

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.07.014

紧密连接蛋白 1 和血管内皮生长因子 C 蛋白与大肠癌的关系研究

李燕, 吴密璐[△], 骆玉霜, 刘志波, 陈蓉
(青海大学附属医院病理科, 西宁 810000)

[摘要] **目的** 探讨紧密连接蛋白 1(Claudin-1)与血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在大肠癌组织中的表达情况及二者间的相互关系。**方法** 对该院病理科收集的 50 例大肠癌组织、癌旁组织及 50 例正常大肠组织采用免疫组织化学 SP 法检测, 根据患者的年龄、性别、是否发生淋巴结转移、浸润深度、临床分期进行综合比较, 分析 Claudin-1 和 VEGF-C 蛋白在大肠癌组织中表达的相关性。**结果** 大肠癌组织的 Claudin-1、VEGF-C 阳性率显著高于癌旁组织和正常大肠组织 ($\chi^2=32.270, P=0.000; \chi^2=41.209, P=0.000$); 癌旁组织的 Claudin-1、VEGF-C 阳性率显著高于正常大肠组织 ($\chi^2=7.294, P=0.007; \chi^2=5.741, P=0.017$)。大肠癌组织 Claudin-1 的表达与分化程度、浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移具有密切关系 ($P<0.05$), 大肠癌组织 VEGF-C 的表达与浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤大小具有密切关系 ($P<0.05$)。大肠癌 Claudin-1、VEGF-C 表达具有显著的正相关关系 ($\chi^2=10.953, P=0.001, r=0.468$)。**结论** 大肠癌组织的 Claudin-1、VEGF-C 表达显著高于癌旁组织和正常大肠组织, 大肠癌组织的 Claudin-1、VEGF-C 表达与临床分期等因素具有一定的关系。

[关键词] 血管内皮生长因子; 连接蛋白类; 肠肿瘤**[中图分类号]** R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)07-0909-03

Relationship of Claudin-1 and VEGF-C protein with colorectal cancer

Li Yan, Wu Milu[△], Luo Yushuang, Liu Zhibo, Chen Rong

(Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of tight junction protein 1(Claudin-1) and vascular endothelial growth factor C(VEGF-C) in colorectal carcinoma tissues and the relationship between them. **Methods** Totally 50 cases of colorectal carcinoma, paracancerous tissues and 50 cases of normal colorectal tissues from Department of Pathology were detected by immunohistochemistry SP method, according to the patient's age, gender, lymph node metastasis, depth of invasion, clinical stage for comprehensive comparison, and analyze the Claudin 1 and VEGF-C protein expression in colorectal cancer tissues. **Results** The positive rates of Claudin-1, VEGF-C in colorectal cancer tissues was significantly higher than that in paracancerous tissue and normal colorectal tissues ($\chi^2=32.270, P=0.000; \chi^2=41.209, P=0.000$), the positive rate of Claudin-1, VEGF-C in paracancerous cancer tissues was significantly higher than that in normal colorectal tissues ($\chi^2=7.294, P=0.007; \chi^2=5.741, P=0.017$). The expression of colorectal carcinoma Claudin-1 had close relationship with differentiation, invasion degree, TNM stage, lymph node metastasis ($P<0.05$), the expression of VEGF-C had colse relatons with infiltration degress, TNM stage, lymph node metastasis, tumor size ($P<0.05$). The expression of colorectal cancer Claudin-1, VEGF-C had significantly positive correlation ($\chi^2=10.953, P=0.001, r=0.468$). **Conclusion** The expression of colorectal cancer Claudin-1, VEGF-C was significantly higher than that in paracancerous tissue and normal colorectal tissue, the expression of Claudin-1, VEGF-C had a certain relationship with clinical staging.

[Key words] vascular endothelial growth factor; connexins; intestinal neoplasms

大肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 每年的发病率和病死率都在持续上升, 50%~60% 的患者死于肿瘤复发和转移^[1]。肿瘤的发生、发展与转移是一个复杂的、多步骤、多因素相互作用的动态过程, 有研究显示紧密连接蛋白 1(Claudin-1)和血管内皮生长因子 C(VEGF-C)在大肠癌组织中呈现高表达状态, 与肿瘤的发生、浸润、淋巴转移有关。Claudin-1 对于维持上皮屏障结构的稳定性及细胞间物质交流具有重要作用; VEGF-C 能诱导肿瘤外周形成新的淋巴管, 使肿瘤细胞从新生淋巴管转移^[2]。本研究通过免疫组织化学方法检测 Claudin-1 和 VEGF-C 在大肠癌组织、癌旁组织及正常大肠组织的表达情况, 分析两种蛋白与大肠癌的相关性, 为大肠癌的诊断及预后评价提供参考, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究选取本院病理科 2013 年 3 月至 2014 年 12 月收集的 50 例大肠癌组织、癌旁组织及 50 例正常大肠

