

文章编号:1005-6947(2006)03-0185-05

· 实验研究 ·

肝外胆管癌组织中 PTTG 和 VEGF 的表达及相关性研究

陈鸽, 汤恢焕, 冯超

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨 PTTG 和 VEGF 蛋白在肝外胆管癌中的表达相关性及其与胆管癌发展的关系。方法 应用免疫组化技术 SABC 法检测 PTTG 和 VEGF 蛋白在 36 例胆管癌标本、30 例胆管癌旁组织和 12 例胆管良性病变中的表达。结果 胆管癌组织和癌旁组织中 PTTG 的阳性表达率分别为 72.2% (26/36) 和 63.3% (19/30), VEGF 的阳性表达率分别为 83.3% (30/36) 和 76.7% (23/30); 在胆管良性病变组织中均未检测到 PTTG 和 VEGF 的表达。上述 3 种组织之间的 PTTG 和 VEGF 蛋白表达差异均有显著性 ($P < 0.05$)。癌组织中 PTTG 和 VEGF 蛋白的表达呈正相关 ($r = 0.703$, $P < 0.001$)。PTTG 和 VEGF 蛋白表达与肿瘤转移与否关系密切, 但与患者的性别、年龄、肿瘤大小及分化无关。结论 PTTG 和 VEGF 在胆管癌中高表达, 两者表达呈正相关; 与胆管癌的转移与否关系密切。

关键词:胆管肿瘤/病理学; 胆管, 肝外/病理学; PTTG; VEGF

中图分类号: R735.8; R322.47

文献标识码: A

Study of the expression and correlation of PTTG and VEGF in human extrahepatic cholangiocarcinoma

CHEN Ling, TANG Hui-huan, FEN Chao

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation of the expressions of PTTG and VEGF proteins in extrahepatic cholangiocarcinoma, and study its role in the development of extrahepatic cholangiocarcinoma.

Methods Expression of PTTG and VEGF proteins was detected by SABC immunohistochemical technique in 36 cases of extrahepatic cholangiocarcinoma, 30 cases of adjacent histologically noncancerous bile duct tissues and 12 cases of benign bile duct lesions. **Results** The positive rates of PTTG and VEGF proteins were 72.2% (26/36) and 83.3% (30/36) respectively, in extrahepatic cholangiocarcinoma; and 63.3% (19/30) and 76.7% (23/30) in adjacent histologically noncancerous bile duct tissues. The expression of PTTG protein was significantly positively correlated with that of VEGF protein ($P < 0.05$) in cholangiocarcinoma. In contrast, no expression of PTTG and VEGF proteins was detectable in 12 cases of benign bile duct lesions ($P < 0.01$). The expression of PTTG and VEGF was closely related to metastasis of extrahepatic cholangiocarcinoma, but was not related to sex or age of the patients, tumor size or tumor differentiation. **Conclusions** There is a significant positive correlation between high expressions of PTTG and VEGF proteins in cholangiocarcinoma. The high expressions of PTTG and VEGF proteins may be related to the metastasis of extrahepatic cholangiocarcinoma.

