论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0372-04

巨噬细胞移动抑制因子和结缔组织生长因子在食管癌中的表达及其与预后的关系

庞 慧,解瑞玲,尚 可,范菲菲,贾永旭,李醒亚 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科)

【摘要】 **目的** 研究食管癌组织中巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的表达情况及其对预后的影响。**方法** 应用免疫组织化学染色法检测MIF和CTGF在84例食管癌组织中的表达水平,应用Cox回归模型和Kaplan-Meier生存曲线分析其与患者预后的关系。**结果** 本组病例3年生存率为59.5%(50/84)。MIF和CTGF的表达与肿瘤浸润深度($P=0.006$,$P=0.011$)和肿瘤的临床分期($P=0.023$, $P=0.006$)密切相关。单因素生存分析表明,MIF和CTGF低表达组较高表达组均有生存优势,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Cox模型多因素分析表明,食管癌组织中CTGF表达水平、临床分期和肿瘤分化程度是影响食管癌患者生存的独立预后因素($P<0.05$)。**结论** 食管癌组织中CTGF高表达、肿瘤低分化和临床分期较晚与患者预后不良显著相关。

【关键词】 食管肿瘤;巨噬细胞移动抑制因子;结缔组织生长因子;预后
【中图法分类号】 R341;R446.6;R735.1 【文献标志码】 A

Expressions of MIF and CTGF and their relationship with prognosis of esophageal carcinoma

Pang Hui, Xie Ruiling, Shang Ke, Fan Feifei, Jia Yongxu, Li Xingya (Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expression and prognostic value of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and connective tissue growth factor (CTGF) in esophageal carcinoma. **Methods** The expression of MIF and CTGF were detected by SP immunohistochemistry in 84 specimens of pathologically identified esophageal carcinoma tissue collected by Department of Thoracic Surgery of our hospital from Jan. 1 2004 to Jun. 30 2006. The clinical data including TNM stages and differentiation were respectively analyzed. They were all followed up till Jun 30 2010. The relationship of the expressions with prognosis of patients was evaluated by Cox regression model and Kaplan-Meier survival curve analysis. **Results** The three-year overall survival rate of the patients was 59.5% (50/84). The expression of MIF and CTGF were significantly associated with the depth of tumor infiltration ($P=0.006$, $P=0.011$) and TNM stage ($P=0.023$, $P=0.006$). Univariate survival analysis suggested that three-year survival rate of the patients with high CTGF and MIF expressions was poorer than those with lower expressions. Cox multivariate analysis indicated that CTGF expression, TNM staging and differential degree were the independent prognostic factors affecting survival rate of patients ($P<0.05$). **Conclusion** High CTGF expression is associated with a poor prognosis in esophageal cancer. CTGF is a useful prognostic marker for esophageal carcinoma.

【**Key words**】 esophageal neoplasms; macrophage migration-inhibitory factors; connective tissue growth factor; prognosis

Corresponding author: Li Xingya, E-mail: zlzjonline@yahoo.com.cn

食管癌在恶性肿瘤中的发病率居第6位,在我国河南等地区有着更高的发病率。目前已经开展很多关于食管癌形态学和临床病理特征的相关性研究。探讨食管癌侵袭、转移的分子机制,对进一步寻找有效的预防、诊断和治疗方法均具有重要意义。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是来源于活化T淋巴细胞的细胞因子,是人体内重要

【通信作者】 李醒亚,E-mail:zlzjonline@yahoo.com.cn

的致炎因子,与人体微环境共同促进肿瘤的生长及浸润[1]。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是 CCN 家族成员之一,其表达水平与多种恶性肿瘤的发生及演进有关[2]。有研究[3]表明这二者在组织器官纤维化过程中起重要作用。本实验采用免疫组织化学染色法研究 MIF 和 CTGF 在食管癌组织中的表达,探讨其表达水平与临床病理特征的关系,为其应用于食管癌的预后判断提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集河南省肿瘤医院胸外科 2004 年 1 月 1 日至 2006 年 6 月 30 日手术切除的食管癌标本 84 例,均经病理确诊。所有病例无糖尿病、类风湿、甲状腺功能亢进等其他疾病,术前未接受化、放疗。术后开始随访,截止日期为 2010 年 6 月 30 日;生存时间以月为单位,计算自手术之日至死亡或最后随访时间。其中男性 61 例,女性 23 例,年龄 45 ~ 76 岁,中位年龄 60 岁。按国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)第 7 版 TNM 分期标准,Ⅰ期 10 例、Ⅱ期 48 例、Ⅲ期 26 例。鳞癌 71 例、腺癌 8 例、其他类型包括神经内分泌癌、梭形细胞癌、大细胞癌共 5 例。

