论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0932-03

Claudin 3 在食管腺癌和贲门腺癌的表达和意义

王 军,房殿春,赵晶京,杨仕明 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 Claudin 3 在食管腺癌和贲门腺癌的表达及意义。**方法** 分别采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 16 例食管腺癌、20 例食管鳞癌、15 例弥漫型贲门腺癌、25 例肠型贲门腺癌、15 例正常食管黏膜和 15 例正常贲门黏膜组织中 Claudin 3 mRNA 及蛋白表达。**结果** 与正常对照组和食管鳞癌、贲门弥漫型腺癌组相比,食管腺癌和贲门肠化型腺癌组织中 Claudin 3 mRNA 及蛋白表达显著增高($P<0.01$);食管鳞癌组、贲门弥漫型癌组 Claudin 3 mRNA 及蛋白表达与正常对照组无明显变化($P>0.05$)。**结论** Claudin 3 与食管腺癌和贲门肠化型腺癌发生有关。

关键词: Claudin 3;食管腺癌;贲门腺癌

中图法分类号: R730.23;R735.1;R735.2 **文献标识码:** A

Expression and significance of Claudin 3 in adenocarcinoma of esophagus and cardia adenocarcinoma

WANG Jun, FANG Dian-chun, ZHAO Jing-jing, YANG Shi-ming (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of Claudin 3 in adenocarcinoma of esophagus and gastric cardia. Methods We subjected pathologically confirmed 16 cases of esophageal adenocarcinoma (EAC), 20 cases of esophageal squamous cell carcinoma (ESC), and 40 cases of gastric cardiac adenocarcinoma (CAC, including 15 diffuse and 25 intestinal cases). Tissue samples were collected with aid of gastroscope. Fifteen samples of normal esophageal mucosa and 15 samples of normal cardiac mucosa served as control. RT-PCR and Western blotting were used respectively to detect the mRNA and protein expression of Claudin 3 in these tissue samples. Results The mRNA and protein expressions of Claudin 3 were increased in EAC and intestinal CA compared with those in normal tissues, ESC and diffuse CAC. There was no significant difference of the expression of Claudin 3 between normal group and ESC and diffuse CAC group. Conclusion Claudin 3 might be related to the development of EAC and intestinal CAC, and expected to be the tumor maker and therapeutic target of this kind of carcinoma.

Key words: Claudin 3; esophagus adenocarcinoma; cardia adenocarcinoma

上皮细胞之间的连接复合体由紧密连接和黏附连接等构成。近年发现 Claudin 膜蛋白家族是构成紧密连接最重要的结构蛋白。新近又发现包括消化系统在内,Claudin 蛋白在多种上皮组织肿瘤表达明显异常。食管腺癌和贲门腺癌的病因和发病机制还存在较大争议。2005 年 Gyorffy 等[1]最先在 Barrett 食管和食管腺癌黏膜中检测出 Claudin 3 表达明显增高。2007 年 Matsuda 等[2]报道了在胃癌中 Claudin 3 表达也明显增高,但未关注其在贲门腺癌的表达。这些发现从细胞紧密连接角度打开了研究食管腺癌和贲门腺癌之间联系的新视野。因此,我们检测食管腺癌和贲门腺癌 Claudin 3 蛋白表达变化,并探讨其临床诊疗意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象和分组

收集我院 2005 年 8 月至 2006 年 9 月诊疗患者 76 例,病例均应用 Olympus 240 或 260 胃镜进行观察并收集活检标本,经病理学证实。将病例分为食管腺癌组、食管鳞癌组和贲门腺癌组。食管腺癌组 16 例,男性 10 例,女性 6 例,年龄 38~70 岁,平均 62 岁。食管鳞癌组 20 例,男性 13 例,女性 7 例,年龄 35~76 岁,平均 61 岁。贲门腺癌组 40 例:肠型 25 例,男性 15 例,女性 10 例,年龄 37~74 岁,平均 61 岁;弥漫型 15 例,男性 8 例,女性 7 例,年龄 34~76 岁,平均 63 岁。正常对照组来源

作者简介:王 军,男,河南省信阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事胃食管反流病和上消化道肿瘤的发病机制和治疗方面的研究,发表论文 18 篇。电话:(023)68765191

