

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.07.023

# 间隙连接蛋白 Cx26 和 Cx43 的表达及与食管鳞癌浸润和转移关系

林宏伟<sup>1</sup>,白桦<sup>1</sup>,栗敏<sup>1</sup>,肖鹏<sup>1</sup>,陈奎生<sup>2</sup>,张红新<sup>2</sup>**Expression of Gap Junction Proteins Connexin26 and Connexin43 and Their Correlation with Occurrence, Invasion and Metastasis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma**LIN Hong-wei<sup>1</sup>,BAI Hua<sup>1</sup>,LI Min<sup>1</sup>,XIAO Peng<sup>1</sup>,CHEN Kui-sheng<sup>2</sup>,ZHANG Hong-xin<sup>2</sup>

1. Medical Oncology of Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Pathology, Basic Medical College of Zhengzhou University

**Abstract: Objective** To study the relationship between the expression of gap junction proteins connexin26 and connexin43 and the occurrence, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. **Methods** The expression of Cx26 and Cx43 proteins and mRNA were detected by SP immunohistochemical and RT-PCR methods in 42 cases of esophageal squamous cell carcinoma (EC) tissue, 17 cases of mucosa adjacent to cancer and 42 cases of normal esophageal mucosa. **Results** The positive expressions of Cx26, Cx43 protein and mRNA in cancer tissue were both lower than that in normal mucosa tissue, and the positive expression of Cx26, Cx43 protein in tumor-adjacent atypical hyperplasia epithelium had a decreasing trend. Cx26, Cx43 gene loss or decreased expression had closely correlation with invasion depth and lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. There was a correlation between the expression of Cx26, Cx43 protein and differentiation levels of tumor, and positive correlation between the expression of Cx26, Cx43 protein and the expression of Cx26, Cx43 mRNA. **Conclusion** Connexin26 and connexin43 can provide a theoretical basis to suppress of carcinogenesis, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma and may be used for early diagnosis, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma.

**Key words:** Esophageal carcinoma; Connexin; Immunohistochemistry; Reversed transcript polymerase chain reaction

**摘要:目的** 探讨间隙连接蛋白 Cx26 和 Cx43 的表达在食管鳞状细胞癌发生、发展以及浸润和转移中的作用。**方法** 通过 RT-PCR、免疫组织化学技术联合检测 Cx26 和 Cx43 在 42 例食管鳞状细胞癌组织、17 例癌旁不典型增生组织以及 42 例相应正常食管黏膜组织的表达情况。**结果** 在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜中 Cx26、Cx43 mRNA 相对表达量及蛋白阳性表达率均低于正常食管黏膜和癌旁不典型增生组织。Cx26、Cx43 蛋白和 mRNA 阳性表达率均随癌组织浸润深度的加深而明显降低,在有淋巴结转移的癌组织均明显低于无淋巴结转移组癌组织。Cx26、Cx43 在食管鳞癌组织中 mRNA 相对表达量均随分化程度降低呈下降趋势。Cx26 与 Cx43 mRNA 表达和蛋白表达之间均呈正相关关系。**结论** Cx26、Cx43 基因抑制食管鳞癌发生、发展及浸润、转移,是早期预测食管鳞癌发生和浸润转移的有效指标。

**关键词:**食管癌;间隙连接蛋白;免疫组织化学;逆转录聚合酶链反应

**中图分类号:**R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2011)07-0809-05

## 0 引言

细胞间隙连接(gap junction, GJ)由两个相邻细胞膜上 4 个连接子(connex)相互衔接而成,是普遍存在于细胞间的膜通道结构,其介导的细胞间隙连

接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)在调控细胞的增殖、分化、新陈代谢以及内环境的稳定等生理过程中发挥着重要作用。每个连接子由 6 个相同的连接蛋白亚单位构成,每个亚单位即称为细胞间隙连接蛋白(connexin)。近年来研究显示多种肿瘤的发生和细胞转化的发生均与间隙连接通讯功能丧失以及间隙连接蛋白表达异常密切相关。本研究旨在探讨 Cx26、Cx43 蛋白表达在食管鳞

