

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.08.016

锌指转录因子 Snail 及 E-钙黏附素在食管鳞癌中的表达及意义

范天黎¹, 侯桂琴², 席宇³, 王艳鸽⁴, 李晟磊⁵, 刘红涛³

Expression of Zinc Finger Transcription Factor Snail and E-cadherin in Esophageal Cancer and Its Significance

FAN Tian-li¹, HOU Gui-qin², XI Yu³, WANG Yan-ge⁴, LI Sheng-lei⁵, LIU Hong-tao³

1. Department of Pharmacology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China, 2. Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, 3. Department of Bioengineering; 4. Department of Cell Biology and Genetics, Medical College of He'nan Univerity; 5. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital Zhengzhou University, He'nan Key Laboratory of Tumor Pathology

Corresponding Author: LIU Hong-tao, E-mail: liuht1230@126.com

Abstract: Objective To detect the expression of zinc finger transcript factor Snail and E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma(ESCC), and explore the association between those molecules and invasion and metastasis of esophageal cancer. **Methods** Immunohistochemical method was used to investigate the expression of Snail and E-cadherin proteins in 62 cases of ESCC, 31 cases of adjacent atypical hyperplasia epithelium, and 62 cases of normal esophageal epithelium, and relationship between the expression of Snail and E-cadherin and the clinic pathological data in ESCC was analyzed.

Results Expression of both Snail and E-cadherin proteins were tightly associated with tissue grade, invasion depth and lymph node metastasis ($P < 0.05$). In addition, the positive expression rate of Snail protein in ESCC, adjacent atypical hyperplasia epithelium and normal esophageal epithelium tissue were 79.0% (49/62), 48.4% (15/31) and 17.7% (11/62), respectively, and there was a significant difference among the 3 groups ($\chi^2 = 50.129, P < 0.01$), whereas the positive expression rate of E-cadherin protein in ESCC, adjacent atypical hyperplasia epithelium and normal esophageal epithelium tissue were 40.3% (25/62), 71.0% (22/31) and 95.2% (59/62), respectively, and there was a significant difference among the 3 groups ($\chi^2 = 48.426, P < 0.01$). Further correlation analysis revealed that expression of Snail and E-cadherin appeared negative correlation in ESCC. **Conclusion**

Aberrant expression of Snail and E-cadherin may be closely correlated with the development and progression of ESCC, detection of combination of Snail and E-cadherin may be the important biology marker of invasion and metastasis of ESCC.

Key words: Zinc finger transcription factor Snail; E-cadherin; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; Invasion and metastasis

摘要:目的 检测锌指转录因子 Snail 及 E-钙黏附素(E-cadherin)蛋白在食管鳞癌中的表达,分析其与食管鳞癌侵袭、转移的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 Snail 及 E-cadherin 在 62 例食管鳞癌组织、31 例癌旁不典型增生组织及 62 例正常食管黏膜组织中的表达,并分析其与临床病理参数的关系。**结果** 食管鳞癌组织中 Snail 及 E-cadherin 蛋白表达均与癌的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$);在食管鳞癌癌变过程中 Snail 蛋白表达在癌组织、癌旁不典型增生

组织及正常黏膜组织中的表达率依次降低,分别为 79.0% (49/62)、48.4% (15/31)、17.7% (11/62),组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 50.129, P < 0.01$);而 E-cadherin 蛋白在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达率依次升高,分别为 40.3% (25/62)、71.0% (22/31)、95.2% (59/62),组间比较差异有统

收稿日期:2009-04-14;修回日期:2009-10-21

基金项目:河南省医学科技攻关资助项目(20050009)

作者单位:1. 450001 郑州,郑州大学基础医学院药理学教研室,2. 药学院临床药理学系,3. 生物工程系;4. 河南大学医学院细胞生物学与遗传学教研室;5. 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室

通信作者:刘红涛,E-mail:liuht1230@126.com

作者简介:范天黎(1969-),女,博士,讲师,主要从事肿瘤分子生物学研究

计学意义($\chi^2 = 48.426, P < 0.01$)。进一步相关性分析表明: Snail 和 E-cadherin 蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈负相关。
结论 Snail 及 E-cadherin 蛋白的异常表达可能与食管鳞癌的发生、发展密切相关,二者的联合检测有可能作为食管鳞癌侵袭、转移的重要生物学标志。

