

CLDN1 在食管鳞癌中的表达及其分布 异常在食管癌发生中的作用*

张大伟¹, 吴 剑², 任德莲³, 李 俊¹, 胡 智¹, 戴天阳^{1△}

1. 西南医科大学附属医院 心胸外科 (泸州 646000); 2. 西南医科大学附属医院 医学实验中心 (泸州 646000);

3. 西南医科大学 免疫学教研室 (泸州 646000)

【摘要】 目的 检测紧密连接蛋白 CLDN1 在食管鳞癌组织中的表达, 研究 CLDN1 对食管鳞癌 TE-11 细胞生物学功能的影响。**方法** 应用免疫组化检测食管鳞癌组织芯片(含 30 例食管鳞癌组织、30 例癌旁组织及 30 例食管远端组织)中 CLDN1 的表达, 比较食管癌组织及癌旁组织中 CLDN1 的表达差异; 应用 Western blot 检测 15 例食管鳞癌患者术后组织和食管癌细胞株 CLDN1 的表达, 分析 CLDN1 在肿瘤细胞及正常食管上皮细胞内的分布; 构建包含 CLDN1 shRNA 序列的慢病毒并转染 TE-11 细胞, 采用 Western blot 和流式细胞术检测 CLDN1 干扰效果及细胞内分布。通过 CCK-8 检测细胞增殖能力; Transwell 检测细胞侵袭迁移能力; 采用 Rhodamine phalloidin 染色 TE-11 细胞骨架并在激光共聚焦显微镜下观察细胞肌丝变化。**结果** 免疫组化结果显示 CLDN1 在癌组织及癌旁组织中阳性表达率无明显差异($P>0.05$), 但在高分化和中分化的食管鳞癌组织 CLDN1 呈强阳性表达, 低分化食管鳞癌组织 CLDN1 表达明显降低; Western blot 检测 CLDN1 在 TE-11 细胞中主要分布在细胞核内; 干扰 CLDN1 表达后, TE-11 细胞增殖明显减慢, 侵袭及迁移能力降低。激光共聚焦显微镜显示下调 CLDN1 表达后, TE-11 细胞骨架蛋白荧光强度减弱, 细胞表面肌丝减少。**结论** CLDN1 在食管鳞癌组织中的表达与其分化程度相关, 在 TE-11 中具有促癌作用, 其表达及分布异常与肿瘤的发生发展密切相关, 有望作为食管鳞癌的重要生物标志物。

【关键词】 CLDN1 食管鳞癌 肿瘤发生

Expression of CLDN1 and Its Nuclear Distribution in Esophageal Squamous Carcinoma ZHANG Da-wei¹, WU Jian², REN De-lian³, LI Jun¹, HU Zhi¹, DAI Tian-yang^{1△}. 1. Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Medical Experimental Center, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 3. Department of Immunology, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

△ Corresponding author, E-mail: daitianyang12345@163.com

【Abstract】 Objective To determine the expression of tight junction protein CLDN1 in esophageal squamous carcinoma (ESCC) and to explore the effect of CLDN1 on the biological function of ESCC TE-11 cells. **Methods** This study collected 30 ESCC tissues, 30 adjacent normal tissues and 30 distal esophageal tissues to detected the expression of CLDN1 in tissue microarray by immunohistochemistry method. Western blot was employed to determine the expression of CLDN1 in 15 ESCC tissues and cell lines, and then the distribution of CLDN1 in tumor cells and normal esophageal epithelial cells was analyzed. Lentivirus containing the sequence of CLDN1 shRNA was constructed and transfected into TE-11 cells, the transfection efficiency and intracellular distribution was determined by Western blot and flow cytometry. Cell proliferation was detected by CCK-8, the invasion and migration ability of cells was determined with Transwell. Cytoskeleton changes was observed by laser scanning confocal microscope. **Results** Immunohistochemical results showed no significant difference between the cancer tissues and adjacent tissues in term of the positive rate of CLDN1 ($P>0.05$). CLDN1 was highly expressed in highly and moderately differentiated ESCC tissues, but its expression was significantly decreased in poorly differentiated cancer tissues. Western blot revealed that CLDN1 was mainly distributed in the nucleus of TE-11 cells. The proliferation of TE-11 cells, as well as invasion and migration ability, were declined obviously when the expression of CLDN1 being down-regulated, while the cytoskeleton protein fluorescence intensity deceased. **Conclusion** The expression of CLDN1 in ESCC tissue is associated with its differentiation and may promote carcinogenesis in TE-11 cells.

