

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.013

涎腺肿瘤中半乳糖凝集素-3 与 Wnt 通路蛋白的相关性研究

杨春蓉, 陈 路, 胡余昌, 罗代珍, 宋子华

(三峡大学病理学研究所, 宜昌 443003)

【摘 要】目的: 研究半乳糖凝集素-3(Galectin-3)与 Wnt 通路相关蛋白 β -链蛋白(β -catenin)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)和 E-钙黏附蛋白(E-cadherin)在涎腺肿瘤中表达, 探讨它们之间的相关性及临床意义。方法: 分析本病理研究所收集的涎腺恶性肿瘤标本, 进行 HE 染色, 光镜观察, 以涎腺慢性炎症(38 例)作为阴性对照, 应用免疫组化(S-P 法)检测 Galectin-3 与 β -catenin、E-cadherin、Cyclin D1 在 107 例涎腺肿瘤中(58 例恶性肿瘤, 49 例良性肿瘤)的表达情况及相关性。结果: 在涎腺恶性肿瘤组织中, Galectin-3 蛋白的阳性表达率为 72.4%(42/58), 显著高于在涎腺良性肿瘤组织中的表达率 42.9%(21/49)($P<0.05$); 涎腺恶性肿瘤组织中 β -catenin、Cyclin D1 蛋白的阳性表达率分别为 75.9%(44/58)和 81%(47/58), 高于在涎腺良性肿瘤组织中的表达率 38.8%(19/49)和 59.2%(29/49)($P<0.05$), 差异有统计学意义。Galectin-3 与 β -catenin 两者的蛋白表达呈正相关($r=0.313$, $P<0.05$)。结论: Galectin-3 可能与 Wnt 信号通路密切相关, 这为临床针对 Wnt 通路的抗肿瘤治疗提供了新的思路。

【关键词】半乳糖凝集素-3; 涎腺肿瘤; 免疫组化; β -链蛋白

【中国图书分类法分类号】R737.11

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-20

Correlation between Galectin-3 and Wnt pathway-related protein in salivary gland tumor

YANG Chunrong, CHEN Lu, HU Yuchang, LUO Daizhen, SONG Zihua

(Institute of Pathology, China Three Gorges University)

【Abstract】Objective: To study the expression of Galectin-3, Wnt pathway related protein(β -catenin, Cyclin D1 and E-cadherin) in salivary gland tumors and to explore the relationship and the clinical significance among them. Methods: The benign and malignant tumors of salivary gland specimens were observed under HE staining and light microscopy. Immunohistochemical staining(S-P method) was applied to detect the expression and correlation of Galectin-3, β -catenin, E-cadherin and Cyclin D1 in 107 cases of salivary gland tumors(58 cases of malignant tumors and 49 cases of benign tumors) and 38 cases of chronic inflammation of salivary glands were ended as negative control. Results: The positive rate of Galectin-3 was 72.4%(42/58) in malignant salivary tumor, higher than that in benign salivary tumor($P<0.05$). The positive rates of β -catenin and Cyclin D1 protein were higher in malignant salivary tumor[75.9%(44/58) and 81%(47/58)] than in benign salivary tumor($P<0.05$). There were significant positive correlations between Galectin-3 and β -catenin($r=0.313$, $P<0.05$). Conclusions: Galectin-3, Wnt pathway related protein β -catenin and Cyclin D1 are correlated with each other, which may provide new sight in the treatment of salivary gland tumor.

【Key words】Galectin-3; salivary gland tumor; immunohistochemistry; β -catenin

涎腺肿瘤多数为良性, 全球的年发病率为(0.4~13.5)/10万人口, 恶性肿瘤的发病率为(0.4~2.6)/10万人口。所有原发性、上皮性涎腺肿瘤的 64%~80% 发生在腮腺, 7%~11% 发生在颌下腺, 发生在舌下腺者占 1% 以下, 9%~23% 发生在小涎腺, 良性肿瘤占 54%~79%, 恶性肿瘤占 21%~46%, 高峰发病年龄多数在 50~70 岁^[1]。有关涎腺肿瘤的发生机理, 目前尚

