



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.012
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(2):225-230.

· 基础研究 ·

多功能蛋白聚糖 Versican 与 TNF- α 在胆囊癌组织的表达及意义

李福利¹, 方征², 夏咸军², 刘洪², 赵海滨^{2,3}, 罗昆仑^{1,2}

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 中国人民解放军第一〇一医院 2. 肝胆外科 3. 病理科, 江苏 无锡 214044)

摘要

目的: 探讨多功能蛋白聚糖 Versican 与 TNF- α 在胆囊癌组织中的表达及意义。

方法: 应用免疫组化方法检测并比较 Versican 与 TNF- α 在 62 例胆囊癌组织 (肿瘤组)、30 例胆囊结石伴慢性炎症的胆囊组织 (炎症组)、20 例正常胆囊组织 (正常组) 中的表达, 分析两者与胆囊癌患者临床病理特征及预后的关系。

结果: Versican 与 TNF- α 在正常组、炎症组、肿瘤组中阳性表达率均呈依次逐渐增高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); Versican 与 TNF- α 在胆囊癌组织中的表达呈正相关 ($r = 0.501$, $P < 0.05$)。Versican 与 TNF- α 的表达均与患者 TNM 分期、淋巴结转移有关, 且 Versican 还与胆囊癌分化程度有关 (均 $P < 0.05$)。生存分析显示, Versican 与 TNF- α 阳性表达患者生存率均明显低于各自阴性患者 ($\chi^2 = 5.240, 5.493$, 均 $P < 0.05$), 但两者均阳性患者的生存率与两者单一阳性的患者差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

结论: Versican 与 TNF- α 可能在胆囊癌的发生发展过程中起重要作用, 且 Versican 与 TNF- α 的阳性表达为胆囊癌的不良预后因素。

关键词

胆囊肿瘤; 多功能蛋白聚糖类; 肿瘤坏死因子 α ; 预后
中图分类号: R735.8

Expressions of Versican and TNF- α in gallbladder carcinoma tissue and their significance

LI Fuli¹, FANG Zheng², XIA Xianjun², LIU Hong², ZHAO Haibin^{2,3}, LUO Kunlun^{1,2}

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery 3. Department of Pathology, the 101th Hospital of PLA, Wuxi, Jiangsu 214044, China)

Abstract

Objective: To investigate the expressions of Versican and TNF- α in gallbladder carcinoma and their significance.

Methods: The expressions of Versican and TNF- α in specimens of 62 gallbladder carcinoma tissues (tumor group), 30 gallbladder tissues with gallstones and chronic inflammation (inflammation group) and 20 normal gallbladder tissues (normal group) were detected by immunohistochemical staining and compared, and the relations of their expressions with clinicopathologic variables and prognosis of gallbladder carcinoma patients were analyzed.

基金项目: 南京军区医学科技创新课题资助项目 (14ZD05)。

收稿日期: 2015-07-30; **修订日期:** 2016-01-19。

作者简介: 李福利, 江苏大学医学院硕士研究生, 主要从事肝胆外科方面的研究。

通信作者: 罗昆仑, Email: lkl197041@163.com

Results: Both positive expression rates of Versican and TNF- α presented an ascending order in normal group, inflammation group and tumor group, with statistical difference (all $P < 0.05$); there was a positive correlation between the Versican and TNF- α expression in gallbladder carcinoma tissue ($r = 0.501$, $P < 0.05$). Either Versican or TNF- α expression was significantly related to lymph node metastasis and TNM stage of the patients, and the Versican expression was also related to the degree of differentiation of gallbladder carcinoma (all $P < 0.05$). Survival analysis showed that the survival rate in patients with positive Versican or TNF- α expression was significantly lower than that in their negative counterparts ($\chi^2 = 5.240, 5.493$, both $P < 0.05$), but the survival rate in patients with positive expressions of both Versican and TNF- α had no statistical difference compared with those with the positive expression of either of them alone (both $P > 0.05$).

Conclusion: Versican and TNF- α may probably play an important role in the process of occurrence and development of gallbladder carcinoma, and the positive expression of Versican and TNF- α may predict a poor prognosis.

