

· 临床研究 ·

原发性肾上腺皮质肿瘤组织中间隙连接蛋白 32 和 43 的表达及其临床意义

夏照明¹, 朱陈辉², 万克松², 胡卫列^{2△}

(1. 南方医科大学研究生学院, 广州 510515; 2. 中国人民解放军广州军区广州总医院泌尿外科 510010)

摘要:目的 研究间隙连接蛋白(Cx)32 和 43 在原发性肾上腺皮质肿瘤中的表达, 探讨其在原发性肾上腺皮质肿瘤的临床诊断及预后评估中的价值。方法 应用免疫组化 Novolink™ Polymer 法检测 21 份正常肾上腺组织、45 份肾上腺皮质腺瘤及 14 份肾上腺皮质癌标本中 Cx32、Cx43 的表达水平, 运用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。结果 Cx32 和 Cx43 在肾上腺皮质癌中表达阳性率分别为 21.4% 和 35.7%, 明显低于肾上腺皮质腺瘤中的 68.9% 和 75.6% ($P=0.002, P=0.010$) 及正常肾上腺组织中的 85.7% 和 100% ($P=0.000, P=0.000$); 肾上腺皮质腺瘤中 Cx43 表达的阳性率低于正常肾上腺组 ($P=0.013$)。Cx43 的表达与肾上腺皮质腺瘤患者的预后相关 ($P<0.05$), Cx43 表达越低患者预后越差。在肾上腺皮质癌中, Cx32 和 Cx43 之间的表达呈明显正相关 ($P=0.015$)。结论 联合检测 Cx32 和 Cx43 的表达对鉴别良、恶性肾上腺皮质肿瘤具有重要的参考意义。Cx43 在原发性肾上腺皮质癌组织的表达与患者预后相关, 增加其表达可能改善患者预后。

关键词:肾上腺皮质腺瘤; 肾上腺皮质癌; 连接蛋白类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.013

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)18-1824-03

Expression and clinical significance of Cx32 and Cx43 in primary adrenal cortical tumors

Xia Zhaoming¹, Zhu Chenhui², Wan Kesong², Hu Weilie^{2△}

(1. Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Urology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of connexin 32 and connexin 43 proteins in adrenal tumors. **Methods** The expression of connexin 32 and connexin 43 in 80 specimens including 21 cases of normal adrenal gland, 45 cases of cortex adenoma and 14 cases of cortex adenocarcinoma, were detected by Novolink™ Polymer immunohistochemistry. **Results**

The positive rate of connexin 32 and connexin 43 were 21.4%, 35.7% in cortex adenocarcinoma which were significantly lower than 68.9% and 75.6% respectively in cortex adenoma ($P=0.002, P=0.010$) and it also lower than 85.7% and 100% respectively in normal adrenal gland ($P=0.000, P=0.000$). The positive rate of connexin 43 was 75.6% in cortex adenoma which was significantly lower than 100% in normal adrenal gland ($P=0.013$). The positive expression of connexin 43 was negative correlated with the prognosis of adrenal cortex adenocarcinoma; the lower expression intensity of connexin43, the worse the patients prognosis ($P<0.05$). In cortex adenocarcinoma, the expression of connexin 32 was positive correlated with the expression of connexin 43. **Conclusion** Measurements of connexin 43 and connexin 32 may helpful to distinguish malignant from non-malignant tumors. Expression of connexin 43 is closely correlated to the prognosis of patients, increasing the expression of connexin 43 may improve the patients prognosis.

Key words: adrenocortical adenoma; adrenocortical carcinoma; connexins

脊椎动物的间隙连接(gap junction, GJ)是由不同的间隙连接蛋白(connexin, Cx)构成的细胞连接通道。目前为止,在人体内发现并命名的 Cx 已达 21 种,其介导的细胞间隙连接通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)可在细胞间传递生物信号和能量,从而调控细胞的新陈代谢、增殖和分化,对维持机体的正常功能具有重要作用,近年来国内外研究发现, Cx 表达水平的下降、丧失及异位表达与恶性肿瘤的发生、发展密切相关,而通过转染使 Cx 基因正常表达可以抑制肿瘤的生长、侵袭及转移。已知 Cx32 和 Cx43 在正常肾上腺中均有表达,但 Cx32 和 Cx43 在原发性肾上腺皮质肿瘤方面的研究,国内外少有报道。本研究通过观察 Cx32 和 Cx43 在正常肾上腺组织、肾上腺皮质腺瘤和肾上腺皮质癌组织中的表达,探讨间隙连接蛋白 Cx32 和 Cx43 与原发性肾上腺皮质肿瘤发生、发展的关系及其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 1990 年 4 月至 2010 年 12 月在中国人民解放军广州军区广州总医院经开放或腹腔镜手术切除的 59

