基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1502-04

E-cadherin 在胰腺癌中的表达及与血管生成的关系

费 阳[1],刘绪舜[1],王 峰[1],王 伟[1],刘胜利[2]
(1. 解放军第八一医院普通外科,南京 210002;2. 东南大学附属中大医院普通外科,南京 210009)

【摘 要】目的:探讨胰腺癌组织中 E- 钙粘素(E-cadherin)的表达与胰腺癌临床病理特征及预后的关系,及 E-cadherin 在胰腺癌血管生成中的作用。方法:采用免疫组化 Power Vision 法对 49 例胰腺癌组织及癌旁正常胰腺组织的 E-cadherin、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)和 CD34 抗体的表达情况进行检测。结果:胰腺癌组织中 E-cadherin 阳性表达阳性率为 73.5%,癌旁正常胰腺组织阳性率仅为 16.3%,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。E-cadherin 蛋白和 VEGF 蛋白表达呈正相关($P<0.05$);E-cadherin 阳性组的微血管密度(Microvessel density,MVD)值明显高于阴性低表达组($P<0.05$)。E-cadherin 的表达与胰腺癌组织的分化程度、浸润程度、血管侵袭、淋巴结转移及 pTNM 分期呈明显相关($P<0.05$)。E-cadherin 阳性表达组患者的中位生存时间(18.00 ± 3.65)月低于阴性表达组(30.00 ± 8.01)月,阳性表达组的预后显著差于阴性表达组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:E-cadherin 的异常表达可作为评价胰腺癌预后的辅助指标。E-cadherin 可能激活 VEGF 通道,从而诱导胰腺癌血管的生成。

【关键词】胰腺癌;E-cadherin;血管生成;预后
【中国图书分类法分类号】R363.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-15

Expression of E-cadherin in pancreatic carcinoma and its association with angiogenesis

FEI Yang, et al
(*Department of General Surgery, the 81st Hospital of PLA*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the association of E-cadherin expression with the clinicopathologic features, prognosis and angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Methods*: Immunohistochemistry (Power Vision method) were performed to investigate the expression of E-cadherin protein, VEGF protein and CD34 in 49 patients with pancreatic carcinoma. *Results*: Reduced or loss of membranous expression and cytoplasmic localization of E-cadherin protein were found in pancreatic cancer tissues (36/49, 73.5%) by using immunohistochemistry. Moreover there was an positive relationship among E-cadherin protein, VEGF protein and microvessel density expression ($P<0.05$) in pancreatic cancer tissues. Reduced expression of E-cadherin occurred more frequently in poor differentiation ($\chi^2= 8.279$, $P<0.05$), positive lymph metastasis ($\chi^2=4.045$, $P<0.05$), positive vascular invasion ($\chi^2= 4.738$, $P<0.05$), deeper invasion ($\chi^2= 8.653$, $P<0.05$) and advanced stage ($\chi^2= 11.006$, $P<0.05$). Additionally, reduced expression of E-cadherin protein in tumor correlated with a worse prognosis and normal expression with a better survival rate ($P=0.023$). *Conclusion*: The altered expression of E-cadherin can be regarded as an assistant marker in evaluating the prognosis of pancreatic carcinoma. E-cadherin may activate VEGF-channels, and induce the angiogenesis of pancreatic carcinoma.

【Key words】Pancreatic carcinoma; E-cadherin; Angiogenesis; Prognosis

早期侵袭和转移是胰腺癌的重要特征以及预后不良的关键因素。新生血管的形成是胰腺癌侵袭和转移的关键步骤,胰腺癌的早期局部浸润和转移倾向,依赖于周围组织的血供。E- 钙粘素(E-cadherind)是钙依赖的细胞粘附分子,主要分布于非神经上皮,通过组织的胞内肽段蛋白和连环蛋白与细胞骨架肌动蛋白相连而聚集,参与细胞粘附、生长、增殖等过程。研究表明[1]它在肿瘤的侵袭和转移过程中,尤其在血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)通道中诱导血管的生成过程中起着重要的作用。我们采用免疫组化方法检测 49 例胰腺癌组织中 E-cadherin、VEGF 和微血管密度(Microvessel density,MVD)表达变化,旨在探讨 E-cadherin 在胰腺癌发生、发展和血管生成中的作用,及其与胰腺癌临床病理特征之间的关系。

