

结直肠癌组织 E-钙黏附素蛋白表达与甲基化的关系

黄美近, 彭 慧, 杨祖立, 康 亮, 王 磊, 王 辉, 刘焕亮, 汪建平*
(中山大学附属第六医院//广东省胃肠肛门医院 结直肠肛门外科, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨结直肠癌 E-钙黏附素(E-cad)蛋白表达与基因甲基化的关系及临床意义。【方法】联合采用免疫组化方法(S-P 法)和甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)方法检测 100 例结直肠癌肿瘤组织 E-cad 蛋白表达和基因启动子甲基化情况。免疫组化结果根据阳性肿瘤细胞数的百分比来判断结果:阴性(-):无表达;弱阳性(+):阳性细胞 < 25%;阳性(++):阳性细胞数 25% ~ 75%;强阳性(+++):阳性细胞数>75%。联合(-)和(+)为低表达病例,(++)和(+++)为高表达病例作统计分析,分析蛋白表达与甲基化的相关性及其意义。【结果】100 例结直肠癌组织中,33 例检测到 E-cad 基因启动子甲基化(33%);E-cad 蛋白表达的阳性率为 76%(+ ~ +++),其高表达率为 59%(59/100),低表达率为 41%,主要表现为腺细胞膜着色和胞浆边缘着色,少量间质细胞较少阳性,肿瘤细胞着色不均匀,且丧失极性。在 41 例 E-Cad 蛋白低表达的标本中,28 例基因甲基化阳性(68.3%),E-Cad 蛋白表达与甲基化呈明显负相关($P < 0.001$)。【结论】E-Cad 蛋白的低表达或失表达可能是其基因甲基化的结果,E-Cad 蛋白的表达异常是结直肠癌转移性增强的重要影响因素之一。

关键词: E-钙黏附素;免疫组化和甲基化;结直肠癌

中图分类号:R735.35 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2012)05-0630-04

Relationship and Significance of Expression of E-cadherin Proteins and Methylation of Promoter in Colorectal Cancer Tissues

HUANG Mei-jin, PENG Hui, YANG Zu-li, KANG Liang, WANG Lei, WANG Hui,
LIU Huan-liang, WANG Jian-ping*

(Department of Colorectal & Anal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the relationship between methylation of promoter and the expression of E-cadherin proteins in colorectal cancer. 【Methods】 Streptavidin-peroxidase (S-P) two-step method was used to measure the immunohistochemical expression of E-cadherin proteins in 100 CRC. Those slides exhibiting diffuse immunostaining presenting more than 75% of tumor cells were classified as (+++), between 50% and 75% were classified as (++) , between 25% and 50% were classified as (+), and those with immunoreactivity less than 10% were classified as (-).(-) and (+) were combine together as lower expression cases, while (++) and (+++) were combined together as higher expression cases for statistical analysis. 【Results】 The positive rate of E-cadherin proteins was 76% (+ ~ +++) in 100 sporadic colorectal cancer specimen. Fifty-nine cases showed higher expression of E-cadherin, while decreased E-cadherin immunohistochemical expression was observed in 41 cases. The methylation positive rate was 68.3% of E-cadherin was significant association with protein decreased expression of E-cadherin gene ($P < 0.001$). 【Conclusion】 Methylation of E-cadherin gene was significant association with E-cadherin protein decreased expression. The loss of E-cadherin protein was one of the important influence factors in colorectal cancer metastatic and invasive.

Key words: E-cadherin; immunohistochemical and methylation; colorectal cancer

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(5):630-633]

检测肿瘤 E-钙黏附素(E-cadherin,E-cad)表达并判断与临床病理特征关系的相关性研究文献

报道较多,目前国内外研究得出的结果还不一致,多数文献支持 E-cad 表达下调与肿瘤的侵袭转移

收稿日期:2012-04-10

基金编号:广东省科技计划基金(2011B080701064)

作者简介:黄美近,副教授,E-mail:13924073322@139.com; * 通信作者:汪建平,教授,E-mail:wangjipgz@yahoo.com.cn

相关^[1-2]。我们联合采用免疫组化方法和甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)分析 100 例结直肠癌组织中 E-cad 蛋白表达与基因甲基化的情况,并探讨其蛋白表达和甲基化的相关性和临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本

