

E-cadherin 和 Slug 在口腔鳞状细胞癌中的表达及临床意义

郑彩云 汪鹏 沈显军 王舒仪 郑海红 施更生

摘要 目的 研究 E-cadherin 和 Slug 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织中的表达及临床意义。方法 采用免疫组织化学 DAB 显色法检测 74 例 OSCC 组织切片和 30 例正常口腔黏膜组织切片中 E-cadherin 和 Slug 的表达,分析 E-cadherin 与 Slug 在 OSCC 和正常口腔黏膜组织中的表达及 E-cadherin 与 Slug 的异常表达与临床病理特征之间的关系。结果 在 OSCC 组织中 E-cadherin 和 Slug 的阳性表达率分别为 52.63% (40/74) 和 48.65% (36/74)。结合 OSCC 临床病理特征发现,E-cadherin 的表达与肿瘤病理分级、淋巴结转移有统计学意义($P < 0.05$),Slug 的表达与肿瘤病理分级、TNM 分期、淋巴结转移有统计学意义($P < 0.05$),同时发现 OSCC 组织中 E-cadherin 的表达与 Slug 的表达呈负相关($r = -0.513, P < 0.05$)。结论 E-cadherin 和 Slug 的表达异常可能与 OSCC 的发生、发展、转移相关,其二者的联合检测可作为判断 OSCC 恶性程度和预后的参考指标。

关键词 E-cadherin Slug EMT 口腔鳞状细胞癌 免疫组织化学

中图分类号 R739.8

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.028

Expression and Clinical Significance of E-cadherin and Slug in Oral Squamous Cell Carcinoma. Zheng Caiyun, Wang Peng, Shen Xianjun, et al. Department of Stomatology, Taizhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To explore the expression and the prognostic significance of E-cadherin and Slug in oral squamous cell carcinoma(OSCC) tissues. **Methods** We analyzed the E-cadherin, Slug expression in 74 patients with OSCC and 30 normal oral tissue by means of immunohistochemistry. **Results** E-cadherin, slug positive expression rate in OSCC was 52.63 (40/74) and 48.65% (36/74). The results of clinical and pathological characteristics in OSCC showed that the expression of E-cadherin were associated with pathological and lymph node metastasis($P < 0.05$), while the the expression of Slug were associated with pathological, TNM stage and lymph node metastasis($P < 0.05$). The results also suggested that the expression of E-cadherin and Slug had a negative correlation($r = -0.513, P < 0.05$). **Conclusion** Expression of E-cadherin and Slug may correlate with occurrence, development and metastasis of OS-CC. The expression of E-cadherin and Slug can be regarded as valuable indicators for evaluating biological behavior and the prognosis of OS-CC.

Key words E-cadherin; Slug; EMT; Oral squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry

近年来我国口腔颌面部恶性肿瘤的发生率呈逐年上升的趋势,其中主要以口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)最为多见,约占 80%。口腔鳞状细胞癌患者 5 年生存率仅为 50% 左右,局部侵袭和淋巴结转移是导致患者死亡的主要原因^[1-3]。早期发现并诊断口腔鳞状细胞癌对患者的治疗及预后具有重要意义。从现代分子生物学研究发现,肿瘤转移是癌基因与抑癌基因参与调解的复杂过程,这为从分子水平研究口腔鳞状细胞癌的发病机制

和淋巴结转移奠定了理论基础。

近年来,上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transitions, EMT)学说很好地解释了肿瘤的发生、发展、侵袭和转移,因此受到了越来越多的关注。肿瘤的局部侵袭和远处转移和 EMT 有着密切的关系^[4]。上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)是一种钙依赖性的跨膜蛋白,参与细胞与细胞间黏附,对维持细胞的极性和完整性起重要作用,Slug 是 Snail 锌指转录因子家族成员之一,能够促进肿瘤的侵袭和转移。E-cadherin 和 Slug 均是 EMT 过程中的重要指标,本实验采用免疫组织化学技术,检测二者在 OSCC 组织中的表达情况,以探讨其与各临床病理因素的关联性。