【Key words】 CLDN1 Esophageal squamous carcinoma Tumorigenesis

* 四川省科技厅基金项目(No. 14JC0041)资助

△ 通信作者, E-mail: daitianyang12345@163.com

细胞间紧密连接存在于上皮细胞与内皮细胞间,具有维持细胞极性和屏障的功能。Claudins 是上皮细胞间紧密连接结构蛋白,参与紧密连接的构成^[1]。现有研究表明,Claudins 表达异常与肿瘤的发生、发展关系密切^[1-4]。CLDN1 是 Claudin 家族重要成员之一,在多数肿瘤中具有促癌作用,如乳腺癌^[5]、肝癌^[6]、结肠癌^[7]等。而在部分肿瘤中发挥抑癌功能,如胃癌^[8]、肺癌^[9]。然而,CLDN1 在食管鳞癌中的表达和作用目前尚不明确。本研究应用免疫组化技术检测食管鳞癌组织及癌旁组织中 CLDN1 的表达,通过免疫印迹和流式细胞术分析 CLDN1 在食管鳞癌细胞中的分布,并研究 CLDN1 对 TE-11 细胞增殖、侵袭及迁移、细胞骨架的影响,旨在探索 CLDN1 在食管癌中的表达及在食管癌细胞中的生物学功能,为其生物学行为作用机制的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

1.1.1 组织标本 食管鳞癌组织芯片购于上海芯超生物科技公司(阵列编号:HESoS090PG01 芯片批号:XT15-024),集成了 30 例患者的共 90 例标本,其中包括 30 例食管鳞癌组织,30 例食管癌旁组织,30 例食管远端组织;食管鳞癌高分化 11 例,中分化 12 例,低分化 7 例;男 23 例,女 7 例;年龄 44~74 岁,平均 55.6 岁。另收集 2016 年 3~6 月西南医科大学附属医院手术后食管癌患者标本 15 例,其中高分化 7 例,中分化 5 例,低分化 3 例。男 11 例,女 4 例;年龄 42~73 岁,平均 58.37 岁。标本取出后用手术刀片分别在肿瘤组织及相应的癌旁组织(距食管鳞癌组织>5 cm)取材,经液氮速冻后置于-80℃冰箱低温保存。组织芯片用于免疫组化检测癌组织与癌旁组织 CLDN1 表达的差异性,手术标本用于提取组织蛋白,以备 Western blot 定量检测 CLDN1 表达。

1.1.2 细胞株 正常人食管上皮细胞 HEEC (Sciencell, 美国);食管鳞癌细胞株 Eca109、Eca9706、TE1、TE10、TE11、Kyse150 为本中心实验室保存。正常食管上皮细胞采用无血清上皮细胞培养基,食管癌细胞株采用 RPMI1640 培养基(含有 10%FBS),在含体积分数 5%CO₂、37℃饱和湿度的细胞培养箱中培养。以上细胞株用于筛选高表达 CLDN1 的细胞株。

1.1.3 主要试剂和仪器 SP 免疫组化试剂盒(中

杉金桥,北京),Lv-GFP-Puro-shR-CLDN1 载体由汉恒生物公司构建,包含针对 CLDN1 mRNA 的 shRNA 序列:GCCACAGCATGGTATGGCAAT;Polybrene(汉恒生物公司);MinuteTM 总膜和质膜蛋白分离试剂盒(Inventbiotech 美国);胎牛血清和 RPMI1640 培养基(Hyclone);无血清上皮细胞培养基-2(Sciencell, 美国);嘌呤霉素 (ABI, 美国);抗 GAPDH(碧云天公司);抗 CLDN1 (Abcam 英国);羊抗兔和羊抗鼠 HRP-IgG (碧云天公司);多聚 ADP 核糖聚合酶抗体(抗 PARP, 碧云天公司);抗 β -tublin(中杉金桥,北京);抗 E-cadherin (CST, 美国);APC 标记的 Anti-hCLDN1 单克隆抗体(优宁维生物有限公司 上海);CCK-8 试剂盒(碧云天公司);Transwell 板(康宁公司,美国);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天公司);Rhodamine phalloidin(Cytoskeleton, 美国);Fusion Solo 系列化学发光成像系统(VILBER, 法国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 SP 法检测组织芯片 CLDN1 表达 应用免疫组化 SP 法,按试剂盒说明书操作对食管鳞癌组织芯片进行染色。免疫组化结果判断:任选择 5 个高倍视野($\times 200$)进行观察,根据标本染色强度和阳性细胞百分率对 CLDN1 表达进行评分;染色强度评分:不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;计算视野下阳性细胞的百分率,并按以下标准评分: $\leq 5\%$ 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~100% 为 3 分,将每张切片平均染色强度得分与平均阳性细胞百分率得分各自相乘为其最后得分:0~1 分为阴性(-),2~4 分为弱阳性(+),5~9 分为强阳性(++)。并以 +~++ 计算阳性率。结果在双盲法下判定,每张切片由两名病理科医生分别判断。

1.2.2 Western blot 检测手术标本 CLDN1 表达 取新鲜手术标本,提取食管鳞癌术后患者癌组织及癌旁组织蛋白,应用 Western blot 检测癌组织及癌旁组织 CLDN1 的表达。CLDN1 抗体稀释比例为 1:3 000,以 GAPDH(1:3 000)作为内参照,曝光处理后进行灰度值计算,以 CLDN1 和 GAPDH 灰度值比值作为 CLDN1 蛋白相对表达量。

