

· 临床研究 ·

转化生长因子 β_1 在肝细胞癌的表达^①

刘超^② 区庆嘉 陈双

(中山医科大学孙逸仙纪念医院外科; 广州, 510120)

摘要 用 LSAB法对 12例肝细胞癌病人手术切除标本进行转化生长因子 β_1 (TGF β_1)免疫染色,经计算机图象分析系统分析,发现肝癌组织的 TGF β_1 表达明显低于癌旁肝组织,阳性染色面积(相对数),肝癌与癌旁肝组织分别为 $(9.96 \pm 10.7)\%$ 和 $(56.6 \pm 26.62)\%$ ($P < 0.01$)。此外,外周血 TGF β_1 水平测定 (SELISA法)发现,健康志愿者组和肝硬化病人组外周血 TGF β_1 水平明显高于肝癌病人(未治疗组),3组分别为 $(182.92 \pm 90.45)\mu\text{g/L}$, $(119.53 \pm 87.73)\mu\text{g/L}$ 和 $(62.37 \pm 51.52)\mu\text{g/L}$ ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);本研究提示肝癌细胞 TGF β_1 表达降低可能与其细胞的转化和生长失控有关,也是其生物学特征之一。

关键词 转化生长因子 β_1 ; 癌,肝细胞 病理学; 肝肿瘤 病理学

中图分类号 R 735.7

转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,简称 TGF β)是一多肽大家族,现已发现有 5种类型 (TGF β_{1-5}),人类主要是以 TGF β_1 形式存在。研究发现 TGF β_1 是具有多种功能的细胞因子,作用于体内的多种器官和组织,可抑制上皮细胞生长,促进其分化成熟和凋亡;启动和促进细胞外基质合成;抑制和下调机体免疫反应等^[1]。特别是近来有关肿瘤研究发现,TGF β_1 在许多上皮性肿瘤的发生发展过程中具有重要的意义。为此,本实验采用免疫组化染色和夹心酶联免疫吸附测定(简称 SELISA)测定肝癌组织 TGF β_1 蛋白质表达和肝癌病人外周血浆 TGF β_1 浓度,旨在探讨 TGF β_1 在肝癌发生发展中的作用及其与肝癌生物学特性的关系。

1 临床资料和方法

1.1 病例分组

本资料来源于我院 1995年 3月~ 11月外科住院病人和健康志愿者 51例,按疾病分为肝癌组、肝炎后肝硬化组和正常对照组。肝癌组 27例,均经病理证实为肝细胞癌,其中男 21例,女 6例,平均年龄为 49岁,有 23人 HBs Ag 阳性;肝炎后肝硬化组 14组,其中男 11例,女 3例,平均年龄为 46岁,全部病

人 HBs Ag 阳性,肝炎病史 6年以上;正常对照组为健康志愿者 10例,其中男 6例,女 4例,平均年龄 40岁。

1.2 肝癌组织 TGF β_1 免疫组化染色 (LSAB法^[2])

用肝癌病人手术切除 (12例)标本,取肿瘤交界处组织,连续切成 $4\mu\text{m}$ 厚切片。TGF β_1 单抗购自中国科学院上海细胞生物研究所,型号为 TB21^[3],工作浓度为 1:400,DAB显色,Mayer苏木素复染。

1.2.1 TGF β_1 阳性细胞数计算 以显微镜测微尺 10×10 方格表,每一切片随机选择 5个视野,每一表计算 5个小方格的细胞数。阳性细胞浆内有棕色颗粒。阳性细胞百分比 = 阳性细胞数 / (5个小方格细胞数 $\times 20$) $\times 100\%$,计算 5个视野百分率的平均数。

1.2.2 TGF β_1 阳性细胞面积的计算 以计算机图像分析系统 (ECIPS-95),每一切片随机选择 5个视野,自动计算每一视野阳性染色所占视野的面积百分比,取 5个视野面积百分比的平均值。

1.3 血浆 TGF β_1 浓度测定 (SELISA法^[4])

空腹抽取外周血,EDTA_{Na}抗凝,高速离心去除血小板。TGF β_1 单抗同上。用不同浓度的人血小板提取的 TGF β_1 作为标准品,测定其吸光度 (A),制作标准曲线。再根据标准曲线计算样品的 TGF β_1 浓度。肝癌病人还在治疗后 (肝癌切除或肝动脉栓塞

