

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2005.02.06

• 研究生专栏 •

Connexin 43 和 E-cadherin 在非小细胞肺癌中表达及相关性研究

张永兴 徐洪涛 王恩华

【摘要】 背景与目的 由连接蛋白(connexin, Cx)构成的细胞间隙连接(gap junction)对细胞的增殖和分化起着重要的调控作用, Cx 表达下降将导致细胞恶化。上皮钙粘蛋白(E-cadherin)为上皮细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质粘附的跨膜糖蛋白分子, 其功能抑制或表达下降可使细胞间粘附能力下降, 细胞易于分离。本研究旨在探讨连接蛋白 43(Connexin 43, Cx43)和 E-cadherin 在非小细胞肺癌中的表达及两者的相互关系。方法 采用免疫组织化学 S-P 法检测 85 例原发性非小细胞肺癌组织的 Cx43 和 E-cadherin 蛋白表达, 并进行两者的相关性分析。结果 Cx43 和 E-cadherin 蛋白在非小细胞肺癌中表达显著下降, 其下降程度与肺癌的细胞分化程度、pTNM 分期和有无淋巴结转移均有密切关系, 而与组织学分型无明显关系。Cx43 和 E-cadherin 蛋白表达之间存在明显的相关性。结论 Cx43 和 E-cadherin 蛋白在非小细胞肺癌中表达显著下降, 且两者存在着明显的相关性, 可能是肺癌发生和发展过程中的共同事件。

【关键词】 非小细胞肺癌 Connexin 43 E-cadherin 免疫组织化学

【中图分类号】 R730.231

Expressions of connexin 43 and E-cadherin and their correlation in non-small cell lung cancer ZHANG Yong-xing, XU Hongtao, WANG Enhua. Department of Pathology, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, P. R. China

Corresponding author: WANG Enhua, E-mail: wangeh@hotmail.com

【Abstract】 **Background and objective** Connexin (Cx), a transmembranous protein, makes up of gap junction, which induces the communication of cells and plays an important role in proliferation and differentiation of cells. The directly or indirectly reduced expression of connexin protein may induce a malignant tendency of cells. E-cadherin is a transmembranous glycoprotein and induces the adhesion of epitheliums and extracellular matrix. The reduced expression or dysfunction of E-cadherin will impair the ability of adhesion and make cells easy to be isolated. The aim of this study is to examine the expressions of Connexin 43 (Cx43) and E-cadherin in non-small cell lung cancer (NSCLC), and to analyze their correlation. **Methods** The expressions of Cx43 and E-cadherin proteins were detected in 85 primary NSCLC samples by immunohistochemistry S-P method, and their correlation was then analyzed. **Results** The expressions of Cx43 and E-cadherin were remarkably decreased in NSCLC tissues. Cx43 and E-cadherin expressions were related to cell differentiation, pTNM stage and lymphatic metastasis of NSCLC. The expression of Cx43 significantly correlated with the expression of E-cadherin. **Conclusion** The expressions of Cx43 and E-cadherin significantly decrease in NSCLC and they correlate with each other. It might be common affairs in carcinogenesis and development of NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer Connexin 43 E-cadherin Immunohistochemistry

This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (to WANG Enhua) (No. 30470764).

细胞间隙连接(gap junction)是相邻细胞之间一种能开放和关闭的膜通道结构,由跨细胞膜的连接蛋白(connexin, Cx)构成,在细胞间相互沟通信息,调控

着细胞的增殖和分化,稳定细胞外基质(ECM)的内环境,使细胞与细胞形成协调的整体组织结构,功能比单一细胞增强,即细胞间隙连接通讯(gap junction inter-cellular communication, GJIC)。许多研究发现 Cx 异常表达可使细胞间隙连接形成障碍,引起 GJIC 功能的降低或消失,对肿瘤的发生和发展具有重要意义^[1]。

本研究受国家自然科学基金(No. 30470764)资助

作者单位:110001 沈阳,中国医科大学基础医学院病理教研室(通讯

作者:王恩华, E-mail: wangeh@hotmail.com)

