

胃肠道间质瘤中 TGF- β_1 、uPA 的表达及其意义

赵 滢¹, 张天彪², 王 强¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院 胃肠营养外科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 中国医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的: 探讨胃肠道间质瘤中 TGF- β_1 、uPA 的表达及其在胃肠道间质瘤(GIST)发生及发展中的作用。方法: 应用 RT-PCR 和 Western-blot 方法检测 93 例 GIST 标本中 TGF- β_1 、uPA mRNA 和蛋白水平表达。结果: TGF- β_1 、uPA mRNA 及蛋白在 GIST 组织中呈现高表达, TGF- β_1 、uPA mRNA 及蛋白变化与 NIH 分级、肿瘤侵袭转移及黏膜受侵密切相关($P < 0.05$), 二者呈现正相关($r = 0.356, P < 0.05$)。结论: GIST 中 TGF- β_1 、uPA mRNA 及蛋白均呈现高表达, 并且可能在 GIST 发生发展中起重要作用。

[关键词] 胃肠道间质瘤; 反转录聚合酶链反应; 免疫印迹法; 转化生长因子 β_1 ; 尿激酶型纤溶酶原激活物; TGF- β ; uPA

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)02-0177-04

The Expression of TGF- β_1 and uPA in Gastrointestinal Stromal Tumors and Its Clinical Significance

ZHAO Ying¹, ZHANG Tianbiao², Wang Qiang¹

(1. Department of Gastro-intestinal Nutrition Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of TGF- β_1 and uPA in gastrointestinal stromal tumors (GISTs), and to investigate their roles in genesis and development of GISTs. **Methods:** The expression of TGF- β_1 and uPA mRNA and protein were detected with RT-PCR and western-blot in 93 cases of GISTs. **Results:** The expression of TGF- β_1 and uPA mRNA and proteins was high in GISTs. The changes of TGF- β_1 and uPA mRNA and proteins levels were closely associated with NIH grades, tumor metastasis, and invasion to mucosa ($P < 0.05$). The TGF- β_1 level positively correlated with uPA level ($r = 0.356, P < 0.05$). **Conclusions:** The expression of TGF- β_1 , uPA mRNA and proteins is high in GISTs, and TGF- β_1 level positively correlates with that of uPA. They may play an important role in the genesis and development of GISTs. The results are contribution to further treatment.

[Key words] gastrointestinal stromal tumors; RT-PCR; immunoblotting; TGF- β ; uPA

肿瘤的侵袭、转移是一个复杂多步骤的肿瘤细胞与宿主细胞及基质间相互作用的过程, 侵袭和转移的程度是影响预后的主要因素, 但目前仍然不清楚胃肠道间质瘤(Gastrointestinal stromal tumor, GIST)发生发展和浸润转移的具体分子机制^[1]。研究发现, TGF- β_1 信号通路及 uPA 表达与肿瘤的浸润转移有关, 并介导多种转移相关基因表达调控^[2]。1996 年 1 月~2010 年 10 月, 采用 RT-PCR 和 Western Blot 方法对 93 例 GIST 标本中 TGF- β_1 、

uPA mRNA 水平以及蛋白表达进行检测, 探讨 TGF- β_1 、uPA 之间的关系, 及其与 GIST 侵袭转移的关系, 以此揭示其在 GIST 发生发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

选择临床病理资料完整、手术切除、病理证实

的 GIST 新鲜组织标本 93 例。男性 48 例、女性 45 例,年龄 11 ~ 73 岁、平均 54.3 岁。肿瘤发生于胃 46 例(49.5%)、十二指肠 21 例(22.6%)、结直肠 10 例(10.8%)、食管 7 例(7.5%)、胃肠道外 9 例(9.7%,其中网膜 4 例、肠系膜 3 例、后腹膜 2 例)。

