肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0867-03

E-selectin 在大肠癌的表达及其在血行转移中的作用初探

郎伟思,王继见,张杨眉
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究细胞粘附分子 E-selectin 在大肠癌组织中表达及其在大肠癌血行转移中的作用。方法:应用免疫组织化学方法检测大肠癌组织和正常大肠组织 E-selectin 的表达;并利用 Transwell 小室分析人大肠癌细胞株在不同浓度 E-selectin 时的转移能力变化。结果:E-selectin 在大肠癌组织表达的阳性率为 57.5 %,显著高于正常大肠组织的 6.67%($P<0.05$);有远处转移者阳性率 90%显著高于无远处转移者的 46.67%($P<0.05$);随着 E-selectin 浓度升高(1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L),大肠癌细胞穿膜数目增多[(27.2 ± 4.13)、(52.9 ± 3.56)、(100.7 ± 8.15)]。结论:E-selectin 在大肠癌呈高表达并可能在其血行转移中发挥了一定的作用。

【关键词】细胞粘附分子 E-selectin(E- 选择素);大肠癌;转移
【中国图书分类法分类号】R735-34 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-27

Expression of E-selectin in colorectal neoplasm and its role in the metastasis of blood line

LANG Wei-si, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medicial University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the level of cell adhesion molecule E-selectin in colorectal neoplasm and its relations with metastasis in the blood line. *Methods*:E-selectin expression in colorectal carcinoma and normal colorectal tissue were detected with immunohisochemical technique. The change of shift ability of human colorectal neoplasm cell line was analyzed. *Results*: The expressing rate of E-selectin was 57.5%, obviously higher than 6.67% in the normal colorectal tissue($P<0.05$); With the increase in cancentraction of E-selectin (1 μg/L, 5 μg/L and 10 μg/L), the number of intestine cancer cells penetracting the membrane increased large [(27.2 ± 4.13), (52.9 ± 3.56), (100.7 ± 8.15)]($P<0.05$). *Conclusion*: E-selectin in the colorectal neoplasm assumed is highly expressed possibly and plays certain role in the metastasis of blood line.

【Key words】Cell adhesion molecule selectin E(E-selectin); Colorectal neoplasm; Metastasis

转移是恶性肿瘤导致患者死亡的主要原因,转移机制的研究一直是肿瘤学研究的重要方面。分子生物学的研究发现,多种生物大分子在其中扮演重要角色。其中 E-selectin 即是渐受研究者重视的一种粘附分子。新近的研究发现,E-selectin 与多种肿瘤的演进、转移相关。为了解 E-selectin 与大肠癌之间的关系,本文用免疫组化的方法对 40 例大肠癌手术切除标本 E-selectin 表达进行检测;并利用 Transwell 小室分析人大肠癌细胞株在不同浓度 E-selectin 时的转移能力变化,探讨 E-selectin 在大肠癌的表达情况及其在血行转移中的作用。

作者介绍:郎伟思(1976-),男,住院医师,硕士,
研究方向:胃肠外科。
通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:Wangjj1963@163.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 免疫组化材料 重庆医科大学附属第二医院 2007 年 11 月 ~2008 年 5 月大肠癌外科手术切除标本 40 例(所有病例术前均未行化疗、放疗;术前、术后在本院经病理检查确认;所有病例均无重要器官的伴发疾病如:高血压、糖尿病等),其中男 22 例,女 18 例。患者年龄 40~82 岁(平均64.925 ± 10.407)。无远处转移 30 例,有远处转移 10 例(肝转移 6 例,肺转移 3 例,骨转移 1 例),15 例上述患者(随机)标本远离癌组织 10 cm 以上的正常大肠组织作对照。全部病例术前均未行放、化疗。标本经 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,切 4 μm 厚片作免疫组化检测。

1.1.2 侵袭实验材料 大肠癌细胞株 HT-29; Transwell 小室和 24 孔培养板均购于南京凯基生物科技发展公司,E-se-

lectin 购于美国 RD 公司。

1.2 主要试剂

1.2.1 免疫组化试剂 羊抗人 E-selectin 单克隆抗体购于美国 RD 公司;二步法山羊免疫组化检测试剂盒试剂盒购于北京中杉金桥有限责任公司。

1.2.2 大肠癌细胞株的转移能力试剂 DMEM 培养基(高糖,GibcoBRL 公司);小牛血清和小牛血清蛋白 -BSA(Hyclone 公司)。Matrigel(人工细胞基质)购于美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 染色程序按照试剂盒规程进行操作,主要操作步骤为:(1)石蜡切片脱蜡、水化;(2)置枸盐酸缓冲液中微波中火 10 min,抗原修复;(3)磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,每次 2 min;(4)3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性;(5) 加 E-selectin 单抗 1 滴,4℃过夜,用 PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;(6)滴加试剂 1 聚合物辅助剂(Goat Enhancer 即用型),室温下 15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;(7) 滴加试剂 2 辣根酶标记抗山羊 IgG 多聚体(ploy-HRP anti-Goat IgG 即用型),室温下 15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;(8)二氨基联苯胺(DAB)显色,(9)自来水充分冲洗,苏木素复染及中性树脂封片。以 PBS 替代一抗作阴性对照。