1.2.3 CLDN1 高表达细胞株的筛选 使用 Western blot 检测正常食管上皮细胞和 Eca109、Eca9706、Kyse150、TE-1、TE-10、TE-11 食管鳞癌细胞系中 CLDN1 的表达,筛选 CLDN1 高表达细胞株进行后续实验。方法同 1.2.2。

1.2.4 CLDN1 在 TE-11 细胞内的分布的检测

流式细胞术检测 CLDN1 在 TE-11 及正常食管上皮细胞内的分布:取 TE-11 细胞株和正常食管上皮细胞 HEEC, PBS 洗涤细胞 2 次, 2 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞沉淀, 加入 500 μ L PBS 重悬沉淀, 加入 5 μ L APC 标记的 Anti-hCLDN1 单克隆抗体) 室温孵育 15 min, 上机检测。

Western blot: 取 TE-11 细胞株和正常食管上皮细胞 HEEC 标本, 应用总膜和质膜蛋白分离试剂盒按说明书操作, 分别提取细胞膜、细胞质、细胞核蛋白, 以抗 PARP (1 : 1 000)、抗 β -tublin (1 : 3 000)、抗 E-cadherin (1 : 1 000) 分别标记胞核蛋白、胞质蛋白、胞膜蛋白, 定性比较 CLDN1 在胞膜蛋白、胞质蛋白、胞核蛋白中的表达水平。

1.2.5 慢病毒质粒转染筛选稳定沉默 CLDN1 的 TE-11 细胞 根据已有研究^[10], 确立 1 对 shRNA, 由汉恒生物公司构建靶向针对 CLDN1 基因的 shRNA 重组慢病毒。转染前 1 d, 将 TE-11 细胞接种于 6 孔板中, 细胞密度为 2×10^5 /孔。加入 1 mL RPMI1640 培养基 (含 10% FBS) 进行培养, 加入 GFP-Puro-shR-CLDN1 慢病毒 (MOI = 20) 和 Polybrene (1 μ g/mL) 共培养 12 h, 更换新鲜培养基, 以空载体组为对照组, 命名为 shR-NC, 干扰组命名为 shR-CLDN1。转染 72 h 后加入含 0.2 μ g/mL 嘌呤霉素的 RPMI1640 培养基培养, 14 d 后收集筛选细胞, 通过荧光显微镜观察转染效率。Western blot 检测筛选后的细胞中 CLDN1 蛋白的表达, 方法同 1.2.2。

1.2.6 CCK-8 检测细胞增殖能力 取干扰组及对照组对数生长期细胞, 用培养基制成单细胞悬液, 每孔加入 100 μ L 共 2 000 个细胞接种于 96 孔培养板, 置于培养箱孵育。分别在接种后 24、48、72 h 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度 (OD) 值。

1.2.7 Transwell 检测细胞侵袭、迁移能力 迁移实验: 收集对数生长期的干扰组及对照组细胞, Transwell 上室加入各组细胞 10^5 个, 200 μ L 不含血清培养基, 下室加入 500 μ L 含 FBS 的细胞培养基, 在含体积分数 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h。棉签擦去上室上面的细胞, 倒置风干, 24 孔板中加入等量吉姆萨染液, 将小室置于其中, 37 $^{\circ}$ C 10 min 后取出, PBS 清洗。200 倍显微镜下随机取 4 个视野, 照相, 计算平均每个高倍视野

下的穿膜细胞数。

侵袭实验: 除用 Matrigel 胶模仿基底膜检测细胞侵袭能力外, 其余步骤同迁移实验。

1.2.8 激光共聚焦观察 CLDN-1 对细胞骨架的影响 于培养皿上培养干扰组及对照组细胞至半丰度, 移除培养基, 37 $^{\circ}$ C 下利用 PBS 轻轻洗涤培养细胞一次, 体积分数 4% 多聚甲醛固定液室温固定细胞 10 min。PBS 室温洗涤细胞 30 s 后加入 0.5% TritonX-100 室温透化细胞 5 min。PBS 室温洗涤细胞 30 s, 于潮湿的环境下加入 200 μ L 100 nmol/L Rhodamine phalloidin, 室温避光孵育 30 min。PBS 洗涤培养皿 3 次, 200 μ L 100 nmol/L DAPI 复染 DNA 30 s, 4 $^{\circ}$ C 避光保存上述培养皿, 于激光共聚焦显微镜下观察细胞骨架。

1.2.9 统计学方法 采用单因素方差分析, 比较两组之间的差异采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLDN1 在食管鳞癌组织及细胞株中的表达

