

文章编号:1005-6947(2007)10-0986-05

· 基础研究 ·

胆囊良恶性病变中胆囊星形细胞标记物及其调控因子的表达研究

周庆湘¹, 杨竹林², 刘洁琼², 杨乐平², 苗雄鹰¹

(中南大学湘雅二医院 1. 肝胆外科 2. 肝胆疾病研究室, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 探讨胆囊腺癌、癌旁组织和慢性胆囊炎组织中 GSCs 和其调控因子 TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达水平及其临床病理意义。方法 108 例胆囊腺癌、46 例癌旁组织和 35 例慢性胆囊炎手术切除标本常规石蜡包埋切片, GSCs 染色方法为平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单抗 EnVisionTM 免疫组化法, TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 染色方法为原位杂交法。结果 胆囊腺癌 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA 表达阳性率及其评分明显高于癌旁组织和慢性胆囊炎($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 但腺癌癌变、肿块最大径 < 2 cm、无淋巴结转移和未侵犯周围组织者的 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA 表达阳性率及其评分明显高于低分化腺癌、肿块最大径 ≥ 2 cm、淋巴结转移和侵犯周围组织器官者($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 胆囊腺癌中 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA 表达评分之间均呈高度密切正相关(α -SMA vs TGF- β_1 mRNA, $r = 0.82$; α -SMA vs CTGF mRNA $r = 0.75$; TGF- β_1 mRNA vs CTGF mRNA, $r = 0.78$) 结论 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA 均为反映胆囊腺癌进展、生物学行为及预后的重要生物学标记物, TGF- β_1 和 CTGF 在活化 GSCs 方面可能具有重要调控作用。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(10): 986-990]

关键词: 胆囊肿瘤/病理学; 慢性胆囊炎; 胆囊星形细胞; 转化生长因子- β_1 ; 结缔组织生长因子; 免疫组织化学; 原位杂交

中图分类号: R 735.8

文献标识码: A

Study on the expression of GSCs marker and it's regulated factor in benign and malignant gallbladder lesions

ZHOU Qing-xiang¹, YANG Zhu-lin², LIU Jie-qiong², YANG Le-ping², MIAO Xiong-ying¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery 2. Research Laboratory of Hepatobiliary Diseases, the Second Xiangya Hospital Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective To study the distributions of gallbladder stellate cells (GSCs) and the expressions of TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA in gallbladder adenocarcinoma, pericancerous tissues, and chronic cholecystitis, and their clinicopathological significance. **Methods** EnVisionTM immunohistochemistry of α -SMA monoclonal antibody for GSCs or in situ hybridization for TGF- β_1 mRNA and CTGF mRNA was used in paraffin-embedded sections of the specimens of gallbladder adenocarcinoma ($n = 108$), pericancerous tissues ($n = 46$) and chronic cholecystitis ($n = 35$). **Results** The positive expression rates and scores of α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA were significantly higher in specimens of gallbladder adenocarcinoma than those in pericancerous tissues or chronic cholecystitis ($P < 0.01$). The positive expression rates and scores of α -SMA, TGF- β_1 mRNA and CTGF mRNA were significantly higher in the cases of malignant adenoma, maximal diameter of tumor < 2 cm, with no lymphnode metastasis, and no invasion of regional tissues compared to those in cases of low-differentiated adenocarcinoma, maximal diameter of tumor ≥ 2 cm, with

收稿日期: 2007-07-20; 修订日期: 2007-09-30。

作者简介: 周庆湘, 女, 湖南长沙人, 中南大学湘雅二医院主管护师, 主要从事肝胆胰疾病及实验室方面的研究。

通讯作者: 杨竹林 E-mail: yangzhulin8@sina.com

lymphnode metastasis, and invasion of regional tissues ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). High and close positive correlations were found among the expression scores of α -SMA, TGF- β_1 mRNA and CTGF mRNA in gallbladder adenocarcinoma (α -SMA vs TGF- β_1 mRNA, $r = 0.82$; α -SMA vs CTGF mRNA, $r = 0.75$; TGF- β_1 mRNA vs CTGF mRNA, $r = 0.78$). **Conclusions** The expressions of α -SMA, TGF- β_1 mRNA and CTGF mRNA might be important biological markers for reflecting the carcinogenesis, progression, biological behaviors and prognosis of gallbladder adenocarcinoms. TGF- β_1 and CTGF might have important regulatory effects on the activation of GSCs.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (10) : 986 - 990]

