of iatrogenic femoral pseudoaneurysms: A prospective analysis [J]. *Am Surg*, 2000, 66(10): 937-942.
- [3] 蒋天安, 李鸣, 赵君康, 等. 超声引导下局部压迫或注射凝血酶治疗动脉插管后假性动脉瘤的临床应用 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2004, 13(1): 45.
- [4] Malcux G, Hendrickx S, Vaninbrouckx J, et al. Percutaneous injection of human-thrombin to treat iatrogenic femoral pseudoaneurysms: Short- and mid-term ultrasound follow-up [J]. *Eur Radiol*, 2003, 13: 209-212.

收稿日期 2006-04-20; 接收日期 2006-05-20

作者简介: 车玉英, 硕士, 主任医师, 科主任. Tel: (029)84734102

Email: yychexa@yahoo.com.cn

编辑 许福明