

CAIX、E-cadherin 和 β -catenin 在胃癌组织中的表达及意义

王正栋¹, 陆翠华², 沈小建³, 朱东兵³, 李跃川¹, 田巍巍¹

1. 如皋市人民医院消化科, 江苏 南通 226500; 2. 南通大学附属医院消化科, 江苏 南通 226000;
3. 如皋市人民医院病理科, 江苏 南通 226500

摘要: **目的** 探讨碳酸酐酶 IX (CAIX)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 对胃癌的诊断及预后的判断价值。**方法** 选取 2008 年 1 月至 2011 年 12 月如皋市人民医院普外科行胃癌根治术患者 80 例为研究组 (取其手术切除的胃腺癌病理标本), 及同期 50 例胃镜检查正常者为对照组 (取其黏膜活检正常的病理标本) 为研究对象, 采用免疫组化 SP 法检测两种组织中 CAIX、E-cadherin 和 β -catenin 的表达情况, 分析它们与胃癌临床病理特征及预后之间的关系。随访终点为患者死亡或术后 60 个月。**结果** 在研究组胃癌组织中, CAIX 的阳性表达率及 E-cadherin、 β -catenin 的异常表达率 (染色强度弱、阳性细胞数低和异位表达) 均显著高于对照组正常胃黏膜组织 (P 均 < 0.01)。CAIX 在胃癌组织中的阳性表达与肿瘤直径、肌层浸润深度、淋巴结转移及肿瘤临床分期相关 ($P < 0.05, P < 0.01$); E-cadherin 和 β -catenin 在胃癌组织中的异常表达与肌层浸润深度、病理分化程度、淋巴结转移及肿瘤临床分期相关 ($P < 0.05, P < 0.01$)。胃癌组织中 CAIX 阳性表达与 E-cadherin、 β -catenin 异常表达分别呈正相关 ($r = 0.223, 0.610, P$ 均 < 0.05), 胃癌组织中 E-cadherin 异常表达与 β -catenin 异常表达呈正相关 ($r = 0.434, P < 0.05$)。CAIX 阳性表达的胃癌患者生存率明显低于阴性表达者 ($P < 0.05$), E-cadherin 及 β -catenin 异常表达的胃癌患者生存率明显低于正常表达者 (P 均 < 0.05)。**结论** 胃癌组织中 CAIX 阳性高表达, E-cadherin 及 β -catenin 异常表达。三者的表达情况与胃癌患者生存密切相关。监测 CAIX、E-cadherin 和 β -catenin 对胃癌的诊断及预后判断具有一定的价值。

关键词: 胃癌; 碳酸酐酶 IX; E-钙黏蛋白; β -连环蛋白; 免疫组织化学; 预后

中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2020)10-1358-05

The expression and clinical significance of CAIX, E-cadherin and β -catenin in gastric cancer

WANG Zheng-dong*, LU Cui-hua, SHENG Xiao-jian, ZHU Dong-bing, LI Yue-chuan, TIAN Wei-wei

* Department of Gastroenterology, Rugao People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226500, China

Abstract: Objective To investigate the value of carbonic anhydrase IX (CAIX), E-cadherin and β -catenin in the diagnosis and prognostic prediction of gastric cancer. **Methods** From January 2008 to December 2011, 80 patients with gastric adenocarcinoma surgically removed pathological specimens and 50 pathological specimens with normal mucosal biopsy under gastroscopy were selected as the research objects. and 50 cases of pathological specimens with normal gastroscopic mucosal biopsy under gastroscopy during the same period were selected as the research objects. The expression of CAIX, E-cadherin and β -catenin were detected by immunohistochemical SP in two kinds of tissues to analyze their relationship with clinicopathological features and prognosis. **Results** The positive expression rate of CAIX and abnormal expression rate of E-cadherin and β -catenin in gastric cancer tissues were significantly higher than those in normal gastric mucosa tissues (all $P < 0.01$). The positive expression of CAIX in gastric cancer tissues was related to tumor diameter, depth of muscle layer invasion, lymph node metastasis and clinical stage of the tumor ($P < 0.05, P < 0.01$); the abnormal expression of E-cadherin and β -catenin were related to tumor invasion depth, histological grade, lymph node metastasis and clinical stage of the tumor ($P < 0.05, P < 0.01$). In gastric cancer, the positive expression of CAIX was positively correlated with the abnormal expression of E-cadherin and β -catenin ($r = 0.223, P < 0.05; r = 0.610, P < 0.05$) respectively, while there was a positive correlation between abnormal expression of E-cadherin and β -catenin ($r = 0.434, P < 0.05$). The 5-