Cx 是由位于不同染色体上的 Cx 基因编码的 Cx 大家族,目前发现的近 20 种 Cx 具有高度同源性,在细胞膜上 4 次跨膜,形成 M 型的跨膜分子链;其中 Cx43 为最常见的一种 Cx 蛋白,主要在心肌、平滑肌、晶状体、成纤维细胞、星形细胞等多种组织细胞中表达,肺组织主要表达 Cx43。E-cadherin 为上皮细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质粘附的重要粘附分子,是由位于染色体 16q22.1 上的 E-cadherin 基因编码的钙依赖性跨膜糖蛋白与胞内可溶性连环素(α 、 β 、 γ -连环素)结合成复合体,再跨膜与相邻细胞的 E-cadherin 相互连接,参与细胞粘附和信号传递等。E-cadherin 的功能抑制或表达下降,可使细胞间粘附能力下降,导致瘤细胞呈浸润性生长,自原发部位脱落,形成局部和远端转移。Cx 与 E-cadherin 同为细胞的跨膜蛋白,在肿瘤的发生和发展过程中,二者间是否存在一定的相关性,所见资料甚少。因此,本研究采用免疫组织化学方法检测 85 例病理诊断明确的原发性非小细胞肺癌组织中 Cx43 和 E-cadherin 的表达,分析两者之间表达的相关性,为进一步探讨 Cx43 和 E-cadherin 在肺癌发生、发展过程中的机制提供有益参考。

1 资料与方法

1.1 标本来源

85 例原发性非小细胞肺癌组织和 15 例癌旁正常肺组织均来源于中国医科大学附属第一医院外科手术标本。全组女性 30 例,男性 55 例,术前均未经放疗治疗;患者平均年龄 57 岁(33~76 岁)。按 WHO(1999)肺肿瘤组织学分类标准:腺癌 49 例(肺泡癌 17 例),鳞癌 36 例;高分化 30 例,中分化 24 例,低分化 31 例;有淋巴结转移者 45 例,无淋巴结转移者 40 例。依据国际抗癌联盟(UICC)1997 年修订的肺癌 pTNM 分期标准:Ⅰ期 40 例,Ⅱ期 24 例,Ⅲ+Ⅳ期 21 例。标本全部经中性福尔马林固定、梯度酒精脱水、常规石蜡包埋,制作成 4 μ m 的连续切片。

1.2 试剂来源

Cx43 鼠单克隆抗体和 E-cadherin 鼠单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology Inc 公司,S-P 超敏免疫试剂盒(KIT-9710)及 DAB 染色试剂盒(DAB-0031)购自福州迈新生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学

取石蜡切片,常规脱蜡至水,3% H_2O_2 60 min 灭活内源性过氧化物酶活性,PBS(磷酸盐缓冲液)冲洗 3 \times 5 min,高压修复 1.5 min;PBS 冲洗 3 \times 5 min,50% 山羊血清抗原封闭,37 $^{\circ}$ C 下孵育 60 min;滴加 Cx43(1:50)和 E-cadherin 鼠抗人单克隆抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 冲洗 3 \times 5 min,滴加

生物素化二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;PBS 3 \times 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(1:100)37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;PBS 3 \times 5 min,DAB 显色,苏木素核复染,脱水、透明封片。采用 PBS 代替一抗作阴性对照,其他步骤相同。

1.3.2 结果判断

参照 Nemeth 等^[2]的统计标准和邱雪彬等^[3,4]的判定标准,Cx43 和 E-cadherin 染色结果的判断标准为:无着色为(-),着色癌细胞 \leq 25%为(+),26%~75%为(++), \geq 76%为(+++),将其中(-)~(+)归为阴性表达,(++)~(+++)归为阳性表达。

1.3.3 统计分析

采用 SPSS for windows 11.5 软件,进行 χ^2 检验、spearman 相关分析。

2 结果

2.1 Cx43 和 E-cadherin 表达

Cx43 和 E-cadherin 蛋白在 15 例正常肺组织中均呈较典型的细胞膜表达,阳性率为 100%,提示细胞之间有功能良好的细胞间隙连接和细胞粘附存在。在 85 例肺癌组织中,仅有 43 例 Cx43 阳性表达(50.6%)(图 1),57 例 E-cadherin 阳性表达(67.1%)(图 2),且 Cx43 和 E-cadherin 阳性表达强度明显减弱,并均以胞浆表达为主,少数肺癌组织可见 Cx43 和 E-cadherin 的核表达和膜表达,或浆膜、浆核同时表达;随着分化程度的降低,Cx43 和 E-cadherin 表达减弱更为显著(图 3、4),在低分化肺癌,部分癌组织未见 Cx43 和 E-cadherin 表达,其中尤以 Cx43 为重。

