

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.064.html>

结直肠癌患者血清 TGF- β 1、Smad-3 和 Smad-7 的表达及意义

郑孝翔, 吴文涌, 余昌俊

摘要 目的 检测结直肠癌(CRC)患者外周血中转化生长因子(TGF)- β 1、信号传导蛋白 Smad-3 和 Smad-7 水平的变化,为上皮间质化(EMT)与 CRC 的关系提供临床依据。方法 通过 ELISA 法对 CRC 患者血清中 TGF- β 1、Smad-3 和 Smad-7 的水平进行检测,比较实验组与对照组患者血清中 TGF- β 1、Smad-3 和 Smad-7 的水平。结果 CRC 患者血清中 TGF- β 1 和 Smad-3 水平明显高于对照组($P < 0.01$),Smad-7 的水平显著低于对照组($P < 0.01$),且随着 Dukes 分期等级的增高,TGF- β 1 和 Smad-3 水平逐渐增高($P < 0.01$),Smad-7 水平则逐渐降低($P < 0.01$)。结论 TGF- β 1、Smad-3 和 Smad-7 在 CRC 患者的发病过程中具有重要作用。

关键词 结直肠癌;TGF- β 1;Smad;ELISA

中图分类号 R 604

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0285-03

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.031

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是临床常见

的恶性肿瘤之一,患者往往预后差,死亡率增高。目前普遍认同 CRC 患者出现肿瘤转移与患者的预后不良密切相关,肿瘤转移相关的研究多有报道^[1]。在对 CRC 远处转移的研究^[2-3]中,上皮间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)可能是激活癌症转移发生的一个重要过程。转化生长因子- β 1(transforming growth factor-1, TGF- β 1)是 TGF- β 超家族成员之一,在多种疾病的 EMT 发生过程中发挥了重要的诱导作用。目前推测在 CRC 的 EMT 过程中,TGF- β 1 通过刺激上皮细胞膜形成“配体-受体复合物”并结合磷酸化的 Smad-3 与 Smad-4 结合并发生核转位,结合后的复合物参与了 EMT 相关基因的启动,从而调节 EMT 相关靶基因的表达,如基质金属蛋白酶-2、 α -平滑肌肌动蛋白、结缔组织生长因子等^[3-4]。TGF- β 分为 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 三类,以 TGF- β 1 分布最为广泛。学者们在肿瘤免疫、机制和临床方面都对其进行了广泛的研究^[5]。研究^[6]表明 TGF- β 1 具有促血管生成作用,结果显示血管内皮生长因子促进了 CRC 血管的形成。Smad-7 作为有效的拮抗分子在 EMT 过程中扮演负调节作用。因此 TGF- β /Smad 信号通路是研究 CRC 转移不可回避的关键问题。该研究通过对 CRC 患者

2016-10-17 接收

基金项目:安徽省科技厅公益性技术应用研究联动计划项目(编号:15011d04044)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院胃肠外科,合肥 230022

作者简介:郑孝翔,男,硕士研究生,主治医师;

吴文涌,男,副主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,

E-mail:13805694400@126.com

Expression and clinical significance of SIRT6 in colorectal cancer

Qi Jia, Cui Chunhui, Chen Rihong, et al

(Dept of General Surgery, Zhu Jiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510280)

Abstract Objective To explore the expression and the clinical significance of SIRT6 in colorectal cancer (CRC). **Methods** The expression levels of SIRT6 protein and mRNA in 29 samples of CRC and paired adjacent normal tissues were tested by Western blot and RT-qPCR. 113 paraffin samples (including the former 29 samples) of CRC and adjacent tissues were detected by immunohistochemistry. The associated of expression levels of SIRT6 protein and clinical parameters were analyzed. **Results** The expression level of SIRT6 was significantly lower in CRC than in adjacent normal tissues ($P < 0.05$). The expression level of SIRT6 was associated with differentiated degree, depth of invasive lymphatic metastasis and TNM stage ($P < 0.05$), whereas was not with other clinical parameters. **Conclusion** The low expression of SIRT6 is involved in the tumorigenesis and progression of CRC. SIRT6 might play a role as tumor suppressor and can be regarded as a promising diagnostic and therapeutic target for CRC.