无统一的认识, 弄清这些肿瘤的分子及细胞生物机制对寻找新的治疗方法将起重要作用。 β -catenin 是 β -catenin/Wnt 通路的正向调节因素, 大部分与胞膜上的细胞黏附分子 E-cadherin 结合形成复合体, 而一旦通路被不恰当的激活后, β -catenin 不能降解, 便在胞浆中蓄积, 然后进入核内与 T 细胞转录因子(T cells transcription factor, TCF)结合启动下游靶基因如 Cyclin D1 的转录, 对细胞的增殖分化进行调节^[2]。研究表明, Galectin-3 是一种多功能半乳糖蛋白, 在多种正常细胞中均表达, 同时也表达于一些

作者介绍: 杨春蓉(1983-), 女, 住院医师, 硕士,

研究方向: 肿瘤病理-乳腺癌生物学行为方面的研究。

通信作者: 胡余昌, 男, 副主任医师, Email: huyuchang@hotmail.com。

恶性肿瘤,如甲状腺癌、前列腺癌和胃癌等,研究显示许多恶性肿瘤的发生进展与 Galectin-3 的过度表达有关^[3],近来,研究证明 Galectin-3 蛋白可能是 β -catenin/Wnt 通路的一种重要介质。而且核 Galectin-3 的表达与细胞增殖、激活 Cyclin D1 的表达密切相关^[4]。因此,本实验旨在研究涎腺肿瘤中 Galectin-3 的表达与 Wnt 通路相关蛋白 β -catenin、Cyclin D1 及 E-cadherin 表达的关系,探讨 Galectin-3 在涎腺肿瘤发生中的作用及可能的机制,为临床针对 Wnt 通路的抗肿瘤治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 病史资料

组织标本选自 2000 年-2010 年三峡大学病理学研究所的存档标本,且资料详实。患者年龄 20~80 岁,平均 50 岁。按 WHO 2003 年涎腺肿瘤组织病理类型新分类标准分为:涎腺恶性肿瘤 58 例(其中包括腺样囊性癌 32 例,黏液表皮样癌 17 例,腺泡细胞癌 9 例),良性肿瘤 49 例(其中包括多形性腺瘤 32 例,基底细胞腺瘤 17 例),另以涎腺慢性炎症 38 例作为阴性对照。所有标本均选自术前无放疗、化疗的组织且所有病例临床资料完整,均由 3 位高年资的病理医师双盲确诊。

1.2 主要试剂和仪器

鼠抗人 Galectin-3、鼠抗人 β -catenin、鼠抗人 Cyclin D1、鼠抗人 E-cadherin 即用型单克隆抗体、免疫组化 S-P 法检测试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 实验方法

全部石蜡包埋组织连续 4 μ m 切片,常规脱蜡,进行免疫组织化学 S-P 法染色,按试剂盒说明书进行 DAB 显色。每批次均以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

阳性细胞显棕褐色颗粒,Galectin-3、 β -catenin 和 E-cadherin 阳性表达定位于细胞浆,以背景清晰,细胞浆内出现明显棕黄色颗粒为阳性反应;Cyclin D1 阳性表达定位于细胞核,以背景清晰,细胞核内出现明显棕黄色颗粒为阳性反应。切片在 200 倍镜下取 5 个视野,计算阳性细胞与总细胞数的比值。阴性(-):小于 5%,肿瘤细胞弱棕黄色染色;阳性(+):5%~25%,肿瘤细胞弱棕黄色染色;阳性(++):25%~75%,肿瘤细胞呈弱到中棕黄染色;阳性(+++):大于 75%,肿瘤细胞呈中到强棕黄染色。

1.5 统计学分析

实验数据用 SPSS 13.0 统计软件分析,统计学方法选用 χ^2 检验及 Spearman 等级相关分析, $P < 0.05$ 定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Galectin-3 在涎腺肿瘤中的表达

Galectin-3 在涎腺恶性肿瘤中的阳性率为 72.4%(42/58),主要在癌细胞的胞浆表达,部分癌细胞出现核表达(图 1),高于在涎腺良性肿瘤(42.9%,21/49)和涎腺慢性炎症(29%,11/38)中的表达,涎腺恶性肿瘤组 Galectin-3 阳性率显著高于涎腺良性病变组($P < 0.05$);涎腺恶性肿瘤中 Galectin-3 大多呈高表达和中等表达,而涎腺良性病变组普遍呈低表达或阴性表达(图 2,表 1~3)。

