论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1062-04

Galectin-3 在食管鳞癌中的表达及其临床意义

石 菲,彭贵勇,孙永刚,姚大鹏 (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** 研究 Galectin-3 在食管鳞癌中的表达情况,初步探讨其与食管鳞癌临床病理特征的关系。**方法** ①用 S-P 免疫组化法检测 80 例食管鳞癌石蜡标本中 Galectin-3 蛋白的表达情况;②用 RT-PCR 法检测分析 Galectin-3 mRNA 在 36 例胃镜下切取的新鲜食管鳞癌组织中的表达情况。**结果** ①Galectin-3 蛋白在食管癌组织、正常食管组织中的表达具有明显差异($P<0.05$),在分化程度低、浸润程度深及发生淋巴结转移的食管鳞癌组织中的表达明显高于分化程度高、浸润程度浅及未发生淋巴结转移的食管癌组织($P<0.05$)。②Galectin-3 mRNA 阳性表达率在食管鳞癌组织中为 77.8%(28/36),在远癌正常组织中为 13.9%(5/36),结果具有显著性差异($P<0.05$),并且在分化程度低、浸润程度深及发生淋巴结转移的食管鳞癌组织中的表达明显高于分化程度高、浸润程度浅及未发生淋巴转移的组织,差异亦有显著性($P<0.05$)。**结论** Galectin-3 的差异表达,可能与食管鳞癌的发生、发展及转移有关。

关键词:食管鳞癌;Galectin-3;免疫组织化学;逆转录-聚合酶链反应
中图法分类号:R394.3;R730.23;R735.1 **文献标识码**:A

Association of galectin-3 expression with biological behaviors of squamous carcinoma of esophagus

SHI Fei, PENG Gui-yong, SUN Yong-gang, YAO Da-peng (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the galectin-3 expression in squamous carcinioma of esophagus and analyze its relationship with clinicopathological characteristics. **Methods** S-P immunohistochemistry was used to detect the expression of galectin-3 in 80 paraffin-embedded specimens of esophageal carcinoma and 22 specimens of normal tissues adjacent to the benigh lesions of esophagus. RT-PCR was performed to detect galectin-3 mRNA expression in 36 pairs of fresh squamous carcinoma tissues and corresponding adjacent normal mucosa. **Results** Out of 80 specimens of squamous carcinoma of esophagus, 62 specimens had positive expression of galectin-3, with the positive rate of 77.5% (62/80) that was significantly higher than 27.27% in normal esophageal tissues (6/22, $P<0.05$). The expression of galectin-3 was related to pathological grading, infiltration and lymphatic node metastasis ($P<0.05$). The positive rate of galectin-3 mRNA expression in esophageal carcinoma was 77.8%, while that of the corresponding adjacent normal tissues was 13.9% ($P<0.05$). The high expression of galectin-3 mRNA was correlated with poor differentiation, deep invasion and lymph node metastasis of esophageal carcinoma, but not with the patients' age, gender and tumor size. **Conclusion** Galectin-3 plays a role in the genesis, development and metastasis of esophageal squamous carcinoma.

Key words: esophageal carcinoma; galectin-3; immunohistochemistry; reverse transcriptase polymerase chain reaction

Galectins(β-半乳糖苷结合蛋白)是生物体内广泛存在的一大类结合蛋白,属于凝集素家族[1]。Galectin-3 是该家族的重要成员之一,它广泛表达于上皮细胞和免疫细胞,存在于细胞质及胞核内,参与多种生物学过程,起着调节细胞的增殖、分化、黏附和凋亡的作用,在一些细胞类型中与肿瘤的生长、浸润和转移密切相关。近年来,国内外很多研究显示,Galectin-3 与包括前列腺癌、甲状腺癌、结肠癌、胃癌、肝癌和乳腺癌等多种肿瘤的恶性发展有关[2-5]。但是尚少见从蛋白水平及 mRNA 水平对 Galectin-3 的异常表达与食管癌的关系进行研究。我国是食管鳞癌高发地区[6],鉴于此,本实验中我们采用免疫组织化学染色及 RT-PCR 的方法检测 Galectin-3 在食管鳞癌中的表达情况,并对其临床意义作初步探讨。

