

Caveolin-1 在腮腺多形性腺瘤及瘤旁组织中的表达及临床意义*

张松^{①③} 田向永^② 袁孝伟^② 柯少瑞^② 孙志艳^④ 莫赛军^②

摘要 目的:探讨窖蛋白-1(Caveolin-1, Cav-1)在腮腺多形性腺瘤(pleomorphic adenoma, PA)中的表达及临床意义。**方法:**采用免疫组织化学法检测了9例正常腮腺、33例原发性PA距离瘤体中心(0 cm)及瘤旁组织中(分别距瘤体中心0.5、1.0、1.5和2.0 cm)Cav-1的表达,并进行统计学分析。**结果:**Cav-1在所有正常腮腺样本(100%)均有表达,其主要在导管系统细胞质和细胞膜中表达;除6例距瘤体中心0.5 cm和1例距瘤体中心1.0 cm的样本外,其余瘤旁样本均有Cav-1表达,其表达模式基本上与正常腮腺类似;在PA中,有10例样本(30.30%)表达Cav-1,且在细胞核中显著表达。Cav-1在多形性腺瘤肿瘤组织中的表达最低,并随着与瘤体中心距离的远近,其表达量逐渐升高。Cav-1的表达在瘤体与瘤旁组织间均存在明显差异($P<0.05$),但瘤旁组织1.0、1.5和2.0 cm间Cav-1表达无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**在腮腺多形性腺瘤发生过程中,Cav-1中表达下调并出现了从细胞质、细胞膜到细胞核的转位现象。上述结果表明Cav-1在多形性腺瘤的发生发展中可能起着重要作用,其表达水平的变化可作为判定手术安全边缘的科学依据之一。

关键词 Caveolin-1 多形性腺瘤 腮腺 手术切缘

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20131149

Expression and clinical significances of caveolin-1 in pleomorphic adenoma and paraneoplastic tissues of parotid gland

Song ZHANG^{1,3}, Xiangyong TIAN², Xiaowei YUAN², Shaorui KE², Zhiyan SUN⁴, Saijun MO²

Correspondence to: Saijun MO; E-mail: sjmo@zzu.edu.cn

¹The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052; ²Department of Basic Oncology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001; ³Department of Radiotherapy, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450053; ⁴The Army Orthopaedic Trauma Center, No. 153 Central Hospital of The Chinese People's Liberation Army, Zhengzhou 450001, China.

This work was supported by The Natural Science Foundation of China (No. 81101686) and the Foundation of He'nan Educational Committee (No. 12A310008).

Abstract Objective: This study was conducted to explore the expression and clinical significance of caveolin-1 (Cav-1) in pleomorphic adenoma and paraneoplastic tissues of the parotid gland. **Methods:** Immunohistochemistry was used to detect Cav-1 expression in normal parotid glands, pleomorphic adenoma (0 cm), and paraneoplastic tissues (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 cm from the pleomorphic adenoma). **Results:** Cav-1 was expressed in all normal parotid glands and was mainly expressed in the cytoplasm and plasma membrane of duct systems. Except for six samples 0.5 cm away and one sample 1.0 cm away from the pleomorphic adenoma, Cav-1 was expressed in other adjacent normal tissues, and the expression pattern of Cav-1 was similar to that in normal tissues. In pleomorphic adenoma, Cav-1 only existed in seven samples (accounting for 30.30%) and was prominently expressed in the nucleus. The expression level of Cav-1 was lowest in pleomorphic adenoma and progressively increased with increasing distance from the tumor. A difference in Cav-1 expression was detected between pleomorphic adenoma (0 cm) and paraneoplastic tissues (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 cm from the tumor, $P<0.05$). However, no statistical significance existed between paraneoplastic tissues at 1.0, 1.5, and 2.0 cm from the tumor ($P>0.05$). **Conclusion:** During the development of pleomorphic adenoma, the expression level of Cav-1 progressively decreased, and translocation of Cav-1 expression from cytoplasm and plasma membrane to nucleus occurred. Cav-1 may have an important role in the progress of pleomorphic adenoma, and the variation in the expression level of Cav-1 may be used as a scientific evidence to determine the safe surgical margin of pleomorphic adenoma.