1.3.2 Transwell 小室试验 分 E-selectin 1 μg/L、E-selectin 5 μg/L、E-selectin 10 μg/L 3 个不同浓度,以 BSA 10 g/L 对照。选培养板中 4 孔, 每孔培养板分别加含上述不同浓度 E-selectin 的小牛血清培养液 200 μl。将 Matrigel 铺满 4 个 Transwell 小室表面, 在 Transwell 小室中加入 1 ml 的大肠癌细胞株 HT-29 并放入培养板中。置于 37℃,50 ml/L CO_2 孵育箱中培养 12 h,培养结束后,计算下室浸润的大肠癌细胞数(4%多聚甲醛固定 5 min HE 染色,倒置显微镜下计算 5 个视野的肿瘤细胞数)。

1.4 结果判定及统计学处理

1.4.1 免疫组化结果 以棕黄色为阳性信号,以整张切片中阳性染色血管≥5 条为阳性[1]。

1.4.2 统计学处理 免疫组化结果阳性率比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,使用 SPSS11.5 统计软件,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。Transwell 小室试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据比较采用方差分析;使用 SAS9.1 统计软件,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化

大肠癌组织 E-selectin 表达阳性率为 57.5%(图 1 示阳性表达)显著高于 15 例正常大肠组织 E-selectin 表达(1 例阳性,14 例阴性,阳性率 6.67%)(图 2 示阴性表达),二者差异有统计学意义($P<0.05$)。10 例有远处转移者阳性表达率 90%明显高于 30 例无远处转移者 (46.67%), 二者差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 Transwell 小室试验(肿瘤细胞体外侵袭试验)

培养 12 h 后,HT-29 细胞在 BSA 10 g/L 培养基中穿膜细胞数 (13.4±3.11) 图 3 与在 1 μg/L 的 E-selectin 培养基中穿膜细胞数(27.2±4.13)图 4 有明显差异($P<0.05$),而不同浓度的 E-selectin 培养基之间(1 μg/L 的 E-selectin 5 μg/L 的 E-selectin(图 5)10 μg/L 的 E-selectin(图 6)穿膜细胞数随 E-selectin 浓度的增加而增加,并且差异有统计学意义($P<0.05$)。Transwell 小室试验结果见表 2。

3 讨 论

浸润与转移是恶性肿瘤生长的重要特点,同时它也是一个复杂的多步骤过程。现在已经发现,多种粘附分子在中间起重要作用。Selectin 家族即是其中之一。

通过本实验研究发现,E-Selectin 在大肠癌的间质血管内皮细胞上有较高的阳性表达, 阳性率为 57.5%;在正常大肠组织中 E-Selectin 表达的阳性率较低(6.67%),两者具有统计学差异($P<0.05$),可以认为 E-Selectin 在大肠癌组织中呈高表达; 以此推断 E-Selectin 可能反映肿瘤浸润、转移的潜能大小。有研究表明,E-Selectin 的表达与黑色素瘤[2]、肺癌[3]、胃癌[4] 等恶性肿瘤的发展关系密切。与本研究的结果一致。

同时在大肠癌 10 例有远处转移者的阳性表达

表 1 E-selectin 表达

组别	例数	E-selectin 表达(阳性率%)	χ^2	P 值
大肠癌 $_1$	40	23/40(57.50)	$\chi^2_{1,2}=11.461$	<0.01
对照组 $_2$	15	1/15(6.67)		
大肠癌有远处转移 $_3$	10	9/10(90.00)	$\chi^2_{3,4}=4.126$	<0.05
大肠癌无远处转移 $_4$	30	14/30(46.67)		

表 2 Transwell 小室试验结果

分组		穿膜细胞数($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
对照组		13.4 ± 3.11		
E-selectin 的浓度	1 μg/L	27.2 ± 4.13	838.88	<0.001
	5 μg/L	52.9 ± 3.56		
	10 μg/L	100.7 ± 8.15		

