论著

TGF－βⅡ受体和磷酸化 Smad2 蛋白在食管癌中的表达及意义

何欣蓉[1]　蔡燕[2]　付茂勇[3]（川北医学院附属医院：1 病理科；2 风湿免疫研究所；3 胸外科　四川　南充　637000）

【摘要】 目的　探讨转化生长因子β－Ⅱ型受体（TβRⅡ）和磷酸化 Smad2（P－Smad2）蛋白在食管癌发生和发展中的作用。方法　应用 Western blot 技术对 38 例手术切除的食管癌标本和 12 例癌旁组织中的 TβRⅡ、P－Smad2 的表达进行检测。结果　食管癌中 TβRⅡ、P－Smad2 的表达明显低于癌旁组织，具有显著性差异（$P<0.05$）；但 TβRⅡ、P－Smad2 的表达在不同临床病理特征（年龄、性别构成比、组织分化程度、有无淋巴结转移）中差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结论　食管癌组织中存在 TβRⅡ和 Smad2 的蛋白表达异常，可能与食管癌的发病有关。

【关键词】 TβRⅡ　P－Smad2　食管癌　Western blot

The expression and significance of TβRⅡ and P－Smad2 in esophageal neoplasms. *HE Xin－rong*[1], *CAI Yan*[2], *FU Mao－yong*[3]. 1 *Department of Pathology*; 2 *Rheumatoid immune research institute*; 3 *Hepatobiliary Surgery*, *Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College*, *Nanchong Sichuan* 637000, *China*.

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the expression of TβRⅡ and its downstream P－Smad2 in esophageal neoplasms. **Methods**　Western blot technique was used to detect the expression level of TβRⅡ and P－Smad2 in 38 cases of esophageal neoplasms specimens and 12 cases of paracancerous esophageal tissue. **Results**　In all the 38 cases of esophageal neoplasms specimens, both TβRⅡ and P－Smad2 expressions were decreased. There were significant differences in TβRⅡ and P－Smad2 expressions between esophageal neoplasms and paracancerous esophageal tissue（$P<0.05$）. No obvious correlation was found between expression of the two proteins and age, sex, histological differentiation or lymph node metastasis（$P>0.05$）. **Conclusion**　The results suggest that the levels of TβRⅡ and P－Smad2 may play important role in the progression of esophageal neoplasms.

【**Key words**】 TβRⅡ; P－Smad2; Esophageal neoplasms; Western blot

食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤，占所有恶性肿瘤的2%。全世界每年约有20万人死于食管癌。四川省川北地区为食管癌高发区之一。食管癌病因和发病机制尚未完全阐明，但信号转导在其中的作用越来越受到重视。转化生长因子β（TGF－β）为具有多功能的细胞因子，对多种细胞具有抑制增殖及诱导凋亡作用。目前已基本清楚的是 TGF－β 激活 Smads 的信号转导通路：TGF－β 活化后，先与 TGF－βⅡ型受体（transforming growth factor－beta type Ⅱ receptor，TβRⅡ）二聚体结合，形成复合物，TβRⅡ自磷酸化，进而磷酸化 TGF－βⅠ型受体（TβRⅠ）的 GS 结构域，使之激活而具有激酶活性，活化的 TβRⅠ磷酸化下游 Smads（2 和 3）分子的丝（苏）氨基残基，使 Smad2、Smad3 活化并同 Smad4 形成异源复合物，转位到核，调节靶基因的转录应答[1]，从而抑制细胞生长，诱导其凋亡。目前很多研究表明：TGF－β/Smad 通路的异常可引起信号传导的紊乱，从而导致肿瘤的发生。本研究选取 38 例手术切除的食管癌标本和 12 例癌旁组织，应用 Western blot 技术，对 TGF－β/Smad 通路中的 TβRⅡ、磷酸化 Smad2（P－Smad2）的表达进行检测，结合临床病理资料，探讨食管癌发生发展中 TGF－β/Smad 通路的改变。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　病例　选取 2005 年川北医学院附属医院食管癌根治术标本 38 例为实验组。全部病例均经病理诊断证实。标本切成 2～3 mm^3 大小，液氮中速冻，存于－80℃。其中男性 24 例，女性 14 例。年龄为 41～72 岁，平均 58.2 岁。组织学分类：鳞癌 36 例，其中高分化鳞癌 12 例，中分化鳞癌 18 例，低分化鳞癌 6 例；腺癌 2 例。有淋巴转移 16 例，无转移 22 例。同时收集癌旁组织 12 例作为对照组。