1.2 GIST 的诊断标准 常规形态符合 GIST 诊断要点,免疫组化 CD117 阳性确诊;或者常规形态符合 GIST 诊断要点,CD117 阴性而 CD34 阳性确诊,或者 CD117 及 CD34 阴性,并且平滑肌肌动蛋白(SMA)、结蛋白(Desmin)、神经脊突细胞抗原(S-100)蛋白也均阴性,排除平滑肌源性和神经源性肿瘤,病理组织形态符合 GIST 而纳入本研究。依据 Fletcher 等提出的 GIST 生物学行为分级标准进行分级(NIH 分级),分为 I 级、II 级、III 级和 IV 级^[3]。另取肿瘤旁组织作为对照,肿瘤旁组织标本经病理检查未受肿瘤侵及。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测 uPA、TGF-β₁ 在 GIST 组织及对照组织的 mRNA 水平。按照常规步骤进行操

作:脱蜡和脱水,修整石蜡块,充分暴露组织,切取 5 μm 厚切片,收集 100 mg 组织,分置于 1.5 ml 离心管中;提取总 RNA 然后进行总量的检测,提取的 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,观察 18 S 与 28 S 条带,以条带清晰且 28 S 亮度约为 18 S 的二倍为最佳标准;同时测量 OD 值,计算 OD260/OD280 比值,逆转录酶介导的 cDNA 的合成。PCR 反应体系:采用 PCR 反应体系来检测各目的基因的表达情况。PCR 反应条件为 95 ℃ 变性 1 min, 52 ~ 57 ℃ 退火 2 min, 72 ℃ 延伸 10 min。所有的标本都经过 3 次重复检测,所检测目的基因 uPA、TGF-β₁ 的引物序列以及各目的基因 PCR 反映体系所用的循环数目见表 1。引物设计采用 Primer Premier 5.0 进行。每次操作均经过 3 次重复,将 PCR 产物采用电泳的方法进行分离,UV 凝胶成像分析系统扫描测定 PCR 产物条带的密度,TGF-β₁、uPA 产物带所测得的灰度值与内对照 β-actin 产物带的灰度值进行比较,最后 TGF-β₁、uPA 产物的表达水平以与 β-actin 内对照比值的形式来表达。

表 1 TGF-β₁、uPA 的 PCR 引物序列
Tab.1 PCR primers sequences of TGF-β₁ and uPA

引物	上游序列	下游序列	产物长度	循环数
uPA	5'-CCATCTACAGGAGGCACCG-3'	5'-GCCAAACTGGGGATCGTTAT-3'	347 bp	32
TGF-β ₁	5'-CTGCTGTGGCTACTGGTGC-3'	5'-CATAGATTTGTTGTGGGTTTC-3'	322 bp	32
β-actin	5'-AAATCGTCGTGACATTAA-3'	5'-CTCGTCATACTCCTGCTTG-3'	472 bp	32

1.3.2 Western 印迹法 检测 uPA、TGF-β₁ 在 GIST 组织及对照组织的表达。采用常规方法进行操作,蛋白裂解、定量,根据蛋白浓度,将标本样品蛋白稀释成相同浓度,进行电泳、转印、一抗二抗孵育,最后加入碱性磷酸酶底物 O-dianidine 及 β-naphthyl acid phosphate,经显色液显色 15 min。采用 UVP 扫描仪扫描成像,用 UVP 凝胶分析系统计算曲线面积得到灰度值。

1.4 统计学分析

每组实验重复 3 ~ 4 次,实验结果应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析,相关性研究采用 speraman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 实验结果

