

# 幽门螺杆菌感染的胃癌患者转化生长因子 $\beta_1$ 的表达

张利

**【摘要】 目的** 检测幽门螺杆菌(HP)阳性和阴性胃癌患者的病变组织中转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 的表达分布,并分析其与胃癌患者临床病理学特征的相关性。**方法** 选取 39 例胃癌患者的胃镜活检组织标本,采用快速尿素酶试验(RUT)结合 Giemsa 染色判断 HP 感染。应用冰冻切片免疫组织化学染色法检测胃癌组织中 TGF- $\beta_1$  的表达分布。**结果** HP 阳性者 TGF- $\beta_1$  表达(78.6%)显著高于 HP 阴性者(36.4%) ( $P < 0.05$ ),胃癌患者 HP 感染与 TGF- $\beta_1$  的表达相关。临床 I 期与 II、III、IV 期患者以及浸润深度为 T1 与 T2、T3、T4 胃癌患者的癌组织中 TGF- $\beta_1$  阳性表达差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。胃印戒细胞胞浆频繁出现 TGF- $\beta_1$  强阳性染色。**结论** 胃癌患者中 HP 感染与 TGF- $\beta_1$  的表达存在相关性,TGF- $\beta_1$  在胃癌发生、发展中发挥着重要作用,TGF- $\beta_1$  可成为早期胃癌诊断、治疗和预后的分子标志,HP 可能通过 TGF- $\beta_1$  信号转导通路而在胃癌的发生、发展中起到重要作用。

**【关键词】** 胃癌;转化生长因子  $\beta_1$ ;幽门螺杆菌;免疫组织化学

**Expression of transforming growth factor beta 1 in gastric carcinoma tissue with *Helicobacter pylori* infection** ZHANG Li. The Central Hospital of Taian, Shandong 271000, China  
Corresponding author: ZHANG Li, Email: zldoctor@163.com

**【Abstract】 Objective** To detect the expression and disposition of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) in gastric carcinoma tissue with *Helicobacter pylori* (HP) infection and without *Helicobacter pylori* infection and to analyze the correlation between the expression of TGF- $\beta_1$  and the clinical pathological characteristics. **Methods** Total of 39 cases with gastric carcinoma were collected from gastroscopy with or without *Helicobacter pylori* infection were determined by rapid urease test (RUT) combined with Giemsa staining. The levels of TGF- $\beta_1$  were compared by frozen section method for immunohistochemical staining. **Results** The positive rate of TGF- $\beta_1$  expression in HP-positive gastric carcinoma patients was significantly higher than that in HP-negative patients ( $P < 0.05$ ). The TGF- $\beta_1$  expression levels were significantly different among the stage I group and the stage II, III, IV group; which was the same to T1 depth of invasion and T2, T3, T4 depth of invasion ( $P < 0.05$ ). Frequently, the TGF- $\beta_1$  staining was strong in gastric signet-ring cells. **Conclusions** There is a significant correlation between the expression of TGF- $\beta_1$  and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinoma tissue. TGF- $\beta_1$  plays an important role in the pathogenesis of gastric carcinoma. It could be a molecular marker in early diagnosis, treatment and prognosis in the gastric carcinoma. *Helicobacter pylori* may play an important role in the development of gastric carcinoma through TGF- $\beta_1$  signal pathway.

**【Key words】** Gastric carcinoma; *Helicobacter pylori*; Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta_1$ ); Immunohistochemistry

目前研究表明,胃癌(gastric carcinoma, GC)的发生与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)感染密切相关<sup>[1]</sup>,虽然目前抗 HP 治疗越来越受到人们的重

视,但 HP 感染与胃癌发生的确切机制尚不清楚。胃癌的发生、发展是一个多因素、多步骤、多阶段和多基因改变的过程,研究表明,TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路在肿瘤的发生、发展中扮演着重要角色<sup>[2-3]</sup>,此通路中任一环节的变化都会引起信号转导的异常,进而导致肿瘤的发生和发展<sup>[4]</sup>。虽然近年来大量研究探讨了 HP 感染和 TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路在胃癌发生、发展过程中的作用,但鲜有研究探讨