100 例经病理证实的结直肠癌患者手术切除的肿瘤标本,男 67 例,女 33 例,年龄(58 ± 4.5)岁。结肠癌 48 例,直肠癌 52 例,Duke's A、B 期 42 例,C、D 期 58 例,合并肺肝转移 8 例;浸润程度:T₁ 18 例,T₂ 38 例,T₃ 44 例;高分化 22 例、中分化腺癌 53 例,低未分化腺癌共 25 例;肿块型 38 例、溃疡型 48 例,浸润型 14 例。

1.2 主要试剂

免疫组化和甲基化:PBS 缓冲液、EDTA 缓冲液、TBS 缓冲液;E-cadherin 免疫组化试剂盒、E-cadherin;抗人平抗(福建迈新)克隆号:4A2 产品编号:MAB-0247,S-P 试剂盒:KIT-9710(福建迈新)抗兔/肌二抗,UltraSensitive™ S-P(Mouse/Rabbit)超敏 SP(鼠/兔)试剂盒,即用型免疫组织化学超敏 UltraSensitive™ SP 试剂盒,规格:6 mL/120 片;DAB 显色系统:DAB-0031;DAB Kit(20X)。DNA 纯化试剂盒、RNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒(Promega 公司),氢醌和亚硫酸氢钠(Sigma 公司)。

1.3 结直肠癌 E-cad 组织免疫组化和结果评定

手术切除结直肠癌标本和切除近端正常黏膜组织,40 g/L 多聚甲醛液固定,石蜡包埋,组织切片。经脱蜡和水化、抗原修复、免疫组织化学染色 SP 法(Streptavidin-Peroxidase,SP)链霉素抗生素蛋白-过氧化酶 DAB 显色 5 ~ 10 min,最后脱水、透明、封片、镜检。

间断连续切取 10 张厚度为 5 mm 切片,其中一张用于常规 HE 染色,其余用于 E-cad 免疫组织化学染色。实验阳性结果以福建迈新公司生物技术开发公司提供的阳性切片为标准。本研究采用根据阳性肿瘤细胞数的百分比来判断结果。阴性(-):无表达,弱阳性(+):阳性细胞 < 25%,阳性(++):阳性细胞数 25% ~ 75%;强阳性(+++):阳性细胞数 > 75%。

1.4 E-cad 基因甲基化的检测

取 50 ~ 100 mg 标本在未解冻的情况下剪碎,

然后按照 DNA 提取试剂盒的使用说明进行操作,测定提取基因组 DNA 纯度和浓度。提取的 DNA 经修饰后应用 Wizard DNA 纯化柱进行纯化、碱变性和沉淀回收,回收的 DNA 溶于 30 μL TE 缓冲液中,-80 °C 储存备用。修饰的 DNA 应用 PCR 试剂盒进行巢式双重 PCR,其 PCR 的引物为:上游为 5' -GTT TAG TTT TGG GGA GGG GGT -3' (sense),下游为 5' -ACT ACA ACT CCA AAA ACC CAT AAC TAA -3' (antisense),扩增片段为 270 bp。PCR 反应条件为:反应体积为 30 μL,95 °C 预变性 5 min,95 °C、45 s,49 °C、45 s,72 °C 45 s,40 个循环,最后一个循环 72 °C 延伸 10 min。甲基化特异性引物为:5' -TGT AGT TAC GTA TTT ATT TTT AGT GGC GTC -3' (sense),5' -CGA ATA CGA TCG AAT CGA ACC G -3' (antisense),扩增片段为 112 bp。非甲基化特异性引物为:5' -TGG TTG TAG TTA TGT ATT TTT TAG TGG TGT T -3' (sense),5' -ACA CCA AAT ACA ATC AAA TCA AAC CAA A -3' (antisense),扩增片段为 120 bp。甲基化和非甲基化的引物置于同一个反应条件中进行扩增,反应条件除退火温度为 54 °C、30 s、24 个循环外,其他均与首轮 PCR 条件相同。第 2 轮 PCR 产物 2.0 ~ 5.0 μL 经过 2% 琼脂糖电泳、溴化乙锭染色后,在凝胶成像系统下观察成像记录结果。第二轮 PCR 产物中,出现 112 bp 产物,则为 E-cad 基因存在甲基化,出现 120 bp 产物,则认为基因存在非甲基化。以 100 bp 标准分子质量为分子质量参照,水和甲基化阳性对照。

