

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.11.009

E-选择素在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

李丛丛^{1,2}, 杨锡贵¹, 姜超³, 魏玲⁴, 杨香山⁵, 杨麟珂⁶

Clinical Significance of E-selectin Expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

LI Congcong^{1,2}, YANG Xigui¹, JIANG Chao³, WEI Ling⁴, YANG Xiangshan⁵, YANG Linke⁶

1.Department of Internal Medicine Oncology, Shandong Cancer Hospital, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250117, China; 2.School of Medicine and Life Science, University of Jinan and Shandong Academy of Medical Sciences; 3.Department of Internal Medicine oncology, The Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences; 4.Cancer Research Center, Shandong cancer Hospital; 5.Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Shandong Academy of Medical Sciences; 6.Department of Pathology, Shandong cancer Hospital

Corresponding Author: YANG Xigui, E-mail:zlysxgy@126.com

Abstract: Objective To explore the clinical significance of E-selectin expression in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Fifty-eight tissues of ESCC and adjacent normal mucosa each were collected as samples. The expression of E-selectin mRNA was detected by real-time PCR. E-selectin protein levels were determined by immunohistochemical PV-9000. The correlation between E-selectin expression and the clinical pathological features was analyzed. **Results** The mRNA and protein expression levels of E-selectin were significantly higher in ESCC than in normal mucosa. There was a positive correlation between the expression of E-selectin and clinical stage, lymph node metastasis and invasion depth ($P < 0.05$). No positive correlation was found between the expression of E-selectin and gender, age, tumor location, pathological type, degree of differentiation or tumor size ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression levels of E-selectin mRNA and protein in ESCC tissues were significantly increased and related with the invasion and lymph node metastasis. The enhanced E-selectin may serve as auxiliary indexes for judging disease progression, invasion, metastasis and prognosis prediction and as a new biological target for the treatment of esophageal squamous cell carcinoma.

Key words: E-selectin; Esophageal squamous cell carcinoma; Real-time reverse transcription quantitative PCR; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨食管鳞状细胞癌(简称食管鳞癌)中E-选择素的表达及其临床意义。**方法** 收集手术切除食管鳞癌及癌旁正常组织标本各58例,采用实时荧光定量PCR检测E-选择素(E-selectin) mRNA的表达,采用免疫组织化学PV-9000法检测其蛋白的表达,并分析E-选择素表达与临床病理指标的关系。**结果** E-选择素mRNA与蛋白在食管鳞癌组织中的表达明显增高,均与食管癌临床分期、淋巴结转移、浸润深度有关(P 均 < 0.05),而与患者性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、分化程度、肿瘤大小无显著相关(P 均 > 0.05)。**结论** E-选择素mRNA和蛋白在食管鳞癌组织中表达明显增高,与肿瘤的浸润转移密切相关,有望作为判断食管鳞癌疾病进展、预测侵袭转移、评估预后的辅助指标,为食管鳞癌的治疗提供新的生物作用靶点。

关键词: E-选择素; 食管鳞癌; 实时荧光定量PCR; 免疫组织化学

中图分类号:R735.1 文献标识码:A

0 引言

食管癌是我国人群中常见的恶性肿瘤之一,其死亡率居恶性肿瘤的第四位,而食管癌的浸润转移又是引起患者死亡的主要原因,因此对食管癌发生、浸润转移机制的探讨已成为研究的热点之一。E-选择素是黏附分子选择素家族的重要成员之一,能够促进肿瘤细胞与内皮细胞的黏附、影响肿瘤转移的发

收稿日期:2013-02-08;修回日期:2013-06-24

作者单位:1.250117济南,山东省肿瘤医院肿瘤内科山东省医学科学院;2.济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院;3.山东省医学科学院附属医院肿瘤内科;4.山东省肿瘤医院基础研究中心;5.山东省医学科学院附属医院病理科;6.山东省肿瘤医院病理科

