

肝细胞癌组织中细胞间隙连接蛋白Cx32的表达改变

王 芹, 霍继荣, 刘德良, 王学红

王芹, 霍继荣, 刘德良, 王学红, 中南大学湘雅二医院消化内科 湖南省长沙市 410011

王芹, 女, 1977-03-18 生, 江西省黎川县人, 汉族. 2003 年中南大学湘雅医学院硕士.

项目负责人: 王芹, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院消化内科. jxywq@163.com

收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-24

Expression of gap junction protein Cx32 in human hepatocellular carcinoma tissue

Qin Wang, Ji-Rong Huo, De-Liang Liu, Xue-Hong Wang

Qin Wang, Ji-Rong Huo, De-Liang Liu, Xue-Hong Wang, Department of Gastroenterology, The second Xiang Ya Hospital, Central-South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Qin Wang, Department of Gastroenterology, The second Xiang Ya Hospital, Central-South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. jxywq@163.com

Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-03-24

Abstract

AIM: To investigate the significance and mechanism of expression and localization of gap junction protein Cx32 in hepatocarcinogenesis.

METHODS: The quantity and localization of Cx32 in 34 cases of HCC and 10 cases of normal liver tissue were analyzed by streptavidin-peroxidase immunohistochemical method.

RESULTS: In HCC and normal liver tissues, the positive rates of Cx32 protein were 38.2% and 90% respectively, with a significant difference between them ($P < 0.01$). In HCC (grades I, II and III), the positive rates of Cx32 protein were 57.1%, 40.0% and 29.4% respectively, with a significant difference between HCC II, III and normal liver tissue ($P < 0.05$), and the lower the histological degree, the lower the Cx32 protein positive rate, but the detection rates of Cx32 protein had no significant difference among each histological grade. In normal liver tissue, Cx32 was detected in cytoplasmic membrane at intercellular contacts. But in HCC, Cx32 was detected mainly either intracytoplasmically or in plasma membrane free from contact with other cells.

CONCLUSION: The decrease of Cx32 protein expression level and aberrant localization of Cx32 may play an important role in hepatocarcinogenesis.

Wang Q, Huo JR, Liu DL, Wang XH. Expression of gap junction protein Cx32 in human hepatocellular carcinoma tissue. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(8):1796-1799

摘要

目的: 探讨细胞间隙连接蛋白Cx32在肝细胞癌(hepatocellular

carcinoma, HCC)及正常肝组织中的表达、定位及其在HCC发生中的意义和机制。

方法: 应用SP免疫组化方法检测Cx32蛋白在34例HCC组织和10例正常肝组织中的表达和定位。

结果: Cx32蛋白在HCC及正常肝组织中的阳性率分别为38.2%和90%, 经 χ^2 检验, Cx32蛋白在HCC中的表达低于正常肝组织($P < 0.01$). HCC各级(I、II、III)的阳性率分别为57.1%、40%和29.4%, 其中HCC II和HCC III与正常肝组织相比在统计学上有显著性差异($P < 0.05$). 并且随着HCC分化程度的降低, 其阳性率也随之下降, 但HCC各级之间在统计学上无显著性差异. Cx32蛋白在正常肝细胞中定位于相邻细胞间相互接触的细胞膜上; 而在HCC中既定位于细胞质, 又定位于细胞膜不与邻近细胞接触的游离缘上。

