

· 论著 ·

连接蛋白 43 和上皮细胞钙黏蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中表达的意义

高一菁 陈战 李锐 谢晓梅 涂永久

【摘要】 目的 探讨间隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 及上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) 在乳腺浸润性导管癌组织中表达的作用。**方法** 采用 Elivision 免疫组织化学法对 17 例正常乳腺组织、42 例乳腺良性病变组织 (18 例乳腺纤维腺瘤、24 例纤维腺病) 及 41 例乳腺浸润性导管癌组织中的 Cx43 和 E-cad 表达进行检测。统计分析采用卡方检验、配对计数资料的 McNemar 检验及 Kappa 检验。**结果** Cx43 和 E-cad 在浸润性导管癌中表达明显降低, 与 TNM 分期、病理组织学分级及淋巴结转移有关 ($P < 0.050$)。在浸润性导管癌中 Cx43 和 E-cad 蛋白表达一致性较好 (Kappa 值 = 0.466, $P = 0.003$)。**结论** Cx43 和 E-cad 的表达下降可能在乳腺浸润性导管癌发生和发展过程中发挥一定的作用。联合检测 Cx43 和 E-cad 有利于判断肿瘤的分化程度及浸润转移情况。

【关键词】 乳腺肿瘤; 连接蛋白 43; 上皮细胞钙黏蛋白; 免疫组织化学法

【中图法分类号】 R737.3

【文献标识码】 A

Significance of expressions of connexin 43 and E-cadherin in invasive ductal carcinoma

GAO Yi-jing, CHEN Zhan, LI Rui, XIE Xiao-mei, TU Yong-jiu. Department of General Surgery, The 174th Hospital of PLA, 361003 Xiamen, China

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of connexin 43 (Cx43) and E-cadherin (E-cad) in invasive ductal carcinoma (IDC) and their clinical significance. **Method** The expressions of Cx43 and E-cad proteins were detected in 41 cases of breast invasive ductal carcinoma, 42 cases of benign breast diseases and 17 cases of normal breast tissues by immunohistochemical Elivision method. Chi-square test, McNemar test and Kappa test were used for statistical analysis. **Results** The expressions of Cx43 and E-cad were remarkably decreased in IDC tissues. Both Cx43 and E-cad expressions were significantly related with TNM stage, histologic grading and lymphatic metastasis in breast IDC ($P < 0.050$). There was better agreement between Cx43 and E-cad expressions (Kappa = 0.466, $P = 0.003$). **Conclusion** The decreased expressions of Cx43 and E-cad in IDC might play a role in carcinogenesis and development of IDC. It is conducive to judge tumor differentiation and invasion status by detecting Cx43 and E-cad together.

【Key words】 breast neoplasms; connexin 43; E-cadherin; immunohistochemistry

乳腺癌居女性恶性肿瘤的第二位,而浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, IDC)约占 45%;间隙连接蛋白 43(Cx43)在乳腺癌组织中表达降低,并与淋巴转移存在相关性^[1]。上皮细胞钙黏蛋白(E-cad)为上皮细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质黏附的重要黏附分子,对各种肿瘤的浸润和转移影响较大。Cx43 和 E-cad 同为细胞跨膜蛋白,且共同表达于乳腺上皮细胞,在乳腺肿瘤的发生和发展过程中,二者间是否存在一定的关系?本研究采用免疫组织化学方法检测乳腺浸润性导管癌组织中 Cx43 和 E-cad 的表达,分析二者相互关系,探讨二者在乳腺癌发生、发展过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2010 年 9 月至 2011 年 10 月厦门市解放军第 174 医院病理科存档资料,随机选择正常乳腺组织 17 例,乳腺良性疾病患者 42 例,包括纤维腺瘤 18 例和乳腺纤维腺病 24 例,浸润性导管癌 41 例。所有患者均为女性,其中正常乳腺组织组年龄 34~45 岁;良性病变组年龄 17~53 岁;浸润性导管癌组年龄 33~78 岁,中位年龄 50 岁,患者术前均未接受化疗和放疗,根据 AJCC 第六版乳腺癌分期标准, TNM I、II 期 27 例, III、IV 期 14 例;病理组织学 I、II 级 12 例, III 级 29 例;淋巴结转移阳性 17 例。

1.2 试剂

兔抗人 Cx43 多克隆抗体(ZA-0444,即用型)购自北京中杉金桥生物技术公司;鼠抗人 E-cad 单克隆抗体(MAB-0589,即用型)及 Elivision™ Plus 二步法试剂盒、DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 免疫组织化学

