

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.05.014

Snail 及 N-cadherin 蛋白在骨肉瘤中的表达及其与预后的关系

刘宣毅¹, 贾卫斗², 侯瑞², 王焱²

Expression and Prognosis Analysis of Snail and N-cadherin Protein in Osteosarcoma

Liu Xuanyi¹, Jia Weidou², Hou Rui², Wang Yan²

1. Department of Graduate, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China, 2. The First Department of Osteology, The NO. 251 Hospital of PLA

Corresponding Author: Jia Weidou, E-mail: jwdzr@sina.com

Abstract: Objective To research the expressions of Snail and N-cadherin in osteosarcoma and to explore their roles in the carcinogenesis and progression of osteosarcoma. **Methods** Immunohistochemical assay (SP method) was used to detect the expressions of Snail and N-cadherin in 38 cases osteosarcoma tissues and 10 cases osteochondroma tissues. **Results** (1) Expression of Snail and N-cadherin in osteosarcoma was higher than that in osteochondroma, the comparative differences were significant ($\chi^2 = 27.375, P < 0.01, \chi^2 = 21.849, P < 0.01$). (2) Expression of Snail in osteosarcoma were concerned with soft tissue involvement, Enneking stage, and lung metastases; and the comparative differences were significant ($P < 0.05$). However, the expression of Snail in osteosarcoma were irrelevant with gender, age and mass site ($P > 0.05$). The expression of N-cadherin was positively correlated with that of Snail ($r = 0.421, P < 0.05$). (3) The survival rate of the patients with positive express of Snail and N-cadherin was significant lower than those with negative express of snail and N-cadherin protein in osteosarcoma; and the comparative differences were significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The overexpression of Snail and N-cadherin in osteosarcoma means that they play synergetic roles in the process and metastases of osteosarcoma and poor prognosis.

Key words: Snail; N-cadherin; Osteosarcoma; Immunohistochemical; Prognosis

摘要:目的 观察 Snail 及 N-cadherin 蛋白在骨肉瘤中的表达,探讨其在骨肉瘤发生发展、浸润转移的作用及其与预后的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 38 例骨肉瘤组织、20 例骨软骨瘤组织中 Snail 及 N-cadherin 蛋白的表达。**结果** (1) Snail、N-cadherin 蛋白在骨肉瘤中表达均高于它们在骨软骨瘤组织中的表达,其差异有统计学意义 ($\chi^2 = 27.375, P < 0.01; \chi^2 = 21.849, P < 0.01$); (2) Snail 和 N-cadherin 蛋白与骨肉瘤的软组织浸润、Enneking 分期、肺转移有关 ($P < 0.05$),而与性别、年龄、部位、Dahlin 类型无关 ($P > 0.05$); Snail、N-cadherin 蛋白在骨肉瘤中的表达呈正相关 ($r = 0.421, P < 0.05$); (3) 骨肉瘤中 Snail、N-cadherin 蛋白阳性患者生存率均明显低于阴性患者,其差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 骨肉瘤组织中 Snail 蛋白及 N-cadherin 蛋白的高表达,提示它对骨肉瘤的发生发展和浸润转移起重要作用并预示患者预后不良。

关键词: Snail; N-cadherin; 骨肉瘤; 免疫组织化学; 预后分析

中图分类号: R738.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)05-0551-04

0 引言

骨肉瘤也称成骨肉瘤,是最常见的骨原发性恶性肿瘤,好发于青少年,多发四肢长骨干骺端,预后较差,易复发和血道转移。锌指转录因子 Snail 属于转录抑制因子中 Snail 超家族^[1], Snail 高表达于食管癌^[2]、乳腺癌^[3]、胃癌^[4]等。N-cadherin 是黏附分子钙黏蛋白超家族的重要成员,其介导的细胞与细胞间的黏附,对细胞行为起着至关重

