DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.008
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1021-03

论著

Smad4蛋白在胃癌组织中表达的研究

张朋彬[1],徐采朴[2],史景泉[3] (第三军医大学:[1]附属新桥医院消化内科,重庆 400037;[2]附属西南医院全军消化专科中心;[3]附属西南医院病理学研究所;重庆 400038)

提 要:目的 了解Smad4蛋白在胃癌组织中的表达情况及其意义。方法 应用免疫组织化学方法,对10例正常胃粘膜组织和61例胃癌组织(高中分化腺癌22例,低分化腺癌29例,粘液腺癌3例,印戒细胞癌7例)中的Smad4的表达进行检测。结果 在正常胃粘膜组织,Smad4蛋白主要存在于腺体体底部细胞胞浆中。在胃癌组织,Smad4表达于胞浆及少量细胞核中,它在低分化胃癌组织中的表达明显减少(与正常胃粘膜和高分化腺癌相比,$P<0.01$,$P<0.05$),而且分化越差的胃癌组织,其表达越少。提示在胃癌发生、发展中起了重要作用。结论 Smad4在低分化胃癌组织中表达明显减少,可能在胃癌的发生发展过程中起了一定作用。

关键词:Smad4;胃肿瘤;免疫组织化学
中图法分类号:R341;R394.2;R735.2 文献标识码:A

Expression of Smad4 protein in gastric carcinoma tissue

ZHANG Peng-bin, XU Cai-pu, SHI Jing-quan (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Smad4 protein in gastric carcinoma tissue. Methods Smad4 protein was detected in 10 normal gastric tissue and 61 gastric carcinoma tissue by immunohistochemical method. Results Smad4 protein was mainly expressed in the cytoplasm of the lower parts of the gastric gland adeno in normal gastric tissue and was decreased in gastric carcinoma tissue, especially in the poorly differentiated carcinoma tissue (compared with normal tissue and well differentiated adenocarcinoma carcinoma tissue, $P<0.01$, $P<0.05$). Conclusion Smad4 protein is decreased in poorly differentiated gastric carcinoma tissue, and it may play a role in the development of gastric carcinama.

Key words: Smad4 protein, stomach neoplasm, immunohistochemistry

转化生长因子β(Transforming growth factor β, TGFβ)是一具有多功能的细胞因子,对细胞的生长、分化有着重要的调节作用[1]。它可抑制大多数细胞的生长,如上皮细胞、血液细胞等,并可诱导细胞发生凋亡[2]。Smad4蛋白为传导TGFβ信号的细胞内信使,它将TGFβ信号从细胞膜传至细胞核。我们应用免疫组织化学方法,对Smad4蛋白在胃癌组织中的表达进行了研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

所有标本为我院1997—1998年手术切除胃癌石蜡标本,共61例。其中高分化腺癌22例,低分化腺癌29例,粘液腺癌3例,印戒细胞癌7例。男43例,女19例,平均年龄55.1岁。以癌旁正常胃粘膜组织作为正常对照,共10例。标本连续切5μm厚,供HE染色及免疫组织化学用。

1.2 免疫组织化学染色方法

免疫组织化学采用ABC法,羊抗人Smad4(C端)抗体购自Santa Cruz公司,ABC试剂盒购自武汉博士德公司。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,正常血清封闭,羊抗人Smad4抗体(1∶100)4℃过夜,生物素化兔抗羊IgG 37℃孵化20 min,SABC 37℃孵育20 min,DAB显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。以细胞浆和/或细胞核内有棕黄色沉淀者为表达阳性细胞。观察其表达阳性率,结果表示为无表达(—),1%~25%阳性为(+),26%~50%阳性为(++),51%~75%阳性为(++),>75%阳性为(+++)。

1.3 统计学分析

计数资料,采用χ^2检验。

2 结果

Smad4在正常胃粘膜组织及胃癌组织中的表达情况见表1。

表1 Smad4蛋白在正常胃粘膜组织和胃癌组织中的表达

Tab 1 Expression of Smad4 protein in normal gastric mucosa and gastric carcinoma tissue

Type of tissue	n	Expression of Smad4 protein				
		—	+	++	++	+++
Normal gastric mucosa	10			6	4	
Well and moderately differentiated adenocarcinoma	22		6	7	4	5
Poorly differentiated adenocarcinoma[2]	29		3	21	5	
Signet-ring cell carcinoma[1,2,3]	10	1	7	2		