Keywords: Caveolin-1, pleomorphic adenoma, parotid gland, surgical margins

作者单位:①郑州大学第一附属医院(郑州市450052);②郑州大学基础医学院基础肿瘤学教研室;③郑州人民医院放疗科;④中国人民解放军第一五三中心医院全军创伤骨科中心

*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:81101686)和河南省教育厅科学技术研究重点基金项目(编号:12A310008)资助

通信作者:莫赛军 sjmo@zzu.edu.cn

Cav-1是一个可与多个蛋白相互作用的半跨膜蛋白,在多种肿瘤中不仅表达异常,而且与肿瘤发生过程中细胞恶性转化、增殖、侵袭和转移等密切相关。Cav-1在肿瘤发生过程中的作用具有两面性,即一方面具有抑癌效应,如在卵巢癌、肺癌、胃癌等中Cav-1表达明显下降,抑制肿瘤发展及转移;另一方面可发挥致癌作用,如在前列腺癌、肾癌、膀胱癌等肿瘤细胞中,Cav-1表达上调且促进癌细胞的浸润^[1-3]。研究还发现,Cav-1的表达变化不仅具有上述的组织类型差异,其还与肿瘤发生发展阶段不同以及同一组织的不同细胞类型相关^[4-5]。作为混合瘤的PA,其组织来源、细胞类型复杂,且无完整包膜、具有一定的浸润生长特性,手术治疗后容易复发且存在恶变倾向。目前,临床上主要依靠术前影像学表现、术中肉眼观察及冰冻切片结果来评估安全切缘,但三者均存在不足,从而导致切除后肿瘤复发^[6]。因此,尽早发现肿瘤、界定和明确手术切缘并尽早进行手术具有非常重要的研究价值和临床意义。目前虽然已知Cav-1在涎腺黏液表皮样癌中随着病理级别和临床分期的增高表达下降^[7-8],但其在无任何临床症状的早期阶段,即在多形性腺瘤发生发展阶段,其蛋白质表达水平和细胞类型是否发生变化尚不清楚,因此本研究旨在探讨Cav-1在PA中的表达及其与多形性腺瘤发生发展的相关性,为其作为早期发现肿瘤以及临床判定手术边缘的分子指标奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

收集郑州大学第一附属医院及郑州人民医院2010年3月至2013年12月间病理诊断为PA 33例,其中男性16例,女性19例;患者平均年龄41~65岁。同时收集上述病例的瘤旁组织,均经10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm厚连续切片,HE染色后进行组织学观察,形态学上符合PA的诊断标准。以上标本均得到郑州大学生命科学伦理审查委员会认可。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 常规石蜡包埋组织,4 μm厚连续切片后脱蜡,梯度酒精水化后进行抗原修复,自然冷却至室温。加3% H₂O₂室温孵育5~10 min, PBS冲洗。滴加正常山羊血清封闭非特异性抗原后,加1:100一抗Cav-1(200 μg/mL),4℃孵育过夜, PBS冲洗。滴加二抗37℃反应15 min, PBS冲洗。加SP反应15 min, DAB显色。苏木素轻度复染,脱水、透明、封片。免疫组织化学阳性结果判断标准:以细胞

内出现棕黄色为阳性信号,依据阳性细胞百分数和染色强度进行综合评分。阳性细胞评分:切片中阳性细胞数<1%为0分,1%~5%为1分,16%~20%为2分;21%~50%为3分,51%~100%为4分;以阳性细胞染色强弱评分:基本未着色为0分;着色较浅,略高于背景为1分;着色淡黄为2分;着色棕黄为3分;着色棕褐色为4分。两项乘积≥2为免疫反应阳性,<2分为(-),2~3分为(+),4~6分为(++),>6分为(+++)。对细胞核阳性信号的判断为:切片中阳性细胞数<1%为0分,1%~5%为1分,6%~10%为2分;>10%为3分;以阳性细胞染色强弱评分:基本未着色为0分;着色淡黄为1分;着色棕黄为2分。两项乘积≥2为免疫反应阳性,<2分为(-),2~3分为(+),4~6分为(++).