要的调节作用。N-cadherin 高表达于乳腺癌^[5]、尿路上皮细胞肿瘤^[6]、胰腺癌^[7]。提示 Snail 及 N-cadherin 是肿瘤发生发展和浸润转移的一个重要调节因素。本研究采用免疫组织化学法检测 Snail 蛋白、N-cadherin 蛋白在骨肉瘤及骨软骨瘤组织中的表达,旨在探讨它们在骨肉瘤发生发展、浸润转移及预后生存中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集中国人民解放军第 251 医院骨科 2004 年 1 月—2008 年 1 月间手术切除骨肉瘤标本 38 例,均经病理检查证实,所有患者术前均未进行放、化疗。其中男 20 例,女 18 例;年龄 5~55 岁,中位年龄 25

收稿日期:2011-06-17;修回日期:2011-09-20

作者单位:1. 075000 河北张家口,河北北方学院研究生部;2. 中国人民解放军第 251 医院骨一科

通信作者:贾卫斗, E-mail: jwdzr@sina.com

作者简介:刘宣毅(1984-),男,硕士在读,住院医师,主要从事骨肿瘤的发生机制及预后研究

岁;按 Enneking 分期: I 期 7 例, II 期 9 例, III 期 22 例;肿瘤部位在胫骨 15 例, 股骨 13 例, 其他部位 10 例;组织学分型采用 Dahlin 分型, 其中骨母细胞型 15 例, 纤维母细胞型 7 例, 软骨母细胞型 11 例, 其他类型(血管扩张型、混合型)5 例;有软组织浸润的 32 例, 无浸润 6 例;肺转移者 31 例, 无转移者 7 例, 并选取同期我院病理科存档骨软骨瘤组织标本 20 例作为对照。对所有患者采用电话、信件进行随访, 随访截止时间为 2010 年 12 月, 其中 1 例失访未做统计(失访率 2.6%, 1/38)。

1.2 主要试剂来源

兔抗人 Snail 多克隆抗体购自 Abcom 公司(17732), 鼠抗人 N-cadherin 单克隆抗体(MAB-0571)、免疫组化 SP 试剂盒及 DAB 显色剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组织化学染色(SP 法)

标本均经 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 采用 0.01 mmol/L 的枸橼酸缓冲液抗原修复, 染色程序按 SP 试剂盒说明书进行, DAB 显色, 并用已知 Snail 阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定

Snail 蛋白免疫组织化学法阳性信号以胞核出现棕黄色染色为阳性细胞。按染色强度的深浅积分: 0 分: 无染色; 1 分: 弱阳性; 2 分: 强阳性。按着色细胞百分比: 1 分: 1%~25%; 2 分: 26%~50%; 3 分: 51%~75%; 4 分: 76%~100%。然后按照阳性细胞百分比积分×染色强弱积分, 积分 1~2 为阴性, 3~8 为阳性^[4]。N-cadherin 蛋白免疫组织化学法阳性信号为棕黄色, 定位于细胞膜和(或)细胞质。每例切片选择 10 个高倍视野(×40), 阳性结果判定按阳性细胞数占视野中总细胞数的百分比分为阳性与阴性: 无阳性着色或阳性细胞数 < 20% 为阴性, 阳性细胞数 ≥ 20% 为阳性^[8]。

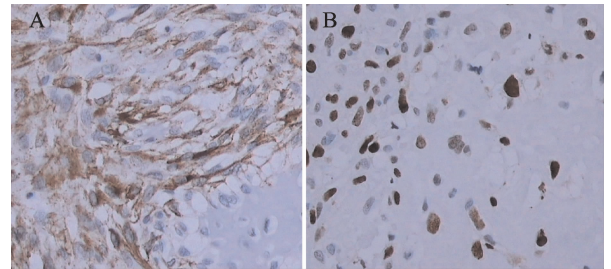
1.5 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 统计分析软件处理, 运用 χ^2 检验、Spearman 相关性检验分析, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法, 以 $\alpha = 0.05$ 作为统计学检验水准。