2.1 uPA 及 TGF-β₁ 的 mRNA 水平及蛋白表达

使用设计的引物(表 1)进行 RT-PCR 实验分

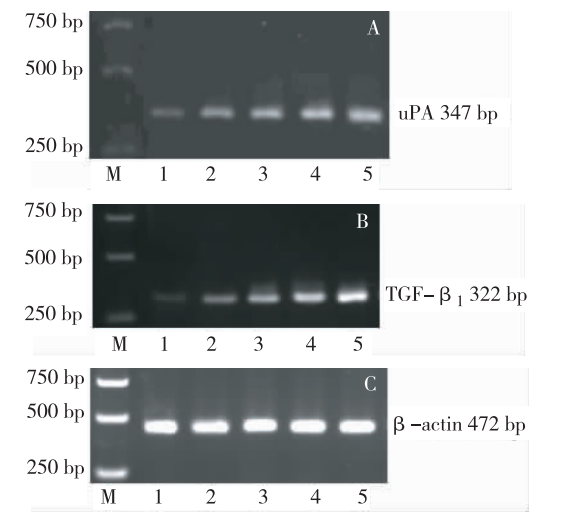
析,结果显示,在 93 例 GIST 中,uPA、TGF-β₁ mRNA 的表达与年龄、性别及组织学类型无显著关系($P > 0.05$)。TGF-β₁ mRNA 的表达与肿瘤侵袭转移、NIH 分级(图 1)及黏膜受侵有显著相关($P < 0.05$),uPA mRNA 的表达与肿瘤侵袭转移、NIH 分级显著相关($P < 0.05$),与黏膜受侵无关($P > 0.05$)。各指标与临床病理特征之间的关系见表 2。uPA、TGF-β₁ 蛋白表达水平与 mRNA 水平基本一致,见图 2。

2.2 相关性分析

将 uPA 的光密度值与 TGF-β₁ 光密度值进行相关性分析,两者存在正相关($r = 0.356, P < 0.05$)。

3 讨论

转化生长因子(transforming growth factor beta1,TGF-β₁)为 25 kD 的二聚体多肽,主要在内皮细胞、血细胞、结缔组织细胞和上皮细胞中表



A. uPA, B. TGF-β₁, C. β-actin; 1-肿瘤旁组织; 2-极低度侵袭危险性; 3-低度侵袭危险性; 4-中度侵袭危险性; 5-高度侵袭危险性; M-Marker。

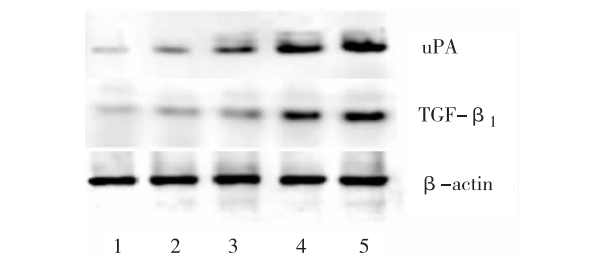
图 1 uPA、TGF-β 在 GIST 组织及对照组织中 mRNA 水平的表达
Fig. 1 The expression of uPA mRNA in GIST group and control group

表 2 GIST 中 uPA、TGF-β₁ mRNA 的表达与临床病理特征的关系

Tab. 2 The relationship of the expression of uPA and TGF-β₁ to clinical pathologic features

临床病理指标	n	uPA	TGF-β ₁
性别			
男	48	0.727 9 ± 0.080 7 ⁽¹⁾	0.638 7 ± 0.079 0 ⁽¹⁾
女	45	0.725 7 ± 0.0868 ⁽²⁾	0.622 1 ± 0.077 3 ⁽¹⁾
年龄(岁)			
≥55	52	0.707 7 ± 0.091 7 ⁽¹⁾	0.612 2 ± 0.073 1 ⁽⁴⁾
<55	41	0.711 5 ± 0.098 2 ⁽¹⁾	0.634 9 ± 0.071 2 ⁽¹⁾
组织学类型			
上皮样	21	0.717 6 ± 0.079 3 ⁽¹⁾	0.623 1 ± 0.077 5 ⁽¹⁾
梭形	54	0.701 7 ± 0.084 0 ⁽²⁾	0.602 2 ± 0.091 1 ⁽¹⁾
混合型	18	0.726 4 ± 0.079 1 ⁽¹⁾	0.637 1 ± 0.102 2 ⁽¹⁾
肿瘤侵袭转移			
无	63	0.629 2 ± 0.069 1 ⁽¹⁾	0.342 8 ± 0.047 1 ⁽⁴⁾
有	30	0.750 8 ± 0.082 2 ⁽¹⁾⁽⁵⁾	0.751 7 ± 0.045 3 ⁽¹⁾⁽⁶⁾
肿瘤旁组织	93	0.430 2 ± 0.064 5	0.192 8 ± 0.028 9
肿瘤组织 NIH 分级			
NIH 超低危	4	0.555 9 ± 0.088 2 ⁽³⁾⁽⁵⁾	0.345 9 ± 0.055 0 ⁽¹⁾⁽⁸⁾
低危	15	0.644 1 ± 0.070 0 ⁽¹⁾⁽⁵⁾	0.487 9 ± 0.053 2 ⁽¹⁾⁽⁶⁾
中危	28	0.706 1 ± 0.084 2 ⁽¹⁾⁽⁷⁾	0.602 2 ± 0.072 1 ⁽¹⁾⁽⁸⁾
高危	46	0.748 1 ± 0.089 1 ⁽¹⁾⁽⁵⁾	0.733 5 ± 0.087 9 ⁽¹⁾⁽⁶⁾
黏膜受侵			
无	60	0.598 9 ± 0.083 9 ⁽¹⁾	0.382 7 ± 0.037 9 ⁽²⁾
有	26	0.714 2 ± 0.085 1 ⁽¹⁾	0.720 0 ± 0.096 1 ⁽²⁾⁽⁶⁾

