

埃兹蛋白与直肠癌发生和局部复发的关系及意义

郭学峰¹, 向贤宏², 何真¹, 马腾辉¹, 兰平¹, 王磊¹, 汪建平^{1*}

(中山大学 1.附属第六医院结直肠外科, 2.附属第一医院肿瘤一科, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨埃兹蛋白(ezrin)的表达在直肠癌发生和局部复发中的关系及意义。【方法】收集中山大学附属第六医院和中山大学附属第一医院 2002 年 8 月至 2009 年 2 月间术后复发的直肠癌石蜡标本 148 例、癌旁正常组织 30 例和随访 5 年内未见肿瘤复发的直肠癌组织 30 例,应用免疫组化的方法检测埃兹蛋白的在癌组织及癌旁组织中的表达差异,分析埃兹蛋白与直肠癌发生和局部复发的关系。【结果】埃兹蛋白在肿瘤中的高表达率为 72.3%(107/148),而在癌旁组织中的高表达率仅为 20%(6/30),两者的差异有统计学意义($P < 0.001$);埃兹蛋白在非局部复发组的直肠癌原发灶组织中的高表达率为 53.3%(16/30),而其在局部复发组直肠癌原发灶组织中的高表达率为 72.3%(107/148),两者的差异有统计学意义($P = 0.04$);在局部复发组中,埃兹蛋白的表达与年龄、性别、肿瘤的大小、分化程度、距肛缘的距离、TNM 分期等临床病理特征均无关($P > 0.05$);在局部复发直肠癌中,埃兹蛋白低表达组的中位复发时间为 2.0 年,而埃兹蛋白高表达组的中位复发时间为 1.2 年,两者的差异有统计学意义($P < 0.001$)。【结论】埃兹蛋白与直肠癌的发生和局部复发有关,可能是个促进直肠癌发生和局部复发的因素之一。

关键词:直肠肿瘤;局部复发;埃兹蛋白;生物标记物;预后

中图分类号:R73 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2012)06-0771-04

Ezrin Expression Predicts Carcinogenesis and Local Recurrence of Rectal Cancer

GUO Xue-feng¹, XIANG Xian-hong², HE Zhen¹, MA Teng-hui¹, LAN Ping¹, WANG Lei¹, WANG Jian-ping^{1*}

(1. Department of Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital, 2. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of ezrin in primary rectal cancer and determine the association between ezrin expression and carcinogenesis and local recurrence of rectal cancer. 【Methods】 Immunohistochemical expression of ezrin was analyzed in 148 primary rectal cancers from patients who developed local recurrence after radical resection, 30 normal intestinal tissues and 30 primary rectal cancers from patients without local recurrence within 5 years after surgery. And the relationship between ezrin expression and carcinogenesis and local recurrence of rectal cancer was analyzed. 【Results】 The high expression rate of ezrin in primary rectal cancer and normal intestinal tissue were 72.3% (107/148) and 20.0% (6/30) ($P < 0.001$). The high expression rate of ezrin in primary rectal cancer with local recurrence and without local recurrence were 53.3% (16/30) and 72.3% (107/148) ($P = 0.04$). The correlation was not found between ezrin expression and clinicopathological features of patients developing local recurrence including age, sex, tumor size, histological differentiation, tumor height, and TNM stage. And the time to develop local recurrence was shorter in patient with high ezrin expression than low ezrin expression (2.0 years vs 1.2 years, $P < 0.001$). 【Conclusion】 Ezrin is associated with carcinogenesis and local recurrence of rectal cancer, and patients with high expression of ezrin may need further individualize therapy after radical resection because of the higher risk of local recurrence.

Key words: rectal neoplasms; neoplasm recurrence; ezrin; biomarker; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 771-774]

寻找能够预测直肠癌术后局部复发的标志物,对判断预后、指导临床治疗有着重要的意义^[1-2]。埃

兹蛋白(ezrin)是近年来肿瘤研究的热点之一,埃兹蛋白的过量表达被证实与多种肿瘤的复发有

收稿日期:2012-06-23

基金项目:广东省自然科学基金博士启动项目(S201204000785)

作者简介:郭学峰,医学博士,主治医师,研究方向:结直肠外科的基础与临床研究,E-mail: guoxf@126.com; * 通信作者:汪建平,教授, E-mail: wangjping@yahoo.com.cn

关^[3-4]。但埃兹蛋白与直肠癌复发的关系尚未明确。本研究拟采用免疫组化的方法,检测埃兹蛋白在直肠癌组织和癌旁正常组织中的差异性表达,探讨埃兹蛋白与直肠癌局部复发的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料