Key words Gallbladder Neoplasms; Versicans; Tumor Necrosis Factor α ; Prognosis

CLC number: R735.8

胆囊癌是胆道系统最常见且恶性度最高的恶性肿瘤之一，其起病隐匿，早期诊断困难，治疗效果差，预后不佳，严重威胁患者生命健康^[1]。目前，分子生物学研究成为探寻胆囊癌治疗方法的热点^[2-3]。许多研究证明多功能蛋白聚糖（Versican）与肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）过度表达于多种恶性肿瘤，且与它们的发生、发展、转移及预后密切相关^[4-8]，本研究通过检测Versican与TNF- α 在胆囊癌组织的表达，探讨它们在胆囊癌的发生、发展、转移及预后中可能发挥的作用及意义。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取我院病理科2009年1月—2015年1月保存的胆囊癌组织标本62例，其中男19例，女43例；术前均未接受放化疗且有完整的病例资料；根据AJCC（2010）版TNM分期标准：I期4例，II期7例，III期28例，IV期23例；无淋巴结转移患者26例，有淋巴结转移患者36例；肿瘤分化程度高分化11例，中分化22例，低分化29例；根据组织学类型分类：腺癌56例，腺鳞癌6例。同时选取我院同期收治的30例胆囊结石伴慢性胆囊炎和20例因严重肝外伤切除的正常胆囊标本作为对照组。

1.2 试剂

Versican兔单克隆抗体与TNF- α 兔多克隆抗体均购自Abcam公司，其他试剂及设备均由我院病理科提供。

1.3 方法

切取石蜡切片，每张切片厚约4 μm ，应用免疫组化SP法检测Versican与TNF- α （工作浓度均为1:100）的表达。以试剂公司提供的阳性标本作阳性对照，以PBS代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

Versican的表达参照Kim等^[9]评分标准，根据间质阳性细胞百分比0%、1%~10%、11%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~90%、>90%分别定为0、1、2、3、4、5、6分，根据染色强度定为：无着色0分、浅黄色1分、棕黄色2分、棕褐色3分，两项相乘0~8分为阴性（-），9~18分为阳性（+）；TNF- α 的表达参照Simons等^[10]的评分标准，根据阳性细胞百分比<1%、1%~30%、31%~75%、>75%分别定为0、1、2、3分，根据染色强度定为：无着色0分、浅黄色1分、棕黄色2分、棕褐色3分，两项相乘0~4分为阴性（-），5~9分为阳性（+）。

1.5 统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件分析，计数资料采用 χ^2 检验，生存分析采用Kaplan-Meier法，相关分析采用Spearman等级相关分析。检验标准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Versican、TNF- α 在各组中的表达分析

Versican主要表达于胆囊上皮细胞周围间质纤维母细胞胞质（图1）。肿瘤组与炎

症组比较 ($\chi^2=5.609$), 肿瘤组与正常组比较 ($\chi^2=20.292$), 炎症组与正常组比较 ($\chi^2=4.975$), 差异均具有统计学意义 (均 $P<0.05$), Versican在正常组、炎症组、肿瘤组中的阳性表达率逐渐增高 (表1); TNF- α 主要表达于胆囊上皮细胞胞质中 (图2), 肿

瘤组与炎症组比较 ($\chi^2=5.902$), 肿瘤组与正常组比较 ($\chi^2=20.657$), 炎症组与正常组比较 ($\chi^2=5.362$), 差异均具有统计学意义 (均 $P<0.05$), TNF- α 在正常组、炎症组、肿瘤组中的阳性表达率逐渐增高 (表1)。

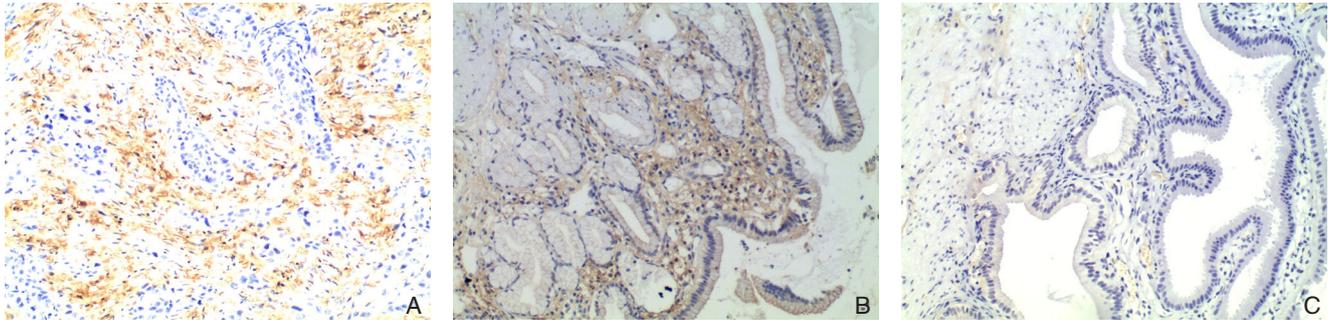


图1 免疫组化检测 Versican 表达 ($\times 200$) A: 肿瘤组; B: 炎症组; C: 正常组

Figure 1 Immunohistochemical staining for Versican expression ($\times 200$) A: Tumor group; B: Inflammation group; C: Normal group