作者介绍:费 阳(1979-),男,硕士,主治医师,
研究方向:肝胆胰肿瘤的诊断与治疗。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 2003 年 01 月至 2006 年 01 月住院患者

手术切除的胰腺癌标本 49 例。术前均未接收抗肿瘤治疗。所有胰腺癌组织标本均经病理学(HE 染色)证实为导管腺癌。标本按照国际抗癌联盟 (UICC) 2002 版关于 TNM 分期系统进行临床分期。正常组织取自距肿瘤边缘 4 cm 以上,并经病理检查排除肿瘤可能的组织标本。取材后迅速置入 -70℃液氮中保存备用。所有病例均有完整的术后随访记录,生存时间的计算从手术日期到由于复发或转移而死亡的日期为止。

1.1.2 试剂 鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体购自 Sigma 公司(工作浓度 1:400),兔抗人 VEGF 多克隆抗体、及鼠抗人 CD34 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,购自北京中杉生物技术有限公司(工作浓度均为 1:100),PowerVision 免疫组化试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

采用免疫组织化学 Power Vision-6000 法。组织标本采用 40 g/L 中性甲醛固定,12 h 后行石蜡包埋后进行连续切片,厚度为 4 μm,每一例组织均做相应的 HE 染色,证实细胞形态和分化程度;烤片后常规二甲苯、梯度乙醇脱腊至水,组织切片行抗原高压热修复。以 0.3%H_2O_2 去离子水孵育 5 min,以阻断内源性过氧化酶,PBS 缓冲液漂洗 3 min × 3 次;滴加一抗,37℃孵育 60 min,PBS 缓冲液漂洗 3 min × 3 次;滴加通用型 IgG 抗体(Fab 段)-HRP 多聚体,37℃孵育 20 min,PBS 缓冲液漂洗 3 min × 3 次;0.04%DAB-0.03% H_2O_2 显色 10 min;蒸馏水冲洗后苏木素复染,再经水洗蓝化、分化、水洗、系列乙醇脱水,树脂封片后观察结果。结果采用双人双盲读片(MVD 以两平均值中较高的数据作为该切片的数据)。

1.3 结果判断

E-cadherin[2]以胞膜和胞浆内出现棕黄色染色为阳性细胞,< 90%的肿瘤细胞染色被判定为 E-cadherin 阴性表达,> 90%的肿瘤细胞染色为 E-cad 阳性表达。VEGF[3] 以肿瘤细胞中出现棕黄色颗粒为阳性,根据细胞染色强度评分 a(0 分:无,1 分:弱,2 分:中,3 分:强);和阳性细胞百分数 b(0 分:无,1 分:1%~25%,2 分:26%~50%,3 分:51%~75%,4 分:76%~100%)确定,a+b>3,为阳性,<3 为阴性。CD34 结果判断及 MVD 计算[4]: 与胰腺癌细胞和其他组织成分有明显区别染成棕黄色细胞或细胞丛作为一个血管,只要结构不相连,分支结构也作为一个血管计算。切片先置于低倍(HPFs × 100)视野下确定最高血管密度区域,然后置于高倍(HPFs × 200)视野下,选择 5 个最高血管密度区域计数(每个视野大小为 0.075 mm^2),再取 5 个区域的平均值。结果以均数 ± 标准差表示。E-cadherin、VEGF 以已证实的阳性表达的结肠癌标本为阳性对照,CD34 以正常血管内皮作为阳性对照,PBS 缓冲液代替一抗作为阴性空白对照。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计分析软件,E-cadherin 的表达与MVD 之间的关系采用 t 检验,E-cadherin 与临床病理因素的关系用检验及 logistic 回归分析,E-cadherin 与 VEGF 表达的关系用 Spearman 秩和检验。生存分析采用 Kaplan - Meier 法,用 Log-rank 检验判断差异性;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 E-cadherin、VEGF 和 MVD 在胰腺癌和癌旁正常胰腺组织中的表达