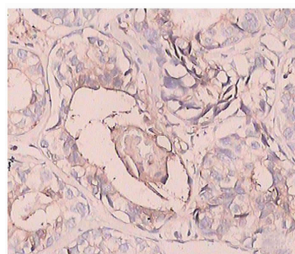


图 1 Galectin-3 在涎腺恶性肿瘤(腺样囊性癌)中的表达 (SP,400 $\times$)

Fig.1 Expressions of Galectin-3 in malignant tumor of salivary gland(adenoid cystic carcinoma) (SP,400 $\times$)

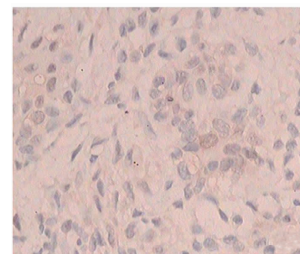


图 2 Galectin-3 在涎腺良性肿瘤(多形性腺瘤)中的表达 (SP,400 $\times$)

Fig.2 Expressions of Galectin-3 in benign tumor of salivary gland (pleomorphic adenoma) (SP,400 $\times$)

2.2 β -catenin、E-cadherin 及 Cyclin D1 在涎腺肿瘤中的表达

在涎腺良性肿瘤中 β -catenin 表达定位于细胞膜,呈黄色网格状分布,阳性表达率为 38.8%(19/49)(图 3),而在涎腺恶性肿瘤细胞膜中的表达减弱,向细胞浆和细胞核转位,出现细胞浆和细胞核的异常表达,阳性表达率为 75.9%(44/58)(图 4);E-cadherin 大部分表达于胞膜,少部分表达于胞浆,相对于涎腺良性肿瘤,E-cadherin 在恶性肿瘤的表达没有明显差异($P > 0.05$),但均高于在涎腺慢性炎症性疾病中的表达($P < 0.05$);cyclin D1 表达于胞核,在涎腺恶性肿瘤细胞中呈现高表达,阳性表达率为 81%(47/58)。按涎腺炎症细胞 $\rightarrow$ 涎腺良性肿瘤 $\rightarrow$ 涎腺恶性肿瘤的顺序, β -catenin 和 E-cadherin 和 Cyclin D1 表达异常始于涎腺良性肿瘤(表 1~3)。

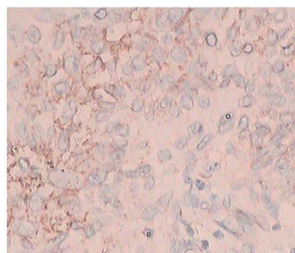


图 3 β -catenin 在涎腺恶性肿瘤(腺样囊性癌)中的表达 (SP,400 $\times$)

Fig.3 Expressions of β -catenin in malignant tumor of salivary gland (adenoid cystic carcinoma) (SP,400 $\times$)

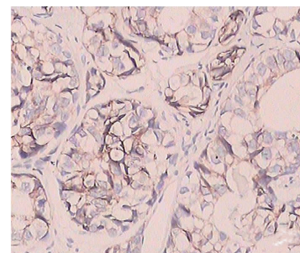


图 4 β -catenin 在涎腺良性肿瘤(多形性腺瘤)中的表达 (SP,400 $\times$)

Fig.4 Expressions of β -catenin in benign tumor of salivary gland (pleomorphic adenoma) (SP,400 $\times$)

表 1 涎腺良、恶性肿瘤中 β -catenin、E-cadherin 及 Cyclin D1 表达比较 ($n, \%$)

Tab.1 Expressions of β -catenin,E-cadherin and Cyclin D1 in benign and malignant salivary gland tumors ($n, \%$)									
组织学类型	例数	Galectin-3		β -catenin		E-cadherin		Cyclin D1	
	107	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
涎腺恶性肿瘤	58	42	72.4	44	75.9	41	70.7	47	81.0
涎腺良性肿瘤	49	21	42.9	19	38.8	34	69.4	29	59.2
χ^2 值		9.584		15.089		0.021		6.163	
P 值		0.002		0.001		0.883		0.013	

表 2 涎腺恶性肿瘤与慢性炎症中 β -catenin、E-cadherin 及 Cyclin D1 表达比较 ($n, \%$)