关键词: 锌指转录因子 Snail; E-钙黏附素; 食管鳞癌; 免疫组织化学; 浸润转移

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2010)08-0918-04

0 引言

侵袭及转移是大多数恶性肿瘤的生物学特性,如何才能更有效的控制其侵袭、转移是目前肿瘤界的难题。Snail 是新近发现的一种锌指转录因子,它可以通过下调 E-cadherin 的表达而降低细胞的黏附力,同时也可以通过上调基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)的表达来增加细胞的侵袭力^[1]。本研究采用免疫组织化学法检测了食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中 Snail 及 E-cadherin 的表达,探讨其在食管黏膜上皮癌变过程中的作用,以期寻找早期诊断和判断预后的分子指标。

1 资料和方法

1.1 资料

62 例食管癌手术切除标本于 2006 年 2 月 26 日—3 月 16 日取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院,所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。其中男 36 例,女 26 例,年龄 38~75(平均 60.6 ± 9.5)岁。所有标本经过病理组织学证实均为鳞状细胞癌。其中组织学分级 I 级 15 例,II 级 25 例,III 级 22 例;伴淋巴结转移者 20 例,无淋巴结转移者 42 例。浸润深度分三组,浸达浅肌层者 7 例,浸达深肌层者 14 例,浸达纤维膜者 41 例。全部样本分别在癌灶、癌旁 3 cm 以内以及远端正常黏膜组织 3 部位取材,经 40 g/L 多聚甲醛液固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚度 4~6 μm,分别用于 HE 和

免疫组织化学染色。羊抗人 Snail 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体及 SP 免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术开发公司。

1.2 方法

采用免疫组织化学 SP 法,Snail 及 E-cadherin 稀释倍数分别为 1:80 和 1:100, DAB 显色,苏木精对比染色。染色步骤严格按照说明书进行,以 PBS 液代替 I 抗体作为阴性对照,以已知阳性反应切片作为阳性对照。Snail 及 E-cadherin 蛋白阳性信号均呈棕黄色颗粒样物质,Snail 主要位于细胞核;E-cadherin 主要位于细胞膜。高倍镜下随机选取 5 个视野(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^[2-3]。(1)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。(2)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。取(1)、(2)两项评分的乘积作为总积分,0~1 分为阴性(-),≥2 分为阳性(+).

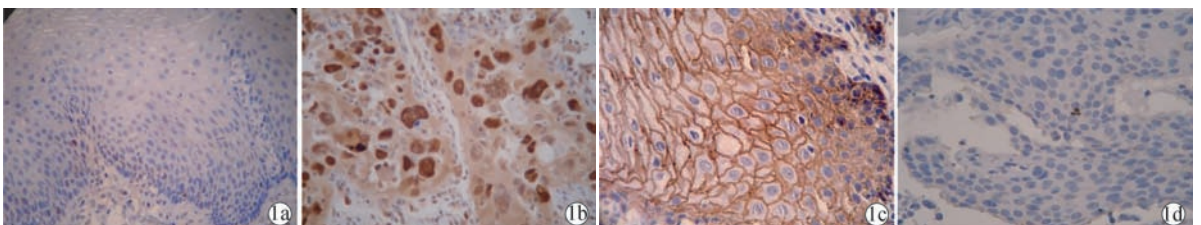
1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计学软件,采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Snail 蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系

Snail 蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞核中,呈浅黄色至深黄色,见图 1a、1b。在食管鳞癌癌变过程中 Snail 蛋白表达在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达率依次降低,分别为 79.0%(49/62)、48.4%(15/31)、17.7%(11/62),组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 50.129, P < 0.01$)。Snail 蛋白表达与食管鳞癌患者的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关(χ^2 分别为 9.794、15.588、6.076, P 均 < 0.05),见表 1。



1a: Expression of Snail in normal esophageal epithelium tissues; 1b: Expression of Snail in ESCC tissues; 1c: Expression of E-cadherin in normal esophageal tissues; 1d: Expression of E-cadherin in ESCC tissues

图 1 Snail、E-cadherin 在正常食管上皮和癌组织中的表达(SP × 400)

Figure 1 Expression of Snail and E-cadherin in normal esophageal epithelium and ESCC tissues (SP × 400)