Key words SIRT6; colorectal cancer; Western blot; RT-qPCR; immunohistochemistry

血清中 TGF-β1、Smad-3 和 Smad-7 水平进行测定,探讨其对 CRC 患者转移及病情进展的影响,为临床 CRC 患者的诊治提供新的依据和思路。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取淮南市第一人民医院胃肠外科 2012 年 2 月~2015 年 9 月间首次诊断为 CRC 的 136 例 CRC 患者为研究对象,所有患者常规进行血生化、影像学、病理学检测。排除标准:接受过抗肿瘤治疗;服用过免疫抑制剂或免疫增强剂;患有肝硬化、肺纤维化、心肌纤维化和其他原发肿瘤疾病者。入选患者中男 75 例,女 61 例;年龄 34~83 (59.42 ± 20.72) 岁。按 Dukes 分期标准分为:① 实验组,共 74 例,病理学分期在 Dukes C~D 期,其中 Dukes C 期 46 例,Dukes D 期 28 例;② 对照组,共 62 例,病理学分期在 Dukes A~B 期,其中 Dukes A 期 30 例,Dukes B 期 32 例。

1.2 研究方法

1.2.1 实验材料 ELISA 抗体试剂盒(美国 Biolog-end 公司);全自动酶标仪(Mutiskan Go,美国 Thermo 公司);离心机(Megfuge 1.0,德国 Heraeus 公司);移液器(德国 Eppendorf 公司)。

1.2.2 实验方法 ① 所有患者于接受治疗前采集静脉血 5 ml,室温静置 15 min 后 1 500 r/min 离心 10 min,离心完毕后立即收集血清标本置于 -80 °C 冰箱低温保存,集中复温监测;② 严格按照 TGF-β1、Smad-3 和 Smad-7 ELISA 试剂盒操作说明逐步操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析,计量资料非正态分布数据采用中位数(四分位间距)即 $M(IQR)$ 表示。组间比较采用两独立样本秩和检验:Mann-Whitney U 检验,多个独立样本比较采用了多组秩和检验:Kruskal-Wallis H 检验。

2 结果

2.1 实验组与对照组外周血 TGF-β1、Smad-3、Smad-7 含量比较 实验组患者 TGF-β1、Smad-3 含量高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);实验

组 Smad-7 含量低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 CRC 患者不同 Dukes 分期血清 TGF-β1、Smad-3、Smad-7 含量比较 各期之间比较,不同 Dukes 分期患者血清 TGF-β1、Smad-3、Smad-7 含量不同或不全相同,随着 Dukes 分期的升级,CRC 患者血清 TGF-β1 和 Smad-3 水平也逐渐增高 ($P < 0.01$),而 Smad-7 则逐渐降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 实验组与对照组血清 TGF-β1、Smad-3、Smad-7 含量比较 [$M(IQR)$]

项目	实验组 ($n=74$)	对照组 ($n=62$)	Z 值	P 值
TGF	150.57(114.91)	90.25(54.37)	-5.311	<0.01
Smad-3	297.92(210.18)	180.67(157.41)	-4.123	<0.01
Smad-7	120.32(122.11)	220.85(245.26)	-5.471	<0.01

3 讨论

Greenburg et al^[7] 于 1982 年首次提出 EMT 概念,其是指上皮细胞在某些条件下发生向间质细胞转化的过程,这一过程已被证实与许多肿瘤疾病的浸润和转移过程密切相关^[8],在肿瘤疾病演变过程中,EMT 可使无侵袭和迁移能力的肿瘤细胞获得浸润和迁移的能力,引发肿瘤的局部浸润和远处转移,而新的定植部位会形成间质-上皮转化(mesenchymal-epithelia transition, MET)过程,最终加速转移灶的形成和生长^[9]。研究^[9-10]表明间皮细胞也可分泌大量的 TGF-β1,证明 TGF-β1 与相关的信号通路在间皮细胞中可能处于应答状态。有学者做了相关研究^[10],将胃癌细胞与间皮细胞共同培养,结果显示 TGF-β1 的含量远远高出了单纯间皮分泌量,这说明 TGF-β1 可能参与了腹膜纤维化改变,在腹膜转移过程中 TGF-β1 表达上调,在癌细胞与间皮共同作用下更为明显。

TGF-β1 是调节细胞生长及胞外基质形成的重要细胞因子,也是 EMT 过程明确的诱导因子,其可通过旁分泌和自分泌作用促进 EMT 的形成和维持。TGF-β/Smad 信号通路是 EMT 形成过程主要的信号

表 2 不同 Dukes 分期患者血清 TGF-β1、Smad-3、Smad-7 含量比较 [$M(IQR)$]

项目	Dukes A ($n=30$)	Dukes B ($n=32$)	Dukes C ($n=46$)	Dukes D ($n=28$)	χ^2 值	P 值
TGF	90.25(38.43)	91.14(70.47)	146.20(94.32)	166.65(157.69)	29.606	<0.01
Smad-3	181.21(151.55)	171.64(160.20)	364.11(119.07)	201.49(156.41)	39.092	<0.01
Smad-7	223.01(225.47)	207.47(251.07)	166.87(119.47)	90.56(59.77)	43.663	<0.01