1.2 实验方法

所有标本先用 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm 连续切片进行 S-P 免疫组织化学检测。S-P 试剂盒、DAB 显色试剂盒、鼠抗人 CTGF 单克隆抗体、鼠抗人 MIF 单克隆抗体为北京中杉金桥生物技术公司产品。操作步骤参照试剂盒说明书进行。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

MIF 阳性细胞主要定位于细胞质,呈棕黄色染色为阳性细胞。应用 Image Pro Plus 5.0 图像分析软件,根据阳性肿瘤细胞所占百分比分为 3 级:<5% 为阴性,5% ~ 25% 为阳性,>25% 为强阳性[4],低表达是指阴性病例加阳性病例,高表达则是指强阳性病例。CTGF 阳性细胞定位于细胞质或胞膜,棕黄色或棕褐色颗粒。根据切片中阳性细胞率分级:0≤10%,1:10% ~ 25%,2:25% ~ 50%,3:≥ 50%,0 和 1 为低表达,2 和 3 为高表达[5]。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 13. 0 统计软件进行分析。计数资料比较用 χ^2 检验,采用 Kaplan-Meier 法计算生存率及描绘生存曲线,Cox 比例风险模型进行多因素生存分析。

2 结果

2.1 MIF 和 CTGF 在食管癌中的表达

MIF 在 84 例食管癌组织中广泛表达,呈灶状或弥漫性分布,主要位于细胞质,也有少数表达于细胞核,其中阴性 12 例,阳性 42 例,强阳性 30 例。CTGF 阴性 39 例,阳性 45 例,CTGF 阳性表达大多位于肿瘤细胞细胞质,还可见于癌组织周围的间质纤维结缔组织和平滑肌。见图 1。

2.2 MIF 和 CTGF 的表达与临床病理特征的关系

采用列联表分析方法,MIF 和 CTGF 的表达与患者的年龄、性别、组织学类型、区域淋巴结转移情况、肿瘤分化程度在统计学上无明显差异($P > 0.05$),但与患者的肿瘤浸润深度($P = 0.006$, $P = 0.011$)和临床分期($P = 0.023$, $P = 0.006$)密切相关。见表 1。

表 1 MIF 和 CTGF 的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	MIF			P 值	CTGF		P 值
	−	+	++		−	+	
年龄(岁)							
<60	6	13	11	0.474	15	15	0.625
≥60	6	29	19		24	30	
性别							
男	9	30	22	0.965	28	33	0.875
女	3	12	8		11	12	
类型							
鳞癌	10	35	26	0.962	35	36	0.116
腺癌	1	4	3		1	7	
其他	1	3	1		3	2	
T 分级							
T_1	5	6	2	0.006	11	2	0.011
T_2	0	17	7		10	14	
T_3	7	19	21		18	29	
N 分级							
N_0	7	26	16	0.768	25	24	0.318
N_1	5	16	14		14	21	
分期							
Ⅰ	4	6	0	0.023	9	1	0.006
Ⅱ	4	26	18		22	26	
Ⅲ	4	10	12		8	18	
分化							
低	2	17	15	0.156	13	21	0.227
中	4	17	10		13	8	
高	6	18	5		13	16	

2.3 单因素分析

MIF 表达分阴性、阳性和强阳性 3 组,生存曲线分析显示,强阳性表达组与患者预后显著负相关,阴性和阳性表达组术后累计生存率显著高于强阳性表达组($P = 0.021$),见图 2。CTGF 高表达组与低表达组相比,后者生存率较高,CTGF 表达与患者预后亦负相关($P = 0.001$)。见图 3。