Key words: Bile Duct Neoplasms/pathol; Bile Duct, Extraheptic/pathol; PTTG; VEGF

CLC number: R735.8; R322.47

Document code: A

基金项目:湖南省卫生厅科研基金资助项目(B2005011)。

收稿日期:2005-08-10; **修订日期:**2005-12-14。

作者简介:陈鸽,男,湖南湘潭人,中南大学湘雅医院博士研究生,主要从事胆道肿瘤方面的研究。

通讯作者:汤恢焕 电话:0731-4327021; E-mail: chendoc@126.com。

肝外胆管癌属于少见的恶性肿瘤,据统计在所有恶性肿瘤中所占比例不足2%,但其发病率有逐渐增多趋势。因其标本来源较少,基因研究相对落后。垂体瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene, PTTG)是近期发现的原癌基因,业已证明它参与恶性肿瘤发生发展的诸多环节。胆管癌中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)与PTTG的表达关联性尚存在诸多争议。本文利用免疫组化的方法,同步检测PTTG和VEGF蛋白在胆管癌、癌旁组织以及良性病变胆管组织中的表达,旨在探讨该两种蛋白在胆管癌中是否存在表达的关联性;并将结果与其临床资料相比较,以探讨两者表达与胆管癌发展、转移的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 收集本院普外科1990年1月—2003年12月手术切除肝外胆管癌标本36例,癌组织取自肿瘤中心或边缘,癌旁组织取自距肿瘤边缘至少10mm的胆管组织,均经病理证实无癌细胞。其中男23例,女13例;年龄32~78(平均53.3)岁。36例标本全部为腺癌,术前均未作放疗、化疗、免疫治疗等抗肿瘤治疗。胆管良性病变组织12例,标本均为因胆囊良性病变而行胆囊切除中的胆囊管;其中男3例,女9例;年龄36~55(平均42.8)岁。所有病例均经病理证实诊断,所用标本均以10%甲醛固定,石蜡包埋。每个蜡块行4 μ m厚连续切片3张。

1.1.2 试剂 PTTG和VEGF山羊抗人多克隆抗体、鼠抗山羊二抗均为美国Santa Cruz公司产品。过氧化物酶标记的卵白素生物素(SABC)染色试剂盒、AEC染色试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 检测方法 用免疫组化SABC法。实验步骤按试剂盒说明书进行:常规脱蜡至水,置3% H_2O_2 中室温10min;置枸橼酸盐缓冲液中行热抗原修复,滴加正常马血清封闭液室温封闭15min;加入一抗于湿盒内4 $^{\circ}C$ 过夜;PBS洗涤后滴加生物素

标记的二抗、SABC,各孵育20min;PBS冲洗3次,最后在AEC显色液显色时间15min,自来水冲洗,苏木素复染,封片观察。将已知阳性的肝癌切片作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定 以肿瘤细胞胞浆出现红色颗粒为阳性细胞;参照Lu^[1]的方法判断染色结果。随机观察5个高倍视野,首先按染色强度记分:无着色为0分,淡红色为1分,红色为2分,棕红色为3分;再按照阳性细胞所占百分率记分:阳性细胞小于5%为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分,超过75%为4分。两者之和为2~3分者作弱阳性(+),4~5分者记作中等阳性(++),6~7分者记作强阳性(+++)。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,其中半定量等级资料采用两独立样本的Wilcoxon秩和检验分析组间差异,PTTG和VEGF之间的相关性采用Spearman等级相关分析,各组之间的阳性率比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 PTTG和VEGF蛋白在胆管癌、癌旁组织及胆管良性病变中的表达

36例胆管癌标本中,PTTG蛋白阳性表达26例,阳性率72.2%;30例癌旁组织阳性表达19例,阳性率63.3%。VEGF在癌组织中蛋白阳性表达30例,阳性率83.3%;癌旁组织中阳性表达23例,阳性率76.7%。癌与癌旁的PTTG和VEGF表达差异均无显著性($P > 0.05$)。12例胆管良性病变组织中未检测到PTTG和VEGF蛋白的阳性表达。行组间比较,PTTG和VEGF蛋白在胆管癌和癌旁组织中的表达与其在胆管良性病变中的表达差异均存在非常显著性($P < 0.01$)(表1)。癌组织中,PTTG和VEGF阳性细胞多为弥漫型或巢型分布,偶见散在型分布;在癌细胞中,PTTG和VEGF蛋白均均匀分布于胞浆,偶见核弱阳性,未见明显胞膜阳性(图1~6)。

表 1 PTTG 和 VEGF 蛋白在胆管癌、癌旁和良性病变组织中的表达(例数)

分组	n	PTTG 表达				阳性率 (%)	P 值	VEGF 表达				阳性率 (%)	P 值
		(-)	(+)	(++)	(+++)			(-)	(+)	(++)	(+++)		
癌组织	36	10	7	9	10	72.2 [†]	0.239	6	6	10	14	83.3 [†]	0.331
癌旁组织	30	11	5	11	3	63.6 [†]		7	2	15	6	76.7 [†]	
良性病变	12	12	0	0	0	0		12	0	0	0	0	

