

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.008

文章编号: 1005-8982(2016)08-0038-06

论著

## 钙黏蛋白 E、桥粒芯糖蛋白 2、磷酸化 Akt 和转录因子 Snail 在侵袭性前列腺癌中的作用

匡小根, 张晖辉, 许韩峰, 李清, 曹友汉

(南华大学附属第一医院 泌尿外科, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:目的** 探讨钙黏蛋白 E(E-cadherin)、桥粒芯糖蛋白(2DSG2)、磷酸化 Akt(pAkt)和转录因子 Snail 在前列腺癌发病进程中的作用; 阐明 E-cadherin、DSG2、pAkt 和 Snail 对前列腺癌发病进程的影响及在临床预后中的作用。**方法** 组织芯片法检测 E-cadherin、DSG2、pAkt 和 Snail 在前列腺癌组织中的表达情况。**结果** 前列腺癌组织中 E-cadherin 表达明显低于正常前列腺组织, 细胞质和细胞核中均可观察到 pAkt 表达, 且在肿瘤高分化区和低分化区内均有较高表达。E-cadherin 和 DSG2 表达呈显著正相关。E-cadherin 和 DSG2 表达下降提示前列腺癌患者血清前列腺特异性抗原(PSA)浓度含量增加, Gleason 评分较高及病理分期更高。**结论** 前列腺癌低分化细胞中钙黏蛋白表达降低, 钙黏蛋白低表达提示肿瘤细胞侵袭性更强, 转移发生率高。钙黏蛋白在前列腺癌发展中发挥关键作用, E-cadherin 和 DSG2 有望成为侵袭性前列腺癌的预后因子。

**关键词:** 前列腺癌; 预后; 组织芯片; E-cadherin; DSG2; pAkt; Snail

**中图分类号:** R737.25

**文献标识码:** A

### Role of E-cadherin, DSG2, pAKT, and Snail in aggressive prostate cancer

Xiao-gen Kuang, Hui-hui Zhang, Han-feng Xu, Qing Li, You-han Cao  
(Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Nanhua University,  
Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the roles of E-cadherin, DSG2, pAKT, and Snail in the development of prostate cancer, and to explore the potential association between E-cadherin, DSG2, pAKT, and Snail and the progression of prostate cancer. **Methods** The expression of E-cadherin, DSG2, pAKT and Snail in prostate cancer tissues was assessed by tissue microarrays. **Results** Compared with normal prostate, a significant decrease in the expression of E-cadherin was found in prostate cancer. The pAKT expression was detected in both cytoplasm and nucleus and was generally high in both well and poorly differentiated areas of the tumor. A strong and significant positive correlation between the expression of E-cadherin and DSG2 was found. Decreased expression of both E-cadherin and DSG2 was related to increased level of serum PSA concentration, higher Gleason scores and advanced pathological stage. **Conclusions** Tumor cells with reduced cadherin expression are more likely to be aggressive and have a greater potential for metastatic behavior. Cadherin plays a critical role in the progression of prostate cancer, and both E-cadherin and DSG2 may be useful prognostic markers of aggressive prostate cancer.

**Keywords:** prostate cancer; prognosis; tissue microarray; E-cadherin; DSG2; pAKT; Snail

收稿日期: 2015-11-19

前列腺癌诊断和治疗的主要挑战是预测当前癌症状态是否会进展为侵袭性癌症<sup>[1]</sup>。到目前为止,除了血清前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)外<sup>[2]</sup>,还没有确定的预后因子用于前列腺癌预后预测。因此,识别和发展新的能够有效预测前列腺癌侵袭性的预后标志物势在必行。

