doi:10.11659/jjssx.02E019010

·基础研究·

结直肠癌组织 Snail、pim-3、E-cadherin 和 Her-2 的表达及与预后的关系

朱 婷,步大成,张英轶,姚俊霞 (复旦大学附属中山医院青浦分院病理科,上海 201700)

[摘 要] **目的** 分析结直肠癌组织锌指转录因子(Snail)、丝/苏氨酸激酶-3(pim-3)、上皮黏附素(E-cadherin)和人表皮生长因子受体-2(Her-2)的表达与结直肠癌患者预后的关系。**方法** 选取 2016 年 7 月至 2017 年 7 月我院行腹会阴联合直肠癌根治术(Miles 手术)的 120 例患者的结直肠癌组织标本作为观察组,选择在我院 86 例健康体检者的正常结直肠组织标本作为对照组。比较分析对照组正常结直肠组织标本与观察组患者的结直肠癌组织标本中 Snail、pim-3、E-cadherin 和 Her-2 阳性率差异及其与患者预后的关系。**结果** 观察组患者结直肠癌组织标本中 E-cadherin 的阳性率明显低于对照组,Snail、pim-3 和 Her-2 的阳性率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。120 例结直肠癌患者术后 12 个月随访率为 100%,随访结果显示,患者病死率为 30.83%(37/120),生存率为 69.17%(83/120)。死亡患者中 Snail、pim-3 和 Her-2 阳性表达率高于生存患者,而 E-cadherin 阳性表达率低于生存患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Snail、pim-3、E-cadherin 和 Her-2 参与了结直肠癌的发病进程,且与患者术后生存率有密切的关系。

[关键词] 结直肠癌;腹会阴联合直肠癌根治术;锌指转录因子;丝/苏氨酸激酶-3;上皮黏附素;人表皮生长因子受体-2

[中图分类号] R735.7+3;735.7+5 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-02-06

Correlation between the expression of Snail, pim-3, E-cadherin and Her-2 and the prognosis in colorectal cancer

ZHU Ting, BU Da-cheng, ZHANG Ying-yi, YAO Jun-xia (Department of Pathology, Qingpu Branch, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China)

Abstract: Objective To analyze the relationship between the expression of zinc finger transcription factor (Snail), serine/threonine kinase-3 (pim-3), epithelial adhesin (E-cadherin) and human epidermal growth factor receptor-2 (Her-2) and the prognosis in colorectal cancer. **Methods** From July 2016 to July 2017, colorectal cancer tissue samples of 120 patients underwent abdominal perineal combined with radical resection of rectal cancer (Miles operation) in our hospital were selected as the observation group. Eighty-six normal colorectal tissue samples from healthy subjects in our hospital were selected as the control group. The expression levels of Snail, pim-3, E-cadherin and Her-2 in normal colorectal tissues and tissues of patients with colorectal cancer were compared and analyzed. **Results** The positive rate of E-cadherin in colorectal cancer tissues of the observation group was significantly lower than that of the control group, and the positive rates of Snail, pim-3 and Her-2 were significantly higher than those of the control group, the difference were significant ($P<0.05$). The follow-up rate of the 120 patients with colorectal cancer was 100%. The mortality rate was 30.83% (37/120) and the survival rate was 69.17% (83/120). Compared with the survivors, the positive expression rates of Snail, pim-3 and Her-2 were higher in dead patients while the positive expression rate of E-cadherin was lower in dead patients, with statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Snail, pim-3, E-cadherin and Her-2 are involved in the pathogenesis of colorectal cancer and they are closely related to the postoperative survival rate.

Keywords: colorectal cancer; abdominal perineal combined with radical resection of rectal cancer; zinc finger transcription factor; serine/threonine kinase-3; epithelial adhesion; human epidermal growth factor receptor-2

结直肠癌是一种常见的消化道肿瘤,发病率较高,在胃肠道肿瘤中占第二位[1-2]。医疗界对结直肠癌的形成、发病机制与预后尚未完全明确,故深入了解结直肠癌的形成、病情发展,寻找预测结直肠癌的影响标志物成为一大研究热点[3]。已有研究显示,锌指转录因子(Snail)是一种具有促进细胞间物质迁移转换和抑制基因表达作用的转录因子;丝/苏氨酸激酶-3(pim-3)是一种具有调控细胞增殖、分化凋亡作用的原癌基因;上皮黏附素(E-cadherin)是一种具有维持细胞间正常连接,参与细胞内信号传导作用的钙黏附素;人表皮生长因子受体-2(Her-2)是一种具有抑制凋亡,促进增殖,增加肿瘤细胞侵袭力,促进肿瘤血管新生和淋巴管新生作用的原癌基因[4-7]。为了分析结直肠癌组织中 Snail、pim-3、E-cadherin、Her-2 的表达情况及与患者预后的关系,本研究选取我院行腹会阴联合直肠癌根治术(Miles 手术)的 120 例患者的结直肠癌组织标本和在我院 86 例健康体检者的正常结直肠组织标本进行研究,现报告如下。

