

ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌组织中的表达及相关性

杨万广, 王万鹏, 张谢夫

■背景资料

研究结果显示: ALDH1与肿瘤的发生、发展密切相关。ALDH1A2是催化视黄醛氧化成维甲酸的关键酶, 维甲酸与维甲酸受体(RAR)以及维甲酸X受体(RXR)通过配体结合区域结合, 直接作用于靶基因, 调节不同靶基因的表达, 进而调控正常和肿瘤细胞的生长和分化。

杨万广, 王万鹏, 郑州大学第一附属医院急诊外科 河南省郑州市 450052
张谢夫, 郑州大学第一附属医院胃肠外科 河南省郑州市 450052
杨万广, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃肠肿瘤的研究。
作者贡献分布: 此课题由杨万广与张谢夫设计; 实验检测分析由杨万广与王万鹏操作完成; 论文写作由杨万广与王万鹏完成。
通讯作者: 张谢夫, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院胃肠外科. kfywg@eyou.com
收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-07
接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Significance of ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer

Wan-Guang Yang, Wan-Peng Wang, Xie-Fu Zhang

Wan-Guang Yang, Wan-Peng Wang, Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Xie-Fu Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Xie-Fu Zhang, Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. kfywg@eyou.com

Received: 2012-12-08 Revised: 2013-01-07

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of ALDH1A2, E-cadherin and MMP2 in colonic cancer and to analyze their clinical significance.

METHODS: RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to examine the expression and distribution of ALDH1A2, E-cadherin and MMP2 in 52 surgically resected specimens of colonic cancer and matched tumor-adjacent colonic mucosal tissue. The correlations among them and their relationship to the clinicopathologic characteristics of colonic cancer were analyzed.

RESULTS: The positive rates of ALDH1A2 and E-cadherin in tumor-adjacent colonic mucosal tissue were 67.31% and 90.38%, respectively,

which were significantly higher than that in colonic cancer tissue. The positive rate of MMP2 in colonic cancer was 86.54%, significantly higher than that in tumor-adjacent colonic mucosal ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blot analyses revealed similar results. There were significant correlations among ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colorectal carcinoma.

CONCLUSION: Expression of ALDH1A2 and E-cadherin in colonic cancer is lower than in tumor-adjacent colonic mucosal tissue, while MMP2 expression in colonic cancer is higher than that in tumor-adjacent colonic mucosal tissue. ALDH1A2 expression was correlated with MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: ALDH1A2; MMP2; E-cadherin; Colonic cancer

Yang WG, Wang WP, Zhang XF. Significance of ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(4): 362-366
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/362.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.362>

摘要

目的: 研究结肠癌组织中ALDH1A2、E-cadherin和MMP2的表达及与临床病理特征之间的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫印迹(Western blot)检测52例结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、E-cadherin和MMP2蛋白的表达, 分析其间的相关性以及与肿瘤临床病理特征之间的关系。

结果: 免疫组织化学测定显示ALDH1A2在52例结肠癌癌旁组织阳性率为67.31%; E-cadherin在52例结肠癌癌旁阳性率为90.38%; 癌旁组织ALDH1A2、E-cadherin的表达率高于癌组织。MMP2在52例结肠组织

■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室



中阳性率占86.54%, 高于癌旁组织($P<0.05$)。逆转录-PCR及免疫印迹技术显示同样结果。ALDH1A2、MMP2及E-cadherin在结肠癌中的表达具有相关性。

结论: 结肠癌中ALDH1A2、E-cadherin表达低于癌旁组织, MMP2表达高于癌旁组织, ALDH1A2、MMP2及E-cadherin三者密切相关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: ALDH1A2; 金属基质蛋白酶2; 上皮钙黏蛋白; 结肠癌

杨万广, 王万鹏, 张谢夫. ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌组织中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 362-366 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/362.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjcd.v21.i4.362>

0 引言

ALDH1A2是乙醛脱氢酶家族中17个基因之一, 乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH1)是负责各种细胞内醛氧化羧酸的细胞质酶^[1]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)s是一类具有降解细胞外基质和基底膜能力的蛋白水解酶, 在肿瘤细胞突破基底膜屏障而浸润转移中起重要作用。上皮钙黏蛋白(E-cadherin)是介导上皮细胞间黏附的主要黏附分子, 主要介导同质性细胞黏附。本研究中, 我们利用免疫组织化学、RT-PCR法及免疫印迹技术测定ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在人结肠癌及癌旁组织中mRNA及蛋白的表达, 探讨其与结肠癌病理分期的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin抗体购自Santa cruz公司; 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 逆转录和PCR扩增试剂盒均购自北京全式金生物公司。病理标本来自2008-2009我院病理科存档52例结肠癌术后的石蜡标本, 男、女各半, 经病理诊断证实, 并且术前未经化疗、放疗, 术后均给予以化疗为主的综合治疗, 并有完整的随访资料。组织标本从2009-09/2010-04在我院手术治疗, 且经病理诊断为结肠癌的患者中选取。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法: 免疫组织化学SP染色按说明书进行, 采用双评分半定量积分法, 对ALDH1A2、MMP2和E-cadherin的IHC结果进行

