重庆维普 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)09-1115-03

盘状结构域受体 1 在食管鳞癌组织中的表达

李 超[1,2], 向小勇[1],陈 力[2],沈学远[2],洪 斌[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院心胸外科,重庆 400016;2. 重庆市第二人民医院心胸外科,重庆 400020)

【摘 要】目的:研究食管鳞癌组织盘状结构域受体 1 蛋白表达情况。方法:采用 Western blotting 技术检测 40 例食管鳞状细胞癌肿瘤组织、癌旁组织、相应正常食管组织中 DDR1 蛋白的表达,并探讨与食管癌临床病理特征的关系。结果:DDR1 蛋白在食管鳞癌组织中的表达水平(1.201 ± 0.348)显著高于癌旁(0.640 ± 0.323)及正常食管组织(0.551 ± 0.413),并且其在食管鳞癌组织中的阳性表达率及表达水平与分化程度和淋巴结转移、侵润深度密切相关($P<0.01$)。结论:DDR1 和食管癌的发生与发展可能相关,食管癌出现转移时 DDR1 蛋白表达升高。

【关键词】DDR1 蛋白;食管鳞癌;Western blotting

【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-09

Expression of DDR1 in esophageal squamous cell carcinoma tissue

LI Chao, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of discoidin domain receptor1 (DDR1) protein in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) tissues. *Methods*: The expression of DDR1 protein was detected by Western blotting in 40 cases of ESCC tissues, para-cancer tissues, and matched esophageal normal tissues, and their relation to clinical pathologic characteristics of esophageal cancer was analyzed. *Results*: The expressionof DDR1 in ESCC(1.201 ± 0.348)were significantly higher than those in para-cancer tissues(0.640 ± 0.323)and normal esophageal tissues(0.551 ± 0.413). The positive expression rate and relative content of DDR1 in ESCC were correlated with degrees of differentiation、lymphnode metastasis and invasion depth of carcinoma ($P<0.05$). *Conclusions*: These findings indicate that DDR1 protein may be closely associated with the incidence and development of ESCC. The upregulation of DDR1 is marked during the metastasis of ESCC.

【Key words】 DDR1 protein; ESCC; Western blotting

盘状结构域受体酪氨酸激酶(Discoidin domain receptor tyrosine kinases, DDRs)是一类胶原受体家族,该家族属受体型蛋白酪氨酸激酶(Protein tyrosine kinases, RTKs),在哺乳类有 2 种,分别为 DDR1 和 DDR2,近年来发现 DDR1 是一类可能与肿瘤的侵袭性和转移性相关的 PTKs。研究表明 DDR1 在许多肿瘤细胞中的表达异常,与肿瘤细胞增殖、粘附、侵润转移以及基质重塑有关[1]。我国是食管癌高发生率的地区,其预后较差,主要与其发生侵润转移有关,迄今为止,对食管癌组织 DDR1 蛋白的研究尚未见报道,本研究通过 western blotting 技术测定 DDR1 蛋白在食管鳞癌中的表达,并结合临床资料分析其在食管鳞癌中的表达与临床病理特征之间的关系。

作者介绍:李 超,(1980-),男,医师,硕士,研究方向:心胸外科。

通讯作者:向小勇,男,教授,E-mail:Charliexiang@sina.com.cn。

1 材料和方法

1.1 材料

全部标本均取自重庆医科大学附属第一医院心胸外科在 2007 年 3 月至 8 月行手术切除的食管癌住院患者 40 例,所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史,肿瘤组织经病理学检查证实均为鳞状上皮细胞癌。

1.2 标本处理

全部标本均在手术中收集,取材后速冻于液氮中,并 -80℃超低温冰箱中贮存备用。标本取材大小均约 1cm × 1cm × 0.2cm,肿瘤组织均在原发灶取材,避开坏死、炎症区域;癌旁组织取自相应肿块旁 2cm;远癌组织取自距肿块边缘 5cm 以上的食管组织。

1.3 主要仪器和试剂

重庆维普 http://www.cqvip.com

兔抗人 DDR1 抗体(SANTACRUZE 公司)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉生物技术有限公司(SANTACRUZE 原装)、PVDF 膜购自 Millipor 公司、预染 Marker 购自 Fermentas 公司,脱脂奶粉(Sigma 公司),匀浆器,蛋白裂解液,离心机,酶标仪(ANTHOS ht),电泳仪(Bio-Rad),凝胶成像仪(Bio-Rad 公司),温控摇床(sigma)。