组织标本。纳入标准: 经病理确诊并接受过放射、化学药物治疗的大肠癌组织; 正常大肠组织经过病理组织学检查排除癌变及其他相关病变, 来源于肠镜检查排除肿瘤病变的患者。本次研究共纳入 150 例标本, 大肠癌组织组 50 例, 男 28 例, 女 22 例; 年龄 48~74 岁, 平均(58.4±7.2)岁; 50 例均为腺癌, 其中结肠癌 23 例, 直肠癌 27 例; 分化程度: 高分化 18 例, 中分化 21 例, 低分化 11 例; 浸润深度: 浆膜层以内 21 例, 浆膜层以下 29 例; 淋巴结转移 22 例, 未转移 28 例; TNM 分期: I 期 13 例, II 期 16 例, III 期 15 例, IV 期 6 例。癌旁组织 50 例标本取自上述 50 例确诊的大肠癌患者的癌旁组织。正常大肠组织 50 例, 男 32 例, 女 18 例; 年龄 44~76 岁, 平均(60.4±8.1)岁。3 组标本上述一般资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 石蜡切片机 RM2235(德国 LEICA 公司), Olympus BX51 型电子显微镜(日本 Olympus 公司), 脱水机 ASP300S(德国 LEICA 公司), 包埋机 EG1150H(德国 LEICA

公司), Claudin-1 兔抗人多克隆抗体(博奥森 bs-1428R Rba), VEGF-C 多克隆抗体(北京中杉生物技术有限公司), 免疫组织化学 SP 试剂盒(福州迈新生物有限公司)。

1.3 检测方法 取患者的大肠癌组织、癌旁组织和正常大肠组织浸泡于 10% 福尔马林溶液固定 24 h, 对组织进行修块, 分别浸泡于 70% 乙醇 3 h、80% 乙醇 3 h、90% 乙醇 3 h、100% 乙醇 I 3 h、100% 乙醇 II 3 h、二甲苯 I 30 min、二甲苯 II 30 min, 在 67 °C 恒温中浸蜡 30 min, 包埋, 修蜡块。使用切片机进行连续 4 μm 切片, 42 °C 展片, 67 °C 烤片 2 h, 然后经过二甲苯 I 5 min、二甲苯 II 5 min、100% 乙醇 I 5 min、100% 乙醇 II 5 min、95% 乙醇 5 min、85% 乙醇 5 min、75% 乙醇 5 min, 枸橼酸盐缓冲液 92~98 °C 30 min 进行抗原修复, 然后根据免疫组织化学试剂盒说明书进行染色, 显微镜下观察并摄片, 每张切片在 400 倍显微镜下选定 10 个视野计算阳性细胞的百分数, VEGF-C 阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 定位于胞质, Claudin-1 阳性物质呈棕黄色细颗粒状定位于胞质和包膜, 阴性细胞数小于 10% (-), 阳性细胞数大于或等于 10% (+)。

1.4 统计学处理 所有收集数据录入 Excel 2003, 在 SPSS17.0 软件中进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用两样本独立 *t* 检验, 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验; 相关分析采用 Spearman 秩相关分析法。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 3 种不同大肠组织中 Claudin-1、VEGF-C 表达情况 大肠癌组织的 Claudin-1、VEGF-C 阳性率显著高于癌旁组织和正常大肠组织 ($\chi^2 = 32.270, P = 0.000; \chi^2 = 41.209, P = 0.000$); 癌旁组织的 Claudin-1、VEGF-C 阳性率显著高于正常大肠组织 ($\chi^2 = 7.294, P = 0.007; \chi^2 = 5.741, P = 0.017$)。见表 1。

表 1 3 种大肠组织中的 Claudin-1、VEGF-C 阳性率

组别	n	Claudin-1		VEGF-C	
		阳性	阳性率(%)	阳性	阳性率(%)
大肠癌组织	50	32	64.00	34	68.00
癌旁组织	50	16	32.00	13	26.00
正常大肠组织	50	5	10.00	4	8.00