作者简介:石 菲,女,山东省临沂市人,硕士研究生,医师,助教,主要从事消化系统肿瘤发病机制方面的研究,电话:(023)68765191,E-mail:sdfapple719@126.com
通信作者:彭贵勇,电话:(023)68754678
收稿日期:2008-01-23;修回日期:2008-03-17

1　材料与方法

1.1　组织标本

收集第三军医大学西南医院 2006 年 10 月至 2007 年 5 月间手术标本共 80 例,由病理科确诊为食管鳞癌,全部病例术前均未行放、化疗.其中男性 47 例,女性 33 例。年龄 27 ~ 80 岁,平均 46.6 岁。病理分级采用常用 3 级分法[7],其中Ⅰ级 30 例、Ⅱ级 32 例、Ⅲ级 18 例;浸润到浅层(浅肌层及以上) 36 例,浸润到深层(深肌层及以下) 44 例;有淋巴结转移 34 例,无淋巴结转移 46 例。正常对照组:取良性病变距病变组织 5 cm 以上的食管正常组织 22 例。所有标本均经过常规 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 切片,用于进行免疫组化染色。另外收集西南医院门诊食管鳞癌患者电子胃镜活检新鲜标本 36 例,其中每例分别取肿瘤组织和相应远癌正常组织(距癌边缘 5 cm 以上),由有经验的镜检医师钳取胃镜下活检组织 2 ~ 3 块经液氮快速冷冻后,置 -80℃ 低温冰箱保存以备提取基因组 DNA。其中男性 25 例,女性 11 例。年龄 36 ~ 74 岁,平均年龄 56 岁。其中高分化 7 例,中分化 16 例,低分化 13 例;伴有淋巴结转移的 20 例,无淋巴结转移的 16 例;浸润到深层的 22 例,浸润到浅层 14 例。详细记载患者姓名、年龄、性别、肿块大小和组织学分级等临床病理资料。

1.2　免疫组化法进行 Galectin-3 蛋白表达定位检测

1.2.1　免疫组化方法　　即用型 Galectin-3 鼠抗人单抗为福州迈新生物技术有限公司产品;S-P 试剂盒、DAB 显色试剂均由北京中杉公司提供。免疫组织化学采用 S-P 法检测(严格按照 S-P 试剂盒说明书步骤操作),DAB 显色。以间变型大细胞淋巴瘤作为阳性对照,PBS 代替一抗作阴性空白对照。

1.2.2　免疫组化结果判断　　Galectin-3 以胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性染色细胞,采用阳性染色强度结合阳性细胞所占百分比进行判断。在 400 倍视野下每张切片随机观察 4 个视野,将切片中平均阳性细胞比例及染色深浅分别计 0 ~ 3 分,切片中无阳性细胞,0 分;阳性细胞 < 25%,1 分;26% ~ 50%,2 分;51% ~ 75%,3 分;> 75%,4 分。染色强度以多数细胞为准:无着色,0 分;淡黄色,1 分;黄或深黄色,2 分;褐或棕褐色,3 分。再按这两项指标的积分相加将结果分为 4 级:0 分为"-";1 ~ 2 分为"+";3 ~ 4 分为"++";5 ~ 6 分为"+++"。其中"++"~"+++"为强阳性表达。