注: † 与胆管良性病变相比, P < 0.01

图 1 PTTG 蛋白强阳性表达(+++)(×400)

图 2 VEGF 蛋白强阳性表达(+++)(×400)

图 3 PTTG 蛋白弱阳性表达(+)(×100)

图 4 VEGF 蛋白弱阳性表达(+)(×400)

图 5 PTTG 蛋白阴性表达(-)(×400)

图 6 PTTG 中等阳性表达(++)(×400)

2.2 胆管癌中 PTTG 和 VEGF 蛋白表达的相关性

36 例胆管癌中,PTTG 和 VEGF 蛋白同时表达阳性者共 24 例,同时表达阴性者共 4 例,表达一致率为 77.8%。Spearman 等级相关分析显示 PTTG 和 VEGF 蛋白表达呈正相关($r = 0.703, P < 0.001$, 表 2)。

2.3 PTTG 和 VEGF 蛋白表达与胆管癌临床特征的关系

将 PTTG 蛋白、VEGF 蛋白表达情况和胆管癌的部分临床、病理资料比较,发现患者的年龄、性别以及肿瘤的大小、分化程度与 PTTG 和 VEGF 的表达差异并无显著性($P > 0.05$)。但肿瘤转移与否与两种蛋白的表达关系密切(表 3)。出现转移的

13 例肿瘤组织切片中,PTTG 和 VEGF 蛋白均呈阳性表达者分别为 92.3% 和 100%,而无转移组则仅为 60.8% 和 73.9%,差异存在显著性($P < 0.05$)。

表 2 36 例胆管癌中 PTTG 与 VEGF 蛋白表达的相关性(例数)

PTTG 强度	VEGF 强度				合计
	(-)	(+)	(++)	(+++)	
(-)	4	4	2	0	10
(+)	1	2	3	1	7
(++)	1	0	2	6	9
(+++)	0	0	3	7	10
合计	6	6	10	14	36

表 3 PTTG 和 VEGF 蛋白表达与胆管癌临床特征的关系

临床特征	总例数	PTTG 蛋白			VEGF 蛋白		
		阳性数	(%)	<i>P</i> 值	阳性数	(%)	<i>P</i> 值
年龄(岁)							
≤60	19	15	78.9	0.341	17	89.4	0.296
>60	17	11	64.7		13	76.4	
性别							
男	23	18	78.3	0.282	20	86.9	0.438
女	13	8	61.5		10	76.9	
分化程度							
高、中	28	19	67.9	0.274	23	82.1	0.720
低	8	7	87.5		7	87.5	
大小(cm)							
≤2	21	13	61.9	0.102	16	76.2	0.174
>2	15	13	86.7		14	93.9	
转移							
有	13	12	92.3	0.043	13	100.0	0.044
无	23	14	60.8		17	73.9	

3 讨论

肝外胆管癌位于肝门部者多见,因解剖部位复杂,切除难度大^[2]。如何对胆管癌进行有效的预后评估和综合治疗一直是困扰胆道外科的难题。基因治疗是综合治疗的重要部分,定义可靠的靶基因是基因治疗的前提条件。

PTTG 编码一条含 203 个氨基酸的蛋白^[3]。在睾丸、胸腺及胚胎肝脏的正常组织中存在 PTTG 的低表达,但在绝大部分恶性肿瘤细胞株中,PTTG 呈现一致性的高表达^[4]。本实验发现:PTTG 蛋白在胆管癌和癌旁组织中均呈现高表达,组织上呈巢型或散在分布;细胞中 PTTG 主要为胞浆阳性,分布均匀,偶见核弱阳性,未见膜阳性表达。在 12 例良性胆管病变中,未测得 PTTG 蛋白的阳性表达。此结果说明 PTTG 基因过度表达极有可能在胆管癌的发生和发展的过程中起到一定的作用。此现象或许与 PTTG 的某些已知作用有关,如引起有丝分裂时染色体分离障碍;引起染色体不稳定;转录激活 *c-myc* 等癌基因;上调 bFGF 等血管因子;与 p53 基因一起参与细胞凋亡的调控等^[5]。至于