2.2 不同大肠癌临床特征与 Claudin-1、VEGF-C 表达的关系 大肠癌组织 Claudin-1 的表达与分化程度、浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移具有密切关系 ($P < 0.05$), 大肠癌组织 VEGF-C 的表达与浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤最大径具有密切关系 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大肠癌不同临床特征与 Claudin-1、VEGF-C 表达的关系

因素	Claudin-1					VEGF-C				
	阳性	阴性	χ^2	<i>P</i>	<i>r</i>	阳性	阴性	χ^2	<i>P</i>	<i>r</i>
性别										
男	20	8	1.524	0.217	0.175	19	9	0.001	0.981	0.003
女	12	10				15	7			
年龄(岁)										
>60	14	10	0.643	0.423	-0.113	17	7	0.170	0.680	0.058
≤60	18	8				17	9			
分化程度										
高分化	22	17	4.432	0.035	0.301	24	15	3.401	0.065	0.261
低分化	10	1				10	1			
浸润程度										
浆膜层	23	6	7.025	0.008	0.375	24	5	8.636	0.003	0.416
未及浆膜层	9	12				10	11			
TNM 分期										
I+II 期	15	14	4.516	0.034	0.301	16	13	5.221	0.022	0.323
III+IV 期	17	4				18	3			
淋巴结转移										
是	20	2	12.374	0.000	0.497	20	2	9.475	0.002	0.435
否	12	16				14	14			
肿瘤最大径(cm)										
>5	21	12	0.006	0.941	0.011	23	10	0.128	0.720	0.051
≤5	11	6				11	6			

2.3 大肠癌患者的 Claudin-1、VEGF-C 表达的相关关系 大肠癌 Claudin-1、VEGF-C 表达具有显著的正相关关系 ($\chi^2 =$

10.953, $P=0.001$, $r=0.468$), 见表 3。

表 3 大肠癌患者的 Claudin-1、VEGF-C 表达的相关性

VEGF-C	Claudin-1		合计
	阳性	阴性	
阳性	27	7	34
阴性	5	11	16
合计	32	18	50

$$\chi^2=10.953, P=0.001, r=0.468.$$

3 讨 论

肿瘤的发生是多因素、多基因参与的复杂过程,从基因水平探讨大肠癌的发生发展规律、发病基础,以及发病机制,将对大肠癌的诊断及治疗提供重要依据。本研究通过对大肠癌组织中 Claudin-1 和 VEGF-C 的表达进行分析,初步阐明了二者在大肠癌发生发展中的作用。

Claudin-1 属于紧密连接蛋白家族,是 Furuse 于 1998 年发现的位于人染色体 3q28-q29 编码 21 个氨基酸的基因^[3],其主要作用是参与细胞与细胞间的紧密连接,调控细胞间的物质交换^[4]。有研究显示,很多肿瘤的发生发展过程中 Claudin-1 表达异常,如大肠癌、肾细胞癌、卵巢癌、胃腺癌等^[5]。很多研究显示,结肠癌组织中 Claudin-1 呈现过表达状态,但是 Claudin-1 表达上调的意义尚不明确。Wnt 和 Notch 信号通路在正常结肠的发育过程中具有重要作用, Claudin-1 是 Tcf/Lef 信号的靶分子,也是 Wnt 和 Notch 信号通路的启动环节,结肠癌组织中 Claudin-1 的高表达导致 Wnt 目标基因上调,如原癌基因、cyclin D1 和 c-myc 等,对于肿瘤的发生具有重要作用。本研究结果显示,大肠癌组织中 Claudin-1 的表达水平高于癌旁组织和正常大肠组织,提示 Claudin-1 表达的位置与量的异常促成了肿瘤的发生。随着大肠癌的发展,膜蛋白 Claudin-1 表现出自细胞膜向细胞质转移的趋势,作为细胞与外界沟通桥梁的细胞膜发生改变,导致细胞内外信息传递异常,从而引起肿瘤发生转移。同时本研究结果显示 Claudin-1 表达与大肠癌的分化程度、浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移具有密切关系,可能的机制为 Claudin-1 过表达可能抑制 E-Cadherin 的表达,上调 β -Cadherin/Tcf 信号通路,最终导致肿瘤发生发展,或者 Claudin-1 过表达诱导金属基质蛋白酶 2(MMP2)表达,使正常细胞具有侵袭能力,从而促进肿瘤转移。有研究显示 APC Min 结肠癌模型小鼠的生存期限较健康鼠明显降低,可能与 Claudin-1 过表达有关,与本研究结果有相似性^[6]。