Key words: Gallbladder Neoplasms/pathol; Chronic Cholecystitis; Gallbladder Stellate Cells; Transforming Growth Factor- β_1 ; Connective Tissues Growth Factor; Immunohistochemistry; In Situ Hybridization

CLC number: R 735.8

Document code: A

近年研究发现肝、胰星形细胞(HSCs, PSCs)在肝纤维化和慢性胰腺炎纤维化发生发展中具有极重要作用,是纤维化发生的效应细胞^[1-4]。其活化受多种因子调控,其中最主要的是转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)^[4-7]。新近证实HSCs和PSCs在肝癌和胰腺癌发生、发展、生物学行为及预后方面起重要作用,且与TGF- β_1 , CTGF等生长调控因子有密切关系^[8-11]。笔者应用免疫组化标记和原位杂交技术探讨胆囊腺癌、癌旁组织和慢性胆囊炎组织中GSCs分布及其与TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA表达的关系和意义。

1 材料与方法

1.1 标本分组及临床病理资料

1.1.1 胆囊癌组 收集湘雅二医院、湘雅医院和湖南省人民医院1996年6月—2006年6月胆囊癌手术切除标本108例,男31例(28.7%),女77例(71.3%);年龄范围38~76岁,平均(54.5±12.8)岁,58例伴有胆囊结石(53.7%)。病理类型均为腺癌,其中腺瘤癌变9例(8.2%),高分化腺癌29例(26.9%),中分化腺癌29例(26.9%),低分化腺癌30例(27.8%),黏液腺癌11例(10.2%);术中发现侵犯胆囊外周围组织器官59例(54.6%);有59例发生区域淋巴结转移(54.6%);手术方式包括根治性切除34例(31.5%),姑息手术48例(44.4%)和因广泛转移不能手术切除26例(24.1%)。

1.1.2 癌旁组织组 从以上108例胆囊腺癌中选择46例癌旁组织(距癌组织 ≥ 3 mm),经病理检查证实,其中正常胆囊组织10例,伴轻度不典

型增生10例,中度不典型增生12例和重度不典型增生14例,均未发现癌变。

1.1.3 慢性胆囊炎组(对照组) 收集35例慢性胆囊炎组织标本(单纯慢性胆囊炎15例,慢性胆囊炎伴胆囊结石20例),经病理检查证实,其中正常胆囊黏膜11例,伴轻度不典型增生12例,中度不典型增生7例及重度不典型增生5例。标本均经4%甲醛固定后常规制作石蜡包埋切片,切片厚4 μ m。

1.2 主要试剂

鼠抗人平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体购自福建迈新公司; EnVisionTM 染色试剂盒(兔/鼠)购自上海基因公司; TGF- β_1 mRNA和CTGF mRNA原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司。

1.3 方法

1.3.1 α -SMA EnVisionTM 免疫组化法测定 严格按试剂说明书操作,主要步骤如下:切片脱蜡至蒸馏水洗 \rightarrow 3% H_2O_2 甲醇液10 min \rightarrow 胰蛋白酶消化15 min \rightarrow 滴-抗37 $^{\circ}C$ 孵育60 min \rightarrow PBS洗3次 \times 5 min \rightarrow 滴A液37 $^{\circ}C$ 孵育30 min \rightarrow PBS洗3次 \times 5 min \rightarrow 滴显色液室温15 min \rightarrow 苏木精线染1 min \rightarrow 自来水返蓝 \rightarrow 脱水.透明和中性树胶封片。

1.3.2 原位杂交技术检测 TGF- β_1 mRNA和CTGF mRNA 严格按试剂说明操作。主要步骤如下:切片脱蜡至蒸馏水洗 \rightarrow 3% H_2O_2 甲醇液10 min \rightarrow 胰蛋白酶消化15 min \rightarrow 预杂交液42 $^{\circ}C$ 孵育2 h \rightarrow 杂交液42 $^{\circ}C$ 孵育过夜(> 12 h) \rightarrow 2 \times SSC洗3次 \times 2 min \rightarrow 0.5 \times SSC洗2次 \times 2 min \rightarrow 0.2SSC洗2次 \times 2 min \rightarrow 滴鼠抗地高辛37 $^{\circ}C$ 孵育2 h \rightarrow 滴SABC液37 $^{\circ}C$ 孵育40 min \rightarrow 滴生物化辣根过氧化物酶37 $^{\circ}C$ 20 min \rightarrow DAB-HCL显色15 min \rightarrow 苏木精浅染1 min \rightarrow 自来水返蓝 \rightarrow 脱水.透明封固。

