

E-cadherin 表达和 AKT 磷酸化水平与宫颈病变的相关性分析

田 园,冯定庆,伍娇娇,徐 兵,孙多样,胡卫平

摘要 目的 探讨 E-cadherin 的表达和 AKT 的磷酸化水平与宫颈病变程度的相关性。方法 收集 20 例正常宫颈组织、30 例宫颈上皮内瘤变(CIN)组织、50 例宫颈鳞癌组织,采用荧光实时定量 PCR 和免疫组化方法分别检测组织中 E-cadherin、 β -catenin、p-AKT 和 Loricrin 的 mRNA 及蛋白表达情况,分析 E-cadherin 表达和 AKT 磷酸化水平的相关性,及其与宫颈病变程度和宫颈鳞癌分化程度的相关性。结果 免疫组化结果显示,随着宫颈病变的进展,E-cadherin、Loricrin 的表达逐渐降低,甚至缺失($P < 0.05$);在正常宫颈上皮 β -catenin 表达于胞膜,随着宫颈病变的进展,逐渐由胞膜向胞质和胞核转移,且表达阳性率逐渐降低($P < 0.05$);上述指标定量 PCR 结果与免疫组化结果基本一致。p-AKT 的表达则随病变进展而逐渐升高($P < 0.05$)。相关分析显示,E-cadherin 的表达与宫颈病变的程度及鳞癌的分化程度呈负相关($r_s = -0.688, -0.438; P < 0.01$),而与 p-AKT 的表达则呈正相关($r_s = 0.462, 0.692; P < 0.01$);E-cadherin 与

p-AKT 的表达呈负相关($r_s = -0.828, P < 0.01$)。结论 E-cadherin 的表达缺失与 AKT 磷酸化水平的增高与宫颈病变的发生发展密切相关;二者联合可用于监测宫颈病变的进展,指导临床治疗方案。

关键词 E-cadherin; β -catenin; p-AKT; Loricrin; 宫颈上皮内瘤变; 宫颈鳞癌

中图分类号 R 711.74

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)07-1007-06

宫颈癌是常见的妇科肿瘤,早期确诊可大大提高手术治愈率和生存率。宫颈癌的发生发展是一个连续的过程,一般由正常宫颈组织转化为宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN),再进一步进展成浸润性癌和远处转移性癌。因此,寻求一个可靠的指标来监测宫颈癌进展及评价治疗效果是改善临床宫颈癌预后的必要手段。

宫颈病变的进展常常伴随有上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象发生。在此过程中上皮细胞的极性丧失,迁移和运动能力增强,同时上皮表型丢失而逐渐获得间质表型。E-cadherin 是上皮组织中的一类钙依赖性跨膜糖蛋白,与 β -catenin 共同形成复合物,参与正常上皮间

2014-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81072127);安徽省自然科学基金(编号:11040606M176、11040606M178)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院妇产科,合肥 230001

作者简介: 田 园,女,硕士研究生;

胡卫平,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: syhwp@163.com

patients were significantly lower than the level before the operation ($P < 0.05$). Serum CEA and CYFRA21-1 level of postoperative one week and one month in NSCLC patients showed no significant difference compared with benign disease control group ($P > 0.05$), serum TK1 and SCC-Ag level of the postoperative one week showed statistically significant difference compared with benign disease control group ($P < 0.05$), the postoperative one month level of serum TK1 and SCC-Ag showed no significant difference compared with benign disease control group ($P > 0.05$). ③ The preoperative level of TK1 and CEA in adenocarcinoma were higher than that in squamous carcinoma ($P < 0.05$). ④ The preoperative level of serum TK1 and CYFRA21-1 in female NSCLC patients were higher than male patients, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), preoperative serum CEA and SCC-Ag level of NSCLC patients showed no obvious statistical correlation with gender ($P > 0.05$). The preoperative level of serum TK1 in NSCLC patients negatively correlated with the degree of differentiation of lung cancer, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The perioperative level of tumor markers in NSCLC may be useful in monitoring diagnosis and differential diagnosis of NSCLC, especially in analyzing the invisible tumor burden of NSCLC patients. The perioperative level of tumor markers in NSCLC is related with the surgical effect and tissue types, and serum TK1 and CEA are more suitable for the evaluation of patients with lung adenocarcinoma. There is some value in the clinical applications.