结论: 间隙连接蛋白Cx32在HCC中的表达下调及定位异常可能是HCC发生的重要环节。

王芹, 霍继荣, 刘德良, 王学红. 肝细胞癌组织中细胞间隙连接蛋白 Cx32 的表达改变. *世界华人消化杂志* 2004;12(8):1796-1799

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1796.asp>

0 引言

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第三位, 仅次于胃癌和食管癌. 在肝癌中约有 90% 为肝细胞癌 (HCC). 我国是 HCC 的高发国, 每年全世界有超过 25 万的新发病例, 而其中 11 万 (44.7%) 就发生在中国^[1]. HCC 的发病机制尚不明确. 间隙连接是相邻细胞间的膜通道, 由胞膜上的连接蛋白(connexin Cx)亚单位构成. 细胞通过间隙连接所介导的细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC)进行细胞间信息和能量的传递, 调控细胞的生长、分化, 保持内环境的稳定^[2-3]. Cx32 是肝脏中的主要表达的连接蛋白^[4]. 在肿瘤组织中 Cx32 的表达下调, 并可观察到其定位存在异常^[5-10]. Cx32 蛋白的表达的下调及定位的异常和由此产生的信号传导通路的紊乱将导致相邻细胞间的 GJIC 的异常^[11], 人们认为这可能是 HCC 发生的重要机制之一. 为探索 Cx32 蛋白在人 HCC 和正常人肝组织中的表达和定位, 了解 Cx32 的表达和定位与 HCC 发生之间的关系, 我们应用 SP 免疫组化方法检测了 34 例 HCC 和 10 例正常肝组织中 Cx32 的表达和定位。

1 材料和方法

1.1 材料 收集标本 44 例. 2001–2003 年中南大学湘雅二医院外科手术切除病理学证实 HCC 标本 34 例. 男 31 例, 女 3 例, 年龄 27–73(45±13)岁. 并按 Edmondson^[12] 分类标准分为 I, II, III 级. 所有病例术前均未经过放疗和化疗. 正常肝组织标本 10 例, 男 8 例, 女 2 例, 年龄 17–40(27±7)岁. 小鼠抗人 connexin-32mAb(美国 CHEMICON 公司).

1.2 方法 标本均经 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μm 连续切片, 分别进行 HE 染色和免疫组化染色, 然后光镜下进行细胞形态观察, 做出病理诊断及分型. SP 免疫组化染色步骤严格按照说明书步骤进行, 光镜下观察, 计数. 用已知标准的 Cx32 表达阳性的正常肝组织标本作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照. 细胞内出现棕黄色颗粒为阳性细胞. 每张切片在高倍镜视野下计数 500 个肿瘤或正常肝细胞. 阴性(-): 阳性细胞 <5%; 阳性(+): 5–50% 细胞阳性染色; 强阳性(++): 阳性细胞数 >50%^[13].

统计学处理 实验数据采用 SPSS10.0 软件进行处理. 所有结果均经 χ^2 检验. 以 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准.

2 结果

2.1 Cx32 的定位 用 Cx32mAb 检测 Cx32 蛋白的免疫反应阳性显色为棕黄色颗粒. 正常肝组织强阳性, 阳性颗粒呈点状分布于胞膜上(图 1A); 在 HCC 组织中, 阳性染色弱, 阳性染色颗粒则大多分布于细胞膜上不与邻近细胞相接触的游离缘上, 或者分布于细胞质内(图 1B–F).

2.2 Cx32 在 HCC 及正常肝组织中的表达 经 χ^2 检验表明, Cx32 在 HCC 的阳性率低于正常肝脏组织($P<0.01$) (表 1). HCC 组织学类型以索状/梁状型和实体型为主 27 例, 索状假腺型和硬化型 4 例, 低分化型 3 例. 其中 1 例索状/梁状型和 1 例索状假腺型中可见部分透明细胞. HCC 13 例 Cx32 蛋白表达阳性, 其中在组织学类型上 6 例属于分化较好的索状/梁状型, 2 例为索状假腺型, 4 例实体型, 1 例为低分化型. 在这 13 例阳性标本