① 孙逸仙纪念医院科研基金资助课题; ② 第一作者,1967年生,男,博士生

术后 5 d)进行了测定,以观察治疗对其的影响。

1.4 统计分析

两组均数的比较采用 t 检验,方差不齐时采用近似法;4组均数的比较采用 F 检验,方差不齐时将数据转换(按对数转换);4组均数的两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 两组 TGF β_1 蛋白表达

肝细胞表达的 TGF β_1 蛋白位于胞浆,经染色后呈棕色。显微镜下见肝癌组织和癌旁肝组织均有阳性细胞,但肝癌组织中的阳性细胞数和面积明显低于癌旁肝组织。

2.1.1 两组 TGF β_1 阳性细胞率的比较 肝癌组 TGF β_1 阳性细胞率平均占 (2.42 \pm 5.39)%,癌旁肝组织为 (34.48 \pm 28.68)%,癌旁肝组织 TGF β_1 阳性细胞率明显高于肝癌组织 ($P < 0.01$,表 1)。

表 1 两组 TGF β_1 阳性细胞率比较^{1),2)}

分组	n	($\bar{x} \pm s$)%
肝癌组织	12	2.42 \pm 5.39
癌旁肝组织	12	34.48 \pm 28.68

1)方差齐性检验, $F = 28.12$, $P < 0.01$,方差不齐,用近似 t 值计算; 2) $t = 3.81$, $P < 0.01$

2.1.2 两组 TGF β_1 阳性面积(百分数)比较 肝癌组织 TGF β_1 阳性面积平均占 (9.96 \pm 10.7)%,癌旁肝组织占 (56.60 \pm 26.62)%,癌旁肝组织高于肝癌组织,差别有显著性 ($P < 0.01$,表 2)。

表 2 两组 TGF β_1 阳性面积(百分数)比较^{1),2)}

分组	n	($\bar{x} \pm s$)%
肝癌组织	12	9.96 \pm 10.70
癌旁肝组织	12	56.60 \pm 26.62

1)方差齐性检验, $F = 6.01$, $P < 0.01$,方差不齐,用近似 t 值计算; 2) $t = 5.63$, $P < 0.01$

2.2 各组血浆 TGF β_1 浓度

表 3 显示 4 组外周血血浆 TGF β_1 浓度,其中正常组数值 > 肝硬变组 > 肝癌组(治疗前)。正常组与肝癌组、肝硬变组与肝癌组差别有显著性;正常组与肝硬变组差别无显著性。肝癌组治疗后数值大大高于治疗前,差别有显著性。

表 3 各组间外周血浆 TGF β_1 浓度比较^{1),2)}

分组	n	($\bar{x} \pm s$) μ g/L
1 正常	10	182.92 \pm 90.45
2 肝硬化 肝癌	14	119.53 \pm 87.73
3 治疗前	15	62.37 \pm 51.52
4 治疗后	15	519.87 \pm 310.2

1)方差齐性检验, $i^2 = 42.7$, $P < 0.01$;方差不齐,数据经对数转换, $i^2 = 7.81$, $P > 0.05$;方差齐: $F = 7.43$, $P < 0.01$; 2)1 $^{\circ}$: 3, $q = 6.22$, $P < 0.01$; 1 $^{\circ}$: 2, $q = 2.69$, $P > 0.05$; 2 $^{\circ}$: 3, $q = 3.53$, $P < 0.05$; 3 $^{\circ}$: 4, $q = 10.83$, $P < 0.01$

3 讨论

对肝细胞而言, TGF β_1 是其生长的主要负性调节因子,可抑制肝细胞的增殖和促进其分化成熟。在肝大部切除肝再生晚期,再生肝组织 TGF β_1 表达增加,通过旁分泌生长抑制作用使肝细胞再生停止^[5]。目前国内外研究已证实, TGF β_1 对多种人肝癌细胞株生长增殖有抑制作用,如 BEL-7402 和 Hep3B 细胞株,同时还对表皮生长因子促进上述癌细胞的生长效应产生拮抗作用。本实验研究发现肝癌组织 TGF β_1 蛋白质表达水平显著低于癌旁肝组织,肝癌病人血浆 TGF β_1 水平较正常人明显低下。这表明,可能在肝细胞癌变或发展过程中 TGF β_1 表达减少,使其分化障碍,负性生长调控作用受抑制和凋亡受阻,出现生长失控现象。