组织芯片免疫组化结果显示, 食管鳞癌组织 CLDN1 阳性表达率为 83% (25/30), 癌旁组织阳性表达率为 86% (52/60), 食管鳞癌组织 CLDN1 阳性表达率和癌旁组织相比差异并无统计学意义 ($P > 0.05$); 高分化和中分化的食管鳞癌组织 CLDN1 呈强阳性表达, 而低分化食管鳞癌组织 CLDN1 呈弱阳性, 提示表达明显降低。此外, 我们发现癌旁组织中 CLDN1 主要表达在细胞膜上; 而在食管鳞癌组织中, CLDN1 主要表达在细胞质和细胞核中。Western blot 检测术后分化程度不同的癌组织表明, 低分化食管鳞癌组织中 CLDN1 表达下调, 而高分化和中分化食管鳞癌组织中 CLDN1 表达上调 (图 1)。在细胞水平, 我们发现食管鳞癌细胞株 CLDN1 在 TE-11 中表达升高, 在 EC109、EC9706、KYSE150、TE-1、TE-10 中表达降低 (图 2)。TE-11 在这些细胞株中 CLDN1 表达最高; 因此我们选择 TE-11 作为 CLDN1 在肿瘤细胞中生物学功能的研究对象, 进行后续实验。

2.2 CLDN1 在食管癌细胞及正常食管上皮细胞的分布差异

Western blot 检测到 CLDN1 在肿瘤细胞 TE-11 中主要分布于细胞核内, 而在正常食管上皮细胞 HEEC 中主要分布于细胞膜上, 其中抗 PARP、抗 β -tublin、抗 E-cadherin 分别标记核蛋白、细胞质蛋

白、细胞膜蛋白,检测蛋白抽提效果(图 3)。

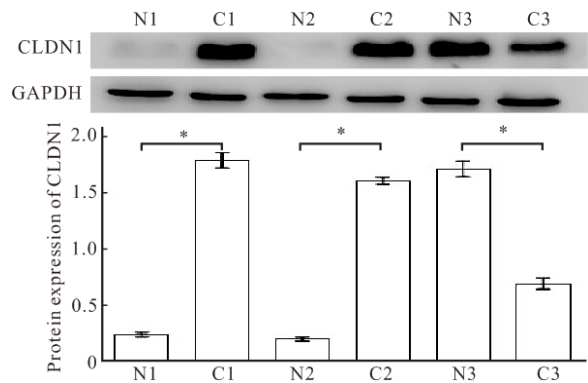


图 1 CLDN1 在不同分化程度食管癌组织中的表达情况

Fig 1 Expression of CLDN1 in ESCC tissues by differentiation

N: Adjacent normal tissue; C: ESCC tissue; N1, C1: High differentiation; N2, C2: Moderate differentiation; N3, C3: Low differentiation. * $P < 0.05$

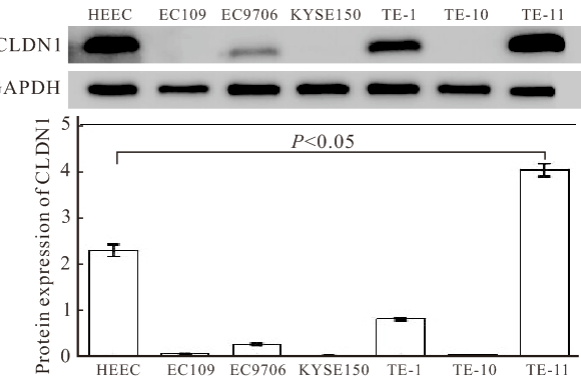


图 2 CLDN1 在食管癌细胞株中的表达情况

Fig 2 Expression of CLDN1 in esophagus cancer cell lines

* $P < 0.05$, vs. normal esophageal epithelial cell HEEC

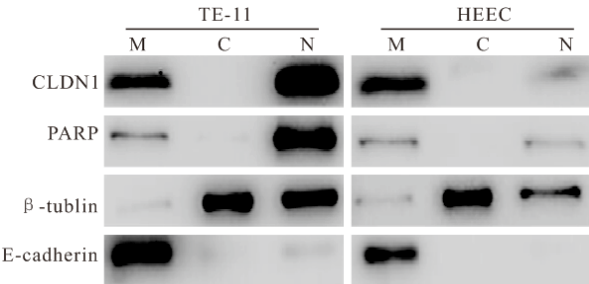


图 3 Western blot 检测 CLDN1 在食管癌 TE-11 细胞及正常食管上皮细胞 HEEC 内的分布

Fig 3 Intracellular distribution of CLDN1 in TE-11 and HEEC determined by Western blot

M: Membrane; C: Cytoplasm; N: Nucleus; PARP: Poly-ADP-ribose polymerase

流式细胞术结果显示,正常食管上皮细胞加入 APC 标记的抗-hCLDN1 后,其胞膜侧向散射光强度明显增加,表明 CLDN1 主要分布于细胞膜上;TE-11 加入 APC 标记的抗-hCLDN1 后侧向散射光强度增加不明显,表明与正常食管上皮细胞比较,TE-11 在细胞膜上的分布明显减少,与 Western blot 结果一致(图 4)。

2.3 稳定沉默 CLDN1 的 TE-11 细胞筛选鉴定

经过嘌呤霉素筛选后,我们得到稳定转染 GFP-PURO-shR-CLDN1 慢病毒的 TE11 细胞株,荧光显微镜分析显示,病毒转染效率达到 91%(shR-NC 组)及 87%(shR-CLDN1 组),Western blot 结果表明,shR-CLDN1 组表达水平只有对照组的 18%,明显降低($P < 0.05$),见图 5。