[基金项目] 上海市青浦区科技发展基金(青科发 2016-04)

1 资料与方法

1.1 临床资料

将2016年7月至2017年7月在我院行Miles手术的120例结直肠癌患者的组织标本作为观察组,再选取我院86例健康体检者的正常结直肠组织标本作为对照组。观察组患者120例,男69例,女51例;年龄25~73岁,平均(49.56±22.47)岁;病理类型:黏液细胞癌23例,乳头状腺癌27例,管状腺癌50例,印戒细胞癌20例;分化程度:低分化41例,中分化66例,高分化13例;肿瘤部位:结肠63例,直肠57例。对照组健康体检者86例,男48例,女38例;年龄24~75岁,平均(49.52±22.63)岁。

观察组纳入标准:①经活检和病理检查学确诊;②未接受过相关治疗;③患者及家属知情且在知情同意书上签字。排除标准:①预计存活期少于12个月;②存在听力、视力或精神障碍。本研究通过我院伦理委员会认证。2组患者在性别和年龄等方面比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

多克隆兔Snail、E-cadherin抗体购于北京奥博星生物技术有限责任公司,单克隆鼠Her-2抗体购于武汉博士德生物工程有限公司,多克隆羊pim-3抗体购于美国Santa Cruz公司,二氨基联苯胺(DBA)显色试剂盒及SP试剂盒均购于北京天根生化科技有限公司。

结直肠癌患者组织标本和正常结直肠组织标本用10%甲醛固定,并用石蜡包埋后,切出厚度为4 μm的薄片。然后用免疫组织化学SP染色,30%过氧化氢和蒸馏水按照1∶10比例混合后对样本切片进行内源性酶灭活(室温)10 min,PBS清洗后(5 min×3次),将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)高压3 min进行抗原修复[8-9]。5% BSA封闭后孵育一抗(1∶200)4 ℃过夜,孵育二抗后DAB显色再苏木青复染,最后封片观察。以本实验室自行配制磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照,用已知标志物的阳性组织切片做阳性对照。

2组标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2表达情况的判定:Snail表达的判定标准为细胞核中出现棕黄色颗粒即为阳性细胞。Her-2表达的判定标准为细胞膜中出现棕黄色颗粒即为阳性细胞;在100倍镜下寻找代表性区域,在400倍镜下观察阳性细胞少于10%判定为阴性,超过或者等于10%判定为阳性。E-cadherin表达的判定标准为细胞核或细胞浆中出现棕黄色颗粒判定为阳性细胞。pim-3表达的判定标准为细胞质中出现棕黄色颗粒即为阳性细胞;在100倍镜下寻找代表性区域,在400倍镜下观察阳性细胞少于25%判定为阴性,超过或者等于25%判定为阳性。

比较2组患者结直肠组织标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2表达情况。术后随访12个月,比较末次检查观察组结直肠组织标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2的表达情况,并分析与结直肠癌患者预后的关系。

1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0统计学软件对数据进行分析,计数资料以率(%)表示,采用χ^2检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2组标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2的表达情况

观察组标本E-cadherin阳性率明显低于对照组,Snail、pim-3和Her-2阳性率明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表1。免疫组织化学SP染色Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2在正常结直肠组织标本中的阴性表达和结直肠癌组织中的阳性表达见图1。

表1 2组标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2的阳性表达[例(%)]

组别	n	Snail	pim-3	E-cadherin	Her-2
观察组	120	97(80.83)	83(69.17)	27(22.50)	67(55.83)
对照组	86	8(9.30)	2(2.33)	68(79.07)	7(8.14)
χ^2		10.571	92.348	64.516	49.507
P		0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 结直肠癌组织标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2的表达与预后分析

