

Granzyme B在原发及淋巴转移性胃癌细胞中的差异表达及其与肿瘤血管生成的关系

周业江, 熊玉霞, 易国平, 徐亮, 夏冬, 魏仁智

■背景资料

GrB是CTL及NK细胞所特有的细胞毒蛋白, 发现其在肺癌、乳腺癌及胃癌等上皮源性肿瘤细胞表达是近年来肿瘤研究领域的重要进展, 但GrB在上皮肿瘤细胞表达的生物学意义至今仍不清楚.

周业江, 易国平, 夏冬, 魏仁智, 徐亮, 泸州医学院附属医院普外科 四川省泸州市 646000
熊玉霞, 泸州医学院药理教研室 四川省泸州市 646000
周业江, 泸州医学院附属医院普外科副教授, 医学博士, 硕士研究生导师, 主要从事胃肠肿瘤的基础与临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30672058
通讯作者: 周业江, 646000, 四川省泸州市江阳区太平街25号, 泸州医学院第一附属医院普外科. zyj7525@163.com
电话: 0830-3165421 传真: 0830-3165421
收稿日期: 2006-08-16 接受日期: 2006-09-16

Differential expression of Granzyme B in tumor cells between primary and metastatic gastric cancer and its potential role in tumor angiogenesis

Ye-Jiang Zhou, Yu-Xia Xiong, Guo-Ping Yi, Liang Xu, Dong Xia, Ren-Zhi Wei

Ye-Jiang Zhou, Guo-Ping Yi, Liang Xu, Dong Xia, Ren-Zhi Wei, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Yu-Xia Xiong, Department of Pharmacology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30672058

Correspondence to: Dr. Ye-Jiang Zhou, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Jiangyang District, Luzhou 646000, China. zyj7525@163.com

Received: 2006-08-16 Accepted: 2006-09-16

Abstract

AIM: To investigate the potential role of Granzyme B (GrB) in the biological behavior of gastric cancer, such as angiogenesis and lymphatic metastasis.

METHODS: The identification of GrB expression in gastric cancer cells was performed immunohistologically in patients with primary gastric cancers (PGC, $n = 35$) and lymphoid metastatic gastric cancer (LMGC, $n = 23$), and GrB⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTL) served as positive internal control. The antibodies recognizing vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD34

were employed to detect the VEGF expression and microvascular density (MVD), respectively.

RESULTS: The positive rate of GrB expression was relatively lower in PGC with lymphoid metastasis than that without metastasis, but no significant difference was observed ($P = 0.709$). The positive rate of GrB expression in LMGC was significantly higher than that in the corresponding PGC ($P = 0.038$). The synchronous expression rate of GrB and VEGF came up to 57.1%, while there was no significant correlation between them. A significant negative correlation was found between the level of GrB expression and MVD ($r = -0.421$, $P = 0.012$) in PGC. VEGF expression was showed to have no significant effect on MVD in GrB positive PGC ($P = 0.494$). However, the decreased MVD in VEGF⁺ PGC was remarkably associated with GrB expression ($P = 0.023$), and similar feature was exhibited in VEGF negative PGC ($P = 0.134$). The lowest and the highest MVD were demonstrated in PGC with positive GrB and negative VEGF, and PGC with positive VEGF and negative GrB, respectively ($P = 0.013$).

CONCLUSION: The over-expression of GrB in gastric cancer cells might contribute to the inhibition of tumor angiogenesis, but also might contribute to the survival potential of diffused tumor cells in lymph gland.

Key Words: Gastric cancer; Granzyme B; Angiogenesis; Lymphoid metastasis

Zhou YJ, Xiong YX, Yi GP, Xu L, Xia D, Wei RZ. Differential expression of Granzyme B in tumor cells between primary and metastatic gastric cancer and its potential role in tumor angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(30):2938-2942

摘要

目的: 探讨胃癌细胞Granzyme B(GrB)表达在肿瘤血管生成和淋巴转移中的作用.