2 结果

2.1 Snail、N-cadherin 蛋白在骨肉瘤及骨软骨瘤组织中的表达

Snail 蛋白免疫组织化学法染色阳性信号为棕黄色, 定位于细胞的胞核, 见图 1。38 例骨肉瘤组织中, Snail、N-cadherin 蛋白阳性率分别为 81.6% (31/38) 和 78.9% (30/38), 明显高于骨软骨瘤组织中的 10% (2/20) 和 15.0% (3/20), 差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 27.375, P < 0.01, \chi^2 = 21.849, P < 0.01$), 见表 1。



A: positive signal is the brown granules, located in the tumor cell membrane and(or) cytoplasm; B: positive signal is the brown granules, located in the nuclei of tumor cells

图 1 N-cadherin、Snail 蛋白在骨肉瘤中呈阳性表达(SP × 200)
Figure 1 Positive expression of N-cadherin and hadro-positive expression of Snail in osteosarcoma(SP × 200)

2.2 Snail、N-cadherin 蛋白表达及其与骨肉瘤临床病理指标的关系

38 例骨肉瘤组织中, Snail 蛋白表达与软组织浸润、Enneking 分期、肺转移有关, 其差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与性别、年龄、部位、Dahlin 类型无关 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 骨肉瘤中 Snail、N-cadherin 蛋白表达的相关性

38 例骨肉瘤组织中, Snail 及 N-cadherin 蛋白均阳性的 27 例 (71.1%), Snail 蛋白阳性且 N-cadherin 蛋白阴性 4 例 (10.5%), Snail 蛋白阴性且 N-cadherin 蛋白阳性 3 例 (7.9%), 均阴性 4 例 (10.5%), 两者的表达呈正相关 ($r = 0.421, P < 0.05$), 见表 3。

2.4 生存分析

对所有患者进行随访, 3 年总生存率为 40.5% (死亡 22 例, 存活 15 例, 1 例失访未统计), Kaplan-Meier 生存分析表明 Snail、N-cadherin 蛋白阳性患者生存率明显低于阴性患者 ($P < 0.05$), 见图 2、3。

表 1 Snail、N-cadherin 蛋白在骨肉瘤及骨软骨瘤组织中的表达

Table 1 Expression of Snail and N-cadherin in osteosarcoma and osteochondroma

Groups	n	Snail			N-cadherin		
		+	-	positive rate(%)	+	-	positive rate(%)
Osteosarcoma	38	31	7	81.6	30	8	78.9
Osteochondroma	20	2	18	10.0	3	17	15.0

表 2 Snail、N-cadherin 蛋白表达与骨肉瘤临床病理指标的关系

Table 2 The relationship between the expression of Snail and N-cadherin and clinicopathology indicators in osteosarcoma

Clinical and pathological indicator	n	Expression of Snail				Expression of N-cadherin			
		+	Positive rate(%)	χ^2	P	+	Positive rate(%)	χ^2	P
Gender									
Male	20	16	80.0			16	80.0		
Female	18	15	83.3	0.070	>0.05	14	77.8	0.028	>0.05
Age(year)									
≥18	23	18	78.3			17	73.9		
<18	15	13	86.7	0.427	>0.05	13	86.7	0.889	>0.05
Parts of the body									
Tibia	15	13	86.7			12	80.0		
Thighbone	13	10	76.9	0.462	>0.05	9	69.2	1.483	>0.05
Other	10	8	80.0			9	90.0		
Dahin type									
Osteoblast	15	13	86.7			12	80.0		
Fibroblast	7	5	71.4			6	85.7		
Chondroblast	11	9	81.8	0.747	>0.05	8	72.7	0.462	>0.05
Other	5	4	80.0			4	80.0		
Tissue infiltration									
Metastasis	6	3	50.0			2	33.3		
Metastasis-free	32	28	87.5	4.728	<0.05	28	87.5	8.919	<0.05
Enneking staging									
I	7	3	42.9			2	28.6		
II	9	7	77.8	9.889	<0.01	6	66.7	10.942	<0.01
III	22	21	95.5			20	90.9		
Pulmonary metastasis									
Metastasis-free	7	3	42.9			1	14.3		
Metastasis	31	28	90.3	8.561	<0.01	29	93.5	21.586	<0.01

