

TrkB 在结肠癌旁淋巴结转移癌组织中的表达及其与细胞凋亡的关系

TrkB Expression in Lymph Nodes Metastatic Tissue of Adjacent Colon Cancer and its Relation with Cell Apoptosis
MA Si-ping, ZHANG Jing-ru, ZHANG Qing-tong, et al.

马思平, 张菁茹, 张庆彤, 王永鹏 (辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042)

摘要: [目的] 探讨结肠癌淋巴结转移癌中 TrkB 表达与肿瘤细胞凋亡之间的关系。[方法] 应用免疫组化方法检测 30 例结肠癌旁淋巴结转移癌组织中 TrkB 的表达情况, 并应用 TUNEL 染色方法检测肿瘤细胞凋亡情况。[结果] TrkB 在 30 例癌旁淋巴结转移癌中均有表达, 22 例 (73.3%) 为高表达, 细胞凋亡率为 6.9%~23.5%。肠系膜淋巴结转移组 TrkB 高表达率为 92.9%, 高于癌旁淋巴结转移组。转移淋巴结中 TrkB 高表达的肿瘤细胞平均凋亡率为 11.6%, 显著低于 TrkB 低表达的肿瘤细胞的平均凋亡率 (15.0%) ($P=0.021$)。[结论] 结肠癌组织中 TrkB 表达越强, 淋巴结转移越广泛, TrkB 与结肠癌的发展演进密切相关。

关键词: TrkB; 结肠癌; 细胞凋亡; 淋巴结转移; 免疫组织化学; TUNEL 染色

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)06-0469-03

TrkB 是一种营养神经的酪氨酸激酶受体^[1], 它参与细胞内多种信号转导通路的调节及其生物学功能。关于 TrkB 的研究目前集中在生理或病理的条件下, TrkB 通过 PI3K 信号通路有效且特异性地抑制与 caspase 相关的非恶性上皮细胞失巢凋亡^[2]。TrkB 能够诱导形成大的细胞团, 使细胞在悬浮状态下存活并增殖。在小鼠动物实验中, 这些细胞迅速形成浸润淋巴管和血管的肿瘤, 并转移至远隔器官。与 TrkB 抑制失巢凋亡的能力一致, 转移灶内 (无论是小血管浸润灶或大肿瘤结节) 含有非常少的凋亡细胞^[3]。这些结果表明 TrkB 具有明显的促癌作用, 以及特异性促进细胞存活的功能, 有助于肿瘤细胞转移, 这可能是过表达 TrkB 的肿瘤具有侵袭性的原因之一。但关于 TrkB 在结肠癌淋巴结转移癌组织中的表达与肿瘤细胞凋亡之间关系的文献较少报道, TrkB 是否通过抑制肿瘤细胞凋亡从而有助于结肠癌转移, 以及 TrkB 对于结肠癌发生发展的作用还不明确。本研究探讨手术切除的结肠癌淋巴结转移灶

中 TrkB 的表达与肿瘤细胞凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 结肠癌转移淋巴结标本

30 例结肠癌转移淋巴结标本来自辽宁省肿瘤医院大肠外科 2006 年 3~11 月手术切除标本, 在术前均未经过化疗或放疗。转移淋巴结标本经福尔马林固定并石蜡包埋后, 切片进行常规 HE 染色, 结果分别由两名病理科医师依据 2002 年美国癌症联合会 (AJCC) 结直肠癌分级系统, 确定肿瘤组织学分型。30 例结肠腺癌包括: 高分化癌 11 例, 中分化癌 13 例, 低分化癌 6 例; 原发肿瘤直径 <5cm 10 例, ≥ 5 cm 20 例。常规行病理学检查切除的结肠癌淋巴结, 确定淋巴结转移范围。其中 16 例只有癌旁淋巴结转移为癌旁淋巴结转移组 (N_1 组), 另外 14 例癌旁淋巴结及肠系膜淋巴结均有癌转移为肠系膜淋巴结转移组 (N_2 组)。

1.2 主要试剂及实验材料

兔抗人 TrkB 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司); SP

收稿日期: 2012-02-06; 修回日期: 2012-03-30
基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20102121)
E-mail: brucema1@163.com

免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术公司);TUNEL 染色试剂盒(Roche 公司);其他均为国产分析纯试剂。

1.3 免疫组化染色检测 TrkB 表达

30 例结肠癌转移的淋巴结组织切片常规进行脱蜡、水化,然后染色:3% H_2O_2 37℃下分别孵育切片 1h;高温高压抗原修复 2min;5%山羊血清 37℃下孵育切片 1h;滴加一抗(兔多克隆抗 TrkB 抗体,1:100 稀释)4℃冰箱中孵育过夜;滴加二抗山羊抗兔 IgG 和 SP 复合物于 37℃分别孵育切片 30min;DAB 显色;苏木素复染。并设立阳性及阴性对照。由两名病理医师对切片的染色情况分别进行评分。在细胞膜或细胞浆出现棕黄色颗粒为 TrkB 阳性。要求至少查看 5 个高倍视野($\times 400$),然后进行 TrkB 的染色强度评分:黄色弱染为 1 分,棕色强染为 2 分;同时评价阳性细胞百分比:阴性为 0 分,1%~50%为 1 分,51%~75%为 2 分, $\geq 76\%$ 为 3 分。两项评分的乘积作为最后评分确定标本的染色情况:0 分为阴性; ≤ 3 分为低表达; >3 分为高表达。