方法: 以细胞毒T淋巴细胞为内对照, 采用免

疫组织化学染色S-P法检测35例胃癌及其中23例淋巴转移癌细胞GrB蛋白的表达;同法检测35例胃癌血管内皮生长因子(VEGF)的表达及CD34标记的微血管密度(MVD)。

结果: GrB的表达在无淋巴转移的胃癌高于有淋巴转移者,但无显著性差异,但淋巴转移灶的胃癌细胞GrB阳性率较相应的原发肿瘤显著增高($P = 0.038$);胃癌GrB与VEGF表达的不同步率达57.1%,两者表达水平无明显相关性,而GrB表达水平与胃癌MVD呈显著负相关($r = -0.421$, $P = 0.012$);GrB阳性胃癌无论其VEGF表达水平如何,其MVD无显著差异;VEGF阳性胃癌MVD与GrB的表达状态明显相关,GrB阳性者MVD显著下降($P = 0.023$),在VEGF阴性胃癌中也有类似结果;GrB⁺&VEGF⁻表型胃癌MVD最低,VEGF⁺&GrB⁻表型胃癌MVD最高,两者有显著性的差异($P = 0.013$)。

结论: 胃癌细胞GrB表达可能有助于抑制肿瘤血管生成,但也可能有助于淋巴转移胃癌细胞的存活。

关键词: 胃癌; 颗粒酶B; 血管生成; 淋巴转移

周业江, 熊玉霞, 易国平, 徐亮, 夏冬, 魏仁智. Granzyme B在原发及淋巴转移性胃癌细胞中的差异表达及其与肿瘤血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(30):2938-2942
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2938.asp>

0 引言

Granzyme B(GrB)是细胞毒T淋巴细胞和NK细胞发挥免疫应答作用的主要效应分子,近年来有研究发现,GrB可表达于人体肺癌、乳腺癌^[1-2]和胃癌^[3]等上皮肿瘤细胞,成为肿瘤研究的重要进展。但其在肿瘤细胞中表达的生物学意义仍不清楚。本研究观察GrB在原发胃癌及淋巴转移癌细胞中的表达状况,以及GrB与VEGF表达和微血管密度(MVD)的关系,探讨GrB在胃癌血管生成和淋巴转移等生物学行为中的作用,为进一步揭示GrB在胃癌细胞表达的生物学意义奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 35例胃癌来自1996-2000年在我院普外科手术治疗的患者,其中男28例,女7例;年龄31-66(平均45)岁;早期胃癌4例(均为原位癌)、进展期胃癌31例;肿瘤浸及浆膜者16例;伴有淋巴转移者23例,参照国际抗癌联盟(UICC)的TNM分期标准,Ⅰ期10例、Ⅱ期18例、Ⅲ期15例、Ⅳ

期2例。所有胃癌患者均接受了根治性或姑息手术切除,但术前均未接受化疗、放疗及生物治疗。鼠抗GrB, CD34 mAb、兔抗VEGF多克隆抗体、Ultrasensitive S-P Kit及DAB Kit均购自福州迈新生物技术开发公司的即用型产品。

1.2 方法 石蜡包埋的组织标本5 μm连续切片,应用S-P免疫组化染色法,操作按试剂说明进行,高温高压修复抗原,用PBS替代一抗作阴性对照。胃癌细胞GrB表达以间质中GrB⁺CTL为内对照,定位于细胞质。GrB和VEGF的表达水平以染色强度评分+阳性细胞面积评分的积分表示,采用先前的方法评定^[4],以积分≥3为表达阳性,淋巴转移的胃癌细胞GrB表达采用相同的方法评估。MVD计数标准与方法参照Weidner *et al*^[5]的方法,对任何相互独立的、直径8个红细胞直径的微血管、单个内皮细胞或细胞簇均视为一个微血管计数。计数方法为:先在低倍镜(×100)下扫视整个切片,寻找出4个高血管密度区(热区),再在高倍镜(×200)下计数,其平均值作为MVD。