1: $P<0.01$ *vs* Normal gastric mucosa; 2: $P<0.05$ *vs* Well and moderately differentiated adenocarcinoma; 3: $P<0.01$ *vs* Poorly differentiated adenocarcinoma

在正常胃粘膜组织,Smad4蛋白主要表达于细胞浆中,以胃腺体的体部和底部最为明显,而腺体表面的粘液细胞则几乎无表达,见图1,这与TGFβ及其受体在正常胃粘膜腺体中的表达相似。在胃癌组织中,Smad4蛋白除表达于细胞浆外,也可见于少数细胞核中,与正常胃粘膜组织相比,其表达明显减少。Smad4蛋白在胃癌组织中的表达与癌组织的分化有着明显的关系。在低分化胃癌和粘液腺癌及印戒细胞癌,Smad4蛋白的表达较高中分化腺癌明显减少($P<0.05$),见图2,3。

作者简介:张朋彬(1966—),男,河北省宁晋县人,博士,主治医师,讲师。电话:(023)68755114-74604
收稿日期:2001-06-15;修回日期:2001-08-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 1 Smad4 在正常胃粘膜组织中的表达 (ABC×100)
Fig 1 Expression of Smad4 in normal gastric mucosa (ABC× 100)
图 2 Smad4 在高中分化腺癌中的表达 (ABC× 200)
Fig 2 Expression of Smad4 in well and moderately differentiated adenocarcinoma (ABC×200)
图 3 Smad4 在低化腺癌中的表达 (ABC× 200)
Fig 3 Expression of Smad4 in poorly differentiated adenocarcinoma (ABC× 200)

3 讨论

TGF β 为一多功能的细胞因子,对细胞的生长、分化有着重要的调节作用。在信号传导时,TGF β 首先与其Ⅱ型受体结合,后者使Ⅰ型受体也加入这一复合体并被活化。活化的受体通过激活细胞内 Smad 蛋白而将 TGF β 信号从细胞膜传到细胞核。

TGF β 对多细胞的生长具有抑制作用,同时还能刺激细胞间质生成及免疫抑制作用;此外,TGF β 也能抑制上皮源性肿瘤细胞的生长。一些研究发现,尽管 TGF β 表达未减少,但有些肿瘤细胞并不受 TGF β 的生长抑制作用。其原因除 TGF β 的免疫抑制作用使癌细胞逃脱机体的监视外[3],TGF β 的信号传递中断也是其中一个原因,如有些胃癌细胞伴有 TGF β 受体的表达缺陷[4]。

Smad 蛋白分为三类,即途径限制性(Pathway-restricted)、共享性(Common-mediator)及抑制性(Inhibitory)[5]。其中共享性 Smad 蛋白为 Smad4。正常情况下,这些蛋白位于细胞浆中。在 TGF β 信号传导时,途径限制性 Smad 蛋白被活化的Ⅰ型受体激活后,与 Smad4 蛋白形成复合体,一并转入细胞核,在那里指导目的基因的转录。Smad4 与途径限制性 Smad 复合体在细胞核中,通过与核转录调节因子及靶基因启动子的结合,达到调节细胞生长的作用。在从细胞膜至细胞核信号传导中,Smad4 蛋白与途径限制性 Smad 蛋白缺一不可,否则将导致信号传递中断,使细胞逃脱 TGF β 的抑制作用[6]。

Smad4,又称 DPC4(Deleted in pancreatic cancer 4),位于染色体 $18q^{21.1}$,最初作为肿瘤抑癌基因而被发现。有 30%的胰腺癌 Smad4 基因表达缺失,另有 20%发生突变[7]。此外,在卵巢癌、乳腺癌及头颈部肿瘤中,Smad4 基因也存在着表达缺失或突变[8,9]。这些研究发现,Smad4 基因的突变多发生于其 C 端,而 C 端是 Smad4 发挥作用的重要功能区[10]。Smad4 的突变使其与途径限限制性 Smad 不能形成复合物,不能进入细胞核,从而使 TGF β 信号传递中断,细胞逃脱 TGF β 的生长抑制作用。