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB 或 Akt) 和磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, pAkt) 在前列腺癌中过表达, Akt/pAkt 蛋白表达与前列腺癌生化复发相关<sup>[3-4]</sup>。尽管目前发现前列腺癌中钙黏蛋白 E (E-cadherin) 表达缺失<sup>[5-6]</sup>, 但目前尚未见关于 E-cadherin 表达缺失与前列腺癌生化复发相关性的研究报道。此外, 目前也未见关于桥粒芯糖蛋白 2 (desmoglein 2, DSG2) 在前列腺癌中表达情况的研究报道。以往研究表明, PI3K/Akt 信号通路活化可通过上皮细胞-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关转录因子 Snail 抑制前列腺癌 E-cadherin 转录。本研究检测前列腺癌组织标本中 DSG2、活化 Akt 和 Snail 表达情况及其相关性, 并分析 E-cadherin 及 DSG2 和生化复发的相关性, 探讨 E-cadherin 和 DSG2 作为前列腺癌侵袭性有效预测因子的潜力。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

128 例前列腺癌组织标本均为 2001 年 1 月-2005 年 12 月南华附属第一医院泌尿外科前列腺癌手术后样本。用于 mRNA 提取的所有组织均是经尿道前列腺电切术及耻骨弓上前列腺切除术中迅速收集, 然后投入已经准备好的液氮中, 冷冻保存。切取组织直接用包埋剂进行包埋, 制作冷冻切片。所有病例均经 HE 染色确定, 并进行 Gleason 评分及临床分期。术后均经病理证实为前列腺癌。

### 1.2 主要方法

所有标本均经 10% 中性福尔马林溶液固定, 石蜡包埋, 应用组织芯片制备仪制备芯片。首先每个组织制作 1 张 HE 切片, 由病理专家在显微镜下将病变的典型部位进行定位, 并在切片上标记相关区域, 然后将该切片和石蜡组织块进行比较, 依靠 HE 切片上标记在石蜡组织块同一部位也做一标记, 这样就可以做到准确定位。制备长 36 mm × 宽 26 mm × 高 15 mm 大小的空白蜡块, 在此蜡块 26 mm × 21 mm 范围内打孔 (1.5 mm) 制成 12 × 9 共 108 点阵

芯片的模块。穿刺事先标记的目标组织 (直径 1.5 mm), 准确放入空白蜡块的小孔内。每例标本均编号, 从空载体芯片蜡块第 1 排第 3 孔开始, 依次按序操作直至将所有标本均种植于空白蜡块中, 最后用石蜡切片机进行连续切片。建立布有 250 个阵列 (样本) 不同级别的前列腺临床标本的组织芯片, 正常前列腺组织标本 10 例。

### 1.3 免疫荧光双重染色 (FITC-CY3) 和激光扫描共聚焦显微镜观察

取组织芯片石蜡切片 (4 μm), 58℃ 烤 18 h, 常规脱蜡, PBS 洗 3 遍。柠檬酸缓冲液抗原修复 20 min, 室温冷却 20 min, PBS 洗 3 遍。滴加 20% 蛋清, 室温静置 30 min, PBS 洗 3 遍。滴加 10% 正常羊血清, 室温静置 20 min。加鼠 E-cadherin/DSG2/pAkt/Snail (1 : 50) 和 CK8/18 (1 : 100) 混合物, 室温孵育 4 h, PBS 洗 3 遍。加羊抗鼠 IgG-FITC (1 : 30) 和生物素化羊抗兔 IgG (1 : 100) 混合物, 避光室温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍。加 Streptavidin.Cy3, 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍, 蒸馏水洗 3 min, 以防荧光淬灭剂封片。Leica TCS SP2 激光扫描共聚焦显微镜下扫描, 计算机采集数据, 数字成像。CK8/18 阳性细胞可见细胞核内绿色荧光, E-cadherin/DSG2/pAkt/Snail 阳性细胞核内可见红色荧光。

### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。率的比较采用  $\chi^2$  检验和确切概率法, 等级资料比较采用秩和检验, 等级资料的关联分析采用 Spearman 等级相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫荧光分析原发性前列腺癌组织芯片中 E-cadherin、DSG2、pAkt 和 Snail 的表达