表 1 Snail 和 E-cadherin 蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

Table 2 The relationship between the expression of Snail and E-cadherin and the clinic pathological data in ESCC

Characteristics	n	Snail			χ^2	P	E-cadherin			χ^2	P
		-	+	Positive ratio(%)			-	+	Positive ratio(%)		
Tissue grade											
I	15	7	8	53.3	9.794	0.007	4	11	73.3	9.962	0.007
II	25	5	20	80.0			16	9	36.0		
III	22	1	21	95.9			17	5	22.7		
Invasion depth											
Superficial muscular layer	7	5	2	28.6	15.588	0.000	1	6	85.7	11.063	0.004
Deep muscular layer	14	5	9	64.3			6	8	57.1		
Fibrous membrane	41	3	38	92.7			30	11	26.8		
Lymph node metastasis											
No	42	13	29	69.0	6.076	0.014	21	50.0	3.897	0.048	
Yes	20	0	20	100			4	20.0			

2.2 E-cadherin 蛋白在食管鳞癌中的表达及其与临床生物学行为的关系

E-cadherin 蛋白阳性着色定位于细胞膜,呈棕黄色或深黄色,见图 1c、1d。在正常食管黏膜组织中 E-cadherin 的表达主要定位于细胞膜,在食管癌组织中 E-cadherin 的表达或定位于细胞膜、或其膜表达消失,但是我们的实验过程中发现,在食管癌组织中没有见到 E-cadherin 的核表达或胞质表达。此外,在食管鳞癌癌变过程中 E-cadherin 蛋白在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达率依次升高,分别为 40.3%(25/62)、71.0%(22/31)、95.2%(59/62),组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 48.426, P < 0.01$)。E-cadherin 蛋白阳性表达率随着组织学分级、浸润深度的增加逐渐降低(χ^2 分别为 9.962、11.063, P 均 < 0.05);有淋巴结转移组 E-cadherin 蛋白阳性表达率明显低于无淋巴结转移组($\chi^2 = 3.897, P < 0.05$),见表 1。

2.3 Snail 和 E-cadherin 蛋白在食管鳞癌组织中表达的相关性分析

在 Snail 蛋白表达阳性的 49 例中,其 E-cadherin 表达阳性的占 15 例,而在 Snail 蛋白表达阴性的 13 例中,其 E-cadherin 表达阴性的占 10 例。Snail 和 E-cadherin 在食管鳞癌组织中的表达呈负相关($\gamma = -0.384, P < 0.01$)。

3 讨论

食管癌是我国最常见的消化系统的恶性肿瘤之一,尤其是在河南安阳地区发病率非常高。随着医疗技术的发展、分子生物学的广泛应用以及各相关部门的不懈努力,近年来河南安阳地区食管癌的发

病率已有较明显的下降,但其具体作用机制仍有待于进一步研究。

脊椎动物的 Snail 家族包括两个成员:Snail 和 Slug。Snail 最初在果蝇体内发现,定位于人类染色体 20q13.13。目前的研究结果显示,其同源分子在大多数种属的动物体内均存在。Snail 家族成员编码具有锌指结构的转录因子,这些转录因子都具有类似的结构,包括含有 4~6 个锌指结构的高度保守的羧基末端区域和多变的氨基酸末端区域,其中 Cys-His(C₂H₂) 锌指结构中的 2 个半胱氨酸和 2 个组氨酸残基能与 Zn²⁺ 形成配键,可以通过序列特异的 DNA 连接构象发挥作用。锌指由 2 个 β 折叠片,1 个 α 螺旋和含有 1 个 DNA 连接凹槽的氨基酸末端区域构成。Snail 可与靶基因上含有的 CAGGTG 核心碱基序列的 E-box 作用元件结合,从而调节其表达^[4-6]。E-cadherin 被认为是 Snail 直接作用的靶基因。Snail 通过直接抑制 E-cadherin 的表达,将上皮细胞转换成为间充质细胞。在对 E-cadherin 启动子的研究中发现,在启动子 5' 端序列存在调控元件,这个调控元件包含有 2 个 E-box(E-盒)结构,其内含一致的 5' - CAGGTG 序列,Snail 可与 E-box 结合,在转录水平上抑制 E-cadherin 的表达^[7-9]。小鼠 Snail 与 HDAC1/2 和共抑制物 mSin3A 可形成多分子的抑制复合物,从而改变基因的局部结构来抑制 E-cadherin 的表达^[10]。