2.4 多因素分析

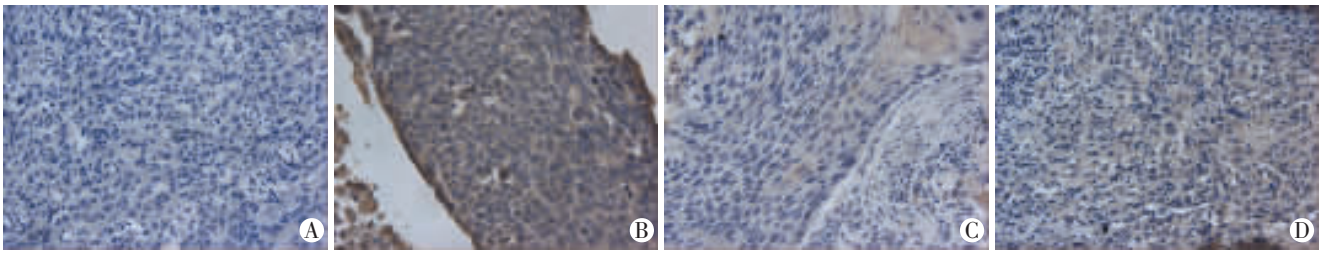
以患者的年龄、性别、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤分化程度、癌组织中 CTGF 和 MIF 表达水平为变量,进行 Cox 多因素回归分析,结果显示,食管癌的独立预后因素为 TNM 分期($P = 0.002$)、肿瘤分化程度($P = 0.000$)及 CTGF 表达水平($P = 0.023$)。而年龄、性别、肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 MIF 表达水平与预后无明显关系($P > 0.05$)。

2.5 相关性分析

在 84 例食管癌组织标本中,MIF 和 CTGF 同时低表达为 30 例,同时高表达为 21 例,通过 2 × 2 配对资料的关联性分析,显示二者在食管癌组织中的表达呈正相关关系($r = 0.238$, $P = 0.024$)。

3 讨论

MIF 不仅作为重要的细胞因子参与机体的炎症及免疫反应,而且和细胞的生长及分化有着非常密切的关系。本研究表明,MIF 低表达组患者生存率明显优于高表达组,其表达水平与肿瘤的浸润深度和临床分期相



A:MIF 低表达;B:MIF 高表达;C:CTGF 低表达;D:CTGF 高表达

图1 MIF 和 CTGF 在食管癌组织中的表达 (S-P ×400)

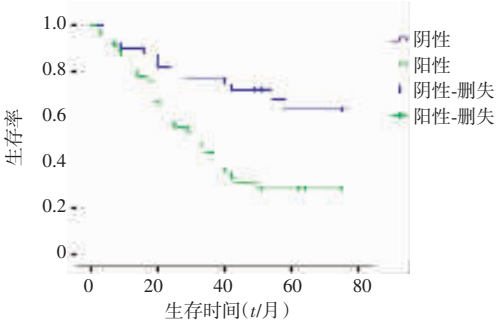


图2 食管癌患者 CTGF 表达与食管癌预后关系生存曲线

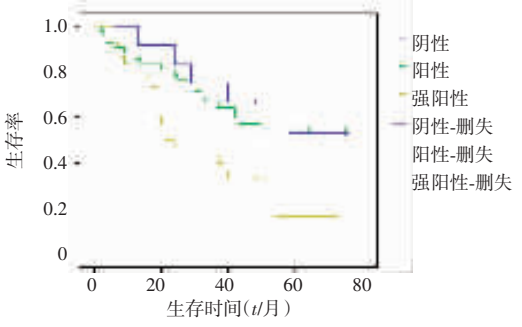


图3 食管癌患者 MIF 表达与食管癌预后关系生存曲线

关,说明 MIF 高表达促进肿瘤的生长及转移。其具体机制目前尚不清楚,可能的因素包括:MIF 可以从转录水平抑制细胞内 P53 的活性,保护肿瘤细胞和其他细胞如巨噬细胞免于凋亡,促进肿瘤的形成[6];另外,食管癌组织中 MIF 过度表达,可以刺激肿瘤细胞分泌血管内皮生长因子和白介素-8,使癌组织中微血管密度增加,且与 MIF 表达水平正相关[7];MIF 可以调节恶性肿瘤的黏附因子,如激活金属蛋白酶-1、金属蛋白酶-9、金属蛋白酶-13 等,引起肿瘤细胞外基质降解,促进肿瘤转移[8]。这说明 MIF 与肿瘤微环境相互作用,通过多个途径共同作用,促进肿瘤的发展及浸润转移。

CTGF 是一种富含半胱氨酸的分泌性多肽,属于生长因子 CCN 基因家族,可由内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞等多种细胞合成分泌。CTGF 不仅与器官纤维化及瘢痕形成密切相关,而且和多种恶性肿瘤的发生发展、血管生成及其预后有密切关系。但是 CTGF 在不同类型的肿瘤中发挥着不同、甚至相互矛盾的功能,可能由于其结构、作用的细胞类型、活化的信号通路不同而出现显著差异。相关研究表明,在结肠癌[9]与肺腺癌[10]及口腔鳞癌[11]中,CTGF 高表达者,疾病进展慢,侵袭和转移能力弱,表明 CTGF 作为肿瘤抑制因子发挥作用;而在乳腺癌[12]中,CTGF 高表达病情恶化快,患者生存期短,预后差,提示它可能成为促肿瘤形成因子。CTGF 是一种新的血管生成促进分子,可以促进血管平滑肌细胞和内皮细胞增殖,介导内皮细胞黏附,诱导内皮细胞形成长管状,从而导致新血管形成,还可以诱导金属蛋白酶类的表达并下调金属酶组织抑制剂的表达,诱导血管生成[13]。通过对前列腺癌的研究发现,CTGF 作为转化生长因子 β1 的下游效应分子,可以促进肿瘤间质血管生成[14]。本研究中高表达 CTGF 的患者预后较差,表明 CTGF 作为促肿瘤形成因子,通过促进肿瘤血管生成这一实体瘤形成的必要生物学过程促进肿瘤的侵袭转移。

