

结肠癌患者癌组织中 CD44v6 和Ⅳ型胶原的表达及血清中 HA 和Ⅳ型胶原的定量检测

徐 钊, 张 霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭

徐钊, 张霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
项目负责人: 徐钊, 400038, 重庆市高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心.
电话: 023-68754678 传真: 023-68754124
收稿日期: 2004-06-21 接受日期: 2004-10-07

Expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues, concentrations of serum hyaluronic acid and type IV collagen in patients with colorectal carcinoma

Zhao Xu, Xia Zhang, Dian-Chun Fang, Hua-Yuan Jin, Yuan-Hui Luo, Xiao-Chu Yian, Dong-Xu Wang

Zhao Xu, Xia Zhang, Dian-Chun Fang, Hua-Yuan Jin, Yuan-Hui Luo, Xiao-Chu Yian, Dong-Xu Wang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Dr. Zhao Xu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Received: 2004-06-21 Accepted: 2004-10-07

Abstract

AIM: To explore the role of CD44v6, type IV collagen expression in tissues and concentration of serum hyaluronic acid (HA) and type IV collagen in predication of prognosis of patients with colorectal carcinoma.

METHODS: Expression of CD44v6 and type IV collagen in the carcinoma tissues ($n=60$) and normal tissues ($n=10$) were detected by immunohistochemistry. Meanwhile, concentrations of HA and type IV collagen in serum were tested with radioimmunoassay.

RESULTS: Positive rate of CD44v6 in colorectal tissues was 75%, which was significantly higher than that in adjacent or normal tissues. Expression of CD44v6 in patients with lymph node metastasis was significantly higher than that without metastasis; expression of CD44v6 in Duke C or Duke D stage was significantly higher than that in Duke A or Duke B stage (62.5%, 66.7% vs 30.3%, 36.4% respectively, $P<0.01$). Expression of type IV collagen in poor or moderate differentiation tissues was significantly lower than that in well-differentiation ones (29.0%, 18.1% vs 61.1%; $P<0.01$). Expression of type IV collagen in Duke C, Duke D stage or in tissues with lymph node metastasis was significantly lower than that in Duke A, Duke B stage or that in tissues without lymph node metastasis (31.1%,

16.6%, 20.8% vs 70.0%; 54.5%, 58.3%, respectively; $P<0.01$). Concentrations of serum HA and type IV collagen in patients with colorectal cancer were significantly higher than those in normal group (200 ± 160 , 125 ± 42 $\mu\text{g/L}$ vs 61 ± 14 , 60 ± 15 $\mu\text{g/L}$, $P<0.01$) and they related to lymph node metastasis and Dukes staging. With the increased expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues of patients with colorectal cancer, the concentration of serum HA increased, whereas the concentration of serum type IV collagen decreased.

CONCLUSION: Expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues and concentrations of serum HA and type IV collagen are useful parameters in predication of prognosis of patients with colorectal carcinoma.

Xu Z, Zhang X, Fang DC, Jin HY, Luo YH, Yian XC, Wang DX. Expression of CD44v6 and type IV collagen in tissues, concentrations of serum hyaluronic acid and type IV collagen in patients with colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(10):2312-2315

摘要

目的: 探讨结肠癌组织中CD44v6和Ⅳ型胶原的表达以及血清中透明质酸(HA)和Ⅳ型胶原的浓度在结肠癌预后判断中的作用。

方法: 采用免疫组织化学技术, 检测60例结肠癌组织以及10名正常组织中CD44v6和Ⅳ型胶原的表达, 同时采用放射免疫技术检测上述60例结肠癌及10名正常人血清中透明质酸(HA)和Ⅳ型胶原的含量。