采用 Elivision 免疫组织化学法,石蜡切片,常规脱蜡水化;柠檬酸高温高压修复 2 min;3% H₂O₂ 15~20 min 消除内源性过氧化物酶活性;分别滴加兔抗人 Cx43 抗体、鼠抗人 E-cad 抗体后置 37℃ 水浴箱孵育 50 min;按说明书先后加增强剂和酶标抗鼠/兔聚合物,分别室温孵育 20 min、30 min;DAB 显色 30 s,苏木素复染,脱水,封片。每批染色均设立以 PBS 代替一抗的阴性对照及阳性对照(阳性对照 Cx43 为 Wistar 雄性大鼠心脏, E-cad 用已知的阳性切片)。

1.4 结果判定

Cx43 的判定的方法^[2]:着色细胞<10%为 0 分,10%~40%为 1 分,41%~70%为 2 分,>70%为 3 分;着色强度计分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分;两项相乘,总计分 0~3 分为阴性表达(-),4 分以上为阳性表达(+)。E-cad 阳性细胞为黄色-棕黄色着色,按阳性细胞比例:阳性细胞数<10%为 0 分,10%~40%为 1 分,41%~70%为 2 分,>70%为 3 分;按组织的着色强度:不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;总

分6分及以下为阴性表达(-),6分以上为阳性表达(+)^[3]。结果由两名病理医师独立评分,同一病例评分取平均值作为该病例的最终评分。

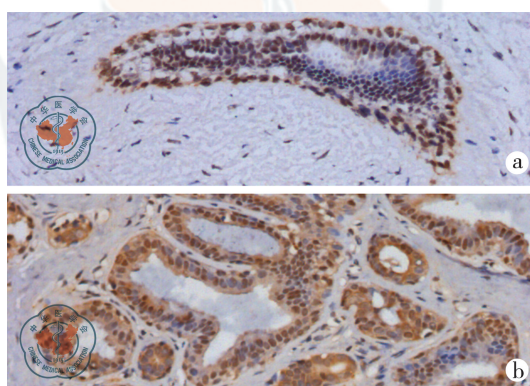
1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,采用 χ^2 检验进行组间比较及两两比较,乳腺浸润性导管癌组织中 Cx43 与 E-cad 的表达关系分析采用配对计数资料的 McNemar 检验和 Kappa 检验; $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cx43 和 E-cad 不同人群中的表达

在正常乳腺组织及良性病变中 Cx43 蛋白呈棕黄色颗粒,主要定位于乳腺肌上皮的细胞质上,于靠近胞膜处染色加深(图 1)。在乳腺癌组织中 Cx43 蛋白表达的明显下降,随着病理组织学分级的上升而减弱(图 2、3)。Cx43 蛋白在正常组织和乳腺良性病变组中,全部阳性表达;41 例浸润性导管癌组中,22 例(53.65%) Cx43 蛋白呈阴性表达(表 1)。



a: 乳腺纤维瘤; b: 乳腺纤维腺病

图 1 良性病变中 Cx43 的表达定位于胞质,其中以肌上皮细胞明显,于靠近胞膜处有染色质聚积 (EP $\times 100$)

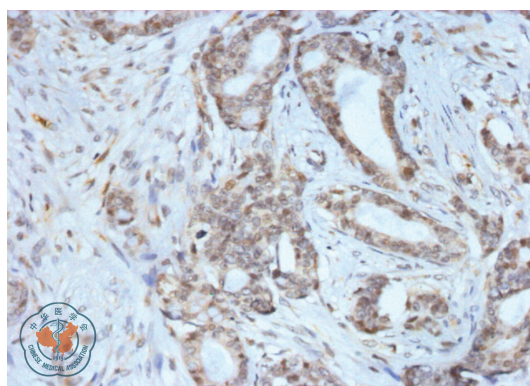


图 2 浸润性导管癌 I、II 级 Cx43 的表达有所减弱 (EP $\times 100$)

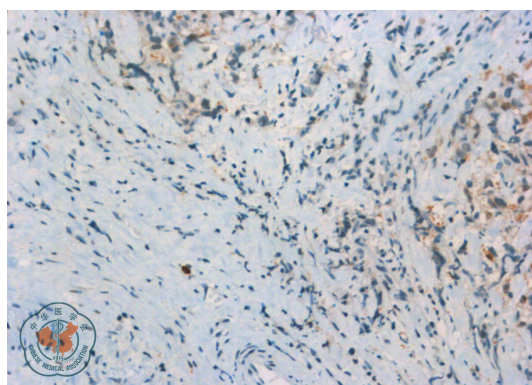
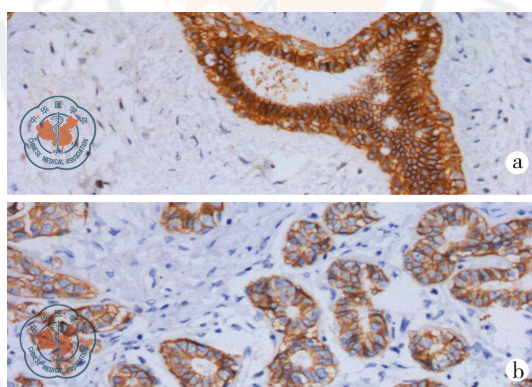


