

人结肠癌组织中VM、EMT及Wnt通路关键蛋白表达的相关性分析

杨宏¹, 乔梦¹, 李皓静¹, 杜家乐², 陈速研², 罗丹阳¹, 何敏¹, 张翠英*

(1. 内蒙古自治区人民医院 肿瘤内科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 内蒙古医科大学)

摘要:目的:本研究探讨结肠癌组织中VM、EMT和Wnt通路关键蛋白表达的相关性。方法:选取200例结肠癌患者的组织标本,利用免疫组化测定VM、EMT的两种标记蛋白(Vimentin、E-cadherin)及Wnt通路调节蛋白 β -catenin的表达,并探讨其相关性。结果:200例人结肠癌组织中有45例VM表达阳性,VM阳性患者肿瘤分化更差、分期更晚,更易发生复发转移,差异有统计学意义($P < 0.05$)。VM阳性时Vimentin高表达(66.7%),E-cadherin低表达(15.5%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时VM阳性 β -catenin为高表达(60.0%),VM阴性 β -catenin为低表达(8.4%),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。 β -catenin阳性的结肠癌组织中,Vimentin为高表达(72.5%),而E-cadherin低表达(30.0%),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:在结肠癌组织内存在VM现象,VM与EMT存在相关性。VM与Wnt通路存在相关性。结肠癌中Wnt通路活化可能促进EMT发生。

关键词:结肠癌;血管生成拟态;上皮间质转化;Wnt通路

中图分类号: R735.3+5

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)05-0489-04

结肠癌严重危害人类健康,肿瘤血管生成是结肠癌侵袭转移不可或缺的因素。最新研究表明血管生成拟态(Vasculogenic Mimicry, VM)与肿瘤细胞的生长转移密切相关^[1]。已有研究表明结肠癌组织中存在VM现象且存在VM的患者往往恶性程度高,易发生血道转移,预后差。VM形成的具体机制未完全明确,有研究认为上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在VM形成过程中发挥重要作用^[2]。EMT是上皮细胞向间充质细胞转化的现象,会受到细胞信号转导机制精准调控,其中Wnt通路被认为是参与调控EMT的重要信号通路之一^[3]。然而VM形成与Wnt通路是否存在关联仍不清楚。另外结肠癌中Wnt通路与EMT关系仍需验证。本研究通过免疫组化技术分别检测结肠癌病例组织中VM表达,同时检测EMT的标记蛋白Vimentin和E-cadherin的表达,检测Wnt通路调控蛋白 β -catenin的表达。初步分析和研究结肠癌VM表达情况以及VM表达与临床病理特征的关系;分析VM与EMT两种标记蛋白表达的关系;分析VM与Wnt通路调控蛋白 β -catenin表达的关系;分析 β -catenin表达与EMT两种标记蛋白的关系,为进一

步研究VM、EMT以及Wnt通路这三者之间的内在联系奠定初步基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2018-01~2019-12期间我院收治的200例结肠癌患者的组织标本,所有入组患者均接受手术治疗,排除术前接受过放疗化疗的患者。患者中包括男性109例,女性91例,年龄范围25~74岁,平均年龄为(50.61 ± 18.3)岁。收集所有患者临床病理资料,另由两位有经验的病理医师复阅切片并确认为结肠癌。

1.2 方法

采用CD34免疫组化染色与过碘酸-雪夫氏(PAS)染色法两种方法共同判定VM,PAS阳性且周围衬有肿瘤细胞,但CD34为阴性的管道结构被认为是VM(+),400倍镜下观察至少10个不同的视野判断结果^[4]。

免疫组化SP染色测定EMT相关因子Vimentin、E-cadherin的表达,阳性染色结果判定:Vimentin >

收稿日期:2021-07-21;修回日期:2021-08-27

基金项目:内蒙古自治区人民医院院内基金(2016028)。

作者简介:杨宏(1979-),女,内蒙古自治区人民医院肿瘤内科副主任医师。

通讯作者:张翠英,主任医师,E-mail:yanghongnmg@sina.com 内蒙古自治区人民医院肿瘤内科,010017

10%, E-cadherin > 50%为阳性表达^[4]。

免疫组化染色判定 Wnt 通路相关因子 β -catenin 表达情况。结果根据 IRS 系统进行评价: IRS (分值) = 染色程度 (SI) \times 阳性细胞比例 (PP)。评判标准: 0 分, 阴性, 记为(-); 1 分以上阳性, 记为(+)^[5]。

