

Toll样受体4在胃食管交界部腺癌发展中的作用及与血管密度的关系

王 炜,吴延虎,朱锦富,刘 翔,张石江*

(南京医科大学第一附属医院胸心外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 Toll 样受体 4(TLR4)在胃食管交界部腺癌发展中的作用及其与血管生成之间的关系。方法:采用回顾分析,通过免疫组化法检测 43 例(其中 23 例为随访证实已出现复发转移)经病理证实的胃食管交界部腺癌手术切除标本中 TLR4 蛋白的表达;采用 CD34 抗体标记微血管内皮细胞,计算微血管密度(MVD)。分析 TLR4 蛋白的表达、MVD 与胃食管交界部腺癌主要临床病理参数以及预后的关系。结果:TLR4 蛋白的阳性表达率为 69.8%,其中 A 组(复发转移组)TLR4 蛋白阳性率为 82.6%,明显高于对照组 B 组(55.0%, $P < 0.05$);有淋巴结转移者的 TLR4 蛋白阳性表达率(79.3%)高于无淋巴结转移者(50.0%, $P=0.05$);TNM 分期为 III+IV 期者的 TLR4 蛋白阳性表达率(82.8%),明显高于 I+II 期者(42.9%, $P < 0.01$)。TLR4 蛋白的表达与 MVD 呈正相关($P=0.008$)。结论:TLR4 的高表达与胃食管交界部腺癌的发生发展及患者的预后情况密切相关,可能与 TLR4 促进肿瘤微血管生成相关。

[关键词] 胃食管交界部腺癌;Toll 样受体;微血管密度

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-678-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150516

Relationship between TLR4 expression and angiogenesis in human AEJ

Wang Wei, Wu Yanhu, Zhu Jingfu, Liu Xiang, Zhang Shijiang*

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliate Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Toll-like receptor 4 overexpression in human AEJ and the relationship between TLR4 overexpression and angiogenesis. **Methods:** Through retrospective analysis, a total of 43 surgically resected human AEJ specimens were investigated for TLR4 protein expression by immunohistochemical SP methods, CD34 antibody was used to mark microvascular endothelial cells and the microvessel density(MVD) was determined. The correlation among TLR4 protein expression and MVD and clinicopathologic features of AEJ was analyzed. **Results:** TLR4 protein positive rate was 69.8%, rate of 82.6% in group A which was metastasis and recurrence was significantly higher than that of the control group B($P < 0.05$). TLR4 protein positive rate in the cases with lymph node metastasis(79.3%) was significantly higher than that in the cases without lymph node metastasis(50.0%) ($P=0.05$). TLR4 protein positive rate in the patients with stage III and IV of TNM classification was 82.8%, which was significantly higher than that in the patients with stage I and II (42.9%, $P < 0.05$). MVD was closely related to TNM stage of AEJ ($P=0.008$). There was a strong positive correlation between TLR4 protein expression and MVD($P=0.012$). There was no statistical significance among tumor grade, size, vascular metastasis, and neural invasion. **Conclusions:** TLR4 expression was closely related to the progression of tumor and prognosis of patients and might be related to the promotion of tumor angiogenesis.

[Key words] AEJ; Toll-like receptor; MVD

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05):678-681]

胃食管交界部腺癌(adenocarcinoma of esophago-gastric junction, AEJ)作为常见的恶性肿瘤之一,具有恶性度高、易转移等特点,且发病率呈明显上升趋势^[1-2]。胃食管交界部腺癌有别于食管腺癌和

胃腺癌具有独立的发病机制和流行病学等特征,越来越多地引起国内外关注^[3]。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)4 是人类发现的第一个 TLR 家族相关蛋白,也是目前与肿瘤关系最为密切的蛋白之一。它在乳腺癌、结直肠癌等恶性肿瘤都具有较高的表达^[4],但其机制尚未完全阐明。新生血管对实体肿瘤的发展起到重要的作用。多数学者通过实验

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81270298)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zsjiangnjmu@163.com

证实微血管密度(microvessel density, MVD)与肿瘤的生长、转移、预后具有密切的关系,认为它是一个反映恶性肿瘤生物学行为的重要参数^[5]。但关于胃食管交界部腺癌的 TLR4 表达与血管生成的关系尚不完全清楚。本研究通过检测组织样本中 TLR4 蛋白的表达,分析其与临床病理特征及 MVD 的相关性,探讨其在胃食管交界部腺癌发生、发展的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