2 结果

2.1 E-cad 蛋白在结直肠癌组织和相应的正常黏膜的表达

100 例结直肠癌组织中 E-cad 阳性表达 59 例(59%),阴性表达为 41 例(41%),主要表现为腺细胞膜着色和胞浆边缘着色,少量间质细胞较少阳性,肿瘤细胞着色不均匀,且丧失极性(图 A-C)。

2.2 E-cad 蛋白在结直肠癌组织的阴性表达与临床病理的关系

100 例结直肠癌组织中,E-cad 蛋白阴性表达与患者性别、年龄、肿瘤部位远近无明显相关。E-cad 蛋白阴性表达与肿瘤淋巴结转移、肿瘤分化程度、肿瘤浸润深度呈明显相关性($P < 0.05$;表 1)。

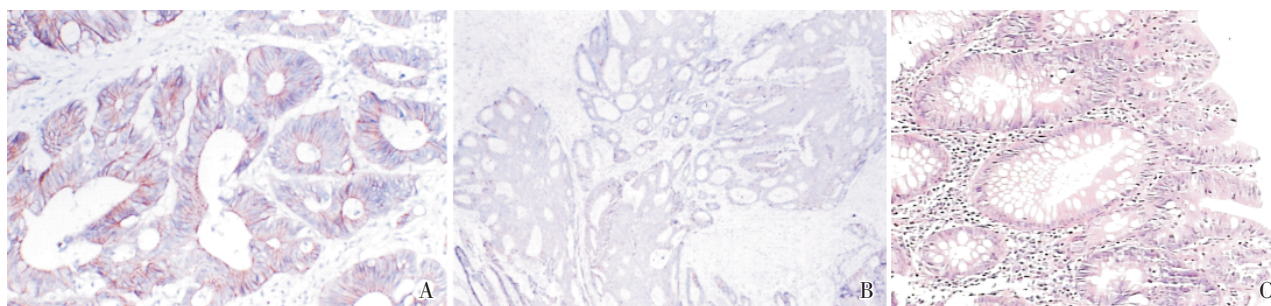


图 1 结直肠癌组织中和正常黏膜的 E-cad 表达

Fig. 1 E-cad expression of colorectal cancer tissues and normal mucosa

A: well differentiated adenocarcinoma; B: moderately differentiated adenocarcinoma; C: mucous membrane; SP, × 200

表 1 E-cad 蛋白表达与结直肠癌临床病理特征的关系

Table 1 Relationship and significance between the expression of e-cadherin proteins and clinical pathological result of colorectal cancer

	Case	Negative	Expression (%)	P value
Gender				$P = 0.819 > 0.05$
Male	67	28	41.8	
Female	33	13	39.4	
Age/years				$P = 0.974 > 0.05$
<50	27	11	40.7	
≥50	73	30	41.1	
Location ¹⁾				$P = 0.874 > 0.05$
Proximal	72	29	40.2	
Distal	28	12	42.9	
Lymph node metastasis				$P = 0.010 < 0.05$
Negative	42	11	26.2	
Positive	58	30	51.7	
Differentiation				$P = 0.025 < 0.05$
Well differentiated	22	6	27.3	
Moderately differentiated	53	20	37.7	
Poor differentiated	25	15	60	
Infiltrated stage				$P = 0.048 < 0.05$
T1	18	6	33.3	
T2	38	11	28.9	
T3	44	24	54.5	

1) Tumor distance definition: for the proximal sigmoid colon above the sigmoid colon and below the distal

2.3 E-cad 基因甲基化在结直肠肿瘤组织和正常组织的发生率

100 例结直肠癌组织中 E-cad 基因 CPG 区甲基化阳性率 33% (33/100), 相应的正常组织无甲基化, 第二轮产物电泳结果见图 2。

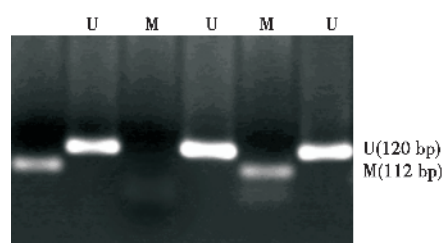


图 2 MSP 法分析结直肠癌标本 E-cad 基因甲基化状态

Fig. 2 MSP analysis of colorectal cancer specimens of promoter of E-cadherin gene methylation status

