

E-钙粘蛋白在胃癌演进过程中的改变及意义

付伟伟 纪祥瑞 李玉军 孙玲玲

作者单位:266003 青岛市,青岛大学医学院附属医院病理科

【摘要】 目的 了解 E-钙粘蛋白在基因产物水平异质化表达对胃癌发生发展中的作用。**方法** 以 35 例新鲜胃癌标本和 10 例癌旁组织标本中提取的 DNA 为模板,采用 PCR-单链构象多态性分析法对 E-钙粘蛋白的 exon8 和 exon9 的基因突变进行筛选,对筛选阳性标本行 DNA 序列测定进行确证;采用免疫组化法检测以上标本的 E-钙粘蛋白表达情况;采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据分析。**结果** 35 例胃癌标本中有 3 例检出 E-钙粘蛋白 exon8 突变,突变阳性率为 8.6%(3/35),exon9 未发现基因突变,检测出的突变全部位于分化不良型胃癌标本中。6 例分化型胃癌和 10 例癌旁组织中未检出基因突变。E-钙粘蛋白在癌与癌周黏膜、肿瘤分化程度及 Lauren 不同分型中的表达差异均具有统计学意义(P 均 <0.05)。**结论** E-钙粘蛋白是参与胃癌发生、发展的重要分子,其表达与胃癌的分化程度、浸润性生长、组织结构完整性和破坏程度等生物学行为具有较显著相关性,其发生基因突变是导致胃癌发生、发展的重要因素。

【关键词】 胃肿瘤;E-钙粘蛋白;基因突变;PCR-SSCP

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.004

The alteration and significance of E-cadherin during the progression of gastric carcinoma

FU Wei-wei, JI Xiang-rui, LI Yu-jun, et al. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of expression of E-cadherin in the level of gene products to gastric carcinoma's development. **Methods** 35 specimens from primary site of gastric carcinoma and 10 specimens from peripheral tissues of gastric tumor were detected. And the the E-cadherin gene mutation in exon8 and exon9 were screened by PCR-single strand conformational polymorphism method, and the positive results were confirmed by DNA sequencing. The protein expression of E-cadherin in these specimens were detected by immunohistochemistry. All data were analysed by SPSS 12.0 software. **Results** In 35 specimens, 3 specimens were detected E-cadherin gene mutation in exon8, the mutation rate was 8.6%(3/35). There was no E-cadherin gene mutation in exon9. 3 specimens E-cadherin gene mutation in exon8 were undifferentiated specimens. E-cadherin gene mutation in 6 specimens differentiated gastric carcinoma and 10 specimens adjacent gastric mucosa were not detected. The different expressions of E-cadherin in gastric carcinoma and mucous membrane of the gastric carcinoma, degree of tumor differentiation and Lauren types were all had statistical significance (P all <0.05). **Conclusion** E-cadherin is an important gene during the process of gastric carcinoma, significantly related with the degree of differentiation, infiltration growth, the integrity of tissue structure of gastric cancer, and the mechanism of gene mutation. E-cadherin gene mutation is an important factor led to the progress of gastric carcinoma.

【Key words】 Gastric neoplasms; E-cadherin; Gene mutation; PCR-SSCP

我国是胃癌的高发区,胃癌年患病率和病死率均明显高于世界平均水平,胃癌的发生及演进过程是一个多步骤、连续的过程,肿瘤细胞间黏附力的丧失是胃癌浸润转移的关键环节之一。E-钙粘蛋白是一种重要的存在于细胞膜上的钙依赖性黏附分子,其第 6~11 外显子(exon)能与钙离子特异性结合而发挥黏附功能。同时 E-钙粘蛋白是上皮细胞-间质细胞转变的关键分子,其在维持癌细胞的上皮形态