收稿日期:2010-11-12;修回日期:2011-04-14

作者单位:1. 450000 郑州,郑州人民医院肿瘤内科;2. 郑州大学医学院病理学教研室

作者简介:林宏伟(1967-),女,硕士,副主任医师,主要从事恶性肿瘤的综合治疗

状细胞癌发生、发展以及浸润和转移中的作用。

### 1 资料与方法

#### 1.1 研究对象

42 例食管癌手术切除标本分别取自郑州大学第一附属医院和第二附属医院,其中包括女 18 例,男 24 例;年龄 35~77 岁,平均(59.75±6.77)岁。所有患者术前均未行化疗、放疗及免疫治疗。42 例患者均经病理组织学证实为鳞状细胞癌,其中 I 级 19 例、II 级 15 例、III 级 8 例;淋巴结转移组 14 例和无淋巴结转移组 28 例。据浸润深度分为浅层组 15 例(肿瘤浸润深度在浅肌层以下,包括黏膜层、黏膜下层)和深层组 27 例(肿瘤超过浅肌层浸润至深肌层或外膜层)。每例标本均在癌灶及远端正常黏膜组织处分别取材。癌旁组织取材于肿瘤边缘肉眼观察为正常黏膜但 Lugol's 液染色为不染区,癌旁组织为不典型增生组织。

#### 1.2 试剂与方法

UNIQ-10 柱式总 RNA 抽提纯化试剂盒购自上海生物工程有限公司,MMuLV 逆转录酶购自 MBI 公司,RNasin 购自华美生物工程技术公司,Cx43cDNA 引物序列:上游:5'-TTGGTCATGTGTGCTAAGGG-3',下游:5'-CCAGCTGTCCTGTCCATTCT-3';Cx26 cDNA 引物序列:上游:5'-TTGGTCATGTGTGCTAAGGG-3',下游:5'-CCAGCTGTCCTGTCCATTCT-3';内参 β-actin 引物序列:上游:5'-CAAGGCCAACCGCGAGAAGATG-3',下游:5'-CGACACGATGCAGCGGGACCTG-3';均由北京奥科生物工程有限公司合成。鼠抗人 Cx26 及 Cx43 多克隆抗体为美国 Sigma 公司产品;SP 免疫组织化学试剂盒为美国 Zymed 公司产品。

#### 1.3 结果判定

RT-PCR 阳性判断:目的基因 Cx26 的 RT-PCR 产物经凝胶电泳后,在紫外灯下出现 671 bp 荧光条带;Cx43 的 RT-PCR 产物经凝胶电泳后,在紫外灯下出现 495 bp 荧光条带。

免疫组织化学结果依照参照文献<sup>[1-2]</sup>确定 Cx43 蛋白和 Cx26 蛋白阳性表达的判定标准。Cx43 和 Cx26 蛋白位于细胞膜或细胞质内,阳性信号均呈棕黄色颗粒样物质。在显微镜下随机选取 5 个高倍视野(每个视野观察细胞数不少于 200 个),按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定。(1)按阳性细胞数占同类细胞数的百分比:<30%为 1 分,30%~70%为 2 分,>70%为 3 分;(2)按切片中细胞着色深浅评分:0 分:细胞无显色,1 分:浅黄色,2 分:棕黄色,3 分:棕褐色。取(1)、(2)两项评分的乘

积作为总积分,0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),≥4 分为阳性(+++)。

#### 1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,两样本率的比较采用四格表资料的  $\chi^2$  检验;多样本率的比较采用行列表资料的  $\chi^2$  检验;计量资料采用 *t* 检验,差异性分析用配对  $\chi^2$  检验,相关性检验用 Spearman 相关分析。以  $\alpha=0.05$  为显著性检验水准。

