

TSP-1 在前列腺癌中的表达及临床意义

张辉^{1*} 丁森泰¹ 刘莹² 吕家驹¹

[摘要] 目的:探讨前列腺癌中肿瘤血管生成与凝血酶敏感蛋白-1(TSP-1)表达的相关性。方法:采用免疫组织化学方法检测 22 例前列腺癌中微血管密度(MVD)值和 TSP-1 的表达,采用 RT-PCR 检测 7 例前列腺癌组织中 TSP-1 mRNA 的表达。结果:前列腺癌中 TSP-1 阳性表达率为 72.7%(16/22),绝大多数表达位于肿瘤细胞的胞质中,少数表达位于肿瘤细胞外基质。在 22 例前列腺癌组织中,平均 MVD 为 71.21±31.14/100 倍视野,具有 TSP-1 强表达的肿瘤组织中 MVD 值较高。7 例前列腺癌组织均表达 TSP-1 mRNA,TSP-1 mRNA 在前列腺癌的各期肿瘤组织呈高水平表达。TSP-1 的免疫活性与微血管密度间呈显著地相关性($r=0.54, P=0.009$)。结论:TSP-1 在前列腺癌组织中呈高表达,与前列腺癌的血管生成相关,可能有促进前列腺癌血管生长的作用。

[关键词] 前列腺癌;凝血酶敏感蛋白-1;微血管密度

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2006)09-0678-04

The expression of thrombospondin-1 in prostate cancer and its clinical significance

ZHANFG Hui¹ DING Sentai¹ LIU Ying² LU Jiaju¹

(¹Department of Urology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan, 250021, China; ²Department of Pathology, Shandong Provincial Hospital)

Abstract Objective: To investigate the expression of thrombospondin-1 (TSP-1) in prostate cancer and its relation to the angiogenesis. **Methods:** The expression of TSP-1 and microvessel density (MVD) were studied in 22 prostate cancer patients by using immunohistochemical technology, and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis for TSP-1 mRNA in 7 cases prostate cancer tissues. **Results:** Positive expression of TSP-1 protein detected in 16(72.7%) of the 22 cases. Most positive staining for TSP-1 were seen in the cytoplasm of the cancer cells, some were in the extracellular matrix. The mean MVD in 22 prostate cancer cases was 71.21±31.14 vessels per 100 high field of vision. Using RT-PCR analysis, we observed high levels of TSP-1 mRNA expression in 7 prostate cancer. Tumors with a high expression of TSP-1 showed a high MVD and the correlation between TSP-1 immunopositivity and microvessel density was highly significant($r=0.54, P=0.009$). **Conclusions:** The TSP-1 is strongly expressed in most prostate cancer and were associated with neovascularization. TSP-1 is likely to contribute to the extensive neovascularization.

Key words Prostate cancer; Thrombospondin-1; Microvessel density

肿瘤新生血管生成对实体瘤的生物学行为和转移潜能起重要作用,血管生成与肿瘤的进展和预后密切相关。血管生成有赖于诱导和抑制血管生成的许多分子之间的平衡。本文采用免疫组织化学方法检测 22 例前列腺癌组织标本的凝血酶敏感蛋白-1(Thrombospondin-1, TSP-1)的表达,并计数微血管密度(Microvessel density, MVD),分析 TSP-1 与前列腺癌微血管密度之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

22 例标本为我院 1999 年 10 月~2004 年 5 月收住院的前列腺癌患者标本,其中前列腺癌根治术标本 9 例,余均为前列腺穿刺病理标本。本组病例

均为男性,年龄 51~77 岁,平均 65.7±6.9 岁。按照 UICC1997 年分期:Ⅰ期 2 例(T₁N₀M₀ 2 例),Ⅱ期 7 例(T₂N₀M₀ 6 例, T₁N₁M₀ 1 例),Ⅲ期 3 例(T₃N₁M₀ 3 例),Ⅳ期 10 例(T₄N₁M₁ 4 例, T₄N_xM₁ 6 例)。