1.4 实验方法

食管癌组织及癌旁组织为实验组,正常食管黏膜组织为对照组。在冰浴中以 RIPA 蛋白裂解液提取蛋白,采用Bradford 法测定蛋白含量,将所有蛋白含量调整为相同浓度。上样后行 8%的 SDS-PAGE 电泳,电泳后将分离胶上的蛋白转移至经甲醛处理过的 PVDF 膜上,用 5%脱脂拉奶粉封闭膜 2h,分别加入适当比例的一抗及兔抗人 β-actin 抗体,40℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10min,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(稀释度 1: 1 500),370C 孵育 1h,TBST 洗膜 3 次,每次 10min。然后以化学发光试剂盒(北京中杉生物技术有限公司)显色,凝胶成像仪采取图像,分子条带为125ku 的位置出现条带为 DDR1 蛋白表达阳性。观察滤膜并摄片。再用 quanity one 分析软件对条带进行分析处理。

1.5 统计学处理

计量资料用均数 ± 标准差表示,采用 SPASS13.0 软件包进行统计分析。以各目的蛋白条带与 β-actin 条带光密度之比来表示 DDR1 的相对表达水平,两组间相对表达水平的比较采用 t 检验,组比较用方差分析,两组间相互比较用 q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 DDR1 的表达

Western blotting 检测,分子条带为 125ku 的位置出现蛋白的条带为 DDR1 表达阳性。检测发现 40例食管癌组织、癌旁组织、对照组中 DDR1 阳性表达分别为 25 例、14 例和 10 例,DDR1 蛋白在在食管鳞癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织及正常食管组织,食管癌组织与对应的癌旁及正常食管粘膜组织之间 DDR1 蛋白表达具有非常显著的差异($P<0.01$),而癌旁及正常食管粘膜组织之间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1 和表 1。

2.2 DDR1 的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

在中、低分化组 DDR1 的表达水平均显著高于高分化组($t=3.7811$,$P<0.01$),有淋巴结转移组 DDR1的表达

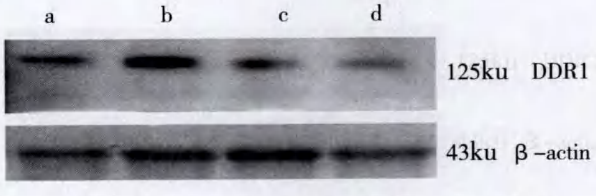


图 1 Western blotting 检测食管癌粘膜 DDR1 蛋白表达(a、b 为癌组,c 为癌旁组,d 为正常粘膜组)

表 1 不同食管鳞癌中 DDR1 表达的比较

组别	n	DDR1($\bar{x}\pm s$)	F 值	P 值
正常组织	40	0.551 ± 0.413		
癌旁组织	40	0.640 ± 0.323[a]	37.51	
食管癌组织	40	1.201 ± 0.348[b,c]		0.000 0

第 2 组与第 1 组比较,[a]$P>0.05$,第 3 组与第 1 组比较,[b]$P<0.01$,第 3 组与第 2 组比较,$P<0.01$

表 2 食管鳞癌组织中 DDR1 蛋白表达水平与临床病理特征的关系

组别		n	DDR1($\bar{x}\pm s$)	F 值	P 值
分化程度	高	13	0.224 ± 0.390		
	中低	27	0.880 ± 0.562	3.781 1	0.000 5
淋巴结转移	无	18	0.759 ± 0.105		
	有	22	1.046 ± 0.147	6.951 7	0.000 0
侵润深度	浅层	23	0.890 ± 0.126		
	深层	17	1.062 ± 0.168	3.717 1	0.000 6

第 2 组与第 1 组比较,$P<0.01$

重庆维普 http://www.cqvip.com

水平为显著高于无淋巴结转移(t=6.951 7, P=0.000 01),侵及食管深层组织中 DDR1 的表达水平也显著高于侵及浅层组(t=3.717 1, P<0.01)。结果及统计学分析见表 2。

3 讨 论

DDR1 基因定位于人的 6P21 和小鼠的 17C,目前共发现 DDR1 共有 5 个异构体 DDR1a、DDR1b、DDR1c、DDR1d、DDR1e,DDR1 在脑内表达丰富,在角蛋白细胞、大肠内膜上皮层、肺上皮细胞、乳腺、肾上腺皮质和甲状腺滤泡均有表达[2]。DDRs 是胶原受体,主要功能是通过调控胶原合成和降解、酶活性,并监控细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)形成,肿瘤局部侵润过程中细胞外基质和基底膜重塑是癌细胞侵袭转移过程中的关键环节[3],在人类 213 个 ECM 相关基因中,DDR1 激动可导致多达 11 个基因表达明显上调或下调[4]。有多个研究组报道,DDR1 在某些肿瘤组织中表达增高[5,6],如在乳腺癌、肺癌、卵巢癌以及其他上皮性肿瘤,其高表达提示在肿瘤发生中可能起作用,说明肿瘤细胞转化后的侵袭和转移特性可能由 DDR1 介导,因为恶性肿瘤细胞突破组织屏障需要破坏胞外基质。