1.1.2　试剂　实验中所用兔抗 P－Smad2 多克隆抗体和兔抗 TβRⅡ多克隆抗体购自 Santa cruz 公司，使用浓度为 1∶100。二抗及兔抗 β－actin 多克隆抗体购自中山生物技术有限公司。ECL 显色试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2　方法

1.2.1　Western blot 分析　组织先用匀浆器碾碎后，用 RIPA 裂解液提取组织蛋白质，用 BCA 蛋白定量试剂盒测浓度。各取 100 μg，10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜，用第二抗体偶联物进行免疫检测，发光底物显迹法进行显迹，经显影，定影后分析杂交信号，并以同一张膜上重复杂交 β－actin 作为对照，用 Quantity one 凝胶分析软件分析结果。

1.2.2　食管癌中 βRⅡ、P－Smad2 表达差异比较　采用单因素方差分析比较不同年龄（每 10 年 1 组）及组织学分化类型（按高分化、中分化、低分化 3 组）之间的食管癌中 TβRⅡ、P－Smad2 的表达差异，比较食管癌中 TβRⅡ、P－Smad2 与性别、淋巴结转移的关系。

1.3　统计学处理　应用 SPSS 16.0 软件包，计数资料采用卡方检验；计量资料采用 t 检验分析，所得数据以

基金项目：四川省卫生厅科研项目（编号：080096）

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌中 TβRⅡ、P－Smad2 的表达 用 Quantity one 做光密度分析，用 TβRⅡ、P－Smad2 分别与内参 a－actin 的平均光密度比值($\bar{x} \pm s$)来表示 TβRⅡ、P－Smad2 的相对浓度。结果表明对照组 TβRⅡ、P－Smad2 蛋白的表达均明显弱于实验组(图 1)。TβRⅡ在食管癌组织平均灰度值明显低于癌旁食管组织平均灰度值；P－Smad2 在食管癌组织平均灰度值也明显低于癌旁食管组织平均灰度值。这两种蛋白在食管癌和癌旁组织中的表达差异均有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

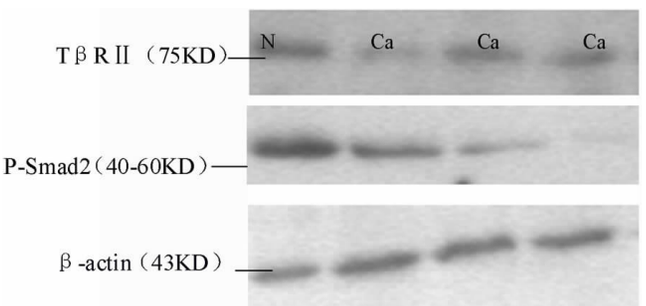

图 1 Western blot 检测食管癌和癌旁组织中 TβRⅡ、P－Smad2 的表达
Ca：食管癌组织；N：食管癌旁组织

表 1 人食管癌及癌旁组织中 TβRⅡ、P－Smad2 的平均灰度分析

检测指标	癌旁食管组织平均灰度值	食管癌组织平均灰度值	t 值	P 值
TβRⅡ	1.610±0.730	0.990±0.340	4.600	<0.05
P－Smad2	1.712±0.706	0.993±0.339	4.773	<0.05

2.2 TβRⅡ、P－Smad2 的表达与食管癌病理特征的相关性 采用单因素方差分析比较不同年龄(每 10 年 1 组)及组织学分化类型(按高分化、中分化、低分化 3 组)之间的 TβRⅡ、P－Smad2 的表达差异，结果显示两种蛋白表达在不同年龄、不同组织分化中均无明显差异($P>0.05$)(表 2)。采用 t 检验分别比较发病不同性别和有无淋巴结转移之间的 TβRⅡ、P－Smad2 的表达差异，结果两种蛋白在不同性别中无显著差异($P>0.05$)；P－Smad2 蛋白、TβRⅡ蛋白分别在有淋巴结转移和无淋巴结转移间比较无明显差异($P>0.05$)。详见见表 2～3。

3 讨论

TβRⅡ、P－Smad2 都是 TGF－β 超家族信号传导的成员，为 TGF－β/Smad 通路的必要因素之一。目前研究表明：在多种肿瘤中，如子宫内膜癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌和肝癌等，均发现存在 TβRⅡ，Smad2 的突变或表达下调[2-6]。我们选取 2005 年川北医学院附属医院