### 2 结果

#### 2.1 Cx26 mRNA 及 Cx43 mRNA 的表达

Cx26 在食管鳞状细胞癌组织、癌旁不典型增生组织以及正常食管黏膜组织中 mRNA 的相对含量依次增高,分别为(0.707±0.097)、(0.787±0.084)、(0.879±0.046),三组间两两比较,差异均有统计学意义( $F=63.945, P<0.05$ )。Cx43 mRNA 的相对含量在食管鳞状细胞癌组织、癌旁不典型增生组织以及正常食管黏膜组织中依次增高,分别为(0.692±0.084)、(0.715±0.037)和(0.783±0.051),三组间两两比较,差异均有统计学意义( $F=33.729, P<0.05$ ),见图 1、2。

#### 2.2 Cx26 mRNA 及 Cx43 mRNA 的表达与食管鳞癌临床病理生物学行为间的关系

食管鳞癌标本中 Cx26 mRNA 及 Cx43 mRNA 的相对含量与淋巴结转移情况、浸润深度、组织学分级有关( $P<0.05$ ),与食管鳞癌患者的性别及年龄无关( $P>0.05$ ),见表 1。

#### 2.3 Cx26 蛋白及 Cx43 蛋白的表达

食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜中 Cx26 蛋白的阳性表达率分别为 40.5%、70.6%、95.2%,两两相比,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。Cx43 蛋白阳性表达率分别为 31.0%、64.7%、88.1%,两两相比,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3、4。

#### 2.4 Cx26 蛋白及 Cx43 蛋白表达与食管鳞癌临床病理生物学行为的关系

Cx26 蛋白及 Cx43 蛋白在 42 例食管鳞癌标本中的阳性表达率与淋巴结转移情况、浸润深度、组织学分级有关( $P<0.05$ ),与食管鳞癌患者性别和年龄无关( $P>0.05$ ),见表 2。

#### 2.5 食管鳞癌组织 Cx26 mRNA 及 Cx43 mRNA 和蛋白表达的关系

Cx26 蛋白表达阳性的 17 例病例中,其相对含量为(0.830±0.070),Cx26 蛋白表达阴性的 25 例病例中,相对含量为(0.772±0.119),两组间比较差

异有统计学意义( $P < 0.01$ )。Cx43 蛋白表达阳性的 13 例病例中,其相对含量为( $0.762 \pm 0.044$ ), CX43 蛋白表达阴性的 29 例病例中,相对含量为( $0.645 \pm 0.071$ ),两组间比较差异有统计学意义( $P$

$< 0.01$ )。

2.6 食管鳞癌组织 Cx26 及 Cx43 蛋白表达的相关性分析

在食管鳞癌组织中 Cx26 蛋白和 Cx43 蛋白表

表 1 食管鳞癌组织中 Cx26 mRNA、Cx43 mRNA 表达与临床病理学参数间的关系

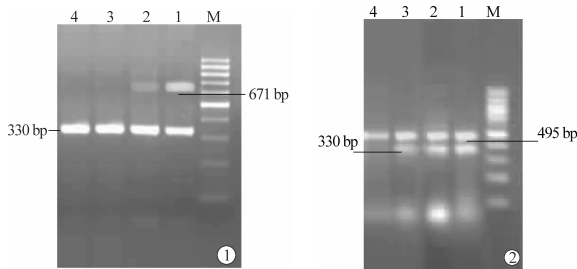
Table 1 Relationship between the expression of Cx26 mRNA and Cx43 mRNA and clinicopathological parameters in esophageal squamous cell carcinoma

Characteristics	<i>n</i>	Cx26 mRNA relative content	<i>F</i>	<i>P</i>	Cx43 mRNA relative content	<i>F</i>	<i>P</i>
Gender							
Male	24	0.782 ± 0.100			0.688 ± 0.072		
Female	18	0.807 ± 0.100	1.018	0.317	0.694 ± 0.091	1.325	0.312
Age(years)							
≥60	22	0.769 ± 0.084			0.669 ± 0.084		
<60	20	0.819 ± 0.110	0.880	0.352	0.713 ± 0.131	0.857	0.349
Histological grade							
I	19	0.816 ± 0.074			0.731 ± 0.084		
II	15	0.766 ± 0.092	5.222	0.008	0.707 ± 0.085	8.238	0.002
III	8	0.758 ± 0.099			0.638 ± 0.038		
Invasive depth							
Superficial layer	15	0.847 ± 0.112			0.726 ± 0.105		
Deep zone	27	0.785 ± 0.090	3.303	0.044	0.681 ± 0.059	3.317	0.041
Lymph node metastasis							
+	14	0.825 ± 0.083			0.785 ± 0.083		
-	28	0.768 ± 0.113	5.103	0.028	0.638 ± 0.113	17.184	0.000