128 例前列腺癌患者组织标本用福尔马林固定和石蜡包埋后, 分别提取直径约为 2 mm 圆柱状核心组织, 并将这些组织嵌入到同一张切片, 用于构建前列腺癌组织芯片, 以便能同时测定各蛋白在多个样本中表达情况。前列腺癌组织芯片由上海芯超生物科技有限公司制作完成。前列腺癌组织芯片构建时, 首先由两名病理科教授检测各患者组织标本, 以确定肿瘤细胞高密度区, 供公司参考。构建好后, 从前列腺癌组织芯片石蜡包埋中切取 5 μm 组织用于免疫荧光分析。蛋白表达计分方法为发生免疫反应的肿瘤细胞占组织核的百分比 (见图 1)。然后对每

个样本组织核的平均值进行统计学分析。患者的临床学特征见表 1。

### 2.2 前列腺癌组织中 E-cadherin、DSG2、pAkt 和 Snail 蛋白的表达情况

免疫组织化学结果表明前列腺癌组织中 E-cadherin 和 DSG2 表达明显低于前列腺组织,肿瘤高分化区细胞边缘 E-cadherin 和 DSG2 蛋白高水平表达,而肿瘤低分化区域 E-cadherin 和 DSG2 表达下降(见图2A、2B)。pAkt 在前列腺癌细胞质和细胞核中均表达,且在肿瘤高分化区和低分化区内均有较高表达(见图 2C)。此外,前列腺癌 Snail 核表达水平较正常组织也略有上升(见图 2D)。见表 2。

### 2.3 前列腺癌蛋白表达和临床病理学特征的关系

斯皮尔曼秩相关法统计发现,E-cadherin 和 DSG2 表达呈显著正相关,pAkt 表达升高同时 Snail 水平也升高,pAkt 和 Snail 表达之间呈弱显著正相关。此外,pAkt 与 E-cadherin 表达成弱显著正相关。pAkt 与 DSG2 表达相关性要比 pAkt 和 E-cadherin 表达相关性还要弱,而且无统计学意义。这些结果表明 E-cadherin 和 DSG2 随着 pAkt 表达增强而增强,E-cadherin 和 Snail 之间存在微弱负相关,但相

表 1 患者一般资料 (n=128)

项目	例(%)
<b>确诊时年龄</b>	
平均年龄(年龄范围)	61(41.0~74.7)
<61 岁	62(48.4)
≥61 岁	66(51.6)
<b>确诊时 PSA 含量</b>	
平均含量(含量范围)	7(0.4~51.4)
≤4 ng/ml	22(17.2)
4~10 ng/ml	84(65.6)
≥10 ng/ml	22(17.2)
<b>格里森评分</b>	
≤7 分	46(35.9)
7 分	55(43.0)
≥7 分	27(21.1)
<b>TNM 分期</b>	
T <sub>1-2</sub>	102(79.7)
T <sub>3</sub>	23(18.0)
T <sub>4</sub>	3(2.3)
<b>切除边缘</b>	
阴性	83(64.8)
阳性	45(35.2)
<b>淋巴管侵犯</b>	
阴性	121(94.5)
阳性	7(5.5)
<b>神经浸润</b>	
阴性	42(32.8)
阳性	86(67.2)
<b>生化复发</b>	
阴性	98(76.6)
阳性	30(23.4)