Cx43 和 E-cadherin 蛋白在非小细胞肺癌中的表达情况详见表 1。85 例非小细胞肺癌 Cx43 和 E-cadherin 的阳性表达率与细胞分化程度、pTNM 分期及有无淋巴结转移均有密切关系。随着分化程度的降低,Cx43 和 E-cadherin 的阳性表达率也明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);不同 pTNM 分期中,Cx43 和 E-cadherin 的阳性表达率随着分期的升高而下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);有淋巴结转移的肺癌组织中 Cx43 和 E-cadherin 阳性表达率较无淋巴结转移的肺癌组织显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。Cx43 和 E-cadherin 蛋白表达与病理组织学分型均无明显关系($P > 0.05$, $P > 0.05$)。

2.2 Cx43 和 E-cadherin 表达的相关性

如表 2 所示,85 例肺癌中 40 例 Cx43 和 E-cadherin 同时阳性表达,25 例同时呈阴性表达,E-cadherin 阳性表达而 Cx43 阴性表达为 17 例,Cx43 阳性表达而 E-cadherin 阴性表达为 3 例,经统计分析有显著性差异($r_s = 0.59$),表明 Cx43 和 E-cadherin 的表达具有相关性。

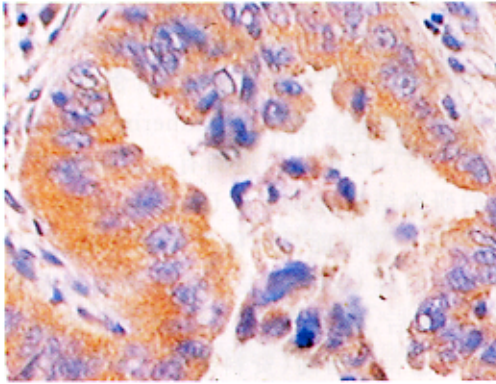


图 1 高分化肺腺癌中 Cx43 膜表达缺失, 胞浆内强表达 (S-P 法 × 200)

Fig 1 The membrane expression of Cx43 was absent and cytoplasmic expression was strong in well differentiated adenocarcinoma (S-P method, ×200)

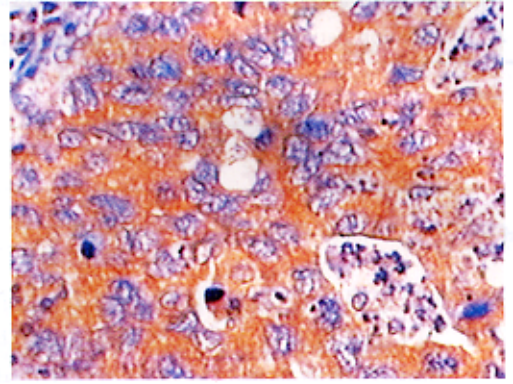


图 3 中分化肺腺癌中 Cx43 胞浆弱表达, 部分细胞核表达 (S-P 法 × 200)

Fig 3 Cx43 expressed weakly in cytoplasm and appeared in some nuclei in moderately differentiated adenocarcinoma (S-P method, ×200)

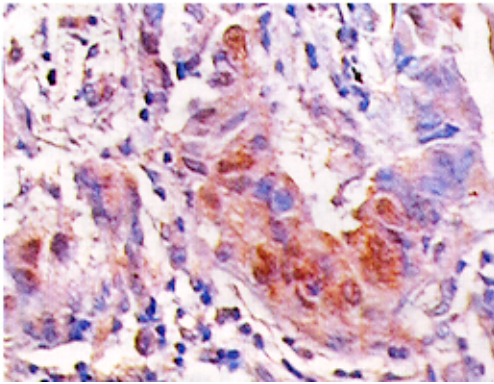


图 2 中分化肺鳞癌中 E-cadherin 膜表达缺失, 胞浆内表达 (S-P 法 × 200)

