

文章编号: 1005-6947(2012)05-0549-05

· 基础研究 ·

Claudin-1 及 E-cadherin 与乳腺癌关系的研究

庄晓明¹, 樊祥山², 吴鸿雁², 曹永晖³, 肖红⁴

(南京大学医学院附属鼓楼医院 1. 普通外科 2. 病理科 3. 医学信息科, 江苏 南京 210008; 4. 南京医科大学附属脑科医院研究所, 江苏 南京 210029)

摘要

目的: 探讨紧密连接蛋白 1 (claudin-1, Cldn-1) 和上皮钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) 在乳腺癌组织中的表达及其与乳腺癌侵袭转移的关系。

方法: 应用组织芯片技术和免疫组化法检测 77 例乳腺癌标本中 Cldn-1 和 E-cad 的表达情况, 并分析两者与乳腺癌淋巴结转移、TNM 分期和肿块最大径以及组织学分级间的关系。

结果: Cldn-1 和 E-cad 表达强度与乳腺癌的淋巴结转移及临床分期有关, 有淋巴结转移的乳腺癌组 Cldn-1 和 E-cad 表达强度明显弱于无淋巴结转移组 ($P=0.0009$, $P=0.014$); Cldn-1 在 TNM III 期的表达强度分别弱于 I 期和 II 期 ($P=0.046$, $P=0.047$)。而 E-cad 的表达强度 II 期及 III 期均弱于 I 期 ($P=0.021$, $P=0.001$)。Cldn-1 和 E-cad 表达强度与肿块最大径各分组间及组织学各分级之间差异无统计学意义 ($P=0.967$, $P=0.150$ 及 $P=0.188$, $P=0.164$)。Cldn-1 与 E-cad 两者在乳腺癌组织中的表达强度差异无统计学意义 ($P=0.747$)。

结论: 在乳腺癌的发展和转移中 Cldn-1 及 E-cad 的表达强度均呈现减弱趋势, 但两者可能是独立的因素; 联合检测有助于对乳腺癌高复发危险性的筛选, 两者可作为判断乳腺癌淋巴结转移、复发和评估预后的参考指标。

关键词

乳腺肿瘤 / 病理学; 淋巴转移; 紧密连接蛋白 1; 钙黏着糖蛋白类

中图分类号: R737.9 文献标识码: A

[中国普通外科杂志, 2012, 21(5):549-553]

Relations of claudin-1 and E-cadherin with breast cancer

ZHUANG Xiaoming¹, FAN Xiangshan², WU Hongyan², CAO Yonghui³, XIAO Hong⁴

(1. Department of General Surgery 2. Department of Pathology 3. Department of Medical Information, the Affiliated Drum Tower Hospital, Medical College, Nanjing University, Nanjing 210008, China; 4. Research Institute, the Affiliated Brain Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the expressions of tight junction protein claudin-1 (Cldn-1) and E-cadherin (E-cad) in breast cancer tissue and their relations with invasion and metastasis of this cancer.

Methods: The expressions of Cldn-1 and E-cad in the breast cancer samples ($n=77$) were detected by using tissue chip technology and immunohistochemistry. The relations of Cldn-1 and E-cad with lymph node metastases, TNM stage, maximum lump diameter and histological classification of breast cancer were analyzed.

Results: The expression intensities of Cldn-1 and E-cad were associated with lymph node metastases and clinical stage of breast cancer. The results showed that the expression intensities of Cldn-1 and E-cad in the

收稿日期: 2011-10-17; 修订日期: 2012-04-19。

作者简介: 庄晓明, 南京大学医学院附属鼓楼医院主任医师, 主要从事乳腺和甲状腺外科的临床及基础方面的研究。

通讯作者: 庄晓明, Email: drzhxm@126.com

breast cancer tissues with nodal metastases were significantly lower than those without lymph node metastases ($P=0.0009$, $P=0.014$), the expression intensity of Cldn-1 in stage III breast cancer was significantly lower than that in stage I and stage II ($P=0.046$, $P=0.047$), and the expression intensities of E-cad in both stage II and stage III breast cancer were significantly lower than that in stage I ($P=0.021$, $P=0.001$). The expression intensities of Cldn-1 and E-cad were unrelated to the maximum lump diameter and histological classification of the tumor ($P=0.967$, $P=0.150$ and $P=0.188$, $P=0.164$). There was no significant difference between the expression intensities of Cldn-1 and E-cad in breast cancer ($P=0.747$).

