

· 临床研究 ·

食管癌组织中 PTEN、E-cadherin 的表达及其与淋巴结转移的关系*

李昌秀¹, 罗治彬^{1△}, 曹友德², 徐红梅¹, 杨达荣¹, 杨 柳¹, 吴时军¹, 张 黎¹

(1. 重庆市合川区人民医院病理科 401520; 2. 重庆医科大学病理学教研室 400016)

摘要:目的 探讨第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶和张力蛋白基因(PTEN)与 E-钙黏蛋白(E-CD)在食管癌及其癌前病变中的表达及意义。方法 采用免疫组化分别检测重庆市合川区人民医院 2005~2011 年活检标本的非典型增生 150 例(轻、中、重度各 50 例)及 60 例食管癌组织中的表达情况及相互关系。结果 在中度非典型增生、重度非典型增生及食管癌中 PTEN 及 E-CD 的阳性表达率明显低于与正常食管组织, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 有淋巴结转移组 PTEN 阳性表达率(22.22%)和 E-CD 阳性表达率(8.33%)明显低于无淋巴结转移组中 PTEN(75.00%)及 E-CD(83.33%)的表达($P < 0.05$); PTEN 与 E-CD 的表达呈正相关性($r = 0.579, P < 0.01$), 并且 PTEN 及 E-CD 与淋巴结转移呈负相关($P < 0.01$)。结论 PTEN 与 E-CD 可能参与食管癌的发生且影响癌细胞转移; 食管癌中 PTEN 与 E-CD 的表达存在一定的相关性, 可能有相互和(或)协同作用; 联合检测 PTEN 与 E-CD 有望成为食管癌早期诊断、评估生物学行为及预后的重要生物学指标。

关键词:食管肿瘤; 第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶和张力蛋白基因; 钙黏着糖蛋白类; 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)34-3594-03

The expression of PTEN and E cadherin in esophageal carcinoma and their correlation with lymph node metastasis*

Li Changxiu¹, Luo Zhibin^{1△}, Cao Youde², Xu Hongmei¹, Yang Darong¹, Yang Liu¹, Wu Shijun¹, Zhang Li¹

(1. Department of Pathology, People's Hospital of Hechuan District, Hechuan, Chongqing 401520, China;

2. Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10(PTEN) and E-cadherin(E-CD) in the esophageal carcinoma and its precancerous lesion. **Methods** The expression and interrelation of PTEN and E-CD was evaluated in 50 cases of mild atypical hyperplasia and 50 case of moderate atypical hyperplasia and 50 cases of severe atypical hyperplasia and 60 cases of esophageal carcinoma by immunohistochemical staining methods. **Results**

The positive rates of PTEN and of E-CD were significantly weaker in moderate atypical hyperplasia and severe atypical hyperplasia and esophageal carcinoma than those in normal squamous cell of esophagus($P < 0.01$). The positive rates of PTEN and E-CD (22.22%, 8.33%) in the lymph node metastasis group respectively were significantly lower than those(75.00%, 83.33%) in the non lymph node metastasis group($P < 0.05$). The expression of PTEN was positively correlated with E-CD($r = 0.579, P < 0.01$). And the expression of PTEN and E-CD was negatively correlated with lymph node metastasis($P < 0.01$). **Conclusion** PTEN and E-CD may play an important role in esophageal carcinoma development and lymph node metastasis. A positive correlation is found between the expression of PTEN and E-CD in esophageal carcinoma. There may be an interaction or synergic action between PTEN and E-CD. Expressions of PTEN and E-CD might be helpful in early diagnosis and evaluation of the biological behavior and prognosis of esophageal carcinoma.

