维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0615-03

术前介入化疗对大肠癌组织 Smad4 表达的影响

李 毅,程 勇,张 伟

(重庆医科大学附属第一医院胃肠外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨术前介入化疗对大肠癌 Smad4 表达的影响。方法:应用免疫组化 SP 技术对 15 例经术前介入化疗的进展期大肠癌标本进行 Smad4 检测,并以 18 例经全身静脉化疗及 21 例未经化疗进展期大肠癌作为对照。结果:在 3 个组中 Smad4 的表达呈递增趋势($P<0.05$),其阳性率为未经化疗的空白对照组 19.0%(4/21)、全身静脉化疗组 61.1%(11/18)、介入化疗组 93.3%(14/15)($P<0.05$)。结论:术前介入化疗可使进展期大肠癌组织中 Smad4 表达明显增高,术前介入化疗可作为比全身静脉化疗更为有效的一种治疗进展期大肠癌的辅助化疗手段。

【关键词】介入化疗;大肠癌;Smad4

【中国图书分类法分类号】R730.53 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-19

Effects of preoperative intraarterial infusion chemotherapy on the expression of Smad4 in colorectal carcinoma

LI Yi, et al

(*Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of preoperative intraarterial infusion chemotherapy on the expression of Smad4 in colorectal carcinoma. *Methods*: 15 cases of advanced colorectal carcinoma were treated with preoperative intraarterial infusion chemotherapy, 18 cases treated with systemic chemotherapy and 21 cases treated with operation served as the control group. The expression of Smad4 was detected by immunohistochemic S-P method. *Result*: Among the three groups, the expression level of Smad4 gradually increased($P<0.05$). Positive expression of Smad4 in three groups were 19.0 %(4/21)(operation served), 61.1% (11/18)(vein chemotherapy) and hespectively 93.3% (14/15)(preoperative intraarterial infusion chemotherapy)($P<0.05$). *Conclusion*: Preoperative intraarterial infusion chemotherapy could induce the high level of Smad4 expression, so it could be a more effective chemotherapy than systemic chemotherapy.

【Key words】 Intraarterial infusion chemotherapy; Colorectal carcinoma; Smad4

大肠癌是我国常见恶性肿瘤,常规的治疗以手术治疗为主,辅以放疗及化疗,但是由于大多数肿瘤病人发现较晚,术中术后多发现淋巴结转移,给手术根治带来困难,术后复发机率也较高,而术前介入化疗作为一种有效的新辅助化疗方法,在临床上得到广泛应用。在胞内信号分子 Smads 蛋白家族中,Smad4 是调节转录和 TGF-β 抗增殖应答的重要因子,在 TGF-β/Smad 信号传输途径中处于中枢位置,本研究旨在探讨术前介入化疗对大肠癌 Smad4 表达的影响,为临床医师对进展期大肠癌实施术前化疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 病例资料

本研究对象为 2005 年 9 月~2007 年 8 月重庆医科大学附属第一医院胃肠外科收治的进展期大肠癌患者,随机分为术前化疗组(术前介入化疗+根治术)15 例,其中结肠癌 4 例、直肠癌 11 例;全身静脉化疗组(术前静脉化疗+根治术)18 例,其中结肠癌 6 例、直肠癌 12 例;非化疗组(仅行根治手术)21 例,其中结肠癌 7 例、直肠癌 14 例。介入化疗组男 9 例、女 6 例,年龄 42~70 岁;静脉化疗组男 10 例、女 8 例,年龄 45~68 岁;非化疗组男 13 例、女 8 例,年龄 40~71 岁。所有患者术前均经病理确诊,术后经病理诊断均为腺癌。患有

作者介绍:李 毅(1979-),男,硕士,研究方向:胃肠道肿瘤。

通讯作者:程 勇,男,副教授,Email:chengyongcq@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

心、肺、肝、肾重要器官疾病，近期接受放化疗，恶病质，重度贫血，白细胞记数<4.0×10⁹个/L以及未行根治术的患者不入组。所有标本均经10%福尔马林固定，石蜡包埋4μm连续切片，重新HE染色，复查确诊。