1.2.2 图像处理 先对每个切片进行仔细镜检分析,然后采用OLYMPUS显微镜和佳能数码相机每张切片对细胞密集区取4个视野,

1.3 统计学分析

应用Image-Pro Plus 6.0(IPP 6.0)软件分析系统对阳性细胞的累积光密度(IOD)进行分析。采用SPSS 15.0统计软件包进行分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Caveolin-1的表达分布

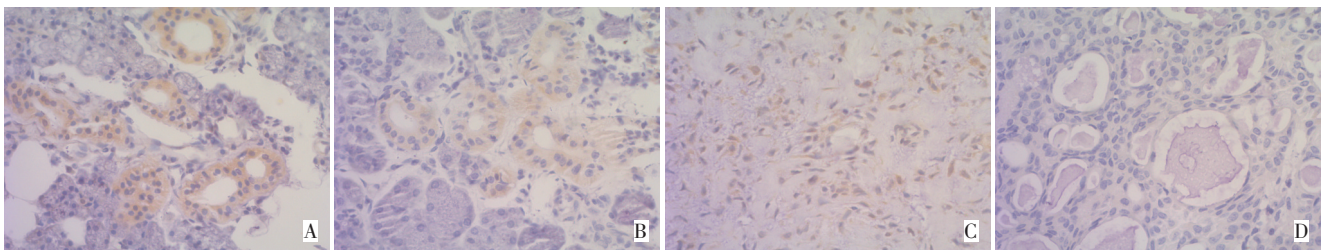
采用免疫组织化学对9例正常腮腺、33例PA瘤体中心(0 cm)及瘤旁组织中(分别距瘤体中心0.5、1.0、1.5和2.0 cm)Cav-1的表达分别进行检测。结果显示Cav-1在所有正常腮腺样本(100%)均有表达,且主要在导管上皮细胞质和细胞膜中表达,腺泡细胞几乎不表达(图1A)。除6例距瘤体中心0.5 cm和1例距瘤体中心1.0 cm的样本外,其余瘤旁样本均有Cav-1表达(表1),其表达模式基本上与正常腮腺类似(图1B)。在多形性腺瘤中,有10例样本(30.30%)表达Cav-1(表1),且在细胞核中显著表达(图1C,表2);其余23例样本(69.70%)几乎未检测到Cav-1的表达(表1和图1D)。在正常腮腺和瘤旁2.0 cm组织中,Cav-1在细胞核中几乎无表达,而在瘤旁0.5、1.0、1.5 cm组织中,虽然细胞核表达的样本数较多(分别为18、14和7例),但每例样本中仅有1%~5%的细胞存在细胞核阳性信号(表2)。

2.2 Caveolin-1表达与PA发生的相关性

对33例PA及瘤旁组织中Cav-1表达的样本数进行分析,结果显示随着与瘤体距离的增加,不仅Cav-1阳性表达的样本数距离的远近,其阳性表达强度也同样递增(表1)。

采用IPP 6.0软件对切片中免疫组织化学染色胞浆中的阳性信号进行定量分析,计算每张切片(4个视野图片)的积分光密度(integral optical density, IOD),采用SPSS15.0统计软件分析其结果。研究结果显示PA、瘤旁组织(0.5、1.0、1.5、2.0cm)和正常组织的IOD($\bar{x}\pm s$)值分别为9.91±19.34、68.25±40.12、92.27±51.22、103.42±61.46、100.97±45.93和104.29±10.52。多形性腺瘤中Cav-1的表达水平显著低于瘤旁组织,且随着距瘤体的远近,Cav-1表达水平逐渐升高(表1)。多形性腺瘤中Cav-1的表达与瘤旁