Key words: esophageal neoplasms; PTEN; cadherins; immunohistochemistry

食管癌是中国高发的恶性肿瘤,其病因和发病机制尚不明确,可能与原癌基因激活、抑癌基因失活以及细胞凋亡相关基因-肿瘤转移抑制基因异常等有关。因此,加强对食管癌特异的分子病理学变化的研究,不仅有助于阐明其发生、发展机制,更有利于指导临床治疗。第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶和张力蛋白基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)是具脂质磷酸酶活性的抑癌基因^[1]。而 E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-CD)是一种依赖 Ca 的细胞间黏附分子,是维持正常上皮完整性和极性的跨膜糖蛋白。两者在肿瘤的发生及转移方面起着重要作用。本研究选择正常食管黏膜、非典型增生的活检标本及食管癌切除的石蜡标本,分别检测 PTEN、E-CD 在其组织中的表达情况及相互关系,以期探索食管癌基因治疗的有效靶基因提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 收集重庆市合川区人民医院 2005~2011 年活检

标本的非典型增生 150 例(轻、中、重度各 50 例)及食管癌根治切除的石蜡标本 60 例。癌旁正常黏膜组织 40 例。60 例食管癌组织标本经病理组织学证实为鳞状细胞癌,术前均未行放疗及化疗。其中男 38 例,女 22 例;年龄 46~79 岁,平均(63.4±7.6)岁;有淋巴结转移 36 例,无淋巴结转移 24 例。

1.2 主要试剂及方法 PTEN 单克隆抗体、E-CD 单克隆抗体、SP 试剂盒及 DAB 显色液均购自福建迈新生物工程有限公司。组织经 10% 甲醛固定,4 μm 连续石蜡切片。采用 SP 免疫组化染色法,按照 SP 检测试剂盒说明书的步骤操作。

1.3 结果的判定 参照许良中等^[2]的资料,综合考虑切片中阳性细胞占所观察同类细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两项指标,半定量判断结果。PTEN 及 E-CD 免疫组化的观察,先在低倍镜下选取最强着色区,然后选 10 个高倍镜视野(×400),分别记数 100 个细胞,其颜色深浅参考文献评分:胞质或胞膜上无棕黄色颗粒为 0 分、淡黄色为 1 分、棕黄色为 2 分、

表 1 PTEN 及 E-CD 在食管癌及非典型增生中的表达

项目	n	PTEN			E-CD		
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
正常食管组织	40	37	3	92.50	36	4	90.00
非典型增生							
轻度	50	39	11	78.00	41	9	82.00
中度	50	36	14	72.00 [△]	40	10	80.00 [△]
重度	50	28	22	56.00*	27	23	54.00*
食管癌	60	26	34	43.33*	23	37	38.33*

*: $P < 0.01$, Δ : $P < 0.05$, 与正常食管组织比较。

表 2 PTEN 及 E-CD 在食管癌中的表达与临床病理的关系

项目	n	PTEN(+)	PTEN(-)	χ^2	r	E-CD(+)	E-CD(-)	χ^2	r
性别									
男	38	17	21	0.078	0.036 [△]	16	22	0.618	0.101 [△]
女	22	9	13			7	15		
年龄(岁)									
≥ 60	44	19	25	2.574	0.203 [△]	17	27	0.060	0.032 [△]
< 60	16	7	9			6	10		
分化程度									
高分化	19	13	6	7.176	0.327*	12	7	7.608	0.335*
中分化	15	6	9			5	10		
低分化	26	7	19			6	20		
淋巴结转移									
有	36	8	28	30.110	0.584*	3	33	34.200	0.603*
无	24	18	6			20	4		
E-CD 的表达									
阳性	23	20	3	28.900	0.579*				
阴性	37	6	31						

*: $P < 0.01$, Δ : $P > 0.05$, 与正常食管组织比较。

棕褐色为 3 分。染色细胞所占百分比打分: 无阳性细胞为 0 分、1%~10% 为 1 分、11%~50% 为 2 分、 $\geq 51\%$ 为 3 分。两项乘积得分 ≥ 3 分定为阳性, 其中 3~4 分(+), 5~7 分(++), 8~9 分(+++)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行分析, 计数资料进行 χ^2 检验; 两个变量相关性分析采用双变量相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN 及 E-CD 在食管癌及非典型增生中的表达

PTEN 在正常食道鳞状上皮中表达于细胞核, 为强表达(封 2 图 1)。PTEN 的阳性表达率在轻、中、重度非典型增生和食管癌中的表达分别为 78.00%、72.00%、56.00%、43.33%, 显著低于正常食管组织的表达(92.5%), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。且 PTEN 在非典型中的表达强弱与分级有关, 并随着分级的升高而减弱, 鳞癌中表达减弱至无表达, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。E-CD 在正常食道鳞状上皮中表达于细胞膜(封 2 图 2)。E-CD 的阳性表达率在轻、中、重度非典型增生和食管癌中的表达分别为 82.00%、80.00%、54.00%、38.33%。重度非典型增生及食管癌中 E-CD 的表达显著低于正常食管

