基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1472-03

TFPI-2 在肝癌和正常肝组织中表达的差异

周金敬[1],徐 勇[2],涂植光[1]

(1. 重庆医科大学检验系临床检验诊断学实验室,重庆 400016;2. 深圳市人民医院龙华分院,广东 518020)

【摘 要】目的:探讨肝癌组织和癌旁正常肝组织中组织因子途径抑制物 2(Tissue factor pathway inhibitor-2,TFPI-2)基因及蛋白表达情况。方法:应用原位杂交和免疫组织化学技术检测 30 例肝癌患者的癌组织和癌旁正常肝组织中 TFPI-2 的基因和蛋白表达。结果:正常肝组织中 TFPI-2mRNA 的表达显著高于肝癌组织($P<0.05$),TFPI-2 指数分别为 88.23 ± 1.43 和 30.66 ± 2.47;正常肝组织中 TFPI-2 蛋白的表达显著高于肝癌组织($P<0.05$),TFPI-2 指数分别为 46.60 ± 1.80 和 22.54 ± 1.22。结论:肝癌组织和正常肝组织中 TFPI-2mRNA 和蛋白表达均存在明显差异,为进一步探讨 TFPI-2 表达与肝癌的发展、侵袭转移的关系提供了理论依据。

【关键词】组织因子途径抑制物 2;肝癌;原位杂交;免疫组化

【中国图书分类法分类号】R73-37 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-16

Difference in expression of TFPI-2 mRNA and protein between hepatocellular carcinoma and normal hepatic tissue

ZHOU Jin-jing, et al

(*Department of Medical Laboratory, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of tissue factor pathway inhibitor-2(TFPI-2) in hepatocellular carcinoma and tumor-adjacent normal tissue. *Methods*: The expression of TFPI-2 mRNA and protein were determined respectively by in situ hybridization(ISH) and immunohistochemical staining(IHC) in 30 cases of hepatic cancer tissue and tumor-adjacent normal tissues. *Results*: The expression of TFPI-2 mRNA was obviously higher in normal tissues than in carcinoma($P<0.05$), with the indices of 88.23 ± 1.43 and 30.66 ± 2.47 respectively. The expression of TFPI-2 protein in normal tissues was higher than that in carcinoma($P<0.05$), with the indices of 46.60 ± 1.80 and 22.54 ± 1.22 respectively. *Conclusion*: The difference in the expression of TFPI-2 is detected between hepatocellular carcinoma and normal hepatic tissue, which provides a theoretical basis for further study on the relation between TFPI-2 and the progression, invasion, and metastasis of liver cancer.

【Key words】Tissue factor pathway inhibitor-2; Hepatic cancer tissue; In situ hybridization; Immunohistochemistry

人组织因子途径抑制物 2(Human tissue factor pathway inhibitor-2,TFPI-2),是一种 Kunitz 型蛋白酶抑制剂[1],可抑制降解细胞外基质的多种蛋白酶。TFPI-2 基因分布广泛,在人类肝、肾、心、骨骼肌等正常组织中有着高度表达,而在一些肿瘤组织中表达降低。近年来研究显示,TFPI-2 的表达在抑制肿瘤侵袭转移中发挥着重要作用。目前国内尚未见到有关 TFPI-2 在肝癌中的研究报道。本研究以初步研究结果为依据[2,3],利用原位杂交和免疫组化技术检测 TFPI-2 在肝癌组织和正常肝组织中 mRNA 和蛋白表达的差异来探讨 TFPI-2 在肝癌的发展、侵袭转移中的作用。

作者介绍:周金敬(1982-),女,硕士,

研究方向:抗肿瘤细胞侵袭转移相关基因的功能研究。

通讯作者:涂植光,男,教授,E-mail: tuzhiguang@yahoo.com.cn。

基金项目:广东省医学科研基金(B2004107)及深圳市医学科研基金(200404052)。

1 材料与方法

1.1 标本收集

组织标本取自深圳市人民医院肝胆外科 2006 年 11 月~2008 年 3 月经手术切除的新鲜肝细胞肝癌组织及瘤旁的正常组织。标本取出后立即以 4%的多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,制作厚度为 6 μm 的切片备用。

1.2 主要试剂

人 TFPI-2 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;二步法免疫组化检测试剂及浓缩型 DAB 试剂

盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;抗人 TFPI-2 单克隆抗体购自美国R&D 公司。针对人 TFPI-2 靶基因的 mRNA 序列为:①5'-ACGAC AGGTACACGCACAGCTGCCG CCAGTTCCTG-3';② 5'-TACACCTGGGAGGCTTCCGACGA TGCTTGCTGGAG -3';③5'-TATTTTAATCCAAGATACAGA ACCTGT GATGCTTT -3'。