基金项目:台州市医学会研究基金资助项目(TZSYXH15-13)

作者单位:317000 温州医科大学附属台州医院口腔科(郑彩云、汪鹏、沈显军、王舒仪、施更生),病理科(郑海红)

通讯作者:施更生,主任医师,硕士生导师,电子信箱:shigs@enz-emed.com

材料与方 法

1. 材料:实验组样本为随机抽取温州医科大学附属台州医院病理科 2011 年 10 月~2014 年 10 月间手术切除的 OSCC 病理蜡块组织共计 74 例(男性 34 例,女性 40 例;患者年龄 35~86 岁,平均年龄 67 岁),全部病例均经病理证实。其中 28 例为高分化 OSCC 组织,30 例为中分化 OSCC 组织,16 例为低分化 OSCC 组织;其中伴淋巴结转移 OSCC 组织 20 例,无淋巴结转移 OSCC 组织 54 例;TNM 分期中:I + II 期 OSCC 组织 50 例,III + IV 期 OSCC 组织 24 例。正常口腔黏膜组织 30 例(来自口腔良性病变患者并经病理证实为正常上皮组织)作为对照组,上述组织均通过 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋。所有患者术前均未接受治疗(放、化疗及免疫治疗)。TNM 分期来自病历原始记载,组织学分级来自笔者医院病理科记载,TNM 分期采用 UICC(2002 年)标准,组织病理学分类参照 WHO 2005 年标准。试剂:鼠抗 E-cadherin 单克隆抗体(sc-7870)购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗 Slug 单克隆抗体(sc-15391)购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组织化学检测试剂盒(GK500710)购自上海基因科技有限公司。

2. 方法:(1)标本的处理:选取经 HE 染色证实为 OSCC 组织的石蜡标本,制作 3 μ m 连续切片,裱片于洁净的载玻片上,56 $^{\circ}$ C 烤箱过夜。(2)染色步骤:免疫组织化学染色采用二步法 DAB 显色试剂盒进行操作。首先所有切片均通过二甲苯中脱蜡 3 次,每次 5min,再经梯度乙醇洗脱二甲苯(无水乙醇 2 次,每次 3min,95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇各 1 次,每次 3min),接着用流水中冲洗切片 10s;再将切片置于 EDTA 抗原修复液中,置于 95 $^{\circ}$ C 中修复 20min,室温冷却后,用 PBS 清洗 3 次,每次 5min,再用 3% H₂O₂ 封闭 5min(封闭内源性过氧化物酶);PBS 清洗 3 次,每次 3min;再滴加封闭血清(试剂盒提供)室温孵育

60min;滴加一抗(E-cadherin 以 1:200 稀释、Slug 以 1:50 稀释),阴性对照用一抗用 PBS 代替,置于 37 $^{\circ}$ C 中孵育 1h;PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 3min;实验组与对照组中均滴加试剂盒中提供的辣根过氧化物酶标记的二抗,置于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30min;PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 3min;DAB 显色 5min;流水冲洗后苏木素复染 1min;流水清洗 30min 后经乙醇梯度脱水;用二甲苯透明处理,中性树胶封片,晾干。(3)结果判定:根据染色强度和染色细胞百分比进行评分,E-cadherin 以细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞,Slug 以细胞核或者细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞。根据染色强度:无着色 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。根据染色细胞百分比:根据切片中阳性细胞数所占比例将结果分为 4 级:无明显阳性细胞数为阴性记 0 分,阳性细胞数 \leq 10% 记为 1 分,11% \leq 阳性细胞数 \leq 50% 记为 2 分,51% \leq 阳性细胞数 \leq 75% 记为 3 分,阳性细胞数 $>$ 76% 记为 4 分。免疫反应的得分为阳性细胞的染色强度得分与百分率得分的乘积,当乘积 \geq 3 时计为免疫反应阳性,否则为阴性。

