

上皮细胞间质转化和骨肉瘤侵袭转移相关性研究进展

袁赤亭 雷新环 洪 盾

[中图分类号] R738

[文献标识码] A

骨肉瘤是最常见成骨的恶性肿瘤,约占骨恶性肿瘤的20%左右,其特点是恶性程度高、易复发、易转移、预后差。骨肉瘤细胞易发生转移侵袭是造成预后差的主要原因之一,而骨肉瘤细胞的侵袭及转移与细胞黏附分子及细胞骨架等方面有关。上皮性钙黏蛋白(E-cadherin)是一种重要的细胞间黏附分子,维持组织结构形态和结构,抑制细胞游走和迁徙;细胞骨架包括波形蛋白(vimentin)和 β -连环蛋白(β -catenin),这两种分子跟肿瘤细胞侵袭力和转移呈正相关;这3种蛋白均属于EMT标志物,其中EMT还包括细胞外基质、转录因子等成分。近几年越来越多研究发现EMT标志物与骨肉瘤发生发展有着密切关系,逐渐受到大家的重视,成为骨肉瘤侵袭和转移研究方面热点之一^[1]。

一、EMT概念

EMT即上皮间质转化是指上皮细胞在某些生理和特定病理情况下,上皮细胞改变表型,失去极性,向无极性的间质细胞转化,从而获得浸润、活动及游走等现象,这概念首先是Greenberg和Hay在1982年首次提出的概念。此过程包括细胞形态学改变和基因型改变,且研究发现这些变化与组织纤维化、胚胎形成和发育及肿瘤侵袭和转移等有着密切关系。EMT过程中相关基因型改变如下^[2]:①细胞表面蛋白:包括上皮性钙黏蛋白(E-cadherin)和神经性钙黏蛋白(N-cadherin)等,其中E-cadherin是最重要一个,是维持上皮细胞表型和极性的重要分子,在EMT过程表达下降;②细胞骨架:包括波形蛋白(vimentin)、细胞角蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白和 β -连环蛋白(β -catenin)等,vimentin和 β -catenin是较重要两个成分,是间质细胞的标志物,在EMT过程表达升高;③细胞外基质:主要代表为纤维连接蛋

白(fibronectin, FN),在EMT过程表达升高,是一个非特异性指标;④转录因子:Snail、Slug和Twist等在EMT过程中表达均升高。因此研究者根据EMT标志物和细胞形态改变来评估EMT与某些疾病的关系。

EMT根据不同功能被分为3种类型^[3]。I型主要发生在原肠胚胎形成和神经嵴细胞形成。II型主要与伤口愈合、组织再生、炎症和纤维化发生有关。III型主要发生在上皮性癌细胞转化为迁移性间质性癌细胞,使癌细胞发生侵袭和转移。

二、EMT相关标志物的特点及与骨肉瘤相关性

1. E-cadherin: E-cadherin是一种钙黏蛋白中细胞黏附分子,该基因位于16q22.1区域,分子质量为124kDa左右,为单链I型跨膜蛋白,具有钙黏蛋白特点,分为胞质区、跨膜区、胞膜外区等3部分。该分子中氨基末端(N端)位于胞膜外,与钙结合部位;羧基末端(C端)位于胞质内,与细胞骨架相连,将胞外信号转导至胞内,甚至细胞核,产生相关的生物效应。研究发现当细胞外中钙离子存在时,才能激活E-cadherin分子,使胞内游离C端与连环蛋白(catenin)结合,形成E-cadherin-catenin复合物;研究者还发现E-cadherin胞质内C端有游离型和结合型,结合型主要是E-cadherin-catenin复合物,游离型和结合型处于动态平衡状态,当平衡发生变化时,将发生一系列不同生物学效应,当平衡趋向结合型,细胞黏附力增加。反之,与细胞骨架相连发生改变,细胞间连接减少,导致黏附力减弱,细胞活动力和侵袭力增强。

研究表明E-cadherin与某些恶性肿瘤发生发展有着密切关系,目前研究较成熟的是E-cadherin与乳腺癌、胃癌等肿瘤,与骨肉瘤方面较少,但近年来研究逐渐增多。Yin等^[4]研究107例骨肉瘤患者发现E-cadherin在成骨性、成软骨性及成纤维性等3种不同类型骨肉瘤组织中表达存在统计学差异,在未转移骨肉瘤中阳性率远大于转移的,以及E-cadherin阳