表 2 食管鳞癌组织中 Cx26、Cx43 蛋白表达与临床病理学参数的关系

Table 2 Relationship between the expression of Cx26mRNA and Cx43 mRNA and clinicopathological parameters in esophageal squamous cell carcinoma

Characteristics	<i>n</i>	Cx26 protein expression			$\chi^2$	<i>P</i>	Cx43 protein expression			$\chi^2$	<i>P</i>
		-	+	Positive rate(%)			-	+	Positive rate(%)		
Gender											
Male	24	16	8	33.3			18	6	25.0		
Female	18	9	9	50.0	0.595	0.440	11	7	38.9	0.392	0.531
Age(years)											
≥60	22	11	11	50.0			14	8	36.4		
<60	20	14	6	30.0	1.008	0.315	15	5	25.0	0.213	0.644
Histological grade											
I	19	6	13	68.4			10	9	47.4		
II	15	12	3	20.0	11.952	0.003	11	4	26.7	6.288	0.016
III	8	7	1	12.5			8	0	0		
Invasive depth											
Superficial layer	15	1	14	93.3			4	11	73.3		
Deep zone	27	24	3	11.1	23.753	0.000	25	2	7.4	16.647	0.000
Lymph node metastasis											
+	14	3	11	78.6			3	11	78.6		
-	28	22	6	21.4	10.389	0.001	26	2	7.1	19.064	0.000



1: normal esophageal mucosa; 2: tumor-adjacent atypical hyperplasia epithelium; 3: esophageal squamous cell carcinoma; 4: negative control; M: Marker DNA Ladder

图 1 食管鳞癌及正常食管黏膜组织中 Cx26 基因 RT-PCR 结果

Figure 1 Expression of Cx26 mRNA was detected by RT-PCR in esophageal squamous cell carcinoma and normal esophageal mucosa

图 2 食管鳞癌及正常食管黏膜组织中 Cx43 基因 RT-PCR 结果

Figure 2 Expression of Cx43 mRNA was detected by RT-PCR in esophageal squamous cell carcinoma and normal esophageal mucosa

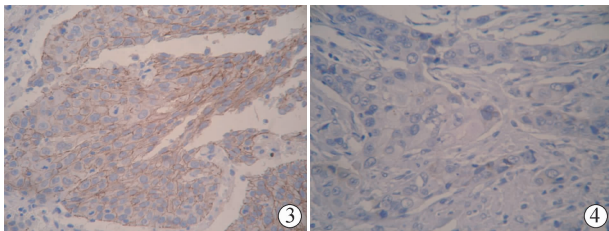


图 3 食管鳞癌组织中 Cx26 蛋白免疫组织化学检测 (SP × 200)

Figure 3 Expression of Cx26 in esophageal squamous cell carcinoma (SP × 200)

图 4 食管鳞癌组织中 Cx43 蛋白免疫组织化学检测 (SP × 200)

Figure 4 Expression of Cx43 in esophageal squamous cell carcinoma (SP × 200)

达呈正相关关系,在 Cx26 蛋白阳性表达的 17 例中,Cx43 蛋白表达阳性的有 12 例,而在 Cx26 蛋白表达阴性的 25 例中,Cx43 蛋白表达阴性有 24 例,两组之间比较差异有统计学意义( $r_s = 0.707, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

细胞间隙连接是普遍存在于动物组织中的一种细胞连接结构,细胞通过它进行细胞间信号传递,调控细胞的新陈代谢、增殖、分化等生理过程,对机体的代谢、平衡及生长发育有重要意义。国内外对细胞间隙通讯与癌变的关系进行了大量研究,发现多数肿瘤细胞无 GJIC 功能,其间隙连接少或无,邻近