E-cadherin 主要在胰腺癌细胞质中表达,阳性率为73.5%(36/49),而癌旁正常胰腺组织中 E-cadherin 主要表现为膜连续性表达,阳性率为 16.3%(8/49)(图 1、2)。两者比较差异有统计学意义(P=0.017)。VEGF 在癌旁正常胰腺细胞主要亦为胞膜表达(阳性率为 20.4%,24.5%),在胰腺癌中表达阳性率分别为 67.3%和 81.6%,之间差异均有统计学意义(P=0.006)。CD34 阳性细胞着色部位主要是血管内皮细胞的胞膜和胞浆,胰腺癌中标记的微血管明显多于正常组织(47.21 ± 7.92 vs 16.32 ± 11.15,P=0.018)。

2.2 胰腺癌中 E-cadherin 与 VEGF、MVD 表达的相关性分析

E-cadherin 和 VEGF 蛋白表达呈正相关(P=0.006);E-cadherin 阳性组的 MVD 值明显高于阴性低表达组(P=0.013)(表 1)。

2.3 E-cadherin 在胰腺癌中的表达与临床病理特征的关系

E-cadherin 阳性表达与患者性别和年龄、血清 CEA 和 CA199,胰腺癌病变部位、大小均无关,P > 0.05 (表 2)。在在胰腺癌组织中,E-cadherin 阳性表达与组织分化程度、浸润程度、血管侵袭、淋巴结转移及 pTNM 分期呈明显相关(表 2)。Logistic 逐步回归也显示 E-cadherin 阳性表达与淋巴结转移有关(表 3)。

2.4 E-cadherin 的表达水平与胰腺癌生存率的关系

对 49 例胰腺癌患者进行随访。对 Kaplan-Meier 生存曲线行 Log-Rank 检验分析表明:E-cadherin 阳性表达组患者的中位生存时间(18.00 ± 3.65)月低于阴性表达组(30.00 ± 8.01)月,阳性表达组的预后显著差于阴性表达组,差异有统计学意义(P=0.023)(图 3)。

3 讨 论

Sasaki 等[5]证实 E-cadherin 在食管癌中呈现异常表达,且与患者预后密切相关。Facina 等[6]在乳腺癌的研究中发现 E-cadherin 与肿瘤的组织分化程度、浸润程度、淋巴结转移及 pTNM 分期密切相关。本实验显示,49 例胰腺癌组织中有 36 例表现为 E-cadherin 膜表达缺失,而胞质表达,与文献报道一致。正常胰腺组织中主要分布在细胞膜上,E-cadherin 在胰腺癌中阳性率为 73.5%,两者间差异有统计学意义,提示 E-cadherin 可以抑制胰腺细胞向恶性方向转化,在胰腺癌的发生过程中起负性作用。E-cadherin 的阳性表达与胰腺癌组织分化程度负相关,提示 E-cadherin 对胰腺癌组织学分化有调节作用。E-cadherin 的阳性表达与胰腺癌的浸润程度、血管侵袭、淋巴结转移及 pTNM 分期呈明显正相关,这些结果提示,E-cadherin 在抑制胰腺癌的发展、浸润和转移过程中起重要作用,其在癌组织中膜表达降低可能导致肿瘤具有更强的侵袭转移能力。E-cadherin 阳性表达组的预后显著差于阴性表达组,说明 E-cadherin 可作为评估胰腺癌患者预后