VEGF-C 属血管内皮生长因子和血小板生长因子家族,是 Jeltsch 等 1997 年发现的位于人类染色体的 4q34 编码 119 个氨基酸的基因^[7],是第一个报道的淋巴增殖刺激因子,可以调节淋巴内皮细胞的增殖和分化,促进肿瘤淋巴结转移, VEGF-C 的异常表达与食管癌的不良预后有关,被认为是预测淋巴结转移的有效指标^[8]。很多研究中显示 VEGF-C 的表达是淋巴结转移、远处转移和预后不良的象征^[9]。本研究显示 VEGF-C 在大肠癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织和正常大肠组织,提示 VEGF-C 在大肠癌的发生过程中具有重要作用,与大肠癌的浸润、分期、淋巴转移有关;可能原因是 VEGF-C 由癌组织产生后,通过自分泌和旁分泌的形式与 VEGFR-3 结合,通过 MEK/ERK 及 PI3K 激酶/AKT 途径诱导内皮细胞增殖和迁移从而导致肿瘤淋巴管和血管的新生,改变肿瘤外基质的黏附性,促进肿瘤的转移浸润^[10]。

本研究对 Claudin-1 和 VEGF-C 的表达进行了相关性分

析,结果显示二者表达具有明显的正相关关系,即随着大肠癌分化程度的升高, Claudin-1 和 VEGF-C 的表达逐渐降低, III + IV 期患者的阳性率明显高于 I + II 期,有淋巴结转移的患者二者的表达高于未出现淋巴结转移的患者,提示 Claudin-1 和 VEGF-C 的表达均与大肠癌的分化、转移、分期等有关,因此对 Claudin-1 和 VEGF-C 的表达进行分析可以为大肠癌患者预后和生存判断提供重要依据。

综上所述,大肠癌组织中 Claudin-1 和 VEGF-C 呈现高表达状态,与肿瘤的分化、转移、分期具有密切联系,而且 Claudin-1 和 VEGF-C 的表达水平呈正相关, Claudin-1 和 VEGF-C 两基因参与了大肠癌的发生发展过程,是肿瘤转移基因,促进肿瘤的发生和转移。对大肠癌患者的 Claudin-1 和 VEGF-C 表达水平进行检测,可以作为大肠癌患者诊断、生存及预后评价的参考指标。

参考文献

- [1] 陈忠龙,谭东,戴龙,等.厦门市城乡居民大肠癌死亡趋势比较[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(12): 910-911, 920.
- [2] 张国建,阮洪训,阎庆辉,等.紧密连接蛋白 1 和血管内皮生长因子 C 在大肠癌表达的相关性[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(4): 859-861.
- [3] 王琳,李世拥,安萍,等. Claudin-1 和 Claudin-4 在结直肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2012, 15(10): 1073-1076.
- [4] Christian K. Claudin-15 and-25b expression in the intestinal tract of Atlantic salmon in response to seawater acclimation, smoltification and hormone treatment [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2010, 155A (3): 361-370.
- [5] 张真真,张声,陈余鹏,等.紧密连接相关蛋白在胃腺癌中的联合表达及预后意义[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(2): 85-88.
- [6] Pope JL, Ahmad R, Bhat AA, et al. Claudin-1 overexpression in intestinal epithelial cells enhances susceptibility to adenomatous polyposis coli-mediated colon tumorigenesis [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 167.
- [7] Yang J, Wu HF, Qian LX, et al. Increased expressions of vascularendothelial growth factor (VEGF), VEGF-C and VEGF receptor-3 in prostate cancer tissue are associated with tumor progression [J]. Asian J Androl, 2006, 8(2): 169-175.
- [8] Von Rahden BH, Stein HJ, Pühringer F, et al. Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2005, 65 (12): 5038-5044.
- [9] 戴小军,王珍,张晓春,等.血管内皮生长因子/血管内皮生长因子受体分子成像术在肿瘤诊治中的应用[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(6): 1387-1388.
- [10] 张国建,秦晓宁,阎庆辉,等.肿瘤转移相关基因-1 和血管内皮生长因子 C 在胃癌中的相关性[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(3): 499-501.