

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.04.007

文章编号: 1005-8982(2016)04-0033-06

临床论著

AEG1 与钙黏附蛋白 E 在食管癌中表达的相关性及其意义

赵润根¹, 张彩凤¹, 姬娟娟¹, 张利利¹, 肖怀葱¹, 夏永华², 韩宇¹
(新乡医学院第一附属医院 1. 消化内科, 2. 皮肤科, 河南 卫辉 453100)

摘要:目的 研究星形细胞上调基因 1(AEG1)和钙黏附蛋白 E(E-cad)在食管癌中的表达的相关性,并分析与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组织化学方法和 Western blot 两种方法检测 58 例食管癌组织及其相应的癌旁组织中 AEG1 和钙黏附蛋白 E 的表达,并分析与临床病理特征的相关性。**结果** 在 58 例食管癌组织中 AEG1 表达的阳性率 82.7% 明显高于相应的癌旁组织的 51.7%($P < 0.05$),且表达阳性率与性别、年龄、肿瘤的部位、肿瘤病理类型无相关性($P > 0.05$),而与肿瘤分化程度、浸润深度、临床分期、淋巴结转移相关($P < 0.05$);在 58 例食管癌组织中钙黏附蛋白 E 的阳性率为 31%,明显低于相应癌旁组织的 94.8%($P < 0.05$),且表达阳性率与性别、年龄、肿瘤的部位、肿瘤病理类型无相关性($P > 0.05$),而与肿瘤分化程度、浸润深度、临床分期、淋巴结转移相关($P < 0.05$);食管癌中 AEG1 与钙黏附蛋白 E 的表达呈明显的负相关($r = -0.483, P < 0.05$)。**结论** AEG1 和钙黏附蛋白 E 在食管癌中的表达分别表现为高表达和表达缺失,且两者与食管癌的浸润、转移密切相关,AEG1 可能介导食管癌中钙黏附蛋白 E 的表达下调。

关键词: 星形细胞上调基因 1;钙黏附蛋白 E;食管癌;免疫组织化学

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Correlationship and significance of AEG1 and expression of E-cad in esophageal carcinoma

Run-gen Zhao¹, Cai-feng Zhang¹, Juan-juan Ji¹, Li-li Zhang¹,
Huai-cong Xiao¹, Yong-hua Xia², Yu Han¹

(1.Department of Gastroenterology; 2.Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China)

Abstract: Objective To explore the correlation of astrocyte elevated gene 1 (AEG1) and expression of E-cadherin (E-cad) protein in esophageal carcinoma, and analyze its relationship with clinical pathological features. **Methods** Immunohistochemical and Western Blot test methods were used to detect the expression of AEG1 and E-cadherin protein in 58 cases of esophageal carcinoma tissues and its corresponding adjacent tissues. Then we analyzed the relationship of AEG1, E-cadherin and clinicopathologic correlation. **Results** In 58 cases of esophageal carcinoma tissues, the positive expression rate of AEG1 was 82.7%; The positive expression rate of AEG1 was 51.7% in the corresponding adjacent tissues, the positive expression rate of AEG1 in esophageal carcinoma tissues was obviously higher than that in the corresponding adjacent tissues ($P < 0.05$), and the expression positive rate of AEG1 in esophageal carcinoma tissues was related to differentiated degree, depth of invasion, clinical stage, and lymph node metastasis ($P < 0.05$); but no relation with sex, age, tumor site, and pathologic types ($P > 0.05$); in 58 cases of esophageal carcinoma tissues, the positive expression rate of E-cadherin protein was 31%, the positive expression

收稿日期: 2015-10-28

[通信作者] 韩宇, E-mail: hy198317@126.com, Tel: 13837315730

rate of E-cadherin was 94.8%; the positive expression rate of E-cadherin in esophageal carcinoma tissues was obviously less than that in the corresponding adjacent tissues ($P < 0.05$); It is related to differentiated degree, depth of invasion, clinical stage, and lymph node metastasis ($P < 0.05$); but no relation with sex, age, tumor site, and pathologic types ($P > 0.05$); the expression of *AEG1* and E-cadherin protein was significantly negative correlation ($r = 0.483$, $P < 0.05$).

Conclusions The expression of *AEG1* and E-cadherin in esophageal carcinoma was characterized by over-expression and loss-expression, and they were closely associated with invasion and metastasis of esophageal carcinoma, *AEG1* may be mediated E-cadherin less-expression in esophageal carcinoma.