year survival rate of gastric cancer patients with CAIX positive expression was lower than that with negative expression ($P < 0.05$); the survival rate of expression gastric cancer patients with abnormal of E-cadherin and β -catenin were lower than that with normal expression (all $P < 0.05$). **Conclusions** The high expression of CAIX and the abnormal expression of E-cadherin and β -catenin exist in gastric cancer tissues. The expression of the three is closely related to the survival of gastric cancer patients. Monitoring CAIX, E-cadherin and β -catenin has a certain value in the diagnosis and prognostic prediction of gastric cancer.

Key words: Gastric cancer; Carbonic anhydrase IX; E-cadherin; β -catenin; Immunohistochemistry; Prognosis

Fund program: High-Level Talent Funding Project of "Six Talent Peaks" in Jiangsu Province (2016-WSN-286); Science and Technology Project of Rugao [SRG(15)3005]

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤,发病率及死亡率逐年上升。国际癌症研究机构数据显示,2018 年全球胃癌新发病例约 103 万,位于全部恶性肿瘤的第 5 位^[1]。我国胃癌发病数约 67.9 万,因胃癌死亡总数约 49.8 万,仅次于肺癌,位居肿瘤死亡率排行第 2 位^[2]。尽管目前胃癌的诊断水平较前有所提高,以手术为主结合辅助化疗、靶向治疗等综合治疗方法不断完善,但我国胃癌的生存率提高并不明显,针对胃癌的发病机制及其侵袭、转移特点的研究具有重要的临床意义,探讨胃癌发病过程中的关键分子,可为胃癌诊断、治疗提供新的靶点。

缺氧作为一种常见的生物学特征,广泛存在于多种恶性实体肿瘤中^[3]。在缺氧状态下肿瘤细胞相关调控基因的表达增加,从而使细胞适应缺氧微环境,并得以快速生长。碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA) IX 是近来发现的一个重要的检测细胞缺氧的指标,由缺氧诱导因子(HIF)-1 激活,将肿瘤细胞的 pH 维持在正常值,保证肿瘤细胞在缺氧微环境下持续生长^[4]。恶性肿瘤的浸润、转移机制包括黏附、降解、运动和血管形成等,肿瘤细胞间的黏附功能丧失是其中的重要环节^[5],上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)与 β -连环蛋白(β -catenin)是发挥重要作用的细胞黏附分子。本课题采用 SP 免疫组化方法检测胃癌组织中 CAIX、E-cadherin 和 β -catenin 的表达,探索三种蛋白在胃癌发生发展中的作用及其相互关系,以期为胃癌的诊断、治疗提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2008 年 1 月至 2011 年 12 月如皋市人民医院普外科行胃癌根治术患者 80 例(取其手术切除胃腺癌病理标本,术前均未接受放疗、化疗及内分泌治疗)为研究组,另选取同期 50 例胃镜检查正常者(取其黏膜活检正常的病理标本)作为对照组。实验所用蜡块均由两名病理医师再次读片后挑选,确保其准确性。采用国际抗癌联盟(UICC,第七

版)的 TNM 分期标准进行临床分期。本研究经院伦理委员会批准,在研究前向研究对象说明研究的意义、内容及方法,患者同意后签署知情同意书,自愿参加本研究。胃癌患者共 80 例,失访 2 例,随访 78 例,随访时间至患者死亡或术后 60 个月。

1.2 研究试剂 兔抗人多克隆抗体(CAIX)、鼠抗人单克隆抗体(E-cadherin)、鼠抗人单克隆抗体(β -catenin)及 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。

1.3 研究方法 预先制作防脱片,蜡块连续按 4 μ m 厚度切片后烘干。经 HE 染色核实诊断,裱组织片于防脱片上,按照 CAIX、E-cadherin 及 β -catenin 试剂盒说明书进行免疫组化 SP 法染色,显微镜观察读片。