例典型的肾上腺肿瘤患者标本,患者均有完整的临床资料和随访结果,术前均未接受化疗及放疗。全部肿瘤标本经病理证实,结合临床资料确定其中肾上腺皮质腺瘤 45 例,肾上腺皮质癌 14 例。正常肾上腺组织标本 21 份,为中国人民解放军广州军区广州总医院泌尿外科尸体肾移植取肾源时所取的肾上腺组织,经 HE 染色证实为正常肾上腺组织。所有组织标本统一采用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,组织切片厚度为 2.5 μm 。本组病例肾上腺皮质腺瘤组中,男 19 例,女 26 例;肾上腺皮质癌组中,男 10 例,女 4 例。肾上腺皮质腺瘤患者除手术治疗外,未加化疗、放疗及其他特殊治疗;肾上腺皮质癌患者随访时间 126~2 319 d,其中死亡 10 例(2 例死于非肿瘤原因),4 例健康存在。

1.2 方法

1.2.1 试剂 Cx32、Cx43 多克隆抗体购自北京博奥生物工程有限公司, Novolink™ Polymer 试剂盒购于北京中衫金桥生物工程有限公司,免疫组织化学采用 Novolink™ Polymer 法, Cx32、Cx43 稀释浓度均为 1:300(稀释剂为一抗稀释液)。

△ 通讯作者, E-mail: Huwl-mr@vip.sina.com.

1.2.2 染色步骤 切片用二甲苯常规脱蜡,梯度乙醇和蒸馏水水化。0.5% H₂O₂ 封闭内源性过氧化酶 10 min,自来水冲洗,蒸馏水冲洗,0.01 mol/L、pH=6.0 的柠檬酸缓冲液进行高温修复抗原 2 min,冷水降温后自然冷却,PBS 冲洗,滴加 RE7102 抑制内源性过氧化酶 5 min,PBS 冲洗 3 次(每次 5 min),滴加一抗 4℃ 冰箱内孵育过夜,PBS 洗 3 次(每次 5 min),滴加一抗后封闭剂(RE7111)孵育切片 30 min,PBS 洗 3 次(每次 5 min),滴加二抗(Novolink™ 聚合物)孵育切片 30 min,PBS 洗 3 次(每次 5 min),二氨基联苯胺(DAB)显色 5 min,自来水洗,蒸馏水洗,苏木精复染 2 min 或不复染,自来水洗。脱水,透明,封片。以 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)代替一抗为阴性对照,分别以已知阳性的正常肝组织、正常肾上腺组织切片作 Cx32 和 Cx43 的阳性对照。

1.2.3 结果判定 分别由两名经验丰富的病理科医师在不知临床和病理资料的情况下独立阅片,光镜下细胞膜或细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞标志。Cx32 和 Cx43 表达结果的判断方法一致,即在高倍镜下随机选择 10 个视野,计数 200 个细胞,计算阳性细胞百分率,阳性细胞数小于 10% 为阴性(-),10%~<25% 为弱阳性(+),25%~<50% 为中等阳性(++),≥50% 的为强阳性(+++)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。率的比较采用四格表的 χ^2 检验,各因素间的相关性用 Spearman 等级相关分析进行,生存分析用 Cox 比例风险回归模型进行。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cx32、Cx43 在各种组织中的表达结果 Cx32、Cx43 主要表达于细胞膜和细胞质内,细胞核内无表达,在正常肾上腺组

织中主要表达于束状带及网状带,球状带较少表达。Cx32 在正常肾上腺组织、肾上腺皮质腺瘤及肾上腺皮质癌组织中的阳性表达率分别为 85.7%、68.9%、21.4%。Cx43 在正常肾上腺组织、肾上腺皮质腺瘤及肾上腺皮质癌组织中的阳性表达率分别为 100%、75.6%、35.7%。Cx32、Cx43 在肾上腺皮质癌组织中的阳性表达率明显低于肾上腺皮质腺瘤及正常肾上腺组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。肾上腺皮质腺瘤中 Cx43 的阳性表达率低于正常肾上腺组织($P<0.05$),肾上腺皮质腺瘤中 Cx32 的阳性表达率与正常肾上腺组织比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见插图 II 图 1、2 及表 1。

表 1 Cx43 和 Cx32 在各种组织中的表达结果(n)

组织类型	n	Cx43				Cx32			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常肾上腺组织	21	0	2	5	14	3	4	2	12
肾上腺皮质腺瘤	45	11	5	13	16	14	4	11	16
肾上腺皮质癌	14	9	3	2	0	11	2	1	0