表 3 骨肉瘤中 Snail、N-cadherin 蛋白表达的相关性

Table 3 The correlation between Snail and N-cadherin in Osteosarcoma

Snail	N-cadherin		Total
	+	-	
+	27	4	31
-	3	4	7
Total	30	8	38

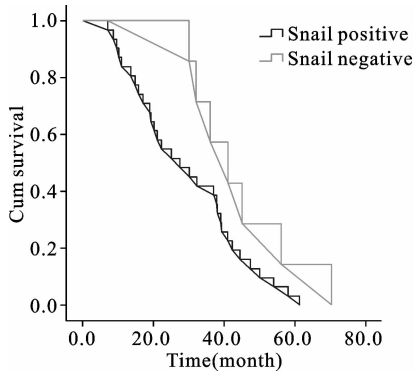


图 2 骨肉瘤中 Snail 蛋白阳性及阴性表达的 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 2 Kaplan-Meier survival curve of positive and negative expression of Snail in osteosarcoma

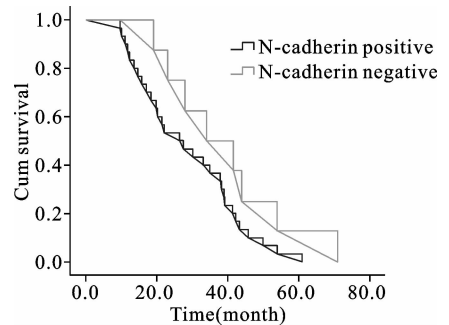


图 3 骨肉瘤中 N-cadherin 蛋白阳性及阴性表达的 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 3 Kaplan-Meier survival curve of positive and negative expression of N-cadherin in osteosarcoma

3 讨论

Snail 因其在许多肿瘤中高表达而倍受关注,是一类锌指转录因子,通过与转录生长因子超家庭成员内具有信号转换功能的转录因子(Smad)相互作用,竞争性结合 E-cadherin 启动子区的 E-box 序列^[9],从而抑制 E-cadherin、闭锁蛋白(occludin)等的表达,使成纤维细胞特定蛋白-1(FSP1)、波形蛋

白(Vimentin)等的表达上调,提高细胞侵袭转移能力,所以 Snail 被认为是肿瘤转移的促进因素^[10]。N-cadherin 通常情况下仅表达于神经外胚层和中胚层来源的组织,在正常的组织中是不表达的,Nagi 等^[5]及 Lascombe 等^[6]在乳腺癌及尿路上皮细胞肿瘤的实验表明,N-cadherin 在二者中高表达,且随着肿瘤病理分级增高而增高。

本研究显示,与骨软骨瘤组织相比,骨肉瘤组织 Snail 表达阳性率显著增高,提示 Snail 的低表达对骨肉瘤发生、转移发展可能起重要作用。与骨肉瘤不同临床分期、病理学分级及有否肺转移有关($P < 0.05$),我们推测 Snail 的表达与骨肉瘤的分化有关,恶性程度越高、分化越差其 Snail 的表达越明显。结合 Snail 的表达与骨肉瘤临床病理指标的关系,发现有肺转移的 Snail 阳性表达显著高于未发生肺转移者,提示骨肉瘤组织中 Snail 的表达增加可能对肺转移有一定促进作用;有软组织侵犯的骨肉瘤组织中 Snail 阳性表达显著高于未侵犯者,提示 Snail 的阳性表达与骨肉瘤浸润能力有关;同时,Enneking 分期越高,Snail 表达越高,提示分化越差、恶性程度越高的肿瘤其 Snail 表达越高,而与骨肉瘤患者性别、年龄、部位、Dahlin 类型无关($P > 0.05$),这与文献报道结果一致^[11-12]。Snail 蛋白在骨肉瘤组织中表达明显高于其在骨软骨瘤组织中的表达($P < 0.01$),提示 Snail 在骨肉瘤组织中的表达上调,可能通过某些信号转导通路抑制了异常突变细胞的凋亡,从而扰乱了细胞正常的生长和凋亡途径,促使细胞逃离免疫监视。