分析。以出现棕黄色或棕色颗粒的细胞作为阳性细胞, ALDH1A2、MMP2阳性部位在细胞浆, E-cadherin的阳性部位在胞膜, 部分细胞浆也呈阳性。

1.2.2 逆转录-PCR法测定结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA的表达: 采用用TRIzol提取组织中mRNA; 反转录成cDNA, 反应条件为离心、混匀后42 °C孵育30 min, 然后85 °C加热5 min用来灭活逆转录酶。取2 μL进行后续扩增, 其余-84 °C保存。PCR扩增目的基因(ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin); 扩增结束后, 产物经1.5%(w/v)琼脂糖凝胶溶液电泳, 当溴酚蓝电泳至适当位置, 在紫外灯下观察结果和拍照。

1.2.3 Western blot检测组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin蛋白的表达: 组织标本冰上匀浆充分裂解, 取20 μg蛋白样品于10%SDS-PAGE电泳分离并转膜。膜在室温下封闭1 h, 4 °C一抗孵育过夜。辣根过氧化物酶标记二抗室温下孵育1 h。ECL试剂检测蛋白条带。将胶片扫描后用Bandscan5.0软件进行灰度分析。

统计学处理 所有数据采用mean±SD表示, 多均数的比较采用方差分析。 $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学测定ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌及癌旁组织中的表达 ALDH1A2、MMP2表达于细胞胞浆, 呈淡黄至棕黄、棕褐色。ALDH1A2在52例结肠癌癌旁中35例阳性表达, 17例阴性表达, 阳性率占67.31%。MMP2在52例结肠癌组织中45例阳性表达, 7例阴性表达, 阳性率占86.54%。E-cadherin表达于细胞胞膜/浆, 呈淡黄至棕黄、棕褐色。E-cadherin在52例结肠癌癌旁中47例阳性表达, 5例阴性表达, 阳性率占90.38%。差异均有统计学意义(表1)。RT-PCR测定结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA的表达: RT-PCR结果显示ALDH1A2 mRNA含量在癌旁组织中高于结肠癌; MMP2 mRNA含量在癌组织中高于癌旁组织; E-cadherin mRNA含量在癌旁组织中高于结肠癌, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 表2, 图1)。Western blot测定结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin蛋白的表达: 免疫印迹结果显示ALDH1A2蛋白含量在癌旁组织中高于结肠癌; MMP2蛋白含量在癌组织中高

■研发前沿
本文最先利用免疫组织化学技术、逆转录-PCR技术及免疫印迹技术测定人结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP2和E-cadherin mRNA及蛋白的表达情况, 探讨ALDH1A2在体内对结肠癌的影响, 以期找到ALDH1A2在结肠癌中的作用机制。

■ 相关报道

Dahiya发现13-cis-RA除了能抑制人前列腺癌细胞株LNCaP生长、使其裸鼠致瘤性及软琼脂克隆形成能力下降外，还能使IV型胶原酶的活性下降50%。RA使胃癌细胞株MKN45H对基底膜胶(Matrigel)的黏附能力下降，明胶酶的分泌能力降低。以上研究显示ALDH1A2催化生成的维甲酸具有抑制肿瘤细胞生长、增殖、侵袭转移及黏附的作用。

表 1 ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin在结肠癌及癌旁组织中的表达 ($n = 52$)

分组	阴性		阳性		阳性率(%)	χ^2 值	P值
	(-)	(+)	(++)	(+++)			
ALDH1A2							
结肠癌组织	32	13	6	1	38.46	5.34	<0.05
癌旁组织	17	13	10	12	67.31		
E-cadherin							
结肠癌组织	37	11	3	1	28.85	9.47	<0.05
癌旁组织	5	17	22	8	90.38		
MMP2表达强度							
结肠癌组织	7	7	25	13	86.54	7.19	<0.05
癌旁组织	35	10	5	2	32.69		

表 2 结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA及蛋白的表达 (mean ± SD)

