论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1816-04

结肠癌中埃滋蛋白和细胞间黏附分子1的表达及意义

刘津杉[1],朱明才[1],董蒲江[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院胃肠外科[1],重庆市高校神经病学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨埃滋蛋白(Ezrin)和细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecules 1,ICAM-1)在结肠癌组织中的表达及意义。**方法** 应用免疫组织化学S-P法和Western blot方法检测32例结肠癌及癌旁正常组织中Ezrin和ICAM-1的表达,分析其与结肠癌临床病理特点的关系。**结果** ①Ezrin和ICAM-1在结肠癌组织中高表达,正常组织低表达或不表达。Western blot检测结果:Ezrin在癌组织中表达量为(2 121.0±631.5),在正常组织中为(907.8±258.3);ICAM-1在癌组织中表达量为(2 511.5±627.2),在正常组织中为(676.2±323.6),免疫组化显示二者主要表达于细胞膜和细胞质,肿瘤间质中也可见ICAM-1表达,且癌组织中的表达明显高于正常组织。②二者在结肠癌Dukes C+D期中的表达明显高于A+B期($P<0.01$),在有淋巴结转移组的表达明显高于无转移组($P<0.01$)。③Ezrin和ICAM-1表达成正相关($r=0.898$,$P<0.01$)。**结论** Ezrin和ICAM-1在结肠癌组织中均有表达,其表达程度与结肠癌的分期、有无淋巴结转移有关。

[关键词] 结肠癌转移;Ezrin;ICAM-1;免疫组化;Western blotting
[中图法分类号] R735.35; R341; R730.23 [文献标志码] A

Expression of Ezrin and intercellular adhesion molecule 1 in colon cancer and its clinical significance

Liu Jinshan[1], Zhu Mingcai[1], Dong Pujiang[2] ([1]Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing Colleges and Universities, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of Ezrin and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in colon cancer and its clinical significance. **Methods** Expression of Ezrin and ICAM-1 in 32 colon cancer tissue samples and 32 its adjacent normal tissue samples was detected by immunohistochemistry S-P and Western blot, respectively. Its relation with the cliniopathological characteristics of colon cancer was analyzed. **Results** Western blot showed that Ezrin and ICAM-1 were highly expressed in colon cancer tissue samples, lowly or not expressed in normal colon tissue samples ($P<0.01$). The expression level of Ezrin was 2 121.0±631.5 in colon cancer tissue samples and 907.8±258.3 in its adjacent normal tissue samples, while the expression level of ICAM-1 was 2 511.5±627.2 in colon cancer tissue samples and 676.2±323.6 in its adjacent normal tissue samples ($P<0.01$). Immunohistochemistry demonstrated that Ezrin and ICAM-1were mainly expressed in cytomenbrane and cytoplasm. ICAM-1 was also expressed in intercellular substance. The ICAM-1 expression level was significantly higher in colon cancer tissue samples than in its adjacent normal tissue samples($P<0.01$). The expression level of Ezrin and ICAM-1 was significantly higher in Dukes C+D colon cancer than in Dukes A+B colon cancer($P<0.01$), and in colon cancer with lymphatic metastasis than in that without lymphatic metastasis ($P<0.01$). The expression of Ezrin and ICAM-1 was positively related ($r=0.898$, $P<0.01$). **Conclusion** Ezrin and ICAM-1 are expressed in colon cancer tissue, and their expression levels are related with the sage and lymphatic metastasis of colon cancer.