Key words NSCLC; TK1; CEA; CYFRA21-1; SCC-Ag

的黏附连接;其表达下调或缺失是 EMT 发生的重要标志^[1]。Loricrin 是细胞终末分化的标志,可代表上皮细胞分化程度。目前已经证实在宫颈癌细胞株中 PI3K/AKT 信号通路的持续激活可促进 EMT 发生,从而增加了肿瘤细胞的侵袭性和转移性^[2],其机制主要是通过 AKT/GSK-3 β /Snail 通路来调节 EMT 过程,与多种恶性肿瘤的侵袭性表型均密切相关^[3]。因此,选取临床不同宫颈病变组织,检测其中 E-cadherin 及其下游分子的表达及 AKT 磷酸化水平在不同时期宫颈病变组织中的表达变化,通过相关性分析,探讨二者对宫颈病变进展预测的临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2010 年 3 月 ~ 2013 年 3 月安徽医科大学附属省立医院收治的 CIN 患者 30 例 (CIN I 12 例, CIN II ~ III 18 例)、宫颈鳞癌患者 50 例 (按 2009 年国际妇产科联盟 (FIGO) 分期标准, I 期 21 例, II 期 29 例): 其中高分化 8 例, 中分化 23 例, 低分化 19 例。病例术前均未接受治疗; 选择因子宫肌瘤行全子宫切除手术的正常宫颈组织 20 例作为对照; 将部分新鲜组织用甲醛固定、石蜡包埋, 用于病理检测; 剩余组织储存于 -80 °C 冰箱, 用于提取 RNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂来源 E-cadherin 抗体、 β -catenin 抗体、p-AKT 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); Loricrin 抗体 (英国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记二抗、DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司); TRIzol (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Kit (日本 TaKaRa 公司); Opticon[®] 2 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 MJ Research 公司)。见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'→3')	引物长度 (bp)
E-cadherin	F: GAGTGCCAACTGGACCATTCAGTA	86
	R: AGTCACCCACCTCTAAGGCCATC	
β -catenin	F: GCTGATCTTGGACTTGATATTGGTG	117
	R: GTCCATACCCAAGGCATCCTG	
Loricrin	F: GGCTGCATCTAGTTCTGCTGTTTA	82
	R: CAAATTTATTGACTGAGGCACTGG	
GAPDH	F: CTTAGCACCCCTGGCCCAAG	151
	R: GATGTTCTGGAGAGCCCCG	

1.2.2 免疫组织化学染色 取部分组织石蜡包埋,

4 μ m 连续切片, 进行免疫组化 SP 法染色, 具体操作按试剂说明书进行: 石蜡切片常规脱蜡至水; 0.01 mol/L (pH 6.0) 柠檬酸盐缓冲液中抗原修复; 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶; 滴加一抗 4 °C 过夜, E-cadherin、 β -catenin、Loricrin、p-AKT 一抗稀释度均为 1 : 50; 滴加二抗, 室温下孵育 20 min; DAB 显色 5 ~ 10 min; 苏木精复染, PBS 蓝化; 脱水透明, 中性树胶封片。

阳性细胞判定: 选择 10 个不同视野, 根据阳性细胞百分比及染色强度计分, 其标准为: 以阳性细胞百分比判断染色范围, 无计为 0 分, 10% 以下为 1 分, 11% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 80% 为 3 分, 80% 以上为 4 分; 染色强度依次以 0、1、2、3 表示, 依次指阴性、弱阳性 (淡黄色)、阳性 (棕黄色)、强阳性 (棕褐色); 最终积分为两者乘积。根据积分将表达情况分为 3 个级别, 0 分为阴性, 1 ~ 4 分为低表达, 4 分以上为高表达^[4]。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 将收集的新鲜组织剪碎, 加入 TRIzol 提取组织 RNA, 取 2 μ g RNA 根据逆转录酶体系逆转录为 cDNA; 以 GAPDH 作为内参, 加入特异性引物, 利用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Kit 进行荧光定量 PCR, 用 Opticon[®] 2 实时荧光定量 PCR 仪测出 Δ Ct 值及熔解曲线, 计算出相对基因表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析, 采用 χ^2 检验分析不同程度宫颈病变间的各蛋白的表达变化, 并用方差分析比较各组蛋白间 mRNA 的表达变化; 用 Spearman 等级相关分析 E-cadherin 与宫颈病变程度及宫颈癌分化程度间、E-cadherin 与 p-AKT 间的相关性。