表 1 胰腺癌中 E-cadherin 的表达与 VEGF 及 MVD 的关系

相关蛋白指标	胰腺癌组织中 E-cadherin 的表达		统计学检验值	*P* 值
	阳性	阴性		
VEGF 阳性(n=40)	32	8	8.712*	0.006
VEGF 阴性(n=9)	4	5		
MVD($\bar{x} \pm s$)	49.29 ± 6.86	13.80 ± 2.92	4.896#	0.013

注：* 为 χ^2 检验值，# 为 t 检验值

表 2 E-cadherin 的表达与胰腺癌患者临床病理指标的关系

临床病理指标	E-cadherin 的表达		χ^2 值	*P* 值
	阳性	阴性		
性别			0.313	0.161
男性	25	7		
女性	11	6		
年龄			1.625	0.089
≤60 岁	15	3		
>60 岁	21	10		
CEA			0.271	0.232
≤5 μg/L	14	4		
>5 μg/L	22	9		
CA199			0.272	0.231
≤29 KU/L	11	5		
>29 KU/L	25	8		
肿瘤大小			2.305	0.058
≤2 cm	19	10		
>2 cm	17	3		
分化程度			8.279	0.003
高分化	5	7		
中分化	17	3		
低分化	14	3		
肿瘤位置			0.859	0.113
胰头	24	7		
胰体尾	9	5		
全胰	3	1		
浸润程度			8.653	0.017
T_1	14	5		
T_2	4	6		
T_3	12	1		
T_4	6	1		
血管侵袭			4.738	0.025
阴性	18	2		
阳性	18	11		
淋巴结转移			4.045	0.029
阴性	20	3		
阳性	16	10		
pTNM 分期			11.006	0.002
Ⅰ期	10	6		
Ⅱ期	5	6		
Ⅲ期	13	1		
Ⅳ期	8	0		

表 3 logistic 回归分析 E-cadherin 的表达与胰腺癌患者临床病理指标的关系

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
分化程度	0.081	0.041	3.871	1	0.049	2.588
浸润程度	1.799	0.873	4.251	1	0.039	6.044
血管侵袭	2.006	1.082	6.793	1	0.015	6.287
淋巴结转移	2.589	1.113	7.018	1	0.007	7.212
pTNM 分期	2.196	1.001	6.285	1	0.013	6.470

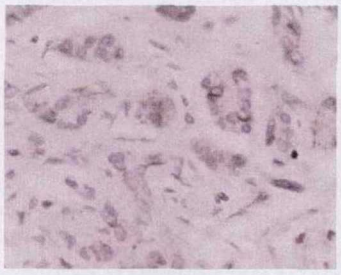


图 1 胰腺癌组织中 E-cadherin 的表达 PV 法 ×400

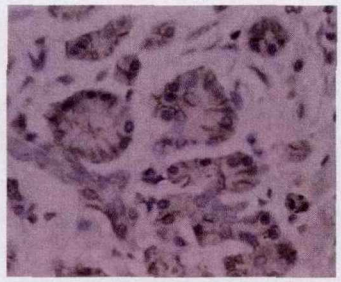


图 2 正常胰腺组织中 E-cadherin 的表达 PV 法 ×400

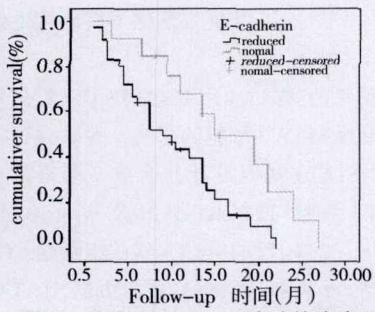


图 3 不同 E-cadherin 表达的胰腺癌患者的生存曲线(Kaplan-Meier 曲线)