1.3　RT-PCR 法进行 Galectin-3 mRNA 的表达检测

1.3.1　试剂和引物合成　　总 RNA 提取采用上海华舜生物工程有限公司的小量组织/细胞总 RNA 快速抽提纯化试剂盒(W6701);RT-PCR 试剂购于 Takara Biotechnology Co.(Japan)(DRR037S,DRR01AM)。Galectin-3 和 β-actin 的引物序列分别针对 GenBank 中的 NM_002306 和 X00351,采用 Primer5.0 软件设计,序列如下:Galectin-3 的上游引物:5′-CTTATAACCTGC-CTTTGCCTGG-3′(base 368 - 389),下游引物:5′-GCAACAT-CATTCCCTCTTTGGA-3′(base 464 - 485),产物长度为 117 bp;β-actin 的上游引物:-TGGACATCCGCAAAGACCTG-3′(base 901 - 920),下游引物:5′-CCGATCCACACGGAGTACTT-3′(base 1047 - 1066),产物长度为 165 bp。引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.3.2　组织总 RNA 提取　　新鲜组织 RNA 提取采用苯酚/氯仿法,使用总 RNA 提取试剂盒中的亲和层析柱,具体步骤按照试剂盒说明书执行。所提取的总 RNA 的完整性经 1% 琼脂糖电泳,可见明显的 18S 和 28S。所提取的总 RNA 用紫外分光光度计定量并检测其纯度,A_{260}/A_{280} 比值为 1.8 ~ 2.0 者可用于翻转录反应,-80℃ 保存备用。

1.3.3　RT-PCR 法检测　　逆转录、PCR 扩增反应体系及步骤均严格按照说明书执行。反应终止后,每管中取 5 μl PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(EB 染色)后,紫外投射反射仪下观察结果,并在凝胶成像仪上照相。以 100 ~ 600 bp DNA Marker 为标准,在 117 bp 位置出现条带为 Galectin-3 表达阳性,在 165 bp 位置上出现条带为 β-actin 表达阳性。

1.4　统计学处理

运用 SPSS 11.0 统计分析软件,根据资料类型采用配对资料 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法,对所有资料进行统计学分析,检验标准取以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2　结果

2.1　Galectin-3 的免疫组织化学检测结果

2.1.1　Galectin-3 在食管鳞癌组织及正常食管组织中阳性染色结果及分布　　Galectin-3 阳性信号呈棕黄色颗粒状或线网状染色,大多数病例定位于细胞质(图 1、图 2),少数位于间质。Galectin-3 蛋白在肿瘤组织中呈异质性表达,即在肿瘤的不同区域表现出不同的特点,或弥散分布,或呈小片状、灶状分布,染色强度亦不一致。80 例食管癌组织中 Galectin-3 的阳性表达率 77.5%,22 例正常食管黏膜组织中 Galectin-3 多为阴性表达,少数为弱阳性表(27.27%),两者间差异有统计学意义($P < 0.05$),提示食管鳞癌组织中 Galectin-3 蛋白高表达。

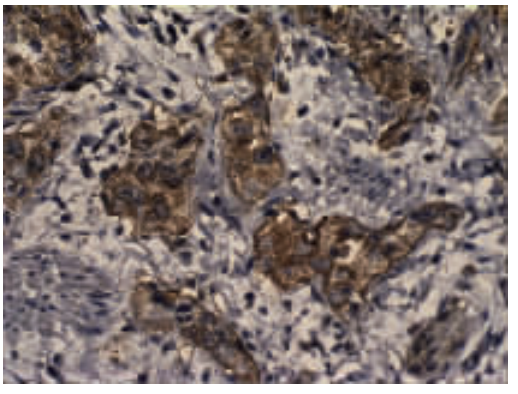


图 1　Galectin-3 在低分化食管鳞癌中的表达　(S-P ×400)

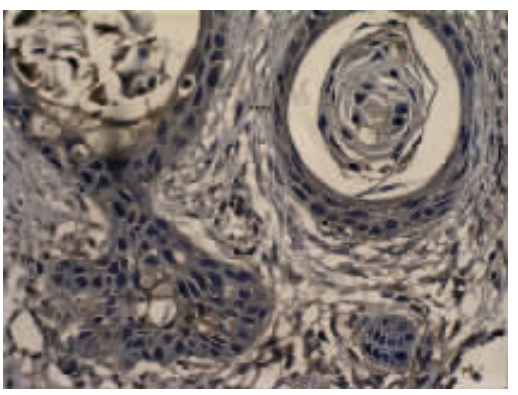


图 2　Galectin-3 在高分化食管鳞癌中的表达　(S-P ×400)