1.3 统计学方法

本研究采用 SPSS 22.0 软件, 计数资料采用 χ^2 检验; 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验; 检验水准为 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人结肠癌组织中 VM 表达情况分析

共检测 200 例结肠癌患者术后组织蜡块的 VM 表达情况。结果显示, 结肠癌患者中的确存在 VM 现象, 本研究 200 例结肠癌中有 45 例 VM 表达(+), 且阳性表达者与较差的肿瘤组织分化、较高的临床分期及复发转移相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 结肠癌组织 VM 蛋白表达情况及临床特征关系(n)

临床特征	参数	总数	VM+	χ^2	P
年龄	<50	72	18	0.403	0.525
	≥ 50	128	27		
性别	男	109	22	0.737	0.391
	女	91	23		
肿瘤大小(cm)	≥ 10	22	5	0.001	0.978
	<10	178	40		
组织分化	高分化	47	3	21.151	< 0.01
	中分化	100	12		
	低分化	53	30		
临床分期	I	10	1	55.987	< 0.01
	II	130	12		
	III	50	23		
	IV	10	9		
复发或转移	存在	70	37	56.914	< 0.01
	不存在	130	8		

注: *为 VM 阳性组与阴性组的差异有统计学意义。

2.2 人结肠癌组织中 VM 蛋白和 EMT 蛋白表达的相关性分析

本研究 45 例 VM 阳性的结肠癌组织中 Vimentin 为高表达率(66.7%), E-cadherin 为低表达(15.5%); 而 VM 阴性中 Vimentin 为低表达(14.8%), E-cad-

herin 为高表达(74.8%), (见表 2)。统计学分析显示 VM 阳性组与阴性组中结肠癌细胞 Vimentin 和 E-cadherin 的表达差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示存在 VM 的结肠癌组织中肿瘤细胞多发生 EMT, 二者具有相关性。

表 2 VM 与 EMT 标记蛋白表达之间的关系[n (%)]

VM 表达	Vimentin 表达		E-cadherin 表达		P
	+	-	+	-	
+(n=45)	30(66.7)	15(33.3)	7(15.5)	38(84.5)	0.000*
-(n=155)	23(14.8)	132(85.2)	116(74.8)	39(25.2)	

注: *为 VM 阳性组与阴性组表达有统计学差异。

2.3 人结肠癌组织中 VM 阳性与 Wnt 通路调控蛋白 β -catenin 表达的相关性分析

本研究 45 例 VM 阳性的结肠癌组织中, 有 27 例(60%) β -catenin 表达阳性, 而 VM 阴性中只有 13 例

(8.4%) β -catenin 表达阳性(见表 3)。VM 表达在 β -catenin 阳性与阴性组的表达具有统计学差异 ($P < 0.05$)。提示 VM 表达与 Wnt 通路调控蛋白 β -catenin 表达具有相关性。

表3 VM表达与β-catenin表达的相关性 [n (%)]

VM 表达	β-catenin 表达		χ ²	P
	+(n=40)	-(n=160)		
+(n=45)	27(60%)	18(40%)	58.065	<0.01
-(n=155)	13(8.4%)	142(91.6%)		

注:*为阳性组与阴性组比较有统计学差异。

2.4 人结肠癌组织中β-catenin表达与EMT的两种标记蛋白(Vimentin、E-cadherin)表达的相关性分析

200例结肠癌组织中有40例β-catenin阳性, Vimentin为高表达(72.5%),而E-cadherin低表达

(30.0%);而β-catenin阴性中, Vimentin低表达(15.0%)而E-cadherin高表达(69.4%)(见表4)。经统计学分析表明β-catenin与Vimentin表达呈正相关(P<0.05),同时与E-cadherin呈负相关(P<0.05)。提示β-catenin阳性者更易发生EMT。

表4 Wnt/β-catenin信号通路状态有关蛋白和EMT蛋白表达的关系[n (%)]