通信作者:房殿春,E-mail: fangdianchun@hotmail.com

收稿日期:2007-12-07;修回日期:2008-02-14

于手术后食管、贲门良性肿瘤周围正常组织,分为正常食管黏膜组和正常贲门黏膜组($n=15$),取手术后新鲜组织 50 ~ 100 mg,保存于液氮后再转入 -70 ℃冰箱中保存备用。

1.2　试验方法

1.2.1　Claudin 3 mRNA 表达　　Tripure 液(Roche 公司)提取食管黏膜组织总的 RNA。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。根据 GenBank 中 Claudin 3 基因序列设计 Claudin 3 引物序列,上游:5′-CACCACCACCAACACCAC-3′,下游:5′-CAAGTATTGGCGGTCACC-3′,产物 249 bp;内参 GAPDH 引物,上游:5′-CGGGAAACTGTGGCGTGAT-3′,下游:5′-CAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3′,产物 311 bp。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。采用 Invitrogen 公司 RT-PCR 试剂盒进行逆转录及 PCR 扩增。PCR 反应参数:94 ℃预变性 5 min、94 ℃变性 30 s、52 ℃退火 40 s、72 ℃延伸 1 min、26 个循环,72 ℃再延伸 10 min。结果判定:反应后产物电泳,电泳结果用凝胶紫外扫描成像仪扫描,Bandscan 软件进行图像分析,用 Claudin 3 和 GAPDH 两者灰度值的比值表示 Claudin 3 mRNA 的相对含量。

1.2.2　Claudin 3 蛋白质表达　　采用 Western blot 半定量法研究蛋白质表达,具体见文献[3]。一抗购自 Labvision 公司。结果判定:用 Gel Scan 图像分析处理系统对 Claudin 3 蛋白条带进行扫描、定量。同时用小鼠抗人 Beta-actin(1∶1 000)做内参对照。二者比值代表 Claudin 3 蛋白表达量。

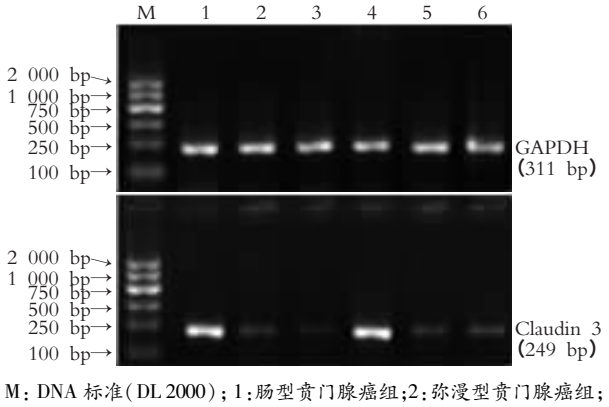
1.3　统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,对食管各组之间、贲门各组之间 Claudin 3 mRNA 和蛋白表达的差异用单因素方差分析;对食管腺癌组与肠型贲门腺癌组之间 mRNA 和蛋白表达的差异用 t 检验。

2　结果

2.1　Claudin 3 mRNA 含量测定

Claudin 3 mRNA 在食管腺癌组和贲门腺癌组含量见图 1、表 1。与正常食管黏膜组和食管鳞癌组相比,食管腺癌组 Claudin mRNA 增加了约 15 倍($P<0.01$),肠型贲门腺癌组与正常贲门黏膜组及弥漫型癌组相比增加约 17 倍($P<0.01$),与正常对照组相比,食管鳞癌组和弥漫型贲门腺癌组 Claudin 3 mRNA 含量未见明显变化($P>0.05$)。食管腺癌组与肠型贲门腺癌组含量无明显差异($P>0.05$)。

