

文章编号:1005-6947(2005)06-0460-03

· 简要论著 ·

TGF β R II 和 Smad4 在血管瘤组织中的表达

熊建明, 黄建华, 刘光强, 汤恢煊, 樊孝文, 曾剑

(中南大学湘雅医院 血管外科, 湖南 长沙 410008)

摘要: 笔者采用免疫组织化学方法检测血管瘤和毛细血管畸形组织中 TGF β R II 和 Smad4 的表达, 以探讨血管瘤组织中两者的关系及其在血管瘤增生退化过程中可能的作用。结果显示 TGF β R II 和 Smad4 在增生期血管瘤组织中呈低~中度表达, 退化期血管瘤组织中均呈中~高度表达, 而在血管瘤畸形组织中低表达或无表达。提示 TGF β 信号通过 Smad4 依赖型信号转导通路在退化期血管瘤中发挥作用, 可抑制血管增生和促进内皮细胞凋亡。

关键词: 血管瘤/病理学; 转化生长因子 β ; Smad4 蛋白

中图分类号: R732.2; R977.1 **文献标识码:** B

转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF β) 是一种具有多功能活性的细胞因子, 在调节细胞生长、分化、凋亡和间质的合成等方面起重要作用。TGF β 通过与其细胞膜上受体 (TGF β R I, TGF β R II 等) 结合和通过细胞浆内 Smads 蛋白将细胞外信号转导入胞核内。其中 Smad4 蛋白是 TGF β 信号转导的关键蛋白。文献^[1] 报告 Smad4 基因可抑制血管生成。本研究应用免疫组织化学方法检测血管瘤和毛细血管畸形组织中 TGF β R II 和 Smad4 的表达, 以探讨其在血管瘤组织中两者的关系及其在血管瘤增生退化过程中可能的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源及其一般资料

标本选自本院 2000 年 4 月~2004 年 4 月有完整病历资料的血管瘤和毛细血管畸形的 20 例患者。其中血管瘤 14 例, 男 6 例, 女 8 例, 年龄 2 个月至 8 岁; 毛细血管畸形 (为正常血管内皮细胞, 用于对照) 6 例, 男 3 例, 女 3 例, 年龄 76d 至 3 岁。每一标本 HE 染色后根据血管瘤组织结构进行病理分期^[2]: 血管瘤组织内 20% 以上部位有纤维变性或脂肪浸润或有血管腔闭塞者为消退期血管瘤, 本组 6 例; 无上述组织结构改变者为增生期血管瘤, 本组 8 例。

1.2 试剂和仪器

兔抗人 TGF β R II (0.1 mL, 分装) 和 Smad4 (0.1 mL, 分装) 多克隆抗体、SABC 试剂盒和 DAB 均购自武汉博士德生物制剂有限公司。另备有实验用 YWY781 型医用微波炉 (浙江省医疗器械有限公司) 及 420 型恒温水浴箱 (姜堰市新康医疗器械有限公司) 等。

1.3 方法

采用免疫组化 SABC 法。常规脱蜡至水, 滴加 3% 过氧化氢溶液 20 mL 抑制内源性过氧化物酶; PBS 冲洗, 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 (pH6.0) 微波炉热修复抗原; PBS 冲洗, 抗原修复液 I 进一步暴露抗原 10 min; PBS 冲洗, 5% BSA 封闭液封闭非特异性抗原 20 min, 倾去后滴加一抗 (浓度 1:50), 37 $^{\circ}$ C 湿盒内水浴 90 min; PBS 冲洗, 滴加二抗, 37 $^{\circ}$ C 湿盒内水浴 20 min; PBS 洗 2 min 3 次, 滴加 SABC, 37 $^{\circ}$ C 湿盒内水浴 20 min; PBS 洗 5 min 3 次, DAB 显色液显色; 自来水冲洗, 苏木素复染 1 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片观察。PBS 液代替一抗作阴性对照, 随试剂附送阳性标本作阳性对照。