结果: 结肠癌组织中CD44v6阳性率为75%, 明显高于癌旁对照及正常结肠组织, 有淋巴结转移组的结肠癌组织中CD44v6的表达明显高于无转移组(70.9% vs 33.3%, $P<0.01$), Duke A和Duke B期明显低于Duke C和Duke D期(30.3%, 36.4% vs 62.5%, 66.7%, $P<0.01$); 而Ⅳ型胶原在结肠癌组织中均有不同程度的减少, 其中高分化组结肠癌组织中明显高于中、低分化组(61.1% vs 29.0%, 18.1%, $P<0.01$), 有淋巴结转移组明显低于无淋巴结转移组(20.8% vs 58.3%, $P<0.01$), Dukes A和Duke B期明显高于Duke C和Duke D期(70.0%, 54.5% vs 31.3%, 16.6%, $P<0.01$), 结肠癌患者血清中HA和Ⅳ型胶原含量明显高于正常对照组(200 ± 160 $\mu\text{g/L}$, 125 ± 42 $\mu\text{g/L}$ vs 61 ± 14 $\mu\text{g/L}$, 60 ± 15 $\mu\text{g/L}$, $P<0.01$), 且与有无淋巴结转移和Dukes分期相关, 随着组织中CD44v6和Ⅳ型胶原表

达逐渐增加, 血清中 HA 亦逐渐增加, 而 IV 型胶原则逐渐减少。

结论: 组织中 CD44v6 和 IV 型胶原的表达及血清中 HA 和 IV 型胶原的含量对判断结肠癌患者的预后具有重要意义。

徐钊, 张霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭. 结肠癌患者癌组织中 CD44v6 和 IV 型胶原的表达及血清中 HA 和 IV 型胶原的定量检测. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2312-2315

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2312.asp>

0 引言

浸润和转移是恶性肿瘤患者死亡的主要原因之一, 他是一个复杂多步骤的主动过程, 包括肿瘤细胞脱离原发灶、局部浸润、进入宿主血液循环、出血管进入靶器官间质、在靶器官内增生等步骤. 其本质是肿瘤细胞与宿主细胞、肿瘤细胞与细胞外基质之间相互作用的过程. 基底膜成分的破坏及肿瘤细胞表面黏附分子表达异常是肿瘤浸润转移的两个重要环节. 我们采用免疫组织化学技术检测 60 例结肠癌患者 IV 型胶原及 CD44v6 的表达, 同时检测患者血清中 HA 和 IV 型胶原含量, 以探讨其对结肠癌浸润转移及预后判断的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌 60 例选自本院 1997-04/1998-01 行根治术的患者. 病例纳入标准: 均经手术病理证实, 无肝肾功能异常, 无内分泌疾病及其他部位恶性肿瘤, 无放化疗病史者. 其中男性 37 例, 女性 23 例, 年龄 22-76 岁 (平均 56.9 岁). 取少许手术切除的肿瘤组织常规 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 5 μ m. 其中 A 期 10 例, B 期 22 例, C 期 16 例, D 期 12 例; 有淋巴结转移 24 例, 无淋巴结转移 36 例. 另外 10 名正常大肠组织同时进行免疫组化染色。

1.2 方法 采用免疫组化 ABC 法. CD44V6 及 IV 型胶原单克隆抗体及 ABC 试剂盒购自中山生物技术公司, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 抗原经胰酶和/或微波修复后, 室温下操作: 切片脱蜡至水; 3 mL/L 过氧化氢阻断 10 min; 非免疫血清封闭 10 min; 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 二抗孵育 37 $^{\circ}$ C 30 min; 三抗 37 $^{\circ}$ C 30 min; DAB 显色, 镜下观察, 显出黄色颗粒后终止反应; 苏木素复染, 中性树胶封片. CD44v6 结果判定, 根据染色的程度和范围分为 4 级: 强阳性(+++): 阳性细胞占整个切片的 70% 以上; 阳性(++): 阳性细胞占整个切片的 30-70%; 弱阳性(+): 阳性细胞占整个切片的 10-30%; 阴性(-): 阳性细胞占整个切片的 10% 以下. IV 型胶原结果判定, 根据癌性腺体或癌巢周围基底膜完整程度分为 4 级: 完全缺如(-); 碎片状(+); 间断性(++); 变薄的连续状(+++). 于手术前清晨空腹抽取静脉血, 室温放置 2 h 后离心分离血清, -20 $^{\circ}$ C 保存备用. HA 及 IV 型胶原放免试剂盒购自上海海军医学研究所生物技术中心, 检测严格按试剂盒说明书进