2 结果

2.1 E-cadherin、 β -catenin、p-AKT、Loricrin 在不同宫颈病变中的表达情况 E-cadherin 主要表达在细胞膜上, 正常宫颈、CIN、宫颈癌中 E-cadherin 的阳性表达率分别为 95%、87%、54%, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在正常宫颈上皮中, β -catenin 主要表达于细胞膜, 而在 CIN 和浸润癌组织中, 其阳性表达多见于胞质甚至部分胞核中, 正常宫颈、CIN、宫颈癌中 β -catenin 阳性表达率逐渐下降, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Loricrin 主要表达于细胞膜, 随着疾病的进展, 其阳性表达率也是逐渐降低的 ($P < 0.05$)。p-AKT 阳性表达多于细胞核中, 正常宫颈、CIN、宫颈癌中 p-AKT 的阳性表达率分别

为40%、57%、74%，组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1、2。

2.2 E-cadherin、 β -catenin、Loricrin 在不同宫颈病变中 mRNA 表达情况 另外,用荧光定量 PCR 的方法检测其中10例正常宫颈组织,20例CIN组织,15例宫颈鳞癌组织中上述3种指标的mRNA表达情况,结果显示:E-cadherin、 β -catenin、Loricrin 随着宫颈病变程度的进展,其mRNA表达的水平均逐渐下降($P < 0.05$),见图3。

2.3 E-cadherin、p-AKT 的表达与宫颈病变程度及宫颈癌分化程度的相关性 为了进一步说明 E-cadherin 及 AKT 磷酸化水平与宫颈病变程度以及宫颈分化程度之间的相关性,故将其表达阳性率与宫颈病变程度及宫颈癌分化程度进行相关性分析。随着病变程度的进展,E-cadherin 的表达水平逐渐下降,AKT 磷酸化水平逐渐升高,相关性分析示 E-cadherin 的表达与宫颈病变的程度呈负相关($r_s = -0.688, P < 0.01$);而 p-AKT 的表达则呈正相关($r_s = 0.462, P < 0.01$)。见图4。E-cadherin 与鳞癌的分化程度也呈负相关($r_s = -0.438, P < 0.01$);p-AKT 与分化程度呈正相关($r_s = 0.692, P < 0.01$),见图5。

2.4 E-cadherin 与 p-AKT 的相关性分析 前文

已经证明上述指标与宫颈病变的进展具有相关性,为了进一步说明 E-cadherin 与 AKT 的磷酸化水平之间是否存在相关性,笔者分析了所有宫颈标本中 E-cadherin 与 p-AKT 的表达情况,结果显示 E-cadherin 与 p-AKT 的表达呈负相关($r_s = -0.828, P < 0.01$),见图6。

3 讨论

E-cadherin 是维持正常上皮细胞形态和结构完整性的重要分子,其表达水平的下降缺失可引起细胞间相互作用降低,细胞形态发生改变,增加了细胞的迁移能力,更利于癌细胞的转移及浸润,是 EMT 发生的重要标志。在上皮性卵巢癌、乳腺癌、胃癌、食管癌、肺癌、甲状腺癌等肿瘤中,均已证实肿瘤恶性程度越高,E-cadherin 的表达水平越低^[5-8]。本研究结果显示 E-cadherin 蛋白和 mRNA 在正常宫颈、CIN 和宫颈鳞癌间的表达逐渐降低,且 E-cadherin 的降低与宫颈病变的进展及鳞癌的分化程度呈负相关性,说明 E-cadherin 可能通过 EMT 参与了宫颈癌的进展,其表达水平下降也为肿瘤的转移创造了条件。