Keywords: astrocyte elevated gene1; E-cadherin; esophageal carcinoma; immunohistochemistry

食管癌是我国常见的恶性肿瘤,由于早期症状不典型,多数患者发现时已属晚期,具有较高的死亡率,居全国各类恶性肿瘤的第 4 位^[1],其中深度浸润和转移是主要的死因。目前对于食管癌的治疗除传统的外科手术、放化疗治疗外,随着人们对肿瘤发病的分子水平的研究不断加深,针对新分子靶点的分子靶向治疗成为食管癌治疗的新方向。星形细胞上调基因 1(astrocyte elevated gene 1, *AEG1*)是新近发现的癌基因。研究发现 *AEG1* 在多种肿瘤(如乳腺癌^[2]、神经胶质瘤^[3]、前列腺癌^[4]、胃癌等^[5])中存在高表达,并与肿瘤的进展、转移与侵袭、不良预后密切相关^[6-7]。钙黏附蛋白 E(E-cadherin, E-cad)是表达于正常上皮细胞表面的黏附分子,介导上皮细胞间的黏附性。E-cad 在多种肿瘤中存在明显表达减少甚至缺失,与肿瘤的转移与侵袭、不良预后密切相关^[8]。然而两者在食管癌中表达的相关性并未见报道。本研究拟通过免疫组织化学和 Western blot 检测食管癌及相应癌旁食管黏膜中 *AEG1* 和 E-cad 表达水平,并分析两者与临床病理特征的关系,探讨两者在食管癌中表达的相关性及其意义。

1 材料与方法

1.1 组织材料

选取 58 例新乡医学院第一附属医院胃镜室取得的食管癌病理活检标本,所有标本均经 2 位高年资病理科医师确诊;所有患者均为首次就诊,均未接受治疗。

1.2 试剂与仪器

鼠多克隆 *AEG1* 抗体(稀释倍数 1:100)和鼠多克隆钙黏附蛋白 E 抗体(稀释倍数 1:100)、DAB 显色剂均购自武汉博士德生物有限公司,免疫组织化学 SP 法二抗试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司,改进型枸橼酸盐缓冲抗原修复液(50×)购自碧云天生物科技有限公司,蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒、凝胶试剂盒、山羊抗鼠二抗、ECL 显色液

均购自碧云天生物科技有限公司,组织包埋机(湖北孝感, BM-IX);石蜡切片机(上海 Thermo Shadon, Finesse 325);Amersham Imager 600 凝胶成像系统(美国 GE Healthcare),垂直电泳系统(美国 Bio-rad)。

1.3 方法与结果判定

1.3.1 免疫组织化学 将取得的组织标本用 4%中性甲醛固定,进行石蜡包埋切片。常规脱蜡复水、微波法抗原修复、过氧化氢中和内源性的过氧化氢酶、山羊血清封闭、滴加一抗、4℃过夜、滴加二抗、滴加生物素-卵链霉素蛋白、DAB 显色、复染、中性树脂胶封片、观察。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。对于阳性染色结果的判定采用双盲法进行,由 2 位高年资病理科医师独立读片。*AEG1* 阳性表达主要定位于细胞质,少量表达于细胞膜,阳性表达为棕黄色颗粒。每张切片随机挑选 5 个视野($\times 400$),每个视野计数 100 个完整的肿瘤细胞,先根据阳性细胞所占的百分数计分:<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;再根据阳性细胞着色程度计分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,褐黄色为 3 分。将两者相乘所得的总分进行结果判定:分别对应 4 种表达强度:阴性:- (评分 0~1)、弱阳性:+ (评分 2~4)、中度阳性:++ (评分 5~8) 和强阳性:+++ (评分 9~12);(+~+++)统计为阳性,(-)为阴性。

1.3.2 免疫蛋白印迹 对新鲜的食管癌组织和癌旁组织标本进行总蛋白的提取并定量;将蛋白用 8%的 SDS-PAGE 胶电泳,电泳后取下凝胶将蛋白电转到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗(*AEG1* 和 E-cad 浓度均为 1:670)4℃过夜;第 2 天加入二抗,室温孵育 1 h,在 Amersham Imager 600 化学发光成像系统曝光,蛋白表达的灰度值运用 mage-Pro Plus 5.0 软件分析。蛋白相对表达为目的基因表达量与内参基因表达量的比值,Gapdh 为内参。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析,计数资料用 χ^2 检验或 Fisher's 精确检验,相关性用 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEG1 和 E-cad 在食管癌组织和癌旁组织中的表达