1.3.3 对照 以福建迈新公司(α -SMA)或武汉博士德公司提供的阳性切片作为三者染色的阳性对照,以0.01 mol/L PBS液(PH7.4)替代-抗作为 α -SMA染色的阴性对照,以原位杂交专用PBS液替代杂交液作为TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA染色的阴性对照。

1.3.4 染色评分 细胞浆中含棕黄色颗粒者为 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA阳性细胞。 α -SMA阳性细胞为除血管平滑肌细胞以外的胆囊

其他组织细胞(图1); TGF- β_1 mRNA和CTGF mRNA阳性细胞删除各类间质细胞和炎性细胞(图2-3)。评分标准:将细胞浆着色强度评分(弱,1分;中,2分;强,3分)和阳性细胞率评分($\leq 5\%$,0分;6%~10%,1分;11%~20%,2分;21%~50%,3分;>50%,4分)之和为该病例评分值,将评分值 ≤ 2 分定为阴性病例, ≥ 3 分定为阳性病例。

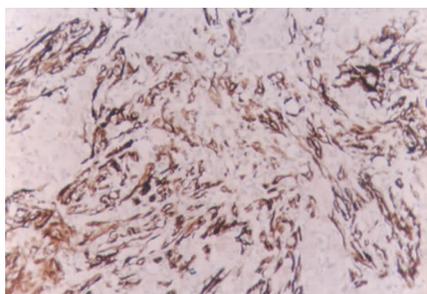


图1 α -SMA阳性表达,评分6分,胆囊高分化腺癌,EnVisonTM免疫组化法(DAB显色 $\times 200$)

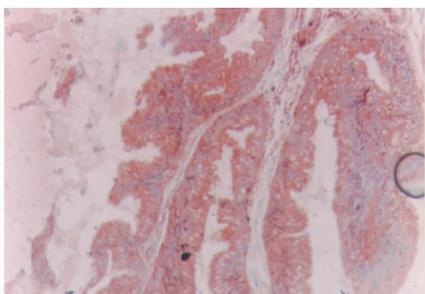


图2 TGF- β_1 mRNA阳性表达,评分6分,胆囊高分化腺癌,原位杂交染色(AEC显色 $\times 200$)

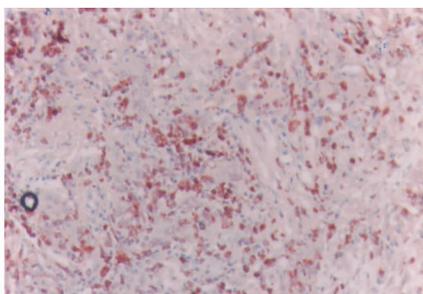


图3 CTGF mRNA阳性表达,评分5分,胆囊低分化腺癌,原位杂交染色(AEC显色 $\times 200$)

1.4 统计学处理

将所得实验数据输入至SPSS13.0统计软件中进行 χ^2 检验、 t 检验、 F 检验或Fishers精确概率法,相关分析行Spearman等级相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 胆囊良恶性病变 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA的表达

α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA表达阳性的在108例胆囊腺癌中分别为66例(61.1%), 66例(61.1%)和65例(60.2%),其评分值分别为 3.19 ± 1.46 , 2.70 ± 2.06 和 2.57 ± 1.90 ; 46例癌旁组织中分别为13例(28.5%), 15例(32.6%)和15例(32.6%),其评分值分别为 1.25 ± 1.22 , 1.41 ± 1.12 和 1.37 ± 1.23 ; 35例慢性胆囊炎阳性病例分别为6例(17.1%), 6例(17.1%)和7例(20.0%),其评分值分别为 0.87 ± 1.24 , 0.93 ± 1.21 和 0.98 ± 1.18 ; 胆囊腺癌 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA表达阳性率及其评分均明显高于癌旁组织和慢性胆囊炎均 $P < 0.01$ (表1)。