Conclusion: Both Cldn-1 and E-cad expressions show a decreasing trend in development and metastases of breast cancer, but both may be independent factors. Combination measurement of Cldn-1 and E-cad is of value for the screening of breast cancer with high risk of recurrence, and they may be potential indicators for metastases, recurrence and prognostic estimation of breast cancer.

KEY WORDS

Breast Neoplasms/pathol; Lymphatic Metastasis; Claudin-1; Cadherins

CLC number: R737.9

Document code: A

[Chinese Journal of General Surgery, 2012, 21(5): 549–553]

转移是乳腺癌患者的主要致死因素。普遍认为, 转移的早期表现是细胞和细胞间的粘连消失, 从而导致个体癌细胞从原发瘤上释放出来。上皮细胞间的粘连主要由两类连接维持: 黏附连接和紧密连接。多数研究都聚焦在黏附连接的跨膜蛋白—上皮钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) 上, 并认为 E-cad 是多数组织癌细胞的抑制物质, 同时也是些肿瘤的有效预后指标^[1]。而对紧密连接中的紧密连接蛋白 1 (claudin-1, Cldn-1) 的研究较少。本实验应用组织芯片技术及免疫组织化学 (免疫组化) 方法对乳腺癌标本中 Cldn-1 及 E-cad 的表达情况进行检测, 以探讨其与乳腺癌发生、发展、浸润及转移的关系。

1 材料与方法

1.1 标本及其一般资料

收集我院 2002 年 12 月—2005 年 10 月间手术治疗的乳腺恶性肿瘤标本 77 例, 均为女性, 年龄 31~78 岁。经病理学证实为乳腺浸润性导管癌 (IDC) 75 例, 非典型髓样癌、黏液癌各 1 例。根据 TNM 分期, I 期 14 例, II 期 42 例, III 期 21 例; 有腋淋巴结转移 39 例, 无腋淋巴结转移病例 38 例。所有患者术前均未行化疗、放疗及内分泌治疗。标本均经 10% 中性福尔马林溶液固定, 常规处理后石蜡包埋。

1.2 主要试剂和仪器

Cldn-1 鼠抗人单克隆抗体浓缩液购自美国

Abcam 公司 (批号 ab56417), 以 1:400 的比例稀释成工作液。第二代免疫组化 Envision 广谱试剂盒购自美国 DAKO 公司 (编号 K5007)。鼠抗人 E-cad 单克隆抗体 (4A2C7) 购自美国 Zymed 公司, 以 1:200 稀释。组织微阵列打孔系统购自美国 Beecher instrument 公司。组织芯片载体为购自德国 Menzel-Glaser SuperFrost Plus 的玻片。

1.3 实验方法

标本均经 2 位有经验病理医师复诊并根据苏木精—伊红 (HE) 切片标记出典型病变范围后, 应用组织微阵列打孔仪分别在每例组织蜡块相应部位取样, 然后移植至受体蜡块上, 制成乳腺病变组织芯片蜡块。按同样方法构建另一个包含相同病例标本且阵列设计相同的组织芯片蜡块以进行重复实验; 分别连续 4 μm 厚切片, 制备成组织芯片备用。对组织芯片进行免疫组化染色, 实验步骤按 Envision 两步法试剂盒说明书进行。按上述方法将每个检测指标在另一张组织芯片上重复实验。本组资料已去除肿瘤细胞过少及掉片的样本, 并选取 Cldn-1 及 E-cad 两者染色均有效者, 共计 77 例有效样本。统计分析 Cldn-1 和 E-cad 的表达与乳腺癌临床病理特征之间的关系。

1.4 结果评定

无背景着色情况下, 以细胞出现黄色颗粒者为阳性。综合考虑染色强度和阳性细胞数, 采用半定量积分法判定免疫组化染色结果: 计算阳性细胞百分数并赋予分值, $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分,