1.2 研究材料

采用即用型免疫组织化学染色 SABC 试剂盒(武汉博士德生物技术公司),兔抗人 CD34 多克隆抗体(北京中杉生物技术公司, Santa Cruz 公司产品),鼠抗人 TSP-1 单克隆抗体(福建迈新生物技术公司, Neomarker 公司产品),DAB 显色剂(北京中杉生物技术公司)。免疫组织化学采用 SABC 法,按照 SABC 试剂盒说明书进行,其中 CD34、TSP-1 的工作浓度均为 1:100。

Trizol 试剂购自上海生工生物工程公司,引物由上海博亚生物技术有限公司合成。RT-PCR 试

¹ 山东大学山东省立医院泌尿外科(济南, 250021)

² 山东省立医院病理科

* 现在山东省立医院器官移植中心

剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖购自北京晶美生物有限公司。Biometra Thermo cyclor PCR 扩增仪、数字图像分析仪-2200 由美国 Alpha Innotech Corporation 公司生产,低温高速离心机由美国 Heraeus 公司生产。TSP-1 引物序列:P1 为 5'-ACCGCATTCAGAGTCTGGC-3', P2 为 5'-ATGGGGACGTCCAACCTCAGC-3'; β-actin 引物序列:P1 为 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', P2 为 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。

1.3 结果判定

TSP-1 以胞质染成棕黄色的肿瘤细胞为阳性细胞。阴性(-):未见阳性细胞;弱阳性(+):阳性细胞数占肿瘤细胞数的 10%以下;阳性(++):阳性细胞数占肿瘤细胞数的 10%~50%;强阳性(+++):阳性细胞数占肿瘤细胞数的 50%以上。为了便于统计分析,将阴性和弱阳性者定义为阴性组,将阳性和强阳性者定义为阳性组。MVD 按照 Takahashi 等^[3]报道的方法进行,先用 40 倍光镜扫描整个切片,寻找血管最密集区,即“热点”。血管密集区一般位于肿瘤浸润前缘,也可位于肿瘤组织的任何部位。然后在 100 倍视野下计数微血管数量。每张切片计数 3 个视野,取 3 个视野的平均值为该切片的微血管密度。微血管的判断标准为染成棕黄色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇。

1.4 RNA 提取和 RT-PCR 反应

7 例组织标本(其中 T₁N₀M₀ 1 例, T₂N₀M₀ 4 例, T₃N₁M₀ 1 例, T₄N₁M₁ 1 例)经 Trizol 试剂按常规提取总 RNA,再经氯仿抽提纯化,异丙醇沉淀,70%乙醇洗涤,溶于 0.1%DEPC 水中,储存于-80℃冰箱中备用。按照 RT-PCR 试剂盒步骤说明进行,RT 体系如下:10 mmol/L dNTP 混合物 1 μl, 1 U/μl RNA 酶抑制剂 0.5 μl, 0.5 g/L OligodT 通用引物 1 μl, AMV 逆转录酶 1 μl, 5×逆转录缓冲液 4 μl, RNA 模板 4 μl, ddH₂O 8.5 μl, 总体积共 20 μl。逆转录反应条件:30℃反应 1 min, 42℃反应 30 min, 99℃反应 5 min, 5℃反应 5 min。PCR 反应体系:DNA 模板 2 μl, 10 mmol/L dNTP 混合物 0.5 μl, 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 1 μl, P₁P₂ 引物(12.5 pmol/each) 1 μl, 10 U/μl Taq 酶 0.125 μl, ddH₂O 18 μl, 总体积共 25 μl。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min, 94℃变性 1 min, 57℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共循环 30 次, 72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后,用数字图像分析仪-2200 成像鉴定 TSP-1 扩增产物为 493 bp, β-actin 内参照为 500 bp。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计处理,对计

数资料两因素间差异的比较采用 χ² 及 Fisher 精确检验,对计量资料的比较采用 t 检验及单因素方差分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌的微血管计数

