

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.27.005

E-cad、Ep-CAM 在头颈部腺样囊性癌中表达的临床意义*

李雷激¹,张迪¹,覃纲¹,向兰¹,刘跃华¹,祝琳¹,骆文龙²

(1. 泸州医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科,四川泸州 646000;

2. 重庆医科大学附属第二医院耳鼻咽喉头颈外科 400016)

[摘要] **目的** 研究细胞黏附分子(CAM)上皮性钙黏连蛋白(E-cad)、上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)在头颈部腺样囊性癌(ACC)中的表达情况,探讨其在头颈部 ACC 发生、发展及侵袭转移中的作用。**方法** 应用免疫组织化学 EnVision 法检测 60 例头颈部 ACC 及 30 例正常腺体组织中 E-cad、Ep-CAM 的表达情况,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对免疫组织化学结果进行分析。**结果** E-cad 在头颈部 ACC 中的表达低于正常腺体组织($P<0.05$),Ep-CAM 在头颈部 ACC 中的表达高于正常腺体组织($P<0.05$);E-cad 在头颈部 ACC 组织中的相对低表达分别与 ACC 的病例分型、临床分期、有无神经症状及有无复发转移有关($P<0.05$);Ep-CAM 在头颈部 ACC 组织中的高表达分别与 ACC 的病例分型、临床分期、有无神经症状及有无复发转移有关($P<0.05$)。E-cad 与 Ep-CAM 在头颈部 ACC 中的表达呈负相关关系($r=-0.890, P=0.000$)。**结论** E-cad 可能具有抑制头颈部 ACC 发生、发展的作用,Ep-CAM 在头颈部 ACC 中表达越高,提示头颈部 ACC 恶性程度越高。

[关键词] E-cad;Ep-CAM;腺样囊性癌;免疫组织化学**[中图分类号]** R739.65**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)27-3759-03**Expression of E-cad and Ep-CAM in head and neck adenoid cystic carcinoma and its clinical significance***Li Leiji¹, Zhang Di¹, Qin Gang¹, Xiang Lan¹, Liu Yuehua¹, Zhu Lin¹, Luo Wenlong²

(1. Department of Otolaryngology Affiliated Hospital of Luzhou Medical

College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of E-cad, Ep-CAM in head and neck ACC and clarify its role and in the malignant progress, invasion and metastasis of ACC. **Methods** The expression of E-cad and Ep-CAM in 60 cases of head and neck ACC specimens and 30 cases of normal gland tissues were detected by immunohistochemistry EnVision method. The result of immunohistochemistry was conducted by the Image-Pro Plus 6.0 image analysis system. **Results** The expression of E-cad in head and neck ACC was statistically significant lower than that in normal gland tissue ($P<0.05$). The expression of Ep-CAM in head and neck ACC was statistically significant higher than that in normal gland tissue ($P<0.05$). The decreasing expression of E-cad in head and neck ACC was closely related to the different pathological patterns, clinical stages, neurological symptom and local recurrences or distant metastases ($P<0.05$). The high expression of Ep-CAM in head and neck ACC was closely related to the different pathological patterns, clinical stages, neurological symptoms and local recurrences or distant metastases ($P<0.05$). There was a negative correlation about the expression between E-cad and Ep-CAM in head and neck ACC ($r=-0.890, P=0.000$). **Conclusion** E-cad may act as a inhibitor in the occurrence and development of ACC. The higher expression of Ep-CAM in head and neck ACC showed that ACC had a more poorer prognosis.

[Key words] E-cad; Ep-CAM; adenoid cystic carcinoma; immunohistochemistry

腺样囊性癌(ACC)是常发生在大小涎腺的恶性肿瘤之一,约占所有头颈部肿瘤的2%~4%^[1]。其突出的特点是肿瘤生长缓慢,患者可长期带瘤生存,易局部复发、嗜神经侵袭和远处转移,但少有区域淋巴结转移,且远处转移的发生与原发部位的肿瘤是否控制无关^[2]。肿瘤侵袭与转移发生的基础是肿瘤细胞的黏附与去黏附,细胞黏附分子(CAM)正是介导这一系列黏附与去黏附的重要信号转导分子。本实验旨在检测上皮性钙黏连蛋白(E-cad)、上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)在头颈部 ACC 中的表达,揭示其在头颈部 ACC 发生、发展及侵袭转移中的作用及相关性。

1 材料与方**1.1 临床标本** 收集四川医科大学附属第一医院 2004 年 1

月至 2009 年 1 月住院治疗的 60 例头颈部 ACC 患者临床资料,并予以随访。收集病理科同期正常腺体组织 30 例(来源于因腺体的良性肿瘤或增生行腺体浅叶或全部切除术后的标本)作为对照。