表1 α -SMA, TGF- β_1 mRNA和CTGF mRNA在胆囊良恶性病变中表达情况

指标	胆囊腺癌	癌旁组织	慢性胆囊炎
α -SMA			
阳性病例(%)	66(61.1)	13(28.5) [†]	6(17.1) [†]
评分	3.19 ± 1.46	1.25 ± 1.22 [†]	0.87 ± 1.24 [†]
TGF- β_1 mRNA			
阳性病例(%)	66(61.1)	15(32.6) [†]	6(17.1) [†]
评分	2.70 ± 2.06	1.41 ± 1.12 [†]	0.93 ± 1.21 [†]
CTGF mRNA			
阳性病例(%)	65(60.2)	15(32.6) [†]	7(20.07) [†]
评分	2.57 ± 1.90	1.37 ± 1.23 [†]	0.98 ± 1.18 [†]

注:†与胆囊腺癌组比较, $P > 0.01$

2.2 胆囊腺癌临床病理特征与 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA表达的关系

腺癌瘤变、肿块最大径 < 2 cm、无淋巴结转移及未侵犯周围组织的胆囊癌病例其 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA表达阳性率及其评分明显高于低分化腺癌、肿块最大径 ≥ 2 cm、淋巴结转移及侵犯周围组织器官病例($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表2)。

表 2 胆囊腺瘤临床病理特征与 α -SMA, TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达的关系

临床病理特征	例数	α -SMA						TGF- β_1 mRNA						CTGF mRNA						
		阳性例数	X ² 值	P值	评分($\bar{x}\pm s$)	t	p	阳性例数	X ² 值	P值	评分($\bar{x}\pm s$)	t	p	阳性例数	X ² 值	P值	评分($\bar{x}\pm s$)	t	p	
性别																				
男	31	18	0.17	>0.05	3.06±1.36	0.58	>0.05	18	0.17	>0.05	2.68±2.09	0.04	>0.05	20	0.34	0.67	2.74±1.97	0.58	>0.05	
女	77	48			3.25±1.51			48			2.71±2.06			45			2.51±1.88			
年龄																				
≤45岁	24	18	2.51	>0.05	3.54±1.38	1.32	>0.05	17	1.23	>0.05	3.13±2.03	1.14	>0.05	16	0.54	0.49	2.54±1.91	0.10	>0.05	
>45岁	84	48			3.10±1.48			49			2.58±2.07			49			2.58±1.90			
病理类型																				
腺瘤癌变	9	9			4.78±0.83			9			4.67±1.12			9			3.89±1.05			
高分化	29	21			3.52±1.45			20			3.35±2.06			21			3.21±2.01			
中分化	29	22			3.41±1.27			23			3.34±1.56			20			2.83±2.00			
低分化	30	9			2.33±1.27			9			1.30±1.77			9			1.50±1.55			
粘液腺癌	11	5			2.82±1.47			5			1.55±1.86			6			2.09±1.22			
肿块最大径																				
<2cm	31	23	3.13	>0.05	3.78±1.44	2.51	<0.01	24	4.87	<0.05	3.69±1.62	3.63	<0.01	22	2.11	>0.05	3.58±1.62	3.92	<0.01	
≥2cm	77	43			2.95±1.58			42			2.31±1.88			43			2.15±1.75			
淋巴结转移																				
无	49	42	22.85	<0.01	4.04±1.37	6.43	<0.01	41	19.21	<0.01	3.78±1.71	5.57	<0.01	39	14.10	<0.01	3.45±1.73	4.80	<0.10	
有	59	24			2.49±1.14			25			1.81±1.91			26			1.85±1.72			
侵犯周围组织																				
无	49	44	31.06	<0.01	4.14±1.29	7.60	<0.01	44	31.06	<0.01	3.92±1.62	6.60	<0.01	41	2.11	>0.05	3.59±1.68	0.58	<0.01	
有	59	22			2.41±1.08			22			1.69±1.84			24			1.73±1.63			
胆囊结石																				
无	50	27	1.98	>0.05	3.15±1.44	0.28	>0.05	28	1.02	>0.05	2.61±1.95	0.46	>0.05	27	1.49	>0.05	2.46±1.95	0.47	>0.05	
有	58	39			3.22±1.21			38			2.77±1.74			38			2.62±1.64			

注: † 组内比较, α -SMA: $\chi^2 = 23.29, P < 0.01, F = 7.34, P < 0.01$; TGF- β_1 mRNA: $\chi^2 = 123.87, P < 0.01, F = 10.58, P < 0.01$; CTGF mRNA: $\chi^2 = 20.25, P < 0.01, F = 5.36, P < 0.01$

