乳腺浸润性导管癌连接蛋白 43 和上皮性钙黏蛋白相关性研究

涂永久,高一菁,陈 战,李 锐 (解放军第 174 医院普通外科,福建 厦门 361003)

[摘 要] **目的** 探讨乳腺浸润性导管癌组织中间隙连接蛋白 43(Cx43)及上皮性钙黏蛋白(E-cad)表达中的相关性。**方法** 采用 Elivision免疫组织化学法对 89 例乳腺侵润性导管癌组织及 48 例分区组织的 Cx43 与 E-cad 检测。**结果** 乳腺浸润性导管癌的肿瘤区、交界区和远癌区的 Cx43 和 E-cad 蛋白表达具有较好的一致性($\gamma = 0.460$, $P < 0.01$);在肿瘤区两者同时为阴性表达时,淋巴结转移率最高。**结论** Cx43 和 E-cad 在乳腺浸润性导管癌发生和发展过程中具有一定的协同作用,与其发生浸润转移有关。

[关键词] 乳腺癌;间隙连接蛋白 43;上皮性钙黏蛋白;相关性

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)06-0586-03

Expressions of Connexin43 and E-cadherin and their significance in invasive ductal carcinoma

TU Yong-jiu, GAO Yi-jing, CHEN Zhan, LI Rui (Department of General Surgery, 174th Hospital of PLA, Xiamen 361003, Fujian, China)

Abstract: Objective To explore the correlation of Connexion43(Cx43), E-cadherin(E-cad) in breast infiltrating ductal carcinoma tissue. **Methods** The expressions of Cx43 and E-cad proteins were detected in 89 cases breast infiltrating ductal carcinoma tissue, 48 cases partition groups. by immunohistochemistry Elivision method. **Results** The expressions of Cx43 and E-cad has a better consistency in the tumor area, the border area and far cancer area of breast infiltrating ductal carcinoma. For both the negative expression in tumor area same time, the rate of lymph node metastasis was highest. **Conclusion** Cx43 and E-cad in breast invasive ductal carcinoma has a certain synergy in the process of the occurrence and development, which related to its metastasis occurred.

Keywords: breast cancer; Connexin43; E-cadherin; correlation

连接蛋白 43(Connexin43, Cx43)和上皮性钙黏蛋白(E-cadherin, E-cad)的表达情况及功能状态已被证

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201406005

[收稿日期] 2014-08-15 [修回日期] 2014-10-10

Neth J Med, 2005, 63(10): 382 – 392.

[2] Wolthuis EK, Choi G, Dessing MC, et al. Mechanical ventilation with lower tidal volumes and positive end-expiratory pressure prevents pulmonary inflammation in patients without preexisting lung injury[J]. Anesthesiology, 2008, 108(1): 46 – 54.

[3] Raju C. Reddy. Immunomodulatory role of PPARγ in alveolar macrophages[J]. Journal of Invertigative Medicine, 2008, 56(2): 522 – 527.

[4] Virender K, Rehan Reiko S, Julia C, et al. Antenatally administered PPARγ agonist rosiglitazone prevents hyperoxia-induced neonatal rat lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(6): 672 – 680.

[5] Michelet P, D'Journo XB, Roch A, et al. Protective ventilation influences systemic inflammation after esophagectomy: a randomized controlled study. Anesthesiology, 2007, 107(1): 176 – 177.

[6] Bhatta Charya S, Sen N, Yiming MT, et al. High tidal volume ventilation induces proinflammatory signaling in rat lung endothelium[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 28(2): 218 – 224.

[7] Tremblay L, Valenza F, Ribeiro S, et al. Injurious ventilatory stratrgies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model[J]. J Clin Invest, 1997, 99(5): 944 – 952.

[8] Gattinoni L, Carlesso E, Langer T. Towards ultraprotective mechanical ventilation[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2012, 25(1): 141 – 147.

[9] Ngiam N, Kavanagh BP. Ventilator-induced lung injury: the role of gene activation[J]. Curr Opin Crit Care, 2012, 18(1): 16 – 22.

[10] Basilia Z, Paul W H, Michael O'C, et al. Lung injury after hemorrhage is age dependent: role of peroxisome proliferator-activated receptor [J]. Crit Care Med, 2009, 37(6): 1978 – 1987.

[11] Theodore JS, Venkateshwar GK, Raju CR. Peroxisome proliferator-activated receptor-γas a regulator of lung inflammation and repair [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005, (2): 226 – 231.

[12] Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation[J]. Inflamm Res, 2000, 49(10): 497 – 505.