1.2 化疗方案

介入化疗：采用Seldinger法经皮股动脉穿刺插管，在数字血管减影(Digital subtraction angiograph，DSA)下根据肿瘤位置和造影显示，超选相应动脉，先一次性推注奥沙利铂130mg/m²，LV200mg/m²，5-FU 0.75g/m²，药物注射完毕后，在超选肿瘤血管后，再以超液化碘油、明胶海绵细条或丝线进行栓塞。一般先以超液化碘油与少量奥沙利铂混合均匀作栓塞剂栓塞，在DSA下观察碘油在肿瘤局部沉积满意，无返流即可，常用量5～7ml。若沉积不满意，改用明胶海绵细条或丝线栓塞。所有患者于介入后7～21d(平均14d)手术。

全身化疗：术前应用奥沙利铂130mg/m²，LV200mg/m²，5-FU 0.75g/m²行5d全身静脉化疗，并予止吐治疗，定期检测肝肾功能、血常规，所有患者于化疗后7～21d(平均14d)手术。

1.3 主要试剂

鼠抗人Smad4单抗购自武汉博士德生物技术有限公司，免疫组化S-P9000型试剂盒及DAB显色剂均购自北京中杉试剂公司。

1.4 检测方法

Smad4工作浓度为1∶100，按S-P试剂盒实验步骤操作。切片常规脱蜡水化，过氧化氢封闭内源性过氧化物酶，胰酶消化，蒸馏水漂洗，枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复20min，室温冷却后PBS漂洗3次，正常血清封闭，鼠抗人Smad4抗体37℃孵化2～3h，PBS漂洗3次，滴加二抗37℃，30min，PBS漂洗3次，DAB显色，苏木素复染，常规脱水、透明、封片。用PBS液替代一抗做阴性对照，以细胞浆和(或)细胞核内有棕黄色颗粒沉淀者为表达阳性细胞。结果判定：参照Salovaara R[11]标准判定结果：光镜下以阳性细胞数占整个观察细胞的百分率评价(取10个高倍镜视野的平均数)：<5%阳性为(-)，5%～9%阳性为(+)，10%～34%阳性为(++)，>35%阳性为(+++)。

1.5 术后疗效分析

疗效评定参照胃癌化疗组织学疗效评定标准。0级：无效。未见癌细胞和组织因治疗引起的变性坏死损害；Ⅰ级：轻效，2/3以下的癌细胞发生变性坏死和溶解；Ⅱ级：轻显效，2/3以上的癌细胞发生变性坏死溶解；Ⅲ级：显效，癌细胞全部变性坏死溶解或消失，有时可见癌组织为肉芽组织或纤维组织所代替。

1.6 统计学分析

采用SPSS12.0统计学软件包，进行方差分析、χ^2检验，条件不满足者用Fisher精确概率法检验，以$P<0.05$作为有统计学意义的判断标准。

2 结 果

2.1 疗效结果

介入化疗组0级1例、Ⅰ级1例、Ⅱ级9例、Ⅲ例4例，总有效率93.3%；其中有8例发现淋巴结转移，转移率53.3%。全身化疗组0级5例、Ⅰ级4例、Ⅱ级7例、Ⅲ例2例，总有效率72.2%；其中有14例发现淋巴结转移，转移率77.7%。未经化疗组0级21例、Ⅰ级0例、Ⅱ级0例、Ⅲ例0例，总有效率0%；其中有19例发现淋巴结转移，转移率90.4%。

2.2 Smad4在大肠癌中的表达

在全身静脉化疗和介入化疗组中，Smad4蛋白除表达于细胞浆以外，也可见于少数细胞核，在未经化疗的空白对照组中，Smad4蛋白主要表达于细胞浆中，以腺体的体部和底部最为明显，而细胞核内则几乎无表达。未经化疗组Smad4蛋白的阳性表