2.2 Cx32、Cx43 的表达与肾上腺皮质癌患者临床病理的关系 Cx32、Cx 43 与肾上腺皮质癌患者的年龄、性别、肿瘤的临床分期无明显相关性($P>0.05$),见表 2。

2.3 Cx32、Cx43 的表达与肾上腺皮质癌患者预后的关系 14 例肾上腺皮质癌患者死亡 10 例,利用 Cox 回归模型进行多因素生存分析,Cx32 与原发肾上腺皮质癌的预后无关($P>0.05$);Cx43 与原发肾上腺皮质癌的预后有相关性($P<0.05$),Cx43 表达越低,患者预后越差。

表 2 Cx43 和 Cx32 表达结果与临床病理特征的关系

项目	n	Cx43				P	Cx32				P
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
TNM 分期						>0.05					>0.05
T ₁ ~T ₂	11	7	3	1	0		9	2	0	0	
T ₃ ~T ₄	3	2	0	1	0		2	1	0	0	
年龄(岁)						>0.05					>0.05
<48	8	5	0	1	0		6	1	1	0	
≥48	6	4	2	2	0		5	1	0	0	
性别						>0.05					>0.05
男	10	6	2	2	0		8	1	1	0	
女	4	2	2	0	0		3	0	1	0	

2.4 肾上腺皮质癌中 Cx32、Cx43 表达的关系 11 例 Cx32 阴性的肾上腺皮质癌中有 9 例 Cx43 呈阴性,5 例 Cx43 阳性的肾上腺皮质癌中 3 例 Cx32 呈阳性。单因素相关分析结果表明,Cx32 和 Cx43 之间的表达呈明显的正相关($r=0.646, P=0.013$)。

3 讨论

肾上腺皮质癌是一种比较罕见的肾上腺恶性肿瘤,年发病率为 1~2/100 万,40% 的患者在诊断时已有远处转移,从影像学上难以诊断,肾上腺皮质癌的组织结构与形态和肾上腺皮质腺瘤皮质相像,从病理形态及临床表现鉴别肾上腺皮质肿瘤的良好、恶性亦比较困难,因此非常有必要从蛋白水平上对肾上腺皮质肿瘤进行研究,探讨其生物学行为,为临床诊断及治疗提

供理论依据。

GJ 普遍存在于脊椎动物体内,是细胞连接的一种,由相邻细胞膜上的 Cx 构成。GJIC 介导相邻细胞电信号的直接传递,以及营养物质、代谢产物、离子、第二信使、相对分子质量小于 1000 的亲水性物质的交换^[1],GJIC 在胚胎发育、细胞分化和增殖、内环境稳定以及细胞间活动协调等方面具有重要作用。研究证实 Cx 表达异常与肿瘤的增殖、侵袭、转移有密切关系^[2],范松青等^[3]采用组织微阵列与免疫组织化学染色研究发现多种肿瘤存在 Cx 的表达异常。

人的 Cx32 基因定位在 X 染色体 Xp11. q22_上,其相对分子质量为 32×10³,主要表达在正常的肝细胞的细胞膜上,在泌尿系统中也有不同程度表达。Cx32 作为一种抑癌基因在肾

癌的发生、发展、治疗中的作用研究较多^[4],而在肾上腺方面的研究主要集中在动物实验^[5],Willenberg 等^[6]研究发现 Cx32 主要表达于肾上腺皮质区,在肾上腺髓质及肾上腺髓质肿瘤没有表达。本研究发现 Cx32 在肾上腺皮质组织、肾上腺皮质腺瘤,肾上腺皮质癌表达的阳性率分别为 85.7%、68.9%、21.4%,Cx32 在肾上腺皮质癌表达的阳性率明显低于肾上腺皮质腺瘤及正常肾上腺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);Cx32 与肾上腺皮质癌患者的临床分期、性别、年龄以及预后均无相关性($P > 0.05$)。

Cx43 是第一个被克隆的 Cx,其相对分子质量为 43×10^3 ,人的组织中的 Cx43 存在两个基因位点,一个表达基因定位在 6 号染色体上,另一个假基因(pseudogene)定位在 5 号染色体上。Cx43 是 Cx 中研究最多的一种蛋白,Cx43 在膀胱移行细胞癌^[7]、非精原细胞瘤^[8]、子宫内膜癌^[9]、胃癌^[10]等恶性肿瘤的下调表达已有报道。Murry 等^[11]研究发现 Cx43 主要表达于肾上腺皮质的网状带及束状带,在肾上腺髓质没有表达或微弱表达,Cx43 在肾上腺皮质癌表达的阳性率明显低于肾上腺皮质腺瘤及正常肾上腺组织。本研究发现 Cx43 在肾上腺皮质组织、肾上腺皮质腺瘤及肾上腺皮质癌表达的阳性率分别为 100%、75.6%、35.7%,Cx43 在肾上腺皮质癌表达的阳性率明显低于肾上腺皮质腺瘤及正常肾上腺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$);生存分析显示,Cx43 与肾上腺皮质癌患者的预后相关($P < 0.05$),Cx43 表达的阳性率越低,患者的预后越差。