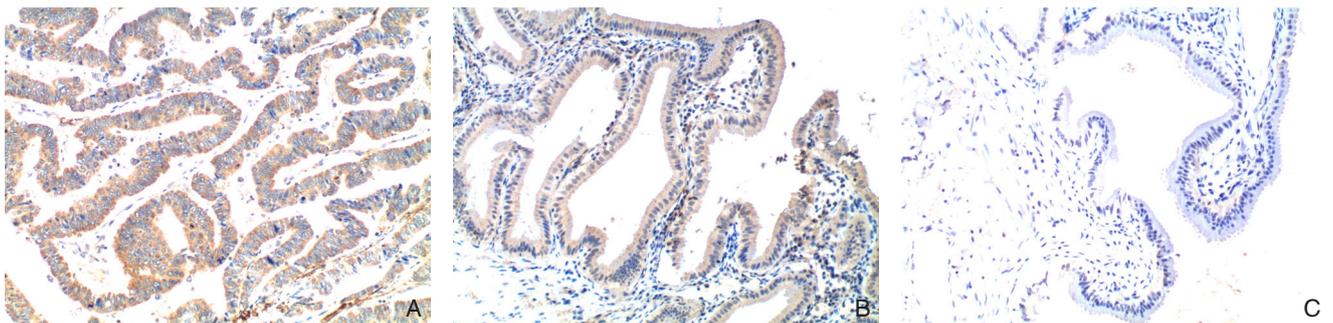


图2 免疫组化检测 TNF- α 表达 ($\times 200$) A: 肿瘤组; B: 炎症组; C: 正常组

Figure 2 Immunohistochemical staining for TNF- α expression ($\times 200$) A: Tumor group; B: Inflammation group; C: Normal group

表1 各组 Versican 与 TNF- α 表达的比较 [n (%)]

Table 1 Comparison of the expressions of Versican and TNF- α among groups [n (%)]

组别	n	Versican 表达		TNF- α 表达	
		阳性	阴性	阳性	阴性
肿瘤组	62	39 (62.9)	23 (37.1)	45 (72.6)	17 (27.4)
炎症组	30	11 (36.7)	19 (63.3)	14 (46.7)	16 (53.3)
正常组	20	1 (5.0)	19 (95.0)	3 (15.0)	17 (85.0)

2.2 胆囊癌组织 Versican 与 TNF- α 表达的相关性

相关性统计分析结果显示, Versican 与 TNF- α 在62例胆囊癌中的表达呈正相关 ($r=0.501, P<0.05$) (表2)。

2.3 Versican、TNF- α 与胆囊癌临床病理特征的关系

分析结果显示, Versican表达与患者的性

别、年龄、组织类型无关 (均 $P>0.05$), 而与癌组织的分化程度、淋巴结转移、TNM分期有关 (均 $P<0.05$), 胆囊癌分化程度越低、临床分期越晚、有淋巴结转移时 Versican 阳性率越高; TNF- α 表达与患者的性别、年龄、组织类型、分化程度无关 (均 $P>0.05$), 而与癌组织淋巴结转移、TNM分期有关 (均 $P<0.05$), 胆囊癌临床分期越晚, 有淋巴结转移时 TNF- α 阳性率越高 (表3)。

表2 Versican 与 TNF- α 在胆囊癌表达的相关性分析关系
Table 2 Correlation analysis between Versican and TNF- α expressions in gallbladder carcinoma tissue

Versican	TNF- α		总计	r	P
	阳性	阴性			
阳性	35	4	39	0.501	<0.05
阴性	10	13	23		

表 3 Versican、TNF- α 与胆囊癌临床病理特征的关系 [n (%)]Table 3 Relations of Versican and TNF- α expressions with the clinicopathologic variables in gallbladder carcinoma patients [n (%)]