1.2 免疫组织化学方法 病理科石蜡组织块,3 μm 切片,常规脱蜡水化,抗原修复(E-cad 用 Tris/EDTA 修复液, pH 9.0; Ep-CAM 用柠檬酸盐缓冲液, pH 6.0),灭活内源性过氧化物酶,滴加一抗(鼠抗人 E-cad 单克隆抗体稀释度为 1:100;鼠抗人 Ep-CAM 单克隆抗体为工作液不稀释直接滴加),滴加 En-Vision 二抗, DAB 显色,苏木素复染,脱水透明封片。

1.3 指标分析 对 E-cad、Ep-CAM 的免疫组织化学染色结果进行定位观察及图像采集。每张切片随机选取 5 个不重叠

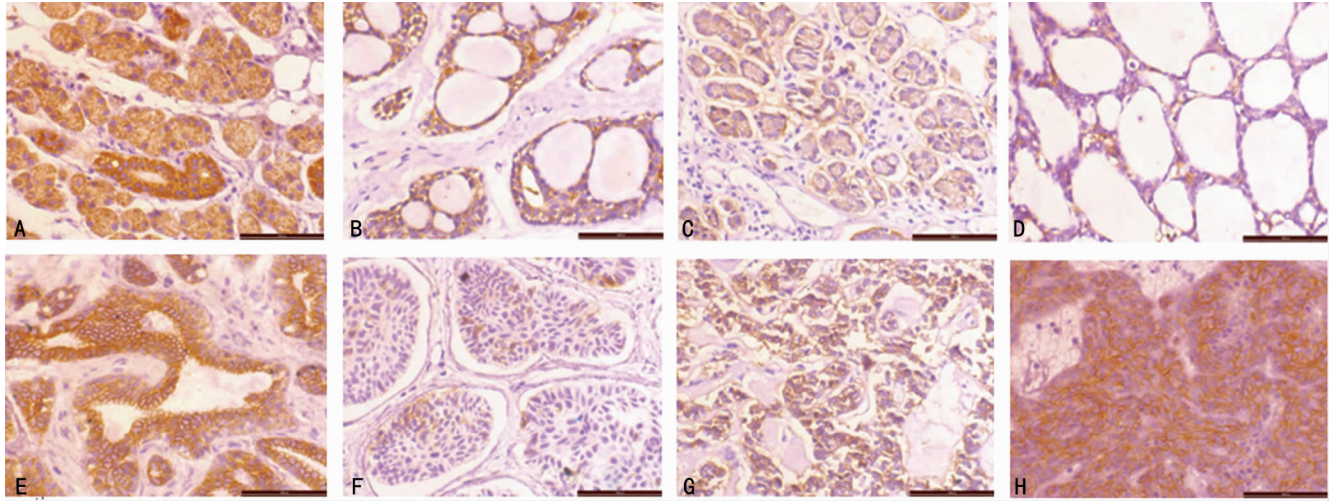
的高倍视野拍照,保持统一的光源亮度、对比度、饱和度,以及相同的曝光时间。利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统,计算出阳性区域的平均光密度(MOD)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析、SNK 两两比较、*t* 检验、Pearson 相关分析等统计学方法,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E-cad 及 Ep-CAM 在头颈部 ACC 及正常腺体组织中的表达 E-cad 及 Ep-CAM 的阳性表达部位均主要位于细胞膜及少许细胞质。E-cad 在正常腺体组织中,呈强阳性表达,特

别是导管上皮表达最强(图 1A)。在头颈部 ACC 肿瘤细胞中表达较低,头颈部 ACC 实体型中可见 E-cad 表达明显缺失,实体型形成的大小不一的癌巢中,基本无 E-cad 的表达(图 1B)。E-cad 在头颈部 ACC 中的表达低于正常腺体组织,两组比较差异有统计学意义($t=6.652, P=0.000$)。Ep-CAM 在正常腺体组织中呈弱阳性表达(图 1C),在头颈部 ACC 肿瘤细胞中呈强阳性表达,特别是头颈部 ACC 实体型中,肿瘤细胞的细胞膜及细胞浆均呈强阳性表达(图 1D)。Ep-CAM 在头颈部 ACC 中表达明显高于正常腺体组织,两组比较差异有统计学意义($t=9.898, P=0.000$)。