本实验中 CTGF 和 MIF 低表达组生存率明显优于高表达组,二者的相关性分析显示正相关,表示二者可能通过不同的作用机制共同促进肿瘤血管生成,在肿瘤细胞浸润转移中可能发挥协同作用,但是二者之间相互作用的分子机制仍有待进一步研究。通过检测 CTGF 的表达联合临床分期可以帮助我们判断食管癌患者的预后。另外,CTGF 可能成为食管癌治疗新的靶向基因,通过抑制其表达,从而抑制肿瘤的生长及转移。

参考文献:

[1] Conroy H, Mawhinney L, Donnelly S C. Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF): the potential missing link[J]. QJM, 2010, 103(11): 831-836.

[2] 吴贤敏, 唐琼兰, 谢贤镛, 等. CTGF 与肿瘤的研究进展[J]. 川北医学院学报, 2007, 22(6): 609-612.

[3] Burke J P, Ferrante M, Dejaegher K, *et al*. Transcriptomic analysis of intestinal fibrosis-associated gene expression in response to medical therapy in Crohn's disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2008, 14(9): 1197-1204.

[4] 赵劲松, 廖克龙. MIF 在食管鳞癌组织和癌旁组织中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 740-742.

[5] Zhou Z Q, Cao W H, Xie J J, *et al*. Expression and prognostic significance of THBS1, Cyr61 and CTGF in esophageal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 291.

[6] Honda A, Abe R, Yoshihisa Y, *et al*. Deficient deletion of apoptotic cells by macrophage migration inhibitory factor (MIF) overexpression accelerates photocarcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(9): 1597-1605.

[7] Ren Y, Law S, Huang X, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor

stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg, 2005, 242(1): 55 - 63.

[8] Yu X, Lin S G, Huang X R, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages *via* the MEK-ERK MAP kinase pathway[J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 27(2): 103 - 109.

[9] Lin B R, Chang C C, Che T F, *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.

[10] Chang C C, Shih J Y, Jeng Y M, *et al*. Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(5): 364 - 375.

[11] Moritani N H, Kubota S, Nishida T, *et al*. Suppressive effect of overexpressed connective tissue growth factor on tumor cell growth in a human oral squamous cell carcinoma-derived cell line[J]. Cancer Lett, 2003, 192(2): 205 - 214.

[12] Kang Y, Siegel P M, Shu W, *et al*. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone [J]. Cancer Cell, 2003, 3(6): 537 - 549.

[13] Yang M, Huang H, Li J, *et al*. Connective tissue growth factor increases matrix metalloproteinase-2 and suppresses tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 production by cultured renal interstitial fibroblasts[J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(6): 817 - 824

[14] Yang F, Tuxhorn J A, Ressler S J, *et al*. Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis [J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8887 - 8895.

(收稿 2010-10-12 修回 2010-11-18)
(编辑 王小宴)

(上接 359 页)

DNA 抽提试剂盒提取总 DNA，并用 Nanodrop 分光光度仪对 DNA 进行定量。DNA 含量的测定方法为：采用 TE 缓冲液（pH = 8.0）将分光光度仪调零，然后取 1 μl DNA 样本测定波长 260 nm 时的吸光度值，自动生成的结果为 DNA 的浓度。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测 mtDNA 的拷贝数 本实验通过测定 mtDNA 的 ND1 基因拷贝数，反映 mtDNA 的拷贝数；β - actin 作为本实验的看家基因，实时荧光定量 PCR 标准品为本室保存的人 β-actin 质粒，通过计算 ND1 拷贝数/β-actin 比值，得到 mtDNA 的相对拷贝数。引物序列：ND1，正义链 5′-ATACAACTACGCAAAGGCCCCA-3′；反义链 5′-AATAGGAGGCCTAGGTTGAGGT-3′。β-actin 正义链 5′-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3′；反义链 5′-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3′。实时荧光定量 PCR 反应体系为：SYRB（含 dNTP、Mg^{2+}、*Taq* 酶、PCR buffer 等）12.5 μl，灭菌水 10.5 μl，基因组 DNA 1 μl，10 pmol/L 的上下游引物共 1 μl。PCR 扩增条件为：95 ℃ 10 s，（95 ℃ 5 s，60 ℃ 20 s 读板）×40 循环。温度从 50 ℃升高到 95 ℃，温度每升高 0.2 ℃读板 1 s，进行融解曲线分析[4]。