[13] Bull AW. The role of peroxisome proliferator activated receptorγ in colon cancer and inflammatory bowel disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2003, 127(9): 1121 – 1123.

[14] Reddy AT, Lakshmi SP, Kleinhenz JM, et al. Endothelial cell peroxisome proliferator-activated receptor γ reduces endotoxemic pulmonary inflammation and injury[J]. J Immunol, 2012, 189(11): 5411 – 5420.

[15] Kawanishi S, Takahashi T, Morimatsu H, et al. Inhalation of carbon monoxide following resuscitation ameliorates hemorrhagic shock-induced lung injury[J]. Mol Med Rep, 2013, 79(1): 3 – 10.

(编辑:周小林)

实与多种人类疾病有关。目前,也有学者对两者的表达相关性关系进行研究,发现它们在肺癌、结肠癌、膀胱癌、喉癌等均有一定同向性及一致性。Cx43 和 E-cad同为表达于相邻细胞膜跨膜蛋白,共同对维持细胞间的稳定结构与调节细胞间的信息传递有着重要意义。为了解它们二者的表达是否具有相关性,作者对 89 例乳腺浸润性导管癌组织中的 Cx43 和 E-cad 的表达情况进行相关性分析,然后对 48 例分区取材的乳腺癌标本中 Cx43 和 E-cad 在同向表达时与淋巴结转移状态进行分析,探讨二者联合检测时是否有助于判断乳腺肿瘤的浸润转移能力。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2010 年 9 月至 2013 年 10 月本院普通外科收治的乳腺浸润性导管癌 89 例手术切除标本,每例病例在同一方向连续分 3 区取材,分别为肿瘤区,交界区,远癌区。肿瘤区为手术标本中肿瘤活检部分;交界区为肿瘤活检边缘外 1 ~ 2 cm 处的含有乳腺腺体组织部分;远癌区为肿瘤活检边缘外 2 ~ 4 cm 处的含有乳腺腺体组织部分,分区检测标本共有 48 例。将所有取材组织标记后制作成蜡块标本。所有病例资料完整,患者年龄 36 ~ 68 岁,中位年龄 52 岁;TNM Ⅰ期 9 例(18.7%),Ⅱ期 26(54.2%)例,13 例(27.1%);病理组织学Ⅰ级 2 例(4.2%),Ⅱ级 9 例(18.7%),Ⅲ级 37 例(77.1%);有淋巴结转移 25 例(52.0%),无淋巴结转移 23 例(48.0%)。所有病例术前均未进行放、化疗及内分泌治疗;手术方式为乳腺癌根治切除术或改良根治术;均由术后常规病理证实诊断为浸润性导管癌;关于病理分级及有无淋巴结转移也经由病理确诊;伴有其他部位的原发性肿瘤或转移性肿瘤均未入组。

1.2 试剂

Cx43 多克隆抗体(ZA-0444,即用型)购自北京中杉金桥生物技术公司;E-cad 单克隆抗体(MAB-0589,即用型)及 ElivisionTM Plus 二步法试剂盒、DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组织化学

采用 Elivision 免疫组化法,石蜡切片,常规脱蜡水化;柠檬酸高温高压修复 2 min;3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性 15 ~ 20 min;滴加 I 抗后置 37 ℃水育箱孵育 50 min;按说明先后加增强剂和酶标抗鼠/兔聚合物,分别室温孵育 20 min、30 min;DAB 显色 30 s,苏木素复染,脱水,封片。每批染色均设立以 PBS 代替 I 抗的阴性对照及阳性对照(阳性对照 Cx43 为 Wistar 雄性大鼠心脏,E-cad 用已知的阳性切片)。

1.4 结果判定

Cx43 的判定参考高一菁的方法[1]:着色细胞小于 10%(0 分);10% ~ 40%(1 分);41% ~ 70%(2 分);>70% 为 3 分;着色强度计分:无着色(0 分);淡黄色(1 分);棕黄色(2 分)。两项相乘,总计分 0 ~ 3 分为异常表达(-);4 分以上为正常表达(+)。E-cad 阳性细胞为黄色 - 棕黄色着色。按阳性细胞比例:阳性细胞数 < 10%(0 分),10% ~ 40%(1 分),41 ~ 70%(2 分),>70%(3 分)。按组织的着色强度:不着色(0 分),淡黄色(1 分),黄色(2 分),棕黄色(3 分)。6 分以下为减弱表达(-),6 分以上为正常表达(+)。结果由 2 名正高病理医师独立评分,同一病例评分取平均值作为该病例的最终评分。