[**Key words**] colon cancer; Ezrin; intercellular adhesion molecule 1; immunohistochemistry; Western blotting

Corresponding author: Liu Jinshan, E-mail:deyiliujinshan@163.com

[通信作者] 刘津杉,E-mail:deyiliujinshan@163.com

埃滋蛋白(Ezrin)是一种细胞膜与细胞骨架的连接蛋白,具有调节细胞骨架肌动蛋白,调整细胞形态、黏附和活性,参与信号转导途径等功能[1-2]。细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecules 1,ICAM-1)是一种单链糖蛋白,与细胞骨架相连接,并与 Ezrin 有特定的结合位点,可以随细胞骨架的变化改变其亚细胞分布。二者在肿瘤发展过程中具有重要作用,目前尚少见联合研究结肠癌中 Ezrin 和 ICAM-1 的报道。本实验采用免疫组织化学 S-P 法和 Western blot 方法检测结肠癌中 Ezrin 和 ICAM-1 的表达,探讨二者在结肠癌发生、转移中的作用。

1　资料与方法

1.1　临床标本

选取重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 2010 年 5 - 10 月行结肠癌根治术标本 32 例,其中男性 17 例,女性 15 例,年龄 >60 岁者 13 例,≤60 岁者 19 例。术前均未行抗肿瘤治疗。术后经病理诊断证实低分化腺癌 6 例,中分化腺癌 24 例,高分化腺癌 2 例;有淋巴结转移 20 例,无淋巴结转移 12 例。每例标本离体后迅速去掉坏死组织及血块,分为 2 份分别投入 4% 多聚甲醛和 -70 ℃液氮中保存,另取距肿瘤边缘约 10 cm 处正常结肠组织做对照。免疫组化和 Western blot 检测均采用癌组织和正常组织对比,另 Western blot 中癌组织按年龄、性别、淋巴结转移与否、Dukes 分期分别进行对比研究。

1.2　主要试剂

Ezrin 小鼠抗人单克隆抗体(进口原装)、ICAM-1 小鼠抗人单克隆抗体(国内分装)及 ECL 化学发光显色试剂盒购自 Santa Cruz 公司,S-P 试剂盒、DAB 显色液购自北京四正柏生物科技有限公司,SDS-PAGE、蛋白裂解液(RIPA、PMSF)购自碧云天生物技术研究所,HRP 标记二抗(山羊抗小鼠)、小鼠抗人 β-actin 一抗购至北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3　免疫组织化学

组织经常规石蜡包埋,4 μm 连续切片,切片均采用微波抗原修复,其余步骤参照 S-P 试剂盒说明书进行,每例癌组织标本均和正常黏膜组织染色进行对比。

1.4　Western blot 检测

①组织蛋白提取:称取冰冻组织标本 50 mg 置于匀浆器中,组织剪尽量将组织剪碎,按 1 mg:15 μl 加入预冷的裂解液,置于冰上匀浆 45 min,将样品倒入离心管中,4 ℃下 14 000 r/min 离心 5 min,收集上层清液,尽量避免吸取漂浮絮状物,用 BSA 方法对所提蛋白质进行浓度测定,调整浓度到一相同值,加入 4 × 上样缓冲液,100 ℃沸水煮 7 min 使蛋白充分变性。②电泳、转膜及显色:配制 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,待凝胶充分凝集后将玻板放入电泳槽中,按每孔上样 15 μl 依次上样。电泳时浓缩胶用电压 60 V,分离胶电压 80 V,电泳完成后将蛋白转印于 PVDF 膜(孔径 0.45 μm),5% 脱脂奶粉封闭后加入 Ezrin(稀释比例 1∶500)和 ICAM-1(稀释比例 1∶300)抗体,4 ℃冰箱过夜,37 ℃复温 90 min 后,TBST 缓冲液洗膜 3 次 × 10 min,加入二抗(稀释比例 1∶1 000),37 ℃孵育 60 min 后再次以 TBST 洗膜 3 次 × 10 min,ECL 化学发光法显色,Quantity One 软件分析记录条带信息。

1.5　统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行 t 检验和 Pearson 相关分析。

2　结果

2.1　Ezrin、ICAM-1 免疫组化检测结果

Ezrin 在结肠癌组织中表达于细胞质及部分细胞膜,呈散在的均匀致密表达,在正常组织中不表达或仅低表达(图 1)。ICAM-1 表达于结肠癌组织细胞膜,肿瘤间质中亦见表达,为均一的棕黄色颗粒,在正常组织中不表达或低表达(图 2)。