Tab.2 Expressions of β -catenin,E-cadherin and Cyclin D1 in malignant tumors and chronic inflammation of salivary gland ($n, \%$)									
组织学类型	例数	Galectin-3		β -catenin		E-cadherin		Cyclin D1	
	96	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
涎腺恶性肿瘤	58	42	72.4	44	75.9	41	70.7	47	81.0
涎腺良性肿瘤	38	11	29.0	8	21.0	17	44.7	4	10.5
χ^2 值		17.541		27.780		6.466		45.833	
P 值		0.000		0.000		0.011		0.000	

表 3 涎腺良性肿瘤与慢性炎症中 β -catenin、E-cadherin 及 Cyclin D1 表达比较 ($n, \%$)

Tab.3 Expressions of β -catenin, E-cadherin and Cyclin D1 in benign tumors and chronic inflammation of salivary gland ($n, \%$)									
组织学类型	例数	Galectin-3		β -catenin		E-cadherin		Cyclin D1	
	87	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
涎腺恶性肿瘤	49	21	42.9	19	38.8	34	69.4	29	59.2
涎腺良性肿瘤	38	11	29.0	8	21.0	17	44.7	4	10.5
χ^2 值		1.781		3.141		5.362		21.522	
P 值		0.182		0.076		0.021		0.000	

2.3 涎腺肿瘤中 Galectin-3 与 β -catenin 表达的相关性

Spearman 相关分析示 Galectin-3 与 β -catenin 表达呈正相关($P<0.05$),相关系数为 0.313,见表 4。

表 4 涎腺肿瘤中 Galectin-3 与 β -catenin 表达的相关性
Tab.4 Correlations of expressions of Galectin-3 and β -catenin in salivary gland tumors

β -catenin	n	Galectin-3				r_s 值	P 值
		-	+	++	+++		
-	14	10	1	2	1	0.313	0.017
+	4	1	1	1	1		
++	18	4	2	5	7		
+++	22	1	7	2	12		
总数	58	16	11	10	21		

3 讨 论

正常成熟细胞中 Wnt 通路只是处于维持细胞正常活动所必需的状态,胞浆内的 β -catenin 大部分与细胞膜上的 E-cadherin 结合,少部分与胞浆内 APC 蛋白、GSK-3 β 及轴蛋白结合,三者结合形成复合体后,GSK-3 β 通过磷酸化可降解 β -catenin,因

而胞浆内游离的 β -catenin 水平极低,不能进入细胞核调控相应基因表达。肿瘤细胞中多种因素如结肠腺瘤性息肉病、Axin 及 β -catenin 基因本身突变均可导致 Wnt 信号传导途径异常激活, β -catenin 在胞浆内大量积聚,达到一定浓度后进入核内与 TCF/Lef 结合,启动下游靶基因 C-myc、CyclinD1 等的转录,从而抑制凋亡或促进细胞增值,诱发肿瘤形成。E-cad/catenin 复合体介导同型细胞间的粘附,对上皮极性、完整性的维持起重要作用^[5-8]。而 β -catenin 是 Wnt 通路的正向调节因素,是 Wnt 信号通路中的关键成员。本研究中,58 例涎腺恶性肿瘤中 β -catenin 的高表达率达 75.9%,明显高于涎腺炎症性疾病(21%)及良性肿瘤(38.8%),从涎腺炎症性疾病到良性肿瘤向恶性肿瘤的改变过程中, β -catenin 异常表达呈渐增趋势,提示 β -catenin 异常增高表达的是涎腺肿瘤发展进程中的早期事件,从涎腺良性肿瘤开始就有增高的变化。本研究实验数据显示,58 例涎腺恶性肿瘤中 β -catenin 表达的增高,同时也激活了 Wnt 信号传导通路下游相关基因

Cyclin D1 的转录(蛋白表达阳性率达 81%),从而使细胞增殖失控,促进肿瘤的发生与进展。然而,与细胞粘附密切相关的 E-cadherin,在涎腺良恶性肿瘤中的表达没有明显差异(此点与以往报道略有不符^[9],具体原因有待进一步研究),但是均高于涎腺慢性炎症,故推测涎腺良性肿瘤的过程中细胞间的粘附能力就发生了变化,而这种变化一直持续到涎腺恶性肿瘤。在涎腺良性肿瘤中,以上 3 种蛋白均比涎腺炎性组织细胞中的表达明显增高,进一步证实了, Wnt 信号传导通路的异常激活是涎腺肿瘤发生发展过程中的早期事件,提示在涎腺肿瘤的早期阶段,对该通路蛋白进行特异性干扰,对预防恶性肿瘤的发生和肿瘤治疗均提供了新的思路。