注：每两组间比较采用 SNK 法，结果显示差异均有统计学意义。

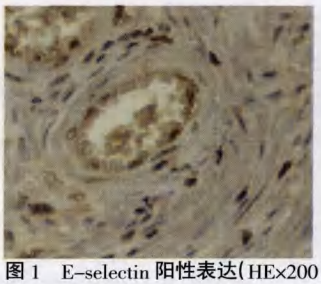


图 1 E-selectin 阳性表达（HE×200）

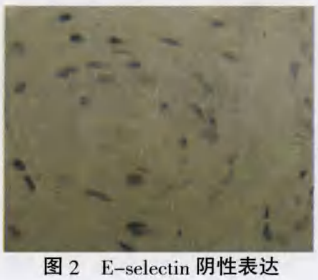


图 2 E-selectin 阴性表达（HE×200）



图 3 HT-29 细胞在 BSA 10 μg/L 培养基中穿膜细胞数（HE×200）

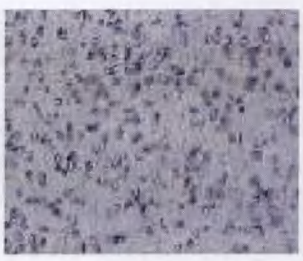


图 4 HT-29 细胞在 E-selectin 1 μg/L 培养基中穿膜细胞数（HE×200）



图 5 HT-29 细胞在 E-selectin 5 μg/L 培养基中穿膜细胞数（HE×200）



图 6 HT-29 细胞在 E-selectin 10 μg/L 培养基中穿膜细胞数（HE×200）

率 90%明显高于 30 例无远处转移者，二者差异有统计学意义（P<0.05），可以认为 E-Selectin 在有远处转移的大肠癌组织中表达明显高于无远处转移者。以此推断 E-Selectin 可能介导大肠癌的血行转移。

另外，在肿瘤细胞体外侵袭实验中发现，培养基中无 E-Selectin 时（即对照组：BSA 10 g/L 培养基中）大肠癌细胞株 HT-29 穿膜细胞数目（13.4±3.11）较少；培养基中有 1 μg/L 的 E-Selectin 时癌细胞穿膜数目明显增多（27.2±4.13），二者相比具有统计学差异（P<0.05）；而不同浓度的 E-Selectin 培养基之间（1 μg/L 的 E-Selectin；5 μg/L 的 E-Selectin；10 μg/L 的 E-Selectin）穿膜细胞数 [(27.2±4.13)；(52.9±3.56)；(100.7±8.15)] 随 E-Selectin 浓度的增加而增加，并且两两比较差异均有统计学意义（P<0.05），可以认为 E-selectin 浓度与大肠癌细胞穿膜能力有关，浓度越高穿膜能力越强，结合 E-Selectin 在大肠癌组织中的高表达和 E-Selectin 在有远处转移者的大肠癌组织中表达明显高于无远处转移者，说明 E-Selectin 有利于大肠癌细胞的远处转移。这也说明 E-Selectin 在大肠癌中表达可以反映肿瘤浸润、转移的潜能大小。Alexiou 等[5]在结肠癌患者的研究中发现，血清 E-Selectin 浓度的升高可以反映结肠癌的进展和转移程度。以上结论与我们的结果一致。

本研究发现 E-Selectin 的表达与大肠癌的血行转移可能有密切联系，提示将来可能通过检测大肠癌组织中 E-Selectin 的表达情况，对大肠癌患者的病情，尤其是肿瘤发生转移的可能性进行评估，指导大肠癌的临床治疗。同时，阻断 E-Selectin 的表达，则可能阻断或部分阻断肿瘤的血行转移，与此有关的研究对肿瘤的临床治疗会很有意义。但这还需大量深入的研究。

综上 E-Selectin 在大肠癌中的表达与远处转移有关；E-Selectin 在大肠癌的血行转移中起重要作用，对预测大肠癌的血行转移有十分重要的意义。

参 考 文 献

[1] 尚培中，谷化平，孙印臣，等. 粘附分子 P 选择素在大肠癌的表达及其意义[J].华北国防医药，2002，14(3)：160-161.

[2] Ma Y Q，Geng J G. Heparan sulfate-like proteoglyca mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow[J]. Immunol，2000，165(1)：558-565.

[3] Li L，Short H J，Qian K X，et al. Characterization of glycoprotein ligands for P-selectin on a human small cell lung cancer cell line NCI-H345 [J]. Biochem Biophys Res Commun，2001，288(3)：637-644.

[4] 陈金联，章月星，储榆德，等. 粘附分子 P 选择素单克隆抗体抑制胃癌转移的实验研究[J]. 中华医学杂志，1998，78(6)：437-439.

[5] A lexiou D，Karayiannakis A J，Syrigos K N，et al. Serum levels of E-selectin，ICAM21 and VCAM21 in colorectal cancer patients：correlations with clinicopathological features，patient survival and tumour surgery [J]. Eur J Cancer，2001，37(18)：2392-2397.

（责任编辑：冉明会）