和功能方面起着某种关键性作用,其表达程度及功能活性状态直接影响细胞正常的黏附和信号转导功能,导致细胞的脱离、侵袭和转移^[1]。因此,下调肿瘤细胞 E-钙粘蛋白可使非侵袭性肿瘤进一步转变为高侵袭性肿瘤^[2]。目前发现基因突变或缺失、表达下降以及转录和翻译的失常等多种机制可导致 E-钙粘蛋白异常^[3]。而 Fukudome 等^[4]研究发现 exon8 和 exon9 在胃癌中的突变频率较高。因此,本文研究采

用 PCR-单链构象多态性(PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)分析检测 E-钙粘蛋白 exon8 和 exon9 的基因突变情况,并采用 DNA 序列分析法确证突变谱,结合 E-钙粘蛋白免疫组化的表达情况,从基因水平和蛋白水平探讨 E-钙粘蛋白功能异常的部分调控机制,阐述其在胃癌演进异质化过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院病理科 2004 年 9 月至 2004 年 11 月的 35 例新鲜胃癌手术标本,其中男 28 例,女 7 例,平均年龄(60.60 ± 10.36)岁;10 例癌周正常黏膜(距肿瘤边缘 ≥ 5 cm)标本,其中男 7 例,女 3 例,平均年龄(63.8 ± 9.45)岁。根据日本胃癌研究会 1995 年的分型方案,将胃癌分为分化型(乳头状和高、中度分化的管状腺癌)和分化不良型(低分化腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌和未分化癌),其中中度分化腺癌 6 例,低分化腺癌 22 例,黏液腺癌 5 例,印戒细胞癌 2 例;按 Lauren 分型将胃癌分为肠型、弥漫型和混合型,其中肠型为 6 例,弥漫型为 25 例,混合型为 4 例。

1.2 仪器与试剂 DNA 扩增仪 4800 型(美国 PERKIN 公司)、紫外投射仪 MacroVueUvis-20 型(美国 Hoefer 公司)、垂直电泳仪 MiniVE 型(美国 Hoefer 公司)、电泳仪(北京市六一仪器厂)、石蜡切片机 Leica RM2135 型(德国 Leica 公司)、电热恒温水浴箱 HHW21Cu600 型(上海医疗器械厂);PCR 试剂(TaqDNA 聚合酶、dNTPs、 $10\times$ buffer、 Mg^{2+})购自北京 Promega 公司;引物由上海生物工程工程技术公司合成(PAGE 纯化);蛋白酶 K、琼脂糖购自上海生物工程工程技术公司;Tris、EDTA、SDS、饱和酚、氯仿、丙烯酰胺等为国产分析纯及生化试剂;兔抗人 E-钙粘蛋白单克隆抗体及 PV-9000 试剂盒均购于北京中山试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR-SSCP 法 采用 PCR-SSCP 法对 E-钙粘蛋白 exon8、exon9 的基因突变进行筛选。

1.3.1.1 DNA 提取 取液氮保存的新鲜手术标本约 1 g,加入 4 μ l 的蛋白酶 K(终浓度 0.1 mg/mL)和 DNA 提取缓冲液 500 μ l,55 $^{\circ}$ C 温浴 3 h,酚/氯仿/异戊醇抽提,冰无水乙醇沉淀,冰 75%酒精洗涤,重溶于双蒸水中,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.3.1.2 引物设计 ① exon8:F 5'-AGGTGGC-TAGTGTTCCTCG-3'(218 bp);R 5'-CCTTTCTTTG-GAAACCTCTAA -3'。② exon9:F 5'-GACA-