行. 同批检测 10 名正常献血员血清中 HA 及 IV 型胶原的含量作为正常对照。

统计学处理 采用 χ^2 检测处理相关数据, $P < 0.05$ 为相差显著, $P < 0.01$ 为相差非常显著。

2 结果

2.1 大肠癌组织, CD44v6 表达阳性者 45/60 例, 占 75%, 而癌旁大肠黏膜及正常大肠组织未见有 CD44v6 表达(0/70), 两组相差非常显著($P < 0.01$, 图 1). CD44v6 的表达与淋巴结转移及 Dukes 分期明显相关, 有淋巴结转移组 CD44v6 的表达明显高于无淋巴结转移组($P < 0.01$); Dukes C、D 期 CD44v6 的表达明显高于 Dukes A、B 期($P < 0.01$, 表 1). 而 CD44v6 的表达与患者年龄、性别、分化程度和组织学类型无明显相关性($P > 0.05$). 正常结肠组织及癌旁组织 IV 型胶原表达是连续完整的, 呈现为清晰的棕黄色连续细线状分布或完整环绕腺体(图 2-3). 60 例结肠癌组织中 IV 型胶原的分布有不同程度减少, 其中 7 例为变薄的连续状(+++), 19 例为间断状(++), 21 例为碎片状(+), 13 例完全缺如(-).

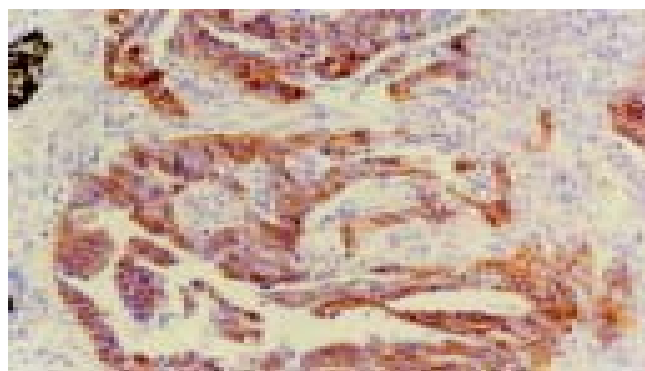


图 1 中分化结肠癌 CD44v6 强阳性表达, 细胞膜呈明显的棕黄色 ABC 法 $\times 200$.

表 1 大肠癌 CD44v6 表达与淋巴结转移及 Dukes 分期的关系

病理指标	n	CD44v6 的表达	
		-/+ (%)	++/+++ (%)
淋巴结转移 有	24	7 (29.1)	17 (70.9) ^b
无	36	24 (66.7)	12 (33.3)
Dukes 分期 A	10	7 (70.0)	3 (30.0)
B	22	14 (63.6)	8 (36.4)
C	16	6 (37.5)	10 (62.5) ^d
D	12	4 (33.3)	8 (66.7) ^d

^b $P < 0.01$ vs 无淋巴结转移; ^d $P < 0.01$ vs Dukes A, B.

低分化、有淋巴结转移及 Dukes C 和 D 期组 IV 型胶原表达以完全缺如及碎片状(-/+)为主, 明显高于高分化、无淋巴结转移及 Dukes A 和 B 期组($P < 0.01$, 表 2), IV 型胶原表达与肿瘤组织学类型无关($P > 0.05$).

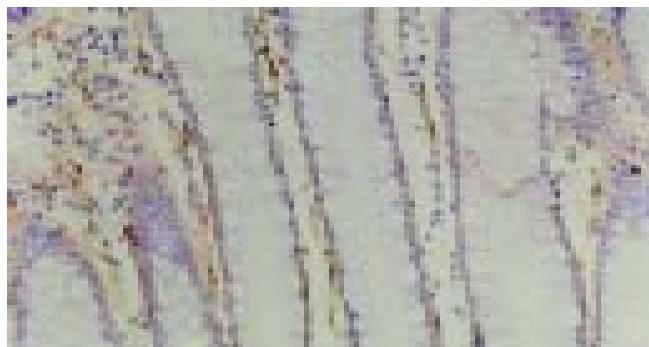


图2 正常结肠黏膜基底膜IV型胶原呈连续线条状ABC法×200.