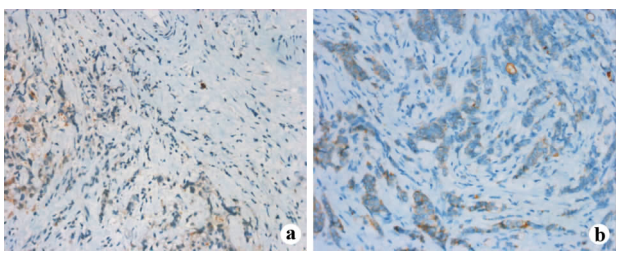
1.5 统计学处理

统计学分析运用 SPSS 19.0 软件,Cx43 与 E-cad 的表达关系分析采用配对计数资料的 McNemar 检验和 Kappa 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cx43 与 E-cad 在浸润性导管癌的表达

在乳腺癌组织中 Cx43 蛋白表达明显下降,随着病理组织学分级的上升而减弱(图 1)。E-cad 在乳腺癌组织中,E-cad 表达胞膜处,少数出现细胞浆异位表达,随肿瘤病理组织学分级的升高,表达减弱甚至缺失(见图 1)。



a:Cx43 蛋白表达明显减弱,少数细胞出现胞核异位表达;b:E-cad 的表达明显减弱

图 1 浸润性导管癌中 III 级 Cx43 及 E-cad 的表达(EP × 100)

2.2 浸润性导管癌 Cx43 与 E-cad 表达的相关性

89 例浸润性导管癌组织中,Cx43 和 E-cad 同时呈阳性表达 31 例,同时呈阴性表达 34 例。采用交叉表卡方检验,$P < 0.001$,具有统计学意义,提示两个基因的表达相关联。经相关性检验求得列联系数 $r = 0.460$($P < 0.001$)。采用 Kappa 分析对两者表达的结果进行一致性检验,求得 $K = 0.510$($P < 0.001$),见表 1。

表 1 Cx43 与 E-cad 蛋白的表达关系

Cx43	E-cad		χ^2	rs
	+	-		
+	31	7	22.312	0.460
-	15	34		

2.3 Cx43 与 E-cad 在乳腺癌 3 区中表达的相关性

48 例乳腺癌手术标本分别检测肿瘤区、交界区及远癌区组织中 Cx43 和 E-cad,分别获得同时呈阳性表达及同时呈阴性表达例数,并计算各组列联系数,采用 Kappa 分析对二者表达的结果进行内部一致性检验,求得 K 值(表 2)。

2.4 Cx43 与 E-cad 共同表达和乳腺癌淋巴结转移的关

肿瘤区及交界区中随着 Cx43 和 E-cad 阴性表达出现,淋巴结转移率逐渐增高,各组间差异有显著统计学意义;远癌区中各组间差异无统计学意义($P = 0.341$),见表 3。

表 2 CX43 与 E-cad 在乳腺癌 3 区中表达的相关性(例)

组别	CX43⁺ E-cad⁺	CX43⁺ E-cad⁻	CX43⁻ E-cad⁺	CX43⁻ E-cad⁻	*P*	*rs*	*K*
肿瘤区	17	5	8	18	0.001	0.421	0.460
交界区	26	4	7	11	0.001	0.447	0.494
远癌区	40	2	3	3	0.001	0.440	0.487

表 3 CX43 与 E-cad 在乳腺癌 3 区中表达与淋巴结转移的相关性[例(%)]

组别	CX43⁺ E-cad⁺	CX43⁺ E-cad⁻ + CX43⁻ E-cad⁺	CX43⁻ E-cad⁻	χ^2	*P*
肿瘤区	3(17.6)	8(61.5)	14(77.8)	13.305	0.001
交界区	8(30.8)	8(72.7)	9(81.8)	10.508	0.005
远癌区	19(47.5)	4(80.0)	2(67.7)	2.154	0.341

3 讨论

在乳腺癌的治疗上,无论是手术方式还是放化疗方案都已日趋成熟[2],但是仍有 50% 左右的患者在治疗后 5 年内出现复发而导致治疗失败。远处转移是乳腺癌患者的主要死因,也是影响乳腺癌预后的主要因素。因此从肿瘤生物学角度认识并寻求更合理、更准确预测转移的检测方法和标志性指标是一研究热点。E-cad 通过介导 Ca^{2+} 依赖性细胞间隙连接形成途径,促进 Cx 向胞膜转运,并引导由 Cx43 聚合的连接子对头铆接成间隙连接通道[3-6]。有研究发现 Cx43 可诱导 E-cad 的表达,并促进其转移到细胞膜,从而加强了细胞间隙连接通讯[7-9]。Bao 等[10]认为钙黏蛋白是 Cx 组配的最主要因素之一,Cx43[11-12] 及 E-cad[13-15] 与乳腺癌转移有关。