在正常宫颈上皮组织中, β -catenin 主要表达在细胞膜上,胞质内并无表达,说明在正常宫颈中, β -catenin 参与形成 E-cadherin-catenin 复合体的形成,

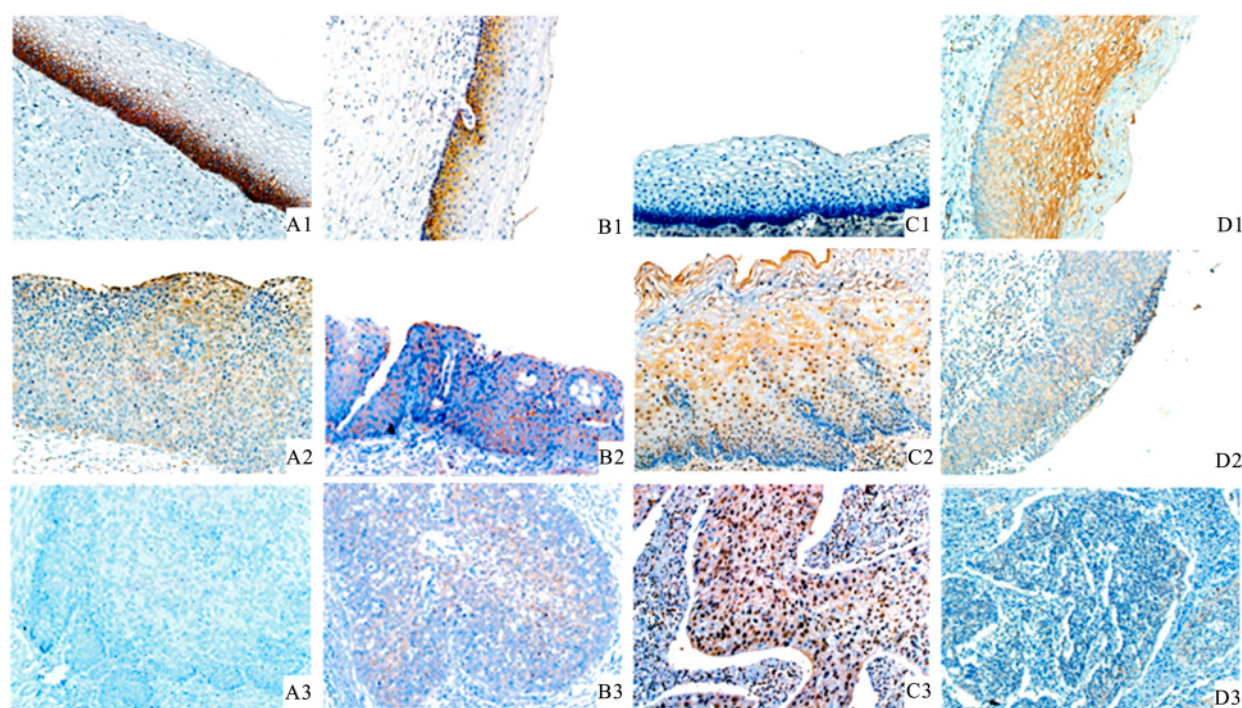


图1 免疫组化显示 E-cadherin、 β -catenin、p-AKT、Loricrin 在正常宫颈、CIN 及宫颈癌中的表达情况 ×200

A: E-cadherin; B: β -catenin; C: p-AKT; D: Loricrin; 1: 正常宫颈组织; 2: CIN; 3: 宫颈鳞癌组织