CATCTCTTTGCTCTGC -3'(268 bp);R 5'-GGA-CAAGGGTATGAACAGCT-3'。

1.3.1.3 PCR 扩增 PCR 反应总体积为 25 μ l,其中含基因组 DNA 2 μ l、 $4\times$ dNTPs 2.5 μ l、 Mg^{2+} 1.2 μ l、引物各 1 μ l、1 U TaqDNA 聚合酶 0.4 μ l、 $10\times$ buffer 2.5 μ l、双蒸水 14.4 μ l。于 PCR 循环仪中 94 $^{\circ}$ C 变性 75 s,60 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.3.1.4 电泳、银染 取 2~3 μ l PCR 产物加等体积变性缓冲液混匀,沸水中变性 10 min,冰上骤冷 5 min,快速上样;行 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(丙烯酰胺:甲双叉丙烯酰胺=29:1),电泳条件为缓冲液 $1\times$ TBE,环境温度 4 $^{\circ}$ C,恒压 150 V,时间 120~180 min。取下凝胶,于固定液(10%乙醇+0.5%冰醋酸)中 5~10 min,双蒸水漂洗两次;凝胶浸泡于染色液(0.2%硝酸银)中 5~10 min,双蒸水漂洗两次;将凝胶浸泡于显色液(0.75%氢氧化钠+0.2%甲醛)中显色,至出现棕褐色 DNA 区带为止,双蒸水漂洗,阅读结果。

1.3.1.5 结果判断及标准 正常的双链 PCR 片段经变性处理后,在非变性聚丙烯酰胺凝胶下电泳应出现两条单链条带及未变性完全的 DNA 双链,因此 PCR-SSCP 分析结果至少显示三条条带。但是,由于一种 DNA 单链有时可形成两种或多种构象,有可能检出三条或四条单链条带。若 PCR 片段有突变、插入或缺失,由于其单链构象发生改变而使单链的泳动速度异常或条带数增加、减少。我们依照以下标准判断为异常迁移条带:(1)结果具有可重复性;(2)异常迁移条带仅见于肿瘤组织中;(3)其他病例正常标本中未见异常迁移条带。

1.3.2 DNA 序列分析 将经 PCR-SSCP 法筛选为突变阳性的 E-钙粘蛋白编码基因的 PCR 产物各 50~100 μ l,送至上海生工生物工程测序部(仪器为 ABI PRISM 377-96,测序试剂为 Big Dye terminator)分别用自带引物(同 PCR 引物)20 μ l 进行测序。

1.3.3 免疫组化分析 将与 PCR 标本相对应的石蜡标本切成 5~7 μ m 厚的切片,采用兔抗人 E-钙粘蛋白单克隆抗体及 PV-9000 试剂盒,两步法染色,DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。实验操作严格按照试剂盒说明书进行。E-钙粘蛋白阳性判断标准:阳性细胞呈细胞膜连续性着色,癌周胃黏膜 E-钙粘蛋白上皮细胞膜几乎全部着色,在细胞相邻的侧面呈连续线状。每张切片观察 10 个具有代表性的视野,评分采用着色细胞百分率得分法,<5%为 0

分,5%~25%为1分,26%~50%为2分,>50%为3分,0~1分为阴性,2~3分为阳性。免疫染色部分的改变(位于细胞质内或细胞核内)视为异常,记为0分。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件对所有数据进行分析,组间率的比较采用 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 PCR 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳证实每一标本都成功扩增出 E-钙粘蛋白的 exon8 和 exon9 产物(见图 1)。

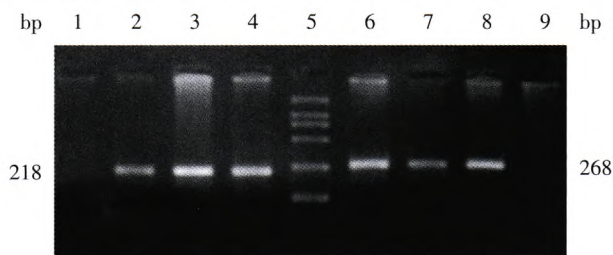


图 1 E-钙粘蛋白 exon8 和 exon9 的 PCR 产物

注:1,9 阴性对照;5 为 DL2000 DNA marker,从上到下,条带依次为 2000 bp、1000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp;2~4 为扩增的不同组织的 exon8 产物(218 bp);6~8 为扩增的不同组织的 exon9 产物(268 bp)