性患者术后生存率比阴性高,因此他们推测骨肉瘤中 E-cadherin 表达高低可能与肿瘤类型、骨肉瘤侵袭转移及预后等情况有关。Niinaka 等^[5]研究发现间质细胞上皮转化(mesenchymal epithelial transition, MET)后抑制了骨肉瘤细胞株 LM8 生长和肺转移,同时 MET 后 E-cadherin 表达升高。根据文献报道,笔者认为 E-cadherin 表达强弱与骨肉瘤侵袭转移呈负相关,但在 E-cadherin 基因敲除前后骨肉瘤细胞侵袭力变化目前暂无相关报道,其作用机制也未明确,需要进一步研究。

2. vimentin: vimentin 是细胞骨架的中间纤维家族中重要成员之一,编码 vimentin 基因位于 10p13,分子质量大小为 57kDa 左右,该蛋白单体分为 3 部分:头部氨基端(N)、尾部的羧基端(C)及两端之间螺旋杆状区。两个单体相互扭曲形成二聚体,进一步形成四聚体,与其他四聚体构成波形蛋白丝,并与微丝及微管共同形成了一个细胞支架网络而维持细胞完整性。vimentin 在不同肿瘤组织表达不同,主要受 vimentin 表达上调和下调机制调节。上调机制主要跟 GC 盒、核因子- κ B(NF- κ B)、反义沉默子(ASE)及转化生长因子- β (TGF- β)等有关,这些因子均促进 vimentin 表达升高;下调机制主要通过 ZBP-89 结合 vimentin 启动子附近的序列,从而抑制 vimentin 表达。vimentin 表达升高或下降,对肿瘤细胞功能有着重要密切关系。研究发现恶性肿瘤中 vimentin 表达高低与侵袭力强弱呈正比^[6]。Zhang 等^[7]研究者通过免疫组织化学对骨肉瘤标本检测发现,骨肉瘤中高表达 vimentin,跟骨肉瘤转移和预后有关。Niinaka 等^[5]研究发现人成骨细胞株 MG63 中 AMF/PGI 被沉默后转化为成骨细胞后,vimentin 表达明显下降及侵袭力减弱。同时,人成骨细胞株 LM8 中 AMF/PGI 被沉默前后,vimentin 表达高低与侵袭力较强弱呈正相关性。总之,根据目前研究发现 vimentin 在不同类型骨肉瘤中表达不同,但与骨肉瘤发生、发展相关性未明确。

3. β -catenin: β -catenin 是一种黏附分子相关的可溶性蛋白,编码该基因位于染色体 3p21、3p22,分子质量约 92kDa。该蛋白分成 3 部分:N 端结构域、C 端结构域和中间区域。N 端结构域含有糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)和酪氨酸蛋白激酶(PTK)的磷酸化位点,后者是 catenin 结合位点,对维持 β -catenin 稳定性具有重要作用。C 端结构域含有 T 细胞转录因子结合位点,对激活下游基因转录起到关键作用;中间区域包括 Arm 区域,还有 E-cadherin、

APC 等结合位点,共同参与 Wnt 转导通路。 β -catenin 主要以复合物形式存在于细胞膜、细胞质和细胞核中,细胞膜中 β -catenin 与 E-cadherin 胞内 C 端结合,再通过 α -catenin 与细胞骨架相关分子结合,形成 E-cadherin-catenin-细胞骨架分子复合物,参与细胞黏附、迁移等功能;细胞质中 β -catenin 被 GSK-3 β 和 PTK 磷酸化后,逐渐被降解,同时胞质中会不断合成新 β -catenin 分子,始终保持合成与分解处于动态平衡状态,如果有些因素导致磷酸化过程发生异常,引起 β -catenin 在胞质大量积累,导致 Wnt/ β -catenin 通路相关基因被激活或抑制,从而出现不同疾病。