AEG1 在食管癌组中表达的阳性率明显高于癌

旁组,两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与癌旁组比较,食管癌中 E-cad 的表达明显减少,差异有统计学意义。见图 1 和表 1。

2.2 AEG1 和 E-cad 在食管癌组织中表达的相关性

AEG1 阳性组中 E-cad 阳性率为 20.8%,明显低于 AEG1 阴性组中 E-cad 的阳性率 83.3%;两者在食管癌中的表达呈明显负相关 ($r = -0.483$),差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

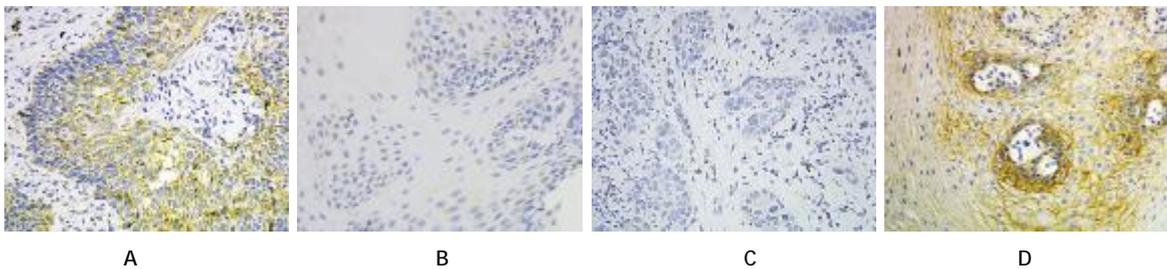


图 1 AEG1 和 E-cad 在食管癌及癌旁组织中的表达
A:食管癌中 AEG1 的阳性表达(SP×200);B:癌旁组织中 AEG1 的阴性表达(SP×200);C:食管癌中 E-cad 的阴性表达(SP×200);D:癌旁组织中 E-cad 的阳性表达(SP法×200)

表 1 AEG1、E-cad 在食管癌及其癌旁组织中的表达情况

组别	例数	AEG1 表达情况			E-cad 表达情况		
		阳性 / 例	阴性 / 例	阳性率 / %	阳性 / 例	阴性 / 例	阳性率 / %
食管癌组	58	48	10	82.7	18	40	31.0
癌旁组	58	30	28	51.7	55	3	94.8

表 2 AEG1 与 E-cad 在食管癌中表达的相关性

项目	E-cad		r 值	P 值
	+	-		
AEG1	+	10	-0.483	0.000
	-	8		

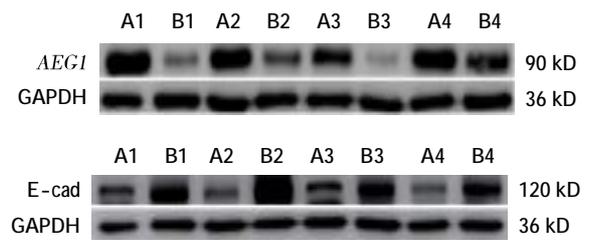
2.3 AEG1 和 E-cad 在食管癌中表达与临床病理因素之间的关系

食管癌组织中 AEG1 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的部位及病理类型无关 ($P > 0.05$);而与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移情况、临床分期相关 ($P < 0.05$),随着分化程度的降低、浸润深度的加深, AEG1 的表达阳性率越高,有淋巴转移的患者中 AEG1 的阳性率明显高于无淋巴结转移的患者。食管癌组织中 E-cad 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的部位及病理类型无相关性 ($P > 0.05$);而与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移情况、临床分期相关 ($P < 0.05$),随着分化程度的降低、浸润深度的加深, E-cad 的表达阳性率逐渐降低,有淋巴

转移的患者中 E-cad 的阳性率明显低于无淋巴结转移的患者。见表 3。

2.4 食管癌和癌旁组织中 AEG1 和 E-cad 蛋白表达水平的比较

食管癌和癌旁组织中 AEG1 和 E-cad 蛋白表达水平的比较见图 2、3、4。食管癌中 AEG1 蛋白表达水平明显高于相应的癌旁组织 ($P < 0.05$),食管癌组织中 E-cad 的表达水平明显低于相应的癌旁组织 ($P < 0.05$),两者差异有统计学意义。见图 5、6。