我们通过免疫组织化学方法发现 Smad4 蛋白在正常胃粘膜组织中表达的部位与 TGF β 及其受体的表达相似,均集中表达于胃腺体的体底部,因该部位是主细胞、壁细胞集中所在部位,说明 TGF β 对这些细胞的功能起着重要的调节作用。在高中分化胃癌组织 Smad4 蛋白的表达与正常胃粘膜组织相比,并未减少。但在低分化胃癌组织中,Smad4 蛋白的表达明显下降,而且其表达与胃癌组织的分化明显相关,在分化越低的胃癌组织,其表达越少。提示其表达下降在胃癌组织的发生、发展过程中起了重要作用。Smad4 蛋白在胃癌组织中表达的减少,影响了信号从细胞膜至细胞核的传导,使其对胃癌细胞的抑制作用减弱。Smad4 蛋白表达减少的原因,可能与前述 Smad4 基因的表达缺失及突变有关。

我们在对 Smad4 蛋白在胃癌组织中表达研究的同时,对 TGF β 在胃癌组织中的表达也进行了研究,发现 TGF β 在胃癌细胞中的表达并未减少,而且在胃癌组织间质中,TGF β 也有较强的表达,与文献[3]报道相似。目前认为 TGF β 失去对肿瘤细胞的抑制作用,与其受体及受体后信号传导缺陷有关,如受体及 Smad4 蛋白表达的异常。

Smad4 蛋白在胃癌组织中表达的减少,影响了 TGF β 信号的传导,使其对胃癌细胞的生长抑制作用减弱,在一定程度上促进了胃癌的发生、发展。

参考文献:

[1] Massague J. The transforming growth factor-β family[J]. Annu Rev Cell Biol, 1990, 6: 597—641.
[2] 张朋彬, 徐采朴. 转化生长因子 β 与胃癌[J]. 新消化病学杂志, 1998, 6(7): 630—631.
[3] Morisaki T, Katano M, Ibubo A, *et al*. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues[J]. J Surg Oncol, 1996, 63(4): 234—239.
[4] Wang J, Sun L, Myeroff L, *et al*. Demonstration that mutation of the type Ⅱ transforming growth factor β receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 1995, 270(37): 22 044—22 049.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[5] Heldin C H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. Nature, 1997, 390(6 659): 465—471.
[6] Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, *et al*. Partnership between DPC4 and smad proteins in TGF-β signalling pathways[J]. Nature, 1996, 383(6 603): 832—836.
[7] Hahn S A, Schutte M, Hoque A T, *et al*. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21. 1[J]. Science, 1996, 271(5 247): 350—353.
[8] Schutte M, Hruban R H, Hedrick L, *et al*. DPC4 gene in various tumor types[J]. Cancer Res, 1996, 56(11): 2 527—2 530.
[9] Kim S K, Fan Y, Papadimitrakopoulou V, *et al*. DPC4, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(11): 2 519—2 521.
[10] de Caestecker M P, Hemmati P, Larisch-Bloch S, *et al*. Characterization of functional domains within Smad4/DPC4[J]. J Biol Chem, 1997, 272(21): 13 690—13 696.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2001)09-1023-01

个案与短篇

胃电节律失常大鼠胆碱能神经及 cAMP 的变化及意义

Changes and significance of acetylcholine and cAMP in rats with electro gastric arrhythm

赵晶京, 王振华, 罗元辉 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心, 重庆 400038)

乙酰胆碱作为胃窦肌间神经丛内重要的兴奋性神经递质, 在调节胃电节律中发挥重要作用[1], 但其调控胃电节律的机制尚不明确。有研究报道, 环磷酸腺苷(cAMP)在胃肠慢波的产生和调控中发挥作用[2]。乙酰胆碱、cAMP 对胃电节律的调控有无关联性尚未见报道。我们通过建立胃电节律失常大鼠模型, 观察肌间神经丛胆碱能神经和胃平滑肌组织 cAMP 含量变化, 探讨乙酰胆碱与 cAMP 在调控胃电节律中的关系, 进一步揭示胃电节律失常的发生机制。