注:与肿瘤旁对照组织相比, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$; 组间比较, ⁽³⁾ $P < 0.05$; ⁽⁴⁾ $P < 0.01$ 。



1-肿瘤旁组织; 2-极低度侵袭危险性; 3-低度侵袭危险性; 4-中度侵袭危险性; 5-高度侵袭危险性。

图 2 GIST 中 uPA 和 TGF-β₁ 蛋白的表达
Fig. 2 The expression of uPA, TGF-β₁ proteins in GIST

达^[4],它具有刺激肿瘤血管生成、侵袭、转移,对宿主免疫抑制以及使肿瘤生长加速等多种作用^[5]。Mceachern 等通过对胰腺癌细胞株 4T1 细胞的研究发现,高表达的 TGF-β₁ mRNA 促进了肿瘤的侵袭和转移。Neaf 和 Cardillo^[6]也分别发现在胃癌和结肠癌组织中发现 TGF-β₁ mRNA 高表达,TGF-β₁在许多恶性肿瘤的发生发展过程中发挥双重作用,在肿瘤发展早期具有抑制肿瘤细胞增殖的作用,能抑制细胞的增生使细胞停留在 G1 期,诱导细胞凋亡,稳定染色体;在肿瘤发展后期,肿瘤细胞失去了对 TGF-β₁ 抑癌作用的敏感性,TGF-β₁ 通过上皮间质质转变的过程发生形态学改变和增强浸润性。本研究发现,在 GIST 组织中 TGF-β₁ 蛋白呈现高表达,并且 TGF-β₁ mRNA 的表达与 NIH 分级、肿瘤侵袭转移、黏膜受侵密切相关 ($P < 0.05$),与患者年龄、性别及组织学类型无关 ($P > 0.05$)。研究还发现,GIST 中 TGF-β₁ mRNA 的表达水平与 GIST 的恶性表现有关,TGF-β₁ mRNA 表达水平高的病灶具有较强的纵深浸润和广泛转移的倾向和能力,其生物学行为更恶,预后也更差,其机制可能有以下方面。(1)通过上调细胞黏附分子 CD44 和整合素 β₁ 的表达,促进细胞因子的分泌,促进蛋白水解酶的分泌,增强其侵袭转移能力;(2)TGF-β₁ 作为一种运动因子,促进肿瘤细胞的运动和迁移;(3)TGF-β₁ 刺激 VEGF 高表达,间接影响肿瘤中的血管生成;(4)TGF-β₁ 直接刺激肿瘤的血管生成,使瘤体内的自然杀伤细胞处于低活性状态,从而有利于肿瘤的迅速增殖^[7~9]。

尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 是由 Astedt 等^[10]首先发现,其基因定位于 10 号染色体长臂上,长度 6.5 kb,编码分子量为 53 kD 的蛋白酶。uPA 以一种非