A1-A4:癌组织样本;B1-B4:癌旁组织样本
图 2 AEG1、钙黏附蛋白 E 在食管癌与相应的癌旁组织中的表达情况

表 3 AEG1、E-cad 在食管癌中的表达与临床病理因素之间的关系

临床病理	例数	AEG1 表达情况			P 值	E-cad 表达情况			P 值
		阳性 / 例	阴性 / 例	阳性率 / %		阳性 / 例	阴性 / 例	阳性率 / %	
性别									
男	32	28	4	87.5	0.319	9	23	28.1	0.595
女	26	20	6	76.9		9	17	34.6	
年龄									
≥60 岁	48	41	7	85.4	0.353	15	33	31.2	1.000
<60 岁	10	7	3	70.0		3	7	30.0	
肿瘤部位									
食管上段	12	9	3	75.0	0.092	6	6	50.0	0.066
食管中段	38	34	4	89.5		8	30	21.1	
食管下段	8	5	3	62.5		4	4	50.0	
病理类型									
鳞癌	49	42	7	85.7	0.177	14	35	28.6	0.438
非鳞癌	9	6	3	66.7		4	5	44.4	
分化程度									
高 - 中分化	26	17	9	66.7	0.030	14	12	53.8	0.010
低分化	32	31	1	96.9		4	28	12.5	
浸润深度									
T1-T2	25	16	9	64.0	0.010	13	12	52.0	0.040
T3-T4	33	32	1	97.0		5	28	15.2	
淋巴结转移情况									
有	38	37	1	97.4	0.000	4	34	10.5%	0.000
无	20	11	9	55.0		14	6	70.0%	
临床分期									
I、II 期	28	20	8	67.9	0.038	17	11	60.7%	0.000
III、IV 期	30	28	2	96.7		1	29	3.3%	