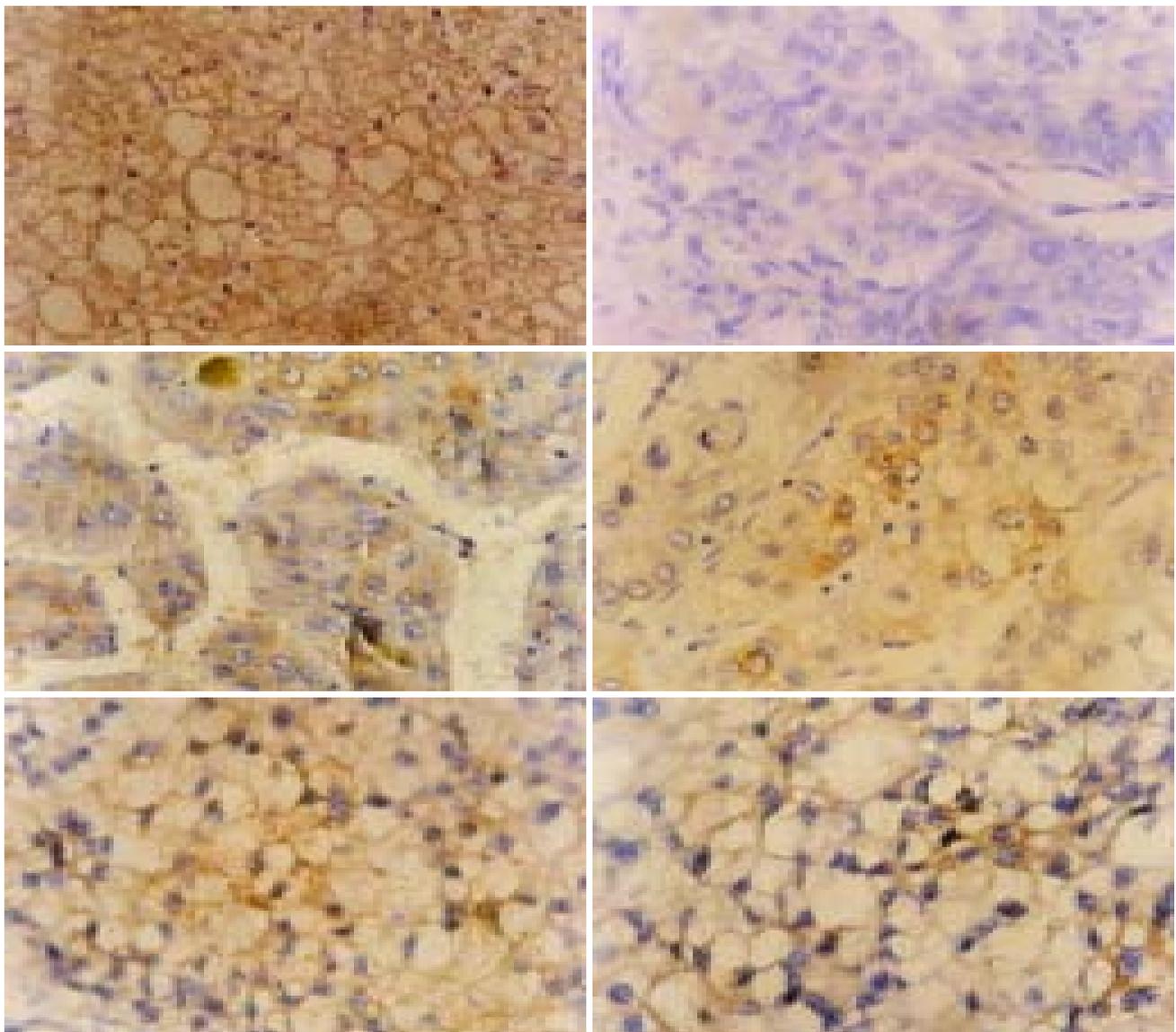


图 1 肝组织 Cx32 表达 SP × 400. A: 正常肝组织, 棕黄色点状定位于相邻细胞膜上; B: 肝细胞癌阴性; C: 索状假腺型 HCC 阳性胞质; D: 索状/条状型 HCC 阳性胞质; E: 索状假腺型 HCC 透明细胞胞膜阳性; F: 索状/条状型 HCC, Cx32 蛋白透明细胞胞膜阳性.

中有 6 例为强阳性表达, 含有部分透明细胞的 2 例标本均为强阳性表达, 2 例索状 / 梁状型和 1 例实体型也为强阳性, 1 例低分化型呈强阳性(表 2). Cx32 蛋白在 HCC I, II, III 级中的阳性率逐渐下降, 但各级相互之间无显著性($P > 0.05$). 其中 HCC II, III 与正常肝组织阳性率相比有显著性差异($P < 0.05$)(表 1).