的参考指标。

血管形成是一个复杂的过程，包括：①内皮细胞迁移和增殖；②内皮条索形成管腔；③血管重建形成完善的血管网。VEGF 就是通过直接或间接途经来影响上述过程的。而 E-cadherin 参与了 VEGF 诱导的血管新生过程[7]，是 VEGF信号路径一个组成部分。其可能的途经是[8]：E-cadherin 的胞内近膜端与连环蛋白 Arm1～7 重复域与结合形成钙粘素－连环蛋白复合体，触发 E-cadherin 的磷酸化或去磷酸化，激动传导激酶途径，以非胞外信号（p42 和 p44 ERKs）促进 VEGF 与其受体 VEGF-2 的结合，而 VEGF 是活性最强的可溶性血管内皮细胞促有丝分裂素，和血管形成因子，刺激血管的形成；即 E-cadherin 参与了 VEGF 诱导血管新生的过程。本实验结果表明，胰腺癌组织中 E-cadherin 与 VEGF 的表达有明显相关性。E-cad 在复合体中的主要作用是通过控制连环蛋白进入内体溶酶体途径来调节连环蛋白的表达，从而动态调节黏附所需细胞表面连环蛋白的数量。Reynolds 实验室[9]提出了一个模型，细胞表面连环蛋白的转归依赖于 E-cadherin，而且细胞之间的粘附最终受到信号事件控制，很可能通过磷酸化与 E-cadherin 传递信号，以至于动态调节 E-cadherin 与连环蛋白相互作用的亲和力。这也明确了 E-cadheirn 在微血管内皮细胞质膜的粘附特性中起到了调节剂的作用。调节 E-cadheirn 的酪氨酸磷酸化在信号通路是一个关键事件，可以引发粘附连接的改变。E-cadherin 定位于内皮细胞间连接处，参与调节血管屏障功能和血管新生过程中的血管内皮细胞重组，对于血管分支与形态形成也是必要的。Rabascio 等[9]在与血管新生相关的肿瘤中发现，外周血 E-cadRNA 增高，并且当患者完全缓解时就降至正常水平。这也表明了 E-cad 和血管新生的密切关系。

我们的研究证实检测胰腺癌组织中 E-cadheirn 的表达水平可以评价患者的预后，有助于临床筛选高复发转移风险的病例，从而为肿瘤的个体化辅助治疗提供科学的依据。在 VEGF 通道中诱导血管的生成过程中 E-cadherin 起着重要的作用，而 E-cadherin 是否还与其他相关的信号分子有着联系，以及下调的时间、机制、结果也还不是很清楚。有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Kim D Y, Joo J K, Park Y K, et al. E-cadherin expression in early gastric carcinoma and correlation with lymph node metastasis[J]. J Surg Oncol, 2007, 96(32): 429-435.

[2] Torer N T, Kayaselcuk F, Nursal T Z, et al. Adhesion molecules as prognostic markers in pancreatic adenocarcinoma[J]. J Surg Oncol, 2007, 96(32): 419-423.

[3] Ganggaiswari A, Kresno S B, Krisnuhoni E. VEGF expression and *desmoplastic reaction as potential progressive factors in young patients* with colorectal cancer[J]. Acta Med Indones, 2010, 42(16): 6-11.

[4] Bellovin D I, Bates R C, Muzikansky A, et al. Altered localization of E-cadherin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease[J]. Cancer Res, 2005, 65(38): 10938-10945.

[5] Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 21: 158.

[6] Facina G, Lopes-Costa P V, Dos Santos A R, et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin in sclerosing adenosis, ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast[J]. Diagn Cytopathol, 2010, 38(11): 235-238.

[7] Fainaru O, Adini I, Benny O, et al. Doxycycline induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and prevents vascular hyperpermeability[J]. FASEB J, 2008, 22(18): 3728-3735.

[8] Abraham S, Yeo M, Montero-Balaguer M, et al. VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation[J]. Curr Biol, 2009, 28(19): 668-674.

[9] Rabascio C, Muratori E, Mancuso P, et al. Assessing tumor angiogenesis: increased circulating VE-cadherin RNA in patients with cancer indicates viability of circulating endothelial cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(37): 4373-4377.

（责任编辑：关蕴良）