

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.011

文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0057-04

## TGF- $\beta_1$ 和 $\beta$ -catenin 在儿童结肠息肉中的表达及意义

王松阳

(漯河市第二人民医院 外二科, 河南 漯河 462000)

**摘要:** **目的** 分析转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 和  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 在儿童结肠息肉中的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 蛋白在儿童结肠息肉中的表达情况, 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin mRNA 的表达水平, 分析其相关性。**结果** TGF- $\beta_1$  蛋白在儿童单发和多发幼年性息肉组织中的阳性表达率为 27.59% 和 48.28%,  $\beta$ -catenin 蛋白阳性表达率分别为 13.79% 和 41.38%, TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 的表达呈正相关 ( $r=0.463$ ,  $P=0.000$ )。多发幼年性息肉组织中 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin mRNA 相对表达水平高于正常组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。**结论** TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 可能参与了儿童结肠息肉的发生和进展。

**关键词:** 结肠息肉; 转化生长因子  $\beta_1$ ;  $\beta$ -连环蛋白; 儿童; 相关性

**中图分类号:** R725.7

**文献标识码:** A

## Expression and clinical significance of TGF- $\beta_1$ and $\beta$ -catenin in colon polyps of children

Song-yang Wang

(Department of General Surgery, Luohe Second People's Hospital, Luohe, Henan 462000, China)

**Abstract: Objective** To analyze expression of TGF- $\beta_1$  and  $\beta$ -catenin in colon polyps of children and potential clinical significance. **Methods** Expression of TGF- $\beta_1$  and  $\beta$ -catenin protein in colon polyps of children was detected by immunohistochemistry and RT-PCR. Potential correlations between TGF- $\beta_1$  and  $\beta$ -catenin were analyzed. **Results** The positive expression rates of TGF- $\beta_1$  protein in children with single and multiple juvenile polyps were 27.59% and 48.28%, respectively. Positive expression rates of  $\beta$ -catenin in children with single and multiple juvenile polyps were 13.79% and 41.38%, respectively. TGF- $\beta_1$  was positively correlated with  $\beta$ -catenin ( $r=0.634$ ,  $P<0.01$ ). Expression levels of TGF- $\beta_1$  and  $\beta$ -catenin in multiple juvenile polyp tissue were significantly higher than those in the normal tissue ( $P<0.05$ ). **Conclusions** TGF- $\beta_1$  and  $\beta$ -catenin are involved in the development and progression of colon polyps in children.

**Keywords:** colonic polyps; TGF- $\beta_1$ ;  $\beta$ -catenin; children; correlation

儿童结肠息肉 (colonic polyps) 为儿童肠黏膜隆起赘生物, 一般均为具有错构瘤特征的幼年性息肉, 并会诱发儿童下消化道出血。目前, 儿童结肠息肉通过结肠镜检查, 检出率较高。该病的发病机制还不明确, 文献认为该病的发生与遗传因素有关, 并与多

个信号通路异常表达有关, 为多基因参加和调控的过程<sup>[1]</sup>。

研究表明, 转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta_1$ ) 与结肠癌、肝癌等多种肿瘤发生有关, 通过双向调控影响肿瘤生物学行为<sup>[2]</sup>。而  $\beta$ -

连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 作为 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的细胞因子, 可以直接调节细胞的增殖和分化。目前有关 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 在儿童结肠息肉中的表达、进展及机制报道较少, 本研究主要分析儿童结肠息肉中 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 蛋白的阳性表达及基因表达水平, 并分析其分子机制, 为儿童结肠息肉预防和治疗提供依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2006 年 1 月—2017 年 1 月河南省漯河市第二人民医院病理科存档的儿童息肉石蜡标本 54 例。其中, 单发幼年性息肉 29 例。男性 18 例, 女性 11 例; 年龄 4 ~ 13 岁, 平均  $(6.2 \pm 1.9)$  岁。多发幼年性息肉 25 例。男性 16 例, 女性 9 例; 年龄 4 ~ 12 岁, 平均  $(6.1 \pm 1.7)$  岁。收集同期标本旁组织 25 例, 病理分析为正常组织。标本采集均告知家属并知情同意。

### 1.2 主要试剂

兔抗人 TGF- $\beta_1$  多克隆抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), 兔抗  $\beta$ -catenin 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 二氨基联苯胺显色试剂盒, SP 法免疫组织化学 (以下简称免疫组化) 试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司), Fast-King 一步法逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]。