表1 Smad4在不同实验组中的表达

阳性等级	Smad4		
	未经化疗组	全身化疗组	介入化疗组
+++	1	7	13
++	2	1	1
+	1	3	0
-	17	7	1

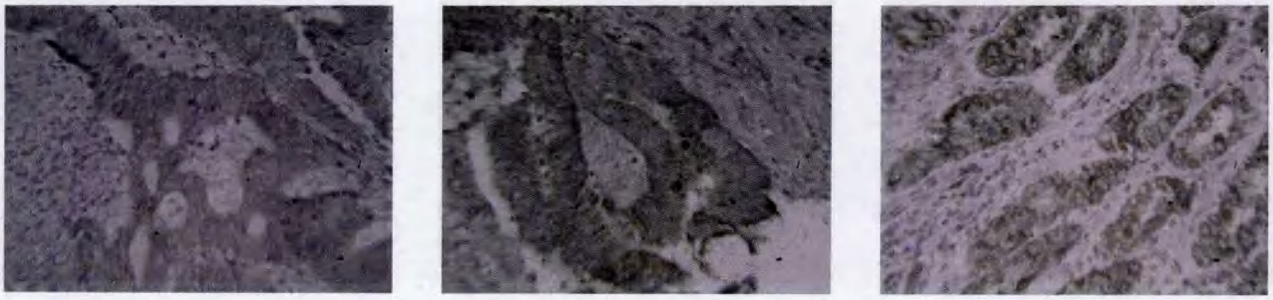
注：未经化疗组与全身化疗组比较$P=0.020$；全身化疗组与介入化疗组比较$P=0.028$；未经化疗组与全身化疗组、介入化疗组两两比较$P=0.000\ 1$。

表2 Smad4表达阳性率

组别	阳性例数	阴性例数	合计	阳性率(%)
未经化疗组	4	17	21	19.0
全身化疗组	11	7	18	61.1
介入化疗组	14	1	15	93.3

注：未经化疗组与全身化疗组比较$P=0.010$；全身化疗组与介入化疗组比较$P=0.046$；未经化疗组与全身化疗组、介入化疗组两两比较$P=0.000\ 1$。

维普资讯 http://www.cqvip.com



A B C

A. Smad4 在未化疗组的表达；B. Smad4 在全身化疗组的表达；C. Smad4 在介入化疗组表达

图 1 Smad4 在不同实验组的表达

达显著低于全身静脉化疗组和介入化疗组，差异均有显著性（$P<0.05$），全身静脉化疗组和介入化疗组相比较，前者表达低于后者（$P<0.05$）。见表 1、表 2 及图 1。

3 讨 论

大肠癌是我国常见恶性肿瘤，目前对早期大肠癌的手术治疗已取得良好疗效，但其早期多无特异性症状，半数以上患者就诊时已为中晚期，手术切除困难，术前介入化疗在肿瘤的各级血管结构尚未被手术破坏之前对肿瘤的主要滋养动脉给药，2/3 以上的药物在肿瘤局部产生作用，研究表明化疗药物的局部浓度增加 1 倍，对肿瘤的杀伤作用可增强 10 倍，因此介入化疗在相同药物剂量的条件下，对肿瘤的杀伤作用将更为明显，从而可以起到肿瘤降期及提高手术切除率的目的。而通过肿瘤动脉直接给药，既可作用于肿瘤本身及周围淋巴结，又可通过门静脉到达肝脏，对肝内的转移灶起到杀伤作用，未被代谢的药物进入体循环，对全身治疗也起到一定作用，而且对全身重要脏器系统的影响也相对较小[2]。

大肠癌的发生发展是一个涉及多种基因改变和多阶段致癌的复杂过程，许多细胞，包括恶性转化的细胞的生长和功能都受 TGF-β/Smad 信号通路的调控，而 $TGF-\beta_1$ 的表达与大肠癌淋巴结转移、临床病理分期（Dukes 分期）及患者术后复发率、生存率相关[3]。位于 18q21 染色体上的 Smad4 蛋白的突变目前被认为是大肠癌发生发展的重要因素，观察研究显示 Smad4 在胰腺癌中的突变占到 50%，在大肠癌中的突变则有大约 15%[4]。它在信号传输途径中处于中枢位置，是将 TGF-β 信号由胞浆传至胞核的信使，李琨琨等[5]采用免疫组化 S-P 法检测 64 例大肠癌组织中 $TGF-\beta_1$ 和 Smad4 蛋白，结果提示随着大肠癌侵润及转移的发展，Smad4 的阳性率明显下降，提示 Smad4 的低表达使 $TGF-\beta_1$ 抑制肿瘤生长的传导通路被阻断，与大肠癌的发展及预后有密切关系。国外也有研究表明 Smad4 在结肠癌中功能性缺失率为 30%[6]。Hafid 等[7]应用免疫组化法检测 86 名 Duckes C 的大肠癌患者癌组织中Smad4 表达水平，及其与生存率的关系，结果显示 Smad4 低表达组的中位生存期为 1.7 年，而高表达组患者生存期均大于 9 年，表明 Smad4 表达水平与患者预后有显著关系。