大量研究表明,Cx 异常表达和 GJIC 功能缺陷与多种肿瘤的恶性增殖和转化密切相关。近年来,利用基因敲除及负显性抑制技术(dominant negative)阻断 Cx 基因的表达,导致细胞失去对生长的控制,从而形成肿瘤,因此 Cx 家族基因也被认为是肿瘤抑制基因^[12]。Cx 抑制肿瘤发生的机制目前尚不明确,McLanhan 等^[13]研究发现增加 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 Cx26、Cx43 的表达可以抑制肿瘤的发生。Langlois 等^[14]研究发现 Cx43 抑制肿瘤的发生与小凹蛋白(caveolin-1)密切相关。目前研究还发现 Cx 的强制表达可以使得 N-粘蛋白表达下降及增加 MDA-MB-43 乳腺癌细胞对凋亡的敏感性,从而抑制肿瘤转移^[15]。作者推测 GJ 减少或者丧失使机体的调控信息不能有效传递到细胞,细胞间信号得不到交换,细胞内环境失衡,细胞功能异常等,这一系列变化导致细胞无限制增殖,从而导致肿瘤的发生。

本实验采用免疫组化的方法对肾上腺皮质肿瘤中 Cx32、Cx43 的表达进行初步的研究,并将 Cx32、Cx43 的表达与患者临床资料进行了统计学分析,研究结果显示 Cx32、Cx43 与肾上腺肿瘤的发生、发展有一定的关系,二者之间呈正相关,其相互作用的机制有待进一步研究。本研究提示临床中联合检测肾上腺肿瘤组织中 Cx32、Cx43 的表达对鉴别肾上腺皮质肿瘤的良、恶性有一定的参考价值,检测肾上腺皮质癌中 Cx43 的表达对判断患者的预后有一定的指导意义。

参考文献:

[1] Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 228-232.
 [2] Pointis G, Fiorini C, Gilleron J, et al. Connexins as precocious markers and molecular targets for chemical and pharmacological agents in carcinogenesis[J]. *Curr Med*

Chem, 2007, 14(21): 2288-2303.

- [3] 范松青,周鸣,向秋,等. 细胞间隙连接蛋白在多种类型癌组织中的原位表达研究[J]. *癌症*, 2003, 22(7): 686-690.
 [4] Sato H, Hagiwara H, Ohde Y, et al. Regulation of renal cell carcinoma cell proliferation, invasion and metastasis by connexin 32 gene[J]. *J Membr Biol*, 2007, 216(1): 17-21.
 [5] King TJ, Lampe PD. Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(5): 669-680.
 [6] Willenberg HS, Schott M, Saeger W, et al. Expression of connexins in chromaffin cells of normal human adrenals and in benign and malignant pheochromocytomas[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1073(8): 578-583.
 [7] 曾向阳,吴传璋,罗志刚,等. 间隙连接蛋白 Cx26 Cx43 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(5): 713-717.
 [8] Steiner M, Weipoltshammer K, Viehberger G, et al. Immunohistochemical expression analysis of Cx43, Cx26, c-KIT and PIAP in contralateral testis biopsies of patients with non-seminomatous testicular germ cell tumor[J]. *Histochem Cell Biol*, 2011, 135(1): 73-81.
 [9] Wincewicz A, Baltaziak M, Kanczuga-Koda L, et al. Aberrant distributions and relationships among E-cadherin, beta-catenin, and connexin 26 and 43 in endometrioid adenocarcinomas[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2010, 29(4): 358-365.
 [10] Tang B, Peng ZH, Yu PW, et al. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric Cancer and metastatic lymph nodes[J]. *Med Oncol*, 2011, 28(2): 502-508.
 [11] Murray SA, Davis K, Fishman LM, et al. Alpha1 connexin 43 gap junctions are decreased in human adrenocortical tumors[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(2): 890-895.
 [12] Trosko JE, Tai MH. Adult stem cell theory of the multi-stage, multi-mechanism theory of carcinogenesis: role of inflammation on the promotion of initiated stem cells[J]. *Contrib Microbiol*, 2006, 13(2): 45-65.
 [13] McLachlan E, Shao Q, Wang HL, et al. Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(20): 9886-9894.
 [14] Langlois S, Cowan KN, Shao Q, et al. The tumor-suppressive function of Connexin 43 in keratinocytes is mediated in part via interaction with caveolin-1[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 4222-4232.
 [15] Li Z, Zhou Z, Welch DR, et al. Expressing connexin 43 in breast Cancer cells reduces their metastasis to lungs[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(8): 893-901.