2.2 PCR-SSCP 结果 35 例胃癌标本中,3 例(分别用 A、B、C 表示)E-钙粘蛋白的 exon8 中出现了异常条带(见图 2~图 4),表明发生了基因突变,突变阳性率为 8.6%(3/35),exon9 未发现基因突变。发生突变的 3 例标本全部为分化不良型胃癌标本(A 及 C 标本为印戒细胞癌,B 标本为低分化腺癌),6 例分化型胃癌和 10 例癌旁组织标本均未检出基因突变。

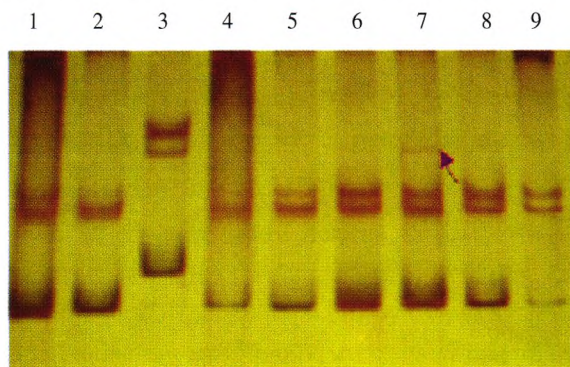


图 2 含 A 标本的各类型 PCR-SSCP 银染结果

注:7 为 A 标本的 E-钙粘蛋白 exon8 的 PCR-SSCP 银染条带,箭头所示为银染异常条带;3 为 A 标本的 E-钙粘蛋白 exon9 的 PCR-SSCP 银染正常条带;8,9 为癌旁组织,其余为肿瘤组织的 E-钙粘蛋白 exon8 的 PCR-SSCP 银染正常条带

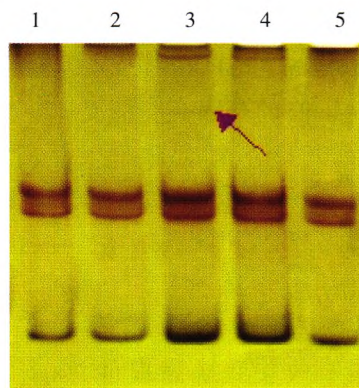


图 3 含 B 标本的各类型 PCR-SSCP 银染结果

注:3 为 B 标本 E-钙粘蛋白 exon8 的 PCR-SSCP 银染条带,箭头所示为银染异常条带;5 为癌旁组织 exon8 的正常条带,其余为肿瘤组织的 exon8 的 PCR-SSCP 银染正常条带

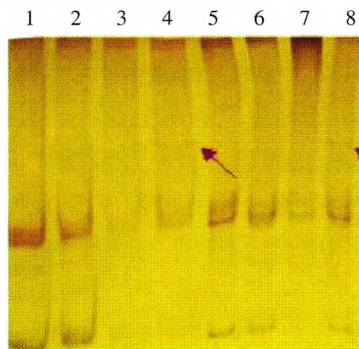


图 4 含 C 标本的各类型 PCR-SSCP 银染结果

注:4,8 为 C 标本 E-钙粘蛋白 exon8 的 PCR-SSCP 银染条带,箭头所示为银染异常条带;1~3 同 5~7,为肿瘤组织的 E-钙粘蛋白 exon8 的 PCR-SSCP 正常条带

2.3 DNA 测序结果 3 例 PCR-SSCP 银染分析阳性样本经 DNA 测序分析均确定了突变位点。突变类型为插入突变 1 例,碱基置换 2 例。A 标本在编码 22 位点处发生碱基置换 CCG→CCG, B 标本在编码 124 位点处发生碱基置换 AGG→ATG, C 标本在编码 29 位点处插入 A 碱基(见图 5~图 7)。