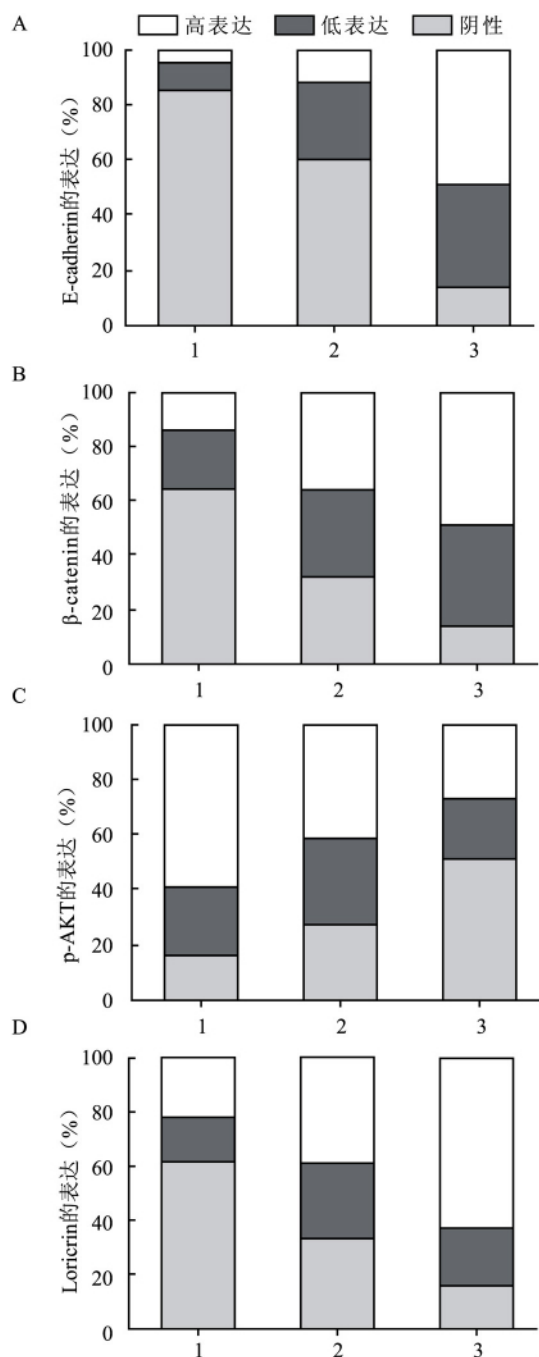


图2 免疫组化中 E-cadherin、β-catenin、p-AKT、Loricrin 在不同宫颈组织中的表达阳性率
1: 正常宫颈; 2: CIN; 3: 宫颈癌

共同维持细胞的连接,维持上皮的完整性^[8]。随着病变进展,在 CIN 及宫颈癌组织中 β-catenin 的表达出现在胞质及胞核内,即当 Wnt 信号通路被激活时,抑制了 GSK-3β 的活性,β-catenin 磷酸化作用降低,进一步由泛素介导的 β-catenin 的降解减少,故引起 β-catenin 细胞胞质蓄积,随着细胞质内 β-catenin 的积累,导致其核转位,与 T-细胞因子/淋巴增