通信作者:杨锡贵, E-mail:zlysxgy@126.com

作者简介:李丛丛(1986-),女,硕士,主要从事肿瘤内科学研究

生及介导白细胞向炎症反应部位迁移,因此这一变化在某种程度上可反映恶性肿瘤的发展程度、转移状况,可作为对恶性肿瘤病情、病期、预后判断的重要指标^[1]。近年来研究表明,E-选择素在脑胶质瘤^[2]、乳腺癌^[3]、结直肠癌^[4]等肿瘤组织中高表达,与肿瘤的侵袭转移密切相关。本研究采用免疫组织化学法和实时荧光定量PCR联合检测E-选择素在食管鳞癌及癌旁正常食管黏膜组织中的表达,分析其与临床病理生物学行为的关系,以期对食管鳞癌发生发展研究提供新的思路,为其临床治疗提供新的作用靶点。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象 收集2012年1月至5月山东省肿瘤医院胸外科手术切除的新鲜标本58例,经病理学证实均为食管鳞癌,所有患者术前未接受任何治疗。其中男46例,女12例,年龄46~75岁,平均60岁。其中高分化18例、中分化23例、低分化17例;28例发生淋巴结转移(经病理证实)。术后分期根据AJCC(美国癌症联合委员会)公布的食管鳞癌TNM分期(2010年第七版)。同时取相应的癌旁正常组织(距离癌组织 ≥ 5 cm)作为对照。新鲜标本放入液氮后存放于 -80°C 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:兔抗人浓缩型E-选择素多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;PV-9000试剂盒、DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。总RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司、反转录及荧光定量PCR试剂盒购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司;E-选择素和内参 β -actin基因的特异性引物由上海生工生物工程有限公司合成。主要仪器:PCR仪购自美国ABI SYSTEM公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量PCR 采用TRIzol提取总RNA,琼脂糖电泳鉴定总RNA有无降解,紫外分光光度仪检测RNA浓度及纯度。取500 ng总RNA,按照反转录试剂盒推荐的10 μl 体系进行反转录反应,合成cDNA。以 β -Actin作为内部参照基因,E-选择素引物序列(236 bp):上游5'-GGACACAGCAAATCCCAGTT-3';下游5'-GACAGCATCGCATCTCACAG-3'。内参 β -Actin引物序列(157 bp):上游5'-TTAGTTGCGTTACACCCTTTC-3',下游5'-GCTGTCACCTTCACCGTTC-3'。严格按照荧光定量PCR试剂盒说明书进行两步法PCR反应,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;PCR反应95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,循环

40次。读取Ct值,参照文献^[5]计算:以 β -Actin为阳性内对照基因来校正PCR模板的细胞拷贝数(目标基因 ΔCt 值=目标基因Ct值-同一样本 β -Actin Ct值),重复3次,消除组间的加样量误差。目标组的 ΔCt 平均值减去其对照组的 ΔCt 平均值得到每个目的基因相对循环数($\Delta\Delta\text{Ct}$ 值),即 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 目标基因=处理组 ΔCt 目标基因-对照组 ΔCt 目标基因,基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算。

1.2.2 免疫组织化学法 标本经福尔马林固定,石蜡包埋,常规制备免疫组织化学石蜡切片。免疫组织化学PV-9000二步法检测,以已知阳性切片作阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。结果判断:每张切片由两名病理医师在双盲法下进行判定。E-selectin表达主要定位于细胞膜,亦可表达于细胞质。细胞膜和细胞质被染成棕黄色者为阳性细胞。根据染色程度和染色细胞百分率进行综合评分^[6]:基本不着色为0分,着色淡为1分,着色适中为2分,着色深为3分;着色细胞占计数细胞百分率0~5%为0分,>5%~25%为1分,>25%~50%为2分,>50%为3分。将每张切片的着色程度得分与着色细胞百分率得分相乘,其结果为每张切片的最后得分:得0~1分判定为阴性(-),2~3分判定为弱阳性(+),4~6分判定为中等强度阳性(++),6分以上判定为强阳性(+++)。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析,E-选择素蛋白表达与临床病理特征的关系采用 χ^2 检验、Fisher确切概率法;QRT-PCR的各项数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用配对 t 检验、两个独立样本 t 检验、单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