A: E-cad 在正常腺体组织中阳性表达; B: E-cad 在 ACC 中弱阳性表达; C: Ep-CAM 在正常腺体组织中弱阳性表达; D: Ep-CAM 在 ACC 筛状型中阳性表达; E: E-cad 在 ACC 管状型中阳性表达; F: E-cad 在 ACC 实体型中表达缺失; G: Ep-CAM 在 ACC 管状型中阳性表达; H: Ep-CAM 在 ACC 实体型中强阳性表达。

图 1 E-cad 及 Ep-CAM 在不同部位的表达 (EnVision $\times 400$)

表 1 E-cad、Ep-CAM 在头颈部 ACC 不同分组中的表达情况($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	E-cad 的 MOD 值	Ep-CAM 的 MOD 值
病理类型			
筛状型	24	0.113 \pm 0.040 ^a	0.090 \pm 0.031 ^a
管状型	23	0.090 \pm 0.041 ^a	0.090 \pm 0.025 ^a
实体型	13	0.026 \pm 0.023	0.123 \pm 0.034
分期			
I~II	32	0.098 \pm 0.051	0.085 \pm 0.028
III~IV	28	0.070 \pm 0.045 ^b	0.111 \pm 0.031 ^b
神经症状			
有	33	0.067 \pm 0.039	0.108 \pm 0.029
无	27	0.108 \pm 0.052 ^c	0.083 \pm 0.031 ^c
复发转移			
有	18	0.062 \pm 0.046	0.114 \pm 0.034
无	42	0.095 \pm 0.049 ^d	0.090 \pm 0.029 ^d

^a: $P<0.05$, 与实体型比较; ^b: $P<0.05$, 与 I~II 期比较; ^c: $P<0.05$, 与有神经症状比较; ^d: $P<0.05$, 与有复发转移比较。

2.2 E-cad 及 Ep-CAM 在头颈部 ACC 不同分组中的表达 E-cad 在头颈部 ACC 筛状型、管状型(图 1E)及实体型(图 1F)

患者中的表达情况比较差异有统计学意义($F=23.119, P=0.000$), 两两比较发现实体型中的表达较筛状型及管状型明显减少, 差异有统计学意义($P<0.05$), 在筛状型与管状型中的表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。E-cad 在头颈部 ACC 临床 III~IV 患者中表达比临床 I~II 期患者减少, 两组比较差异有统计学意义($t=2.239, P=0.029$)。E-cad 在头颈部 ACC 有神经症状患者中的表达比无神经症状患者中的表达减少, 差异有统计学意义($t=3.454, P=0.001$); 在有复发转移患者中的表达比无复发转移患者中的表达减少, 差异有统计学意义($t=2.433, P=0.018$)。见表 1。

Ep-CAM 在头颈部 ACC 的筛状型、管状型(图 1G)和实体型(图 1H)患者中的表达情况 3 组比较差异有统计学意义($F=6.240, P=0.004$)。经两两比较发现, 实体型中表达较筛状型及管状型明显增加, 差异有统计学意义($P<0.05$), 在筛状型与管状型中的表达比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Ep-CAM 在头颈部 ACC 临床 III~IV 期患者中的表达比临床 I~II 期患者增加, 两组比较, 差异有统计学意义($t=3.489, P=0.001$)。Ep-CAM 在头颈部 ACC 有神经症状患者中的表达比无神经症状患者中的表达增加, 差异有统计学意义($t=3.222, P=0.002$), Ep-CAM 在头颈部 ACC 有复发转移患者中的表达比无复发转移患者中的表达增加, 差异有统计学意义($t=2.830, P=0.006$)。见表 1。

2.3 头颈部 ACC 中 E-cad 及 Ep-CAM 表达的相关性分析

采用 Pearson 相关分析显示,头颈部 ACC 中 E-cad 蛋白与 Ep-CAM 蛋白的表达呈负相关($r = -0.890, P = 0.000$)。

3 讨 论

E-cad 属于 CAM 的钙黏素族,可见于所有的上皮细胞中,其在维持上皮细胞极性和稳定性中起重要作用。E-cad 的缺失,破坏了相邻细胞间正常的黏附,导致恶性细胞从上皮细胞层中分离,并且直接影响与肿瘤的发展和转移相关的信号通路,比如激活经典的 Wnt 信号通路、转化生长因子 β (TGF- β) 信号通路等,从而促进肿瘤的发生^[3]。因此,E-cad 是上皮性肿瘤发生、发展中的决定性因子,E-cad 基因又被认为是肿瘤侵袭抑制基因^[4]。大量研究发现,E-cad 的表达较少、缺失和表达异常与胃癌、乳腺癌、鼻咽癌、喉癌等的侵袭转移和预后密切相关^[5-6]。本研究发现,E-cad 在正常腺体组织中大量表达。在头颈部 ACC 组织中,E-cad 表达缺失或者表达紊乱,实体型中 E-cad 的表达较其他两型明显降低,特别是在实体型形成的大小不一的癌巢中,基本无 E-cad 的表达。E-cad 的表达在头颈部 ACC 临床 III~IV 期和有神经症状及复发转移的患者中表明明显降低,说明 E-cad 表达越低的头颈部 ACC 分期越晚,越容易出现神经症状及复发转移,即恶性程度越高。因此 E-cad 在头颈部 ACC 的恶性进展中起重要作用,E-cad 可能具有抑制头颈部 ACC 发生、发展的作用。