2.3 胆囊癌中 α -SMA, TGF- β_1 mRNA, CTGF mRNA 表达的相互关系

66 例 α -SMA 阳性的胆囊癌中 TGF- β_1 mRNA 阳性 56 例, CTGF mRNA 阳性 55 例, α -SMA 表达与 TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 呈高度一致性 ($\chi^2 = 40.24, P < 0.01; \chi^2 = 37.95, P < 0.01$)。 α -SMA 表达评分与 TGF- β_1 mRNA ($r = 0.82, P < 0.01$) 和 CTGF mRNA 表达评分 ($r = 0.75, P < 0.01$) 呈高度密切正相关; TGF- β_1 mRNA 表达评分与 CTGF mRNA 表达评分也呈高度密切正相关 ($r = 0.78, P < 0.01$)

3 讨论

HSCs 和 PSCs 具有相同细胞结构和相似的生物学功能, 均为间质细胞, 约占细胞总数 4% 左右, 正常情况下呈静止状态, 合成少量胶原成分, 其主要功能与维持正常组织结构有关, 表达特异性标记物结蛋白、胞质富含 vitA 脂滴; 但在各种激活因子作用下, 迅速从静止状态活化, 失去 VitA 脂滴, 转化为活化肌纤维母细胞亚型, 具有高度

自我增殖能力, 大量表达 α -SMA 而不表达结蛋白, 合成大量 ECM 合成大量 ECM 蛋白成分^[3-5]。近年研究表明 HSCs 和 PSCs 的活化是肝纤维和慢性胰腺炎纤维化发生的核心环节, 是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要来源细胞^[2-4]。此外, HSCs 和 PSCs 与肝癌发生、进展、血管生成、转移及预后有较密切关系, α -SMA 表达高者 (或计数高者) 病情进展慢, 血管生成密度低, 转移、侵袭能力低、生存期长, 其机理与其合成 ECM 蛋白有关, 因为大量包裹在肿瘤周围的胶原纤维限制了肿瘤生长侵袭和转移, 但确切机制仍需深入研究^[8-12]。胆囊癌及胆囊良性病变中是否也存在 α -SMA 表达阳性的细胞其意义如何罕见文献报道。本组资料发现, 胆囊癌及良性病变中均存在数量不等的 α -SMA 阳性胆囊星形细胞, 胆囊腺癌 α -SMA 表达阳性率及其评分明显高于癌旁组织和慢性胆囊炎 ($P < 0.01$), 且腺瘤癌变、肿块最大径 < 2 cm、无淋巴结转移及未侵犯周围组织病例 α -SMA 表达阳性率及其评分明显高于低分化腺癌、肿块最大径 ≥ 2 cm、淋巴结转移及侵犯周

围组织器官病例 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示, 胆囊星形细胞数量与胆囊腺癌进展、生长速率、转移及侵袭能力密切相关, 胆囊星形细胞数量可能是反映胆囊腺癌预后的重要生物学指标。

TGF- β 是属于一组调节细胞生长和分化的 TGF- β 超家族, TGF- β_1 基因定位于染色体 19q³, 含有 7 个外显子。研究证实 TGF- β_1 通过与受体结合后对细胞生长、分化及免疫功能均有重要调节作用, 正常情况下对间质细胞起刺激作用, 而对上皮或神经外胚层来源的细胞起抑制作用。CTGF 为分子量 36 ~ 38 kD 的富含半胱氨酸的肝磷脂结合多肽, 由 349 个氨基酸残基构成, 属于 CNN 生长因子家族, 是由 TGF- β_1 诱导产生的重要下游介质, 具有促有丝分裂、趋化细胞、诱导黏附、促进细胞增生和调节血管生成等作用。近年研究发现, TGF- β_1 和 CTGF 均为调节 HSCs 和 PSCs 活化的最重要的因子, 能促进活化 HSCs 和 PSCs 大量合成 α -SMA 和 ECM, 是肝、胰纤维化发生的重要促进因子。TGF- β_1 和 CTGF 表达水平与一些恶性肿瘤恶性程度、进展、血管生成、生物学行为和预后密切相关, 高水平表达者的恶性肿瘤恶性程度低、进展慢、不易发生转移及侵袭能力低及预后好, 其机制可能是: (1) 活化 α -SMA 阳性细胞大量合成 ECM 而致癌组织周边形成胶原纤维包裹; (2) 趋化炎性细胞向癌间质迁移和浸润; (3) 通过多种信号传导通路激活下游生长因子或细胞因子的作用^[13-19], 但确切的作用机制仍需深入研究。本组资料发现, 胆囊腺癌 TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达阳性率及其评分明显高于癌旁组织和慢性胆囊炎 ($P < 0.01$); 腺癌癌变、肿块最大径 < 2 cm、无淋巴结转移及未侵犯周围组织器官病例 TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达阳性率及其评分明显高于低分化腺癌、肿块最大径 ≥ 2 cm、淋巴结转移及侵袭周围组织器官病例 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。胆囊腺癌中 α -SMA, TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达呈高度一致性, 其评分值之间呈高度密切正相关。说明 TGF- β_1 mRNA 和 CTGF mRNA 表达水平是反映胆囊腺癌发生、进展、生物学行为和预后的重要生物学标记物。