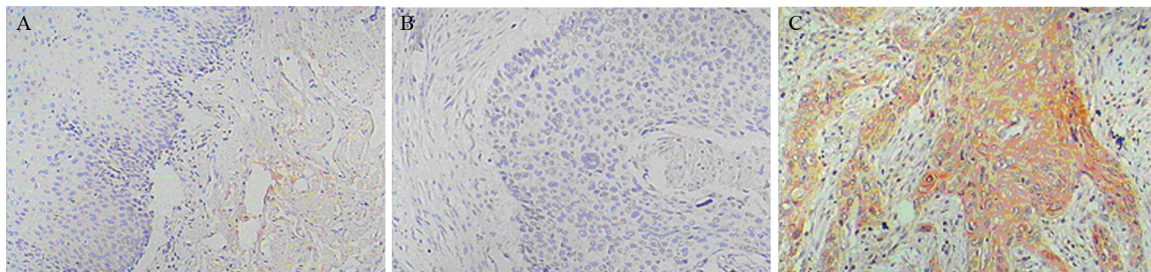
2 结果

2.1 实时荧光定量PCR检测结果

E-选择素mRNA在食管鳞癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织($P<0.01$),且E-选择素mRNA表达在临床分期、浸润深度、淋巴结转移方面差异具有统计学意义($P<0.05$),而在性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、肿瘤大小、分化程度方面差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 免疫组织化学结果

E-选择素蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率为67.2%(39/58),在正常食管黏膜中的阳性表达率为0(0/58),差异具有统计学意义($\chi^2=58.753$, $P<0.01$),见图1。E-选择素蛋白表达在临床分期、浸润深度、淋巴结转移方面差异具有统计学意义(P 均 <0.05),而在性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、



A: negative expression of E-selectin in normal esophageal mucosa; B: negative expression of esophageal squamous cell carcinoma; C: positive expression of E-selectin in esophageal squamous cell carcinoma

图 1 E-选择素在不同食管组织中的表达 (PV×100)

Figure 1 Expression of E-selectin in different esophageal tissues (PV×100)

肿瘤大小、分化程度方面差异无统计学意义(P 均 >0.05), 见表1。免疫组织化学结果与实时荧光定量PCR结果相一致。

3 讨论

肿瘤的生长与转移是一个多步骤的过程, 其过程包括肿瘤细胞与脉管内皮细胞间复杂的相互作用, 这种相互作用受许多细胞表面黏附受体的调节, 黏附受体包括选择素类、结合素类、免疫球蛋

白样黏附分子。E-选择素是黏附分子选择素家族的重要成员之一, 作为诱导性黏附分子, 通过与其配体sLe-X、sLe-A 或相关寡聚糖结合后, 诱导肿瘤细胞与内皮细胞的直接接触, 从而介导细胞起始黏附和 组织特异性招募, 促进了肿瘤的转移^[6]。多项体外研究表明, E-选择素能够介导肿瘤细胞的黏附、滚动、渗出, 最终导致转移^[7-9]。同样在动物体内也证明其在结肠癌肺转移起关键作用^[10]。而且通过抑制E-选择素的表达, 可阻止肿瘤细胞的黏附^[11], 抑制肿瘤生长

表 1 E-选择素mRNA、蛋白表达与食管鳞癌患者临床病理特征的关系

Table 1 Relationship of E-selectin mRNA and protein expression with clinicopathologic features of esophageal squamous cell carcinoma