通路之一 在上皮细胞表面受体的结构改变中扮演了启动和转导的作用 并最终影响 EMT 的发生和细胞的增殖。研究^[7-8]显示 EMT 形成过程中 TGF- β /Smad 信号通路可通过诱导 miR155 的表达水平 抑制 RhoA 的过表达 从而加速 EMT 的进展。因此 研究相关信号因子在机体水平的变化和规律可能为临床疾病的诊治提供指导依据。

研究^[11]表明 直肠癌患者 Smad-2 的表达低于正常直肠黏膜组织 在直肠的癌变过程中 Smad-2 表达通常会缺失 进一步验证了作为肿瘤细胞抑癌基因的意义。但在直肠癌病理不同临床分期、病理分级及发病过程中 差异无统计学意义。因此有人推测 Smad-2 可能是直肠癌发生的早期事件 在直肠癌的进展中可能意义不大。

本研究结果显示 CRC 患者外周血中 TGF- β 1 和 Smad-3 随着 Dukes 分期的增高 呈现明显的增长趋势。实验组患者的外周血 TGF- β 1 和 Smad-3 较对照组呈现明显的高表达 可能预示着 CRC 患者机体肿瘤转移的过程中 EMT 的参与非常活跃。而外周血 Smad-7 水平的结果也显示随着 Dukes 分期的增高 Smad-7 水平逐渐下降 阻断 EMT 过程形成的能力随之下降 这一现象为临床监测 CRC 患者转移情况提供了一个新的思路。

参考文献

[1] Diaz J A , Slomaka T. State of the art review: colorectal cancer

- screening[J]. Am J Lifestyle Med ,2012 ,6(3) :196 -203.
- [2] Hugo H , Ackland M L , Blick T , et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression [J]. J Cell Physiol ,2007 ,213(2) :374 -83.
- [3] Smith B N , Bhowmick N A. Role of EMT in metastasis and therapy resistance [J]. J Clin Med ,2016 ,5(2) :17.
- [4] Lin R L , Zhao L J. Mechanistic basis and clinical relevance of the role of transforming growth factor- β in cancer [J]. Cancer Biol Med ,2015 ,12(4) :385 -93.
- [5] 陆 威 ,李永翔 张尚鑫 ,等. 胃癌患者外周血及癌组织中的 CD4⁺ + CD25⁺ + 调节性 T 细胞、Foxp3、TGF- β 1 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 安徽医科大学学报 ,2013 ,48(7) :790 -3.
- [6] 乌日尼勒图 德力格尔图. COX-2 和 VEGF 在结直肠癌组织中的表达及其临床病理意义[J]. 内蒙古医科大学学报 ,2015 ,37(4) :323 -8.
- [7] Greenburg G , Hay E D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. J Cell Biol ,1982 ,95(1) :333 -9.
- [8] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion [J]. Int J Biochem Cell Biol ,2007 ,39(12) :2153 -60.
- [9] Kong W , Yang H , He L , et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA [J]. Mol Cell Biol ,2008 ,28(22) :6773 -84.
- [10] 孙洪鸣 龚 伟. p16、CD44v6 和 TGF- β 1 在胃癌中的表达及其相关性研究[J]. 中国医师杂志 2010 ,12(5) :615 -7.
- [11] Jakowlew S B. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev 2006 25(3) : 435 -57.

Expression and clinical significance of TGF- β 1 , Smad-3 and Smad-7 in the serum of colorectal cancer patients

Zheng Xiaoxiang , Wu Wenyong , Yu Changjun

(Dept of Gastrointestinal Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To provide clinical evidence for the relationship between epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer (CRC) by detecting the expression of TGF- β , Smad-3 and Smad-7 in serum from CRC patients. **Methods** We detected the expression levels of TGF- β 1 , Smad-3 and Smad-7 by ELISA method. **Results** The expression levels of TGF- β 1 , Smad-3 were significantly higher and the Smad-7 was significantly lower in CRC patients than those in control group ($P < 0.01$). The expression levels of TGF- β 1 and Smad-3 were significantly higher in Dukes D than those in Dukes B , C. The Smad-7 was significantly lower in Dukes D than that in Dukes B , C ($P < 0.01$). **Conclusion** TGF- β 1 and Smad-3 and Smad-7 may play an important role in the development of CRC.

Key words colorectal cancer; TGF- β 1; Smad; ELISA