统计学处理 计量资料以means±SD表示,根据适用条件,组间差异比较采用One-way ANOVA或非参数检验及Pearson相关性分析;计数资料以阳性率表示,采用Fisher精确概率法分析,应用统计软件SSPS 13.0处理,以 $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 GrB在胃癌原发灶和淋巴转移灶肿瘤细胞的差异表达 以胃癌组织中浸润的GrB⁺T淋巴细胞作为阳性内对照,在各种分化程度及组织类型的胃癌中均可观察到GrB的表达,其表达定位于细胞质(图1),胃癌原发灶GrB表达阳性率为34.3%(12/35),GrB表达与肿瘤分化程度、浸润深度、淋巴结转移状态和TNM分期均无明显关系。淋巴转移灶的胃癌细胞也可见GrB表达(图2),23例淋巴转移胃癌GrB阳性表达率为65.2%(15/23),而相应的原发癌GrB阳性表达率为30.4%(7/23),两者具有显著性差异($P = 0.038$)。

2.2 GrB表达与胃癌VEGF表达和血管生成活性的关系 VEGF表达定位于细胞质,CD34位于肿瘤血管内皮细胞,显示肿瘤新生血管(图3)。GrB阳性胃癌VEGF的表达水平高于GrB阴性胃癌,但差异无统计学意义,相关分析显示两者无显著相关性($P = 0.31$);GrB阳性胃癌MVD显著低于GrB阴性胃癌,具有统计学意义(39.12 ± 14.56 vs 53.05 ± 20.97 , $P = 0.048$),相关性分析显

■ 研究前沿
淋巴转移和血管生成是影响胃癌预后的重要因素,GrB表达在胃癌淋巴转移和血管生成中的作用目前尚不清楚,我们就此进行初步探讨。

■创新盘点

本研究提示GrB可能具有双向作用: (1)具有VEGF非依赖性的抑制胃癌血管生成的作用; (2)GrB表达本身并无促进胃癌淋巴转移的作用, 但可能使转移的胃癌细胞具有免疫耐受的功能而有助于在淋巴结的存活和发展. 国内外无类似报道.

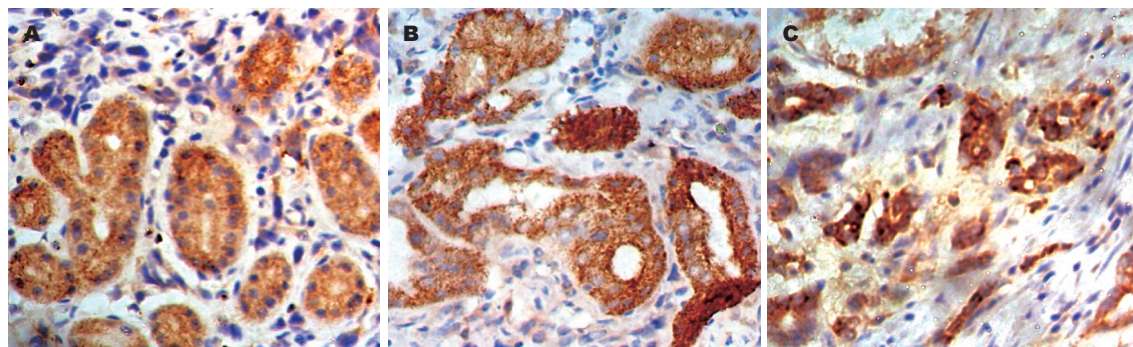


图1 胃癌细胞GrB阳性表达(SP×400). A: 高分化腺癌; B: 中分化腺癌; C: 低分化腺癌.