120例结直肠癌患者术后随访12个月,随访率为100%。随访截止时患者病死率为30.83%(37/120),生存率为69.17%(83/120)。死亡患者中Snail、pim-3和Her-2的阳性表达率高于生存患者,而E-cadherin的阳性表达率低于生存患者,上述比较差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 结直肠癌组织标本Snail、pim-3、E-cadherin和Her-2的阳性表达与预后分析[例(%)]

随访结果	n	Snail	pim-3	E-cadherin	Her-2
生存	83	62(74.70)	51(61.45)	23(27.71)	34(40.96)
死亡	37	35(94.59)	32(86.47)	4(10.81)	33(89.19)
χ^2		6.539	7.524	4.192	24.136
P		0.011	0.006	0.041	0.000

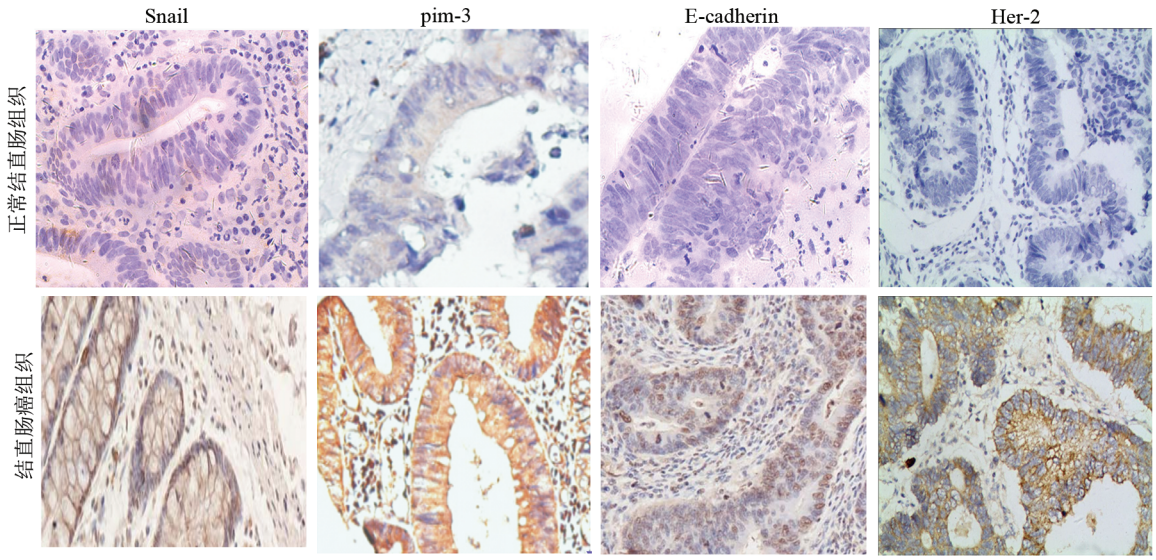


图1 免疫组织化学染色结果(SP ×400)

3 讨论

随着我国经济的快速发展,人们的饮食结构发生了巨大的改变,使得结直肠癌的发病率逐渐增加[10-11]。结直肠癌的主要临床表现为血便、腹泻、局部腹痛,后期还可能伴随贫血或体重减轻,严重的会导致患者死亡,极大地影响其生活质量和生命安全[12]。结直肠癌发病过程较复杂,不易早期发现,目前其发病原因、早期诊断标志物、改善预后的标志物尚不清楚[13-14]。有研究报道,结直肠癌的发生、转移及预后与多种生物指标相关[15-16]。因此,为了分析结直肠癌组织 Snail、pim-3、E-cadherin 及 Her-2 的表达情况及其与患者预后的关系,本研究选取我院结直肠癌患者组织标本和体检健康人群的正常结直肠组织标本进行对比研究。