2.4 E-钙粘蛋白免疫组化结果及其表达情况与临床病理因素的关系 胃癌组织中 E-钙粘蛋白呈不连续性胞膜着色(见图 8),胞浆或胞核异质性着色(点状、间断状、小团状胞浆着色),尤其是印戒细胞癌、低分化腺癌和弥漫性浸润的癌细胞几乎不着色,或呈少量胞浆、胞核表达(见图 9~图 11)。

由表 1 可见,E-钙粘蛋白的表达在胃癌患者的肿瘤大小、年龄、性别、肿瘤浸润深度和肿瘤是否淋巴结转移中的差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),但在癌与癌周黏膜、肿瘤分化程度及 Lauren 分型中的差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

3 讨论

E-钙粘蛋白与连环蛋白结合后形成细胞内的

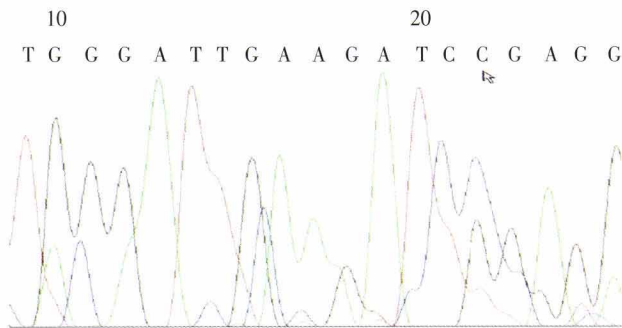


图 5 A 标本的 E-钙粘蛋白 exon8 的突变情况

注:在编码 22 位点处碱基置换 CGG→CCG

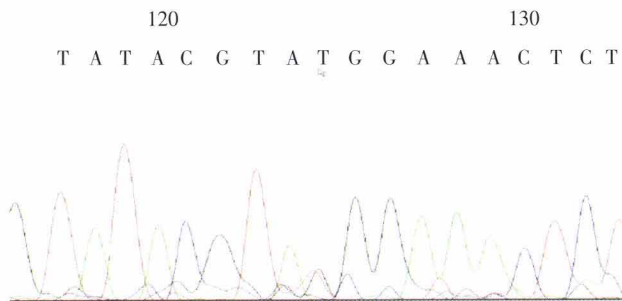


图 6 B 标本的 E-钙粘蛋白 exon8 的突变情况

注:突变位置在编码 124 位点处碱基置换 AGG→ATG

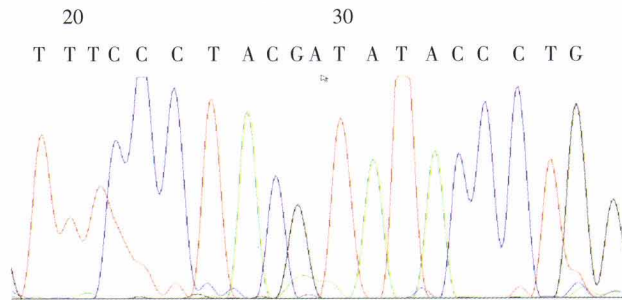


图 7 C 标本的 E-钙粘蛋白 exon8 的突变情况

注:在编码 29 位点处插入 A 碱基

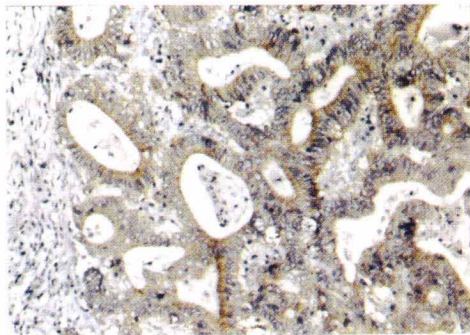


图 8 E-钙粘蛋白在胃中度分化腺癌中的表达(200×)