3. 统计学方法:应用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行统计处理,各组数据间率的比较采用 χ^2 检验,定性资料的统计用 Fisher 精确概率法,两因素相关性分析采用 Spearman 等级相关,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. E-cadherin 和 Slug 蛋白在不同组织中的表达:E-cadherin 在 OSCC 组织中的阳性表达率为 52.63% (40/74),在正常组织中的阳性表达率为 100% (30/30),Slug 在 OSCC 组织中的阳性表达率为 48.65% (36/74),在正常组织中的阳性表达率为 16.67% (5/30),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。详见图 1 及表 1。

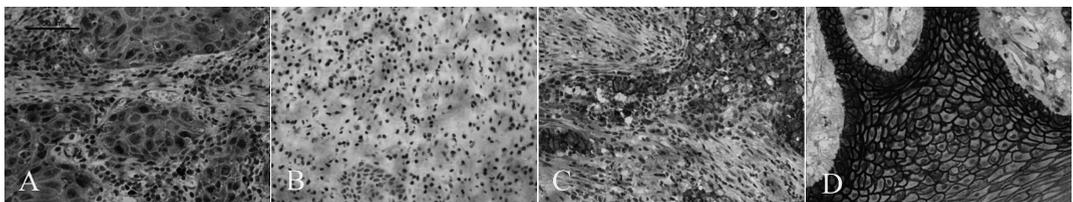


图 1 E-cadherin 和 Slug 在 OSCC 及正常组织中的表达(DAB 染色,苏木素复染,标尺 = 50 μ m)

A. Slug 在 OSCC 中的阳性表达;B. Slug 在正常组织中的阴性表达;

C. E-cadherin 在 OSCC 中的弱阳性表达;D. E-cadherin 在正常组织中的强阳性表达

表1 E-cadherin、Slug在OSCC和正常组织中的表达

组织类型	E-cadherin		Slug	
	阳性例数	阳性率(%)	阳性例数	阳性率(%)
OSCC组织	40	52.63	36	48.65
正常组织	30	100	5	16.67

E-cadherin在OSCC和正常组织中的表达相比, $P < 0.05$; Slug在OSCC和正常组织中的表达相比, $P < 0.05$

2. E-cadherin和Slug蛋白表达与OSCC临床病理特征的关系: E-cadherin蛋白阳性表达与患者年龄、性别、TNM分期相关性不显著($P > 0.05$), 与肿瘤的病理分级及有无淋巴结转移具有相关性($P < 0.05$)。Slug蛋白阳性表达与患者年龄、性别相关性不显著($P > 0.05$), 与肿瘤的病理分级、TNM分期及有无淋巴结转移具有相关性($P < 0.05$), 详见表2。

表2 E-cadherin、Slug在OSCC中的阳性表达与OSCC临床病理特征的关系

类别	n	E-cadherin			P	Slug			P
		阳性	阳性率(%)	χ^2		阳性	阳性率(%)	χ^2	
年龄(岁)									
<65	28	12	42.86	1.606	0.155	16	57.14	0.811	0.338
≥65	46	28	60.87			20	43.48		
性别									
男性	34	16	47.06	0.773	0.350	20	58.82	1.908	0.161
女性	40	24	60.00			16	40.00		
病理分级									
高分化	28	22	78.57	12.874	0.002	6	27.27	25.473	0.000
中分化	30	14	46.67			16	53.33		
低分化	16	4	25.00			14	87.50		
TNM分期									
I+II	50	30	60.00	1.518	0.212	20	40.00	3.610	0.047
III+IV	24	10	41.67			16	66.67		
淋巴结转移									
有转移	20	6	30.00	5.127	0.017	16	80.00	9.132	0.001
无转移	54	34	62.96			20	37.04		