组织(0.5、1.0、1.5、2.0 cm)相比,差异具有统计学意义($P<0.01$);瘤旁0.5 cm与瘤旁1.0、1.5、2.0 cm组织相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);而瘤旁1.0 cm与1.5、2.0 cm组织相比,差异无统计学意义($P>0.05$),瘤旁1.5 cm与2.0 cm组织相比,差异亦无统计学意义($P>0.05$)。另外分析结果还显示,正常腮腺中Cav-1的表达,与多形性腺瘤相比具有明显差异($P<0.01$);与瘤旁0.5 cm组织相比表达差异具有统计学意义($P<0.05$);但与瘤旁1.0、1.5、2.0 cm组织相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。



A. Normal tissues of the parotid gland (the arrow points to the positive signals in cytoplasm and nuclear areas); B. tissues located a certain distance away from the pleomorphic adenoma (one sample 0.5 cm away from pleomorphic adenoma, the arrow point to the positive signals in cytoplasm and nuclear); C. pleomorphic adenoma with Cav-1 positive signals (the arrow points to the positive signals in the nuclear area); D. pleomorphic adenoma with negative Cav-1 signal

图1 Cav-1在正常腮腺、多形性腺瘤及瘤旁组织中的表达 (H&E×200)

Figure 1 Expression of Cav-1 in normal tissues and tissues located at a certain distance away from pleomorphic adenoma and pleomorphic adenoma of the parotid gland (H&E×200)

表1 Caveolin-1在正常腮腺、腮腺多形性腺瘤(PA)及瘤旁组织中的表达分布 例

Table 1 Expression of Cav-1 in normal tissues and tissues located at a certain distance away from pleomorphic adenoma and pleomorphic adenoma of the parotid gland n

Positive signals	PA	Tissues apart from PA (cm)				Normal tissues
		0.5	1.0	1.5	2.0	
-	23	6	1	0	0	0
+	4	21	8	5	4	0
++	6	5	19	20	23	8
+++	0	1	5	8	6	1
Total	33	33	33	33	33	9

表2 Caveolin-1在正常腮腺、腮腺多形性腺瘤(PA)及瘤旁组织细胞核中的表达分布 例

Table 2 Nuclear distributions of Cav-1 in normal tissues and tissues located at a certain distance away from pleomorphic adenoma and pleomorphic adenoma of the parotid gland n

Positive signals in nuclear	PA	Tissues apart from PA (cm)				Normal tissues
		0.5	1.0	1.5	2.0	
-	23	15	19	26	33	9
+	4	18	14	7	0	0
++	6	0	0	0	0	0
Total	33	33	33	33	33	9

3 讨论

Cav-1在肿瘤发生过程中既有抑癌效应,又有致癌作用^[1-2]。有研究表明,Cav-1在涎腺黏液表皮样癌中随着病理级别和临床分期的增高表达下降^[7-8]。上述研究结论表明Cav-1从腮腺良性病变到恶性发展的过程中均发挥抑制作用,因此Cav-1表达水平的降低可作为腮腺瘤变以及癌变过程中的监测指标之一。

蛋白质亚细胞定位变化在肿瘤发生过程中起着重要的作用,目前改变某些蛋白质的亚细胞定位在肿瘤治疗中的研究已取得了重大进展^[9-10]。本研究的正常腮腺组织中,Cav-1在导管系统的胞浆和胞膜稳定表达;在大部分瘤旁组织中其表达模式基本与正常腮腺组织中一致。值得注意的是,PA中Cav-1除在胞浆和胞膜中表达外,在肿瘤细胞核中大量表达,表明Cav-1在细胞核中的富集可能与PA发生相关。研究表明Cav-1表达下调可增强 β -catenin-TCF/LEF-1的转录活性,从而促进肿瘤细胞的浸润和转移^[1]。已知 α - β -catenin-E-cadherin复合物稳定性与肿瘤浸润转移密切相关^[11-12],而且 β -catenin在腮腺正常组织、多形性腺瘤旁组织及PA中表达水平逐渐升高^[13]。因此PA具有高浸润生长特性可能与下调表达,Cav-1增强 β -catenin的表达相关。但亦有研究表明,Cav-1超表达与E-cadherin/ β catenins复合体中某一分子异常表达相关^[2,14]。出现该结果的原因可能与Cav-1在不同肿瘤、或相同肿瘤细胞类型、或肿瘤发生不同阶段的作用及机制不同有关^[1-3,15]。