1.3 方法

1.3.1 原位杂交 人 TFPI-2 原位杂交检测试剂盒采用针对 TFPI-2 的寡核苷酸探针,经地高辛标记。原位杂交所用试剂均经 0.1%的 DEPC 处理。石蜡组织切片经常规脱蜡至水,按 TFPI-2 原位杂交检测试剂盒说明进行实验操作:3%H_2O_2 灭活,胃蛋白酶消化,1%多聚甲醛后固定,预杂交,杂交,封闭液、生物素化鼠抗地高辛、SABC 作用,DAB 避光显色,苏木素复染,中性树胶封片。以 PBS 代替杂交液作为阴性对照。

1.3.2 免疫组化 组织切片经脱蜡至水,按二步法免疫组化检测试剂说明进行实验操作:3%H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶;加 TFPI-2 单克隆抗体,4℃过夜;加山羊抗小鼠 IgG 抗体-HRP 多聚体,37℃处理 30 min;加新鲜配置的 DAB 显色液,避光显色;苏木素复染,中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3.3 结果判定 实验设有阳性对照和阴性对照,以已知阳性表达的胎盘组织作为阳性对照。TFPI-2mRNA 阳性表达定位于细胞胞浆中,以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片随机选取 5 个高倍视野(×400),计数 100 个细胞,计算阳性细胞所占百分比为 TFPI-2 标记指数。免疫组化结果判定同上。

1.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计学软件 SPSS11.5 进行 t 检验分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 正常肝组织和肝癌组织中 TFPI-2mRNA 的表达

TFPI-2 原位杂交结果见图 1、2。TFPI-2mRNA 表达主要分布在肝细胞胞浆中,为粗细不一的棕黄色颗粒。在血管内皮细胞,尤其肝汇管区也有着丰富的表达。正常肝组织中 TFPI-2mRNA 的表达水平显著高于肝癌组织,TFPI-2 指数分别为 88.23±1.43 和 30.66±2.47,差别有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 正常肝组织和肝癌组织中 TFPI-2 蛋白的表达

TFPI-2 免疫组化结果见图 3、4。TFPI-2 蛋白为分泌性蛋白,在细胞外基质,血管周围有着高丰度的表达,部分分布在肝细胞胞浆中,为粗细不一的棕黄色颗粒。正常肝组织中 TFPI-2 蛋白的表达水平显著高于肝癌组织,TFPI-2 指数分别为 46.60±1.80 和 22.54±1.22,差别有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,有着高度的肝内侵袭性和转移性。目前肝癌治疗的研究重点,已经从单纯研究手术治疗、化疗、放疗手段以及

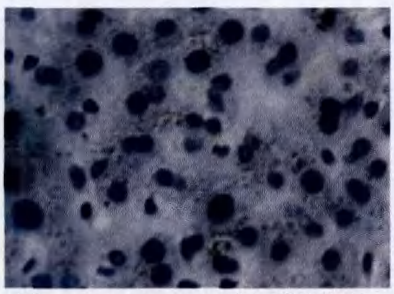


图 1 TFPI-2mRNA 在正常肝组织中的表达(免疫组化×400)

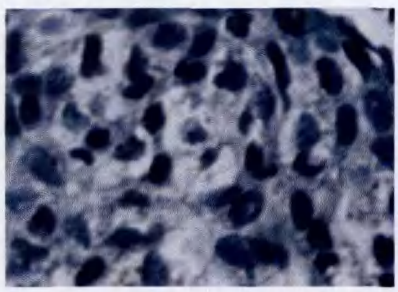


图 2 TFPI-2mRNA 在肝癌组织中的表达(免疫组化×400)

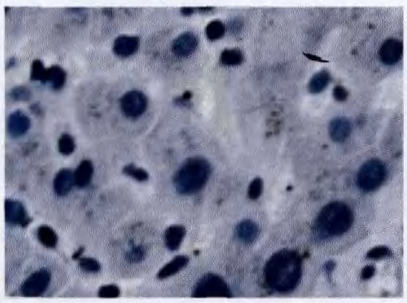


图 3 TFPI-2 蛋白在正常肝组织中的表达(免疫组化×400)

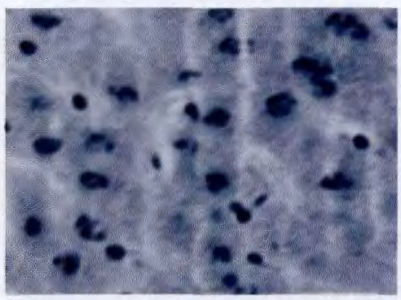


图 4 TFPI-2 蛋白在肝癌组织中的表达(免疫组化×400)