本研究显示,结直肠癌患者组织标本 E-cadherin 阳性率明显低于正常结直肠组织标本,Snail、pim-3 和 Her-2 阳性率明显高于正常结直肠组织标本。这是由于存在于人体非神经上皮细胞的 E-cadherin 具有维持细胞间正常连接、参与细胞内信号传导的作用。E-cadherin 是一种钙依赖性的跨膜蛋白,参与细胞与细胞间黏附,分布于人和动物的各类上皮细胞,在维持细胞的极性和完整性方面起着重要的作用。Chen 等[15]的研究表明,细胞表面 E-cadherin 的减少是恶性肿瘤转移和扩散的关键,同时 E-cadherin/ β-catenin 黏附复合物的解离是结直肠癌中上皮间充质转化的关键,促进了肿瘤的侵袭转移。在大肠癌的相关研究中也发现,E-cadherin 的减少与生存期缩短密切相关,本研究结果与上述研究一致[15]。Snail 是 E-cadherin 的靶基因,Snail 中的锌指结构能够直接抑制 E-cadherin 的转录,使得上皮细胞间的连接作用减弱,使细胞间出现松散,易于扩散和转移,故 Snail 的阳性表达与 E-cadherin 的阳性表达趋势相反。Lopes 等[16]在口腔鳞癌中的研究中也证实了 E-cadherin 和 Snail 的相关性,两者的亚细胞定位对于口腔癌早期发现具有重要意义。Her-2 蛋白由胞外的配体结合区、单链跨膜区及胞内的蛋白酪氨酸激酶区三部分组成[17]。由于目前尚未发现能与 Her-2 蛋白直接结合的配体,其主要通过与家族中其他成员[包括 EGFR(HERl/erbBI)和 Her3/erbB3、HER4/erbB4]结合形成异二聚体,然后再间接与各自的配体结合发挥作用。Her-2 蛋白常为异二聚体首选伴侣,且活性常强于其他异二聚体,其与配体结合后,主要通过引起受体二聚化及胞浆内酪氨酸激酶区的自身磷酸化,从而激活酪氨酸激酶的活性。Her-2 的过度表达可潜在激活 EGFR 的信号通路,同时可促进 EGFR 介导的转化和肿瘤的发生。且 Her-2 作为一种原癌基因,可以抑制肿瘤细胞凋亡,促进其增殖,增加肿瘤细胞的侵袭力,促进肿瘤血管新生和淋巴管新生。Espejo-Herrera 等[18]的研究表明,Her-2 的活化可以直接导致人体部分细胞恶变或恶变潜能增加,且其能够下调 E-cadherin,增加肿瘤细胞的侵袭性。另外,pim-3 能够调控细胞增殖、分化、凋亡,增强细胞的抗凋亡作用,且 pim-3 能促使凋亡分子 Bad 发生磷酸化,使其失去活性,导致 Bcl-2 表达增加,从而肿瘤细胞急剧增加[18-19]。同时,pim-3 对肿瘤细胞的增殖、细胞周期具有调节作用,能够增强细胞的抗凋亡作用。有研究显示 Her-2、pim-3 的阳性表达与 E-cadherin 的阳性表达趋势相反[16-19]。

本研究对我院行 Miles 手术治疗的 120 例结直肠

癌患者术后随访 12 个月,随访率为 100%。随访截止时患者病死率为 30.83%,生存率为 69.17%,发现死亡患者中 Snail、pim-3 和 Her-2 阳性表达率高于生存患者,而 E-cadherin 阳性表达率低于生存患者。E-cadherin的表达缺失会增加结直肠癌患者的病死率,本研究结果与既往研究一致[20-21]。Snail、pim-3、Her-2 的阳性表达与 E-cadherin 的阳性表达趋势相反,E-cadherin 表达缺失的同时 Snail、pim-3 和 Her-2 的阳性表达率增加,患者病死率也增加,这与既往研究报道的 pim-3、Her-2 高表达患者预后极差的结果一致,提示 E-cadherin 的表达缺失,Snail、Her-2、pim-3 的表达增强与结直肠癌的预后有较大关系,可将其作为预测结直肠癌预后的重要因素[20]。

综上所述,Snail、pim-3、E-cadherin 和 Her-2 参与了结直肠癌的发病进程,且与患者术后生存率有密切的关系,而 Snail、pim-3、E-cadherin 和 Her-2 蛋白的表达量是否与结直肠癌的病理分期以及转移有相关性,亟待后期的研究。

[参考文献]

[1] Drew DA, Cao Y, Chan AT. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(3): 173. doi: 10.1038/nrc.2016.4.

[2] Schuebel KE, Chen W, Cope L, et al. Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer[J]. Plos Genetics, 2016, 3(9):1709-1723. doi: 10.1371/journal.pgen.0030157.

[3] Ling H, Pickard K, Ivan C, et al. The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis[J]. Gut, 2016, 65(6):977-989. doi:org/10.1136/gutjnl-2015-309372.

[4] Ma Y, Wu L, Liu X, et al. KLF4 inhibits colorectal cancer cell proliferation dependent on NDRG2 signaling[J]. Oncol Rep, 2017, 38(2): 975. doi: 10.3892/or.2017.5736.