1.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡

切片常规脱蜡、水化,蛋白酶 K 室温下孵育切片 15min。再将 50 μ l TdT 及 450 μ l 荧光素标记的 dUTP 液混匀后,制备 TUNEL 反应混合液。玻片干燥后加 50 μ l TUNEL 反应混合液,并设立阳性和阴性对照,加盖玻片于 37℃湿盒中避光孵育 1h。玻片干燥后加 50 μ l converter-POD,加盖玻片于 37℃湿盒中避光孵育 30min。DAB 显色,苏木素复染。最后用梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在细胞核出现明显的棕黄色颗粒为凋亡细胞,显微镜下($\times 200$)随机选取 5 个视野,观察并计数凋亡细胞,计算细胞凋亡率=(凋亡细胞数/同一视野细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.5 统计学处理

数据分析应用 SPSS 13.0 统计学软件。应用 χ^2 检验分析 TrkB 高表达与淋巴结转移范围之间的关系,应用 t 检验分析 TrkB 高表达与细胞凋亡之间的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

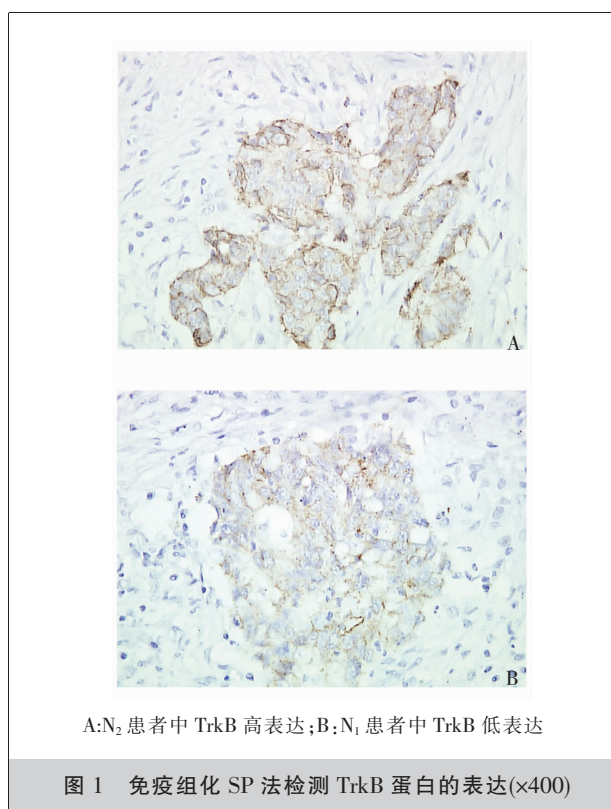
2.1 TrkB 表达情况

30 例结肠癌旁淋巴结转移癌组织均有不同程度的 TrkB 表达。见图 1。22 例(73.3%)癌旁淋巴

结转移灶 TrkB 呈高表达,如表 1 所示, N_2 组 TrkB 高表达率为 92.9%(13/14),显著高于 N_1 组的 TrkB 高表达率(56.25%),两组间差异具有统计学意义($P=0.039$)。

表 1 结肠癌旁淋巴结转移癌组织中 TrkB 表达与淋巴结转移范围的关系

淋巴结转移范围	例数	TrkB 表达		P 值
		高表达 (n=22)	低表达 (n=8)	
N_1 组	16	9(56.25)	7(43.75)	0.039
N_2 组	14	13(92.85)	1(7.15)	

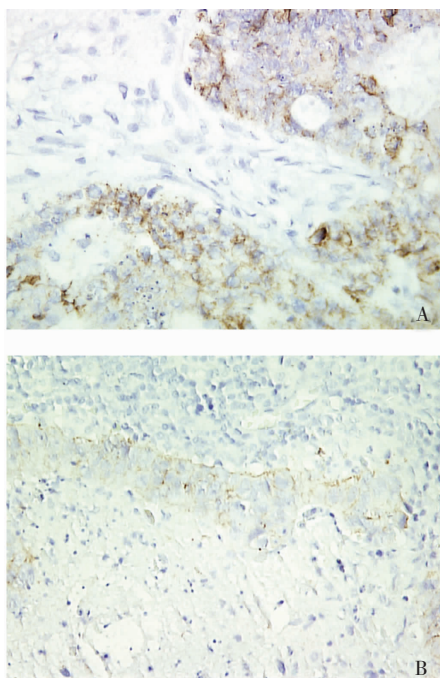


2.2 细胞凋亡情况

结肠癌旁淋巴结转移癌组织中 TrkB 表达与细胞凋亡情况见图 2。30 例结肠癌旁淋巴结转移癌组织中肿瘤细胞凋亡率为 6.9%~23.5%,平均凋亡率为 12.5%。癌旁淋巴结转移癌组织中 TrkB 高表达组的肿瘤细胞平均凋亡率为 11.6%,显著低于 TrkB 低表达组的肿瘤细胞平均凋亡率(15.0%),两组间差异具有统计学意义($P=0.021$)。