1.4 结果判断

血管内皮细胞染成棕黄色为阳性细胞。TGF β R II 阳性反应定位于内皮细胞胞膜和胞浆上, Smad4 阳性反应定位于内皮细胞胞浆, 为棕黄色颗粒。依据 1996 年 5 月北京举办的“全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会”标准^[3], 按阳性细胞所占的比例数进行分级: < 25% 为 (-), 25% ~

收稿日期:2004-11-10; 修订日期:2005-03-07。

作者简介:熊建明 (1972-), 男, 湖南桃江人, 中南大学湘雅医院主治医师, 主要从事血管、肝胆方面的研究。

收稿日期:熊建明 电话: E-mail: xiangfeng_112@163.com。

50% 为 (+), 51% ~ 75% 为 (++) , > 75% 为 (+++)。

2 结果

TGFβR II 和 Smad 4 在增生期血管瘤组织中呈低~中度表达,退化期血管瘤组织中均呈中~高度表达,而在血管畸形组织中低表达或无表达

2.1 TGFβR II 的表达

TGFβR II 的阳性表达率在血管瘤明显高于毛细

血管畸形 ($P < 0.01$) (表 1); 表达的平均阳性细胞在增生期血管瘤明显低于退化期血管瘤 ($P < 0.01$) (表 2)。

表 1 TGFβR II 在血管瘤和毛细血管畸形组织上的表达

组别	n	TGFβR II 表达例数				阳性率 (%)	P
		(-)	(+)	(++)	(+++)		
血管瘤	14	1	3	6	4	92.86	<0.01
毛细血管畸形	6	5	1	0	0	16.67	

注:用 Fisher 确切概括率法检验两者差异的显著性

表 2 TGFβR II 在增生期血管瘤和退化期血管瘤上的表达

组别	n	阳性细胞率 (%)								$(\bar{x} \pm s) \%$	t	P
		10	30	40	55	55	60	70	70			
增生期血管瘤	8	10	30	40	55	55	60	70	43.75 ± 0.198	3.889	<0.01	
退化期血管瘤	6	60	70	80	90	95	85	80.00 ± 0.130				

2.2 Smad4 的表达

Smad4 的阳性表达率在血管瘤明显高于毛细血管畸形 ($P < 0.01$) (表 3); 表达的平均阳性细胞率在增生血管瘤明显低于退化性血管瘤 ($P < 0.01$) (表 4)。

表 3 Smad 4 在血管瘤和毛细血管畸形上的表达

组别	n	Smad4 表达例数				阳性率 (%)	P
		(-)	(+)	(++)	(+++)		
血管瘤	14	2	4	5	3	85.71	<0.01
毛细血管畸形	6	5	1	0	0	16.67	

表 4 Smad4 在增生期血管瘤和退化期血管瘤上的表达

组别	n	阳性细胞率 (%)								$(\bar{x} \pm s) \%$	t	P
		10	15	30	40	45	45	60	65			
增生期血管瘤	8	10	15	30	40	45	45	60	65	38.75 ± 0.196	3.659	<0.01
退化期血管瘤	6	60	55	70	80	90	85	73.33 ± 0.140				

3 讨论

血管瘤是婴幼儿常见的良性肿瘤。临床上大致分为三期^[4]:增殖期 (proliferating phase), 为 0 ~ 1 岁阶段, 该期病变生长迅速; 退化进展期 (involuting phase), 1 ~ 5 岁阶段, 部分病变进入自发消退阶段; 退化完成期 (involved phase), 5 ~ 12 岁, 残留病灶缓慢地消退、消失。血管瘤是一种以内皮细胞增生为特征的肿瘤。而血管畸形不是新生物, 其病程中内皮细胞的增生是正常的, 它是血管形态发生的错误, 表现为各种管腔的异常, 通常在出生时已存在, 增长速度和身体的发育成比例, 不会自行消退。基于此, 故选用毛细血管畸形作为本试验的对照。