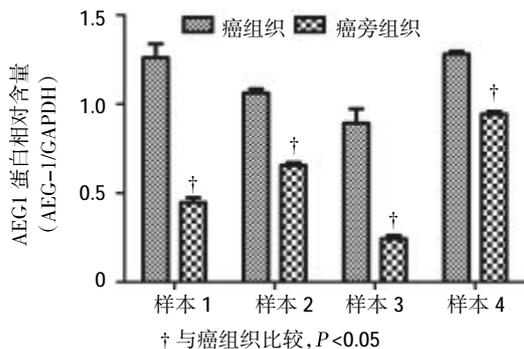


图 3 食管癌与相应的癌旁组织中 AEG1 表达的比较

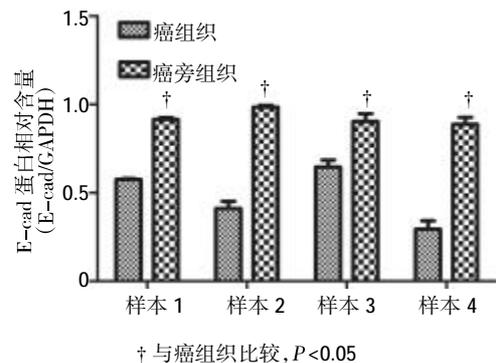


图 4 食管癌与相应癌旁组织中的 E-cad 表达的比较

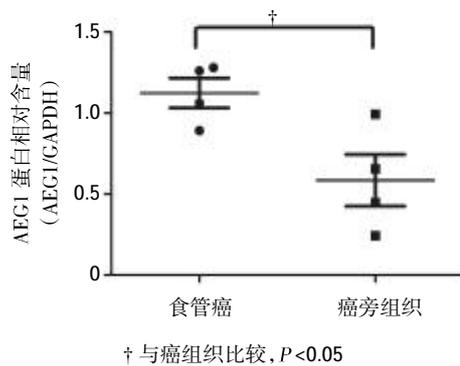


图 5 食管癌与癌旁组织中 AEG1 含量的比较

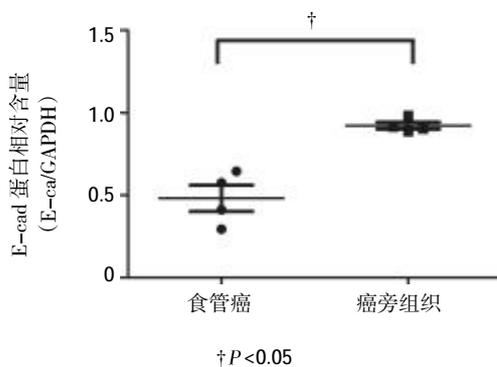


图 6 食管癌与癌旁组织中 E-cad 含量的比较

3 讨论

AEG1 是新近发现的原癌基因,其 cDNA 序列全长 3 611 bp,包含 12 个外显子和 11 个内含子,位于人类 8 号染色体上^[9]。大量研究表明,AEG1 有促进肿瘤细胞的增殖^[10]、抑制细胞凋亡^[11]、促进细胞侵袭和转移、增加化疗抗性^[12]、促进肿瘤血管形成等^[13]生物学功能。提示 AEG1 在肿瘤的发生、发展及恶性进程中发挥重要作用。近年来的研究发现,神经胶质瘤^[3]、前列腺癌^[4]、胃癌^[5]、卵巢癌等^[14]多种肿瘤中都存在 AEG1 的高表达。为研究食管癌中 AEG1 的表达情况,本实验采用免疫组织化学和 Western blot 方法对 58 例食管癌组织和相对应的癌旁组织中 AEG1 的表达情况进行检测。结果显示食管癌组织中 AEG1 的表达阳性率明显高于相对应的癌旁组织 ($P < 0.05$),两者比较差异有统计学意义。为进一步探讨 AEG1 在食管癌中表达的意义,本研究比较分析 58 例食管癌患者的临床病理资料。

浸润和转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因,浸润深度和远处转移与患者的不良预后密切相关^[15]。研究证实,AEG1 能促进乳腺癌细胞转移到小鼠的肺部^[16],在转移的淋巴结中 AEG1 表达水平明显高于无淋巴结转移的肿瘤组织^[13];AEG1 的表达可以明显抑

制肿瘤组织向淋巴结的转移^[12]。这提示 AEG1 在肿瘤细胞的浸润和转移密切相关。本研究比较分析 58 例食管癌标本,其中浸润深度在 T₁-T₂ 之间的病例 25 例,AEG1 的阳性率为 64.0%,显著低于浸润深度在 T₃-T₄ 的 97.0% ($P = 0.01$)。其中有淋巴结转移的患者 38 例,AEG1 的阳性率为 97.4%,显著高于无淋巴结转移的 55.0% ($P = 0.00$),也支持这一观点。同时本研究还发现在食管癌组织中 AEG1 的表达与肿瘤的分化程度和临床分期密切相关 ($P < 0.05$),而与肿瘤的部位、病理类型、患者的年龄及性别无关。其具体分子机制目前尚不清楚。

肿瘤细胞的转移是一个多阶段的过程^[17]。目前多数研究表明,肿瘤细胞的转移的发生起始于上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[18],EMT 的过程包括细胞表面的紧密连接蛋白减少或重新排列以及一些间质细胞蛋白的表达的增多;从而导致细胞失去上皮极性并获得间质特性,使细胞获得较强的侵袭和转移能力。钙黏附蛋白 E 是一种钙依赖性的细胞跨膜蛋白;其功能的发挥主要是 E-cad 与 β 连环素结合形成 E-cad/ β 连环素复合体,锚定于细胞骨架上,从而介导同种细胞间的黏附并维持组织结构的功能。研究证实,E-cad 在包括食管癌在内的多种肿瘤中都存在表达的缺失,并与肿瘤的浸润深度和远处转移密切相关^[19]。本研究通过对 58 例食管癌标本中钙黏附蛋白 E 的表达进行比较分析发现,在 AEG1 表达阳性的 48 例标本中仅有 10 例出现 E-cad 的阳性,阳性率为 20.8%;而在 AEG1 表达阴性的 10 例食管癌标本中 8 例钙黏附蛋白 E 表现为阳性,阳性率为 80%;相关分析结果显示,AEG1 和 E-cad 在食管癌的表达中呈明显负相关 ($r = -0.483, P = 0.00$),差异有统计学意义。另外,在实验中还发现在食管癌标本中随着 AEG1 阳性程度的增强,E-cad 表达水平相应的降低,因此可推测 AEG1 在食管癌中的过表达可能通过某种通路下调 E-cad 的表达。有文献报道,在肺癌^[20]、宫颈癌等^[21]的研究中发现 AEG1 表达上调具有诱导上皮细胞间质化的生物功能,其中 Wnt/ β -catenin 信号通路在此过程中发挥重要作用。其可能的机制为 AEG1 通过激活酪蛋白激酶 (CKI δ) 从而诱导糖原合酶激酶 -3 β (GSK-3 β) 的磷酸化激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,导致细胞中 β -catenin 水平表达下降,介导上皮细胞的表面黏附分子的表达。这与本结果相一致。