2.4 沉默 CLDN1 抑制 TE-11 细胞的增殖

CCK-8 实验结果显示,shR-CLDN1 组细胞 24 h、48 h、72 h 的 OD₄₅₀ 值低于 shR-NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明沉默 TE-11 细胞 CLDN1 的表达后,食管鳞癌细胞增殖能力下降,CLDN1 具有促进 TE-11 细胞增殖的能力(附表)。

附表 下调 CLDN1 表达对 TE-11 细胞增殖能力的影响

Table The proliferation of TE-11 cell after downregulating the expression of CLDN1

Group	OD ₄₅₀		
	24 h	48 h	72 h
shR-NC	0.56±0.07	1.08±0.08	1.50±0.19
shR-CLDN1	0.34±0.06*	0.65±0.07*	1.19±0.13*

* $P < 0.05$, vs. shR-NC group

2.5 沉默 CLDN1 抑制 TE-11 细胞侵袭及迁移能力

Transwell 实验迁移结果显示,沉默 CLDN1 在 TE-11 细胞中表达后,shR-CLDN1 组的穿膜细胞数(82.7 ± 2.0)低于 shR-NC 组(98.7 ± 3.3),差异有统计学意义($P < 0.05$)。在小室中加入 Matrigel 基质胶模拟肿瘤侵袭微环境后,shR-CLDN1 组细胞穿膜数(50.3 ± 1.3)低于 shR-NC 组(83.0 ± 2.5),差异有统计学意义($P < 0.05$),这一结果表明,CLDN1 具有促进 TE-11 细胞侵袭转移的生物学功能(图 6)。

2.6 激光共聚焦观察 CLDN1 对 TE-11 细胞骨架的影响

应用 Rhodamine phalloidin 对细胞骨架进行染色,通过激光共聚焦显微镜观察 CLDN1 对 TE-11 细胞骨架的影响。我们发现 shR-CLDN1 组骨架蛋