Fig 2 The membrane expression of E-cadherin was absent and cytoplasmic expression was strong in moderately differentiated squamous cell carcinoma (S-P method, ×200)

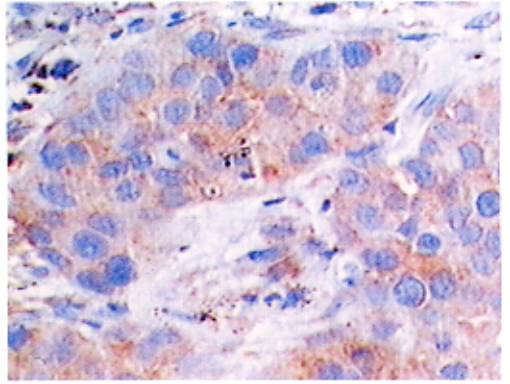


图 4 低分化肺鳞癌中 E-cadherin 胞浆弱表达 (S-P 法 × 200)

Fig 4 E-cadherin expressed weakly in cytoplasm in poorly differentiated squamous cell carcinoma (S-P method, ×200)

表 1 非小细胞肺癌中 Cx43 及 E-cadherin 蛋白表达与临床病理特征的关系

Tab 1 Relationships between Cx43, E-cadherin expression and clinicopathologic characteristics in NSCLC

Characteristic	n	Cx43			E-cadherin		
		Positive (%)	χ^2 value	P value	Positive (%)	χ^2 value	P value
Differentiation							
Well	30	21(70.0)			24(80.0)		
Moderate	24	12(50.0)	8.69	<0.05	19(79.2)	10.60	<0.01
Poor	31	10(32.3)			14(45.2)		
Histology							
Adenocarcinoma	49	26(53.1)	0.28	>0.05	33(67.3)	0.00	>0.05
Squamous cell carcinoma	36	17(47.2)			24(66.7)		
TNM stage							
I	40	26(65.0)			31(77.5)		
II	24	10(41.7)	6.56	<0.05	18(75.0)	10.63	<0.01
III+IV	21	7(33.3)			8(38.1)		
Lymphatic metastasis							
Positive	45	13(28.9)	18.01	<0.01	25(55.6)	5.73	<0.05
Negative	40	30(75.0)			32(80.0)		

表 2 非小细胞肺癌中 Cx43 和 E-cadherin 蛋白表达的关系

Tab 2 Correlation between Cx43 and E-cadherin expression

Cx43	E-cadherin		P value	r_s
	+	-		
+	40	3	<0.01	0.59
-	17	25		

3 讨论

肿瘤细胞普遍存在的 GJIC 缺陷与 Cx 蛋白表达下降有关,而 Cx 蛋白表达下降可能是 Cx 基因甲基化所致^[5,6]。同时有研究表明,Cx 不仅在 GJIC 中发挥着重要作用,而且在细胞内也参与细胞生长、分化的调控过程^[7]。我们的研究表明,85 例非小细胞肺癌组织中 Cx43 蛋白阳性表达率均较正常肺组织下降,其下降程度与肺癌细胞的分化程度相关,在分化程度较高的肺癌,Cx43 的阳性表达率下降较少,而分化程度较低的肺癌组织中,阳性表达率下降较多;且阳性表达以胞浆表达为主。如果 Cx43 有一定量的表达,即使为异位表达,如胞浆表达,亦可使肺癌细胞有较高的分化程度,可能与其参与细胞内的分化调控过程有关。在本研究中,Cx43 的阳性表达率还与 pTNM 分期及有无淋巴结转移有关,pTNM I 期的阳性表达率最高,III + IV 期阳性表达率最低;有淋巴结转移者较无淋巴结转移者阳性表达率低。Cx43 在腺癌中的阳性表达率为 53.1%,鳞癌中为 47.2%,经统计学分析无显著性差异,即 Cx43 的表达与病理组织学分型无明显关系。

E-cadherin 具有抑制肿瘤浸润及转移的作用,被称为抗浸润的抑癌基因。本研究中,E-cadherin 的阳性表达率随着肺癌细胞分化程度的下降而呈下降趋势,与相关资料一致^[4]。E-cadherin 在不同 pTNM 分期及有、无淋巴结转移组织中的表达差异进一步证明了 E-cadherin 表达与肿瘤转移关系密切,即高表达 E-cadherin 的 pTNM I 期和无淋巴结转移的肺癌组织细胞粘附较好,而低表达 E-cadherin 的 pTNM III + IV 期和有淋巴结转移的肺癌组织细胞粘附较差。本研究中,E-cadherin 表达与病理组织学分型无明显关系。