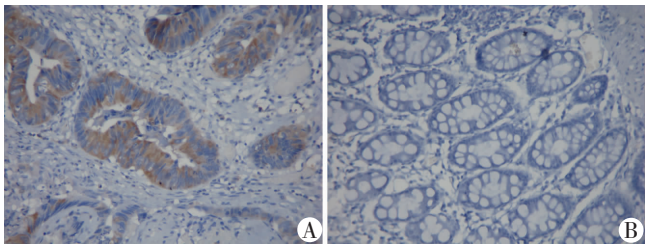


图 1　结肠癌组织(A)和正常结肠组织(B)中 Ezrin 的表达　(S-P ×200)

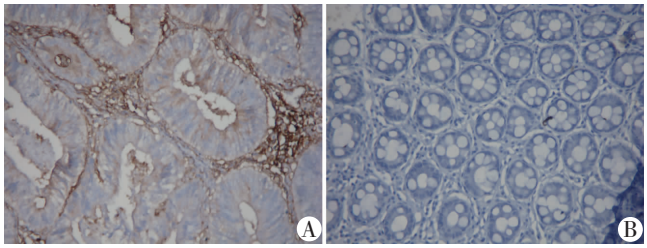
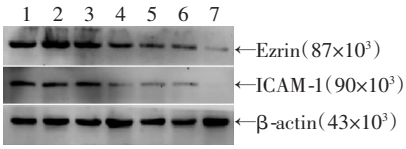


图 2　结肠癌组织(A)和正常结肠组织(B)中 ICAM-1 的表达　(S-P ×200)

2.2　Ezrin、ICAM-1 的 Western blot 检测结果

与正常组织(907.8 ± 258.3),(676.2 ± 323.6)相比,结肠癌组织中 Ezrin 和 ICAM-1 的表达(2 121.0 ± 631.5),(2 511.5 ± 627.2)显著增高($t = 5.254$, $P < 0.01$; $t = 8.135$, $P < 0.01$)(图 3);在结肠癌中,Ezrin 和 ICAM-1 的表达强度与肿瘤的分期、有否淋巴结转移密切相关,Dukes C + D 期癌组织显著高于 Dukes A + B 期($t = 4.838$, $P < 0.01$; $t = 3.056$, $P < 0.01$),20 例有淋巴结转移组显著高于 12 例无淋巴结转移组($t = 5.882$, $P < 0.01$; $t = 4.126$, $P < 0.01$);两者表达与患者的年龄、性别、肿瘤的分化程度均无明显相关性(图 3、表 1)。经 Pearson 相关分析发现 Ezrin 和 ICAM-1 的表达呈明显的正相关($r = 0.898$, $P < 0.01$)。



1 ~ 3:有淋巴结转移结肠癌组织;4 ~ 6:无淋巴结转移结肠癌组织;7:正常结肠组织

图 3　Western blot 检测有无淋巴结转移结肠癌组织和正常结肠组织的 Ezrin、ICAM-1 表达差异

表1 Western blot检测结肠癌Ezrin和ICAM-1的表达与临床病例特征之间的关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征	n	Ezrin	ICAM-1
性别			
男	17	2 095.2 ± 743.1	2 486.7 ± 783.8
女	15	2 151.0 ± 501.9	2 540.8 ± 407.2
年龄			
≤60岁	19	1 969.6 ± 705.7	2 382.7 ± 670.3
>60岁	13	2 363.1 ± 414.4	2 726.2 ± 511.5
肿瘤分化			
高分化	2	1 681.6	0.0
中分化	24	2 079.4 ± 637.8	2 444.0 ± 643.1
低分化	6	2 325.9 ± 648.4	2 713.5 ± 581.7
Dukes分期			
A+B期	9	1 404.1 ± 550.0	1 931.0 ± 611.3
C+D期	23	2 385.1 ± 423.7	2 502.0 ± 513.5[a]
淋巴结转移			
有	20	2 497.1 ± 358.4	2 798.3 ± 462.5[b]
无	12	1 519.1 ± 489.5	1 937.9 ± 519.9

a:$P<0.01$,与Dukes A+B期比较;b:$P<0.01$,与无淋巴结转移组比较

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤重要的生物学特征,是导致患者死亡的主要因素,大约90%的恶性肿瘤患者死于肿瘤转移。肿瘤转移是一个复杂的过程,大致包括:肿瘤细胞从原发灶脱离,侵入周围组织、血管、淋巴管系统及腹膜腔等,经上述系统到达一个离原发灶较远的地方,并且融入新的组织环境,逃逸机体的免疫攻击,最终在新的环境中生长增殖[3]。