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.019

基金项目:泰山医学院青年科学基金课题(No. 2011ZRQN035)

作者单位:271000 泰安市,山东省泰安市中心医院

通讯作者:张利,Email:zldoctor@163.com

二者在胃癌发生、发展过程中的相关性。本研究通过分析胃癌 HP 阳性组和 HP 阴性组患者活检组织标本中转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta_1$ ) 的表达以及与临床病理间的关系,了解胃癌患者 HP 感染与 TGF- $\beta_1$  的表达水平及相关性,同时探讨 HP 感染和胃癌的发生机制、临床特点及病理学分期的相关性。

## 资料与方法

### 一、研究对象

本研究收集山东省泰安市中心医院普外科 2007 年 11 月~2008 年 11 月胃癌手术患者标本,共 39 例,入组对象术前均诊断明确,均未接受放射治疗及药物化疗。根据国际抗癌联盟制定的 TNM 分类标准进行组织学诊断和临床分期。术前行胃镜检查时于病变处取组织进行活检,并在胃窦部正常黏膜处取标本备行幽门螺杆菌检测。术后即取肿瘤组织和距其 5 cm 以上相应正常胃组织,标本分为 2 份,其中 1 份于  $-80^{\circ}\text{C}$  液氮冻存,备用于免疫组织化学检测;另 1 份给予福尔马林固定、石蜡包埋,备用于 HE 染色。

### 二、研究方法

1. 幽门螺杆菌的检测:切片行 Giemsa 染色,常规石蜡切片、脱蜡至水、蒸馏水洗;擦干切片周边水分,滴加 Giemsa 工作液覆盖组织片,常温下放置 1~2 min;95% 乙醇分化兼脱水,于无水乙醇中片刻;二甲苯透明,中性树胶封片。结果显示,幽门螺杆菌主要存在于胃黏膜表面的黏液中、细胞表面、胃小凹内和腺腔中及癌旁黏膜等,显示为蓝色或深蓝色,呈海鸥状、杆状或弯曲状。术前内镜检查时取正常胃窦黏膜组织,应用幽门螺杆菌尿素酶检测试剂(福建三强生物化工有限公司)检测,两者均阳性者判定为幽门螺杆菌阳性,两者均阴性者判定为幽门螺杆菌阴性(仅 1 项阳性者,不纳入研究范围)。

2. 胃组织标本 TGF- $\beta_1$  的检测:连续冰冻切片厚 4  $\mu\text{m}$ ,免疫组织化学染色采用生物素-链亲和素-过氧化物酶法(ABC 法)。含有 3% 过氧化氢的冰甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶反应 15 min,非特异性的抗体结合用羊血清(武汉博士德生物公司产品)封闭 30 min,单克隆抗-TGF- $\beta$ (武汉博士德生物公司产品)分别孵育切片,(抗体稀释度 1:100,4 $^{\circ}\text{C}$  过夜)。已结合的抗体用 DAKO 公司产的超敏检测试剂盒(Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark, K5001)检测,DAB 显色后,苏木素复染。用 PBS 和不相关抗体分别为一抗和二抗作为阴性对照。

结果判断:由两位病理医师在不知病理结果情

况下,采用 Remmele W 半定量计数法进行免疫染色结果判断。按下列方法计数:IRS = SI  $\times$  PP,其中 SI 代表染色强度,共分 4 个等级:0、1、2 和 3 分别为阴性、弱阳性、中度阳性和强阳性;PP 代表阳性细胞百分率,当无阳性染色细胞时记为 0,当细胞阳性率 < 10%、10%~50%、51%~80% 和 > 80% 时,分别记为 1、2、3 和 4;IRS 的乘积为 0~12,如果积分 > 2 判为阳性染色,其中积分在 3~6 分认为中度阳性,积分 > 6 认为强阳性。其中 TGF- $\beta_1$  的阳性染色存在于细胞胞浆和胞膜,并且呈棕黄色染色颗粒。

### 三、统计学处理

统计分析采用 SPSS 13.0 软件包。胃癌组织与相应正常黏膜组织 TGF- $\beta_1$  表达之间的分析、胃癌患者 HP 感染与 TGF- $\beta_1$  表达的关系均采用  $\chi^2$  检验;TGF- $\beta_1$  的表达和患者临床特点及病理学参数间的关系应用 Mann-Whitney U 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、胃癌患者 HP 的感染情况