TGFβ 在细胞表面有 TGFβ I 和 II 型受体。在 TGFβ 的刺激下, II 型受体激酶先磷酸化, 尔后结合 I 型受体, 使 I 型受体的激酶活化。活化的 I 型受体磷酸化, 然后激活细胞内信号传导介质 Smads (包括 Smad1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), Smads 将 TGFβ 的信号传递到核内^[5]。其中 Smad 4 在 TGFβ 信号传导途径中处于中心地位^[6]。在体内血管生成过程中 TGFβ1 可抑制内皮细胞的增殖和迁移。Chang 等^[7]发现, 消退期血管瘤比增殖期血管瘤的 TGFβ1 mRNA 表达略高。袁新初等^[8]报道 46 例小儿皮肤血管瘤在退化期血管瘤组织中 TGFβ1 表达率明显高于增殖期。目前认为 TGFβ1 在血管瘤中的作用可能主要是促进血管瘤的消退。本研究的结果显示 TGFβR II 和 Smad 4 在增生期血管瘤组织中呈低

~ 中度表达,退化期血管瘤组织中 TGF β R II 和 Smad 4 均呈中~高度表达,而在血管畸形组织中低表达或无表达。提示两者与血管瘤的增生退化有关。结合文献推测其可能的机制为:TGF β 信号通过 Smad4 依赖型信号转导通路在退化期血管瘤中发挥作用,可抑制血管增生和促进内皮细胞的调亡。但 Dai 等^[6] 证明存在有不依赖于 Smad 4 的 TGF β 信号通路,如 ras 通路。

Smad 4 基因可能的下游目的基因包括血管内皮生长因子(VEGF),TSP-1 等^[9,10]。罗庚求等报道^[11] Smad4 基因能够降低 VEGF 的表达和微血管密度。Schwarte-Waldhoff 等报道^[12] Smad4 能抑制血管的生成,降低 VEGF 的表达,增加 TSP-1 的表达,减少血管密度,上述作用与 TGF β 通路无关。

参考文献:

[1] Schwarte Waldhoff I, Schmiegel W. Smad4 transcriptional pathways and angiogenesis [J]. *Int J Gastrointest Cancer*, 2002, 31(1):47-59.

[2] 高解春,金百祥. 小儿血管瘤的组织结构观察及其演变规律探讨[J]. *中华小儿外科杂志*, 1991, 12(4): 193.

[3] 中华病理学杂志编辑委员会. 《全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会》会议纪要[J]. *中华病理学杂志*, 1996, 25(2):326-329.

[4] Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HPW, *et al.* Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy

and childhood [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(6):2357-2364.

- [5] Padgett RW, Cho SH, Evangelista C. Smads are central component in transforming growth factor - β signaling [J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 78(1):47.
- [6] Dai JL, Schute M, Bansal RK, *et al.* Transforming growth factor - beta responsiveness in DPC4/SMAD4 null cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 1999, 26(1):37-43.
- [7] Chang J, Most D, Bresnick B, *et al.* Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 103(1):1-9.
- [8] 袁新初,周乾毅. 转化生长因子 β 1 在毛细血管瘤组织中的表达[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2002, 23(3):213-214.
- [9] 黄忠诚,扬竹林,李永国,等. 胰腺癌组织 Smad4 mRNA, TGF β 1 和 TGF β R1 的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(10):609-661.
- [10] 唐朝晖,邹声泉. 抑癌基因 DPC4/SMAD4 的缺失表达与胰腺肿瘤的关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3):168-170.
- [11] 罗庚求,李景和,文继舫,等. DPC4 基因转染对结肠癌血管生成的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(3):580-584.
- [12] Schwarte - Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, *et al.* Smad4/DPC4 - mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(9):9624-9629.

关于征求论文获奖证书的启示

刊出论文获奖情况是检验期刊质量的一项重要指标,也是对作者及编者工作的肯定。《中国普通外科杂志》在广大作者、读者的支持下,近年来得到了长足的发展和进步,据有关权威机构统计分析其影响因子已居同类期刊前列。为了进一步提高办刊质量,收集各方面反馈信息,编辑部敬请在本刊已发表论文并获得各种奖励者将获奖证书及相关资料复印件寄本刊编辑部。凡寄回获奖证明者可优先发表论文,谢谢合作。