表 2 食管癌中 TβRⅡ、P－Smad2 与年龄、组织分化的关系

临床病理特征	例数	TβRⅡ			P－Smad2		
		食管癌组织平均灰度值	F 值	P 值	食管癌组织平均灰度值	F 值	P 值
年龄(岁)							
40～49	4	0.774±0.239	1.212	0.320	0.920±0.268	0.832	0.486
50～59	15	0.969±0.315			0.990±0.317		
60～69	15	1.093±0.369			1.078±0.369		
70～79	4	1.127±0.214			0.983±0.231		
组织分化							
高分化组	12	1.003±0.346	0.120	0.887	0.940±0.327	0.549	0.583
中分化组	18	1.017±0.328			1.022±0.383		
低分化组	6	0.948±0.189			1.017±0.194		

表 3 食管癌中 TβRⅡ、P－Smad2 与性别、淋巴结转移的关系

临床病理特征	TβRⅡ			P－Smad2		
	食管癌组织平均灰度值	t 值	P 值	食管癌组织平均灰度值	t 值	P 值
性别						
男性	0.979±0.196	－1.984	0.055	0.997±0.332	0.832	0.486
女性	1.010±0.149			0.989±0.345		
淋巴结转移						
有	0.929±0.231	1.299	0.202	0.919±0.248	1.701	0.098
无	1.048±0.379			1.066±0.381		

例食管癌根治术标本 38 例为实验组，另选取 12 例癌旁组织为对照组，采用 Western blot 技术检测食管癌和癌旁组织中 TβRⅡ、P－Smad2 的表达，结果显示 TβRⅡ、P－Smad2 的表达均较癌旁组织下降，两者差异具有统计学意义($P<0.05$)。

Fukai 等[7]研究人食管鳞状细胞癌时发现，癌灶中 TβRⅠ、Ⅱ表达下降与肌层浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关。王柏春等[8]采用免疫组化方法测的 TβRⅡ在食管癌中低表达，且低表达与食管癌的不良分化呈正相关。但本文将 P－Smad2、TβRⅡ的表达结合临床病理资料分析，发现癌组织中 TβRⅡ、P－Smad2 的表达水平都与发病年龄、性别构成比、组织分化程度、淋巴结

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

转移无明显相关性($P>0.05$) 。

由此可见,TGF - β/Smad 信号转导通路的改变与食管癌的发生发展有密切关系。TβR Ⅱ、P - Smad2 的表达降低,使得瘤细胞逃避 TGF - β 的生长抑制作用,从而发生细胞增殖。因此,如果能通过多种方式使瘤细胞恢复对 TGF - β 的生长抑制的反应,将有可能对肿瘤治疗提供新的方法。此外,食管癌中 TGF - β/Smad 信号通路中其他信号的转导因子,如 Smad4、Smad7 等,在食管癌发生、演进中的作用仍需进一步的探讨。

参考文献

[1] Derynck R, Zhang YE. Smad - dependent and Smad - independent pathways in TGF - beta family signalling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577 - 584.

[2] 刘贵鹏,王东娇,李莹莹,等. Smad 2/3 和 Smad 4 在子宫内膜癌中的表达及其相关性 [J]. 中国医科大学学报, 2010, 60(7): 546 - 576.

[3] Munoz NM, Upton M, Rojas A, et al. Transforming growth factor beta receptor type II inactivation induces the malignant transformation of intestinal neoplasms initiated by Apc mutation [J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 9837 - 9844.

[4] 沈迎春,刘华. 转化生长因子受体Ⅰ、Ⅱ和 Smad4 在胃癌中的表达及其临床意义 [J]. 同济大学学报(医学版), 2008, 29(3): 79 - 83.

[5] Zhao H, Shiina H, Greene KL, et al. CpG methylation at promoter site - 140 inactivates TGFbeta2 receptor gene in prostate cancer [J]. Cancer, 2005, 104(1): 44 - 52.

[6] 程朋,曾维政,张汝,等. TGF - β1 与 Smad2 基因在肝细胞肝癌中的表达及意义 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(11): 980 - 983.

[7] Fukai Y, Fukuchi M, Masuda N, et al. Reduced expression of transforming growth factor - beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2003, 104(2): 161 - 166.

[8] 王柏春,王胜发,毕宏远,等. 人食管癌中 TGF - β 受体Ⅰ和Ⅱ表达的临床分析 [J]. 基础医学与临床, 2007, 27(7): 822 - 823.