近年来关于骨肉瘤与 β -catenin 表达及转导通路相关性相继展开。Yang 等^[8]研究 54 例骨肉瘤患者后发现 N-cadherin 表达减弱, β -catenin 表达异常升高,且 β -catenin 表达与转移有着密切关系。Jin 等^[9]研究表明诱导骨肉瘤细胞凋亡是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路来完成,以上研究提示骨肉瘤中 β -catenin 表达高低与细胞侵袭转移及凋亡有关,而这些功能变化可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路来完成。Xia 等^[10]通过 siRNA 转染技术,将 MG63 细胞中 β -catenin 基因沉默后,经塞来昔布处理后,发现塞来昔布是通过激活 GSK-3 β 和抑制 β -catenin 依赖性基因来抑制骨肉瘤细胞株 MG63 生存能力;Zhang 等^[11]研究骨肉瘤细胞株 MG63 中 β -catenin 基因被沉默后,发现 MG63 侵袭力和活动力明显下降,以及 MG63 对多柔比星药物敏感度减弱,因此他们认为骨肉瘤细胞转移侵袭和对多柔比星敏感度均与 β -catenin 有关。总之, β -catenin 基因表达高低可能与骨肉瘤侵袭转移及耐药性有关,但 β -catenin 在骨肉瘤发生发展中具体作用机制尚未完全明确,需要进一步研究探讨。

4. 纤维连接蛋白(fibronectin, FN): FN 是细胞外基质的重要组成部分之一,该基因定位于人染色体 2q34~36, FN 是由两条肽链通过二硫键连接而成的双股多肽高分子糖蛋白,两股肽链分子质量各约 220kDa。正常情况下, FN 广泛存在于皮下基膜、平滑肌细胞及疏松组织,具有调节细胞增殖分化和增加细胞间连接等多种生物学效应。研究发现某些肿瘤发生侵袭和转移时, FN 表达较正常组织明显升高。近年来研究 FN 与骨肉瘤相关性越来越多, Na 等^[12,13]对 65 例低分化骨肉瘤、20 例高分化骨肉瘤、7 例骨样骨瘤及 7 例正常骨组织中 FN 表达情况进行研究,发

现 FN 在不同组织中表达高低不同,在低分化骨肉瘤最高(44.6%),在正常骨组织无表达;FN 在各种类型骨肉瘤中阳性率也不同,在成骨性骨肉瘤阳性表达最高(75.9%);FN 在转移骨肉瘤中表达(65.5%)明显高于未发生转移(34.5%);FN 阳性患者比阴性的生存能力差及生存时间短。根据这些数据,他们推测骨肉瘤中 FN 表达与转移及预后密切相关。因此笔者推测 FN 可能与骨肉瘤分型、转移、侵袭及治疗有关。

5. Snail 超家族:Snail 超家族是一种含有锌指结构的 DNA 结合蛋白,包括 Snail1 (Snail)、Snail2 (Slug)和 Snail3 (Smuc)等 3 个,Snail1 和 Snail2 较为重要,两者在 EMT 中功能相当^[3]。Snail 超家族是调控 EMT 重要转录因子之一,具有提高 FN 及 vimentin 等间质细胞标志物和抑制 E-cadherin 及细胞角蛋白等上皮细胞标志物的功能^[3]。Snail 超家族调节 EMT 作用机制如下:Snail 超家族通过与 Smad 相互作用蛋白(SIP-1)竞争来结合 E-cadherin 启动子区域的 E 盒,抑制 E-cadherin 和细胞角蛋白等分子的转录,导致 E-cadherin 表达下降和 vimentin 表达升高,从而引起 EMT 发生。

研究发现 Snail 表达增高与肿瘤转移和预后有着密切关系。Yang 等^[14]通过转染技术来抑制 Snail1 基因后,引起骨肉瘤细胞凋亡及侵袭力减弱,他们认为 Snail1 基因可能与骨肉瘤细胞侵袭转移有关。Sharili 等^[15]对犬和猫骨肉瘤标本进行研究,发现 Snail2 在 3 种不同分化能力骨肉瘤中具有统计学差异,在低分化中表达最高,在高分化中表达最低;Snail2 在不同类型骨肉瘤中表达也存在明显差异,在成骨肉瘤中表达最高。他们推测 Snail2 可能是作为诊断骨肉瘤标志物之一。Sharili 等^[16]研究 Saos-2 细胞中 Snail2 基因被敲除后,Saos-2 细胞活动力减少,细胞骨架发生改变及细胞突处减少;使 Saos-2 细胞高表达 Snail2 基因后,Saos-2 细胞活动力增加,细胞突处增加。因此他们推测 Snail2 可能是临床骨肉瘤潜在治疗靶点。