入组标准:①胃食管交界部肿瘤;②病理明确诊断为腺癌;③手术完整切除肿瘤;④术前未接受任何治疗,术后按照 TNM 分期标准进行正规放、化疗等综合治疗。排除标准:①既往有肿瘤病史;②胃肠道手术病史;③有严重的心、肺、肾等严重并发症者;④临床病理及随访资料不完整。

按上述标准,对 2011~2012 年在南京医科大学第一附属医院实行手术切除并经病理证实的胃食管交界部腺癌的患者进行门诊和/或电话随访(随访间隔为 18 个月)。B 超、CT 或 MR 等影像学检查发现消化道新发病灶,腹腔网膜出现转移性淋巴结,或发现其他器官出现新发病灶,均视为肿瘤转移复发。共随访了 58 例患者,其中证实出现肿瘤复发的患者共计 23 例,作为复发转移组(A 组);并未出现转移的患者中采用随机数字法随机选取 20 例作为对照组(B 组)。共收集组织标本 43 份,男 36 例,女 7 例;年龄 53~81 岁,平均年龄 66 岁,中位年龄 65 岁;采用 2010 年国际抗癌联盟/美国癌症联合委员会(UICC/AJCC)TNM 分期标准:TNM 分期为 I~II 期 14 例,III~IV 期 29 例(TNM 为手术病理评价)。其中 A 组 TNM 分期为 I~II 期 1 例,III~IV 期 22 例;男 20 例,女 3 例;平均年龄 66 岁;高、中分化 3 例,低分化 20 例。B 组 I~II 期 13 例,III~IV 期 7 例;男 16 例,女 4 例;平均年龄 66 岁;高、中分化 9 例,低分化 11 例。

1.2 方法

1.2.1 TLR4 表达

所有原发灶组织标本经石蜡包埋,连续切片厚 4 μm ,采用免疫组化染色超敏两步法(SP 染色法)测定石蜡切片中 TLR4 蛋白表达,按 SP 免疫组化试剂盒说明书操作。其中一抗为鼠抗人 TLR4 单克隆抗体(工作浓度为 1:100,Abcam 公司,英国),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 作为二抗。用已

知 TLR4 表达强阳性的乳腺癌组织切片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作阴性对照。结果判断:TLR4 蛋白阳性染色为细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒,用低倍镜选取阳性表达区域,随机观察 5 个高倍视野($\times 400$),根据阳性细胞染色强度和阳性细胞率分别记分。评分标准:阳性细胞率 $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~29%为 1 分,30%~59%为 2 分, $\geq 60\%$ 为 3 分;无着色 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。两项分数之和为 0 分、1 分判为阴性,2 分为弱阳性,3 分和 4 分为中等强度阳性,5 分及以上者为强阳性。阳性表达率以表达阳性(包括中等阳性和强阳性)的病例占总病例数的百分比表示。

1.2.2 MVD 计数

用小鼠抗人 CD34 单抗即用型(福州市迈新生物技术开发公司)抗体对切片进行染色。CD34 主要表达于血管内皮细胞膜,被染成棕色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇作为 1 个血管计数,结构不相连的分支结构也作为 1 个血管计数,厚壁血管或管径 $>50 \mu\text{m}$ 的血管则排除在外。先在低倍镜下($\times 200$)选择血管密集区,在高倍镜下($\times 400$)随机选取 5 个不同视野计数微血管个数,取其平均值为 MVD(视野大小显微镜摄像视野)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 软件对各种数据进行统计处理,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本之间的比较选用独立样本 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验。TLR4 与 MVD 水平的相关性采用秩相关分析。所有检验均为双侧检验且 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 癌组织中 TLR4 蛋白的表达及 MVD 值

TLR4 蛋白阳性染色为细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒,主要染色区域为分化不完全的腺体组织(图 1)。TLR4 蛋白表达为阴性 13 例、阳性 30 例,阳性表达率为 69.8%。其中复发转移组 TLR4 蛋白阳性率(19 例,82.6%)明显高于对照组(11 例,55.0%)($P < 0.05$)。

CD34 主要表达于血管内皮细胞膜,微血管染色呈棕黄色,肿瘤组织中血管最密集染色区域主要位于癌灶边缘(图 2)。在转移复发组中 MVD 值为 29.92 ± 11.06 ,高于对照组的 MVD 值 25.30 ± 8.50 ,但两者间无统计学差异($P = 0.137$)。