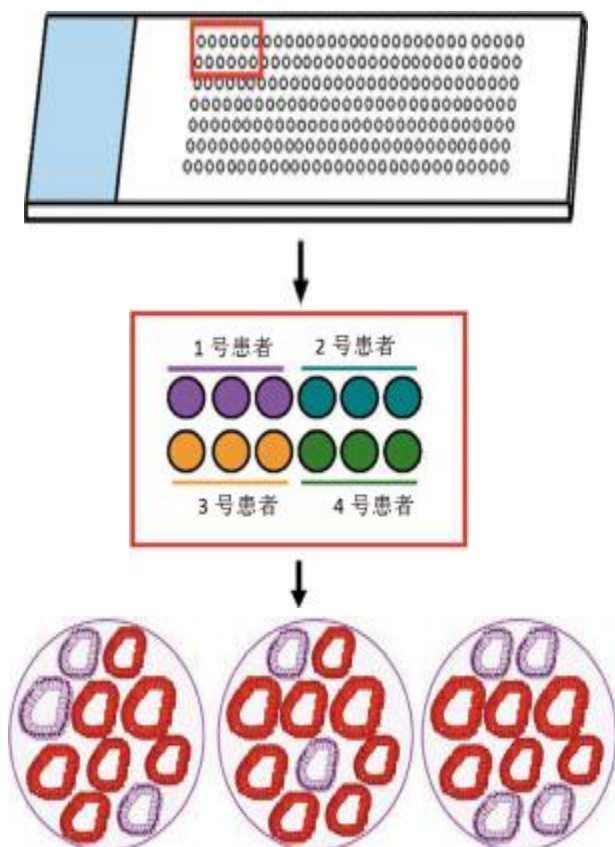


图 1 前列腺癌组织芯片制备及评价流程图

关性无统计学意义。此外,DSG2 和 Snail 表达呈微弱正相关,相关性也无统计学意义,提示前列腺癌中 Snail 表达并不影响 DSG2 表达。

统计还发现 E-cadherin 表达和所有检查临床病理特征之间存在负相关,尽管其相关性无统计学意义。而 DSG2 表达和所有临床病理特征也呈负相关,DSG2 表达分别与血清 PSA 浓度、Gleason 评分

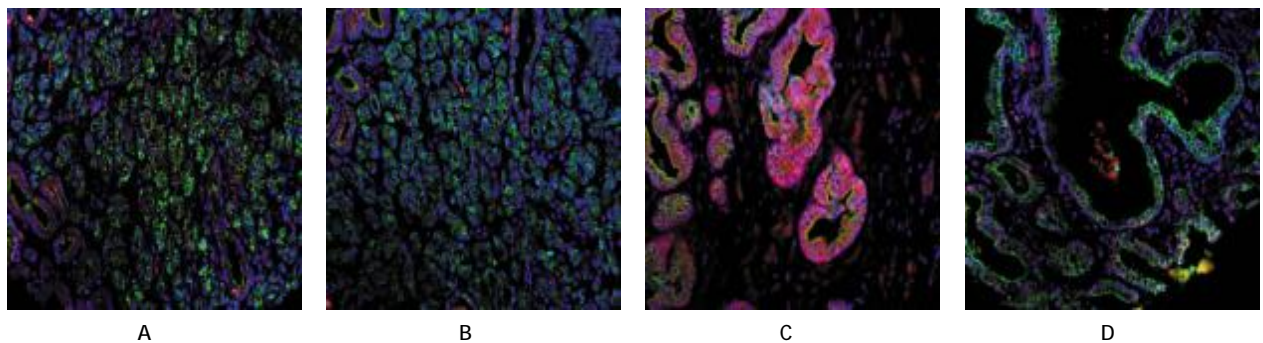
呈显著负相关,并且其相关性稍强于 E-cadherin 表达与血清 PSA 浓度、Gleason 评分的相关性。总之,本结果表明,E-cadherin 和 DSG2 表达下降提示前列腺癌患者血清 PSA 浓度含量增加、Gleason 评分较高及病理分期更高。见表 3。

#### 2.4 蛋白表达的临床影响

E-cadherin 表达 70%处最接近于前列腺癌标本 E-cadherin 表达平均值,因而选取该处为阈值,将患者分为 E-cadherin 高表达组( $\geq 70\%$ )与 E-cadherin 低表达组( $< 70\%$ ),比较两组患者生存期,结果发现 E-cadherin 表达 $\geq 70\%$ 组患者无复发生存率高于 E-cadherin 表达 $< 70\%$ 组患者,差异有统计学意义(见图 3A,  $P=0.043$ )。E-cadherin 表达 $< 70\%$ 组患者生化复发中值时间为 104 个月,而 E-cadherin 表达 $\geq 70\%$ 组患者 120 个月随访期结束后尚未达到生化复发中值时间。同样选取 DSG2 表达 60%水平处为阈值,DSG2 表达 $\geq 60\%$ 组患者无复发生存率高于 DSG2 表达 $< 60\%$ 组患者,差异有统计学意义(见图 3B,  $P=0.01$ );DSG2 表达 $< 60\%$ 患者生化复发中值时间为 104 个月,而 DSG2 表达 $\geq 60\%$ 患者在 120 个