1 材料与方法

Wistar 大鼠 40 只, 随机分为两组: ①正常对照组: 20 只, 正常进食水; ②模型组: 20 只, 按不规则喂养方法[3] 建立模型。

胃窦浆膜下埋置双银丝电极, 成都产 YW-型胃肠电放大仪记录胃电慢波, 计算机自行分析慢波参数。

肌间神经丛铺片按我实验室创立的方法进行[4], Kamovsky-Root' s 直接法显示肌间神经丛胆碱能神经, 采用医学图像分析系统进行定量。

cAMP 含量测定采用放免法, ^{125}I-cAMP 放免试剂盒由上海中医药大学同位素室提供。

统计学处理采用 t 检验及相关分析。

2 结果

模型组肌间神经丛胆碱能神经分布面密度(15. 21 ± 5. 60)%明显低于正常组(24. 88 ± 8. 08)%, $P<0.01$, 而 cAMP 含量(510. 49 ± 269. 68) FM/mg 明显高于正常组(276. 651 ± 125. 970)FM/mg, $P<0.05$, 胃慢波异常节律指数(18. 01 ± 11. 08)%、频率变异系数(36. 01 ± 8. 66)%明显高于正常组, 分别为(4. 12 ± 3. 77)%和(21. 55 ± 3. 98)%, $P<0.01$, 且模型组肌间神经丛胆碱能神经含量与该组慢波异常节律指数和频率变异系数均呈显著负相关($r=-0.909$, $P<0.01$ 与 $r=-0.642$, $P<0.05$), 而模型组 cAMP 含量与该组慢波异常节律指数和频率变异系数呈显著正相关($r=0.902$, $P<0.01$ 与 $r=0.733$, $P<0.05$)。

3 讨论

不规则喂养方法建立的大鼠胃电节律失常模型, 稳定性、重复性好, 成功率高, 是研究胃电节律失常可靠理想的动物模型。实验结果表明, 模型组大鼠胃窦肌间神经丛内胆碱能神经含量较正常对照组明显减少, 且胆碱能神经含量与慢波异常节律指数和频率变异系数均呈显著负相关, 提示内源性乙酰胆碱的减少与模型大鼠的胃电节律失常发生有关。模型组大鼠胃窦平滑肌组织中 cAMP 含量较正常对照组明显增高, 并且 cAMP 含量与慢波频率变异系数和异常节律指数呈显著正相关, 提示内源性 cAMP 增高可引起胃电节律失常。

乙酰胆碱经毒蕈碱受体(M 受体)发挥效应。M 受体与配体结合后, 再经由膜内侧的三磷酸鸟苷结合蛋白(G 蛋白)而激活细胞内信息传递系统。消化道平滑肌主要含 M_2 和 M_3 两类 M 受体, M_2 受体激活 Gi 蛋白, Gi 蛋白抑制腺苷酸环化酶的活性, 使胞内 cAMP 含量减少, M_3 受体主要激活 Gq 蛋白, Gq 蛋白激发系列反应使胞浆内 Ca^{2+} 增多后触发平滑肌收缩[5]。我们实验结果提示, 乙酰胆碱减少及 cAMP 增多均与胃电节律失常相关, 由此我们推测, 胃电节律失常模型组大鼠肌间神经丛胆碱能神经减少, 局部释放乙酰胆碱减少, 抑制腺苷酸环化酶作用减低, 导致第二信使 cAMP 的产生增多, 从而引起胃电节律失常。乙酰胆碱可能正是通过减少 cAMP 途径减少胃电节律失常。

关键词: 乙酰胆碱; 环腺苷酸; 胃电节律失常
中图法分类号: R333. 2 文献标识码: B

参考文献:

[1] 龙庆林, 王振华. 乙酰胆碱对大鼠胃电节律的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 797—799.
[2] Anuras S. cAMP and calcium in generation of slow waves in cat colon[J]. Am J Physiol, 1982, 242: G124—G127.
[3] 张 勇, 王振华. 大鼠胃电节律失常模型的建立[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(7): 612—613.
[4] 张伟刚, 陈代陆, 王振华. 大鼠胃窦肌间神经丛铺片方法的建立[J]. 解剖科学进展, 2000, 6(1): 81.
[5] 秦晓民, 石宣政. 消化道平滑肌胆碱能 M 受体亚型及其细胞内信息传递机制.[J]. 华人消化杂志, 1998, 6(3): 274—275.

作者简介: 赵晶京(1973—), 女, 河南省信阳市人, 硕士研究生, 医师, 主要从事胃肠动力方面的研究。电话: (023)68754678

收稿日期: 2001-05-27; 修回日期: 2001-08-23

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net