### 1.3 免疫组化染色检测 TGF- $\beta_1$ 和 $\beta$ -catenin 的表达

常规固定标本、脱水并进行石蜡包埋, 连续切片 ( $4 \mu\text{m}$ ), 抗原修复, 采用 SP 法行免疫组化染色, 二氨基联苯胺显色, 镜检。磷酸盐缓冲液替代一抗制作阴性对照切片。TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 为胞浆、胞膜和 / 或细胞核染色, 呈棕黄色颗粒状或线状, 其中单一或混合染色即为阳性染色细胞。随机选择 4 个视野

( $\times 400$ ) 双盲法读片。TGF- $\beta_1$  的阳性诊断: 胞浆和 / 或胞膜着色  $\geq 30\%$ 。 $\beta$ -catenin 异常表达: 胞膜着色  $\geq 70\%$  为正常, 相反为胞膜表达缺失, 胞浆和 / 或胞核着色  $>10\%$  为异位表达, 胞膜表达缺失和异位表达均为异常表达。

### 1.4 RT-PCR 检测 TGF- $\beta_1$ 和 $\beta$ -catenin mRNA 的表达

Trizol 提取总 RNA, 按照 Fast-King 一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验。引物序列由上海英骏公司提供。TGF- $\beta_1$  (NM\_000660.6) 序列: 正向 5'-GGCTACCATGCCAACTTCT-3', 反向 5'-GACACAGAGATCCGCAGTCC-3', 扩增产物长度 384 bp;  $\beta$ -catenin (X87838.1) 序列: 正向 5'-GGCCTAGGTGTCCAAAGGTG-3', 反向 5'-AGAATGACCCGATAGTGCC-3', 产物长度 201 bp; 内参 GAPDH (NM\_001289745.2) 序列: 正向 5'-GAATTTGGCCACACTCAGTCC-3', 反向 5'-GTACATGACAAGGTGCGGCT-3', 长度 110 bp。

### 1.5 统计学方法

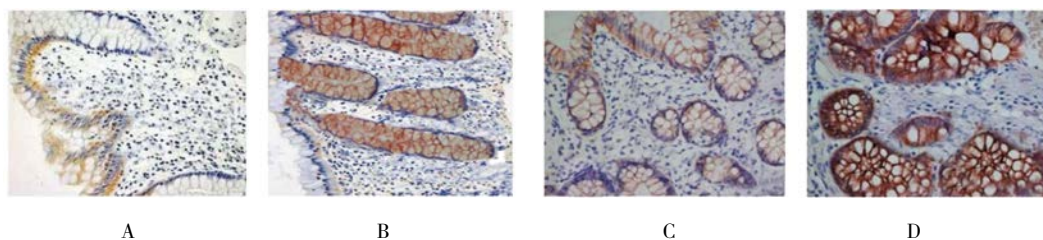
数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验。计数资料以率 (%) 表示, 比较用  $\chi^2$  检验, 相关分析用 Spearman 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TGF- $\beta_1$ 和 $\beta$ -catenin 的表达情况

TGF- $\beta_1$  蛋白在正常结肠组织的腺体腺上皮细胞、间质细胞细胞膜可见少量表达, 而幼年性息肉组织中表达主要位于胞膜、胞浆和 / 或细胞核中, 呈棕黄色颗粒。 $\beta$ -catenin 蛋白在正常结肠组织上皮细胞 (包括腺体上皮细胞) 膜可见少量的表达, 呈棕黄色。而幼年性息肉组织中可见膜表达、胞浆表达和部分核表达。见图 1。

TGF- $\beta_1$  在儿童多发幼年性息肉组织中的阳性表



A、B: TGF- $\beta_1$  蛋白在结肠正常组织和幼年性息肉组织中的表达; C、D:  $\beta$ -catenin 蛋白在结肠正常组织和幼年性息肉组织中的表达

图 1 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 蛋白在儿童幼年性息肉组织中的表达 ( $\times 400$ )

达率高于正常组织阳性表达率 ( $P < 0.05$ ), 而单发幼年性息肉组织中的阳性表达率与正常组织阳性表达率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。  $\beta$ -catenin 蛋白在儿童多发幼年性息肉组织中的表达率高于正常组织表达率以及单发幼年性息肉组织中的表达率 (均  $P < 0.05$ ), 而单发幼年性息肉组织中的表达率与正常组织比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 在儿童幼年性息肉组织中的表达

组别	n	TGF- $\beta_1$		$\chi^2$ 值	P 值	$\beta$ -catenin		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性例数	阳性率 /%			阳性例数	阳性率 /%		
正常组	25	5	20.00			1	4.00		
单发息肉组	25	8	27.59	4.849	0.029	4	13.79	11.767	0.003
多发息肉组	29	14	48.28			12	41.38		