临床病理特征	n	Versican		P	TNF- α		P
		阳性	阴性		阳性	阴性	
年龄 (岁)							
< 60	21	14 (66.7)	7 (33.3)	0.661	16 (76.2)	5 (23.8)	0.648
\geq 60	41	25 (61.0)	16 (39.0)		29 (70.7)	12 (29.3)	
性别							
男	19	10 (52.6)	9 (47.4)	0.266	15 (78.9)	4 (21.1)	0.455
女	43	29 (67.4)	14 (32.6)		30 (69.8)	13 (30.0)	
组织类型							
腺癌	56	34 (60.7)	22 (39.3)	0.519	39 (69.6)	17 (30.4)	0.270
腺鳞癌	6	5 (83.3)	1 (16.7)		6 (100.0)	0 (0.0)	
病理分级							
高分化	11	4 (36.4)	7 (63.6)	0.007	6 (54.5)	5 (45.5)	0.068
中分化	22	11 (50.0)	11 (50.0)		14 (63.6)	8 (36.4)	
低分化	29	24 (82.8)	5 (17.2)		25 (86.2)	4 (13.8)	
淋巴结转移							
有	36	27 (75.0)	9 (25.0)	0.020	30 (83.3)	6 (16.7)	0.026
无	26	12 (46.2)	14 (53.8)		15 (57.7)	11 (42.3)	
TNM 分期							
I	4	1 (25.0)	3 (75.0)	0.036	1 (25.0)	3 (75.0)	0.024
II	7	2 (28.6)	5 (71.4)		3 (42.9)	4 (57.1)	
III	28	18 (64.3)	10 (35.7)		23 (82.1)	5 (17.9)	
IV	23	18 (78.3)	5 (21.7)		18 (78.3)	5 (21.7)	

2.4 Versican 与 TNF- α 对胆囊癌患者生存预后的关系

采用电话、信件方式随访胆囊癌患者术后生存情况, 随访时间1~43个月, 其中56例死亡, 6例至随访结束仍存活。生存分析结果显示: Versican 与 TNF- α 阳性组患者生存率均明显低于各自阴性组 ($\chi^2=5.240$ 、 5.493 , $P=0.022$ 、 0.019),

并且 Versican、TNF- α 均阳性组生存率明显低于 Versican、TNF- α 均阴性组 ($\chi^2=5.797$, $P=0.016$), 但 Versican、TNF- α 均阳性组与 Versican 阳性 TNF- α 阴性组比较 ($\chi^2=2.075$, $P=0.150$)、与 Versican 阴性 TNF- α 阳性组比较 ($\chi^2=2.257$, $P=0.133$) 差异均无统计学意义 (图3)。

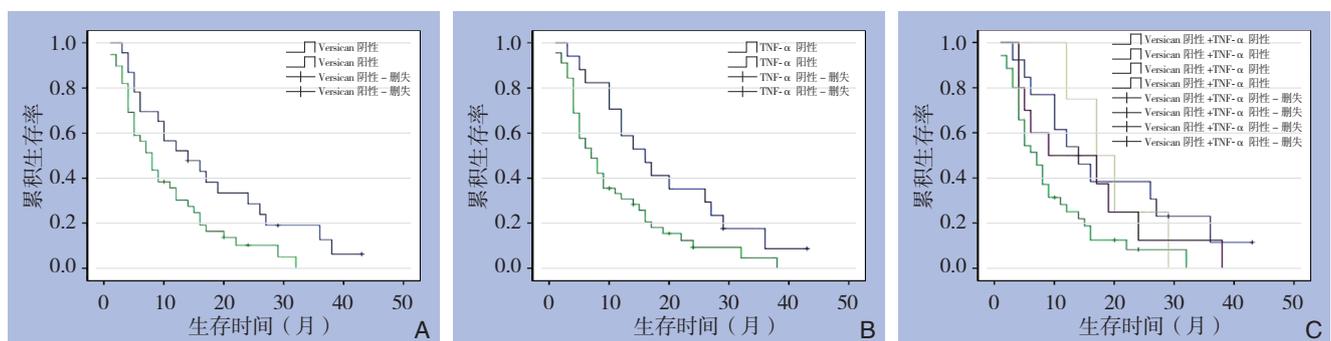


图 3 不同 Versican 与 TNF- α 表达状态胆囊癌患者的生存曲线 A: Versican 阳性与阴性表达患者; B: TNF- α 阳性与阴性表达患者; C: Versican、TNF- α 均阳性、均阴性及单一阳性患者