(收稿日期: 2011 - 07 - 22)

(上接第 3 页)

增加,心输出量降低,血压升高。有研究证实高血压患者血浆和脑脊液[7]中 U II 浓度与血压正相关,并且 U II 基因单核苷酸多态性与原发性高血压发展有关。本研究也发现 SHR 组无论心肌组织还是胸主动脉 GPR14 表达水平均显著高于其对照 WKY 组大鼠,这可能导致高血压组大鼠对 U II 敏感性增加,从而使血管紧张性收缩增强,参与高血压的发生发展。

近来随着人们对 RNA 干扰现象和机制认识的进展,越来越多的研究者利用这种技术作为基因治疗的一种手段。有不少 RNA 干扰治疗研究是针对肿瘤和单基因缺陷性遗传病等,在高血压等心血管疾病方面,也有研究者应用腺病毒为载体靶向 AT1R 基因的 RNA 干扰技术来治疗高血压小鼠[8-9],但尚未有靶向 GPR14 的 RNA 干扰治疗高血压的文献报道。本研究发现,与注射前相比, WKY 大鼠和 SHR 尾静脉注射靶向 U II 受体 GPR14 进行 RNA 干扰的重组腺病毒,无论在 WKY 大鼠还是 SHR 组注射后 1 周即开始降低心肌组织和胸主动脉的 GPR14 蛋白表达,该效应在注射后 4 周仍存在,注射后 2 周时降低最明显。并且无创尾动脉压测定结果也表明 SBP 时程变化情况与 GPR14 受体表达变化情况一致,并且 SBP 降低幅度在 SHR 组较 WKY 组更明显。这些结果表明,尾静脉注射携带 GPR14 基因的重组腺病毒能够显著下调 GPR14,可持续至少 4 周。一次注射靶向 GPR14 进行 RNA 干扰的重组腺病毒能长期降低血压,并且 SHR 组对 GPR14 下调的影响更敏感。

心血管重构是高血压时的显著病理改变,主要表现为心肌细胞肥大、间质纤维化和血管中膜增厚等。本研究结果也表明 SHR 注射裸病毒对照组左心重/体质量、心肌细胞横截面积、胸主动脉及肠系膜上动脉中膜厚度和中膜厚/管腔内径均显著高于 WKY 注射 Ad 对照组,表明 SHR 确有心血管重构发生。尾静脉注射 Ad - GPR14 - shRNA 后 2 周时 GPR14 蛋白水平和血压下降最明显,因此选择注射后 2 周取材观察心血管病理学改变,结果发现与 SHR - Ad - GPR14 - shRNA 组左心重/体质量、心肌细胞横截面积、胸主动脉及肠系膜上动脉中膜厚度和中膜厚/管腔内径均显著低于 SHR - Ad 对照组,这表明治疗显著改善了 SHR 心血管重构情况。

综上所述,以腺病毒为载体的 RNA 干扰技术能有效发挥基因沉默效应,长期靶向 GPR14 的 RNA 干扰下调了心肌和主动脉 GPR14 蛋白水平,由此发挥显著降低高血压大鼠血压和心血管保护效应。较传统药物治疗有明显优势,以 GPR14 为靶点的 RNA 干扰有望成为新的抗高血压策略。

参考文献

[1] Albertin G, Guidolin D, Sorato E, et al. Urotensin - II - stimulated expression of pro - angiogenic factors in human vascular endothelial cells [J]. Regul Pept, 2011, 172(1 - 3): 16 - 22.

[2] Tsoukas P, Kane E, Giaid A. Potential Clinical Implications of the Urotensin II Receptor Antagonists [J]. Front Pharmacol, 2011, 2: 38.

[3] Bai XY, Liu XC, Yang Q, et al. The interaction between human urotensin II and vasodilator agents in human internal mammary artery with possible clinical implications [J]. Ann Thorac Surg, 2011, 92(2): 610 - 616.

[4] Pawar R, Kemp W, Roberts S, et al. Urotensin II levels are an important marker for the severity of portal hypertension in children [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011, 53(1): 88 - 92.

[5] Liao Y, Du JB, Tang CS, et al. Change and significance in the levels of plasma urotensin II and catestatin in children with postural orthostatic tachycardia syndrome [J]. Beijing Da Xue Xue Bao, 2011, 43(3): 436 - 439.

[6] Cheung BM, Leung R, Man YB, et al. Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension [J]. J Hypertens, 2004, 22(7): 1341 - 1344.

[7] 石莹,王艳霞,姚泰,等. 尾加压素Ⅱ对自发性高血压大鼠胸主动脉的收缩效应及其对血管平滑肌细胞内 ERK_(1/2) 磷酸化的影响 [J]. 复旦学报(医学版), 2008, 53(1): 48 - 52

[8] 张敬群,马业新,汪道文,等. RNA 干扰技术选择性下调血管紧张素Ⅱ1a 型受体及其作用的实验研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2006, 34(1): 54 - 59.

[9] Chen Y, Chen H, Hoffmann A, et al. Adenovirus - mediated small - interference RNA for in vivo silencing of angiotensin AT1a receptors in mouse brain [J]. Hypertension, 2006, 47(2): 230 - 237.

(收稿日期: 2011 - 06 - 12)

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net