本实验结果显示,Snail 蛋白在正常食管组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中均有表达,但在癌组织中的表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 Snail 高表达的肿瘤可能具有更强的侵袭能力。而食管癌组织中 E-cadherin 的表达水

平与正常组织相比显著降低,这与之前在乳腺癌、肺癌和胃癌的临床研究结果一致^[11-13]。此外,我们的研究发现,在正常食管黏膜组织中 E-cadherin 的表达主要定位于细胞膜,在食管癌组织中 E-cadherin 的表达或定位于细胞膜、或其膜表达消失,未见食管癌组织中 E-cadherin 的核表达或胞质表达。E-cadherin 低表达可促进细胞外基质的降解,有利于肿瘤细胞的侵袭和转移,这充分表明 Snail 参与对 E-cadherin 的调节。此外,结果还表明,食管鳞癌组织中 Snail 和 E-cadherin 蛋白表达均与癌的组织学分级、浸润深度及淋巴结转移密切相关(P 均 < 0.05),且两者在食管鳞癌组织中的表达呈负相关,提示 Snail 和 E-cadherin 在食管鳞癌的发生发展中发挥重要作用。

目前,肿瘤细胞中 Snail 表达的机制仍不甚清楚,对参与肿瘤发生发展、浸润、转移的分子机制还研究不多。研究推测 Snail 可能作为转录因子,居于信号通路级联反应的中心环节,对其上游信号转导通路以及下游 Snail 靶基因进行调控。通过阻断 Snail 信号途径,有望降低食管鳞癌的恶性程度及浸润转移率,改善患者预后。肿瘤侵袭转移的机制十分复杂,受多种因素的影响,是一种相互协调、相互作用的过程。其中 E-cadherin 介导的黏附系统的破坏是一个主要事件,而 Snail 在这个过程中发挥了重要的作用。因此,下一步我们将通过研究 Snail 在食管癌中的调控机制,更深入了解其在食管癌发生发展中的作用,该研究有望为 Snail 作为转移潜能的标志物提供理论依据,为其早日应用于临床打下坚实的基础,进一步为提高患者的生存率起到积极的作用。

参考文献:

[1] Laffin B, Wellberg E, Kwak HI, et al. Loss of single-minded-2s in the mouse mammary gland induces an epithelial-mesenchymal transition associated with up-regulation of slug and ma-

trix metalloprotease 2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(6): 1936-1946.

- [2] 林称意,郭家龙,左顺庆,等. PTTG 与 c-myc 在食管癌中的表达及其相关性 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36 (5): 415-418.
- [3] 李兰梅,金东岭,梁爽,等. survivin 和 CK18 在甲状腺肿瘤中的表达 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36 (5): 409-411.
- [4] Twigg SR, Wilkie AO. Characterisation of the human snail (SNAI1) gene and exclusion as a major disease gene in cranio-synostosis[J]. *Hum Genet*, 1999, 105(4): 320-326.
- [5] Tomassetti A, De Santis G, Castellano G, et al. Variant HNF1 modulates epithelial plasticity of normal and transformed ovary cells [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(12): 1481-1492.
- [6] Selck H, Aufderheide J, Pounds N, et al. Effects of food type, feeding frequency, and temperature on juvenile survival and growth of *Marisa cornuarietis* (Mollusca: Gastropoda) [J]. *Invertebr Biol*, 2006, 125(2): 106-116.
- [7] Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(9): 3533-3544.
- [8] Espineda CE, Chang JH, Twiss J, et al. Repression of Na,K-ATPase beta1-subunit by the transcription factor snail in carcinoma [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(3): 1364-1373.
- [9] Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells [J]. *Biochem J*, 2006, 394 (Pt 2): 449-457.
- [10] Peinado H, Ballestar E, Esteller M, et al. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (1): 306-319.
- [11] Zhang YG, DU J, Tian XX, et al. Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120 (18): 1597-1605.
- [12] Dohadwala M, Yang SC, Luo J, et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin; prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (10): 5338-5345.
- [13] 葛杰,陈子华,陈志康,等. CDX₂ 和 E-钙粘附素在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. *南方医科大学学报*, 2008, 28(2): 279-281.

[编辑:周永红;校对:刘红武]