白荧光强度明显明显低于 shR-NC 组,细胞表面肌

丝明显减少(图 7)。

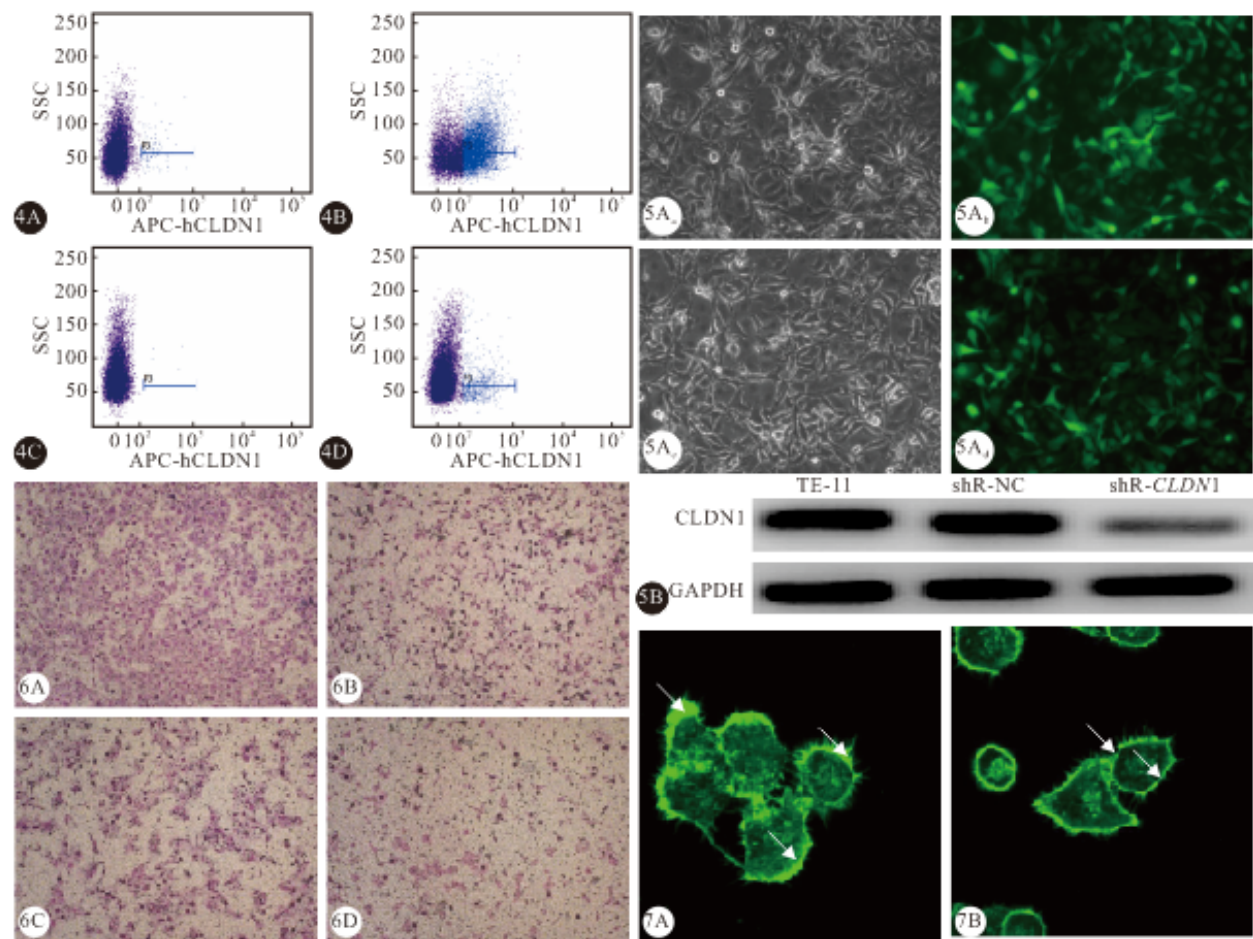


图 4 流式细胞术检测 CLDN1 在食管癌 TE-11 细胞及正常食管上皮细胞 HEEC 内的分布 (A, ×200), Western blot 检测干扰效果 (B) 图 6 Transwell 检测沉默 CLDN1 对 TE-11 细胞迁移及侵袭能力的影响。×200 图 7 激光共聚焦显微镜观察沉默 CLDN1 后对细胞骨架蛋白的影响(箭头代表细胞表面肌丝)。×400

Fig 4 Intracellular distribution of CLDN1 in TE-11 and HEEC determined by flow cytometry (A, ×200) and Western blot (B) Fig 5 Lentivirus transfection effect determined by immunofluorescence microscopy (A, ×200) and Western blot (B) Fig 6 Migration (A, B) and invasion (C, D) of TE-11 after downregulating the expression of CLDN1 detected by Transwell. ×200 Fig 7 Variation of cytoskeleton after downregulating the expression of CLDN1 (arrows: Myoneme of cells) under laser confocal microscopy. ×400

4A: HEEC control group; 4B: HEEC treated with Anti-hCLDN1; 4C: TE-11 control group; 4D: TE-11 treated with Anti-hCLDN1; 5A_a, 5A_c: Light scope; 5A_b, 5A_d: GFP; 5A_a, 5A_b, 6A, 6C, 7A: shR-NC; 5A_c, 5A_d, 6B, 6D, 7B: shR-CLDN1

3 讨论

食管鳞癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,调查显示食管鳞癌患者的术后生存率依然低下,5年生存率尚不到 30%。肿瘤复发、转移是造成食管鳞癌患者预后不佳的最主要原因^[11]。CLDN1 是细胞紧密连接家族蛋白成员之一,参与构成细胞紧密连接,在正常情况下以 4 次跨膜的形式分布在细胞膜上,对上皮屏障和细胞极性的维持发挥重要功能^[12-13]。研究显示,CLDN1 与多种肿瘤的发生发展关系密切。CLDN1 可以诱导肝癌细胞的上皮间

质转化^[6,14],结肠癌中 CLDN1 表达的增加与结肠癌转移相关^[15-16],基底细胞型乳腺癌干扰 CLDN1 表达后会抑制细胞侵袭迁移的能力^[17]。CLDN1 的表达具有组织特异性,如 CLDN1 在宫颈癌、结肠癌、胃癌中高表达,在肝癌及侵袭性乳腺癌中低表达^[3],甚至在同一肿瘤的不同分子亚型中表达亦不相同^[18-19]。有文献报道,食管鳞癌组织中 CLDN1 表达升高^[20-21]。我们发现食管鳞癌组织及癌旁组织 CLDN1 表达并无明显差异,但高、中分化的食管鳞癌组织 CLDN1 的表达高于低分化组织。已有研究显示,紧密连接蛋白可以进入细胞核内促进肿瘤

的发生发展,如 β -catenin、ZO-1、ZO-2^[7,22]。我们发现食管鳞癌细胞中 CLDN1 主要分布于细胞核,而在正常上皮细胞中则多位于细胞膜,提示 CLDN1 分布异常可能与食管鳞癌发生发展有关。

Claudins 表达的异常伴随着细胞紧密连接完整性的破坏,导致上皮屏障结构的破坏及细胞极性的消失,是肿瘤细胞增殖、侵袭迁移的机制之一。例如,有研究显示,沉默乳腺癌 MDA-MB-231 细胞及 MCF7 细胞 CLDN1 的表达可抑制肿瘤细胞的增殖及侵袭迁移^[18],在肺腺癌 CL1-5 细胞中过表达 CLDN1 会降低细胞侵袭迁移的能力^[9]。在本研究中,我们筛选到了高表达 CLDN1 的食管鳞癌细胞株 TE-11,并且通过沉默 CLDN1 的表达,发现沉默 CLDN1 可抑制食管鳞癌细胞 TE-11 的增殖和侵袭迁移的能力。激光共聚焦显微镜结果表明,干扰 CLDN1 的表达后,TE-11 细胞的细胞骨架发生变化,肌丝蛋白的数量减少,荧光强度降低,提示食管鳞癌细胞 TE-11 的转移能力减弱。上述结果表明 CLDN1 对食管鳞癌细胞的增殖、侵袭迁移及运动有着促进作用。此外,我们发现 CLDN1 具有促癌功能,但在低分化食管鳞癌组织中 CLDN1 表达却下调,是否因为 CLDN1 随着分化程度的降低更多地分布于细胞核内,需要进一步的研究证实。其次肿瘤的发生发展是多因素、多步骤的过程,低分化食管鳞癌的侵袭转移可能存在其他重要基因和分子机制,而 CLDN1 可能主要在食管癌早期发挥作用。