入组的 39 例胃癌患者中幽门螺杆菌阳性者 28 例(71.8%),阴性者 11 例(18.2%)。

### 二、胃组织标本中 TGF- $\beta_1$ 的表达

TGF- $\beta_1$  在正常胃黏膜细胞染色呈阴性或弱阳性,而在胃癌组织中的表达有两种表现:肿瘤组织边缘存在散在 TGF- $\beta_1$  强染色(图 1),肿瘤中心区域为 TGF- $\beta_1$  均质阳性染色。本研究中 39 例患者中有 23 例为 TGF- $\beta_1$  的阳性染色,其中中度染色者 13 例,强阳性染色者 10 例。

### 三、胃癌患者 HP 感染与 TGF- $\beta_1$ 表达的相关性

28 例 HP 感染的阳性胃癌患者中 22 例有 TGF- $\beta_1$  阳性表达(78.6%),在 11 例 HP 阴性患者中有 4 例阳性表达(36.4%),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 四、胃癌组织标本中 TGF- $\beta_1$ 表达与临床病理学参数的相关性

临床 I 期的 10 例患者中有 9 例为阳性表达,而 5 例呈强阳性表达的患者中有 4 例为印戒细胞癌患者(图 2);II、III 和 IV 期的 29 例患者中有 14 例为阳性表达;临床 I 期和 II、III、IV 期胃癌组织 TGF- $\beta_1$  的阳性表达差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。8 例浸润深度为 T1 患者的癌组织有 TGF- $\beta_1$  的阳性表达,而 4 例强阳性表达中有 3 例为印戒细胞癌患者;T2、T3、T4 浸润深度患者共有 31 例,其中 15 例为阳性表达,在 T1 与 T2、T3、T4 浸润深度,TGF- $\beta_1$  的表达差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

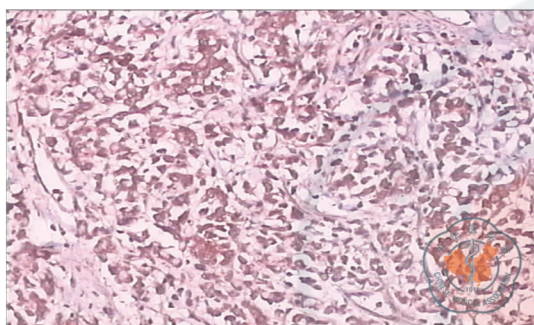
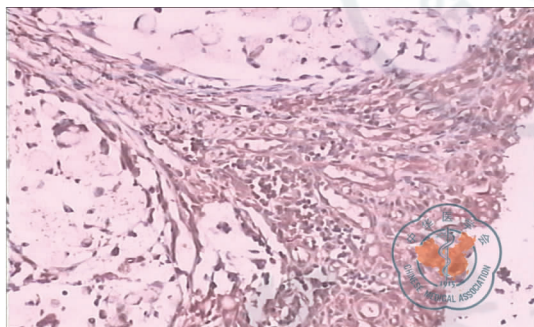


表 1 胃癌组织标本中 TGF- $\beta_1$  表达与临床病理学参数的相关性

组别	例数	性别 (男/女)	年龄(岁)		TNM 分期(例)		组织学分类(例)	
			< 50	$\geq 50$	I	II、III 和 IV	分化型	未分化型
TGF- $\beta_1$ 阴性组	16	12/4	3	13	1	15	3	13
TGF- $\beta_1$ 阳性组	23	18/5	8	15	9	14	9	14
<i>P</i>		0.812	0.274		0.021		0.175	

组别	例数	淋巴结转移(例)		浸润深度(例)		远处转移(例)	
		(-)	(+)	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> 、T <sub>3</sub> 和 T <sub>4</sub>	(-)	(+)
TGF- $\beta_1$ 阴性组	16	3	13	0	16	15	1
TGF- $\beta_1$ 阳性组	23	9	14	8	15	19	4
<i>P</i>		0.175		0.008		0.306	