Ep-CAM 是一类在多数上皮细胞中表达的非钙离子依赖性 CAM,属于未分类的 CAM 家族。Ep-CAM 具有与免疫球蛋白超家族相似的生物功能,却缺乏与免疫球蛋白功能区类似的结构。Ep-CAM 表达在大多数的正常上皮组织、良性恶性增生组织及胚胎组织中,恶性上皮肿瘤组织中表达呈强阳性^[7]。参与细胞增殖分化、黏附、信号传导等过程,能促进肿瘤的发生、发展,且可能与 E-cad 的缺失相关。Ep-CAM 可能是通过激活经典的 Wnt 信号转导通路等途径,导致肿瘤的发生^[8]。如果能抑制 Ep-CAM 的高表达,可能对阻止 ACC 的恶性进展及侵袭转移起重要作用。Went 等^[9]研究发现 Ep-CAM 在基本上所有的腺癌中高表达,如胰腺癌、乳腺癌等。本研究发现,Ep-CAM 在正常腺体中低表达,在头颈部 ACC 中高表达,在实体型、临床 III~IV 期、有神经症状及有复发转移的头颈部 ACC 患者中的表达明显增高。通过对 Ep-CAM 的检测,能评估头颈部 ACC 患者的恶性程度。如果能抑制 Ep-CAM 的高表达,可能对阻止头颈部 ACC 的恶性进展及侵袭转移起重要作用。目前,针对 Ep-CAM 的免疫治疗已在一些肿瘤中开展,并且被证明能降低肿瘤患者的病死率^[10]。希望通过对 Ep-CAM 的研究,能为头颈部 ACC 的免疫治疗提供帮助。

上皮间质转化(EMT)指发生在胚胎发育和伤口愈合过程中的一种细胞表型的转换,近年来发现 EMT 与肿瘤的恶性进程有关。有研究者发现 E-cad、Ep-CAM、整合素 $\alpha\beta6$ 均与 EMT 有密切关系,这些 CAM 的变化参与了 EMT 的发生^[11]。E-cad 减少,使细胞间的紧密连接被破坏,肿瘤细胞获得侵袭性及转移性,这是 EMT 发生的重要标志之一^[12-13]。E-cad 及 Ep-CAM 在头颈部 ACC 中的表达呈负相关关系,推测在头颈部 ACC 的恶性进程中,可能出现 E-cad 及 Ep-CAM 这两种 CAM 相互拮抗的作用。E-cad 及 Ep-CAM 可能是通过 EMT 这一途径在头颈部 ACC 的发生、发展及侵袭转移中起作用。

参考文献

- [1] Balamucki CJ, Amdur RJ, Werning JW, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck[J]. *Am J Otolaryngol*, 2012, 33(5): 510-518.
- [2] Van Weert S, Bloemena E, Van Der Waal I, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck; a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period[J]. *Oral Oncol*, 2013, 49(8): 824-829.
- [3] Christofori G. New signals from the invasive front[J]. *Nature*, 2006, 441(792): 444-450.
- [4] Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, et al. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 48.
- [5] Younis LK, El SH, Haque I. The prognostic value of E-cadherin expression in breast cancer[J]. *Int J Health Sci*, 2007, 1(1): 43-51.
- [6] Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, et al. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule[J]. *J Cell Biol*, 1994, 125(2): 437-446.
- [7] Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ, et al. Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins[J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(5): 1337-1348.
- [8] Maetzel D, Denzel S, Mack B, et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(2): 162-171.
- [9] Went P, Vasei M, Bubendorf L, et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(1): 128-135.
- [10] Kurtz JE, Dufour P. Adecatumumab; an anti-EpCAM monoclonal antibody, from the bench to the bedside[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(6): 951-958.
- [11] Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C. Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy[J]. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36(6): 458-467.
- [12] Turley EA, Veisoh M, Radisky DC, et al. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008, 5(5): 280-290.
- [13] Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8319-8326.