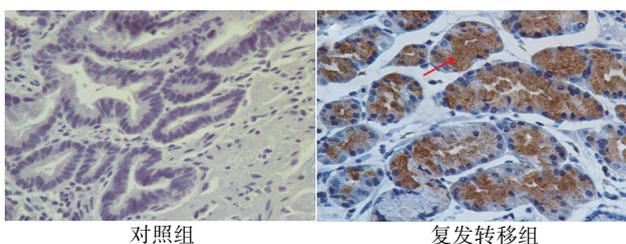


图1 TLR4在胃食管交界部腺癌组织中的表达(SP法,×400)
Figure 1 TLR4 expression in the AEJ(SP method,×400)

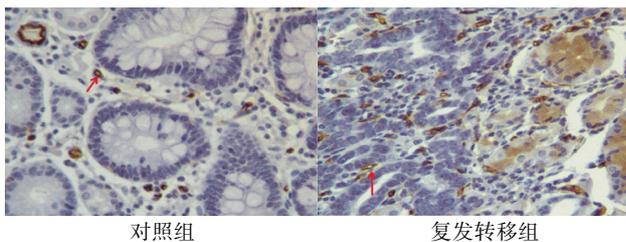


图2 CD34在胃食管交界部腺癌组织中的表达(×400)
Figure 2 CD34 expression in the AEJ(×400)

2.2 TLR4 蛋白表达、MVD 与临床病理特征的关系

癌组织中 TLR4 蛋白的表达与患者年龄、性别、浸润深度、最大直径、肿瘤分化程度、脉管转移、神经侵犯的相关性无统计学意义,而与肿瘤病理分期、淋巴结转移及是否出现复发转移密切相关。MVD 与肿瘤病理分期相关,与患者年龄、性别、肿瘤浸润深度等相关性无统计学意义(表 1)。

2.3 TLR4 蛋白表达与 MVD 的相关性

癌组织中 TLR4 蛋白表达在阴性、弱阳性、中等阳性和强阳性组的 MVD 呈正相关,差异具有统计学意义($r=0.400, P=0.008$,图 3)。

3 讨论

1984 年在果蝇体内首次发现了 TLR。TLR 可通过识别病原相关的分子模式(PAMPs)及某些内

表 1 TLR4 表达、MVD 与胃食管交界部腺癌临床病理特征的关系

Tab 1 The Relationship among TLR4 expression, MVD and clinicopathological features of AEJ

临床病理特征	n	TLR4 阳性[n(%)]	χ^2 值	P 值	MVD	t 值	P 值
年龄(岁)			0.01	0.975		1.36	0.182
<66	23	16(69.6)			29.71 ± 11.61		
≥66	20	14(70.0)			25.54 ± 7.75		
性别			0.01	0.917		1.07	0.292
男	36	25(69.4)			27.05 ± 9.35		
女	7	5(71.4)			31.50 ± 13.63		
TNM 分期			7.13	0.008		2.67	0.011
I~II	14	6(42.9)			22.23 ± 6.81		
III~IV	29	24(82.8)			30.45 ± 10.44		
分化程度			1.03	0.310		0.56	0.581
高、中分化	13	8(61.5)			29.16 ± 12.46		
低分化	30	22(73.3)			27.23 ± 9.23		
淋巴结转移			3.85	0.050		1.06	0.296
阳性	29	23(79.3)			28.90 ± 9.41		
阴性	14	7(50.0)			25.43 ± 11.42		
浸润深度			0.63	0.427		0.99	0.329
< 浆膜层	7	4(57.1)			24.31 ± 8.97		
≥浆膜层	36	26(72.2)			28.44 ± 10.30		
最大直径(cm)			0.40	0.526		0.19	0.848
<4	23	17(73.9)			28.05 ± 10.17		
≥4	20	13(65.0)			27.45 ± 10.29		
脉管内癌栓			1.29	0.256		0.59	0.559
阳性	6	3(50.0)			25.50 ± 8.68		
阴性	37	27(73.0)			28.14 ± 10.38		
神经侵犯			0.13	0.721		0.54	0.595
阳性	8	6(75.0)			26.03 ± 8.28		
阴性	35	24(68.6)			28.17 ± 10.55		
复发转移			3.87	0.049		1.52	0.137
阳性	23	19(82.6)			29.92 ± 11.06		
阴性	20	11(55.0)			25.30 ± 8.50		

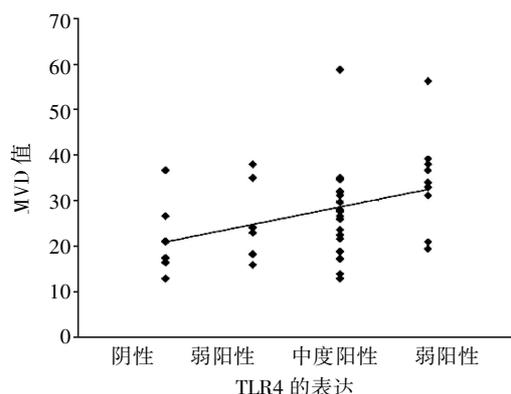


图 3 胃食管交界部腺癌组织中 TLR4 表达和 MVD 的相关性
Figure 3 Correlation between TLR4 expression and MVD in AEJ