图 1 TGF- $\beta_1$  在胃腺癌组织中的表达注:免疫组织化学染色( $\times 200$ )图 2 TGF- $\beta_1$  在胃印戒细胞癌中的表达注:免疫组织化学染色( $\times 100$ )

## 讨 论

目前,国内外已有大量研究证实 HP 感染在胃癌的发生中发挥重要作用,同时 HP 感染可能是胃癌的一个重要的启动因素。虽然目前已肯定了 HP 感染与胃癌发生的关系,但其导致胃癌发生的确切机制尚不明确。研究认为可能有以下机制<sup>[5-6]</sup>:①在 HP 毒力因子(如 cagA、VacA、菌毛、鞭毛、尿素酶、脂酶或磷脂酶 A 等)的长期作用下,胃黏膜上皮细胞反复发生炎性损伤,同时抑制细胞的修复,影响上皮的愈合,以致逐渐出现肠上皮化生、黏膜萎缩或异型增

生<sup>[7]</sup>。②HP 感染使胃黏膜上皮细胞的基因及表达异常。包括原癌基因(如 c-met、c-myc、c-erb-B2 和 bcl-2 等)的激活,某些蛋白如增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的异常表达,某些肿瘤抑制基因如 APC、Runx3、p53、p16 和 p21 的突变失活等。HP 感染是胃癌的主要病因之一,慢性胃炎向胃癌的演变过程中,持续的幽门螺杆菌感染可能通过促进血管内皮生长因子的表达导致新生血管生成,从而诱导胃癌发生<sup>[8]</sup>。有研究通过测定 HP 感染的胃癌以及癌前病变组织中(如胃息肉、慢性萎缩性胃炎等)原癌基因的表达,认为在早期胃癌中 HP 感染可能促进 ras p21 蛋白的表达,同时可诱导 p53 抑癌基因发生突变;而在胃癌发展的晚期可能使 c-erb-B2 过度表达,预后常较差<sup>[9]</sup>。本研究显示 28 例 HP 阳性的胃癌患者中有 22 例 TGF- $\beta_1$  呈阳性表达(78.6%),而在 11 例 HP 阴性患者中有 4 例呈阳性表达(36.4%)( $P < 0.05$ ),差异具有统计学意义;认为胃癌患者中 HP 感染与 TGF- $\beta_1$  的表达具有相关性,考虑 HP 可能会通过 TGF- $\beta_1$  而作用于 TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路从而在胃癌的发生、发展过程中起到一定的作用。

目前研究证实,TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路在胃癌的发生、发展过程中起着重要作用。TGF- $\beta$  通过与靶细胞表面的 TGF- $\beta$  受体结合而发挥作用来调节细胞生理活动<sup>[10]</sup>,目前已经发现了 TGF- $\beta$ I、II、III、IV 的 4 型 TGF- $\beta$  受体(TGF- $\beta$  receptor),该信号转导通路中必不可少的受体为 TGF- $\beta$ I 型和 II 型受体。基因突变是癌变的原因之一,TGF- $\beta$  及其受体的基因突变亦是如此。Nafe 等<sup>[11]</sup>在 mRNA 水平研究中发现,在 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$  和 TGF- $\beta_3$  的 mRNA 在胃癌组织中的表达较正常胃黏膜组织明显升高,且 3 个亚型在胃癌组织中都有表达,而正常胃黏膜中仅有 1 或 2 个亚型表达。胃癌的发生、发展与 TGF- $\beta$  信号转导通路之间的关系

比较复杂,在胃癌发生、发展的不同时期 TGF- $\beta$  可起到双向作用,即有时抑制肿瘤发生、发展,有时亦可促进其发展<sup>[12]</sup>。有关研究发现,使用致癌原作用于 TGF- $\beta_1$  杂合性等位基因裸鼠,可使其所患癌症的恶性程度更高(包括肺癌和肝癌);同时得到结论认为应用 TGF- $\beta$  对癌症有抑制作用,且该抑癌作用与使用剂量呈正比<sup>[13]</sup>。