>75% 为 4 分; 观察着色强度并赋予分值, 无着色为 0 分, 浅黄着色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄着色为 3 分。两者相乘, 0 分为 (-), 1~4 分为 (+), 5~8 分为 (++) , 9~12 分为 (+++)。由 2 名富有

经验的病理医师独立对 2 张组织芯片上的染色结果分别进行评分, 对同 1 病例的评分结果取平均值作为该病例的最终评分。将评分 (-) ~ (+) 设为低表达, 评分 (++) ~ (+++) 为高表达 (图 1A-D)。

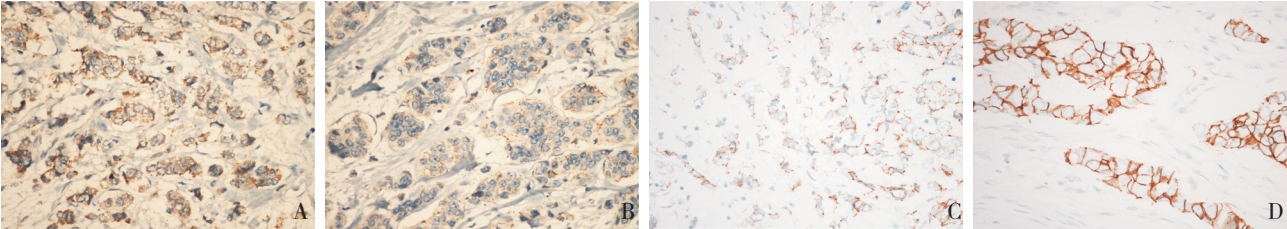


图 1 乳腺浸润性导管癌 Cldn-1 和 E-cad 的染色强度的比较 (EnVision 两步法 ×400) A: Cldn-1 弱阳性; B: Cldn-1 极弱阳性或阴性; C: E-cad 弱阳性; D: E-cad 强阳性

Figure 1 Comparison of the staining intensities of Cldn-1 and E-cad in invasive duct carcinoma (EnVision two step method ×400) A: Cldn-1 (weak positive); B: Cldn-1 (very weak positive or negative); C: E-cad (weak positive); D: E-cad (strong positive)

1.5 统计学处理

所有数据采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺癌中 Cldn-1 和 E-cad 的表达强度与病理参数的关系

乳腺癌中有腋淋巴结转移组的 Cldn-1 表达强度弱于无淋巴结转移组 ($\chi^2=10.986$, $P=0.0009$) ; 乳腺癌 TNM 分期中, I 期和 II 期组之间的 Cldn-1 表达强度差异无统计学意义 ($\chi^2=0.215$, $P=0.643$) , III 期的表达强度明显弱于 I 期和 II 期, 差异有统计学意义 ($\chi^2=3.998$,

$P=0.046$; $\chi^2=3.962$, $P=0.047$) ; 而在肿瘤最大径各组间及组织学分级 G_1 , G_2 , G_3 组间的 Cldn-1 表达强度差异无统计学意义 ($\chi^2=0.068$, $P=0.967$; $\chi^2=3.80$, $P=0.150$) (表 1)。

乳腺癌中 E-cad 表达强度有腋淋巴结转移组的弱于无淋巴结转移组 ($\chi^2=6.065$, $P=0.014$) ; 乳腺癌 TNM 分期中, II 期和 III 期的表达强度明显弱于 I 期, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.349$, $P=0.021$; $\chi^2=10.496$, $P=0.001$) ; II 期 和 III 期组之间的 E-cad 表达强度差异无统计学意义 ($\chi^2=2.577$, $P=0.108$) ; 而在肿瘤最大径各组间及组织学分级 G_1 , G_2 , G_3 组间的 E-cad 表达强度差异无统计学意义 ($\chi^2=3.343$, $P=0.188$; $\chi^2=3.613$, $P=0.164$) (表 1)。