3. E-cadherin和Slug在OSCC组织中表达的相关性: 运用Spearman等级相关分析E-cadherin、Slug蛋白二者之间的相互关系, 在74例OSCC组织中, E-cadherin蛋白的表达与Slug蛋白的表达呈明显负相关, 差异具有统计学意义($r = -0.513, P < 0.05$), 详见表3。

表3 OSCC组织中E-cadherin、Slug表达的相关性

E-cadherin	Slug		合计
	+	-	
+	10	30	40
-	26	8	34
合计	36	38	74

OSCC组织中E-cadherin与Slug蛋白的表达呈明显负相关, $r = -0.513, P < 0.05$

讨 论

在21世纪, 随着科技的不断进步, 对恶性肿瘤的检测手段不断增多, 但现今对恶性肿瘤的发病机制及转化转归尚需进一步研究。在口腔恶性肿瘤中, 临床

上更多的治疗手段是手术治疗, 但后期常会发生颈部淋巴结等转移, 现阶段研究表明多种恶性肿瘤的发生发展与EMT有关。EMT是指细胞表型发生极大变化, 即上皮细胞表型消失, 被具有侵袭性的间叶细胞表型取代, 表达间叶细胞的标志物有波形蛋白、纤连蛋白等, 上皮细胞常用的标志物有E-cadherin、细胞角蛋白和黏蛋白-1(Mucin-1)^[5]。EMT的分子机制及其复杂, 许多信号通路参与其中, 其中通过TGF-β和(或)Hedgehog通路诱导激活转录因子Snail进而抑制E-cadherin基因表达是EMT的一个重要机制^[6]。

Snail超家族是锌指状结构的转录因子家族, 包括Snail、Snai2(Slug)、和Snai3(Smuc)3种因子, 能促进EMT的发生, 研究表明, Snai1通过EMT机制在恶性肿瘤形成中发挥着重要作用。此外, Snai1还与药物的调控、免疫抵抗力及癌症干细胞(cancer stem cell, CSC)表型相关联^[7]。另有研究表明Slug高表达与乳腺癌、甲状腺癌和结肠癌的侵袭转移密切相关^[8-10]。但据笔者所知, 在OSCC组织中有关Slug

蛋白的表达鲜有报道。E-cadherin 的表达缺失是一个关键的环节和重要标志,无论是在胚胎发育还是肿瘤中,EMT 过程均伴有 E-cadherin 的表达缺失^[11]。有研究表明,在 OSCC 进程中,E-cadherin 下调会导致细胞间黏附力下降、细胞迁徙运动能力和侵袭能力增强,从而促进肿瘤生长方式转变^[12,13]。Batlle 等^[14]和 Cano 等^[15]研究证明,Slug 是一种强烈的 E-cadherin 基因转录抑制剂,可以显著抑制 E-cadherin 基因转录导致 EMT,从而促进肿瘤侵袭和转移。Turner 等^[16]研究明确,Slug 通过与位于 E-cadherin 启动子 5'端 E-pal 元件中的 E-box 结构结合,从而抑制 E-cadherin 基因转录。

为探索 OSCC 中 E-cadherin 和 Slug 的表达异常,以及 E-cadherin 和 Slug 之间的相互联系,本实验通过免疫组化 DAB 显色法检测 74 例 OSCC 中 E-cadherin 和 Slug 的表达。研究结果显示,与正常组相比,OSCC 组中 E-cadherin 的阳性表达率显著降低,表明 E-cadherin 可能参与了 OSCC 的发生、发展过程,且是影响 OSCC 预后的独立因素。进一步分析发现 E-cadherin 在不同病理分级的 OSCC 中的表达有差异,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),这与 Mohtasham 等^[17]的研究结果相一致,而在淋巴结转移阳性组中的表达较阴性组明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),据此笔者推测,E-cadherin 的表达与肿瘤的病理分级及淋巴结转移与否有关,分化越差、有淋巴结转移的肿瘤其 E-cadherin 缺失越明显。而临床分期中,E-cadherin 在 III + IV 期组中的表达较 I + II 期组降低,两者之间虽然没有统计学意义 ($P > 0.05$),但在临床上仍具有一定的参考价值。