月随访期结束后尚未达到生化复发中值时间。总之,钙 E-cadherin 和 DSG2 表达降低与前列腺癌生化复发有关,有望成为前列腺癌侵袭性的预后因子。

前列腺癌组织中 pAkt 表达水平(67%)高于正常前列腺组织(38%)。pAkt 阴性前列腺癌患者无复发存活率高于 pAkt 阳性前列腺癌患者(见图 3C,  $P=0.038$ ),差异有统计学意义。pAkt 阳性患者生化复发中值时间为 106 个月,而 pAkt 阴性患者在 120 个月随访期结束后尚未达到生化复发中值时间。采用同样方法测定 Snail 表达,结果发现前列腺癌组织 Snail 表达略高于正常前列腺组织(64% vs 60%);Snail 阴性前列腺癌患者无复发存活率比阳性患者要高,但差异无统计学意义(见图 3D,  $P=0.263$ )。Snail 阳性患者生化复发中值时间为 106 个月,而阴性患者在 120 个月随访期接受后尚未达到生化复发中值时间。综合上述结果发现 pAkt 表达与前列腺癌生化复发有关,且这种相关性具有统计学意义,表明 pAkt 能够作为前列腺癌侵袭性的预后因子。尽管如此,综合本次结果表明 E-cadherin 和 DSG2 是更为有效的前列腺癌预后因子。



A: E-cadherin; B: DSG2; C: pAkt; D: Snail; 目的蛋白为红色;绿色为 CK8/18 蛋白;蓝色为胞核 DAPI 染色

图 2 免疫荧光检测 E-cadherin、DSG2、pAkt 和 Snail 等蛋白在前列腺癌组织中的表达情况

表 2 前列腺癌组织中 E-cadherin、DSG2、pAkt 和 Snail 蛋白的表达情况

组别	E-cadherin			DSG2		
	均值	标准差	M(Q25, Q75)	均值	标准差	M(Q25, Q75)
前列腺癌组织	69.2	20.2	75(60.0, 83.3)	57.5	25.7	66.7(40.0, 76.7)
正常前列腺组织	87.2	3.6	88(85.0, 90.0)	81.1	9.9	84.5(80.0, 86.7)
P 值	0.000			0.000		
组别	pAkt			Snail		
	均值	标准差	M(Q25, Q75)	均值	标准差	M(Q25, Q75)
前列腺癌组织	28.8	27.8	23.3(0.0, 53.3)	8.9	18.3	0(0.0, 10.0)
正常前列腺组织	8.2	7.9	0(0.0, 9.0)	7.3	14.5	0(0.0, 6.3)
P 值	0.000			0.000		

表 3 各种蛋白表达关系及蛋白表达与前列腺癌临床病理学侵袭性特征的关系

项目	PSA	Gleason 评分	TNM 分期	pAkt	E-cadherin	DSG2	Snail
<b>PSA</b>							
相关系数	1.000	0.312	0.256	0.111	-0.072	-0.161	-0.071
P 值	-	0.000	0.000	0.034	0.201	0.004	0.200
<b>Gleason 评分</b>							
相关系数		1.000	0.363	0.163	-0.109	-0.160	0.032
P 值		-	0.000	0.002	0.054	0.005	0.566
<b>TNM 分期</b>							
相关系数			1.000	0.109	-0.803	-0.084	-0.001
P 值			-	0.037	0.139	0.135	0.979
<b>pAkt</b>							
相关系数				1.000	0.134	0.053	0.129
P 值				-	0.017	0.358	0.021
<b>E-cadherin</b>							
相关系数					1.000	0.498	-0.025
P 值					-	0.000	0.669
<b>DSG2</b>							
相关系数						1.000	0.033
P 值						-	0.578
<b>Snail</b>							
相关系数							1.000
P 值							-