寻找抗肿瘤药物,转移到了如何在手术和放/化疗后,抑制残存肿瘤细胞的再增殖和侵袭转移。肿瘤细胞合成分泌的纤溶酶、基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase,MMPS)、胰蛋白酶等多种蛋白酶对细胞外基质(Extracelluar matrix,ECM)中的胶原蛋白、蛋白多糖、层粘连蛋白、纤维结合素等成分具有强大的降解能力,在实现肿瘤细胞侵袭转移中起着关键作用[3]。

TFPI-2 基因位于人类 7 号染色体 q22[4],属于 Kunitz 结构超家族的成员。TFPI-2 是一种广谱丝氨酸蛋白酶抑制剂,体外可强烈抑制包括纤溶酶、胰蛋白酶、基质金属蛋白酶 1(Matrix metalloproteinase -1,MMP-1)和 3(Matrix metalloproteinase-3,MMP-3)在内的多种蛋白酶活性,在纤溶、伤口愈合及血管生成等一系列生理病理过程中发挥着重要作用,尤其在防止 ECM 降解与肿瘤细胞的侵袭转移中起着重要作用[5]。在一些恶性肿瘤中,TFPI-2 的表达明显降低,甚至丢失,而将带有 TFPI-2 基因的表达载体转染入恶性肿瘤细胞可明显抑制肿瘤细胞的侵袭转移性。Konduri 等[6]的研究表明,TFPI-2 能明显抑制黑色素瘤细胞、肺癌细胞、神经胶质瘤细胞等的侵袭能力;国内也有研究发现 TFPI-2 在胰腺癌、卵巢癌等的侵袭转移中有明显的抑制作用[7,8]。TFPI-2 不仅通过抑制多种蛋白酶的活性来维持 ECM 稳定,还通过调节肿瘤细胞的增殖与凋亡[9],进而抑制肿瘤的侵袭生长;TFPI-2 能明显抑制肿瘤血管内皮生长因子的产生,抑制肿瘤的血管生成[10],从而降低了恶性肿瘤的侵袭转移潜能。TFPI-2 可能在肿瘤侵袭发展的多个环节中起负调控作用。

在本实验中,我们采用原位杂交和免疫组化技术检测肝癌组织和癌旁正常肝组织中 TFPI2mRNA 及其相应蛋白的表达,结果显示正常肝组织中 TFPI-2 有着高丰度的转录水平和蛋白表达,而在肝癌组织中的表达显著减少,提示 TFPI-2 表达的减少和丢失可能是导致肝癌具高度侵袭性和转移性的原因,其具体机制有待进一步研究。在后续实验中,我们会将 TFPI-2 转染入肝癌细胞 HepG2 中进一步研究 TFPI-2 的表达对肝癌细胞侵袭转移的作用及其机制,为寻找新的肝癌治疗方法提供思路。

参 考 文 献

[1] Neaud V, Duplantier J G, Mazzocco C, et al. Thrombin up-regulates tissue factor pathway inhibitor-2 synthesis through a cyclooxygenase-2-dependent, epidermal growth factor receptor-independent mechanism[J]. Blood, 2004,279(7): 5200-5206.

[2] 徐 勇, 刘雪燕, 李体远, 等. 中国人 TFPI-2 基因的克隆及测序分析[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2005,26(7): 388-389.

[3] 毕 晓, 徐 勇, 涂植光. 中国人组织因子途径抑制物 -2 基因的真核表达载体的构建[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(2):106-107.

[4] Kong D, Ma D, Bai H, et al. Expression and characterization of the first kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor-2[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,324 (4):1179-1182.

[5] Chand H S,Foster D C,Kisiel W,et al. Structure,function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2 [J]. Thromb Haemost,2005,94 (6): 1122-1130.

[6] Konduri S D,Rao C N,Chandrasekar N,et al. A novel function of tissue factor pathway inhibitor-2(TFPI-2) in human glioma invasion[J]. Oncogene,2001,20(47): 6938-6945.

[7] 仲 任, 黄瑞滨, 宋善俊, 等. 组织因子途径抑制物 2 对卵巢癌细胞迁徙和浸润能力的影响[J]. 癌症, 2003, 22(10):1038-1041.

[8] 汤志刚, 孙振阳, 胡何节, 等. TFPI-2 对胰腺癌细胞体内和体外侵袭能力的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志,2008,15(1):46-50.

[9] Kondraganti S,Gondi C S,Gujrati M,et al. Restoration of tissue factor pathway inhibitor inhibits invasion and tumor growth in vitro and in vivo in a malignant meningioma cell line[J]. Int J Oncol,2006,29(1):25-32.

[10] Chand H S, Du X, Ma D, et al. The effect of human tissue factor pathway inhibitor-2 on the growth and metastasis of fibrosarcoma tumors in athymic mice[J]. Blood,2004,103(3):1069-1077.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132