组织的表达(90.00%), 差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 PTEN 及 E-CD 在食管癌中的表达与临床病理的关系 在 E-CD 阳性的 23 例食管癌患者中, 有 20 例 PTEN 阳性, 而在 E-CD 阴性的 37 例中有 31 例 PTEN 表达阴性, 两者呈正相关性($r = 0.579, P < 0.01$)。淋巴结转移与 PTEN($r = -0.584, P < 0.01$)、E-CD($r = -0.603, P < 0.01$)的表达呈负相关。分化程度与 PTEN($r = 0.327, P < 0.01$)、E-CD($r = 0.335, P < 0.01$)的表达无明显相关。而两者在食管癌中的表达与患者的性别及年龄无相关性($P > 0.05$), 见表 2。

3 讨论

PTEN 基因表达的蛋白具有蛋白磷酸酶及脂质磷酸酶双重活性, 可使磷脂酯肌醇-3-激酶(PI3k)去磷酸化, 阻止 PI3k/丝苏氨酸蛋白激酶(Akt)途径, 使细胞生长阻滞至 G₁ 期, 从而发挥调控细胞周期的作用。众多研究结果表明, 抑癌基因 PTEN 编码的蛋白是具有磷酸酶活性的抑癌蛋白, 其在众多恶性肿瘤中存在突变、缺失或低表达, 导致其抑癌功能减弱或丧失^[3-4]。Hafsi 等^[5]发现, PTEN 的过甲基化导致 PTEN 低水平转录及 PTEN 蛋白的减少甚至缺失, 从而引起胃肠道上皮过度增生进而形成肿瘤。本研究结果显示, PTEN 的阳性表达

率在中、重度非典型增生和食管癌中的表达分别为 72.00%、56.00%、43.33%，显著低于正常食管组织的表达(92.5%)，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与冷雪芹等^[6]研究结果一致，说明 PTEN 基因的失活或缺失在食管癌的癌变过程中起到重要作用。宿主细胞基因突变导致磷酸酶及下游调节酶活性改变，细胞凋亡受到抑制，细胞无限制增殖形成肿瘤。同时，本研究结果显示有淋巴结转移组 PTEN 蛋白表达明显低于无淋巴结转移组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Ettl 等^[7]研究结果一致，笔者推测 PTEN 蛋白可能对肿瘤细胞的迁移有抑制作用，是食管癌转移的负相关因子。

E-CD 是钙黏附蛋白家族中的一种同质型钙依赖型跨膜糖蛋白。当 E-CD 表达下降或缺失时，细胞的黏附能力下降，可促进癌细胞侵袭和转移，表明 E-CD 是一种抗侵袭分子。Saad 等^[8]研究表明，E-CD 缺失或低表达可以成为预测胃癌疾病进展、淋巴结转移及预后评估的有效指标，甚至可以作为肿瘤转移的一个标志物。Khamis 等^[9]在前列腺癌组织中发现，E-CD 的表达明显低于在良性前列腺增生及 PIN 中的表达，推测 E-CD 蛋白表达丢失可能是肿瘤的早期事件。本研究结果也显示，E-CD 在中度非典型增生(80.00%)、重度非典型增生(54.00%)及食管癌(38.33%)中的阳性表达率显著低于正常食管组织(87.5%)，差异有统计学意义($P < 0.01$)。食管癌发生早期 E-CD 基因就已经发生改变，并随肿瘤的进展最终完全消失，致使维持细胞间紧密连接、聚集的黏附系统功能丧失，促使细胞恶性转化、增殖和分化失控及侵袭转移能力增强。本实验也发现淋巴结转移组中食管癌 E-CD 表达明显低于无淋巴结转移组，差异有统计学意义($P < 0.01$)。