1.4 结果判定 CAIX 阳性染色定位于细胞膜或细胞浆内,呈棕黄色颗粒。使用 Bachtary 等^[6]的方法,进行半定量处理,结合阳性细胞占比和染色强度,即弱染色者为 1 分,清晰染色者为 2 分,强染色者为 3 分;每张切片随机 5 个高倍视野,每视野计数肿瘤细胞 100 个,1 分:阳性细胞占比 $\leq 10\%$; 2 分:11% ~ 50%; 3 分:51% ~ 80%; 4 分: $> 80\%$,上述两项分数之和为总分。阳性表达:总分 ≥ 3 分,阴性表达:总分 ≤ 2 分。E-cadherin 与 β -catenin 染色后的细胞膜上出现棕黄色颗粒(续线状、斑点状)沉积为阳性染色,使用李飞宇等^[7]的方法判断,正常表达:肿瘤组织中染色方式和强度与正常胃黏膜相同且每张切片随机 5 个高倍视野,每视野计数肿瘤细胞 100 个,阳性细胞数 $\geq 90\%$ 。异常表达:即细胞膜染色强度减弱、染色强弱不均且每张切片随机 5 个高倍视野,每视野计数肿瘤细胞 100 个,阳性细胞数 $< 90\%$; 胞核或胞浆出现染色。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,采用 Spearman 进行等级相关分析, Kaplan-Meier 法作生存分析并绘制生存曲线图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAIX、E-cadherin 及 β -catenin 在两种组织中的表达情况 在研究组胃癌组织中 CAIX 的阳性表达率及 E-cadherin、 β -catenin 的异常表达率均显著高于对照组正常胃黏膜组织(P 均 < 0.01)。见表 1。

2.2 CAIX、E-cadherin 及 β -catenin 与胃癌临床病理参数的关系 在研究组胃癌组织中, CAIX 的阳性表达与肿瘤直径、肌层浸润深度、淋巴结转移及肿瘤临床分期相关($P < 0.05, P < 0.01$); E-cadherin 和 β -catenin 的异常表达均与肌层浸润深度、病理分化程度、淋巴结转移及肿瘤临床分期相关($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

2.3 胃癌组织中 CAIX、E-cadherin 和 β -catenin 表达的相关性 在研究组胃癌组织中 CAIX 阳性表达与 E-cadherin、 β -catenin 异常表达分别呈正相关($r =$

0.223、0.610, P 均 < 0.05), 胃癌组织中 E-cadherin 异常表达与 β -catenin 异常表达呈正相关($r = 0.434, P < 0.05$)。

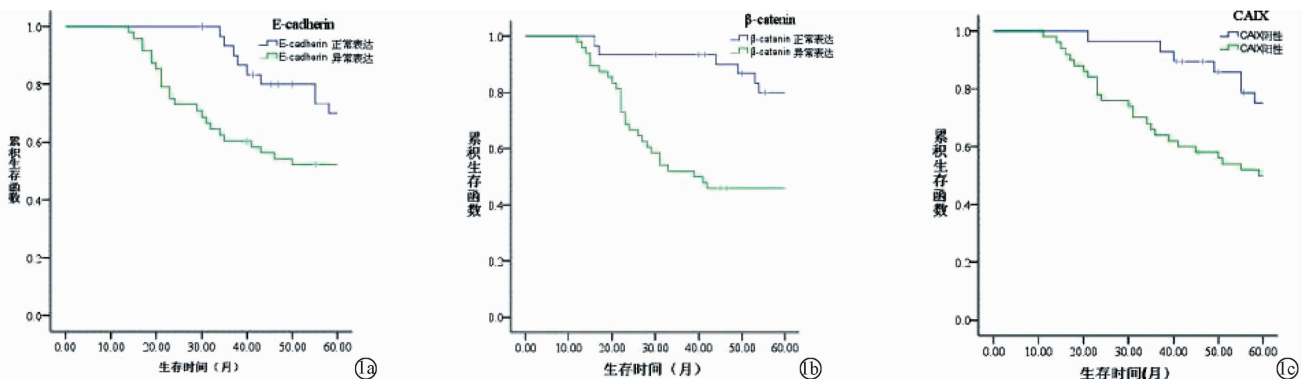
2.4 CAIX、E-cadherin 和 β -catenin 的表达与胃癌患者预后的关系 在研究组中, CAIX 阳性表达的胃癌患者 5 年生存率显著低于阴性表达者($P < 0.05$), E-cadherin 及 β -catenin 异常表达的胃癌患者 5 年生存率显著低于正常表达者(P 均 < 0.05)。见图 1。

表 1 CAIX、E-cadherin 及 β -catenin 在两种组织中的表达情况 例(%)