3 讨论

转移是结肠癌恶性生物学行为的主要表现之



A:癌旁淋巴结转移癌组织中 TrkB 高表达,细胞较少发生凋亡;
B:TrkB 低表达,凋亡细胞数较多

图 2 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡(x400)

一,通常也是肿瘤治疗失败的主要原因。失巢凋亡(即缺少细胞-细胞外基质相互作用导致的细胞凋亡)被认为是阻断肿瘤转移的生理性屏障。耐受失巢凋亡的肿瘤细胞可以在循环系统内存活,因此能够在远隔脏器内形成转移灶^[4]。研究发现,TrkB 过表达有助于骨髓瘤细胞的存活^[5],而阻断 TrkB 信号通路可以降低神经母细胞瘤细胞的生存能力^[6]。TrkB 在多种人类肿瘤中过表达,能够增强肝癌细胞的侵袭能力^[7],促进卵巢浆液性囊腺癌的转移^[8],赵卫民等^[9]也发现 TrkB 广泛表达于鼻咽癌组织,而且 TrkB 高表达与肿瘤体积、TNM 分期和淋巴结转移密切相关,因此 TrkB 在促进肿瘤转移方面具有重要作用。

本研究应用免疫组化方法检测 30 例结肠癌癌旁淋巴结转移癌中 TrkB 蛋白表达情况,并应用 TUNEL 染色方法检测肿瘤细胞凋亡情况,结果显示 TrkB 蛋白在 30 例淋巴结转移癌中均有表达,其中 22 例为高表达(73.3%),细胞凋亡率为 6.9%~23.5%。我们对 TrkB 高表达与结肠癌癌旁淋巴结转移范围之间的关系进行分析发现,肠系膜淋巴结转移组 TrkB 高表达率为 92.9%(13/14),显著高于只

有癌旁淋巴结转移组 TrkB 高表达率($P=0.039$)。结果提示肿瘤细胞中 TrkB 表达越强,淋巴结转移越广泛,TrkB 与结肠癌的发展演进密切相关。在非小细胞肺癌中亦有相似的结果^[10]。有研究表明,TrkB 具有保护细胞、抑制细胞凋亡的作用^[11]。我们进一步对结肠癌癌旁淋巴结转移癌的肿瘤细胞中 TrkB 表达与细胞凋亡之间的关系进行分析发现,TrkB 高表达与细胞凋亡呈负相关,提示结肠癌中 TrkB 过表达可能通过抑制细胞凋亡从而有助于肿瘤细胞在循环系统内存活,继而形成淋巴结转移灶及发生远隔转移。

综上所述,TrkB 在结肠癌淋巴结转移癌中高表达,并与肿瘤细胞凋亡呈负相关,且结肠癌淋巴结转移范围越大,则癌旁淋巴结中癌细胞表达 TrkB 越强,提示 TrkB 可能在促进结肠癌淋巴结转移过程中起着重要作用。

参考文献:

- [1] Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction[J]. Annu Rev Biochem, 2003, 72:609-642.
- [2] Douma S, van Laar T, Zevenhoven J, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB[J]. Nature, 2004, 430(7003): 1034-1039.
- [3] Geiger TR, Peeper DS. Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis[J]. Cancer Res, 2007, 67(13):6221-6229.
- [4] Liotta LA, Kohn E. Anoikis: cancer and the homeless cell[J]. Nature, 2004, 430(7003):973-974.
- [5] Pearse RN, Swendeman SL, Li Y, et al. A neurotrophin axis in myeloma: TrkB and BDNF promote tumor-cell survival[J]. Blood, 2005, 105(11):4429-4436.
- [6] Fung W, Hasan MY, Loh AH, et al. Gene expression of TRK neurotrophin receptors in advanced neuroblastomas in Singapore-a pilot study [J]. Pediatr Hematol Oncol, 2011, 28(7):571-578.
- [7] Zhang Z, Han L, Liu Y, et al. Up-regulation of Tropomyosin related kinase B contributes to resistance to detachment-induced apoptosis in hepatoma multicellular aggregations[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(5):1211-1216.
- [8] Zheng W, Dai Q, Tao P, et al. Overexpression of tyrosine kinase receptor B promotes metastasis of ovarian serous adenocarcinoma by lymphangiogenesis [J]. Tumori, 2011, 97(6):756-761.
- [9] 赵卫民, 温文胜, 张哲, 等. 酪氨酸激酶受体 B 在鼻咽癌中的表达及临床意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 21(11):497-500.
- [10] Zhang S, Guo D, Luo W, et al. TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells [J]. BMC Cancer, 2010, 10:43.
- [11] Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, et al. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway [J]. Cancer Res, 2002, 62(22):6756-6763.