此外本研究还发现,E-cad 在 OSCC 中的表达与患者性别、年龄无明显关联。本研究数据统计显示,OSCC 组织中 E-cadherin 和 Slug 的表达呈负相关 ($r = -0.513, P < 0.05$),说明 Slug 可能通过某种机制调节 E-cadherin 的表达进而调控恶性肿瘤侵袭能力,但据本实验数据发现,在正常组织中有 Slug 阳性表达,在癌组织中亦有 E-cadherin 阳性表达,可以推断 EMT 不仅有一种机制参与,可能还有其他机制有待于进一步探索。由实验结果可以得知 Slug 在 OSCC 组织中的阳性表达率显著高于在正常组织中的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),推测 Slug 可以作为推断 OSCC 发生、发展及预后的一个独立因素。在分化程度上,分化越差的 OSCC 组织中 Slug 的阳性表达率越高,在临床分期中 III + IV 期组中的阳性

表达率较 I + II 期组增高,有淋巴结转移组的 OSCC 组织中 Slug 的阳性表达率高于无淋巴结转移组,且这 3 个组别中差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),由此推测,Slug 不仅参与了 OSCC 的发生、发展,还与 OSCC 的病理分级、TNM 分期及淋巴结转移具有一定的关系。在临床上病理分化等级越差、TNM 分期越高、淋巴结有转移均提示患者预后越差,而由实验统计得知在此种情况下 Slug 阳性率较高,说明 Slug 可以作为判断 OSCC 的预后指标。

综上所述,E-cadherin 和 Slug 在肿瘤的浸润和转移过程中扮演着重要的角色,而 E-cadherin 和 Slug 是 EMT 机制中两个的重要生物学指标,进一步说明 EMT 可能参与了肿瘤的发生、发展过程。本实验结果显示,E-cadherin 和 Slug 阳性表达与 OSCC 的各临床病理特征有着密切的关系,可能参与 OSCC 的发生、发展和转移,但其具体机制有待于进一步研究,在临床联合检测 E-cadherin/Slug 的表达率对恶性肿瘤预防及预后有较大的指导及参考作用,为临床治疗口腔颌面部的恶性肿瘤提供了又一个重要依据。

参考文献

- Kademan D. Oral cancer [J]. Mayo Clin Proc, 2007, 82(7): 878 - 887
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74 - 108
- Wang HC, Chiang WF, Huang HH, et al. Promoter hypermethylation of the gene encoding heat shock protein B1 in oral squamous carcinoma cells [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013, 115(3): 376 - 384
- Wang Y, Lin Z, Sun L, et al. Akt/Ezrin Tyr353/NF-kappaB pathway regulates EGF-induced EMT and metastasis in tongue squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2014, 110(3): 695 - 705
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial - mesenchymal transition [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420 - 1428
- Jia W, Zhu J, Martin TA, et al. Epithelial - mesenchymal transition (EMT) markers in human pituitary adenomas indicate a clinical course [J]. Anticancer Res, 2015, 35(5): 2635 - 2643
- Wang H, Zhang G, Zhang H, et al. Acquisition of epithelial - mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/beta-catenin/Snail signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723: 156 - 166
- Hardy RG, Vicente - Duenas C, Gonzalez - Herrero I, et al. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis [J]. Am J Pathol, 2007, 171(3): 1037 - 1046
- Cobaleda C, Perez - Caro M, Vicente - Duenas C, et al. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development [J]. Annu Rev Genet, 2007, 41: 41 - 61
- Zhang KJ, Zhang BY, Zhang KP, et al. Clinicopathologic significance