Figure 3 Survival curves of gallbladder carcinoma patients with different Versican and TNF- α expression statuses A: Patients with positive or negative Versican expression; B: Patients with positive or negative TNF- α expression; C: Patients with both positive and negative or either positive Versican and TNF- α expression

3 讨论

Versican是一种来自成纤维细胞的多功能蛋白聚糖,其在正常生理状态下表达量很低,但在炎症反应、创伤修复及肿瘤生长过程中表达量明显增高^[11]。大量研究^[12-15]显示Versican在细胞的增殖、迁移、黏附、分化中发挥重要作用并过度表达于多种恶性肿瘤,这与Versican的G1、G3亚基区功能密切相关:G1区能够与透明质酸(HA)、CD44等结合促进细胞的增殖与迁移能力,G3区能够与纤粘连蛋白(FN)、血管内皮生长因子(VEGF)结合促进肿瘤生长与血管形成^[16]。另外,Kunisada等^[17]在紫外线诱导大鼠皮肤癌变实验中发现Versican的过表达加剧皮肤炎症反应并与皮肤癌变密切相关,提示Versican在肿瘤癌变过程中可能发挥重要作用。本研究首次证明Versican在胆囊癌中高表达,并且其在正常组、炎症组、肿瘤组中的表达逐渐增高,提示Versican也可能参与了胆囊癌变的发生。Versican与胆囊癌临床病理特征及预后分析显示:Versican的表达与胆囊癌的分化程度、TNM分期、淋巴结转移有关,并且与患者不良预后相关,说明Versican在胆囊癌的发展、侵袭与转移过程中可能起重要作用,并可以作为预测胆囊癌患者预后的指标。

近年来研究发现TNF- α 对肿瘤具有双向作用,既能够杀伤肿瘤细胞又能够促进肿瘤细胞生长、转移^[18]。许多研究^[7-8]也显示TNF- α 在恶性肿瘤中高表达且与肿瘤的发展密切相关。另外,有研究^[19]显示慢性炎症性疾病中病灶长期炎症环境上调TNF- α 的表达,TNF- α 不仅可以刺激其他炎症因子以及趋化因子产生,而且能够激活连接炎症与肿瘤的重要调控因子NF- κ B,NF- κ B也以正反馈方式刺激TNF- α 及其他炎症因子的表达,如此形成恶性循环促使持续炎症向细胞癌变发展。本研究结果也显示TNF- α 在正常组、炎症组、肿瘤组中的表达逐渐增高,并且TNF- α 的表达与胆囊癌的TNM分期、淋巴结转移及不良预后有关,说明TNF- α 在胆囊癌的发生发展过程中也发挥重要作用。但本研究中TNF- α 与代表肿瘤恶性程度的肿瘤分化程度无关,这可能与本研究的样本量偏小有关,需更大样本量的实验研究。

Kim等^[20]研究发现Lewis肺癌细胞中存在Versican-TLR2-TNF- α 通路,Lewis肺癌细胞分泌的Versican能够通过活化TLR2进而刺激巨噬细

胞分泌TNF- α ,从而促进癌细胞的转移。本研究中,胆囊癌组织中Versican主要表达于癌细胞周围间质纤维母细胞胞质,TNF- α 主要表达于癌细胞胞质,相关性分析显示Versican与TNF- α 的表达呈正相关,两者共同促进胆囊癌的发展与转移。因此我们推测胆囊癌癌周间质纤维母细胞分泌的Versican也可能通过Versican-TLR2-TNF- α 通路方式刺激癌细胞分泌TNF- α 从而促进胆囊癌的侵袭与转移,但具体机制仍需进一步研究。

综上所述,Versican与TNF- α 与胆囊癌的发生、发展密切相关,通过对两者在胆囊癌中表达的研究,有助于进一步阐明胆囊癌的发生、发展机制。此外,本研究中,Versican与TNF- α 在胆囊癌中呈现高表达,均与患者的不良预后相关,因此,通过抑制Versican与TNF- α 的表达,阻断Versican/TNF- α 通路,改变肿瘤细胞微环境,有可能阻止胆囊癌的发展与转移,改善患者预后。本研究也为胆囊癌的靶向治疗提供了新的理论依据。