Ezrin是ERM蛋白家族中的一员[1-2],主要表达于细胞表面以维持内皮细胞的极性,将细胞膜蛋白与肌动蛋白-细胞骨架相连接,通过介导这种连接,Ezrin在细胞的运动、迁移、有丝分裂等生理功能中发挥重要作用。研究[1,4]证实Ezrin在纤维肉瘤和骨肉瘤的转移中发挥关键作用,且相应的表达水平和预后直接相关。Ezrin可能通过与细胞膜表面分子相结合来改变细胞的黏附作用,亦可通过参与Rho[5]、PDGF[2]等多种信号途径来促进肿瘤的发生、发展。王忠良等[6-7]应用RNA干扰方法抑制Ezrin的表达,证实Ezrin在肺癌和胃癌的转移中发挥重要作用。Wang等[8]发现Ezrin在结肠癌中的表达明显高于正常结肠组织,并且高表达的Ezrin水平和结肠癌的侵袭转移密切相关。Adam等[9]研究发现,结直肠癌中Ezrin主要表达于细胞质,显著高于正常组织,并且结肠癌中表达高于直肠癌,Ezrin的表达情况与患者的预后成负相关。本实验通过免疫组化和Western blot研究显示,Ezrin主要定位于结肠癌组织的癌细胞质中,少量表达于细胞膜,正常结肠细胞中也有部分表达。结肠癌组织的表达明显高于正常组织($P<0.01$),有淋巴结转移者明显高于无淋巴结转移($P<0.01$),Dukes分期C+D的肿瘤明显高于A+B期($P<0.01$),但Ezrin的表达与患者的年龄、性别以及肿瘤的分化程度无显著相关性。提示Ezrin的高表达与肿瘤的发生、发展及转移密切相关,在结肠癌中检测Ezrin的表达对于判断结肠癌的预后有重要价值。与Gavert等[10]的研究结论一致。

ICAM-1是一种单链糖蛋白,相对分子质量为$(80\sim110)\times10^3$,在不同组织中相对分子质量有所差异。在炎症细胞、肿瘤细胞及附近的基质细胞中表达。ICAM-1可能提高癌细胞与基质细胞的黏附、抗机体的肿瘤免疫,从而使肿瘤容易发生转移。Maurer等[11]研究发现,同癌旁正常组织相比,结肠癌组织中ICAM-1的表达显著增高,而且与周围炎症细胞浸润有关。洪道显等[12]检测大肠癌患者血清中ICAM-1的浓度发现,在正常患者、无转移患者、有转移患者的血清中ICAM-1的浓度依次上升,在一定程度上反映了大肠癌的进展及转移情况。本研究结果显示,ICAM-1在结肠癌组织中的表达明显高于正常组织($P<0.01$)。在癌组织中,ICAM-1表达程度与肿瘤分期、有否淋巴结转移密切相关,而与肿瘤分化程度、患者年龄、性别无明显相关性。这与张海伶等[13-15]的研究结果一致。说明ICAM-1与结肠癌的浸润转移有着密切的关系。