图3 浸润性导管癌中Ⅲ级 Cx43 的表达明显减弱,少数细胞出现胞核异位表达 (EP ×100)

E-cad 在正常乳腺组织及良性病变表达上皮细胞的细胞膜呈棕黄色线性染色(图4)。在乳腺癌组织中, E-cad 表达胞膜处,少数出现细胞质异位表达,随肿瘤病理组织学分级的升高,表达减弱甚至缺失(图5~6)。E-cad 蛋白在正常组织和乳腺良性病变组中,全部呈阳性表达,而浸润性导管癌组中,19 例(46.34%)阴性表达(表1)。



a:乳腺纤维瘤;b:乳腺纤维腺病

图4 良性病变 E-cad 的表达在胞膜处成线性染色(EP ×100)

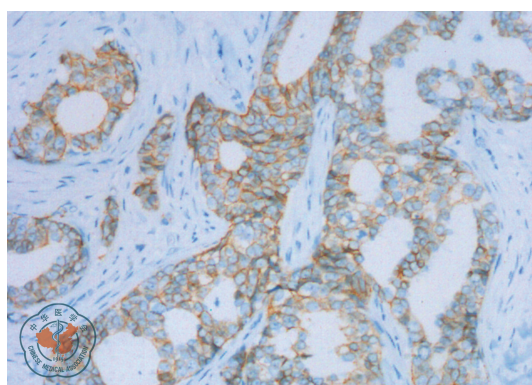


图5 浸润性导管癌 I、II 级 E-cad 的表达有所减弱 (EP ×100)

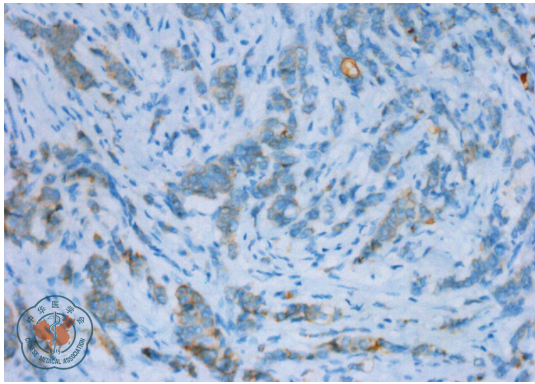


图 6 浸润性导管癌 III 级 E-cad 的表达明显减弱(EP ×100)

表 1 Cx43 和 E-cad 在不同的乳腺组织中表达的比较

分组	例数	Cx43				E-cad			
		阳性(例)	阴性(例)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性(例)	阴性(例)	χ^2 值	<i>P</i> 值
正常乳腺	17	17	0			17	0		
良性病变	42	42	0	40.588	<0.001	42	0	33.755	<0.001
浸润性导管癌	41	19	22			22	22		

Cx43:正常乳腺比良性病变 $P=1$;浸润性导管癌比正常乳腺和良性病变 P 均<0.001;E-cad:正常乳腺比良性病变 $P=1$;浸润性导管癌比正常乳腺和良性病变 $P<0.001$

2.2 Cx43 和 E-cad 的表达与浸润性导管癌病理组织分级、TNM 分期和淋巴结转移的关系

41 例浸润性导管癌组织切片中 Cx43 和 E-cad 的表达结果显示:两者在淋巴结转移组的阳性表达率明显低于未转移组 ($P<0.010$);两者表达率随着肿瘤组织病理组织学分级 ($P<0.010$) 和 TNM 分期 ($P<0.001$) 的升高而降低(表 2)。

表 2 乳腺浸润性导管癌中的 Cx43 和 E-cad 蛋白的表达与临床病理特征的关系

分组	例数	Cx43					E-cad				
		阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i> 值	阳性(例)	阴性(例)	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i> 值
淋巴结转移					9.616	0.001				6.866	0.008
转移组	17	3	14	17.60%			5	12	29.40%		
未转移组	24	16	8	66.70%			17	7	70.80%		
TNM 分期					8.785	<0.01				5.381	0.020
I + II	27	17	10	63.00%			18	9	66.70%		
III + IV	14	2	12	14.30%			4	10	28.60%		
组织学分组					9.336	<0.01				9.856	0.001
I + II	12	10	2	83.30%			11	1	91.67%		
III	29	9	20	31.00%			11	18	37.90%		