正常组织或良性肿瘤的间隙连接正常。GJIC 在癌变过程中扮演着极为重要的作用<sup>[3]</sup>。连接蛋白(Cx)是 GJIC 物质基础,已有研究显示某些 Cx 基因具有抑制肿瘤生长的特点,如 Cx26、Cx43、Cx32 等<sup>[4]</sup>。转化细胞或者肿瘤细胞中 GJIC 的丧失均存在有 Cx 的异常表达,采用一定的药物或者基因转染的方式均可以增加 Cx 的基因表达,并且可以明显抑制肿瘤的生长。因此 Cx 基因被认为是又一类肿瘤抑制基因<sup>[5-7]</sup>。

本研究结果显示:食管正常黏膜中 Cx26 和 Cx43 mRNA 表达量均明显高于癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织,差异均有统计学意义( $P$  值均  $< 0.01$ )。上述结果提示食管鳞状细胞癌组织中存在有抑癌基因 Cx26、Cx43 mRNA 的表达下调,致使部分食管鳞癌组织中 Cx26、Cx43 蛋白缺失或表达下调。Cx26、Cx43 蛋白和 mRNA 表达下调可能参与了食管黏膜上皮细胞的恶性转化,说明其可能与食管鳞癌的发生相关。

研究发现多种肿瘤细胞的黏附、迁移、浸润转移与 Cx26、Cx43 基因的异常表达密切相关<sup>[8]</sup>。本研究显示:不同浸润深度的食管鳞癌组织中 Cx26、Cx43 mRNA 和蛋白表达均随癌组织浸润深度的加深而明显降低( $P < 0.05$ ),浸润浅层的鳞癌组织中 Cx26 及 Cx43 mRNA 相对表达量明显高于浸润深度深层者,两者相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 Cx26、Cx43 蛋白和 mRNA 的异常表达可能与食管鳞状细胞癌的浸润相关。有淋巴结转移的癌组织中 Cx26、Cx43 蛋白和 mRNA 的表达均明显低于无淋巴结转移的癌组织,两者相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明 Cx43、Cx26 mRNA 和蛋白的异常表达可能与食管鳞状细胞癌淋巴道转移有关,其表达异常可能作为食管鳞状细胞癌浸润、转移的标志之一。

有研究还发现 Cx26、Cx43 的表达与恶性肿瘤的分化程度及组织学类型密切相关,张海成等<sup>[9]</sup>在对膀胱移行细胞癌研究发现 Cx26 蛋白的异常表达与肿瘤组织学分级有明显的相关性( $P < 0.05$ )。本研究结果显示:I 级、II 级和 III 级食管鳞癌组织中 Cx26、Cx43 蛋白的表达随分化程度降低而明显下降,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 Cx26、Cx43 蛋白异常表达与食管鳞癌的分化程度有关。同时发现 Cx26、Cx43 mRNA 相对表达量随分化程度降低而下降,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果表明 Cx26、Cx43 基因在诱导食管癌等肿瘤细胞分化过程中起重要作用。

因此,Cx26、Cx43 基因可能抑制食管鳞癌发

生、发展及浸润、转移,其表达异常可能作为早期发现食管鳞癌发生和浸润转移的指标,但还有待于进一步研究。

**参考文献:**

[1] 李晟磊,刘宗文,赵秋民,等.食管鳞癌组织中 RECK mRNA 和蛋白的表达及意义[J].中国肿瘤临床,2007,34(22):1280-1286.

[2] 李晟磊,赵志华,赵秋民,等.食管鳞状细胞癌组织中 RECK 蛋白的表达与微血管密度检测[J].郑州大学学报(医学版),2007,42(6):1019-1021.

[3] Tao R, Hu MF, Lou JT, et al. Effects of H pylori infection on gap-junctional intercellular communication and proliferation of gastric epithelial cells in vitro [J]. World J Gastroenterol, 2007,13(4):5497-5500.

[4] Seo MS, Park JS, Yang SR, et al. Expression of MAP kinases and connexins in the differentiation of rat mammary epithelial

cells[J]. J Vet Med Sci,2006,68(6):567-571.