6. Twist:Twist 是一种碱性螺旋-环-螺旋蛋白,最早是 1983 年在果蝇中发现的,是近年来被发现及研究较多一种转录因子,是通过 E-box 相关元素来调节许多靶基因表达。Twist 基因位于 7p21.2,由于羟基末端不同,人 Twist 分为 Twist1 和 Twist2, Twist1 常称为 Twist。Twist 调控 EMT 参与肿瘤侵袭及转移是目前研究的焦点,研究发现 Twist 可以促进 Snail 表

达,从而使 E-cadherin 表达增强,以及 FN 和 N-cadherin 表达减弱,导致 EMT 发生。Twist 在骨肉瘤方面研究还处于早期阶段,相关研究相继展开。Entz 等^[17]研究发现 Twist 与低分化骨肉瘤有明显相关性,推测可能作为检测骨肉瘤的基因标志物。Yin 等^[4]研究发现, Twist 在成骨性骨肉瘤中表达最高(38.6%),在成纤维性中无表达, Twist 在转移中表达(52.8%)明显高于未发生转移(33.3%)。根据化疗效果来比较 Twist 表达情况,化疗效果好的患者 Twist 阳性表达率为 30.6%,化疗效果差的患者 Twist 阳性表达率为 33.3%。根据随访后生存率比较,阳性患者术后各时间段生存率较低。根据这些数据,他们推测骨肉瘤中 Twist 表达高低与肿瘤类型有关,还与骨肉瘤侵袭转移及生存率呈正比,但与化疗效果相关性及其具体作用机制均未明确。

三、展 望

目前文献报道多数是关于临床骨肉瘤标本及体外细胞实验与 EMT 关系,基本停留在 EMT 在骨肉瘤表达及转移、侵袭方面,而 EMT 在骨肉瘤中相关作用机制未明确,以及 EMT 与骨肉瘤患者化疗之间关系研究极少,至今仍存在很多的争议之处。原因是在体内发生侵袭和转移的骨肉瘤细胞只占原发肿瘤的很少一部分,当骨肉瘤发生 EMT 时的一些基因、转录、蛋白水平的改变往往为原发肿瘤所掩盖。如何确定和判断骨肉瘤已经发生 EMT 是一个很难的问题。实际上体内骨肉瘤细胞发生侵袭和转移经历 EMT 和 MET 两个过程,两个处于动态过程。因此 EMT 相关分子、动物模型及人体研究有望成为骨肉瘤研究领域的热点,为骨肉瘤早期诊断、预后评估提供价值,并且有望为骨肉瘤治疗提供新的靶点。

参考文献

- 1 Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, *et al.* Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22):9483-9493
- 2 Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, *et al.* Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma[J]. *J Dent Res*, 2013, 92(2):114-121
- 3 Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1429-1437
- 4 Yin K, Liao Q, He H, *et al.* Prognostic value of Twist and E-cadherin in patients with osteosarcoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5):3449-3455
- 5 Niinaka Y, Harada K, Fujimuro M, *et al.* Silencing of autocrine motility factor induces mesenchymal-to-epithelial transition and sup-