M: methylation; U: unmethylation; T: tumor

2.4 E-cad 蛋白的表达与相应基因启动子甲基化的相关性

在 41 例 E-cad 蛋白表达阴性的标本中, 28 例启动子甲基化阳性 (68.3%); 经 χ^2 检验 E-cad 蛋白表达与甲基化呈明显负相关 ($P < 0.001$)。

3 讨论

E-钙黏附素是一种跨膜糖蛋白, 具有钙依赖性的同型细胞黏附作用, 对维持组织结构的完整性、细胞极性、细胞分化等起重要作用, 目前已成为研究肿瘤浸润转移机制的热点之一, E-cad 黏附系统在恶性肿瘤的发生发展过程中有抗转移功能, 癌细胞通过多种机制损害 E-cad 的黏附作用, 使癌细胞易于离散并逃离原发灶发生侵袭转移^[1]! 多数研究结果认为 E-钙黏附素是多种肿瘤发生发展的浸润抑制基因, 其表达异常与肿瘤分化、浸润深度等密切相关, 如胃癌、乳腺癌、胰腺癌等^[2-4]。本实验结果显示结直肠癌组织中 E-钙黏附素的异常表达与肿瘤分化和浸润程度相关, 与

文献报道一致。最近研究结果^[5]显示,在结直肠癌组织中 E-钙黏附素表达的部位改变—有肿瘤细胞的细胞膜向胞浆移动与肿瘤细胞的侵袭性增强明显相关,认为 E-钙黏附素在肿瘤细胞表达部位的改变可作为结直肠癌侵袭性增强的信号。

E-cad 基因启动子区甲基化,钙离子结合位点突变,导致钙黏蛋白表达水平下降和 α 、 β 、 γ -cat 基因突变,钙黏蛋白结合型边环素减少,胞浆游离型连环素增加,导致基因转录失控、细胞轨化或迁移性改变等原因,损害了 E-cad 黏附系统的功能^[6-7]。本组先前研究结果显示结直肠癌组织 E-cad 基因甲基化与淋巴结转移、肝转移和 Dukes 分期明显相关,E-cad 基因甲基化可能是结直肠癌侵袭性增强的原因之一^[8]。Kanazawa 等^[9]研究结直肠癌 E-cadherin 基因甲基化与免疫组化关系时,结果显示在 54%E-cad 蛋白阴性的病例中,77.8%表现为该基因甲基化阳性,E-cadherin 甲基化与蛋白的表达呈明显负相关($P < 0.05$)。Graziano 等^[10]在研究胃癌免疫组化结果也认为 E-cad 甲基化与蛋白的表达呈明显负相关($P < 0.001$)。本组资料在 41 例 E-cadherin 蛋白表达阴性的标本中,68.3%病例表现为 E-cad 基因甲基化阳性,结果也认为 E-cadherin 甲基化与蛋白的表达呈明显负相关。因此本研究认为 E-钙黏附素甲基化可能是其蛋白失表达的原因之一,E-钙黏附素表达异常是结直肠癌发生发展的重要影响因素。

参考文献:

- [1] Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers[J]. Am J Pathol, 1998, 153:333-339.
- [2] Stănculescu D, Mărgăritescu C, Stepan A, et al. E-cadherin in gastric carcinomas related to histological prognostic parameters [J]. Rom J Morphol Embryol, 2011, 52(3 Suppl):1107-1112.
- [3] Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4356-4348.
- [4] Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, et al. Expression patterns of alpha-, beta- and gamma-catenin in pancreatic cancer: correlation with E-cadherin expression, pathological features and prognosis [J]. Anticancer Res, 2001, 21(6A):4127-4134.
- [5] Xiong H, Hong J, Du W, et al. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition [J]. J Biol Chem, 2012, 287(8): 5819-5832.
- [6] Shiozaki H, Doki Y, Oka H, et al. E-cadherin expression and cancer invasion and metastasis [J]. Hum Cell, 1993, 6(2):94-99.
- [7] Buda A, Pignatelli M. E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis [J]. Cell Commun Adhes, 2011, 18(6): 133-143.
- [8] 黄美近,褚忠华,杨祖立,等. E-钙黏附素基因甲基化与结直肠癌临床病理特征的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(11): 77-78.
- [9] Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, et al. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region [J]. Int J Cancer, 2002, 102(3): 225-229.
- [10] Graziano F, Arduini F, Ruzzo A, et al. Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(8): 2784-2789.

(编辑 张恩健)