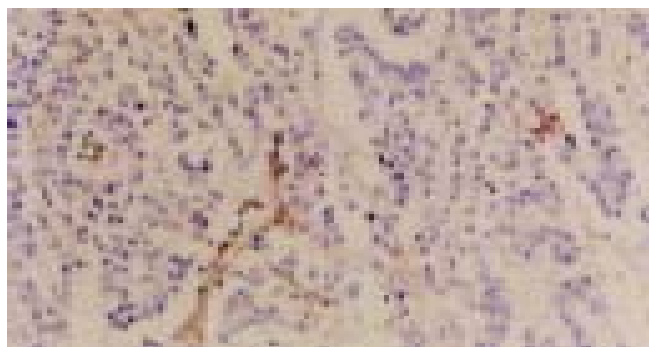


图3 结肠癌基底膜IV型胶原呈表达阳性,呈碎片状ABC法×200.

表2 IV型胶原表达与临床病理指标的关系

病理指标	n	IV型胶原的表达	
		-/+ (%)	++/+++ (%)
分化程度	高	18	7 (38.8)
	中	31	22 (70.9)
	低	11	9 (81.8)
淋巴结转移	有	24	19 (79.1)
	无	36	15 (41.6)
Dukes 分期	A	10	3 (30.0)
	B	22	10 (45.5)
	C	16	11 (68.8)
	D	12	10 (83.3)

^b $P<0.01$ vs 高分化组; ^d $P<0.01$ vs 有淋巴结转移组; ^f $P<0.01$ vs Dukes C, D 组.

2.2 血清中HA、IV型胶原含量正常人分别为 $62 \pm 14 \mu\text{g/L}$, $60 \pm 15 \mu\text{g/L}$, 结肠癌患者血清中HA、IV型胶原含量分别为 $203 \pm 160 \mu\text{g/L}$, $125 \pm 42 \mu\text{g/L}$, 二者相差非常显著($P<0.01$). 进一步分析表明, 肿瘤患者血清中HA和IV型胶原含量与肿瘤大小、分化程度无明显相关性, 而与有淋巴结转移明显相关, 且HA含量与Dukes分期亦明显相关($P<0.01$), IV型胶原含量Dukes C、D期略高于A、B期, 但无统计学意义($P>0.05$, 表3). 本组60例大肠癌随着组织中CD44v6表达增高, 血清中HA的含量亦呈上升趋势, CD44v6强阳性表达的患者, 血清中HA含量明显高于CD44v6阴性的患者

($P<0.01$, 表4). IV型胶原的表达愈少, 血清中IV型胶原含量愈高(表5).

表3 大肠癌患者血清HA与临床病理指标的关系

病理指标	n	HA(mean \pm SD)($\mu\text{g/L}$)	IV型胶原(mean \pm SD)($\mu\text{g/L}$)
大小(cm) ≥ 5	24	247.5 ± 22.6	120.5 ± 52.2
	<5	169.4 ± 153.2	127.8 ± 42.3
分化程度	高分化	152.7 ± 116.2	115.9 ± 44.0
	中分化	216.3 ± 214.7	126.0 ± 42.8
	低分化	246.1 ± 214.6	135.1 ± 61.0
淋巴结转移	有	122.4 ± 127.7^b	109.0 ± 35.8^b
	无	323.0 ± 209.9	148.1 ± 51.6
Dukes 分期	A	92.6 ± 24.2	97.0 ± 25.2
	B	131.8 ± 157.1	115.5 ± 41.2
	C	265.6 ± 175.4^d	139.1 ± 40.4
	D	340.5 ± 240.6^d	145.2 ± 63.3

^b $P<0.01$ vs 无淋巴结转移; ^d $P<0.01$ vs Dukes A, B 期.