本实验显示,结合 N-cadherin 的表达与骨肉瘤临床病理指标的关系,发现有局部浸润、肺转移,Enneking 分期越高,N-cadherin 的表达也越高,提示 N-cadherin 的阳性表达与骨肉瘤局部浸润及远处转移有关,而与患者的年龄、性别、部位及 Dahlin 类型无关($P > 0.05$)。与相关 N-cadherin 的文献报道一致^[5-7]。结果提示:N-cadherin 可能是导致骨肉瘤细胞的发生、侵袭转移的一个重要调节因素及指标。在骨髓造血微环境中,N-cadherin 表达于成骨细胞及部分造血干细胞,在 N-cadherin 介导下,两者相互作用,维持造血干细胞处于相对平稳状态^[13]。实验结果提示在骨肉瘤中因 N-cadherin 蛋白的反常表达,可能导致成骨细胞获得恶性增殖及侵袭转移的能力。Kaplan-Meier 生存曲线显示,骨肉瘤组织 Snail 及 N-cadherin 蛋白阳性患者生存率明显低于阴性患者,且差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 Snail 或 N-cadherin 蛋白阳性患者预后较差。说明两者在骨肉瘤浸润和转移过程中可能起着

重要的作用,可作为骨肉瘤发生发展以及浸润转移的指标。

总之,本研究显示 Snail 及 N-cadherin 蛋白在骨肉瘤的进展过程中起重要作用,故联合检测 Snail 及 N-cadherin 蛋白在骨肉瘤组织中的表达有助于评估患者的预后情况,为临床诊治骨肉瘤提供崭新的思路,即:阻断 Snail 及 N-cadherin 的高表达可能会抑制骨肉瘤细胞侵袭和转移,从而改善患者的预后情况。但有关两者的相互作用机制尚不明了,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Herfs M, Hubert P, Suarez-Carmona M, et al. Regulation of p63 Isoforms by Snail and Slug Transcription Factors in Human Squamous Cell Carcinoma[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(4): 1941-9.
- [2] Usami Y, Satake S, Nakayama F, et al. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression[J]. *J Pathol*, 2008, 215(3): 330-9.
- [3] Anthony J, Trimboli, Koichi F, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 937-45.
- [4] Lee SH, Kim JH, Lee YS, et al. M1958 regulation of GLI1 and Snail in helicobacter pylori infected gastric epithelial cells[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(5): 447-8.
- [5] Nagi C, Guttman M, Jaffer S, et al. N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant-invasive micropapillary carcinoma [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 94(3): 225-35.
- [6] Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(9): 2780-7.
- [7] Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 1): 4125-33.
- [8] Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(9): 2780-7.
- [9] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, zeb and bHLH factors in tumor progression: an alliance against the epithelial phenotype [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(6): 415-28.
- [10] Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, et al. Snail and snail2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines[J]. *Oncogene*, 2008, 27(34): 4690-701.
- [11] Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, et al. Cancer metastasis accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells[J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(3): 195-206.
- [12] Hu CT, Wu JR, Chang TY, et al. The transcriptional factor Snail simultaneously triggers cell cycle arrest and migration of human hepatoma HepG2 [J]. *J Biomed Sci*, 2008, 15(3): 343-55.
- [13] Taichman RS. Blood and bone; two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche [J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2631-9.