	ALDH1A2	MMP2	E-cadherin
RT-PCR			
结肠癌	0.136 ± 0.021	0.529 ± 0.063	0.159 ± 0.022
癌旁组织	0.675 ± 0.074 ^a	0.172 ± 0.024 ^a	0.572 ± 0.077 ^a
WB			
结肠癌	0.094 ± 0.013	0.634 ± 0.068	0.115 ± 0.014
癌旁组织	0.528 ± 0.065 ^a	0.325 ± 0.043 ^a	0.483 ± 0.068 ^a

^aP<0.05 vs 结肠癌组织。

表 3 ALDH1A2与MMP2在结肠癌组织中表达的相互关系 (n)

ALDH1A2	MMP-2		Kappa	P值
	阳性	阴性		
阳性	14	6	0.532	<0.05
阴性	31	1		

表 4 ALDH1A2与E-cadherin在结肠癌组织中表达的相互关系 (n)

ALDH1A2	E-cadherin		Kappa	P值
	阳性	阴性		
阳性	12	8	0.532	<0.05
阴性	3	29		

于癌旁组织；E-cadherin蛋白含量在癌旁组织中高于结肠癌，差异均有统计学意义($P<0.05$ ，表5，图2)。

2.2 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在大肠癌组织中表达的相关性 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在大肠癌组织中表达的相互关系分别见表3-5。表中显示的相互关系三者具有密切相关性($P<0.05$)。

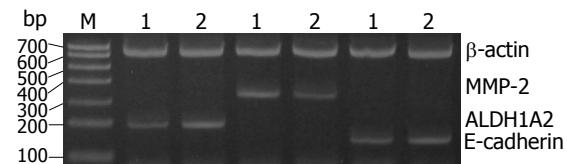


图 1 结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA的表达。

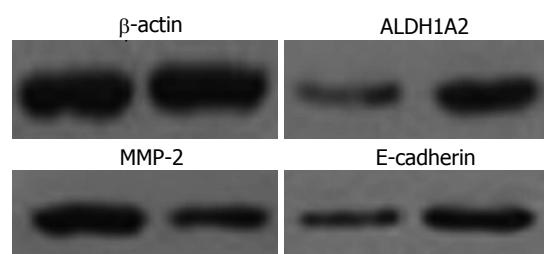


图 2 结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin的表达。

3 讨论

结肠癌患者5年生存率近十年来徘徊在50%左右。在西方国家进展也差别不大^[1]。日本结肠癌术后5年生存率60年代是45%，到80年代上升的78%^[2]。ALDH是负责各种细胞内醛氧化羧酸的细胞质酶^[3]。到目前为止，已经发现17种ALDH

表 5 MMP2与E-cadherin在结肠癌组织中表达的相互关系(η)

ALDH1A2	MMP-2		Kappa	P 值
	阳性	阴性		
阳性	13	32	0.646	<0.05
阴性	2	5		

的亚型。2010年宾夕法尼亚大学Deng等^[4]发现, ALDH1在正常人体组织的表达和分布差异显著。正常组织细胞中, 维生素A代谢的中间产物为视黄醛, ALDH1A2不可逆氧化视黄醛为维甲酸^[5]。ALDH1A2是催化视黄醛的氧化成维甲酸的关键酶^[6], 维甲酸正常的生理浓度很低, 与维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和维甲酸X受体(retinoic X receptor, RXR)通过配体结合区域结合, 直接作用于靶基因, 调节不同靶基因的表达, 进而调控正常和肿瘤细胞的生长和分化^[7-9]。Dahiya等^[10]发现ALDH1A2催化生成的维甲酸具有抑制肿瘤细胞生长、增殖、侵袭转移及黏附的作用。RA使胃癌细胞株MKN45H对基底膜胶(Matrigel)的黏附能力下降, 明胶酶的分泌能力降低^[11,12], 也有研究证明该基因可能参与癌细胞增殖的负性调控^[13]。本研究发现, 在结肠癌旁组织中, ALDH1A2表达于细胞胞浆, 并证明癌旁组织中ALDH1A2酶高表达, 而结肠癌组织中低表达。这一结果证实ALDH1A2与结肠癌的生物学行为相关。

肿瘤转移的前提是突破原位基底膜屏障迁移入血或远处器官, 黏附是肿瘤迁徙和转移的始动因素^[14]。而MMP在肿瘤细胞突破基底膜屏障而浸润、转移中起重要作用。本研究中结果表明: MMP2表达于细胞胞浆, MMP2蛋白在癌组织远高于癌旁组织。这一结果证实了MMP2蛋白可能影响了结肠癌的生物学行为。本研究还证实E-cadherin在癌组织中表达高于对照组织, 这一结果也与国内的研究结果一致^[15], 表明E-cadherin表达减弱是肿瘤细胞低分化的重要因素。