表4 大肠癌患者组织中CD44v6含量与血清中HA含量的关系(mean \pm SD, $\mu\text{g/L}$)

组织CD44v6	n	血清HA含量
+++	13	324 ± 229^b
++	16	203 ± 199
+	16	186 ± 196
-	15	117 ± 49

^b $P<0.01$ vs +, - 组.

表5 大肠癌患者组织中IV型胶原表达与血清含量的关系(mean \pm SD, $\mu\text{g/L}$)

组织IV型胶原	n	血清IV型胶原含量
+++	7	100 ± 36^b
++	19	104 ± 33^a
+	21	129 ± 45
-	13	152 ± 43

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs - 组.

3 讨论

IV型胶原是正常基底膜的主要组成成分之一, 其分布变化与各种癌肿转移潜能密切相关^[1-2]. Havenith *et al*^[3]报道IV型胶原在结肠癌中的表达与Dukes分期呈负相关, 有转移的结肠癌组织中IV胶原的表达亦明显减少. Offerhaus *et al*^[4]报道临床分期越晚的结肠癌患者其癌组织中IV型胶原的含量亦越少, 组织中IV型胶原的分布与其预后指标一致. 我们采用免疫组化法检测了10例正常结肠及60例结肠癌组织中IV型胶原的表达, 结果表明, 正常结肠组织中IV型胶原呈连续完整性, 而癌组

组织中 IV 型胶原分布有不同程度的减少, 进一步研究表明癌组织低分化、有淋巴结转移、Dukes C、D 期结肠癌患者, IV 型胶原表达以完全缺如及碎片状为主, 而高分化、无淋巴结转移、Dukes A、B 期结肠癌患者, IV 型胶原表达以间断性或连续变薄为主. 与组织中 IV 型胶原变化相一致, 结肠癌患者血清中 IV 型胶原的含量明显增高, 有淋巴结转移的肿瘤患者血清中 IV 型胶原含量明显高于无转移患者, 进一步研究发现, 随着肿瘤组织中 IV 型胶原表达逐渐减少, 血清中 IV 型胶原含量明显增加, 提示组织中 IV 型胶原表达的增加与血清中 IV 型胶原含量的减少可作为评价结肠癌患者预后良好指标.

CD44 是一种跨膜糖蛋白, 属细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAM)家族. 作为细胞黏附分子的一种, 参与了细胞与细胞之间、细胞与基质之间的特异性黏附, 人类 CD44 基因定位于 11 号染色体短臂上, CD44 基因的外显子按剪接方式的不同分为标准(CD44s)及变异型(CD44v), 而变异型按外显子拼接类型不同又分为许多亚型^[5]. 近年来的研究表明, CD44v 与许多肿瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关^[6-13]. CD44v6 是 CD44 的一个拼接变异体(splice variants), 主要出现在机体的病理过程, 特别是肿瘤的发生发展过程中, CD44v6 的过量表达与结肠癌、胃癌、食管癌及恶性黑色素瘤等许多肿瘤的生长、浸润、转移及预后密切相关, 下调 CD44v6 的表达可以明显抑制结肠癌细胞的肝转移能力^[10]. 谷化平 *et al*^[14] 检测了 90 例大肠癌, 发现 CD44v6 的 mRNA 阳性表达分别为 62 例(68.9%), CD44v6 的 mRNA 高表达与大肠癌 Duke's 分期、浆膜浸润、淋巴结转移、肝脏转移均呈正相关. 陈冰 *et al*^[15] 采用免疫组织化学法检测 87 例结直肠癌中的 CD44v6 表达. 发现结直肠癌组织中 CD44v6 的阳性表达率为 58.6%, 结直肠癌中 CD44v6 的表达与肿瘤的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和 Dukes 分期密切相关($P < 0.05$), 认为检测结直肠癌组织中 CD44v6 的表达可反映肿瘤的生物行为. 我们采用免疫组化方法, 发现 CD44v6 与结肠癌淋巴结转移密切相关, 有淋巴结转移者 CD44v6 表达明显强于无淋巴结转移者, 并且发现 CD44v6 表达与结肠癌的 Dukes 分期明显相关, Dukes C、D 期 CD44v6 表达明显强于 Dukes A 期和 B 期, 与国外报道基本一致. 我们未发现 CD44v6 的表达与肿瘤分化、类型及大小相关.