有哪些机制参与了胆管癌的发生发展,尚待进一步的研究。

新生血管生成是实体肿瘤增殖和转移的重要条件。VEGF 既是一种内皮生长因子,又是一种血管因子,是肿瘤血管生成中最重要的始动因子之一^[6]。有资料统计肝外胆管癌中 VEGF 的阳性表达率为 62.2% ~ 72.7%^[7-8]。与 bFGF 相比,VEGF 在胆管癌中的表达率和表达量高,与预后和转移的关系更加密切^[9]。PTTG 与 bFGF 环路促进作用的关系已基本确定^[10],但学术界对于 PTTG 和 VEGF 之间是否存在肯定的正相关联仍不确定。McCabe^[11]认为垂体瘤中的血管生成和 PTTG 刺激 VEGF 表达增高密切相关。Hunter^[12]认为尽管 PTTG 确实存在诱导血管生成的作用,但未必是通过 VEGF 通路的上调来实现的,两种基因表达不存在关联性。本试验中 26 例 PTTG 阳性表达的胆管癌,有 24 例同时可测得 VEGF 阳性表达,10 例 PTTG 阴性表达的胆管癌有 4 例 VEGF 阴性表达;表达的一致率为 77.8%,呈现明显的正相关。在胆管癌中,PTTG 和 VEGF 的这种正相关联是“直接效

应”还是“网络效应”,仍需进一步实验证明。

在结合分析 PTTG 和 VEGF 蛋白表达情况和部分临床资料中发现:PTTG 和 VEGF 表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度均无显著关系;但在 13 例出现转移的胆管癌中,PTTG 和 VEGF 表达的阳性率分别为 92.3% 和 100%,明显高于无转移组中两种蛋白的阳性比例,说明 PTTG 和 VEGF 有可能同时参与了胆管癌的转移过程。有研究显示人为转染 PTTG 至 PTTG(-) 的细胞株,可测得 VEGF 表达的升高;此过程发生在 VEGF 的转录阶段而非翻译阶段,依赖于 PTTG 蛋白结合域的完整性^[9]。这就存在一种可能:胆管癌中 PTTG 表达增高促进了 VEGF 的转录增强,从而诱发新生血管生长,为肿瘤的转移提供了条件。但此假设仍需进一步实验证明。

参考文献:

- [1] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(9):1808~1812.
- [2] 杨维良,张野,邹小明,等. 肝外胆管癌的诊治 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(1):14-17.
- [3] Yu R, Ren SG, Horwitz GA, *et al.* Pituitary tumor transforming gene (PTTG) regulates placental JEG-3 cell division and survival: evidence from live cell imaging [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(8):1137-1146.
- [4] Kakar SS. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG) [J]. *Gene*, 1999, 240(2):317-324.
- [5] Bernal JA, Luna R, Espina A, *et al.* Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis [J]. *Nat Genet*, 2002, 32(2):306-311.
- [6] Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis [J]. *Cell*, 1993, 72(6):835-846.
- [7] 周军,汤恢焕. 胆管癌微血管计数和 VEGF 及 MMP2 的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(2):122-124.
- [8] 常实,汤恢焕,周军,等. 肝外胆管癌 nm23-H₁ 和 VEGF 的表达及其临床意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(8):625-627.
- [9] Ogasawara S, Yano H, Higaki K, *et al.* Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines [J]. *Hepatol Res*, 2000, 20(1):97-113.
- [10] McCabe CJ, Khaira JS, Boelaert K, *et al.* Expression of pituitary tumour transforming gene (PTTG) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in human pituitary adenomas: relationships to clinical tumour behaviour [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 58(2):141-150.
- [11] McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, *et al.* Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9):4238-4244.
- [12] Hunter JA, Skelly RH, Aylwin SJ, *et al.* The relationship between pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression and in vitro hormone and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human pituitary adenomas [J]. *Eur J Endocrinol*, 2003, 148(2):203-211.