参考文献

- [1] Li Y, Zhang J, Ma H. Chronic inflammation and gallbladder cancer[J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(2):242-248.
- [2] 张华洋,孔棣,马波.胆囊癌生物学标志物研究进展[J].*中国普通外科杂志*, 2014, 23(8):1112-1116.
Zhang HY, Kong D, Ma B. Advances in biomarkers of gallbladder carcinoma[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2014, 23(8):1112-1116.
- [3] 石程剑,秦仁义,王欣,等.血管心外膜活性物质在胆囊癌中的表达及临床意义[J].*中国普通外科杂志*, 2013, 22(8):994-997.
Shi CJ, Qin RY, Wang X, et al. Expression of blood vessel epicardial substance in human gallbladder cancer and its clinical significance[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2013, 22(8):994-997.
- [4] Du WW, Fang L, Yang X, et al. The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal[J]. *Mol Cancer Res*, 2013, 11(5):443-455.
- [5] Onken J, Moeckel S, Leukel P, et al. Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas[J]. *J Neurooncol*, 2014, 120(1):73-83.
- [6] Fang L, Du WW, Yang X, et al. Versican 3'-untranslated region (3'-UTR) functions as a ceRNA in inducing the development of hepatocellular carcinoma by regulating miRNA activity[J]. *FASEB J*, 2013, 27(3): 907-919.
- [7] Michalaki V, Syrigos K, Charles P, et al. Serum levels of IL-6

- and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer[J]. Br J Cancer, 2004, 90(12):2312-2316.
- [8] 赵彬, 李红旗, 李广升, 等. 核因子- κ B 激活途径与 TNF- α 和细胞间黏附分子-1 在原发性肝细胞性肝癌中的作用探讨[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(13):44-47.
- Zhao B, Li HQ, Li GS, et al. Role of nuclear factor- κ B pathway and TNF alpha and intercellular adhesion molecule-1 in primary hepatocellular carcinoma[J]. China Journal of Modern Medicine, 2014, 24(13):44-47.
- [9] Kim NS, Lee HH, Jung CK, et al. Versican expression in tumor epithelial cells is correlated with a good prognosis in gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2014, 34(10):5613-5619.
- [10] Simons MP, Moore JM, Kemp TJ, et al. Identification of the mycobacterial subcomponents involved in the release of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand from human neutrophils[J]. Infect Immun, 2007, 75(3):1265-1271.
- [11] Wight TN, Kinsella MG, Evanko SP, et al. Versican and the regulation of cell phenotype in disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(8):2441-2451.
- [12] Desjardins M, Xie J, Gurler H, et al. Versican regulates metastasis of epithelial ovarian carcinoma cells and spheroids[J]. J Ovarian Res, 2014, 7:70. doi: 10.1186/1757-2215-7-70.
- [13] Du WW, Yang W, Yee AJ. Roles of versican in cancer biology--tumorigenesis, progression and metastasis[J]. Histol Histopathol, 2013, 28(6):701-713.
- [14] Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, et al. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer[J]. Ann Oncol, 2007, 18(2):269-274.
- [15] 杨迷玲, 王立峰, 杨金花, 等. Versican在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 中华病理学杂志, 2014, 43(7):473-477.
- Yang ML, Wang LF, Yang JH, et al. Expression of Versican and its clinical significance in gastric carcinoma[J]. Chinese Journal of Pathology, 2014, 43(7):473-477.
- [16] Wu YJ, La Pierre DP, Wu J, et al. The interaction of versican with its binding partners[J]. Cell Res, 2005, 15(7):483-494.
- [17] Kunisada M, Yogianti F, Sakumi K, et al. Increased expression of versican in the inflammatory response to UVB- and reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis[J]. Am J Pathol, 2011, 179(6):3056-3065.
- [18] Bertazza L, Mocellin S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(29):3337-3352.
- [19] Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer[J]. Nature, 2004, 431(7007):461-466.
- [20] Kim S, Takahashi H, Lin WW, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis[J]. Nature, 2009, 457(7225):102-106.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 李福利, 方征, 夏咸军, 等. 多功能蛋白聚糖 Versican与TNF- α 在胆囊癌组织的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(2):225-230. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.012

Cite this article as: Li FL, Fang Z, Xia XJ, et al. Expressions of Versican and TNF- α in gallbladder carcinoma tissue and their significance[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(2):225-230. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.02.012