综上所述,我们认为,CLDN1 在高分化及中分化食管鳞癌中表达上调,在低分化食管鳞癌中表达明显下降,且其主要分布于肿瘤细胞核中,能够促进食管鳞癌细胞增殖、侵袭迁移,可能是食管鳞癌潜在的治疗靶点。本实验组通过干扰 CLDN1 的表达来检测其在食管癌中的生物学功能,尚需过表达 CLDN1 进一步验证其在食管癌中的作用。由于本实验组检测的样本量有限,尤其是低分化食管鳞癌在临床中相对少见,因此需要更多的样本来验证 CLDN1 与食管鳞癌分化程度之间的关系。其次,CLDN1 进入细胞核内的具体作用及其机制目前尚不明确,需要进一步的研究探索。

参 考 文 献

- [1] SAWADA N. Tight junction-related human diseases. *Pathol Int*,2013,63(1):1-12.
- [2] SINGH AB, SHARMA A, DHAWAN P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*, 2010, 2010: 541957 [2016-01-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2910494/>. doi: 10.1155/2010/541957.
- [3] KWON M. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci*,2013,14(9):18148-18180.
- [4] OUBAN A, AHMED AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol*,2010,25(1):83-90.
- [5] AKASAKA H, SATO F, MOROHASHI S, *et al*. Anti-apoptotic effect of CLDN1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells. *BMC Cancer*, 2010, 10: 548 [2016-03-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2958956/>. doi: 10.1186/1471-2407-10-548.
- [6] SUH Y, YOON C, KIM R, *et al*. CLDN1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene*, 2013, 32(41):4873-4882.
- [7] DHAWAN P, SINGH AB, DEANE NG, *et al*. CLDN1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest*,2005,115(7):1765-1776.
- [8] CHANG T, ITO K, KO T, *et al*. CLDN1 has tumor suppressive activity and is a direct target of RUNX3 in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*,2010,138(1):255-65. e1-e3 [2016-05-22]. [http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(09\)01459-0/pdf](http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(09)01459-0/pdf). doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.044.
- [9] CHAO YC, PAN SH, YANG SC, *et al*. CLDN1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*,2009,179(2):123-133.
- [10] FORTEIR AM, ASSELIN E, CADRIN M. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem*,2013,288(16):11555-11571.
- [11] 乔友林. 食管癌流行病学研究的重要里程碑. *中国肿瘤临床*,2016(12):500-501.
- [12] TSUKITA S, YAMAZAKI Y, KATSUNO T, *et al*. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*,2008,27(55):6930-6938.
- [13] FORSTER C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol*,2008,130(1):55-70.
- [14] YOON C, KIM M, PARK M, *et al*. CLDN1 acts through c-Abl-protein kinase Cdelta (PKCdelta) signaling and has a causal role in the acquisition of invasive capacity in human liver cells. *J Biol Chem*,2010,285(1):226-233.
- [15] KINUGASU T, AKAGI Y, OGIH T, *et al*. Increased CLDN1 protein expression in hepatic metastatic lesions of colorectal cancer. *Anticancer Res*,2012,32(6):2309-2314.
- [16] SHIOU S, SINGH A, MOORTHY K, *et al*. Smad4 regulates CLDN1 expression in a transforming growth factor-beta-independent manner in colon cancer cells. *Cancer Res*, 2007,67(4):1571-1579.
- [17] BLANCHARD A, MA X, DUEXK K, *et al*. Claudin 1 expression in basal-like breast cancer is related to patient age.

- BMC Cancer, 2013, 13: 268 [2016-03-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674926/>. doi: 10.1186/1471-2407-13-268.
- [18] ZHAO X, ZOU Y, GU Q, *et al.* Lentiviral vector mediated CLDN1 silencing inhibits epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Viruses*, 2015, 7(6): 2965-2979.
- [19] MYAL Y, LEYGUE E, BLANCHARD A. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 956897 [2016-03-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871677/>. doi: 10.1155/2010/956897.

- [20] 郭琦, 唐美爱, 李印, 等. CLDN1 和 Claudin-3 在食管鳞癌中的表达. *中国肿瘤临床*, 2009, 36(6): 340-344.
- [21] GYORFFY H, HOLCZBAUER A, NAGY P, *et al.* Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Virchows Arch*, 2005, 447(6): 961-968.
- [22] IKARI A, WATANABE R, SATO T, *et al.* Nuclear distribution of claudin-2 increases cell proliferation in human lung adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(9): 2079-2088.