22 例前列腺癌中,微血管内皮细胞被 CD34 抗体染色后,可见间质微血管的分布呈异质性,在肿瘤组织浸润边缘较密集,其平均微血管密度为每 100 倍视野下 71.21±31.14 个,其中 8 例有淋巴结转移者明显高于 8 例无淋巴结转移者(81.85±21.63: 52.19±25.15, P=0.024);而 10 例有远处转移者 MVD 明显高于 12 例无远处转移者(88.74±28.47: 56.6±26.0, P=0.012)(表 1, 图 1)。

表 1 MVD 与淋巴结转移、远处转移及 TSP-1 表达的关系

项目	例数	MVD	P 值
淋巴结转移			
有	8	81.85±21.63	0.024
无	8	52.19±25.15	
远处转移			
有	10	88.74±28.47	0.012
无	12	56.6±26.0	
TSP-1 蛋白			
-	2	27.95±7.42	0.009
+	4	44.88±17.43	
++	10	73.98±22.63	
+++	6	98.58±27.17	

2.2 TSP-1 的表达及其与淋巴结转移和远处转移的关系

在 22 例前列腺癌标本中, TSP-1 表达阳性率为 72.7%(16/22), 而且大多数 TSP-1 染色表达于肿瘤细胞的胞质中(图 2), 但也有一小部分表达于肿瘤细胞外基质中(图 3)。本组研究结果显示 TSP-1 的表达与前列腺癌临床分期、病理分级、有无淋巴结转移和远处转移之间均无相关性(表 2)。

7 例前列腺癌组织标本进行 RT-PCR 反应, 7 例组织标本均可以观察到 493 bp 大小的 PCR 产物片段, 其分布于前列腺癌的各期组织中(图 4)。说明 TSP-1 mRNA 在前列腺癌组织中呈高水平表达。

2.3 TSP-1 与 MVD 的关系

在 22 例前列腺癌中, 肿瘤组织中 MVD 高表达组的 TSP-1 表达率为 100%, 而 MVD 低表达组的 TSP-1 表达率为 45.45%。经统计学处理, 具有 TSP-1 高表达的肿瘤组织中, MVD 也呈高表达。TSP-1 和 MVD 之间呈显著的正相关(r=0.54, P=0.009)(图 5)。

3 讨论

新生血管的生成在实体肿瘤生长、浸润和转移

表 2 TSP-1 的表达与前列腺癌分期的关系

项目	例数	TSP-1 的表达		P 值
		阳性	阴性	
分期				
Ⅰ期	2	1	1	0.639
Ⅱ期	7	5	2	
Ⅲ期	3	3	0	
Ⅳ期	10	7	3	
淋巴结转移				
有	8	7	1	0.240
无	8	5	3	
远处转移				
有	10	7	3	0.793
无	12	9	3	
MVD*				
高	11	11	0	0.012
低	11	5	6	

* MVD 以均值 71.21 为界分为高表达和低表达两组

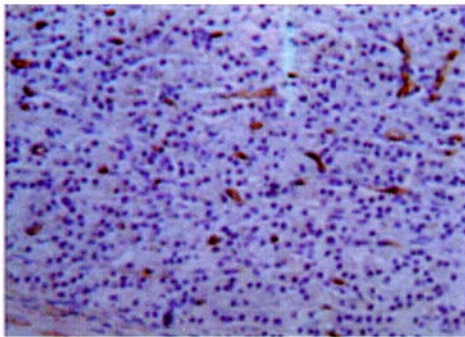


图 1 CD34 在前列腺癌组织中的表达 (×100)

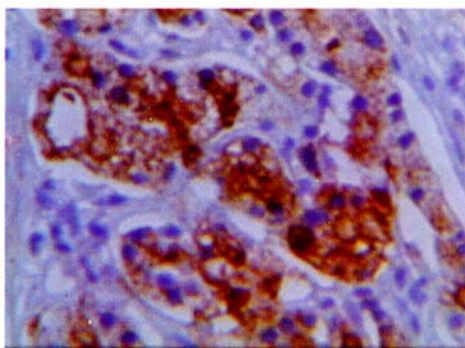


图 2 TSP-1 在前列腺癌细胞胞质中的表达 (×250)