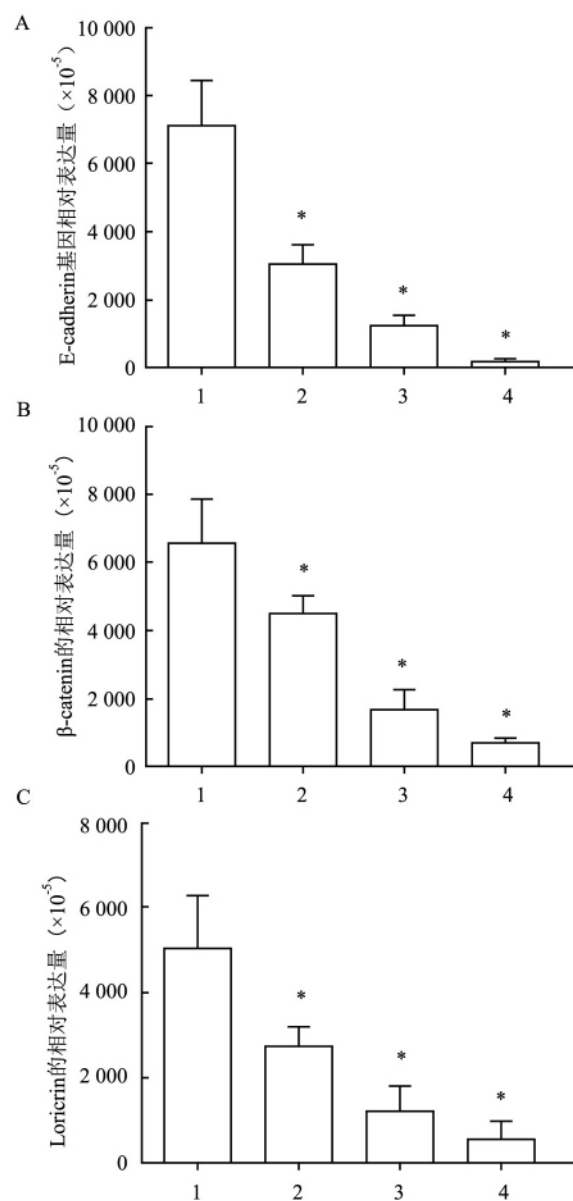


图3 荧光定量 PCR 显示 E-cadherin、β-catenin、Loricrin 在不同宫颈标本中 mRNA 的表达情况

1: 正常宫颈; 2: CIN I; 3: CIN II ~ III; 4: 浸润癌; 组间两两比较: * $P < 0.05$

强子家族的转录因子结合,诱导靶基因的表达,包括调节细胞增殖的 cyclin D1、c-myc、MMP-7 及 CD44,故细胞出现恶性增殖^[14]。

在前列腺癌、卵巢癌以及宫颈癌等的进展过程中,随着病理分级及临床期别的增高,p-AKT 的表达水平均逐渐升高^[11-12],本研究显示随着宫颈病变的进展,p-AKT 的水平逐渐升高,二者呈正相关性,与其基本一致,因此 p-AKT 与宫颈病变的进展密切相关。还有研究^[13]结果表明,GSK-3β 是 PI3K/AKT 信号通路及 Wnt 通路的交叉点,激活的 p-AKT 蛋白

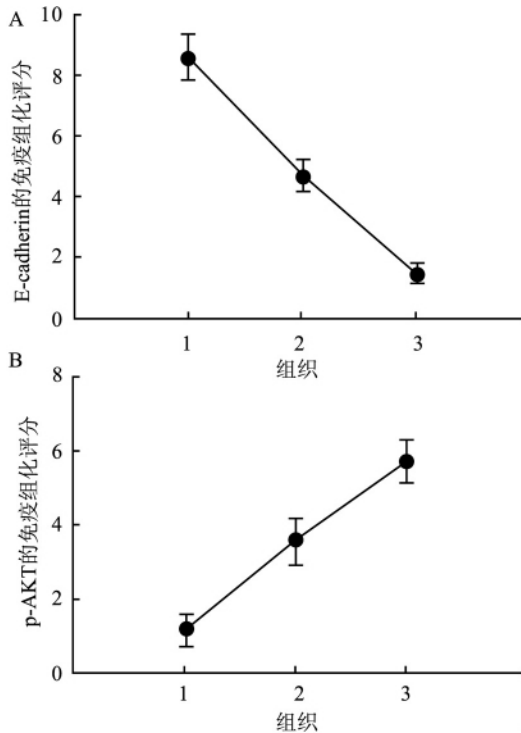


图4 E-cadherin、p-AKT 的表达与宫颈癌病变程度的相关性
A: E-cadherin; B: p-AKT; 1: 正常宫颈; 2: CIN; 3: 浸润癌

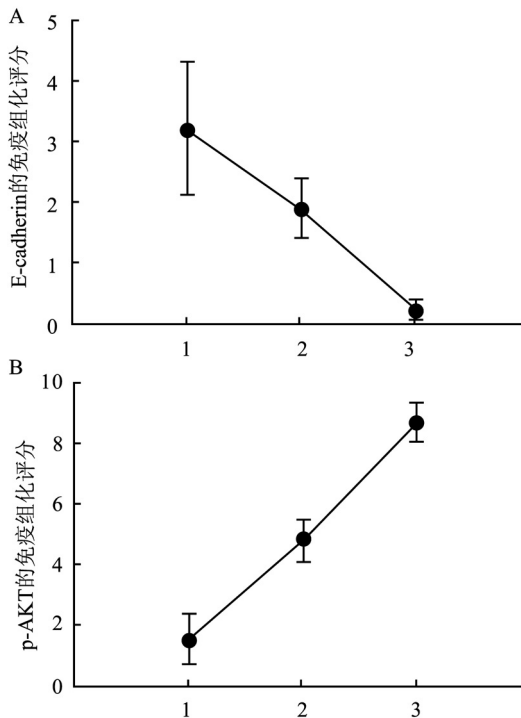


图5 E-cadherin、p-AKT 的表达与宫颈癌分化程度的相关性
A: E-cadherin; B: p-AKT; 1: 高分化; 2: 中分化; 3: 低分化