组别	例数	CAIX 阳性表达	E-cadherin 异常表达	β -catenin 异常表达
胃癌组织	80	52(65.0)	49(61.2)	54(67.5)
正常胃黏膜组织	50	6(12.0)	0	0
χ^2 值		34.978	49.151	57.730
P 值		0.000	0.000	0.000

表 2 CAIX、E-cadherin 及 β -catenin 与胃癌临床病理参数的关系 例(%)

病理参数	例数	CAIX			E-cadherin			β -catenin		
		阳性表达	χ^2 值	P 值	异常表达	χ^2 值	P 值	异常表达	χ^2 值	P 值
年龄										
≤60 岁	51	31(60.8)	1.099	0.295	33(64.7)	0.708	0.400	36(70.6)	0.612	0.434
>60 岁	29	21(72.4)			16(55.2)			18(62.1)		
性别										
男	45	30(66.7)	0.126	0.723	29(64.4)	0.442	0.506	33(73.3)	1.595	0.207
女	35	22(62.9)			20(57.1)			21(60.0)		
病理分化程度										
低或未分化	49	32(65.3)	0.005	0.942	36(73.5)	7.955	0.005	39(79.6)	8.428	0.004
中或高分化	31	20(64.5)			13(41.9)			15(48.4)		
肿瘤直径										
≤5 cm	61	36(59.0)	4.042	0.044	38(62.3)	0.118	0.731	41(67.2)	0.010	0.922
>5 cm	19	16(84.2)			11(57.9)			13(68.4)		
肌层浸润深度										
≤2/3	25	11(44.0)	7.049	0.008	10(40.0)	6.918	0.009	10(40.0)	12.536	0.000
>2/3	55	41(74.6)			39(70.9)			44(80.0)		
淋巴结转移										
是	53	40(75.5)	7.569	0.006	40(75.5)	13.382	0.000	40(75.5)	4.549	0.033
否	27	12(44.4)			9(33.3)			14(51.9)		
TNM 分期										
I/II	37	18(48.7)	8.090	0.004	11(29.7)	28.815	0.000	16(43.2)	18.463	0.000
III/IV	43	34(79.1)			38(88.4)			38(88.4)		



注:1a:E-cadherin 异常表达与正常表达者;1b: β -catenin 异常表达与正常表达者;1c:CAIX 阳性表达与阴性表达者。

图 1 胃癌不同 CAIX、E-cadherin、 β -catenin 表达患者生存曲线比较

3 讨论

我国的胃癌发病数占全世界总发病数的 42%；是所有肿瘤死亡的第二大原因^[8]。尽管各种检验、检查技术不断普及,放大胃镜、染色内镜、共聚焦内镜逐步推广,早期胃癌的检出率得到提高,但与日本及欧美等国家仍有较大差距^[9-10]。胃癌确诊时大都已处于中晚期,预后差,目前尚缺乏有效的防控手段。胃癌的形成、浸润和转移是非常复杂的病变过程,这个过程受诸多基因及其产物的调控。

CA 是 1940 年发现的第一个含锌酶,催化机体内 CO₂ 可逆的水合作用,参与酸碱平衡、呼吸及各种体液形成等许多生理过程,在目前发现的 15 种 CA 同工酶中,CAIX 是由酸性氨基酸组成的跨膜糖蛋白,最早发现于与人乳腺癌细胞联合培养的人宫颈癌 Hela 细胞株中,起初称作 MN,后来发现 MN 蛋白与碳酸酐酶 a-CA 的结构有高度同源性,故命名为 CAIX^[11]。许多学者对恶性肿瘤中 CAIX 的表达与肿瘤生物学行为之间的关系进行了研究。Oosterwijk 等^[12]首次报道在肾细胞癌中 CAIX 高表达。马宗丽等^[13]报道在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变及宫颈鳞癌组织中 CAIX 阳性表达率渐进性增强。本研究结果显示,正常胃黏膜中 CAIX 阳性表达 12.0%,胃癌组织中 65.0%,说明在胃癌组织中 CAIX 的表达显著增高,与前述研究结果一致。本研究数据还显示,CAIX 的高阳性率与肿瘤直径大、浸润深、分期晚有关,笔者考虑这与恶性肿瘤增殖迅速、肿瘤组织坏死缺氧有关。有研究表明,CAIX 是一种可靠的缺氧标志,与肿瘤预后相关。Kirkpatrick 等^[14]的研究显示,CAIX 高表达的患者更容易发生肿瘤的远处转移。Liao 等^[15]发现 CAIX 强阳性表达与患者的疾病无进展生存率及总生存率呈负相关,认为 CAIX 蛋白的表达是具有高危因素的早期宫颈癌患者预后的独立预测因素。本研究中有淋巴转移者 CAIX 阳性表达较高,胃癌 CAIX 阳性患者 5 年生存率较低,提示 CAIX 与胃癌预后密切相关,或可作为判定胃癌患者预后的指标之一。CAIX 在其他恶性肿瘤尤其是肾癌的研究较为深入,已有将 CAIX 抗体成功地应用于肾癌治疗的报道,而在胃癌中是否存在类似效果,还有待进一步的研究。