我们对ALDH1A2、MMP2及E-cadherin在结肠癌中的表达进行了相关性分析, 结果显示ALDH1A2与MMP2及E-cadherin具有密切的相关性。我们可以设想ALDH1A2在癌组织中的低表达可能导致ATRA合成的减少, 进而通过MMP2的高表达来水解结肠癌细胞浸润扩散过程中的一道天然屏障-基底膜, 导致结肠癌细胞侵袭转移能力大大加强, 同时结肠癌中E-cad-

herin的低表达, 细胞间黏附力下降, 肿瘤细胞易于从肿瘤团块上脱落下来, 进入浸润转移进程, 为我们进一步的研究奠定了基础。

4 参考文献

- Li HY, Ge X, Huang GM, Li KY, Zhao JQ, Yu XM, Bi WS, Wang YL. GSTP1, ERCC1 and ERCC2 polymorphisms, expression and clinical outcome of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3465-3469 [PMID: 22994779]
- Wen F, Zhou Y, Wang W, Hu QC, Liu YT, Zhang PF, Du ZD, Dai J, Li Q. Ca/Mg infusions for the prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2013; 24: 171-178 [PMID: 22898039 DOI: 10.1093/annonc/mds211]
- Vasilicou V, Nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2005; 2: 138-143 [PMID: 16004729]
- Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KE, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 2010; 5: e10277 [PMID: 20422001 DOI: 10.1371/journal.pone.0010277]
- Xiao T, Shoeb M, Siddiqui MS, Zhang M, Ramana KV, Srivastava SK, Vasilicou V, Ansari NH. Molecular cloning and oxidative modification of human lens ALDH1A1: implication in impaired detoxification of lipid aldehydes. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72: 577-584 [PMID: 19296407 DOI: 10.1080/15287390802706371]
- Seritrakul P, Samarat E, Lama TT, Gibert Y, Laudet V, Jackman WR. Retinoic acid expands the evolutionarily reduced dentition of zebrafish. *FASEB J* 2012; 26: 5014-5024 [PMID: 22942074 DOI: 10.1096/fj.12-209304]
- Yanagawa Y, Chen JC, Hsu LC, Yoshida A. The transcriptional regulation of human aldehyde dehydrogenase I gene. The structural and functional analysis of the promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 17521-17527 [PMID: 7615557 DOI: 10.1074/jbc.270.29.17521]
- Patel M, Lu L, Zander DS, Sreerama L, Coco D, Moreb JS. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer* 2008; 59: 340-349 [PMID: 17920722 DOI: 10.1016/j.lungcan.2007.08.033]
- Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 3382-3389 [PMID: 19336570 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4418]
- Dahiya A, Thavendiranathan P, Thomas JD, Flamm SD. Apical hypertrophic cardiomyopathy with and without aneurysm. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1709 [PMID: 23079118 DOI: 10.1016/j.jacc.2012.05.055]
- Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, Liu J. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol* 2009; 22: 817-823 [PMID: 19329942]

■创新盘点
经检索查新发现
国内有ALDH1A2
基因影响膀胱癌
细胞株的生物学
行为研究, 但均未
涉及ALDH1A2基
因在结肠癌组织
中的表达。通过本
研究结果, 可以设
想ALDH1A2在癌
组织中的低表达
可能导致ATRA
合成的减少, 进
而影响到MMP2
及E-cadherin的
表达, 通过上调
MMP2的表达来
水解结肠癌细胞
浸润扩散过程
中的一道天然屏障-
基底膜, 导致结
肠癌细胞侵袭转
移能力大大加强,
同时下调结肠癌
中E-cadherin的表
达, 引起细胞间黏
附力下降, 使结
肠癌细胞易于从肿
瘤团块上脱落下
来, 进入浸润转移
进程。

■ 同行评价

本文实验设计科学、合理，数据完整，分析问题逻辑性强，结合临床工作，有一定的指导意义。

- 12 Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 45-55 [PMID: 20028757 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1630]
- 13 杨万广, 张谢夫, 张善峰. ALDH1A2基因过表达对结肠癌LoVo细胞增殖、侵袭及黏附能力的影响. 中华实验外科杂志 2012; 29: 1747-1749
- 14 许天文, 陈道达, 陈剑英, 郑勇斌, 连彦军. 血管内皮生长因子C在大肠癌中的表达及其与淋巴结转移的关系. 中华实验外科杂志 2005; 22: 598-599
- 15 肖胜军, 张小玲, 容明智, 方宇, 曾思恩. 转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin在结肠腺癌中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3756-3759

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广全国各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传递、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。