(2017-05-12 收稿, 2017-10-11 修回)

编辑 吕熙

· 个案报告 ·

点阵激光治疗纤维毛囊瘤 1 例报告

王婷婷, 李咏[△]

四川大学华西医院 皮肤性病科 (成都 610041)

【关键词】 纤维毛囊瘤 CO₂ 点阵激光 治疗

患者, 女, 36 岁, 因面部丘疹 20 年就诊。20 年前患者双侧鼻翼出现肤色丘疹, 随年龄增长, 皮疹逐渐增多、增大, 自觉瘙痒。家族史: 患者父母及亲缘中无近亲婚配史, 婚后育一子一女, 子女无类似疾病。家系调查 3 代 16 人, 发现患者弟弟 24 岁, 自 10 岁始面部出现类似皮疹, 但症状较患者轻, 且不同意行皮肤组织病理学检查, 故未明确诊断。患者体格检查: 发育正常, 各系统检查未见异常。皮肤科检查: 双侧鼻

翼、颊部及眶周多发肤色至淡红色、表面光滑、坚实的毛囊性丘疹, 直径 0.1~0.6 cm, 部分融合。皮肤组织病理 HE 染色(图 1)示: 表皮大致正常, 真皮内见多个毛囊, 漏斗部毛囊上皮条索状向外突出或延伸, 毛囊周围以增生的胶原纤维。结合临床表现诊断: 纤维毛囊瘤。

治疗方法: 治疗前外用 5% 复方利多卡因乳膏 1 h, 采用 CO₂ 点阵激光治疗。首先选择超脉冲模式, 从上至下依次气化, 直至丘疹消失; 相对小且密集成片的皮损采用点阵模式治疗, 达到消除残留皮损的效果。治疗需多次, 间隔时间为 1 月。患者治疗 4 次后, 皮损消退 70%~80%, 随诊半年无复发, 见图 2~图 3。患者弟弟仅治疗 2 次, 皮损消退效果尚不明显。

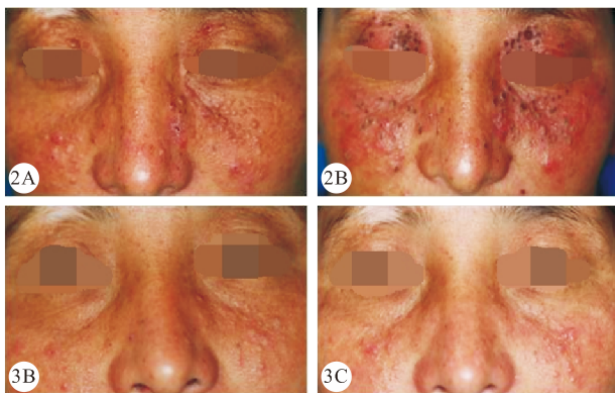
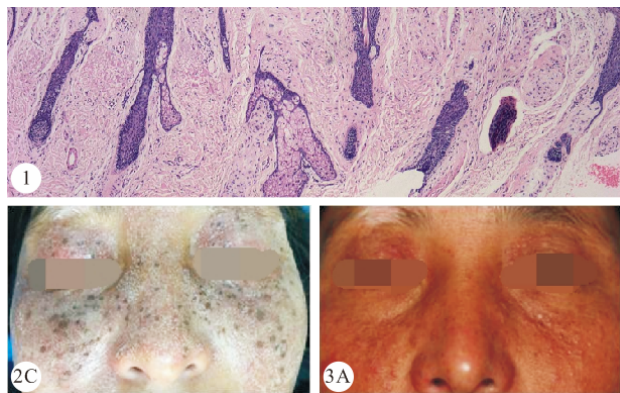


图 1 患者皮损 HE 染色。×100

图 2 患者面部纤维毛囊瘤治疗前和治疗后皮肤即刻反应

图 3 患者面部纤维毛囊瘤治疗后皮损改善

2A: 治疗前; 2B: 脉冲模式治疗后即刻; 2C: 点阵模式治疗后即刻; 3A: 第一次治疗后; 3B: 第二次治疗后; 3C: 第三次治疗后

讨论 纤维毛囊瘤是一种良性错构瘤, 21~30 岁好发, 常见于头面部和颈部, 表现为黄白色或白色圆顶状丘疹, 直径 2~4 mm, 有些丘疹有脐凹, 其中有角栓或毛发, 毛囊周围以增生的胶原纤维。本病目前无明确有效的治疗方法, 国内外采用普通激光、电干燥法烧灼等治疗面部散发丘疹, 效果均不理想。对于有美容需求的患者, 治疗中采用 CO₂ 点

阵激光的超脉冲模式, 将增生的纤维组织气化; 采用微米级的点阵模式分批分次治疗密集皮损。在点阵模式下, 光斑之间有一定间隙, 治疗时只有部分皮肤碳化, 未碳化区域的正常皮肤作为热缓冲区域, 有利于损伤后快速修复, 降低术后色素沉着及瘢痕等风险。

(2017-04-02 收稿, 2017-07-21 修回)

编辑 吕熙