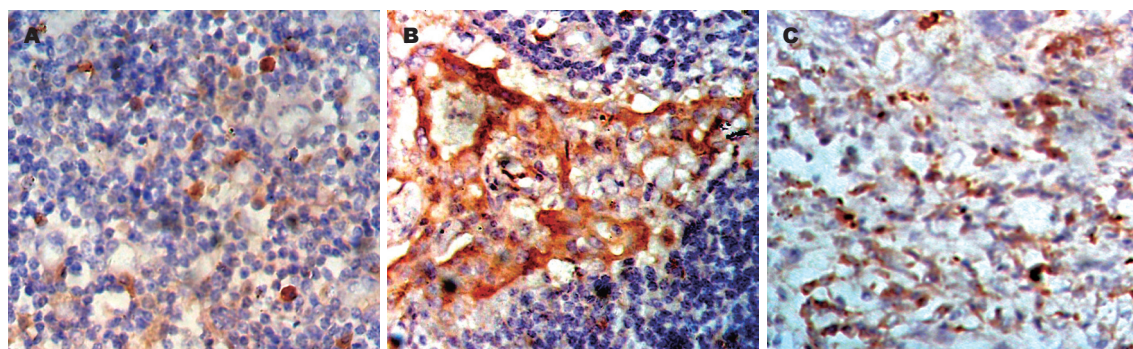


图2 GrB在淋巴转移胃癌细胞阳性表达(SP×400). A: 淋巴细胞GrB表达(阳性对照); B: 淋巴转移胃癌细胞GrB强阳性表达, 周围淋巴组织可见GrB阳性淋巴细胞; C: 淋巴转移的胃低分化腺癌GrB阳性表达.

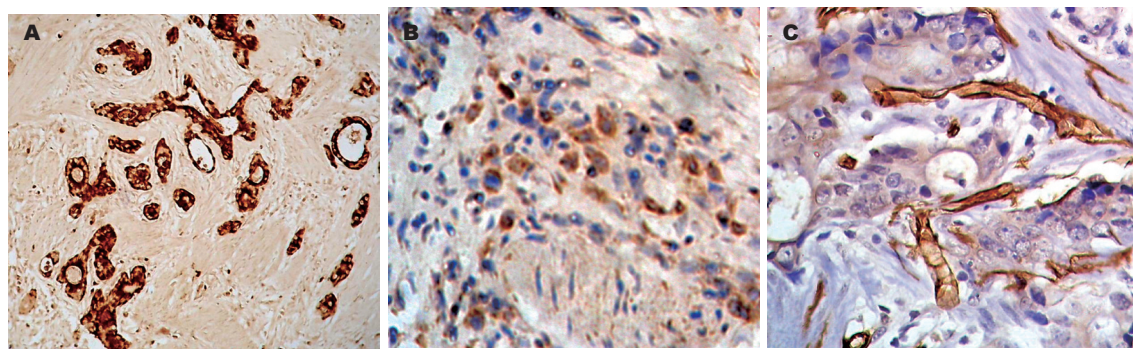


图3 胃癌组织VEGF表达和肿瘤微血管检测(SP). A-B: 浸润性胃中、低分化腺癌(×200); C: CD34⁺肿瘤微血管内皮细胞(×400).

示, GrB表达程度与胃癌MVD呈显著负相关($r = -0.421, P = 0.012$, 图4).

2.3 GrB和VEGF表达之间的关系及其不同组合与胃癌血管生成活性的关系 GrB和VEGF组成的4种不同表型的胃癌中, 两者同时阳性表达者占22.8%(8/35), 同时阴性表达者占34.3%(12/35), 同步率为57.1%; GrB⁺&VEGF⁻胃癌占11.43%(4/35), GrB⁻&VEGF⁺胃癌占31.4%(11/35), 非同步率42.9%, 两者无显著差异($P > 0.05$). GrB和VEGF组成的各表型组间胃癌MVD有显著性差异($F = 3.142, P = 0.039$), 其中

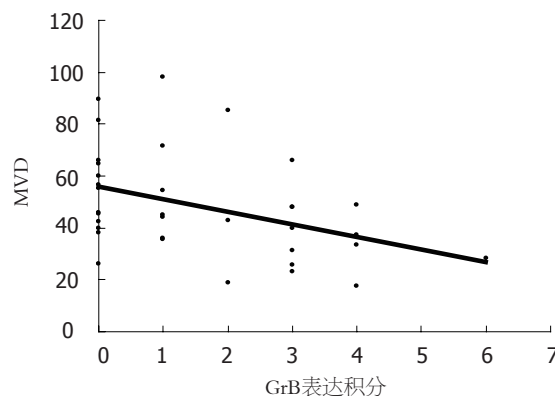


图4 胃癌细胞GrB表达水平与肿瘤血管生成的关系.