1.4 统计学分析

结果以数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并通过 SPSS 12.0 软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

移居高原 1 年的受试者白细胞 mtDNA 的拷贝数为（0.123 8 ± 0.018 0），显著高于平原对照（0.082 2 ± 0.009 4）和高原肺水肿患者（0.029 1 ± 0.005 5）（$P < 0.05$）。高原肺水肿患者中的 mtDNA 拷贝数显著低于平原对照、世居藏族（0.084 7 ± 0.012 8）（$P < 0.05$）。

3 讨论

线粒体是细胞进行氧化磷酸化反应的主要场所，是高等动物细胞核外唯一含有 DNA 的细胞器。mtDNA 的功能不但与其结构完整性有关，还与其拷贝数有关。mtDNA 拷贝数增加被认为是总线粒体呼吸功能的代偿[4]。高原缺氧时线粒体的变化尚不统一，通过低压舱模拟海拔 4 400 m 高原慢性缺氧 9 个月后，大鼠肝脏和心脏每克组织中线粒体蛋白增加，电镜分析发现线粒体数量和体积密度均增加。有文献报道出生并生活在 4 250 m 高原的牛心肌线粒体数目增加 40%，兔和豚鼠心肌和大鼠脑线粒体密度没有增加，而习服高原低氧的人，骨骼肌线粒体数量反而下降[5]。因而缺氧时在细胞分子水平是否通过改变 mtDNA 的拷贝数来促进高原习服适应尚不清楚。每个线粒体内含有多个 mtDNA，缺氧时自由基的生成增加，导致 mtDNA 的拷贝数增加，每个细胞中 mtDNA 的拷贝数增加与机体受到的氧化损伤程度密切相关[6]，mtDNA 的增加可以弥补线粒体的功能降低。本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测白细胞 mtDNA 的相对拷贝数，结果发现 mtDNA 的拷贝数在移居汉族中最高，世居藏族中较低，平原汉族中次之，高原肺水肿患者中最低。提示我们移居高原 1 年时，机体通过增加 mtDNA 的数量，来代偿线粒体的功能，促进高原习服。在获得高原适应的世居藏族中，mtDNA 的拷贝数逐渐降低。高原肺水肿是一种特发于高原低氧环境的肺水肿，也是一种高原习服不良的急性高原病，本室前期研究[7]发现了 mtDNA 3010、mtDNA 3970 等位点的变异与高原肺水肿易感性密切相关，提示 mtDNA 的序列改变导致线粒体的功能改变，最后可能引起高原肺水肿。线粒体的功能改变也与 mtDNA 数目改变密切相关。本研究发现高原肺水肿患者中 mtDNA 的数目很低，提示低 mtDNA 拷贝数可能是高原肺水肿的遗传标记之一，也可能是其发病原因之一。

参考文献：

[1] 罗勇军，高钰琪. 线粒体基因组变异与高原环境适应相关性研究进展[J]. 国际遗传学杂志，2010，33(6)：336 - 339.

[2] Luo Y, Gao W, Gao Y, *et al*. Mitochondrial genome analysis of Ochotona curzoniae and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation [J]. Mitochondrion, 2008, 8 (5/6): 352 - 357.

[3] 罗勇军. 线粒体基因组与高原习服适应相关性的初步研究[D]. 重庆：第三军医大学，2008.

[4] 罗勇军，刘昕. 定量 PCR 的标准品的制备及应用[J]. 重庆医学，2005，34 (3)：414 - 415.

[5] Lee H C, Wei Y H. Mitochondrial role in life and death of the cell [J]. J Biomed Sci, 2000, 7(1): 2 - 15.

[6] 高钰琪. 高原病理生理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2006：62.

[7] 商学军，黄宇烽，叶章群，等. 褪黑素在活性氧致精子线粒体功能损伤中的保护作用[J]. 中华男科学杂志，2004，10(8)：604 - 607.

(收稿 2010-11-22 修回 2010-12-09)
(编辑 栾 嘉)