中起重要作用。血管生成因子在新生血管生成的调控中是非常重要的,因为他们能给肿瘤的治疗提供新的机会。TSP-1 在血管生成过程中显示出重要作用,但目前 TSP-1 是肿瘤新生血管生成的抑制剂还是促进剂尚存在争议。在本组研究中,我们探讨 TSP-1 在前列腺癌组织中的分布和表达,同时分析 TSP-1 与反映肿瘤血管生成活跃程度的指标万方数据

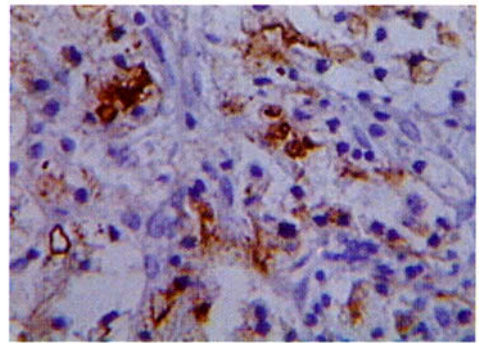
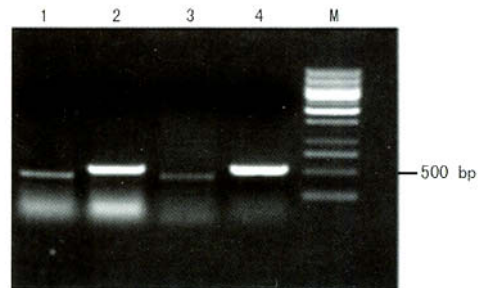


图 3 TSP-1 在前列腺癌细胞外基质中的表达 (×250)



1,3:前列腺癌组织 TSP-1 mRNA 的阳性表达;2,4:内参照 β -actin 的表达;M:DNA Marker

图 4 TSP-1 mRNA 在前列腺癌中的表达

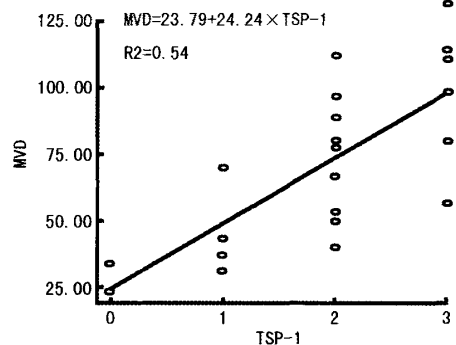


图 5 TSP-1 和 MVD 之间的相关性

MVD 间的关系以及它们与前列腺癌淋巴结转移及远处转移之间的关系。

TSP-1 是一种相对分子质量为 450 000 的多功能细胞外基质糖蛋白,属于 TSP 家族成员之一。在多种肿瘤的生长、转移及血管生成过程中起重要的调控作用,并具有判断肿瘤恶性程度的意义。本组研究中,TSP-1 的阳性表达率为 72.7%,并通过 RT-PCR 分析 TSP-1 存在于前列腺癌各期的肿瘤组织中,说明前列腺癌肿瘤细胞产生 TSP-1。22 例前列腺癌中,TSP-1 染色大多数分布于肿瘤细胞的胞质中,有少部分分布于细胞外基质,这与文献报

道相一致。有学者报道 TSP-1 在甲状腺癌^[3]、乳腺癌^[4]、前列腺癌^[5]肿瘤组织中分布于该肿瘤的胞质中,而也有一些报道显示 TSP-1 表达于胰腺癌^[6]、结肠癌^[7]肿瘤组织的细胞外基质组织中。因此, TSP-1 在肿瘤组织中的表达模式可能是依据器官及组织类型的不同而不同。