本研究通过检测 89 例浸润性导管癌组织发现,Cx43 和 E-cad 的同向表达例数占总病例数的 73.0%(65/89),证实二者在同一标本中的表达确有一定的正相关性。48 例分区取材检测结果提示,Cx43 和 E-cad 在肿瘤区、交界区、远癌区均有一定的相关性和较好的一致性。分区取材的研究结果说明,Cx43 和 E-cad 在肿瘤区、交界区中 Cx43 和 E-cad 共同表达与淋巴结的转移有相关,且当 Cx43 和 E-cad 同时为阴性表达时,淋巴结转移率最高(77.8%),与其它学者研究相仿[16-18]。说明在浸润性导管癌组织中,E-cad 通过调节 Cx43 聚合和转运从而促进了间隙连接的形成;缺乏 E-cad 使肿瘤细胞的间隙连接形成减少,肿瘤细胞也因缺乏间隙连接通信的监控从而易于脱落发生转移。因此我们认为 Cx43 和 E-cad 的表达下降可能是乳腺浸润性导管癌发生和发展过程中的共同事件,联合检测 Cx43 和 E-cad 可作为判断乳腺癌愈后的生物学指标。

[参考文献]

[1] 高一菁,陈 战,李 锐. 连接蛋白 43 和上皮细胞钙黏蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中表达的意义[J]. 中华乳腺病杂志(电子版),2012,6(3):26 - 29.

[2] 蔡新良,郑业华,龚 剑,等. 基于计算机视觉的早期乳腺癌放射治疗一体化摆位系统研究[J]. 局解手术学杂志,2012,21(1):6 - 9.

[3] Alexander DB, Goldberg GS. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels[J]. Curr Med Chem, 2003, 10(19):2045 - 2058.

[4] Berx G, Staes K, Van Hengel J, et al. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1)[J]. Genomics, 1995, 26(2):281 - 289.

[5] Li MW, Mruk DD, Lee WM, et al. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(42):17998 - 18003.

[6] Chakraborty S, Mitra S, Falk MM, et al. E-cadherin differentially regulates the assembly of Connexin43 and Connexin32 into gap junctions in human squamous carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2010, 285(14):10761 - 10776.

[7] Gao FH, Wang Q, Wu YL, et al. c-Jun N-terminal kinase mediates AML1-ETO protein-induced connexin-43 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(2):505 - 511.

[8] Yano T, Yamasaki H. Regulation of cellular invasion and matrix metallo Proteinase activity in Hep G2 cell by connexin 26 transfection[J]. Mol Carcinog, 2001, 31(2):101 - 109.

[9] Govindarajan R, Chakraborty S, Johnson KE, et al. Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(23):4089 - 4107.

[10] Bao B, Jiang J, Yanase T, et al. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly[J]. FASEB J, 2011, 25(1):255 - 264.

[11] Laird DW, Fistouris P, Batist G, et al. Deficiency of Connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors[J]. Cancer Res, 1999, 59(5):4104 - 4110.

[12] 杜俊泽,范林军,齐晓伟,等. MicroRNA-206 可能通过调控 Cx43 表达调节人乳腺癌细胞的转移能力[J]. 第三军医大学学报,2013,3(2):115 - 120.

[13] Dong C, Wu Y, Yao J, et al. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer[J]. J Clin Invest, 2012, 122(4):1469 - 1486.

[14] 李 忠,董 鹏,高默杰,等. 上皮细胞钙粘蛋白与乳腺癌研究进展[J]. 武警医学院学报,2008,17(11):1023 - 1025.

[15] 黄 平,匡久树. 乳腺癌手术治疗后血清 E-cad、CA153 和 VEGF 水平检测的临床意义[J]. 医学信息,2009,12(22):2767 - 2769.

[16] 王晓琳,吕世军. 连接蛋白 43 在乳腺癌组织及癌前病变组织中的表达意义[J]. 肿瘤基础与临床,2010,23(4):292 - 295.

[17] Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, et al. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours[J]. J Pathol, 1998, 184(1):37 - 43.

[18] Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells[J]. J Cell Biol, 1991, 113(1):173 - 185.

(编辑:杨 颖)