国外学者 Ito^[6](1991)和 Bedossa^[7](1995)分别报道了有关人肝癌组织 TGF β_1 蛋白质表达的研究。其结果与本实验相反,他们发现肝癌组织中 TGF β_1 表达比癌旁肝组织要高;同样, Shirai 等^[8](1994)的研究也表明肝癌病人外周血浆 TGF β_1 浓度高于正常人。本实验作者经反复验证,排除了方法学问题后,认为造成这种相反结果可能有以下 2 种因素。其一与标本采集的时机有关,本实验发现在治疗前与治疗采集标本其结果有很大的差异,治疗后病人外周血浆 TGF β_1 水平会大大提高(差别有显著性,表 3),这可能与与肝组织的损伤、炎症反应和再生调节有关。而 Shirai 等^[8]的报告中未交待其检测时机。其二可能因为中国肝癌与西方肝癌生物学特性存在差别。本实验肝癌病人 83% 以上有乙型肝炎感染的背景,而 Ito 组 6 例肝癌病人 HBsAg 均

为阴性; Bedossa组 25例肝癌病人有 7例合并病毒性肝炎; Shirai组 49例肝癌病人中仅 3例检出 HBsAg。本实验中肝硬变组病人血浆 TGF β_1 水平低于正常对照, 因此提示乙型肝炎的感染将影响 TGF β_1 的表达。这可能也是中国肝细胞癌有别于西方肝癌的生物学特性之一。

参 考 文 献

- 1 Sporn M B, Roberts AB, Wakefield LM, *et al.* Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*, 1987, 195: 1039
- 2 梁英杰, 凌启波. 一种快速高敏感的免疫组织化学染色法——LSAB法. *中华病理学杂志*, 1993, 22(6): 369
- 3 施渭康, 叶庆炜, 包林平. 转化生长因子 β_1 单克隆抗体 TB21的生物学特性. *实验生物学报*, 1993, 26(2): 141
- 4 Danielpour D. Improved sandwich enzyme-linked immunosorbent assays for transforming growth factor β_1 . *J Immunol Methods*, 1993, 158: 17
- 5 Braun L, Mead JE, Panzica M, *et al.* Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1539
- 6 Ito N, Kawata S, Tamura S, *et al.* Elevated levels of transforming growth factor β messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 1991, 51: 4080
- 7 Bedossa P, Peltier E, Terris B, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 (TGF β_1) and TGF β_1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology*, 1995, 21: 760
- 8 Shirai Y, Kawata S, Tamura S, *et al.* Plasma transforming growth factor β_1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1994, 73: 2275

(1996-09-05收稿 1996-12-18修回)

THE EXPRESSION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR β_1 IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Liu Chao Ou Qingjia Chen Shuang

(Department of Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Transforming growth factor β_1 (TGF β_1) is an important mediator of control of liver cell proliferation and differentiation. The aim of the current study was to compare TGF β_1 expression in neoplastic human livers and normal liver beside neoplasm. Twelve resections for hepatocellular carcinoma were included in this study. TGF β_1 protein were detected on serial tissue sections using immunohistochemistry. The results were analysed by computerized image analysis system. In liver beside neoplasm, TGF β_1 was significantly expressed. The amount of positive area was respectively (9.96 \pm 10.7)% and (56.6 \pm 26.62)% ($P < 0.01$). Plasma TGF β_1 levels in patients with HCC ($n = 15$) were compared with those in patients with viral hepatitis cirrhosis ($n = 14$) and in normal subjects ($n = 10$) using an enzyme-linked immunosorbent assay system. Normal subjects and the patients with cirrhosis had significantly higher plasma TGF β_1 levels [(182.92 \pm 90.45) μ g/L and (119.53 \pm 87.73) μ g/L] than those in patients with HCC [(62.37 \pm 51.52) μ g/L] ($P < 0.01$). This study suggest that the decrease expression of TGF β_1 by tumoral hepatocytes might be related to its transformation and unlimited proliferation.

Subject headings transforming growth factor beta; carcinoma, hepatocellular/pathology; liver neoplasms/pathology