本研究却发现前列腺癌组织中 TSP-1 与 MVD 的表达存在着显著相关性,在 TSP-1 高表达的肿瘤组织中, MVD 的表达同时也升高,并呈明显的正相关。Rice 等^[8]、Miyanaga 等^[9]报告在乳腺癌、直肠癌中, TSP-1 的表达与肿瘤组织中 MVD 的表达呈显著负相关。但 Zhang 等^[10]报告在胃癌中, TSP-1 的表达与 MVD 呈正相关; Kasper 等^[6]也报道在胰腺癌中, TSP-1 的表达与 MVD 呈正相关。这些研究与本研究的结果相一致。以上这些发现提示, TSP-1 在肿瘤血管生成中的作用可能依赖于肿瘤的类型和内环境模式,但是在许多学者的研究中显示 TSP-1 在肿瘤血管中的作用呈现浓度依赖性,即在低浓度表达的组织中,其抑制肿瘤组织血管生成,而在高浓度表达的组织中则促进新生血管生成^[11]。Taraboletti 等^[12]通过研究证实了 TSP-1 分子在蛋白酶水解后释放出 25 000、140 000 两个作用相反的小分子片断,与肝素结合的 25 000 片断是 TSP-1 的血管生成活性区,而 140 000 片断仍保留着抑制血管生成的作用^[13],解释了 TSP-1 在肿瘤血管生成过程中所起的不同作用。

总之, TSP-1 在前列腺癌组织中呈高表达,且与前列腺癌组织的新生血管生成呈显著的相关性; TSP-1 的高表达可能参与前列腺癌组织中血管生成的调节,促进肿瘤血管的生成,参与肿瘤血管基因的表达。

[参考文献]

- 1 Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(4): 797-802.
- 2 Clezardin P, Frappart L, Clerget M, et al. Expression of thrombospondin (TSP-1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(6): 1421-1430.
- 3 Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, et al. Inhibition

- of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(5): 1125-1131.
- 4 Bertin N, Clezardin P, Kubiak R, et al. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues; correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(3): 396-399.
- 5 Kwak C, Jin C, Lee C, et al. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia[J]. *BJU Int*, 2002, 89(3): 303-309.
- 6 Kasper H U, Ebert M, Malfertheiner P, et al. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma; correlation with microvessel density[J]. *Virchows Arch*, 2001, 438(2): 116-120.
- 7 Maeda K, Nishiguchi Y, Yashiro M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in colorectal carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2000, 5(4): 373-378.
- 8 Rice A J, Steward M A, Quinn G M. Thrombospondin-1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(12): 921-925.
- 9 Miyanaga K, Kato Y, Nakamura T, et al. Expression and role of thrombospondins-1 in colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(6C): 3941-3948.
- 10 Zhang J, Ito R, Oue N, et al. Expression of thrombospondins-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma[J]. *Virchows Arch*, 2003, 442(6): 563-568.
- 11 Qian X, Tuszynski G P. Expression of thrombospondin-1 in cancer; a role in tumor progression[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996, 212(3): 199-207.
- 12 Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, et al. The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells[J]. *FASEB J*, 2000, 14(12): 1674-1676.
- 13 Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski G P. The role of thrombospondin-1 in tumor progression[J]. *Exp Biol Med*, 2001, 226(8): 726-733.

(收稿日期:2006-03-06)

《临床泌尿外科杂志》征文通知

随着时代的发展和科学的进步,应广大泌尿外科医生的要求,《临床泌尿外科杂志》编辑部拟于 2007 年起开辟“国外新技术简介”栏目,每期将刊发 2~3 篇简介性翻译文章,介绍国外泌尿外科新技术、新方法和新药品的使用等。每篇不超过 1 000 字,刊登时免收版面费,稿酬从优。望广大泌尿外科工作者踊跃投稿。投稿时请注明原稿出处、原著者姓名、翻译者单位和姓名、联系电话等。

《临床泌尿外科杂志》编辑部