- pression of osteosarcoma pulmonary metastasis[J]. *Cancer Res*,2010,70(22):9483-9493
- 6 Nodale C, Sheffer M, Jacob - Hirsch J, *et al.* HIPK2 downregulates vimentin and inhibits breast cancer cell invasion[J]. *Cancer Biol Ther*,2012,13(4):198-205
 - 7 Zhang Z, Li H, Zhang H, *et al.* Primary osteosarcoma of the ureter [J]. *Am J Med Sci*,2012,343(6):504-506
 - 8 Yang JZ, Zhang XH, Liu JR, *et al.* Expression and significance of N - cadherin and beta - catenin protein in osteosarcoma[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*,2010,32(8):586-589
 - 9 Jin Z, Han YX, Han XR. Degraded iota - carrageenan can induce apoptosis in human osteosarcoma cells via the Wnt/beta - catenin signaling pathway[J]. *Nutr Cancer*,2013,65(1):126-131
 - 10 Xia JJ, Pei LB, Zhuang JP, *et al.* Celecoxib inhibits beta - catenin - dependent survival of the human osteosarcoma MG - 63 cell line[J]. *J Int Med Res*,2010,38(4):1294-1304
 - 11 Zhang F, Chen A, Chen J, *et al.* SiRNA - mediated silencing of beta - catenin suppresses invasion and chemosensitivity to doxorubicin in MG - 63 osteosarcoma cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2011,12(1):239-245
 - 12 Na KY, Bacchini P, Bertoni F, *et al.* Syndecan - 4 and fibronectin in osteosarcoma[J]. *Pathology*,2012,44(4):325-330
 - 13 Vial D, McKeown - Longo PJ. PAII stimulates assembly of the fibronectin matrix in osteosarcoma cells through crosstalk between the alphavbeta5 and alpha5beta1 integrins[J]. *J Cell Sci*,2008,121(Pt 10):1661-1670
 - 14 Yang H, Zhang Y, Zhou Z, *et al.* Snail - 1 regulates VDR signaling and inhibits 1,25(OH) - D(3) action in osteosarcoma[J]. *Eur J Pharmacol*,2011,670(2-3):341-346
 - 15 Sharili AS, Allen S, Smith K, *et al.* Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy[J]. *Tumour Biol*,2011,32(3):515-526
 - 16 Sharili AS, Allen S, Smith K, *et al.* Snail2 promotes osteosarcoma cell motility through remodelling of the actin cytoskeleton and regulates tumor development[J]. *Cancer Lett*,2013,333(2):170-179
 - 17 Entz - Werle N, Stoetzel C, Berard - Marec P, *et al.* Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas[J]. *Int J Cancer*,2005,117(3):349-355

(收稿日期:2013-11-11)

(修回日期:2013-12-12)

快速康复外科在胃癌 D2 根治术中的研究进展

郑 磊 朱家胜

摘 要 随着医疗模式的转变,外科患者对术后康复有了更高的需求,快速康复旨在缩短住院时间、加快术后康复、减少术后并发症、缩短住院时间。因此,快速康复外科(fast track surgery,FTS)广泛应用于临床各个学科。目前胃癌 D2 根治术被广泛认可,成为胃癌的主要治疗方式,FTS 在该领域的应用也迅速发展。

关键词 快速康复外科 胃肿瘤 D2 根治术

[中图分类号] R656.6 [文献标识码] A

21 世纪,医学模式向医学 - 心理 - 社会模式转变,外科患者对外科治疗提出了新的要求,主要在于促进术后康复、减少并发症发生、缩短住院时间、减少住院费用等。2001 年,丹麦 Hvidovre 大学腹部外科 Kehlet 等^[1]提出快速康复外科(fast track surgery,FTS)并广泛应用于临床各个学科。在我国,快速康复外科最早由黎介寿院士引进。FTS 的概念是在围手术期使用已被证实有效的方法来减少手术应激和并发症、促进患者术后康复,是一系列措施组合的协同结果^[2]。根据 FTS 制定的人性化医疗方案使患者

得到安全康复、高质量、高性价比的外科治疗。目前 FTS 广泛应用于胆囊切除术、疝修补术、乳房癌根治术、甲状腺手术等。

一、FTS 与胃癌 D2 根治术

胃癌是我国最为常见的恶性肿瘤之一,大部分患者就诊时已为进展期。日本《胃癌规约》第 14 版^[3]推荐的胃癌 D2 根治手术已为国内多数胃肠外科医生所接受,胃癌 D2 根治术也成为切除进展期胃癌的标准术式。随着社会发展,临床技术革新,FTS 理念在胃癌 D2 根治术中的应用也越来越广泛,认识也进一步加深。FTS 在胃癌 D2 根治术中的应用主要包括:①术前:术前教育、营养评估、不常规肠道准备、预防性使用药物;②术中:优化麻醉、减少手术创伤、术中保温、合理补液;③术后:早期活动、早期拔出各种

作者单位:241000 芜湖,皖南医学院(郑磊);皖南医学院弋矶山医院(朱家胜)

通讯作者:朱家胜,电子信箱:zhujiasheng2005@126.com