黏着复合体,该细胞黏附系统对于维持细胞间的黏附尤其重要,其发生改变是肿瘤恶变的重要特征之一。作为细胞黏着复合体的重要组成部分,E-钙粘蛋白基因固定于 16 号染色体长臂上(16q22.1)^[3],包括细胞外区、跨膜区和细胞内区三部分,细胞外区的功能最重要,其 exon6~11 能与钙离子特异结合而发挥黏附功能,尤其是 exon8 和 exon9 在胃癌中的突

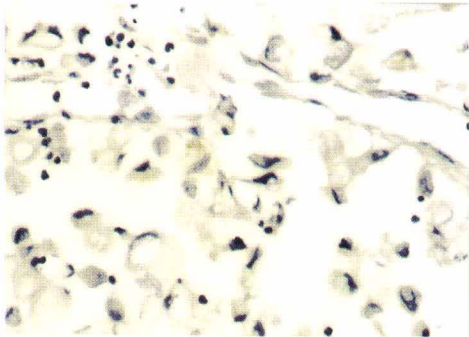


图 9 印戒细胞癌(A 标本)中 E-钙粘蛋白的异质性表达(400×)

注:仅见极少量细胞胞浆内表达

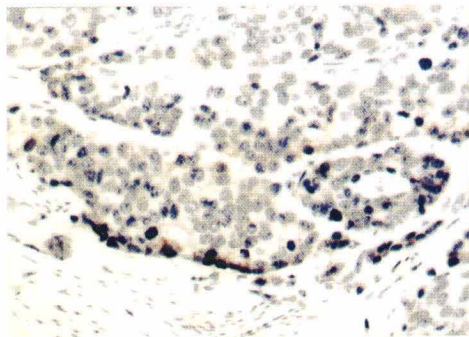


图 10 低分化腺癌(B 标本)中 E-钙粘蛋白的表达(400×)

注:仅见极少量细胞胞浆内弱表达

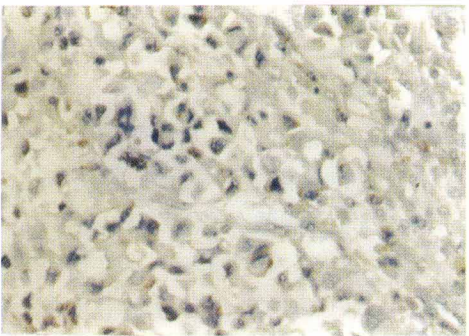


图 11 印戒细胞癌(C 标本)中 E-钙粘蛋白的异质性表达(200×)

注:部分癌细胞呈胞浆、胞核表达

变频率较高。

E-钙粘蛋白在胃癌组织中免疫组化的异常表达常表现为低表达、异位表达,甚至表达缺如,而异位表达的 E-钙粘蛋白可能是一种功能异常或无功能的蛋白,其机制之一为 E-钙粘蛋白在肿瘤中的基因突变。本文研究中发生突变的 A 和 B 标本中 E-钙粘蛋白免疫组化染色显示癌细胞仅少量胞浆、胞核表达,说明在这两个标本中既存在基因的异常,也可能存在其他机制导致的表达量的降低,即基因和蛋白产物两个水平均出现异常,从而导致 E-钙粘蛋白黏附系统功能的失调。发生基因突变的 C 标本中免疫组化显示一定量 E-钙粘蛋白表达,但其表达多