E-cadherin 是一种重要的细胞间黏附分子,通过 β -catenin 途径、TGF- β /Smads 及 PI3K/Akt 通路等途径抑制细胞生长,维持完整的组织结构^[16-17]。正常上皮中 E-cadherin 总是均匀稳定地在细胞边缘区呈强阳性表达,而在大多数肿瘤组织中相对于正常组织显示低表达、不均匀性表达,甚至表达缺如。研究证

实 E-cadherin 的表达与肿瘤转移潜能呈负相关,以 E-cadherin 基因转染可使肿瘤细胞侵袭能力下降,E-cadherin 反义 RNA 则使肿瘤细胞的侵袭能力增强,E-cadherin 功能下调时肿瘤的侵袭、转移能力增强^[18]。Araki 等^[19]检测了 38 例进展期胆管癌患者在发生上皮-间质转化情况下 E-cadherin 的表达量、临床病理及生存率的关系,发现 E-cadherin 低表达患者的生存率显著低于高表达患者。本研究结果与之一致。笔者发现,与正常胃黏膜组织相比,胃癌组织中 E-cadherin 表达显著降低;且 E-cadherin 在有淋巴结转移组的异常(阳性染色细胞数低且胞核、胞浆出现染色)表达率显著高于无淋巴结转移组,在肌层浸润 >2/3 组异常表达率显著高于肌层浸润 \leq 2/3 组,提示 E-cadherin 的异常表达与胃癌细胞向周围组织的浸润程度相关。E-cadherin 在胃癌组织中表达降低和缺失使细胞之间的黏附作用减弱,肿瘤细胞具有了高侵袭性并获得转移潜能。E-cadherin 可能作为一个潜在的预后判断指标。

β -catenin 是一系列与钙黏蛋白相关联的胞浆蛋白,能增加同型细胞间黏附功能,是重要的细胞黏附分子和细胞骨架成分。研究显示, β -catenin 在正常上皮细胞中正常表达,主要定位于细胞膜,细胞浆内表达很少甚至不表达,在肿瘤组织则表现为细胞膜表达明显下调或缺失,出现细胞浆或细胞核的异位表达。 β -catenin 由细胞膜向细胞质和细胞核的移位是通过 Wnt 信号通路实现的^[20]。在进化过程中 Wnt 信号传导通路除了在多种生物调节机制中发挥重要作用,其异常的激活也参与了多种实体肿瘤的发生发展,尤其是在胃肠道肿瘤中^[21]。本研究中, β -catenin 在正常胃黏膜组织 100% 表达,胃癌组织中有 26 例(32.5%)正常表达,54 例(67.5%)出现胞浆和胞核的异位表达,两种组织中表达情况存在显著差异,与前述结果一致,提示 β -catenin 参与了胃癌的发生和发展过程。Takayama 等^[22]检测 β -catenin 在消化道肿瘤中表达情况, β -catenin 在胃癌有 47% 表达下调。Tanaka 等^[23]报道 β -catenin 的表达与胃恶性肿瘤浸润深度、淋巴结转移密切相关。本研究显示, β -catenin 的异常表达在肿瘤浸润较深、出现淋巴结转移及 III/IV 期中显著增高,同时异常表达者 5 年生存率明显降低,提示 β -catenin 参与肿瘤的浸润和转移,严重影响患者的生存与预后。

有学者提出,CAIX 是一种细胞黏附分子,能通过减弱钙黏蛋白介导的细胞间的黏附,促进肿瘤细胞的侵袭及转移。Bartosová 等^[24]的研究发现,CAIX 通过与 β -catenin 相互作用降低 E-cadherin 介导的细胞黏