活化的形式从肿瘤细胞中释放出来,与细胞表面的受体(uPAR)结合后转化为活化的 uPA,能降解细胞外基质中纤维连接蛋白、层黏蛋白和胶原等成分,在肿瘤的浸润和转移过程中起重要作用^[11]。本研究发现,GIST 组织中 uPA mRNA 呈高表达,近肿瘤旁组织表达较弱,而有侵袭转移的 GIST 中 uPA mRNA 阳性表达率显著增高($P < 0.05$),提示 uPA mRNA 表达可作为判断 GIST 侵袭和转移的指标,此结果与观察到的 uPA 蛋白表达结果具有良好的相关性。从表 2 中可见,随 NIH 分级 uPA mRNA 表达增强($P < 0.05$),在正常组织中弱表达,肿瘤侵袭转移组较不转移组明显升高($P < 0.05$)。表明 uPA 与 GIST 的进展有关,在具有浸润能力的恶性肿瘤细胞中常常表现为高表达,是预后差的一个指标;uPA 与黏膜受侵、年龄、性别、组织学类型不相关($P > 0.05$)。本研究结果与国内外其他学者的研究结果一致,提示 uPA 可作为辅助判断肿瘤侵袭转移潜能的分子生物学指标^[12]。

近年来研究发现,TGF- β_1 信号通路参与胃癌、肺癌、前列腺癌及乳腺癌等细胞 uPA 的表达调控,TGF- β_1 能以剂量和时间依赖的方式上调 uPA mRNA 和蛋白的表达,这与本研究结果一致,TGF- β_1 与 uPA mRNA 的表达呈现正相关($r = 0.356$, $P = 0.028$),两者相互促进,共同导致了 GIST 的发生发展及侵袭转移。TGF- β_1 信号通路通过上调 uPA 的表达促进 GIST 的恶性进展及侵袭转移,但其确切机制有待进一步研究,本实验结果可为 TGF- β_1 信号转导通路作为 GIST 治疗的靶点提供相应的实验依据,也为 GIST 预后的评估提供依据,TGF- β_1 和 uPA 有可能成为 GIST 诊断和治疗的监测指标。

4 参考文献

- [1] Paral J, Slaninka I, Kalabova H, et al. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, diagnostics, prognosis and treatment options[J]. Acta Gastroenterol Belg, 2010(3):349-59.
- [2] Philippou A, Maridaki M, Koutsilieris M. The role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) in muscle regeneration[J]. In Vivo, 2008(6):735-50.
- [3] Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach[J]. Hum Pathol, 2002(5):459-65.
- [4] Ingman WV, Robertson SA. The essential roles of TGFBI in reproduction[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009(3):233-9.
- [5] Perera M, Tsang CS, Distel RJ, et al. TGF-beta1 interactome: metastasis and beyond[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2010(4):217-29.
- [6] Li Y, Wang X, Liu L, et al. Rheumatic valvular surgery and concomitant radiofrequency Maze procedure: TGF- β_1 mRNA expression predicting the efficacy[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2010(11):820-4.
- [7] Busse A, Asemissen A, Nonnenmacher A, et al. Systemic immune tuning in renal cell carcinoma: favorable prognostic impact of TGF- β_1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells[J]. J Immunother, 2011(1):113-9.
- [8] Welser JV, Li L, Milner R. Microglial activation state exerts a biphasic influence on brain endothelial cell proliferation by regulating the balance of TNF and TGF-beta1[J]. J Neuroinflammation, 2010(1):89.
- [9] Gonzalez CR, Matzkin ME, Frungieri MB, et al. Expression of the TGF-beta1 system in human testicular pathologies[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2010(1):148.
- [10] Lamy PJ, Romieu G, Jacot W. UPA/PAI-1: a tool for breast cancer treatment individualization[J]. biology, clinical implications and quantification assays[J]. Bull Cancer, 2010(3):341-8.
- [11] Wolff C, Malinowsky K, Berg D, et al. Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis[J]. J Pathol, 2011(1):54-63.
- [12] Schmitt M, Mengele K, Napieralski R, et al. Clinical utility of level-of-evidence-I disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010(8):1051-67.

(2011-01-10 收稿, 2011-03-02 修回)