表 2 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

标本	n	TGF- $\beta_1$	$\beta$ -catenin
正常组	25	0.35 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.03
单发息肉	25	0.38 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.03
多发息肉	29	0.43 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.04
F 值		13.900	21.970
P 值		0.000	0.000

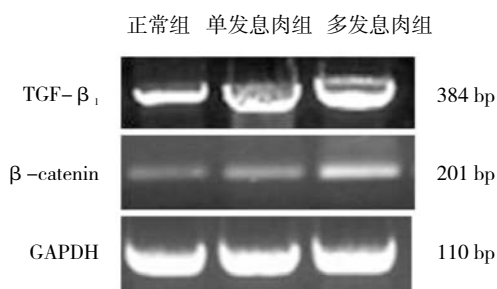


图 2 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin mRNA 的表达

### 2.3 TGF- $\beta_1$ 和 $\beta$ -catenin 相关性分析

儿童多发幼年性息肉组织中 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 的表达呈正相关 ( $r_s = 0.463$ ,  $P = 0.000$ ), 见表 3。

表 3 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 相关性分析 ( $n = 14$ )

TGF- $\beta_1$	$\beta$ -catenin		$r_s$ 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	9	5	0.463	0.000
阴性	3	16		

### 2.2 TGF- $\beta_1$ 和 $\beta$ -catenin mRNA 的表达情况

多发幼年性息肉组织中 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin mRNA 相对表达水平高于单发以及正常组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而单发幼年性息肉组织中的 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin mRNA 相对表达水平与正常组织比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2 和图 2。

## 3 讨论

幼年性息肉病常易诱发溃疡、糜烂出血。部分还出现炎症细胞浸润, 最初的研究显示幼年性息肉无癌变的倾向, 生物学效应表现为良性<sup>[3]</sup>。但近年来部分研究显示, 幼年性息肉也具有转化为腺瘤样息肉恶变的风险。BOSKOVIC 等<sup>[4]</sup>报道 1 例儿童 3 个息肉中伴有低级别上皮内瘤变 (IEN), 而国外 ADOLPH 等<sup>[5]</sup>认为幼年性息肉可以和腺瘤共存, 这也提示幼年性息肉部分可能发生癌变。

TGF- $\beta_1$  为 TGF- $\beta$  /Smad4 信号通路的多功能生长因子, 能调节上皮细胞分化, 协调组织重塑和细胞外基质的形成。并通过诱导细胞因子, 促进细胞的生长和分化, 破坏细胞基质的生长和降解平衡, 促进纤维化并参与息肉的形成。郝国荣等<sup>[6]</sup>研究发现, 子宫内膜息肉中 TGF- $\beta_1$  水平高于正常子宫内膜息肉水平。LEONARDO 等<sup>[7]</sup>研究发现, 17 例鼻息肉病患者的息肉的 TGF- $\beta_1$  水平高于 11 例正常对照的鼻黏膜中 TGF- $\beta_1$  水平。有研究显示 TGF- $\beta_1$  与肿瘤的发生、侵袭和转移有关, 对肿瘤具有双向调节作用, 早期抑制肿瘤的生长, 而晚期主要具有促进作用<sup>[8]</sup>。而且有报道 TGF- $\beta_1$  与乳腺癌的进展、浸润和预后相关<sup>[9]</sup>。本研究显示, TGF- $\beta_1$  在多发幼年性息肉中的阳性表达率以及 TGF- $\beta_1$  mRNA 相对表达水平均高于正常组, 提示 TGF- $\beta_1$  蛋白水平的改变与息肉的发生有关, 并可能促进腺瘤、腺癌的发生, 对此患儿可以询问家族史, 并采用基因检测或肠镜检查。而单发幼年性息肉组织

中的阳性表达率以及 TGF- $\beta_1$  mRNA 相对表达水平与正常组织阳性表达率比较无差异,提示单发幼年性息肉发生癌变的风险较低。而且 TGF- $\beta_1$  蛋白以及基因水平在单发以及多发幼年性息肉组织中较正常组依次增加,这也证明了上述的观点。