综上所述,目前有较多研究结果表明,TGF- $\beta$  在胃癌中存在异常表达。本研究表明,TGF- $\beta_1$  在正常胃黏膜细胞染色呈阴性或弱阳性,入组的 39 例患者胃癌组织中,有 23 例为 TGF- $\beta_1$  阳性染色,其中中度染色者 13 例,强阳性染色者 10 例,与以往研究一致;同时本研究还发现,胃癌细胞的 TGF- $\beta_1$  表达与其 TNM 分期、肿瘤浸润的深度呈正相关,表明 TGF- $\beta_1$  表达增高与肿瘤的转移、侵袭密切相关;因此 TGF- $\beta_1$  可成为胃癌早期诊断、治疗效果评价及其预后的分子标志。已有文献报道称结肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌和前列腺癌等多种肿瘤细胞均有 TGF- $\beta_1$  的过度表达,而且肿瘤细胞已经耐受 TGF- $\beta$ /Smads 信号转导通路介导的生长抑制作用,不仅发生 TGF- $\beta$  受体的改变,也发生 Smads 和癌基因的突变等;因此,癌细胞对 TGF- $\beta$  失去反应性,导致细胞的增殖与凋亡之间失去平衡。此外,还可促进新生血管的生成以及癌细胞的播散,同时促进细胞外基质的合成以及对免疫系统的抑制等,从而为癌细胞提供适宜的生长环境,同时有利于其远处转移及浸润<sup>[14]</sup>,促进肿瘤的发展。

#### 参 考 文 献

- 1 Rozen P. Cancer of the gastrointestinal tract: early detection or early prevention? *Eur J Cancer Prev*, 2004, 13(1): 71-75.
- 2 Galliher AJ, Neil JR, Schieman WP. Role of transforming growth factor-beta in cancer progression. *Future Oncol*, 2006, 2(6): 743-763.
- 3 Lin SJ, Lerch TF, Cook RW, et al. The structural basis of TGF- $\beta$ , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction*, 2006, 132(2): 179-190.
- 4 Kim SS, Shetty K, Katuri V, et al. TGF-beta signaling pathway inactivation and cell cycle deregulation in the development of gastric cancer: role of the beta-spectrin, ELF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(4): 1216-1223.
- 5 崔轶霞, 王海军, 惠起源. 幽门螺杆菌致胃癌发生的机制研究进展. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(5): 625-627.
- 6 姜云水, 方平楚. 幽门螺杆菌与胃癌. *实用肿瘤杂志*, 2002, 17(6): 432-434.
- 7 Blanchard TG, Drakes ML, Czinn SJ. Helicobacter infection Patho-genesis. *Curr Opin Gastroenterol*, 2004, 20(1): 10-15.
- 8 佟书娟, 刘亚平, 尹清云. 幽门螺杆菌感染与胃癌中 VEGF 的表达及肿瘤血管形成的关系. *实用肿瘤学杂志*, 2005, 19(3): 161-163.
- 9 Wang J, Chi DS, Kalin GB, et al. Helicobacter pylori infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(1): 107-113.
- 10 张波, 任建林, 叶震世, 等. 转化生长因子  $\beta_1$  和 Smad7 在胃癌组织中的表达. *中华消化杂志*, 2007, 27(12): 836-837.
- 11 Naef M, Ishiwata T, Friess H, et al. Differential localization of transforming growth factor-beta isoforms in human gastric mucosa and overexpression in gastric carcinoma. *Int J Cancer*, 1997, 71(2): 131-137.
- 12 陈萍, 张利, 魏良洲. 转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 在胃癌组织中的表达. *宁夏医学杂志*, 2009, 31(4): 302-304.
- 13 Tang B, Bottinger EP, Jakowlew SB, et al. Transforming growth factor-beta 1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med*, 1998, 4(7): 802-807.
- 14 Wang KS, Hu ZL, Li JH, et al. Enhancement of metastatic and invasive capacity of gastric cancer cells by transforming growth factor- $\beta_1$ . *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, 38(3): 179-186.

(收稿日期: 2012-01-19)

(本文编辑: 孙荣华)

张利. 幽门螺杆菌感染的胃癌患者转化生长因子  $\beta_1$  的表达[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2012, 6(6): 590-593.