β-catenin 表达	Vimentin 表达		E-cadherin 表达		P
	+	-	+	-	
+(n=40)	29(72.5)	11(27.5)	12(30.0)	28(70.0)	<0.01
-(n=160)	24(15.0)	136(85.0)	111(69.4)	49(30.6)	

注:*为阳性组和阴性组比较具有统计学差异。

3 讨论

美国学者于1999年首次在黑色素瘤的报道中提出了VM^[6]现象,这种特殊现象在多种肿瘤中都可以观察到^[7]。由于VM管道由肿瘤细胞直接围成因此肿瘤细胞更易突破基底膜快速进入血液利于肿瘤侵袭和转移^[8,9]。一项纳入217例结肠癌患者的研究显示VM与肿瘤组织分化程度低、TNM分期晚以及高复发转移密切相关^[10]。本研究结果显示,200例结肠癌组织中有45例VM阳性。其中VM阳性与结肠癌患者的年龄、性别以及肿瘤大小无明显相关,但与肿瘤分化差、临床分期晚及高复发转移密切相关(P<0.05),这与既往研究结果一致。

上皮间质转化(EMT)与癌组织的VM关系密切。EMT发生过程中上皮细胞失去其上皮表型如E-cadherin、claudin等粘附蛋白表达下调导致细胞间桥粒连接减弱,同时获得间质特性如Vimentin、SMA等表达上调。本研究检测和比较了结肠癌组织中VM与EMT的两种标记蛋白Vimentin和E-cadherin的表达。VM阳性组Vimentin高表达而E-cadherin表达缺失,提示VM存在的结肠癌组织中癌细胞间充质表型上调而上皮表型缺失,因此推测VM阳性结肠癌更容易发生EMT。

Wnt通路是调控EMT的重要信号通路之一^[11],既然EMT参与肿瘤VM形成那么VM与Wnt通路是否相关值得关注。Wnt信号通路的激活在肿瘤发生

中至关重要^[12]。研究表明Wnt通路异常会引起血管发育异常和血管生成^[13]。本研究初步分析VM与Wnt通路的调控蛋白β-catenin的关系,结果提示二者呈正相关,提示VM与β-catenin调控的Wnt/β-catenin信号通路之间可能具有相关性。

EMT在恶性肿瘤的进展和转移中发挥重要作用^[14]。许多研究报道Wnt通路与EMT的发生密切相关^[15,16]。为了验证结肠癌组织中Wnt通路与EMT的关系,本研究初步分析该信号通路的调节蛋白β-catenin与EMT的两个标记蛋白(Vimentin)、E-cadherin)表达的相关性。结果提示β-catenin调控的Wnt信号通路活化可能引起结肠癌细胞间质表型(Vimentin)上调和上皮表型(E-cadherin)下调,即β-catenin阳性更容易发生EMT。

综上所述,在结肠癌组织内存在VM现象,且VM阳性的结肠癌患者分化更差、临床分期更晚,更易发生复发转移。VM与Vimentin表达呈现正相关,与E-cadherin为负相关,提示VM与EMT密切相关。同时VM与Wnt信号通路的调控蛋白β-catenin表达呈正相关,提示VM与Wnt通路之间存在相关性。另外β-catenin与Vimentin表达为正相关但与E-cadherin负相关,提示结肠癌中Wnt通路异常活化可能促进EMT发生。本研究为进一步研究结肠癌组织中VM、EMT、Wnt通路三者之间的内在联系奠定了初步基础。

(下转第500页)

Postnatal Outcome—An Institutional Experience over 10 Years.[J]. Ping Lee May, Rajadurai Victor Samuel, Saffari Seyed Ehsan, Chandran Suresh. Fetal diagnosis and therapy . 2017 (1)

[14]Detection of fetal abnormalities by second-trimester ultrasound screening in a non-selected population.[J]. Rydberg Catharina, Tun ó n Katarina. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica. 2017 (2)

[15]Nonobstructive Diffuse Dilated Bowel Loops: Prenatal Diag

nosis, Fetal Characteristics and Neonatal Outcomes.[J]. Katz Guy, Pode-Shakked Ben, Berkenstadt Michal, Bilik Ron, Polak Charcon Sylvie, Barshack Iris, Achiron Reuven, Gilboa Yinon. Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine . 2017