透明质酸(HA)作为 CD44 的配体, 在肿瘤转移中亦具有重要的作用^[16]. 国内许洪卫 *et al*^[17] 的研究表明在结直肠癌患者中, Dukes C 期和 / 或有淋巴结转移的患者, 其血清 HA 水平与患者的 Dukes 分期及有无淋巴结转移密切相关. 进一步研究发现随着 CD44v6 表达的明显增

加, 患者血清中 HA 的含量亦明显增加. 提示血清中 HA 的水平可以反应其组织中 CD44 受体的水平.

总之, 结肠癌组织中 CD44v6 和 IV 型胶原表达及血清中 HA 和 IV 型胶原的含量可作为评价结肠癌患者预后的良好指标.

4 参考文献

- Galbavy S, Lukac L, Porubsky J, Cerna M, Labuda M, Kmet'ova J, Papincak J, Durdik S, Jakubovsky J. Collagen type IV in epithelial tumours of colon. *Acta Histochem* 2002;104:331-334
- Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Odze RD. Utility of MMP-1, P53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:206-215
- Havenith MG, Arends JW, Simon R, Volovices A, Wiggers T, Bosman FT. Type IV collagen immunoreactivity in clorectal cancer, prognostic value of basement membrane depositon. *Cancer* 1988;62:2207-2211
- Offerhaus GJ, Giardiello FM, Bruijn JA, Stijnen T, Molyvas EN, Fleuren GJ. The value of immunohistochemistry for collagen IV expression in colorectal carcinomas. *Cancer* 1991; 67:99-105
- 徐钊, 范维珂. CD44 与消化道肿瘤转移和预后评估的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册 1998;19:111-113
- Lewy-Trenda I, Omulecka A, Janczukowicz J, Papierz W. CD44 expression in human meningiomas: an immunohistochemical analysis. *Pol J Pathol* 2004;55:33-37
- Balaram P, Alex S, Panikkar B, Rajalekshmi TN. Adhesion-related proteins E-cadherin, P-cadherin, CD44, and CD44v6, and antimetastatic protein nm23H1 in complete hydatidiform moles in relation to invasion potential. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:532-539
- 蔡崎, 陆洪芳, 孙孟红, 杜祥, 范月珍, 施达仁. 结直肠癌组织中 CD44v3, v6 蛋白的表达意义. 世界华消化杂志 2000;8:1255-1258
- Zhang JC, Wang ZR, Cheng YJ, Yang DZ, Shi JS, Liang AL, Liu NN, Wang XM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and CD44 variant exon 6 in primary tumors and corresponding lymph node metastases of colorectal carcinoma with Dukes stage C or D. *World J Gastroenterol* 2003;9:1482-1486
- Barshishat M, Levi I, Benharroch D, Schwartz B. Butyrate down-regulates CD44 transcription and liver colonisation in a highly metastatic human colon carcinoma cell line. *Br J Cancer* 2002;87:1314-1320
- Rall CJ, Rustgi AK. CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995;55: 1831-1835
- Dong WG, Sun XM, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2596-2600
- 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍. 直肠癌组织 CD44v6, DNA 含量的联合检测及临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11:1382-1384
- 谷化平, 倪灿荣, 詹榕洲. 大肠癌 CD44s, CD44v6 和 nm23H1 的 mRNA 表达与转移及预后的相关性. 世界华人消化杂志 2000; 8:887-891
- 陈冰, 黄文斌. CD44v6 在结直肠癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2002;10:471-472
- Vizoso FJ, del Casar JM, Corte MD, Garcia I, Corte MG, Alvarez A, Garcia-Muniz L. Significance of cytosolic hyaluronan levels in gastric cancer. *Eur J Surg Onco* 2004;30:318-324
- 许洪卫, 王元和, 高瀚. 结、直肠癌侵袭性和根治手术对血清透明质酸浓度的影响. 解放军医学杂志 1996;21:131-132