表 1 Cx32 蛋白在 HCC 及正常肝脏组织中的阳性率

n

表 2 Cx32 蛋白在 HCC 各组织学类型中的阳性率

3 讨论

由间隙连接通道介导的 GJIC 被认为在保持组织内稳态, 胚胎发育, 细胞分化, 生长调控和肿瘤发生中起重要作用. 肿瘤被认为是生长及发育的异常, 而 GJIC 与细胞的分化和生长调控有关; 同时也因为 GJIC 对内环境的稳态的维持至关重要, 而肿瘤的形成毫无疑问存在内环境稳态的紊乱或丧失, 故人们认为 GJIC 的紊乱在肿瘤发生中起重要作用. 据报道已经在许多肿瘤细胞, 包括 HCC 细胞中发现了 GJIC, 特别是异源性 GJIC (heterologous GJIC) 的减少, 而这种 GJIC 的减少使得肿瘤细胞得以逃脱系统或局部的生长控制机制, 是肿瘤的发生机制之一^[7, 14-16]. 导致 GJIC 异常的分子机制包括^[17]: 连接蛋白的基因突变; 连接蛋白的表达异常; 连接蛋白的定位异常; 和受其他因子调节. 在肝脏组织中主要表达的连接蛋白是 Cx32, Cx32 基因在肝癌组织中的突变情况很少见^[7, 18]. 因此认为 Cx32 的基因突变未在 HCC 的发生中起作用, 而在 HCC 发生机制中起重要作用的可能是连接蛋白的表达及定位异常及其他一些因素.

本实验结果显示 Cx32 在正常肝脏组织较 HCC 阳性率高, 二者有显著性差异($P < 0.01$). 这一点与马向东 *et al* 的研究结果相似^[13, 18]. 另外, 本实验分析了各组织学类型的 HCC 的 Cx32 蛋白的表达情况, 由于各组织学类型的样本例数较少, 无法从统计学上判定 HCC 的各组织学类型与 Cx32 蛋白表达的关系, 但我们发现在 13 例 Cx32 蛋白表达阳性的 HCC 样本中多以分化较好的索

状 / 梁状型为主, 二例含有部分分化较好的透明细胞的样本表达均为强阳性. 并且按 Edmondson 分类标准分为 HCC I, II, III 级后, 可发现随着 HCC 分化程度的降低, Cx32 的阳性率也逐渐下降, 提示 Cx32 蛋白的表达与分化程度可能有关, 分化较好的组织因与正常肝组织在组织学上较接近, 故而 Cx32 蛋白的表达率也相对较高. 然而 HCC 各级间比较在统计学上无差异, 这可能也与样本例数较少相关.

此外, 我们观察到 Cx32 蛋白在 HCC 的定位存在异常: 在 HCC 中 Cx32 多定位于胞质内, 或细胞膜上不与其他细胞接触的游离缘上, 而在正常的细胞均定位于细胞间相互接触的细胞膜上. 这与 Krutovskikh *et al*^[7] 的研究结果是一致的. 据报道至少有 3 种机制可能解释肿瘤细胞中的这种定位异常^[7]. 第一, 肿瘤细胞中的 Cx32 蛋白可能是一种突变形式, 因此他不能插入胞膜上的正常位点. 但是至今尚未在人类肝脏肿瘤中发现 Cx32 编码序列的任何基因突变的证据; 第二, Cx32 蛋白的转录后过程(如磷酸化)存在缺陷, 而正常的磷酸化过程对于组装好的蛋白转运到细胞膜上是至关重要的. 人们发现这种机制可以解释 Cx43 的定位异常, 然而却似乎不能解释 Cx32 的定位异常^[19-21]. 第三, 一些调节 Cx32 蛋白在细胞内转运的因子在人类肿瘤组织中可能缺陷, 其中比较引人注目的是 E- 钙粘连素(E-cadherin), 有实验表明 E- 钙粘连素是形成有功能间隙连接所必须的^[22]. 大多数研究者认为 Cx32 从胞质到胞膜的转运的确与 E- 钙粘连素有关, E- 粘连素的异常可以引起 Cx32 的定位异常^[23-26].

本实验结果显示 HCC 中存在 Cx32 蛋白的表达下调和定位异常, Cx32 的表达下调可能直接影响了 GJIC, 导致 GJIC 的异常; 而 Cx32 的定位异常使得 Cx32 不在能够形成功能性间隙连接的位点上, 从而产生 Cx32 蛋白的功能异常, 这种定位异常还可能干扰了旁观者效应 (bystander effect)^[27-30], 最终导致肝细胞生长失控, 去分化而恶性增生, 致肿瘤产生. Cx32 蛋白的表达下调和定位异常可能参与了 HCC 的发生, 是 HCC 发生的机制之一.

4 参考文献