使下游 GSK-3 β 在丝氨酸 Ser9 位点上发生磷酸化而失活,故抑制了 Wnt 通路中 β -catenin 的降解,大量 β -catenin 在胞质内累积,促进肿瘤细胞增殖。在正

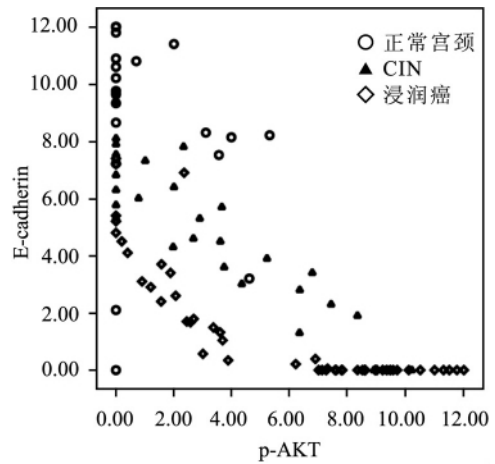


图6 E-cadherin 与 p-AKT 的相关性分析

常宫颈向宫颈癌进展过程中,细胞恶性潜能逐渐升高,正常分化水平逐渐降低,Loricrin 作为终末分化的指标,本研究中 Loricrin 的蛋白及 mRNA 表达水平均降低,也进一步证实这一点。PI3K/AKT 信号转导通路是重要的细胞生长信号通路之一,通过激活或抑制下游蛋白 mTOR、Bad、Caspase-9、Tuberin、GSK-3 β 等,进一步调控细胞生长、分化、凋亡、血管生成等效应,Assinder et al^[4] 在前列腺癌中已证实其主要通过 AKT/GSK-3 β /Snail 通路调节 EMT 过程。p-AKT 代表了 PI3K/AKT 信号转导通路的激活状态,活化的 p-AKT 通过诱导 GSK-3 β 磷酸化而失活,进一步抑制下游 Snail 蛋白的磷酸化,促进其核转位并降低蛋白稳定性,从而诱导 EMT 的发生,上皮向间质转化,E-cadherin 的表达水平下降甚至缺失^[3]。本研究中 E-cadherin 与 p-AKT 的表达情况呈负相关性,说明在宫颈癌中,AKT 的磷酸化水平的提高与 E-cadherin 表达水平的降低有关,更进一步证实了 AKT/GSK-3 β /Snail 通路的活化与 EMT 间的调控关系,促进细胞恶性增殖及转移。因此,宫颈病变中 E-cadherin 和 AKT 磷酸化的水平与病变程度及上皮最终分化程度有密切联系。

本研究结合临床标本检测 E-cadherin 及其下游分子的表达及 AKT 磷酸化水平在不同程度宫颈病变组织中的表达变化,通过相关性分析发现,二者与病变程度和癌组织分化密切相关,因此二者在预测宫颈病变进展,对指导临床治疗方案具有重要价值。

参考文献

- [1] Wells A, Yate S C, Shepard C R, et al. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the me-