关于 DDR1 与在病理性瘢痕增生的关系报道较多,在实体瘤如肺癌、乳腺癌、头颈部肿瘤等研究中的相关报道也不少[7]。DDR1 受体还可以作为异常增殖细胞侵润的调控者,通过调控胶原—成纤维细胞信号,在调控瘢痕疙瘩胶原过生成方面起重要作用,在瘢痕疙瘩中,DDR1 激动可帮助增殖的细胞突破基质障碍,并避免凋亡[5]。Heinzelmann 等[8]研究发现卵巢癌中 DDR1 蛋白的表达上调是癌细胞侵润发展的一个早期分子事件,其对卵巢癌的早期诊断有潜在的应用价值。Yoshida 等[9]对 52 例垂体腺瘤研究后发现,DDR1 能介导肿瘤细胞的侵袭和粘附力。然而,研究食管癌组织中 DDR1 蛋白表达情况的尚未见报道。本实验检测 DDR1 蛋白在食管鳞癌组织中明显高于癌旁及正常食管粘膜组织,提示食管鳞癌中可能存在 DDR1 表达调控机制的失调,使其表达上升;且在食管鳞癌中组织分化恶性程度越高、伴有淋巴结转移的病例,DDR1 阳性表达越高,说明 DDR1 的阳性表达可预示食管癌有较高的侵袭性的不良预后,因而认为 DDR1 蛋白的高表达可能对食管鳞癌的发生,分化及淋巴结转移有重要影响,可以作为肿瘤诊断、治疗和预后判断的参考指标。基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteina-2,MMP-2)对肿瘤的侵袭和转移起重要作用,Ram 等[10]发现,MMP-2 分子过表达可引起 DDR1 的功能激活,从而可以导致神经胶质瘤细胞粘附侵袭力的增强。在食管癌中 DDR1 与 MMP-2 是否存在共同表达,他们的表达是否具有相关性以及具体的作用机制有待我们进一步研究。

本研究显示,DDR1 可能在食管癌的发生、发展和转移起重要作用,但其参与生理、病理活动的具体过程和机制仍不十分清楚,还有待进一步探讨,这可能将有助于我们揭开肿瘤侵润转移之谜,找到治疗肿瘤转移的有效生物靶点,从而为临床上预防肿瘤转移提供依据。

参 考 文 献

[1] Das S,Ongusaha PP,Yang YS,et al.Discoidin domain receptor1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor-kb pathway activation[J].Cancer Res,2006;66(16):8123-8130.

[2] Abdulhussein R,McFadden C,Fuentes-Prior P,et al. Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor[J]. Biol.Chem,2004;279(30):31462-31470.

[3] 姬立芹,赵纯全,干晓琴.VEGF-C 反义寡核苷酸对卵巢癌细胞 $SKOV_3$ 的粘附、侵袭能力的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007;32(6):610-614.

[4] Vogel WF,Gish GD,Alves F,et al. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen[J]. Molecular Cell, 1997;1(1):13-23.

[5] Chin GS,Lee S,Hsu M,et al.Discoidin domain receptor and their ligand,collagen,are temporally regulated in fetal rat fibroblasts in vitro[J]. Plast Reconstr Surg,2001;107(3):769-776.

[6] Sakamoto O,Suga M,Suda T,et al. Expression of discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase on the human bronchial epithelium [J]. European Respiratory Journal,2001;17(5):969-974.

[7] Vogel WF,Abdulhussein R,Ford CE. Sensing extracellular matrix:an update on discoidin domain receptor function[J].Cellular Signalling,2006;18(8):1108-1116.

[8] Heinzelmann-Schwarz VA,Gardiner-Garden M, Henshall SM, et al. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1,Claudin 3 and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer[J]. Clinical Cancer Research,2004;10(13):4427-4436.

[9] Yoshida D,Teramoto A. Enhancement of pituitary adenoma cell invasion and adhesion is mediated by discoidin domain receptor-1[J]. Neurooncol,2007;82(1):29-40.

[10] Ram R,Lorente G,Nikolich K,et al. Discoidin domain receptor-1a(DDR1a)promotes glioma cell invasion and adhesion in a ssociation with matrix metalloproteinase-2[J]. Journal of Neuro-Oncology, 2006;76(3):239-248.

(责任编辑:冉明会)