近年来，关于 PTEN 及 E-CD 影响肿瘤生物学机制的研究多有报道，较为普遍的是 PI3K/Akt 通路。PI3K 的产物三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)与细胞内含有 pH 结构域的 Akt 和蛋白激酶 1(PDK1)结合后激活 Akt，而 PTEN 能够使 PIP3 去磷酸化，而负调控 PI3K/Akt 通路^[10]。已有研究报道，在多种恶性肿瘤(如恶性黑色素瘤、卵巢癌^[11]等)中发现 PTEN 与 E-CD 呈密切正相关，且 PTEN 通过 PI3K/Akt 途径调节 E-CD 的表达，从而影响肿瘤细胞的黏附能力及转移。而且 Kim^[12]在恶性黑色素瘤中通过 PTEN RNAi 使 RAS 基因激活引起 E-CD 降低导致肿瘤细胞转移。本研究结果显示，在食管癌组织中 E-CD 与 PTEN 的表达呈正相关性($r = 0.579$, $P < 0.01$)。但是 Fournier 等^[13]在用 E-CD 抗体阻断乳腺腺泡结构的极性和细胞间的连接的同时发现内源性 PTEN 蛋白也减少，细胞间 PTEN 蛋白的聚集量也降低。相反，在缺乏内源性 E-CD 的 Skbr-3 乳腺细胞株中导入 E-CD 基因后细胞中 PTEN 的表达增加，细胞间相互作用增强。说明 E-CD 可以通过某种途径调节 PTEN 的表达。同样 Li 等^[14]通过敲除乳腺癌细胞株的 E-CD 基因后导致 PTEN 的表达下降，而且发现过表达 E-CD 的细胞株中 PTEN 蛋白的增加是由于 E-CD 使蛋白酶体依赖的 PTEN 降解途径受损，增强了 PTEN 的稳定性而不是增强了 PTEN 基因的转录。这就解释了为什么 E-CD 低表达的乳腺癌细胞的增殖快而且易于转移。

总之，本研究发现从食管癌的发生到转移，PTEN 及 E-CD 的表达呈现减少趋势，且 PTEN 与 E-CD 存在呈正相关，联合检测 PTEN 与 E-CD 有望成为食管癌早期诊断、评估生物学行

为及预后的重要生物学指标。但是 PTEN 与 E-CD 的相互作用和(或)协同作用的作用机制还未明确，有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Sulis ML, Parsons R. PTEN: from pathology to biology [J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(9): 478-483.
- [2] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231.
- [3] Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, et al. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients [J]. Ann Oncol, 2009, 20(1): 84-90.
- [4] Neto JC, Ikoma MM, Carvalho KC, et al. MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer [J]. Exp Mol Pathol, 2011, 92(1): 20-26.
- [5] Hafsi S, Pezzino FM, Candido S, et al. Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance [J]. Int J Oncol, 2012, 40(3): 639-644.
- [6] 冷雪芹, 李慧娥, 贾慧琼, 等. 食管鳞癌 PTEN 表达的研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(17): 11-13.
- [7] Ettl T, Baader K, Stiegler C, et al. Loss of PTEN is associated with elevated EGFR and HER2 expression and worse prognosis in salivary gland cancer [J]. Br J Cancer, 2012, 106(4): 719-726.
- [8] Saad AA, Awed NM, Abd Elkerim NN, et al. Prognostic significance of E-cadherin expression and peripheral blood micrometastasis in gastric carcinoma patients [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(11): 3059-3067.
- [9] Khamis ZI, Iczkowski KA, Sang QX, et al. Metastasis suppressors in human benign prostate, intraepithelial neoplasia, and invasive cancer: their prospects as therapeutic agents [J]. Med Res Rev, 2011, 16: 1.
- [10] Qiao M, Sheng S, Pardee AB. Metastasis and AKT activation [J]. Cell Cycle, 2008, 7(19): 2991-2996.
- [11] Lau MT, Klausen C, Leung PC, et al. E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via β -catenin-Egr1-mediated PTEN expression [J]. Oncogene, 2011, 30(24): 2753-2766.
- [12] Kim M. Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis [J]. Small Gtpases, 2010, 1(3): 161-164.
- [13] Fournier MV, Fata JE, Martin KJ, et al. Interaction of E-cadherin and PTEN regulates morphogenesis and growth arrest in human mammary epithelial cells [J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4545-4552.
- [14] Li Z, Wang L, Zhang W, et al. Restoring E-cadherin-mediated cell-cell adhesion increases PTEN protein level and stability in human breast carcinoma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(1): 165-170.