参考文献:

- [1] Haughton EL, Tucker SJ, Marek CJ, *et al.* Preynane X receptor activators inhibit human hepatic stellate cell transdifferentiation in vitro [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(1): 194 - 209.
- [2] Schulze-krebs A, Premel D, Popov Y, *et al.* Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(1): 246 - 258.
- [3] Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function [J]. *Mol Cancer*, 2004, 3(1): 26 - 30.
- [4] Apte MV, Wilsom JS. Mechanisms of pancreatic fibrosis [J]. *Dig Dis*, 2004, 22(3): 273 - 279.
- [5] Pinzani M. Pancreatic stellate cells: new kids become mature [J]. *Gut*, 2006, 55(1): 12 - 14.
- [6] Aoki H, Ohnishi H, Hama K, *et al.* Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 in activated rat pancreatic stellate cells [J]. *Cell Biochem*, 2006, 99(1): 221 - 228.
- [7] Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha 5 beta 1 as a novel CCN2 receptor [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(3): 1019 - 1030.
- [8] Zinoly PJ, L'Helgoual'h A, Bonnier D, *et al.* Upregulation of the tumor suppressor gene menin in hepatocellular carcinomas and its significance in fibrogenesis [J]. *Hepatology*, 2006, 44(5): 1296 - 307.
- [9] Jung JO, Gwak GY, Lim YS, *et al.* Role of hepatic stellate cells in the angiogenesis of hepatoma. *Korean J Gastroenterol*, 2003, 42(2): 142 - 148.
- [10] Apte MV, Park S, Phillips PA, *et al.* Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells [J]. *Pancreas*, 2004, 29(3): 179 - 187.
- [11] Yoshida S, Vjiki M, Ding XZ, *et al.* Pancreatic stellate cells (PSCs) express cyclooxygenase-2 (cox-2) and pancreatic cancer stimulates cox-2 in PSCs [J]. *Mol Cancer*, 2005, 4(1): 27 - 29.
- [12] Witt H, Apte MV, Keim V, *et al.* Chronic pancreatitis: Challenges and advances in pathogenesis, genetics diagnosis, and therapy [J]. *Gastroenterology* [J]. 2007, 132(4): 1557 - 1573.
- [13] Vagenas K, Spyropoulos C, Gavala V, *et al.* TGF-beta1, TGF-beta 2, and TGFbeta3 protein expression in gastric carcinomas: correlation with prognostic factors and patient survival. *J Surg Res*, 2007, 139(2): 182 - 188.
- [14] Buck MB, Knabbe C. TGF-beta signaling in breast cancer [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1089(2): 119 - 126.
- [15] Chung SJ, Kim JS, Jung HC, *et al.* Transforming growth factor-(beta) 1 - 509 T reduces risk of colorectal cancer, but not adenoma in Koreans [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(3): 401 - 404.
- [16] Sala-Torra O, Gundacker HM, Striwalz DL, *et al.* Connective tissue growth factor (CTGF) expression and outcome in adult patient with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109(7): 3080 - 3083.
- [17] Dornhofer N, Song S, Bennewith K, *et al.* Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis [J]. *Cancer Res* [J]. 2006, 66(11): 5816 - 5827.
- [18] Itartel M, Dimola FF, Gardini A, *et al.* Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior [J]. *World J Surg*, 2004, 28(8): 818 - 825.
- [19] Lin BR, Chang CC, Che TF, *et al.* Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(1): 9 - 23.