研究表明,在食管癌中分别存在 *AEG1* 的表达上调和 *E-cad* 的表达缺失,且其表达水平与食管癌的分化程度、浸润深度、转移情况密切相关;*AEG1* 和 *E-cad* 有望成为评估食管癌患者转移和浸润的重要生物指标。相关分析显示两者在食管癌中表达呈显著负相关。*AEG1* 可能通过 *Wnt/β-catenin* 信号通路介导 *E-cad* 的表达下调,在食管癌的局部浸润和转移中发挥重要作用。然而在本研究中还有诸多不足之处,还需要进一步研究验证。

参 考 文 献:

- [1] 郝捷,邵康. 中国食管癌流行病学现状, 诊疗现状及未来对策[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21(7): 501-504.
- [2] Wan L, Kang Y. Pleiotropic roles of *AEG-1*/MTDH/LYRIC in breast cancer[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 120(1): 113-134.
- [3] Guo J, Chen X, Xi R, et al. *AEG-1* expression correlates with CD133 and PPP6c levels in human glioma tissues[J]. *Journal of Biomedical Research*, 2014, 28(5): 388.
- [4] Bhatnagar A, Wang Y, Mease RC, et al. *AEG-1* promoter-mediated imaging of prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(20): 5772-5781.
- [5] Dong L, Qin S, Li Y, et al. High expression of astrocyte elevated gene-1 is associated with clinical staging, metastasis, and unfavorable prognosis in gastric carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(3): 2169-2178.
- [6] Meng F, Luo C, Ma L, et al. Clinical significance of astrocyte elevated gene-1 expression in human epithelial ovarian carcinoma[J]. *International Journal of Gynecologic Pathology*, 2011, 30(2): 145-150.
- [7] Xu JB, Wu H, He YL, et al. Astrocyte-elevated gene-1 overexpression is associated with poor prognosis in gastric cancer[J]. *Medical Oncology*, 2011, 28(2): 455-462.
- [8] Hu XK, Ruan Y, Cheng F, et al. p130Cas, E-cadherin and β-catenin in human transitional cell carcinoma of the bladder: expression and clinicopathological significance [J]. *International Journal of Urology*, 2011, 18(9): 630-637.
- [9] Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, et al. Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, et al. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, *AEG-1*[J]. *Gene*, 2005, 353: 8-15.
- [10] 刘海燕,姜玉杰,孙若鹏. SiRNA 下调 astrocyte elevated gene-1 对神经母细胞瘤细胞增殖和凋亡影响的体外研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(4): 705-710.
- [11] 秦瑞英,王宏伟,赵建华,等. *AEG-1* siRNA 对宫颈癌细胞株增殖和凋亡影响的研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(17): 2139-2141.
- [12] Liu XW, Wang DG, Liu HL, et al. Knockdown of astrocyte elevated gene-1 (*AEG-1*) in cervical cancer cells decreases their invasiveness, epithelial to mesenchymal transition, and chemoresistance[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(11): 1702-1707.
- [13] Yu JQ, Zhou Q, Zhu H, et al. Overexpression of astrocyte elevated gene-1(*AEG-1*) in cervical cancer and its correlation with angiogenesis [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2015, 16(6): 2277-2281.
- [14] Li C, Chen K, Cai J, et al. Astrocyte elevated gene-1: a novel independent prognostic biomarker for metastatic ovarian tumors[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(4): 3079-3085.
- [15] Von KS, Conti A, Nobis M, et al. Cancer Cell-Autonomous TRAIL-R Signaling Promotes KRAS-Driven Cancer Progression, Invasion, and Metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(4): 561-573.
- [16] Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2004, 5(4): 365-374.
- [17] Wang Z, Cao CJ, Huang LL, et al. EFEMP1 promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by *AEG-1* via NF-κB signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(16): 14191-14208.
- [18] Song E, Yu W, Xiong X, et al. Astrocyte Elevated Gene-1 Promotes Progression of Cervical Squamous Cell Carcinoma by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition via Wnt Signaling[J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2015, 25(3): 345-355.
- [19] 俞岚,周蕾,武世伍,等. 上皮性卵巢癌中 CD133 与 EMT 相关因子表达的关系[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(9): 1297-1302.
- [20] He WL, He SY, Wang Z, et al. Astrocyte elevated gene-1 (*AEG-1*) induces epithelial-mesenchymal transition in lung cancer through activating *Wnt/β-catenin* signaling[J]. *Bmc Cancer*, 2015, 15(1): 1-13.

(张蕾 编辑)