收集中山大学附属第六医院和中山大学附属第一医院 2002 年 8 月至 2009 年 2 月间手术切除、术前均未经过放化疗、术后随访 5 年内复发的直肠腺癌的石蜡标本 148 例,分别取癌旁正常组织(距肿瘤 > 5 cm)30 例和随访 5 年内未见肿瘤复发的直肠癌组织 30 例作为对照。所有的患者均有完整的临床病案资料及随访结果,直肠癌的原发灶和复发灶均经病理切片检查证实。

1.2 免疫组化检测

埃兹蛋白(3C12)购自 Lab vision Neomarkers 公司,Super picture 试剂盒购自 Zymed 公司,DAB 试剂盒购自 Dako 公司。一抗的稀释度 1:100。其余步骤按 EnVision 两步法进行。以 TBS 代替一抗作阴性对照,用已知的前列腺癌切片做阳性对照。用 Minicore 组织芯片仪(购自 Alphelys)制作组织芯片,切片至 4 μm 厚后,经二甲苯和梯度乙醇脱水至水后加入 3%过氧化氢中,室温封闭 10 min 以抑制内源性过氧化物酶活性。切片在 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0)中煮沸 15 min 修复抗原。PBS 漂洗 3 次后,甩干切片周围水分,加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 漂洗 5 min \times 3 次,加入 HRP 标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 漂洗,DAB 室温下显色,充分冲洗中止显色,苏木精复染细胞核,1%盐酸酒精分色 3 s,冲洗,中性树脂常规封片。

1.3 免疫组化结果的判读

对免疫组化结果的评分采用 6 分的半定量评分系统。该评分系统由阳性细胞的比例和染色强度两个变量组成,阳性细胞比例的评分(0 分,< 25%的阳性细胞;1 分,25%~50%的阳性细胞;2 分,51%~75%的阳性细胞;3 分,>75%的阳性细胞),染色强度的评分(0 分,无棕色的着色;1 分,淡棕色;2 分,中度棕色;3 分,深棕色),最后的评分由阳性细胞比例的评分与染色强度的评分相加。总评分 < 5 分为低表达,总评分 \geq 5 分为高表达。

1.4 统计方法

采用 SPSS 16.0 进行相关数据统计分析,计数资料以百分率或构成比表示,百分率或构成比的比较采用卡方检验或连续性校正的卡方检验,术后局部复发时间曲线的计算采用 Kaplan-Meier 方法,两组间的比较采用 log-rank 检验。所有的检验均为双侧,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 埃兹蛋白在直肠癌原发灶及癌旁组织中的表达

埃兹蛋白在肿瘤组织和癌旁肠黏膜组织的细胞质和细胞膜中呈不同程度的阳性表达,见图 1A、B。其中,埃兹蛋白在肿瘤中的高表达率为 72.3%(107/148),而在癌旁组织中的高表达率仅为 20%(6/30),两者的差异有统计学意义($\chi^2 = 29.429, P < 0.001$),见表 1。

表 1 埃兹蛋白在正常黏膜和癌组织中的差异性表达

	<i>n</i>	Low expression	High expression
Normal mucosa	30	24	6
Carcinoma	148	41	107

$$\chi^2 = 29.429, P < 0.001$$

2.2 埃兹蛋白在非局部复发和局部复发直肠癌原发灶中的表达

埃兹蛋白在非局部复发组的直肠癌原发灶组织中的高表达率为 53.3%(16/30),而其在局部复发组直肠癌原发灶组织中的高表达率为 72.3%(107/148),两者的差异有统计学意义($\chi^2 = 4.201, P = 0.04$),见表 2。

表 2 埃兹蛋白在非局部复发和局部复发癌组织中的差异性表达

Table 2 Ezrin expression in carcinoma tissue of non-local recurrence group and local recurrence group

	<i>n</i>	Low expression	High expression
Non-LR group	30	14	16
LR group	148	41	107