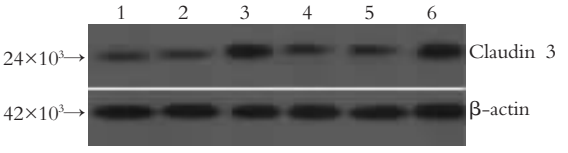


M:DNA 标准(DL 2000);1:肠型贲门腺癌组;2:弥漫型贲门腺癌组;3:正常贲门黏膜组;4:食管腺癌组;5:食管鳞癌组;6:正常食管黏膜组

图 1　RT-PCR 检测各组 Claudin 3 mRNA 的表达

2.2　Claudin 3 蛋白表达测定

Claudin 3 mRNA 在食管腺癌组和贲门腺癌组含量见图 2、表 1。与 Claudin 3 mRNA 含量测定趋势类似,与正常食管黏膜组和食管鳞癌组相比,食管腺癌组 Claudin 3 蛋白表达增加了约 5 倍($P<0.01$),肠型贲门腺癌组与正常贲门黏膜组及弥漫型腺癌组相比增加约 7 倍($P<0.01$)。Claudin 3 蛋白增加的程度低于 mRNA 含量升高的程度。与正常对照组相比,食管鳞癌组和弥漫型贲门腺癌组 Claudin 3 蛋白含量未见明显变化($P>0.05$)。食管腺癌组与肠型贲门腺癌组含量无明显差异。



1:正常食管黏膜组;2:食管鳞癌组;3:食管腺癌组;4:正常贲门黏膜组;5:弥漫型贲门腺癌组;6:肠型贲门腺癌组

图 2　Western blot 检测各组 Claudin 3 蛋白质的表达

表 1　各组 Claudin 3 mRNA 和蛋白表达的情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Claudin 3 mRNA	Claudin 3 蛋白
正常食管黏膜组	15	0.13 ± 0.06	0.16 ± 0.05
食管鳞癌组	20	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.04
食管腺癌组	16	2.28 ± 0.12[ac]	0.98 ± 0.12[ac]
正常贲门黏膜组	15	0.18 ± 0.05	0.13 ± 0.04
弥漫型贲门腺癌组	15	0.14 ± 0.07	0.15 ± 0.06
肠型贲门腺癌组	25	2.21 ± 0.16[bd]	1.14 ± 0.15[bd]

a:$P<0.01$,与正常食管黏膜组比较;b:$P<0.01$,与正常贲门黏膜组比较;c:$P<0.01$,与食管鳞癌组比较;d:$P<0.01$,与弥漫型贲门腺癌组比较

3　讨论

Claudin 蛋白是构成紧密连接的骨架蛋白,有 24 个异构体,参与维持细胞的屏障功能,决定细胞旁物质选择渗透性和细胞极化等重要生理功能[4]。包括消化系统的器官在内,Claudin 蛋白的种类和数量分布具有器官特异性。近期研究发现 Claudin 3 在某些肿瘤,如乳腺癌、卵巢癌、食管腺癌和胃腺癌上皮的 mRNA 和蛋白表达明显增高[5]。我们进一步研究发现食管腺癌和肠化型贲门腺癌的 Claudin 3 mRNA 和蛋白含量特异性增高,提示 Claudin 3 蛋白可以作为诊断该类肿瘤新的标志物。它同该类肿瘤的分化程度、生物学行为、转移和预后及术后复发的关系更值得深入研究。

贲门腺癌和食管腺癌组织来源常不易区分,在发病机制上也有争议。有学者认为贲门腺癌的发生主要与幽门螺杆菌有关,但也有认为它和胃酸及胆汁的胃食管反流更密切,即胃食管反流使食管或/和贲门局部黏膜先发生肠化,进而引起不典型增生和癌变[6]。本研究显示食管腺癌组和肠化型贲门腺癌组的 Claudin 3 mRNA 和蛋白含量变化趋势基本相同,弥漫型贲门腺癌组与正常贲门黏膜组比较却无明显异常,提醒我们研究

贲门腺癌应注意其病理分型,同时应注意胃食管反流在肠化型贲门腺癌和弥漫型腺癌发生中作用是否一致。

食管腺癌和贲门腺癌的手术治疗效果尚不满意,预后较差。Claudin 3 在该类肿瘤的特异性表达为其治疗提供了新的靶点。研究结果表明,Claudin 3 是产气荚膜梭菌肠毒素(CPE)的受体,据此可以通过 CPE 对高表达 Claudin 3 的肿瘤产生特异性的细胞溶解作用[7]。Kominsky 等[8]发现把 CPE 注入表达 Claudin 3 的乳腺瘤体组织内,乳腺癌细胞表现出明显的细胞溶解。可以设想,类似的治疗将同样适用食管腺癌和肠化型贲门腺癌。随着研究的深入,基于 Claudin 3 特异表达的基因治疗手段将为该类临床肿瘤患者带来新的希望。