本实验发现：在全身静脉化疗和介入化疗组中，Smad4 蛋白除表达于细胞浆以外，也可见于少数细胞核，在未经化疗的空白对照组中，Smad4 蛋白主要表达于细胞浆中，以腺体的体部和底部最为明显，而细胞核内则几乎无表达，提示化疗可能通过重新激活被阻断的 TGF-β/Smad 通路，达到对消化道肿瘤的治疗目的。而从 Smad4 蛋白阳性表达率来看，未经化疗组（19.0%）＜全身化疗组（61.1%）＜介入化疗组（93.3%），符合近期疗效结果，提示介入化疗能更加有效的通过 Smad4 蛋白，影响 TGF-β/Smad 通路。

本实验对比研究了 3 组大肠癌中 Smad4 的表达，结果显示从未经化疗的空白对照组→全身化疗组→介入化疗组，Smad4 的表达递增趋势，由此可以得出，术前介入化疗能更为有效的通过 Smad4 干预 TGF-β/Smad 通路，从而达到对大肠癌的治疗作用，可作为比全身静脉化疗更为有效的一种治疗进

（下转第 637 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

uterine leiomyomata[J]. Am J Obstet Gynecol,2003;101(3):431-437.
[3] 田 杰,赵曼曼,温锦英,等. 不同术式子宫切除术对患者内分泌及骨代谢的影响[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2003;19(8):497-498.
[4] Spies J,Patel A,Epstein N,et al. Recent advances in uterine fibroid embolization[J]. Curr Opin Obstet Gynaecol,2005;17(6):562-567.
[5] 霍 钢,李九州,郑履平,等.高强度聚焦超声损伤离体恶性胶质瘤的研究[J]. 第三军医大学学报,2006;28(11):1229-1230.

(责任编辑:冉明会)

(上接第 563 页)

[1] Wayne LG. Dormancy of mycobacterium tuberculosis and latency of disease[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,1994;13(11):908-914.
[2] Vladimir VY,Tatiana KK,Elvira IR,et al. Proteins of the Rpf Family:Immune Cell Reactivity and Vaccination Efficacy against Tuberculosis in Mice[J]. Infection and Immunity,2003;71(8):4789-4794.
[3] Galina V,Mukamolova GV. A family of autocrine growth factors in Mycobacterium tuberculosis[J]. Molecular Microbiology,2002;46(3):623-635.
[4] Galina V,Mukamolova GV,Arseny S,et al. A bacterial cytokine [J]. Microbilogy,1998;95(15):8916-8921.
[5] Martin CG,Nicholas HK,Angharad PD,et al. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain[J]. Trends in biochemical sciences,2004;29(1):7-10.
[6] Sergey B,Mukamolova GV,Vasiliy P,et al. Culturability of Mycobacterium tuberculosis cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promoters recovery[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology,2000;29(8):233-240.
[7] Adrie JC,Edsmond MC,Mary KH,et al. Mycobacterium tuberculosis WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth[J]. PNAS,2002;99(5):3147-3152.
[8] Martin CG,Philippe B,Brian H,et al. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from Mycobacterium tuberculosis shows homology to lysozymes[J]. Nat Struct Mol Biol,2005;12(3):270-273.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 617 页)

展期大肠癌的辅助化疗手段。

参 考 文 献

[1] Salovaara R,Roth S. Frequent loss of Smad4/DPC4 protein in colorectal cancers[J]. Colorectal Cancer,2002;51(1):56-59.
[2] Inagaki M,Yagi T,Shima Y,et al. A successful case of preoperative intermittent hepatic arterial infusion of high-dose 5-FU and pharmacokinetic modulating chemotherapy against unresectable liver metastasis of colon cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho,2000;27(12):1830-1833.
[3] 唐 华,张才全.TGF-1 蛋白在大肠癌组织的表达及意义[J].重庆医科大学学报,2004;29(1):71-73.
[4] Rik Derynck,Rosemary J. Akhurst,Allan Balmain.TGF-signaling in tumor suppression and cancer progression[J]. Nature Genetics,2001;29(10):117-129.
[5] 李锟锟,王 黎,刘益清,等.TGFβ-1 及 Smad4 在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 河南肿瘤学杂志,2004;17(2):86-88.
[6] Pizzi S,Azzoni C,Bassi D,et al. Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract [J]. Cancer, 2003;98(6):1273-1282.
[7] Alazzouzi H,Alhopuro P. SMAD4 As a PrognosticMarker in Colorectal Cancer[J]. Clin Cancer Res,2005;11(7):2606-2611.

(责任编辑:冉明会)