$$\chi^2 = 4.201, P = 0.04$$

2.3 埃兹蛋白的表达与局部复发性直肠癌临床病理特征的关系

在局部复发组中,埃兹蛋白的表达与年龄、性

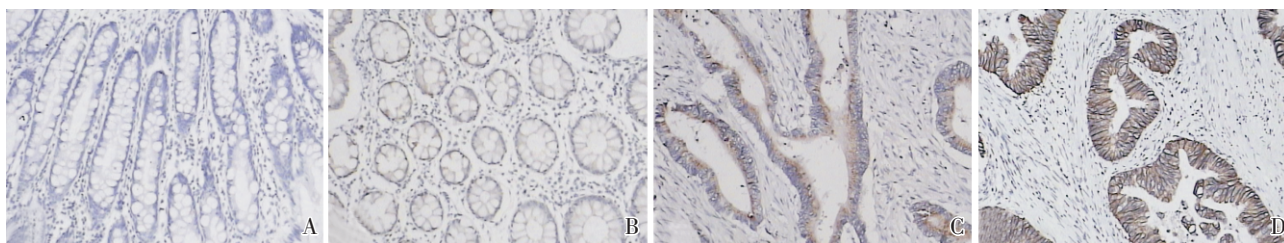


图 1 埃兹蛋白在癌旁组织和肿瘤组织中的表达情况

Fig.1 Ezrin expression in normal mucosal and carcinoma

A: plasma of para-tumor; B: cell membrane of para-tumor; C: plasma of tumor; D: cell membrane of tumor; Immunohistochemical staining, $\times 100$.

别、肿瘤的大小、分化程度、距肛缘的距离、TNM 分期等临床病理特征均无关 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 埃兹蛋白的表达与 148 例复发性直肠癌患者临床病理特征的关系

Table 3 The relationship between clinicopathological characteristics of local recurrence rectal cancer and ezrin expression

Valuables	n (148)	Low expression (n = 41)	High expression (n = 107)	χ^2	P
Age (years)				0.222	0.638
< 60	64	19	45		
≥ 60	84	22	62		
Sex				1.041	0.308
Female	75	18	57		
Male	73	23	50		
Tumor size				1.500	0.221
< 5 cm	71	23	48		
≥ 5 cm	77	18	59		
Histological differentiation				0.718	0.699 ¹⁾
Well	17	5	12		
Moderate	99	29	70		
Poor	32	7	25		
Tumor height/cm				0.993	0.609
Low (0 ~ 5)	51	13	38		
Medium (6 ~ 10)	62	16	46		
High (> 10)	35	12	23		
TNM stage				0.560	0.756 ¹⁾
I	14	3	11		
II	45	14	31		
III	89	24	65		

1) Continuity-corrected chi-square test

2.4 埃兹蛋白的表达与直肠癌局部复发时间的关系

在局部复发直肠癌中, 埃兹蛋白低表达组的

中位复发时间为 2.0 年, 95%CI 为 1.54 ~ 2.46; 而埃兹蛋白高表达组的中位复发时间为 1.2 年, 95%CI 为 1.01 ~ 1.39; 两者的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 46.64, P < 0.001$), 见图 2。

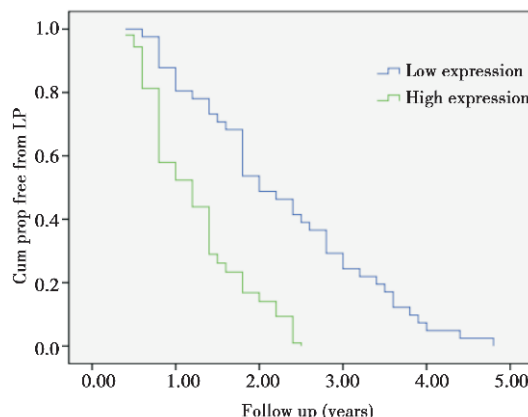


图 2 埃兹蛋白的表达与直肠癌局部复发时间的关系

Fig.2 Time to development of LR in tumors with low and high ezrin expression

3 讨论

埃兹蛋白作为 ERM (ezrin/radixin/moesin) 家族成员之一, 是连接细胞骨架 (主要是肌动蛋白) 和细胞膜的桥连蛋白^[5-6]。活化的埃兹蛋白 C 端与肌动蛋白细胞骨架连接, N 端与多种跨膜分子结合, 如 CD44、ICAM-1 和 E-Cadherin 等^[7-11]。埃兹蛋白激活后, 调节肌动蛋白依赖的多种细胞功能, 参与细胞形态改变、细胞膜结构组建、细胞运动、黏附、相关信号传导, 在肿瘤细胞运动、黏附、侵袭中发挥重要作用^[12-13]。目前的研究表明, 埃兹蛋白的过度表达可介导多种的肿瘤的形成、侵袭、复发和转移^[14-15]。