源性配体引发信号传导而引起炎症介质的释放,在天然免疫系统中发挥重要作用。许多肿瘤的发生来源于炎症的慢性刺激,随着研究的深入,TLR 与肿瘤的关系也更多为人所了解。除了在免疫细胞表达外,TLR 还在肿瘤细胞高表达,与多种肿瘤的发生、发展密切相关。其中作为研究最广的 TLR4,几乎分布于所有的细胞系,主要表达在参与宿主防御功能的细胞^[6],也是现阶段人们认识与肿瘤相关最广的家族成员。本实验中,胃食管交界部腺癌组织中 TLR4 具有较高的表达,且与肿瘤分期、淋巴结转移、预后情况密切相关,提示 TLR4 对肿瘤的促进、发展起到重要作用。

关于 TLR 促进肿瘤的机制尚未完全阐明,有研究显示其中可能的机制是:TLR 受体通过 NF- κ B 通路的活化和炎症介质的释放,诱导干扰素和促炎因子的合成。一方面调控机体的免疫反应,另一方面构建有利于肿瘤细胞生长的微环境,介导肿瘤细胞的免疫逃逸,并且增强肿瘤细胞的浸润,加速肿瘤恶化进程^[7-9]。

肿瘤的生长需要血管来提供营养和排泄自身代谢产物。随着瘤体的增大,肿瘤生长、浸润和转移必须依赖肿瘤血管生成,需要大量新生血管网来提供丰富的血供,以满足组织所需^[10]。已有大量研究表明,TLR 能够调控血管内皮生长因子(VEGF)的表达,促进血管生成的增加^[11]。通过调控 TLR 信号中的 VEGF 可以达到抑制肿瘤发展的目的^[12]。本研究显示,胃食管交界部腺癌组织中 MVD 表达与肿瘤 TNM 分期密切相关,与淋巴结转移、预后情况呈相关趋势。且 MVD 与 TLR4 蛋白表达密切相关,提示促进肿瘤微血管的生长可能是 TLR4 参与肿瘤发生、发

展的一重要路径。

[参考文献]

- [1] 秦新裕. 食管胃交界部腺癌的特点及外科治疗[J]. 中华胃肠外科杂志,2010,13(9):637-639
- [2] 张祥宏. 食管胃交界腺癌——一个值得病理学家关注的问题[J]. 中华病理学杂志,2007,36(6):363-365
- [3] Rüschoff J. Adenocarcinoma of the GEJ:gastric or oesophageal cancer? [J]. Recent Results Cancer Res, 2012,196(48):107-113
- [4] Mai CW,Kang YB,Pichika MR. Should a toll-like receptor 4(TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer TLR-4:its expression and effects in the ten most common cancers[J]. Onco Targets Ther,2013,6:1573-1587
- [5] 丁洪基. 肿瘤微血管密度检测及其临床病理意义[J]. 诊断病理学杂志,2008,15(3):241-243
- [6] 吕宝军,侯冰宗,王晓鸿,等. TLR4、NF- κ B 和 AP-1 在乳腺癌中的表达及其与临床病理特征的相关性研究[J]. 中华普通外科学文献:电子版,2011,5(6):508-511
- [7] Guo H,Chen Y,Hu X,et al. The regulation of Toll-like receptor 2 by miR-143 suppresses the invasion and migration of a subset of human colorectal carcinoma cells [J]. Mol Cancer,2013,12(1):77
- [8] Yang H,Wang B,Wang T,et al. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis[J]. PLoS One,2014,9(10):e109980
- [9] Rutkowski MR,Cadungog MG,Zhang R,et al. Microbially driven TLR5-Dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation [J]. Cancer Cell,2015,27(1):27-40
- [10] 满晓华,孙运良,龚燕芳,等. Toll 样受体 4 在胰腺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成的关系[J]. 中华胰腺病杂志,2012,12(3):167-169
- [11] Riddell JR,Bshara W,Moser MT,et al. Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature [J]. Cancer Res,2011,71(5):1637-1646
- [12] Fuchs CS,Tomasek J,Yong CJ,et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international,randomised,multicentre,placebocontrolled,phase 3 trial[J]. Lancet,2014,383(9911):31-39

[收稿日期] 2014-12-23