以GrB⁺&VEGF⁻胃癌MVD最低, GrB⁻&VEGF⁺胃癌MVD最高. 分层分析显示: 在GrB⁺胃癌中, VEGF阳性较VEGF阴性者MVD增高, 但无统计学意义; 在GrB⁻胃癌中VEGF阳性较阴性者MVD增高更为明显, 但亦无统计学意义(60.14 ± 19.8 vs 48.4 ± 20.34 , $P = 0.134$), 与之相反, 在VEGF阳性胃癌中, GrB阳性者MVD显著下降(60.14 ± 19.8 vs 39.88 ± 13.97 , $P = 0.023$); 在VEGF阴性胃癌中, GrB阳性者MVD亦明显低于GrB阴性者, 但无统计学意义(48.4 ± 20.34 vs 32.13 ± 13.4 , $P = 0.134$); GrB⁺&VEGF⁺胃癌组织MVD高于GrB⁺&VEGF⁻胃癌, 两者差异有统计学意义(60.14 ± 19.8 vs 32.13 ± 13.4 , $P = 0.013$).

3 讨论

GrB在非淋巴肿瘤中表达的报道极少. Kontani *et al*^[1]首先发现GrB和穿孔素在人体乳腺癌和肺癌细胞的表达, 且两者的表达水平与区域淋巴结的转移呈显著负相关; Hu *et al*^[2]最近在人体乳癌细胞和RB缺失的乳癌细胞株证实确有内源性GrB的表达, 但其表达调节机制仍不明确. 本研究显示, GrB在人体胃癌细胞也有表达, 值得注意的是, GrB在分化程度较高, 浸润程度较低、无淋巴转移的胃癌中表达较高, 呈现出与胃癌分化、浸润, 淋巴转移等生物学行为为负性关联的趋势, 尽管无统计学意义, 这是否可提示GrB阳性的胃癌具有较好的预后? 由于本研究观察的样本量较小, GrB表达与胃癌生物学行为的关系尚难以确定, 需要进一步研究. GrB在胃癌淋巴转移中的作用是本研究关注的重要内容, 为此, 我们进一步检测了淋巴转移性胃癌细胞GrB表达的情况. 结果发现, 在淋巴转移肿瘤细胞GrB呈阳性或强阳性表达, 而其相应的原发灶肿瘤细胞GrB则呈弱阳性表达, 转移至淋巴结的胃癌细胞GrB表达水平较相应的原发肿瘤细胞显著上调, 这是否暗示GrB阳性胃癌细胞可能具有较高的淋巴转移潜能? 有研究显示, 表达GrB的淋巴细胞及树突状细胞本身可表达丝氨酸蛋白酶抑制剂PI9, PI9可防止GrB介导的细胞毒攻击而具有免疫豁免功能^[6], 我们推测表达GrB的胃癌细胞也可能存在类似的机制. 由此, 我们提出下列假说: GrB阳性的胃癌细胞本身可能并不具有更高的淋巴转移潜能, 但其可使肿瘤细胞获得免疫耐受的功能: 一旦发生转移后能更好地耐受CTL攻击而在淋巴组织获得较高的生存

能力, 而GrB阴性胃癌细胞转移到淋巴组织则易被清除而难以存活和发展, GrB在淋巴转移性的胃癌细胞高表达现象可能是经过细胞免疫选择后的结果. 无论如何, 本研究结果提示, GrB表达与胃癌淋巴转移可能有着密切的关系.