- tastatic seeding of disseminated carcinomas [1]. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(6): 621–8.
- [2] Yan W, Fu Y, Tian D, et al. PI3k inase/Akt signaling mediates epithelial mesenchymal transition in hypoxic hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(3): 631–6.
- [3] Wen W, Ding J, Sun W, et al. Cyclin G1-mediated epithelial-mesenchymal transition via phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling facilitates liver cancer progression [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1787–98.
- [4] Cheng Y, Zhou Y, Jiang W, et al. Significance of E-cadherin, β -catenin, and vimentin expression as postoperative prognosis indicators in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(8): 1213–20.
- [5] Sun G Y, Wu J X, Wu J S, et al. Caveolin-1, E-cadherin and β -catenin in gastric carcinoma, precancerous tissues and chronic non-atrophic gastritis [J]. *Cancer Res*, 2012, 24(1): 23–8.
- [6] Zhai J, Yang X, Zhang Y, et al. Reduced expression levels of the death-associated protein kinase and E-cadherin are correlated with the development of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ther Med*, 2013, 5(3): 972–6.
- [7] Shiwu W U, Lan Y, Wenqing S, et al. Expression and clinical significance of CD82/ KAI1 and E-cadherin in non-small cell lung cancer [J]. *Arch Iran Med*, 2012, 15(11): 707–12.
- [8] Slowinska-Klencka D, Sporny S, Stasikowska-Kanicka O, et al. E-cadherin expression is more associated with histopathological type of thyroid cancer than with the metastatic potential of tumors [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012, 50(4): 519–26.
- [9] Niessen C M, Gottardi C J. Molecular components of the adherens junction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778(3): 562–71.
- [10] Jamieson C, Sharma M, Henderson B R. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop [J]. *Biochem Cell Biol*, 2012, 44(6): 847–50.
- [11] Mailk S N, Brattain M, Ghosh P M, et al. Immunohistochemical demonstration of phosphor-AKT in high Gleason grade prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(4): 1168–71.
- [12] 魏 欣, 吕庆杰, 孙寒雪, 等. 上皮性卵巢癌中磷酸化蛋白激酶 B 和磷酸化糖原合成酶激酶-3 β 及 β -catenin 蛋白的表达及意义 [J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(2): 86–90.
- [13] Jope R S, Yuskaitis C J, Beurel E, et al. Glycogen synthase kinase-3(GSK3): inflammation diseases, and therapeutics [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(4–5): 577–95.
- [14] Assinder S J, Dong Q, Kovacevic Z, et al. The TGF- β , PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer [J]. *Biochem*, 2009, 417(2): 411–21.
- [15] Zhou B P, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 931–40.

Correlation analysis of E-cadherin expression and AKT phosphorylation levels in cervical lesions

Tian Yuan, Feng Dingqing, Wu Jiaojiao, et al

(Dept of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the correlation between the expression of E-cadherin and the level of phosphorylation of AKT and the degree of cervical lesions. **Methods** 20 cases of normal cervical tissue, 30 cases of CIN tissues, and 50 cases of cervical squamous cell carcinoma were collected; real-time PCR and immunohistochemistry were used to detect mRNA and protein expression of E-cadherin, β -catenin, p-AKT and Loricrin in tissue, correlation between E-cadherin expression and AKT phosphorylation levels, and the correlation between two markers above and degree of cervical lesions and the differentiation of cervical cancer were analysed. **Results** Immunohistochemical results showed that with the progress of cervical lesions, expression of E-cadherin and Loricrin would decrease, or absent ($P < 0.05$); β -catenin expresses in the membrane in normal epithelial, gradually transferring from the membrane to the cytoplasm and nucleus with cervical lesions progressing, and the expression was totally decreased ($P < 0.05$); quantitative PCR results were consistent with the above-mentioned immunohistochemical results of protein. Conversely, the expression of p-AKT gradually increased with the progress of the disease ($P < 0.05$). The analyses showed that the expression of E-cadherin and stage of cervical lesions and squamous differentiation were negatively correlated ($r_s = -0.688, -0.438; P < 0.01$) while the expression of p-AKT had positive correlation with them ($r_s = 0.462, 0.692; P < 0.01$). E-cadherin and p-AKT expression were negatively correlated ($r_s = -0.828, P < 0.01$). **Conclusion** Loss of E-cadherin expression and increase of AKT phosphorylation are closely related with the development of cervical lesions; the combination of them can be used to monitor the progress of cervical lesions and guide clinical treatment programs.

Key words E-cadherin; β -catenin; p-AKT; Loricrin; cervical intraepithelial neoplasia; cervical cancer