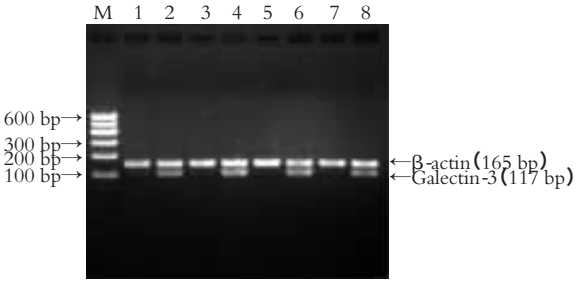
2.1.2 Galectin-3 蛋白表达与食管癌病理分级及浸润、转移的关系 Galectin-3 蛋白在临床分级为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级食管癌中的阳性率依次为 66.67%、75.0%、100%，在低分化组分别高于高、中分化组，差异有显著性（$P=0.025$），提示 Galectin-3 阳性率随食管鳞癌病理分级上升而升高。且 Galectin-3 表达的阳性率与癌症浸润深度及淋巴结转移相比较，差异也均有统计学意义（$P<0.05$，表1）。但是，Galectin-3 蛋白表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小及组织学类型无关。

表1 80例食管鳞癌中 Galectin-3 的表达与肿瘤临床病理特征的关系

指标	例数	Galectin-3 表达强度				阳性率(%)	P 值
		−	+	++	+++		
病理分级							
Ⅰ	30	10	13	5	2	66.67	
Ⅱ	32	8	7	10	7	75.0	0.025
Ⅲ	18	0	2	4	12	100.00	
浸润深度							
浅层	36	15	10	7	4	58.33	<0.05
深层	44	3	11	13	17	93.18	
淋巴结转移							
无	46	17	16	8	5	63.04	<0.05
有	34	1	4	13	16	97.06	

2.2 Galectin-3 的 RT-PCR 检测结果

2.2.1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果 Galectin-3 及内参 β-actin 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳，其大小与预先设计引物大小一致（图3）。36例食管癌组织中有 28 例表达 Galectin-3 mRNA，阳性率为 77.8%；相应的远癌正常组织中只有 5 例呈阳性或弱阳性表达，阳性率为 13.9%，两者相比较具有统计学差异（$P<0.05$）（表2）。



1、3、5、7：远癌正常组织；2、4、6、8：食管癌组织；M：DNA 标准

图3 食管鳞癌及远癌正常组织中 Galectin-3 mRNA 的表达

表2 Galectin-3 mRNA 在食管癌组织与远癌正常组织表达的关系

远癌正常组织	食管癌组织		合计
	+	−	
+	2	3	5
−	26	5	31
合计	28	8	36

2.2.2 Galectin-3 mRNA 表达与食管鳞癌临床病理的关系（表3） Galectin-3 mRNA 阳性表达率与食管鳞癌的分化程度、浸润深度、以及有无淋巴结转移有关，与患者的性别、年龄、肿瘤大小无关。在高、中、低分化的食管鳞癌标本中，Galectin-3 mRNA 的阳性表达率分别为 42.9%（3/7）、81.3%（13/16）和 92.3%（12/13），随着食管癌分化程度的降低呈逐渐升高的趋势，且高分化组与低分化组之间存在统计学差异（$P<0.05$）。在有淋巴结转移和无淋巴结转移的食管鳞癌标本中，Galectin-3 mRNA 的阳性表达率分别为 95.0%（19/20）、56.3%（9/16）两者阳性表达率比较有显著性差异（$P<0.05$）。在深层浸润组和浅层浸润组中，Galectin-3 mRNA 的阳性表达率分别是 90.9%（20/22）和 57.1%（8/14），两者相比较也有显著性差异（$P<0.05$）。