表 1 E-钙粘蛋白表达情况与临床病理因素的关系

		例数	正常表达	异常表达	正常表达率(%)	确切概率(P 值)	P 值
年龄	≤ 50 岁	8	1	7	12.5	12.5000	> 0.05
	> 50 岁	27	8	19	29.6		
性别	男	28	7	21	25.0	0.6450	> 0.05
	女	7	2	5	28.6		
肿瘤大小	< 5 cm	15	3	12	20.0	0.7000	> 0.05
	> 5 cm	20	6	14	30.0		
浸润深度	未侵及浆膜	6	1	5	16.7	1.0000	> 0.05
	侵及浆膜	29	8	21	27.6		
淋巴结转移	阴性	9	4	5	44.4	0.1920	> 0.05
	阳性	26	5	21	19.2		
分化程度	分化型	6	4	2	66.7	0.0270	< 0.05
	分化不良型	29	5	24	17.2		
癌与癌周黏膜	原发癌	35	9	26	25.7	0.0004	< 0.05
	癌周黏膜	10	9	1	90.0		
Lauren 分型	肠型、混合型	10	7	3	70.0	0.0005	< 0.05
	弥漫型	25	2	23	8.0		

丧失了膜性表达而主要弥散性的分布于整个细胞浆中,其细胞膜表达分布散乱,极性分布消失。以上发现使本文进一步确认在这些肿瘤细胞中的 E-钙粘蛋白黏附系统的失活与基因突变有关。

E-钙粘蛋白的异常表达及在细胞内的定位异常往往意味着肿瘤的恶性程度更高、侵袭能力更强。本文研究中 E-钙粘蛋白基因突变阳性检出者均为弥漫型胃癌,免疫组化结果显示 E-钙粘蛋白在分化型胃癌(印戒细胞癌、低分化癌及黏液腺癌)中的正常表达率显著高于分化不良型(本文研究中仅为中度分化腺癌),在肠型、混合型胃癌中正常表达率显著高于弥漫型胃癌,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。免疫组化结果和突变分析结果均表明 E-钙粘蛋白表达与胃癌的分化程度、浸润能力、组织结构完整性、破坏程度等生物学行为具有较显著的相关性,并且在决定向哪种亚型发展中起着重要的作用。

由此可见,E-钙粘蛋白表达异常是胃癌恶变重要的生物学指标,能更准确地反映胃癌浸润转移的生物学行为,对判断预后具有重要的指导意义^[5],具有临床应用的价值和潜力。基因突变是导致 E-钙粘蛋白功能异常的重要机制之一,E-钙粘蛋白功能破坏是导致细胞发生浸润转移的关键步骤之一^[6]。其功能异常机制有多种,如转录抑制、基因突变、启动子区域甲基化、连环蛋白异常或删除等^[7]。本文仅就 E-钙粘蛋白基因突变进行相关研究,证实其发生基

因突变是导致胃癌发生、发展过程中的重要分子改变。对 E-钙粘蛋白从基因水平和蛋白产物水平综合分析,可加深对胃癌的发生机制的研究,提示临床可从多角度、多层次了解肿瘤的演进和异质化。

4 参考文献

- 1 Gloushankova NA. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumour transformation. Biochemistry (Mosc), 2008, 73: 742-750.
- 2 廖雯婷,崔艳梅,丁彦青. Bmi-1 PTEN 及 E-Cadherin 在结直肠癌中的表达和意义. 中国肿瘤临床, 2012, 39: 559-563.
- 3 崔银江, 李少华. E-钙粘附素的研究进展. 中国矫形外科杂志, 2009, 17: 1001-1003.
- 4 Fukudome Y, Yanagihara K, Takeichi M, et al. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse type human gastric carcinoma. Int J Cancer, 2000, 88: 579-583.
- 5 葛杰, 陈子华, 陈志康, 等. CDX2 和 E-钙粘附素在胃癌组织中的表达及临床意义. 南方医科大学学报, 2008, 28: 279-281.
- 6 许春进, 刘华, 陈玉龙, 等. E-钙粘附素和基质金属蛋白酶-2 在胃癌中的表达及浸润转移的关系. 中华消化杂志, 2003, 23: 753-754.
- 7 Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-cateinin adhesion and signaling functions. Physiology (Bethesda), 2007, 22: 303-309.

(收稿日期: 2012-11-23)

(本文编辑: 杨军)