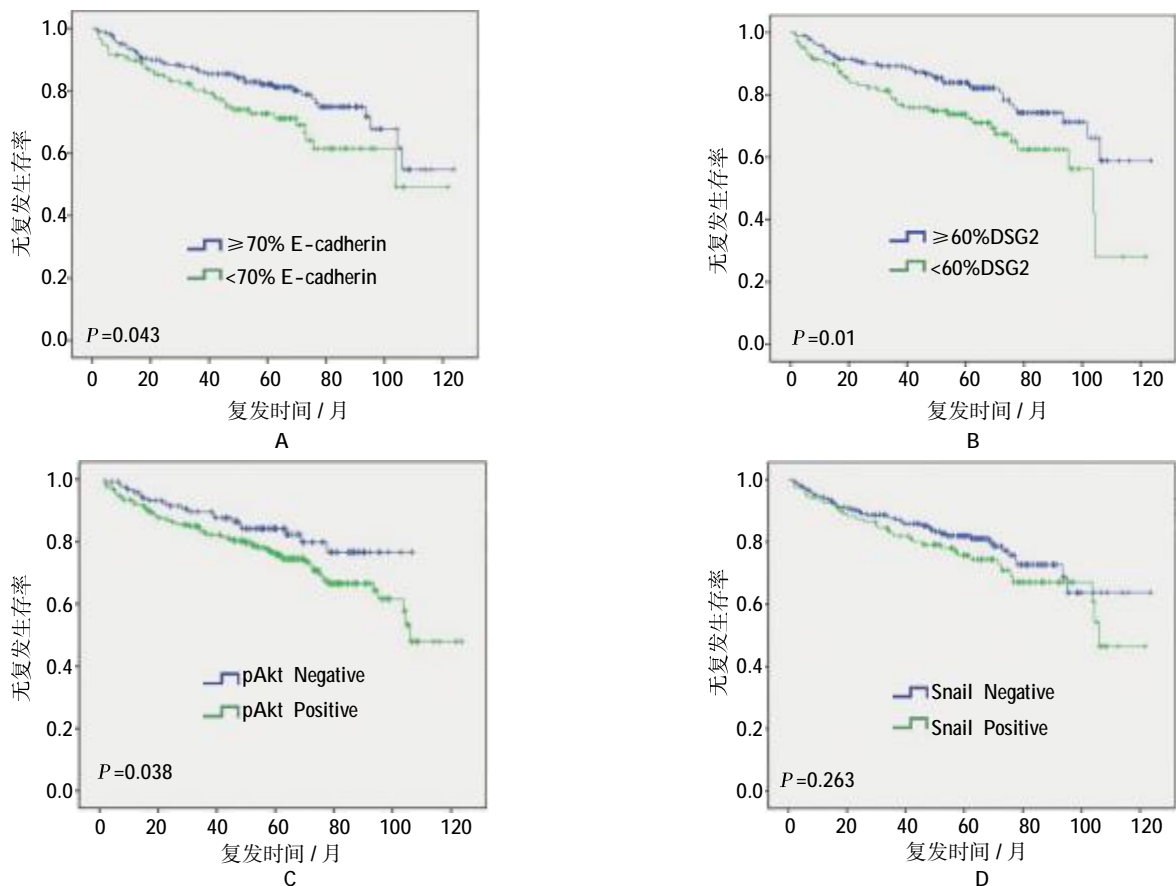


图 3 4 种蛋白与前列腺癌生化复发之间的关系

### 3 讨论

PI3K/Akt 信号通路可能通过 Snail 介导前列腺癌 E-cadherin 转录抑制,而对 DSG2 表达无影响,此外,E-cadherin 与 DSG2 表达调控无关<sup>[7]</sup>。本研究采用 Spearman 秩相关结果分析发现 E-cadherin 和 Snail 之间存在微弱负相关。这些结果提示 Snail 可能是前列腺癌 E-cadherin 表达的转录抑制因子,但与 DSG2 表达抑制无关。本研究 pAkt 和 E-cadherin 表达呈弱显著正相关,与以往研究结果不一致<sup>[8]</sup>,提示 PI3K/Akt 通路虽然抑制 E-cadherin 转录,但是 pAkt 和 E-cadherin 表达确实呈弱显著正相关,提示前列腺癌中还存在其他 E-cadherin 表达抑制机制。