Galectin-3 是一种 β -半乳糖苷结合蛋白, Galectin-3 具有促进癌细胞与周围基质的粘附、抗凋亡、促进肿瘤微血管发生等作用;近年来还发现 Galectin-3 是 Wnt/ β -catenin 信号途径的关键调节因子^[10-12],其与 β -catenin、TCF-4 组成三元复合物,共同启动下游靶基因(如: Cyclin D1, C-myc)的转录,从而促进细胞增殖;同时也观察到在涎腺恶性肿瘤细胞中有 Galectin-3 蛋白表达(高达 72.4%),明显高于涎腺良性肿瘤细胞(阳性率 42.9%)和涎腺炎性组织细胞(阳性率 28.9%),并且和 β -catenin 表达呈正相关,提示 Galectin-3 有可能参与 Wnt/ β -catenin 信号途径,且与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白共同作用,在肿瘤的发生发展过程中起着相当重要的作用,在涎腺恶性肿瘤中 β -catenin、Galectin-3 同时高表达,并通过信号转导激活 Wnt 信号通路下游与细胞增殖密切相关的基因 Cyclin D1 的表达(本实验中高表达 81%),通过上述多种途径共同作用促进肿瘤演进和转移。

因此,如果能设计针对 Wnt 信号通路或者 Galectin-3 基因表达的抑制因子,在涎腺肿瘤的早期阶段进行干预,从基因水平降低细胞的生长及侵袭转移能力,是否会达到抑制涎腺肿瘤的发生及进展的目的,有待进一步研究。这同时也为涎腺肿瘤的临床预防和治疗提供了新的理论依据,为肿瘤的基因治疗开辟了新的途径,值得我们深入研究下去。

参 考 文 献

- [1] Barnes L, John W E, Reichart P, et al. Pathology & genetics head and neck tumours[M]. Oxford: Oxford University Press, 2009; 248-249.
- [2] Nejak-Bowen K N, Monga S P. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1): 44-58.
- [3] Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis[J]. Apoptosis, 2005, 10(2): 267-275.
- [4] Sundblad V, Croci D O, Rabinovich G A. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues[J]. Histol Histopathol, 2011, 26(2): 247-265.
- [5] Ferrazzo K L, Neto M M, dos Santos E, et al. Differential expression of galectin-3, beta-catenin, and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary glands[J]. J Oral Pathol Med, 2009, 38(9): 701-707.
- [6] 王菲莉, 郭翔, 袁太泽, 等. Wnt-1、 β -catenin 在鼻咽癌组织中的表达及其临床意义[J]. 癌症, 2009, 28(1): 91-95.
- [7] Wang F L, Guo X, Yuan T Z, et al. Wnt-1, β -catenin expression in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Cancer, 2009, 28(1): 91-95.
- [8] Queimado L, Obeso D, Hatfield M D, et al. Dysregulation of Wnt pathway components in human salivary gland tumors[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 134(1): 94-101.
- [9] van der Schroeff M P, Terhaard C H, Wieringa M H, et al. Cytology and histology have limited added value in prognostic models for salivary gland carcinomas[J]. Oral Oncol, 2010, 46(9): 662-666.
- [10] 彭辉, 钟雪云, 刘坤平, 等. 应用组织芯片检测食管鳞状细胞癌中 APC[J]. 癌症, 2009, 28(1): 49-53.
- [11] Peng H, Zhong X Y, Liu K P, et al. Tissue microarray detection of esophageal squamous cell carcinoma of the APC[J]. Chinese Journal of Cancer, 2009, 28(1): 49-53.
- [12] Weinberger P M, Adam B L, Gourin C G, et al. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt pathway activation in thyroid carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133(5): 503-510.
- [13] Song S, Mazurek N, Liu C, et al. Galectin-3 mediates nuclear beta-catenin accumulation and Wnt signaling in human colon cancer cells by regulation of glycogen synthase kinase-3beta activity[J]. Cancer Res, 2009, 69(4): 1343-1349.
- [14] Abdel-Aziz H O, Murai Y, Takasaki I, et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to NNK-induced lung tumorigenesis: an oligonucleotide microarray study[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2008, 134(7): 777-788.

(责任编辑:唐秋姗)