本研究结果表明Cav-1在PA中的表达与瘤旁组织、正常组织相比,其阳性表达率和强度均存在显著差异。PA中Cav-1表达下调可能与其高浸润转移特性相关。对PA临床手术具有较好的指导意义,因此Cav-1是一个判定肿瘤早期发生以及临床判定PA手术安全边缘的候选分子指标。

参考文献

- 1 Senetta R, Stella G, Pozzi E, et al. Caveolin-1 as a promoter of tumour spreading: when, how, where and why[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(3):325-336.
- 2 Mo SJ, Yang SL, Cui Z. New glimpses of caveolin-1 functions in embryonic development and human diseases[J]. Front Biol, 2011, 6(5):367-376.
- 3 Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, et al. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(4):715-735.
- 4 Schlegel A, Arvan P, Lisanti MP. Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2001, 276(6):4398-4408.
- 5 Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, et al. Different roles for caveo-

- lin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(12):4277-4285.
- 6 Li C, Xu YQ, Fan JC. Advances in the Research of Surgical Margins for Pleomorphic Adenoma of Parotid Gland[J]. Chin J Clin Oncol, 2011, 38(4):238-240. [李超,徐义全,樊晋川.腮腺多形性腺瘤手术切缘研究进展[J].中国肿瘤临床,2011,38(4):238-240.]
- 7 Shi L, Chen XM, Wang L, et al. Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome[J]. Cancer, 2007, 109(8):1523-1531.
- 8 Shi L, Chen XM, Chen Z, et al. Expression and Significant of Caveolin-1 and PCNA in Mucoepidermoid Carcinoma of Salivary Glands[J]. Journal of Oral Science Research, 2011, 27(7):596-599. [史璐,陈新明,陈智,等.涎腺粘液表皮样癌中Caveolin-1、PCNA的表达及意义[J].口腔医学研究,2011,27(7):596-599.]
- 9 Xia X, Ma Q, Li X, et al. Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2011, 11:399.
- 10 Saifo MS, Rempinski DJ, Rustum YM, et al. Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers[J]. Mol Cancer, 2010, 9:310.
- 11 Lu Z, Ghosh S, Wang Z, et al. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion[J]. Cancer Cell, 2003, 4(6):499-515.
- 12 Masuelli L, Budillon A, Marzocchella L, et al. Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/ α - β catenins complex and multiple erbb receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(9):3344-3353.
- 13 Tang GX, Zhu SR, Chen WM, et al. Expression and significance of β -catenin, CyclinD1 in pleomorphic adenoma and carcinoma in pleomorphic adenoma of parotid gland[J]. J Clin Stomatol, 2009, 25(3):131-133. [汤国雄,朱声荣,陈卫民,等.腮腺多形性腺瘤及其恶变中 β -连环蛋白、细胞周期蛋白D1的表达[J].临床口腔医学杂志,2009,25(3):131-133.]
- 14 Hu J, Shao S, Song Y, et al. Hepatocyte growth factor induces invasion and migration of ovarian cancer cells by decreasing the expression of E-cadherin, beta-catenin, and caveolin-1[J]. Anat Rec (Hoboken), 2010, 293(7):1134-1139.
- 15 Mo SJ, Zhang SW, Yang SL. Research Advances in the Correlation between caveolin-1 gene and Oncogenesis[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2012, 24(6):477-479. [莫赛军,张淑伟,杨胜利.caveolin-1基因与肿瘤发生相关性的研究进展[J].癌变.畸变.突变,2012,24(6):477-479.]

(2013-07-16收稿)

(2013-12-17修回)

(本文编辑:杨红欣)

作者简介

张松 硕士研究生。研究方向为消化系统肿瘤。

E-mail: sjmo@zzu.edu.cn