Clinicopathologic features	n	E-selectin mRNA	t(F)	P	E-selectin protein			
					+	Positive rate (%)	χ^2	P
Gender								
Male	46	2.192±0.705			32	69.6		
Female	12	1.793±0.869	1.279	0.206	7	58.3	0.154	0.694
Age (years)								
<60	27	2.006±0.684			18	66.7		
≥60	31	2.235±0.786	1.178	0.244	21	67.7	0.008	0.931
Tumor location(thoracic)								
Upper or middle	30	2.081±0.691			19	63.3		
Lower	28	2.179±0.804	0.495	0.622	20	71.4	0.431	0.512
Pathological types								
Ulcerative	32	1.989±0.750			24	75.0		
Medullary	26	2.241±0.729	1.295	0.201	15	57.7	1.951	0.163
Tumor size (cm)								
<5	34	2.064±0.866			22	64.7		
≥5	24	2.219±0.525	0.843	0.403	17	70.8	0.240	0.624
Differentiation								
High	18	1.851±0.690			10	55.6		
Middle	23	2.240±0.645	1.879	0.162	15	65.2	2.921	0.232
Low	17	2.270±0.872			14	82.4		
Invasion depth								
T1-T2	8	1.755±0.647			2	25.0		
T3	43	2.098±0.723	3.759	0.029	31	72.1	7.130	0.018
T4	7	2.741±0.674			6	85.7		
Stage								
I - II	30	1.841±0.696			15	50.0		
III - IV	28	2.436±0.674	3.298	0.002	24	85.7	8.386	0.004
Lymph node metastasis								
Yes	28	2.360±0.709			23	82.1		
No	30	1.912±0.718	2.388	0.020	16	53.3	5.457	0.019

及血管形成^[12], 进而降低了肿瘤侵袭转移潜能。

研究发现, E-选择素在乳腺癌^[13]、上皮性卵巢癌^[14]、脑胶质瘤^[2]等肿瘤呈高表达, 而在人体正常组织中呈低表达甚至几乎不表达。本研究采用实时荧光定量PCR和免疫组织化学PV-9000法, 联合检测58例食管鳞癌组织中E-选择素的表达均显著高于其在相应的癌旁正常食管黏膜组织的表达, 提示E-选择素在食管鳞癌的发生过程中可能起重要促进作用, 这与上述文献的研究结果一致。Shaker等^[3]研究发现, E-选择素的表达与肿瘤的分期、淋巴结转移有关, 而与肿瘤的分化程度无关。有研究^[4]还发现其表达与肿瘤的浸润深度有关, 而与患者的性别、年龄、肿瘤大小无关。本研究发现, E-选择素mRNA、蛋白在浸润深度深、临床分期晚、有淋巴结转移的患者中的表达明显高于浸润深度浅、临床分期早、无淋巴结转移的患者, 这表明E-选择素mRNA、蛋白的表达与食管鳞癌的侵袭转移密切相关。这与Bal等^[15]、Zhang等^[16]研究结果基本一致。推测可能原因是肿瘤患者的巨噬细胞等可产生TNF, 肿瘤本身也可产生细胞分裂素, 这些因素均可使肿瘤患者E-选择素表达增高, E-选择素能够促进肿瘤细胞与内皮细胞的黏附、影响肿瘤转移的发生^[1]。E-选择素mRNA与蛋白的检测结果一致, 说明食管鳞癌中E-选择素表达的增强是由于基因转录水平上调的结果, 这符合基因表达的中心法则。E-选择素的高表达可能预示着患者预后不佳, 测定E-选择素有助于早期判断预后。由于本研究选取的病例随访时间较短, 未分析E-选择素的表达与食管鳞癌患者长期预后的关系, 因此, 尚需进一步研究。

总之, E-选择素的异常表达在一定程度上促进了食管鳞癌的发生、发展, 并与肿瘤的侵袭转移密切相关。这对于进一步明确食管鳞癌的发病机制、寻找新的分子治疗靶点、指导食管鳞癌个体化治疗、判断疾病预后, 具有重大的指导意义。

参考文献:

[1] Shi MY, Zhai ZY. Research progress on the relation between E-selectin and tumor[J]. Neimenggu Yi Xue Za Zhi, 2011, 43(8):945-57. [史梅英, 赵志英. E-选择素与肿瘤关系的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2011, 43(8):945-57.]