Ezrin是连接细胞骨架和细胞膜的桥接蛋白,有N端、C端、α螺旋区域3个结构域,N端伸向细胞膜,称为FERM区,该区可直接或间接地与细胞膜蛋白(CD44、ICAM-1、ICAM-2、整合素、E-钙黏蛋白等)相结合,通过调节肌动蛋白的组装和收缩,调节细胞与细胞、细胞与基质间的黏附和运动。目前许多学者采用免疫组织化学染色方法研究了Ezrin和ICAM-1在肿瘤侵袭转移中的作用,但均只从定性方面检测了其中1个蛋白,单方面说明了某一蛋白对肿瘤发展的影响,具体怎样影响肿瘤的转移侵袭却未能阐述,且单个检测敏感度和特异度均较低。潘立峰等[16]首次用免疫组化方法联合检测胃癌中Ezrin和ICAM-1的表达,发现胃癌中Ezrin和ICAM-1的高表达成正相关($r=0.46$,$P=0.00$),联合检测两者的表达可提高检测的敏感度和特异度。本研究采用定性、定量结合的方法联合检测Ezrin和ICAM-1的表达情况,不仅发现Ezrin和ICAM-1的表达呈明显的正相关($r=0.898$,$P<0.01$),且从Ezrin和ICAM-1的结构特点出发,结合二者在免疫组化研究中在结肠癌细胞中的定位,说明二者可能形成蛋白复合体,使肿瘤细胞通过细胞骨架-细胞膜-基质这样一个连接形成转移,在肿瘤的转移中共同发挥重要作用。

综上所述,结肠癌组织中Ezrin和ICAM-1均高表达,其表达程度与肿瘤的分期、转移与否密切相关,而

与患者的年龄、性别及肿瘤分化程度无相关性，说明 Ezrin、ICAM-1 高表达的结肠癌更易形成转移，联合检测二者的表达可作为判断结肠癌预后的指标。Ezrin 和 ICAM-1 在结肠癌中的表达成正相关，提示 Ezrin 和 ICAM-1 可能形成蛋白复合物，辅以 ICAM-1 的抗肿瘤免疫作用，共同介导结肠癌的转移，但具体机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Yu Y, Khan J, Khanna C, *et al*. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 175 - 181.

[2] Bretscher A, Edwards K, Fehon R G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(8): 586 - 599.

[3] Hunter K W. Ezrin, a key component in tumor metastasis[J]. Trends Mol Med, 2004, 10(5): 201 - 204.

[4] Khanna C, Wan X, Bose S, *et al*. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 182 - 186.

[5] Pujuguet P, Del-Maestro L, Gautreau A, *et al*. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(5): 2181 - 2191.

[6] 王忠良，李旭良，张德文，等. Ezrin 在 UMR106 骨肉瘤细胞株移植瘤成瘤及肺转移中的作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(2)：156 - 159.

[7] 樊丽琳，房殿春. RNA 干扰 Ezrin 体外对胃癌 AGS 细胞侵袭和迁移的影响[J]. 第三军医大学学报，2009，31(21)：2137 - 2139.

[8] Wang H J, Zhu J S, 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.

[9] Elzagheid A, Korkeila E, Bendardaf R, *et al*. Intense cytoplasmic ezrin immunoreactivity predicts poor survival in colorectal cancer[J]. Hum Pathol, 2008, 39(12): 1737 - 1743.

[10] Gavert N, Ben-Shmuel A, Lemmon V, *et al*. Nuclear factor-kappaB signaling and ezrin are essential for L1-mediated metastasis of colon cancer cells[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 12): 2135 - 2143.

[11] Maurer C A, Friess H, Kretschmann B, *et al*. Over-expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 might influence tumor progression in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 1998, 79(1): 76 - 81.

[12] 洪道显，陈火国，陈煜，等. 大肠癌患者可溶性 E-选择素及细胞内黏附分子-1 血清水平的临床意义[J]. 现代肿瘤医学，2006，14(12)：1553 - 1555.

[13] 张海伶，李红霞，郭文有，等. 大肠癌中 ICAM-1 基因的表达及其对预后的影响[J]. 中国现代医药杂志，2006，8(6)：58 - 60.

[14] 徐胜美，马红梅，郭东. ICAM-1 蛋白的表达与大肠癌侵袭转移的相关性[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2010，19(2)：172 - 175.

[15] 刘安丽，贺生. ICAM-1、P 选择素、nM-23 在青年人结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中国现代药物应用，2008，2(23)：4 - 6.