表 1 Cldn-1 和 E-cad 的表达与乳腺癌病理学参数的关系									
Table 1 The relations of Cldn-1 and E-cad expressions with the clinicopathologic characteristics of the breast cancer									
病理学参数	n	Cldn-1 表达强度				E-cad 表达强度			
		低表达	高表达	χ^2	P	低表达	高表达	χ^2	P
淋巴结转移									
(+)	39	29	10	10.986	0.0009	21	18	6.065	0.014
(-)	38	14	24			10	28		
TNM 分期									
I	14	6	8	5.065	0.080	1	13	10.475	0.005
II	42	21	21			17	25		
III	21	16	5			13	8		
肿瘤最大径 (cm)									
~2	21	12	9	0.068	0.967	5	16	3.343	0.188
~5	51	28	23			24	27		
>5	5	3	2			2	3		
组织学分级									
G ₁	8	2	6	3.80	0.150	5	3	3.613	0.164
G ₂	49	28	21			16	33		
G ₃	20	13	7			10	10		

2.2 乳腺癌中 Cldn-1 表达强度与 E-cad 表达强度的关系

乳腺癌中，Cldn-1 和 E-cad 的表达强度两组间无关 ($P>0.05$)。提示该两种因子在乳腺癌中同时具有特异性表达，但两者可能是相对独立的因素，并无因果关系 (表 2)。

表 2 乳腺癌中 Cldn-1 表达强度与 E-cad 的表达强度的关系

Table 2 The relation between the expression intensities of Cldn-1 and E-cad in the breast cancer

Cldn-1 表达强度	n	E-cad 表达强度		χ^2	P
		低表达	高表达		
低表达	43	18	25	0.104	0.747
高表达	34	13	21		

3 讨 论

Cldn-1 是带有 2 个细胞外环结构的跨膜蛋白，是构成上皮细胞紧密连接链的主要成分；它有构筑上皮细胞屏障的作用，同时对上皮细胞膜功能区的离子通路的极化方位、受体和酶都起到关键作用。紧密连接的损坏或不完整会导致细胞内聚力丧失，细胞稳定性下降，细胞与细胞间互相分离，从而增加了肿瘤细胞的运动性，便于肿瘤的浸润和转移。研究^[1-2]表明：Cldn-1 表达的下调以及部分或全部丧失与助长肿瘤的恶性潜能和浸润性及疾病反复有关。Fritzsche 等^[3]认为，Cldn-1 的差异表达与肾恶性肿瘤的进展相关，可作为判断肾细胞癌预后的一个指标。对于肺癌、前列腺癌 Cldn-1 也显示出能抑制肿瘤浸润转移的作用^[4-5]。就宫颈癌而言，Cldn-1 在癌变前的表达更为强烈，而在浸润性癌中其表达则显著减弱。在与乳腺导管原位癌成分中的表达相比，Cldn-1 的表达在浸润性癌细胞成分中减弱程度更大^[1]。Cldn-1 表达下调与乳腺癌无病生存期缩短有关，与淋巴结转移及乳腺癌的复发有关^[1, 6]。

本实验显示：有腋淋巴结转移组的 Cldn-1 表达强度弱于无淋巴结转移组 ($P=0.0009$)；虽然 TNM 各期总体上差异无统计学意义 ($P=0.080$)，但随着肿瘤病期的加重，III 期乳癌的 Cldn-1 表达强度明显弱于 I 期和 II 期。说明 Cldn-1 的表达减弱与乳腺癌的发展、复发转移有关，可将其作为乳腺癌复发转移的检测指标之一。同时，加大样本量对 Cldn-1 在 TNM 各期的表达进行进一步

探讨十分必要。

E-cad 是一类钙依赖性跨膜糖蛋白。它通过介导同型细胞间的黏附反应以维持上皮细胞结构的完整性和细胞的极性，具有细胞接触性生长抑制的功能；同时还可促进旁分泌信号传递，起信息传递和细胞稳定作用。E-cad 是典型的肿瘤浸润抑制基因^[7]。Faleiro-Rodrigues 报道在多种肿瘤中由于上皮钙黏蛋白表达降低和功能障碍而导致肿瘤侵袭性增加^[8]。有研究^[9-10]发现：分化程度良好的肺癌组织的 E-cad 的表达率为 60%，而分化程度差或未分化肺癌的 E-cad 表达率仅为 25.9%；E-cad 表达降低与淋巴结转移密切相关。E-cad 在高、中、低分化型胃癌中，阳性表达率逐渐减少，提示 E-cad 的低表达与肿瘤的分化程度有关^[11]。在人口腔鳞状上皮细胞癌中，E-cad 的表达与口腔鳞状上皮细胞癌分化不良及远处转移相关^[12]。在乳腺癌组织中 E-cad 也表现为缺失或异位^[13-14]。在三阴性乳腺癌的临床病理研究中发现 E-cad 的表达明显下降^[15]。