[2] Fu J, Zhang Y, Zhou YX, et al. The expression and significance of E-selectin P-selectin in human gliomas[J]. Sichuan Yi Xue, 2009, 30(11):1696-8. [傅军, 张一, 周幽心, 等. E-选择素、P选择素在人脑胶质瘤中的表达意义[J]. 四川医学, 2009, 30(11):1696-8.]

[3] Shaker OG, Ay El-Deen MA, Abd El-Rahim MT, et al. Gene expression of E-selectin in tissue and its protein level in ser

um of breast cancer patients[J]. Tumori, 2006, 92(6):524-30.

[4] Zhao LJ, Wan YZ, Xiao M, et al. Expression of integrin α 5 β 1 and E-selectin in colorectal adenocarcinoma and its clinical implication[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2011, 38(7):799-802. [赵丽娟, 万义增, 肖马, 等. 整合素 α 5 β 1和E-选择素蛋白在结直肠癌腺癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(7):799-802.]

[5] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-8.

[6] Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, et al. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(11):1473-91.

[7] Nakagawa T, Endo Y, Watanabe M, et al. Adhesion function of canine mammary gland tumor cells expressing sialyl Lewis X[J]. J Vet Med Sci, 2009, 71(9):1225-8.

[8] Richter U, Schröder C, Wicklein D, et al. Adhesion of small cell lung cancer cells to E- and P-selectin under physiological flow conditions: implications for metastasis formation[J]. Histochem Cell Biol, 2011, 135(5):499-512.

[9] Myung JH, Gajjar KA, Pearson RM, et al. Direct measurements on CD24-mediated rolling of human breast cancer MCF-7 cells on E-selectin[J]. Anal Chem, 2011, 83(3):1078-83.

[10] Köhler S, Ullrich S, Richter U, et al. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung[J]. Br J Cancer, 2010, 102(3):602-9.

[11] Trmblay PL, Huot J, Auger FA. Mechanisms by which E-selectin regulates diapedesis of colon cancer cells under flow conditions[J]. Cancer Res, 2008, 68(13):5167-76.

[12] Liu ZJ, Tian R, Li Y, et al. Inhibition of tumor angiogenesis and melanoma growth by targeting vascular E-selectin [J]. Ann Surg, 2011, 254(3):450-6.

[13] Qiu AF, Xu Q, Wang QQ. Expression and clinical significance of E-selectin and its ligand- sLe- X in breast carcinoma[J]. Zhongguo Jiao Tong Yi Xue Za zhi, 2006, 20(1):20-2. [仇爱峰, 徐青, 王庆庆. 乳腺癌组织中E-选择素及其配体的表达及临床意义[J]. 中国交通医学杂志, 2006, 20(1):20-2.]

[14] Shi MY, Zhao ZY. Expression of E-selectin in epithelial ovarian carcinoma and its clinical significance[J]. Zhongguo Fu Chan Ke Lin Chuang Za Zhi, 2011, 12(5):369-71. [史梅英, 赵志英. E-选择素在上皮性卵巢癌患者中的表达及其临床意义[J]. 中国妇产科临床杂志, 2011, 12(5):369-71.]

[15] Bal N, Kocer NE, Ertorer ME, et al. Maspin, E-selectin, and P-selectin expressions in papillary thyroid carcinomas and their correlation with prognostic parameters[J]. Pathol Res Pract, 2008, 204(10):743-50.

[16] Zhang BH, Chen H, Yao XP, et al. E-selectin and its ligands-sLeX in the metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2002, 1(1):80-2.