[16] 潘立峰，吴敏兰，赵志荣，等. 人胃癌组织中 Ezrin、ICAM-1 的表达及意义的研究[J]. 中国综合临床，2008，24(7)：625 - 628.

（**收稿**：2011-03-07；**修回**：2011-04-12）

（编辑　龙　亮）

（上接 1807 页）

2　讨论

BSC 好发于 60 岁以上的老年男性，多位于段及其以上的支气管[2-3]。国外曾报道 1 例 18 岁女性[4]及 1 例 23 岁女性[5]患者，前者化疗后 2 个月死亡，后者术后 18 个月预后较好。研究显示年龄在 40 岁以下的患者死亡率较老年患者高，肿瘤更具有侵袭性。BSC 主要由基底细胞癌成分和不等量鳞状细胞成分组成，分化程度低，典型的基底细胞样鳞癌表现有：癌巢呈小叶状、分支吻合呈小梁状，没有核仁的小立方形梭形细胞及有丝分裂象活跃等。组织病理学上主要与小细胞癌、部分腺样囊性癌和大细胞神经内分泌癌等鉴别。

肺基底细胞样鳞癌影像学表现报道极少。本例主要表现为右肺下叶肿块影，呈分叶状，边缘见短小毛刺，邻近胸膜凹陷，肿块内密度不均，增强后可见肿块由多个大小基本相同的类圆形无强化低密度区及均匀强化的分隔样结构构成，其分隔厚度基本一致，肿瘤整体呈分隔样不均匀强化表现显著，形似“葡萄”样改变，而形似“葡萄”样改变的肺部肿瘤少见报道，临床工作中亦少发现，是否为肺基底细胞样鳞癌的特异表现有待研究，另外本例肿块内多个点状血管影结构清晰，无受侵改变，这一点在恶性肿瘤中也较为罕见。

此病在影像学表现上主要与鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、小细胞肺癌等肺部肿瘤相鉴别[6]，鳞状细胞表现为肺门或纵隔内的软组织肿块，密度较均匀，常伴有支气管管腔狭窄，增强后肿块呈不均匀强化，肺基底细胞样鳞癌与之鉴别仍然需要依赖病理学。支气管肺泡癌的结节常表现为圆形或不规则形，大小不等，边缘模糊不清，可见细长毛刺，大多数病灶有空泡征或支气管充气征，也常伴有胸膜凹陷征。小细胞肺癌常见于肺门，边界清楚，密度较均匀，增强后呈中度强化。由于目前肺基底细胞样鳞癌没有相关影像学表现统计，所以与其他肺部占位鉴别仍然主要依赖于病理学。

参考文献：

[1] Brambilla E, Moro D, Veale D, *et al*. Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: a new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance[J]. Hum Pathol, 1992, 23(9): 993 - 1003.

[2] Moro D, Brichon P Y, Brambilla E, *et al*. Basaloid bronchial carcinoma. A histologic group with a poor prognosis[J]. Cancer, 1994, 73(11): 2734 - 2739.

[3] Foroulis C N, Iliadis K H, Mauroudis P M, *et al*. Basaloid carcinoma, a rare primary lung neoplasm: report of a case and review of the literature[J]. Lung Cancer, 2002, 35(3): 335 - 338.

[4] Nagakawa H, Hiroshima K, Takiguchi Y, *et al*. Basaloid squamous - cell carcinoma of the lung in a young woman[J]. Int J Clin Oncol, 2006, 11(1): 66 - 68.

[5] Cakir E, Demirag F, Ucoluk G O, *et al*. Basaloid squamous cell carcinoma of the lung: a rare tumour with a rare clinical presentation[J]. Lung Cancer, 2007, 57(1): 109 - 111.

[6] 王光宪，舒健，钟维佳，等. 16 层 CT 在继发性肺淋巴瘤中的诊断价值[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：601 - 603.

（**收稿**：2011-04-08；**修回**：2011-05-31）

（编辑　汪勤俭）