本实验显示：有腋淋巴结转移组的 E-cad 表达强度明显弱于无淋巴结转移组，II 期和 III 期组的表达强度明显弱于 I 期组。说明 E-cad 可以在一定程度上反映肿瘤的转移和复发危险性。对 E-cad 的检测有助于制定个体化治疗方案，以便消除因不必要的治疗引起的并发症，延长生存期。至于本实验所显示的 E-cad 表达强度在 II 期和 III 期组间比较差异无统计学意义，可能与本组样本较少有关；而是否呈依次递减的态势，还有待于大样本的检测与统计分析。

Cldn-1 与 E-cad 在细胞间的黏附连接和紧密连接结构中影响着细胞的稳定性和黏附性，对抑制肿瘤的浸润转移发挥着重要作用。本实验显示，在乳腺癌的进程中，Cldn-1 与 E-cad 的表达强度比较差异无统计学意义，说明两者在乳腺癌中同时有特异性表达，推测两者有可能是相对独立的因素。但究竟它们是否存在协同运作，还需要更多的深入研究。由于 Cldn-1 与 E-cad 的表达下调或表达缺失、功能障碍将会使肿瘤细胞易于脱离原瘤向远处侵袭转移。因此，加强对 Cldn 蛋白作用机制的探索和对两者的联合检测，将有助于判断乳腺癌淋巴结转移、复发和评估预后，为乳腺癌的治疗提供一个新思路。

参考文献

- [1] Morohashi S, Kusumi T, Sato F, et al. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(2):139-143.
- [2] Tokés AM, Kulka J, Paku S, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study[J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(2):R296-305.
- [3] Fritzsche FR, Oelrich B, Johannsen M, et al. Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(21):7035-7042.
- [4] Chao YC, Pan SH, Yang SC, et al. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(2):123-133.
- [5] GM Sheehan, BVS Kallakury, CE Sheehan, et al. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas[J]. *Human Pathology*, 2007, 38(4):564-569.
- [6] Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, et al. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype [J]. *Virchows Arch*, 2009, 454(6):647-656.
- [7] Wheelock MJ, Soler AP, Knudsen KA. Cadherin junctions in mammary tumors [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(3):275-285.
- [8] Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, et al. Association of E-cadherin and beta-catenin immunoexpression with clinicopathologic features in primary ovarian carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(6):663-669.
- [9] Charalabopoulos K, Gogali A, Kostoula OK, et al. Cadherin superfamily of adhesion molecules in primary lung cancer [J]. *Exp Oncol*, 2004, 26(4):256-260.
- [10] Pelosi G, Pasini F, Fraggetta F, et al. Independent value of fascin immunoreactivity for predicting lymph node metastases in typical and atypical pulmonary carcinoids[J]. *Lung Cancer*, 2003, 42(2): 203-213.
- [11] 马钊, 武华, 尉瑞. E-Cadherin、VEGF-C 与胃癌临床病理学关系的研究 [J]. *山西中医学院学报*, 2009, 10(4):56-57.
- [12] Kaur G, Carnelio S, Rao N, et al. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study [J]. *Indian J Dent Res*, 2009, (1):71-76.
- [13] Mastracci TL, Tjan S, Bane AL, et al. E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ of the breast[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(6):741-751.
- [14] Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, et al. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10938-10945.
- [15] 钱宏美, 张亚男, 张勇, 等. 三阴性乳腺癌的临床病理特征分析 [J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(11):1196-1198.

(本文编辑 宋涛)

中国普通外科杂志携手丁香园入驻丁香客

为进一步拉近杂志与读者、作者的距离,活跃学术气氛,实现多方更好的交流和互动,我们已与丁香园网站合作,成为入驻丁香客的首家普通外科领域的期刊。网址: <http://i.dxy.cn/zpwz>, 欢迎大家登录,并为推动我刊的进步和发展、为提高普通外科学术水平献计献策。同时我刊正在网站上招募优秀审稿人、诚征优秀稿件,敬请关注!

中国普通外科杂志编辑部