2.3 浸润性导管癌 Cx43 与 E-cad 表达的相互关系

41 例浸润性导管癌组织中 Cx43 和 E-cad 同时呈阳性表达 15 例,同时呈阴性表达 15 例。经统计分析表明 Cx43 和 E-cad 表达存在一定相关关系(表 3)。

表 3 41 例浸润性导管癌组织中 Cx43 与 E-cad 蛋白的表达关系

Cx43	E-cad(例)		P 值 ^a
	+	-	
+	15	4	0.549
-	7	15	

a: McNemar 检验; Kappa 值=0.466, P=0.003

3 讨论

3.1 Cx43 在乳腺浸润性导管癌中的表达及意义

Cx43 是乳腺组织的一个主要的间隙连接蛋白,是乳腺上皮细胞的跨膜蛋白。Laird^[1]提出,Cx43 蛋白的检测在乳腺癌的早期癌变可能是一个有用的标记,其表达缺失与乳腺肿瘤发展进程有关,Cx43 的正常表达对乳腺癌的转移有抑制作用^[4]。本研究通过免疫组织化学方法发现,Cx43 在正常乳腺及乳腺良性病变组织的肌上皮细胞全部阳性表达,定位于胞质,靠包膜处有染色物质聚积;浸润性导管癌组织中 Cx43 蛋白阳性表达率较正常乳腺组及乳腺良性病变组明显下降,与王晓琳^[5]的研究结果一致。浸润性导管癌组织中的 Cx43 下降程度与淋巴结转移、TNM 分期及病理组织学分级有明显关系。Cx43 在有淋巴结转移者较无淋巴结转移者表达低。TNM I、II 期和组织学 I、II 级的乳腺癌组织中 Cx43 的阳性表达率下降较少,细胞-细胞连接处仍有染色物质积聚;随着 TNM 分期和组织学分级升高,胞质处表达减弱甚至缺失,同时出现胞核异位表达。本实验中 Cx43 随病理组织学分级的上升而出现表达降低,与 Jamieson 研究^[6]报道的结果相符合。

本研究在显微镜下发现,无论是在分化较好的浸润性导管癌及良性病变组织中,甚至是正常乳腺组织,Cx43 均定位于包浆处,而不是单纯地只出现在细胞-细胞连接处这与 Kanczuga-Koda^[7]等的研究结果相符。而大多数研究认为处于功能状态的 Cx 蛋白主要表达在胞膜上,若胞膜处的 Cx 表达缺失,则细胞间不能形成有效的间隙连接通讯(Gap junction intercellular communication, GJIC)^[8]。推测可能的原因是 Cx 蛋白的半衰期极短,Cx43 从翻译合成至分解代谢的半衰期只有 1~3 h^[9],在大部分时间内,Cx43 在内质网中进行磷酸化及完成连接子聚合^[10],而在胞膜上间隙连接斑块的 Cx43 存在时间短因为处于快速装配、分解的动态平衡中。

3.2 E-cad 在乳腺浸润性导管癌的表达及意义

黏附分子使细胞间具有黏附性,从而减少肿瘤细胞脱落,抑制肿瘤转移。而钙离子依赖性细胞黏附分子 E-cad 在细胞黏附过程中起重要作用^[11]。多种肿瘤均存在 E-cad 表达异常,其表达是抑制乳腺癌远处转移的关键因素^[12]。本研究表明,在浸润性导管癌组织中的 E-cad 表达显著下降,淋巴结转移组 E-cad 的正常表达率显著低于无淋巴结转移组,与 Qureshi^[11]关于乳腺癌中 E-cad 蛋白表达与淋巴结转移呈负相关的研究结论相一致。E-cad 在不同 TNM 分期及组织学分级的表达差异说明了 E-cad 通过增加细胞间的黏附作用,从而抑制浸润性导管癌的发展进程,即高表达 E-cad 乳腺癌细胞黏附性强,乳腺癌的 TNM 分期较早、组织学分级较低,而低表达 E-cad 的 TNM 分期晚和组织学分级高的乳腺癌细胞黏附性弱。