表3 Galectin-3 mRNA 表达与 36 例食管癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	Galectin-3 mRNA 表达		P 值
		+	−	
性别				
男	25	20	5	>0.05
女	11	8	3	
年龄(岁)				
<60	15	11	4	>0.05
≥60	21	17	4	
癌大小				
<5 cm	12	7	5	>0.05
≥5 cm	24	21	3	
分化程度				
高分化	7	3	4	<0.05
中分化	16	13	3	
低分化	13	12	1	
淋巴结转移				
有	20	19	1	<0.05
无	16	9	7	
浸润深度				
深层	22	20	2	<0.05
浅层	14	8	6	

3 讨论

Galectin-3 是一种细胞内和细胞外凝集素，已知与细胞表面基质的糖蛋白相互作用，它包括 3 个结合域：一个 NH_2 末端结合域，一个糖结构识别域和一个特有的富含甘氨酸、脯氨酸和酪氨酸重复序列的结构域。NH_2 末端结合域包括控制细胞靶向的 12 个氨基酸残基，为与具有糖苷合物的细胞表面结合时发挥多种功能所必需。羧基末端的糖结合域可被胰蛋白酶裂解为包含 140 个氨基酸残基的糖结构识别域，这是作为 Galectin 标志的分子结构[8]。

既往研究表明，Galectin-3 与胃癌、结肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、前列腺癌、头颈部鳞癌等多种肿瘤的发生和发展密切相关[9-12]。目前认为 Galectin-3 可能从以下几个方面促进肿瘤的形成和转移：① Galectin-3 的糖亲和性促进血管内皮细胞和平滑肌细胞的有丝分裂，参与肿瘤形成过程中的血管生成[13]。② Galectin-3 是基质金属蛋白酶（MMP）-2 和 -9 的底物，MMPs 可以将其分解后产生一个相对分子质量为 22×10^3 的糖

识别域和一个相对分子质量为 9×10^3 的氨基酸残基组成 Galectin-3 末端片段[14]。目前已经明确 MMPs 的表达增高与肿瘤的演进相关，这样裂解的 Galectin-3 可能在肿瘤的转移、侵袭中发挥一定的作用。③ 肿瘤的转移需要肿瘤细胞与内皮细胞粘附，进而形成与炎症反应相类似的细胞溢出，因此认为肿瘤细胞表面的 T 抗原和内皮细胞表面的 Galectin-3 在肿瘤细胞黏附内皮细胞方面发挥重要作用[15]。④ Galectin-3 是一种强有力的凋亡抑制蛋白，研究表明它与 Bcl-2 的序列有明显的相似性，都在 C 末端包含一个 NWGR 四级结构，该结构是 Bcl-2 蛋白抗凋亡功能的关键结构，因此 Galectin-3 抗凋亡活性的机制可能涉及抗凋亡蛋白 Bcl-2[16]。综合而言，肿瘤细胞表面 Galectin-3 表达升高可以通过增加细胞的聚集，提高肿瘤细胞与内皮细胞的亲和性，抗细胞巢式凋亡等，从多种途径影响恶性肿瘤的发生演进，增加其转移潜能。

本研究为了探讨 Galectin-3 在食管鳞癌发生、发展中的作用，分别以石蜡组织以及新鲜食管鳞癌组织为研究对象，应用免疫组化技术和 RT-PCR 技术，从蛋白水平与 mRNA 水平检测 Galectin-3 在食管鳞癌组织中的表达情况。我们的免疫组化检测结果显示 Galectin-3 在食管癌组织中的表达明显高于正常食管上皮组织，在分化程度低、浸润程度深及发生淋巴结转移的组织中的表达明显高于分化程度高、浸润程度浅及未发生淋巴结转移的组织。这些结果提示 Galectin-3 蛋白的高表达与食管鳞癌细胞的癌变、低分化趋向、高侵袭能力有一定的关系。RT-PCR 检测结果表明食管鳞癌组织中 Galectin-3 mRNA 的表达明显高于相应的远癌正常组织。在分化程度低、浸润程度深及发生淋巴结转移的癌组织中的表达明显高于分化程度高、浸润程度浅及未发生淋巴结转移的癌组织。Galectin-3 mRNA 水平的检测与蛋白水平的检测结果一致，说明食管鳞癌中 Galectin-3 表达的增强是由于基因转录水平上调的结果。