虽然研究证实前列腺癌中 E-cadherin 表达缺失,但关于钙黏蛋白在前列腺癌侵袭性预测中的应用还没有大规模研究。此外,目前未见关于前列腺癌桥粒钙黏蛋白表达的研究报道。黏合连接和桥粒参与前列腺上皮细胞间黏连<sup>[9-10]</sup>,因而了解典型钙黏蛋白和桥粒钙黏蛋白的表达将有助于深入探索锚定连接在前列腺癌发展过程中的作用。本研究发现与正常前列腺组织比较,前列腺癌组织中 DSG2 表达显著降低。此外,DSG2 在肿瘤高分化区表达水平高,在肿瘤低分化区表达水平低,与 E-cadherin 分布相似。Spearman 秩相关分析结果显示 E-cadherin 和 DSG2 表达呈显著正相关,E-cadherin 及 DSG2 和血清 PSA 浓度、Gleason 评分及病理分期呈负相关。Kaplan-Meier 存活曲线结果进一步表明 E-cadherin 和 DSG2 等钙黏蛋白低表达肿瘤细胞更可能有侵袭性,比钙黏蛋白高表达细胞发生转移风险更高,这些发现证实 E-cadherin 和 DSG2 等钙黏蛋白在前列腺癌发展中发挥关键作用,E-cadherin 和 DSG2 有望成为侵袭性前列腺癌的预后因子。

### 参 考 文 献:

- [1] 陈靖,牛远杰. 前列腺癌进展的相关基因分子变化[J]. 医学综述, 2011, 3(1): 368-370.
- [2] Leidinger P, Keller A, Milchram L, et al. Combination of autoantibody signature with PSA level enables a highly accurate Blood-Based differentiation of prostate cancer patients from patients with benign prostatic hyperplasia[J]. PloS one, 2015, 10(6): e0128235.
- [3] Shukla S, Bhaskaran N, Babcook MA, et al. Apigenin inhibits prostate cancer progression in TRAMP mice via targeting PI3K/Akt/FoxO pathway[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 452-460.
- [4] 薄海. 前列消癥汤治疗激素难治性前列腺癌及调控 PI3K/Akt 传导通路的分子机制[D]. 中国中医科学院, 2013.
- [5] 刘祎,陈先国,梁朝朝. 前列腺癌肿瘤组织中 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达及意义[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(9): 781-786.
- [6] Chao Y, Wu Q, Shepard C, et al. Hepatocyte induced re-expression of E-cadherin in breast and prostate cancer cells increases chemoresistance [J]. Clinical & Experimental Metastasis, 2012, 29(1): 39-50.
- [7] Kume K, Haraguchi M, Hijioka H, et al. The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 430(3): 889-894.
- [8] Zhang HF, Alshareef A, Wu C, et al. Loss of miR-200b promotes invasion via activating the Kindlin-2/integrin  $\beta$ 1/AKT pathway in esophageal squamous cell carcinoma: An E-cadherin-independent mechanism[J]. Oncotarget, 2015, 6(30): 28949-28960.
- [9] Franzen CA, Todorović V, Desai BV, et al. The desmosomal armadillo protein plakoglobin regulates prostate cancer cell adhesion and motility through vitronectin-dependent Src signaling[J]. PloS one, 2012, 7(7): e42132.
- [10] Chitaev NA, Troyanovsky SM. Direct  $Ca^{2+}$ -dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion[J]. The Journal of Cell Biology, 1997, 138(1): 193-201.

(张蕾 编辑)