3.3 Cx43 与 E-cad 在乳腺浸润性导管癌的表达关系

E-cad 通过介导 Ca^{++} 依赖性间隙连接形成途径促进 Cx 向胞膜转运,并引导由 Cx43 聚合的连接子对头铆接成间隙连接通道。Ko 等^[13]的动态研究发现胶质细胞间的黏附反应发生于细胞接触 60 min 左右,之后在 120 min 后才出现细胞间的信息大量传递。Govindarajan^[14]等发现,经转染 E-cad 基因后的细胞,可以形成由促进 Cx43 装配成间隙连接通道。Musil 等^[15]将 E-cad 基因转染给 GJIC 功能较低的肿瘤细胞系后,可以使这些肿瘤细胞的 GJIC 功能增加。其原因为转染 E-cad 基因后的肿瘤细胞,促进了 Cx43 向胞膜的转运和磷酸化。Bao 等^[16]认为钙黏蛋白是 Cx 组配的最主要因素之一,而 E-cad 对 Cx43 组配成有效的 GJ 具有促进作用,若同时抑制黏附蛋白和钙黏蛋白会扰乱 Cx 的组配。本研究通过检测 41 例浸润性导管癌组织发现,Cx43 和 E-cad 的同向表达例数占总病例数的 73.2% (30/41),证实两者在同一标本中的表达确有较好的一致性。说明在浸润性导管癌组织中,E-cad 通过调节 Cx43 聚合和转运从而促进了间隙连接的形成;缺乏 E-cad 使肿瘤细胞的间隙连接形成减少,肿瘤细胞也因缺乏间隙连接通信的监控从而易于脱落发生转移。

Cx43 和 E-cad 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达下降,两指标的下降与淋巴结转移、TNM 分期及病理组织学分级及淋巴结转移有关系。考虑到 Cx43 和 E-cad 的表达下降可能是乳腺浸润性导管癌发生和发展过程中的共同作用,联合检测 Cx43 和 E-cad 可作为判断肿瘤的分化和转移的生物学指标。

参考文献

- [1] Laird DW, Fistouris P, Batist G, et al. Deficiency of connexin 43 gap junctions is an independent marker for breast tumors [J]. Cancer Res, 1999, 59(5): 4104-4110.

- [2] 谢成耀,刘君,李庆昌,等. 缝隙连接蛋白 Connexin26 在乳腺导管上皮癌变中的调节作用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2008,17(2):170-173.
- [3] 王秋鹏,顾华敏,王四玲. 乳腺浸润性导管癌中 E 钙黏蛋白的表达与微血管密度的关系及意义[J]. 实用医学杂志,2007,23(9):1306-1308.
- [4] Plante I, Stewart MK, Barr K, et al. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease[J]. *Oncogene*,2011,30(14):1681-1692.
- [5] 王晓琳,吕世军. 连接蛋白 43 在乳腺癌组织及癌前病变组织中的表达意义[J]. 肿瘤基础与临床,2010,23(4):292-295.
- [6] Jamieson S, Going JJ, D'Arcy R, et al. Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours [J]. *J Pathol*,1998,184(1):37-43.
- [7] 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.
- [8] Goodenough DA,Paul DL. Gap junctions[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*,2009,1(1):a002576.
- [9] Dunn CA,Su V, Lau AF,et al. Activation of Akt,not connexin 43 protein ubiquitination, regulates gap junction stability [J]. *J Biol Chem*, 2012,287(4):2600-2607.
- [10] Maza J, Mateescu M, Das Sarma J, et al. Differential oligomerization of endoplasmic reticulum-retained connexin43/connexin32 chimeras[J]. *Cell Commun Adhes*,2003,10(4-6):319-323.
- [11] Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells [J]. *Cell Biol*,1991,113(1):173-185.
- [12] Dong C,Wu Y,Yao J, et al. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4):1469-1486.
- [13] Ko K, Arora P, Lee W, et al. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts [J]. *AMJ Physiol Cell Physiol*,2000,279(1):C147-C157.
- [14] Govindarajan R, Chakraborty S, Johnson KE, et al. Assembly of connexin43 into gap junctions is regulated differentially by E-cadherin and N-cadherin in rat liver epithelial cells[J]. *Mol Biol Cell*,2010,21(23):4089-4107.
- [15] Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, et al. Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin 43 in junctional communication-competent and deficient cell lines[J]. *J Cell Biol*,1990,111(5 Pt1):2077-2088.
- [16] Bao B, Jiang J, Yanase T, et al. Connexin-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly[J]. *FASEB J*, 2011, 25(1):255-264.

(收稿日期:2012-04-05)

(本文编辑:赵彬)

高一菁,陈战,李锐,等. 连接蛋白 43 与上皮细胞钙黏蛋白在乳腺浸润性导管癌组织中表达的意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2012,6(3):279-286.