参考文献:

[1] Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, *et al*. Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma[J]. Virchows Arch, 2005, 447(6): 961-968.
[2] Matsuda Y, Semba S, Ueda J, *et al*. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma[J]. Cancer Sci, 2007, 98(7): 1014-1019.
[3] Turner P C, McLennan A G. 分子生物学: 影印版[M]. 第2版, 北京: 科学出版社,2000: 358-359.
[4] Schneeberger E E, Lynch R D. The tight junction: a multifunctional complex[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(6): C1213-C1228.
[5] Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(6): 919-928.
[6] DeMeester S R. Adenocarcinoma of the esophagus and cardia: a review of the disease and its treatment[J]. Ann Surg Oncol, 2006, 13(1): 12-30.
[7] Morin P J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy[J]. Cancer Res, 2005, 65(21): 9603-9606.
[8] Kominsky S L, Vali M, Korz D, *et al*. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4[J]. Am J Pathol, 2004, 164(5): 1627-1633.

(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)10-0934-01

旋转 DSA 三维重建技术在颅内血管造影中的应用

王智平,戚跃勇,梁开运,姜纯蓉 (第三军医大学新桥医院放射科,重庆 400037)

旋转数字减影血管造影(rotational DSA)及三维重建技术较常规 DSA 检查能克服影像中病变血管与周围血管重叠的问题而广泛应用于临床[1]。为了探讨该技术在颅内血管造影中的应用,我院自 2006 年 4-12 月以来,对 119 例颅内血管造影进行了常规 DSA、旋转 DSA 及三维重建技术检查,效果良好,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

119 例颅内 DSA 血管造影患者,男性 67 例,女性 52 例,年龄 11~79 岁,平均 47 岁。

1.2 仪器设备

GE 公司生产的 INNOVA3100 数字平板血管机,该系统具备三维动态旋转 DSA 功能,超大容量动态磁盘阵列。Mark VProVis 高压注射器,GE 公司 AW4.2 处理工作站。

1.3 检查方法

改良 Seldinger 技术经股动脉穿刺股动脉插管成功后,首先选择一侧或双侧颈内动脉插管,对患者进行常规正、侧位全颅内血管造影,疑有病变的血管进一步进行旋转 DSA 及三维重建技术检查。旋转 DSA 方法:调整患者体位,使摄影中心始终围绕着病变中心进行特定的旋转。曝光参数由系统根据预曝光条件自动设定。高压注射器参数设置为:造影剂采用欧乃派克,总量 25 ml,注射流率为 5 ml/s,注射时间 5 s,压力为150 psi,球管旋转角度 0~180°;影像采集 4.0 帧/s。像素矩阵1 024×1 024,程序设定为延迟采集,即注射对比剂 0.5~1.0 s 后开始采集图像。

1.4 图像后处理

图像采集后,系统通过网络自动将图像传到 AW4.2 工作站。此时选择容积再现(volume rendering, VR)、透表明技术(transparent)、面阴影重建法(surface shaded display,SSD)、最大密度投影重建法(maximum intensity projection,MIP)等技术对图像进行三维重建。重建时,适当调节滤波范围可排除颅内毛细血管影像的干扰,从不同角度、不同体位的图像上采用 SSD 和 MIP 联动方式,以最佳位置显示血管的病变。

2 结果

119 例患者中,113 例获得旋转数字减影血管造影检查,未成功 6 例。113 例患者检查结果显示颅内血管正常 50 例,颅内动脉瘤 26 例(图 1、2),动静脉畸形(AVM) 15 例,颈动脉海绵窦瘘(CCF) 2 例,颅内血管狭窄 8 例,动脉瘤栓塞治疗 12 例。

(下转 937 页)

作者简介:王智平,男,四川省巴中市人,技师,主要从事放射介入技术工作。电话:(023)68774676

收稿日期:2008-01-09;修回日期:2008-03-16