- of slug expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(20): 2554 - 2557
- 11 Rosivatz E, Becker I, Specht K, *et al.* Differential expression of the epithelial - mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer [J]. Am J Pathol, 2002, 161(5): 1881 - 1891
 - 12 Ishida T, Hijioka H, Kume K, *et al.* Notch signaling induces EMT in OSCC cell lines in a hypoxic environment [J]. Oncol Lett, 2013, 6(5): 1201 - 1206
 - 13 Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers - E - cadherin, beta - catenin, APC and Vimentin - in oral squamous cell carcinogenesis and transformation [J]. Oral Oncol, 2012, 48(10): 997 - 1006
 - 14 Battle E, Sancho E, Franci C, *et al.* The transcription factor snail is a repressor of E - cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(2): 84 - 89
 - 15 Cano A, Perez - Moreno MA, Rodrigo I, *et al.* The transcription factor snail controls epithelial - mesenchymal transitions by repressing E - cadherin expression [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(2): 76 - 83
 - 16 Turner FE, Broad S, Khanim FL, *et al.* Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes [J]. J Biol Chem, 2006, 281(30): 21321 - 21331
 - 17 Mohtasham N, Anvari K, Memar B, *et al.* Expression of E - cadherin and matrix metalloproteinase - 9 in oral squamous cell carcinoma and histologically negative surgical margins and association with clinicopathological parameters [J]. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(1): 117 - 121

(收稿日期: 2015 - 09 - 25)

(修回日期: 2015 - 11 - 17)

术前营养支持对肝胆肿瘤患者术后营养状况的影响

史宏梅 曹翔 李薇薇

摘要 **目的** 探讨肝胆肿瘤患者术前营养支持对术后营养状况的影响。**方法** 收集 2014 年 1 ~ 7 月入院时术前 NRS 2002 评分 ≥ 3 分的原发性肝胆肿瘤患者 50 例,按是否采用术前营养支持,分成术前营养支持组和非术前营养支持组(对照组),比较两组间术后营养指标的差异。**结果** 术前营养支持组的术后 BMI、血红蛋白、白细胞、淋巴细胞、总蛋白、白蛋白、肌酐、尿酸的改善情况与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与术前相比,而其术后的 BMI、血红蛋白、总蛋白、白蛋白、肌酐、淋巴细胞百分比下降程度也低于对照组。**结论** 肝胆肿瘤患者其术前给予合理的营养支持有助于改善术后营养状况,应重视术前的营养评估,并给予必要的术前营养支持。

关键词 肝胆肿瘤 营养状况 术前营养支持

中图分类号 R151

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.029

Effect of Preoperative Nutritional Support on Postoperative Nutritional Status of Patients with Hepatobiliary Tumor. Shi Hongmei, Cao Xiang, Li Weiwei. Department of Clinical Nutrition, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, The Second of Military Medical University, Shanghai 200438, China

Abstract Objective To investigate the effect of preoperative nutritional support on postoperative nutritional status of patients with hepatobiliary tumor. **Methods** Recruited 50 cases of primary liver cancer patients from January 2014 to July 2014 whose preoperative scores estimated by NRS2002 were more than three points. The patients were divided into preoperative nutrition support group and non preoperative nutrition support group (control group) according to whether they received the preoperative nutrition support. Compared the differences of postoperative nutrition index between the two groups. **Results** Postoperative BMI, hemoglobin, white blood cells, lymphocytes, total protein, albumin and creatinine, uric acid of preoperative nutritional support group have significant differences compared with the control group. The decline degree of postoperative BMI, total protein, albumin, hemoglobin, creatinine, lymphocyte percentage is lower than the control group. **Conclusion** Preoperative nutritional support to patients with hepatobiliary tumor is helpful to improve the postoperative nutritional status. Preoperative nutrition assessment should be paid attention to and the necessary preoperative nutritional support should be provided.

Key words Shepatobiliary cancer; Nutritional status; Preoperative nutrition support

作者单位: 200438 上海, 第二军医大学附属东方肝胆外科医院营养科
通讯作者: 曹翔, 电子信箱: wssc@aliyun.com