$\beta$ -catenin 对癌基因、抑癌基因具有一定的调节作用,高水平的  $\beta$ -catenin 容易产生降解障碍,并出现过度积聚,通过对下游基因的激活,调控细胞增殖和分化,严重时扰乱增殖和凋亡平衡,并最终形成肠息肉<sup>[10]</sup>。金美芳等<sup>[11]</sup>发现,儿童幼年性息肉中, $\beta$ -catenin 蛋白表达和分布改变明显。目前针对肿瘤中  $\beta$ -catenin 水平的变化研究报道较多,但针对儿童幼年性息肉中的  $\beta$ -catenin 水平的变化研究报道较少。本研究中,多发幼年性息肉组织中的  $\beta$ -catenin 阳性表达率以及  $\beta$ -catenin mRNA 的相对表达水平高于正常组织和单发幼年性息肉组织中的表达水平,而单发幼年性息肉组织中的  $\beta$ -catenin 阳性表达水平以及  $\beta$ -catenin mRNA 的相对表达水平与正常组织异常表达率比较无差异,提示单发幼年性息肉恶变倾向较低,但不排除多发幼年性息肉癌变的风险,尤其针对有家族史的患儿需要定时的检查和检测,减少癌变的风险。

研究表明, TGF- $\beta$ /Smad4、Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路与肿瘤的发生和进展有关,并彼此影响调控细胞分化<sup>[12]</sup>。已有研究证实, TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 共同参与、调节原发性肝癌的发生和进展,表明 TGF- $\beta$ /Smad4 信号通路中 TGF- $\beta_1$  在参与经典通路外,还可调节 Wnt 通路,并通过某些途径共同调节基因的表达<sup>[13]</sup>。WINCEWICZ 等<sup>[14]</sup>研究发现, TGF- $\beta_1$  与  $\beta$ -catenin 间的联系有差异。本研究结果表明,幼年性息肉的发生与 TGF- $\beta_1$  和  $\beta$ -catenin 异常表达有关,并具有正相关性,提示 TGF- $\beta_1$  基因可能通过  $\beta$ -catenin 途径促进息肉的形成,尤其多发幼年性息肉中更加明显,级联激活 TGF- $\beta$ /Smad4 信号通路,调控息肉组织细胞的增殖、分化和侵袭。

#### 参 考 文 献:

- [1] 刘璐,王大勇,陈巍,等. 儿童结肠息肉 590 例诊治分析[J]. 临床小儿外科杂志, 2015, 14(4): 298-301.
- [2] 田小霞,张慧英,王黎敏,等. 复合致病因素诱导肝硬化大鼠 TGF- $\alpha$  和 TGF- $\beta_1$  的动态变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(1): 65-68.
- [3] 宋博今. Smad4 与  $\beta$ -catenin 在儿童结肠息肉中的表达[D]. 河南: 郑州大学, 2014.
- [4] BOSKOVIC A, DJURICIC S, GRUJIC B, et al. Early onset of dysplasia in polyps in children with familial adenomatous polyposis: case report and literature review[J]. Arab J Gastroenterol, 2014, 15(2): 88-90.
- [5] ADOLPH V R, BERNABE K. Polyps in children[J]. Clinics in Colon & Rectal Surgery, 2008, 21(4): 280.
- [6] 郝国荣,白凤楼. TGF- $\beta_1$  在子宫内膜息肉中的表达及意义[J]. 河北医药, 2016(2): 253-254.
- [7] LEONARDO B, ROGÉRIO P, CLAUDINA P N, et al. Epithelium and stroma from nasal polyp mucosa exhibits inverse expression of TGF- $\beta_1$  as compared with healthy nasal mucosa[J]. J Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 42(1): 29.
- [8] 王轶,徐桂芳,张斌,等. TGF- $\beta_1$  通过 cyclinD3 对肝细胞癌增殖能力的双重调控作用机制[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(9): 1053-1056.
- [9] 张书勤,魏柏,马薇,等. Smad4、TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta$  R1 在乳腺癌癌细胞中的表达和意义[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(14): 3146-3149.
- [10] SUN G Y, WU J X, WU J S, et al. Caveolin-1, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in gastric carcinoma, precancerous tissues and chronic non-atrophic gastritis[J]. Chinese Journal of Cancer Research, 2012, 24(1): 23-28.
- [11] 金美芳,朱雪明,顾红英,等. E-cadherin,  $\beta$ -catenin 在儿童幼年性息肉中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(31): 3051-3056.
- [12] 饶翠,林山力,文欢,等. 经典转化生长因子  $\beta$ /Smad 信号和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号间的相互作用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2013, 42(5): 591-597.
- [13] 王海全. 转化生长因子  $\beta_1$  通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 上皮间质转化的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [14] WINCEWIZE A, KODA M, SULKOWSKI A S, et al. Comparison of beta-catenin with TGF-beta1, HIF-1alpha and patients' disease-free survival in human colorectal cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(3): 311-318.

(王荣兵 编辑)