[5] Zhang Y W, Nakayama K, Nakayama K, et al. A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation; negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2) [J]. Cancer Res, 2003,63(7):1623-1630.

[6] Mesnil M. Connexins and cancer[J]. Biol Cell,2002,94(7-8):493-500.

[7] DelMonte U, Statuto M. Drop of connexins; a possible link between aging and cancer? [J]. Exp Gerontol,2004,39(2):273-275.

[8] Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer[J]. J Clin Pathol,2006,59(4):429-433.

[9] 张海成,叶钢,江永浩. 间隙连接蛋白 Cx26 和 Cx43 在膀胱癌中的表达[J]. 四川医学,2005,26(7):796-798.

[编辑校对:安 凤]

**(上接第 805 页)**

[10] Yamada K, Ogata S, Saiki Y, et al. Long-term results of intersphincteric resection for low rectal cancer [J]. Dis Colon Rectum, 2009, 52(6): 1065-1071.

[11] Dai Y, Jiang JB, Bi DS, et al. Preservation of the continence function after intersphincteric resection using a prolapsing technique in the patients with low rectal cancer and its clinical prognosis[J]. Chin Med J (Engl),2008, 121(20): 2016-2020.

[12] Weiser MR, Quah HM, Shia J, et al. Sphincter preservation in low rectal cancer is facilitated by preoperative chemoradiation and intersphincteric dissection[J]. Ann Surg, 2009, 249(2): 236-242.

[13] Schiessel R, Novi G, Holzer B, et al. Technique and long-term results of intersphincteric resection for low rectal cancer [J]. Dis Colon Rectum, 2005, 48(10): 1858-1865; discussion 1865-1867.

[14] Hohenberger W, Merkel S, Matzel K, et al. The influence of abdomino-peranal (intersphincteric) resection of lower third rectal carcinoma on the rates of sphincter preservation and locoregional recurrence[J]. Colorectal Dis, 2006, 8(1): 23-33.

[15] 卿三华. 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(11): 1760-1763.

[16] Akasu T, Takawa M, Yamamoto S, et al. Incidence and patterns of recurrence after intersphincteric resection for very low rectal adenocarcinoma[J]. J Am Coll Surg, 2007, 205(5): 642-647.

[17] Akasu T, Takawa M, Yamamoto S, et al. Intersphincteric resection for very low rectal adenocarcinoma; univariate and multivariate analyses of risk factors for recurrence[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(10): 2668-2676.

[18] Tiret E, Poupardin B, McNamara D, et al. Ultralow anterior resection with intersphincteric dissection—what is the limit of safe sphincter preservation? [J]. Colorectal Dis, 2003, 5(5): 454-457.

[19] Chamblou R, Parc Y, Simon T, et al. Long-term results of intersphincteric resection for low rectal cancer[J]. Ann Surg, 2007, 246(6): 916-921; discussion 921-922.

[20] Portier G, Ghouti L, Kirzin S, et al. Oncological outcome of ultra-low coloanal anastomosis with and without intersphincteric resection for low rectal adenocarcinoma [J]. Br J Surg, 2007, 94(3): 341-345.

[21] Rullier E, Goffre B, Bonnel C, et al. Preoperative radiochemotherapy and sphincter-saving resection for T3 carcinomas of the lower third of the rectum[J]. Ann Surg, 2001, 234(5):633-640.

[22] Elshazly WG, Farouk M, Samy M, et al. Preoperative concomitant radiotherapy with oral capecitabine in advanced rectal cancer within 6 cm from anal verge[J]. Int J Colorectal Dis, 2009, 24(4): 401-407.

[23] Williams NS, Bhan C, Murphy J, et al. Functional results of intersphincteric resection for low rectal cancer[J]. Br J Surg, 2007, 94(10): 1272-1277.

[24] Yoo JH, Hasegawa H, Ishii Y, et al. Long-term outcome of per anum intersphincteric rectal dissection with direct coloanal anastomosis for lower rectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2005, 7(5):434-440.

[25] Chin CC, Yeh CY, Huang WS, et al. Clinical outcome of intersphincteric resection for ultra-low rectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(4):640-643.

[编辑:周永红;校对:安 凤]