这些研究结果证实无论在蛋白水平还是在 mRNA 水平，Galectin-3 的异常表达确实在一定程度上促进了食管鳞癌的发生、发展，并与肿瘤的恶性程度以及侵袭和转移能力有密切的相关性。因此，Galectin-3 可作为一个潜在的判断食管癌发病与转移的观测指标，并可能为食管癌的临床治疗提供新靶点。但要想进一步明确 Galectin-3 基因在食管鳞癌演进及转移中发挥的确切生物学作用，我们尚需深入探究其在肿瘤细胞内、外的信号传导通路，特别是 Galectin-3 相关配体在食管癌细胞中的自然特性。

参考文献：

[1] Barondes S H，Cooper D N，Gitt M A，*et al*. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins[J]. J Biol Chem，1994，269(33)：20807－20810.

[2] Bartolazzi A. Improving accuracy of cytology for nodular thyroid lesions[J]. Lancet，2000，355(9216)：1661－1662.

[3] Maeda N，Kawada N，Seki S，*et al*. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways[J]. J Biol Chem，2003，278(21)：l8938－l8944.

[4] Schoeppner H L，Raz A，Ho S B，*et al*. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon[J]. Cancer，1995，75(12)：2818－2826.

[5] Baldus S E，Zirbes T K，Weingarten M，*et al*. Increased galectin-3 expression in gastric cancer：correlations with histopathological subtypes，galactosylated antigens and tumor cell proliferation[J]. Tumour Biol，2000，21(5)：258－266.

[6] Liu J F，Wang Q Z，Hou J. Surgical treatment for cancer of the oesophagus and gastric cardia in Hebei，China[J]. Br J Surg，2004，91(1)：90－98.

[7] 阎晓初. 食管疾病[M]//史景泉，陈意生. 现代外科病理学. 北京：人民军医出版社，1998：107.

[8] Dumic J，Dabelic S，Flogel M. Galectin-3：an open-ended story[J]. Biochim Biophys Acta，2006，1760(4)：616－635.

[9] 杨志明，伍晓汀，何涛，等. 胃癌腹膜转移中 galectin-3 mRNA 的表达与意义[J]. 四川大学学报·医学版，2006，37(1)：105－108.

[10] Greco C，Vona R，Cosimelli M，*et al*. Cell surface overexpression of galectin-3 and the presence of its ligand 90k in the blood plasma as determinants in colon neoplastic lesions[J]. Glycobiology，2004，14(9)：783－792.

[11] Shalom-Feuerstein R，Cooks T，Raz A，*et al*. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells[J]. Cancer Res，2005，65(16)：7292－7300.

[12] Torregrossa L，Faviana P，Camacci T，*et al*. Galectin-3 is highly expressed in nonencapsulated papillary thyroid carcinoma but weakly expressed in encapsulated type；comparison with Hector Battifora mesothelial cell 1 immunoreactivity[J]. Hum Pathol，2007，38(10)：1482－1488.

[13] Nangia-Makker P，Honjo Y，Sarvis R，*et al*. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis[J]. Am J Pathol，2000，156(3)：899－909.

[14] Nangia-Makker P，Raz T，Tait L，*et al*. Galectin-3 cleavage：a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers[J]. Cancer Res，2007，67(24)：11760－11768.

[15] Glinsky V V，Glinsky G V，Rittenhouse-Olson K，*et al*. The role of Thomsen-Friedenreich antigen in adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium[J]. Cancer Res，2001，61(12)：4851－4857.

[16] 魏海燕，王春友. Gal-3 与 Bcl-2、层粘连蛋白受体在胰腺癌中表达的关系及意义[J]. 临床消化病杂志，2003，15(2)：59－61.

（编辑　王　红）