本研究的结果表明, 埃兹蛋白主要在细胞质

和细胞膜中表达,同时,埃兹蛋白在直肠癌癌灶中的高表达率比在癌旁正常肠黏膜中要高,这说明,埃兹蛋白参与了直肠癌的发生。同时埃兹蛋白在局部复发性直肠癌原发灶的肿瘤组织中的高表达率比未复发的直肠癌中的明显要高,这也说明,埃兹蛋白的高表达与直肠癌的局部复发密切相关。这一结果与埃兹蛋白在其他肿瘤局部复发中的研究基本相符。Carneiro等^[4]在软组织肉瘤的研究中发现,埃兹蛋白的高表达可预测软组织肉瘤的复发,并且埃兹蛋白的高表达还是软组织肉瘤复发的独立危险因素(HR = 2.4, 95% CI 1.4 ~ 4.3; P=0.02)。同时,Okamura等^[3]在肝癌中的研究表明,埃兹蛋白的高表达与肝癌患者血清AFP升高密切相关,并且还和肝脏祖细胞标记物——细胞角蛋白19成正相关性。我们的研究中还表明,在局部复发的患者中,埃兹蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤的大小、分化程度、距肛缘的距离和TNM分期等临床病理特征均无关,埃兹蛋白高表达的患者术后局部复发的时间明显比埃兹蛋白低表达的患者要早,这也说明,埃兹蛋白高表达的患者,复发的风险更高,复发的时间更早,预后也就更差,这一结果与Okamura等^[3]在肝癌中的研究基本相符。

诚然,本研究中也存在着一定的缺点。一,本研究在埃兹蛋白的检测方面采用的是免疫组化,在结果的判读方面可能会存在一定的主观性。在本研究中,选两位研究者通阅所有的标本,挑选出具有代表性评分的标本作为评分标准,然后再对所有标本进行独立评分,对评分结果不一致的标本进行重新阅片并讨论,得出一致的评分,尽可能减少结果判读误差。二,本研究仅探讨非磷酸化的埃兹蛋白与直肠癌局部复发的关系,未能探讨埃兹蛋白的活化状态——磷酸化的埃兹蛋白对直肠癌局部复发的影响,并且未能对其中的机制进行相关的探讨,这也是我们下一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 汪建平. 直肠癌局部复发的应对策略[J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13(1): 7-8.
- [2] Hornbrook M, McMullen C, Bulkley J, et al. PS1-21: Long-term rectal cancer survivors: perceived effects of cancer on work and volunteering [J]. Clin Med Res, 2012, 10(3): 149-150.
- [3] Okamura D, Ohtsuka M, Kimura F, et al. Ezrin expression is associated with hepatocellular carcinoma possibly derived from progenitor cells and early recurrence after surgical resection [J]. Mod Pathol, 2008, 21(7): 847-855.
- [4] Carneiro A, Bendahl PO, Akerman M, et al. Ezrin expression predicts local recurrence and development of metastases in soft tissue sarcomas [J]. Clin Pathol, 2011, 64(8): 689-694.
- [5] Wang HJ, Zhu JS, Zhang Q, et al. High level of ezrin expression in colorectal cancer tissues is closely related to tumor malignancy [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(16): 2016-2019.
- [6] Brambilla D, Fais S. The Janus-faced role of ezrin in "linking" cells to either normal or metastatic phenotype [J]. Int J Cancer, 2009, 125(10): 2239-2245.
- [7] Curto M, McClatchey AI. Ezrin...a metastatic determinant? [J]. Cancer Cell, 2004, 5(2): 113-114.
- [8] Kang YK, Hong SW, Lee H, et al. Prognostic implications of ezrin expression in human hepatocellular carcinoma [J]. Mol Carcinog, 2010, 49(9): 798-804.
- [9] Mak H, Naba A, Varma S, et al. Ezrin phosphorylation on tyrosine 477 regulates invasion and metastasis of breast cancer cells [J]. BMC Cancer, 2012, 12(11): 82-85.
- [10] Zhang XQ, Chen GP, Wu T, et al. Expression and clinical significance of ezrin in non-small-cell lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2012, 13(3): 196-204.
- [11] Tian T, Lindell SL, Lam M, et al. Ezrin functionality and hypothermic preservation injury in LLC-PK1 cells [J]. Cryobiology, 2012, 65(1): 60-67.
- [12] Konstantinovskiy S, Davidson B, Reich R. Ezrin and BCAR1/p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids [J]. Clin Exp Metastasis, 2012, 29(6): 527-540.
- [13] Shang X, Wang Y, Zhao Q, et al. siRNAs target sites selection of ezrin and the influence of RNA interference on ezrin expression and biological characters of osteosarcoma cells [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1-2): 363-371.
- [14] Zwaenepoel I, Naba A, Da Cunha MM, et al. Ezrin regulates microvillus morphogenesis by promoting distinct activities of Eps8 proteins [J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(6): 1080-1094.
- [15] Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Smith RV, et al. Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Head Neck Pathol, 2012, 6(2): 232-243.