Ko 等^[8]的研究表明,细胞间粘着连接系统的形成可能略早于细胞间隙连接的形成。Hernandez-Blazquez 等^[9]转染 E-cadherin 基因到鼠皮肤乳头状瘤细胞,形成细胞粘附后导致 Cx43 从细胞质向细胞膜移动,提示 E-cadherin 对间隙连接有调节作用。Yano 等^[10]用 Cx26 基因转染人肝细胞瘤 HepG2 细胞,诱导了 E-cadherin 的表达增高,并促成 E-cadherin 和 β -catenin 从细胞质定位到细胞膜上,形成细胞间粘附后,重建 GJIC。Ko 和 Yano 等的研究说明了 Cx 与 E-

cadherin 之间存在一定的关系,由 E-cadherin 构成的细胞间粘附可能为细胞间隙连接形成的基础条件或先决条件。我们的研究结果显示,85 例肺癌中同时表达或同时不表达 Cx43 和 E-cadherin 者占总病例的 76.5%(65/85),两者的表达确有一定的相关性,为上述学者的研究结果提供了佐证,提示 Cx43 和 E-cadherin 的表达下降可能是肺癌发生和发展过程中的共同事件。我们将 Cx43 低表达的肺癌细胞系 LH7 转染 Cx43 基因后,发现不仅 Cx43 蛋白表达增强,同时 E-cadherin 也表达增高(资料未给出),也说明了两者具有一定关系,但 Cx43 和 E-cadherin 之间更深层次的关系及抑癌作用机制,尚需要深入研究。

参 考 文 献

- 1 Fan SQ, Zhou M, Xiang Q, et al. In situ expression of connexins in various carcinomas. Chin J Cancer, 2003, 22(7): 686-690. [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.癌症,2003,22(7): 686-690.]
- 2 Nemeth L, Rolle U, Puri P. Altered cytoskeleton in smooth muscle of aganglionic bowel. Arch Pathol Lab Med, 2002, 126(6): 692-696.
- 3 Qiu XS, Yang X, Li QC, et al. A study of E-cadherin and β -catenin expression and their correlation with prognosis of non-small cell lung carcinoma. Chin J Pathol, 2002, 31(4): 318-321. [邱雪杉,杨秀,李庆昌,等.上皮钙粘附蛋白和 β -连环素的表达与非小细胞肺癌预后的关系.中华病理学杂志,2002,31(4): 318-321.]
- 4 Yang X, Li QC, Qiu XS, et al. A study of E-cadherin expression and its relation with clinical pathological factors in non-small cell lung cancer. J Chin Med Univ, 2000, 29(5): 323-328. [杨秀,李庆昌,邱雪杉,等.非小细胞肺癌中 E-cadherin 表达及与临床病理因素的关系.中国医科大学学报,2000,29(5): 323-328.]
- 5 Chen JT, Cheng YW, Chou MC, et al. The correlation between aberrant connexin 43 mRNA expression induced by promoter methylation and nodal micrometastasis in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4200-4204.
- 6 Chen Y, Huhn D, Knosel T, et al. Downregulation of connexin 26 in human lung cancer is related to promoter methylation. Int J Cancer, 2005, 113(1): 14-21.
- 7 Zhang YW, Kaneda M, Morita I. The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. J Biol Chem, 2003, 278(45): 44852-44856.
- 8 Ko K, Arora P, Lee W, et al. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(1): C147-C157.
- 9 Hernandez-Blazquez FJ, Joazeiro PP, Omori Y, et al. Control of intracellular movement of connexins by E-cadherin in murine skin papilloma cells. Exp Cell Res, 2001, 270(2): 235-247.
- 10 Yano T, Yamasaki H. Regulation of cellular invasion and matrix metalloproteinase activity in HepG2 cell by connexin 26 transfection. Mol Carcinog, 2001, 31(2): 101-109.

(收稿:2004-11-28 修回:2005-01-31)

(本文编辑 李蓓兰)