[5] Zhuang YW, Wu CE, Zhou JY, et al. Solasodine inhibits human colorectal cancer cells through suppression of the AKT/glycogen synthase kinase-3β/β-catenin pathway[J]. Cancer Sci, 2017, 108(11):2248-2264. doi: 10.1111/cas.13354.

[6] Miskad UA, Cangara MH, Wahid S. Expression of protein regenerating liver-3 (prl-3) and E-cadherin in colorectal cancer[J]. Pathology, 2016, 48(1):143. doi: 10.1016/j.pathol.2015.12.389.

[7] Piccartgebhart M, Holmes E, Baselga J, et al. Adjuvant lapatinib and trastuzumab for early human epidermal growth factor receptor 2-Positive breast cancer: results from the randomized phase Ⅲ adjuvant lapatinib and/or trastuzumab treatment optimization trial[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(10):1034-1042. doi: 10.1200/JCO.2015.62.1797.

[8] Harosh-Davidovich SB, Khalaila I. O-GlcNAcylation affects β-catenin and E-cadherin expression, cell motility and tumorigenicity of colorectal cancer[J]. Exp Cell Res, 2018, 364(1):42. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.01.024.

[9] Tian XQ, Guo FF, Sun DF, et al. Downregulation of ZNF278 arrests the cell cycle and decreases the proliferation of colorectal cancer cells via inhibition of the ERK/MAPK pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 38(6):3685-3692. doi: 10.3892/or.2017.6031.

[10] Dewan K. Correlation of lauren's histological type and expression of E-cadherin and HER-2/neu in gastric adenocarcinoma[J]. J Mol Biol, 2016, 25(3):571. doi: 10.4103/0377-4929.155303.

[11] Trinh A, Trumpi K, De SE MF, et al. Practical and robust identification of molecular subtypes in colorectal cancer by immunohistochemistry[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(2):387-398. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0680.

[12] Sharouni MAE, Postma EL, Diest PJV. Correlation between E-cadherin and p120 expression in invasive ductal breast cancer with a lobular component and MRI findings[J]. Virchows Archiv, 2017, 471(6):707-712. doi: 10.1007/s00428-017-2203-2.

[13] Tang X, Yin K, Zhu H, et al. Correlation between the expression of microRNA-301a-3p and the proportion of Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis[J]. Inflammation, 2016, 39(2):759-767. doi: 10.1007/s10753-016-0304-8.

[14] Ji Q, Han Z, Zhou L, et al. Resveratrol inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer through regulating Snail/E-cadherin expression by TGFβ1/Smads signaling pathway[J]. Cancer Res, 2016,76(14):1689. doi: 10.3892/ol.2015.2988.

[15] Chen HN, Yuan K, Xie N,et al. PDLIM1 stabilizes the E-cadherin/β-catenin complex to prevent epithelial-mesenchymal transition and metastatic potential of colorectal cancer cells [J]. Cancer Res, 2016, 76(5):1122-1134. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1962.

[16] Lopes NM, Xavier FCA, Ortiz RC,et al. Subcellular localization and expression of E-cadherin and SNAIL are relevant since early stages of oral carcinogenesis[J]. Pathol Res Pract,214(8):1185-1191. doi: 10.1016/j.prp.2018.06.004.

[17] Bhagwat SV, Hamm NE, Hsu YC, et al. Overexpression or inducible expression of Snail, Zeb1 or TGFβ recapitulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer cell lines in vitro[J]. Cancer Res, 2016, 76(14):1612. doi: 10.1158/1538-7445.AM2016-1612.

[18] Espejo-Herrera N,Grùcia-Lavedan E,Boldo E,et al. Colorectal cancer risk and nitrate exposure through drinking water and diet[J]. Int J Cancer, 2016, 139(2):334-346. doi: 10.1002/ijc.30083.

[19] Qiu Y,Liu Y,Li WH,et al. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin [J]. Oncol Rep,2018,39(1):138-150. doi:10.3892/or.2017.6081.

[20] Ito K, Park SH, Nayak A, et al. PTK6 inhibition suppresses metastases of triple-negative breast cancer via SNAIL-dependent E-cadherin regulation[J]. Cancer Research, 2016, 76(15):4406. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3445.

[21] Zhao J, Klausen C, Xiong S, et al. Growth differentiation factor 8 induces SKOV3 ovarian cancer cell migration and E-cadherin down-regulation[J]. Cell Signal, 2016, 28(11):1615-1622. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.07.013.

(编辑:陈庆利)