[16]Microarray analysis in pregnancies with isolated echogenic bowel. Singer A, Maya I, Koifman A, et al. Early Human Development . 2018

(上接第 491 页)

参考文献

[1]方虹,周忠明,李云君,等. Notch1 信号通路与宫颈癌血管生成拟态的相关性[J]. 中国医药导报, 2019;16(21):88-92

[2]郑旭,孙保存,赵秀兰,等. 肺肉瘤样癌中血管生成拟态的形成及其与上皮间充质转化的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2013;40(8):431-435

[3]周芷晴,李媛媛,徐志文,等. 基于影响肿瘤间质血管生成探讨枸杞多糖抗小鼠结肠癌作用及机制[J]. 中医学, 2019;8(04):293-299

[4]周路,余征,覃强,等. 卵巢癌组织中 FGF-β 表达与 EMT 的关系及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020;25(06):532-537

[5]吴志超,林伯斌,孙少杰,等. 肝癌组织中 TGF-β、β-catenin 和 EMT 相关蛋白表达水平及临床意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2019;22(12):930-934

[6]Zhang D, Sun B, Zhao X, et al. Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer[J]. Molecular Cancer, 2014;13(1):207-213

[7]Liu Z, Sun B, Qi L, et al. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Cancer Science, 2012;103(4):813-820

[8]Li SQ, Wang ZS, Zhi YL, et al. Wnt3a Promotes the Vasculogenic Mimicry Formation of Colon Cancer via Wnt/β-Catenin signaling [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015;

16(8):18564-18579

[9]Hu J, Dong A, Fernandez—Ruiz V et al. Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2009;69(17):6951-6959

[10]Klaus A. Wnt signaling and its impact on development and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008;8(5):387-398

[11]Vincan E, Darcy P K, Farrelly C A, et al. Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids.[J]. Oncogene, 2007;26(16):2340-2352

[12]Qi H, Sun B, Zhao X, et al. Wnt5a promotes vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transition via protein kinase Cα in epithelial ovarian cancer[J]. Oncology Reports, 2014;18(5):2015-2025

[13]Park JI, Vent AS, Hong Y, et al. Telomerase modulates Wnt signaling by association with target gene chromatin[J]. Nature, 2009;40(25):660-672

[14]Yang W, Yan HX, Chen L, et al. Wnt / beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells[J]. Cancer Res, 2008;68(11):4287-4295

[15]何炜,王全玉,李晓敏,等. Notch1 和 c-Met 在结直肠癌中的表达及其与血管生成拟态和预后的关系[J]. 西部医学, 2016;28(9):1203-1206

[16]庞春光,孙保存,赵秀兰,等. 大肠癌中 β-integrin 表达与血管生成拟态的关系及分子机制的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2013;12(10):7-11

(上接第 494 页)

[10]金春华,王晓燕,张丽丽,等. 儿童维生素 A 缺乏与血红蛋白水平及呼吸道感染相关性研究[J]. 临床儿科杂志, 2017;35(10):755-758

[11]陈文玲,梁金勇,王容娟. 维生素 A 缺乏、炎性因子和小儿反复呼吸道感染的相关性分析[J]. 临床医学工程, 2019;26(8):1095-1096

[12]顾志勇,余加林. 维生素 A 与新生儿肺炎、败血症及呼吸窘迫综合征相关性的临床研究[J]. 儿科药学杂志, 2015;21(6):11-14

[13]WEISKIRCHEN R, TACKE F. Cellular and molecular func

tions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology[J]. Hepatobiliary surgery & nutrition, 2014; 3(6):344-363

[14]傅卓,付俊鲜,杨光路. 儿童肺炎支原体肺炎外周血血清维生素 A、D、E 的变化及相关性[J]. 内蒙古医科大学学报. 2020;42(5):495-496

[15]缪伶俐,刘金祥. 阿奇霉素联合维生素 A 及甘草锌颗粒治疗肺炎支原体肺炎患儿的疗效分析[J]. 临床血液学杂志. 2020;33(8):537-540