VEGF是最强的促肿瘤血管生成的主要因子, 其表达与胃癌血管生成显著相关. 本研究显示, GrB阳性胃癌MVD显著低于GrB阴性者, 其表达程度与MVD呈显著负相关; 但GrB阳性胃癌其VEGF的表达水平并不下降, 反而有所上调; 在GrB和VEGF的各种组合表型中, GrB阳性胃癌无论VEGF的表达水平如何, 其MVD均较GrB阴性表达者显著降低; 分层分析发现: 在GrB阳性胃癌中VEGF阳性表达者MVD仅有轻度增加(无统计学意义), 但在GrB阴性胃癌中VEGF表达者MVD则显著增加; 无论胃癌VEGF的表达状态如何, GrB阳性表达者MVD均显著下降, 尤以在VEGF阳性者更为显著. 而仅有GrB阳性表达胃癌MVD极显著地低于仅有VEGF阳性表达者. 这些结果强烈提示胃癌细胞GrB表达对肿瘤血管生成活性可能具有抑制作用, 其作用并非是通过调节VEGF表达的途径, 也不受VEGF表达水平的影响, 并对VEGF诱导血管生成还可能具有显著的拮抗作用.

GrB是细胞毒蛋白, 可以穿孔素依赖和非依赖的方式进入靶细胞并水解其DNA, 诱导其凋亡, 清除病变细胞, 在细胞免疫中是主要的效应分子. 体外实验证实, 血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合肽-GrB融合蛋白可靶向进入表达VEGFR的猪动脉内皮细胞, 诱导其凋亡^[7]和靶向破坏LoVo细胞诱导的鸡胚绒毛尿囊新生血管^[8], 提示GrB对肿瘤新生血管内皮细胞具有显著细胞毒作用. 据此并结合本研究结果, 我们推测GrB抑制血管生成机制可能有: (1)新生血管内皮细胞有较高的VEGF或其他促血管生成因子的受体表达, GrB也可能在肿瘤细胞内与VEGF或其他促血管生成因子形成融合蛋白的形式分泌, 对新生血管内皮细胞产生靶向细胞毒作用, 诱导其凋亡, 从而抑制血管生成, 其作用对VEGF或其他促血管生成因子的表达有一定依赖性; (2)肿瘤新生血管内皮细胞结构尚不完整, 渗透性高, 为GrB的进入提供了条件, 胃癌细胞通过旁分泌GrB, 发挥细胞毒作用, 直接诱导新生血管内皮细胞凋亡, 其作用不依赖于VEGF的表达.

■应用要点

GrB阳性胃癌可能是胃癌的新亚型, 其生物学行为一定有其特殊性, 对其进一步认识有助于探索胃癌的起源和肿瘤免疫耐受新机制, 对其他肿瘤的研究也有借鉴作用.

■同行评价

本文探讨了胃癌细胞GrB表达与血管生成和淋巴转移中的作用,发现GrB对胃癌血管生成和淋巴转移有抑制作用,为了解胃癌生物学行为提供了重要指标。

4 参考文献

- 1 Kontani K, Sawai S, Hanaoka J, Tezuka N, Inoue S, Fujino S. Involvement of granzyme B and perforin in suppressing nodal metastasis of cancer cells in breast and lung cancers. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 180-186
- 2 Hu SX, Wang S, Wang JP, Mills GB, Zhou Y, Xu HJ. Expression of endogenous granzyme B in a subset of human primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 2003; 89: 135-139
- 3 Zhou YJ, Xiong YX, Li CP, Shi D. Suppression of local immune response by GrB expression in gastric cancer cells. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1573-1575
- 4 Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3225-3229
- 5 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor

angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-1887

- 6 Bladergroen BA, Meijer CJ, ten Berge RL, Hack CE, Muris JJ, Dukers DF, Chott A, Kazama Y, Oudejans JJ, van Berkum O, Kummer JA. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 2002; 99: 232-237
- 7 Liu Y, Cheung LH, Thorpe P, Rosenblum MG. Mechanistic studies of a novel human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)₁₂₁ and the serine protease granzyme B: directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 949-59
- 8 李先茂, 曾位森, 张亚历, 刘晓晴. 血管内皮生长因子受体结合肽介导颗粒酶B靶向性抗肿瘤血管生成. *第四军医大学学报* 2002; 23: 1929-1932

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到:世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].